

T.C.
ÇANAKKALE ONSEKİZ MART ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ GENETİK ANABİLİM DALI



PARKİNSON GENETİK ETİYOGENEZİNDE YENİ NESİL
DİZİLEME(NGS) YÖNTEMİ İLE SAPTANAN VARYANTLARIN
İN-SİLİKO ANALİZİ

UZMANLIK TEZİ

Dr. Ahmet KABLAN

TEZ DANIŞMANI

Prof. Dr. Öztürk ÖZDEMİR

Çanakkale/2021

T.C.
ÇANAKKALE ONSEKİZ MART ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ GENETİK ANABİLİM DALI

PARKİNSON GENETİK ETİYOGENEZİNDE YENİ NESİL
DİZİLEME(NGS) YÖNTEMİ İLE SAPTANAN VARYANTLARIN
İN-SİLİKO ANALİZİ

UZMANLIK TEZİ

Dr. Ahmet KABLAN

TEZ DANIŞMANI

Prof. Dr. Öztürk ÖZDEMİR

Çanakkale/2021

Teşekkür

Bu tez çalışmasında olduğu gibi meslek ve eğitim hayatımın önemli aşamalarında bana yol gösteren, manevi desteğini, tecrübesini, inancını eksik etmeyen ve en önemlisi ikinci bir şansa beni uygun gören sevgili hocalarım Prof.Dr. Öztürk ÖZDEMİR ve Prof.Dr. Fatma SILAN'a sonsuz teşekkürlerimi ifade etmeyi borç bilirim. Aynı zamanda çalışmada emeği geçenler başta olmak üzere bu güzel çalışma ortamında birlikte vakit geçirdiğim, kendilerinden her gün bir şeyler öğrendiğim tüm mesai arkadaşlarıma da teşekkür ederim.



PARKİNSON GENETİK ETİYOGENEZİNDE YENİ NESİL DİZİLEME(NGS) YÖNTEMİ İLE SAPTANAN VARYANTLARIN İN-SİLİKO ANALİZİ

ÖZET

GİRİŞ ve AMAÇ: Parkinson hastalığı sıklıkla ileri yaş popülasyonda görülen substansiya nigra bölgesindeki dopaminerjik nöronların kaybı ile karakterize bir hareket bozukluğu hastalığıdır. Hastalığın %5-15'i genetik yatkınlıkla ilişkilendirilmiştir. Bu çalışmada, moleküler etiyolojik sebeplerin önemli ölçüde heterojenlik gösterdiği parkinsonizmde, Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Tıbbi Genetik Tanı ve Tedavi laboratuvarında yeni nesil DNA dizileme yöntemi ile (NGS) elde edilen çoklu test ve klinik verilerin retrospektif olarak değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM: Bu araştırmada elde edilen veriler, 2018-2019 yılları içerisinde merkezimize başvuran toplam 43 olguya ait aile öyküleri, klinik bilgileri yanısıra güncel literatür tarafından Parkinson hastalığı ile ilişkilendirilmiş toplam 18 gen içeren gen paneli kullanılarak elde edilen laboratuvar verileri retrospektif olarak değerlendirilmiştir. Parkinson hastalığı genetik etiyolojisi açısından erişilebilir güncel literatür değerlendirildiğinde ülkemizde yapılan en geniş gen panelinin kullanıldığı genetik etiyoloji çalışmasıdır.

Araştırmada, çalışmaya dahil edilen olgulara ait; anamnezler gözden geçirildi, genetik verileri ve aile ağaçları elde edildi, değerlendirildi. Elde edilen genetik varyantlar doğrultusunda olgulara ait fenotip – genotip ilişkisi güncel literatür ile korele edildi.

BULGULAR: Güncel veritabanları değerlendirmesine tabi tutulan verilerin analizi sonucunda her olguda en az bir olmak üzere toplam 14 vakada klinikle uyumlu olabilecek genetik varyant saptandı. Değerlendirilen 29 olguda klinik olarak anlamlı olabilecek genetik varyant saptanmadı. Parkinson patogenezinde primer olarak bildirilen toplam 3 spesifik varyant tanımlanmıştır. Saptanan bu spesifik varyantların (EIF4G1 c.3142A>G (p.Ser1048Gly), ATP13A2 c.2859G>A (p.Thr953=), LRRK2 c.4915delA(p.Arg1639GlyfsTer15)) Parkinsonizm genetik etiyogenezinde önemli ölçüde uyumluluk gösterdikleri değerlendirilmiştir. Olgularımıza ait daha önce bildirilmemiş iki yeni varyant saptanmıştır.

TARTIŞMA ve SONUÇ: Araştırma sonunda NGS analizlerinde kullanılan veri tabanlarının güncellenmesi ve konu ile ilgili yeni üretilmiş akademik verilerle desteklenmesinin Parkinson hastalarının doğru ve etkin tanı almalarında önemli ölçüde katkı verici olduğu anlaşılmıştır. Bu duruma örnek olarak, aynı genetik verilerin farklı zamanlarda revize edilmiş veri tabanları ile değerlendirildiklerinde farklı klinik önemde değerlendirildiği açıklıkla görülecektir. Sonuç olarak, moleküler etiyolojik tetikleyicilerin önemli ölçüde heterojenlik gösterdiği Parkinsonizmde doğru ve etkin tanı için NGS yönteminin sağladığı faydanın yanı sıra, elde edilen verilerin Tıbbi Genetik alanında tanı amaçlı kullanılan ileri test ve yöntemlerle korele edilmesi ve seçilmiş olgularda hasta ve varyantların takibi ve belirli aralıklarla tekrardan değerlendirilmesi, bu doğrultuda genetik danışma planlanmasının yararlı olacağı önerilmiştir. Olguların, daha geniş kohortların dahil edildiği, kapsamlı paneller ile çalışılmasının ve bu çalışılan panellerin yine sürekli güncellenen veri tabanları ile değerlendirilmesinin hayati öneme sahip olduğu anlaşılmıştır.

Anahtar kelimeler: Parkinsonizm; yaygın varyant analizi; etiyogenez; yeni nesil dizileme (NGS); Çanakkale popülasyonu

IN-SILICO ANALYSIS OF VARIANTS THAT DETECTED BY THE NEW GENERATION SEQUENCING (NGS) METHOD IN PARKINSON'S GENETIC ETIOGENESIS

ABSTRACT

INTRODUCTION and AIM: Parkinson's disease is a movement disorder characterized by the loss of dopaminergic neurons in the substantia nigra region, which is frequently seen in the elderly population. 5-15% of the disease has been associated with genetic predisposition. In this study, it has been aimed to retrospectively evaluate the clinical data and multiple tests data obtained by the new generation DNA sequencing method (NGS) at the Medical Genetic Diagnosis and Therapy Laboratory of Çanakkale Onsekiz Mart University in parkinsonism, where molecular etiological causes show significant heterogeneity.

MATERIALS and METHODS: In this study, family histories and clinical information of 43 cases, as well as the laboratory data obtained by using the gene panel containing a total of 18 genes associated with Parkinson's disease by the current literature were evaluated retrospectively. This has been largest gene panel reported for Parkinson's disease genetic etiology study in our country, considering the current databases available in terms of genetic etiology.

In the research, anamnesis were reviewed, genetic data and family pedigrees were obtained and evaluated for the cases included in this study. In line with the genetic variants obtained, the phenotype-genotype relationship of the cases was correlated with the current literature.

RESULTS: As a result of the analysis of the data subjected to the evaluation of current databases, a genetic variant that may be compatible with the clinic was determined in 14 cases, with at least one in each case. No clinically significant genetic variant was detected in the 29 cases.

There was two previously unreported novel variants, and total of three specific variants that were reported as primary in Parkinson's pathogenesis were identified. These specific variants (EIF4G1 c.3142A> G (p.Ser1048Gly), ATP13A2 c.2859G> A (p.Thr953 =), LRRK2 c.4915delA (p.Arg1639GlyfsTer15) were considered to be significantly compatible in Parkinsonism genetic etiology.

DISCUSSION and CONCLUSION: When the data evaluated afterward, it has been stated that updating the databases used in NGS analyzes and supporting them with newly produced academic data on the subject significantly contributed to the correct and effective diagnosis of Parkinson's patients. As an example of this situation, it has clearly seen that the same genetic data are evaluated with different clinical significance when evaluated with databases revised at different times. In conclusion, we have suggested that in addition to the benefit provided by NGS method for accurate and effective diagnosis in Parkinsonism, where molecular etiological triggers show significant heterogeneity, correlation of the obtained data with advanced tests and methods used for diagnosis in the field of Medical Genetics as well as reanalysis of the genetic data in selected cases and planning genetic counseling in this direction will be useful. We have proposed that it is of vital importance to study cases with comprehensive panels, including larger cohorts, and to evaluate these panels with continuously updated databases.

Keywords; Parkinsonism; common variant analysis; etiology; new generation sequencing method(NGS); Canakkale population

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR.....	iii
ÖZET.....	iv
ABSTRACT.....	vi
İÇİNDEKİLER.....	viii
KISALTMALAR ve SİMGELER.....	xi
ŞEKİLLER.....	xiii
TABLolar.....	xiv
1. GİRİŞ ve AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Parkinson Hastalığı.....	3
2.1.1. Parkinson Hastalığı tanımı, tarihçesi ve epidemiyolojisi	3
2.1.2. Parkinson Hastalığı Semptomları ve Klinik Tanı.....	4
2.1.2.1. Hastalığın tanısı.....	5
2.1.3. Parkinson Hastalığı Görüntüleme Yöntemleri.....	6
2.1.4. Parkinson Hastalığı Nöropatolojisi	7
2.1.5. Parkinson Hastalığında Tedavi.....	12
2.1.5.1 Dopamin Hedefli Tedaviler	12
2.1.5.1.1. L-DOPA	12
2.1.5.1.2. Katekol-O-metiltransferaz inhibitörleri	13
2.1.5.1.3. Monoamin oksidaz-B inhibitörleri.....	13
2.1.5.1.4. Dopamin agonistleri.....	13
2.1.5.2. Dopamin Hedefli Olmayan Tedaviler	14
2.1.5.3. Derin Beyin Stimülasyonu	16
2.1.5.4. Deneysel Tedaviler	17
2.1.5.4.1. Gen Tedavisi.....	17
2.1.5.4.2. Fetal hücre transplantasyonu	18
2.1.5.4.3. Kök hücre tedavisi	19
2.1.5.5. Yeni tedavi yaklaşımları	20
2.2. Genetik ve Parkinson Hastalığı.....	20

2.2.1. Genel Bilgiler	20
2.2.2. Monogenik Parkinson Hastalığı	22
2.2.3. Sporadik Parkinson Hastalığı	23
2.2.4. Panelde yeralan genler ve Parkinson Hastalığı	24
2.2.4.1. SNCA (Synuclein, Alpha)	26
2.2.4.2. LRRK2 (Leucine-Rich Repeat Kinase 2)	26
2.2.4.3. ATP13A2 (ATPase, Type 13A2)	27
2.2.4.4. DNAJC13 (DNAJ/HSP40 Homolog, Subfamily C, Member 13)	27
2.2.4.5. GIGYF2 (GRB10-Interacting Gyr Protein 2)	28
2.2.4.6. HTRA2 (Htra Serine Peptidase 2)	28
2.2.4.7. MAPT (Microtubule-Associated Protein TAU)	29
2.2.4.8. PLA2G6 (Phospholipase A2, Group VI)	29
2.2.4.9. PARK2 (Parkin-PRKN)	29
2.2.4.10. PARK7/DJ1 (Parkinson Disease 7)	30
2.2.4.11. PINK1 (Pten-Induced Putative Kinase 1)	30
2.2.4.12. VPS35 (Vacuolar Protein Sorting 35)	30
2.2.4.13. SYNJ1 (Synaptojanin 1)	31
2.2.4.14. CHCHD2 (Coiled-Coil-Helix-Coiled-Coil-Helix Domain- Containing Protein 2)	31
2.2.4.15. EIF4G1 (Eukaryotic Translation Initiation Factor 4-Gamma, 1)	31
2.2.4.16. FBXO7 (F-Box Only Protein 7)	32
2.2.4.17. FGF20 (Fibroblast Growth Factor 20)	33
2.2.4.18. UCHL1 (Ubiquitin Carboxyl-Terminal Esterase L1)	33
2.3. YENİ NESİL DNA DİZİLEME TEKNOLOJİSİ	34
2.3.1. DNA Dizileme Teknolojisinin Gelişim Süreci	34
2.3.2. Yeni Nesil DNA Dizileme Teknolojisinin Prensipleri	36
2.3.3. Yeni Nesil DNA Dizileme Kullanım Alanları	37
2.3.4. Varyantların Yorumlanması	37
3. GEREÇ ve YÖNTEM	39
3.1. OLGU SEÇİMİ	39

3.1.1. Kişilerin bilgilendirilmesi, aydınlatılmış onam ve etik kurul onayı	39
3.2. NGS ÇALIŞMA PRENSİPLERİ	40
3.2.1. Çalışmada Kullanılan Panelin Özellikleri	40
3.2.2. DNA İzolasyonu	40
3.2.3. DNA Kütüphanesinin Hazırlanması ve Pürifikasyonu	41
3.2.3.1. KÜTÜPHANE HAZIRLIĞI	42
3.2.3.2. DİGESTİON	43
3.2.3.3. LİGASYON	43
3.2.3.4. PÜRİFİKASYON	44
3.2.3.5. AMPLIFIED LIBRARY'NİN Qubit ile ölçülmesi	45
3.2.3.6. KÜTÜPHANELERİN QUBİT İLE ÖLÇÜMÜ	47
3.2.4. Örneklerin Ion 530TM Çipe Yüklenmesi ve Dizileme	48
3.2.5. Dizileme İşlemi Sonrası Ham Datanın Elde Edilmesi	48
3.3. TESPİT EDİLEN VARYANTLARIN DEĞERLENDİRİLMESİ	50
3.3.1. Tespit Edilen Varyantların Önceliklendirilmesi	52
4. BULGULAR	55
4.1. Demografik ve klinik bulgular	55
4.2. Genetik Bulgular	58
4.2.1. Takipte klinik önemi değişen varyantlar	71
5. TARTIŞMA ve SONUÇ	73
6. KAYNAKLAR	89

KISALTMALAR ve SİMGELER

A	Adenin
ACMG	American College of Medical Genetics and Genomics
AMP	Association for Molecular Pathology
ATP13A2	ATPase, Type 13A2
BAM	Binary Alignment/Map
C	Sitozin
CCMG	Canadian College of Medical Geneticists
CHCHD2	Coiled-Coil-Helix-Coiled-Coil-Helix Domain-Containing Protein 2
DBS	Derin beyin stimülasyonu
ddNTP	Dideoksinükleotid trifosfatlar
DNA	Deoksiribo nükleik asit
DNAJC13	DNAJ/HSP40 Homolog, Subfamily C, Member 13
dNTP	Deoksinükleotid trifosfatlar
EDTA	Ethylene diamine tetra acetic acid
EIF4G1	Eukaryotic Translation Initiation Factor 4-Gamma, 1
FBXO7	F-Box Only Protein 7
FGF20	Fibroblast Growth Factor 20
G	Guanin
GIGYF2	GRB10-Interacting Gyf Protein 2
gnomAD	The Genome Aggregation Database
GWA	Genom çapında ilişkilendirme çalışmaları
HTRA2	Htra Serine Peptidase 2
IGV	Integrative Genomics Viewer
LB	Lewy Body cisimcikleri
LRRK2	Leucine-Rich Repeat Kinase 2
MAPT	Microtubule-Associated Protein TAU
MPH	Monogenik Parkinson hastalığı
MDS	Uluslar arası Parkinson ve Hareket Hastalıkları Topluluğu
MIBG	Iodobenzilguanin sintigrafisi

NGS	Yeni nesil DNA dizileme, (Next Generation Sequencing)
OMIM	Online Mendelian Inheritance in Man
PARK2	Parkın(PRKN)
PARK7	Parkinson Disease 7
PCR	Polimeraz zincir reaksiyonu
PH	Parkinson hastalığı
PINK1	Pten-Induced Putative Kinase 1
PLA2G6	Phospholipase A2, Group VI
SN	Subtansiya nigra
SNCA	Synuclein, Alpha
SYNJ1	Synaptojanın 1
SNP	Tek nükleotit polimorfizmi, (Single nucleotide polymorphism)
T	Timin
UCHL1	Ubiquitin Carboxyl-Terminal Esterase L1
VCF	Variant Calling Format
VPS35	Vacuolar Protein Sorting 35
VUS	Variant of Uncertain Significance
WES	Tüm ekzom analizi, (Whole Exome Sequencing)

ŞEKİLLER

Şekil 1. PH nöropatogenezinde hücre bazında görülen değişimler.....	7
Şekil 2. OMIM'de Parkinson Hastalığı ile ilişkilendirilen genler.....	25
Şekil 3. BAM uzantılı dosyanın IGV programında görüntülenmesi.....	51
Şekil 4. Araştırmaya dahil edilen olguların cinsiyet dağılımları.....	56
Şekil 5. Tespit edilen varyantların olgular üzerinde dağılımı.....	60
Şekil 6. Olgu 2'ye ait aile ağacı çizimi.....	61
Şekil 7. Olgu 10-24-25'e ait aile ağacı çizimi.....	61
Şekil 8. Olgu 12'ye ait aile ağacı çizimi.....	62
Şekil 9. Olgu 13'e ait aile ağacı çizimi.....	63
Şekil 10. EIF4G1 c.3142A>G (p.Ser1048Gly) varyantı IGV genome Browser görüntüsü.....	63
Şekil 11. Olgu 14'e ait aile ağacı çizimi.....	64
Şekil 12. Olgu 23'e ait aile ağacı çizimi.....	65
Şekil 13. Olgu 26'ya ait aile ağacı çizimi.....	65
Şekil 14. Olgu 28'e ait aile ağacı çizimi.....	66
Şekil 15. Olgu 31'e ait aile ağacı çizimi.....	67
Şekil 16. Olgu 33'e ait aile ağacı çizimi.....	67
Şekil 17. ATP13A2 c.2859G>A (p.Thr953=) varyantı IGV genome Browser görüntüsü.....	68
Şekil 18. Olgu 37'e ait aile ağacı çizimi.....	69
Şekil 19. LRRK2 c.4915delA(p.Arg1639GlyfsTer15) varyantı IGV genome Browser görüntüsü.....	69
Şekil 20. Olgu 38'e ait aile ağacı çizimi.....	70
Şekil 21. Olgu 39'a ait aile ağacı çizimi.....	71
Şekil 22. Parkinson hastalığı genetik etyopatogenezi için yapılmış GWA çalışmaları ve ilişki bulunan genler.Hastalık ile net olarak ilişkilendirilmiş(Kare) ve ilişki çelişkili olan genler (elips) gösterilmiştir. * ile işaretli genler atipik parkinsonla ilişkilendirilmiş genleri göstermektedir.....	75

TABLULAR

Tablo 1: Uluslararası Parkinson ve Hareket Hastalıkları Topluluğu (MDS) Parkinson Hastalığı tanı kriterleri	5
Tablo 2: Panelde bulunan genler.....	49
Tablo 3: ACMG 2015 kriterlerine göre varyant değerlendirmede kullanılan skorların oluşum mekanizmaları.....	53
Tablo 4: ACMG kriterlerine göre varyantların sınıflandırılma algoritması.....	54
Tablo 5. Raporlanabilir varyant tespit edilen olguların demografik bilgileri ve klinik özellikleri.....	57
Tablo 6. Tespit edilen varyantların güncel veritabanları değerlendirmeleri ve gnomAD sıklıkları. * ile işaretlenmiş varyantların taşıyıcısı olan olgularımızın pedigree çiziminde PH tanısı veya uzun süreli parkinsonizm bulgusu olan aile bireyi mevcuttur.....	59
Tablo 7. Takipte klinik önemi değişen varyantlar. Olgularımıza ait elde edilen NGS verileri Clinvar ve ACMG olmak üzere iki farklı veritabanı ile farklı periyotlarda yeniden değerlendirilmiştir.....	72

1. GİRİŞ ve AMAÇ

Parkinson hastalığı(PH) iki asırlık bir zaman süresinden daha önce literatürde ilk olarak İngiliz doktor James Parkinson tarafından 'Titremeli Felç' başlığı ile 6 hastanın gözlem sonucu elde edilen verilerinin yayınlanması ile bildirilmiştir[2]. Zamanla hastalık hakkındaki bilgilerimiz teknoloji ve bilimin ilerlemesi ve idealist hekimlerin hummalı çalışmaları ile artmıştır. Parkinson hastalığı 65 yaş civarı popülasyonda %1 prevalans sıklığı ile görülen dünyanın 2. en sık nörodejeneratif hastalığıdır[3, 4]. Parkinson hastalığı temelinde bir hareket hastalığı olarak sınıflandırılabilir fakat hastalığa eşlik eden başka semptomlarda bulunmaktadır. Hastalık sıklıkla yavaş ve kronik bir seyir göstermektedir. Temel bulguları nonintansiyonel tremor, bradikinezi, rijidite ve yürüme ile ilgili problemlerdir[5]. Hastalarda bu kardinal bulgulara eşlik edebildiği gibi prodromal dönemde görülen belirtiler olarakta karşımıza çıkan ek problemlere; kognitif disfonksiyon, psikiyatrik problemler, otonom sinir sistemi ile ilgili bozukluklar ve duyu bozuklukları örnek verilebilir[6].

PH'nda gözlenen hareket bozukluklarının başta substansiya nigra bölgesi pars kompaktada yer alan dopaminerjik nöronların harabiyetinden kaynaklandığı ifade edilmiştir[7]. Bu nöronlar harabiyete uğradıktan sonra sitoplazmalarında PH'na özgü olmayan fakat sıklıkla ilişkilendirilen Lewy Body olarak isimlendirilen protein inklüzyonları birikmektedir. Bu inklüzyonlar a-synuclein pozitif olarak boyanmaktadırlar.

PH kadınlara oranla erkeklerde daha sık gözükmektedir. Hastalığın risk faktörü olarak çevresel toksin maruziyeti, ağır metal zehirlenmeleri, aile hikayesi ve genetik yatkınlık ifade edilebilir[8-10]. Hastalığın tedavisi temelde eksik olan dopamini yerine koyma üzerine kuruludur. Bu yolla hastalık adına kür sağlama

değil semptomatik iyileşme elde edilmektedir. Kür sağlanması için hastalığın altta yatan mekanizmalarının anlaşılması elzemdir ve bu bağlamda genetik alanı tartışmasız bir kaynaktır. Monogenik PH için oran %5-10 olarak ifade edilse de sporadik vakalar ile genetik varyantlar arasındaki korelasyon gün geçtikçe artmaktadır. Bu şekilde genetik ve PH arasındaki ilişkiyi aydınlatmak için bugüne kadar genetik risk faktörü araştırmaları, aile çalışmaları, aday gen çalışmaları, genom çapında ilişkilendirme çalışmaları(GWAS) ve yeni jenerasyon dizileme(NGS) gibi yaklaşımlar ele alınmıştır[11]. Bugüne kadar OMIM'de PH ile ilişkilendirilmiş 31 gen bulunmaktadır. Bu genlerden bir kısmı monogenik PH ile ilişkilendirilirken bir kısmı da sporadik PH için risk faktörü olarak nitelendirilmektedir. Bu şekilde çalışmalardan elde edilen mesaj PH tanısı alan bireylerin genetik tetkiklere tabi tutulması genetik etiyogenezin aydınlatılması için vital önem taşıdığıdır. Türk Nöroloji Derneğine göre ülkemizde yıllık 150 000 civarında kişi tanı almaktadır.

Bu çalışmada bizim temel hedefimiz tarafımıza Parkinson Hastalığı ilişkili klinik hikayeler ile başvuran olguların olası genetik altyapısını aydınlatmak, bu şekilde genetik tetkikleri yapılan hastaların ve genetik tetkik sonuçlarının takibi, klinik önemi bilinmeyen varyantların tekrardan değerlendirilmesi sürecinde nelerin önemli olduğu ve bunun sağlık hizmetine katkısı araştırılmak hedeflenmiştir.

Bu çalışma ülkemizde en geniş gen paneli ile yapılan çalışma olarak değerlendirilmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Parkinson Hastalığı

2.1.1. Parkinson Hastalığı tanımı, tarihçesi ve epidemiyolojisi

Parkinson hastalığı 65 yaş civarı popülasyonda %1 prevalans sıklığı ile görülen ve sıklığı yaşla artan, 85 yaş civarında %5'e ulaşan bir sıklığa sahiptir[4, 5]. PH dünyada en sık görülen ikinci nörodejeneratif hastalıktır[4, 5]. Her yıl yeni tanı alan hastaların global prevalansı kabaca %0.3 olarak bildirilmiştir[6]. Sıklıkla hastalar 60'lı yaşlarında tanı alıyor olsa da hastalığın değişken belirti spektrumu ve bazı belirtilerinin gözden kaçabilmesi dolayısıyla tanı alma yaşı değişkenlik gösterebilmektedir[7]. Daha az sıklıkta olmakla birlikte hastalar 50 yaş öncesi de tanı alabilmektedir ve bu duruma erken başlangıçlı Parkinson Hastalığı denmektedir ek olarak daha nadir görülen 20 yaş öncesi başlangıç gösteren PH, Jüvenil Başlangıçlı PH olarak adlandırılmaktadır[4].

Cinsiyet dağılımının fark göstermediği toplumlar bildirilse de çoğu ülkede PH erkeklerde daha yaygın gözükmektedir[4, 8]. Seksüel koruyucu hormonlar, cinsiyete bağlı genetik mekanizmalar ve değişken toksin maruziyeti neden olarak öne sürülen mekanizmalardandır[8]. İrksal anlamda belirgin bir farka neden olabilecek anlamlı ve geniş çaplı çalışmalar henüz yapılmamıştır, bazı ırklarda görülme sıklığı artışı bildirilmiştir. Örneğin İsrail'de özellikle Aşkenazi Yahudilerinde PH ile ilişkilendirilen *LRRK2* ve *GBA* gen varyantlarının sıklığından dolayı hastalığın görülme sıklığının arttığı yönünde görüş bildirilmiştir[9]. Toplumlar arası görülme sıklığının farklı olması altında yatan neden olarak ırksal farklılıklardan çok toksin maruziyeti, diyet alışkanlıkları vs. gibi ortak çevresel etmenlerin daha öncelikli olarak etkili olabileceğini belirten yayınlar bildirilmiştir[10].

Sıklıkla tanı anından itibaren yavaş ve ilerleyici bir seyir gösteren bu hastalıkta hastanın tanı anından ölüme kadar geçen süresi ortalama 15-20 yıl civarında olarak bildirilmektedir[11, 12]. Buna rağmen hastalar arasında etkilenmeye bağlı olarak daha uzun yaşam süreleri de bildirilmiştir[11]. Toplumların yaşlanması ile birlikte hastalığın tanı hızının artması ve bu durumun toplum adına hem maddi hem manevi olarak bir yük oluşturması beklenmektedir[13].

2.1.2. Parkinson Hastalığı Semptomları ve Klinik Tanı

Parkinson hastalığında gözlemlenen ana klinik belirtiler; istirahat tremoru, bradikinezi, rijidite, postür bozukluğu ve yürüme bozukluğu şeklinde tanımlanabilir[14]. Hastalığın ilerleyişine bağlı olarak semptomlar değişim ve ilerleme gösterebilir, belirtilen klinik problemler PH dışında başka beyin patolojileri nedeniyle de gözlemlenebilmektedir. Parkinson hastalığında gözlemlenen motor problemlerin temel nedeni olarak önemli bir bazal gangliyon olan substansiya nigra da bulunan pars kompakta bölgesindeki dopaminerjik nöronların kaybı gösterilmektedir. Bu bölgede hareketin başlangıcı ve yapılmasından sorumlu tutulan derin nükleuslar bulunmaktadır[3].

Hareket bozukluğu Parkinson hastalığında gözlemlenen ana klinik belirti olmasına ve hastalık tanısını koymada temel gözlemlenmesi beklenen bulgu olmasına rağmen koku alma problemleri, uyku bozuklukları ve kabızlık gibi bulgular bradikinezi veya tremor gibi bulgulardan daha önce ortaya çıkıp ileriye yönelik işaret verici belirtiler olarak gözlemlenebilmektedir[7, 15, 16]. Hastalığın ilerleyen dönemlerinde ise motor problemlerin sıklığı ve şiddetinde artış, tedaviye bağlı nörolojik problemler, duyu ve ağrı problemleri, otonom sinir sistemi ile ilgili problemler ve psikiyatrik problemler gözlenebilmektedir[14].

Hastalığın bu şekilde seyir göstermesinin altında yatan neden olarak beyinde SN dışında farklı bölgelere yayılım göstermesi olarak ileri sürülmüştür[17]. Hastalığın risk faktörleri arasında erkek cinsiyet, ileri yaş ve Avrupa ırkı olmak sayılmaktadır. Bazı araştırmalar belirli tür toksinlere sık maruziyetin de özellikle bu toksinleri metabolize eden enzimlerin polimorfizmleri göz önünde alındığında risk faktörü olarak kabul edildiğini bildirmiştir[18].

2.1.2.1. Hastalığın tanısı

PH için motor semptomlar kardinal bulgu olarak kabul edilmektedir. Bu bulgular bradikinezi, rijidite, tremor, diskinezi, postür bozukluğu ve instabilitesi, disfaji, aksiyel deformiteler ve düşmeler olarak sıralanabilir. Tanı için bradikineziye ek olarak bir ana motor semptom (rijidite veya istirahat tremoru gibi) ve destekleyici veya dışlayıcı özellikler aranmaktadır[19-21].

Tablo 1:Uluslararası Parkinson ve Hareket Hastalıkları Topluluğu(MDS) Parkinson Hastalığı tanı kriterleri.

MDS Parkinson Hastalığı tanı kriterleri

1.Adım: Parkinsonizm tanısı(ana özellik)

- bradikinezi varlığı, hareketin yavaşlaması, devam eden harekette hızın veya amplitüdün azalması
- rijidite ve/veya istirahat tremorundan en az birinin eşlik etmesi

2.Adım:Parkinsonizmin Parkinson hastalığından kaynaklandığını iki aşamada doğrulamak

Parkinson hastalığı tanısı için aşağıdaki 3 kriterde gereklidir.

- Kesin dışlama kriterlerinin yokluğu, görüntülemelerde parkinsonizme neden olacak başka patolojilerin tespiti, atipik parkinsonizm ve ilaç kaynaklı parkinsonizm ve esansiyel tremor olmayacak
- 2 veya daha fazla destekleyici bulgu. Bunlar; L-DOPA cevabı, klasik istirahat tremoru, L-DOPA bağımlı diskineziler, MIBG de kardiyak veya olfaktör denervasyon bulgusu
- Kesin dışlama kriterleri olmayan ama beklenmeyen klinik özelliklerin olmaması. Örneğin çok hızlı tekerlekli sandalye mahkumiyeti veya 5 yıldan kısa sürede otonomik disfonksiyon gelişmesi

Hastalığın başlangıcından itibaren asimetric tek taraflı tutulum beklenmektedir. Hastanın şikayeti olabilecek, tanı anında motor semptomlara eşlik edebilecek nonmotor klinik bulgular arasında uyku bozuklukları, hafıza problemleri, kognitif fonksiyonların azalması, demans, halüsinasyon, mod ve yönelim bozuklukları, otonomik disfonksiyon(sıklıkla ortostatik hipotansiyon, ürogenital disfonksiyon, kabızlık, fazla terleme vb), duyu semptomları(koku almada azalma gibi) ve ağrı bozuklukları bulunmaktadır[15]. Hastalar ilk başvuruda bu şikâyetlere sahip olmasalar dahi hastalığın gidişatı sürecinde bu belirtiler çok yüksek sıklıkla ortaya çıkmaktadır. Yapılan uzun dönem bir çalışmada gözlemlenen 20 yıldan uzun hastalık süreci tecrübe etmiş PH örneklerinde demans %83, halüsinasyon %74, ortostatik hipotansiyon %48, kabızlık %40 ve üriner inkontinans %71 olarak bildirilmiştir[22].

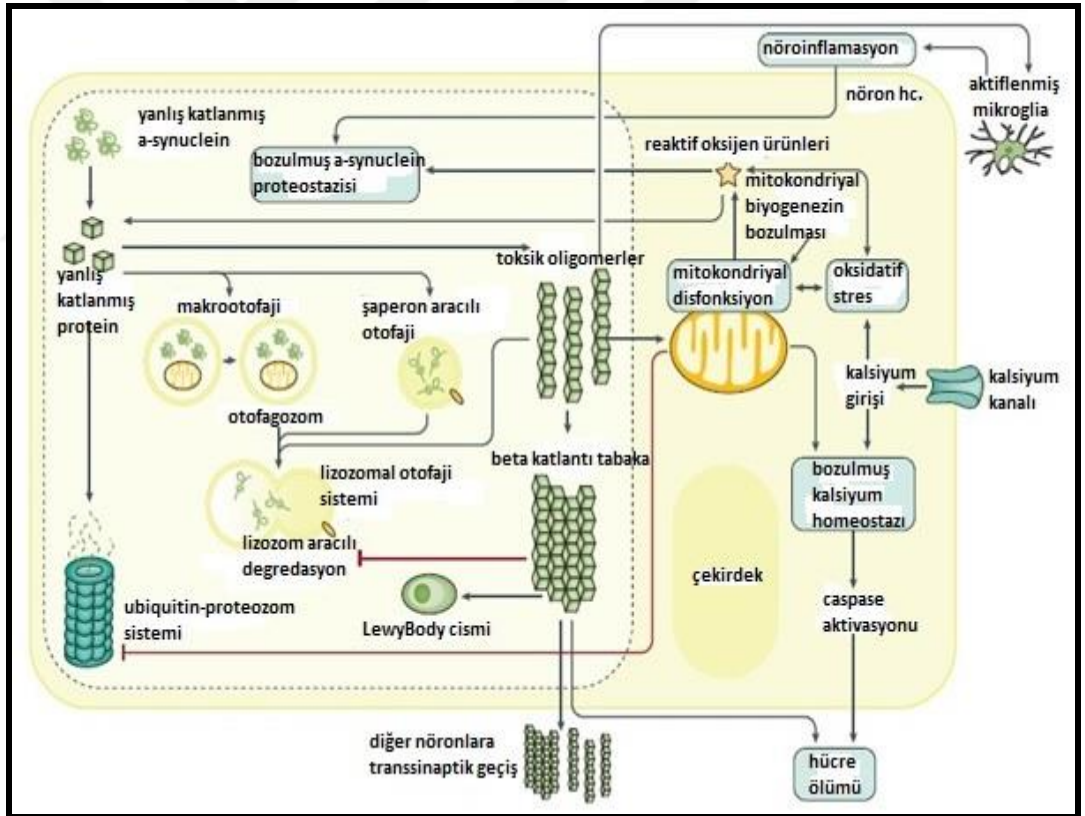
Tipik kardinal bulgular ile başvuran hastalarda tanı koymak sıklıkla basit bir süreç olsa da subklinik bulgularla başvuran hastalarda yanlış tanı alma oranı %24'e kadar yükselebilmektedir[23]. Hastalık tanısı için altın standart tanı yöntemi postmortem patolojik inceleme olarak bildirilmiştir[24].

2.1.3. Parkinson Hastalığı Görüntüleme Yöntemleri

PH tanısında çeşitli görüntüleme yöntemlerinden faydalanılabilmektedir ve bu gereçlerin kullanımı ve tanıya yardımcı olma gücü zamanla ve teknolojiyle paralel olarak kuvvetlenmiştir. Florür-18 izotopolog ile işaretlenmiş L-DOPA molekülünün PET cihazı ile görüntülenmesi PH için ciddi bir dönüm noktası olarak kabul edilmektedir. Zamanla İyot molekülü bazlı SPECT görüntülemeler, PH ve hastalığı taklit edebilecek durumları ayırt etmek için kullanılmaya başlanmıştır[25, 26]. Son olarak ise MR bazlı olan ve çok çeşitli faz, kontrastlanma ve modalite tekniğine sahip görüntüleme yöntemleri yapısal beyin görüntülemeleri ve ayırıcı tanıda kullanılmaktadır[27, 28]. Bu alanda hala çeşitli geliştirilmekte olan teknoloji ve görüntüleme yöntemleri araştırılmaktadır.

2.1.4. Parkinson Hastalığı Nöropatolojisi

Parkinson hastalığında nöronal hücrelerde gözlemlenen temel görüntü SN'da dopaminerjik hücre kaybıyla ortaya çıkan proteinden zengin inklüzyonlar olan Lewy Body cisimleridir[29]. Hastalar klinik belirti vermeye başladıkları vakit SN'da yer alan dopaminerjik nöronların ortalama en az %60 kadarının kaybı gereklidir[14]. Hastalığın altta yatan moleküler patolojisinde birden fazla yolak ve mekanizma gösterilmiştir; a-synuclein protein metabolizması, mitokondriyal disfonksiyon, oksidatif stress, kalsiyum metabolizması, aksonal transport ve nöroinflamasyon bunlardan başlıcalarıdır[23]. Bu mekanizmalar ve bunlara ek olarak gözlenen hücre içi ve dışı değişimler aşağıdaki resimde gösterilmiştir.



Şekil 1: PH nöropatogenezinde hücre bazında görülen değişimler. Poewe ve ark. 2017 yayınından alınmıştır[23].

Klasik bir Lewy Body cismi incelendiğinde a-synuclein pozitif nöronal hücre boyanmaları görülür. a-synuclein bir intrasellüler protein depolanması olup PH için spesifik olmamakla birlikte, PH tanısı için dopaminerjik nöron kaybı ve a-synuclein akümülyasyonunun beraber gözükmesi kesin tanı için gereklidir[17]. Neredeyse tüm PH hastalarında gözlemlenen bu protein akümülyasyonu ile ilgili, a-synuclein kodlayan *SNCA* geninde gözlemlenen nokta mutasyonlarının genetik kalıtmı PH ile ilişkilendirilmesi de a-synucleinin PH'da anahtar rolde yer alan bir mekanizma olduğunu destekler niteliktedir[30, 31]. Yapılan genetik çalışmalar *SNCA* geninde gözlemlenen mutasyonların a-synuclein ekspresyonunu artırıcı etki gösterdiğini ve bu durumun PH patogeneğinde önemli rol oynadığını göstermektedir[32, 33].

a-synuclein proteinin tam olarak rolü anlaşılmasa da hücre içi birçok kompartımanda yer aldığı ve vezikül süreci, mitokondriyal fonksiyonlar, hücre içi trafik üzerine etkisi olan potansiyel bir şaperon olabileceği ileri sürülmüştür[33-35]. İlk üretildiği haliyle çözünür formda bir hücre proteini olan a-synucleinin, çeşitli patolojik süreçler sonucunda oligomerler ve en sonunda fibriller haline gelerek yaşlılığa bağlı protein metabolizmasının yavaşlaması ve protein degradasyonunun sekteye uğraması nedeniyle nöron hücrelerinde birikmeye başladığı düşünülmektedir[36, 37].

a-synuclein protein degradasyonu temelde ubiquitin bağımlı lizozomal enzimler aracılığıyla yapılan bir yıkım işlemidir. Bu süreci sekteye uğratabilecek olası problemler a-synuclein yıkımını yavaşlatarak hücre içerisinde zamanla birikmesine neden olacaktır[38, 39]. Biriken oligomerler tekrardan inhibitör etki gösterip hücreyi bir nevi kısır döngüye sokacaktır. Hayvan çalışmalarında gösterilmiştir ki SN'da bulunan hücrelerde lizozomal enzim seviyeleri azalmış, şaperon bağımlı otofajiye ait markerlar akümülyasyon lehine azalmıştır[40-42]. Lizozomal enzimlerin üretiminde yer alan bazı genlerde görülen mutasyonların da PH ile ilişkilendirilmesi bu çerçevede sürpriz değildir[43].

SN'da dopaminerjik nöronların projeksiyon yaptığı; striatum bölgesinde ve hatta otonom sinir sistemi ile ilgili bölgelerde, enterik sinir sisteminde, dopaminerjik olmayan nöradrenerjik nöronlardan zengin Locus Coeruleus gibi bölgelerde de bu patoloji gözlemlenmiştir. Bu bölgelerde a-synuclein birikiminin gözlenmesi hastalığın nonmotor semptomlarını açıklamada aday olarak bildirilmiştir[17, 44]. SN harici bölgelerde gözlemlenen a-synuclein birikiminin mekanizması olarak a-synuclein protein fibrilleri ve oligomerlerinin prion benzeri bir davranış gösterdiği ileri sürülmüştür. Bu hipoteze göre a-synuclein agregatları akson boyunca iletilip nihai olarak ekstrasellüler boşluğa bırakılarak endositoz aracılığıyla başka hücreler tarafından alınımı sağlanır ve bu şekilde beyin diğer bölgelerinde yer alan nöron hücreleri sırayla a-synuclein akümülyasyonları göstermeye başlar[45-48]. Hastalık sürecinde gördüğümüz klinik şikayetlerin sırayla ilgili beyin bölgelerinde bu akümülyasyonların gerçekleşmesi ile karşımıza çıktığını gösteren yayınlar mevcuttur[17].

Otopsi serilerinde LB görüntüsünün sıklığını %20 civarında belirten yayınlar bulunmaktadır ve bu oran toplumda bildirilen PH sıklığından oldukça fazladır. Bunun nedeni olarak hastaların semptom göstermeye başlamadan önce hayatlarını kaybetmesi ileri sürülmüştür, konuyla ilgili ek araştırmalar gerekmektedir[14]. Bütün bu bilgiler ışığında PH patogenezi motor semptomlar açısından SN'da LB cismi patolojisi ve yıkıcı nöron kaybı iken , nonmotor semptomlar açısından hastalığın LB cismi patolojisinin ilerleyip diğer beyin bölgelerini etkilemesi olarak görülmektedir[49, 50].

Parkinson hastalığı parkinsonizmden temel sorumlu hastalık olmakla birlikte başka hastalıklar da parkinsonizme neden olmaktadır. Örnek olarak Lewy Body cisimcikli demans, Multipl Sistem Atrofisi gibi hastalıklar örnek verilebilir. Bu hastalıklarda gözlemediğimiz patofizyolojik değişiklikler de PH'da görülen değişikliklerle benzeşim göstermektedir. Temel olarak a-synuclein pozitif nöronal hücre boyanmaları görüldüğünden bu grup hastalıklara

a-synucleopatiler denmektedir. Bunlar dışında benzer nörolojik tutulum yapan ve farklı mekanizmaya sahip hastalıklar da bulunmaktadır. Kortikobazal gangliyonik dejenerasyon, progresif supranükleer palsi ,frontotemporal demans, bir kısım Alzheimer hastalığı alt grubu, toksin ve ağır metal zehirlenmeleri de parkinsonizme yol açabilmektedir ve son olarak serebrovasküler olayların parkinsonizme yol açtığı bilinmektedir[51]. Nadir olarak görülmekle birlikte bir grup hastada SN nöron kaybı olmasına rağmen ek olarak Parkinson hastalığı ile ilişkilendirilen patolojik değişimler gözlemlenmeyen nörodejeneratif parkinsonizm vakaları da bildirilmiştir[23].

Parkinson hastalığı patolojisinde yine karşımıza çıkan mitokondriyal fonksiyonun bozukluğunun çeşitli yayınlarda a-synuclein birikimi ile sinerji göstererek hücreyi bir çeşit zararlı döngüye soktuğu ifade edilmiştir[52, 53]. PH tanısı alan hastalardan çeşitli doku örneklemeleri yapılarak gösterilen testlerde mitokondride yer alan kompleks-I aktivitesinin düştüğü gözlemlenmiştir[38, 39]. a-synucleinin sitoplazmada olduğu gibi mitokondri içerisinde de zamanla yığılmasının kompleks-I aktivitesinin azalmasında ve nihai olarak oksidatif stres oluşumunda etkili olduğu düşünülmektedir[54]. Yapılan hayvan çalışmalarında retrograd aksonal dejenerasyonu takiben mitokondride gözlemlenen bu değişikliklerin nöronal hücrede otofajinin durmasına, nöroinflamasyona ve progresif olarak dopaminerjik nöronların ölümüne yol açtığı gözlenmiştir[55, 56].

Mitokondri hasarına bağlı enerji metabolizmasında ortaya çıkabilecek bozuklukların aksonal dejenerasyona yol açabileceği ve bunun nöronal hücrede gözlemlenebilecek ilk bulgu olduğunu öne süren çalışmalar vardır[57, 58]. Bir diğer görüş ise a-synuclein birikiminin bir noktada çok büyük bir hale gelerek aksonal transportu engellemesi öne sürülmüştür[59]. PH etiyogenezinde rol alan bazı genlerin mitokondri fonksiyonlarının sürdürülmesinde görev alan bazı proteinlerin yapımında rol aldığı bilinmektedir. Bunlardan bazıları PINK1, DJ-1

gibi doğrudan ilişkilendirilen genler iken *FBX07*, *PLA2G6*, *VPS13C* ve *CHCHD2* gibi genler ise risk faktörü olarak bildirilmiştir[60-63].

Oksidatif stres yine PH tanısı alan kişilerin ilgili nöronal hücrelerinde gözlemlenen hücre içi değişimlerden birisidir. SN'da bulunan dopaminerjik nöronların oksidatif strese özellikle hassas olabileceğini öneren bir takım gerekçeler sunulmuştur. Bunlar, bu bölgede bulunan nöronların 4.5 metreye kadar uzanabilen myelinsiz aksonlara sahip olması, bu nöronların çok sayıda sinaps yapması dolayısıyla talep edilen yüksek enerji, diğer dopaminerjik nöronlardan farklı olarak otonom pacemaker aktivitesi göstermeleri, hücre içinde var olan dopamin metabolizması metabolitlerinin yüksek toksik stres sonucu gibi özelliklerdir[64, 65].

Nöroinflamasyon, PH çerçevesinde gözlemlenen, hastalığın patogenezinde temelde rol alması dahi duruma katkıda bulunan süreçlerden bir tanesi olarak kabul edilmektedir[66]. GWA(Genome Wide Association) çalışmaları göstermiştir ki; PH ile ilişkilendirilen genlerin bir kısmı yoğun olarak immün sistem hücrelerinde eksprese olmaktadır ve bu açıdan değerlendirildiğinde nöroinflamasyonun PH patogenezinin katkısına delil olarak değerlendirilebilir[67, 68].

Hastalar ile yapılan çalışmalara ek olarak deney çalışmaları da göstermiştir ki a-synuclein birikimi doğal ve adaptif immünitinin uyarılmasına neden olarak tıpkı mitokondriyal mekanizmalarda gördüğümüz gibi birbirini indükleyen bir kısır döngü oluşumuna neden olmaktadır[69-71]. Hatta bazı çalışmalar nöroinflamasyonun a-synuclein protein metabolizmasının sekteye uğramasında tetik çekici mekanizma olduğunu öne sürmüştür[72]. Bu konuyla ilgili olarak özellikle immün sistem hücrelerinde eksprese olan proteinleri kodlayan genler PH için risk faktörü olarak belirlenmiştir[73, 74].

PH ile ilişkilendirilen genlerin birçoğu hücre içerisinde gerçekleşmekte olan metabolizma açısından sık kullanılan yollarda yer almaktadır[1]. Bu durum da bize PH ile ilgili hücre içi mekanizmaların çeşitliliği ve karmaşıklığı hakkında bilgi vermektedir. Genetik olarak kalıtılan PH grubu nispeten küçük bir popülasyonu temsil etse de yapılan genetik çalışmalar hastalık mekanizmalarına ait gözlemlenen a-synuclein protein metabolizması bozuklukları, mitokondriyal disfonksiyon, oksidatif stres, kalsiyum homeostazi, aksonal transport bozuklukları ve nöroinflamasyon yolları gibi mekanizmaları açıklama adına önemli ipuçları vermiştir[23].

2.1.5. Parkinson Hastalığında Tedavi

2.1.5.1 Dopamin Hedefli Tedaviler

PH'nın striatal yollarda dopamin deplesyonuna yol açan, SN pars kompakta bölgesindeki dopaminerjik nöronların kaybı ana patogeneziyle oluşan bir hastalık olduğunun anlaşılmasından dolayı tedavi olarak buradaki dopamin seviyelerini yükseltmek ana hedefiyle, dopamin prekürsörü olarak L-DOPA molekülünün yarım asırdan uzun süre önce kullanılmaya başlanması tedavi buluşu olarak tarihe geçmiştir. Tedavi modaliteleri tarih sürecinde gelişti ve farklı hücre içi mekanizma ve yolları hedefleyen farklı tedavi ajanları ve yöntemleri uygulanmaya başlandı.

2.1.5.1.1. L-DOPA

L-DOPA Parkinson tedavisinde ana farmakolojik ajan olarak yer almaktadır[75, 76]. Özellikle motor semptomların baskılanması konusunda major tedavi ajanı olarak kullanılmasına rağmen, ilacın kan-beyin bariyerinden efektif dozlarda geçişi ve devamlı kullanımda ortaya çıkan komplikasyonları ilacın kullanımını problemlili hale getirmektedir. Bu yan etkilerin –sıklıkla diskineziler- temel mekanizması ve sebebi tam olarak anlaşılmasa da hem post sinaptik hem presinaptik mekanizmaların etkisiyle ortaya çıktığı

düşünülmektedir. Diğer nedenler ise L-DOPA molekülünün kısa yarı ömrü , gastrointestinal emilimin değişkenliği ve kan beyin bariyerinin seçici geçirgen yapısı olarak gözükmektedir[77-79]. Bu yan etkileri aşabilmek adına farklı ilaç iletim mekanizmaları denenmektedir.

2.1.5.1.2. Katekol-O-metiltransferaz inhibitörleri

COMT inhibitörleri olarak adlandırılan farmakolojik ajan grubu temel olarak L-DOPA molekülünün periferik yıkımını azaltıp nihai olarak daha fazla dopamine metabolize olmasını artırarak daha uzun süre biyoyararlanım sağlaması mantığı üzerine kullanılmaktadır. Sistemik dolaşımdan emilen L-DOPA henüz kan-beyin bariyerini geçmeden farklı enzimlerle metabolize olup yıkıma uğradığından bu şekilde COMT inhibitörleri daha fazla miktarda L-DOPA molekülünün santral sinir sistemine geçmesine yardımcı olmakta, özellikle motor semptomlar açısından dalgalanma gösteren hastalarda tercih edilmektedir[80].

2.1.5.1.3. Monoamin oksidaz-B inhibitörleri

Monoamin oksidaz-B inhibitörleri(MAO-B), dopamin moleküllerinin sinaptik boşluktan alınıp oksidasyon aracılığıyla etkisinin sonlandırılmasında rol oynayan MAO-B enzim aktivitesini geri dönüşümlü ve dönüşümsüz olarak bloklamaktadır. Bu yolla sinaptik aralıktaki dopamin konsantrasyonu artmakta ve yarı ömrü uzamaktadır. L-DOPA ile birlikte kullanımının özellikle dalgalı motor semptom görülen hastalarda belirgin klinik iyileşme gösterdiği bildirilmiştir[81].

2.1.5.1.4. Dopamin agonistleri

Dopamin reseptörleri üzerine mimetik etki yapıp dopaminerjik etki gösteren ergot alkaloidleri 70'li yıllarda kullanılmaya başlanmış ve motor semptomlar açısından olumlu etki göstermiştir. Bu ajanlar temelde D2 reseptörlerine bağlanarak etki etmekle birlikte 5-HT reseptörlerine de

bağlandıklarından kardiyak ve pulmoner fibrozis yan etkileri nedeniyle güvenli kullanımı sorunlu olarak gözükmektedir[23]. Dolayısıyla günümüzde kullanılan dopaminomimetiklerin büyük çoğunluğu ergot derivesi olmayıp L-DOPA ile karşılaştırıldığında daha uzun yarı ömre sahip olmaları ile de tedavide başarıyı artırabilmektedir. Bu etkilerinden dolayı semptomlarda gözükten dalgalanmaları azaltmada ciddi aday olarak gözükmektedirler fakat L-DOPA tedavisi ile kıyaslandığında total etki olarak daha az kuvvetli etki göstermekte ve diğer dopamin reseptörlerine de bağlanarak istenmeyen PH dışı etkilere neden olabilmektedirler. Dopamin agonistlerinin bir avantajı da transdermal, sublingual gibi alternatif kullanım yollarının sağladığı kolaylıklar ve biyoyararlanım avantajlarıdır[81-84].

2.1.5.2. Dopamin Hedefli Olmayan Tedaviler

PH için kullanılan ilaçlar temelde eksik olan dopamini yerine koyabilmek için kullanılan ilaçlar olduğundan alternatif yollara, aynı zamanda tedavide kullanılan ilaçların olası yan etkiler veya ilaç direncinin aşılması açısından da yeni arayışlara ihtiyaç duyulmuştur. Tedavide en sık kullanılan ilaçlardan olan L-DOPA tedavisinde görülebilen motor semptomlarda dalgalanma veya L-DOPA bağımlı diskineziler komplikasyon olarak karşımıza çıkabildiği gibi L-DOPA dirençli tremor, postür bozukluğu veya düşmeler gibi tedaviye yanıt vermeyen klinik özellikler olabilmektedir. Şu zamana kadar L-DOPA bağımlı diskinezilerin tedavisinde kullanılan tek ilaç aynı zamanda viral hastalıklarda da tedavide kullanılan amantadindir[80, 84].

Bazı hastalarda nonmotor semptomlar, motor semptomlar kadar hayat kalitesini düşürebilmekte ve hastalığa ait yıkıcı etki olarak tecrübe edilebilmektedir. Sıklıkla azalmış dopamini hedefleyen tedaviler maalesef nonmotor semptomları çoğunlukla tedavi etmemekte ve semptomatik rahatlama sağlamamaktadır. Bu nonmotor semptomların ortaya çıkışında diğer bazal gangliyonlar, beyin sapı yolları, korteks bağlantıları ve dahası santral sinir

sistemi dışında otonom sinir sistemi gibi tedavide hedef alınan farklı yapılar sorumlu olabilmektedir. Bu semptomların tedavisinde farklı bölgeler ve dopamin dışı farklı nörotransmitterler hedef alınarak bazı tedavi ajanları kullanılmaktadır[15, 85].

PH çerçevesinde görülen kognitif disfonksiyon, depresyon ve otonom disfonksiyon hastalığın en ciddi nonmotor semptomları arasındadır. Kognitif disfonksiyon gözlemlenen hastalarda asetil kolinin yıkımını üstlenen enzimlerin blokunu hedefleyen kolinesteraz enzimi inhibitörleri hastalarda klinik iyileşme sağlayabilmektedir.

Parkinson hastalarında görülen psikiyatrik şikayetler için ise en efektif tedavi ajanı klozapin olarak gözükmektedir. Antipsikotiklerin etki mekanizmalarının da sıklıkla dopamin reseptörleri üzerinden olduğu göz önüne alınırsa ilaç seçimi ciddi bir problem olarak gözükmekte fakat klozapin bu hasta grubunda mekanizması tam olarak bilinmese de etkili ve yan etki açısından en makul seçenek olarak öne çıkmaktadır[86, 87].

Yine sık semptomlardan olan depresyon için özellikle bir mekanizma ve yolak öne sürülmemiş dolayısıyla özellikle kullanılması tavsiye edilen bir antidepresan grubu bulunmamaktadır. Küçük bir grup çalışma trisiklik antidepresanlardan daha fazla fayda görülebileceğini iddia etse de bu kanı desteklenmeye ihtiyaç duymaktadır[88].

Otonomik disfonksiyon ise özellikle geç dönem hastalıkta sıklıkla karşımıza çıkan bir problem olarak şikayetin özelliğine göre otonom sinir sistemi çeşitli farmakolojik ajanlarla manipüle edilerek semptomatik rahatlama hedeflenmektedir. Bu doğrultuda ortostatik hipotansiyon için

mineralokortikoidler, noradrenalin prekürsörleri veya adrenerjik ilaçlar üriner inkontinans için antimuskarinik ajanlar, kabızlık için prokinetik ilaçlar gibi otonom sinir sisteminin normal fonksiyonuna yardımcı olan ilaçlar hastaların semptomatik tedavisinde sıklıkla kullanılmaktadır[89].

2.1.5.3. Derin Beyin Stimülasyonu

Derin beyin stimülasyonu(DBS) yöntemi beynin istenilen belli bölgelerine yerleştirilen elektrotlar sayesinde invaziv bir teknikle yüksek frekanslı elektrik dalgaları aracılığıyla aktive edip, fonksiyonuna engel olan lezyonun etkilerini geri getirme amacıyla kullanılmak üzere keşfedilmiş bir yöntemdir.

DBS'nin özellikle PH patogenezinde etkilenen subtalamik nükleus üzerine kullanımı kanıta dayalı olarak hastalarda gözlemlenen diskinezi ve dalgalı motor semptomlar açısından belirgin fayda sağladığı gösterilmiştir[82]. Şu noktayı da göz önüne almak gerekir ki daha önce L-DOPA tedavisinden fayda görmeyen hastaların DBS tedavisinden de fayda görmediği ve bu durumun tek istisnasının L-DOPA kullanımından fayda gören fakat tremoru direnç gösteren hasta grubu olduğu bildirilmiştir.[90]. Bu hasta grubunda DBS'nin tremor kontrolünde başarılı olarak uygulandığı bildirilmiştir.

Ayrıca demans, akut psikoz ve major depresyon semptomları gösteren hastaların DBS tedavisine uygun olmadığı bildirilmiştir. DBS tedavisinden en fayda gören grup erken başlangıçlı genç hasta grubu olarak bildirilmiştir. Özellikle ileri yaş hastalarda cerrahi girişime bağlı komplikasyon gelişme riski artışıdan dolayı DBS seçimi dikkatle yapılmalıdır.

Subtalamik nükleus için bilateral DBS uygulamasının hastalarda gözlemlenen motor semptomlarda ve günlük yaşam aktivitelerinde %50-60 civarında iyileşmeye neden olduğu bildirilmiştir. DBS tedavisi uygulanan hastaların %60 kadarında farmakolojik tedavide kullanılan dopaminerjik ilaçlar daha düşük dozlara düşmüştür. Toplam değerlendirmede diskinezi %60-70, hipokinetik dalgalanmalar %70 azalmış olarak bildirilmiştir[91].

DBS tedavisinde bir diğer tedavi hedefi olan beyin bölgesi de globus pallidus internus bölgesidir. Subtalamik nükleus ile karşılaştırıldığında anlamlı klinik düzelmeye sağlayıp sağlamadığı, ilaç kullanımını azaltması konusunda daha fazla delile ihtiyaç duyulmakla birlikte tedavide alternatif hedef bölgelerden biridir[92].

DBS birden çok alanın ortak hareket etmek durumunda olduğu uygun cerrahi prosedür, uygun elektrot yerleşimi, doğru elektrik stimülasyon ve ilaç tedavisinin ayarlanması ile optimal sonuca ulaşılabilen bir yöntem olarak gözükmektedir. Uygulama sırasında en sık görülen komplikasyonlar intrakraniyal kanamalar ve elektrot yanlış yerleşimi, enfeksiyon gibi cihaz bağımlı komplikasyonlar olarak %1-3 sıklıkta bildirilmiştir. DBS bağımlı mortalite %0,5'in altında gözükmektedir. Teknoloji gelişimi ile daha rafine cihazların gelişimi cihaz kaynaklı komplikasyonları azaltmada önemli rol oynayabilir bu konuda çalışmalar devam etmektedir[90, 93].

2.1.5.4. Deneysel Tedaviler

2.1.5.4.1. Gen Tedavisi

PH adına gen tedavisi çalışmaları iki ana hedef üzerinde yoğunlaşmaktadır; viral vektör aracılı büyüme faktörü sentezi ve nörotransmitter sentezi için enzim üretimi. Deneysel çalışmalarda elde edilen bilgilere göre glial

hücre grubu nörotrofik faktör(gliial cell line-derived neurotrophic factor-GDNF) SN bölgesindeki dopaminerjik nöronları korumakta ve olası hasar durumunda aksonal tamir için rejenerasyon başlangıcında rol almaktadır.

GDNF enjeksiyonu ile ilgili yapılan çalışmalar tartışmalı sonuçlar vermiştir. Bazı hayvan çalışmalarında olumlu sonuçlar veren GDNF alttürleri insan çalışmalarında tutarlı olarak fayda sağlayıp sağlamadığı konusunda ileri araştırılmaya ihtiyaç duymaktadır. Postmortem çalışmalar sonucunda GDNF enjeksiyonunun hastalığın erken dönemlerinde yani hala fonksiyonel aksonal ünite var iken yapılmasının klinik fayda ihtimalini artıracığı ileri sürülmüştür[94-97].

Farklı viral vektör yöntemleri ile tedavi seçeneğinin bir amacı da dopamin sentezini enzimler yoluyla indüklemek olarak gözükmektedir. Burada hedeflenen temel strateji striatum bölgesinde hücreleri genetik olarak modifiye edip tirozin ya da L-DOPA gibi öncü moleküllerden dopamin sentezini sağlamaktır. Yapılan hayvan çalışmalarında bu stratejinin sadece semptomları gidermede değil motor semptomların dalgalı gidişini önlemede etkili bir tedavi yöntemi olabileceği yönünde veriler elde edilmiştir. İnsan çalışmaları ise güvenlik açısından olumlu sonuçlanmış olup terapötik kullanımı konusunda ek çalışmalar yapılmaktadır. Bu şekilde enzim amaçlı diğer bir hedef subtalamik nükleusta glutamat dekarboksilaz iletimi ile GABAerjik inhibisyon aracılı tedavi yanıtı elde etmek olup bu çalışmanın faz II deneyinde olumlu sonuçlar olarak bildirilmiştir[98-100].

2.1.5.4.2. Fetal hücre transplantasyonu

1990'lı yıllar başında kürete edilen fetüsler veya abortus materyallerinden elde edilecek fetal dopaminerjik nöronların PH olan bireylere transplantı ile dopaminerjik nöronlarda artış ve klinik belirtilerin azaltılması düşüncesiyle bir

takım deneysel tedaviler denenmiştir. Bu çalışmalar sonucunda elde edilen veriler hastaların klinik fayda görmediğini ve hatta nakledilen dokudan kaynaklı olarak hastalarda kontrol edilemeyen diskineziler geliştiğini göstermiştir. Sonrasında yapılan çalışmalar bu yan etkinin nakledilen dokudaki seratonerjik nöronların sayısının azaltılması ile azaltılabileceğini gösterse de bu yönde olan çalışmalar büyük oranda durdurulmuştur[101, 102].

Bir süre sonra özellikle Kıta Avrupası'nda tekrardan başlatılan çalışmalarda ise transplante edilen dokuda da 10-15 yıl sonra Lewy Body formasyonu gözleendiği fakat bu durumun kliniğe olan etkisinin net ifade edilemediği bildirilmiştir[103]. Tedavi yöntemi ile ilgili çalışmalar nispeten küçük hasta grupları ile hala devam etmektedir.

2.1.5.4.3. Kök hücre tedavisi

Kök hücre tedavisi çalışmaları son 15 yılda kayda değer bir gelişme gösterdi. Günümüzde orta beyindeki dopaminerjik nöronların fonksiyonlarını yerine getiren sinir hücreleri insan embriyonik kök hücresi ve insandan elde edilen indüklenmiş pluripotent kök hücreden elde edilebilmektedir. Bu kök hücreler hayvan transplantı sonrasında fonksiyonunu yerine getirebilmekte, beyinde inervasyon fonksiyonu sağlamakta ve lezyon tamirini indüklemektedir[104].

Kök hücre tedavisinin insanda kullanımının ise önünde çözülmesi gereken insanla biyolojik uyum, güvenlik aralığı ve yapılması planlanan tedavinin Uluslararası Kök Hücre Araştırma Kurulu onayını alması gibi aşamalar bulunmaktadır[105]. PH ile ilgili olarak bir kaç jenerik çalışma dile getirilmiş olsa da henüz direkt olarak PH tedavisi için yapılan ve sonuç elde edilen bir kontrollü çalışma bulunmamaktadır.

2.1.5.5. Yeni tedavi yaklaşımları

PH patogenezinde rol aldığı düşünölen a-synuclein fibrilleri ve oligomerlerinin hücreden hücreye geçerek patogeneze yaptığı katkının immünolojik protein hedefli yaklaşımlarla eliminasyonu planlanmaktadır. Bir çalışmada insan a-synuclein proteini karboksi ucuna karşı antikor oluşturan ve immünizasyon sağlayan deneysel aşının transjenik fare PH modelinde hücre içi a-synuclein proteini birikimini engellediğı gözlenmiştir[106]. Yine bir başka aşı yollu faz II antikor çalışması güvenli bir şekilde a-synuclein proteinine karşı immünizasyon bildirmiştir.

Bir diğör yaklaşım ise monoklonal antikorların kullanımı ile elde edilen pasif immünizasyon yollu a-synuclein proteini eliminasyonudur. Şu anda klinik deney aşamasına gelmiş bir kaç tane aday molekül bulunmaktadır ve çalışmaların sonucu beklenmektedir. Aynı şekilde a-synuclein proteininin hücre dışı ortamda tutunmasını engelleyecek bir nevi reseptör blokeri görevi üstlenmesi beklenen çeşitli tedavi moleküllerinin dizaynı da teorik olarak gündeme gelmiştir[107, 108].

2.2. Genetik ve Parkinson Hastalığı

2.2.1. Genel Bilgiler

Birkaç dekat öncesine kadar PH, etiolojisinde sıklıkla çevresel faktörlerin rol aldığı sporadik bir hastalık olarak kabul edilmekte iken, ilerleyen teknoloji ve genetik biliminin yayılması sayesinde bu görüş yerini yeni bir anlayışa bırakmıştır[5, 16].

Genetik varyantların penetransı değişkenlik gösterse de, hastalığın temel başlangıç yaşı itibarıyla hastalık tanısı almış kişilerin yaşları dolayısıyla çocuklara genetik kalıtım ihtimali az olarak gözükse bile yapılan epidemiyolojik araştırmalar hastaların %10-30'unun aile hikayesi pozitifliği gösterdiğini bildirmiştir. Bu araştırmalar birinci derece akrabada görülen PH'nın kişinin bağlı riskini 2-7 kat artırdığını göstermektedir[109, 110].

PH için yapılan genetik korelasyon ve etiyoloji çalışmalarının anlamlı sonuçlar elde etmesinin önünde bir takım zorluklar bulunmaktadır. Bunların temelinde hastalığın değişken semptomları gözükmektedir. Hem mikroskopik görüntü düzeyinde hem de klinik olarak PH benzeri tablo gösteren pek çok farklı durum söz konusudur ve kişiye kesin bir şekilde PH tanısı koyabilmek çoğunlukla otopsi ile mümkün olmaktadır.

Hastaların tanısının koyulup genetik testlere tabi tutulması ciddi bir öneme sahiptir. Tüm bu zorluklara rağmen yapılan GWA çalışmaları sayesinde değişken penetrans gösteren çeşitli gen lokusları tanımlanmıştır. Bu gen lokuslarının etkilerinin bazıları daha kesin iken bazıları ise ek araştırmaya gereksinim duymaktadır. Bu çalışmalar sayesinde sporadik ve Mendeliyen kalıtım gözlemlenen PH grupları oluşmuştur[111].

Bulunan bu gen bölgelerinden bazıları PH için tipik olmayan ekstra klinik bulguların gözlemlendiği klinik özelliklere de yol açabilmekle birlikte, diğer bir kısım bölgelerde görülen değişimler ise daha hafif klinik olarak tanımlayabileceğimiz bir parkinsonizm tablosuna yol açabilmektedir[112]. Dolayısıyla çalışmada bildireceğimiz bazı genler etiyolojik olarak sadece PH ile ilişkilendirilmesine rağmen bir kısmı başka hastalıklar ile de ilişkilendirilebilmektedir. Araştırmalar göstermiştir ki genel görünüm olarak PH %5-10 monogenik olarak sınıflandırılırken geri kalan kısım sporadik PH olarak

sınıflandırılmakta ve hastalık süreci genetik ve non-genetik etkileşim sonucu ortaya çıkmaktadır[113].

2.2.2. Monogenik Parkinson Hastalığı

Geniş bir İtalyan aile ve akraba olmayan Yunan kökenli aileler ile 1997’de yapılan ve yayımlanan bir çalışmanın sonucu PH için genetik etioloji dönemini başlattı[31]. *SNCA* geninden tanımlanan patojenik varyantlar PH için mendeliyan kalıtım paternine sahip olabilecek bir hastalık hipotezini gündeme getirdi. Bunu takiben teknolojinin ilerlemesi ile çeşitli otozomal dominant ve resesif kalıtım gösteren genler tanımlandı. Buna rağmen yüksek penetrans gösteren ailesel vakaların nispeten küçük bir kısmında monogenik mutasyonların gösterilmiş olması geri kalan büyük kısmının hala aydınlatılmayı beklediği anlamına gelmektedir.

MPH(Monogenik Parkinson Hastalığı) için önerilen genler arasında *SNCA*, *LRRK2*, *VPS35*, *PRKN*, *PINK1*, *GBA* ve *DJ-1* genlerinde gözlemlenen patojenik değişimler ile hastalık arasındaki ilişki ikna edici gözükmektedir[1]. Sonrasında yapılan çalışmalarda MPH için önerilen başka genler de mevcuttur fakat çalışmaların bu genlerle ilgili ek destekleyici verilere ve oluşan patojenik değişimlerin PH’na yol açıp açmadığı konusunda fonksiyonel validasyonuna ihtiyaç duyulmaktadır. Yakın zamanda yapılan çalışmalar bu genlerin yanına *TMEM230*, *LRP10*, *NUS1* ve *ARSA* gibi genleri aday olarak göstermiştir.

TMEM230 geninden tespit edilen bazı varyantlar farklı iki toplumda ilk olarak PH ile ilişkilendirilse de sonra yapılan çalışmalarla desteklenememiştir[114]. Bir başka toplumda otozomal dominant geçiş gösteren Lewy Body cisimli demans ile takip edilen hastalara yapılan çalışmada *LRP10* geninin PH ile ilişkisi gösterilmiştir[115].

NUS1 ile ilgili varyantlar ise Çin popülasyonunda bildirilmiş ve hayvan deneyleri ile desteklenmiştir[116]. *ARSA* geni lizozomal hidrolaz enzimini kodlayan bir gendir ve bu gende olabilecek patojenik varyantlarının sitozolde a-synuclein metabolizmasında görev alan şaperon görevini sekteye uğratarak akümülyasyonuna yol açabileceği iddia edilse de ileri çalışmalar bu durumu desteklememektedir[117].

Görüldüğü üzere ailesel geçiş gösteren MPH için yapılan genetik çalışmaların önünde ciddi zorluklar yer almaktadır. Modern genetik tekniklerin bu konuda gelecekte bize aydınlatıcı olacağı düşünülmektedir.

2.2.3. Sporadik Parkinson Hastalığı

Sporadik olarak gözlemlenen PH etiyolojisinden küçük bir kısım genetik kökenlidir. Bu şekilde tanı almış hastaların yüksek rakamlarda toplu olarak GWA çalışmalarına tabi tutulması ile aday gen lokusları tanımlanmıştır. Bunlardan ilki 2009 yılında avrupa kökenli ırklar üzerinde yapılmış olup *SNCA* ve *MAPT* gen bölgesini aday göstermişken ikincisi ise asya orijinli olup *SNCA* genine ek olarak *PARK16*, *LRRK2* ve *BST1* gen bölgelerini aday olarak göstermiştir[118, 119]. Bu öncül çalışmaların devamında çeşitli GWA çalışmaları yapılmış ve yapılmakta olup 100 kadar aday lokus belirlenmiştir[120-123].

Elde ettiğimiz bu gelişmelere rağmen belirtmek gerekir ki GWA çalışmalarının doğasından dolayı yakalayamadığı gen lokuslarının olduğu, gerek teknik özellikler gerekse varyasyonların sıklığının azlığı ve düşük etki özelliğinin olabileceği göz önüne alındığında GWA çalışmalarında yakalanamayan aday gen lokuslarının olabileceği yayınlarla ileri sürülmüştür[124-127]. Ek olarak sporadik formları için sadece genetik varyasyonların belirleyiciliğinden de öte gen-çevre etkileşimi ve epigenetik

mekanizmalar da göz önüne alındığında kalıtım modelinin tanımlanması ve genetik etiyolojinin tam olarak rolünün aydınlatılması noktasında önümüzde duran bazı engellerin varlığı ifade edilmiştir[124, 128-131].

Yukarıda belirtilen gen bölgelerinden bazıları hem Mendeliyen gen kalıtımına uygunluk gösterirken aynı zamanda sporadik vakalarda da rol oynayabilmektedir[32, 119]. *SNCA*, *LRRK2*, *GBA* ve *VPS13C* gen lokusları buna örnektir[132]. *SNCA* geninden görülen farklı değişimlerin farklı mekanizmalarda PH etiyolojisinde rol aldığı bildirilmiştir. Bu farklı mekanizmaların ailesel kalıtım gösterebileceği gibi sporadik forma da yol açabileceği ek olarak bazı non-coding varyantların ise PH adına koruyucu etki gösterdiği bildirilmiştir[119, 133-135].

2.2.4. Panelde yer alan genler ve Parkinson Hastalığı

Bu çalışmanın yapıldığı tarih itibarı ile OMIM'de(Online Mendelian Inheritance in Man®) PH ile ilişkilendirilmiş 31 gen bulunmaktadır (**Şekil 2**). PH ile ilişkilendirilen genler gün geçtikçe artmakta ve ileride bildirilen genlere eklemeler olacağı açıkça görülmektedir. Aşağıda, çalışmada yer alan PH genetik etiyopatogenezinde rol oynayabilecek genlerden oluşan NGS gen panelimizde yer alan genler ve klinik etkileri sıralanmıştır.

Parkinson disease - PS168600 - 31 Entries						
Location	Phenotype	Inheritance	Phenotype mapping key	Phenotype MIM number	Gene/Locus	Gene/Locus MIM number
1p36.23	Parkinson disease 7, autosomal recessive early-onset	AR	3	606324	DJ1	602533
1p36.13	Kufor-Rakeb syndrome	AR	3	606693	ATP13A2	610513
1p36.12	Parkinson disease 6, early onset	AR	3	605909	PINK1	608309
1p32	{Parkinson disease 10}		2	606852	PARK10	606852
1p31.3	Parkinson disease 19b, early-onset	AR	3	615528	DNAJC6	608375
1p31.3	Parkinson disease 19a, juvenile-onset	AR	3	615528	DNAJC6	608375
1q22	{Parkinson disease, late-onset, susceptibility to}	AD, Mu	3	168600	GBA	606463
1q32	{Parkinson disease 16}		2	613164	PARK16	613164
2p13	{Parkinson disease 3}		2	602404	PARK3	602404
2p13.1	{Parkinson disease 15}		3	610297	HTRA2	606441
2q37.1	{Parkinson disease 11}		3	607688	GIGYF2	612003
3q22	Parkinson disease 21	AD	2	616361	PARK21	616361
3q27.1	{Parkinson disease 18}	AD	3	614251	EIF4G1	600495
4p13	{?Parkinson disease 5, susceptibility to}	AD	3	613643	UCHL1	191342
4q22.1	Parkinson disease 1	AD	3	168601	SNCA	163890
4q22.1	Parkinson disease 4	AD	3	605543	SNCA	163890
4q23	{Parkinson disease, susceptibility to}	AD, Mu	3	168600	ADH1C	103730
6q26	Parkinson disease, juvenile, type 2	AR	3	600116	PRKN	602544
6q27	{Parkinson disease, susceptibility to}	AD, Mu	3	168600	TBP	600075
7p11.2	Parkinson disease 22, autosomal dominant	AD	3	616710	CHCHD2	616244
12q12	{Parkinson disease 8}	AD	3	607060	LRRK2	609007
12q24.12	{Parkinson disease, late-onset, susceptibility to}	AD, Mu	3	168600	ATXN2	601517
13q21.33	{Parkinson disease, susceptibility to}	AD, Mu	3	168600	ATXN8OS	603660
15q22.2	Parkinson disease 23, autosomal recessive, early onset	AR	3	616840	VPS13C	608879
16q11.2	{Parkinson disease 17}	AD	3	614203	VPS35	601501
17q21.31	{Parkinson disease, susceptibility to}	AD, Mu	3	168600	MAPT	157140
21q22.11	Parkinson disease 20, early-onset	AR	3	615530	SYNJ1	604297
22q12.3	Parkinson disease 15, autosomal recessive	AR	3	260300	FBXO7	605648
22q13.1	Parkinson disease 14, autosomal recessive	AR	3	612953	PLA2G6	603604
Xq21-q25	{Parkinson disease 12}		2	300557	PARK12	300557
Xq24	{Parkinson disease, age of onset, modifier}	AD, Mu	3	168600	GLUD2	300144

Şekil 2 :OMIM'de Parkinson Hastalığı ile ilişkilendirilen genler

Panel genleri;

2.2.4.1. SNCA (Synuclein, Alpha): *SNCA* geni 4q22.1 sitogenetik lokasyonunda yer alan bir gen olup a-synuclein kodlamaktadır ve tarihte ilk defa PH ile ilişkilendirilen gendir[31]. Literatür verilerine göre henüz bu proteinin tam olarak fonksiyonu anlaşılamamış olsa da *SNCA* gen sekansında meydana gelen mutasyonlar PH için risk faktörü olduğu gibi gen dozajının da -*SNCA* geni duplikasyonu ve triplikasyonunu gibi- PH'na neden olması nedeniyle önemli olduğu açıktır. Yine aynı yayında *SNCA*'da görülen gain of function mutasyonların a- synuclein ekspresyonunu artırarak PH'na neden olabileceği ifade edilmiştir[136]. Ayrıca yapılan çalışmalar promotör bölgede yer alan tekrar dizileri ve intron bölgelerinde gözlenen SNP(Single-nucleotide polymorphism)'lerin PH etkeni olabileceğini göstermiştir[137]. *SNCA* geni yapılan farklı GWA çalışmaları sonucunda PH ile ilişkisi kararlı olarak bildirilen az sayıda gen bölgelerinden birtanesidir[118, 138-141].

2.2.4.2. LRRK2 (Leucine-Rich Repeat Kinase 2): *LRRK2* geni 12q12 sitogenetik lokasyonunda yer alan bir gendir ve ilk olarak 2004 yılında yapılan bir çalışmada PH ile ilgili risk faktörü olarak bildirilmiştir[142, 143]. *LRRK2* geninde bildirilen G2019S protein değişimi PH ile ilişkili en sık gözlenen mutasyonlardan biridir[144].

LRRK2 geninde oluşan mutasyonların PH oluşumuna hem sporadik hem ailesel vakalarda katkı yaptığı bildirilmiştir. Yapılan farklı GWA çalışmaları *LRRK2* geninin PH için önemli lokuslardan biri olduğunu doğrular niteliktedir[118, 139, 145]. Asya toplumlarında yapılan bir metaanalizde yine *LRRK2*'nin PH için risk faktörü olduğu gösterilmektedir[146].

LRRK2 fonksiyonu olarak bilinmeyen bir proteini kodlamaktadır. Bu proteinin üzerinde yer almakta olan enzim aktif bölgelerin mitokondriyal

fonksiyonlar, apoptoz, membran trafiği ve mikrotübül polimerizasyonu gibi işlevlere katkıda bulunduğu düşünülmektedir[147]. *LRRK2* ayrıca PH etiyogenezinde yer alan *RAB7L1, VPS35, SNCA, AKT1, MAPT* gibi başka aday genlerle de etkileşim göstermektedir[148-150].

2.2.4.3. ATP13A2 (ATPase, Type 13A2): *ATP13A2* 1p36.13 sitogenetik lokasyonunda yer alan bir endolizozomal geç transporter olup PH da dahil birden fazla nörodejeneratif hastalıkla ilişkilendirilmiştir. Yapılan farklı çalışmalar *ATP13A2* geninin jüvenil başlangıçlı homozigot ve bileşik heterozigot olarak farklı şiddetlerde gözlenen PH'na yol açtığını bildirmiştir. Gen ile ilgili genetik heterojenite ihtimali kuvvetle muhtemel olarak gözlemlenmektedir[151-154].

ATP13A2 mitokondriyal enerji yolları ve lizozomal otofaji yollarına ek olarak a-synuclein metabolizmasına da katkıda bulunmaktadır[155, 156]. Tam olarak mekanizması bilinmese de fonksiyonunun sekteye uğraması lizozomal görevleri bozmakta ve PH oluşumunda rol aldığı düşünülmektedir. Nöronlarda poliaminlerin transportunda rol aldığı ve bu bileşiklerin hücre içi birikiminin lizozomal aktiviteyi bozacağı öngörülmüştür[157].

Bazı çalışmalara göre erken başlangıçlı PH olan hastalara yapılan çalışmalarda kontrol grubuna göre daha sık gözlenen *ATP13A2* heterozigot mutasyonları olduğu belirtilmiştir ki bu da bize *ATP13A2* geninin PH için risk faktörü olduğunu ve klinik şiddet ve semptomların başlangıcı gibi faktörlerin değişkenliğinde rol aldığını düşündürmektedir[158, 159].

2.2.4.4. DNAJC13 (DNAJ/HSP40 Homolog, Subfamily C, Member 13): *DNAJC13* geni sitogenetik lokasyon olarak 3q22.1 bölgesinde yer alan, endosom ilişkili endosom-membran trafiğini düzenlediği düşünülen bir proteini kodlamaktadır. Yapılan çalışmalar *DNAJC13*'te oluşan mutasyonlar ile

meydana gelen endozom içi çözünmez formda a-synuclein birikimi arasında mekanizması tam anlaşılmasa da bağ göstermiştir. Sadece bu yolla değil mutasyon sonucu meydana gelen proteinlerin direkt olarak dopaminerjik nöron kaybına yol açtığı da bildirilmiştir[160, 161]. Yapılan bir çalışmada *DNAJC13* heterozigot mutasyonları geç başlangıçlı sporadik PH ile ilişkilendirilmiştir[162].

2.2.4.5. GIGYF2 (GRB10-Interacting Gyf Protein 2): *GIGYF2* geni 2q37.1 bölgesinde yer alan, insülin reseptörleri ve metabolizmasıyla ilişkili olan bir gen kodlamaktadır. Nöron hücrelerinin glukoz hassas metabolizması ve bu şekilde dopaminerjik nöronların korunmasında olası bozuklukların PH'na yol açabileceği bildirilmiştir[163]. İlk olarak 2009'da Fransız ve İtalyan sporadik PH vakalarında olası aday gen olarak bildirilen *GIGYF2* geninin PH'na nasıl yatkınlık oluşturduğu mekanizması tam olarak aydınlatılamamıştır[164]. Yapılan bir metaanalize göre ise *GIGYF2* geninde tespit edilen varyantların farklı ırklarda farklı şekilde risk faktörü olarak sınıflandırılabilceği bildirilmiştir[165].

2.2.4.6. HTRA2 (Htra Serine Peptidase 2): *HTRA2* geni sitogenetik olarak 2p13.1 bölgesinde yer alan ve mitokondriyal bir proteaz olarak görev alan high-temperature-regulated A2 proteinini kodlamaktadır. Bu protein mitokondriyal moleküler kalite kontrolünde anahtar düzenleyicilerden biri olarak fonksiyon görmektedir[166]. PH nöropatolojisi ve mitokondri fonksiyonları arasındaki ilişki göz önüne alındığında *HTRA2*'de oluşabilecek mutasyonların hastalığa yol açma ihtimali ortaya çıkmaktadır.

Türkiye'den yapılan 6 kuşak bir çalışmada akraba evliliği olan çiftin homozigot olarak kalıttıkları mutasyon PH nedeni olarak bildirilmiştir[167]. Almanya orijinli bir başka çalışmada ise sporadik 4 PH olgusunda bulunan heterozigot mutasyon sağlıklı kontrollerde olmadığı için hastalıkla ilişkili olabileceği bildirilmiştir[168]. *HTRA2* ve PH arasındaki ilişki tam net olarak aydınlatılamasa da, hangi tür varyantların nasıl bir etkiye sahip olacağı tam

olarak bildirilmese de literatürde bu bölge özellikle sporadik PH etiyogenezinde rol oynama ihtimali olan aday gen bölgelerinden bir tanesidir[169].

2.2.4.7. MAPT (Microtubule-Associated Protein TAU): *MAPT* geni 17q21 bölgesinde yer alan ve kodladığı mikrotübül düzenleyici protein-tau ile sıklıkla beyin hücrelerinde eksprese olan bir genidir. Bu protein aksonal transporta ek olarak hücre sitoskeletonine destek sağlamaktadır[170]. *MAPT* geninin iki farklı haplotipi bulunmaktadır ve bu gende meydana gelen değişimler birden çok nörodejeneratif hastalıkla ilişkilendirilmesine rağmen özellikle H1 haplotipi ile PH arasında ki bağ GWA çalışması ile de doğrulanmıştır[118]. Özellikle dominant kalıtım gösteren *MAPT* mutasyonlarının PH ve çeşitli nörodejeneratif hastalıklarla olan ilişkisi literatürde uzun zaman önce bildirilmiş olarak bulunmaktadır[171, 172].

2.2.4.8. PLA2G6 (Phospholipase A2, Group VI): *PLA2G6* geni sitogenetik olarak 22q13.1 lokusunda yer alan fosfolipazların hidrolizinde görev alan bir protein ürünü kodlamaktadır. *PLA2G6* mutasyonları çok çeşitli nörodejeneratif hastalığın yanı sıra erken başlangıçlı otozomal resesif PH ve orta-geç başlangıçlı sporadik PH ile ilişkilendirilmiştir[173].

2.2.4.9. PARK2 (Parkin-PRKN): *PRKN* geni sitogenetik olarak 6q26'da yer alır ve bir protein ligaz enzimi kodlamaktadır. Bu gende meydana gelen ve enzimde aktivite kaybına yol açan mutasyonlar mitofajiyi (zarara uğramış mitokondrilerin eliminasyonu) sekteye uğratmakta, hücre içi protein akümüülasyonuna neden olmakta ve mitokondriyi disfonksiyona uğratmaktadır[174]. *PRKN* geninde meydana gelen homozigot mutasyonlar en sık görülen otozomal resesif juvenil PH genetik etiyolojisi olarak karşımıza çıkmaktadır[175].

PRKN geninin *PINK1* ile birlikte zarara uğramış mitokondrilerin temizlenmesinde anahtar rolde olduğu ve bu genlerde meydana gelen

homozigot ve bileşik heterozigot mutasyonların bu rolü sekteye uğratıp erken başlangıçlı PH'na yol açtığı uzun zamandır bilinmektedir[176].

2.2.4.10. PARK7/DJ1 (Parkinson Disease 7): *DJ1* geni 1p36 sitogenetik bölgesinde yer almaktadır. Kodlamış olduğu protein hücrede antioksidan görevi, transkripsiyon regülasyonu, moleküler şaperon ve protein degradasyonu olaylarında rol almaktadır[177]. Bu gende meydana gelen fonksiyon kaybettirici mutasyonlar erken başlangıçlı otozomal resesif PH ile ilişkilendirilmiştir. *DJ1* geninde meydana gelen mutasyonlar PH dışında başka nörodejeneratif hastalıkların patogenezinde de rol almaktadır[178].

2.2.4.11. PINK1 (Pten-Induced Putative Kinase 1): *PINK1* geni sitogenetik lokasyon olarak 1p36.12 'de yer alan ve PTEN bağımlı putativ kinazı kodlayan bir gendir. Bu protein ürünü özellikle *PARKIN* ile birlikte mitokondriyal kalite kontrol ve mitofajide çok önemli rol oynamaktadır[179]. Yaşla sıklığı artmakta olan hasarlı mitokondrilerin birikimi PH da dahil bir çok nörodejeneratif hastalığın altında yatan nedenlerden birisi olarak bildirilmiştir.

PINK1 geninde meydana gelen mutasyonlar bu mitokondri temizliği sürecini sekteye uğratarak PH için predispozisyon oluşturmaktadır[180]. *PINK1* geninin *PRKN* ile birlikte zarara uğramış mitokondrilerin temizlenmesinde anahtar rolde olduğu ve bu genlerde meydana gelen homozigot ve bileşik heterozigot mutasyonların bu rolü sekteye uğratıp erken başlangıçlı PH'na yol açtığı uzun zamandır bilinmektedir[176].

2.2.4.12. VPS35 (Vacuolar Protein Sorting 35): *VPS35* geni 16q11.2 sitogenetik bölgesinde yer almaktadır. *VPS35* tarafından kodlanan gen hücre içi protein trafiğinden sorumlu bir retromer grubunun üyesi olarak görev yapmaktadır[181]. Bu retromer kompleksinin disfonksiyonu çeşitli nörodejeneratif hastalıklarla ilişkilendirilmiştir[182].

VPS35 geninde özellikle korunmuş bölgelerde meydana gelen heterozigot mutasyonlar erken başlangıçlı otozomal dominant kalıtıma uyan PH ile birçok farklı çalışma tarafından ilişkilendirilmiştir. Sporadik PH için risk faktörü olarak aday gen olduğunu bildiren çalışmalar da mevcuttur[183-185].

2.2.4.13. SYNJ1 (Synaptojanin 1): *SYNJ1* geni 21q22.11 yer almaktadır ve sinaptojanin 1 isimli proteini kodlamaktadır. Bu protein sinaptik veziküllerin fosforilasyonunda önemli rol oynamakta ve geri dönüşümünü sağlamaktadır[186]. Bu gende meydana gelen yıkıcı mutasyonlar sinaptik vezikül siklusunu sekteye uğratmaktadır fakat PH ile ilgili olan mekanizması tam olarak aydınlatılamamıştır. Literatürde *SYNJ1* mutasyonlarının otozomal resesif PH ile ilişkilendiren –bazı yayınlara göre erken başlangıçlı PH- birden fazla farklı yayın bulunmaktadır[187, 188].

2.2.4.14. CHCHD2 (Coiled-Coil-Helix-Coiled-Coil-Helix Domain-Containing Protein 2): *CHCHD2* geni 7p11.2 sitogenetik lokasyonunda yer almaktadır. Kodlamış olduğu protein ürününün tam olarak ne fonksiyon gördüğü bilinmese de mitokondriyal krista yapısının korunması ve sürdürülmesinde görev aldığı düşünülmektedir[189].

Yapılan fonksiyonel çalışmalara göre bu gende meydana gelen mutasyonlar mitokondriyal respiratuar komplekslerde bozulmaya neden olmakta ve oksijen metabolizmasını sekteye uğratmaktadır. Bu durum nöronlarda hayatta kalımı oksidatif strese bağlı olarak kısaltmaktadır[190-192]. *CHCHD2*'de meydana gelen mutasyonları hem sporadik PH için risk faktörü olarak tanımlayan hem de ailesel dominant kalıtmı PH ile ilişkilendiren çalışmalar mevcuttur[32, 193, 194].

2.2.4.15. EIF4G1 (Eukaryotic Translation Initiation Factor 4-Gamma, 1): *EIF4G1* geni 3q27.1 bölgesinde yer almaktadır. Kodladığı protein ürünün translasyon başlatıcı kompleks ile bağlantılı olarak mRNA-Ribozom bağlantısı

ve protein sentezi başlangıcı süreçlerinde rol almaktadır. Bu yolakta meydana gelebilecek değişikliklerin protein sentezini bozarak PH sürecinde yer alabileceği düşünülmektedir [195].

Yapılan bir çalışmada *EIF4G1* mutasyonu heterozigot olarak dominant kalıtım paternine uyumlu şekilde geç başlangıçlı PH ile ilişkilendirilmiştir[196]. 2000'den fazla sayıda hastadan oluşan Avrupa popülasyonlu kohortta benzer şekilde ailesel otozomal dominant kalıtımı işaret eden *EIF4G1* varyantları bildirilmiştir[197].

Yapılan bir başka metaanalizde ise PH olan popülasyonda *EIF4G1* sinonim olmayan değişimlerinin frekansı %1'den daha az olduğu bildirilerek PH için aday bir gen olduğu ama varyasyonlarının oldukça nadir gözlenmekte olduğu ifade edilmiştir[198].

2.2.4.16. FBX07 (F-Box Only Protein 7): *FBX07* 22q12.3 sitogenetik lokasyonunda yer almakta olan bir gendir. Kodladığı protein hücre içi çok önemli süreçlere katkıda bulunup, sinaps nöroplastisitesi, hücre proliferasyonu ve sirkadiyan ritim gibi fonksiyonların devamında ve düzenlenmesinde rol alan F-box içeren protein grubu ailesindedir. PH ile ilişkisinin ise *FBX07*'nin, ubiquitinasyon sürecinde adaptör protein fonksiyonundan kaynaklandığı düşünülmektedir[199, 200].

FBX07 geninde meydana gelen mutasyonlar erken başlangıçlı ağır seyreden otozomal resesif juvenil PH ile ilişkilendirilmiştir[201]. Yapılan çalışmalar bu gende meydana gelen hem homozigot mutasyonların hem de bileşik heterozigot mutasyonların erken başlangıçlı PH'na yol açtığını bildirmektedir[202].

2.2.4.17. FGF20 (Fibroblast Growth Factor 20): *FGF20* 8p22 lokasyonunda yer almakta olup fibroblast büyüme faktörüne ait bir alt tipi kodlamaktadır. *FGF20* özellikle beyinde bazı bölgelerde eksprese olmakta ve dopaminerjik nöronların korunmasında görev yapmaktadır[203]. Ayrıca a-synucleinin ekspresyonundaki regülasyonda rol almasından dolayı gende meydana gelebilecek mutasyonların PH için aday genetik faktör olarak literatürde bildirildiğini görmekteyiz[204].

Yapılan bir çalışmada *FGF20* geninde bulunan bazı değişimlerin PH ile korelasyon gösterdiği bildirilse de aksi yönde fikir bildiren başka çalışmalar da mevcuttur[205, 206]. *FGF20*, PH patogenezinde yer alması 'olası' bir gen gibi gözükmemektedir.

2.2.4.18. UCHL1 (Ubiquitin Carboxyl-Terminal Esterase L1): *UCHL1* sitogenetik olarak 4p14 bölgesinde yer almaktadır. Kodladığı gen ürünü ubiquitin yapım yıkımı ile yakından ilişki içerisindedir. Mutant formda olan protein ürünlerinin protein yapısında yer alan alfa heliks yapıdan daha az içerdikleri ve hücre içi akümülyasyon gösterdikleri dolayısıyla dominant form PH'na yol açtıkları bildirilmiştir[207, 208].

Yapılan bir çalışmada bu gende meydana gelen mutasyonun otozomal dominant paterne uyan PH'na yol açtığı bildirilmiştir[208]. *UCHL1* ve PH arasında her hangi bir ilişki kurulamayan farklı çalışmalar da literatürde mevcuttur[209].

2.3. YENİ NESİL DNA DİZİLEME TEKNOLOJİSİ

2.3.1. DNA Dizileme Teknolojisinin Gelişim Süreci

Adenin (A), Guanin (G), Sitozin (C) ve Timin (T) bazlarının deoksiriboz şeker ve fosfat bağlarıyla oluşturduğu nükleotidlerin belli bir sıraya göre dizilmesi ile oluşan Deoksiribonükleik asit (DNA), bilindiği gibi insan genomunun başat ögesi durumundadır. Bu doğrultuda bilim dünyasında uzunca bir süre en temel amaçlardan biri insan genomunun dizisini doğru bir şekilde tespit etmek olmuştur.

DNA dizileme teknolojisi için 1977 yılı bir dönüm noktası olmuştur. Bu tarihten önceki yöntemlerle ancak kısa bir DNA dizisi oluşturulabilmekte ve bu işlem için ise primitif yöntemler kullanılmakta idi. 1977 yılında Maxam ve Gilbert ile Sanger ve Coulson iki farklı DNA dizileme teknolojisi geliştirdi ve bu yıldan sonra moleküler biyoloji ve genetik alanında gelişmeler çok hızlı bir şekilde arttı[210, 211].

İlk zamanlarda Maxam-Gilbert metodu Sanger-Coulson yöntemine göre daha yeni ve daha kolay uygulanabilir olduğu için popüler olsa da Sanger yönteminin gelişmesiyle Maxam-Gilbert tekniği fazlaca zararlı kimyasal içerdiği ve zorluğu nedeniyle bırakılmıştır. Sanger DNA dizileme yönteminin temelini modifiye edilmiş dideksinükleotid trifosfatların (ddNTP) kullanımına bağlı zincir sonlanması üzerine idi. Bu reaksiyon için normal dNTP'ler, modifiye ddNTP'ler, DNA polimeraz, kalıp DNA ve dizilenmek istenilen bölgeye spesifik primerler gerekmektedir. İlk zamanlar reaksiyonlar 4 farklı şekilde kuruluyor, ilgili primerler radyoaktif olarak işaretleniyordu.

DNA polimeraz normal dNTP'leri kullanarak zinciri uzatırken modifiye edilmiş ddNTP'ler geldiğinde zincir sonlanıyor ve kurulan 4 farklı örnek jel elektroforezine yüklenip X-ray filme aktarıldığında farklı boyutta bantlar görülerek dizi okunuyordu. Sonraları ddNTP'ye bağlanan hazır boyalarla bu 4 reaksiyon tek bir multipleks reaksiyona dönüştürülmüş, kapiller elektroforez sistemi ile otomatize edilmiştir.

Floresan işaretleme tekniğinin gelişmesi Sanger yönteminin kullanımını önemli oranda yaygınlaştırmıştır. Optimize edilen bu yöntem 40 yıldır kullanılmakta ve NGS teknolojisinin yanında hala önemini korumaktadır.

DNA dizileme yöntemleri teknolojiyle birlikte ilerleme kaydetti. Özellikle 1990 yılında insan genom projesinin başlatılması konuya verilen önemin artışının net bir göstergesiydi. İnsanlık tarihinin en büyük biyolojik ortaklık projesi olarak kayıtlara geçen bu projeyi farklı devletler desteklemiş, onlarca üniversite ve araştırma merkezi projede yer almıştır.

İnsan genom projesinin primer amacı yaklaşık 3,2 milyar bazdan oluşan haploid insan genomunun tam dizisini belirlemektir. Bunun yanında küçük genoma sahip farklı organizmaların da genom dizileri ortaya koyulmuştur. Devasa kaynaklar harcanan ve yaklaşık 15 yıl alan bu projenin sonuçlarının 2001 yılında ilk makalesi ve sonunda 2004 yılında tüm insan genomu dizisi yayınlanmıştır [212, 213].

Referans insan genomunun tespit edilmesinden sonra sıra bu dizideki farklılıklar ve hastalık patogenezi arasındaki ilişkinin kurulması adına yeni nesil dizileme yöntemleri zaruri bir ihtiyaç haline geldi ve hızlı bir şekilde günümüz koşullarına ulaştı. Farklı platformlar ve tekniklerle geliştirilen NGS tekniği

günümüzde çok çeşitli cihaz ve malzemelerle dünyanın her yerinde kullanılmaktadır.

2.3.2. Yeni Nesil DNA Dizileme Teknolojisinin Prensipleri

NGS literatürde; "Massively Parallel Sequencing", "Deep Sequencing" ve "Shotgun Sequencing" gibi farklı isimlendirmelerle de adlandırılmıştır. NGS yönteminin kullandığı temeli DNA molekülünün her hücre bölünmesi esnasında replikasyonuna dayanır. DNA replikasyonu için; kalıp DNA, polimeraz enzimi ve dNTP'lere ihtiyaç vardır. Bu üçlüyü farklı tekniklerle kullanarak bir araya getirerek NGS dizileme dediğimiz olay meydana gelir.

NGS çalışması 4 başlık altında incelenebilir: kütüphane hazırlama, amplifikasyon, dizileme ve analiz. Kütüphane hazırlama işlemi için ilk aşama uygun kalite ve miktarda oluşan kalıp DNA'nın fragmentasyon(parçalara ayırma) işlemidir. Bu işlem enzimatik olarak veya fiziksel yöntemlerle gerçekleştirilebilir. Küçük parçalara ayrılan DNA molekülünün uçları tamir edildikten sonra adaptörler (küçük, çift-zincir sentetik DNA parçaları) DNA ligaz enzimi yardımıyla takılır. Hedef bölgeye yönelik hazırlanan kütüphane, polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ve klonal amplifikasyon yöntemiyle çoğaltılır.

Amplifiye edilen klonal ampikonlar dizileme cihazına yüklenir farklı dizileme çeşitlerinden biri ile dizilenir. Dizileme işlemi sonucunda elde edilen ham veri, çeşitli yazılımlar yardımıyla analize hazır hale getirilmektedir. Bu aşama, NGS ile elde ettiğimiz verilerin belkide en önemli ve zor aşaması olan verilen analizi kısmına geçtiğimiz yerdir. Karşılaşılan en önemli zorluk, NGS teknolojilerinin kullanımının ucuzlaması ve yaygınlaşmasıyla dizileme işleminin daha ulaşılabilir olması, elde edilen genetik verinin her geçen gün artması fakat verilerin yüksek doğrulukla analiz edilmesi işleminin giderek zorlaşmasıdır [214, 215]

2.3.3. Yeni Nesil DNA Dizileme Kullanım Alanları

NGS, insan sağlığı ve hastalıkları, virüsler ve bakteriler gibi tüm organizmaların tespiti, atasal DNA analizi, evrimsel biyoloji, bitkilerin ve hatta tüm ekosistemin DNA dizisini anlamak gibi çok geniş bir spektrumu oluşturan alanlarda kullanılmaktadır. NGS yönteminin insan sağlığını ilgilendiren başlıca kullanım alanları şunlardır:

- Tek gen hastalıklarının (Mendeliyan) tanısı,
- Konjenital anomalileri olan hastalarda, bilişsel gerilik ve otizm spektrum bozukluk tanısı olanlarda hastalık nedeni olan varyantın tespiti,
- Genetik heterojenitesi olan hastalıklara (kalp hastalıkları, nörodejeneratif hastalıklar vs.) yönelik gen panelleri ile hastalığa neden olan bütün genlerin aynı anda analiz edilmesi,
- Sporadik kanser olgularında somatik mutasyonların oransal tespiti (klonal),
- Kanser vakalarında erken tanı amacıyla kanda dolaşan serbest DNA'nın analiz edilmesi,
- Anne kanındaki serbest fetal DNA'yı kullanarak prenatal genetik tanı,
- Ailesel vakaları kullanarak Mendeliyan ve kompleks hastalıklarda hastalık yapıcı aday gen tespiti

2.3.4. Varyantların Yorumlanması

Yeni nesil DNA dizileme analizi ile her hastaya ait, referans diziden farklı olan varyant ortaya çıkmaktadır. Bu teknolojinin ne kadar yaygın kullanıldığı göz önüne alındığında ortaya çıkan bu milyonlarca varyantın hastalık oluşumuna neden olup olmayacağı sorusu yanıtlanmak üzere önümüze gelmektedir. Bu varyantların hastalık etkeni olup olmadıklarını anlamak, genom analizi için önümüzdeki en büyük problemi oluşturmaktadır. Bu probleme çözüm amacıyla çok sayıda biyoinformatik yazılım geliştirilmektedir.

Bu tez çalışmasında olgularda tespit edilen varyantları değerlendirmek için biyoinformatik araçlar kullanılmıştır. Bizim çalışmamızın başlığında belirtmiş olduğumuz **in-silico** terimi (kelime anlamı "silikonda" karşılık gelir, bilgisayar çipleri için silikonun toplu kullanımına atıfta bulunur), biyolojik deneylere atıfta bulunarak "bilgisayarda veya bilgisayar simülasyonu yoluyla gerçekleştirilen" anlamına gelen bir ifadedir. Çalışmada, zamanla birlikte sürekli güncellenen ve bakımları yapılan, tahmin doğrulukları yüksek ve sınıflandırma kriterleri güçlü olan, güncel literatür ile sürekli desteklenen Clinvar ve buna ek olarak American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG) veri programları baz alınarak analiz yapılmıştır.

2015 yılında NGS yöntemi uygulanması sonucu tespit edilen varyantların analizinin ve raporlanmasının optimize edilmesi için ACMG, Association for Molecular Pathology (AMP) ve College of American Pathologists grupları tarafından bir kılavuz yayınlanmıştır[216]. Halen kullanılan bu klavuzun ayrıntıları ve nasıl yorumlanacağı **Tablo 3** ve **Tablo 4**'te özetlenmiştir. Kılavuzda; standart bir terminoloji oluşturmanın Mendeliyan hastalıklara neden olan genlerdeki mutasyonları tanımlamak için gerekli olduğu vurgulanmıştır ve varyantlar "patojenik", "muhtemel patojenik", "klinik önemi bilinmeyen", "muhtemel benign" ve "benign" olarak gruplandırılmıştır.

ClinVar veritabanı ise Amerikan Ulusal Sağlık Enstitüsü bünyesinde bulunan 1300'den fazla klinik test laboratuvarları, araştırma laboratuvarları, klinisyenler, hasta girişleri, uzman görüşleri gibi çok farklı kurum ve kişilerin varyantlar hakkında belli kriterler ve kanıtlar çerçevesinde bildirim yaptığı ve kümülatif bir değerlendirme mantığı ile çalışan bütün araştırmacılar tarafından istendiğinde amacına uygun kullanılabilen bir genetik veritabanı olarak yer almaktadır[217].

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. OLGU SEÇİMİ

Bu araştırmada, 2018 ve 2019 yılları içerisinde Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Tıp Fakültesi Genetik Tanı ve Tedavi Merkezine Parkinson hastalığı, parkinsonizm Şikayetleri, aile hikayesi ve insidental genetik bulgu nedeniyle başvuran 43 hastanın laboratuvar verileri ve klinik bilgilerinin retrospektif olarak değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Bu hastalara ait verilerin oluşturulması için Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Tıp Fakültesi Genetik Tanı ve Tedavi Merkezi bünyesindeki imkanlar kullanılmıştır.

Araştırmada kullanılan bütün bireylere ait retrospektif akademik verilerle ilgili bilgilendirilmiş onamlar ve klinik uygulamalar etik onayları alınmıştır. Olguların seçimi için tarafımıza ilgili tarihlerde yönlendirilmiş tüm hastalarımız çalışmaya dahil edilmesi suretiyle olmuştur. Demografik ve klinik özelliklere ait veriler muayene sırasında ve hastane elektronik veri kayıt sisteminden retrospektif olarak elde edilmiştir. Hastaların klinik hikayesi, yaşı, tanı yaşı, cinsiyeti, ilaç kullanım ve pestisit maruziyet öyküleri var ise görüntüleme teknikleri ile elde edilmiş veriler kaydedilmiştir.

3.1.1. Kişilerin bilgilendirilmesi, aydınlatılmış onam ve etik kurul onayı

Olgulara ait tanı ve tedavi amaçlı üretilen akademik verilerin retrospektif olarak değerlendirilmesi amaçlanan mevcut projede; araştırmaya dahil edilen bütün hastalara ait pedigree analizleri, öykü ve klinik bilgileri başvuru sırasında ayrıntılı olarak rapor edilmiş, aydınlatılmış onam formları hasta ve/veya yasal vasilerden ıslak imzalı Şekilde alınmıştır. Ayrıca bazı olgulara ait tarafımızdan eksik olduğu tespit edilen klinik veya demografik bilgiler laboratuvar

kayıtlarımızdaki iletişim bilgileri doğrultusunda telefonla prospektif olarak tamamlanmıştır.

Hastalara ilk değerlendirme sonucunda raporları ve genetik danışma verilmiş ve ileri gelecekte tekrardan sonuçlarının değerlendirilme ihtimali ifade edilmiştir. Bireylerin daha önceden Parkinson Hastalığı NGS analizleri için oluşturulan dataları kontrol edilmiştir. Araştırmanın etik açıdan uygunluğu "Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu" 23.09.2020 tarih ve 2020-12 no'lu karar ile onaylanmıştır.

3.2. NGS ÇALIŞMA PRENSİPLERİ

3.2.1. Çalışmada Kullanılan Panelin Özellikleri

Çalışmada, **Tablo 2**'de yer alan 18 genin ekzon ve ekzon-intron bileşke bölgelerindeki +-10 baz değişiklikleri saptayacak şekilde, GRCh37 (hg19) referans dizisi baz alınan, Thermo Fisher Scientific tarafından hazırlanan özel üretim (custom design) panel kullanıldı. **Tablo 2**'de panelde bulunan 18 gen özetlenmiştir.

3.2.2. DNA İzolasyonu

Hastalardan çalışma için EDTA (Ethylene diamine tetra acetic acid) içeren tüpe 2 ml venöz kan örneği alındı ve Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Tıp Fakültesi Genetik Tanı ve Tedavi Merkezine transfer edildi. DNA izolasyonu, PureLink™ Genomic DNA Mini Kit (Invitrogen, Almanya) kullanılarak üreticinin protokolleri doğrultusunda gerçekleştirildi.

İzolasyon için Heat Block 55°C ye ayarlandı. O ısınırken izolasyon için hazırlıklar yapıldı. 2 ml ependorf tüpün içine 200 µl kan örneği kondu, üzerine 20 µl proteinaz K ve 20 µl RNAaz A eklendi. Örnekler kısa bir vortex ve spin yapıldı 2 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. İnkübasyon sonrası 200 µl PureLink Genomic Lysis/Binding Buffer eklenip vortex spin yapıldıktan sonra 55 °C de 10 dakika inkübasyon yapıldı. İnkübasyon bittikten sonra örneğin üzerine 200 µl etanol (%96-100) eklendi, vortex ve spin yapıldı. Örneğin tamamı spin column'a aktarıldı 10.000 RPM'de 1 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrasında collection tüp atılıp spin column yeni collection tüpe aktarıldı ve üzerine 500 µl Wash Buffer 1 eklendi 10.000 RPM'de 1 dakika santrifüj edildi. Yıkama işlemi bir kez daha Wash Buffer 2 ile tekrar edildi. Yine aynı şekilde collection tüp atılıp spin column yeni collection tüpe aktarıldı ve üzerine 500 µl Wash Buffer 2 eklendi 14.000 RPM'de 3 dakika santrifüj yapıldı. Collection tüp atıldı ve spin column temiz ependorf tüpe konuldu, üzerine 100 µl PureLink Genomic Elution Buffer eklendi ve 2 dakika oda sıcaklığında inkübasyon edildi. İnkübasyon sonrasında 14.000 RPM'de 2 dakika santrifüj yapıldı ve DNA'lar hazır hale getirildi.

3.2.3. DNA Kütüphanesinin Hazırlanması ve Pürifikasyonu

İzole edilen DNA'nın miktar ve kalite analizi için Qubit ile DNA ölçümü yapıldı. Ölçüm için 1/200 oranında Working solution hazırlandı. Örnekler ve standartların ölçümünü yapmak için kullanılacak Working solutiona; 1 µl Qubit Reagent ve 199 µl Qubit Buffer eklendi. Örneklerin ölçümü yapılmadan önce standartların ölçümü yapıldı bunun için, 2 ayrı tüpe 190 µl Working solution ve tüplerden birinin üzerine 10 µl Standart 1, aynı şekilde diğer tüpe de 190 µl Working solution ve 10 µl Standart 2 eklendi. Vortex ve kısa bir spin sonrasında, standart ölçümleri yapıp örneklerin ölçülmesine geçildi. Örneklerin ölçümü için 198 µl Working solution ve 2 µl DNA örneği kullanıldı. Qubit cihazı üzerinde dsDNA-High Sensitivity 2 ng/µl seçilip örnekler ölçüldü. Ölçüm sonrasında DNA örnekleri 10ng/ µl olacak şekilde nuclease free su ile dilüe edildi. Dilüsyon için 8'li strip tüpler kullanıldı.

3.2.3.1. KÜTÜPHANE HAZIRLIĞI

Parkinson paneli 2 poola sahiptir yani tek bir örnek için 2 ayrı PCR yapılır. Her bir pool 10 µl hacme sahip olacak şekilde PCR mixi hazırlanır. Ion AmpliSeq™ Library Kit 2.0 kitinden gerekli malzemeler soğuk rack üzerinde erimeye bırakıldı.

1.pool PCR mixi için;

5X Ion AmpliSeq HiFi Mix	2 µl
2X Ion AmpliSeq Primer Pool 1	5 µl
gDNA (10ng/ µl)	2 µl
Nuclease free su	1 µl

2.pool PCR Mixi için;

5X Ion AmpliSeq HiFi Mix	2 µl
2X Ion AmpliSeq Primer Pool 2	5 µl
gDNA (10ng/ µl)	2 µl
Nuclease free su	1 µl

PCR, plate üzerinde yapıldı, soğuk rack üzerine alınan plate'e hazırlanan mix'den 8 µl dağıtıldı ve üzerine 2 µl dilüe DNA örnekleri konuldu. Plate'i kısa bir vortex ve spin yaptıktan sonra Thermalcycle'a konuldu ve aşağıdaki programa göre reaksiyon başlatıldı.

PCR Programı

99 °C _____ 2 dk	} 18 cycle	Ramp speed: Standart Reaksiyon Süresi : 1 saat 40-45dk.
99 °C _____ 15 sn		
60 °C _____ 4 dk		
4 °C _____ Hold		

Parkinson panel için cycle sayısı 18'di.

PCR sonunda 1 örneğe ait tüm PCR ürünleri tek bir kuyucukta toplandı ve 20 µl hacim elde edildi.

3.2.3.2. DİGESTİON

Ion AmpliSeq™ Library Kit 2.0 kitinden çıkarılan FuPA Reagent enzimi buz üstünde erimeye bırakıldı. Enzim hafif pipetaj ve spin yapıldıktan sonra her bir örneğin üzerine tek tek 2 µl dağıtıldı. Toplam hacim 22 µl'ye çıktı. Plate kısa bir vortex ve spin yapılarak Thermalcyclers'a konuldu.

Thermalcyclers programı :

50 °C _____ 10 dk

55 °C _____ 10 dk

60 °C _____ 20 dk

10 °C _____ 59 dk

Reaksiyon süresi : 40 dk.

22 µl hacim seçildi.

Digestion aşaması devam ederken barkod hazırlığına geçildi. Toplam hacim 8 µl olacak şekilde mix hazırlandı.

Barcode Adapter Mix

Ion P1 Adapter 2 µl

IonXpreeBarcode X 2 µl

Nuclease Free su 4 µl

3.2.3.3. LİGASYON

Ion AmpliSeq™ Library Kit 2.0 kitinden gerekli malzemeler soğuk rack üzerinde erimeye bırakıldı. Malzemeler eridikten sonra DNA Ligase hariç diğer malzemeler vortex ve spin yapıldı. DNA Ligase ise hafif pipetaj ve spin yapıldıktan sonra bir mix hazırlandı. Plate soğuk rack üzerine alınıp mix'den 8 µl dağıtıldı ve toplam hacim 30 µl oldu. Plate kısa bir vortex ve spin yapılarak Thermalcyclers'a konuldu.

Switch Solution 4 µl

Dilüe edilmiş Barcode Adapter Mix 2 µl

DNA Ligase 2 µl

Thermalcycler programı :

22°C _____ 30 dk

72°C _____ 10 dk

10°C _____ Hold

Reaksiyon süresi :40 dk.

3.2.3.4. PÜRİFİKASYON

Agencourt AMPure XP (+4 °C)

1. AMPure XP Reagent oda sıcaklığına ulaşana kadar bekletildi, Beadler iyice vortexlendi ve tamamen dağılana kadar yavaşça pipetaj yapıp kullanıldı.
2. ION LIBRARY KIT ten Platinium PCR SUPER MIX ve Amplification Primer MİX -20 °C'den çıkarıldı ve buz üzerinde erimeye bırakıldı.
3. Taze %70'lik Etanol hazırlandı ve %99'lık Ethanol için örnek başına = 230 µl Absolute Ethanol + 100 µl NF Su × 2 şeklinde ekleme yapıldı.
4. Her well üzerine (toplam hacmin 1,5X katı olacak şekilde) 45 µl Agencourt AMPure XP eklendi ve üzeri strip kapakları ile kapatıldı.
5. Plate, vortex ile 1500-2000 rpm'de 15-20 saniye iyice karışana kadar karıştırma yapıldı.
6. Plate oda sıcaklığına alınıp 5 dk bekletildi.
7. İnkübasyon sonrası, plate manyetik 13'lü manyetik standı alındı 1-12 şeklinde sütunlara denk gelecek şekilde plate yerleştirildi.
8. Karışım tamamen temizlenene kadar beklendi.
9. Multichannel pipet kullanılarak pellete zarar vermeden supernatantlar atıldı.
10. 150 µl taze %70'lik etanol beadlerin üstü kapanacak seviyeye kadar eklendi.
11. 5 kez olmak üzere plate 1-12 sütunlardan alınıp 2-13 sütun hizasına yerleştirilerek yıkama yapıldı.
12. Son yıkama adımı sonrasında plate 1-12 sütun hizasına geri getirilip 1 dakika beklendi.
13. Beadler tamamen kuyucuk çeperlerine yapıştıktan sonra pellete zarar vermeden supernatantlar atıldı.

14.10-12. adımlar, 1 kez daha tekrar edildi.

15.1-10 μl multichannel pipet kullanılarak tüplerin dibinde kalan etanol damlacıkları da uzaklaştırıldı. Etanolün tamamen uzaklaştırılması için plate ağzı açık şekilde 2-3 dakika oda sıcaklığında manyetik stant üzerinde bekletildi.

3.2.3.5. AMPLIFIED LIBRARY'NİN Qubit ile ölçülmesi

Bu aşamada çok vakit kaybetmeden Ion AmpliSeq™ Library Kit 2.0 kitinden PCR Super Mix Hi Fi ve Amplification Primer Mix soğuk rack üzerinde erimeye bırakıldı. PCR Super Mix Hi Fi köpürdüğü için dikkatli bir şekilde vortex ve spin yapıldı. Aynı şekilde Amplification Primer Mix'de vortex ve spin yapıldı.

PCR Super Mix Hi Fi.....45 μl

Amplification Primer Mix.....1.8 μl

olacak şekilde bir mix hazırlandı ve plate buz üzerine alınarak 45'er μl tek tek beadların üzerine bırakıldı. Plate vortex ve spin yapıldıktan sonra manyetik stand üzerinde temizlenene kadar bekletildi. Tamamen berraklaşan supernatanttan beadlere dokunmadan 45 μl alınarak yeni bir plate'e ya da kullandığın plate üzerinde bulunan temiz boş wellere aktarıldı. Aşağıdaki programa göre reaksiyon başlatıldı.

Thermalcycler programı :

98°C.....2 dk

98°C.....15 sn

Reaksiyon süresi :10-15 dk.

54°C.....1 dk

10°C.....~

Purify the amplified library (DynaMAG 96'lık plate magnet ile)

Agencourt AMPure XP (+4 °C)

2 aşamalı purifikasyon çalışması yapılır:

1. İlk aşamada ayrılan XP kullanılır.
2. Beadler iyice vortexlenir veya tamamen dağılına kadar yavaşça pipetaj yaparak kullanılır.

Aşama 1

3. Kuyucukların üzerine 22,5 µl Agencourt AMPure XP eklendi. (0.5X)(normal rack üzerinde)
4. Plate vortex ile 1500-2000 rpm. de 15-20 saniye karıştırma yapıldı, iyice karıştığından emin olunduktan sonra 5 sn quick spin atıldı.
5. Oda sıcaklığında 5 dakika bekletildi.
6. İnkubasyon sonrası, plate magnetik standı alındı. (1-12 sütun hizalaması)
7. Karışım tamamen temizlenene kadar beklendi.
8. Pellete zarar vermeden supernatantın tamamı yeni kuyucuklara alındı.

Aşama 2

Plate magnetten normal rack üzerine alındı.

9. Her kuyucuğun üzerine 54 µl Agencourt AMPure XP eklendi. (1.2X orjinal örnek hacmi)
10. Plate vortex ile 1500-2000 rpm. de 15-20 saniye karıştırma yapıldı, iyice karıştığından emin olduktan sonra tekrar 5 sn quick spin atıldı.
11. Oda sıcaklığında 5 dakika bekletildi.
12. İnkubasyon sonrası, plate magnetik standı alındı. (1-12 sütun hizalaması)
13. Karışım tamamen temizlenene kadar veya 3 dakika bekletildi.
14. Pellete zarar vermeden supernatant atıldı. Amplikonlar bu kez beadlere bağlanmıştır.
15. Her kuyucuğa 150 µl taze %70'lik ethanol eklendi.
16. Plate 1-12 sütunlardan alınıp 2-13 sütun hizasına yerleştirilerek yıkama yapıldı. Bu aşama 5 kere tekrarlandı. Her bir adım için beadler toplanana kadar beklenir.
17. Pellete zarar vermeden supernatant atıldı
18. 15-17. adımlar 1 kez daha tekrar edildi.

19. Kalan son damlacıkların temizlenmesi: 10 luk multichannel pipet kullanılarak kuyucukların dibinde kalan etanol damlacıkları da plate üstü açık spin attırılarak uzaklaştırıldı.
20. Etanolün tamamen uzaklaştırılması için kuyucuklar ağzı açık şekilde 3 dakika oda sıcaklığında çok kurumamaya özen gösterilerek bekletildi.
21. Magnet üzerinde kuyucuklara 50 µl Low TE tek tek pipet değiştirilerek dağıtıldı. Pellet'in üzerinden akıtıldı. Plate vortexlendi, spin down yapıldı.
22. Plate Magnet üzerine yerleştirildi ve süpernatant iyice temizlenene kadar bekletildi.
23. Supernatantın tamamı hazırlanmış olan 0,2 lik pcr tüplerine veya plate'in temiz kuyucuklarına aktarıldı. İstenilen library supernatant içerisindedir.

3.2.3.6. KÜTÜPHANELERİN QUBİT İLE ÖLÇÜMÜ

Ölçüm için 1/200 oranında Working solution hazırlandı. Kütüphane ölçümünü yapmak için kullanılacak Working solutiona; 1 µl Qubit Reagent ve 199 µl Qubit Buffer eklendi. 190 µl Working solution ve üzerine 10 µl kütüphane örneği eklendi. Qubit cihazı üzerinde dsDNA-High Sensitivity ve 10 ng/ml seçilip örnekler ölçüldü. Ölçüm sonrası kütüphane örnekleri 10 ng'a nuclease free su ile dilüe edildi.

İzole edilen DNA'nın miktar ve kalite analizi yapıldıktan sonra hedef bölgeler, Ion Torrent™ Ion AmpliSeq™ Library Kit 2.0 (Life Technologies, ABD) kullanılarak multiplex PCR ile çoğaltıldı. Amplikonlar pürifikasyon amacıyla kısmi olarak parçalandı. Ion Torrent™ Ion Xpress™ Barcode Adapters 1-16 Kit (Life Technologies, ABD) kullanılarak barkodlama gerçekleştirildi. Adaptör takılan kütüphane, Agencourt AMPure XP PCR Purification System (Beckman Coulter, ABD) kullanılarak pürifiye edildi.

3.2.4. Örneklerin Ion 530TM Çipe Yüklenmesi ve Dizileme

Örnekler Ion 530TM Kit ve Ion ChefTM System kullanılarak çiplere yüklendi. Hazırlanan çipler Ion S5TM System (Thermo Fisher Scientific, ABD) cihazına yüklenerek dizileme işlemi gerçekleştirildi.

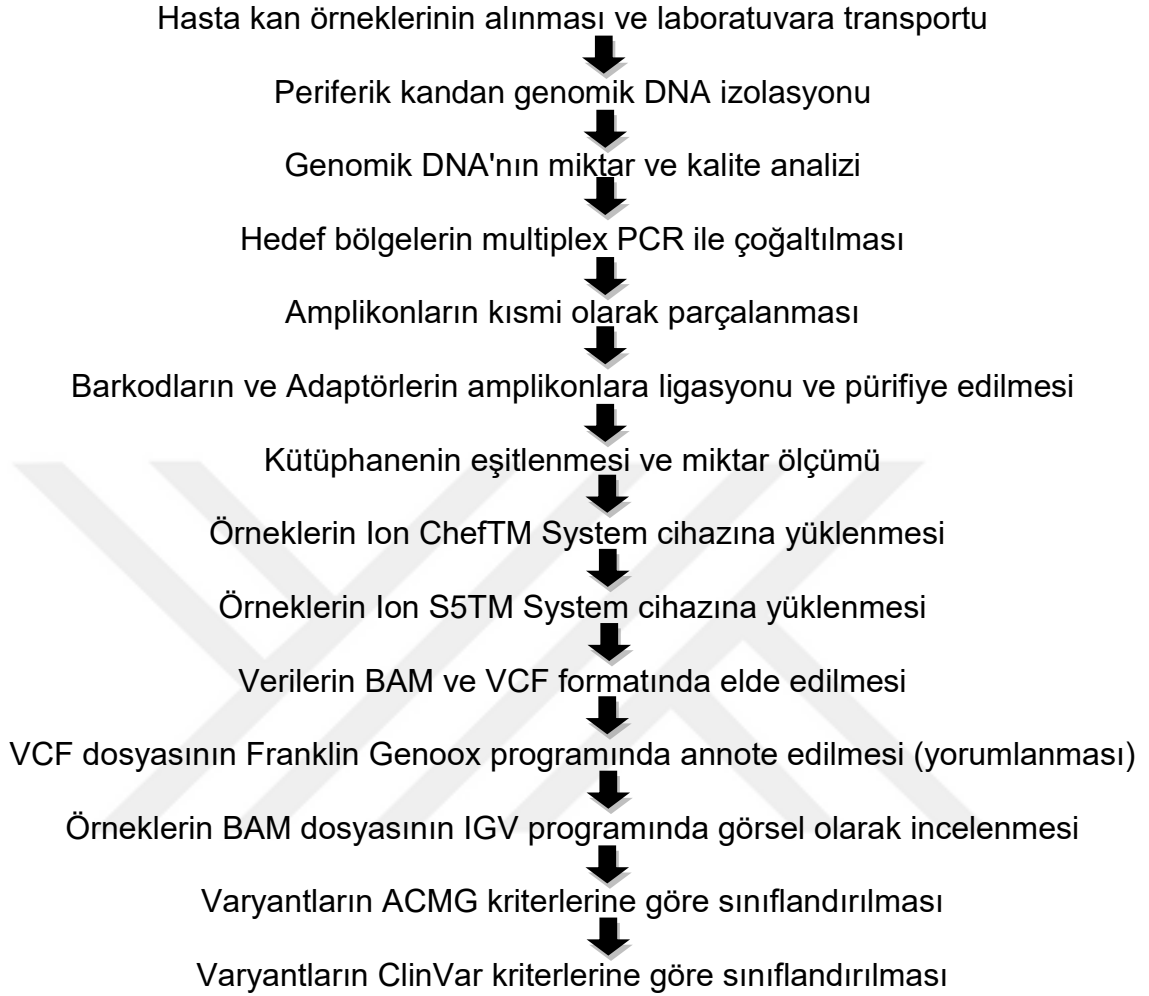
3.2.5. Dizileme İşlemi Sonrası Ham Datanın Elde Edilmesi

Dizileme sonrası elde edilen veri üretici firma tarafından cihaz üzerinde bulunan Torrent Suite™ Software kullanılarak analize hazır veri Binary Alignment/Map (BAM) ve Variant Calling Format (VCF) formatında elde edildi.

Tablo 2. Panelde bulunan genler, referans transkript numaraları ve ilişkili OMIM numarası.

Gen ismi	Ref Seq	OMIM numarası	Gen ismi	Ref Seq	OMIM numarası
ATP13A2 (ATPase, Type 13A2)	NM_022089.3	610513	MAPT (Microtubule-Associated Protein TAU)	NM_001123066.3	157140
SNCA (Synuclein, Alpha)	NM_001146055.2	163890	PLA2G6 (Phospholipase A2, Group VI)	NM_001349867.1	603604
DNAJC13 (DNAJ/HSP40 Homolog, Subfamily C, Member 13)	NM_015268.3	614334	PRKN(PARK2) (Parkin)	NM_004562.2	602544
GIGYF2 (GRB10-Interacting Gyr Protein 2)	NM_001103146.1	612003	PARK7 (Parkinson Disease 7)	NM_007262.4	602533
HTRA2 (Htra Serine Peptidase 2)	NM_181575.4, NM_013247.4	606441	PINK1 (Pten-Induced Putative Kinase 1)	NM_032409.2	608309
LRRK2 (Leucine-Rich Repeat Kinase 2)	NM_198578.3	609007	VPS35 (Vacuolar Protein Sorting 35)	NM_018206.5	601501
SYNJ1 (Synaptojanin 1)	NM_003895.3	604297	EIF4G1 (Eukaryotic Translation Initiation Factor 4-Gamma, 1)	NM_001194947.1	600495
CHCHD2 (Coiled-Coil-Helix Domain-Containing Protein 2)	NM_016139.3	616244	FBXO7 (F-Box Only Protein 7)	NM_012179.3	605648
FGF20 (Fibroblast Growth Factor 20)	NM_019851.2	605558	UCHL1 (Ubiquitin Carboxyl-Terminal Esterase L1)	NM_004181.4	191342

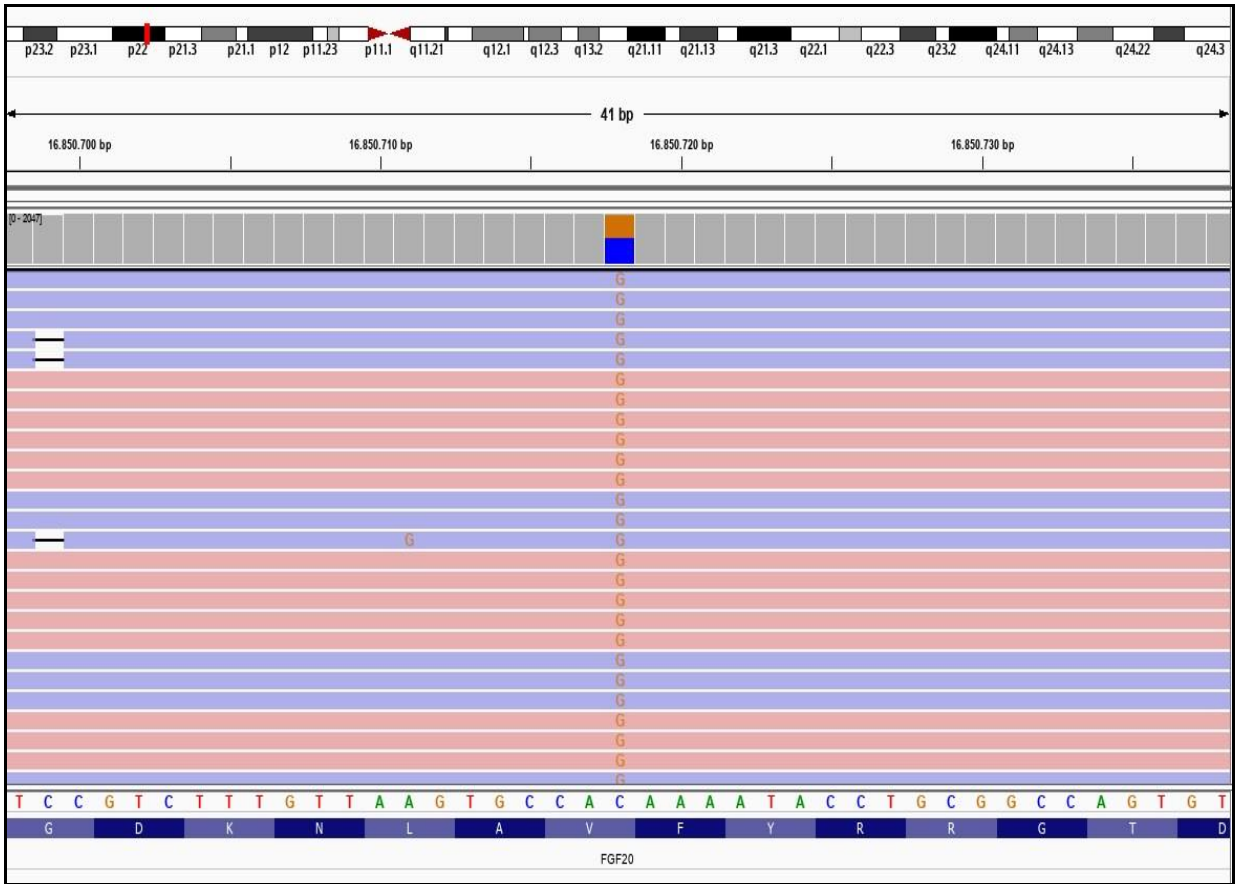
Hedeflenmiş gen yeni nesil dizileme yöntemi ve analizi akış çizelgesi;



3.3. TESPİT EDİLEN VARYANTLARIN DEĞERLENDİRİLMESİ

Çalışma için gerekli hastalara ait daha önceden oluşturulmuş ham veriler(rawdata) arşivden .bam,.bam.bai,.vcf dosyası şeklinde alındı. Analiz programında tespit edilen varyantların gerçeklikleri, The Integrative Genomics Viewer 2.8.2 (IGV, Broad Institute) programı kullanılarak, BAM dosyalarının görsel olarak değerlendirilmesiyle doğrulandı. IGV ile değerlendirme yapılırken aynı çalışmada yer alan tüm hastaların verisi birlikte değerlendirilerek iç kalite kontrol yapılmış oldu. En az %35 allel fraksiyonu eşik değerine ulaşmayan varyantlar çalışma dışı bırakıldı.

Tespit edilen varyantların frekans bilgileri(gnomAD %5 üstü frekans filtre dışı bırakıldı), in-siliko tahmin araçları ve diğer bilgilerinin tespiti için Franklin Genoox programı kullanıldı. Hastaların varyantları değerlendirilirken ekzon-intron bileşke bölgelerindeki değişiklikleri saptayacak şekilde +10,-10 baz genişliğinde yer alan bölgedeki değişimler filtrelendi. Takipte klinik önemi değişen varyantlar için eski analiz belgelerinde kalan varyantlarda ise herhangi bir sınır gözetilmeden klinik bilgisi olan varyantlarda tabloya dahil edildi(**Tablo 7**).



Şekil 3: BAM uzantılı dosyanın IGV programında görüntülenmesi.

Hastaların .vcf uzantılı verileri Franklin Genoox programına yüklendi. Tespit edilen varyantların sınıflandırılması aşamasına geçildi. Varyantları sınıflandırmak için bir filtre oluşturuldu. Oluşturulan filtre için öngörülen özellikler şu şekildedir:

- i. Varyantların The Genome Aggregation Database (gnomAD) ekzom ve gnomAD genom veritabanındaki sıklıklarına göre filtrelenmesi (yüzde 5'in üzerinde görülen varyantlar dışlanmıştır)
- ii. Varyantların 1000 Genomes Project (1000G), Exome Aggregation Consortium (ExAC) ve Exome Sequencing Project v.6500 (ESP6500) veritabanı sıklıklarına göre filtrelenmesi (yüzde 5'in üzerinde görülen varyantlar dışlanmıştır)
- iii. Protein kodlayan bölge dışındaki varyantların dışlanması
- iv. Protein kodlayan bölgelerde hastalık nedeni olabilecek patojenik bir varyant bulunmadığı için ekzon-intron bileşkesine 10 bazdan daha yakın olan varyantlar fonksiyonel etkisi açısından incelendi.
- v. Allel fraksiyonunun en az %35 olması

Varyantların hastalık yapıcı olup olmadığını değerlendirirken, **Tablo 3** ve **Tablo 4**'te özetlenen, ACMG tarafından yayınlanan mutasyon değerlendirme kılavuzu ve ClinVar veritabanındaki bildirimler referans alınmıştır.

3.3.1. Tespit Edilen Varyantların Önceliklendirilmesi

Genetik heterojenitesi olan hastalıklarda tanıya ulaşmada gen paneli çalışması sonunda elde edilen varyantların önceliklendirme işlemi şu anda en önemli aşamayı oluşturmaktadır. Özellikle protein kodlayan bölgede meydana gelen nükleotit değişimleri protein yapısında veya fonksiyonunda bozukluğa yol açarak hastalık gelişimine neden olmaktadır.

Protein kodlayan bu bölgelerin varyantlarının fonksiyonel çalışmasını yapmak her zaman mümkün olmamaktadır. Bu amaçla biyoinformatik tahmin araçları geliştirilmiştir ve yenileri geliştirilmeye devam etmektedir. Biz çalışmamızda bildirim usulü üzerine çalışma prensibine sahip ClinVar ve varyantın çeşitli kriterlere uyumuna göre karar veren ACMG kriterlerini kullandık.

Tablo 3. ACMG 2015 kriterlerine göre varyant değerlendirmede kullanılan skorların oluşum mekanizmaları.

Patojenite lehine çok güçlü delil	PVS1. Hastalık ile ilişkilendirilmiş fonksiyon kaybına yol açan değişim(nonsense mutasyon, çerçeve kayması, splicing etkileyip okuma çerçevesi bozulması, başlangıç kodonu kaybı, tek veya çoklu ekzon silinmesi)
Patojenite lehine çok güçlü delil	PS1 Daha önce tanımlanmış patojenik aminoasit değişiminin aynı kodondaki farklı nükleotit değişikliğinden kaynaklanması PS2 De-novo varyant tanımlanması (anne ve babada olmadığı gösterilen varyantlar) PS3 In-vivo veya in vitro yapılan fonksiyonel çalışmaları bulunan varyantlar PS4 Etkilenen bireylerdeki varyant sıklığının kontrol gruplara göre önemli ölçüde fazla olması
Patojenite lehine orta güçte delil	PM1 Mutasyonun hotspot bölgede ve/veya kritik ve iyi tanımlanmış fonksiyonel domainde yer alması PM2 ESP, 1000G, veya ExAC veritabanlarında kontrol gruplarda olmaması (resesif ise çok düşük sıklıkta olması) PM3 Resesif hastalıklar için patojenik varyantın <i>trans</i> şeklinde tespit edilmesi PM4 Tekrarlamayan bölgelerde in-frame indel kaynaklanan ya da stop kodonu değiştirerek proteinin uzunluğunun değişmesi PM5 Patojenik missense mutasyon tespit edilen bölgede farklı bir missense değişikliğinin saptanması PM6 De-novo olduğu tahmin edilen ancak anne babanın çalışılmadığı durumlar
Patojenite lehine destekleyici delil	PP1 Hastalığa neden olduğu bilinen bir gende aynı ailedeki birden çok etkilenmiş bireyde segregasyon saptanması PP2 Hastalığın çoğunlukla missense varyantlarla ilişkili olduğu durumlarda Benign missense varyant oranının düşük olduğu bir gende missense varyant tespit edilmesi PP3 Birden çok bilgisayar programının gen veya gen ürününün zararlı (deleterious) bir şekilde etkilendiğini göstermesi PP4 Hastanın fenotipi ya da aile öyküsünün tek bir genetik etiyolojiye sahip hastalıkla uyumlu olması PP5 Son zamanlarda güvenilir bir kaynakta patojenik olarak rapor edilmiş ancak ispatı için laboratuvarla bağımsız değerlendirme gerçekleştirilmesinin mümkün olmaması
	BP1 Proteinin erken sonlanmasına sebep olan varyantlarının hastalık nedeni olduğu bilinen genlerde tespit edilen missense varyantlar BP2 Tam penetrans gösteren otozomal dominant bir hastalıkta patojenik bir varyant ile <i>trans</i> pozisyonunda gözlenmesi ya da herhangi bir kalıtım paterninde <i>cis</i> durumunda patojenik varyant gözlenmesi BP3 Fonksiyonu bilinmeyen tekrarlayıcı bölgelerde in-frame delesyon ya da insersiyon saptanması BP4 Birden çok bilgisayar programının gen veya gen ürününün zararlı bir şekilde etkilendiğinin gösterilmemesi

Patojenite aleyhine destekleyici delil	(evrimsel korunmuşluk, "splicing" etkisi) BP5 Alternatif bir moleküler temeli olan bir hastada varyant gözlenmesi BP6 Son zamanlarda güvenilir bir kaynaktan benign olarak rapor edilmiş ancak ispatı için laboratuvarında bağımsız değerlendirme gerçekleştirmek için elverişli olmayan BP7 "Synonymous" varyasyonun "splicing" tahmin algoritmalarında "splice" konsensüs dizilerine etki etmemesi ve yeni bir splice oluşturmaması ve nükleotidin yüksek korunmuş bir bölgede yer almaması
Patojenite aleyhine güçlü delil	BS1 Allel sıklığının hastalık için beklenenden daha yüksek olması BS2 Erken yaşlarda tam penetrans olması beklenen resesif (homozigot), heterozigot (dominant), X'e bağlı (hemizigot) hastalıklar için sağlıklı yetişkin bireylerde gözlenmesi BS3 In vivo ve in vitro fonksiyonel çalışmalarda protein fonksiyonu ve "splicing" üzerine hasar verici etkisinin gösterilememesi BS4 Ailedeki etkilenmiş bireylerde segregasyon olmaması
Patojenite aleyhine mutlak delil	BA1 Exome Sequencing Project, 1000 Genomes Project, veya Exome Aggregation Consortium veritabanlarında allel sıklığı >%5 olması

PVS: Pathogenic Very Strong, PS: Pathogenic Strong, PM: Pathogenic Moderate, PP: Pathogenic Supporting, BA: Benign Stand-Alone, BS: Benign Strong, BP: Benign Supporting

Tablo 4.ACMG kriterlerine göre varyantların sınıflandırılma algoritması.

Patojenik	(i) 1 Çok güçlü (PVS1) VE a) ≥ 1 Güçlü (PS1–PS4) YA DA b) ≥2 Orta (PM1–PM6) YA DA c) 1 Orta (PM1–PM6) ve 1 destekleyici (PP1–PP5) YA DA d) ≥2 Destekleyici (PP1–PP5) (ii) ≥2 Güçlü (PS1–PS4) YA DA (iii) 1 Güçlü (PS1–PS4) VE (a) ≥3 Orta (PM1–PM6) YA DA (b) 2 Orta (PM1–PM6) VE ≥2 destekleyici (PP1–PP5) YA DA (c) 1 Orta (PM1–PM6) VE ≥4 destekleyici (PP1–PP5)
Muhtemel Patojenik	(i) 1 Çok güçlü (PVS1) VE 1 orta (PM1–PM6) YA DA (ii) 1 Güçlü (PS1–PS4) VE 1–2 orta (PM1–PM6) YA DA (iii) 1 Güçlü (PS1–PS4) VE ≥2 destekleyici (PP1–PP5) YA DA (iv) ≥3 Orta (PM1–PM6) YA DA (v) 2 Orta (PM1–PM6) VE ≥2 destekleyici (PP1–PP5) YA DA (vi) 1 Orta (PM1–PM6) VE ≥4 destekleyici (PP1–PP5)
Benign	(i) 1 Tek başına (BA1) YA DA (ii) ≥2 Güçlü (BS1–BS4)
Muhtemel Benign	(i) 1 Güçlü (BS1–BS4) VE 1 destekleyici (BP1–BP7) YA DA (ii) ≥2 Destekleyici (BP1–BP7)
Klinik Önemi Bilinmeyen(VUS)	(i) Yukarıda sıralanan kriterler karşılanmıyorsa YA DA (ii) Benign ve patojenik kriterler çelişkili ise

4. BULGULAR

4.1. Demografik ve klinik bulgular

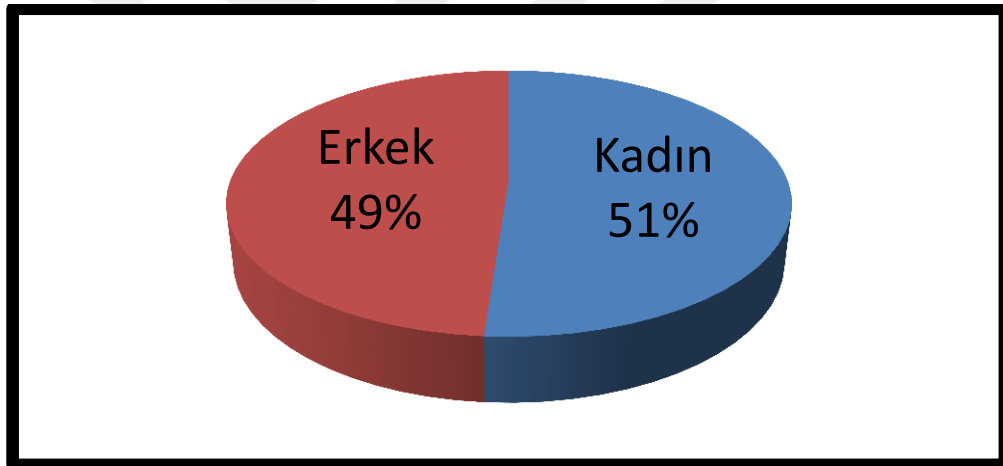
Çalışmamıza toplamda 39 aileden 22 kadın 21 erkek olmak üzere 43 olgu dahil edilmiştir(**Şekil 1**). Tanı merkezimize yönlendirilen hastaların başvuru sebepleri geniş bir yelpaze oluşturmaktadır. Klinik olarak tanı almış hastaların yanı sıra tanı almamış fakat parkinsonizm belirtileri gösteren olgular mevcuttur. Bu bulgular arasında rijidite, tremor, diskinezi, postür bozukluğu ve instabilitesi, disfaji, aksiyel deformiteler ve düşmelere ek olarak uyku bozuklukları, hafıza problemleri, kognitif fonksiyonların azalması, demans, halüsinasyon, mod ve yönelim bozuklukları, otonomik disfonksiyon(sıklıkla ortostatik hipotansiyon, ürogenital disfonksiyon, kabızlık, fazla terleme vb), duyu semptomları(koku almada azalma gibi) ve ağrı bozuklukları bulunmaktadır. Buna ek olarak aile hikayesi ve insidental genetik bulgusu olan olgumuz da bulunmaktadır.

Olgularımızın kliniğe başvurusunda yaş ortalaması 53,4 olarak hesaplanmıştır. Genetik çalışma yapılan proband bireyler değerlendirildiğinde 3 olgumuzun anne babası arasında akraba evliliği hikayesi bulunmaktadır. Olguların bir kısmı tanı almış tedavi görmekte olan hastalar iken bir kısmı ise ayırıcı tanı açısından tarafımıza yönlendirilmiştir. Ailesinde PH tanısı ya da PH ile uyumlu olabilecek uzun süreli gözlemlenebilen en az bir semptom olan olguların oranı 20(%46) olarak bulundu. Bu 20 olguluk grubun içerisinde 8(%40) olguda raporlanabilir, klinik önemi olduğu düşünülen varyant saptandı.

PH tanısı ya da uzun dönem parkinsonizmle uyumlu olabilecek semptomların gözlemlendiği olgular göz önüne alındığında, raporlanabilir varyant tespit edilen olgular içerisinde 8(%57) olgu 50 yaş ve sonrası başlangıç olarak değerlendirilirken , 4(%28) olgu ise 50 yaş öncesi erken başlangıçlı bulgu veya tanıya sahiptir. Bir(%7) olgu kendisinde tanı veya belirti olmamasına rağmen

aile hikayesinden ötürü başvurmuş olup bir raporlanabilir varyant taşıdığı görülmüştür. Son olarak raporlanabilir varyantlar içerisinde değerlendirilen bir olgu(%7) da ise insidental genetik tanı durumu söz konusudur. 20 yaş öncesi hastalık tanısı olan veya uyumlu semptomu sahip 3 olguda raporlanabilir varyant tespit edilememiştir.

Erken başlangıçlı PH tanısı alan ya da uyumlu semptom gözlenen toplam 13 olgudan 4(%30)'ünde raporlanabilir varyant tespit edilmiştir. Yine bu 13 olgu içerisinde 9(%69) kişinin ailesinde PH tanısı alan ya da uzun dönem parkinsonizmle uyumlu olabilecek semptomlara sahip birey hikayesi mevcuttur. Geç başlangıçlı grupta ise aile hikayesi pozitifliği 22 olgu içerisinde 8(%36)'dir.



Şekil 4. Araştırmaya dahil edilen olguların cinsiyet dağılımları.

Klinik olarak raporlanabilir varyant saptanan hastalar ve klinik ve demografik özelliklerini ifade eden tablo aşağıda gösterilmiştir(**Tablo 5**).

Tablo 5. Raporlanabilir varyant tespit edilen olguların demografik bilgileri ve klinik özellikleri.

Klinik Özellikler	Olguların laboratuvar kodları													
	O-02	O-10	O-12	O-13	O-14	O-23	O-25	O-26	O-28	O-31	O-33	O-37	O-38	O-39
Yaş	2	29	75	97	77	40	53	57	64	66	70	54	54	70
Cinsiyet	E	K	E	K	K	E	E	K	K	K	E	K	K	E
Semptom başlangıcı	-	25	53	80	75	37	N/A	54	60	50	65	50	-	65
Motor semptomlar	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
Duyu semptomları	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
Demans	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
Otonomik disfonksiyon	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-
Görüntüleme bulgusu	N/A	-	+	+	+	+	+	+	+	-	N/A	N/A	N/A	+
Aile hikayesi	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+

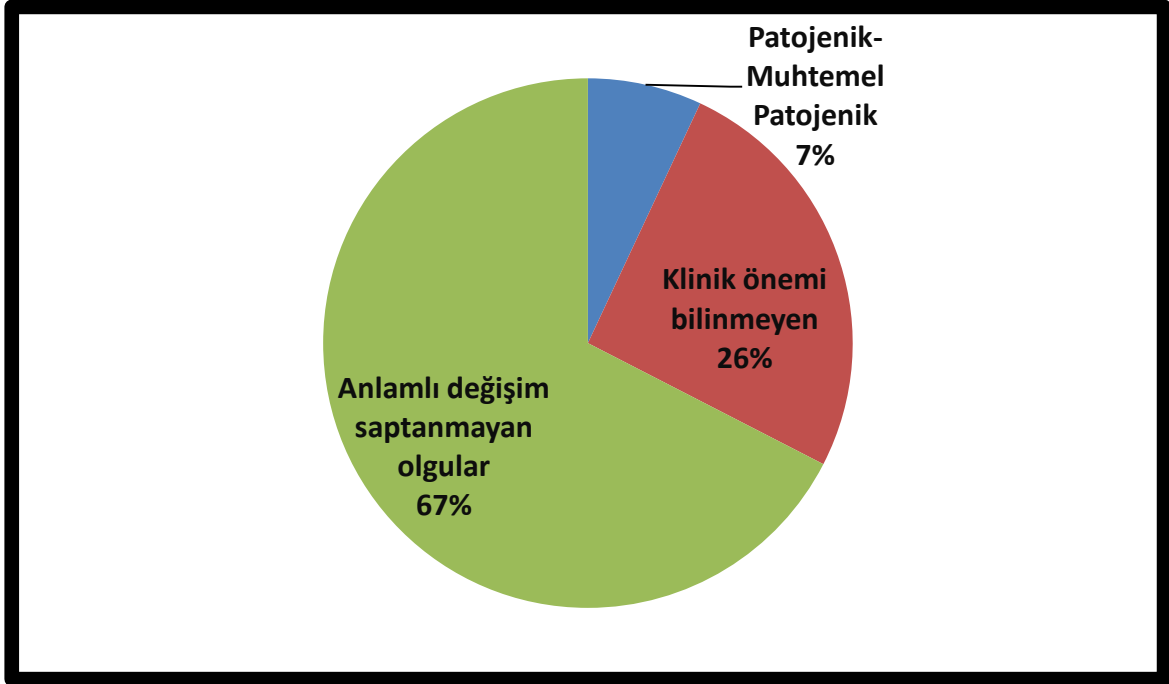
4.2. Genetik Bulgular

Tekrardan analizi yapılan hastalardan toplamda 14'ünde(%32) ClinVar ve/veya ACMG kriterleri çerçevesinde *VUS(Klinik Önemi Bilinmeyen-Variant of Uncertain Significance)-Muhtemel Patojenik-Patojenik* olarak değerlendirilen toplam 14 farklı varyant tespit edilmiştir. Olguların 3(%7)'ünde Patojenik-Muhtemel Patojenik varyant tespit edilirken, 11(%26)'inde klinik önemi bilinmeyen varyant tespit edilmiştir. Tespit edilen varyantların tamamı heterozigot olarak bulunmuştur. Varyantlar ve patojeniteleri aşağıdaki tabloda gösterilmiştir(**Tablo 6**). 9 farklı gende(***EIF4G1, ATP13A2, LRRK2, FBXO7, FGF20, PRKN, SYNJ1, VPS35, DNAJC13***) *VUS-Muhtemel Patojenik-Patojenik* olarak sınıflandırılan varyantlar tespit edilmiştir.

Tablo 6. Tespit edilen varyantların güncel veritabanları değerlendirmeleri ve gnomAD sıklıkları. * ile işaretlenmiş varyantların taşıyıcısı olan olgularımızın pedigree çiziminde PH tanısı veya uzun süreli parkinsonizm bulgusu olan aile bireyi mevcuttur.

Olgu laboratuvar kodları	Gen: Transkript	Varyant Protein değişimi	Varyant tipi	Allel sıklığı (gnomAD)	ACMG Sınıfı	ClinVar Yorumu Clinvar ID	Rapor görüşü(2020)
Olgu-37	LRRK2 (NM_198578.4)	c.4915delA* (p.Arg1639GlyfsTer15)	Çerçeve kaymasına yol açan değişim	-	Patojenik	-	Patojenik
Olgu-33	ATP13A2 (NM_022089.4)	c.2859G>A (p.Thr953=)	Splice etkileyen değişim	0.000007960	Muhtemel Patojenik	Çelişkili yorum; Benign(1); Muhtemel benign(1);VUS(4) ID:210381	Muhtemel Patojenik
Olgu-13	EIF4G1 (NM_001194947.1)	c.3142A>G (p.Ser1048Gly)	Missense	0.00002387	Muhtemel Patojenik	-	Muhtemel Patojenik
Olgu-28, Olgu-25	PRKN (NM_004562.3)	c.245C>A* (p.Ala82Glu)	Missense	0.003484	Benign	Çelişkili yorum Benign(1);VUS(2) ID:7038	VUS
Olgu-26	PRKN (NM_004562.3)	c.136G>A* (p.Ala46Thr)	Missense	0.000003978	VUS	Benign ID:468586	VUS
Olgu-14	SYNJ1 (NM_003895.3)	c.3863C>T (p.Pro1288Leu)	Missense	0.0003041	Muhtemel Benign	VUS ID:567214	VUS
Olgu-12	SYNJ1 (NM_003895.3)	c.700G>A* (p.Ala234Thr)	Missense	0.00005656	Muhtemel Benign	VUS ID:653212	VUS
Olgu-38	ATP13A2 (NM_022089.4)	c.2816T>C* (p.Leu939Pro)	Missense	-	VUS	-	VUS
Olgu-31	DNAJC13 (NM_015268.4)	c.3872A>G* (p.Glu1291Gly)	Missense	0.004565	Benign	Çelişkili yorum Muhtemel benign(2);VUS(1) ID:715477	VUS
Olgu-39	EIF4G1 (NM_198241.3)	c.1403C>A* (p.Ala468Glu)	Missense	-	VUS	-	VUS
Olgu-2	FBXO7 (NM_012179.4)	c.1546G>C (p.Asp516His)	Missense	0.00002841	VUS	Çelişkili yorum Benign(1);VUS(3) ID:444586	VUS
Olgu-10, Olgu-25	FGF20 (NM_019851.3)	c.499G>C* (p.Val167Leu)	Missense	-	VUS	-	VUS
Olgu-39	LRRK2 (NM_198578.4)	c.2915A>G* (p.Asp972Gly)	Missense	0.00006385	VUS	VUS ID:533777	VUS
Olgu-23	VPS35 (NM_018206.6)	c.506+6T>C	Splicing etkileyen değişim	0.000007991	VUS	-	VUS

VUS:Klinik önemi bilinmeyen varyant

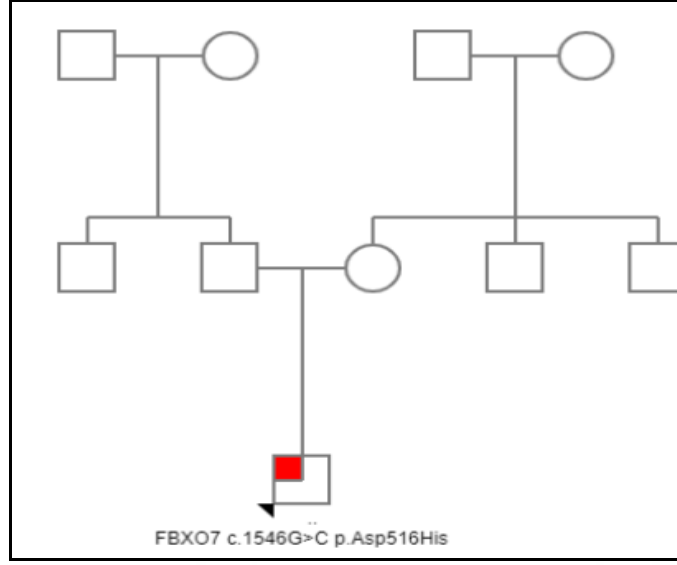


Şekil 5. Tespit edilen varyantların olgular üzerinde dağılımı.

Klinik olarak anlamlı olabilecek varyant tespit edilen olguların soyağaçları ayrıntılı bir şekilde çizildi. 43 olgudan klinik olarak anlamlı olabilecek varyant saptanan 14 olgunun soyağacı ve klinik anamnez bilgileri aşağıda bildirilmiştir. Ok ile işaretlenen bireyler proband olgulardır.

Olgu 2

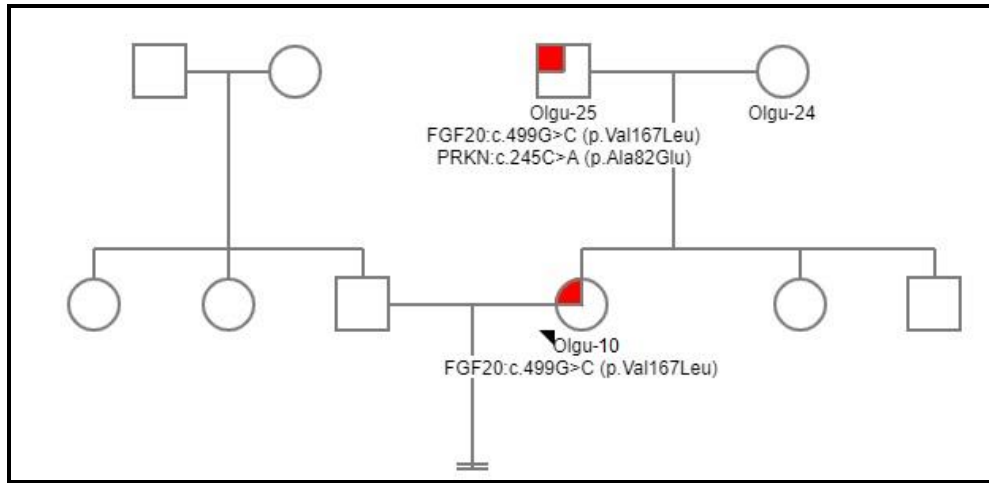
2017 doğumlu hasta, epilepsi etiyolojisi araştırması sırasında array-CGH testi sonucunda *PARK2* geni 2. ekzonda heterozigot delesyon dolayısı ile diğer alleli değerlendirmek üzere NGS değerlendirmesine alınmış olup insidental olarak ***FBXO7(NM_012179.4):c.1546G>C(p.Asp516His)*** değişimi saptanmıştır. Ailede PH hikayesi bulunmamaktadır. Hastanın aile ağacı aşağıdaki gibidir.



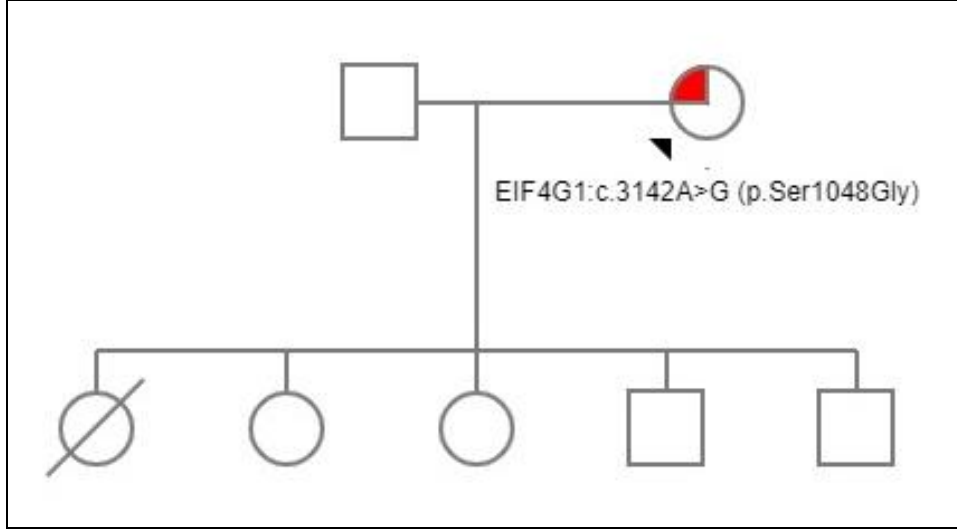
Şekil 6. Olgu 2'ye ait aile ağacı

Olgu 10-24-25

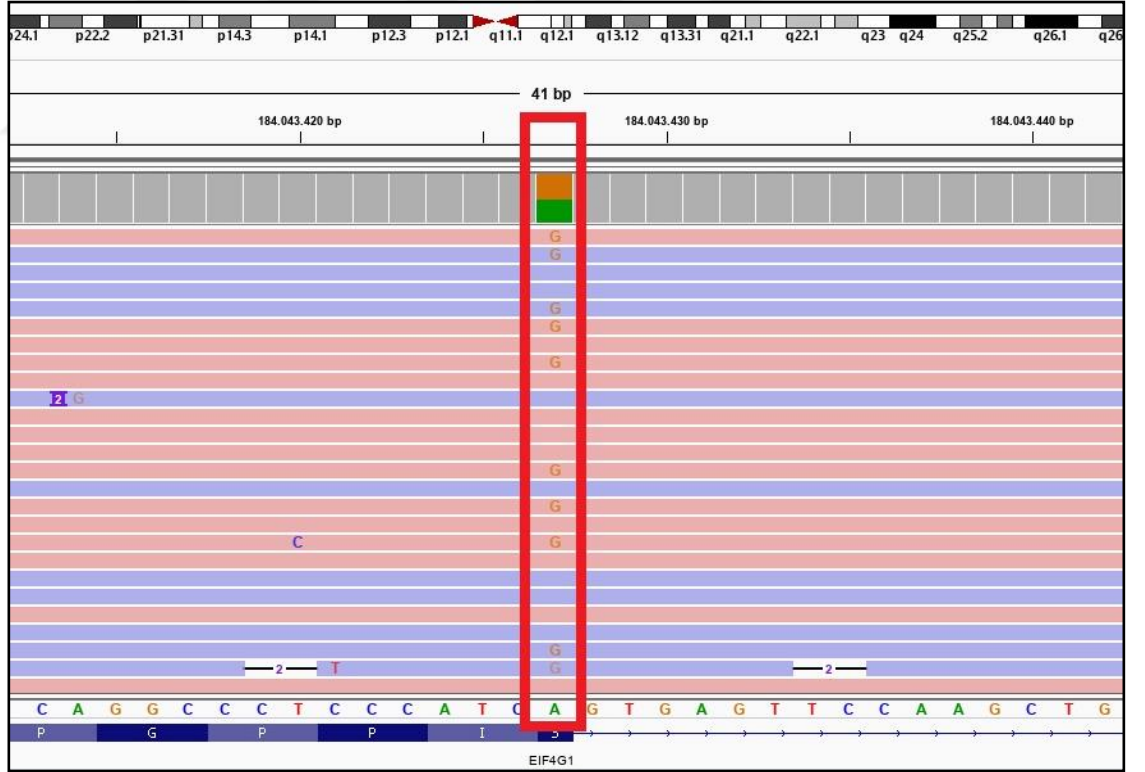
1991 doğumlu hasta kliniğimize başvurduğunda PH tanılı ve tedavisini almakta idi. Tarafımıza yönlendirilme sebebi erken yaşta PH tanısı etiyolojisi olan hastanın analizinde **FGF20(NM_019851.3):c.499G>C(p.Val167Leu)** saptandı aile ağacı aşağıdaki gibidir. Benzer şikayetleri olan babada bu varyanta ek olarak **PRKN(NM_004562.3):c.245C>A(p.Ala82Glu)** varyantı saptanmıştır. Segregasyon olarak annede herhangi bir varyanta rastlanmamıştır.



Şekil 7. Olgu 10-24-25'e ait aile ağacı



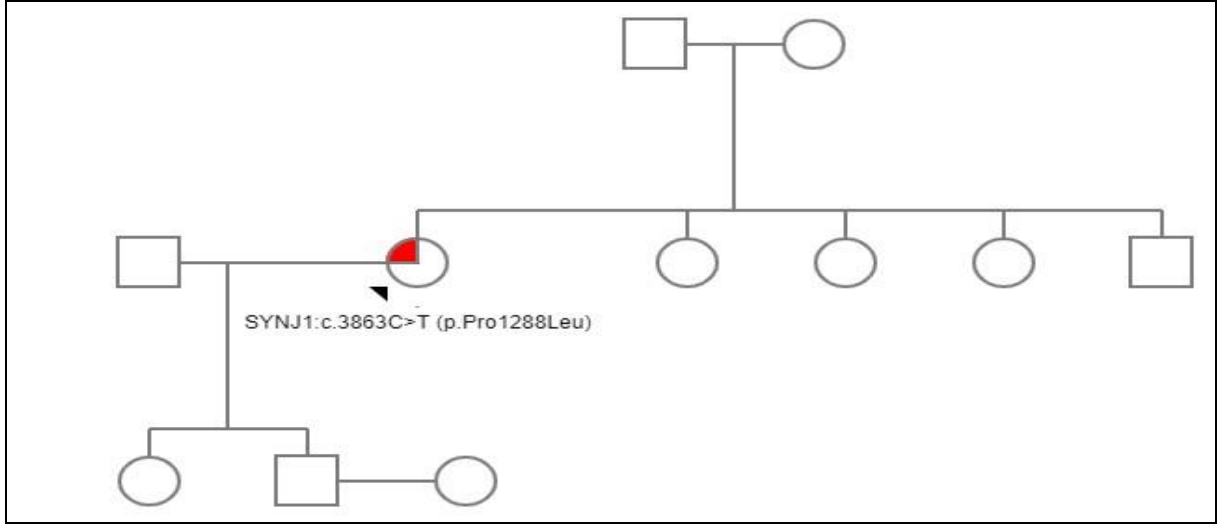
Şekil 9. Olgu 13'e ait aile ağacı



Şekil 10. *EIF4G1*(NM_001194947.1):c.3142A>G(p.Ser1048Gly) varyantı IGV Genome Browser görüntüsü.

Olgu 14

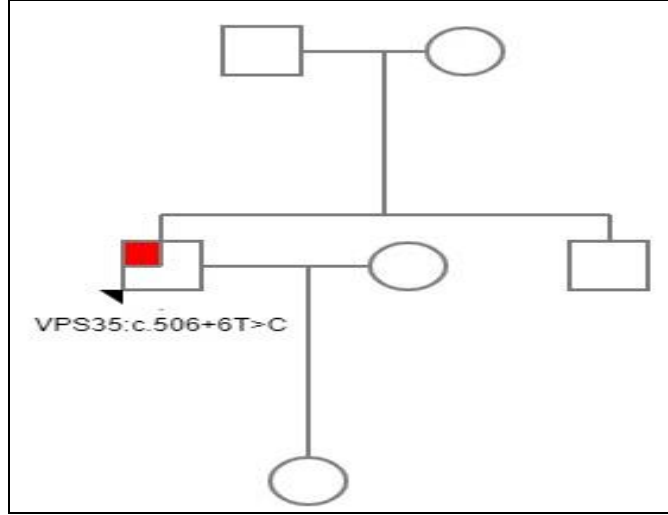
2 yıldır sol taraflı bradikinezi, koreiform hareketler, hemiparezi gibi atipik şikayetlerle tarafımıza ayırıcı tanı açısından yönlendirilen hastada **SYNJ1(NM_003895.3):c.3863C>T(p.Pro1288Leu)** varyantı saptandı. Aile ağacı aşağıdaki gibidir.



Şekil 11. Olgu 14'e ait aile ağacı

Olgu 23

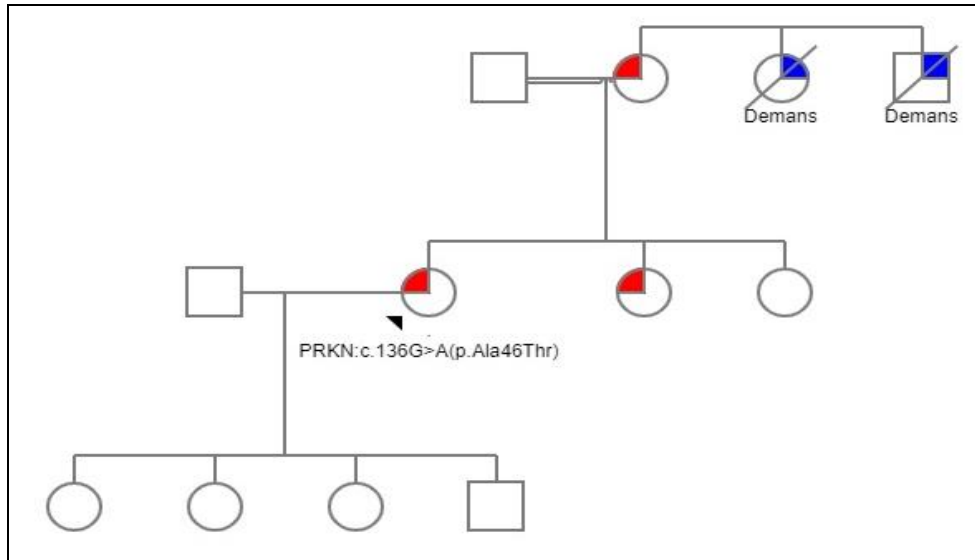
Sağ kolda başlayıp unilateral şekilde devam eden tremor ve bradikinezi şikayetleri ile tarafımıza genç atipik parkinsonizm olarak yönlendirilen hastada **VPS35(NM_018206.6):c.506+6T>C** değişimi saptanmıştır. Aile ağacı aşağıdaki gibidir.



Şekil 12. Olgu 23'e ait aile ağacı

Olgu 26

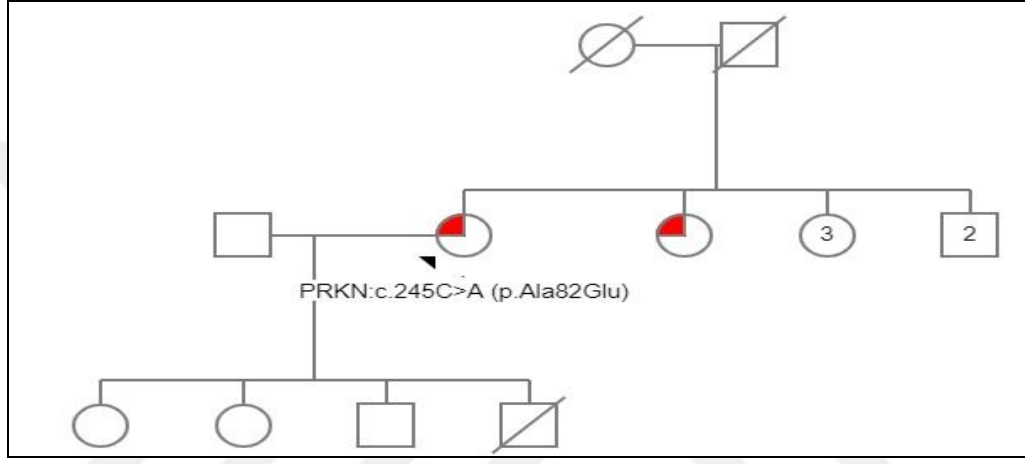
Tarafımıza karakteristik PH bulguları ve güçlü aile hikayesi ile yönlendirilen hastada **PRKN(NM_004562.3):c.136G>A(p.Ala46Thr)** varyantı tespit edilmiştir. Aile ağacı aşağıdaki gibidir.



Şekil 13. Olgu 26'ya ait aile ağacı

Olgu 28

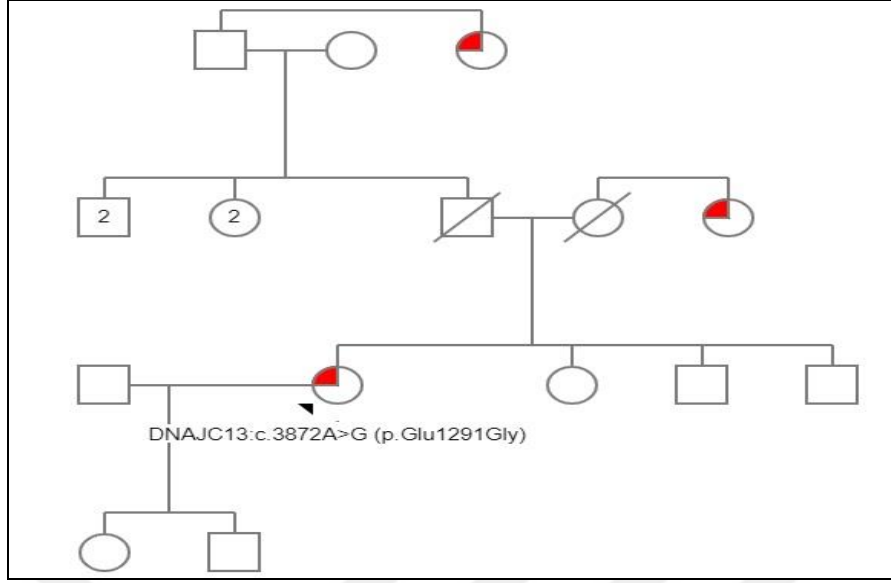
Tek taraflı tremor, bradikinezi, dişli çark muayene bulgusu ve uyku bozukluğu gibi tipik PH bulguları ile tarafımıza yönlendirilen hastada **PRKN (NM_004562.3):c.245C>A(p.Ala82Glu)** varyantı saptanmıştır. Aile ağacı aşağıdaki gibidir.



Şekil 14. Olgu 28'e ait aile ağacı

Olgu 31

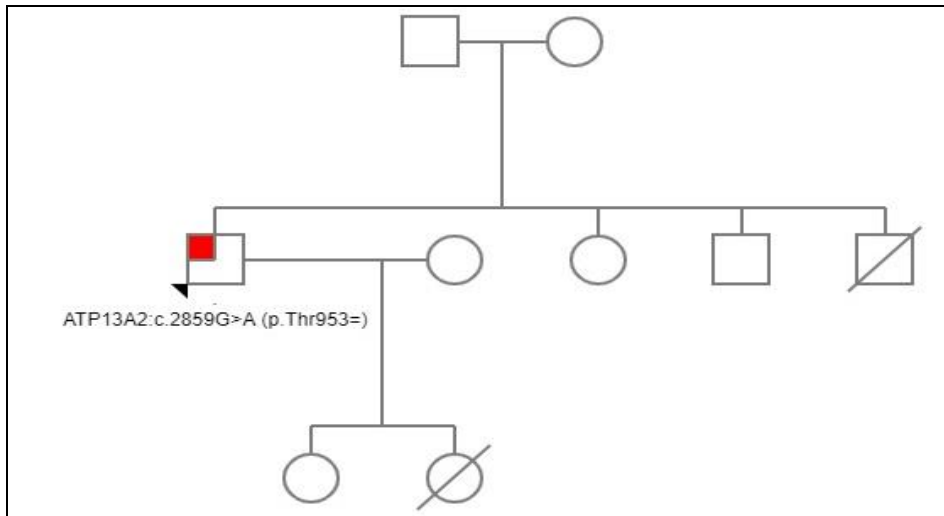
Tek taraflı tremor, bradikinezi, dişli çark muayene bulgusu ailede çok sayıda benzer şikayet ile ayırıcı tanı açısından tarafımıza yönlendirilen hastada **DNAJC13(NM_015268.4):c.3872A>G(p.Glu1291Gly)** varyantı tespit edildi. Aile ağacı aşağıdaki gibidir.



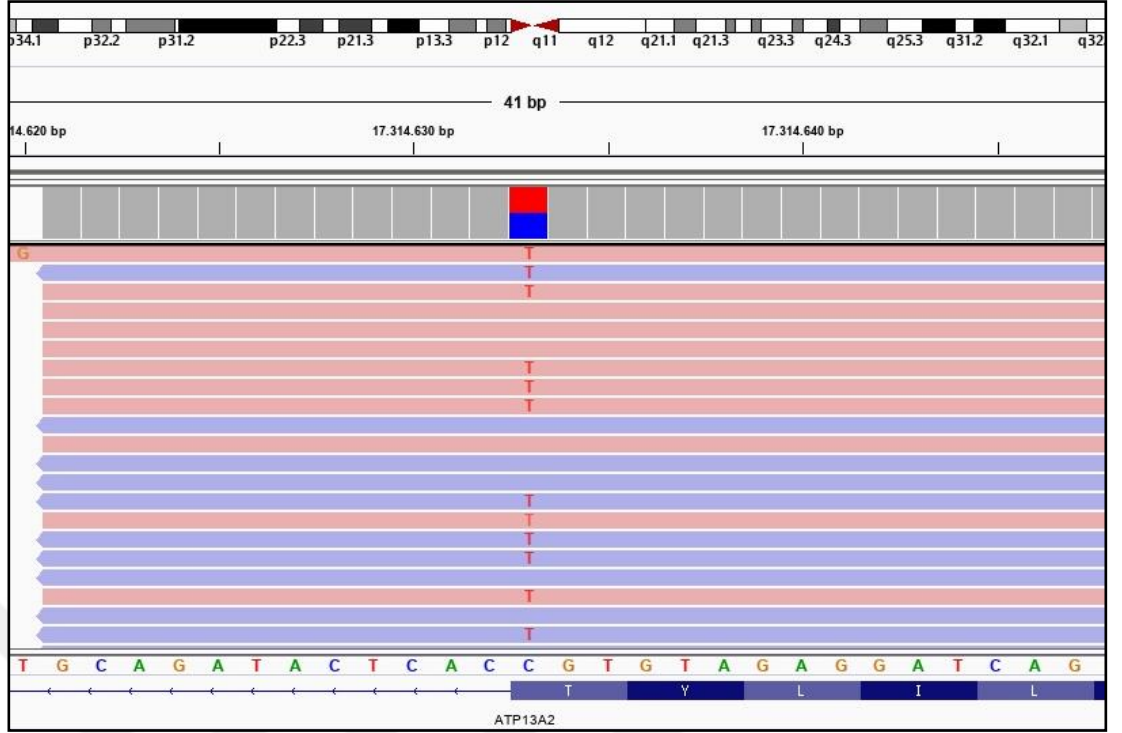
Şekil 15. Olgu 31'e ait aile ağacı

Olgu 33

2 yıldır yeni başlangıçlı unilateral tremor ve bradikinezi şikayetleriyle tarafımıza yönlendirilen hastada **ATP13A2(NM_022089.4):c.2859G>A (p.Thr953=)** varyantı tespit edilmiştir. Aile ağacı ve varyantın IGV Genome Browser görüntüsü aşağıdaki gibidir.



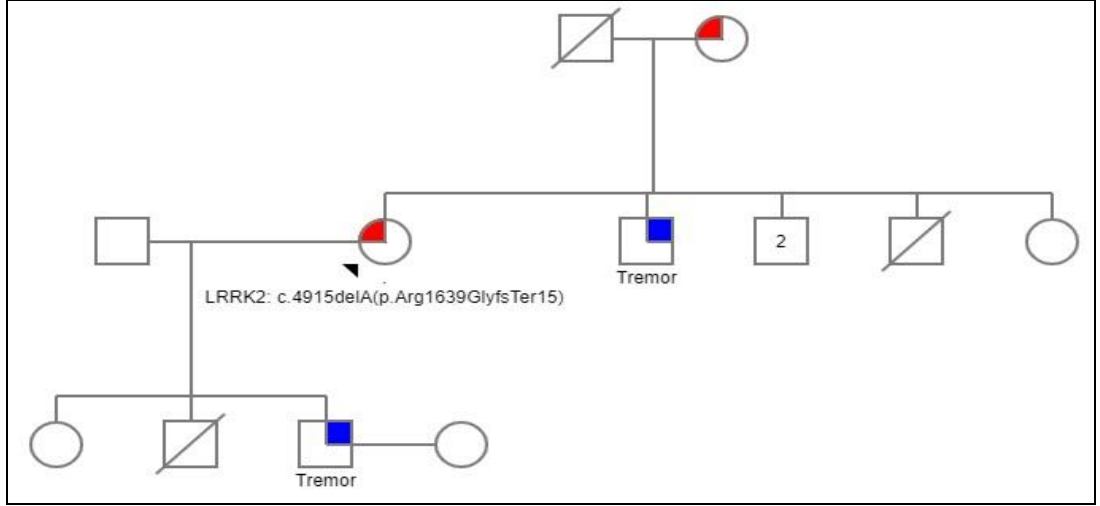
Şekil 16. Olgu 33'e ait aile ağacı



Şekil 17. *ATP13A2*(NM_022089.4):c.2859G>A (p.Thr953=)varyantı IGV genome Browser görüntüsü

Olgu 37

3 yıldır PH tanılı olan hasta, aile hikayesinde PH ve henüz tanı almamış uzun süreli tremor gibi şikayetleri olan hastada ***LRRK2*(NM_198578.4):c.4915delA (p.Arg1639GlyfsTer15)** varyantı saptandı. Aile ağacı ve varyantın IGV Genome Browser görüntüsü aşağıdaki gibidir.



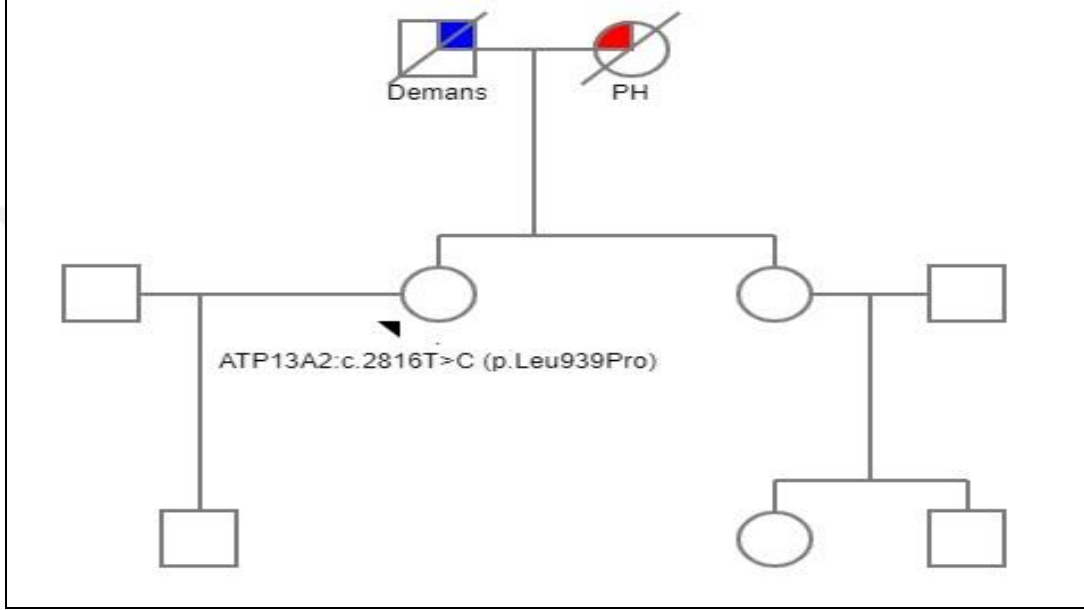
Şekil 18. Olgu 37'ye ait aile ağacı



Şekil 19. *LRRK2*(NM_198578.4): c.4915delA (p.Arg1639GlyfsTer15) varyantı IGV genome Browser görüntüsü

Olgu 38

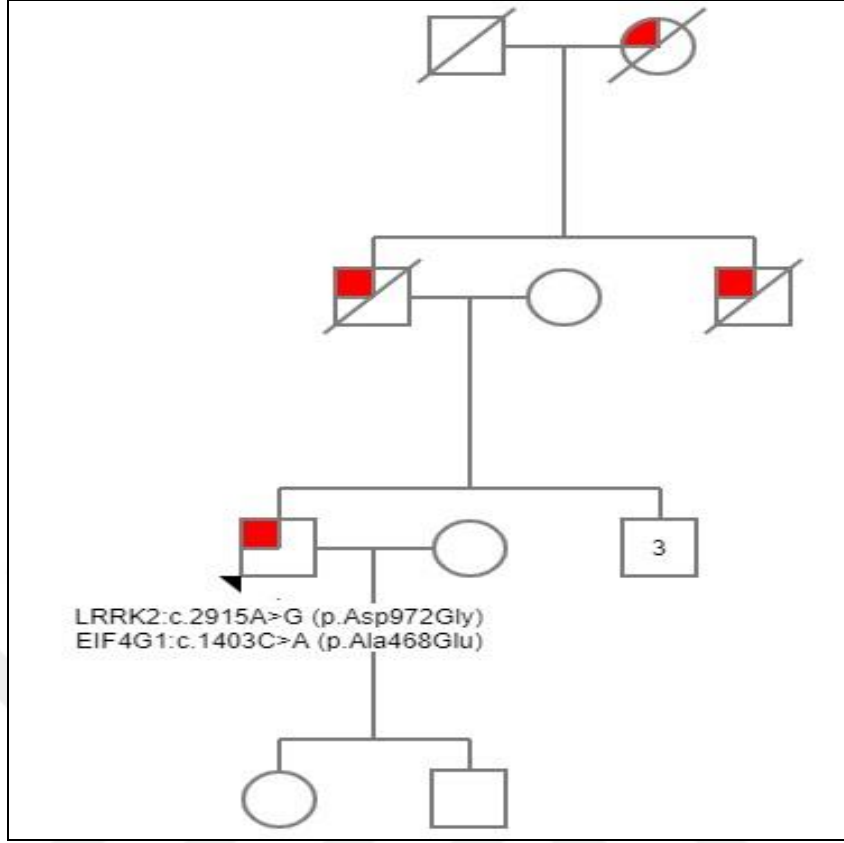
Aile hikayesi nedeniyle tarafımıza başvuran hastanın yapılan analizinde **ATP13A2(NM_022089.4):c.2816T>C(p.Leu939Pro)** varyantı saptanmıştır. Aile ağacı aşağıdaki gibidir.



Şekil 20. Olgu 38'e ait aile ağacı

Olgu 39

Kendisinde sol taraf başlangıçlı tremor ve ailesinde birden fazla kişide PH olan hastanın analizinde **LRRK2(NM_198578.4):c.2915A>G (p.Asp972Gly)** ve **EIF4G1(NM_198241.3):c.1403C>A(p.Ala468Glu)** varyantları saptanmıştır. Aile ağacı aşağıdaki gibidir.



Şekil 21. Olgu 39'a ait aile ağacı

4.2.1. Takipte klinik önemi değişen varyantlar

Olguların ilk değerlendirmelerinde farklı sınıflandırılmış bazı varyantların zaman içinde değişen yorumları aşağıdaki tabloda bildirilmiştir. 16 varyant tarafımızca yapılan ilk değerlendirmede klinik önemi bilinmeyen(VUS) varyant olarak sınıflandırılmasına rağmen takipte patojenite değerleri düşmüş, 1 varyant ise tam aksi yönde patojenite skoru zamanla artmıştır(**Tablo 7**).

Tablo 7. Takipte klinik önemi değişen varyantlar. Olgularımıza ait elde edilen NGS verileri Clinvar ve ACMG olmak üzere iki farklı veritabanı ile farklı periyotlarda yeniden değerlendirilmiştir.

Varyant	Clinvar 2018-2019	Clinvar 2020	ACMG 2018-2019	ACMG 2020
PINK1(NM_032409.3):c.1251+43C>T	-	-	VUS	Benign
PINK1(NM_032409.3):c.1252-25T>C	-	-	VUS	Benign
FGF20(NM_019851.3):c.616G>A	-	Benign	VUS	Benign
PINK1(NM_032409.3):c.1251+43C>T	-	-	VUS	Benign
LRRK2(NM_198578.4):c.1653C>G	Çelişkili yorum Benign(1); VUS(1)	Benign	VUS	Benign
DNAJC13(NM_015268.4):c.4385G>A	-	Benign	VUS	Benign
SYNJ1(NM_003895.3):c.1000A>C	-	Benign	VUS	Muhtemel Benign
GIGYF2NM_001103146.3:c.3524-26T>G	-	-	VUS	Benign
GIGYF2(ENST00000409451.3): c.1311T>C	-	-	VUS	Benign
LRRK2(NM_198578.4):c.4624C>T	Çelişkili yorum Benign(1); VUS(1)	Benign	VUS	Benign
GIGYF2(ENST00000409451.3):c.1311T>C	-	-	VUS	Benign
PINK1(NM_032409.3):c.737G>A	-	-	VUS	Muhtemel Benign
GIGYF2:NM_001103146.1 c.3104C>G	-	-	VUS	Benign
EIF4G1(NM_001194947.1):c.1424C>A	?	-	?	VUS
VPS35(NM_018206.6):c.151G>A	VUS	Benign	Muhtemel Benign	Benign
PRKN(NM_004562.3):c.-30T>C	VUS	Muhtemel Benign	Benign	Muhtemel Benign
PRKN(NM_004562.3):c.136G>A	Benign	Benign	Muhtemel Benign	VUS

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Bu çalışmada genetik etiyolojisi hala aydınlatılmaya devam eden Parkinson Hastalığı ve imkanlarımız dahiline nispeten yeni girmiş olan Yeni Nesil Dizileme yöntemi ile yürütülmüş genetik çalışmalarda tespit edilen varyantların klinik korelasyonu, literatüre katkıda bulunmak, klinik önemi bilinmeyen varyantların raporlanması ve takip sürecinde uğramış oldukları değişimlerin genetik bilimi adına nasıl yorumlanması gerektiğine dair görüş oluşturmak amaçlanmıştır.

Bu amaçla kliniğimize başvuran 43 hastadan 18 gen içeren bir gen panel çalışması yapılmış ve toplam 14 farklı hastada en az bir tane olmak üzere 14 farklı, klinikle uyumlu olabilecek genetik değişim saptanmıştır. Taramalarımıza göre bu çalışma PH için ülkemizde şu ana kadar yapılmış en geniş gen sayısı ile yapılan kapsamlı bir çalışmadır.

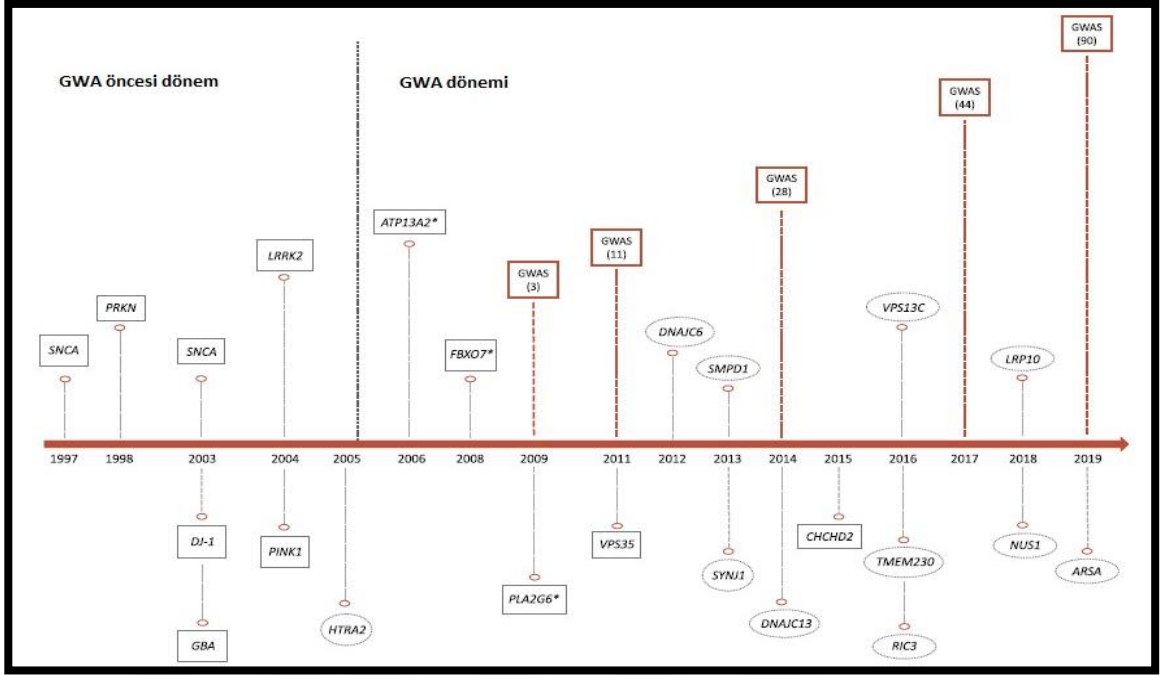
PH, Alzheimer hastalığını takiben en sık görülen ikinci nörodejeneratif hastalık olarak karşımıza çıkmaktadır. Prevalans çalışmaları yapılan topluma göre farklılık göstermekle birlikte yaşın hastalıkta önemli risk faktörlerden birisi olması dolayısıyla yaşla birlikte prevalansı da artmaktadır ve erkeklerde kadınlara oranla daha sık gözükmektedir[218].

Türkiyede Türk Nöroloji Derneği açıklamasına göre yıllık 150 000 civarında PH tanısı olan hasta mevcuttur. Hastalık tedavisi temelde eksik olan dopamini yerine koyan semptomatik rahatlama üzerine planlanan ve kürden uzak gibi gözükse de, özellikle son yıllarda kür üzerine gen tedavileri, kök hücre tedavileri gibi çeşitli deneysel tedavi denemeleri öne çıkmaktadır.

Hastalığın neden meydana geldiği sorusu ise hala önümüzde aşılması gereken bir duvar olarak dikili durmaktadır. PH etiopatogenezinin aydınlatılması, hastalığı oluşturan çeşitli mekanizmaları anlamamıza ve mümkünse tedavisi ve hatta kür sağlama konusunda bize yardımcı olma şansı en yüksek yol gibi gözükmektedir. Bu şekilde hücre düzeyinde hücre içi veya dışı olayların genetik altyapısı ise belkide hastalığın tedavisinde anahtar roldedir. Bu açıdan değerlendirildiğinde PH ve genetik ilişkisi terapötik anlamda önemli bir dialekt olarak görülmektedir.

Genetik etioloji anlamında PH sadece %5-10 gibi küçük bir yüzde halinde Mendeliyen kalıtıma uyan monogenik olarak açıklanabilmektedir. Bu monogenik etioloji içerisinde dominant ve resesif kalıtım modeli ayrı başlıklar altında incelenmekte fakat total olarak hastaların az bir kısmını oluşturmaktadır.

Hastalık tanısı alan diğer kişiler ise sporadik PH olarak adlandırılmakta ve bu grupta genetiğin tam olarak rolünü belirlemek çeşitli açılardan zorluklar içermektedir. Sporadik PH çeşitli genetik ve non-genetik etmenlerin etkileşimi ile açıklanmaktadır[113]. Bu şekilde sporadik olarak adlandırılan etioloji için genetik varyantların katkısını aydınlatmak adına elimizdeki en faydalı yöntemlerden birinin GWA çalışmaları olduğu aşikardır. PH kohortları ve sağlıklı kontrol grubunun karşılaştırıldığı bu çalışmalardan elde edilen veriler atadan kalma genetik olarak yüksek veya düşük risk faktörü olabilecek varyantların yüzdesini genel olarak %22 olarak belirtmektedir[219]. Bu durumda PH genetik etioloji olarak hala bilinmezlerle dolu aydınlatılmayı bekleyen devasa bir hazine değerindedir.



Şekil 22: Parkinson hastalığı genetik etyopatogenezi için yapılmış GWA çalışmaları ve ilişki bulunan genler. Hastalık ile net olarak ilişkilendirilmiş (Kare) ve ilişki çelişkili olan genler (elips) gösterilmiştir. * ile işaretli genler atipik parkinsonla ilişkilendirilmiş genleri göstermektedir. Sara Bandres-Ciga ve ark. 2020 [1].

Bu şekilde şimdiye kadar tanımlanmış ailesel geçiş gösteren genler ve risk faktörü olarak tanımlanan gen bölgelerinin çeşitli merkezlerde ve dünyanın dört bir yanında yapılan çalışmalarla değerlendirilmesi hastalıkta genetik etiyolojinin rolünü aydınlatmada önemli bir saha çalışması olarak öne çıkmaktadır. Teknoloji ve imkanların gelişimi ile birlikte hayatımıza giren NGS yöntemi daha pratik, daha kullanılabilir ve üretilen veri olarak çok zengin bir kaynak sağlamakta bize yardım etmektedir. Özellikle PH gibi kompleks etiyolojiye sahip hastalık grupları için dizayn edilen gen panelleri bu konuda büyük pratiklik sağlamaktadır.

Hastalıkla ilişkilendirilebilecek birden fazla geni aynı anda ve yüksek güvenilirlikle analize imkan veren bu yöntemin kullanımı elimizdeki imkanlar dahilinde hastalığı anlamamıza yardımcı olan en önemli kaynaklardan birisidir. Nitekim biz de bu çalışmayı NGS temelli, günümüze kadar PH ile ilişkilendirilmiş 18 farklı gen içeren bir gen paneli ile yapmış bulunmaktayız.

Çalışmada elde ettiğimiz veriler itibarı ile PH'na neden olarak atfedebileceğimiz, olgularda saptadığımız Patojenik-Muhtemel Patojenik varyantların yüzdesi(%7) uluslararası yayınlarda bildirilen oranlar ile tutarlı gözükmektedir. Tespit edilen varyantlarda homozigotluk veya bileşik heterozigotluk tespit edilmemiş olup hepsi heterozigottur. Klinik önemi bilinmeyen varyantların oranı 11(%26)'dır ve toplamıyla elde edilen oran ise monogenik ve sporadik olarak total değerlendirdiğimizde yine elde edilen oran literatürde bildirilen rakamlarla korele gözükmektedir.

Tespit ettiğimiz varyantlardan ***EIF4G1***(*Eukaryotic Translation Initiation Factor 4-Gamma, 1*)(**NM_001194947.1**):**c.3142A>G (p.Ser1048Gly)** varyantı ileri yaş başlangıç ile uyumlu patojenik varyant olarak değerlendirilmiştir. Olgumuz 60'lı yaşların başında tremor şikayeti ile başvurup 70'li yaşların sonunda tanı almış bir PH olgusudur. *EIF4G1* geninde tespit edilen varyantlar 2011 yılında yayınlanan bir makalede Fransız PH popülasyonunda geç başlangıçlı PH adına etiyolojik neden olarak bildirilmiştir[196]. 2013 yılında yayınlanan bir başka makalede 213 PH olgusunda yapılan çalışmada bulunan R1205H varyantı ailesel bir PH olgusunda saptanmış fakat aynı varyant klinik belirti göstermeyen bir aile bireyinde de gösterilmiş olması üzerine azalmış penetrans gösterdiği bildirilmiştir[220]. Son olarak geniş rakamlı Avrupa kohortunda yapılan bir başka çalışmada yazarlar *EIF4G1* varyantlarının düşük penetranslı ve geç başlangıç gösteren hastalığa neden olma eğiliminde olduğunu belirtmişlerdir[197]. Olgumuzun kliniği ve genetik tetkik sonucu da

literatür ile uyum göstermektedir. Hastamızın MR görüntülemesi santral kortikal atrofi olarak raporlanmıştır.

ATP13A2(*ATPase, Type 13A2*)(**NM_022089.4**):**c.2859G>A (p.Thr953=)**) varyantı saptanan olgumuz ileri yaş başlangıçlı tipik şikayetleri için tarafımıza yönlendirildi. 2007 yılında yayınlanan bir araştırmada iki farklı erken başlangıçlı PH olan İtalyan hastada bulunan heterozigot varyantın hastalık riskini artırabileceği görüşü bildirilmiştir[158]. 2008 yılında yayınlanan ve Han Çin popülasyonunda yapılan bir araştırmaya göre ise *ATP13A2* A746T varyantı erken başlangıçlı PH olgularında kontrol grubuna göre anlamlı derecede sık gözlenmiştir[159]. 2012 yılında yapılan bir hücre çalışmasında ise literatürde o zaman kadar bildirilen ve patojenik olarak değerlendirilen varyantların protein stabilizasyonunu bozmadığı ve hücre içi fonksiyonu wild tipe göre değiştirmedığı dolayısıyla hastalık etiyogenezinde rolü olmadığı bildirilmiştir[221]. Sonuç olarak heterozigot *ATP13A2* varyantlarının PH ile ilişkisi hala net olarak aydınlatılamamış gibi gözükmektedir. Olgumuz ise ileri yaş başlangıçlı -65 yaş- tremor ve bradikinezi şikayeti ile bize başvurmuş olup yaptığımız tetkik sonucu elde ettiğimiz varyantın hastalığa neden olarak en makul seçenek olduğunu ifade etmekteyiz.

LRRK2 (*Leucine-Rich Repeat Kinase 2*)(**NM_198578.4**):**c.4915delA (p.Arg1639GlyfsTer15)**) patojenik varyantı tespit edilen olgumuzun kendisi 50'li yaşların hemen başında tanı almış olup ailesinde PH tanısı alan hastalar bulunmakta ve PH tanısı almayan fakat uzun süredir tremor şikayeti olan yakınları olduğunu bildirmiştir. *LRRK2*, PH adına en çok çalışılan ve yayın yapılan genlerden bir tanesi olup hem dominant kalıtmı ailesel PH ile ilişkilendirilmiş hem de sporadik PH için risk faktörü olarak belirlenmiştir[222]. Bir çok çalışmada ailesel PH çalışmalarında dominant kalıtım paternine uygun olarak farklı heterozigot *LRRK2* varyantları bildirilmiştir[142, 143, 223]. Benzer şekilde farklı gruplar tarafından yapılan çalışmalarda çeşitli tek nükleotid

değişimleri *LRRK2* varyantları sporadik PH için risk faktörü olarak yayınlanmıştır[224, 225]. Olguda çerçeve kaymasına neden olan mutasyon varlığı, annede de PH tanısının olması ailesel geçişi destekler nitelikte olup, ailede henüz tanı almamış fakat benzer klinik bulgular gösteren bireylerin bulunması aile bireyelerine tetkik yapma şansımız olmamasına rağmen penetrans değişkenliğini akla getirmektedir. Bu genetik varyant daha önce literatürde bildirilmiş olmaması sebebiyle novel olarak değerlendirilmiştir.

Hastalarda tespit ettiğimiz klinik önemi bilinmeyen değişimlerin yorumlanması ise yukarıda belirtilen varyantlardan daha komplike bir değerlendirme sürecine ihtiyaç duymaktadır. ACMG varyant değerlendirme önerilerine göre 5 sınıftan birisi olan bu küme, elde edilen genetik değişimle ilgili çelişkili deliller olduğunu ya da değerlendirmek için yeteri kadar veriye sahip olmadığımızı ifade etmektedir[216]. Maalesef özellikle gen panelleri ile yapılan geniş kohortlarda klinik önemi belirsiz varyantlar kümesi nadir veya az sıklıkta denemeyecek kadar sayıda karşımıza çıkmaktadır.

Günümüzde en sık genetik dizileme endikasyonu olarak karşımıza çıkan kanser genetiği ile ilgili çalışmaların %34-41 oranında klinik önemi bilinmeyen varyant raporlama yüzdesiyle sonuçlanması bize konu ile ilgili bir projeksiyon imkanı sunmaktadır[226, 227]. Klinik önemi bilinmeyen varyantlara yaklaşımımız olası yanlış patojenite yönünde ilerlediğinde hasta ve yakınları üzerinde ekstra hayal kırıklığı ve gereksiz tıbbi girişimlere neden olabilecek iken, olası yanlış benign değerlendirmeler ise yalancı bir güven verme durumuna dönüşüp hastanın hayat kalitesini belirleyecek bir takım girişimlerin geciktirilmesi ya da hiç yapılmaması anlamına gelebilmektedir. Bu açıdan bu varyantları anlamlandırabilme aşamasında sıklıkla kullandığımız in-silico veritabanları bizlere yardımcı olmaktadır.

Veritabanlarından elde ettiğimiz veriler herşeye rağmen klinik önemi bilinmeyen varyantları benign ve patojenite spektrumunda net olarak bir köşeye yerleştirmekte sınırlı kalıp önümüze çözülmesi gereken bir soru bırakabilmektedir. Açıkça görünmektedir ki elde ettiğimiz genetik verinin doğru yorumlanması hasta açısından hayati önem taşımaktadır. Tam olarak bu noktada şu görüşü dile getirmek gerektiği kanısındayız, yayınlanan her vaka raporu ve bilgisayar tabanlı in-silico veritabanlarının günbegün evrilmesi ile varyantların değerlerinin değiştiği, varyant değerlendirmenin statik bir olgu olmadığı zamanla değiştiği açıkça gözükmemektedir.

Genetik verinin değerlendirilmesinde testin yapıldığı toplumun genetik veri bankası çok önem arz etmektedir. Yaptığımız çalışmada elde ettiğimiz genetik değişimleri değerlendirmeye tabi tuttuğumuz genetik veri bankalarının sıklıkla belirli etnik grupların genetik verileri ile oluşturulmuş olması durumu bu etnik grupların dışında kalan popülasyonlarda elde edilen varyantların sıklıkla klinik önemi hakkında yeterli veri bulunamamasına ve varyantların VUS olarak sınıflandırılmasına neden olmaktadır[228]. Bu yüzden özellikle benign veya patojenik sınıfına yerleştirilemeyen klinik önemi bilinmeyen varyantların zaman içerisinde yeniden değerlendirilmesi ihtiyacı doğmaktadır[229].

Hastalarımızdan elde ettiğimiz genetik değişimlerden güncel veritabanları kullanılarak tarafımızca VUS(klinik önemi bilinmeyen varyant) olarak sınıflandırılan değişimleri **Tablo 6**'da gösterilmiştir.

Tabloda gösterilen **FBX07** (*F-Box Only Protein 7*)(NM_012179.4): **c.1546G>C (p.Asp516His)** varyantı tarafımıza epilepsi etiyoloji ile yönlendirilen 2 yaşında bir olguda saptandı . Array-CGH sonucunda *PARK2* geni 2. ekzonunda heterozigot delesyonu saptanan hastadan ileri tetkikler sonucu bu varyant tespit edilmiştir. Bu varyant ile ilgili güncel literatürde iki yayın bulunmaktadır ve bu iki yayının ifadeleri çelişkilidir[230, 231]. Olgunun aile ağacında PH hikayesi bulunmuyor.

FGF20 (*Fibroblast Growth Factor 20*)(NM_019851.3):**c.499G>C (p.Val167Leu)** varyantı hakkında ise herhangi bir yayın bulunmamaktadır ve sadece bilgisayar tabanlı veritabanlarından değerlendirildiği kadarı ile VUS olarak nitelendirilmiştir. Olgu 50 yaş öncesi PH tanısı almış olup babasında da benzer bir hikaye söz konusudur. Hastanın beyin MR'ı normal olarak raporlanmıştır. Yukarıda aile ağacı çizimi verilen *Olgu 10'*da görüleceği üzere hastanın benzer şikayetleri olan babasında da bu varyantın bulunması patojenite lehine kanıt oluştursa da elimizde bunda öteye giden başka bir kanıt bulunmamaktadır. **PRKN** (*Parkin*) (NM_004562.3):**c.245C>A (p.Ala82Glu)** varyantı yine literatürde üzerinde net bir anlaşma yapılamamış varyantlardan bir tanesi olarak gözükmemektedir. Aynı varyant için benignden patojeniğe farklı bildirimler içeren yayınlar bulunmaktadır[231, 232]. Bu iki varyant babada (*Olgu 25*) birlikte bulunmaktadır. Aile iletişimi olmadığı için *Olgu 25* ile ilgili bilgilerimiz kısıtlıdır. Bu *PRKN* varyantı, hastamızla akrabalık bağı olmayan *Olgu 28* kodlu vakamızda da mevcuttur.

SYNJ1 (*Synaptojanin 1*)(NM_003895.3):**c.700G>A (p.Ala234Thr)** değişimi ise güncel olarak hiçbir yayında bildirilmemiş olup değerlendirilmesinde sadece bilgisayar tabanlı veritabanları kullanılabilmiştir. Bu olgu 70'li yaşlarında, 2 dekadı aşkın bir süredir motor semptomlara ek olarak demans problemine sahiptir. Görüntüleme sonucu kronik senil atrofi tespit edilmiştir.

Yine nitekim **SYNJ1(NM_003895.3):c.3863C>T(p.Pro1288Leu)** varyantı da benzer kaderi paylaşmaktadır bu varyantı içeren hiçbir yayın bulunmamaktadır. Bu varyantı taşıyan olgumuz 2 yıldır bradikinezi ve koreyi anımsatan hareket bozukluğuna sahiptir. Tomografi görüntülemesi sonucunda kortikal serebral atrofi tespit edilmiştir.

VPS35 (Vacuolar Protein Sorting 35) (NM_018206.6):c.506+6T>C varyantı ise henüz bir yayında bildirilmemiş fakat toplumsal genom tabanlarında az sıklıkta olması ve splicing etkileme potansiyeli itibarıyla patojeniteye neden olma ihtimali olması dolayısıyla VUS olarak sınıflandırılmıştır. Olguda unilateral üst ekstremitte tremor bradikinezisi mevcut olup şikayetler 30'lu yaşlarda başlamıştır. Kraniyal MR'da korona radiata subkortikal beyaz cevherde iskemi raporlanmıştır.

PRKN(NM_004562.3):c.136G>A(p.Ala46Thr) değişimi ise Nijerya popülasyonunda yapılan bir çalışmada kontrol grubuna oranla PH olan kişilerde daha sık görülmesine rağmen bilgisayar temelli verinin protein fonksiyonunu bozma ihtimalini az görmesi nedeniyle hastalıkla ilişkisi net olarak belirtilmemiştir[233]. Bu varyantı taşıyan olgumuzda tremor, bradikinezi, yürüme bozukluğu ve yutma disfonksiyonu mevcuttur. MR görüntülemesinde periventriküler alan sentrum semiovale de kronik laküner infarkt rapor edilmiştir.

Yukarıda belirtildiği üzere **PRKN(NM_004562.3):c.245C>A (p.Ala82Glu)** varyantını taşıyan bir diğer Olgu-28 kodlu vakamız 3-4 yıldır tremor, unutkanlık yürümede zorluk, düşme ve muayenede dişli çark bulgusu olan aynı zamanda ailede PH hikayesi olan bir olgudur. Şikayetleri 60'lı yaşlarında başlamış olup MR görüntülemesinde milimetrik boyutlarda kortikal iskemi raporlanmıştır. Varyantın patojenitesi üzerinde yine yukarıda belirtildiği üzere(*Olgu-25*) net bir fikir birliği yoktur.

DNAJC13 (*DNAJ/HSP40 Homolog, Subfamily C, Member 13*) (**NM_015268.4**):c.3872A>G (**p.Glu1291Gly**) varyantı güncel olarak hiçbir yayında bildirilmemiş olup değerlendirilmesinde sadece bilgisayar tabanlı veritabanları kullanılabilmiştir. Olgumuzda PH klasik motor semptomlarına ek olarak kronik kabızlık problemi mevcuttur. MR görüntülemesi normal olarak raporlanmıştır.

ATP13A2(**NM_022089.4**):c.2816T>C (**p.Leu939Pro**) varyantı değerlendirilirken de yine sadece bilgisayar tabanlı veritabanları kullanılabilmiştir ve literatürde daha önce bildirilmemiş olup, novel varyant olarak değerlendirilmiştir. Bu varyantı taşıyan olgumuzda her hangi bir semptom olmayıp güçlü aile hikayesi nedeniyle tarafımıza başvurmuştur.

LRRK2(**NM_198578.4**):c.2915A>G (**p.Asp972Gly**) varyantı da benzer şekilde bilgisayar tabanlı veritabanları ile değerlendirilmiştir. **EIF4G1**(**NM_198241.3**):c.1403C>A (**p.Ala468Glu**) varyantı ile ilgili Çin menşeli bir çalışmada hasta ve kontrol grubu arasında belirgin fark olmadığı bildirilmiştir fakat varyantın toplumsal veritabanlarındaki frekansı oldukça düşük bildirilmiştir[234]. Bu çalışma ile ilgili olarak kontrol grubunda yer alan 130 sağlıklı birey ile ilgili olarak, kontrol grubunu oluşturan bireylerin yaş aralığı 40-80 olarak ifade edilmiştir ve özellikle genç yaşta olan bireylerin ileride PH geliştirme ihtimali çalışmanın tasarımı gereği dışlanamaz bir durum olarak göze çarpmaktadır. Bu iki varyantı birden taşıyan olgumuz 60'lı yaşlarında olup uzun süredir tremor şikayetine ek olarak ailesinde birden fazla kişide PH tanısı öyküsü mevcuttur. Kraniyal MR'da senil atrofi raporlanmıştır.

Çalışmamızda vurgulamak istediğimiz temel mesajlarımızdan bir tanesi de hastaların ve varyantların takibidir. Yukarıda da ifade edildiği üzere NGS teknolojisinin her geçen gün daha ulaşılabilir olması ve bu teknoloji ile elde

edilen varyant verilerinin gün geçtikçe artması nedeniyle genetik değişimler ve hastalıklar arasındaki bağlantının kurulması günümüz şartları ve imkanlarında dahi oldukça zor bir görev olarak gözükmekte, hatta çok deneyimli klinikler bile bu konuda zorlukların olduğunu çeşitli yayınlarda dile getirmektedirler[216, 235].

Özellikle bu durumda yardımcı olabilecek seçenek olarak varyantların ilerleyen dönemlerde tekrardan değerlendirilmesi seçeneği önümüze çıkmaktadır. Yukarıda belirtildiği üzere hem *in-silico* analiz programlarının mütemadiyen güncellenmesi hem allel frekans verilerinin değişik ırksal kökenli toplumlar için güncellenmesi dolayısıyla varyantların klinik öneminin zamanla değişmesi süpriz olmayan bir durumdur. Bu konuda yayınlanmış bir kaç görüş olsa da henüz üzerinde uzlaşılmış ve yeniden değerlendirmeyi şart koşan uluslararası bir veri rehberi yayınlanmamıştır[236-238].

Yapılan bir araştırmada 5-6 yıllık süre içerisinde varyantların tekrardan değerlendirilmesi ile %26'dan %47'ye doğru artış gösteren bir klinik tanı faydası sağlandığı bildirilmiştir [239]. Özellikle PH gibi her geçen gün yeni aday genlerin hatta aday genler adına yeni varyantların raporlandığı hastalıklar açısından düşünüldüğünde varyantların yeniden değerlendirilmesi klinik değişimin olasılığı üzerine düşünüldüğü zaman kaçınılmaz olarak gözükmektedir. Bu şekilde yapılan planın en önemli noktası ise hasta ile temasın koparılmaması, gerekli zaman aralığında klinik ziyaretleri ve gereklilik halinde hastaya tekrardan ulaşım zamanla değişmiş olan klinik olarak anlamlı genetik varyantlara ait danışmanın verilmesidir[240].

Avrupa Genetik Veri Değerlendirme Komisyonu Euro-Gentest yayınladığı bir makalede varyantların yeni verilerle değerlendirilmesinin değişmesi ve hastaya olan etkisi hakkında klinisyenlerin yeniden hastaları bilgilendirmek durumunda olabileceklerini ifade etmiştir[241]. Kanada Tıbbi Genetik Derneği

(CCMG) ise hastalara verilen genetik danışma sırasında elde edilen verilerinin ileri gelecekte tekrar değerlendirmeye tabi tutulabileceğini ve olası klinik anlamlı değişim olması durumunda tekrar hastalarla iletişim kurulabileceğinin bildirilmesi gerektiğini ifade eden bir yayın oluşturmuştur[242]. ACMG ise yine yayınladığı görüşte klinisyenlere özellikle patojeniteye yakın VUS değişimlerin belirli aralıklarla tekrardan değerlendirilmesini önermiştir[216]. Buna karşılık olarak Birleşik Krallıktan araştırmacılar bu durumun sadece klinisyenin değil aynı zamanda hastanın da sorumluluğunda olduğunu ifade etmiştir[238].

Kendi kliniğimizin tecrübesi ise yukarıda **Tablo 7**'de gösterilmiştir. Tarafımıza başvuru anında yapılan ve Parkinson hastalığı ile ilgili 18 genden oluşan gen panelinden NGS ile elde edilen genetik verilerden analizlerde edilen varyantlar tekrar değerlendirmeye tabi tutulmuştur. Bu yapılan ilk analizlerde yayınlar, in-silico veri tabanları değerlendirilip 16 varyant 'klinik önemi bilinmeyen' olarak sınıflandırılmış iken, güncel verilerle analiz sonucunda bu varyantların 'benign' veya 'muhtemel benign' sınıfında yer aldığı görülmüştür. Sadece 1 varyant ilk değerlendirmede 'benign' olarak değerlendirildikten sonra güncel değerlendirme patojenite skoru artmış olup 'klinik önemi bilinmeyen' olarak tekrardan sınıflandırılmıştır.

Bu iki değerlendirme periyodu arasındaki fark en az 12, en fazla 24 aydır. Bu kadar kısa sürede dahi elde ettiğimiz varyantların %55 kadarının klinik değeri in-silico analizlerde değişim göstermiştir. Bu şekilde NGS sonucu elde edilen verinin 12 ay kadar kısa bir sürede dahi tekrardan analizinde tanıya yönelik anlamlı derecede veri değişimi olduğu çeşitli yayınlarda bildirilmiştir[243-245].

Tekrardan değerlendirme sonrası hasta ile görüşme ve bildirim yapma konusunda da üzerinde uzlaşmış bir metin yoktur. Bazı laboratuvar ve klinikler hasta ile tekrardan iletişim kurmayı önerirken bazıları bu durumu laboratuvar veya kliniğin sorumlulukları arasında görmemişlerdir[246].

Bu konu üzerinde net bir fikir birliğinin sağlanması nedeniyle uluslararası bir rehber yayınlanması klinik pratik açısından elzemdir. Özellikle klinik önemi bilinmeyen varyantlarla ilgili izlenecek yol haritasının standartize edilmesi hem klinisyenler açısından kolaylık sağlama konusunda hem hastalar açısından klinik fayda sağlanması adına önemli bir işleve sahip olacaktır.

SONUÇ ve ÖNERİLER;

- 1- Bu çalışmada klinik olarak PH tanısı almış, şüphesi olan, aile hikayesi olan ve insidental PH genleri ile ilişkili varyant saptanan toplam 43 hasta, NGS temelli 18 gen içeren bir panel çalışmasına tabi tutularak moleküler analizleri güncel verilerle yapılmıştır.
- 2- Bu gen panelinin çalışılması sonucunda hastalardan toplamda 14'inde(%32) ClinVar ve veya ACMG kriterleri çerçevesinde VUS-Muhtemel Patojenik-Patojenik olarak değerlendirilen toplam 14 farklı varyant tespit edilmiştir. Olguların 3(%7)'ünde Patojenik-Muhtemel Patojenik varyant tespit edilirken, 11(%26)'inde Klinik Önemi Bilinmeyen varyant tespit edilmiştir. Tespit edilen varyantların tamamı heterozigot olarak bulunmuştur. Tespit edilen varyantların iki tanesi novel olarak değerlendirilmiştir.
- 3- Ailesinde PH tanısı ya da PH ile uyumlu olabilecek uzun süreli gözlemlenebilen en az bir semptom olan olguların oranı 20(%46) olarak bulunmuş ve bu grubun içerisinde 8(%40) olguda raporlanabilir, klinik önemi olduğu düşünülen varyant saptanmıştır.
- 4- Toplamda 9 farklı gende(**EIF4G1, ATP13A2, LRRK2, FBXO7, FGF20, PRKN, SYNJ1, VPS35, DNAJC13**) VUS-Muhtemel Patojenik-Patojenik olarak sınıflandırılan varyantlar tespit edilmiştir.
- 5- Tespit edilen varyantların değerlendirilmesinde ClinVar ve ACMG veritabanları kullanılmıştır.

- 6- Bu çalışma taradığımız kadarıyla ülkemizde yapılan Parkinson hastalığı ile ilgili en geniş hedeflenmiş gen paneli ile yapılmış genetik etiyojoloji çalışmasıdır.
- 7- Klinik önemi bilinmeyen varyantların raporlanması ve takibi ve yeniden değerlendirilmesinin ne kadar önemli olduğu bir kez daha çalışmamızda ortaya çıkmış, bu konuda uluslararası bir kılavuz gerekliliği belirtilmiştir.
- 8- Sonuç olarak Parkinson Hastalığı genetik etiopatogenezinde literatür katkısında bulunulmuştur.
- 9- Öneri olarak daha geniş kohortların daha fazla sayıda gen içeren gen panelleri ile tetkik edilmesinin üretilecek akademik veri açısından daha zengin olabileceğini ifade etmekteyiz.
- 10- Ek olarak PH ve genetik başlığı altında çalışmalar yoğunlukla moleküler düzeyli testlere yoğunlaşmış olsa da, sitogenetik çalışmalar, kopya sayısı değişiklikleri gibi daha farklı perspektifte genetik anomalilerin PH ile ilişkisinin araştırılmasını olası etiyojolojik faydasından dolayı önermekteyiz.

Projenin Kısıtlılıkları

Çalışmada 18 gen içeren ve PH moleküler tanısı için özel olarak dizayn edilmiş bir panel kullanılmıştır. Bu panel içerisinde OMIM'de PH ile ilişkilendirilen bazı genler bulunmamaktadır. Varyant tespit edilmeyen grupta bu genlerin çalışılmaması bir kısıtlılıktır.

Ayrıca, bu panel ile PH fenotipine yol açan yeni genlerin bulunması mümkün değildir. Aynı şekilde bu panelde sadece PH ilişkili genlerin ekzonları ve ekzon komşuluğundaki bölgeleri analiz edilebilmiştir. Panel içeriğinin promoter bölgeleri, derin intronik bölgeleri, intergenik bölgeleri, büyük insersiyon ve delesyonları saptayabilecek şekilde düzenlenmesi moleküler tanı oranını artıracaktır.

Bütün genetik çalışmalarda sayısal anlamlılık sağlayabilmek ve araştırma gücünü artırabilmek amacıyla örnek miktarının fazla olması tercih edilir. Bu çalışmaya sadece 43 olgu dahil edilebilmiştir. Yüksek hasta sayısı ile yapılacak çalışmalarda anlamlı genetik varyantların bulunma sayısı da artmış olacaktır. Ek olarak elde edilen varyantların çalışılan popülasyondaki (Çanakkale popülasyonu) sıklığının bilinmiyor olması yine karşımıza çıkan bir kısıtlılıktır.

Çalışmanın en önemli kısıtlılıklarından birisinin de tespit edilen varyantların %26'sının ACMG ve ClinVar kriterlerine göre VUS kategorisine girmesi olarak değerlendirilmiştir. Varyant tespit edilen olguların çeşitli nedenlerle aile içi segregasyon çalışmalarına alınamaması, varyantların fonksiyonel çalışmasının yapılamaması, bazı varyantlara ait allel frekansı verisinin olmaması gibi nedenlerden dolayı elde edilen varyantların çoğu VUS kategorisine girmiştir. PH nedeni olabilecek potansiyel varyantlar VUS kategorisine girerek klinik değerlendirmeyi zorlaştırmaktadır.

6. KAYNAKLAR

1. Bandres-Ciga, S., et al., *Genetics of Parkinson's disease: An introspection of its journey towards precision medicine*. Neurobiol Dis, 2020. **137**: p. 104782.
2. Parkinson, J., *An essay on the shaking palsy*. 1817. J Neuropsychiatry Clin Neurosci, 2002. **14**(2): p. 223-36; discussion 222.
3. Rodriguez-Oroz, M.C., et al., *Initial clinical manifestations of Parkinson's disease: features and pathophysiological mechanisms*. Lancet Neurol, 2009. **8**(12): p. 1128-39.
4. Van Den Eeden, S.K., et al., *Incidence of Parkinson's disease: variation by age, gender, and race/ethnicity*. Am J Epidemiol, 2003. **157**(11): p. 1015-22.
5. de Lau, L.M. and M.M. Breteler, *Epidemiology of Parkinson's disease*. Lancet Neurol, 2006. **5**(6): p. 525-35.
6. Pringsheim, T., et al., *The prevalence of Parkinson's disease: a systematic review and meta-analysis*. Mov Disord, 2014. **29**(13): p. 1583-90.
7. Hawkes, C.H., *The prodromal phase of sporadic Parkinson's disease: does it exist and if so how long is it?* Mov Disord, 2008. **23**(13): p. 1799-807.
8. Baldereschi, M., et al., *Parkinson's disease and parkinsonism in a longitudinal study: two-fold higher incidence in men*. ILSA Working Group. Italian Longitudinal Study on Aging. Neurology, 2000. **55**(9): p. 1358-63.
9. Chillag-Talmor, O., et al., *Use of a refined drug tracer algorithm to estimate prevalence and incidence of Parkinson's disease in a large israeli population*. J Parkinsons Dis, 2011. **1**(1): p. 35-47.
10. Morens, D.M., et al., *Epidemiologic observations on Parkinson's disease: incidence and mortality in a prospective study of middle-aged men*. Neurology, 1996. **46**(4): p. 1044-50.
11. Elbaz, A., et al., *Survival study of Parkinson disease in Olmsted County, Minnesota*. Arch Neurol, 2003. **60**(1): p. 91-6.
12. Fahn, S., *Description of Parkinson's disease as a clinical syndrome*. Ann N Y Acad Sci, 2003. **991**: p. 1-14.
13. Dorsey, E.R., et al., *Projected number of people with Parkinson disease in the most populous nations, 2005 through 2030*. Neurology, 2007. **68**(5): p. 384-6.
14. Shulman, J.M., P.L. De Jager, and M.B. Feany, *Parkinson's disease: genetics and pathogenesis*. Annu Rev Pathol, 2011. **6**: p. 193-222.
15. Chaudhuri, K.R. and A.H. Schapira, *Non-motor symptoms of Parkinson's disease: dopaminergic pathophysiology and treatment*. Lancet Neurol, 2009. **8**(5): p. 464-74.
16. Langston, J.W., et al., *Chronic Parkinsonism in humans due to a product of meperidine-analog synthesis*. Science, 1983. **219**(4587): p. 979-80.
17. Braak, H., et al., *Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease*. Neurobiol Aging, 2003. **24**(2): p. 197-211.
18. Wang, X., et al., *The endogenous substrates of brain CYP2D*. Eur J Pharmacol, 2014. **724**: p. 211-8.
19. Kalia, L.V. and A.E. Lang, *Parkinson's disease*. Lancet, 2015. **386**(9996): p. 896-912.
20. Tolosa, E., G. Wenning, and W. Poewe, *The diagnosis of Parkinson's disease*. Lancet Neurol, 2006. **5**(1): p. 75-86.
21. Gibb, W.R. and A.J. Lees, *The relevance of the Lewy body to the pathogenesis of idiopathic Parkinson's disease*. J Neurol Neurosurg Psychiatry, 1988. **51**(6): p. 745-52.
22. Hely, M.A., et al., *The Sydney multicenter study of Parkinson's disease: the inevitability of dementia at 20 years*. Mov Disord, 2008. **23**(6): p. 837-44.

23. Poewe, W., et al., *Parkinson disease*. Nat Rev Dis Primers, 2017. **3**: p. 17013.
24. Rizzo, G., et al., *Accuracy of clinical diagnosis of Parkinson disease: A systematic review and meta-analysis*. Neurology, 2016. **86**(6): p. 566-76.
25. Garnett, E.S., G. Firnau, and C. Nahmias, *Dopamine visualized in the basal ganglia of living man*. Nature, 1983. **305**(5930): p. 137-8.
26. Stoessl, A.J., S. Lehericy, and A.P. Strafella, *Imaging insights into basal ganglia function, Parkinson's disease, and dystonia*. Lancet, 2014. **384**(9942): p. 532-44.
27. Mahlknecht, P., et al., *Significance of MRI in diagnosis and differential diagnosis of Parkinson's disease*. Neurodegener Dis, 2010. **7**(5): p. 300-18.
28. Tuite, P., *Magnetic resonance imaging as a potential biomarker for Parkinson's disease*. Transl Res, 2016. **175**: p. 4-16.
29. Dickson, D.W., et al., *Neuropathological assessment of Parkinson's disease: refining the diagnostic criteria*. Lancet Neurol, 2009. **8**(12): p. 1150-7.
30. Spillantini, M.G., et al., *Alpha-synuclein in Lewy bodies*. Nature, 1997. **388**(6645): p. 839-40.
31. Polymeropoulos, M.H., et al., *Mutation in the alpha-synuclein gene identified in families with Parkinson's disease*. Science, 1997. **276**(5321): p. 2045-7.
32. Nalls, M.A., et al., *Large-scale meta-analysis of genome-wide association data identifies six new risk loci for Parkinson's disease*. Nat Genet, 2014. **46**(9): p. 989-93.
33. Vekrellis, K., et al., *Pathological roles of alpha-synuclein in neurological disorders*. Lancet Neurol, 2011. **10**(11): p. 1015-25.
34. Wales, P., et al., *Limelight on alpha-synuclein: pathological and mechanistic implications in neurodegeneration*. J Parkinsons Dis, 2013. **3**(4): p. 415-59.
35. Burre, J., *The Synaptic Function of alpha-Synuclein*. J Parkinsons Dis, 2015. **5**(4): p. 699-713.
36. Kim, C. and S.J. Lee, *Controlling the mass action of alpha-synuclein in Parkinson's disease*. J Neurochem, 2008. **107**(2): p. 303-16.
37. Melki, R., *Role of Different Alpha-Synuclein Strains in Synucleinopathies, Similarities with other Neurodegenerative Diseases*. J Parkinsons Dis, 2015. **5**(2): p. 217-27.
38. Xilouri, M., O.R. Brekk, and L. Stefanis, *alpha-Synuclein and protein degradation systems: a reciprocal relationship*. Mol Neurobiol, 2013. **47**(2): p. 537-51.
39. Brundin, P., et al., *Research in motion: the enigma of Parkinson's disease pathology spread*. Nat Rev Neurosci, 2008. **9**(10): p. 741-5.
40. Xilouri, M., et al., *Abberant alpha-synuclein confers toxicity to neurons in part through inhibition of chaperone-mediated autophagy*. PLoS One, 2009. **4**(5): p. e5515.
41. Chu, Y., et al., *Alterations in lysosomal and proteasomal markers in Parkinson's disease: relationship to alpha-synuclein inclusions*. Neurobiol Dis, 2009. **35**(3): p. 385-98.
42. Alvarez-Erviti, L., et al., *Chaperone-mediated autophagy markers in Parkinson disease brains*. Arch Neurol, 2010. **67**(12): p. 1464-72.
43. Volpicelli-Daley, L.A., et al., *G2019S-LRRK2 Expression Augments alpha-Synuclein Sequestration into Inclusions in Neurons*. J Neurosci, 2016. **36**(28): p. 7415-27.
44. Braak, H. and K. Del Tredici, *Invited Article: Nervous system pathology in sporadic Parkinson disease*. Neurology, 2008. **70**(20): p. 1916-25.
45. Angot, E., et al., *Are synucleinopathies prion-like disorders?* Lancet Neurol, 2010. **9**(11): p. 1128-38.
46. Brundin, P., R. Melki, and R. Kopito, *Prion-like transmission of protein aggregates in neurodegenerative diseases*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2010. **11**(4): p. 301-7.

47. Tyson, T., J.A. Steiner, and P. Brundin, *Sorting out release, uptake and processing of alpha-synuclein during prion-like spread of pathology*. J Neurochem, 2016. **139 Suppl 1**: p. 275-289.
48. Mao, X., et al., *Pathological alpha-synuclein transmission initiated by binding lymphocyte-activation gene 3*. Science, 2016. **353**(6307).
49. Halliday, G., et al., *The progression of pathology in longitudinally followed patients with Parkinson's disease*. Acta Neuropathol, 2008. **115**(4): p. 409-15.
50. Zaccai, J., et al., *Patterns and stages of alpha-synucleinopathy: Relevance in a population-based cohort*. Neurology, 2008. **70**(13): p. 1042-8.
51. Pickering-Brown, S.M., *Review: Recent progress in frontotemporal lobar degeneration*. Neuropathol Appl Neurobiol, 2010. **36**(1): p. 4-16.
52. Schapira, A.H., *Mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease*. Cell Death Differ, 2007. **14**(7): p. 1261-6.
53. Bose, A. and M.F. Beal, *Mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease*. J Neurochem, 2016. **139 Suppl 1**: p. 216-231.
54. Devi, L., et al., *Mitochondrial import and accumulation of alpha-synuclein impair complex I in human dopaminergic neuronal cultures and Parkinson disease brain*. J Biol Chem, 2008. **283**(14): p. 9089-100.
55. Ekstrand, M.I., et al., *Progressive parkinsonism in mice with respiratory-chain-deficient dopamine neurons*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(4): p. 1325-30.
56. Nordstroma, U., et al., *Progressive nigrostriatal terminal dysfunction and degeneration in the engrailed1 heterozygous mouse model of Parkinson's disease*. Neurobiol Dis, 2015. **73**: p. 70-82.
57. Sossi, V., et al., *Changes of dopamine turnover in the progression of Parkinson's disease as measured by positron emission tomography: their relation to disease-compensatory mechanisms*. J Cereb Blood Flow Metab, 2004. **24**(8): p. 869-76.
58. Sossi, V., et al., *Dopamine turnover increases in asymptomatic LRRK2 mutations carriers*. Mov Disord, 2010. **25**(16): p. 2717-23.
59. Lamberts, J.T., E.N. Hildebrandt, and P. Brundin, *Spreading of alpha-synuclein in the face of axonal transport deficits in Parkinson's disease: a speculative synthesis*. Neurobiol Dis, 2015. **77**: p. 276-83.
60. Kane, L.A., et al., *PINK1 phosphorylates ubiquitin to activate Parkin E3 ubiquitin ligase activity*. J Cell Biol, 2014. **205**(2): p. 143-53.
61. Requejo-Aguilar, R., et al., *DJ1 represses glycolysis and cell proliferation by transcriptionally up-regulating Pink1*. Biochem J, 2015. **467**(2): p. 303-10.
62. Lee, R.G., et al., *Early-onset Parkinson disease caused by a mutation in CHCHD2 and mitochondrial dysfunction*. Neurol Genet, 2018. **4**(5): p. e276.
63. Cieri, D., M. Brini, and T. Cali, *Emerging (and converging) pathways in Parkinson's disease: keeping mitochondrial wellness*. Biochem Biophys Res Commun, 2017. **483**(4): p. 1020-1030.
64. Bolam, J.P. and E.K. Pissadaki, *Living on the edge with too many mouths to feed: why dopamine neurons die*. Mov Disord, 2012. **27**(12): p. 1478-83.
65. Pissadaki, E.K. and J.P. Bolam, *The energy cost of action potential propagation in dopamine neurons: clues to susceptibility in Parkinson's disease*. Front Comput Neurosci, 2013. **7**: p. 13.
66. Moehle, M.S. and A.B. West, *M1 and M2 immune activation in Parkinson's Disease: Foe and ally?* Neuroscience, 2015. **302**: p. 59-73.
67. Schapansky, J., et al., *Membrane recruitment of endogenous LRRK2 precedes its potent regulation of autophagy*. Hum Mol Genet, 2014. **23**(16): p. 4201-14.

68. Ma, B., et al., *LRRK2 modulates microglial activity through regulation of chemokine (C-X3-C) receptor 1-mediated signalling pathways*. Hum Mol Genet, 2016. **25**(16): p. 3515-3523.
69. Ransohoff, R.M., *How neuroinflammation contributes to neurodegeneration*. Science, 2016. **353**(6301): p. 777-83.
70. Hirsch, E.C. and S. Hunot, *Neuroinflammation in Parkinson's disease: a target for neuroprotection?* Lancet Neurol, 2009. **8**(4): p. 382-97.
71. Gao, H.M., et al., *Neuroinflammation and oxidation/nitration of alpha-synuclein linked to dopaminergic neurodegeneration*. J Neurosci, 2008. **28**(30): p. 7687-98.
72. Lema Tome, C.M., et al., *Inflammation and alpha-synuclein's prion-like behavior in Parkinson's disease--is there a link?* Mol Neurobiol, 2013. **47**(2): p. 561-74.
73. Garretti, F., et al., *Autoimmunity in Parkinson's Disease: The Role of alpha-Synuclein-Specific T Cells*. Front Immunol, 2019. **10**: p. 303.
74. Billingsley, K.J., et al., *Genetic risk factors in Parkinson's disease*. Cell Tissue Res, 2018. **373**(1): p. 9-20.
75. Group, P.D.M.C., et al., *Long-term effectiveness of dopamine agonists and monoamine oxidase B inhibitors compared with levodopa as initial treatment for Parkinson's disease (PD MED): a large, open-label, pragmatic randomised trial*. Lancet, 2014. **384**(9949): p. 1196-205.
76. LeWitt, P.A. and S. Fahn, *Levodopa therapy for Parkinson disease: A look backward and forward*. Neurology, 2016. **86**(14 Suppl 1): p. S3-12.
77. Cenci, M.A., *Presynaptic Mechanisms of L-DOPA-Induced Dyskinesia: The Findings, the Debate, and the Therapeutic Implications*. Front Neurol, 2014. **5**: p. 242.
78. Poewe, W. and A. Antonini, *Novel formulations and modes of delivery of levodopa*. Mov Disord, 2015. **30**(1): p. 114-20.
79. Antonini, A., et al., *Effect of levodopa-carbidopa intestinal gel on dyskinesia in advanced Parkinson's disease patients*. Mov Disord, 2016. **31**(4): p. 530-7.
80. Muller, T., *Catechol-O-methyltransferase inhibitors in Parkinson's disease*. Drugs, 2015. **75**(2): p. 157-74.
81. Schapira, A.H., *Monoamine oxidase B inhibitors for the treatment of Parkinson's disease: a review of symptomatic and potential disease-modifying effects*. CNS Drugs, 2011. **25**(12): p. 1061-71.
82. Fox, S.H., et al., *The Movement Disorder Society Evidence-Based Medicine Review Update: Treatments for the motor symptoms of Parkinson's disease*. Mov Disord, 2011. **26** Suppl 3: p. S2-41.
83. Schapira, A.H., et al., *Assessment of Safety and Efficacy of Safinamide as a Levodopa Adjunct in Patients With Parkinson Disease and Motor Fluctuations: A Randomized Clinical Trial*. JAMA Neurol, 2017. **74**(2): p. 216-224.
84. Jankovic, J. and W. Poewe, *Therapies in Parkinson's disease*. Curr Opin Neurol, 2012. **25**(4): p. 433-47.
85. Storch, A., et al., *Nonmotor fluctuations in Parkinson disease: severity and correlation with motor complications*. Neurology, 2013. **80**(9): p. 800-9.
86. Seppi, K., et al., *The Movement Disorder Society Evidence-Based Medicine Review Update: Treatments for the non-motor symptoms of Parkinson's disease*. Mov Disord, 2011. **26** Suppl 3: p. S42-80.
87. Connolly, B. and S.H. Fox, *Treatment of cognitive, psychiatric, and affective disorders associated with Parkinson's disease*. Neurotherapeutics, 2014. **11**(1): p. 78-91.
88. Weintraub, D. and D.J. Burn, *Parkinson's disease: the quintessential neuropsychiatric disorder*. Mov Disord, 2011. **26**(6): p. 1022-31.

89. Perez-Lloret, S., et al., *Emerging drugs for autonomic dysfunction in Parkinson's disease*. Expert Opin Emerg Drugs, 2013. **18**(1): p. 39-53.
90. Bronstein, J.M., et al., *Deep brain stimulation for Parkinson disease: an expert consensus and review of key issues*. Arch Neurol, 2011. **68**(2): p. 165.
91. Deuschl, G. and Y. Agid, *Subthalamic neurostimulation for Parkinson's disease with early fluctuations: balancing the risks and benefits*. Lancet Neurol, 2013. **12**(10): p. 1025-34.
92. Odekerken, V.J., et al., *Subthalamic nucleus versus globus pallidus bilateral deep brain stimulation for advanced Parkinson's disease (NSTAPS study): a randomised controlled trial*. Lancet Neurol, 2013. **12**(1): p. 37-44.
93. Voges, J., et al., *Thirty days complication rate following surgery performed for deep-brain-stimulation*. Mov Disord, 2007. **22**(10): p. 1486-9.
94. Kordower, J.H. and A. Bjorklund, *Trophic factor gene therapy for Parkinson's disease*. Mov Disord, 2013. **28**(1): p. 96-109.
95. Gill, S.S., et al., *Direct brain infusion of glial cell line-derived neurotrophic factor in Parkinson disease*. Nat Med, 2003. **9**(5): p. 589-95.
96. Lang, A.E., et al., *Randomized controlled trial of intraputamenal glial cell line-derived neurotrophic factor infusion in Parkinson disease*. Ann Neurol, 2006. **59**(3): p. 459-66.
97. Kordower, J.H., et al., *Delivery of neurturin by AAV2 (CERE-120)-mediated gene transfer provides structural and functional neuroprotection and neurorestoration in MPTP-treated monkeys*. Ann Neurol, 2006. **60**(6): p. 706-15.
98. Palfi, S., et al., *Long-term safety and tolerability of ProSavin, a lentiviral vector-based gene therapy for Parkinson's disease: a dose escalation, open-label, phase 1/2 trial*. Lancet, 2014. **383**(9923): p. 1138-46.
99. Bjorklund, A., T. Bjorklund, and D. Kirik, *Gene therapy for dopamine replacement in Parkinson's disease*. Sci Transl Med, 2009. **1**(2): p. 2ps2.
100. Carlsson, T., et al., *Reversal of dyskinesias in an animal model of Parkinson's disease by continuous L-DOPA delivery using rAAV vectors*. Brain, 2005. **128**(Pt 3): p. 559-69.
101. Freed, C.R., et al., *Transplantation of embryonic dopamine neurons for severe Parkinson's disease*. N Engl J Med, 2001. **344**(10): p. 710-9.
102. Olanow, C.W., et al., *A double-blind controlled trial of bilateral fetal nigral transplantation in Parkinson's disease*. Ann Neurol, 2003. **54**(3): p. 403-14.
103. Brundin, P. and J.H. Kordower, *Neuropathology in transplants in Parkinson's disease: implications for disease pathogenesis and the future of cell therapy*. Prog Brain Res, 2012. **200**: p. 221-41.
104. Barker, R.A., J. Drouin-Ouellet, and M. Parmar, *Cell-based therapies for Parkinson disease-past insights and future potential*. Nat Rev Neurol, 2015. **11**(9): p. 492-503.
105. Kimmelman, J., et al., *New ISSCR guidelines: clinical translation of stem cell research*. Lancet, 2016. **387**(10032): p. 1979-81.
106. Mandler, M., et al., *Next-generation active immunization approach for synucleinopathies: implications for Parkinson's disease clinical trials*. Acta Neuropathol, 2014. **127**(6): p. 861-79.
107. Bergstrom, A.L., P. Kallunki, and K. Fog, *Development of Passive Immunotherapies for Synucleinopathies*. Mov Disord, 2016. **31**(2): p. 203-13.
108. Schenk, D.B., et al., *First-in-human assessment of PRX002, an anti-alpha-synuclein monoclonal antibody, in healthy volunteers*. Mov Disord, 2017. **32**(2): p. 211-218.
109. Marder, K., et al., *Familial aggregation of early- and late-onset Parkinson's disease*. Ann Neurol, 2003. **54**(4): p. 507-13.
110. Sveinbjornsdottir, S., et al., *Familial aggregation of Parkinson's disease in Iceland*. N Engl J Med, 2000. **343**(24): p. 1765-70.

111. Gasser, T., *Mendelian forms of Parkinson's disease*. *Biochim Biophys Acta*, 2009. **1792**(7): p. 587-96.
112. Hirschhorn, J.N. and M.J. Daly, *Genome-wide association studies for common diseases and complex traits*. *Nat Rev Genet*, 2005. **6**(2): p. 95-108.
113. Kalinderi, K., S. Bostantjopoulou, and L. Fidani, *The genetic background of Parkinson's disease: current progress and future prospects*. *Acta Neurol Scand*, 2016. **134**(5): p. 314-326.
114. Deng, H.X., et al., *Identification of TMEM230 mutations in familial Parkinson's disease*. *Nat Genet*, 2016. **48**(7): p. 733-9.
115. Quadri, M., et al., *LRP10 genetic variants in familial Parkinson's disease and dementia with Lewy bodies: a genome-wide linkage and sequencing study*. *Lancet Neurol*, 2018. **17**(7): p. 597-608.
116. Chen, X., et al., *Genetic analysis of NUS1 in Chinese patients with Parkinson's disease*. *Neurobiol Aging*, 2020. **86**: p. 202 e5-202 e6.
117. Fan, Y., et al., *ARSA gene variants and Parkinson's disease*. *Brain*, 2020. **143**(6): p. e47.
118. Simon-Sanchez, J., et al., *Genome-wide association study reveals genetic risk underlying Parkinson's disease*. *Nat Genet*, 2009. **41**(12): p. 1308-12.
119. Satake, W., et al., *Genome-wide association study identifies common variants at four loci as genetic risk factors for Parkinson's disease*. *Nat Genet*, 2009. **41**(12): p. 1303-7.
120. Kara, E., et al., *Assessment of Parkinson's disease risk loci in Greece*. *Neurobiol Aging*, 2014. **35**(2): p. 442 e9-442 e16.
121. Siitonen, A., et al., *Genetics of early-onset Parkinson's disease in Finland: exome sequencing and genome-wide association study*. *Neurobiol Aging*, 2017. **53**: p. 195 e7-195 e10.
122. Bandres-Ciga, S., et al., *The Genetic Architecture of Parkinson Disease in Spain: Characterizing Population-Specific Risk, Differential Haplotype Structures, and Providing Etiologic Insight*. *Mov Disord*, 2019. **34**(12): p. 1851-1863.
123. Nalls, M.A., et al., *Identification of novel risk loci, causal insights, and heritable risk for Parkinson's disease: a meta-analysis of genome-wide association studies*. *Lancet Neurol*, 2019. **18**(12): p. 1091-1102.
124. Bourrat, P., Q. Lu, and E. Jablonka, *Why the missing heritability might not be in the DNA*. *Bioessays*, 2017. **39**(7).
125. Bomba, L., K. Walter, and N. Soranzo, *The impact of rare and low-frequency genetic variants in common disease*. *Genome Biol*, 2017. **18**(1): p. 77.
126. Yang, J., et al., *Genetic variance estimation with imputed variants finds negligible missing heritability for human height and body mass index*. *Nat Genet*, 2015. **47**(10): p. 1114-20.
127. Vergouw, L.J.M., et al., *LRP10 variants in Parkinson's disease and dementia with Lewy bodies in the South-West of the Netherlands*. *Parkinsonism Relat Disord*, 2019. **65**: p. 243-247.
128. Zuk, O., et al., *The mystery of missing heritability: Genetic interactions create phantom heritability*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2012. **109**(4): p. 1193-8.
129. Ritchie, M.D. and K. Van Steen, *The search for gene-gene interactions in genome-wide association studies: challenges in abundance of methods, practical considerations, and biological interpretation*. *Ann Transl Med*, 2018. **6**(8): p. 157.
130. Trerotola, M., et al., *Epigenetic inheritance and the missing heritability*. *Hum Genomics*, 2015. **9**: p. 17.
131. Cortijo, S., et al., *Mapping the epigenetic basis of complex traits*. *Science*, 2014. **343**(6175): p. 1145-8.

132. Chang, D., et al., *A meta-analysis of genome-wide association studies identifies 17 new Parkinson's disease risk loci*. Nat Genet, 2017. **49**(10): p. 1511-1516.
133. Singleton, A.B., et al., *alpha-Synuclein locus triplication causes Parkinson's disease*. Science, 2003. **302**(5646): p. 841.
134. Pasanen, P., et al., *Novel alpha-synuclein mutation A53E associated with atypical multiple system atrophy and Parkinson's disease-type pathology*. Neurobiol Aging, 2014. **35**(9): p. 2180 e1-5.
135. Trotta, L., et al., *SNCA and MAPT genes: Independent and joint effects in Parkinson disease in the Italian population*. Parkinsonism Relat Disord, 2012. **18**(3): p. 257-62.
136. Farrer, M.J., *Genetics of Parkinson disease: paradigm shifts and future prospects*. Nat Rev Genet, 2006. **7**(4): p. 306-18.
137. Mueller, J.C., et al., *Multiple regions of alpha-synuclein are associated with Parkinson's disease*. Ann Neurol, 2005. **57**(4): p. 535-41.
138. Edwards, T.L., et al., *Genome-wide association study confirms SNPs in SNCA and the MAPT region as common risk factors for Parkinson disease*. Ann Hum Genet, 2010. **74**(2): p. 97-109.
139. International Parkinson Disease Genomics, C., et al., *Imputation of sequence variants for identification of genetic risks for Parkinson's disease: a meta-analysis of genome-wide association studies*. Lancet, 2011. **377**(9766): p. 641-9.
140. Saad, M., et al., *Genome-wide association study confirms BST1 and suggests a locus on 12q24 as the risk loci for Parkinson's disease in the European population*. Hum Mol Genet, 2011. **20**(3): p. 615-27.
141. Consortium, U.K.P.s.D., et al., *Dissection of the genetics of Parkinson's disease identifies an additional association 5' of SNCA and multiple associated haplotypes at 17q21*. Hum Mol Genet, 2011. **20**(2): p. 345-53.
142. Paisan-Ruiz, C., et al., *Cloning of the gene containing mutations that cause PARK8-linked Parkinson's disease*. Neuron, 2004. **44**(4): p. 595-600.
143. Zimprich, A., et al., *Mutations in LRRK2 cause autosomal-dominant parkinsonism with pleomorphic pathology*. Neuron, 2004. **44**(4): p. 601-7.
144. Healy, D.G., et al., *Phenotype, genotype, and worldwide genetic penetrance of LRRK2-associated Parkinson's disease: a case-control study*. Lancet Neurol, 2008. **7**(7): p. 583-90.
145. Do, C.B., et al., *Web-based genome-wide association study identifies two novel loci and a substantial genetic component for Parkinson's disease*. PLoS Genet, 2011. **7**(6): p. e1002141.
146. Wu, X., et al., *Quantitative assessment of the effect of LRRK2 exonic variants on the risk of Parkinson's disease: a meta-analysis*. Parkinsonism Relat Disord, 2012. **18**(6): p. 722-30.
147. Kett, L.R. and W.T. Dauer, *Leucine-rich repeat kinase 2 for beginners: six key questions*. Cold Spring Harb Perspect Med, 2012. **2**(3): p. a009407.
148. MacLeod, D.A., et al., *RAB7L1 interacts with LRRK2 to modify intraneuronal protein sorting and Parkinson's disease risk*. Neuron, 2013. **77**(3): p. 425-39.
149. Qing, H., et al., *Lrrk2 interaction with alpha-synuclein in diffuse Lewy body disease*. Biochem Biophys Res Commun, 2009. **390**(4): p. 1229-34.
150. Qing, H., et al., *Lrrk2 phosphorylates alpha synuclein at serine 129: Parkinson disease implications*. Biochem Biophys Res Commun, 2009. **387**(1): p. 149-52.
151. Najim al-Din, A.S., et al., *Pallido-pyramidal degeneration, supranuclear upgaze paresis and dementia: Kufor-Rakeb syndrome*. Acta Neurol Scand, 1994. **89**(5): p. 347-52.
152. Quinn, N.P., P.J. Goadsby, and A.J. Lees, *Hereditary juvenile parkinsonism with pyramidal signs and mental retardation*. Eur J Neurol, 1995. **2**(1): p. 23-6.

153. Hampshire, D.J., et al., *Kufor-Rakeb syndrome, pallido-pyramidal degeneration with supranuclear upgaze paresis and dementia, maps to 1p36*. J Med Genet, 2001. **38**(10): p. 680-2.
154. Ramirez, A., et al., *Hereditary parkinsonism with dementia is caused by mutations in ATP13A2, encoding a lysosomal type 5 P-type ATPase*. Nat Genet, 2006. **38**(10): p. 1184-91.
155. Dehay, B., et al., *Loss of P-type ATPase ATP13A2/PARK9 function induces general lysosomal deficiency and leads to Parkinson disease neurodegeneration*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2012. **109**(24): p. 9611-6.
156. Usenovic, M., et al., *Deficiency of ATP13A2 leads to lysosomal dysfunction, alpha-synuclein accumulation, and neurotoxicity*. J Neurosci, 2012. **32**(12): p. 4240-6.
157. van Veen, S., et al., *ATP13A2 deficiency disrupts lysosomal polyamine export*. Nature, 2020. **578**(7795): p. 419-424.
158. Di Fonzo, A., et al., *ATP13A2 missense mutations in juvenile parkinsonism and young onset Parkinson disease*. Neurology, 2007. **68**(19): p. 1557-62.
159. Lin, C.H., et al., *Novel ATP13A2 variant associated with Parkinson disease in Taiwan and Singapore*. Neurology, 2008. **71**(21): p. 1727-32.
160. Norris, A., et al., *SNX-1 and RME-8 oppose the assembly of HGRS-1/ESCRT-0 degradative microdomains on endosomes*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2017. **114**(3): p. E307-E316.
161. Gomez-Lamarca, M.J., et al., *Rme-8 depletion perturbs Notch recycling and predisposes to pathogenic signaling*. J Cell Biol, 2015. **210**(2): p. 303-18.
162. Vilarino-Guell, C., et al., *DNAJC13 mutations in Parkinson disease*. Hum Mol Genet, 2014. **23**(7): p. 1794-801.
163. Giovannone, B., et al., *Two novel proteins that are linked to insulin-like growth factor (IGF-I) receptors by the Grb10 adapter and modulate IGF-I signaling*. J Biol Chem, 2003. **278**(34): p. 31564-73.
164. Lautier, C., et al., *Mutations in the GIGYF2 (TNRC15) gene at the PARK11 locus in familial Parkinson disease*. Am J Hum Genet, 2008. **82**(4): p. 822-33.
165. Zhang, Y., et al., *The contribution of GIGYF2 to Parkinson's disease: a meta-analysis*. Neurol Sci, 2015. **36**(11): p. 2073-9.
166. Desideri, E. and L.M. Martins, *Mitochondrial Stress Signalling: HTRA2 and Parkinson's Disease*. Int J Cell Biol, 2012. **2012**: p. 607929.
167. Unal Gulsuner, H., et al., *Mitochondrial serine protease HTRA2 p.G399S in a kindred with essential tremor and Parkinson disease*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2014. **111**(51): p. 18285-90.
168. Strauss, K.M., et al., *Loss of function mutations in the gene encoding Omi/HtrA2 in Parkinson's disease*. Hum Mol Genet, 2005. **14**(15): p. 2099-111.
169. Bogaerts, V., et al., *Genetic variability in the mitochondrial serine protease HTRA2 contributes to risk for Parkinson disease*. Hum Mutat, 2008. **29**(6): p. 832-40.
170. Pascale, E., et al., *Genetic Architecture of MAPT Gene Region in Parkinson Disease Subtypes*. Front Cell Neurosci, 2016. **10**: p. 96.
171. Spillantini, M.G., et al., *Mutation in the tau gene in familial multiple system tauopathy with presenile dementia*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(13): p. 7737-41.
172. Hutton, M., et al., *Association of missense and 5'-splice-site mutations in tau with the inherited dementia FTDP-17*. Nature, 1998. **393**(6686): p. 702-5.
173. Guo, Y.P., B.S. Tang, and J.F. Guo, *PLA2G6-Associated Neurodegeneration (PLAN): Review of Clinical Phenotypes and Genotypes*. Front Neurol, 2018. **9**: p. 1100.
174. Dawson, T.M. and V.L. Dawson, *The role of parkin in familial and sporadic Parkinson's disease*. Mov Disord, 2010. **25 Suppl 1**: p. S32-9.

175. Kitada, T., et al., *Mutations in the parkin gene cause autosomal recessive juvenile parkinsonism*. Nature, 1998. **392**(6676): p. 605-8.
176. Corti, O., S. Lesage, and A. Brice, *What genetics tells us about the causes and mechanisms of Parkinson's disease*. Physiol Rev, 2011. **91**(4): p. 1161-218.
177. Hijioka, M., et al., *DJ-1/PARK7: A New Therapeutic Target for Neurodegenerative Disorders*. Biol Pharm Bull, 2017. **40**(5): p. 548-552.
178. Annesi, G., et al., *DJ-1 mutations and parkinsonism-dementia-amyotrophic lateral sclerosis complex*. Ann Neurol, 2005. **58**(5): p. 803-7.
179. Truban, D., et al., *PINK1, Parkin, and Mitochondrial Quality Control: What can we Learn about Parkinson's Disease Pathobiology?* J Parkinsons Dis, 2017. **7**(1): p. 13-29.
180. de Rijk, M.C., et al., *Prevalence of Parkinson's disease in the elderly: the Rotterdam Study*. Neurology, 1995. **45**(12): p. 2143-6.
181. Seaman, M.N., *The retromer complex - endosomal protein recycling and beyond*. J Cell Sci, 2012. **125**(Pt 20): p. 4693-702.
182. Belenkaya, T.Y., et al., *The retromer complex influences Wnt secretion by recycling wntless from endosomes to the trans-Golgi network*. Dev Cell, 2008. **14**(1): p. 120-31.
183. Wider, C., et al., *Autosomal dominant dopa-responsive parkinsonism in a multigenerational Swiss family*. Parkinsonism Relat Disord, 2008. **14**(6): p. 465-70.
184. Vilarino-Guell, C., et al., *VPS35 mutations in Parkinson disease*. Am J Hum Genet, 2011. **89**(1): p. 162-7.
185. Kumar, K.R., et al., *Frequency of the D620N mutation in VPS35 in Parkinson disease*. Arch Neurol, 2012. **69**(10): p. 1360-4.
186. Ben Romdhan, S., et al., *A Novel SYNJ1 Mutation in a Tunisian Family with Juvenile Parkinson's Disease Associated with Epilepsy*. J Mol Neurosci, 2018. **66**(2): p. 273-278.
187. Quadri, M., et al., *Mutation in the SYNJ1 gene associated with autosomal recessive, early-onset Parkinsonism*. Hum Mutat, 2013. **34**(9): p. 1208-15.
188. Krebs, C.E., et al., *The Sac1 domain of SYNJ1 identified mutated in a family with early-onset progressive Parkinsonism with generalized seizures*. Hum Mutat, 2013. **34**(9): p. 1200-7.
189. Bannwarth, S., et al., *A mitochondrial origin for frontotemporal dementia and amyotrophic lateral sclerosis through CHCHD10 involvement*. Brain, 2014. **137**(Pt 8): p. 2329-45.
190. Liu, Y., et al., *CHCHD2 inhibits apoptosis by interacting with Bcl-x L to regulate Bax activation*. Cell Death Differ, 2015. **22**(6): p. 1035-46.
191. Adam-Vizi, V. and C. Chinopoulos, *Bioenergetics and the formation of mitochondrial reactive oxygen species*. Trends Pharmacol Sci, 2006. **27**(12): p. 639-45.
192. Murphy, M.P., *How mitochondria produce reactive oxygen species*. Biochem J, 2009. **417**(1): p. 1-13.
193. Funayama, M., et al., *CHCHD2 mutations in autosomal dominant late-onset Parkinson's disease: a genome-wide linkage and sequencing study*. Lancet Neurol, 2015. **14**(3): p. 274-82.
194. Jansen, I.E., et al., *CHCHD2 and Parkinson's disease*. Lancet Neurol, 2015. **14**(7): p. 678-9.
195. Sonenberg, N. and A.G. Hinnebusch, *Regulation of translation initiation in eukaryotes: mechanisms and biological targets*. Cell, 2009. **136**(4): p. 731-45.
196. Chartier-Harlin, M.C., et al., *Translation initiator EIF4G1 mutations in familial Parkinson disease*. Am J Hum Genet, 2011. **89**(3): p. 398-406.
197. Huttenlocher, J., et al., *EIF4G1 is neither a strong nor a common risk factor for Parkinson's disease: evidence from large European cohorts*. J Med Genet, 2015. **52**(1): p. 37-41.

198. Deng, H., Y. Wu, and J. Jankovic, *The EIF4G1 gene and Parkinson's disease*. Acta Neurol Scand, 2015. **132**(2): p. 73-8.
199. Bounoutas, A., et al., *mec-15 encodes an F-box protein required for touch receptor neuron mechanosensation, synapse formation and development*. Genetics, 2009. **183**(2): p. 607-17, 1S1-4S1.
200. Kim, W.Y., R. Geng, and D.E. Somers, *Circadian phase-specific degradation of the F-box protein ZTL is mediated by the proteasome*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(8): p. 4933-8.
201. Zhou, Z.D., J.C.T. Lee, and E.K. Tan, *Pathophysiological mechanisms linking F-box only protein 7 (FBXO7) and Parkinson's disease (PD)*. Mutat Res, 2018. **778**: p. 72-78.
202. Di Fonzo, A., et al., *FBXO7 mutations cause autosomal recessive, early-onset parkinsonian-pyramidal syndrome*. Neurology, 2009. **72**(3): p. 240-5.
203. Ohmachi, S., et al., *Preferential neurotrophic activity of fibroblast growth factor-20 for dopaminergic neurons through fibroblast growth factor receptor-1c*. J Neurosci Res, 2003. **72**(4): p. 436-43.
204. Wang, G., et al., *Variation in the miRNA-433 binding site of FGF20 confers risk for Parkinson disease by overexpression of alpha-synuclein*. Am J Hum Genet, 2008. **82**(2): p. 283-9.
205. van der Walt, J.M., et al., *Fibroblast growth factor 20 polymorphisms and haplotypes strongly influence risk of Parkinson disease*. Am J Hum Genet, 2004. **74**(6): p. 1121-7.
206. Wider, C., et al., *FGF20 and Parkinson's disease: no evidence of association or pathogenicity via alpha-synuclein expression*. Mov Disord, 2009. **24**(3): p. 455-9.
207. Nishikawa, K., et al., *Alterations of structure and hydrolase activity of parkinsonism-associated human ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase L1 variants*. Biochem Biophys Res Commun, 2003. **304**(1): p. 176-83.
208. Leroy, E., et al., *The ubiquitin pathway in Parkinson's disease*. Nature, 1998. **395**(6701): p. 451-2.
209. Healy, D.G., et al., *UCHL-1 is not a Parkinson's disease susceptibility gene*. Ann Neurol, 2006. **59**(4): p. 627-33.
210. Sanger, F., S. Nicklen, and A.R. Coulson, *DNA sequencing with chain-terminating inhibitors*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1977. **74**(12): p. 5463-7.
211. Maxam, A.M. and W. Gilbert, *A new method for sequencing DNA*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1977. **74**(2): p. 560-4.
212. International Human Genome Sequencing, C., *Finishing the euchromatic sequence of the human genome*. Nature, 2004. **431**(7011): p. 931-45.
213. Lander, E.S., et al., *Initial sequencing and analysis of the human genome*. Nature, 2001. **409**(6822): p. 860-921.
214. Goodwin, S., J.D. McPherson, and W.R. McCombie, *Coming of age: ten years of next-generation sequencing technologies*. Nat Rev Genet, 2016. **17**(6): p. 333-51.
215. Eilbeck, K., A. Quinlan, and M. Yandell, *Settling the score: variant prioritization and Mendelian disease*. Nat Rev Genet, 2017. **18**(10): p. 599-612.
216. Richards, S., et al., *Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology*. Genet Med, 2015. **17**(5): p. 405-24.
217. Landrum, M.J., et al., *ClinVar: improvements to accessing data*. Nucleic Acids Res, 2020. **48**(D1): p. D835-D844.
218. Delamarre, A. and W.G. Meissner, *Epidemiology, environmental risk factors and genetics of Parkinson's disease*. Presse Med, 2017. **46**(2 Pt 1): p. 175-181.

219. Blauwendraat, C., M.A. Nalls, and A.B. Singleton, *The genetic architecture of Parkinson's disease*. *Lancet Neurol*, 2020. **19**(2): p. 170-178.
220. Nuytemans, K., et al., *Whole exome sequencing of rare variants in EIF4G1 and VPS35 in Parkinson disease*. *Neurology*, 2013. **80**(11): p. 982-9.
221. Podhajska, A., et al., *Common pathogenic effects of missense mutations in the P-type ATPase ATP13A2 (PARK9) associated with early-onset parkinsonism*. *PLoS One*, 2012. **7**(6): p. e39942.
222. Dachsel, J.C. and M.J. Farrer, *LRRK2 and Parkinson disease*. *Arch Neurol*, 2010. **67**(5): p. 542-7.
223. Nichols, W.C., et al., *Genetic screening for a single common LRRK2 mutation in familial Parkinson's disease*. *Lancet*, 2005. **365**(9457): p. 410-2.
224. Di Fonzo, A., et al., *A common missense variant in the LRRK2 gene, Gly2385Arg, associated with Parkinson's disease risk in Taiwan*. *Neurogenetics*, 2006. **7**(3): p. 133-8.
225. Tan, E.K., et al., *The LRRK2 Gly2385Arg variant is associated with Parkinson's disease: genetic and functional evidence*. *Hum Genet*, 2007. **120**(6): p. 857-63.
226. Frey, M.K., et al., *Rescreening for genetic mutations using multi-gene panel testing in patients who previously underwent non-informative genetic screening*. *Gynecol Oncol*, 2015. **139**(2): p. 211-5.
227. Esterling, L., et al., *Impact of a Cancer Gene Variant Reclassification Program Over a 20-Year Period*. *JCO Precis Oncol*, 2020. **4**.
228. Murray, M.L., et al., *Follow-up of carriers of BRCA1 and BRCA2 variants of unknown significance: variant reclassification and surgical decisions*. *Genet Med*, 2011. **13**(12): p. 998-1005.
229. Eccles, B.K., et al., *Understanding of BRCA VUS genetic results by breast cancer specialists*. *BMC Cancer*, 2015. **15**: p. 936.
230. Ghani, M., et al., *Mutation analysis of patients with neurodegenerative disorders using NeuroX array*. *Neurobiol Aging*, 2015. **36**(1): p. 545 e9-14.
231. Gorostidi, A., et al., *Genetic Mutation Analysis of Parkinson's Disease Patients Using Multigene Next-Generation Sequencing Panels*. *Mol Diagn Ther*, 2016. **20**(5): p. 481-91.
232. Erer, S., et al., *Mutation analysis of the PARKIN, PINK1, DJ1, and SNCA genes in Turkish early-onset Parkinson's patients and genotype-phenotype correlations*. *Clin Neurol Neurosurg*, 2016. **148**: p. 147-53.
233. Okubadejo, N., et al., *Analysis of Nigerians with apparently sporadic Parkinson disease for mutations in LRRK2, PRKN and ATXN3*. *PLoS One*, 2008. **3**(10): p. e3421.
234. Ma, Y., D. Zheng, and H. Li, *Association analysis of EIF4G1 and Parkinson disease in Xinjiang Uygur and Han nationality*. *Medicine (Baltimore)*, 2018. **97**(18): p. e0234.
235. Vears, D.F., K. Senecal, and P. Borry, *Reporting practices for variants of uncertain significance from next generation sequencing technologies*. *Eur J Med Genet*, 2017. **60**(10): p. 553-558.
236. Carrieri, D., et al., *Recontacting in clinical practice: an investigation of the views of healthcare professionals and clinical scientists in the United Kingdom*. *Eur J Hum Genet*, 2017. **25**(3): p. 275-279.
237. Carrieri, D., et al., *Recontact in clinical practice: a survey of clinical genetics services in the United Kingdom*. *Genet Med*, 2016. **18**(9): p. 876-81.
238. Dheensa, S., et al., *A 'joint venture' model of recontacting in clinical genomics: challenges for responsible implementation*. *Eur J Med Genet*, 2017. **60**(7): p. 403-409.
239. Liu, P., et al., *Reanalysis of Clinical Exome Sequencing Data*. *N Engl J Med*, 2019. **380**(25): p. 2478-2480.
240. Carrieri, D., et al., *Recontacting in clinical genetics and genomic medicine? We need to talk about it*. *Eur J Hum Genet*, 2017. **25**(5): p. 520-521.

241. Matthijs, G., et al., *Guidelines for diagnostic next-generation sequencing*. Eur J Hum Genet, 2016. **24**(10): p. 1515.
242. Boycott, K., et al., *The clinical application of genome-wide sequencing for monogenic diseases in Canada: Position Statement of the Canadian College of Medical Geneticists*. J Med Genet, 2015. **52**(7): p. 431-7.
243. Wenger, A.M., et al., *Systematic reanalysis of clinical exome data yields additional diagnoses: implications for providers*. Genet Med, 2017. **19**(2): p. 209-214.
244. Wright, C.F., et al., *Making new genetic diagnoses with old data: iterative reanalysis and reporting from genome-wide data in 1,133 families with developmental disorders*. Genet Med, 2018. **20**(10): p. 1216-1223.
245. Ewans, L.J., et al., *Whole-exome sequencing reanalysis at 12 months boosts diagnosis and is cost-effective when applied early in Mendelian disorders*. Genet Med, 2018. **20**(12): p. 1564-1574.
246. Vears, D.F., et al., *Analysis of VUS reporting, variant reinterpretation and recontact policies in clinical genomic sequencing consent forms*. Eur J Hum Genet, 2018. **26**(12): p. 1743-1751.