FATİH TEPGEÇ

← Adınızı soyadınızı giriniz

İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ SAĞ. BİL. ENST.

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

↓

DOKTORA TEZİ

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

İSTANBUL-20018

← Tez Sınavının yapılacağı yılı yazınız

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

**DOKTORA TEZİ**

# PARKİNSON HASTALIĞINA NEDEN OLAN BİLİNEN VE YENİ GENLERDE İLİŞKİLİ MUTASYONLARIN ARAŞTIRILMASI

**FATİH TEPGEÇ**

**DANIŞMAN**
**PROF. DR. Z. OYA UYGUNER**

**İKİNCİ DANIŞMAN**
**DR. GÜVEN TOKSOY**

**GENETİK ANABİLİM DALI**
**GENETİK PROGRAMI**

**İSTANBUL-2018**

# TEZ ONAYI

## DOKTORA TEZİ ONAYI

İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Genetik Anabilim Dalı, Genetik Programında Doktora öğrencisi Fatih TEPGEÇ tarafından Prof. Dr. Zehra Oya UYGUNER'in danışmanlığında hazırlanan **"Parkinson Hastalığına Neden Olan Bilinen ve Yeni Genlerde İlişkili Mutasyonların Araştırılması"** başlıklı tez aşağıdaki jüri üyeleri tarafından 08/08/2018 tarihinde yapılan Tez Savunma Sınavında başarılı bulunmuş ve Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

**Prof. Dr. Zehra Oya UYGUNER**
İ.Ü. İstanbul Tıp Fakültesi
Tıbbi Genetik Anabilim Dalı

**Prof. Dr. Seher BAŞARAN**
İ.Ü. İstanbul Tıp Fakültesi
Tıbbi Genetik Anabilim Dalı

**Prof. Dr. Haşmet A. HANAĞASI**
İ.Ü. İstanbul Tıp Fakültesi
Nöroloji Anabilim Dalı

**Doç. Dr. Gözde YEŞİL**
Bezmialem V. Üni. Tıp Fakültesi
Tıbbi Genetik Anabilim Dalı

**Doç. Dr. Azize Esra GÜRSOY**
Bezmialem V. Üni. Tıp Fakültesi
Nöroloji Anabilim Dalı

# BEYAN

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

FATİH TEPGEÇ



# İTHAF

Üzerimde emeği olan herkese ithaf ediyorum

# TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim boyunca engin bilgi ve tecrübelerinin yanı sıra sabrı ve iyi niyetiyle bana yol gösteren, çalışmalarıma her daim destek olarak bana umut veren, öncelikle kendi işimi doğru yapmamı ve moralimi yüksek tutmamı öğreten, sevgili tez danışmanım hocam sayın *Prof. Dr. Zehra Oya UYGUNER*'e,

Bana disiplin ve çalışmayı öğreten, yaptığım yanlışlara rağmen doğru yolu gösterip benden umudunu kesmeyen, doktora eğitimim boyunca kendisinden çok fazla bilgi edindiğim hocam sayın *Prof. Dr. Seher BAŞARAN*'a

Doktora eğitimimin ilk anlardan itibaren elimden tutup bana destek olmuş sevgili hocam *Doç. Dr. Birsen KARAMAN*'a

Sadece engin bilgisiyle değil, yaptığı ağabeyliğiyle de yanımda olan ikinci tez danışmanım sayın hocam *Dr. Güven TOKSOY*'a

Beni aralarına kabul edip ufkumu genişleten, beraber çalışmaktan her zaman keyif aldığım Nöroloji bölümüne; başta değerli hocam *Prof. Dr. İ.Hakan GÜRVİT*'e, tez danışmanım *Prof Dr. Haşmet A. HANAĞASI*'na, *Doç. Dr. Başar BİLGİÇ*'e, *Doç. Dr. Aslı DEMİRTAŞ-TATLIDEDE*'ye, *Uzm. Dr. Zeynep TÜFEKÇİOĞLU*'na, *Uzm. Dr. Mine SEZGİN*'e, tüm asistan arkadaşlarıma ve çalışanlarına,

Kliniğimizde bana vakit ayırıp ilgilenen, değerli arkadaşım *Uzm. Dr. Umut ALTUNOĞLU*'na, *Uzm. Dr. Şahin AVCI*'ya, tüm asistan ve uzman arkadaşlarımla çalışanlarına,

Neşesini, çalışma azmini ve kişiliğini hiç unutmayıp özlediğim ağabeyim *Kadir KAYA*'ya,

Doktoram boyunca arkadaşlıklarını ve desteklerini esirgemeyen değerli çalışma arkadaşlarım *Alev YALIN, Volkan KARAMAN, Dr. Çağrı GÜLEÇ* ile aynı ortamı paylaştığım tüm değerli laboratuvar çalışanı arkadaşlarıma,

Eğitimim sırasında tanıştığım ve beni destekleyen arkadaşlarım *Uzm. Dr. Uğur ÇIKRIKCI*'ya, *Gözde AKKAYA*'ya, *Dr. Ani KIÇİK*'e, *Dr. Merve Çebi*'ye ve Dr. İrem Kalay'a ve daha nice arkadaşıma,

Her anımda yanımda olmuş ve desteklerini hissettiğim, isimlerini yazamasam da beni mazur görecek herkese,

Ve en önemlisi, beni var edip bunca sene desteğini esirgemeyen aileme,

En içten teşekkürlerimle,

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: TDK-2016-20253

# İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI ..... İİ
BEYAN ..... İİİ
İTHAF ..... İV
TEŞEKKÜR ..... V
İÇİNDEKİLER ..... Vİ
TABLOLAR LİSTESİ ..... X
ŞEKİLLER LİSTESİ ..... Xİ
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ ..... Xİİİ
ÖZET ..... XV
ABSTRACT ..... XVİ
1. GİRİŞ VE AMAÇ ..... 1
2. GENEL BİLGİLER ..... 3
2.1. Parkinson Hastalığı ..... 3
2.1.1. Parkinson Hastalığı İlişkili Hücresel Yolaklar ..... 4
2.1.1.1. Sinaptik İletişim ..... 5
2.1.1.2. Mitokondriyal Disfonksiyon ..... 6
2.1.1.3. Lizozomal İşlev Bozuklukları ..... 7
2.1.1.4. Diğer Yolaklar ..... 9
2.1.1.4.1. Dopaminerjik Nöron Farklılaşması ..... 9
2.1.1.4.2. Dopamin Sentezi, Metabolizması ve Fonksiyonu ..... 9
2.1.1.4.3. Enflamasyon Yolağı ..... 10
2.2. PH Genetiği ..... 10
2.2.1. *SNCA* (*PARK1*; Synuclein Alpha; NM_000345) ..... 11
2.2.2. *PRKN* (*PARK2;* Parkin RBR E3 Ubiquitin Protein Ligase; NM_004562) ..... 12
2.2.3. *UCHL1* (PARK5; Ubiquitin Carboxyl-Terminal Esterase L1; NM_004181) ..... 13
2.2.4. *PINK1* (PARK6*; PTEN* Induced Putative Kinase 1; NM_032409) ..... 13
2.2.5. *DJ1* (PARK7; Oncogene DJ1; NM_007262.4) ..... 14
2.2.6. *LRRK2* (PARK8; Leucine-Rich Repeat Kinase 2; NM_198578) ..... 14
2.2.7. *ATP13A2* (PARK9; ATPase 13A2; NM_022089) ..... 16
2.2.8. PH İlişkili Diğer Lokuslar ..... 16

2.2.9. PH ile İlişkisi Olan Diğer Genler .....19
2.2.9.1. *TH* (Tyrosine Hydroxylase; NM_199292.2) .....19
2.2.9.2. *MAPT* (Microtubule Associated Protein Tau; NM_005910.5) .....19
2.2.9.3. *CP* (Ceruloplasmin, NM_000096.3) .....20
2.2.9.4. *TWNK* (Twinkle mtDNA Helicase; NM_021830.4) .....20
2.2.9.5. *GAK* (Cyclin G Associated Kinase; NM_005255.2) .....21
2.2.9.6. *ATP1A3* (ATPase Na+/K+ Transporting Subunit Alpha 3; NM_152296.3) 21
2.2.9.7. *GBA* (Glucosylceramidase Beta, NM_001005741.2) .....21
2.2.9.8. *DCTN1* (Dynactin Subunit 1, NM_004082.4) .....22
2.2.9.9. *PRKRA* (Protein Kinase, Interferon-Inducible Doublestranded RNA Dependent Activator; NM_003690.4) .....23
2.2.9.10. *SLC6A3* (Solute Carrier Family 6 Member 3; NM_001044.4) .....23
2.2.9.11. *EIF4G1* (Eukaryotic Translation Initiation Factor 4 gamma 1; NM_198241.2) .....24
2.2.9.12. *GCH1* (GTP Cyclohydrolase I; NM_000161.2) .....24
2.2.9.13. *EEF1D* (Eukaryotic Translation Elongation Factor 1 Delta; NM_032378.4) .....24
2.2.9.14. *NPC1* (Niemann-Pick disease, Type C1; NM_000271.4) .....25
2.2.9.15. *SMPD1* (Sphingomyelin Phosphodiesterase 1; NM_000543.4) .....25
2.2.9.16. *DNAJC13* (Dnaj/Hsp40 Homolog, Subfamily C, Member 13; NM_015268.3) .....25
2.2.9.17. *GRN* (Granulin Precursor; NM_002087.2) .....26
2.2.9.18. *TREM2* (Triggering Receptor Expressed on Myeloid Cells 2; NM_018965.2) .....26
2.2.9.19. *POLG* (DNA Polymerase Gamma, Catalytic Subunit; NM_002693.2) .....26
2.3. Genetik Hastalıkların Tanısında Kullanılan Moleküler Yöntemler .....27
2.3.1. DNA Dizileme Yöntemleri .....27
2.3.1.1. Sanger Dizileme .....28
2.3.1.2. Yeni Nesil Dizileme (YND) .....29
2.3.1.2.1. Ion Torrent Platformu .....31
2.3.2. Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification Yöntemi .....36
3. GEREÇ VE YÖNTEM .....39
3.1. Çalışma Grubu .....39

3.2. Olguların Değerlendirilmesi .....39
3.2.1. Klinik değerlendirmeler .....39
3.2.2. Moleküler Analizler .....39
3.2.2.1. DNA İzolasyonu.....39
3.2.2.1.1. DNA Kalite Değerlendirmesi Ve Seyreltilme İşlemleri .....39
3.2.2.1.2. DNA Yoğunluklarının Qubit® 3.11 Florometre İle Ölçümü.....40
3.2.2.2. YND Uygulamaları .....40
3.2.2.2.1. YND Paneli için Hedef Bölgelerin Seçilmesi ve Özgün Primer Tasarımı40
3.2.2.2.2. Hedef Bölgelerin Hot Spot Dosyalarının Oluşturulması .....41
3.2.2.2.3. YND için kütüphane Hazırlanması .....41
3.2.2.2.3.1. Hedeflenen DNA Bölgelerinin Çoğaltılması .....42
3.2.2.2.3.2. Primer Dizilerinin Kısmi Olarak Kesilmesi (Fupa) .....43
3.2.2.2.3.3. Barkodlanan Ürünlerin Saflaştırılması.....44
3.2.2.2.3.4 Saflaştırılan Kütüphane Ürünlerinin Normalizasyonu.....44
3.2.2.2.3.5. Kantitasyon Için Dilusyon Faktörü Hesaplanması Ve Ölçümü .....46
3.2.2.2.4. Taslak (*Template*) Hazırlanması .....46
3.2.2.2.5. EmPZR.....46
3.2.2.2.6. EmPZR Ürünlerinin Zenginleştirilmesi .....47
3.2.2.2.6.1. Melt-Off Çözeltisinin Hazırlanması.....47
3.2.2.2.6.2. Streptavidin C1 Boncuklarının Yıkanması .....48
3.2.2.2.7. Zenginleştirilmiş Ürünlerin Dizilenmesi.....49
3.2.2.2.8. Veri Analizi.....50
3.2.2.2.9. Saptanan Değişimlerin Sanger Dizileme İle Doğrulanması.....50
3.2.2.2.9.1. Primer Tasarlanması.....50
3.2.2.2.9.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu.....50
3.2.2.2.9.3. Dizi PZR Reaksiyonu.....51
3.2.2.2.9.4. Kapiller Elektroforez Aşaması.....52
3.2.2.2.9.5. Kapiller Elektroforez Sonuçlarını Ve Değerlendirmeleri .....52
3.2.2.3. MLPA.....53
3.2.2.4.1. Denatürasyon ve Hibridizasyon Aşaması .....54
3.2.2.4.2. Ligasyon Aşaması .....55
3.2.2.4.3. MLPA PZR Reaksiyonu .....55
3.2.2.4.4. Kapiler Elektroforez İle Fragmanların Saptanması.....55

3.2.2.4.5. Kapiler Elektroforezin Değerlendirilmesi.....56
4. BULGULAR.....57
5. TARTIŞMA.....78
KAYNAKLAR.....89
FORMLAR.....111
ETİK KURUL KARARI.....114
PATENT HAKKI İZNİ.....115
İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI.....116
ÖZGEÇMİŞ.....117

# TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 2-1: PH ile ilişkili lokuslar ve genler ..... 11
Tablo 2-2: G2019S mutasyonunun farklı toplumlardaki görülme sıklığı ..... 15
Tablo 2-3: Yeni nesil platformlarının karşılaştırılması (217) berglund'dan alınmış ve yeniden düzenlenmiştir ..... 30
Tablo 2-4: "Patojenik" değerlendirmeler için kriterler ..... 33
Tablo 2-5: "Zararsız" değerlendirmeler için kriterler ..... 34
Tablo 2-6: Saptanan değerlerin puanlandırılması ..... 35
Tablo 3-1: YND panelinde bulunan gen listesi ..... 41
Tablo 3-2: 2X primer havuzu için hazırlanan karışım ..... 42
Tablo 3-3: PZR solüsyonları ..... 42
Tablo 3-4: Hedef bölgelerin çoğaltılmasında kullanılan termal döngü programı ..... 42
Tablo 3-5: Primer dizilerinin kesimi için kullanılan termal döngü programı ..... 43
Tablo 3-6: Barkod adaptör karışımı ..... 43
Tablo 3-7: Barkod adaptör ligasyon solüsyonu ..... 43
Tablo 3-8: Ligasyon için kullanılan termal döngü programı ..... 44
Tablo 3-9: Saflaştırılıran kütüphane ürünlerinin normalizasyonu için kullanılan PZR programı ..... 45
Tablo 3-10: Amplifikasyon Çözeltisi ..... 46
Tablo 3-11: Kuyulara yüklenen çözelti ve emPZR ürünleri ..... 48
Tablo 3-12: Dizileme planı ..... 49
Tablo 3-13: MLPA gen ve ekzon bilgileri ..... 53
Tablo 3-14: MLPA gen ve ekzon bilgileri (devam) ..... 54
Tablo 4-1: Seride saptanan tanımlanmış mutasyonların saptandığı teknik ve genlere göre dağılımı ..... 57
Tablo 4-2: PH ilişkili tanımlanmış mutasyon saptanan olguların klinik ve moleküler genetik bulguları ..... 58
Tablo 4-3: PH ilişkili tanımlanmış bir mutasyon saptanmayan olgularda gözlenen varyantlar ..... 74
Tablo 4-4: PH ile ilişkili tanımlı mutasyon taşımayan olgulardaki varyantların bulundukları genlere göre değerlendirilmesi ..... 76

# ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2-1: Nigrostriatal yolak ..... 4
Şekil 2-2: PH'da rol oynayan hücresel yolaklar ..... 5
Şekil 2-3: DNA fragmanlarının farklı uzunluklarına göre ayrıştırılması ..... 28
Şekil 2-4: Sanger dizileme prensibi ..... 29
Şekil 2-5: Ion Torrent platformu işleyişi (Chadran 2018 (234) den değiştirilerek eklenmiştir) ..... 32
Şekil 2-6: MLPA prensibi ..... 37
Şekil 3-1: Ion OneTouch 2 cihazı ve parçaları ..... 47
Şekil 3-2: 8 Kuyulu Levha ..... 48
Şekil 3-3: MLPA çıktısı örneği ..... 56
Şekil 4-1: Olgu#190'ın aile ağacı, indeks (IV-2)'e ait MLPA testinde saptanan *PRKN* ekzon 2 homozigot delesyon mutasyonunun görüntüsü ..... 59
Şekil 4-2: Olgu#15'e ait aile ağacı, indeks (III-6)'e ait MLPA testinde saptanan *PRKN* ekzon3 homozigot delesyon mutasyonunun görüntüsü ..... 60
Şekil 4-3: Olgu#157'ye ait aile ağacı, indeks (III-2)'e ait MLPA testinde saptanan *PRKN* ekzon 3 homozigot delesyon mutasyonunun görüntüsü ..... 61
Şekil 4-4: Olgu#86'ya ait aile ağacı, indeks (II-5)'e ait MLPA testinde saptanan *PRKN* ekzon 3-4 homozigot delesyon mutasyonunun görüntüsü ..... 62
Şekil 4-5: Olgu#7'ye ait aile ağacı, indeks (III-3)'e ait MLPA testinde saptanan *SNCA* ekzon 1-6 heterozigot duplikasyon mutasyonunun görüntüsü ..... 63
Şekil 4-6: Olgu#119'a ait aile ağacı, indeks (II-4)'e ait MLPA testinde saptanan *SNCA* ekzon 1-6 homozigot duplikasyon mutasyonunun görüntüsü. ..... 64
Şekil 4-7: Olgu#263'e ait aile ağacı, indeks (III-1)'e ait MLPA testinde saptanan *SNCA* ekzon1-6 homozigot duplikasyon mutasyonunun görüntüsü ..... 65
Şekil 4-8: Olgu#85'e ait aile ağacı, indeks (III-6)'e ait MLPA testinde saptanan *DJ1* ekzon1-5 homozigot delesyon mutasyonunun görüntüsü ..... 66
Şekil 4-9: Olgu#17'e ait aile ağacı, indeks (II-4)'e ait YND panel-gen testinde saptanan *PRKN* ekzon 2; c.167T>A; p.V56E homozigot mutasyonunun görüntüsü ..... 67

Şekil 4-10: Olgu#54'e ait aile ağacı, indeks (III-6)'e ait YND panel-gen testinde saptanan *PRKN* ekzon 8'de homozigot c.931C>T (p.Q311*) mutasyonunun görüntüsü ..... 68
Şekil 4-11: Olgu#71'e ait aile ağacı, indeks (II-4)'e ait YND panel-gen testinde saptanan *PRKN* ekzon 9'da homozigot c.1083+1delG delesyon mutasyonunun görüntüsü ve Sanger doğrulama görüntüsü ..... 69
Şekil 4-12: Olgu#105'ye ait aile ağacı, indeks (II-2)'e ait YND panel-gen testinde saptanan *PRKN* ekzon2'de homozigot c.79_81delAAG (p.K27del) delesyon mutasyonunun görüntüsü ve Sanger doğrulama görüntüsü ..... 70
Şekil 4-13: Olgu#160'a ait aile ağacı, indeks (II-4)'e ait YND panel-gen testinde saptanan *FBXO7* ekzon 9'da homozigot c.1492C>T (p.R498*) mutasyonunun görüntüsü ..... 71
Şekil 4-14: Olgu#255'e ait aile ağacı, indeks (III-4)'e ait YND panel-gen testinde saptanan *FBXO7* ekzon 1'de homozigot c.101T>G (p.L34R) mutasyonunun görüntüsü ..... 72
Şekil 4-15: Olgu#277'e ait aile ağacı, indeks (III-4)'e ait YND panel-gen testinde saptanan *PRKN* ekzon 2'de hemizigotc.125G>C ( p.R42P) mutasyonu ve MLPA testinde heterozigot ekzon 2-4 delesyon mutasyonunun görüntüsü ..... 73
Şekil 5-1: PH'nda saptanan mutasyon tiplerinin genlere göre dağılımı. Lill ve ark. (242)yayınından değiştirilerek ve serimizdeki bilgiler eklenerek hazırlanmıştır. ..... 79

## SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

| | |
|---|---|
| PH | : Parkinson hastalığı |
| AH | : Alzheimer hastalığı |
| JB | : Juvenil başlangıçlı |
| EB | : Erken başlangıçlı |
| GB | : Geç başlangıçlı |
| L-Dopa | : Levadopa |
| OR | : Otozomal resesif |
| OD | : Otozomal dominant |
| XLR | : X'e bağlı resesif |
| YND | : Yeni nesil dizileme |
| MLPA | : Multiple Ligation Dependent Probe Amplification |
| LDB | : Lizozomal depo bozuklukları |
| BOS | : Beyin omurilik sıvısı |
| DM | : Diabetes Mellitus |
| CDK | : Siklin bağımlı kinaz |
| GBA | : Beta Glukozidaz |
| EF1 | : Elongasyon Faktör 1 |
| SD | : Sanger dizileme |
| dNTP | : Deoksiribonükleotid |
| ddNTP | : Dideoksiribonükleotid |
| emPZR | : Emülsiyon polimeraz zincir reaksiyonu |
| PZR | : Polimeraz zincir reaksiyonu |
| TED | : Tüm ekzom dizileme |
| TGD | : Tüm genom dizileme |
| TSS | : Torrent Suite Server |
| BAM | : Binary Alignment Map |
| VCF | : Variant Call Format |
| TMAP | : Torrent Mapping Aligment Program |

NAD : Nikotinamid adenin dinükleotid

CNV : Kopya sayısı değişimi

OMIM : Online Mendelian Inheritance in Man

HGMD : Human Gene Mutation Database

CADASIL : Subkortikal enfarkt ve lökoensefalopati ile giden otozomal dominant serebral arteriyopati

NoREF : Referans ile aynı

NoCall : Okuması yapılmamış

MAF : Nadir allel frekansı

# ÖZET

TEPGEÇ, F. Parkinson Hastalığına Neden Olan Bilinen Ve Yeni Genlerde İlişkili Mutasyonların Araştırılması. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Genetik ABD. Doktora Tezi. İstanbul. 2018

Parkinson Hastalığı (PH), Alzheimer Hastalığı'ndan (AH) sonra en sık görülen nörodejeneratif hastalık olup juvenil (<20 yaş), erken (<50 yaş) ve geç (>50 yaş) başlangıçlı olarak üç formu vardır. Hastalık çoğunlukla sporadik görülmekle birlikte %15'i ailevidir ve otozomal dominant, resesif ve X'e bağlı kalıtım göstermektedir.
Hastalık ilişkili bilinen ve yeni genlerde mutasyonların tanımlanması, patolojik yolakların anlaşılması, genotip-fenotip ilişkilerinin aydınlatılması, PH'nın oluşum ve ilerleyişindeki faktörleri daha iyi anlamamıza, tedavi stratejilerinin yönlendirilmesine önemli katkılar sunmaktadır. Sık görülen bir hastalık olmasına karşın PH'nın klinik heterojenitesi ve ileri yaş hastalığı olması genetik etiyolojinin aydınlatılmasını güçleştirmektedir.
Çalışmamızda 63 PH tanılı olguda bilinen genlerin incelenmesi ve bu genlerde mutasyon saptanmayan büyük ailelerde tüm ekzom çalışması ile yeni genlerin tanımlanması amaçlanmıştı. Bilinen genlerdeki büyük mutasyonlar MLPA, küçük mutasyonlar bölümümüzde tasarlanan, içinde 33 PH ilişkili genin yer aldığı, 42 gen içeren demans-gen paneli kapsamında yeni nesil dizileme (YND) tekniği ile incelendi
Serimizde, 15 olguda 4 farklı gende, 12 farklı bilinen mutasyon saptandı. Bu mutasyonların 5'i büyük delesyon, biri büyük duplikasyon ve altısı küçük mutasyonlardı. Mutasyonların %12,7 (8/63)'si MLPA %11,1 (7/63)'i YND ile gösterildi. Bir olguda *PRKN*'de büyük delesyon ve nokta mutasyonu ile bileşik heterozigotluk gözlendi. Mutasyon dağılımı, juvenil başlangıçlı olgularda %50 (1/2), erken başlangıçlı olgularda %27 (13/48), ve geç başlangıçlı olgularda %7,7 (1/13) idi.
Çalışmamızda incelenen genlerde herhangi bir mutasyon saptanmayan üç büyük aile tüm ekzom çalışmasına aday nitelikte olmasına karşın, diğer aile bireylerinin onam vermemesi nedeniyle yapılamadı.

Sonuçlarımızın, moleküler genetik tanı algoritmalarının oluşturulmasına, toplumumuza özgün mutasyonların belirlenmesine ve ailelere genetik danışma verilmesine katkı sağlaması beklenmektedir.

Anahtar Kelimeler: Parkinson Hastalığı, Yeni Nesil Dizleme, Ion Torrent Platformu, MLPA
Bu çalışma, İstanbul Üniversite, Bilimsel Araştırma Projeleri TDK-2016-20253 ile desteklenmiştir.

## ABSTRACT

TEPGEC F. Investigation of Related Mutations in Known and Candidate Genes Causing Parkinson's Disease. Istanbul University, Institute of Health Science, Genetics Department. Doctoral Thesis. Istanbul. 2018.

Parkinson's disease (PD) is the most common neurodegenerative disorder after Alzheimer's disease, exhibits as juvenile-PD (<20 years), early-onset-PD (<50 years) and late-onset-PD (>50 years). Only 15% present autosomal dominant, recessive and X-linked while the majority occur as a sporadic form.

Identifying mutations in disease-associated genes, clearer understanding of the pathological pathways and genotype-phenotype relationships are critical toward better comprehension of PD –and equally– in developing treatment strategies. Clinical heterogeneity and being advanced age disease make the determination of its genetic aetiology very difficult.

We examined 63 PD patients for related genes with the end goal of identifying new genes by using whole exome sequencing (WES) in multi-afflicted families with no link to known genes. Gross mutations were studied by MLPA, small mutations with a next generation sequencing (NGS) dementia-gene-panel containing 42 genes, in which 33 are associated with PD. Twelve different mutations (five gross-deletions, one gross-duplication, six small) in four genes were detected in 15 cases. Mutations were detected by MLPA in 12.7% (8/63) and by NGS in 11.1% (7/63). In one case, *PARK2* had a large deletion and a point mutation with compound heterozygous form. The mutation range was 50% (1/2) in juvenile-PD cases, 27% (13/48) in early-onset-PD cases, and 7.7% (1/13) in late-onset-PD cases. In three large families-who possessed no known mutation in the examined genes- WES could not be performed due to lack of consent.

We hope our results will contribute the development of molecular genetic diagnosis algorithms, learning mutation frequencies of our population and genetic counselling.

Key words: Parkinson's disease, New Generation Sequencing, Ion Torrent Platform, MLPA

This project was supported by Istanbul University Scientific Research Projects TDK-2016-20253.

# 1. GİRİŞ VE AMAÇ

Parkinson Hastalığı (PH), nigrostriatal dopaminerjik nöronlarda ilerleyici yıkımla seyreden kompleks bir hastalıktır (1). Asya ve Afrikalılarda, beyaz ırkla karşılaştırıldığında daha nadir olduğu bildirilen hastalık, erken yaşlarda görülen bazı formlarının bulunmasına rağmen, en sık görülen formu 60 yaş üzeri bireyleri etkilemektedir. Hastalığın 20'li yaşlarda başlayan formu "juvenil başlangıçlı" (JB), 50 yaşından önce başlayanları "erken başlangıçlı" (EB) ve 50 yaş üstünde başlayanları "geç başlangıçlı" (GB) tip olarak tanımlanır. Bir motor nöron hastalığı olan PH kliniğinde tutulum bölgelerine bağlı olarak bradikinezi-akinezi, rijidite, postüral instabilite ve istirahat tremoru görülür. Hastalık seyri esnasında motor bulgulara yürüme, konuşma ve belli basit görevleri yerine getirmede zorluklar eklenebilir. Bununla beraber hastalarda depresyon, duygusal değişimler, çiğneme ve yutkunmada zorlukları, üriner problemler, kabızlık, cilt problemleri ve uyku düzensizlikleri de görülmektedir. Bu klinik tabloda; sinaptik iletişim sorunları, mitokondriyel disfonksiyon ve lizozomal otofajinin mezensefalon bölgesindeki substantia nigrada dopaminerjik nöronların seçici ve ilerleyici yıkımlarının bulunduğu gösterilmiştir. Yapılan post mortem incelemelerde substantia nigrada Lewy cisimciği denilen intrasitoplazmik inklüzyon cisimciklerinin varlığı bildirilse de bazı PH formlarında Lewy cisimciğinin oluşmadığı gözlenmiştir (2-4).

PH'nın özgün bir laboratuvar belirteci bulunmadığından tanı, tıbbi öykü ve klinik muayene ile konulmaktadır. Beyinde dopamine çevrilerek dopaminerjik yıkımı kompanse etmekte rol oynayan Levadopaya (L-Dopa) verilen yanıt hastalığın tedavisinde altın standarttır ve tanıyı destekleyen bulgular arasında yer almaktadır. PH'da dopaminerjik yıkımda işlev gören genlerin de içinde bulunduğu karmaşık moleküler etyopatogenezinin henüz az bir kısmı aydınlatılabilmiştir (2).

Yaşlanma sürecinde kardiyovasküler hastalıklardan sonra en sık görülen ve yaşam kalitesini belirleyen hastalıklar, içerisinde PH'nın da bulunduğu demanslardır. Dünya Sağlık Örgütünün çalışmaları 2050'lerde dünya nüfusunun %15'inden fazlasının >65yaş olup 120 milyon demans hastası olacağını ve Alzheimer Hastalığı (AH)'nın ardından ikinci sırada PH'nın bulunacağını göstermekte ve bu durumun gelişmiş ve gelişmekte olan ülkelerde sağlık politikalarında önemli sorunlara yol açabileceği ön

görülmektedir. Bu nedenle nörodejenerasyon mekanizmalarının altında yatan yolakların moleküler etyopatogenezininin aydınlatılması, doğru tanı, presemptomatik tanının yanı sıra ilişkili yolaklara/ genlere/ mutasyonlara özgün tedavi edici yeni ilaçların geliştirilmesine olanak sağlayacaktır (5).

PH olgularının önemli bir çoğunluğu, ileri yaşlarda ortaya çıkan genellikle sporadik görülen formunu taşımaktadır. Ancak araştırmalar birinci derece akrabalarda riskin yaklaşık 2,7-3,5 kat arttığını göstermektedir ki bu durum multifaktoriyel kalıtım ile uyumludur. PH, otozomal resesif (OR), otozomal dominant (OD) ve nadiren X'e bağlı resesif (XLR) kalıtım da gösterebilmektedir. OD formlarında hastalığın başlama yaşı OR'e göre daha geç olmaktadır (6).

PH'nın OD formlarıyla ilişkilendirilmiş bugüne kadar üç gen tanımlanmıştır; ***LRRK2, SNCA***, ***VPS35, LLRK2*** genin geç başlangıçlı ve sporadik formlardaki mutasyon frekansı farklı populasyonlarda %2 - %40 arasında değişmektedir. *SNCA* ve *VPS35* gen mutasyonları ise daha nadir olarak gösterilmektedir. OR kalıtım gösteren çok sayıda genden *PRKN*, *PINK1, DJ-1, UCH-L1* ve *ATP13A2* en sık ilişkilendirilmiş olanlarıdır. Tüm PH formlarında görülme sıklığı %1 olan *PRKN* mutasyonları, erken başlangıçlı formda %10-20, ailevi olgularda ise %77 olarak bildirilmektedir. ***PINK1,*** ikinci en sık mutasyon saptanan gen olup, çeşitli etnik gruplarda mutasyon oranları %1-%9 arasında bildirilmektedir. ***DJ-1*** geni için bu oran %1-%2, ***UCH-L1*** ve ***ATP13A2*** mutasyonları için ise çok daha nadir olarak bildirilmektedir (6).

Bu çalışmada, klinik olarak PH tanısı almış 63 olguda, hastalık ilişkili 33 genin tüm kodlayan ekzon, ekzon-intron sınır bölgelerine özgün tasarlanan yeni nesil dizileme (YND) temelli panel-gen testi ve MLPA tekniği ile incelendi.

Amacımız, ülkemizde PH kliniği olan olgularda moleküler genetik tanı algoritmalarının oluşturulması, hastalıkla ilişkili toplumumuza özgün mutasyonların belirlenmesi ve ailelere özgün genetik danışma desteğinin verilmesidir.

# 2. GENEL BİLGİLER

## 2.1. Parkinson Hastalığı

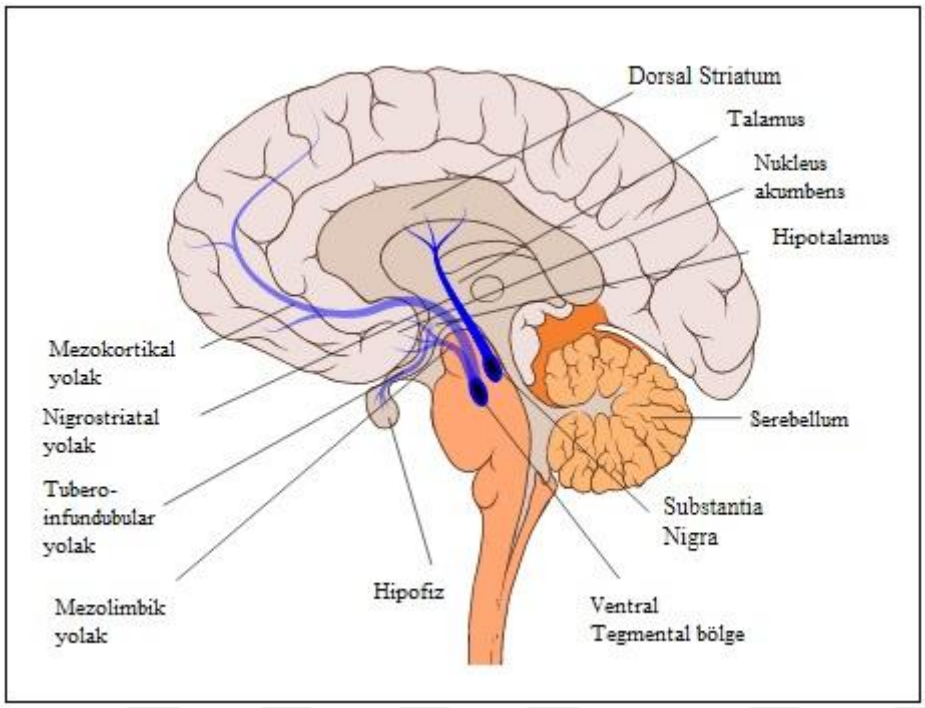
Parkinson Hastalığı (PH) ilk olarak 1817 yılında James Parkinson tarafından yazılan ‘’The Shaking Palsy’’ adlı monografide ‘Herhangi bir hareketin parçası olmayan azalmış kas gücüne eşlik eden istemsiz tremüloz hareketler, gövdenin öne eğilimi ve yürüyüşte bozulmaya eğilim, duyularda ve zekâda hasar olmaması’’ cümlesi ile tanımlanmıştır (7). Hastalığın bulgularına ait ilk kayıtlara Antik Yunan, Mısır ve Hint toplumlarının yazılı metinlerinde rastlanılsa da (8) günümüzdeki adı, 1877 de modern nörolojinin babası sayılan Jean-Martin Charcot kendi kitabında, James Parkinson onuruna hastalığın yeniden adlandırılmasını savunmasıyla literatüre geçmiştir (9).

PH, hareket bozukluğu grubundaki hastalıklar arasında esansiyel tremordan sonra en sık görülen hastalıktır (1). Bir sendrom olarak değerlendirildiğinde etyolojisine göre dejeneratif ve semptomatik olarak iki ayrı gruba ayrılabilir. Temel dört semptomu olan bradikinezi, rijidite, tremor ve postüral instabilitenin ek bulgular olmaksızın tanımlanan formu ‘’İdyopatik Parkinson Hastalığı’’ olarak adlandırılıp, sendromun dejeneratif grubunda yer alır (2-4).

PH, patolojik açıdan incelendiğinde mezensefalonda yer alan substantia nigranın pars compacta kısmındaki melanin içeren dopaminerjik nöronların yıkılması ve kalan hücrelerinde de Lewy cisimciği olarak adlandırılan alfa-sinnüklein ve ubiqitin proteinlerin bulunmasıyla tanımlanır (10, 11). Substantia nigra anatomik olarak farklı fonksiyonlarda işlev gören iki yapıya ayrılır; demir içeren ventral bölüm pars reticulata ve melanin pigmenti içeren dorsal bölüm pars compacta. Temel işlevleri arasında göz hareketleri, motor hareketlerin planlanması, ödül mekanizmaları, öğrenme ve bağımlılık yer almaktadır (10, 12). İçerdiği nöronlar ile dorsal striatum arasındaki bağlantı beyindeki dört ana dopaminerjik yolak arasında yer alan nigrostriatal yolağını (Şekil 2.1) oluşturur (11).

Nigrostriatal dopaminerjik yolaktaki nöronal yapı diğer memelilere oranla insanda evrimsel açıdan farklılık göstermektedir. Bu sebeple PH sadece insana özgü bir nörodejeneratif hastalık olarak tanımlanmaktadır. Son zamanlarda hastalığın görülme

sıklığındaki artış için, türümüzün yaşam tarzının tarihsel süreçteki değişimlerinin bir sonucu olduğu da öne sürülmektedir (13).



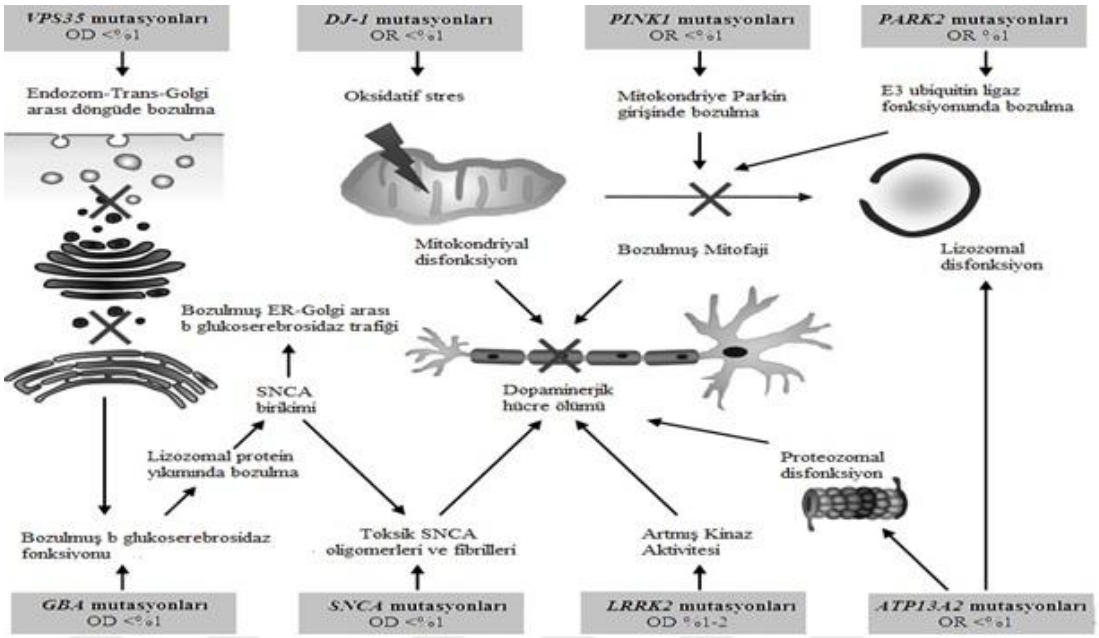

**Şekil 2-1: Nigrostriatal yolak**

Bu yolaktaki dopaminerjik nöronların kaybının %60-70'lere varması ve bu kayba komşu hücrelerdeki Lewy cisimciklerinin varlığının eklenmesi, PH'ın temel klinik bulgularını ortaya çıkarırken, patolojik kesin tanı için de gereklidir (14).

Dopaminerjik nöronlar beyindeki nöronların %1'inden azını oluşturup, motor davranışlar, motivasyon ve işlem belleği gibi işlevlerden sorumlu önemli beyin bölgelerini innerve ederler. Embriyolojik olarak mezensefalik- diensefalik bağlantıdaki tek bir hücre grubundan köken almaktadırlar (15).

### 2.1.1. Parkinson Hastalığı İlişkili Hücresel Yolaklar

PH ile ilişkisi bulunan genlerin çoğu; sinaptik iletişim, mitokondriyel disfonksiyon ve lizozomal işlev bozukluklarını kapsayan üç farklı temel hücresel yolakta (Şekil 2.2) yer almaktadır (16). Bu yolaklara ek olarak dopamin sentezi, dopaminerjik nöronlar ve inflamasyonla ilişkili genlerinde hastalığın etyopatogenezinde rol oynadığı bildirilmiştir.




**Şekil 2-2: PH'da rol oynayan hücresel yolaklar**
Kumar ve ark. (17) değiştirerek eklenmiştir

### 2.1.1.1. Sinaptik İletişim

Sinapslar, nöron-nöron ve nöron-kas hücreleri arasındaki kimyasal ve elektriksel yollarla haberleşmeyi sağlayan bağlantı noktalarıdır. Haberleşme çeşitlerine göre ‘’kimyasal’’ ve ‘’elektriksel’’ olarak sınıflandırılırlar. Kimyasal sinapslar; merkezi ve periferik sinir sisteminde bulunup, tek yönlü ileti yaparken, elektriksel sinapslar; kalp kası, visseral düz kas lifleri ve merkezi sinir sisteminde bulunur ve çift yönlü ileti yaparlar. Birbirleriyle temas ettikleri bölgeye göre; aksodendritik, aksoaksonik ve aksosomatik olarak sınıflandırılabilirler. Sinapsların büyük kısmını oluşturan kimyasal sinapslarda ileti, uyaranın etkisi sonucu salınan nörotransmitter maddelerle sağlanırken, elektriksel sinapslar, elektrik akımını bağlantı yaptıkları hücreye doğrudan iletirler (18).

SNCA gen ürünü olan alfa-sinnüklein proteini, çoğunlukla kimyasal sinaps bölgelerinde bulunur ve hücre membranı, golgi-endoplazmik retikulum ağı, mitokondri, ubiquitin-proteozom sistemi, lizozom ve histonlar gibi hücrenin birçok komponenti ile ilişkidedir (19). Bu proteinin agregatlarıyla oluşan Lewy cisimcikleri; PH, Lewy cisimcikli demans, çoklu sistem atrofisi gibi bir çok hastalığı kapsayan- “sinnükleopatileri” meydana getirir (20). Uzun yıllar biriken bu agregatların oluşturdukları çözünmeyen inklüzyonların toksik olduğu ve ilişkili hastalıklar için

belirteç oldukları düşünülmüş olsa da, son yıllardaki çalışmalar normal bireylerin post-mortem beyin dokusunda da bulundukları gösterilmiş ve biriken oligomerlerin toksik olduğu, inklüzyonların ise detoksifikasyon yapıları olduğu görüşünü desteklemiştir. Bu durum bir başka nörodejeneratif hastalık olan Alzheimer hastalığında APP proteininin oluşturduğu agregatlar ile benzerlik göstermektedir. Bu birikimlerin artışı fonksiyon kayıpları ve hücresel yıkım ile ilişkili görülmektedir (21).

#### 2.1.1.2. Mitokondriyal Disfonksiyon

Mitokondri, ana fonksiyonu aerobik solunum sırasında ATP üretimi olan, bulunduğu hücrenin enerji ihtiyacına göre sayısı artan, eritrositler dışında tüm hücrelerimizde bulunan bir organeldir. Diğer organellerden en büyük farkı, 16569 baz içeren sirküler yapıda kendilerine ait mitokondriyel DNA (MtDNA) adı verilen DNA'dan çok sayıda kopya içermeleri ve enerji ihtiyacına göre sayılarını nükleer genomdan bağımsız bir şekilde arttırabilmeleridir (22, 23).

Epidemiyolojik çalışmalar PH için riskin yaşla birlikte arttığını ve bu süreçte mitokondriyel mutasyonların ve reaktif oksijen türlerinin (ROS) artışlarının da riski arttırdığını göstermektedir (24). PH hastalarında yapılan otopsilerde, mitokondriyel proteinlerin alt birimlerinin sentezlerindeki hatalara bağlı olarak kompleks 1 aktivitesinde anlamlı azalma ile substantia nigra ve diğer beyin bölgelerinde bu birimlerin artmış oksidatif hasarları gözlemlenmiştir (25, 26). Kompleks 1'i oluşturan 46 alt ünitenin 36'sı nükleer ve 7'si mitokondriyel genomdan kodlanmaktadır (27). PH'da, Kompleks 1 alt ünitelerini kodlayan genlerdeki mutasyonların, korunmuş bölgelerde olmasa da, bir kısmının solunum zincirinde yer alan alt ünitelerin ikincil yapılarını değiştirdiği ve bu şekilde azalmış aktivasyona (mitokondriyel disfonksiyon) yol açtığı gösterilmiştir (28). Bozulmuş Kompleks 1 aktivitesinin doğrudan PH patogenezi kökenli mi, yoksa ilaca bağlı sekonder bulgu mu olduğu tam kesinleşmemekle beraber levadopa dozajı ile korelasyonunun bulunmaması ve diğer nörodejeneratif hastalıklarda bozulma göstermemesi bu durumun patogenez ile ilişkisini doğrular yöndedir (29, 30).

MtDNA, etkin tamir mekanizmalarına sahip olmadığından ROS ve serbest radikallerin hasarlarına daha çok maruz kalmakta ve bu durum mutasyon oranının artışına yol açmaktadır. Normal yaşlanma sürecinde de görülen yüksek mutasyon oranı, PH olgularındaki dopaminerjik nöronlarda ve bilhassa striatum bölgesinde daha sıklıkla

gözlenmektedir (31). Mutasyonlara ek olarak çeşitli mitokondriyel haplogrupların farklı popülasyonlarda PH ile ilişkileri de gösterilmiştir (32-34).

MtDNA'ya bağlı hasarların yanı sıra, mitokondri ile ilişkili birçok nükleer genomdaki genlerin mutasyon ve polimorfizmlerinin PH ilişkili olduğu ya da riski arttırdığı bildirilmiştir (28). Nükleer genomdaki *SNCA*, *PRKN*, *DJ-1*, *PINK1*, *LRRK2* ve *HTRA2* genleri (direk veya indirekt) mitokondriyel disfonksiyonda rol almaktadır. Dopaminerjik nöronlar, bu genlerin mitokondrideki etkileri sonucu apopitoz ve/veya nekroza uğrar. Bu mekanizmaya göre *SNCA* (küçük mutasyon, triplikasyon), *LRRK2* (küçük mutasyon), *PINK1* (küçük mutasyon) ve *DJ-1*(küçük mutasyon) genleri hücre ölüm yolağını kompleks 1 inhibisyonu ile etkilerler ve ilk aşamada ROS üretimi başlar ve intrensek pro-apoptotik yolak aktive olur. Bunu pro-apoptotik bir protein olan BAX'ın mitokondri içine alınması ve Sitokrom C'nin sitozole salınımı izler. *PINK1* geni proteini, *PRKN* geninin kodladığı Parkin ile etkileşime girip Sitokrom C'nin salınımını inhibe ederek apopitozu engellemede görev alır. *TRAP1* ve *HTRA2* geninin ürünleri, PINK1'in substratları olarak işlev görmektedirler. Mitokondriyel biyogenez, parkin'in *TFAM* ile interaksiyonu yoluyla da düzenlenebilmektedir (35). Bu apoptotik olaylarla birlikte nekroz da görülebilir. ROS artışıyla DNA hasarı sonrasında *PARP-1* geni aktive olur ve PAR polimerlerinin mitokondri içinde artışına ve NAD+ ile ATP'nin azalmasına yol açar. *PARP-1* aktivasyonu ölüm sinyali olarak iş görerek nukleusda DNA parçalanmasını ve programlanmış hücre ölümünü başlatır. Mitokondriyel faktörlerin sitozole salınmasıyla beraber kaspas bağımlı/bağımsız hücre ölüm yolakları tetiklenir. *PINK1* ve *PRKN* genindeki PH ile ilişkili mutasyonlar aynı zamanda hasarlı mitokondrilerin yıkımında (mitofaji) bozulmaya yol açar ve hasarlı mitokondrilerin birikmesi sonucunda enerji üretiminde aksaklıklara yol açarak hücresel yıkıma sebep olur (35).

#### 2.1.1.3. Lizozomal İşlev Bozuklukları

Lizozomlar, içerdikleri hidrolitik enzimlerle endositoz, fagositoz ve otofaji gibi birçok hücresel sindirim işlevinden sorumlu, asidik yapıda organellerdir. Hücre içinde birikmeye eğilimli α-sinnüklein gibi uzun ömürlü proteinler ile yaşlı ve hasarlı organellerin temizlenmesini sağlarlar. PH olgularında mitokondriyel disfonksiyon ile α-sinnüklein birikiminin gösterilmiş olması PH'na ve diğer nörodejeneratif hastalıkların

patogenezinde lizozomal işlev bozukluklarının katkısı olabileceğini ortaya koymaktadır (36).

Lizozomal depo bozuklukları (LDB) genelde otozomal resesif kalıtımla seyreden, nörodejenerasyon ve miyelinizasyon kusurları ile karakterize metabolik hastalık grubudur. Lizozomal fonksiyon bozukluğuna bağlı olarak parçalanmamış makromoleküllerin hücreler ve dokular içinde birikimiyle ortaya çıkar. LDB grubu, Gaucher hastalığı, Niemann-Pick hastalığı ve nöronal seroid lipofüzinozların da içerisinde olduğu 50'den fazla hastalığı kapsar. Bu grubun görülme sıklığı 5000 canlı doğumda birdir (37). LDB olgularındaki tremor, bradikinezi, bilişsel azalma gibi bulgular PH'nın klinik bulgularıyla örtüşmektedir. Patolojik incelemelerde Tip 1 Gaucher hastalığında PH'na benzer şekilde, Lewy cisimciği benzeri inklüzyonlar görülmektedir. PH ve Lewy cisimli demans olgularının beyin omurilik sıvısında (BOS) glikoserebrosidaz aktivitesinde belirgin azalma gösterilmiştir (37). *GBA* geninin proteini glikoserebrosidaz, glikosilseramidden, seramid ve glikoz oluşumunu katalize eder. *GBA*'daki mutasyonlar, PH ile Gaucher hastalığı ile ilişkilidir. Sporadik PH hastalarındaki incelemeler, heterozigot L444P, D409H, E326K ve H255Q gibi patolojik varyantlar saptandığından hastalık riskinin önemli derecede arttığını göstermektedir (38). LDB ile ilişkili genlerden *SMPD1* ve *NPC1* gen mutasyonlarının da PH için risk faktörü olduğu bildirilmiştir (37).

Yakın zamanda proteinlerin metabolize edilme işlevlerinde, ubiquitin bağımlı proteozomal yolların yanı sıra işlev gösteren lizozomal otofaji süreçleri keşfedilmiştir. Lizozom inhibisyonundan sonra α-sinnüklein düzeylerinde artışın gözlenmesi, degradasyonun tamamen proteozomal olmayabileceği hipotezini desteklemektedir. Lizozom inhibisyonu sırasında, α-sinnüklein organel içinde göç etmek yerine lizozom reseptörlerine bağlanmaktadır. Ayrıca mutasyonlu α-sinnüklein, doğrudan lizozomal membran reseptörlerine bağlanmakta ve böylece hem kendi hem de diğer protein substratlarının lizozomal otofajinin indükleyici yıkımını engellemektedir (39). Lizozomal işlevlerde görev alan bir başka proteini kodlayan *ATP13A2* geni mutasyonları da tipik ve erken başlangıçlı PH olgularında gösterilmiştir (40, 41).

#### 2.1.1.4. Diğer Yolaklar

##### 2.1.1.4.1. Dopaminerjik Nöron Farklılaşması

PH patogenezinde dopaminerjik nöron farklılaşmasında rol alan genlerin etkinliği, ailevi PH olgularında bir transkripsiyon faktörü olan Nurr1'in geni *NR4A2*'de saptanan mutasyonlar ile ilk olarak ortaya konulmuş (42) ve bu gendeki polimorfik varyantların hastalık riski üzerine etkisi gösterilmiştir (43). Dopaminerjik nöron farklılaşmasında rol alan diğer transkripsiyon faktörleri araştırıldığında örneğin substansiya nigranın ventral ve ventromedyal bölgelerindeki nöronlarına özgün proteini kodlayan *PITX3* geninin 1. intronundaki polimorfizmlerin sporadik PH ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (44). Beyin büyüme faktörü *BDNF*, glial büyüme faktörü *GDNF* ve bunların transformasyon faktörü olan TGF'a dopaminerjik nöronların farklılaşma ve normal fonksiyonunun sağlanmasında rol almaktadır. Bunlardan yalnızca *BDNF*'nin V66M polimorfizminin sporadik PH ile ilişkili olabileceği Japon toplumunda gösterilmiş olmasına (45) rağmen böyle bir ilişki Avrupa toplumunda gösterilememiştir (46).

##### 2.1.1.4.2. Dopamin Sentezi, Metabolizması ve Fonksiyonu

PH'nda semptomlar, dopamin substansiya nigradaki sentezde azalma ve bunun striatumdaki konsantrasyonun düşmesine bağlıdır. Dopamin sistemindeki (sentez, transport, sinaptik salınım ve kabul) bozulmalar bu sonuca götüren sebeplerden biridir. Dopamin sentezinin oranı dopaminin DOPA ya çevrilmesi ile sınırlıdır. Bu işlem triptofan hidrolizi ile katalize edildiğinden ilgili gen incelenmiş ancak PH ilişkili bir değişim saptanmamıştır. Öte yandan tirozin hidroksilaz aktivitesini kontrol eden proteinler ve bu enzimin (Nurr1) geninin PH patogenezindeki önemi bilinmektedir (42). Tirozin hidroksilazın kofaktörü olan tetrahidrobiopterin (BH4) sentezinin bozulmasının PH ile ilişkili olabileceği düşünülmüş ve BH4 biosentez yolağının ilk enzimi olan GTP siklohidroksilazın geninde (*GCH1*) saptanan mutasyonların PH benzeri fenotiple ilişkili olduğu gösterilmiştir (47). BH4 biyosentezinin son aşamasını katalize eden SRR enziminin geni *PARK3* lokusuna haritalanmış ve bunun PH ilişkili gen olduğu ön görülmüştür (48, 49). Hücredeki dopamin düzeyi, yıkımında etkin diğer enzimlerle ilişkili olduğundan bu yolakta etkin genler (dopamin-b-hidrolaz, monoamin oxidaz A ve B, katekol-O-metiltransferaz) araştırılmış ve polimorfizmler gösterilmiştir (50-53). Henüz dopamin reseptör genleri ile PH arasında bir ilişki gösterilememiş olsa da

dopamin transportunda etkin *DAT1* geninde özellikle uzun süre pestisit maruziyeti olan olgularda polimorfik varyantlar gösterilmiştir (54).

#### 2.1.1.4.3. Enflamasyon Yolağı

PH'da substansiya nigradaki mikrogliaların aktivasyonu ile nöronların apopitozu başlar (55). Aktive olan mikroglialar farklı antienflamatuar sitokinler üretir ve aynı zamanda nöronal nitrik oksit sentetaz ekspresyonu başlar ve bu durum nitrik oksit ve oksidatif stres artışına yol açar. Sitokin aktivasyonu transkripsiyon faktörü NF-kB'yi aktive ederek dopaminerjik nöronların oksidatif strese duyarlılığını ve muhtemelen onların ölümlerini arttırır (56, 57). Antienflamatuar sitokinler ile onların hedef genlerinde yapılan çalışmalar PH ile bir çok polimorfizmin ilişkisini göstermiştir (örn. *TNFA* ya da *TNF* geninin promoter bölgesindeki 308G/A polimorfizmi, interleukin-1b geninde 551C/T polimorfizmi gibi) (58, 59).

## 2.2. PH Genetiği

Tarihsel olarak klinik hastalıklar ile ilişkili kromozomal bölgeler, genlerden daha önce keşfedilmiştir. İlerleyen yıllarda bu bölgelerde yer alıp hastalıkla ilişkisi saptanan genler ''İnsan Genom Organizasyonu Gen Nomenklatür Komitesi'' ( Human Genome Organisation Gene Nomenclature Comittee, HGNC) tarafından oluşturulan veritabanına eklenmektedir (*PARK1* lokusunun *SNCA* olarak adlandırılması gibi). Henüz ilişkili gen bulunmayan lokuslar ise lokus adlarıyla anılmaya devam etmektedir (60).

Günümüze kadar, PH ile ilişkili 23 lokus tanımlanmıştır. Bu lokuslardan PARK4'ün eşleştirme aşamasında kaynaklanan bir hata sebebiyle yanlış olarak isimlendirildiği aslında PARK1 lokusu olduğu daha sonra anlaşılmıştır . Bu lokuslardaki bazı eşleşmelerin hastalık ile ilişkisi henüz netleşmemiştir (60). Tanımlanmış lokuslar ve ilişkili genler Tablo 2.1. de gösterilmektedir. Bu lokuslarda tanımlanan genlerin haricinde hastalıkla ilişkisi olan başka genler de GWAS çalışmaları ile tanımlanmıştır.

Bu genlerden OD kalıtım gösteren üçünde (*LRRK2, SNCA, VPS35*) ve OR kalıtım gösteren beşinde (*PRKN, PINK1, DJ1, UCHL1, ATP13A2*) saptanan mutasyonlar PH'da en sık rastlanılan mutasyonlardır.

**Tablo 2-1: PH ile ilişkili lokuslar ve genler**

| Lokus | Gen | Kalıtım | RefSeq transkript no | RefSeq peptid no | Tanımlandığı Yıl |
|---|---|---|---|---|---|
| PARK1 PARK4 | *SNCA* | OD | NM_000345 | NP_000336 | 1997 |
| PARK2 | *PRKN* | OR | NM_004562 | NP_004553 | 1998 |
| PARK3 | *SPR* | OR/OD | NM_003124 | NP_003115 | 2003 |
| PARK5 | *UCHL1* | OD | NM_004181 | NP_004172 | 1998 |
| PARK6 | *PINK1* | OR | NM_032409 | NP_115785 | 2001 |
| PARK7 | *DJ1* | OR | NM_007262 | NP_009193 | 2003 |
| PARK8 | *LRRK2* | OD | NM_198578 | NP_940980 | 2004 |
| PARK9 | *ATP13A2* | OR | NM_022089 | NP_071372 | 2006 |
| PARK10 | *USP24* | ? | NM_015306 | NP_056121 | 2002 |
| PARK11 | *GIGYF2* | OD | NM_001103146 | NP_001096616 | 2008 |
| PARK12 | *TAF1* | OR | NM_004606 | NP_004597 | 2002 |
| PARK13 | *HTRA2* | OD | NM_013247 | NP_037379 | 2005 |
| PARK14 | *PLA2G6* | OR | NM_003560 | NP_003551 | 2009 |
| PARK15 | *FBXO7* | OR | NM_012179 | NP_036311 | 2009 |
| PARK16 | *ADORA1* | ? | NM_000674 | NP_000665 | 2009 |
| PARK17 | *VPS35* | OD | NM_018206 | NP_060676 | 2008 |
| PARK18 | *EIF4G1* | OD | NM_198241 | NP_937884 | 2011 |
| PARK19 | *DNAJC6* | OR | NM_001256864 | NP_001243793 | 2012 |
| PARK20 | *SYNJ1* | OR | NM_003895 | NP_003886 | 2013 |
| PARK21 | *DNAJC13* | OD | NM_015268 | NP_056083 | 2014 |
| PARK22 | *CHCHD2* | OD | NM_016139 | NP_057223 | 2015 |
| PARK23 | *VPS13C* | OR | NM_020821 | NP_065872 | 2016 |

### 2.2.1. *SNCA* (*PARK1*; Synuclein Alpha; NM_000345)

Ailevi PH ile ilişkilendirilen ilk gen, 4q21 de lokalize ve a-sinnüklein proteinini kodlayan *SNCA* genidir (61). Daha önce hastalık ile ilişkilendirilen ve PARK4 lokusu olarak isimlendirilen bu bölgeyi içeren 0.4-6.37 Mb'lık duplikasyonlar ile hastalık ilişkisi bilinmekteydi. Gendeki hastalık ilişkili mutasyonlar çoğunlukla a-sinnüklein dozunda değişimlere neden olan duplikasyon ve triplikasyonlardır, ancak nadiren otozomal dominant nokta mutasyonları da görülmektedir (62). *SNCA* gen duplikasyonları görülen ailelerde yapılan klinik ve genetik çalışmalar, gen kopyasının artışıyla hastalığın başlangıç yaşının daha erken olduğunu ve daha ağır seyrettiğini göstermiştir (63).

*SNCA* geninin kodladığı a-sinnüklein proteini 140 aminoasitten oluşur ve doğal yapısı katlanmamış durumdadır. Molekül, amfipatik N-ucu (a-helikal bölgesi),

hidrofobik merkezi (non-amiloid beta parçası -NAC domaini-) ve asidik bir C-ucu olmak üzere üç kısımdan oluşmaktadır. Proteinin tam işlevi bilinmemekle beraber bulgular, bulunduğu sinaptik veziküllerde ağırlıklı olarak dopamin depolanması ve iletiminde rol alıp, protein-protein ve protein-lipid etkileşimlerini düzenleyen bir şaperon olduğu yönündedir (64). Gen ürünü a-sinnüklein birikimlerinin PH olgularında Lewy cisimciklerinin ana bileşenlerini oluşturması, birikim sürecinin PH patogenezinde önemli bir rol oynadığını göstermektedir (65). HGMD'de gen ile ilişkili 33 mutasyon tanımlanmıştır (26.06.18).

### 2.2.2. *PRKN* (*PARK2;* Parkin RBR E3 Ubiquitin Protein Ligase; NM_004562)

Juvenil OR Parkinsonizm gösteren Japon bir ailede 1998 yılında ilk defa tanımlanan *PRKN* geni, 6q25.2-q27 bölgesinde lokalizedir (66). Daha sonraki yıllarda farklı etnik gruplarda farklı mutasyonların çoğunlukla homozigot ya da birleşik heterozigot formda olduğu, juvenil tip PH olgularının %50'si ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (67). Gende 120'nin üzerinde mutasyon tanımlanmış olup bunlar çoğun nokta mutasyonları (50'nin üzerinde yanlış anlamlı mutasyon) olsa da ekzon bölgelerinde del/dup ve triplikasyon mutasyonları da bildirilmiştir (68-71). *PRKN* ilişkili mutasyon taşıyan bireylerde hastalığın tipik klinik bulguları gözlenmekle beraber, çoğunda diğer PH formlarına görülen nöritler ve Lewy cisimcikleri bulunmaz. Bu hastalardaki semptomların gelişimi daha erken ve simetrik başlangıçlı olmakla beraber, hastalığın ilerlemesi daha yavaştır. İlk klinik belirtiler distoni ile başlar, hiperrefleks ve zayıflamış postural bozukluklar görülür (72).

*PRKN* geni 12 ekzondan oluşur ve ubiquitin ligaz aktivitesi gösteren 465 aminoasitlik parkin proteinini kodlar. Gen ve kodladığı protein yapısal ve fonksiyonel özellikler bakımından ubiquitin ligazların RBR (halka-arasında-halka-ring-between-ring) ailesinden E3 ubiquitin ligaz olduğu belirtilmiştir. Proteinin ana görevi ubiquitini, ubiquitin birleştiren enzimlerden alarak, a-sinnüklein, sinfilin-1, parkin, Sept-4 (CDCrel-2), PAEL-R, cyclin E, JTV1 (p38), sinaptotagmin XI, tubulin ve poliglutamin tekrarlı proteinler gibi özel substratlara taşımaktır (73). Proteinin yetersizliği, ubiquitinitasyon sürecinde bozulmalara ve substratı olan proteinlerin birikmesiyle nöronal ölüme yol açmaktadır. Literatür bilgileri, parkinin bir nöroprotektif protein olarak işlev görerek dopaminerjik nöronların sağ kalımlarına destek olduğunu (74),

mitokondriyel işlevlere de katıldığını ve mitokondriyel disfonksiyonda rol oynadığını vurgulamaktadır (75). HGMD'de gen ile ilişkili 311 mutasyon bildirilmiştir (26.06.18).

### 2.2.3. *UCHL1* (PARK5; Ubiquitin Carboxyl-Terminal Esterase L1; NM_004181)

Erken başlangıçlı OD formda bir fenotip gösteren Alman bir olguda *UCHL1* genini içeren PARK5 lokusu 1998 yılında tanımlanmış ve aynı aileden 4 bireyde I93M saptanmıştır (76). Bu gende mutasyon taşıyan olgularda tipik PH semptomlarına ek olarak koku almada etkilenme ve ilerleyici kognitif yıkım gözlenmektedir.

4p14 bölgesinde lokalize, 9 ekzondan oluşan *UCHL1* genin 223 aminoasit içeren proteini Lewy cisimciklerinde ve nöritlerde yoğunlukla görülmekle beraber, beyinde de bulunmakta ve beyindeki total proteinlerin %1-2'sini oluşturmaktadır (77). Biyokimyasal çalışmalar genin ubiquitin bağımlı proteozomal yıkımda rol aldığını göstermektedir. Monomer formları poliubiquitin zincirlerini hidrolize ederken, dimer formları E3 ligaz olarak işlev görmektedir. Mutasyonlarının varlığı, proteinin ligaz fonksiyonunun ve dolayısıyla dimerizasyonun artışına, ubiquitin hidrolizinin azalmasına yol açmakta böylece ubiquitin birikimleri oluşmaktadır (78). HGMD'de gen ile ilişkili bir mutasyon tanımlıdır (26.06.18).

### 2.2.4. *PINK1* (PARK6*; PTEN* Induced Putative Kinase 1; NM_032409)

PH ilişkili OR kalıtımlı bir diğer gen de 1p35-p36 bölgesinde lokalize *PINK1* genidir. İlk olarak geniş bir İtalyan ailesinde gösterilen (79) bu genin ürünü bir serin/treonin protein kinazdır. Gende bugüne kadar tanımlanmış 50'den fazla mutasyon bulunmakta ve bunlar yanlış anlamlı, çerçeve kaymasına yol açan tek nokta mutasyonu ve 6-8. ekzonlarını kapsayan 50 kb'lik delesyon mutasyonlarıdır. Bu mutasyonların çoğunun hastalık gelişimini erken döneme çektiği (80), homozigot ve birleşik heterozigot mutasyonlarda, hastalığın klinik başlangıcının geniş bir aralığa yayıldığı (32 -48 yaş), tipik geç başlangıçlı PH olgularına oranla atipik bir gelişim gösterdiği bildirilmiştir (79, 81).

Genin kodladığı 581 aminoasitlik Pink1 proteinin N-ucu motifi mitokondri ile bağlanmadan sorumludur ve Ca-Calmodulin ailesindeki serin/treonin kinazlara benzeyen aşırı korunmuş protein kinaz domainleri içerir. Gen ürünü olan protein geniş bir doku ve hücre grubunda gösterilmekle birlikte ekspresyonunun çoğunlukla mitokondride olduğu düşünülmektedir. Özelliklerinden biri olan zayıf çözünülürlüğü

sebebiyle sporadik PH olgularındaki Lewy cisimciklerin %10'unda agregat olarak bulunmaktadır. Tam işlevi aydınlatılamamakla beraber mitokondriyel kinaz olarak görev yaptığı ve nöronları oksidatif stresden koruduğu düşünülmektedir (82). HGMD'de gen ile ilişkili 113 mutasyon bulunmaktadır (26.06.18).

### 2.2.5. *DJ1* (PARK7; Oncogene DJ1; NM_007262.4)

PH'na yönelik bağlantı analizlerinde saptanan yedinci lokus (PARK7), 2001 yılında OR kalıtım gösteren klinik semptomlarının yanı sıra distoni ve psikotik epizodlar da gösteren bir ailede kromozom 1p36 bölgesiyle ilişkilendirilmiştir (83). Daha sonra PARK7 lokusunda büyük bir delesyon, ve bu bölgedeki DJ-1 proteinini kodlayan gende yanlış anlamlı L166P mutasyonu gösterilmiştir (84). PH için bi-allelik kalıtım gösteren bu gendeki mutasyonlar, yavaş ilerleyen genç başlangıçlı (20-40 yaş) fenotipe yol açmaktadır. Gende nokta mutasyonlarının yanı sıra ekzon delesyon ve duplikasyonları da saptanmaktadır. Mutasyonlar, gen ürününün çok hızlı bir post translasyonel degregasyona uğramasına veya protein sentezinin tamamen kaybına yol açmaktadır. *DJ-1* gen mutasyonları tüm erken başlangıçlı olguların %1-2'sinde görülmektedir (84). Evrimsel açıdan çok iyi korunmuş DJ-1 proteini, 189 amino asitten oluşur ve DJ-1/ThiJ/PfpI protein süper ailesinde yer alır. Protein, beyin dahil olmak üzere birçok memeli dokusunda dağılım gösterir ve çoğunlukla sitoplazmada bulunsa da, bir kısmının mitokondri ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (85).

*DJ-1* geni PH ile ilişkilendirilmeden önce sperm olgunlaşması ve fertilizasyonuyla ilişkili bir proto-onkogen olarak tanımlanmıştır. Daha sonra yapılan çalışmalarla proteinin, antioksidan özellikleri taşıdığı ve hücreleri oksidatif strese karşı koruduğu, apoptozun regülasyonunda rol alarak a-sinnüklein agregasyonunu inhibe ettiği gösterilmiştir. Oksidatif stres altında parkin proteinine bağlanması, bu iki proteinin nöroprotektif etkisi olduğunu düşündürmektedir (86). HGMD'de gen ile ilişkili 30 mutasyon bildirilmiştir (26.06.18).

### 2.2.6. *LRRK2* (PARK8; Leucine-Rich Repeat Kinase 2; NM_198578)

PARK8 lokusu, 2002 yılında OD PH gösteren bir ailede 11p11.2-q13.1 bölgesinde saptanmıştır (87). Yaklaşık 116 genin bulunduğu bu lokusta 2004 yılında iki farklı bağımsız araştırma grubu hastalıkla ilişkili olan *LRRK2* genini tanımlamıştır (88, 89). "Dardarin" olarak adlandırılan proteini kodlayan genin mono-allelik mutasyonları erken başlangıçlı sporadik veya ailevi formlarla ilişkilidir. Tanımlanan mutasyonlar,

yanlış anlamlı mutasyonlar ile kırpılma bölgelerini etkileyen nokta mutasyonlarıdır. Bu gen, erken başlangıçlı ailevi olguların %15'inden, sporadik olguların ise %3.6'sından sorumlu bulunmuştur. Gende bugüne kadar 120'nin üzerinde farklı varyant tanımlanmış olsa da 61'inin patojenik etkisi olduğu düşünülmektedir (HGMD, 09.10.2017). Genin penentransının toplumlar arasında farklılıklar gösterdiği, 50 yaş popülasyonunda %17 ve 70 yaş grubunda ise %55 olduğu bildirilmektedir. Penetransın düşük olması, fenokopinin varlığı ve geç yaşta ortaya çıkabilmesi segregasyon analizini zorlaştırmaktadır (90, 91). Genin 41. ekzonundaki G2019S mutasyonu sadece bu gen için değil tüm PH olgularında saptanan en yüksek frekanstaki nokta mutasyonudur. Mutasyonun toplumlar arasında farklılıklar gösteren görülme sıklığı oranları Tablo 2.2. de özetlenmiştir (91-93).

**Tablo 2-2: G2019S mutasyonunun farklı toplumlardaki görülme sıklığı**

| **Toplum** | **Ailevi (%)** | **Sporadik (%)** |
|---|---|---|
| Avrupa popülasyonu | 11,5 | 4,6 |
| Askenazi yahudileri | 13,3 | 29,7 |
| Arap popülasyonu | 37 | 40,8 |
| Rus popülasyonu | 13 | 5 |
| Moğol popülasyonu | Nadir | Nadir |

Bu mutasyonun günümüzde 3 farklı haplotip ile ilişkili olarak saptanması, mutasyonun insan evolüsyonunda birden fazla kez oluştuğunu göstermektedir. Avrupa, Amerika popülasyonları ile Aşkenazi Yahudilerinde %95 oranında görülen Haplotip 1 en sıklıkla rastlanan haplotiptir ve birkaç bin yıl önce yakın doğuda ortaya çıktığı düşünülmektedir. Haplotip 2, Avrupa kökenli 5 ailede, Haplotip 3 ise Japon ve Türk ailelerinde saptanmıştır (91).

51 ekzonlu *LRRK2* geni, 275 kDa'luk, 2527 aminoasitlik, Ras ailesinin ROCO alt ailesine ait ve iki Roc domaini ve COR domaini, WD40 domaini olan, lösinden zengin tekrarlara sahip serin/threonin-protein kinaz yapıdaki bir proteinini kodlamaktadır (89). Akciğer, böbrek, kalp ve özellikle substantia nigradaki dopaminerjik nöronlarda olmak üzere beynin farklı bölgelerinde ifade edilmektedir.

Dardarin, sitoplazmada ağırlıklı olarak Golgi aparatında, sitoplazma membranının sinaptik veziküllerinde bulunur ve mitokondrinin dış membranı ile ilişkidedir (94). Günümüzde biyolojik fonksiyonu tam açıklanamasa da hücre kültürü çalışmalarında protein kinaz aktivitesi göstermektedir (95). LRRK2, aksonların büyüme ve dallanmasında, Golgi aparatının, lizozomların ve mitokondrilerin işlevleri sırasında sinaptik veziküllerdeki madde alış-verişinin kontrolunda görev alır (96). HGMD'de gen ile ilişkili 53 mutasyon bildirilmiştir (26.06.18).

### 2.2.7. *ATP13A2* (PARK9; ATPase 13A2; NM_022089)

PH ile ilişkili dokuzuncu lokus, *ATP13A2* genini içeren 1p36 bölgesine tanımlanmıştır. Gendeki mutasyonlar ilk olarak birbirinden bağımsız iki çalışmada, iki farklı Kufor-Rakeb sendromlu ailede gösterilmiştir (40, 97). Kufor-Rakeb sendromu genç yaşlarda başlayan (11-16 yaş) OR kalıtımlı, levadopa cevaplı PH'nın atipik bir formunu oluşturmaktadır (98). Hastalık hızlı ilerler ve piramidal dejenerasyon, demans, supranükleer yüz palsisi ve jeneralize beyin atrofisi gözlenir (99).

*ATP13A2* geninin kodladığı proteininin fizyolojik görevi tam olarak bilinmese de, içerisinde inorganik katyonların ağırlıklı olduğu çeşitli substrat gruplarının taşınmasından sorumlu olduğu düşünülmektedir. Gen ürünü özellikle substantia nigradaki dopaminerjik nöronlarda ifade olmaktadır. Hücre kültürü çalışmaları proteininin, lizozomal membrana lokalize olduğunu gösterir, mutant formların kodladığı proteinlerin daha kısa olduğu ve proteozomal yıkıma uğramak üzere endoplazmik retikuluma gönderildiği gösterilmiştir (97). HGMD'de gen ile ilişkisi bulunan 19 mutasyon bildirilmiştir (26.06.18).

### 2.2.8. PH İlişkili Diğer Lokuslar

Kromozom 2p13'e haritalandırılan PARK3 lokusu, hastalığın geç OD formuyla bağlantılı olup olgularda sporadik PH ile benzer klinik bulgularla ilişkilendirilmektedir (100). Bu bölgedeki *SPR* geninin dopamin sentezi ile ilişkili olabileceği ileri sürülmüştür (48, 49).

1p32'de lokalize PARK10 lokusu İzlanda toplumunda yapılan geniş çaplı bir genetik taramada saptanmıştır. Sporadik formla benzerlik gösteren klinik tablosu ve başlama yaşı ortalaması 65.8 olan PH grubu ile ilişkili bulunmuştur (101). 2009 yılında Norveç popülasyonunda yapılan çalışma ile PARK10 lokusunda 1000 fazla SNP

gösterilmiş ve bu bölgedeki *UPS24* geninin hastalık ilişkili olduğunu ileri sürülmüştür (102). Ancak, bu bilginin doğrulanması için lokusla ilişkili diğer genlerin de taranması gerekmektedir.

PH ilişkili bir başka gen *GIGYF2,* 2q37 de lokalize PARK11 olarak tanımlanmıştır. Fransız ve İtalyan olgularda gende 10 nokta mutasyonu gösterilmiş ve sıklığı %6,4 olarak bildirilmiştir (103, 104). *GIGYF2* geni PERQ amino asit zengini ve GYF domaini içeren bir proteini kodlar Bu protein, tirozin kinaz reseptör sinyal, IGF1 ve insulin reseptör yolağının regülasyonunda rol oynar.

PARK12 lokusu sporadik olgularda Xq'ye bağlantılanmıştır (105), ancak bu lokustaki genlerin hiç birinde mutasyon gösterilememiştir (OMIM, 09.10.2017).

2p13 de lokalize PARK13 lokusuna komşu olan *HTRA2*, aday genler arasında yer almaktadır. Bu gende yer alan 2 mutasyon (G399S ve R404W) ve bir polimorfik varyant (A141S) Belçika ve Almanya'daki sporadik PH olgularında gösterilmiştir (106, 107). *HTRA2* geninin protein ürününün proteolitik aktivitesi bulunduğu, membran arası bölgede yer aldığı ve apoptoz sırasında sitozole salındığı gösterilmiştir. *HTRA2* geni *knockout* farelerde PH fenotipine benzer nörodejenerasyonlar göstermektedir (108). Mutant varyant (G399S) ve allelik varyantın mitokondriyel morfolojide değişikliğe yol açarak disfonksiyona sebep olduğu yapılan in vitro deneylerle gösterilmiştir. Mutant varyantı taşıyan hücrelerin normal tipteki hücrelere oranla stres bağımlı ölüme daha duyarlı olduğu gösterilmiştir (106).

PARK14 ve PARK15 lokusları PH'nın nadir ve atipik formuna uyan ailelerde tanımlanmıştır. *PLA2G6* geni (PARK14 lokusu) kromozom 22 de yer almakta ve kalsiyum bağımlı fosfolipaz 2'yi kodlamaktadır. Bu gende yapılan çalışmalarda hastalığın OR formunda erken başlangıçlı, levadopa cevaplı PH ile ilişkisi gösterilmiştir (109). İran, İtalya ve Danimarka ailelerinde ise piramidal bulguların eşlik ettiği OR formda PH için *FBXO7* (PARK15) geninde homozigot ve birleşik heterozigot mutasyonlar tanımlanmıştır. *FBXO7* geni 22. kromozomda yer alır ve proteinlerin ubiquitin bağımlı proteozomal yıkımında görevli bir proteini kodlar (110).

2008 yılında tanımlanan PARK17 lokusundaki *VPS35* (Vacuolar protein sorting 35 homolog (S. Cerevisiae; NM_018206) geni, endozomlar ve trans golgi ağı arasında membran proteinlerinin döngüsünü sağlayan bir kargo proteindir. Gende oluşan mutasyonlar mono-allelik olup, proteinin reseptör geri dönüşüm döngüsünde

bozulmalara yol açtığı ve PH'nın geç başlangıçlı formu ile ilişkili olduğu düşünülmektedir (111).

1p31 de lokalize PARK19 lokusundaki *DNJC6* genininde saptanan homozigot c.801-2A>G mutasyonu akraba evliliği olan bir ailenin iki oğlunda tanımlanmıştır (112). Her iki bireyde de yirmili yaşlardan önce ciddi fiziksel bozuklukların oluştuğu ve L-Dopaya yanıt vermeyen PH formu görülmüştür. Heterozigot taşıyıcılarda (ebeveynler ve 2 kardeş) ise herhangi bir nörolojik etkilenme görülmemiştir.

*SYNJ1* (PARK20) geni 2000 yılında floresan insitu hibridizasyon teknikleri ile 21q22.2'ye haritalanmıştır (113). Kodladığı sinaptojanin-1 bir polifosfoinositid olup klatrin kaplı çukur ve sinaptik veziküllerin dinamik yapılarında görev alır (114). Birbirinden bağımsız yapılan çalışmalarda gen ile ilişkili bir homozigot missense bir mutasyon (R258Q), akraba evliliği bulunan biri Pakistanlı biri İtalyan iki ailedeki OR erken başlangıçlı PH olan bireylerde saptanmıştır. Daha sonra homozigozite haritalandırması ve ekzom analizleri ile ailelerde ki diğer bireylerde segregasyon çalışmaları yapılmıştır (115, 116). Hastalarda yirmili yaşlarda PH bulguları ilerleyici şekilde gözüktüğü, İranlı ailede jeneralize nöbetlerin, İtalyan ailede ise kognitif tutulumun varlığı bildirilmiştir. *SYNJ1* geninin *LRRK2* genindeki mutasyonlar gibi sinaptik veziküllerin geri dönüşümlerinde oluşturdukları hasarların PH'da gözüken nörodejenerasyonda rolü olduğu düşünülmektedir. Hastalıkla ilişkili olarak HGMD'de 5 mutasyon, 4 de klinik ilişkisi kesinleşmemiş değişim bildirilmiştir (26.06.18).

*DNAJC13* (PARK21) geni ilk olarak 1998 yılında radyasyon hibrid analizleri ile 3. kromozomla ilişkilendirilmiş (117), 2005 yılında yapılan sekans analizleriyle ise 3q22.1 bölgesinde olduğu tanımlanmıştır (118). 56 ekzonlu genin ürünü endozomal sistem membranlarında bulunur ve vezikül formasyon ve trafiğinde görev alır (119). Hastalığın tipik bulgularını gösterip Levadopaya yanıt veren tipik erişkin başlangıçlı OD form olarak tanımlanan PARK21 ile ilişkilendirilen *DNAJC13* genindeki mutasyonlar 13 etkilenmiş bireyin buluduğu geniş bir ailede gösterilmiştir (119). Hastalıkla ilişkili olarak HGMD'de 5 mutasyon 4 de ilişkisi tam anlaşılmamış değişim bildirilmiştir(26.06.18).

### 2.2.9. PH ile İlişkisi Olan Diğer Genler

#### 2.2.9.1. *TH* (Tyrosine Hydroxylase; NM_199292.2)

Tirozin hidroksilaz, dopamin ve diğer katekolaminlerin biyosentezinde hız kısıtlıyıcı aşamadan sorumludur ve L-tirozin'i L-3,4 dihidroksifenilalanin'e (L-DOPA) çevirir. PH'nda oksidatif stres ve imflamatuar yolaklardaki etkisi sebebiyle hastalığın gelişimine katkıda bulunduğu düşünülmektedir (120).

*TH* geni 8 kb boyuntunda 14 ekzondan oluşur ve 11p15.5 bölgesinde yer almaktadır ve bi-allelik mutasyonlarının Segawa sendromu ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (121).

*TH* genindeki bi-allelik mutasyonların bebeklik çağındaki olgularda OR PH oluşturduğu gözlemlenmiştir (122). Sorumlu mutasyonun genin alfa helikal bölgesinde olduğu gösterilmiştir (L236P). Yapılan çalışmalarda mutant gen ürününün aktivitesinin çok azaldığı saptanmıştır. İki ailede yapılan bir başka çalışmada ise saptanan birleşik heterozigot mutasyonlar (R337H ve T494M) erken başlayan PH kliniği göstermektedir. Mutasyon saptanan hastalar düşük dozda L-Dopa ile hayatlarına normal bir şekilde devam edebilmektedir (123) . HGMD'de *TH* ve PH ile ilişkili 7 adet mutasyon tanımlıdır (26.06.18).

#### 2.2.9.2. *MAPT* (Microtubule Associated Protein Tau; NM_005910.5)

Mikrotübül ilişkili proteinler (MAP), mikrotübüllerde tubulin ile ilişki içerisindedir ve aksonlarda yoğun olarak bulunurlar (124).

17q21 bölgesinde lokalize *MAPT* geni 11 ekzondan oluşur ve tau proteinini kodlar (125, 126). Alzheimer hastalarının frontal kortekslerinden elde edilen cDNA'larda yapılan incelemeler, proteinin Alzheimer hastalığında biriken sarmal iplikciklerin temel proteini olduğunu göstermiştir (127). Erişkin bir insan beyninde tau proteinin alternatif mRNA kesimiyle oluşan ve boyutları 352 ile 441 aa arasında değişen 6 isoformu bulunmaktadır (128). İsoformlarında, N-terminal bölgedeki 29 veya 58 aa ekleri ile C terminaldeki 31 aa'lık tekrarların varlıklarına göre farklılık göstermektedir. Genin 10. ekzonunun alternatif kesimine göre 3 adet 3 tekrarlı izoform ile 3 adet 4 tekrarlı izoformu bulunmaktadır. Normal serebral korteksde 3 tekrarlı ve 4 tekrarlı izoformların oranı eşit olarak bulunmaktadır. Bu tekrar bölgeleri genel olarak tau proteininin mikrotübül bağlayan bölgelerini oluşturmaktadır (128).

*MAPT* geni polimorfik bir inversiyonun varlığına göre 2 farklı haplotip içerir. H1 haplotipi daha yaygın olup inversiyon içermezken, H2 haplotipi geninde içinde olduğu 900 kb lik bir bölgenin inversiyonunu içermektedir (129). H1 haplotipinin promotoru H2 haplotipininkine göre daha etkin transkribe olmaktadır (130). Haplotiplerin yaklaşık 3 milyon yıl önce farklılaştığı gösterilmiştir (131). H2 haplotipi Afrikalılarda %6 iken Doğu Asyada %1'den daha az, Avrupada ise %20 oranında bulunmaktadır.

Şempanze beyinlerindeki tau proteinlerinin en uzun formunun (441 aa) insan tau proteini ile %100 benzerlik gösterdiği bildirilmektedir. Yapılan çalışmalar insan dışındaki primatlarda H2 haplotipinin çok daha yüksek oranda olduğunu göstermektedir. Şempanze beyinlerinin tau patolojisi geliştirmemesi tau geninin intron sekanslarındaki farklılıklarına bağlı olduğu düşünülmektedir (132). Yapılan çalışmalar H1/H1 haplotipinin idiyopatik Parkinson ile ilişkili olduğuna işaret etmektedir (130). Bununla beraber HGMD'de *MAPT* geninde PH ile ilişkili 19 mutasyon tanımlanmıştır (26.06.18).

#### 2.2.9.3. *CP* (Ceruloplasmin, NM_000096.3)

Seruloplasmin, 3q24-q25 bölgesinde bulunup 19 ekzona sahip 3700 nükleotidden oluşan bir plazma metalloprotein genidir (133, 134). Glial hücre spesifik serüloplazmin gen ekspresyonunun merkezi sinir sistemindeki demir homeostazı ve nöronal hayatta kalım için gerekli olduğu gösterilmiştir (135). 1999 yılında yapılan bir çalışmada L-Dopaya yanıt vermeyen, tremoru ve demansı bulunmayan, rijidite ve akinezisi olan diabetes mellituslu (DM) bir PH olgusunda CP geninde saptanan mutasyonların, DM ve PH'ın aseruloplazminemi için erken semptomlardan olabileceğini bildirmişlerdir (136).

#### 2.2.9.4. *TWNK* (Twinkle mtDNA Helicase; NM_021830.4)

*TWNK* geni 10q24.31 de bulunan 684 aa'lık yapısal olarak faj T/ primaz/helikaz ve diğer hekzamerik ring helikazları ile benzerlik gösteren mitokondriyel bir proteini kodlamaktadır (137). Kodladığı twinkle proteini, mtDNA replikasyonu için gereken 3' bölgesi, helikaz aktivitesini oluşturmak için gerekli bağlayıcı bölgesi ve 5' bölgesinden oluşmaktadır. Çoğu patojenik mutasyonun bağlayıcı bölgede olduğu bildirilmiştir (138). Genin mono-allelik mutasyonlarının progresif eksternal oftalmopleji hastalığı ile ilişkili olduğu bildirilmekle beraber, 334. aminoasitte oluşan heterozigot bir mutasyonun

(R334Q) *POLG* genindeki bir başka heterozigot mutasyon ile (G848S) ile beraber digenik kalıtım göstererek, saptandığı olguda L-Dopa yanıtlı PH oluşturduğu bildirilmiştir (139).

### 2.2.9.5. *GAK* (Cyclin G Associated Kinase; NM_005255.2)

Ökaryotlarda hücre siklüsü serin/threonin veya tirozinin fosforilasyon/defosforilasyon kontrolüyle sağlanıp aktiviteleri siklinler ve siklin-bağımlı protein kinaz (CDK) inhibitörleri tarafından düzenlenen siklin bağımlı protein kinazlar tarafından yönetilmektedir. Siklin molekülleri ‘’siklin box’’ denilen ortak bir bölge içermektedir. Memeli hücrelerinde siklin A’dan siklin I’ya kadar adlandırılan 9 siklin türü tanımlanmıştır. 1997 yılında 4p16.3 bölgesinde tanımlanan *GAK* geninin 1311 aminoasitten oluşan proteini hücrede siklin G ve CDK5 ile birlikte fonksiyon göstermektedir ve G1 fazında ekspresyonunun arttığı gösterilmiştir (140). Sonraki yıllarda Avrupa kökenli Amerikalı popülasyonunda yapılan genom boyu ilişkilendirme (GWAS) çalışmalarında PH ile *GAK* genindeki rs11248051 (c.3166+578G>A)’nin ilişkili olduğu gösterilmiştir (141, 142) 2011 yılında Kuzey İspanya toplumunda yapılan bir diğer GWAS çalışmasında ise PH ile *GAK* arasında ilişki gösterilememiştir (143).

### 2.2.9.6. *ATP1A3* (ATPase Na+/K+ Transporting Subunit Alpha 3; NM_152296.3)

1998 yılında 19q23.2’de tanımlanan 25 kb’lik *ATP1A3* geni 23 ekzondan oluşmakta ve sodyum-potasyum pompasının (Na(+)/ K(+)-ATPaz) alfa-3 katalitik alt ünitesini kodlamaktadır (144). *ATP1A3* izoformları bazal ganglia, hipokampus ve serebellumu da içeren çeşitli beyin bölgelerindeki nöronlarda eksprese edilmektedir. 2004 yılında yapılan çalışmalarda hızlı seyreden distoni parkinsonizmi hastalarında *ATP1A3* geninde 6 farklı heterozigot mutasyon tanımlanmıştır. Yapılan ekspresyon çalışmaları mutasyonların enzim aktivitesinde veya stabilitesindeki bozukluğa sebep olduğunu göstermektedir (145). Günümüzde genin HGMD’de PH ile ilişkili 18 mutasyonu olduğu gösterilmektedir (26.06.18).

### 2.2.9.7. *GBA* (Glucosylceramidase Beta, NM_001005741.2)

Beta Glukozidaz (*GBA*) glikolipid glukosilseramidi yıkarak seramid ve glukoza dönüştüren lizozomal bir enzimdir (146). Somatik hücre hibridizasyonu teknikleriyle 1981-1983 yılları arasında yapılan gen haritalamala çalışmalarında kromozomal

lokasyonu hakkında net bir bilgi saptanamamış, ilerleyen yıllarda genin psödogeni olduğunun keşfedilmesiyle birlikte 1q21 deki yeri kesinleşmiştir (147-151). Psödogen, foksiyonel gen ile %96 benzerlik gösterip *GBA* geninin 16 kb gerisinde bulunur (152). Çoğu intronun başlangıçlarında Alu dizi tekrarlarının bulunduğu büyük delesyonlar ile tamamına dağılmış tek nokta değişimleri gözlenmektedir (153). Gaucher hastalığı bulunan olguların lenfoblast ve fibroblastlarından elde edilen RNA'larda yapılan çalışmalar psödogenin ürünün normal gen ürünü kadar transkribe olduğunu göstermektedir (152). Psödogenin bir raportör gene aktarımı sonucunda aktivitesinin olduğu gözlemlenmiş, fakat psödogende bulunan mutasyonlar sebebiyle mRNA'sının dayanıksız olduğu ve sahip olduğu diğer fonksiyonel bozukluklar sebebiyle enzimin sentezinin olmadığı görülmüştür (154). Genin psödogeniyle birlikte ''XOVR'' olarak adlandırılan bir füzyon geni oluşturan mutasyonlar tanımlanmıştır(151).

11 ekzonu bulunan *GBA* genindeki bi-allelik mutasyonlar Gaucher hastalığı ile ilişkilendirilmektedir. Bununla beraber Gaucher hastalarında sıklıkla PH görülmesi ve sporadik PH olgularında *GBA* mutasyonlarının saptanması, iki hastalık arasında bir ilişki olduğunu düşündürmektedir. Yapılan çalışmalarda mutant *GBA* varyantlarının parkin geni ile bağlantı kurduğu ve bu bağlantının mutant varyantın stabilitesini etkilediği gösterilmiştir (155). Parkin proteini aynı zamanda *GBA* mutant proteinlerinin birikmesine de yol açmaktadır. Gaucher hastalarının ailelerinden yapılan çalışmalarda *GBA* genindeki heterozigot mutasyonların PH gelişiminde risk faktörü olacağı belirtilmiştir (156). Daha sonraki yıllarda yapılan çalışmalarda *GBA* mutasyonları taşıyan PH olgularının, *GBA* mutasyonu taşımayan olgulara göre daha erken bulgu verdiği, mutasyonların PH için mendelyan bir kalıtımdan çok, hastalık gelişimiyle ilişkili bir risk faktörü olduğu vurgulanmıştır (157). Genin HGMD'de tanımlı PH ile ilişkili 33 mutasyonu bildirilmiştir (26.06.18).

#### 2.2.9.8. *DCTN1* (Dynactin Subunit 1, NM_004082.4)

*DCTN1* geni, mikrotübül bazlı biyolojik motor proteini olup mikrotübüllere ve sitoplazmik dineine doğrudan bağlanan ve dinaktin kompleksinin en büyük polipeptidi olan p150 adlı proteini kodlamaktadır. Dineinler ilk olarak flajella ve ökaryotik siliyalarda ATP hidrolizi ile hücresel hareketi sağlayan enzimler olarak tanımlanmışlardır (158). Dineinin sitoplazmik formları ise vesiküllerin ve organellerin mikrotübüller boyunca hareketini sağlamaktadır (159). Büyük bir makromoleküler

kompleks olan dinaktin ise organellerin mikrotübüller boyunca yaptığı dineine bağımlı hareket için gereklidir. Dinaktin-dinein bağlanması ise vesiküller ve organellerin aksonal transport mekanizmasında önemli bir rolü olduğundan nöronal fonksiyon için kritik önem taşımaktadır. Drosophilada yapılan çalışmalar p150'nin mutant formlarının heterozigot durumda optik bölgedeki nöronlarda hasara yol açtığı ve birleşik göz formu oluşturduğu, homozigot durumlarda ise letal olduğunu göstermiştir (158).

*DCTN1* geni 2p13'de lokalize olup 32 ekzondan oluşmaktadır (158, 160). Genin mono-allelik mutasyonları, klinik bulguları arasında parkinsonizminde bulunduğu Perry hastalığı ile ilişkilendirilmektedir. 2009'da yapılan bir çalışmada Kuzey Amerika, Avrupa ve Kuzey Afrika kökenli 159 ailevi PH olgusu *DCTN1* geni için dizilenmiş, 36 varyant (9 yanlış anlamlı, 5 sessiz, 22 intronik) saptanmıştır (161). Segregasyon çalışmalarında ise bu varyantların hastalıkla ilişkisi gösterilememiştir. İlerleyen yıllarda farklı toplumlarda yapılan çalışmalarda ise ilişkili farklı mutasyonlar saptanmıştır (162-164).

#### 2.2.9.9. *PRKRA* (Protein Kinase, Interferon-Inducible Doublestranded RNA Dependent Activator; NM_003690.4)

1998 yılında tanımlanan (165) çift iplikli RNA-ilişkili protein kinaz aktivatör (*PRKRA*) geni 2q31.3'de yer almaktadır. Gen ürünü özellikle antiviral aktivitelerde interferon için ara buluculuk yapmaktadır. Bazı çalışmalarda distoni ve parkinsonizmli olgularda gende homozigot mutasyonlar bildirilmiştir (166-168). HGMD'de *PRKRA* geni için PH ile ilişkisi tanımlanmış 3 mutasyon listelenmiştir (26.06.18).

#### 2.2.9.10. *SLC6A3* (Solute Carrier Family 6 Member 3; NM_001044.4)

*SLC6A3* geni tarafından kodlanan dopamin transporter (DAT) proteini, dopaminerjik nörotransmisyonun esas regülatörü olarak görev yapıp sinapslardan dopaminin aktif geri alınımını sağlamaktadır. Gendeki mutasyonların PH, Tourette sendromu ve madde bağımlılığıyla ilişkili olduğu gösterilmiştir (169). Gen 15 ekzonlu, 60 kb büyüklüğünde (169) ve 5p15.33 de lokalizedir (170). Gendeki homozigot ve birleşik heterozigot mutasyonları infantil parkinsonizm-distonili hastalarda bildirilmiştir (171, 172). Ekspresyon çalışmalarında mutant proteinlerin işlevlerinde kayıplar gözlenmiş, olguların çoğu genç yaşta kaybedilmiştir. HGMD'de *SLC6A3* geni için PH ile ilişkisi tanımlanmış 7 mutasyon bulunmaktadır (26.06.18).

### 2.2.9.11. *EIF4G1* (Eukaryotic Translation Initiation Factor 4 gamma 1; NM_198241.2)

*EIFG41* geninin proteini p220 (eIF4-gamma), 5'uçlarına *cap* modifikasyonuna uğramış mRNA'ların cap bölgesini tanıyan ve çözen bir protein grubu olan EIF4 grubuna dahildir (173). EIF4G'nin memeli hücrelerinde poli-A bağımlı translasyonda işlev aldığı düşünülmektedir (174). Gen 3q27 bölgesinde lokalizedir (173). Geniş bir Fransız ailesinde bağlantı analizi çalışmasında gende bulunan heterozigot mutasyonların OD PH ve Lewy-body hastalığı ile ilişkisi gösterilmiş, bulgular mRNA translasyonundaki defektlerin hastalığın başlamasında etkisini vurgulamıştır (175). Takip eden yıllarda aynı mutasyon daha geniş olgu gruplarında çalışıldığında sadece bir OD PH olgusunda gösterilebilmiş, ancak 65 yaş üzeri 5 sağlıklı bireyde gösterildiğinden düşük frekanslı veya ileri yaş bulguları için önemli olabileceği ileri sürülmüştür (176). Bu çalışmada gende saptanan diğer değişimler ise polimorfizm olarak değerlendirilmiştir. HGMD de gen için hastalık ilişkili 2 mutasyon, hastalıkla ilişkisi olabileceği düşünülen 14 varyant tanımlanmıştır (26.06.18).

### 2.2.9.12. *GCH1* (GTP Cyclohydrolase I; NM_000161.2)

*GCH1*'in proteini olan GTP siklohidrolaz, fenilalanin, tirozin ve triptofan hidroksilazların esansiyel kofaktörü olan tertahidrobiopterinin biyosentesindeki hız sınırlayıcı adımı katalizlemektedir. *GCH1* geni 14q21-q22 bölgesinde yer alıp (177), 6 ekzondan oluşmaktadır (178). Gendeki mono-allelik mutasyonların OD dopa yanıtlı distoni ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (179-182). Mutasyon gösterilen bir Fransız ailede juvenil başlangıçlı Dopa yanıtlı distoni görülen 4 kardeşte aynı zamanda PH bulgularının da bulunduğu bildirilmiştir (183). HGMD'de gende PH ile ilişkili tanımlı 1 mutasyon ile ilişkili olduğu düşünülen 10 farklı varyant bildirmektedir (26.06.18).

### 2.2.9.13. *EEF1D* (Eukaryotic Translation Elongation Factor 1 Delta; NM_032378.4)

*EEF1D* geninin ürünü ökaryotik elongasyon faktör-1(EF1)- delta, EF1 kompleksini oluşturan 4 alt üniteden biridir ve guanin nukleotid değişim proteini olarak işlev görür. Bu ünitelerden EIF-alfa-GTP aminoacil-tRNA'yı ribozoma aktarmak ile sorumludur ve bu işlev GTP hidrolizi ile gerçekleşmektedir. EF1-alfa-GDP'nin EF1-alfa GTP'ye dönüşümünde ise beta, gama ve delta üniteleri görev almaktadır (184). 2014'de yayınlanan 862 PH olgusu ve 1014 kontrol içeren bir çalışmada (185) bu gende 6 varyant saptanmış ve birinin (A549V) sadece bir hastada görülüp kontrollerde

rastlanmamış olması nedeniyle hastalıkla ilişkili olduğu öne sürülmüştür. HGMD de hastalıkla ilişkili olduğu düşünülen tek varyant bu olarak bildirilmektedir (26.06.18).

#### 2.2.9.14. *NPC1* (Niemann-Pick disease, Type C1; NM_000271.4)

Niemann Pick tip C1 hastalığı ile ilişkilendirilen *NPC1* geni pozisyonel klonlama metotlarıyla 1997 yılında tanımlanmıştır (186). 18q11.2 bölgesinde bulunan gen 25 ekzondan oluşup 47 kb boyutlarındadır ve bütün ekzon/intron bölgeleri GT/AG kuralına uygunluk gösterir (187). Genin 1278 aminoasitlik ürünün, intraselüler kolesterol trafiğinin düzenlenmesinde görevli olduğu gösterilmiştir (186). 2004 yılında yapılan bir çalışmada, heterozigot nokta mutasyonu (G992R) taşıyan tremorlu bir PH olgusu bildirilmiştir (188). 2013 yılında *NPC1* ve *NPC2* genlerinin yaşa bağımlı nörodejeneratif hastalıklarla ilişkisinin araştırıldığı bir çalışmada, *NPC1*'de 2 farklı mutasyonu birlikte taşıyan bir olgu bildirilmiş ancak segregasyon çalışmaları mutasyonların *cis* durumunda olduğunu göstermiştir (189). HGMD'de hastalıkla ilişkili olabileceğine vurgu yapılan iki farklı varyasyon gösterilmektedir (26.06.18).

#### 2.2.9.15. *SMPD1* (Sphingomyelin Phosphodiesterase 1; NM_000543.4)

Ürinden izole edilerek tanımlanan 128 aa boyutundaki sfingomiyelinaz asit, (190) 11p15 bölgesinde yer alan *SMPD1* geni tarafından kodlanmaktadır (114). Gendeki mutasyonlar Nieman Pick hastalığı ile ilişkilendirilmekle beraber (MIM#607608) 2002 de yapılan bir çalışmada (191) 55 yaşındaki bir PH olgusunda da mutasyon bildirilmiştir (c.1829_1831delGCC). 198 PH olgusunda (192) gen ile ilişkili tek bir varyant sadece olgularda saptanıp, kontrollerde bulunmadığından, hastalık ilişkili varyant olarak yorumlanmış ve HGMD de sadece bu varyant yer almıştır (26.06.18).

#### 2.2.9.16. *DNAJC13* (Dnaj/Hsp40 Homolog, Subfamily C, Member 13; NM_015268.3)

*DNAJC13* (PARK21) geni ilk olarak 1998 yılında radyasyon hibrid analizleri ile 3. kromozoma lokalize edilmiş (117), 2005 yılında dizi analizleriyle ise 3q22.1 bölgesinde yer aldığı gösterilmiştir (118). 56 ekzon içeren genin endozomal sistem membranlarında bulunup vezikül formasyonunda ve trafiğinde görevli bir proteini kodladığı belirlenmiştir (119). Hastalığın tipik bulgularını gösteren, levadopaya yanıt veren erişkin başlangıçlı OD form olarak tanımlanan PARK21 ile ilişkilendirilen *DNAJC13* geninde mutasyon, 13 etkilenmiş olgulu geniş bir ailede saptanmıştır (119).

Hastalıkla ilişkili olarak HGMD'de 5 mutasyon ve 4 klinik ilişkisi tam anlaşılmamış varyant bildirilmiştir (26.06.18).

#### 2.2.9.17. *GRN* (Granulin Precursor; NM_002087.2)

*GRN* geni 1992 yılında 17. kromozomla ilişkilendirilmiş (193), 1999 yılında ise (194) 17q21.32 bölgesinde lokalize edilmiştir. Gen ürünü olan Progranulin 88 kD luk bir glikoproteindir ve otokrin büyüme faktörü olarak işlev görmektedir (195). Gendeki mono-allelik mutasyonların Frontotemporal Demans ile ilişkilisi gösterilmiştir (196). 2007 yayınlanan bir çalışma, mutasyon taşıyan olguların %30'unda parkinsonizm bulgularının varlığına dikkat çekmektedir. Hastalıkla ilişkili olarak HGMD'de tanımlanmış 1 mutasyon bildirilmektedir (26.06.18).

#### 2.2.9.18. *TREM2* (Triggering Receptor Expressed on Myeloid Cells 2; NM_018965.2)

*TREM2* geni somatik hücre hibrid analizleri ile 2000 (197) yılında kromozom 6 ile ilişkilendirilmiş, sekans analizleri ile 2003 yılında (198) 6p21.1 bölgesinde lokalize edilmiştir. Gen, immunoglobin reseptör süper ailesine ait tip 1 transmembran proteini kodlar. Proteinin osteoklast yüzeylerinde, olgunlaşmamış dendritik hücrelerde ve makrofajlarda saptanmış, primer olarak merkezi sinir sisteminde mikroglialarda eksprese edildiği bildirilmiştir (199). *TREM2*'deki bi-allelik mutasyonlar Nasu-Hakola hastalığı ile ilişkilendirilmekle beraber, mono-allelik mutasyonların Alzheimer hastalığı için risk faktörü olduğu bildirilmiştir (200). Bu gende HGMD'de PH ilişkili tek bir varyant bildirilmektedir (26.06.18).

#### 2.2.9.19. *POLG* (DNA Polymerase Gamma, Catalytic Subunit; NM_002693.2)

*POLG* geni FISH yöntemi ile 1997 yılında (201) 15q24-q26 bölgesine ancak, yine aynı yıl başka bir çalışma ile (202) 15q25 bölgesine lokalize edilmiştir. Kodladığı proteinin insan mitokondriyel DNA'sının replikasyonunda önemli olan gamma DNA polimeraz enzimi olduğu gösterilmiştir (203), daha sonraki yıllarda enzimin hem nükleus hem de mitokondride bulunduğu gösterilmiştir. Proteinin düzeltme yapan bölgesi olan ekzonükleaz bölgesindeki mutasyonların mtDNA'daki nokta mutasyonlarına sebep olduğu anlaşılmıştır (204). Ana bulgusu erken başlangıçlı PH olan 2 kardeşte bu genin 16. ekzonunda heterozigot bir değişim (c.2492A>G) bildirilmiş (205) olmakla beraber, 2007 yılında yapılan başka bir çalışmada (206) bu değişimin bir

polimorfizm olduğu raporlanmıştır. Hastalıkla ilişkili olarak HGMD'de 4 mutasyon 1 de ilişkisi kesin olmayan bir değişim bulunmaktadır (26.06.18).

## 2.3. Genetik Hastalıkların Tanısında Kullanılan Moleküler Yöntemler

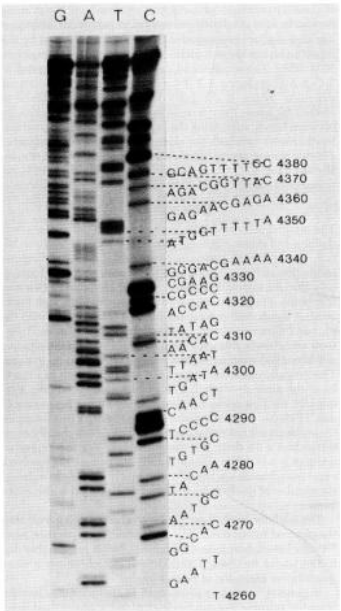
### 2.3.1. DNA Dizileme Yöntemleri

DNA dizileme, DNA zincirinin nükleotid diziliminin sırasının belirlenmesi işlemidir. 1976'da Maxam ve Gilbert (207) tarafından geliştirilen uçları boyalı zincirlerin kimyasal olarak kırılması işlemi 1977'de Sanger ve ark. (208) tarafından geliştirilip günümüzde de altın standart olarak kullanılan zincir sonlandırma metodu, DNA dizileme teknolojisinin başlangıcı olarak kabul edilmektedir. 1986 yılında Smith ve ark.(209) tarafından nükleotidlerin farklı floroforlarla işaretlenmesi ve işaretli nükleotidlerin poliakrilamid jel elektroforezinde bir detektör yoluyla saptanmasını sağlayan yöntemler ile DNA dizilemesinin otomatize edilmesinin önü açılmıştır. 1995 yılında Fleischmann ve ark. (210) haemophilus influenzea'nın tüm genomuna ait diziyi bu teknikle yayınlamıştır. Bu yayındaki sorumlu kişi Venter'in daha sonra kurduğu Celera şirketi ile Amerika Ulusal Sağlık Enstitüsü'nün ortak çalışmalarıyla tüm insan genomunun dizilenmesi amacıyla geliştirilen ''İnsan Genom Projesi'' 2000 yılı Haziran ayında başarıyla tamamlanmıştır (211).

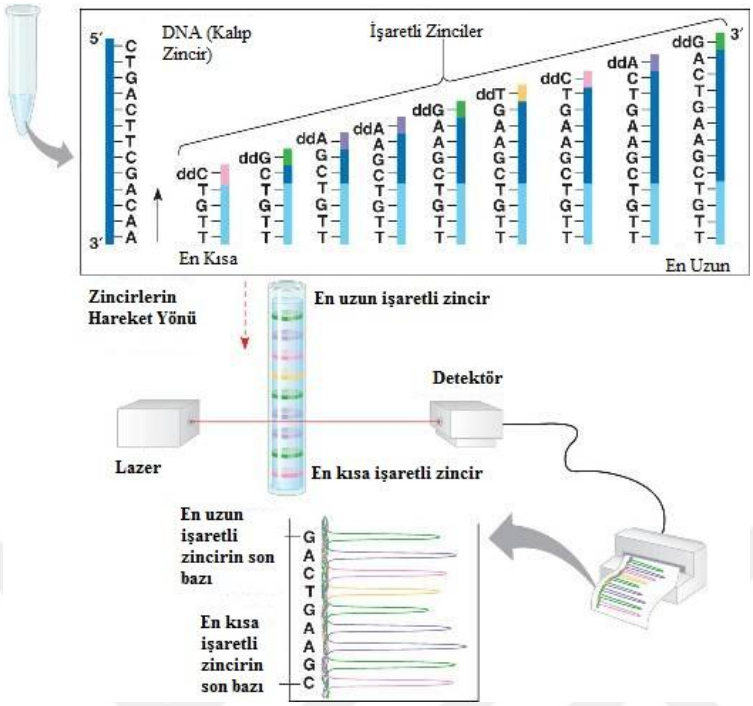
İnsan Genom Projesi kapsamında yapılan tüm genom dizileme çalışmaları her klonun bağımsız çoğaltılması ve dizilenmesi gereksinimlerinden dolayı 10 yıldan fazla sürmüştür. Sonuçları değerlendirildiğinde Sanger dizileme (SD) yönteminin tüm genom dizileme işlemleri için yetersiz kaldığı maliyet ve süreyi azaltıp verimliliği arttıracak yeni yöntemlere ihtiyaç duyulduğu ortaya çıkmıştır (212). Bu sebeple YND veya ikinci nesil dizileme olarak adlandırılan çok fazla sayıda klonun eş zamanlı olarak çoğaltılmasına ve analiz edilmesine olanak sağlayan dizileme yöntemleri geliştirilmiştir. Bu tekniğin kullanımı, tüm genomun, ekzomun ya da özelleştirilmiş panel gen testlerinin geliştirilmesine ve birçok hastanın eş zamanlı incelenmesine olanak sağlayarak hastalıkların genetik etyopatogenezlerinin hızla ve daha uygun maliyetlerle aydınlatılmasına, genetik tanı için yaklaşımların çeşitlenmesine olanak sağlamıştır (213, 214).

### 2.3.1.1. Sanger Dizileme

SD olarak tanımlanan ve günümüzde dizileme yöntemlerinin altın standardı olarak kabul edilen dizileme yöntemi, Sanger ve ark. 1977 yılında geliştirilmiş ve yayınlanmıştır (208). Zincir sonlandırma yöntemi olarak tanımlanan SD yönteminin temelinde yeni oligonükleotid zinciri oluşumu sırasında ortamdaki diğer deoksiribonükleotidlere (dNTP) ilaveten reaksiyonda 3' hidroksil grubuna sahip olmayan dideoksiribonükleotidler (ddNTP) bulunmakta, bu nükleotidlerin DNA Polimeraz I'i inhibe etmesi ve zinciri sonlandırması beklenmektedir. Sanger ve ark. (215) 4 farklı karışım tübünün her birine farklı işaretli (a-32-p) ddNTP koyup, bu karışımlara primer bağlanmış tek zincirli kalıp DNA'yı, DNA polimeraz ve dNTPleri eklemiştir. Çoğaltılma esnasında ddNTP'ye maruz kalan oligonukleotid dizilerinin boyu, ddNTP'nin yeni oluşan diziye dahil olması tesadüfi olduğundan farklı uzunluklarda olmaktadır. Daha sonra her tüpte oluşan oligonukleotidlerin akrilamid jelde yürütülmesiyle fragman boyutlarına göre ayrışmaktadır (Şekil 2.3). 1986 yılında Smith ve ark. nın (216) her bir ddNTP'yi farklı floroforlarla işaretleyerek bu floroforların bir dedektör aracılığıyla saptaması yöntemini geliştirmesi saysinde otomasyon sistemlerinin ortaya çıkması sağlanmıştır (Şekil 2.4). Günümüzde otomatize edilmiş kapiller sistemleri ile aynı anda çoklu dizi örneklerinin dizilenmesi mümkün olmaktadır.




**Şekil 2-3: DNA fragmanlarının farklı uzunluklarına göre ayrıştırılması**




**Şekil 2-4: Sanger dizileme prensibi**

**(**http://bio1151.nicerweb.com/Locked/media/ch20/termination.html adresinden alınmış ve yeniden düzenlenmiştir**.)**

### 2.3.1.2. Yeni Nesil Dizileme (YND)

Hedef DNA materyalinin çeşitli yollarla (mekanik, enzimatik) ufak parçalara ayırarak ya da amplifikasyon ürünlerini kullanarak, eş zamanlı çok miktarda dizilenmesi esasına dayanan yöntem YND olarak adlandırılmaktadır. Bu yöntemi kullanan ilk sistem 2005 yılında *454 Life Sciences* firması tarafından 454 platform adı ile piyasaya sürülmüş, 2006 yılında Solexa (*Genome Analyser*), Agencourt (SOLID) platformları satışa sunulmuştur. Bu platformlardan Agencourt Applied Biosystems, Solexa Illumina, 454 Life Science ise Roche tarafından satın alınmıştır. 2011 yılında ise Ion Torrent firmasından PGM, Pacific Bioscience firmasından Pac Bio ve Illumina firmasından Miseq platformları da YND platformlarına eklenmiştir.

YND tekniği uygulaması, kalıp hazırlanması, dizilenme, görüntülenme ve verilerin analizi aşamalarından oluşmaktadır. Kalıp hazırlanma aşamasında, tek bir DNA molekülü ya da tek DNA molekülünün klonal olarak çoğaltılması ile olmak üzere iki yöntem kullanılır.

Tek bir DNA molekülü kalıbından hazırlanma aşamasında öncelikle başlangıç materyali 200-250 bç uzunluğunda rastgele fragmanlara ayrıştırılır. Bu fragmanların sonlarına ortak adaptörlerin eklenmesiyle elde edilen kalıbın katı desteğe kovalent bağlı primer moleküllerine hibridizasyonu gerçekleşir. Tek iplikli tek-molekül kalıpları, immobilize primerler ile uzatılarak bölgesel olarak dağıtılmış kalıpların bulunduğu katı desteğe bağlanır. Ardından dağınık tekli polimeraz moleküllerinin bu katı desteğe tutturulması sağlanır (217).

Klonal olarak çoğaltılmış kalıpların hazırlanma aşamasında ise yaygın olarak emülsiyon polimeraz zincir reaksiyonu (emPZR) (218) ve katı faz amplifikasyonu (219) yöntemleri kullanılmaktadır. Uçlarındaki diziler vasıtasıyla mikroskobik boncuklar üzerindeki DNA zincirlerine bağlanan DNA fragmentlerinin yağ içinde bulunan emülsiyon damlacıkları içinde klonal olarak çoğaltılması emPZR yönteminin temelini oluşturmaktadır. Katı faz amplikasyon yöntemi ise cam bir slayt üstünde fragmanlardan ya da komplementer kalıplardan elde edilen gelişigüzel dağılımlı ve klonal olarak çoğaltılmış kümelerin elde edilmesi temeline dayalıdır (220).

Dizileme aşamalarında ki yöntemlerde ise; gerçek zamanlı dizileme, ligasyona dayalı dizileme, pirodizileme (tek nükleotit ekleme) ve geri dönüşümlü zincir sonlanması gibi farklı yöntemler bulunmaktadır (221). Farklı YND platformları dizileme ve kalıp hazırlama aşamalarında farklı yöntemler kullanmaktadır (Tablo 2.3).

**Tablo 2-3: Yeni nesil platformlarının karşılaştırılması (217) berglund'dan alınmış ve yeniden düzenlenmiştir**

| | **1. Nesil** | **2. Nesil** | | | | **3. Nesil** | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | **Sanger** | **FLX 454 GS (ROCHE)** | **Solexa (Illumina)** | **SOLID (Applied Biosystem)** | **Ion Torrent (Thermo Fisher)** | **Helicos (HeliScope)** | **PacBio (Pasific Bioscience)** |
| **Kütüphane hazırlanması** | Mekanik veya enzimatik fragmen-tasyon | Mekanik veya enzimatik fragmentasyon | Mekanik veya enzimatik fragmentasyon | Mekanik veya enzimatik fragmen-tasyon | Mekanik veya enzimatik fragmentas-yon | Mekanik veya enzimatik fragmentasyon | Mekanik veya enzimatik fragmentasyon |
| **Çoğaltma aşaması** | PZR | emPZR | Köprü PZR | emPZR | emPZR | Yok | Yok |
| **Dizileme** | Zincir sonlan-ması | Piro-dizileme | Geri dönüşümlü zincir sonlanması | Prob ligasyonu | Hidrojen iyonuna duyarlı yarı iletken | Gerçek zamanlı | Gerçek zamanlı |

YND, hastalık/ sendrom ile ilişkili bir çok genin eş zamanlı dizilenmesi amacıyla oluşturulan hedefe yönelik gen panelleri, tüm ekzom dizileme (TED), tüm genom dizileme (TGD), ekspresyon çalışmaları için RNA dizilenmesi ve metagenomik çalışmalar gibi bir çok farklı alanda kullanılabilmektedir (222).

YND teknolojisindeki temel yetersizlik, Polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) sonrası okuma alınan bölgenin içeriğinde karşılaşılan sorunlardan kaynaklanır. Bu teknikte elde edilen okuma uzunlukları yaklaşık olarak 400 bç uzunluktadır. Boyutlarının kısa olması, biyoinformatik araçların okuma dizilerini referans genoma hizalarken bilhassa tekrar dizilerinde, büyük delesyon ve duplikasyon bölgeleri ile dengeli translokasyonlarda ve kırık bölgelerin amplikon sınırları içinde bulunması gibi durumlarda bu sistemlerin yetersiz kalmasına sebep olur (223). Buna ek olarak okumaların sonucunda elde edilen çok miktarda varyant ve bu varyantların anlamlandırılmasında yaşanan zorluklar, ko-segregasyon analizleri, hedef bölgelerdeki motife yada GC baz içeriğinin zenginliğine bağlı düşük okuma alınması ve bu bölgelerin yeniden taranma gerekliliği gibi durumlar inceleme süresi uzatırken ilave maliyete sebep olmaktadır.

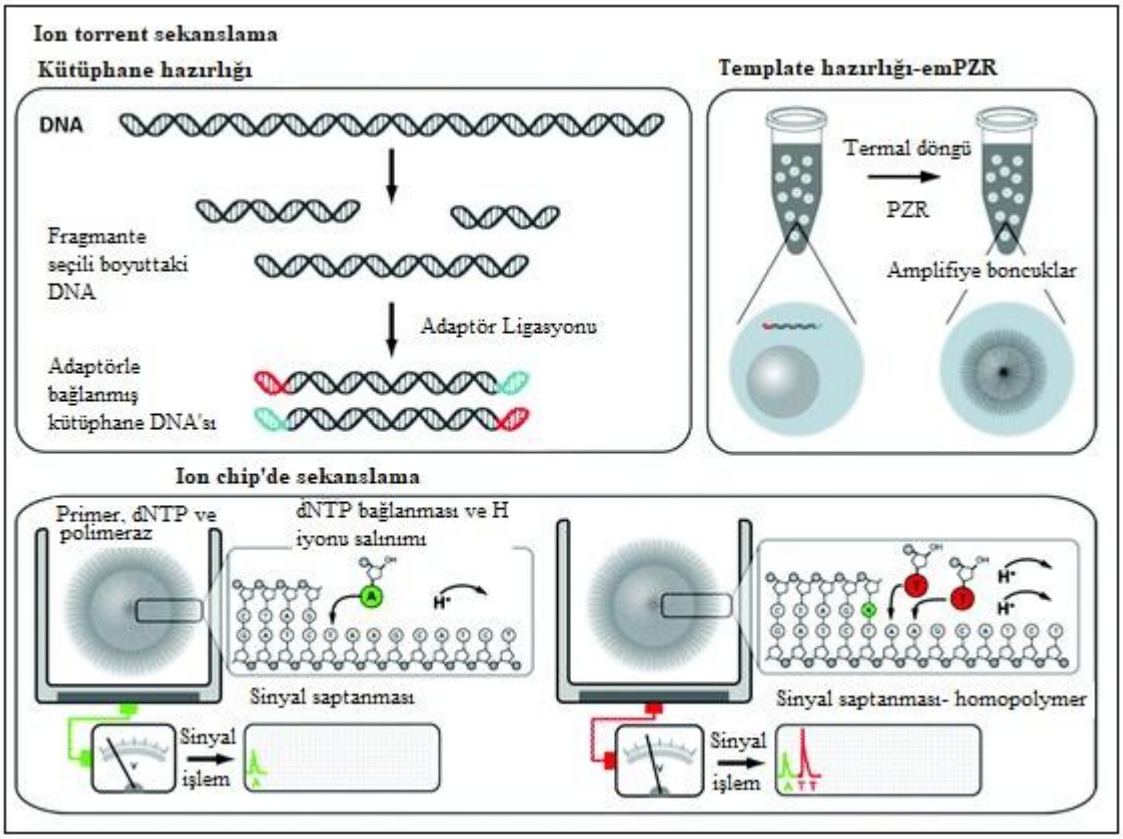
Bu sorunların aşılması amacıyla bir sonraki nesil dizileme teknolojilerinin PZR'a dayalı bir yöntem olmaması yönünde çalışılmakta, böylece hem sürenin kısalması hem de PZR hatalarının önüne geçilmesi hedeflenmektedir (223).

Diğer adıyla tek-zincir molekül dizileme teknolojisi olarak adlandırılan bu teknoloji; DNA polimeraz kullanılarak sentez yoluyla dizileme, nanopordan geçiş yöntemlerini kullanarak dizileme ve direk görüntüleme ile dizileme olmak üzere 3 gruba ayrılmaktadır. Bu teknolojinin günümüzdeki temsilcileri arasında; nanopor teknolojisiyle tek zincirli DNA molekülünün doğrudan elektriksel algılanması (Oxford Nanopor), optik okumalı nanopor teknolojisi ile dizileme ve transistor aracılı dizileme (IBM), floresan rezonans enerji aktarımını kullanan gerçek zamanlı DNA dizilemesi (Visigen Biotechnology) ve tek iplikli DNA molekülünün gerçek zamanlı dizilemesi (Pacific Biosciences) bulunmaktadır (224-232).

#### 2.3.1.2.1. Ion Torrent Platformu

Ion Torrent platformu sistemi, nükleotidlerin uzayan yeni DNA zincirine eklenmesi sırasında açığa çıkan $H^+$ iyonlarının neden olduğu pH değişimlerine göre dizileme yapmaktadır (233). Dizileme için floresan işaretli nükleotidlere ve lazer

sistemine ihtiyaç duymaması ile diğer platformlardan farklı daha ekonomik bir platformdur (Şekil 2.5).




**Şekil 2-5: Ion Torrent platformu işleyişi (Chadran 2018 (234) den değiştirilerek eklenmiştir)**

Platformdaki kalıp hazırlama aşaması; DNA'nın parçalanması, parçalanmış uçların enzimatik modifikasyonu ve adaptöre bağlanmaları ve adaptör bağlı ürünlerin emülsiyon PZR'ı ile çoğaltılmasından oluşmaktadır. Parçalanmış uçlarından adaptöre bağlanan DNA parçaları, üzerlerinde adaptör dizilerinin tamamlayıcı bazlarından oluşan diziler, kovalentin bağlı olduğu boncuklarla eşleşirler. Her bir boncuklu DNA parçası, içerisinde PZR için gerekli reaktifler ve polimeraz bulunan yağ damlacıkları içinde emülsiyon PZR ile çoğaltılır. Çoğaltılan ürünleri taşıyan boncuklar bir sonraki aşamada saflaştırılır. Boncuklu DNA parçalarına dizileme sırasında dNTP bağlandığı sırada ortaya salınan $H^+$ iyonları sinyal alıcısı tarafından algılanarak ham veriye dönüştürülür (233). Platformun Torrent Suite Server (TSS) olarak adlandırılan programı, sinyal

işlemesi, baz isimlendirmesi, haritalama, varyant isimlendirme, önceliklendirme ve yorumlama aşamalarını otomatize olarak gerçekleştirir.

Sinyal işleme ve baz isimlendirme işlemi sonrasında veri (ionogram), haritalanmamış BAM dosyası formatına dönüştürülür. Daha sonra adaptör kontaminasyonu, indel ve düşük kalitedeki okumalar sonucu oluşan hatalı diziler ile standartlara uymayan okumaların çıkartılma işlemlerinin yapıldığı ham verinin kalite kontrolü aşaması gelir. Bu aşamada kalite değerleri ile nükleotid dağılımları görsel hale getirilir, okumalar referans genom üzerindeki lokasyonlarının belirlenmesi ve hizalanması (haritalama ve hizalama) işlemi gerçekleşir. TMAP (Torrent Mapping Aligment Program) algoritması kullanılarak, FASQ formatındaki diziler bu aşamada SAM/BAM uzantılı dosya formatlarına dönüştürülüp BAM dosyası olarak saklanır. Haritalama sonrası kalite kontrolünden geçen hizalanmış diziler referans genomla kıyaslanarak varyasyonların belirlenmesi sağlanır. TSS'nin oluşturmuş olduğu BAM ve BAM-BAI formatındaki veriler, Ion torrent platformunun Ion Reporter adlı programı ile çalışma için belirlenmiş varyant isimlendirme ve analiz parametrelerine göre ilişkilendirilir ve sonrasında detaylı VCF raporu oluşturulur. Referans genomda tanımlı olmayan varyantların analizi için çeşitli in silico algoritma programları (MutationTaster, SIFT/Provean, PolyPhen-2, Human Splice Finder vb).(17, 235-237) ve aile ağacı bilgileri eşliğinde değerlendirme yapılır.

Saptanan varyantların değerlendirmesinde Tablo 2.4 ve Tablo 2.5 deki sınıflandırmalar kullanılmaktadır. Bu sınıflandırmada patojenik değerlendirmeler (tablo 1.4); çok güçlü (PVS1), güçlü (PS1-4), orta (PM1-6) ve destekleyici (PP1-5), zararsız değerlendirmeler ise (Tablo 2.5); tek başına (BA1), güçlü (BS1-4) ve destekleyici (BP1-6) kullanılmıştır. Saptanan değerlerin puanlanmasında ise Tablo 2.6'dan yararlanılmıştır (238, 239).

**Tablo 2-4: "Patojenik" değerlendirmeler için kriterler**

| **Patojenite Olasılığı** | **Kategori** |
|---|---|
| Çok güçlü | **PSV1** Hastalıkla ilişkisi bilinen gende fonksiyon kaybına yol açan değişim (Anlamsız mutasyon, çerçeve kayması, kırpılma bölgesi mutasyonları, başlangıç kodonu mutasyonları, tekli veya çoklu |

| | |
|---|---|
| | ekzon delesyonları) |
| Güçlü | **PS1** Önceden bildirilmiş bir nükleotit değişimindeki farklı bir aminoasit değişimi<br>**PS2** Aile öyküsü olmayan hasta bireyde saptanılan Dde novo değişim<br>**PS3** Invitro ya da invivo fonksiyonel analizleri bilinen genlerdeki değişimler<br>**PS4** Etkilenmiş bireylerdeki varyantların kontrol gruplarına nazaran anlamlı derecede fazla olması |
| Orta | **PM1** Bilinen bir fonksiyonel domainde ya da mutasyonel hotspot noktada oluşan zararsız olmayan değişim<br>**PM2** Çeşitli büyük çalışmalarda (Exome Sequencing Project, 1000 Genome, Exome Aggregation Consortium gibi) kontrollerde gösterilmemiş (ya da resesif durumlarda frekansı çok düşük olan) değişimler<br>**PM3** Resesif hastalıklar için trans durumda saptanan patojenik varyantlar<br>**PM4** Çerçeve içindeki tekrarlanmayan bölgelerde indel veya dur kodonu kaybı sonucu proteininin boyutundaki değişimler<br>**PM5** Daha önce tanımlı yanlış anlamlı mutasyonu olan bir aminoasitte saptanmış yeni bir yanlış anlamlı değişim<br>**PM6** De novo olduğu düşünüldüğü halde ailede segregasyon analizi yapılmamış değişim |
| Destekleyici | **PP1** Hastalıkla ilişkili gende saptanan değişim için aile içinde segregasyonun varlığı<br>**PP2** Hastalıkla ilişkisi bilinen gene ait tanımlı yaygın yanlış anlamlı değişimlerin varlığı ve bu gende saptanmış yanlış anlamlı değişim<br>**PP3** Çeşitli in silico programlarda saptanılan patojenite değerlendirmesine dair bulgular<br>**PP4** Tek gen ile ilişkili bir hastalık için uygun hasta fenotipi ya da aile öyküsü<br>**PP5** Patojenik olarak bildirilen ama laboratuvar ortamında bağımsız olarak patojenitesi kanıtlanmamış bulgular |

**Tablo 2-5: "Zararsız" değerlendirmeler için kriterler**

| **Zararsız olasılığına dair veri** | **Kategori** |
|---|---|
| Tek başına | **BA1** Çeşitli büyük çalışmalarda (Exome Sequencing Project, 1000 Genome, Exome Aggregation Consortium gibi) allel frekansı >5% |

| | |
|---|---|
| | olan değişimler |
| Güçlü | **BS1** Allel frekansının hastalığın görülme sıklığından yüksek olduğu değişimler<br>**BS2** Sağlıklı bireylerde erken yaşta tam penetranslı gözlemlenen değişimler (hastalığa göre resesifler için homozigot, dominant için heterozigot, X'e bağlılar için hemizigot)<br>**BS3** In vitro veya in vivo çalışmalarda protein fonksiyonunda veya kırpılmada etkisi olmadığı saptanılmış değişimler<br>**BS4** Ailedeki etkinlenmiş bireylerde segregasyonun olmadığı değişimler |
| Destekleyici | **BP1** Yanlış katlanmış varyantların hastalık yaptığı bildirilen genlerdeki yanlış anlamlı değişimler<br>**BP2** Tam penetranslı dominant gen/hastalıkda patojenik varyantın trans durumda bulunmasıyada herhangi bir kalıtım paterni için patojenik varyantın cis durumda bulunması<br>**BP3** Fonksiyonu bilinmeyen tekrar bölgelerindeki çerçeve içi indel varlığı<br>**BP4** Gen ya da gen ürününde yapılan in silico analizlerde zararsız bulunan değişimler<br>**BP5** Hastalık için alternatif moleküler yapıda bulunan değişimler<br>**BP6** zararsız olarak bildirilmesine rağmen laboratuvar ortamında bağımsız çalışması yapılamamış değişimler<br>**BP7** Yüksek korunmuş bölgede bulunmayan ve kırpılma hatası ya da yeni kırpılma bölgesi yaratmayan sessiz değişimler |

**Tablo 2-6: Saptanan değerlerin puanlandırılması**

| | |
|---|---|
| Patojenik | (i) 1 çok güçlü (PSV1) ve<br>(a) ≥ 1 güçlü (PS1-4) ya da<br>(b) ≥ 2 orta (PM1-6) ya da<br>(c) 1 orta (PM1-6) ve 1 destekleyici (PP1-5) ya da<br>(d) ≥ 2 destekliyici (PP1-5)<br>(ii) ≥ 2 güçlü (PS1-4) ya da<br>(iii) 1 güçlü (PS1-4) ve<br>(a) ≥ 3 orta (PM1-6) ya da<br>(b) 2 orta (PM1-6) ve ≥ 2 destekliyici (PP1-5) ya da<br>(c) 1 orta (PM1-6) ve ≥ 4 destekliyici (PP1-5) |
| Olası Patojenik | (i) 1 çok güçlü (PSV1) ve 1 orta (PM1-6) ya da<br>(ii) ≥ 1 güçlü (PS1-4) ve 1-2 orta (PM1-6) ya da |

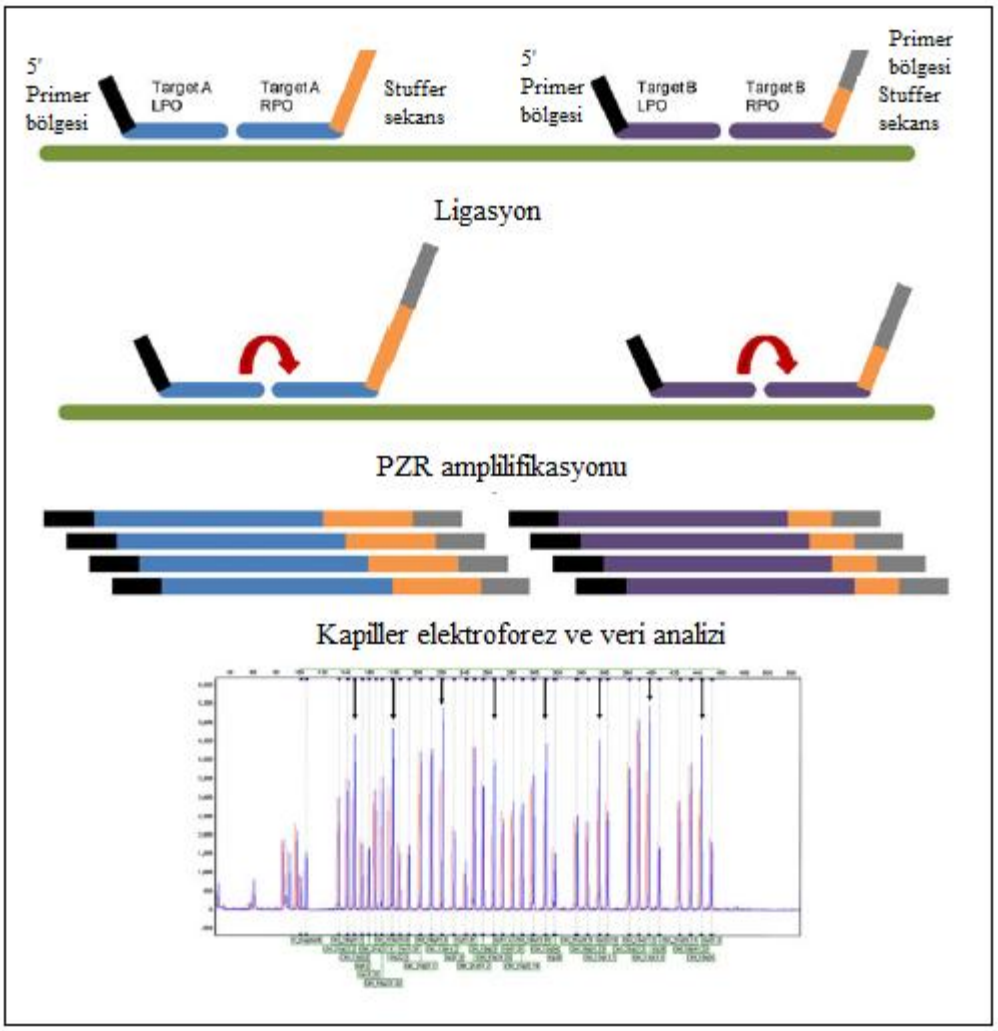
| | |
|---|---|
| | (iii) 1 güçlü (PS1-4) ve ≥ 2 destekliyici (PP1-5) ya da<br>(iv) 2 orta (PM1-6) ve ≥ 2 destekleyici (PP1-5) ya da<br>(v) 1 orta (PM1-6) ve ≥ 4 destekleyici (PP1-5) |
| Zararsız | (i) 1 tek başına (BA1) ya da<br>(ii) ≥ 2 güçlü (BS1-4) |
| Olası Zararsız | (i) 1 güçlü (BS1-4) ve 1 destekleyici (BP1-7) ya da<br>(ii) ≥ 2 destekleyici (BP1-7) |
| VUS (Önemi bilinmeyen değişim) | (i) Üsteki değerlendirmelere dahil olamayan yada<br>(ii) Zararsız ya da patonejik değerlendirmesi çelişkili olan |

### 2.3.2. Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification Yöntemi

Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification (MLPA) tekniği 2002 yılında MRC-Holland firması tarafından DNA'daki kopya sayılarını değerlendirmek üzere viral RNA'ların saptanması için kullanılan ligasyon bağımlı PZR tekniğinin modifiye edilmesiyle geliştirilmiş ve kullanıma sunulmuştur. Teknik, hedefteki özgün dizilerin, çoklu PZR ardından eş zamanlı olarak değerlendirilmesi esasına dayanır (240).

MLPA işleminde her bir hedef bölgeye ortak özellikler içeren özgün problar tasarlanmıştır. Problar iki ana parçadan oluşmaktadır. Bunlardan 5' tarafta bulunan oligonükleotid sırasıyla ileri primer dizisinin eşlenik motifini ve hedef alınan DNA dizisinin eşlenik motifini içeren dizilerden (20-30 bp) oluşmaktadır. Probun 3' parçasını oluşturan oligonukleotid ise sırası ile hedef alınan DNA dizisinin komşu eşlenik motifini (25-43bp) devamında fragmanların farklı boyda oluşmasını sağlayacak dolgu dizisini (19-370 bp) ve sonunda geri primerin eşlenik dizisini taşımaktadır.

İşlem basamakları temel olarak 4 aşamadan oluşur; 1) hedef bölgeler ile onlara özgün spesifik probların hibridizasyonu, 2) hibridize olan probların ligasyonları, 3) ligasyona uğramış probların PZR ile çoğaltılması ve 4) çoğaltılan ürünlerin kapiller elektroforezde fragman analizi ile değerlendirilmesi (Şekil 2.6) (240).




**Şekil 2-6: MLPA prensibi**

Bu işlemlerde sırasıyla; DNA denatüre edilerek, araştırılacak bölgelerin her birine özgü ikişer parçadan oluşmuş farklı oligonükleotid prob içeren karışım ile bir gece inkübasyona bırakılır. Hibdridizasyondan sonra birbirine komşu bölgelere hibridize olan prob parçaları Nikotinamid Adenin Dinükleotid (NAD) bağımlı ligaz kullanılarak ligasyon (problar arasındaki boşluğun fosfodiester bağı kurularak kapanması) işlemine tabi tutulur. Ligasyonla birleşmiş olan problar PZR ile çoğaltılırlar. PZR ile çoğaltılan farklı probların fragman ürünleri kapiller elektroforez kullanılarak ayrıştırılır ve kontrol ürünlerinden gelen sinyallerle kıyaslanarak değerlendirilir. Probların özgün bağlanma bölgelerindeki mutasyonların varlığında ya da tüm hedeflerin delesyona uğraması halinde hibridizasyon gerçekleşmediği için ligasyon ile prob

parçaları bağlanmayıp PZR işleminde çoğaltılamayacağından fragman elde edilemez ve sinyal alınmaz (240).

Yapılan tüm işlemler için 20 ng DNA'nın yeterli olması, birçok olguda aynı anda 50'den fazla hedef bölgenin delesyon ve duplikasyonlarının taranması, kullanımının kolaylığı, düşük hata payı ve düşük maliyeti MLPA'nın avantajlarıdır. Kapiler elektroforez cihazına ihtiyaç duyulması, küçük nokta mutasyonlarını, çoğu inversiyon ile dengeli translokasyonlar ile prob dışındaki diziye özgü kopya sayısı değişimi (CNV) tespit edememesi, hedefe yönelik olması ve kontaminasyona açık olması ise dezavantajlarıdır.

# 3. GEREÇ VE YÖNTEM

## 3.1. Çalışma Grubu

Çalışma grubumuz, 20015-2017 yılları arasında İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi, Nöroloji AD'da klinik olarak PH tanısı alarak moleküler genetik inceleme için Tıbbi Genetik AD'mıza yönlendirilen 63 indeks olgudan oluştu.

Çalışma grubundaki her birey için en az 3 jenerasyonu içeren aile ağaçları hazırlandı. Olgular eş zamanlı olarak YND panel analizi ve MLPA ile değerlendirildi. YND panel analizinde mutasyon bulunan olgularda saptanan mutasyon SD ile konfirme edildi, segregasyon analizi için aile bireyleri SD ile incelendi.

Çalışmanın etik açıdan uygunluğu, İ.Ü. İstanbul Tıp Fakültesi Etik Kurulu tarafından onaylandı (25.12.2015 tarih ve TDK-2016-20253 sayı). Çalışmaya katılan olgulardan bilgilendirilmiş onam alındı.

Katılımcılardan DNA eldesi için 2 ml periferik kan alındı.

## 3.2. Olguların Değerlendirilmesi

### 3.2.1. Klinik değerlendirmeler

Her olgu için ekte (Ek-1) gösterilen moleküler genetik analiz istek formu hazırlanıp fizik muayene bulguları ve aile öykülerine göre aile ağaçları eklendi.

### 3.2.2. Moleküler Analizler

#### 3.2.2.1. DNA İzolasyonu

Çalışmaya dahil edilen olgulardan alınan steril 2 ml $K_3$EDTA'lı periferik venöz kan örneklerinden solüsyon / manyetik boncuk bazlı sisteme özgün kitler (*Magnapure Large Volume KIT*, ve *EZ1 DNA Blood 350 ml kit 154054059 ref no:951054 QIAGENE*) kullanılarak firma protokollerine uygun şekilde DNA izolasyonu yapıldı.

##### 3.2.2.1.1. DNA Kalite Değerlendirmesi Ve Seyreltilme İşlemleri

İzolasyonu takiben DNA örneklerin yoğunlukları (ng/µl) ve absorbsiyon ölçümleri ($A_{260/280}$) (1,80 - 1,89) spektrofotometrede ölçülerek kayıt edildi (Nanodrop 2000c, ThermoScientific). DNA örnekleri alikotlanarak, yoğunlukları 1,6-2.0 ng/µl olacak şekilde miliQ (18MΩ) su kullanılarak seyreltildi.

#### 3.2.2.1.2. DNA Yoğunluklarının Qubit® 3.11 Florometre İle Ölçümü

Seyreltilmiş DNA örnekleri kalibrasyon için özgün kit (*Qubit dsDNA HS Assay Kit*) ile ölçüldü. Kitin içeriğinde bulunan farklı iki standart örnek ölçümler için kullanıldı. Standart örneklerin her biri için 199 µl *Qubit® dsDNA HS Buffer* ile 1 µl *Qubit® dsDNA HS Reagent* kullanılarak çalışma solüsyonu hazırlandı. Ardından 10 µl standart örnek ile 190 µl çalışma solüsyonu karıştırılıp 2 dakika oda sıcaklığında inkübe edildikten sonra *Qubit® 3.11 Florometre*'de ölçüldü. Daha sonra aynı şekilde hazırlanan çalışma solüsyonu kullanılarak her örnek için ayrı miks hazırlanıp (198 µl çalışma solusyonu ile 2 µl seyreltilmiş DNA örneği) oda sıcaklığında iki dakikalık inkübasyon ardından ölçüldü. Örneklerin DNA yoğunlukları hedef aralığa (1,6-2 ng/µl) ulaşıncaya kadar gerekli seyreltme ya da deriştirme işlemleri yapıldı.

### 3.2.2.2. YND Uygulamaları

#### 3.2.2.2.1. YND Paneli için Hedef Bölgelerin Seçilmesi ve Özgün Primer Tasarımı

PH ile ilişkili genler için, OMIM (*Online Mendelian Inheritance in Man*) ve HGMD (*Biobase Professional*) veri tabanları genler ve mutasyonları açısından tarandı. Kullanılan YND platformuna (*IonTorrent PGM*) uygun olmayan genomik düzeydeki büyük indel mutasyonlar ile tekrar sayısı artışlarına sahip genler ve mutasyonlar elendi. HGMD'den çalışmaya eklenen genlerin her birinin 2015 yılındaki transkripti referans alınarak *IonAmpliSeq Designer* (http://www.ampliseq.com) ile kodlayan bölgeleri, 10 baz çiftlik ekson-intron sınır bölgeleri ve varsa mutasyon tanımlanmış diğer bölgeleri (derin intron, UTR vs.) içeren 242,96 kb'lik alan 884 amplikondan %98,72 kapsamda (coverage) iki primer havuzundan oluşan bir YND paneli oluşturuldu.

Kliniğimize yönlendirilen nörodejeneratif hastalık gruplarını ( PH, Alzheimer hastalığı ve Subkortikal Enfarkt ve Lökoensefalopati ile giden Otozomal Dominant Serebral Arteriyopati (CADASIL)) içermesinden ötürü ''Demans paneli'' olarak adlandırılan YND panelinde bulunan genlerin listesi aşağıdaki ekte (Tablo 3.1) yer almaktadır.

**Tablo 3-1: YND panelinde bulunan gen listesi**

| GEN | REFSEQ | GEN | REFSEQ | GEN | REFSEQ |
|---|---|---|---|---|---|
| *ADAM10* | NM_001110.2 | *FBXO7* | NM_012179.3 | *PLA2G6* | NM_003560.2 |
| *APOE* | NM_000041.2 | *GAK* | NM_005255.2 | *POLG* | NM_002693.2 |
| *APP* | NM_000484.3 | *GBA* | NM_001005741.2 | *PRKRA* | NM_003690.4 |
| *ATP13A2* | NM_022089.2 | *GCH1* | NM_000161.2 | *PSEN1* | NM_000021.3 |
| *ATP1A3* | NM_152296.3 | *GIGYF2* | NM_001103146.1 | *PSEN2* | NM_000447.2 |
| *C10orf2* | NM_021830.4 | *GRN* | NM_002087.2 | *SLC6A3* | NM_001044.4 |
| *CALHM1* | NM_001001412.3 | *HTRA2* | NM_013247.4 | *SMPD1* | NM_000543.4 |
| *CLU* | NM_001831.2 | *LRRK2* | NM_198578.3 | *SNCA* | NM_000345.3 |
| *CP* | NM_000096.3 | *MAPT* | NM_005910.5 | *SORL1* | NM_003105.5 |
| *DCTN1* | NM_004082.4 | *NOTCH3* | NM_000435.2 | *SYNJ1* | NM_003895.3 |
| *DNAJC13* | NM_015268.3 | *NPC1* | NM_000271.4 | *TH* | NM_199292.2 |
| *DNAJC6* | NM_001256864.1 | *PARK2* | NM_004562.2 | *TREM2* | NM_018965.2 |
| *EEF1D* | NM_032378.4 | *PARK7* | NM_007262.4 | *UCHL1* | NM_004181.4 |
| *EIF4G1* | NM_198241.2 | *PINK1* | NM_032409.2 | *VPS35* | NM_018206.4 |

#### 3.2.2.2.2. Hedef Bölgelerin Hot Spot Dosyalarının Oluşturulması

Biyoinformatik analizlerde kullanılmak amacıyla, tasarlanan YND panelindeki bölgelerde bilinen bütün varyasyon içeren bilgiler, oluşturulan amplikonlar için hg19/GRCh37 referans alınarak başlangıç ve bitiş koordinatlarına göre ENSEMBL (http://grch37.ensembl.org/) veri tabanından indirildi. İndirilen bilgiler bir excel dosyasında her varyasyona özgü olarak; bulunduğu kromozom, başlangıç ve bitiş koordinatı, ismi, referans ve değişime uğramış allel bilgilerini kapsayacak şekilde tanımlandı. Bunun yanında *HGMD Professional 2015.4* sürümü üzerinden ilişkili bölgeler için mutasyon bilgileri kontrol edilip, ENSEMBL içerisinden alınan koordinatlara eklendi. Bütün bu bilgilerle oluşturulan excel dosyası, BED dosyası formatına çevrilip *Torrentserver* ve *IonReporter* yazılımlarındaki ilgili analiz akış şemasına eklendi.

#### 3.2.2.2.3. YND için kütüphane Hazırlanması

Kütüphane hazırlanması firma protokollerine uygun olacak şekilde, *IonAmpliseq Library Kit 2.0* (*Life Technologies*) kullanılarak yapıldı. Hazırlanan kütüphane ürünleri, *IonXpress Barcode Adapters Kit* (*Life Technologies*) ile barkodlanıp, *Agentcourt AMPure XP reagent* ve % 70'lik etanol kullanılarak saflaştırıldı. Ardından *Ion Library Quantitation Kit* kullanılarak qPCR yöntemi ile normalizasyon için miktar tayini yapıldı.

### 3.2.2.2.3.1. Hedeflenen DNA Bölgelerinin Çoğaltılması

Hedeflenen DNA bölgelerinin çoğaltılması için toplam 884 primer çifti içeren (havuz I: 448 primer çifti; havuz II: 436 primer çifti) iki adet primer havuzu kullanıldı. Örneklerin herbiri için iki farklı primer havuzu kullanılıp (Tablo 3.2) iki farklı karışım hazırlandı.

**Tablo 3-2: 2X primer havuzu için hazırlanan karışım**

| Malzeme | Miktar |
|---|---|
| 5X Ion Ampliseq HiFi karışımı | 4 µl |
| 2X Ion Ampliseq primer havuzu | 10 µl |
| Total hacim | 14 µl |

PZR için; hazırlanan iki farklı karışım kullanılarak her bir örnek başına (Tablo 3.3) gösterilen şekilde iki farklı solüsyon oluşturuldu.

**Tablo 3-3: PZR solüsyonları**

| Malzeme | Miktar |
|---|---|
| 2X Primer havuzu için hazırlanan karışım | 14 µl |
| Seyreltilmiş DNA örneği | 6 µl |
| Total hacim | 20 µl |

Hazırlanan PZR solüsyonu, Tablo 3.4'de gösterilen program kullanılarak termal döngü cihazında hedef bölgelerin çoğaltılması için kullanıldı.

**Tablo 3-4: Hedef bölgelerin çoğaltılmasında kullanılan termal döngü programı**

| Evre | Basamak | Sıcaklık | Süre |
|---|---|---|---|
| Bekleme | Enzim aktivasyonu | 99 °C | 2 dk |
| Döngü (x16) | Denatürasyon | 99 °C | 15 sn |
| | Bağlanma ve uzama | 60 °C | 4 dk |
| Bekleme | - | 10 °C | ∞ |

### 3.2.2.2.3.2. Primer Dizilerinin Kısmi Olarak Kesilmesi (Fupa)

Primer dizilerinin kısmi olarak kesilmesi için, her bir DNA örneğinin iki farklı primer havuzu ile çoğaltılmış PZR ürünleri, her birinden 10'ar µl alınarak, toplam hacim 20 µl olacak şekilde birleştirildi. Birleştirilmiş ürünlere 2 µl *FuPa Reagent* eklenerek, Tablo 3.5'de gösterilen programda termal döngü cihazına kondu.

**Tablo 3-5: Primer dizilerinin kesimi için kullanılan termal döngü programı**

| **Sıcaklık** | **Süre** |
|---|---|
| 50 °C | 10 dk |
| 55 °C | 10 dk |
| 60 °C | 20 dk |
| 10 °C | Bekleme (1 saate kadar) |

Bu işlemin ardından barkod ve adaptor ekleme aşamasına geçildi. Her bir barkod için Tablo 3.6'da belirtilen oranda ( 1:4 ) seyreltilme yapıldı.

**Tablo 3-6: Barkod adaptör karışımı**

| **İçerik** | **Hacim** |
|---|---|
| Ion P1 Adapter | 2 µl |
| IonXpress™Barcode X | 2 µl |
| Nükleazdan arındırılmış su | 4 µl |
| **Toplam hacim** | **8 µl** |

Primer dizilerinin kısmi kesiminden sonra elde edilen ürün, örnek başına, Tablo 3.7'de yer alan diğer kimyasallarla karıştırılarak, barkod-adaptörlerin ligasyonu için kullanılan Tablo 3.8'deki programda termal döngü cihazına kondu.

İşlem sonrasında karışımlarda çoğaltılmamış DNA materyalinin ve kullanılmayan enzimlerin uzaklaştırılması amacıyla saflaştırılması aşamasına geçildi.

**Tablo 3-7: Barkod adaptör ligasyon solüsyonu**

| **Malzeme** | **Hacim** |
|---|---|
| Switch solusyonu | 4 µl |

| | |
|---|---|
| Barkod-Adaptör karışımı | 2 µl |
| DNA ligaz | 2 µl |
| Primer dizileri kısmı olarak kesilmiş ürün | 22 µl |
| **Toplam Hacim** | **30 µl** |

**Tablo 3-8: Ligasyon için kullanılan termal döngü programı**

| **Sıcaklık** | **Süre** |
|---|---|
| 22 °C | 30 dk |
| 68°C | 5dk |
| 72°C | 5dk |
| 10 °C | Bekleme (24 saate kadar) |

### 3.2.2.2.3.3. Barkodlanan Ürünlerin Saflaştırılması

Her bir örneğe, toplam örnek hacminin yaklaşık 1.5 katı (~45 µl) *Agencourt®AMPure® XP Reagent* eklenip pipetaj yapıldı ve ardından 5 dk oda sıcaklığına bekletildi. Sonra örnekleri içeren plak (plate) manyetik bir rafa (DynaMag™ -96 Side Magnet (Cat.no.12331D) alınarak solusyon berraklaşıncaya kadar (~2 dk) oda sıcaklığında inkübe edildi. İnkübasyon aşamasından sonra pellete zarar vermeden supernatant fazı uzaklaştırıldı. Ardından her bir örneğe 150 µl taze hazırlanmış % 70'lik etanol eklendi. Plak, manyetik raf üzerinde her iki yana hareket ettirilerek, barkodlanmış amplikonların bağlı olduğu manyetik boncukların etanol ile yıkanması sağlandı ve supernatant uzaklaştırıldı. Bu işlem ikinci kez tekrarlandıktan sonra alkolün tamamen ortamdan uzaklaştığından emin olmak için 5 dk oda sıcaklığında inkübe edilip kütüphane ürünlerinin normalizasyon aşaması işlemine geçildi.

### 3.2.2.2.3.4 Saflaştırılan Kütüphane Ürünlerinin Normalizasyonu

Kütüphane, normalizasyon için yeterli materyal elde etme amacıyla Platinum™ PCR SuperMix ve Library Amplification Primer Mix ile amplifiye edildi. Bu işlem için, manyetik boncuklara bağlı kütüphane ürünleri mıknatıs ile alındı. 50 µL Platinum ™ PCR Super Mix HiFi ve 2 µL Library Amplification Primer Mix'i her ürüne gelecek şekilde karışım yapıldı. Yapışkan film ile kapatılan plak, manyetik rafa yerleştirilerek en az 2 dakika oda ısısında beklenildi. 50 µl süpernant her kuyucuktan çekilerek yeni plaktaki boş kuyucuğa aktarıldı. Yeni plaktaki ürünler termal döngü cihazında Tablo 3.9'da bulunan programda çoğaltıldı.

**Tablo 3-9: Saflaştırılıran kütüphane ürünlerinin normalizasyonu için kullanılan PZR programı**

| Aşama | Isı | Zaman |
|---|---|---|
| Bekleme | 98°C | 2 dakika |
| Döngü(x5) | 98°C | 15 saniye |
| | 64°C | 1 dakika |
| Bekleme | 10°C | Bekleme |

Bu işlemin ardından ürünlere Agencourt ™ AMPure ™ XP Kit ile iki aşamalı saflaştırma işlemi yapıldı. İlk aşamada yüksek molekül ağırlıklı DNA boncuklara bağlandığı, amplikonların ve primerlerin solüsyon halinde kaldığı aşamadan oluşur. Bu sebeple, plaktaki örnek hacminin 0,5X katı kadar *Agencourt ™ AMPure ™ XP* reaktifi (25 µL) her bir kuyuya eklendi. DNA ile boncuk süspansiyonunun iyice karışması için pipetaj yapıldı. Karışım 5 dakika oda ısısında inkübe edildikten sonra manyetik rafa alınıp 5 dakika süresince solüsyonun berraklaşması beklendi. Ardından her bir kuyucukta bulunan ürün, boncuk pellete zarar vermeden çekilerek yeni kuyucuklara aktarıldı. Bu aşamada boncuklara bağlanan amplikonlar pelletten ayrıştırılır. Bu ayrışma aşaması için Agencourt ™ AMPure ™ XP reaktifinden orijinal örnek hacminin 1.2X miktarı (60 µL) eklendi. Boncuk süspansiyonunu DNA ile iyice karıştırmak için birkaç kez pipetaj yapıldı. Boncuklarla tamamen bağlanması için 5 dakika oda ısısında inkübasyona bırakıldı. Ardından plak manyetik rafa aktarıldı. Burada 3 dakika kuyucuklardaki sıvı berraklaşana kadar beklendi, geriye kalan süpernatant çekilerek kuyudan uzaklaştırılıp atıldı.

Boncukların yıkanması için 150 µL yeni hazırlanmış %70'lik alkol her bir kuyucuğa dağıtıldı. Plak, manyetik raf üzerinde her iki yana hareket ettirilerek, barkodlanmış amplikonların bağlı olduğu manyetik boncukların etanol ile yıkanması sağlandı ve supernatant uzaklaştırıldı. Bu işlemin iki tekrarı ardından karışımdaki alkolün tamamen ortamdan uzaklaştığından emin olmak için 5 dk oda sıcaklığında inkübasyon yapıldı.

Magnetik boncuklara bağlanmış amplikonların ayrıştırılarak çözünmesi için, her bir kuyucuğa 50 µl *low TE* (Tris-EDTA) ilave edildi. *Low TE* eklenmiş örnekleri içeren plak, manyetik rafa yerleştirildi ve manyetik boncukların kuyucukların kenarlarına tam olarak yapışması için oda sıcaklığında 2 dk bekletildi.

#### 3.2.2.2.3.5. Kantitasyon Için Dilusyon Faktörü Hesaplanması Ve Ölçümü

199 ml Qubit™ dsDNA HS Buffer ve 1 ml Qubit™ dsDNA HS reagent karıştırılarak working solüsyonu hazırlandı. 10 ml amplifiye edilmiş kütüphane üzerine 190 ml bu karışım eklendi. İki dakika oda ısısında inkübasyona bırakıldı. Bu sırada Qubit™ standard 1 ve 2 nin üzerine (10'ar ml'lik) 190 ml working solusyonu eklenir. Bu standartlar Qubit™ 3.0 Fluorometer cihazına tanıtıldıktan sonra inkübe edilmiş ürünler cihazda ölçüldü.

Elde edilen konsantrasyon 24 ng/ml ye bölünerek dilusyon faktörü hesaplandı. Sabit olarak belirlenen 10µl ürün üzerine dilusyon faktörüne göre belirlenen miktarda TE eklendi. Ardından, kütüphane ürünleri ~100 pM yoğunluğa eşitlenerek normalizasyon gerçekleştirildi ve her birinden 10 µl alınarak emülsiyon PZR'de kullanılmak üzere stok kütüphane ürünleri hazırlandı.

#### 3.2.2.2.4. Taslak (*Template*) Hazırlanması

Taslak hazırlama aşaması emPZR ve zengileştirme aşamasını içeren taslak hazırlama aşamasında Ion PGM™ HiQ™ View OT2 Kit kullanıldı.

#### 3.2.2.2.5. EmPZR

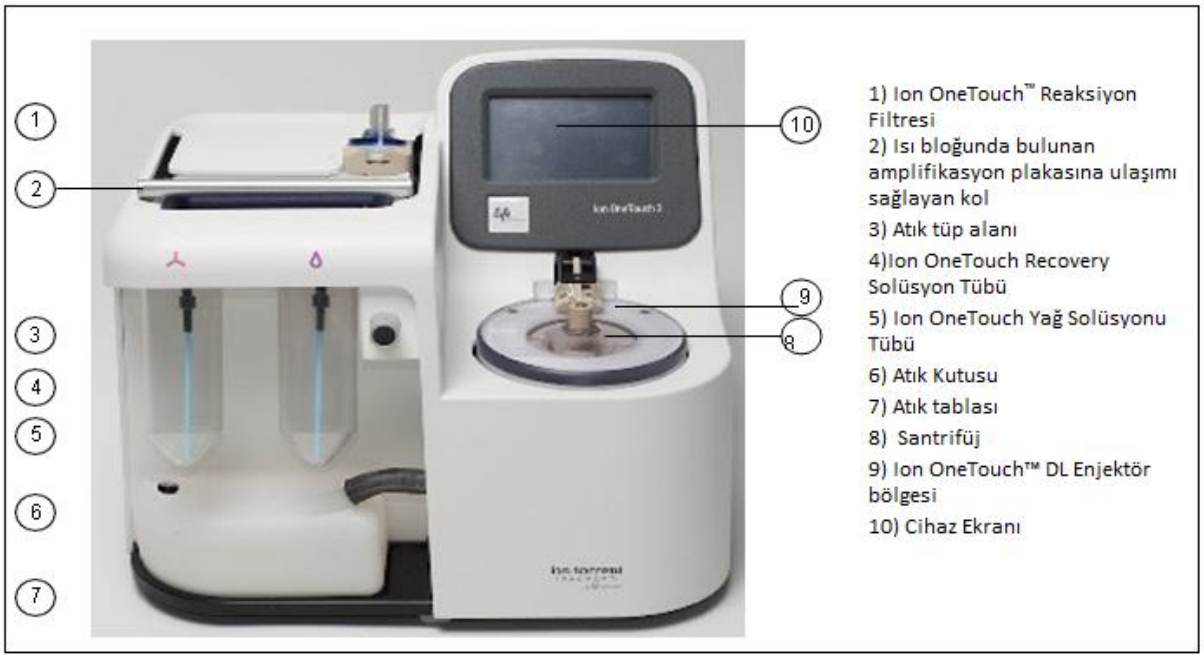
Stok kütüphane ürünlerinin 12 pM'a seyreltilmesi için, öncelikle her üründen 2 µl alınıp nükleazdan arındırılmış su ile 25 µl'ye tamamlanarak dilue kütüphane ürünü yapıldı. Ardından emPZR için Tablo 3.10'da gösterilen amplifikasyon çözeltisi yapıldı.

**Tablo 3-10: Amplifikasyon Çözeltisi**

| | |
|---|---|
| Nükleazdan arındılırmış su | 25 µL |
| Ion PGM™ Hi-Q™ View Enzim Karışımı | 50 µL |
| Dilue kütüphane ürünü | 25 µL |
| Ion PGM™ Hi-Q™ View ISP | 100 µL |
| **Total** | **1000 µL** |

Hazırlanan amplifikasyon çözeltisi vorteks ile karıştırıldıktan sonra, tüm karışım reaksiyon filtresine (*Ion PGM OneTouch Plus Reaction Filter*) yüklendi. Ardından 2 kez 850 µl reaksiyon yağı filtreye ilave edildi. İşlem bittikten sonra ürünlerin toplanacağı 2 tüp (recovery tubes) cihaza yerleştirilmeden önce 150 µl Ion OneTouch

Breaking Solution eklenip cihaza yerleştirildi. Kullanılan kite uygun programda, Şekil 3.1'deki*Ion OneTouch 2* cihazında emPZR yapıldı.




**Şekil 3-1: Ion OneTouch 2 cihazı ve parçaları**

EmPZR sonrası yaklaşık 10 dakikalık santrifüj yapılıp amplikon yüklü partiküllerin dibe çökmesi sağlandı. Her iki tüpte 100 µl ürün bırakılıp, supernatant kısmı uzaklaştırıldı. Tüplerin üstlerine 500 µl Ion OneTouch Yıkama Solüsyonu eklenip pipetaj yapılmasının ardından ürünler 1.5 ml'lik yeni bir ependorf tüpünde birleştirildi. Ependorf tüpü 2.5 dakika santrifüj edilip renkli amplikon yüklü partiküllerin bulunduğu pellete zarar vermeden 100 µl kalacak şekilde supernatant uzaklaştırıldı.

### 3.2.2.2.6. EmPZR Ürünlerinin Zenginleştirilmesi

#### 3.2.2.2.6.1. Melt-Off Çözeltisinin Hazırlanması

*Melt-Off* çözeltisi için *Tween® Solution* ve NaOH kullanıldı. Final yoğunluklar; % 0.1*Tween® 20 deterjan* ve 125 mM NaOH olacak şekilde, 280 µl *Tween®* çözeltisi ve 40 µl 1 M NaOH kullanılarak 320 µl hazırlandı.

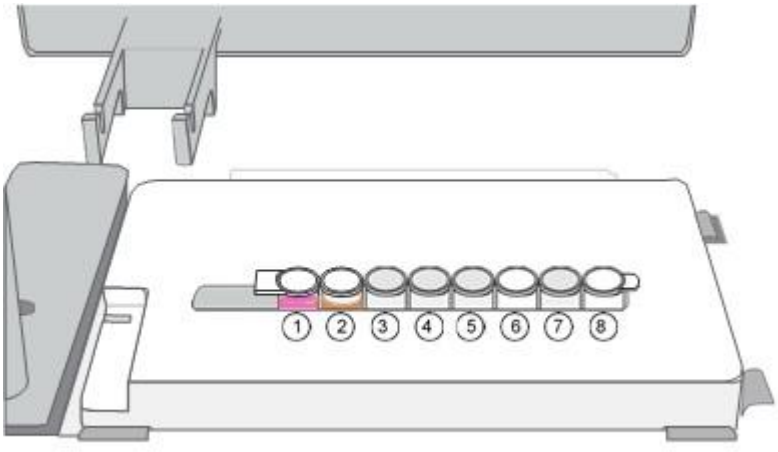
### 3.2.2.2.6.2. Streptavidin C1 Boncuklarının Yıkanması

*DynaBeads® MyOne™ Streptavidin C1 Beads* pipetaj yapılarak iyice karıştırıldı ve bu karışımdan 13 µl alınıp 1.5 ml'lik ependorf tüpüne aktarıldı. Ependorf, manyetik rafa (*DynaMag™-2 Magnet*) alınarak oda sıcaklığında 2 dakika bekletilerek boncukların ependorf duvarına yapışması sağlandı. Oluşan supernatant karışımdan uzaklaştırıldı. 130 µl *MyOne™BeadsWash Solution* eklenerek ependorf manyetik raftan alındı ve pipetaj yapıldı. Böylece streptavidin C1 boncukları çözeltiden uzaklaştırıldı.

Hazırlanan çözeltiler ve emPZR ürünü, Tablo 3.11'de gösterilen sırada 8 kuyulu levhaya (Şekil 3.3) yüklendi.

**Tablo 3-11: Kuyulara yüklenen çözelti ve emPZR ürünleri**

| Kuyu Numarası | Yüklenen malzeme |
|---|---|
| 1 numaralı Kuyu | emPZR ürünü (100 µl) |
| 2 numaralı Kuyu | DynaBeads® MyOne™ Streptavidin C1 Beads (130 µl) |
| 3 numaralı Kuyu | Ion OneTouch™ Wash Solution (300 µl) |
| 4 numaralı Kuyu | Ion OneTouch™ Wash Solution (300 µl) |
| 5 numaralı Kuyu | Ion OneTouch™ Wash Solution (300 µl) |
| 6 numaralı Kuyu | Boş |
| 7 numaralı Kuyu | Taze hazırlanmış melt-off çözeltisi (300 µl) |
| 8 numaralı Kuyu | Boş |




**Şekil 3-2: 8 Kuyulu Levha**

Zenginleştirme işlemi için *IonOneTouch™ ES* cihazına yerleştirildi. Zenginleştirme sonrası oluşacak ürünün aktarılacağı 0.2 ml ependorf tüpüne 10 µl nötralizasyon çözeltisi konulmasının ardından işlem başlatıldı.

### 3.2.2.2.7. Zenginleştirilmiş Ürünlerin Dizilenmesi

Zenginleştirilmiş ürünlerin dizilenmesinde Ion PGM™ Hi‑Q™ View Sequencing Kiti kullanıldı. Firma protokollerine uygun şekilde Ion PGM™ dizileme cihazı, klorid tablet ve 18 MΩ su ile yıkanmasının ardından, pH kalibrasyonları yapıldı ve zenginleştirilmiş ürünler çipe (*Ion 318™ Chip v2*) yüklendi. Tablo 3.12'de belirtildiği şekilde dizileme planı oluşturuldu ve ardından dizileme işlemi başlatıldı.

**Tablo 3-12: Dizileme planı**

| | |
|---|---|
| **Ion Reporter** | Version: 5.6 |
| **Örnek** | DNA |
| **Hedef Tekniği** | AmpliSeq DNA |
| **Ion reporter iş akışı** | DEMANS |
| **Kütüphane hazırlanmasında kullanılan kit** | Ion AmpliSeq 2.0 Library Kit |
| **Kütüphane anahtarı** | Ion TCAG (TCAG) |
| **Template Kiti** | Ion PGM™ Hi‑Q™ View OT2 |
| **Dizileme Kiti** | Ion PGM™ Hi‑Q™ View Sequencing Kit |
| **Akış sayısı** | 850 |
| **Çip Tipi** | Ion 318™ Chip V2 |
| **3' Adaptör:** | Ion P1B<br>(ATCACCGACTGCCCATAGAGAGGCTGAGAC) |
| **Barkod** | IonXpress |
| **Boncuk yükleme (%)** | 10 |
| **Anahtar Sinyal (1-100)** | 30 |
| **Kullanılabilir dizi (%)** | 30 |
| **Referans Kütüphane** | Hg 19 (Homo sapiens) |
| **Hedef Bölgeler** | IAD82119_197_ Designed |
| **Hotspot Bölgeler** | ALZ_PARK_CAD_HOTSPOTS_v2 |
| **Eklentiler** | CoverageAnalysis<br>FileExporter<br>RunTransfer<br>variantCaller (germline_low_stringency) |
| **Proje** | ALZ_PARK_CAD_Panel |

#### 3.2.2.2.8. Veri Analizi

Dizileme ardından *Torrent server* yazılımına iletilen verilere ait BAM dosyaları, analiz edilmek üzere *IonReporter* yazılımına aktarıldı. *IonReporter'*da hedef bölgeler ile önceden hazırlanmış *hotspot* bölgeleri içeren BED dosyayı eklenip parametre ayarları düzenlenerek analiz akış şeması hazırlandı. Bu analiz şeması ile analiz edilen her olguda bulunan değişimlerden; referans ile aynı (NoREF), okuması yapılamamış (NoCall) ve nadir allel frekansları (MAF) >0.02 olanları filtrelendi. Filtrelemenin ardından kalan değişimler hotspot dosyası verilerine göre tekrar değerlendirildi. Hotspot dosyasında tanımlı olmayan değişimler, yer aldıkları bölge, çerçeve kayması veya dur kodonu oluşturması ve aminoasit değiştirmesi özelliklerine göre sınıflandırılıp *in silico* olarak olası patolojik etkileri *MutationTaster (http://www.mutationtaster.org/), Prediction of functional effects of human nsSNPs* (*http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/*), *Scale-in variant feature transform* (*http://sift.jcvi.org/*), Protein Variation Effect Analyzer (*http://provean.jcvi.org*) ve Exome Aggregation Consortium (*http://exac.broadinstitute.org/*) veritabanlarında kontrol edildi. Beraberinde filtre işleminden geçen tüm varyantlar platforma özgün olası okuma hataları varlığına karşı IGV dosyalarıyla incelendi. Son olarak saptanan varyantların çalışma grubunda kaç olguda gözüktüğü bilgisi değerlendirmelere dahil edildi.

#### 3.2.2.2.9. Saptanan Değişimlerin Sanger Dizileme İle Doğrulanması

##### 3.2.2.2.9.1. Primer Tasarlanması

Saptanan değişimler için, saptandığı veya yakın olduğu eksonun tümünü kapsayacak, dbSNP veritabanında tanımlı bir SNP veya tekrarlayan dizi içermeyen, 18-24 baz boyutlarında, ileri-geri primerlerinin bağlanma ısıları birbirlerine yakın (en fazla +/- 2-5˚C fark), içeriğindeki nükleotidlerin eşit miktarlarda olan özgün primerler tasarlandı. Tasarlanan primerler *UCSC Genome Bioinformatics* (https://genome.ucsc.edu/index.html)' den "*in silico* PZR" sistemi ile test edildi.

##### 3.2.2.2.9.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu

Tasarlanan her primer çiftine özgü bir protokol hazırlanarak PZR işlemi gerçekleştirildi. Her bir PZR reaksiyonu için 1X tampon solüsyonu (10X $(NH4)_2SO_4$) (Biomatik), 25 mM $MgCl_2$ (Biomatik), %0-10 DMSO (Biomatik Corporation), 200 µM dNTP (Thermo Scientific), 0,1µM - 0,5µM ileri ve geri primerler ve 0.5 U Taq polimeraz enzimi (Biomatik) ve 200 ng gDNA kullanıldı. Karışım, bidistile su ($dH_20$)

ile 25 µl'ye tamamlanarak hazırlandı. Tüm çalışmalar buz üzerinde gerçekleştirildi. Her PZR çalışmasında amplifiye edilen her bir bölge DNA içermeyen kontrol PZR (negatif kontrol)'ı ile birlikte çalışıldı.

PZR işlemleri termal döngü cihazında (MJ Research PTC-200 ve DNA Engine-BIORAD-T100) tasarlanan protokole uygun program yapıldı (94°C de 10 dk'lık ilk denatürasyon, takiben 30-40 döngülük 94°C de 30 sn denatürasyon, primerlerin Tm 'e göre değişen 64°C den 52°C ye kadar ve 30 sn bağlanma ve 72°C de 45-90 sn (1 kb / 1 dk) uzama aşaması ve son olarak 72°C de 10 dklık uzama süresi). PZR sonrasında amplifikasyon ürünlerinden 5 µl alınarak, 50 bp'lik merdiven markörü (Sigma) ile birlikte 8 µg/ml etidyum bromür içeren %1.2'lik agaroz (Sigma) jelde, 1X TBE tamponunda, 130 V da, 20 - 25 dk yürütüldü. Ultraviyole ışık altında elde edilen bantlar görüntülendi ve kayıt edildi.

Jelde amplifikasyonu saptanan ürünlere enzimatik PZR saflaştırması (Exonuclease-I (Lot:00173016-Thermo Scientific) ve Rapid Alkaline Fosfataz (04898133001-Roche) kullanılarak) yapıldı. Saflaştırılma aşamasından sonra ürünler dizi PZR reaksiyonuna kadar 4°C'de karanlıkta saklandı.

**3.2.2.2.9.3. Dizi PZR Reaksiyonu**

Saflaştırılmış PZR ürünleri ile dizi PZR reaksiyonu termal döngü (MJ Research PTC-200 ve DNA Engine-BIORAD-T100) cihazında yapıldı. Çalışmaların tümü buz üzerinde gerçekleştirildi.

Her bir dizi PZR reaksiyonu için PZR için gerekli kimyasalları içeren 5X tampon solüsyonu BigDye buffer, içeriğinde ddNTP ve AmpliTaq DNA polimeraz içeren BigDye v3.1, dizileme için seçilen PZR primeri, saflaştırılmış PZR ürünü ve $dH_2O$ ilavesiyle son hacmi 10µl olacak ürün-PZR karışımları plak (plate - USA Scientific-800-522-8477) üzerinde kendine özel ayrılan bir kuyucuğa yerleştirilir. Plak termal döngü (MJ Research PTC-200 ve DNA Engine-BIORAD-T100) cihazında özgün program ile işleme tabi tutuldu (25 döngüde; 96°C de 10 sn ile denatürasyon, 50°C de 5 sn ile bağlanma ve 60°C de 4 dk ile sonlanma). 4°C ye gelen cihazdan dizi reaksiyon ürünleri alındı.

Dizi PZR'ı ardından ürünlerin karışımda bulunan diğer ürünlerden temizlenmesi için plak içerisindeki kuyucuklarına, ürün başına 1 µl 125 mM EDTA, 1 µl 3M sodyum

asetat ve 25 µl %100 etanol eklendi. Plak koruyucu bantla kapatılarak oda ısısında 15 dak. beklendi ve ve ardından 3810 rpm'de 45 dak. santrifüj yapıldı. Plak üzerindeki koruyucu yapışkan bant açılarak kuyucuk ağızları üste gelecek biçimde çevrildi ve 1100 rpm'de 30 sn. kısa santrifüj yapıldı. Her bir kuyucuğa 35 µl %70'lik etanol eklendi. Plak koruyucu yapışkan bant ile kapatıldı ve 3460 rpm'de 15 dak. santrifüj edildi. Plak üzerindeki koruyucu yapışkan bant açılarak hızlı vakum konsantratöründe (SpeedVac Concentrator/Thermo Scientific SAVANT DNA 120) yaklaşık 40 dakika eklenerek alkol uzaklaştırılması yapıldı. Süre bitip alkolün tamamı uçurulduğunda, her bir kuyucuğa 10 µl injeksiyon buffer'ı ((dH2O ya da HiDi formamid (Highly Deionized formamid)) eklendi. Örnekler 95 °C de 5 dakika denatüre edildi, 2 dakika buz üzerinde bekletildi.

#### 3.2.2.2.9.4. Kapiller Elektroforez Aşaması

Dizi PZR saflaştırma işlemi tamamlanıp buz üzerinde plak içerisindeki özgün kuyucuklarında bekletilen örnekler ABI3500 cihazına yerleştirilerek yürütme işlemine geçildi. Cihaz yürütme işleminde kalibrasyonu yapılmış dizileme boya seti olan Dye set seçildi. Yürütme voltajı: 13,4 kVolts, ön yürütme voltajı: 15 kVolts, injeksiyon voltajı:1,6 kVolts, yürütme süresi:2.520 sn, ön yürütme süresi:180 sn, injeksiyon zamanı:8 sn ve veri gecikmesi (data delay): 250 sn. 'ye ayarları yapılarak ürünler kapiller elektroforez de yürütüldü.

#### 3.2.2.2.9.5. Kapiller Elektroforez Sonuçlarını Ve Değerlendirmeleri

Kapiller Elektroforezi sonucunda alınan piklerin rengine göre değerlendirme yapıldı (Adenin yeşil, Guanin siyah, Timin kırmızı, Sitozin mavi). Pikler ABI Sequencing Analysis v5.4 ve SeqScape v2.7 (ABI) programları kullanılarak bilgisayar ortamında analiz edildi. Analiz sonuçları değerlendirilmesinde USCS (https://genome.ucsc.edu/index.html), ve Ensembl (http://www.ensembl.org/index.html) başta olmak üzere çeşitli web sitelerinden faydalanıldı.

Analiz işlemi için SeqScape v2.7 programına bu sitelerden alınan referans diziler yüklenilip, bu dizilere ait transkriptlerin ekson ve intron bölgeleri programa tanıtıldı. Her bir dizi için alınan FASTA formatları tanıtılan referans diziler eşliğinde analiz edildi. Analiz sırasında hedef dizinin yeri, dizilendiği primerin yönü, saflaştırma kalitesi, dizilenmiş baz uzunluğu, analize giren piklerin kalitesi ve yüksekliği ile arka alan gürültüsü öncelikle değerlendirildi. Herhangi bir sorun varlığında dizileme işlemi

sorun kaynağının yaşandığı aşama öncesinden tekrar dizileme işlemine alındı. Sorunu olmayan diziler veri tabanları eşliğinde değerlendirildi.

### 3.2.2.3. MLPA

Çalışmada PH için özgün ticari SALSA MLPA Parkinson kiti ile gelen prob karışımı (P051-B1 / P052-C1) kullanıldı (MRC-Holland). Kit içerisinde bulunan genler ve ekzon bölgeleri Tablo 3.13 ve 3.14'de gösterilmektedir.

**Tablo 3-13: MLPA gen ve ekzon bilgileri**

| Length (nt) | SALSA MLPA probe | Chromosomal location | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | reference | 1p36 | PARK2 | SNCA | 12q12 |
| 64-70-76-82 | Q-fragments: DNA quantity; only visible with less than 100 ng sample DNA | | | | | |
| 88-92-96 | D-fragments: Low signal of 88 or 96 nt fragment indicates incomplete denaturation | | | | | |
| 100 | X-fragment: Specific for the X chromosome | | | | | |
| 105 | Y-fragment: Specific for the Y chromosome | | | | | |
| 130 | Reference probe 00797-L00463 | 5q31 | | | | |
| 136 ± | **PINK1** probe 03695-L03590 | | **Exon 5** | | | |
| 142 | **PINK1** probe 03691-L03106 | | **Exon 1** | | | |
| 151 § ¥ | **SNCA** probe 02166-L24877 **mutation-specific** | | | | **Exon 3** | |
| 157 | **SNCA** probe 02168-L01665 | | | | **Exon 5** | |
| 166 | **PINK1** probe 03692-L03107 | | **Exon 2** | | | |
| 172 | **ATP13A2** probe 11715-L12486 | | **Exon 9** | | | |
| 178 | **SNCA** probe 02169-L13410 | | | | **Exon 7** | |
| 184 ¬ | **LPA** probe 04615-L03891 | | | 6q25.3 | | |
| 193 § | **LRRK2** probe 04575-L04006 **mutation-specific** | | | | | **Exon 41** |
| 202 | **PINK1** probe 12067-L12939 | | **Exon 3** | | | |
| 209 ¥ | **ATP13A2** probe 11716-L24879 | | **Exon 2** | | | |
| 214 | Reference probe 07634-L14385 | 10p14 | | | | |
| 221 + ¥ | **PINK1** probe 03694-L24880 | | **Exon 4** | | | |
| 229 | **PINK1** probe 03698-L03154 | | **Exon 7** | | | |
| 237 | **PARK2** probe 02178-L01676 | | | **Exon 6** | | |
| 247 | **SNCA** probe 04616-L03892 | | | | **Exon 4** | |
| 258 ¥ | **PARK2** probe 03203-L24881 | | | **Exon 1** | | |
| 265 | Reference probe 01649-L01226 | 3p25 | | | | |
| 274 | **PARK2** probe 02179-L16298 | | | **Exon 7** | | |
| 283 | **PARK2** probe 02174-L05093 | | | **Exon 2** | | |
| 292 | **PARK2** probe 02180-L05094 | | | **Exon 8** | | |
| 301 | Reference probe 00895-L00483 | 3p22 | | | | |
| 310 | **PARK2** probe 03205-L02566 | | | **Exon 3** | | |
| 319 ¥ | **PARK2** probe 02181-L24882 | | | **Exon 9** | | |
| 328 | **PINK1** probe 14272-L15929 | | **Exon 6** | | | |
| 337 | **PARK2** probe 03363-L02747 | | | **Exon 4** | | |
| 346 | **PARK2** probe 02182-L03127 | | | **Exon 10** | | |
| 355 | Reference probe 05665-L05117 | 8q13 | | | | |
| 366 * ¥ | **PARK2** probe 02177-L24889 | | | **Exon 5** | | |
| 375 ¥ | **PARK2** probe 02183-L24890 | | | **Exon 11** | | |
| 384 ¥ | Reference probe 01850-L24891 | 9q34 | | | | |
| 391 | **PARK2** probe 02184-L01682 | | | **Exon 12** | | |
| 400 ¬ | **TNFRSF9** probe 02185-L01683 | | **Exon 3** | | | |
| 409 | **PARK7** probe 02187-L03592 | | **Exon 3** | | | |
| 418 | Reference probe 08323-L08192 | 2p23 | | | | |
| 427 | **PARK7** probe 03690-L03105 | | **Exon 1b** | | | |
| 436 | **PARK7** probe 02188-L01686 | | **Exon 5** | | | |
| 445 | **SNCA** probe 04096-L03102 | | | | **Exon 2a** | |
| 454 | **PARK7** probe 02189-L02365 | | **Exon 7** | | | |
| 463 | **PINK1** probe 03697-L03153 | | **Exon 8** | | | |
| 479 | **SNCA** probe 03689-L03104 | | | | **Exon 6** | |
| 490 ‡ | Reference probe 09114-L09174 | 1p36 | | | | |

**Tablo 3-14: MLPA gen ve ekzon bilgileri (devam)**

| Length (nt) | SALSA MLPA probe | Chromosomal location | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | reference | GCH1 | PARK2 | UCHL1 | LRRK2 | other |
| 64-70-76-82 | Q-fragments: DNA quantity; only visible with less than 100 ng sample DNA | | | | | | |
| 88-92-96 | D-fragments: Low signal of 88 or 96 nt fragment indicates incomplete denaturation | | | | | | |
| 100 | X-fragment: Specific for the X chromosome | | | | | | |
| 105 | Y-fragment: Specific for the Y chromosome | | | | | | |
| 130 | Reference probe 00797-L00463 | 5q31 | | | | | |
| 136 | **PACRG** probe 03204-L02565 | | | **Exon 1** | | | |
| 142 | **CAV2** probe 03357-L02741 | | | | | | 7q31 |
| 149 | **UCHL1** probe 03680-L03095 | | | | **Exon 4** | | |
| 154 | **PARK2** probe 03366-L02750 | | | **Exon 7** | | | |
| 160 | **UCHL1** probe 03679-L03094 | | | | **Exon 1** | | |
| 166 § | **LRRK2** probe 04574-L04006 **mutation-specific** | | | | | **Exon 41** | |
| 171 | **PARK2** probe 03361-L03999 | | | **Exon 2** | | | |
| 177 | **UCHL1** probe 03681-L03096 | | | | **Exon 5** | | |
| 184 | **LRRK2** probe 06134-L05587 | | | | | **Exon 2** | |
| 193 | Reference probe 01567-L01139 | 22q12 | | | | | |
| 200 | **UCHL1** probe 02937-L05095 | | | | **Exon 9** | | |
| 208 | **GCH1** probe 04405-L03099 | | **Exon 3** | | | | |
| 214 | **PARK2** probe 06135-L07959 | | | **Exon 12** | | | |
| 220 | **LRRK2** probe 04282-L03686 | | | | | **Exon 41** | |
| 226 | **ATP13A2** probe 11717-L12488 | | | | | | 1p36 |
| 232 | **ATP13A2** probe 12581-L13662 | | | | | | 1p36 |
| 238 | **PARK2** probe 03365-L02749 | | | **Exon 6** | | | |
| 247 * | Reference probe 13174-L14493 | 03q29 | | | | | |
| 255 | **GCH1** probe 04618-L03894 | | **Exon 1** | | | | |
| 265 | **PARK2** probe 05654-L05108 | | | **Exon 3** | | | |
| 274 | **LRRK2** probe 04281-L03685 | | | | | **Exon 27** | |
| 283 | **GCH1** probe 04404-L02610 | | **Exon 6b** | | | | |
| 292 | **PARK2** probe 03367-L02751 | | | **Exon 8** | | | |
| 301 | Reference probe 03255-L02692 | 11p13 | | | | | |
| 310 | **GCH1** probe 03683-L03098 | | **Exon 2** | | | | |
| 319 | **GCH1** probe 03685-L03100 | | **Exon 5** | | | | |
| 328 | **LRRK2** probe 04283-L03687 | | | | | **Exon 49** | |
| 336 | **PARK2** probe 02176-L01674 | | | **Exon 4** | | | |
| 346 | **PARK2** probe 03369-L02753 | | | **Exon 10** | | | |
| 355 | Reference probe 04014-L03437 | 2q33 | | | | | |
| 364 | **PARK2** probe 03364-L02748 | | | **Exon 5** | | | |
| 373 | **LRRK2** probe 04278-L03682 | | | | | **Exon 1** | |
| 381 | Reference probe 01136-L00694 | 4q35 | | | | | |
| 391 | **PARK2** probe 04614-L03890 | | | **Exon 11** | | | |
| 400 | **CAV1** probe 03359-L02743 | | | | | | 7q31 |
| 409 | Reference probe 00963-L09340 | 2p16 | | | | | |
| 418 | **PARK2** probe 03368-L02752 | | | **Exon 9** | | | |
| 426 | **LRRK2** probe 04279-L03683 | | | | | **Exon 10** | |
| 436 | Reference probe 02967-L02399 | 7q31 | | | | | |
| 445 | Reference probe 01799-L01362 | 13q14 | | | | | |
| 454 | **SNCA** probe 04092-L03103 | | | | | | 4q22 |
| 463 | **LRRK2** probe 04280-L03684 | | | | | **Exon 15** | |

### 3.2.2.4.1. Denatürasyon ve Hibridizasyon Aşaması

İşlem öncesi DNA örnekleri yoğunlukları 25-30 ng/µl olacak şekilde TE çözeltisi (PH 8.0) içinde seyreltildi. SALSA Prop karışımı ve MLPA tamponu oda ısısında bekletilerek çözülmeleri sağlandı. Protokolde iki farklı prop karışımı

olduğundan her örnek için ilgili prop karışımına özgü ayrı 200 µl'lik etiketlendirilmiş PZR tüpleri hazırlandı. Bu tüplere, her biri için yapılan DNA çözeltisinden 5 µl eklendi ve termal döngü cihazında MLPA için hazırlanmış protokolün ilk aşamasında 98°C' de 5 dakika denatüre edildi. Bu sırada örnek başına 1,5 µl prob ve 1,5 µl Salsa Buffer (%10 pipetajda olası kayıp için eklenerek) içeren master miks hazırlanıp pipetaj yardımıyla karıştılırdı. Her 20 hasta için 3 referans örnek çalışmaya eklendi. Denaturasyon sonrasında Termal döngü cihazında 25°C lik aşamaya geçmiş tüplere, bu master miksden 3 µl eklenerek pipetaj yapıldı. Ardından PZR protokolü bir sonraki aşamaya aktarılarak hibridizasyon aşamasına geçildi.

**3.2.2.4.2. Ligasyon Aşaması**

Bu aşama için her bir örnek başına 3 µl Ligaz Buffer A, 3 µl Ligaz Buffer B, 1 µl Ligaz 65 enzimi ve 27,6 µl $dH_2O$ içeren ligasyon karışımı hazırlandı. Soğuk panelde muhafaza edilen bu ligasyon karışımından 34,6 µl hibridizasyon aşamasının ardından 54°C bekleme ısısına geçen termal döngü cihazında bulunan tüpe pipetaj yapılarak eklendi. Ardından tüpler 54°C 15 dakika bekletilerek PZR reaksiyonu için hazır hale getirildi.

**3.2.2.4.3. MLPA PZR Reaksiyonu**

PZR aşaması için örnek başına 2 µl ilişkili SALSA PZR primeri, 0,5 µl SALSA polimeraz enzimi ve 7,5 µl dH2O olacak şekilde PZR karışımı hazırlandı. Hazırlanan PZR karışımından 10 µl termal döngü cihazında 60°C'de bekleme aşamasında olan tüplere pipetaj yoluyla aktarılıp PZR protokolü bir sonraki aşamaya aktarılarak PZR işlemi başlatıldı.

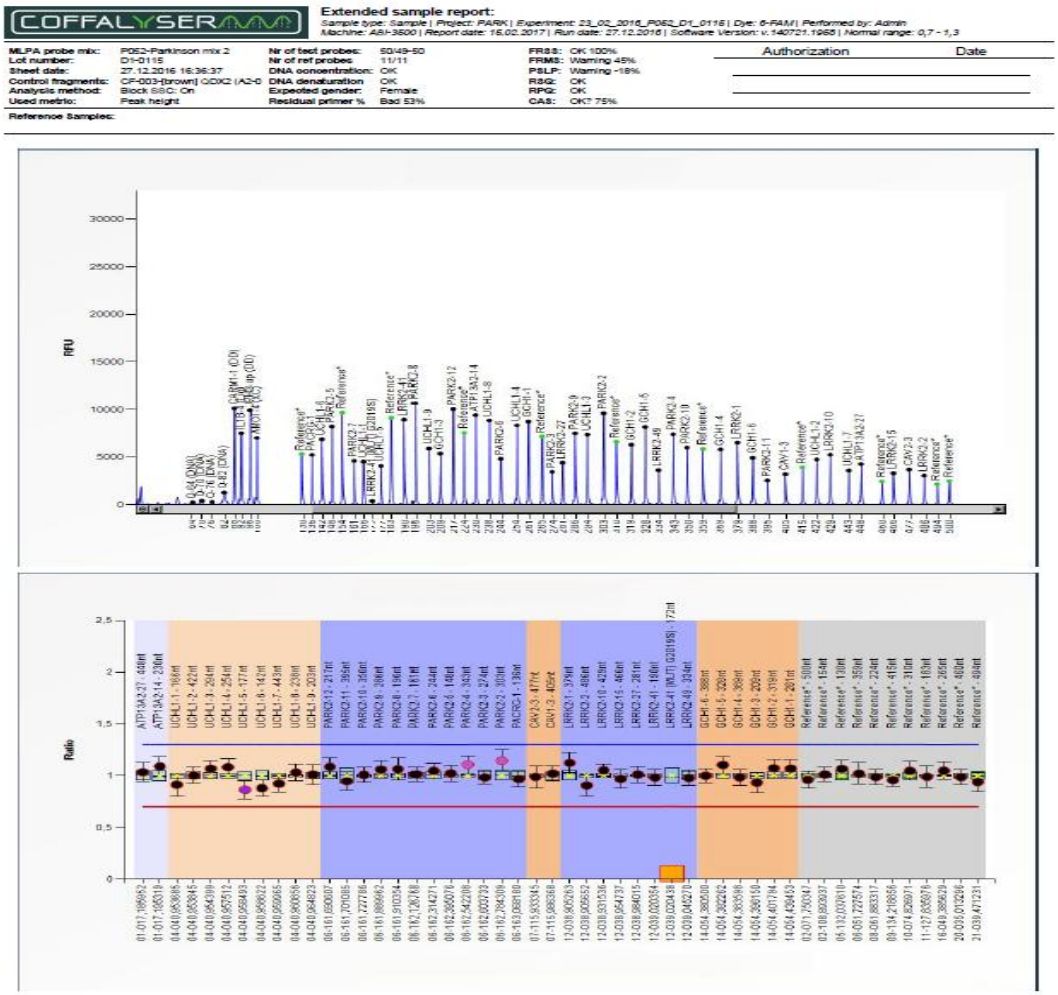
**3.2.2.4.4. Kapiler Elektroforez İle Fragmanların Saptanması**

PZR işlemi ardından termal döngü cihazında 4°C'de bekleyen ürünler -4°C ye alındı. Bu sırada her bir örnek için 0,2 µl LIZ size standard (Liz-500, Lot:0904226, Applied Biosystems) ve 9,5 µl formamid (Highly Deionized - Hidi) içeren yükleme tamponu hazırlandı. ABI3500 cihazı için uygun olan plakta (USA Scientific-800-522-8477) her bir kuyuya 0,3 µl örnek ve 9,7 µl yükleme tamponu eklendi. Plak, kendisine uygun septa (AB Applied Biosystems-182901S9R) ile kapatıldı ve plak santrifüjünde (BIOSAN LMC300) 1200RPM de 2 dakika çevrildi. Santrifüjün ardından kapiller elektroforez cihazında yürütme ayarları düzenlenerek yürütme işlemine geçildi.

Yürütme voltajı; 13,4 kVolts, ön yürütme voltajı; 15 kVolts, injeksiyon voltajı: 1,6 kVolts, yürütme süresi: 2.520 sn, ön yürütme süresi:180 sn, injeksiyon zamanı: 8 sn ve veri gecikmesi süresi (data delay): 250 sn. Kapiller sıcaklığı 60 ˚C. FSA formatındaki ham veri Coffalyser.net (v.131211.0000) kullanılarak değerlendirildi.

### 3.2.2.4.5. Kapiler Elektroforezin Değerlendirilmesi

Cihazdan .fsa formatında elde edilen fragmanlar verisi Coffalyser.Net (v.131211.0000)(MRC-Holland) programına aktarıldı (Şekil 3.3). Programın kite özgü ayarları yapılarak örnekler yüklendi. Değerlendirme aşamasında referans örneklere göre pik şiddeti oranları 0,7 ve altı için delesyon, 1,30 ve üstü için duplikasyon olarak değerlendirildi.




**Şekil 3-3: MLPA çıktısı örneği**

# 4. BULGULAR

Bu çalışmada PH klinik tanılı 63 olgu MLPA ve YND teknikleri kullanılarak ilişkili genler kapsamında değerlendirildi. Bu olguların 48 erken, 2 juvenil ve 13 geç başlangıçlı PH tanısı almışlardı. Olguların 15'inde tanımlı patojenik varyant (%23,8) saptandı ve bu varyantların genlere göre dağılımı Tablo 4.1'de gösterildi. Seride, 15 olguda 4 farklı gende, 12 farklı tanımlanmış patojenik varyant saptandı. Bu mutasyonların 5'i delesyon, biri duplikasyon ve 6'sı ise nokta mutasyonu idi. Serimizde mutasyon saptama oranı MLPA tekniği ile %12,7 (8/63) ve YND ile %11,1 (7/63) idi. Bir olguda *PRKN* geninde biri delesyon diğeri nokta mutasyonu olmak üzere bileşik heterozigotluk gözlendi. Erken, juvenil ve geç başlangıçlı olgular ayrı ayrı değerlendirildiğinde erken başlangıçlı olgulardaki mutasyon oranı %27 (13/48), juvenil başlangıçlı olgularda %50 (1/2) ve geç başlangıçlı olgularda %7,7 (1/13) idi.

**Tablo 4-1: Seride saptanan tanımlanmış mutasyonların saptandığı teknik ve genlere göre dağılımı**

| Tekniklere göre mutasyon saptanma oranları (%) | Mutasyon saptanan Gen | Olgu grubu (n=63) | | | Saptanan mutasyonların genlere göre dağılımı (%) |
|---|---|---|---|---|---|
| | | Juvenil başlangıçlı n=2 | Erken başlangıçlı n=48 | Geç başlangıçlı n=13 | |
| YND n=6 (%40) | *FBXO7* | 1 | 1 | 0 | 2 (%3.2) |
| | *PARK2* | 0 | 4 | 0 | 9 (%14,3) |
| YND + MLPA n=1 (%7) | | 0 | 1 | 0 | |
| MLPA n=8 (%53) | | 0 | 4 | 0 | |
| | *PARK7* | 0 | 1 | 0 | 1 (%1,6) |
| | *SNCA* | 0 | 2 | 1 | 3 (%4,8) |

Hastalık ilişkili tanımlanmış patojenik varyant saptanan 15 olgunun klinik bulguları, bu olgularda gözlenen ancak klinik etkisi bilinmeyen varyantlar ve bunların genlere göre dağılımı Tablo 4.2'de gösterildi.

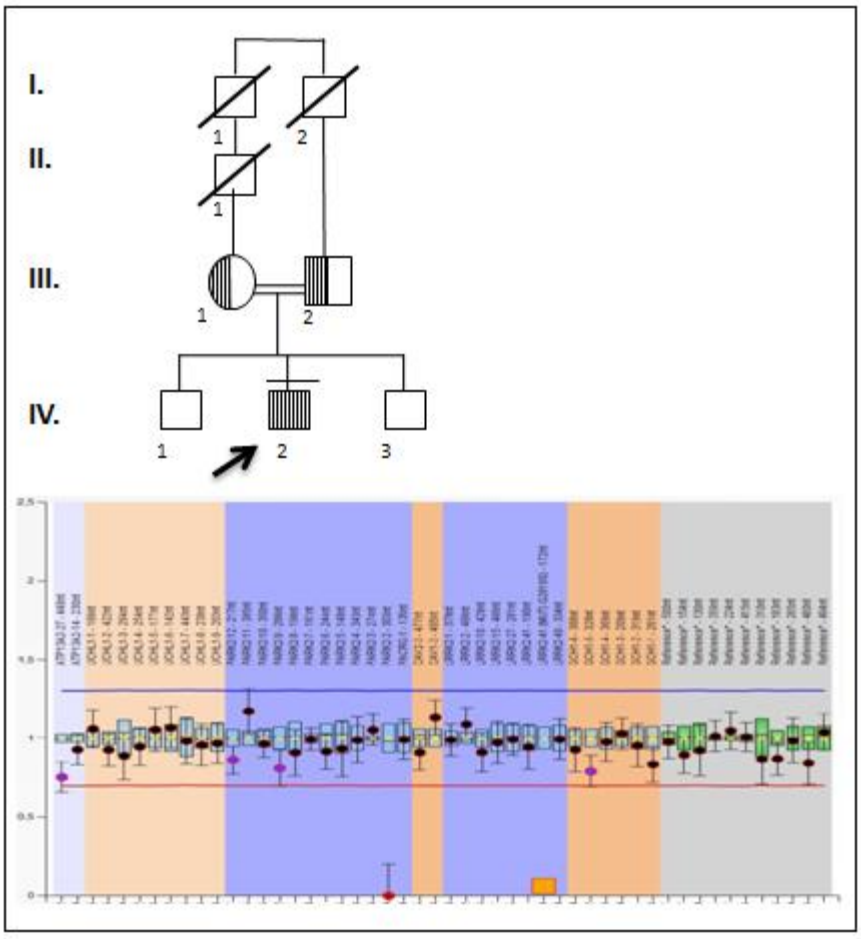
Patojenik varyant saptanan15 olguya ait aile ağaçları ve mutasyon görüntüleri ise Şekil 4.1 -4.15'de gösterildi.

**Tablo 4-2: PH ilişkili tanımlanmış mutasyon saptanan olguların klinik ve moleküler genetik bulguları**

| Olgu No | Cinsiyet | PH Tipi | Akraba Evliliği | Ailede başka etkilenmiş olgu | Kardinal Bulgular | | | | Majör etkileki patojenik mutasyonlar | | YND testindeki panel genlerde saptanan ve patojenik tahmini olan varyantlar | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | | Bradikinezi | Rijidite | Tremor | Postural instabilite | Gen | Mutasyon | Gen | Değişim | varyant bilgisi | MUTATION TASTER | SIFT (Puan) | POLYPHEN2 HUMDIV | POLYPHEN2 HUMVAR | Intervar |
| 190 | E | EB | - | - | L | L | L | YOK | *PRKN* | Hom. Ex 2 del | | | | | | | | |
| 15 | K | EB | + | + | L>R | L>R | R | VAR | *PRKN* | Hom. Ex 3 del | *APP* | hom. Ex18; c.2234A>G; p.E745G | BU ÇALIŞMA | 1 | D 0 | 0.999 | 0.999 | Olası patojenik |
| 157 | E | GB | + | + | YOK | YOK | YOK | YOK | *PRKN* | Hom. Ex 3 del | *SYNJ1* | het. Ex4; c.406C>T; p.R136* | CM151449 | 1 | | | | Patojenik |
| 86 | E | EB | Ayrı Köy | + | L>R | L>R | YOK | YOK | *PRKN* | Hom. Ex 3-4 del | | | | | | | | |
| 7 | E | GB | + | + | B>L | B>L | YOK | YOK | *SNCA* | Het. Ex 1-6 dup | *GBA* | het. Ex6; c.497A>T; p.D166V | CM037089; rs79396061 | 1 | D 0 | 1.000 | 1.000 | VUS |
| | | | | | | | | | | | *NOTCH3* | het. Ex4; c.5084A>G; p.H1702R | CM107598; rs147373451 | 1 | T 0.13 | 0.997 | 0.777 | VUS |
| 119 | E | EB | Ayrı Köy | - | BL | BL | YOK | YOK | *SNCA* | Hom. Ex 1-6 dup | *SORL1* | het. Ex15; c.2152G>A; p.V718M | BU ÇALIŞMA | 1 | T 0.27 | 0.668 | 0.259 | VUS |
| | | | | | | | | | | | *FBXO7* | het. Ex9; c.1441C>T; p.R481C | rs148272407 | 1 | D 0 | 1.000 | 0.939 | VUS |
| 263 | E | EB | + | + | B>L | B>L | YOK | YOK | *SNCA* | Hom. Ex 1-6 dup | | | | | | | | |
| 83 | K | EB | + | - | B>L | B>L | YOK | YOK | *PARK7* | Hom. Ex 1-5 del | *EIF4G1* | het. Ex17; c.2932A>G; p.E831= | rs112236915 | 1 | | | | VUS |
| 17 | K | EB | Ayrı Köy | - | Sol ALT | L>R | VAR | YOK | *PRKN* | Ex3; c.[167D>A];[167D>A], p.V56E | | | | | | | | |
| 54 | E | EB | + | + | B>L | B>L | YOK | YOK | *PRKN* | Ex8; c.[931C>T];[931C>T], p.Q311* | | | | | | | | |
| 71 | K | EB | Ayrı Köy | + | B>L | B>L | YOK | YOK | *PRKN* | Ex9; c.[1083+1delG];[1083+1delG] | *NOTCH3* | het. Ex33; c.6061G>A; p.V2021M | rs199630476 | 1 | T 0.15 | 1.000 | 0.999 | VUS |
| 105 | K | EB | + | + | L | L | YOK | YOK | *PRKN* | Ex2; c.[79_81delAAG];[79_81delAAG] p.K27del | | | | | | | | |
| 160 | E | JB | Yakın Köy | + | L>R | BL | L>R | YOK | *FBXO7* | Ex9; c.[1492C>T];[1492C>T] p.R498* | *MAPT* | het. IVS+9; 15+39G>A | CS033126; rs63751443 | 1 | | | | |
| 255 | E | EB | + | + | L>R | BL | SOL EL | YOK | *FBXO7* | Ex1; c.[1001T>G];[1001T>G], p.L34R | | | | | | | | |
| 277 | E | EB | - | - | B>L | B>L | YOK | VAR | *PRKN* | [Ex2; c.125G>C; p.R42P];[Ex 2-4 del] | *LRRK2* | het. Ex13; c.1480C>T; p.R494Y | BU ÇALIŞMA | 1 | D 0.01 | 0.999 | 0.926 | VUS |
| | | | | | | | | | | | *SORL1* | het. Ex46; c.6194A>T; p.D2065V | CM150191; rs140327834 | 1 | D 0.01 | 1.000 | 0.997 | VUS |

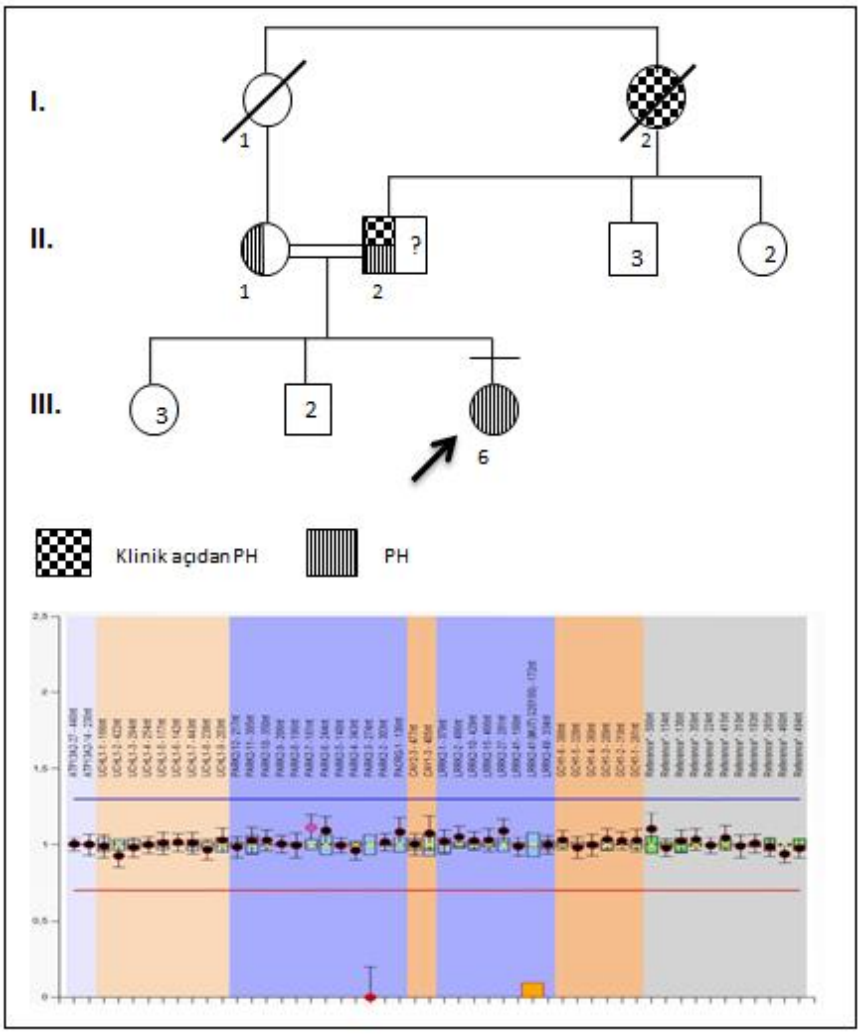
(EB: erken başlangıç; GB: geç başlangıç; JB; Juvenil başlangıç BL: bilateral)

Aile#190; Aralarında $1,5^0$ kuzen evliliği olan ailenin 2. gebeliğinden doğan olgumuzda (IV:2) MLPA ile *PRKN* geninde ekzon 2 homozigot delesyon mutasyonu saptandı. MLPA testinde tek ekzon delesyonlarında nadiren prob bağlanma bölgesinde nokta mutasyonu ya da küçük bir mutasyon görülebilmektedir. Bu tip sonuçların mutlaka PZR yapılarak ve ürün elde edilmesi durumunda ise Sanger ile dizi yapılarak incelenmesi gerekmektedir. Bu çalışmada tek ekzon delesyonu için ek bir doğrulama çalışması yapılmasına gerek kalmamıştır. Çünkü, MLPA sisteminde kontrol olarak kullanılan ve *PRKN* genin ekzon 2 bölgesinin yakın komşuluğunda yer alan iki bölge de çift doz eksikliği saptandığından ek bir doğrulama çalışmasına gerek kalmamıştır. Genin OR kalıtımı gereği anne ve babanın taşıyıcılığı kesindir. Aileye genetik danışma bu sonuca uygun olarak verildi.



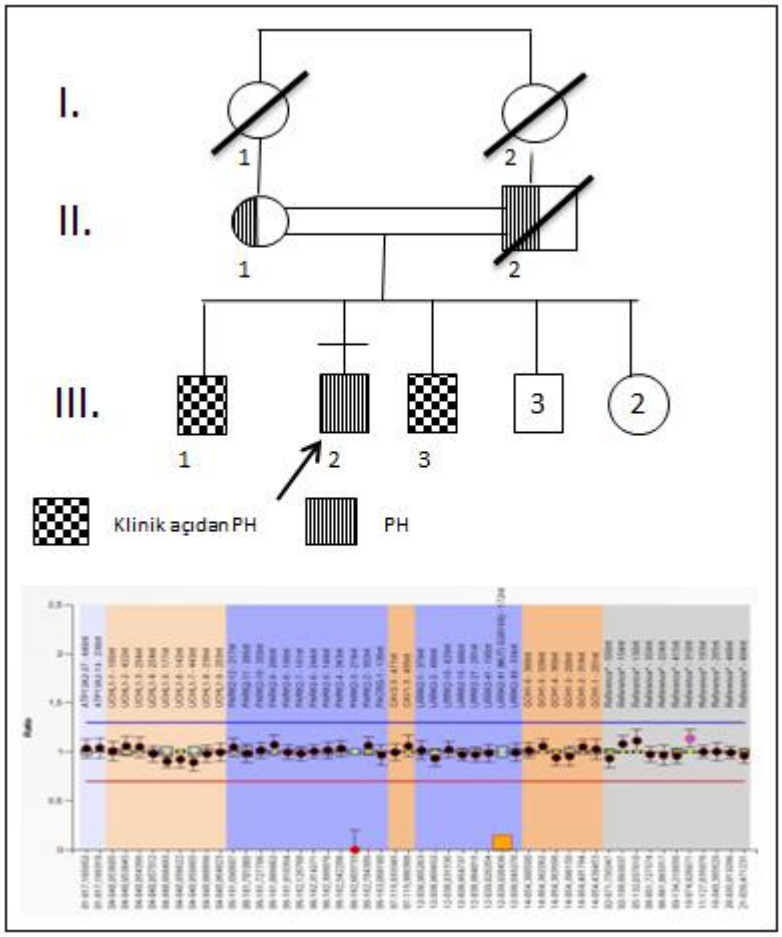

**Şekil 4-1: Olgu#190'ın aile ağacı, indeks (IV-2)'e ait MLPA testinde saptanan *PRKN* ekzon 2 homozigot delesyon mutasyonunun görüntüsü**

Aile #15; Aralarında $1^0$ kuzen evliliği olan ailenin 3. gebeliğinden doğan olgumuzda (III:6) MLPA ile *PRKN* geninde ekzon 3'de homozigot delesyon mutasyonu saptandı. Aile öyküsünde olgunun babasında ve onun annesinde de PH bulgularının bulunduğu öğrenildi. Genin OR kalıtımı gereği annenin ve babanın taşıyıcılığı kesindir. Ancak, aile ağacına göre etkilenmiş olan babanın delesyon için homozigotluğu da dışlanamaz. Aileye genetik danışma bu sonuca uygun olarak verildi, anne ve babada test yapılması önerildi.



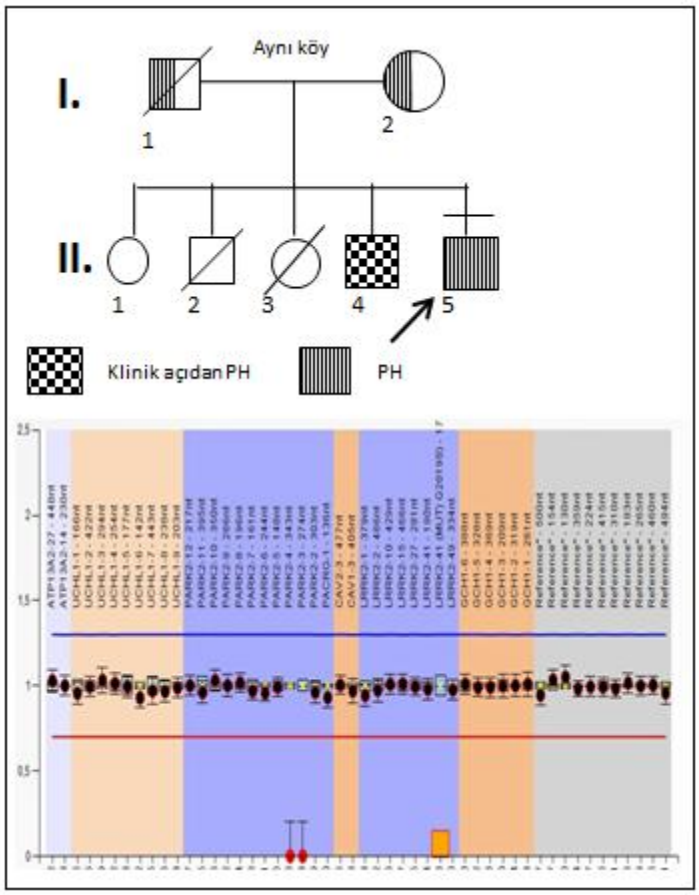

**Şekil 4-2: Olgu#15'e ait aile ağacı, indeks (III-6)'e ait MLPA testinde saptanan *PRKN* ekzon3 homozigot delesyon mutasyonunun görüntüsü**

Aile #157: Aralarında $1^0$ kuzen evliliği olan ailenin 2. gebeliğinden doğan olgumuzda (III:2) MLPA ile *PRKN* geninde ekzon 3 homozigot delesyon mutasyonu saptandı. İndeks olgunun etkilenmiş 2 kardeşi ve klinik bulgusu olmayan 5 kardeşi olduğu aile öyküsünden anlaşıldı. Genin OR kalıtımı gereği anne ve babasının taşıyıcılığı kesindir. Aileye genetik danışma bu sonuca uygun verildi.



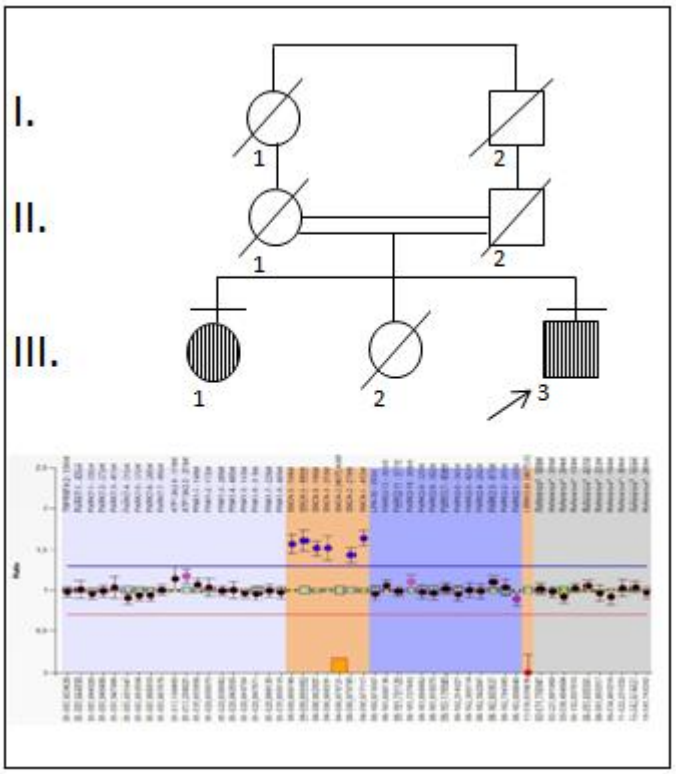

**Şekil 4-3: Olgu#157'ye ait aile ağacı, indeks (III-2)'e ait MLPA testinde saptanan *PRKN* ekzon 3 homozigot delesyon mutasyonunun görüntüsü**

Aile #86: *PRKN* geninde ekzon 3-4'de homozigot delesyon mutasyonu saptanan indeks olgunun (II:5) etkilenmiş bir kardeşi olduğu, akraba evliliği bildirilmemesine rağmen anne ve babanın aynı köyden olması ortak ata olasılığını destekledi. Aileye OR kalıtıma uygun genetik danışma verildi.



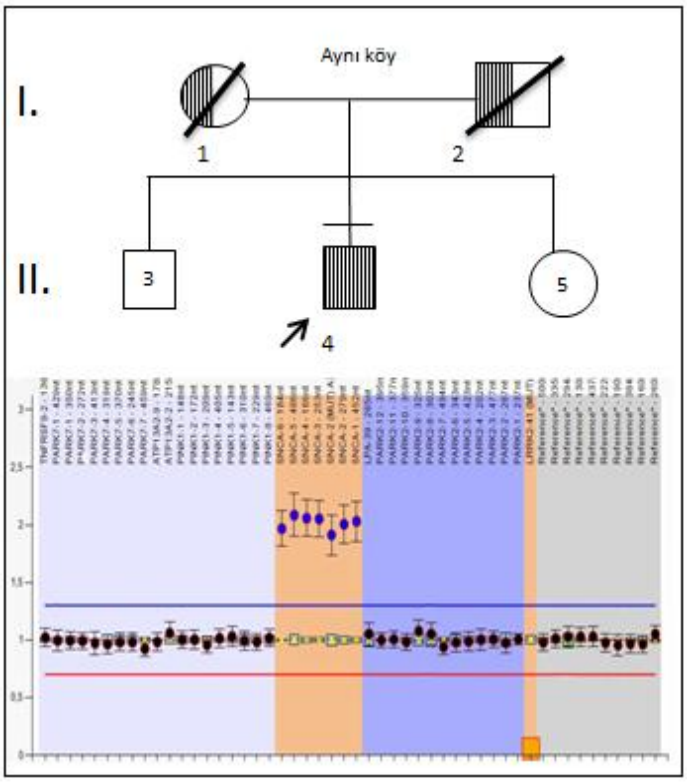

**Şekil 4-4: Olgu#86'ya ait aile ağacı, indeks (II-5)'e ait MLPA testinde saptanan *PRKN* ekzon 3-4 homozigot delesyon mutasyonunun görüntüsü**

Aile #7: Aralarında $1^0$ kuzen evliliği olan ailenin 3. gebeliğinden doğan olgumuzda (III.3) MLPA ile OD *SNCA* geninde ekzon 1-6 heterozigot duplikasyon mutasyonu saptandı. Benzer etkilenmiş kardeşinde (III:1) yapılan çalışmada da aynı mutasyon saptandı. Aileye genetik danışma bu sonuca uygun verildi.



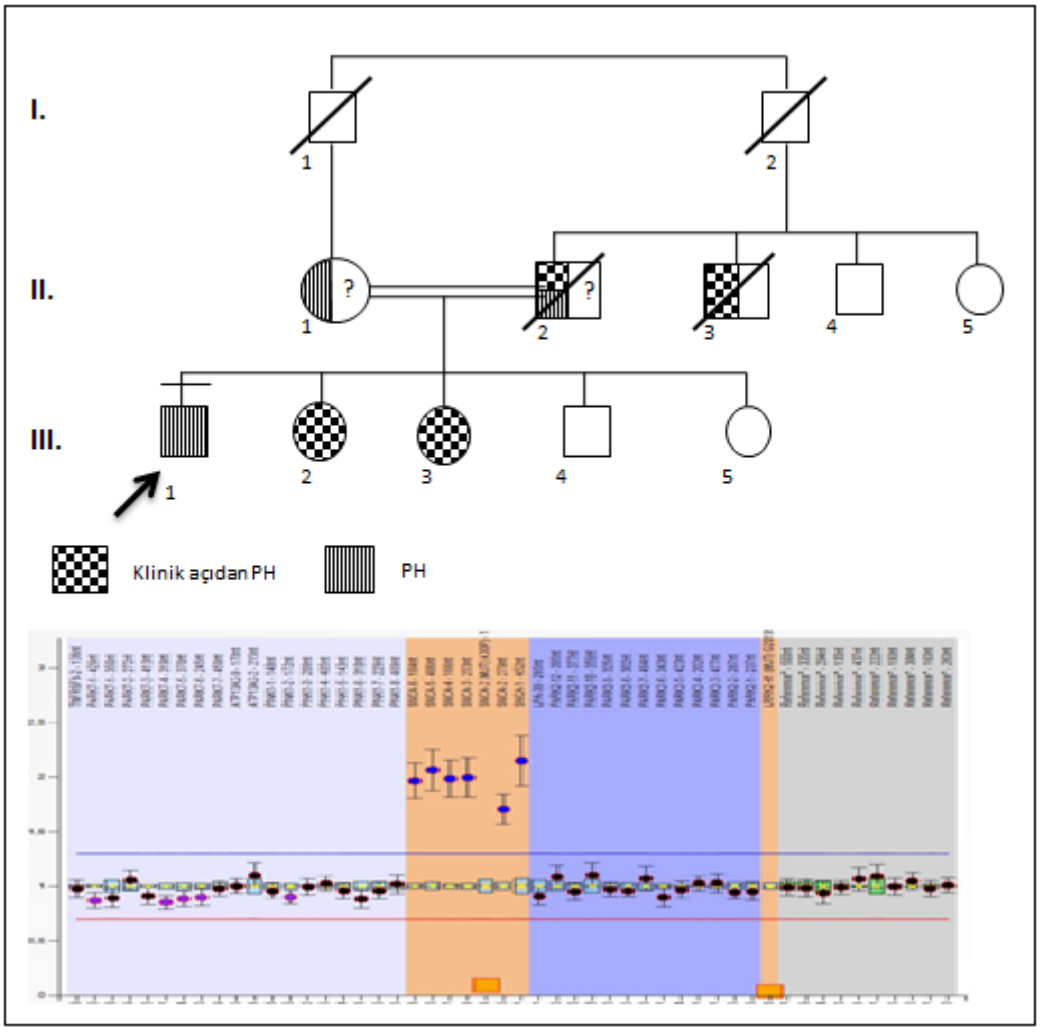

**Şekil 4-5: Olgu#7'ye ait aile ağacı, indeks (III-3)'e ait MLPA testinde saptanan *SNCA* ekzon 1-6 heterozigot duplikasyon mutasyonunun görüntüsü**

Aile #119: *SNCA* geninde MLPA ile ekzon1-6 homozigot duplikasyon mutasyonu saptandı (II:4). Akraba evliliği bildirilmemesine rağmen anne ve babanın aynı köyden olması ortak ata olasılığını destekledi. Olgunun, anne, baba ve diğer kardeşlerinde klinik bilgi yoktu. Aileye OD kalıtıma uygun genetik danışma verildi.



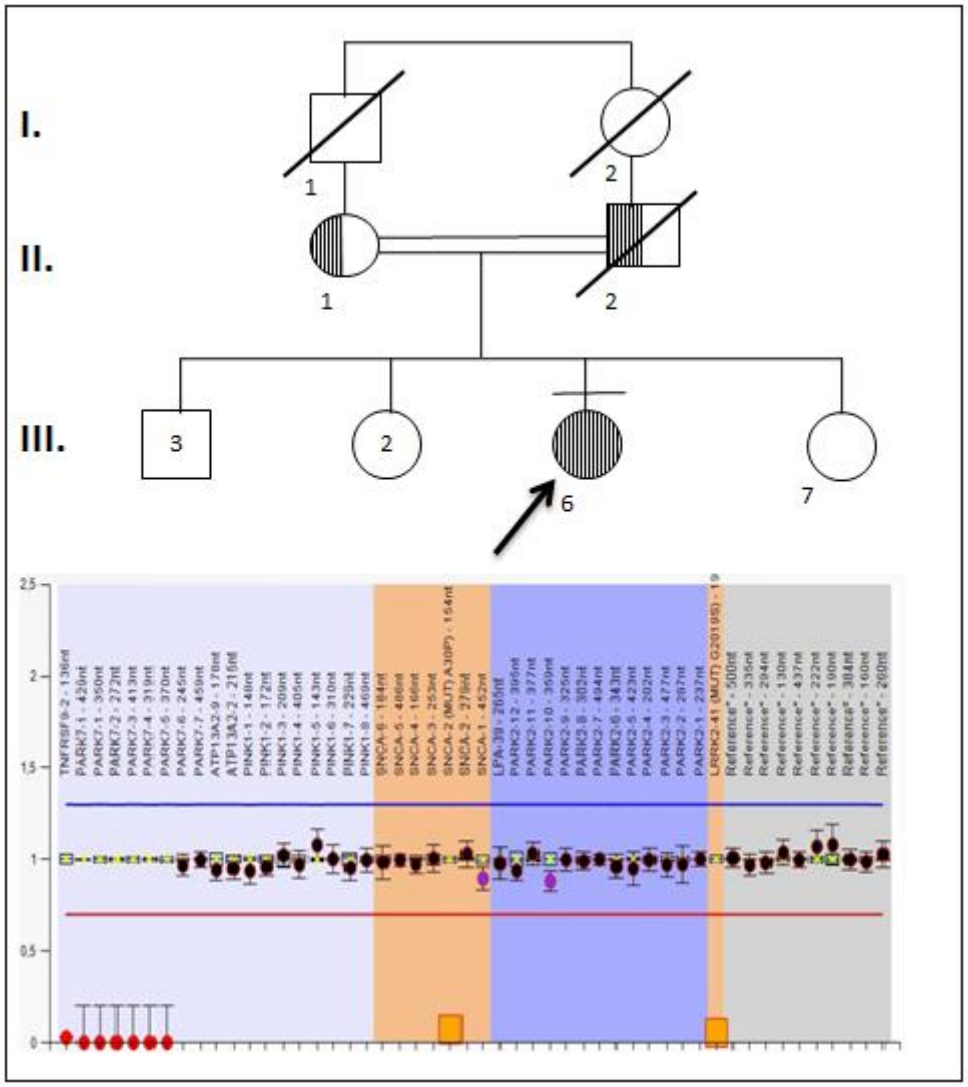

**Şekil 4-6: Olgu#119'a ait aile ağacı, indeks (II-4)'e ait MLPA testinde saptanan *SNCA* ekzon 1-6 homozigot duplikasyon mutasyonunun görüntüsü.**

Aile #263: Aralarında $1^0$ kuzen evliliği olan ailenin ilk gebeliğinden doğan olgumuzda (III:1) MLPA ile *SNCA* geninde ekzon 1-6 homozigot duplikasyon mutasyonu saptandı. Aile öyküsünde hastanın 2 kardeşinin, ölmüş olan babası ve amcasının etkilenmiş olduğu öğrenildi. SNCA ilişkili PH OD kalıtım modeline uygun olmasına karşın mutasyon için taşıyıcı olması beklenen annesinin ise klinik bulgusunun olmadığı bilgisi mevcuttu. Aileye genetik danışma OD kalıtıma uygun olarak verildi.



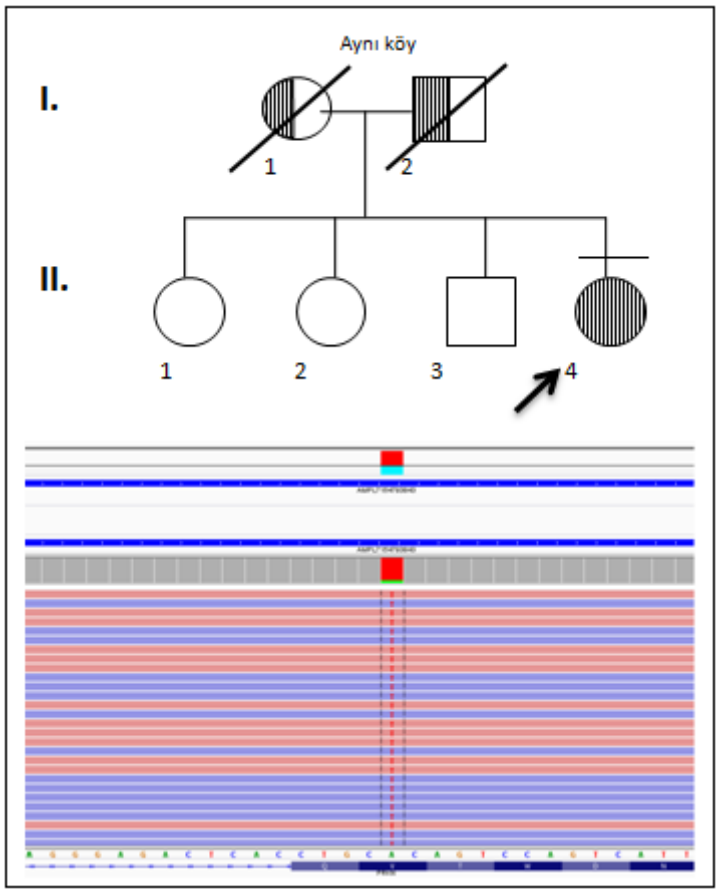

**Şekil 4-7: Olgu#263'e ait aile ağacı, indeks (III-1)'e ait MLPA testinde saptanan *SNCA* ekzon1-6 homozigot duplikasyon mutasyonunun görüntüsü**

Aile #85: Aralarında $1^0$ kuzen evliliği olan ailenin 6. gebeliğinden doğan olgumuzda (III:6) MLPA ile *DJ-1* geninde ekzon 1-5 homozigot delesyon mutasyonu saptandı. Genin OR kalıtımı gereği anne ve babasının taşıyıcılığı kesindir. Aileye OR kalıtıma uygun genetik danışma verildi.



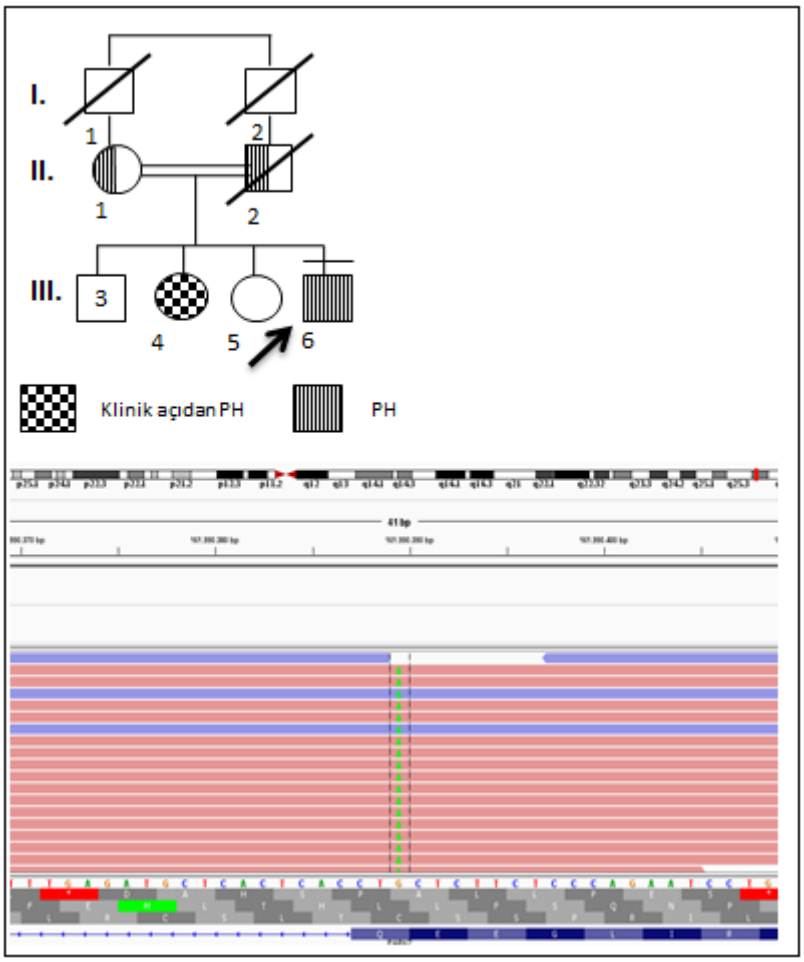

**Şekil 4-8: Olgu#85'e ait aile ağacı, indeks (III-6)'e ait MLPA testinde saptanan *DJ1* ekzon1-5 homozigot delesyon mutasyonunun görüntüsü**

Aile #17: *PRKN* geninde YND analizi ile ekzon 2 de homozigot c.167T>A (p.V56E) mutasyonu saptandı. Akraba evliliği bildirilmemesine rağmen anne ve babanın aynı köyden olması üst kuşaklarda ortak ata varlığını destekledi. Aileye OR kalıtıma uygun genetik danışma verildi.



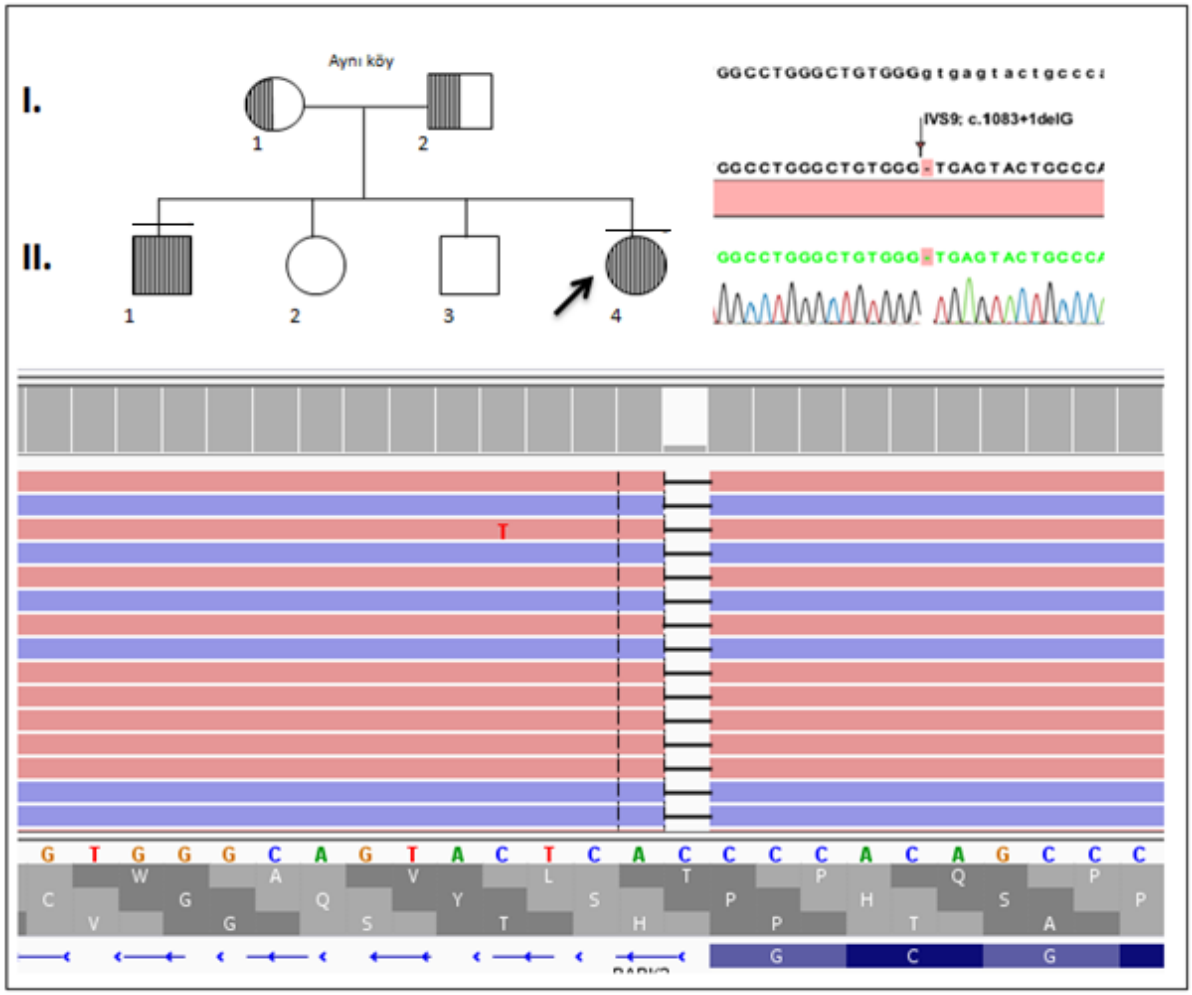

**Şekil 4-9: Olgu#17'e ait aile ağacı, indeks (II-4)'e ait YND panel-gen testinde saptanan *PRKN* ekzon 2; c.167T>A; p.V56E homozigot mutasyonunun görüntüsü**

Aile #54: Aralarında $1^0$ kuzen evliliği olan ailenin 6. gebeliğinden doğan olgumuzda (III:6) YND ile *PRKN* geninde ekzon 8'de homozigot c.931C>T ( p.Q311*) mutasyonu saptandı. Aile öyküsü indeks olgunun bir etkilenmiş kardeşi (III:4) olduğunu gösterdi. Genin OR kalıtımı gereği anne ve babanın taşıyıcılığı kesindir ve aileye bu sonuca uygun genetik danışma verilmiştir.



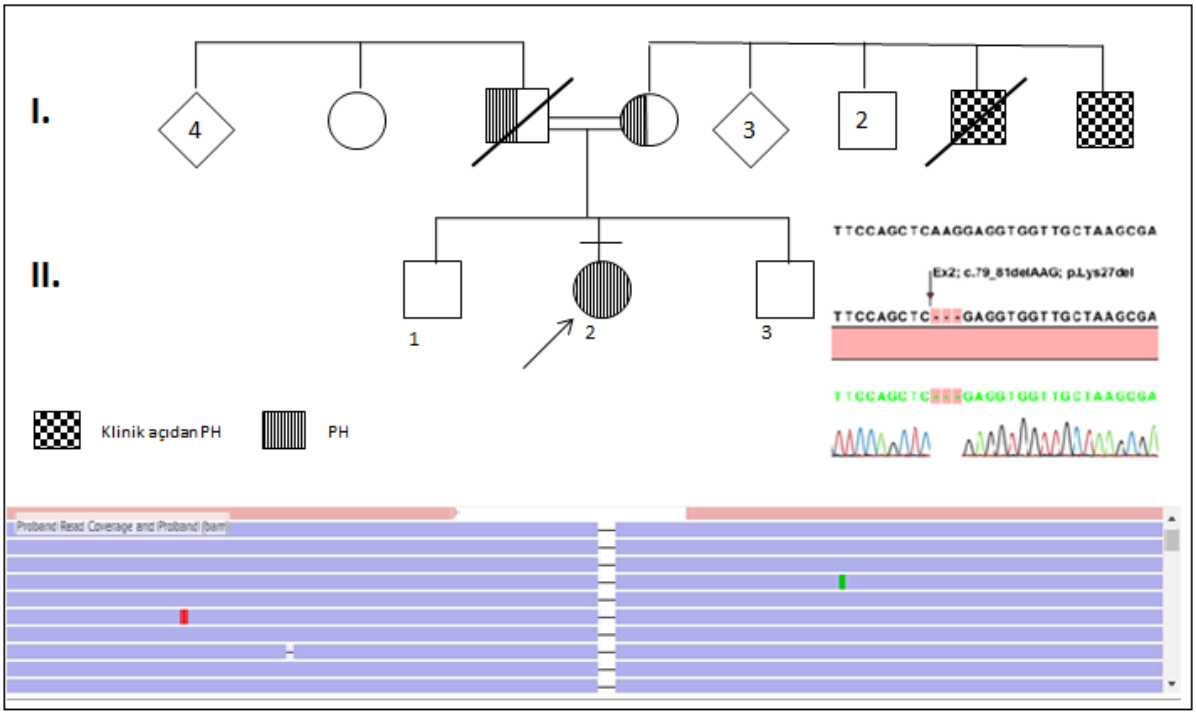

**Şekil 4-10: Olgu#54'e ait aile ağacı, indeks (III-6)'e ait YND panel-gen testinde saptanan *PRKN* ekzon 8'de homozigot c.931C>T (p.Q311*) mutasyonunun görüntüsü**

Aile #71: *PRKN* geninde ekzon 9'da homozigot c.1083+1delG mutasyonu gösterilen indeks olgunun (II:4) etkilenmiş kardeşinde de (II:1) aynı mutasyon homozigot olarak saptandı. Akraba evliliği bildirilmemesine rağmen anne ve babanın aynı köyden olması, üst kuşaklarda ortak ata olasılığını destekledi. Aileye OR kalıtıma uygun genetik danışma verildi.



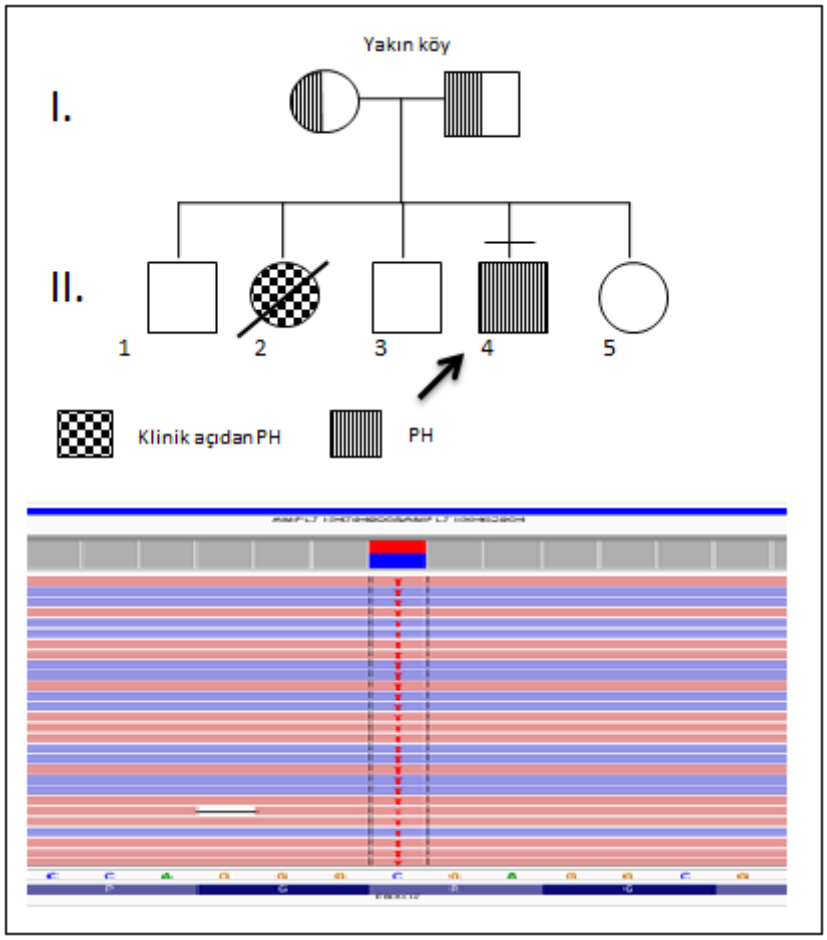

**Şekil 4-11: Olgu#71'e ait aile ağacı, indeks (II-4)'e ait YND panel-gen testinde saptanan *PRKN* ekzon 9'da homozigot c.1083+1delG delesyon mutasyonunun görüntüsü ve Sanger doğrulama görüntüsü**

Aile #105: Aralarında $1^0$ kuzen evliliği olduğu belirtilen ailenin 2. gebeliğinden doğan olgumuzda (II:2) YND ile *PRKN* geni ekzon 2'de c.79_81delAAG (p.K27del) homozigot mutasyonu saptandı. Aile öyküsü alınırken indeks olgunun 2 dayısının benzer bulgular taşıdığı bildirildi. Genin OR kalıtımı gereği anne ve babasının taşıyıcılığı kesindir. Aileye bu sonuca uygun genetik danışma verildi.



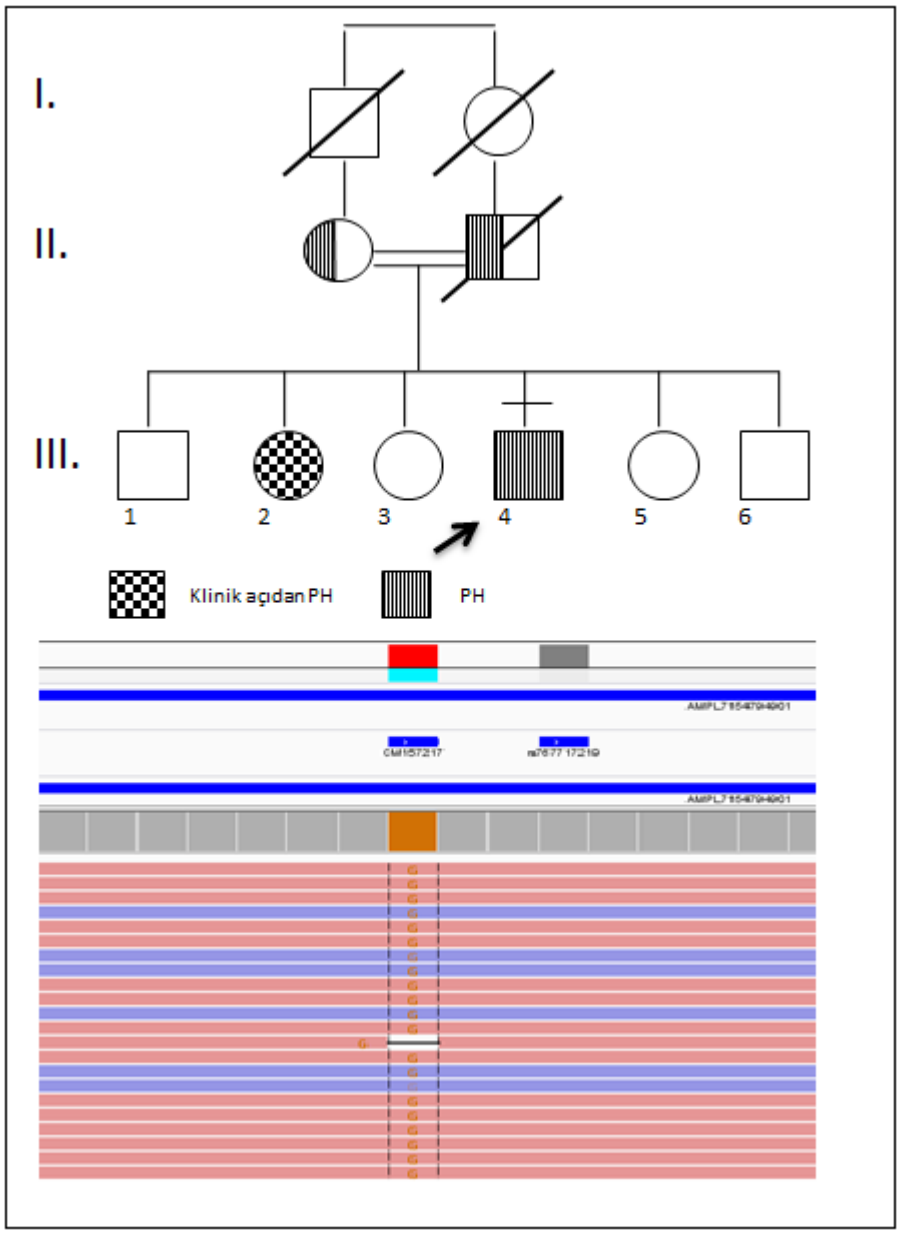

**Şekil 4-12: Olgu#105'ye ait aile ağacı, indeks (II-2)'e ait YND panel-gen testinde saptanan *PRKN* ekzon2'de homozigot c.79_81delAAG (p.K27del) delesyon mutasyonunun görüntüsü ve Sanger doğrulama görüntüsü**

Aile #160: *FBXO7* geni ekzon 9'da homozigot c.1492C>T (p.R498*) mutasyonu saptanan indeks olgunun (II:4) etkilenmiş bir kardeşinin olması ve akraba evliliği bildirilmemesine rağmen anne ve babanın yakın köylerden olması, üst kuşaklarda ortak ata varlığını destekledi. Aileye OR kalıtıma uygun genetik danışma verildi.



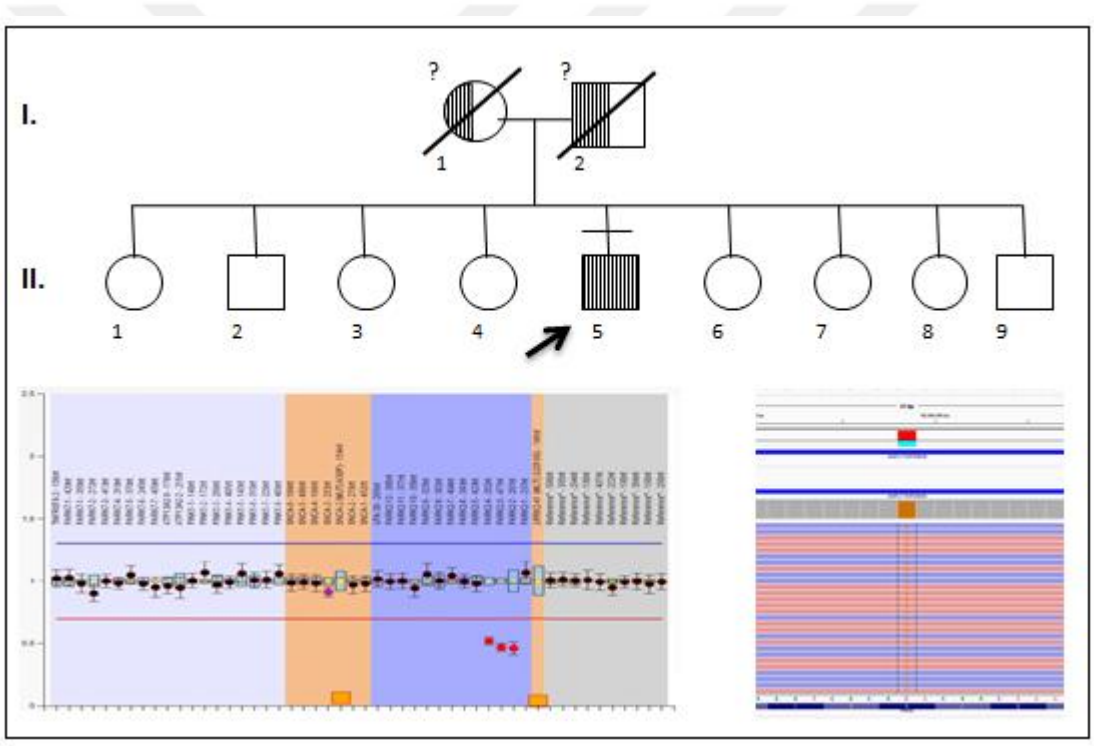

**Şekil 4-13: Olgu#160'a ait aile ağacı, indeks (II-4)'e ait YND panel-gen testinde saptanan *FBXO7* ekzon 9'da homozigot c.1492C>T (p.R498*) mutasyonunun görüntüsü**

Aile #255: Aralarında $1^0$ kuzen evliliği olan ailenin 4. gebeliğinden doğan olgumuzda (III:4) YND ile *FBXO7* geni ekzon 1'de homozigot c.101T>G (p.L34R) mutasyonu saptandı. Aile öyküsü alınırken, indeks olgunun etkilenmiş bir kardeşi ve klinik bulgusu olmayan dört kardeşi olduğu bildirildi. Genin OR kalıtımı gereği anne ve babasının taşıyıcılığı kesindir. Aileye genetik danışma bu sonuca uygun verildi.




**Şekil 4-14: Olgu#255'e ait aile ağacı, indeks (III-4)'e ait YND panel-gen testinde saptanan *FBXO7* ekzon 1'de homozigot c.101T>G (p.L34R) mutasyonunun görüntüsü**

Aile #277: Aralarında akrabalık olduğu bildirilen ailenin 5. gebeliğinden doğan olgumuzda (II:5) *PRKN* geninde MLPA ile ekzon 2-4 heterozigot delesyon mutasyonu, YND ile ekzon 2'de hemizigot c.125G>C (p.R42P) mutasyonu saptandı. Bu sonuç, mutasyonların birleşik heterozigot formda *PRKN* gen ilişkili PH'nın kalıtım modeli ile uyumlu olduğu gözlendi. Aile öyküsüne göre indeks olgunun kendisinden yaş olarak büyük ve küçük olan hiçbir kardeşinde PH öyküsü olmadığı bilgisi elde edildi. Ölmüş olan anne ve babanın mutasyonlardan biri için taşıyıcı olması beklenirken hangisi olduğu ve iki mutasyondan birinin yeni oluşup oluşmadığı söylenemez. Aileye bu sonuca uygun genetik danışma verildi.




**Şekil 4-15: Olgu#277'e ait aile ağacı, indeks (III-4)'e ait YND panel-gen testinde saptanan *PRKN* ekzon 2'de hemizigotc.125G>C ( p.R42P) mutasyonu ve MLPA testinde heterozigot ekzon 2-4 delesyon mutasyonunun görüntüsü**

**Tablo 4-3: PH ilişkili tanımlanmış bir mutasyon saptanmayan olgularda gözlenen varyantlar**

| Olgu No | Akrabalık | Ailede Hasta | *Gen* | Değişim | Varyant Bilgisi | MUTATION TASTER | SIFT (Puan) | POLYPHEN2 HUMDIV | POLYPHEN2 HUMVAR | Intervar |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 169 | ? | ? | ***APP*** | het. Ex17; c.2124C>T; p.G708= | rs148888161 | 1 | | | | Benign |
| 190 | ? | ? | ***CP*** | het. Ex19; c.2793A>G; p.L931= | rs34987997 | 1 | | | | Olası Benign |
| 53 | - | + | ***MAPT*** | het. Ex9; c.462G>A; p.P154= | rs201046056 | 1 | | | | Olası Benign |
| 67 | ? | ? | ***PRKN*** | het. Ex9; c.942G>A; p.R314= | rs763015574 | 1 | | | | Olası Benign |
| 161 | ? | ? | ***VPS35*** | het. Ex15; c.1881C>T; p.A627= | rs138794859 | 1 | | | | Olası Benign |
| 108 | - | - | ***GCH1*** | het. Ex1; c.68C>T; p.P23L | CM011337; rs41298432 | 1 | T 0.44 | 0.291 | 0.125 | Olası Benign |
| 241 | ? | ? | ***PLA2G6*** | het. Ex17; c.2417C>G; p.P806R | rs140758033 | 1 | D 0 | 1.000 | 0.997 | Olası Benign |
| 75 | ? | ? | ***PLA2G6*** | het. Ex15; c.2162T>C; p.V721A | rs775929222 | 1 | T 0.57 | 0.986 | 0.889 | VUS |
| 170 | ? | ? | ***LRRK2*** | het. Ex36;c.5178A>G; :p.A1726= | rs200185983 | 1 | | | | Olası Benign |
| 138 | - | + | ***LRRK2*** | het. Ex5; c.446C>G; p.T149S | rs199567598 | 1 | T 0.47 | 0.179 | 0.077 | VUS |
| 230 | ? | ? | ***GBA*** | het. Ex9; c.1223C>T;p.T408M | CM960697; rs75548401 | 1 | T 0.12 | 0.086 | 0.021 | Olası Benign |
| 240 | ? | + | ***GBA*** | het. Ex10; c.1301G>C; p.R434P | CM005403; rs775661835 | 1 | T 0.08 | 0.126 | 0.141 | VUS |
| 242 | ? | ? | ***GBA*** | het. Ex10; c.1301G>C; p.R434P | CM005403; rs775661835 | 1 | T 0.08 | 0.126 | 0.141 | VUS |
| 13 | - | + | ***DNAJC6*** | het. Ex3; c.371C>G; p.T124S | rs777685662 | 1 | T 0.23 | 0.000 | 0.001 | VUS |
| 103 | + | - | ***GAK*** | hom. Ex21; c.2759C>T; p.A920V | BU ÇALIŞMA | 1 | D 0.04 | 0.161 | 0.071 | VUS |
| 101 | - | - | ***POLG*** | het. Ex21; c.3382C>T; p.R1128C | rs755544706 | 1 | D 0 | 1.000 | 0.999 | VUS |
| 8 | - | + | ***SORL1*** | het. Ex47; c.6419T>C; p.V2140A | BU ÇALIŞMA | 1 | T (0.68) | 0.003 | 0.003 | VUS |
| 117 | - | - | ***SORL1*** | het. Ex46; c.6194A>T; p.D2065V | CM150191; rs140327834 | 1 | D 0.01 | 1.000 | 0.997 | VUS |
| 12 | - | - | ***TH*** | het. Ex13; c.1361A>G; p.Q454R | BU ÇALIŞMA | 1 | T 0.38 | 0.523 | 0.727 | VUS |
| 16 | ? | ? | ***DNAJC13*** | het. Ex37; c.4262C>T; p.A1421V | rs61748102 | 1 | D 0.01 | 0.998 | 0.803 | Benign |
| | | | ***APOE*** | het. Ex4; c.940A>C; p.S314R | rs61748102 | 1 | T 0.55 | 0.020 | 0.009 | VUS |
| 76 | + | + | ***SLC6A3*** | het. Ex10; c.1398C>T; p.N466= | rs2270912 | 1 | | | | Olası Benign |
| | | | ***APP*** | het. Ex13; c.1604G>A; p.R535H | rs753052785 | 1 | T 0.95 | 0.999 | 0.983 | VUS |
| 107 | ? | ? | ***POLG*** | het. Ex2; c.391T>C; p.Y131H | rs562847013 | 1 | T 0.53 | 0.895 | 0.424 | VUS |
| | | | ***SYNJ1*** | het. Ex3; c.271A>C; p.T91A | BU ÇALIŞMA | 1 | T 0.24 | 0.158 | 0.065 | VUS |
| 130 | - | + | ***ATP13A2*** | het. Ex12; c.1130G>A; p.G377E | BU ÇALIŞMA | 1 | T 0.06 | 1.000 | 0.999 | VUS |
| | | | ***NPC1*** | het. Ex6; c.684C>T; p.D228= | rs558452690 | 1 | | | | Olası Benign |
| 159 | + | + | ***CP*** | het. Ex16; c.2684G>C; p.G895A | CM066769; rs139633388 | 1 | D 0.02 | 1.000 | 1.000 | Olası Patojenik |
| | | | ***NOTCH3*** | het. Ex33; c.5937C>T; p.A1979= | rs570392715 | 1 | | | | Olası Benign |
| 184 | ? | ? | ***PINK1*** | het. Ex7; c.1390C>T; p.R464C | TANIMLI | 1 | T 0.08 | 1.000 | 0.995 | VUS |
| | | | ***PSEN2*** | het. Ex5; c.300C>T; p.I100= | rs200801915 | 1 | | | | Olası Benign |
| 243 | + | ? | ***ATP13A2*** | het. Ex25; c.2859G>A; p.T953= | rs144557304 | 1 | | | | VUS |
| | | | ***GAK*** | het. Ex25; c.3501C>T; p.P1167= | rs147555555 | 1 | | | | Olası Benign |
| 278 | ? | ? | ***GAK*** | het. Ex19; c.2151G>A; p.R717= | rs144509628 | 1 | | | | Olası Benign |
| | | | ***LRRK2*** | het. Ex8; c.867C>T; p.N289= | rs17490713 | 1 | | | | Olası Benign |

| | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 57 | + | - | ***GBA*** | het. Ex9; c.1223C>T; p.T408M | CM960697; rs75548401 | 1 | T 0.12 | 0.086 | 0.021 | Olası Benign |
| | | | ***EIF4G1*** | het. Ex10; c.831A>G; p.E277= | TANIMLI | 1 | | | | Olası Benign |
| | | | ***PLA2G6*** | het. Ex12; c.1614C>T; p.R538= | rs373930150 | 1 | | | | Olası Benign |
| 94 | - | + | ***DNAJC13*** | het. Ex6; c.493T>G; p.T165D | rs753475492 | 1 | T 0.25 | 0.940 | 0.368 | VUS |
| | | | ***SORL1*** | het. Ex20; c.2771A>G; p.N924S | CM123107; rs377498269 | 1 | D 0.01 | 0.905 | 0.426 | VUS |
| | | | ***LRRK2*** | het. Ex4; c.356T>C; p.L119P | CM150168; rs33995463 | 1 | D 0 | 0.996 | 0.894 | VUS |
| 134 | - | + | ***PRKN*** | het. Ex12; c.1372A>C; p.M458L | CM096654; rs182893847 | 1 | T 0.62 | 0.964 | 0.625 | VUS |
| | | | ***POLG*** | het. Ex21; c.3382C>T; p.R1128C | rs755544706 | 1 | D 0 | 1.000 | 0.999 | VUS |
| | | | ***FBXO7*** | het. Ex7; c.1082A>G; p.D361G | rs765132485 | 1 | T 0.17 | 0.994 | 0.962 | VUS |
| 136 | ? | ? | ***SLC6A3*** | het. Ex14; c.1805A>G; p.E602G | CM056407; rs147837176 | 2 | T 0.49 | 0.009 | 0.024 | VUS |
| | | | ***NPC1*** | het. Ex6; c.684C>T; p.D228= | rs558452690 | 1 | | | | Olası Benign |
| | | | ***EIF4G1*** | het. Ex27; c.4006G>A; p.V1336M | BU ÇALIŞMA | 1 | D 0.02 | 1.000 | 0.990 | VUS |
| 162 | - | - | ***SMPD1*** | het. Ex1; c.270C>T; p.T90= | BU ÇALIŞMA | 1 | | | | Olası Benign |
| | | | ***GCH1*** | het. Ex3; c.506C>G; p.A169G | TANIMLI | 1 | D 0 | 1.000 | 0.998 | VUS |
| | | | ***NOTCH3*** | het. Ex17; c.2580C>T; p.N860= | rs201436750 | 1 | | | | Olası Benign |
| 168 | ? | ? | ***GBA*** | het. Ex10; c.1323C>G; p.I441M | BU ÇALIŞMA | 1 | D 0 | 0.999 | 0.985 | VUS |
| | | | ***CP*** | het. Ex11; c.2030T>C; p.L677P | rs149158988 | 1 | D 0 | 1.000 | 0.999 | VUS |
| | | | ***SORL1*** | het. Ex27; c.3813C>T; p.C1271= | rs540304639 | 1 | | | | VUS |
| 171 | ? | ? | ***PRKN*** | het. Ex10; c.1204C>T; p.R402C | CM056983; rs55830907 | 1 | D 0 | 1.000 | 1.000 | VUS |
| | | | ***GBA*** | het. Ex9; c.1224G>A; p.T408= | CM1616540; rs138498426 | 1 | | | | VUS |
| | | | ***PSEN2*** | het. Ex5; c.149A>G; p.Q50R | rs143501870 | 1 | T 0.55 | 0.000 | 0.000 | VUS |
| 194 | ? | ? | ***UCHL1*** | het. Ex9; c.609A>G; p.E203= | rs147661219 | 1 | | | | Benign |
| | | | ***TH*** | het. Ex13; c.1411G>T; p.A471S | rs374465917 | 1 | D 0.03 | 0.992 | 0.990 | VUS |
| | | | ***SMPD1*** | het. Ex2; c.340G>A; p.V114M | CM121726; rs142215226 | 1 | T 0.14 | 0.985 | 0.985 | VUS |
| | | | ***NPC1*** | het. Ex23; c.3561G>T; p.A1187= | rs55724504 | 1 | | | | Olası Benign |
| | | | ***PLA2G6*** | het. Ex17; c.2417C>G; p.P806R | rs140758033 | 1 | D 0 | 1.000 | 0.997 | Olası Benign |
| 246 | ? | ? | ***ATP13A2*** | het. Ex25; c.2859G>A; :p.T953= | rs144557304 | 1 | | | | VUS |
| | | | ***TH*** | het. Ex6; c.594G>T; p.V229= | rs544661832 | 1 | | | | Olası Benign |
| | | | ***SORL1*** | het. Ex24; c.3396C>T; p.I1132= | rs957720370 | 1 | | | | Olası Benign |
| | | | ***LRRK2*** | het. Ex16; c.1831G>A; p.G611R | TANIMLI | 1 | T 0.61 | 0.974 | 0.548 | VUS |
| | | | ***PSEN1*** | het. Ex7; c.578T>G; p.V193G | rs780461228 | 1 | D 0 | 0.140 | 0.160 | VUS |

(1: hastalık yapıcı,?: veriye ulaşılamadı, T: Tolere edilebilir, D: Hasarlı)

**Tablo 4-4: PH ile ilişkili tanımlı mutasyon taşımayan olgulardaki varyantların bulundukları genlere göre değerlendirilmesi**

| Gen | Değişim | Varyant Bilgisi | PH Olgularında Allel sayısı (n=126) | Serideki Allel sayısı (n=430) | ExAC | 1000 Genomes | MUTATION TASTER | SIFT (Score) | POLYPHEN2 HUMDIV | POLYPHEN2 HUMVAR | Intervar |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| ***APP*** | het. Ex17; c.2124C>T; p.G708= | rs148888161 | 1 | 1 | 0.0020/248 | 0.0028/14 | Zararlı | | | | Benign |
| ***DNAJC13*** | het. Ex37; c.4262C>T; p.A1421V | rs61748102 | 1 | 3 | 0.0177/2140 | 0.0128/64 | Zararlı | D 0.01 | 0.998 | 0.803 | Benign |
| ***UCHL1*** | het. Ex9; c.609A>G; p.E203= | rs147661219 | 1 | 2 | 0.0011/120 | 0.0020/10 | Zararlı | | | | Benign |
| ***CP*** | het. Ex19; c.2793A>G; p.L931= | rs34987997 | 1 | 2 | 0.0021/257 | 0.0010/5 | Zararlı | | | | Olası Benign |
| ***EIF4G1*** | het. Ex10; c.831A>G; p.E277= | TANIMLI | 1 | 1 | | | Zararlı | | | | Olası Benign |
| ***GAK*** | het. Ex25; c.3501C>T; p.P1167= | rs147555555 | 1 | 1 | 0.00008/9 | | Zararlı | | | | Olası Benign |
| ***GAK*** | het. Ex19; c.2151G>A; p.R717= | rs144509628 | 1 | 2 | 0.0003/31 | 0.0002/1 | Zararlı | | | | Olası Benign |
| ***GCH1*** | het. Ex1; c.68C>T; p.P23L | CM011337; rs41298432 | 1 | 3 | 0.0068/54 | 0.0016/8 | Zararlı | T 0.44 | 0.291 | 0.125 | Olası Benign |
| ***LRRK2*** | het. Ex36;c.5178A>G; :p.A1726= | rs200185983 | 1 | 2 | 0.00006/7 | | Zararlı | | | | Olası Benign |
| ***LRRK2*** | het. Ex8; c.867C>T; p.N289= | rs17490713 | 1 | 1 | 0.0038/461 | 0.0162/81 | Zararlı | | | | Olası Benign |
| ***MAPT*** | het. Ex9; c.462G>A; p.P154= | rs201046056 | 1 | 1 | 0.0002/23 | 0.0004/2 | Zararlı | | | | Olası Benign |
| ***NOTCH3*** | het. Ex33; c.5937C>T; p.A1979= | rs570392715 | 1 | 1 | 0.0001/16 | 0.0002/1 | Zararlı | | | | Olası Benign |
| ***NOTCH3*** | het. Ex17; c.2580C>T; p.N860= | rs201436750 | 1 | 1 | 0.0010/22 | 0.0006/3 | Zararlı | | | | Olası Benign |
| ***NPC1*** | het. Ex23; c.3561G>T; p.A1187= | rs55724504 | 1 | 2 | 0.0025/302 | 0.0022/11 | Zararlı | | | | Olası Benign |
| ***PRKN*** | het. Ex9; c.942G>A; p.R314= | rs763015574 | 1 | 2 | 0.00003/4 | | Zararlı | | | | Olası Benign |
| ***PLA2G6*** | het. Ex12; c.1614C>T; p.R538= | rs373930150 | 1 | 2 | 0.0001/13 | | Zararlı | | | | Olası Benign |
| ***PSEN2*** | het. Ex5; c.300C>T; p.I100= | rs200801915 | 1 | 1 | 0.0001/14 | 0.0004/2 | Zararlı | | | | Olası Benign |
| ***SLC6A3*** | het. Ex10; c.1398C>T; p.N466= | rs2270912 | 1 | 1 | 0.0018/216 | 0.0046/23 | Zararlı | | | | Olası Benign |
| ***SMPD1*** | het. Ex1; c.270C>T; p.T90= | BU ÇALIŞMA | 1 | 1 | | | Zararlı | | | | Olası Benign |
| ***SORL1*** | het. Ex24; c.3396C>T; p.I1132= | rs957720370 | 1 | 1 | | | Zararlı | | | | Olası Benign |
| ***TH*** | het. Ex6; c.594G>T; p.V229= | rs544661832 | 1 | 1 | 0.0003/25 | 0.0006/3 | Zararlı | | | | Olası Benign |
| ***VPS35*** | het. Ex15; c.1881C>T; p.A627= | rs138794859 | 1 | 1 | 0.0001/14 | | Zararlı | | | | Olası Benign |
| ***GBA*** | het. Ex9; c.1223C>T; p.T408M | CM960697; rs75548401 | 2 | 3 | 0.0066/766 | 0.0018/9 | Zararlı | T 0.12 | 0.086 | 0.021 | Olası Benign |
| ***NPC1*** | het. Ex6; c.684C>T; p.D228= | rs558452690 | 2 | 2 | 0.00005/6 | 0.0002/1 | Zararlı | | | | Olası Benign |
| ***PLA2G6*** | het. Ex17; c.2417C>G; p.P806R | rs140758033 | 2 | 3 | 0.0019/64 | 0.0030/15 | Zararlı | D 0 | 1.000 | 0.997 | Olası Benign |
| ***APOE*** | het. Ex4; c.940A>C; p.S314R | rs61748102 | 1 | 1 | 0.0177/2140 | 0.0128/64 | Zararlı | T 0.55 | 0.020 | 0.009 | VUS |
| ***APP*** | het. Ex13; c.1604G>A; p.R535H | rs753052785 | 1 | 1 | 0.000008/1 | | Zararlı | T 0.95 | 0.999 | 0.983 | VUS |
| ***ATP13A2*** | het. Ex12; c.1130G>A; p.G377E | BU ÇALIŞMA | 1 | 1 | | | Zararlı | T 0.06 | 1.000 | 0.999 | VUS |
| ***ATP13A2*** | het. Ex25; c.2859G>A; p.T953= | rs144557304 | 2 | 2 | 0.0011/130 | 0.0004/2 | Zararlı | | | | VUS |
| ***CP*** | het. Ex11; c.2030T>C; p.L677P | rs149158988 | 1 | 1 | 0.00005/6 | | Zararlı | D 0 | 1.000 | 0.999 | VUS |
| ***DNAJC13*** | het. Ex6; c.493T>G; p.T165D | rs753475492 | 1 | 1 | | | Zararlı | T 0.25 | 0.940 | 0.368 | VUS |
| ***DNAJC6*** | het. Ex3; c.371C>G; p.T124S | rs777685662 | 1 | 1 | 0.00002/2 | | Zararlı | T 0.23 | 0.000 | 0.001 | VUS |
| ***EIF4G1*** | het. Ex27; c.4006G>A; p.V1336M | BU ÇALIŞMA | 1 | 1 | | | Zararlı | D 0.02 | 1.000 | 0.990 | VUS |
| ***FBXO7*** | het. Ex7; c.1082A>G; p.D361G | rs765132485 | 1 | 1 | 0.0001/17 | | Zararlı | T 0.17 | 0.994 | 0.962 | VUS |
| ***GAK*** | hom. Ex21; c.2759C>T; p.A920V | BU ÇALIŞMA | 2 | 1 | | | Zararlı | D 0.04 | 0.161 | 0.071 | VUS |
| ***GBA*** | het. Ex10; c.1323C>G; p.I441M | BU ÇALIŞMA | 1 | 1 | | | Zararlı | D 0 | 0.999 | 0.985 | VUS |

| | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| ***GBA*** | het. Ex9; c.1224G>A; p.T408= | CM1616540; rs138498426 | 1 | 1 | 0.0004/41 | | Zararlı | | | | VUS |
| ***GBA*** | het. Ex10; c.1301G>C; p.R434P | CM005403; rs775661835 | 2 | 2 | 0.000008/1 | | Zararlı | T 0.08 | 0.126 | 0.141 | VUS |
| ***GCH1*** | het. Ex3; c.506C>G; p.A169G | TANIMLI | 1 | 1 | | | Zararlı | D 0 | 1.000 | 0.998 | VUS |
| ***LRRK2*** | het. Ex4; c.356T>C; p.L119P | CM150168; rs33995463 | 1 | 2 | 0.0013/156 | 0.0008/4 | Zararlı | D 0 | 0.996 | 0.894 | VUS |
| ***LRRK2*** | het. Ex5; c.446C>G; p.T149S | rs199567598 | 1 | 2 | 0.00002/3 | | Zararlı | T 0.47 | 0.179 | 0.077 | VUS |
| ***LRRK2*** | het. Ex16; c.1831G>A; p.G611R | TANIMLI | 1 | 1 | | | Zararlı | T 0.61 | 0.974 | 0.548 | VUS |
| ***PRKN*** | het. Ex12; c.1372A>C; p.M458L | CM096654; rs182893847 | 1 | 4 | 0.0003/33 | 0.0014/7 | Zararlı | T 0.62 | 0.964 | 0.625 | VUS |
| ***PRKN*** | het. Ex10; c.1204C>T; p.R402C | CM056983; rs55830907 | 1 | 4 | 0.0020/243 | 0.0022/11 | Zararlı | D 0 | 1.000 | 1.000 | VUS |
| ***PINK1*** | het. Ex7; c.1390C>T; p.R464C | TANIMLI | 1 | 1 | | | Zararlı | T 0.08 | 1.000 | 0.995 | VUS |
| ***PLA2G6*** | het. Ex15; c.2162T>C; p.V721A | rs775929222 | 1 | 2 | 0.00002/2 | | Zararlı | T 0.57 | 0.986 | 0.889 | VUS |
| ***POLG*** | het. Ex21; c.3382C>T; p.R1128C | rs755544706 | 2 | 3 | 0.00003/4 | | Zararlı | D 0 | 1.000 | 0.999 | VUS |
| ***PSEN1*** | het. Ex7; c.578T>G; p.V193G | rs780461228 | 1 | 1 | 0.000008/1 | | Zararlı | D 0 | 0.140 | 0.160 | VUS |
| ***PSEN2*** | het. Ex5; c.149A>G; p.Q50R | rs143501870 | 1 | 1 | 0.0002/26 | | Zararlı | T 0.55 | 0.000 | 0.000 | VUS |
| ***SLC6A3*** | het. Ex14; c.1805A>G; p.E602G | CM056407; rs147837176 | 2 | 2 | 0.0007/32 | 0.0004/2 | Zararlı | T 0.49 | 0.009 | 0.024 | VUS |
| ***SMPD1*** | het. Ex2; c.340G>A; p.V114M | CM121726; rs142215226 | 1 | 2 | 0.0008/92 | 0.0006/3 | Zararlı | T 0.14 | 0.985 | 0.985 | VUS |
| ***SORL1*** | het. Ex47; c.6419T>C; p.V2140A | BU ÇALIŞMA | 1 | 1 | | | Zararlı | T (0.68) | 0.003 | 0.003 | VUS |
| ***SORL1*** | het. Ex20; c.2771A>G; p.N924S | CM123107; rs377498269 | 1 | 1 | 0.00004/5 | | Zararlı | D 0.01 | 0.905 | 0.426 | VUS |
| ***SORL1*** | het. Ex46; c.6194A>T; pD2065V | CM150191; rs140327834 | 1 | 3 | 0.0028/338 | 0.0008/4 | Zararlı | D 0.01 | 1.000 | 0.997 | VUS |
| ***SORL1*** | het. Ex27; c.3813C>T; p.C1271= | rs540304639 | 1 | 1 | 0.00004/5 | | Zararlı | | | | VUS |
| ***SYNJ1*** | het. Ex3; c.271A>C; p.T91A | BU ÇALIŞMA | 1 | 1 | | | Zararlı | T 0.24 | 0.158 | 0.065 | VUS |
| ***TH*** | het. Ex13; c.1361A>G; p.Q454R | BU ÇALIŞMA | 1 | 1 | | | Zararlı | T 0.38 | 0.523 | 0.727 | VUS |
| ***TH*** | het. Ex13; c.1411G>T; p.A471S | rs374465917 | 1 | 2 | 0.00010/12 | | Zararlı | D 0.03 | 0.992 | 0.990 | VUS |
| ***CP*** | het. Ex16; c.2684G>C; p.G895A | CM066769; rs139633388 | 1 | 1 | 0.0015/177 | 0.0008/4 | Zararlı | D 0.02 | 1.000 | 1.000 | Olası Patojenik |

(T: Tolere edilebilir, D: Zararlı)

# 5. TARTIŞMA

Nörodejeneratif bir hastalık olan PH, OD, OR, X'e bağlı resesif ya da multifaktoriyel kalıtım gösterir ve olguların %5-10'unda monogenik kalıtım gözlenmektedir. Hastalığın görülme sıklığı yaştan bağımsız olarak 100.000'de 13.4, bir insanın ömrü boyunca hastalık geliştirme riski ise %1-2 olarak bildirilmektedir. İlerleyen yaşla görülme sıklığı artmakla birlikte, erken başlangıçlı formları da bulunmaktadır. Günümüzde PH ilişkili 23 lokus ve bu lokuslarda yer alan 19 gen tanımlanmış olup genom boyu çalışmalarla her geçen gün hastalık ilişkili yeni genler tanımlanmaya devam etmektedir (6).

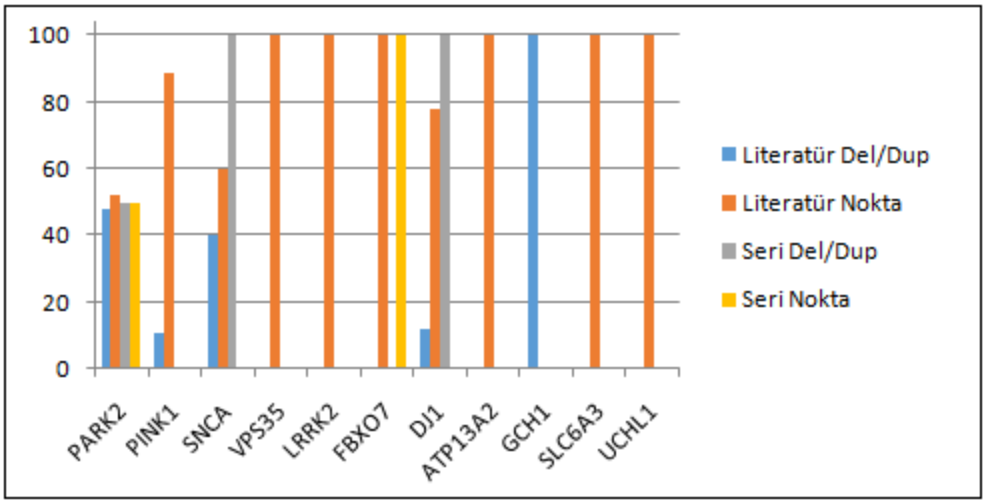
Hastalığın genetik etiyolojisinin aydınlatılması, klinik açıdan henüz tedaviyi yönlendirmese de prognoz hakkında bilgi sağlamakta, hastaya ve ailesine verilecek genetik danışmayı belirlemektedir. OD ve OR genlerin saptanması durumunda genetik danışmada klasik riskler verilebilirken, multifaktöriyel veya ilişkili genin belirlenemediği olgularda riskin topluma göre 2.7 ile 3.5 kat arttığı, bu bireylerin ömürleri boyunca hastalığa yakalanma riskinin %3 -7 arasında değiştiği bilgisi verilebilmektedir (5). Hastalık ilişkili mutasyon/genin saptanması durumunda aile bireylerinde presemptomatik tanı olanağı doğmaktadır. Hastalığın etyopatogenezinin aydınlatılmasına yönelik araştırmalar, ilişkili metabolik yolakların belirlenmesine ve daha etkin ilaçların ve genetik tedavilerin geliştirilmesine olanak sağlayacaktır.

Bu tez çalışmasında, klinik açıdan PH tanısı alan hastalarda tanı amaçlı hedef genlerin YND panel-gen testi ve eş zamanlı MLPA analizleri ile incelenerek, kendi popülasyonumuza ait mutasyon oranlarını saptamak, mutasyon bulunmayan uygun ailelerde ise tüm ekzom çalışmalarıyla yeni genlerin araştırılması planlanmıştı. Tüm ekzom çalışması için uygun olgular belirlenmiş olmasına rağmen üst kuşakların ve kardeşlerin çoğu zaman hayatta olmamaları sebebiyle klinik değerlendirilme yapılamamış ve DNA eldesine uygun materyale ulaşılamamış ya da aile üyeleri çalışmaya katılmayı kabul etmediklerinden bu çalışma gerçekleştirilememiştir.

Literatürde PH ile ilişkili genlerin büyük çoğunluğunda DNA dizi analizleri ile saptanabilen küçük mutasyonlar ve *DJ1, ATP13A2, PINK1, SNCA, PRKN, LRRK2* ve *GCH1* genlerinde büyük delesyon ve duplikasyonların bulunduğu bildirilmiştir (5). PH olgularında monogenik kalıtım uyumlu genlerde mutasyon oranı %5-10 (6) arasında

bildirilirken, serimizde bu oran %23,8 olarak saptandı. Ülkemizde yapılmış çalışmalarda da bu oranın yüksek (%16,9) olduğu gözlenmektedir (241). Bunun sebebi literatürde de belirtildiği gibi toplumumuzda akraba evliliklerinin sıklığı nedeniyle OR kalıtımlı genlerde saptanan mutasyonlardır. Türkiye genelinde akraba evliliği oranı %21 iken bu oran çalışma grubumuzda %39,5 mutasyon saptananlar içinde ise %93 idi. Nitekim, serimizde mutasyon saptanan genlerden üçü OR kalıtım, biri ise OD kalıtım göstermekteydi.

Literatürde genlere göre bildirilen delesyon ve duplikasyonlar ile nokta mutasyonların oranları serimizdeki oranlarla karşılaştırıldığında (Şekil 5.1), serimizde *PINK1*, *VPS35*, *LRRK2*, *ATP13A1*, *GCH1*, *SLC6A3* ve *UCHL1* genlerinde hiç mutasyon saptanmadığı göslenmektedir *PRKN* geninde saptanan mutasyon oranları ve tiplerinin literatür ile uyumlu olduğu, *SNCA* ve *DJ1* geninde büyük mutasyonların serimizde literatüre göre daha yüksek oranda bulunduğu görülmektedir. Literatürde sıklıkla nokta mutasyonu saptandığı bildirilen *VPS35, LRRK2, ATP13A2, SLC6A3* ve *UCHL1* genlerinde ve delesyon/duplikasyon saptandığı bildirilen *GCH1* geninde, serimizde mutasyon saptanmamış olması olgu sayımızın azlığı ile açıklanabilir. Literatür ile uyumlu olarak *FBX07* genindeki mutasyonların tümü dizileme yöntemi ile saptanabilecek nitelikte bulunmuştur.




**Şekil 5-1: PH'nda saptanan mutasyon tiplerinin genlere göre dağılımı. Lill ve ark. (242)yayınından değiştirilerek ve serimizdeki bilgiler eklenerek hazırlanmıştır.**

Serimizde en yüksek mutasyon oranı *PRKN* geninde (%14.3) saptanmıştı (Tablo 4.1). Literatürde *PRKN* genine ait 317 mutasyon bildirilmiştir (HGMD, 26.06.2018). Serimizdeki 9 olguda bu mutasyonlardan 9'u gözlenmiştir. Mutasyonu belirlenebilen EB-PH olgularının %49'unda görüldüğü bildirilen (6) *PRKN* mutasyonları, serimizdeki EB-PH olguların %64,2'inde bulunmuştur ki bu sonuç yüksek akraba evliliği ile açıklanabilir. Diğer toplumlarda <%1 altında yani nadir olarak bildirilen (5) OR kalıtımlı *PRKN* geninin serimizde tüm PH olgularının %14,3'ünde mutasyon saptanmış olması, Türkiye'den sunulan başka çalışmalarda da bu oranın %4 ila %18,6'sında bulunmuş olması (241, 243, 244), toplumumuzdaki PH olgularında *PRKN* geninin mutasyon frekansının yüksek olduğunu göstermektedir. *PRKN* genindeki mutasyon oranının yıllar içinde yükseliyor olması ise bu gende hem büyük hem de küçük mutasyonları saptamada teknolojinin rezolüsyon ve hız açısından ilerlemesi ile paralellik göstermektedir. İlk olarak, *PRKN* geni ile ilişkili 1998 yılında Kitada ve ark.'nın (1998) (66) yayınladığı ve proteini için ''Parkin'' isimlendirilmesi yapılan çalışmada OR-PH taşıyan 5 ailede D6S305 ve D6S253 markörleriyle ekzon 4 ve 5-7'yi içeren delesyonlar saptanmıştı. Aynı yıl yayınlanan diğer çalışmalarda (245, 246) mikrosatellit markörleriyle genin farklı ekzonlarını içeren delesyonlar bildirilmişti. İlerleyen yıllarda MLPA tekniğinin kullanılmasıyla (247) ekzon del/dup saptanma oranları artmıştır.

Olgu#190'da homozigot olarak saptanan *PRKN* geni ekzon 2 delesyonu ilk olarak Lücking ve ark. (2000) (248) tarafından tanımlanmıştır. Bu çalışmada 73 aileden izole ve ailevi 152 etkilenmiş ve 53 etkilenmemiş birey incelenmiş ve çeşitli küçük ve büyük mutasyonlar saptanan olgular arasında klinik fark olmadığı, akraba evliliği bulunan izole veya ailevi olgularda mutasyon oranı yakın (%50 ve %62) bulunduğu bildirilmiştir. Olgularımızın ikisinde (Olgu#15 ve Olgu#157) homozigot olarak saptanan üçüncü ekzon delesyonu ilk olarak 1998 yılında Lücking ve ark. (1998) (245) tarafından biri Fransız diğeri Portekizli iki ailede bildirilmişti. Yazarlar, bu mutasyonu taşıyan olguların, serilerindeki nokta mutasyonu taşıyan olgulara oranla daha düşük frekansta tremorları ve daha ağır bir klinik tabloları olduğunu ve ailelerinin akraba evliliği yapmadığını belirtmiştir. Akraba evliliği bulunan iki ailemizden birindeki olgulardan Olgu#157 tremor bildirilmezken, Olgu#15'de tremor bulgusu mevcuttu. Baba ve babaannesinde de PH bulunan bu olguda, YND panel incelemesinde AH ile ilişkili *APP* geninin 18. ekzonunda daha önce tanımlanmamış, *in silico* incelemelerde

‘’olası patojenik’’ sınıfında değerlendirilen c.2234A>G (p.E745G) değişimi homozigot olarak saptanmıştı. PH ile AH’nın birlikteliğini değerlendiren Burns ve ark. (2009) (249), parkin proteinin proteozomal aktiviteyi arttırarak *APP* geninin kodladığı proteinin kesim ürünlerinden olan ve hastalıkla ilişkilendirilen alfa- beta-42 fragmanlarını temizlediğini bildirmiştir. *APP* geninin heterozigot mutasyonları AH ile ilişkilendirilmekte, bilhassa proteinin alfa-beta kısmını kodlayan 16. ve 17. ekzonlarında hastalık ile ilişkili mutasyonlar tanımlanmaktadır (250). Bu bölgeler dışındaki mutasyonlarla ilgili bir çalışmada (251), serimizde saptanan değişimin koordinatlarına yakın, heterozigot durumda bir değişim saptanmış ancak bu varyantın kontrol grubunda da gözlendiği bildirilerek varyant “olası patojenik” grubunda değerlendirilmiştir. İlk olarak serimizde Olgu#15’de gözlenen *APP* geni ekzon 18 varyantının klinik etkisinin (PH ve AH açısından) araştırılmasında aile içi segregasyon çalışmalarının katkısı olacaktır. Demans paneli içerisinde değerlendirilen 430 allellik kontrol grubumuzda sadece bu olguda gözlenen bu varyantın hastalıkla ilişkili olması ya da klinik bulguları ağırlaştırması beklenmektedir.

Olgu#157'de tanımlı *PRKN* gen mutasyonun yanı sıra *SYNJ1* geninde ekzon 4 de tanımlı c:406C>T (p.R136*) heterozigot mutasyonu saptanmıştı. Bu mutasyonu homozigot olarak taşıyan olgularda (252) epileptik ataklar ve *tau* patolojisi tanımlanmıştır. Olgumuz ise değişimi heterozigot olarak taşımakta ve benzer bulgu göstermemektedir. Ancak bu varyantın PH kliniğine etkisi bilinmemektedir. Ailedeki etkilenmiş bireylerde de bu varyantın varlığı araştırılarak klinik etkisinin araştırılması literatüre katkı sağlayacağı kanısındayız.

Olgu#86‘da saptanan *PRKN* geni ekzon 3 ve 4’ü kapsayan homozigot delesyonu, Kobayashi ve ark. (2000) (253) tarafından, diskinezi ve levadopaya iyi cevap veren bir olguda saptanmıştı. Olgumuzun klinik bulguları da bu olgu ile uyumlu idi (Tablo 4.2). Aile ağacı incelemelerinde olgunun anne ve babasının aynı köyden olup, abisinde ve halasının iki çocuğunda da PH olduğu belirlenmişti. Aile ağacı incelemeleri ile olası etkilenmiş bireyler belirlenerek homozigot mutasyonlu bireylerin erken tedavi şansı olabileceği bilgisi genetik danışma ile verildi.

Serimizde *PRKN* ile ilişkili tanımlanmış 5 farklı nokta mutasyonu (Olgu#17, Olgu#54, Olgu#71, Olgu#105 ve Olgu#277) (Tablo 4.2) saptanmıştı. Olgu#17 de 2. ekzonda homozigot olarak bulunan c.167T>A (p.V56E) yanlış anlamlı mutasyon,

literatürde sadece biri İspanyol diğeri Kolombiya'lı 6 kuşaklı büyük bir ailede C212Y ile birlikte birleşik heterozigot formda bildirilmiştir (254, 255). Pineda-Trujillo ve ark. (2006) (255), C121Y mutasyonunun 15-17 kuşaktır Kolombiya'da bulunan İspanya kökenli bireylerde bulunduğunu ileri sürmüştür. Bizim olgumuzda ise homozigot olarak saptanan V56E mutasyonunun kökenini belirlemek mümkün olamamıştır. Populasyonumuzda bu mutasyonun tekrar saptanması durumunda STR markörleri ile ortak atanın araştırılması düşünülebilir.

Olgu#54'de saptanan 8. ekzonda homozigot c.931C>T (p.Q311*) anlamsız mutasyon, literatürde 1998 yılında Hattori ve ark. (1998) (256) tarafından akraba evliliği olan bir Türk hastada tanımlanmıştı. Bu olguda JB PH gözlenirken olgumuzda bulgular 38 yaşlarında başladığından EB-PH grubunda değerlendirilmiştir. Benzer PH bulguları gösteren ablasında ise moleküler çalışma tamamlanmamıştır. Olgunun diğer 5 kardeşinde ise herhangi bir klinik bulgu bulunmadığından moleküler çalışma henüz planlanmamıştır. Ancak aile, akraba evliliği yapılması durumunda taşıyıcılık açısından bireylerde test yapılmasının mümkün olduğu konusunda bilgilendirilmiştir.

Olgu#71' de gözlenen *PRKN* genindeki kırpılma hatasına yol açan homozigot c.1083+1delG mutasyonu Ghazavi ve ark. (2011) (257) İranlı akraba evliliği olan bir olgu ve kardeşinde bildirilmiştir. Bu olgunun Juvenil tipte olması, tremor ile postural insitabilite bulgularının varlığı ile olgumuzun kliniğinden farklılık (EB-PH) göstermektedir. Olgu#71'in aile ağacı incelendiğinde ailesinin aynı köyden gelmesi ve benzer bulguları olan abisi nedeniyle akraba evliliği olasılığı düşünülmüştü. Etkilenmiş ağabey aynı mutasyonu homozigot olarak taşımaktaydı ve akraba evliliği yapmıştı. Bu nedenle genetik danışmada kendi çocuklarında da bu hastalık için artmış risk bulunduğu bilgisi paylaşıldı. Bu mutasyonun yanı sıra indeks olguda *NOTCH3* geninin 33. ekzonunda heterozigot saptanan c.6061G>A (p.V2021M) değişiminin literatürde nadir varyant olarak tanımlı olduğu ve *in silico* analizde "VUS" olarak değerlendirildiği belirlendi. *NOTCH3*'ün OD kalıtımlı CADASIL hastalığından sorumlu olduğunun bilinmesi hastalığın önemli bulgularından biri olan migrenin bizim olgumuzda 45 yaşından itibaren görülüyor olması bu iki farklı hastalığın örtüşen bir bulgusu gibi düşünülse de olgumuzda ak madde değişimlerinin olmaması bu olası birlikteliği dışlayan durumlar olarak değerlendirilmiştir. Olgunun ak madde değişimleri açısından takip edilmesi söz konusu varyantın kliniğe etkisi hakkında katkı sağlayacaktır

Olgu#105'de bulunan *PRKN* genindeki ekzon 2 c.79_81delAAG (p.K27del) mutasyonu ilk olarak 2012 yılında (243) Türkiye'den akraba evliliği olan bir ailede tanımlanmıştır. Bu olgu, klinik bulguları ile de olgumuzla benzerlik göstermektedir. Etkilenmiş olduğu bildirilen iki dayısının moleküler analizleri ailenin çalışmaya katılmaması nedeniyle yapılamamıştır.

Olgu#277'de *PRKN* geninde ekzon 2'de saptanan c.125G>C (p.R42P) mutasyonu, ekzon 2-4 delesyonu ile birleşik heterozigot formda idi. Lücking ve ark. (2000) (248) *PRKN* için nokta mutasyonu gibi küçük mutasyonların delesyon ve duplikasyon gibi büyük mutasyonlarla birleşik heterozigot formda görülmesi ilk olarak İtalyan bir ailede gösterilmiştir. Olgumuzda görülen birleşik heterozigot mutasyonlar ise Morais ve ark. (2016) (258) tarafından akraba evliliği ve aile öyküsü olmayan 31 yaşındaki bir olguda bildirilmiştir. Olguda yapılan YND incelemelerinde, *LRRK2* genine ait daha önce tanımlanmamış ve ''VUS'' olarak değerlendirilen yanlış anlamlı bir değişim ile *SORL1* geninde ilk tanımlandığı yıllarda PH ile ilişkisi olduğu düşünülen ancak sonraki çalışmalarla zararsız olarak nitelendirilen iki varyant saptandı (Tablo 4.2). *LRRK2*'deki değişimin aile içi segregasyon analizleri ile araştırılması, etkisinin anlaşılmasına katkı sağlayabilir.

Serimizde ikinci en sık mutasyon saptanan gen, %4,8 oranı ile *SNCA* idi. Literatürde tüm PH olgularının %1-2'sinde *SNCA* geni mutasyonu saptandığı bildirilmektedir (241). Türkiye'den bugüne kadar bu gende 2 olguda tüm ekzonları kapsayan duplikasyon mutasyonu bildirilmiştir (241). Serimizde ise üç olguda duplikasyon mutasyonu (Olgu#7, Olgu#119, Olgu#263) saptanmasına karşın, nokta mutasyonuna rastlanmamıştır. GB-PH grubundaki Olgu#7'de genin tüm ekzonlarını içeren heterozigot duplikasyon 2004 de Singleton ve ark. (62) tarafından tanımlanmıştı. Mutasyonlu olgularda PH'ya özgü tüm kardinal bulgular görülürken olgumuzda tremor ve postural instabilite gözlenmemişti. Olgunun benzer klinik bulguları taşıyan ablasında da aynı mutasyon saptanmıştır. Etkilenmiş bu iki kardeşin YND analizlerinde olgumuzda *GBA* geninde ekzon 6 da Gaucher hastalığı ile ilişkisi bilinen heterozigot c.497A>t (p.D166V) değişimi saptanırken ablasında bulunmamıştır (Tablo 4.2). Olgu ve ablasında saptanan bir diğer değişim *NOTCH3* geninde gösterilen ve önceki literatürlerde hastalık ilişkili olduğu öne sürülen bir mutasyonun (c.509A>G; p.H170R) varlığı idi. İki olgu klinik açıdan incelendiğinde CADASIL hastalığına dair klinik bir

bulgu taşımadıkları belirlendi. En yeni veritabanlarında (HGMD) da bu değişim artık patojenik değil nadir bir varyant olarak yorumlanmaktadır. Literatürde *SNCA* duplikasyonunu homozigot olarak taşıyan bireylerin kliniğinin daha ağır olduğu (olgulardan birinde bulgular 25 yaşlarında başlayıp 48 yaşında kaybedilmiş) bildirilmiştir (91, 259). Serimizde EB-PH grubunda bu duplikasyonu homozigot olarak taşıyan Olgu#119 ve Olgu#263'de de hastalık seyrinin bir önce anlatılan heterozigot olguya göre daha hızlı olması literatürle uyumlu bulunurken, her iki olgunun hastalık başlangıç yaşının literatürdeki olgunun aksine daha ileri yaşta başlamış olması (39 ve 35 yaş) literatürle uyumsuz bulunmuştur; olgularımız henüz (45 ve 42 yaş) hayattadırlar.

Serimizde %3.2 oranı ile ***FBXO7***'geni en sık mutasyon saptanan genler içinde üçüncü sırada yer almıştır. Bu güne kadar gende sadece nokta mutasyonları tanımlanmış büyük mutasyonlar gösterilmemiştir (242). Ebeveynleri yakın köylerden olan Olgu#160'da saptanan 9. ekzonda c.1492C>T (p.R498*) anlamsız mutasyon, daha önce 6 farklı çalışmada (110, 260-264) bildirilmiştir. İtalyan'dan ) akraba evliliği bilinmeyen ancak mutasyonu homozigot taşıdığı gösterilen olguda da olgumuz gibi JB-PH ve benzer klinik seyir tanımlanmıştır(110). Pakistan ile Türkiye'nin Güneydoğu Anadolu bölgesinden olguların bildirildiği diğer çalışmalarda da bu mutasyonu homozigot taşıyan olguların ağır bir hastalık seyri ile 30'lu yaşlarda kaybedildikleri bildirilmiştir. 13 yaşında hastalık bulguları başlayarak 28 yaşında kaybedilen bir ablası bulunan ve 14 yaşında iken bulguları başlayan olgumuz henüz 22 yaşındadır. Olgumuzda ek olarak frontotemporal demans ile ilişkili *MAPT* geninde değişim gösterilmiş (tablo 4.2) olsa da klinik bulguların ortaya çıkması için (40-60 yaş) olgumuz henüz çok gençtir (265).

Olgu#255'de ekzon 1 deki c.101T>G(p.L34R) mutasyonu literatürde ilk defa 2015 yılında Lohmann ve ark. (2015) (263) tarafından akraba evliliği yapan Türk bir ailenin iki bireyinde tanımlanmıştır. Olgumuz, bu olgularla benzer şekilde EB-PH grubunda değerlendirilmiştir. YND analizinde ek olarak çocukluk çağı distoni ile ilişkilendirilen *GCH1* geninde tanımlı bir değişim saptanmıştır (tablo 4.2). Literatürde değişim ilk yıllarda patojenik olarak değerlendirilmekle birlikte, sonraki yıllarda "benign" olarak yorumlanmıştır. Olgumuzda da distoni bulgusunun olmaması değişimin zararsız olduğunu desteklemektedir.

Serimizde mutasyon saptanan genler arasında %1,6 ile dördüncü sırada yer alan ***DJ1***geninin HGMD'de tanımlı 30 varyantı bulunmaktadır. PH olgularında *DJ1* geni mutasyon saptanma oranı nadir olarak tanımlanmaktadır (5).

Olgu#85'de saptadığımız *DJ1* geninin 1-5 ekzonları kapsayan homozigot delesyon, Bonifati ve ark. (2003) (84) tarafından akraba evliliği bulunan Hollandalı bir ailede tanımlanmıştır. Ancak klinik bulgular açısından tremor ve postural insitabilite gözükmemesiyle olgumuz bu olgu ile farklılık göstermektedir. Daha önce Türkiye'den olguların yer aldığı 3 çalışmada 5 olguda (üçü aynı aileden) 3 farklı mutasyon tanımlanmıştır (244, 266, 267).

Literatürde en sıklıkla mutasyon saptanan gen ***LRRK2*** geni olmasına karşın serimizde bu gende mutasyon saptanmamış olması ilgi çekicidir. Bu gen mutasyonlarının PH olgularında görülme sıklığı %1 olarak bildirmekle birlikte, en sıklıkla Kuzey Afrika Araplarında (sporadik olgularda %36, ailevi olgularda %42) gösterilmiştir (268). Türkiye olgu serilerinde mutasyon oranı "ender" olarak (269) tanımlanmış, ancak son çalışmada %1.1 olarak bildirilmiştir (241). Çalışma grubumuzda *LRRK2* geninde tanımlı herhangi bir mutasyon saptanmaması olgu grubumuzun yeterli büyüklükte (n=63) olmaması, *LRRK2* mutasyonlarının geç başlangıçlı formlarla ilişkili olmasına karşın olgu grubumuzun önemli bir kısmının (50/63) EB- PH grubunda yer alması ile açıklanabilir. YND incelemelerinde patojenik mutasyonu bulunmayan 5 farklı bireyde *LRRK2* geninde 5 varyant saptanmıştı. Hepsi tanımlı bu varyantlardan biri izole, bir diğeri ise *GAK* geninde saptanan tanımlı ve sessiz bir varyantla (olası benign) birlikte bulunan sessiz değişimlerdi. Geri kalan tanımlı 3 varyant *in silico* incelemelerde ''VUS'' olarak değerlendirilmiş olan yanlış anlamlı değişimlerdi. Bu varyantların tek tek ya da klinik açıdan genetik bir yük getirip getirmediğininaraştırılması için aile içi segregasyon çalışmalarının yapılması ve daha büyük olgu gruplarının çalışılması gerekmektedir.

Hastalık ilişkili tanımlanmış bir mutasyonu olmayan 48 olgudaki YND filtre işlemlerinin ardından *in silico* analizler sonucunda 3'ü "benign", 22'si "olası benign", 33'ü "VUS',' biri de "olası patojenik" varyant saptanmıştı (Tablo 4.4). Kalıtım modeli ile uygun varyantların klinik etkilerinin araştırılması açısından bu ailelerde segregasyon analizi yapılması uygun olacaktır ve sonuçlar literatüre katkı sağlayacaktır.

*CP,* serebellar ataksi ve aseruloplazmi ile ilişkilendirilen OR bir gendir. Ancak, parkinsonizm, diabetis mellitus bulguları da gözlenen aseruloplazmi tanılı Japon bir olguda 1. ekzonunda bir bazlık homozigot delesyon saptanması nedeniyle YND paneline alınmıştı (136). Olgularımızdan birinde farklı bir ‘’olası patojenik’’ olarak değerlendirilen varyant heterozigot formda gözlendi (Tablo 4.4) ve kalıtım kalıbına uymaması nedeniyle PH ilişkili olamayacağı düşünüldü. Bu olguda CADASIL ilişkili OD *NOTCH3* geninde de *“*olası zararsız” bir varyant da saptanmıştı. Farklı genlerdeki varyantların karşılıklı etkilerinin araştırılması açısından bu olguların ve bilgilerin izlenmesi gerekmektedir.

Hastalık ilişkili tanımlanmış bir mutasyonu olmayan olgularda saptanan varyantlardan 34’ü intervar analizi ile VUS grubunda değerlendirilmişti. Varyantların 7’si ilk olarak bu çalışmada saptanmış ve bunlardan dördü PH ilişkili dört gende (*GBA, ATP13A2, SYNJ1, EIF4G1*) gözlenen yanlış anlamlı değişimlerdi.

Gaucher hastalığı ile ilişkili OR *GBA* geninde saptanan varyantın *in silico* incelemelerde "VUS" olarak değerlendirilmesinin sebebi, daha önce tanımlı olmaması, gendeki heterozigot değişimlerin PH ilişkili olarak bildirilmesi ve varyantın bulunduğu kodonun hastalık ilişkili hot spot noktada bulunmasıdır. GBA heterozigot varyantları, GB-PH grubunda gözlenmekte ve lizozomal işlevlerin bozulmasına yol açarak hastalığın ortaya çıkmasına neden olduğu düşünülmektedir. EB-PH grubundaki hastamızda bu varyantın segregasyon analizleri ile değerlendirilmesi literatüre katkı sağlayacaktır.

OR *ATP13A2* geni de *GBA* gibi lizozomal fonksiyonlarda görevlidir. Homozigot mutasyonlarının tipik ve EB-PH da görülür. Ancak, Di Fonzo ve ark. (2007) (41) EB-PH hastalarında heterozigot mutasyonlar göstermişler ve bunların da hastalıkla ilişkili olabileceğini ileri sürmüşlerdir. Bu gende saptadığımız missense varyantın PH ile ilişkili tanımlı başka bir mutasyona yakın bölgede yer alması ve daha önce tanımlanmamış olması sebebiyle *in silico* analizlerde "VUS" olarak değerlendirilmiştir. Bu sonuç Di Fonzove ark.’ nın görüşünü desteklemiş, ancak olgumuzun benzer bulgular gösteren bir kuzeni ile kendinden küçük ve bulgu göstermeyen 5 kardeşinde segregasyon analizi, varyantın heterozigot formlarının klinik ilişkili olup olmadığını değerlendirme konusunda önemli olacaktır.

OR *SYNJ1* geninde saptanan varyant (Tablo 4.4) daha önce tanımlanmamış ve *in silico* değerlendirme programları tarafından "zararlı mutasyon" olarak bildirilmiş olmasından dolayı "VUS" olarak değerlendirilmiştir. *SYNJ1* mutasyonlarının homozigot formlarının PH ilişkisi literatürde tanımlanmış, ancak heterozigot varyantların da ilişkili olabileceği Quadri ve ark. (2013) (116) tarafından bildirilmiştir. GB-PH grubundaki bir hastamızın iki sağlıklı bir de benzer bulguları olan kardeşi bulunmaktadır. Bu değişimin klinik etkisinin aydınlatılmasında ailede yapılacak segregasyon analizi önemli katkılar sağlayacaktır.

OD *EIF4G1* genindeki heterozigot mutasyonları GB-PH ile ilişkilendirilmektedir. Olgumuzdaki (Olgu#168, Tablo 4.4) daha önce tanımlanmamış olan varyant, mutasyonel hot spot bölgesinde yer alması sebebiyle yapılan değerlendirilmede "VUS" olarak tanımlanmıştır. Olgumuzun hastalık başlangıç yaşı (EB-PH), HGMD'de hastalık ilişkisi kesinleşen varyantları taşıyan olgular ile örtüşmekteydi.

3 olgu da 7 farklı gende VUS grubunda değerlendirilen 8 adet VUS olarak değerlendirilen varyantlar (2 olguda 3 VUS ve 1 olguda 2 VUS) saptanmıştı. PH'da "digenik kalıtım" 4 yayında bildirilmiştir (270-273). Bu yayınlarda, digenik kalıtım, *PRKN* genindeki heterozigot tanımlı mutasyonların *PINK1*, *LRRK2* ve *DJ1* genlerindeki diğer heterozigot mutasyonlarla birlikte görüldüğü olgularda gösterilmiştir. Serimizde *PRKN* geninde iki olguda heterozigot formda saptanan tanımlı mutasyonlar (Tablo 4.4; Olgu#134 ve Olgu#171), bir olguda *GBA* geninde tanımlı sessiz bir mutasyon ile *PSEN2* geninde (AH ilişkili) tanımlı nadir bir varyantla, diğer olguda *POLG* ve *FBXO7*genlerinde nadir varyantlarla birlikte saptanmıştı. Ailelerin segregasyon analiz sonuçları digenik kalıtımın araştırılmasında önemli katkılar sağlayabilir.

VUS olarak değerlendirilen 33 varyantın 8'i gen panelinde AH ilişkili genlerde saptanmıştı. Bu varyantlar tanımlı olmalarına rağmen toplumlarda nadir görülen varyantlardı, ancak PH ilişkili olarak değerlendirilmediğinden olguların AH açısından izlemi önerilebilir.

OR kalıtımlı farklı genlerde izole ya da ''olası benign'' varyantlarla birlikte gözlenen10 heterozigot varyant (tablo 4.4) intervar analizi ile ''VUS'' olarak değerlendirilse de kalıtım kalıbı ile desteklenmediğinden hastalık ilişkili bulunmamıştır.

Serimizde 6 olguda intervar analizi ile VUS olarak değerlendirilse de kalıtım modeline uymadıklarından klinik ilişkili bulunmayan 6 varyant değerlendirilemeye alınmadı.

YND teknolojisi kullanımıyla, tüm ekzonyada tüm genom çalışmaları öncesinde, birden fazla gen ve/veya büyük gen içeren hastalıklarda panel-gen testi kullanımı, mutasyon saptama oranını arttırmakta, maliyet, iş gücü ve harcanan zamanı belirgin oranda azaltmaktadır. Ülkemizde ve kohortumuzda akraba evliliğinin sık olması, serimizde OR kalıtımla ilişkili genlerde mutasyon saptanma oranını arttırmıştır. Bu çalışmada, PH olgularında YND ve MLPA tekniklerinin birlikte kullanımı sayesinde daha önce Türkiye toplumunda bildirilmemiş mutasyonlar gösterilebilmiştir. Serimizde ulaşılan yurtdışı ve diğer Türkiye serilerine göre daha yüksek mutasyon saptama oranı, YND temelli panel gen yaklaşımının, PH gibi ileri yaşa özgü ve monogenik formların düşük oranda gözlendiği hastalıklar için etkin ve uygun bir seçenek olduğunu göstermiştir.

İleri yaşa özgü hastalıklarla ilişkili panellerde, mutasyon saptama olasılıkları yüksek olmakla beraber, elde edilen varyantların değerlendirebileceği kontrol gruplarının az olması ve üst kuşaklara ait inceleme materyallerine ulaşılamaması gibi nedenlerle biyoinformatik analiz aşamasında zorluklarla karşılaşılmaktadır. Üst kuşaklara ve sağlıklı bireylerdeki varyantlara ulaşamama sadece panel gen testlerinde değil, tüm ekzom ve tüm genom çalışmalarında da bir sorun olarak ortaya çıkmaktadır. Bu sorunun üstesinden gelebilmek amacıyla ülkemize özgü sağlıklı yaşlılara ait elde edilen bilgilerin toplanacağı bir veri bankasının oluşturulması bir seçenek olabilir.

## KAYNAKLAR


1. Thenganatt, M.A. and E.D. Louis, *Distinguishing essential tremor from Parkinson's disease: bedside tests and laboratory evaluations.* Expert review of neurotherapeutics, 2012. **12**(6): p. 687-696.
2. Jankovic, J., *Parkinson's disease: clinical features and diagnosis.* Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry, 2008. **79**(4): p. 368-376.
3. Jankovik, J., *Pathophysiology and assessment of parkinsonian symptoms and signs.* Handbook of Parkison_s disease. New York: Taylor & Francis, 2007. **4975**.
4. Rodriguez-Oroz, M.C., et al., *Initial clinical manifestations of Parkinson's disease: features and pathophysiological mechanisms.* The Lancet Neurology, 2009. **8**(12): p. 1128-1139.
5. Farlow, J., et al., *Parkinson disease overview.* 2014.
6. Deng, H., P. Wang, and J. Jankovic, *The genetics of Parkinson disease.* Ageing Res Rev, 2018. **42**: p. 72-85.
7. Parkinson, J., *An essay on the shaking palsy* 1817, London.
8. PJ, G.R., *Prehistory of Parkinson's disease.* Neurologia (Barcelona, Spain), 2004. **19**(10): p. 735-737.
9. Lees, A.J., *Unresolved issues relating to the shaking palsy on the celebration of James Parkinson's 250th birthday.* Movement disorders, 2007. **22**(S17).
10. Gibb, W., *Neuropathology of the substantia nigra.* European neurology, 1991. **31**(Suppl. 1): p. 48-59.
11. Braak, H., et al., *Stages in the development of Parkinson's disease-related pathology.* Cell and tissue research, 2004. **318**(1): p. 121-134.
12. Torata Sano, D., *Beitrag zur vergleichenden Anatomie der Substantia nigra, des Corpus Luysii und der Zona incerta.* European Neurology, 1910. **27**(2): p. 110-127.
13. Garcia-Ruiz, P.J. and A.J. Espay, *Parkinson Disease: An Evolutionary Perspective.* Frontiers in neurology, 2017. **8**: p. 157.
14. Lang, A. and A. Lozano, *REVIEW ARTICLES-Medical Progress: Parkinson's Disease (First of Two Parts).* New England Journal of Medicine-Unbound Volume, 1998. **339**(15): p. 1044-1053.
15. Chinta, S.J. and J.K. Andersen, *Dopaminergic neurons.* The international journal of biochemistry & cell biology, 2005. **37**(5): p. 942-946.

16. Trinh, J. and M. Farrer, *Advances in the genetics of Parkinson disease.* Nature Reviews Neurology, 2013. **9**(8): p. 445.

17. Kumar, P., S. Henikoff, and P.C. Ng, *Predicting the effects of coding non-synonymous variants on protein function using the SIFT algorithm.* Nature protocols, 2009. **4**(7): p. 1073.

18. Kuno, M., *The synapse: function, plasticity, and neurotrophism*. 1995: Oxford University Press, USA.

19. Jakes, R., M.G. Spillantini, and M. Goedert, *Identification of two distinct synucleins from human brain.* FEBS letters, 1994. **345**(1): p. 27-32.

20. Giasson, B.I., et al., *Oxidative damage linked to neurodegeneration by selective α-synuclein nitration in synucleinopathy lesions.* Science, 2000. **290**(5493): p. 985-989.

21. Berrocal, R., et al., *α-Synuclein misfolding versus aggregation relevance to Parkinson's disease: Critical assessment and modeling.* Molecular neurobiology, 2015. **51**(3): p. 1417-1431.

22. Ernster, L. and G. Schatz, *Mitochondria: a historical review.* J Cell Biol, 1981. **91**(3): p. 227s-255s.

23. Wiesner, R.J., J.C. Rüegg, and I. Morano, *Counting target molecules by exponential polymerase chain reaction: copy number of mitochondrial DNA in rat tissues.* Biochemical and biophysical research communications, 1992. **183**(2): p. 553-559.

24. Panov, A., et al., *Rotenone Model of Parkinson Disease Multiple Brain Mitochondria Dysfunctions after Short Term Systemic Rotenone Intoxication.* Journal of Biological Chemistry, 2005. **280**(51): p. 42026-42035.

25. Langston, J.W., et al., *Chronic Parkinsonism in humans due to a product of meperidine-analog synthesis.* Science, 1983. **219**(4587): p. 979-980.

26. Franco-Iborra, S., M. Vila, and C. Perier, *The Parkinson disease mitochondrial hypothesis: where are we at?* The Neuroscientist, 2016. **22**(3): p. 266-277.

27. Lenaz, G., et al., *Mitochondrial Complex I: structural and functional aspects.* Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics, 2006. **1757**(9-10): p. 1406-1420.

28. Bose, A. and M.F. Beal, *Mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease.* Journal of neurochemistry, 2016. **139**(S1): p. 216-231.

29. Nutt, J., *Australasian Society of Clinical and Experimental Pharmacologists and Toxicologists, 1994: PHARMACODYNAMICS OF LEVODOPA IN PARKINSON'S DISEASE.* Clinical and experimental pharmacology and physiology, 1995. **22**(11): p. 837-840.

30. Thanvi, B., N. Lo, and T. Robinson, *Levodopa-induced dyskinesia in Parkinson's disease: clinical features, pathogenesis, prevention and treatment.* Postgraduate medical journal, 2007. **83**(980): p. 384-388.

31. Chinta, S.J., et al., *Mitochondrial alpha-synuclein accumulation impairs complex I function in dopaminergic neurons and results in increased mitophagy in vivo.* Neuroscience letters, 2010. **486**(3): p. 235-239.

32. Jiang, Y., T. Ellis, and A.R. Greenlee, *Genotyping Parkinson disease-associated mitochondrial polymorphisms.* Clinical medicine & research, 2004. **2**(2): p. 99-106.

33. Ienco, E.C., et al., *May "mitochondrial eve" and mitochondrial haplogroups play a role in neurodegeneration and Alzheimer's disease?* International Journal of Alzheimer's Disease, 2011. **2011**.

34. Chen, Y.-F., et al., *Mitochondrial DNA haplogroups and the risk of sporadic parkinson's disease in han Chinese.* Chinese medical journal, 2015. **128**(13): p. 1748.

35. Moon, H.E. and S.H. Paek, *Mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease.* Experimental neurobiology, 2015. **24**(2): p. 103-116.

36. Dehay, B., et al., *Lysosomal impairment in Parkinson's disease.* Movement Disorders, 2013. **28**(6): p. 725-732.

37. Deng, H., X. Xiu, and J. Jankovic, *Genetic convergence of Parkinson's disease and lysosomal storage disorders.* Molecular neurobiology, 2015. **51**(3): p. 1554-1568.

38. Nichols, W., et al., *Variation in GIGYF2 is not associated with Parkinson disease.* Neurology, 2009. **72**(22): p. 1886-1892.

39. Cuervo, A.M., et al., *Impaired degradation of mutant α-synuclein by chaperone-mediated autophagy.* Science, 2004. **305**(5688): p. 1292-1295.

40. Hampshire, D.J., et al., *Kufor-Rakeb syndrome, pallido-pyramidal degeneration with supranuclear upgaze paresis and dementia, maps to 1p36.* Journal of medical genetics, 2001. **38**(10): p. 680-682.

41. Di Fonzo, A., et al., *ATP13A2 missense mutations in juvenile parkinsonism and young onset Parkinson's disease.* Movement Disorders, 2007. **22**: p. S134-S135.

42. Le, W.-d., et al., *Mutations in NR4A2 associated with familial Parkinson disease.* Nature genetics, 2003. **33**(1): p. 85.

43. Sleiman, P., et al., *Characterisation of a novel NR4A2 mutation in Parkinson's disease brain.* Neuroscience letters, 2009. **457**(2): p. 75-79.

44. Bergman, O., et al., *PITX3 polymorphism is associated with early onset Parkinson's disease.* Neurobiology of aging, 2010. **31**(1): p. 114-117.

45. Toda, T., et al., *Toward identification of susceptibility genes for sporadic Parkinson's disease.* Journal of neurology, 2003. **250**(3): p. iii40-iii43.

46. Xiromerisiou, G., et al., *BDNF tagging polymorphisms and haplotype analysis in sporadic Parkinson's disease in diverse ethnic groups.* Neuroscience letters, 2007. **415**(1): p. 59-63.

47. Bressman, S., *Dystonia: phenotypes and genotypes.* Revue neurologique, 2003. **159**(10 Pt 1): p. 849-856.

48. Karamohamed, S., et al., *A haplotype at the PARK3 locus influences onset age for Parkinson's disease The GenePD study.* Neurology, 2003. **61**(11): p. 1557-1561.

49. Sharma, M., et al., *The sepiapterin reductase gene region reveals association in the PARK3 locus: analysis of familial and sporadic Parkinson's disease in European populations.* Journal of medical genetics, 2006. **43**(7): p. 557-562.

50. Healy, D.G., et al., *A functional polymorphism regulating dopamine β-hydroxylase influences against Parkinson's disease.* Annals of neurology, 2004. **55**(3): p. 443-446.

51. Healy, D., et al., *Tau gene and Parkinson's disease: a case–control study and meta-analysis.* Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry, 2004. **75**(7): p. 962-965.

52. Kang, S.J., et al., *Family-based case–control study of MAOA and MAOB polymorphisms in Parkinson disease.* Movement disorders, 2006. **21**(12): p. 2175-2180.

53. Yoritaka, A., et al., *Catechol-O-methyltransferase genotype and susceptibility to Parkinson's disease in Japan.* Journal of neural transmission, 1997. **104**(11-12): p. 1313-1317.

54. Ritz, B.R., et al., *Dopamine transporter genetic variants and pesticides in Parkinson's disease.* Environmental health perspectives, 2009. **117**(6): p. 964.

55. Orr, C., D. Rowe, and G. Halliday, *An inflammatory review of Parkinson's disease.* Progress in neurobiology, 2002. **68**(5): p. 325-340.

56. Hunot, S., et al., *Nuclear translocation of NF-κB is increased in dopaminergic neurons of patients with Parkinson disease.* Proceedings of the National Academy of Sciences, 1997. **94**(14): p. 7531-7536.

57. Zhang, Y., V.L. Dawson, and T.M. Dawson, *Oxidative stress and genetics in the pathogenesis of Parkinson's disease.* Neurobiology of disease, 2000. **7**(4): p. 240-250.

58. Krüger, R., et al., *Genetic analysis of immunomodulating factors in sporadic Parkinson's disease.* Journal of neural transmission, 2000. **107**(5): p. 553-562.

59. Mattila, K., et al., *Association of an interleukin 1B gene polymorphism (− 511) with Parkinson's disease in Finnish patients.* Journal of medical genetics, 2002. **39**(6): p. 400-402.

60. Marras, C., et al., *Fixing the broken system of genetic locus symbols Parkinson disease and dystonia as examples.* Neurology, 2012. **78**(13): p. 1016-1024.

61. Polymeropoulos, M.H., et al., *Mapping of a gene for Parkinson's disease to chromosome 4q21-q23.* Science, 1996. **274**(5290): p. 1197-1199.

62. Singleton, A., et al., *α-Synuclein locus triplication causes Parkinson's disease.* Science, 2003. **302**(5646): p. 841-841.

63. Fuchs, J., et al., *Phenotypic variation in a large Swedish pedigree due to SNCA duplication and triplication.* Neurology, 2007. **68**(12): p. 916-922.

64. Yavich, L., et al., *Role of α-synuclein in presynaptic dopamine recruitment.* Journal of Neuroscience, 2004. **24**(49): p. 11165-11170.

65. Fortin, D.L., et al., *Lipid rafts mediate the synaptic localization of α-synuclein.* Journal of Neuroscience, 2004. **24**(30): p. 6715-6723.

66. Kitada, T., et al., *Mutations in the parkin gene cause autosomal recessive juvenile parkinsonism.* Nature, 1998. **392**(6676): p. 605-8.

67. Oliveri, R., et al., *The parkin gene is not involved in late-onset Parkinson's disease.* Neurology, 2001. **57**(2): p. 359-362.

68. Hedrich, K., et al., *Evaluation of 50 probands with early-onset Parkinson's disease for Parkin mutations.* Neurology, 2002. **58**(8): p. 1239-1246.

69. Illarioshkin, S.N., et al., *Mutation analysis of the parkin gene in Russian families with autosomal recessive juvenile parkinsonism.* Movement disorders, 2003. **18**(8): p. 914-919.

70. Kann, M., et al., *The parkin gene is not involved in late-onset Parkinson's disease.* Neurology, 2002. **58**(5): p. 835-835.

71. Sinha, R., et al., *Prevalence of parkin gene mutations and variations in idiopathic Parkinson's disease.* Parkinsonism & related disorders, 2005. **11**(6): p. 341-347.

72. Lohmann, E., et al., *How much phenotypic variation can be attributed to parkin genotype?* Annals of neurology, 2003. **54**(2): p. 176-185.

73. Shimura, H., et al., *Familial Parkinson disease gene product, parkin, is a ubiquitin-protein ligase.* Nature genetics, 2000. **25**(3): p. 302.

74. Cookson, M.R., et al., *RING finger 1 mutations in Parkin produce altered localization of the protein.* Human molecular genetics, 2003. **12**(22): p. 2957-2965.

75. Kuroda, Y., et al., *Parkin enhances mitochondrial biogenesis in proliferating cells.* Human molecular genetics, 2006. **15**(6): p. 883-895.

76. Leroy, E., et al., *The ubiquitin pathway in Parkinson's disease.* Nature, 1998. **395**(6701): p. 451.

77. Wilkinson, K.D., et al., *The neuron-specific protein PGP 9.5 is a ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase.* Science, 1989. **246**(4930): p. 670-673.

78. Liu, Y., et al., *The UCH-L1 gene encodes two opposing enzymatic activities that affect α-synuclein degradation and Parkinson's disease susceptibility.* Cell, 2002. **111**(2): p. 209-218.

79. Valente, E.M., et al., *Localization of a novel locus for autosomal recessive early-onset parkinsonism, PARK6, on human chromosome 1p35-p36.* The American Journal of Human Genetics, 2001. **68**(4): p. 895-900.

80. Li, Y., et al., *Clinicogenetic study of PINK1 mutations in autosomal recessive early-onset parkinsonism.* Neurology, 2005. **64**(11): p. 1955-1957.

81. Schiesling, C., et al., *Familial Parkinson's disease–genetics, clinical phenotype and neuropathology in relation to the common sporadic form of the disease.* Neuropathology and applied neurobiology, 2008. **34**(3): p. 255-271.

82. Gandhi, S., et al., *PINK1 protein in normal human brain and Parkinson's disease.* Brain, 2006. **129**(7): p. 1720-1731.

83. Van Duijn, C., et al., *Park7, a novel locus for autosomal recessive early-onset parkinsonism, on chromosome 1p36.* The American Journal of Human Genetics, 2001. **69**(3): p. 629-634.

84. Bonifati, V., et al., *Mutations in the DJ-1 gene associated with autosomal recessive early-onset parkinsonism.* Science, 2003. **299**(5604): p. 256-259.

85. Zhang, L., et al., *Mitochondrial localization of the Parkinson's disease related protein DJ-1: implications for pathogenesis.* Human molecular genetics, 2005. **14**(14): p. 2063-2073.

86. Mandemakers, W., V.A. Morais, and B. De Strooper, *A cell biological perspective on mitochondrial dysfunction in Parkinson disease and other neurodegenerative diseases.* Journal of cell science, 2007. **120**(10): p. 1707-1716.

87. Funayama, M., et al., *A new locus for Parkinson's disease (PARK8) maps to chromosome 12p11. 2–q13. 1.* Annals of neurology, 2002. **51**(3): p. 296-301.

88. Paisán-Ruíz, C., et al., *Cloning of the gene containing mutations that cause PARK8-linked Parkinson's disease.* Neuron, 2004. **44**(4): p. 595-600.

89. Zimprich, A., et al., *Mutations in LRRK2 cause autosomal-dominant parkinsonism with pleomorphic pathology.* Neuron, 2004. **44**(4): p. 601-607.

90. Krüger, R., *LRRK2 in Parkinson's disease–drawing the curtain of penetrance: a commentary.* BMC medicine, 2008. **6**(1): p. 33.

91. Lesage, S. and A. Brice, *Parkinson's disease: from monogenic forms to genetic susceptibility factors.* Human molecular genetics, 2009. **18**(R1): p. R48-R59.

92. Tan, E., *Identification of a common genetic risk variant (LRRK2 Gly2385Arg) in Parkinson's disease.* ANNALS-ACADEMY OF MEDICINE SINGAPORE, 2006. **35**(11): p. 840.

93. Illarioshkin, S., et al., *A common leucine-rich repeat kinase 2 gene mutation in familial and sporadic Parkinson's disease in Russia.* European journal of neurology, 2007. **14**(4): p. 413-417.

94. Hatano, T., et al., *Leucine-rich repeat kinase 2 associates with lipid rafts.* Human molecular genetics, 2007. **16**(6): p. 678-690.

95. West, A.B., et al., *Parkinson's disease-associated mutations in LRRK2 link enhanced GTP-binding and kinase activities to neuronal toxicity.* Human molecular genetics, 2007. **16**(2): p. 223-232.

96. MacLeod, D., et al., *The familial Parkinsonism gene LRRK2 regulates neurite process morphology.* Neuron, 2006. **52**(4): p. 587-593.

97. Ramirez, A., et al., *Hereditary parkinsonism with dementia is caused by mutations in ATP13A2, encoding a lysosomal type 5 P-type ATPase.* Nature genetics, 2006. **38**(10): p. 1184.

98. Williams, D.R., et al., *Kufor Rakeb Disease: Autosomal recessive, levodopa-responsive parkinsonism with pyramidal degeneration, supranuclear gaze palsy, and dementia.* Movement disorders, 2005. **20**(10): p. 1264-1271.

99. Al-Din, A., et al., *Pallido-pyramidal degeneration, supranuclear upgaze paresis and dementia: Kufor-Rakeb syndrome.* Acta neurologica Scandinavica, 1994. **89**(5): p. 347-352.

100. Gasser, T., et al., *A susceptibility locus for Parkinson's disease maps to chromosome 2p13.* Nature genetics, 1998. **18**(3): p. 262.

101. Hicks, A.A., et al., *A susceptibility gene for late-onset idiopathic Parkinson's disease.* Annals of neurology, 2002. **52**(5): p. 549-555.

102. Haugarvoll, K., et al., *Fine-mapping and candidate gene investigation within the PARK10 locus.* European Journal of Human Genetics, 2009. **17**(3): p. 336.

103. Lautier, C., et al., *Mutations in the GIGYF2 (TNRC15) gene at the PARK11 locus in familial Parkinson disease.* The American Journal of Human Genetics, 2008. **82**(4): p. 822-833.

104. Pankratz, N., et al., *Significant linkage of Parkinson disease to chromosome 2q36-37.* The American Journal of Human Genetics, 2003. **72**(4): p. 1053-1057.

105. Pankratz, N., et al., *Genome screen to identify susceptibility genes for Parkinson disease in a sample without parkin mutations.* The American Journal of Human Genetics, 2002. **71**(1): p. 124-135.

106. Strauss, K.M., et al., *Loss of function mutations in the gene encoding Omi/HtrA2 in Parkinson's disease.* Human molecular genetics, 2005. **14**(15): p. 2099-2111.

107. Bogaerts, V., et al., *Genetic variability in the mitochondrial serine protease HTRA2 contributes to risk for Parkinson disease.* Human mutation, 2008. **29**(6): p. 832-840.

108. Martins, L.M., et al., *Neuroprotective role of the Reaper-related serine protease HtrA2/Omi revealed by targeted deletion in mice.* Molecular and cellular biology, 2004. **24**(22): p. 9848-9862.

109. Paisan-Ruiz, C., et al., *Characterization of PLA2G6 as a locus for dystonia-parkinsonism.* Annals of neurology, 2009. **65**(1): p. 19-23.

110. Di Fonzo, A., et al., *FBXO7 mutations cause autosomal recessive, early-onset parkinsonian-pyramidal syndrome.* Neurology, 2009. **72**(3): p. 240-245.

111. Wider, C., et al., *Autosomal dominant dopa-responsive parkinsonism in a multigenerational Swiss family.* Parkinsonism & related disorders, 2008. **14**(6): p. 465-470.

112. Edvardson, S., et al., *A deleterious mutation in DNAJC6 encoding the neuronal-specific clathrin-uncoating co-chaperone auxilin, is associated with juvenile parkinsonism.* PLoS One, 2012. **7**(5): p. e36458.

113. Cremona, O., et al., *Essential role of phosphoinositide metabolism in synaptic vesicle recycling.* Cell, 1999. **99**(2): p. 179-188.

114. Perera, R.M., et al., *Two synaptojanin 1 isoforms are recruited to clathrin-coated pits at different stages.* Proceedings of the National Academy of Sciences, 2006. **103**(51): p. 19332-19337.

115. Krebs, C.E., et al., *The Sac1 domain of SYNJ1 identified mutated in a family with early-onset progressive Parkinsonism with generalized seizures.* Human mutation, 2013. **34**(9): p. 1200-1207.

116. Quadri, M., et al., *Mutation in the SYNJ1 Gene Associated with Autosomal Recessive, Early-Onset P arkinsonism.* Human mutation, 2013. **34**(9): p. 1208-1215.

117. Ishikawa, K.-i., et al., *Prediction of the coding sequences of unidentified human genes. X. The complete sequences of 100 new cDNA clones from brain which can code for large proteins in vitro.* DNA Research, 1998. **5**(3): p. 169-176.

118. Girard, M., et al., *The DnaJ-domain protein RME-8 functions in endosomal trafficking.* Journal of Biological Chemistry, 2005. **280**(48): p. 40135-40143.

119. Vilariño-Güell, C., et al., *DNAJC13 mutations in Parkinson disease.* Human molecular genetics, 2013. **23**(7): p. 1794-1801.

120. Tolleson, C. and D. Claassen, *The function of tyrosine hydroxylase in the normal and Parkinsonian brain.* CNS & Neurological Disorders-Drug Targets (Formerly Current Drug Targets-CNS & Neurological Disorders), 2012. **11**(4): p. 381-386.

121. Craig, S., et al. *LOCALIZATION OF THE HUMAN TYROSINE-HYDROXYLASE GENE TO CHROMOSOME-11P15*. in *CYTOGENETICS AND*

*CELL GENETICS*. 1985. KARGER ALLSCHWILERSTRASSE 10, CH-4009 BASEL, SWITZERLAND.

122. Lüdecke, B., B. Dworniczak, and K. Bartholomé, *A point mutation in the tyrosine hydroxylase gene associated with Segawa's syndrome.* Human genetics, 1995. **95**(1): p. 123-125.

123. Swaans, R., et al., *Four novel mutations in the tyrosine hydroxylase gene in patients with infantile parkinsonism.* Annals of human genetics, 2000. **64**(1): p. 25-31.

124. Neve, R.L., et al., *Identification of cDNA clones for the human microtubule-associated protein tau and chromosomal localization of the genes for tau and microtubule-associated protein 2.* Molecular Brain Research, 1986. **1**(3): p. 271-280.

125. Donlon, T., P. Harris, and R. Neve. *LOCALIZATION OF MICROTUBULE-ASSOCIATED PROTEIN TAU (MTBT1) TO CHROMOSOME-17Q21*. in *Cytogenetics and Cell Genetics*. 1987. KARGER ALLSCHWILERSTRASSE 10, CH-4009 BASEL, SWITZERLAND.

126. Andreadis, A., W.M. Brown, and K.S. Kosik, *Structure and novel exons of the human. tau. gene.* Biochemistry, 1992. **31**(43): p. 10626-10633.

127. Goedert, M., et al., *Cloning and sequencing of the cDNA encoding a core protein of the paired helical filament of Alzheimer disease: identification as the microtubule-associated protein tau.* Proceedings of the National Academy of Sciences, 1988. **85**(11): p. 4051-4055.

128. Goedert, M., et al., *Multiple isoforms of human microtubule-associated protein tau: sequences and localization in neurofibrillary tangles of Alzheimer's disease.* Neuron, 1989. **3**(4): p. 519-526.

129. Donnelly, M.P., et al., *The distribution and most recent common ancestor of the 17q21 inversion in humans.* The American Journal of Human Genetics, 2010. **86**(2): p. 161-171.

130. Kwok, J.B., et al., *Tau haplotypes regulate transcription and are associated with Parkinson's disease.* Annals of neurology, 2004. **55**(3): p. 329-334.

131. Stefansson, H., et al., *A common inversion under selection in Europeans.* Nature genetics, 2005. **37**(2): p. 129.

132. Holzer, M., et al., *Tau gene (MAPT) sequence variation among primates.* Gene, 2004. **341**: p. 313-322.

133. Royle, N., et al., *Human genes encoding prothrombin and ceruloplasmin map to 11p11–q12 and 3q21–24, respectively.* Somatic cell and molecular genetics, 1987. **13**(3): p. 285-292.

134. Daimon, M., et al., *Fine structure of the human ceruloplasmin gene.* Biochemical and biophysical research communications, 1995. **208**(3): p. 1028-1035.

135. Klomp, L.W. and J.D. Gitlin, *Expression of the ceruloplasmin gene in the human retina and brain: implications for a pathogenic model in aceruloplasminemia.* Human molecular genetics, 1996. **5**(12): p. 1989-1996.

136. Kohno, S., et al., *Aceruloplasminemia with a novel mutation associated with parkinsonism.* Neurogenetics, 2000. **2**(4): p. 237-238.

137. Spelbrink, J.N., et al., *Human mitochondrial DNA deletions associated with mutations in the gene encoding Twinkle, a phage T7 gene 4-like protein localized in mitochondria.* Nature genetics, 2001. **28**(3): p. 223.

138. Van Hove, J.L., et al., *Finding twinkle in the eyes of a 71-year-old lady: A case report and review of the genotypic and phenotypic spectrum of TWINKLE-related dominant disease.* American Journal of Medical Genetics Part A, 2009. **149**(5): p. 861-867.

139. Goethem, G.V., et al., *Digenic progressive external ophthalmoplegia in a sporadic patient: recessive mutations in POLG and C10orf2/Twinkle.* Human mutation, 2003. **22**(2): p. 175-176.

140. Kimura, S.H., et al., *Structure, expression, and chromosomal localization of human GAK.* Genomics, 1997. **44**(2): p. 179-187.

141. Pankratz, N., et al., *Genomewide association study for susceptibility genes contributing to familial Parkinson disease.* Human genetics, 2009. **124**(6): p. 593-605.

142. Hamza, T.H., et al., *Common genetic variation in the HLA region is associated with late-onset sporadic Parkinson's disease.* Nature genetics, 2010. **42**(9): p. 781.

143. Mata, I.F., et al., *Replication of MAPT and SNCA, but not PARK16-18, as susceptibility genes for Parkinson's disease.* Movement disorders, 2011. **26**(5): p. 819-823.

144. Ovchinnikov, Y.A., et al., *Family of human Na+, K+-ATPase genes Structure of the gene for the catalytic subunit (αIII-form) and its relationship with structural features of the protein.* FEBS letters, 1988. **233**(1): p. 87-94.

145. de Carvalho Aguiar, P., et al., *Mutations in the Na+/K+-ATPase α3 gene ATP1A3 are associated with rapid-onset dystonia parkinsonism.* Neuron, 2004. **43**(2): p. 169-175.

146. Beutler, E., *Gaucher disease: new molecular approaches to diagnosis and treatment.* Science, 1992. **256**(5058): p. 794-799.

147. Shafit-Zagardo, B., et al., *Assignment of the gene for acid beta-glucosidase to human chromosome 1.* American journal of human genetics, 1981. **33**(4): p. 564.

148. Devine, E., et al., *Regional assignment of the structural gene for human acid β-glucosidase to q42→ qter on chromosome 1.* Cytogenetic and Genome Research, 1982. **33**(4): p. 340-344.

149. Barneveld, R., et al., *Assignment of the gene coding for human β-glucocerebrosidase to the region q21-q31 of chromosome 1 using monoclonal antibodies.* Human genetics, 1983. **64**(3): p. 227-231.

150. Ginns, E.I., et al., *Gene mapping and leader polypeptide sequence of human glucocerebrosidase: implications for Gaucher disease.* Proceedings of the National Academy of Sciences, 1985. **82**(20): p. 7101-7105.

151. Zimran, A., et al., *Prediction of severity of Gaucher's disease by identification of mutations at DNA level.* The Lancet, 1989. **334**(8659): p. 349-352.

152. Sorge, J., et al., *High level transcription of the glucocerebrosidase pseudogene in normal subjects and patients with Gaucher disease.* The Journal of clinical investigation, 1990. **86**(4): p. 1137-1141.

153. Horowitz, M., et al., *The human glucocerebrosidase gene and pseudogene: structure and evolution.* Genomics, 1989. **4**(1): p. 87-96.

154. Reiner, O. and M. Horowitz, *Differential expression of the human glucocerebrosidase-coding gene.* Gene, 1988. **73**(2): p. 469-478.

155. Ron, I., D. Rapaport, and M. Horowitz, *Interaction between parkin and mutant glucocerebrosidase variants: a possible link between Parkinson disease and Gaucher disease.* Human molecular genetics, 2010. **19**(19): p. 3771-3781.

156. Goker-Alpan, O., et al., *Parkinsonism among Gaucher disease carriers.* Journal of medical genetics, 2004. **41**(12): p. 937-940.

157. Sidransky, E., et al., *Multicenter analysis of glucocerebrosidase mutations in Parkinson's disease.* New England Journal of Medicine, 2009. **361**(17): p. 1651-1661.

158. Holzbaur, E.L. and M.K. Tokito, *Localization of the DCTN1 Gene Encoding p150 Glued to Human Chromosome 2p13 by Fluorescencein SituHybridization.* Genomics, 1996. **31**(3): p. 398-399.

159. Holzbaur, E. and R. Vallee, *Dyneins: molecular structure and cellular function.* Annual review of cell biology, 1994. **10**(1): p. 339-372.

160. Collin, G.B., et al., *HumanDCTN1: Genomic Structure and Evaluation as a Candidate for Alström Syndrome.* Genomics, 1998. **53**(3): p. 359-364.

161. Vilariño-Güell, C., et al., *Characterization of DCTN1 genetic variability in neurodegeneration.* Neurology, 2009. **72**(23): p. 2024-2028.

162. Araki, E., et al., *A Novel DCTN1 mutation with late-onset parkinsonism and frontotemporal atrophy.* Movement Disorders, 2014. **29**(9): p. 1201-1204.

163. Tey, S., et al., *Mutation analysis of genes within the dynactin complex in a cohort of hereditary peripheral neuropathies.* Clinical genetics, 2016. **90**(2): p. 127-133.

164. Aji, B., et al., *Perry syndrome: a disorder to consider in the differential diagnosis of Parkinsonism.* Journal of the neurological sciences, 2013. **330**(1): p. 117-118.

165. Patel, R.C. and G.C. Sen, *PACT, a protein activator of the interferon-induced protein kinase, PKR.* The EMBO journal, 1998. **17**(15): p. 4379-4390.

166. Zech, M., et al., *DYT16 revisited: exome sequencing identifies PRKRA mutations in a European dystonia family.* Movement Disorders, 2014. **29**(12): p. 1504-1510.

167. Camargos, S., et al., *DYT16, a novel young-onset dystonia-parkinsonism disorder: identification of a segregating mutation in the stress-response protein PRKRA.* The Lancet Neurology, 2008. **7**(3): p. 207-215.

168. Lemmon, M.E., et al., *A novel presentation of DYT 16: acute onset in infancy and association with MRI abnormalities.* Movement Disorders, 2013. **28**(14): p. 1937-1938.

169. Vandenbergh, D.J., A.M. Persico, and G.R. Uhl, *A human dopamine transporter cDNA predicts reduced glycosylation, displays a novel repetitive element and provides racially-dimorphic TaqI RFLPs.* Molecular brain research, 1992. **15**(1-2): p. 161-166.

170. Gelernter, J., et al., *The dopamine transporter protein gene (SLC6A3): primary linkage mapping and linkage studies in Tourette syndrome.* Genomics, 1995. **30**(3): p. 459-463.

171. Kurian, M.A., et al., *Homozygous loss-of-function mutations in the gene encoding the dopamine transporter are associated with infantile parkinsonism-dystonia.* The Journal of clinical investigation, 2009. **119**(6): p. 1595-1603.

172. Kurian, M.A., et al., *Clinical and molecular characterisation of hereditary dopamine transporter deficiency syndrome: an observational cohort and experimental study.* The Lancet Neurology, 2011. **10**(1): p. 54-62.

173. Yan, R. and R.E. Rhoads, *Human protein synthesis initiation factor eIF-4γ is encoded by a single gene (EIF4G) that maps to chromosome 3q27—qter.* Genomics, 1995. **26**(2): p. 394-398.

174. Imataka, H., A. Gradi, and N. Sonenberg, *A newly identified N-terminal amino acid sequence of human eIF4G binds poly (A)-binding protein and functions in poly (A)-dependent translation.* The EMBO journal, 1998. **17**(24): p. 7480-7489.

175. Chartier-Harlin, M.-C., et al., *Translation initiator EIF4G1 mutations in familial Parkinson disease.* The American Journal of Human Genetics, 2011. **89**(3): p. 398-406.

176. Huttenlocher, J., et al., *EIF4G1 is neither a strong nor a common risk factor for Parkinson's disease: evidence from large European cohorts.* Journal of medical genetics, 2014: p. jmedgenet-2014-102570.

177. Thöny, B., C.W. Heizmann, and M.-G. Mattei, *Human GTP-cyclohydrolase I gene and sepiapterin reductase gene map to region 14q21–q22 and 2p14–p12, respectively, by in situ hybridization.* Genomics, 1995. **26**(1): p. 168-170.

178. Ichinose, H., et al., *Characterization of mouse and human GTP cyclohydrolase I genes Mutations in patients with GTP cyclohydrolase I deficiency.* Journal of Biological Chemistry, 1995. **270**(17): p. 10062-10071.

179. Ichinose, H., et al., *Hereditary progressive dystonia with marked diurnal fluctuation caused by mutations in the GTP cyclohydrolase I gene.* Nature genetics, 1994. **8**(3): p. 236.

180. Skrygan, M., et al., *A splice mutation in the GTP cyclohydrolase I gene causes dopa-responsive dystonia by exon skipping.* Journal of inherited metabolic disease, 2001. **24**(3): p. 345-351.

181. Hagenah, J., et al., *High mutation rate in dopa-responsive dystonia: detection with comprehensive GCHI screening.* Neurology, 2005. **64**(5): p. 908-911.

182. Steinberger, D., et al., *Utility of MLPA in deletion analysis of GCH1 in dopa-responsive dystonia.* Neurogenetics, 2007. **8**(1): p. 51-55.

183. Brique, S., et al., *A new GTP-cyclohydrolase I mutation in an unusual doparesponsive dystonia, familial form.* Neuroreport, 1999. **10**(3): p. 487-491.

184. Sanders, J., et al., *Immunofluorescence studies of human fibroblasts demonstrate the presence of the complex of elongation factor-1 beta gamma delta in the endoplasmic reticulum.* Journal of Cell Science, 1996. **109**(5): p. 1113-1117.

185. Schulte, E.C., et al., *Rare variants in LRRK1 and Parkinson's disease.* neurogenetics, 2014. **15**(1): p. 49-57.

186. Carstea, E.D., et al., *Niemann-Pick C1 disease gene: homology to mediators of cholesterol homeostasis.* Science, 1997. **277**(5323): p. 228-231.

187. Morris, J.A., et al., *The genomic organization and polymorphism analysis of the human Niemann-Pick C1 gene.* Biochemical and biophysical research communications, 1999. **261**(2): p. 493-498.

188. Josephs, K.A., J.Y. Matsumoto, and N.M. Lindor, *Heterozygous Niemann-Pick disease type C presenting with tremor.* Neurology, 2004. **63**(11): p. 2189-2190.

189. Zech, M., et al., *Niemann-Pick C disease gene mutations and age-related neurodegenerative disorders.* PloS one, 2013. **8**(12): p. e82879.

190. Quintern, L.E., et al., *Isolation of cDNA clones encoding human acid sphingomyelinase: occurrence of alternatively processed transcripts.* The EMBO journal, 1989. **8**(9): p. 2469-2473.

191. Volders, P., et al., *Niemann-Pick disease type B: An unusual clinical presentation with multiple vertebral fractures.* American Journal of Medical Genetics Part A, 2002. **109**(1): p. 42-51.

192. Foo, J.-N., et al., *A rare lysosomal enzyme gene SMPD1 variant (p. R591C) associates with Parkinson's disease.* Neurobiology of aging, 2013. **34**(12): p. 2890. e13-2890. e15.

193. Bhandari, V., R. Palfree, and A. Bateman, *Isolation and sequence of the granulin precursor cDNA from human bone marrow reveals tandem cysteine-rich granulin domains.* Proceedings of the National Academy of Sciences, 1992. **89**(5): p. 1715-1719.

194. Thornton, M., et al., *The Human Platelet IIb Gene Is Not Closely Linked to Its Integrin Partner β3.* Blood, 1999. **94**(6): p. 2039-2047.

195. Serrero, G., *Autocrine growth factor revisited: PC-cell-derived growth factor (progranulin), a critical player in breast cancer tumorigenesis.* Biochemical and biophysical research communications, 2003. **308**(3): p. 409-413.

196. Mukherjee, O., et al., *HDDD2 is a familial frontotemporal lobar degeneration with ubiquitin-positive, tau-negative inclusions caused by a missense mutation in the signal peptide of progranulin.* Annals of neurology, 2006. **60**(3): p. 314-322.

197. Bouchon, A., J. Dietrich, and M. Colonna, *Cutting edge: inflammatory responses can be triggered by TREM-1, a novel receptor expressed on neutrophils and monocytes.* The Journal of Immunology, 2000. **164**(10): p. 4991-4995.

198. Allcock, R.J., et al., *The human TREM gene cluster at 6p21. 1 encodes both activating and inhibitory single IgV domain receptors and includes NKp44.* European journal of immunology, 2003. **33**(2): p. 567-577.

199. Atagi, Y., et al., *Apolipoprotein E is a ligand for triggering receptor expressed on myeloid cells 2 (TREM2).* Journal of Biological Chemistry, 2015. **290**(43): p. 26043-26050.

200. Jonsson, T., et al., *Variant of TREM2 associated with the risk of Alzheimer's disease.* New England Journal of Medicine, 2013. **368**(2): p. 107-116.

201. Zullo, S., et al., *Localization by fluorescence in situ hybridization (FISH) of human mitochondrial polymerase γ (POLG) to human chromosome band 15q24→ q26, and of mouse mitochondrial polymerase γ (Polg) to mouse chromosome band 7E, with confirmation by direct sequence analysis of bacterial artificial chromosomes (BACs).* Cytogenetic and Genome Research, 1997. **78**(3-4): p. 281-284.

202. Walker, R.L., P. Meltzer, and P. Anziano, *A PAC containing the human mitochondrial DNA polymerase gamma gene (POLG) maps to chromosome 15q25.* Genomics, 1997. **40**(2).

203. Lestienne, P., *Evidence for a direct role of the DNA polymerase gamma in the replication of the human mitochondrial DNA in vitro.* Biochemical and biophysical research communications, 1987. **146**(3): p. 1146-1153.

204. Del Bo, R., et al., *Remarkable infidelity of polymerase γA associated with mutations in POLG1 exonuclease domain.* Neurology, 2003. **61**(7): p. 903-908.

205. Mancuso, M., et al., *POLG mutations causing ophthalmoplegia, sensorimotor polyneuropathy, ataxia, and deafness.* Neurology, 2004. **62**(2): p. 316-318.

206. Luoma, P.T., et al., *Functional defects due to spacer-region mutations of human mitochondrial DNA polymerase in a family with an ataxia-myopathy syndrome.* Human molecular genetics, 2005. **14**(14): p. 1907-1920.

207. Maxam, A.M. and W. Gilbert, *A new method for sequencing DNA.* Proceedings of the National Academy of Sciences, 1977. **74**(2): p. 560-564.

208. Sanger, F., S. Nicklen, and A.R. Coulson, *DNA sequencing with chain-terminating inhibitors.* Proceedings of the national academy of sciences, 1977. **74**(12): p. 5463-5467.

209. Smith, W.W., et al., *Leucine-rich repeat kinase 2 (LRRK2) interacts with parkin, and mutant LRRK2 induces neuronal degeneration.* Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2005. **102**(51): p. 18676-18681.

210. Fleischmann, R.D., et al., *Whole-genome random sequencing and assembly of Haemophilus influenzae Rd.* Science, 1995. **269**(5223): p. 496-512.

211. Venter, J.C., et al., *The sequence of the human genome.* science, 2001. **291**(5507): p. 1304-1351.

212. Consortium, E.P., *The ENCODE (ENCyclopedia of DNA elements) project.* Science, 2004. **306**(5696): p. 636-640.

213. Bainbridge, M.N., et al., *Whole-genome sequencing for optimized patient management.* Science translational medicine, 2011. **3**(87): p. 87re3-87re3.

214. Ng, S.B., et al., *Targeted capture and massively parallel sequencing of 12 human exomes.* Nature, 2009. **461**(7261): p. 272.

215. Sanger, F. and A.R. Coulson, *A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase.* Journal of molecular biology, 1975. **94**(3): p. 441-448.

216. Smith, L.M., et al., *Fluorescence detection in automated DNA sequence analysis.* Nature, 1986. **321**(6071): p. 674.

217. Eid, J., et al., *Real-time DNA sequencing from single polymerase molecules.* Science, 2008.

218. Dressman, D., et al., *Transforming single DNA molecules into fluorescent magnetic particles for detection and enumeration of genetic variations.* Proceedings of the National Academy of Sciences, 2003. **100**(15): p. 8817-8822.

219. Fedurco, M., et al., *BTA, a novel reagent for DNA attachment on glass and efficient generation of solid-phase amplified DNA colonies.* Nucleic acids research, 2006. **34**(3): p. e22-e22.

220. Shendure, J. and H. Ji, *Next-generation DNA sequencing.* Nature biotechnology, 2008. **26**(10): p. 1135.

221. Metzker, M.L., *Sequencing technologies—the next generation.* Nature reviews genetics, 2010. **11**(1): p. 31.

222. Su, Z., et al., *Next-generation sequencing and its applications in molecular diagnostics.* Expert review of molecular diagnostics, 2011. **11**(3): p. 333-343.

223. Goodwin, S., et al., *Oxford Nanopore sequencing, hybrid error correction, and de novo assembly of a eukaryotic genome.* Genome research, 2015.

224. Branton, D., et al., *The potential and challenges of nanopore sequencing*, in *Nanoscience And Technology: A Collection of Reviews from Nature Journals*. 2010, World Scientific. p. 261-268.

225. Derrington, I.M., et al., *Nanopore DNA sequencing with MspA.* Proceedings of the National Academy of Sciences, 2010. **107**(37): p. 16060-16065.

226. Howorka, S., S. Cheley, and H. Bayley, *Sequence-specific detection of individual DNA strands using engineered nanopores.* Nature biotechnology, 2001. **19**(7): p. 636.

227. Krivanek, O.L., et al., *Atom-by-atom structural and chemical analysis by annular dark-field electron microscopy.* Nature, 2010. **464**(7288): p. 571.

228. Luan, B., et al., *Base-by-base ratcheting of single stranded DNA through a solid-state nanopore.* Physical review letters, 2010. **104**(23): p. 238103.

229. McNally, B., et al., *Optical recognition of converted DNA nucleotides for single-molecule DNA sequencing using nanopore arrays.* Nano letters, 2010. **10**(6): p. 2237-2244.

230. Polonsky, S., S. Rossnagel, and G. Stolovitzky, *Nanopore in metal-dielectric sandwich for DNA position control.* Applied Physics Letters, 2007. **91**(15): p. 153103.

231. Stoddart, D., et al., *Single-nucleotide discrimination in immobilized DNA oligonucleotides with a biological nanopore.* Proceedings of the National Academy of Sciences, 2009. **106**(19): p. 7702-7707.

232. Krems, M., et al., *Effects of Dephasing on DNA Sequencing via Transverse Electronic Transport.* Bulletin of the American Physical Society, 2009. **54**.

233. Merriman, B., I.T. D Team, and J.M. Rothberg, *Progress in ion torrent semiconductor chip based sequencing.* Electrophoresis, 2012. **33**(23): p. 3397-3417.

234. Chandran, A., *Overview of Next-Generation Sequencing Technologies and Its Application in Chemical Biology*, in *Advancing Development of Synthetic Gene Regulators*. 2018, Springer. p. 1-41.

235. Adzhubei, I., D.M. Jordan, and S.R. Sunyaev, *Predicting functional effect of human missense mutations using PolyPhen-2.* Current protocols in human genetics, 2013. **76**(1): p. 7.20. 1-7.20. 41.

236. Schwarz, J.M., et al., *MutationTaster2: mutation prediction for the deep-sequencing age.* Nature methods, 2014. **11**(4): p. 361.

237. Desmet, F.-O., et al., *Human Splicing Finder: an online bioinformatics tool to predict splicing signals.* Nucleic acids research, 2009. **37**(9): p. e67-e67.

238. Richards, C.S., et al., *ACMG recommendations for standards for interpretation and reporting of sequence variations: Revisions 2007.* Genetics in Medicine, 2008. **10**(4): p. 294.

239. Li, Q. and K. Wang, *InterVar: clinical interpretation of genetic variants by the 2015 ACMG-AMP guidelines.* The American Journal of Human Genetics, 2017. **100**(2): p. 267-280.

240. Schouten, J.P., et al., *Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification.* Nucleic acids research, 2002. **30**(12): p. e57-e57.

241. Kessler, C., et al., *Role of LRRK2 and SNCA in autosomal dominant Parkinson's disease in Turkey.* Parkinsonism & related disorders, 2017.

242. Lill, C.M., *Genetics of Parkinson's disease.* Molecular and cellular probes, 2016. **30**(6): p. 386-396.

243. Lohmann, E., et al., *Genetic bases and phenotypes of autosomal recessive Parkinson disease in a Turkish population.* European journal of neurology, 2012. **19**(5): p. 769-775.

244. 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.* Clinical neurology and neurosurgery, 2016. **148**: p. 147-153.

245. Lücking, C., et al., *Homozygous deletions in parkin gene in European and North African families with autosomal recessive juvenile parkinsonism.* The Lancet, 1998. **352**(9137): p. 1355-1356.

246. Leroy, E., et al., *Deletions in the Parkin gene and genetic heterogeneity in a Greek family with early onset Parkinson's disease.* Human genetics, 1998. **103**(4): p. 424-427.

247. Macedo, M.G., et al., *Genotypic and phenotypic characteristics of Dutch patients with early onset Parkinson's disease.* Movement Disorders, 2009. **24**(2): p. 196-203.

248. Lücking, C.B., et al., *Association between early-onset Parkinson's disease and mutations in the parkin gene.* New England Journal of Medicine, 2000. **342**(21): p. 1560-1567.

249. Burns, M.P., et al., *Parkin promotes intracellular Aβ 1–42 clearance.* Human molecular genetics, 2009. **18**(17): p. 3206-3216.

250. Bird, T.D., *Early-onset familial Alzheimer disease.* 2012.

251. Edwards-Lee, T., et al., *An African American family with early-onset Alzheimer disease and an APP (T714I) mutation.* Neurology, 2005. **64**(2): p. 377-379.

252. Dyment, D.A., et al., *Homozygous nonsense mutation in SYNJ1 associated with intractable epilepsy and tau pathology.* Neurobiology of aging, 2015. **36**(2): p. 1222. e1-1222. e5.

253. Kobayashi, T., et al., *Exonic deletion mutations of the Parkin gene among sporadic patients with Parkinson's disease.* Parkinsonism & related disorders, 2000. **6**(3): p. 129-131.

254. Hoenicka, J., et al., *Molecular findings in familial Parkinson disease in Spain.* Archives of neurology, 2002. **59**(6): p. 966-970.

255. Pineda-Trujillo, N., et al., *A genetic cluster of early onset Parkinson's disease in a Colombian population.* American Journal of Medical Genetics Part B: Neuropsychiatric Genetics, 2006. **141**(8): p. 885-889.

256. Hattori, N., et al., *Point Mutations (Thr240Arg and Ala311Stop) in theParkinGene.* Biochemical and biophysical research communications, 1998. **249**(3): p. 754-758.

257. Ghazavi, F., et al., *PRKN, DJ-1, and PINK1 screening identifies novel splice site mutation in PRKN and two novel DJ-1 mutations.* Movement Disorders, 2011. **26**(1): p. 80-89.

258. Morais, S., et al., *Genomic mechanisms underlying PARK2 large deletions identified in a cohort of patients with PD.* Neurology Genetics, 2016. **2**(3): p. e73.

259. Ikeuchi, T., et al., *Patients homozygous and heterozygous for SNCA duplication in a family with parkinsonism and dementia.* Archives of neurology, 2008. **65**(4): p. 514-519.

260. Paisán-Ruiz, C., et al., *Early-onset L-dopa-responsive parkinsonism with pyramidal signs due to ATP13A2, PLA2G6, FBXO7 and spatacsin mutations.* Movement Disorders, 2010. **25**(12): p. 1791-1800.

261. Yalcin-Cakmakli, G., et al., *A new Turkish family with homozygous FBXO7 truncating mutation and juvenile atypical parkinsonism.* Parkinsonism & related disorders, 2014. **20**(11): p. 1248-1252.

262. Gündüz, A., et al., *FBXO7–R498X mutation: Phenotypic variability from chorea to early onset parkinsonism within a family.* Parkinsonism & related disorders, 2014. **20**(11): p. 1253-1256.

263. Lohmann, E., et al., *A new F-box protein 7 gene mutation causing typical Parkinson's disease.* Movement Disorders, 2015. **30**(8): p. 1130-1133.

264. Conedera, S., et al., *FBXO7 mutations in Parkinson's disease and multiple system atrophy.* Neurobiology of aging, 2016. **40**: p. 192. e1-192. e5.

265. Stanford, P.M., et al., *Frequency of tau mutations in familial and sporadic frontotemporal dementia and other tauopathies.* Journal of neurology, 2004. **251**(9): p. 1098-1104.

266. Hanagasi, H.A., et al., *A novel homozygous DJ1 mutation causes parkinsonism and ALS in a Turkish family.* Parkinsonism & related disorders, 2016. **29**: p. 117-120.

267. Hering, R., et al., *Novel homozygous p. E64D mutation in DJ1 in early onset Parkinson disease (PARK7).* Human mutation, 2004. **24**(4): p. 321-329.

268. Martin, I., et al., *LRRK2 pathobiology in Parkinson's disease.* Journal of neurochemistry, 2014. **131**(5): p. 554-565.

269. Hanagasi, H., et al., *LRRK2 mutations are uncommon in Turkey.* European journal of neurology, 2011. **18**(10): p. e137-e137.

270. Monroy-Jaramillo, N., et al., *Genetic mutations in early-onset Parkinson's disease Mexican patients: Molecular testing implications.* American Journal of Medical Genetics Part B: Neuropsychiatric Genetics, 2014. **165**(3): p. 235-244.

271. Funayama, M., et al., *Familial Parkinsonism with digenic parkin and PINK1 mutations.* Movement Disorders, 2008. **23**(10): p. 1461-1465.

272. Dächsel, J.C., et al., *Digenic parkinsonism: investigation of the synergistic effects of PRKN and LRRK2.* Neuroscience letters, 2006. **410**(2): p. 80-84.

273. Tang, B., et al., *Association of PINK1 and DJ-1 confers digenic inheritance of early-onset Parkinson's disease.* Human molecular genetics, 2006. **15**(11): p. 1816-1825.

# FORMLAR

**T.C**
**İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ**
**İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ**
**TIBBİ GENETİK ANABİLİM DALI**

## MOLEKÜLER İNCELEMELER İÇİN BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU

**Proje Adı**

**"PARKİNSON HASTALIĞINA NEDEN OLAN BİLİNEN VE YENİ GENLERDE İLİŞKİLİ MUTASYONLARIN ARAŞTIRILMASI"**

**Tarih:**

**I-Araştırmayla İlgili Bilgiler**

Bu proje, İstanbul Tıp Fakültesi, Tıbbi Genetik Anabilim Dalının Genetik Laboratuvarında gerçekleştirilecek bir genetik çalışma olup, Parkinson Hastalığında (PH), ilişkili genlerdeki mutasyonların sıklıklarını ve yeni genlerin araştırılmasını hedeflemektedir. Projede mutasyon saptanan olgularda genetip-fenotip ilişkisi araştırılacaktır. Elde edilen sonuçların hastalığın moleküler patogenezine yeni açılımlar kazandırmasını, tanımlanmış yolakların irdelenmesini ve ülkemizdeki PH olgularındaki ilişkili gen ve mutasyon sıklıklarının belirlenerek moleküler yaklaşımlara katkı sağlamasını umuyoruz.

Bu çalışmaya izin vermeden önce sizleri çalışmanın riskleri ve yararları konusunda bilgilendirmek istiyoruz.

Size ait genetik bilgi kesinlikle gizli kalacaktır. İnceleme sonunda elde edilecek sonuçlar istediğiniz takdirde size bildirilecektir. Ancak bu bilgiyi öğrenmeyi reddetmek her zaman hakkınızdır. Bu bilgiyi sizin dışınızda birisi ile paylaşmamız sadece sizin izninize bağlı olacaktır.

Bu incelemelerin esas amacı sizde/aile bireyinizde saptanan mutasyonları daha detaylı araştırmak, klinik tanıyı desteklemek/desteklememek ve genotip-fenotip ilişkisinin anlaşılmasına ve ülkemizdeki mutasyon sıklıklarının belirlenmesine yardımcı olacak bilgilere ulaşmaktır.

Bu çalışma tek merkezli olup 100 olgu ile gerçekleştirilecek ve 24 ay sürecektir (Ocak 2016-Ocak 2018).

Bu projeye katılmak için sizden 2 ml periferik kan örneği alınacaktır. Bu örnekten elde edilen DNA materyali proje çalışmasında kullanılacaktır. Elde edilen DNA örneğinin yetersiz veya kalitesiz olması durumunda tekrar örnek istenebilecektir. Bu durumda gönüllü tekrar bilgilendirilerek izni alınacaktır.

**Olası riskler ve faydalar:**

Kan alınması sırasında oluşabilecek riskler:

(1) İğne batmasına bağlı olarak az bir ac ıduyulması.

(2) İğne batması sonrasında çok nadiren enfeksiyon gelişmesi durumu.

Yapılacak genetik testin getirebileceği olası riskler: Size ait genetik bilgi kesinlikle gizli kalacaktır. İnceleme sonunda elde edilecek sonuçlar istediğiniz takdirde size bildirilecektir. Ancak bu bilgiyi öğrenmeyi reddetmek her zaman hakkınızdır. Bu bilgiyi sizin dışınızda birisi ile paylaşmamız sadece sizin izninize bağlı olacaktır.

Olası yararlar:Bu incelemelerin esas amacı sizde/aile bireyinizde saptanan mutasyonları daha detaylı araştırmak, klinik tanıyı desteklemek/desteklememek ve genotip-fenotip ilişkisinin anlaşılmasına ve ülkemizdeki mutasyon sıklıklarının belirlenmesine yardımcı olacak bilgilere ulaşmaktır.

**II- Gönüllünün Haklarıyla İlgili Bilgiler:**

Bu çalışmaya katılmaktan herhangi bir aşamada vazgeçebilirsiniz. Bu durumda, tedaviniz devam eder, herhangi bir cezaya ya da yaptırıma maruz kalmayacaksınız, hiçbir hakkınızı kaybetmeyeceksiniz

İzleyicilerin, yoklama yapan kişilerin, Etik Kurul, Kurum ve diğer ilgili sağlık otoritelerinin gönüllünün orijinal tıbbi kayıtlarına doğrudan erişimlerinin bulunabileceğini, ancak bu bilgilerin gizli tutulacağını, yazılı bilgilendirilmiş gönüllü olur formunun imzalanmasıyla gönüllü veya yasal temsilcisinin söz konusu erişime izin verilmiş olacağını bildirmek isteriz.

Gönüllünün kimliğini ortaya çıkaracak kayıtlar gizli tutulacaktır. Kamuoyuna açıklanmayacak, araştırma sonuçları bilimsel dergilerde yayımlansa dahi gönüllünün kimliğinin gizli kalacağını bildirmek isteriz.

Bu çalışmaya katılmanız için sizden herhangi bir ücret istenmeyecektir.

Bu belgeyi okuduktan sonra çalışmaya katılma kararı verirseniz formda aşağıdaki kutucuklardan birini seçiniz.

DNA örneğimin:

□ *Sadece yukarıda bahsi geçen araştırmada kullanılmasına izin veriyorum*

□ *İleride yapılması planlanan tüm araştırmalarda kullanılmasına izin veriyorum*

□ *hiçbir koşulda kullanılmasına izin vermiyorum*

**III- Katılımcının/Hastanın Beyanı**

Sayın Dr..... tarafından ……..…… (Kurum Adı)..... (Anabilim Dalı, ,Ünite Adı)'da tıbbi bir araştırma yapılacağı belirtilerek bu araştırma ile ilgili yukarıdaki bilgiler bana aktarıldı. Bu bilgilerden sonra böyle bir araştırmaya "katılımcı" (denek) olarak davet edildim.Eğer bu araştırmaya katılırsam hekim ile aramda kalması gereken bana ait bilgilerin gizliliğine bu araştırma sırasında da büyük özen ve saygı ile yaklaşılacağına inanıyorum. Araştırma sonuçlarının eğitim ve bilimsel amaçlarla kullanımı sırasında kişisel bilgilerimin ihtimamla korunacağı konusunda bana yeterli güven verildi.

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

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

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

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

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

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

İmzalı bu form kağıdının bir kopyası bana verilecektir.

Kontak kurulabilecek kişiler:
Prof. Dr. Z. Oya Uyguner (ITF Tıbbi Genetik AD)-Sorumlu Araştırmacı

Prof. Dr. Haşmet Hanağası (ITF Nöroloji AD) – Projenin Klinik,Sorumlusu
Uzm. Tıbbi Biol. Fatih Tepgeç((ITF Tıbbi Genetik AD)-Yardımcı Araştırmacı

Ulaşılabilecek Tel. No.'ları: Direk hat: (0 212) 414 20 00 – 32574 (ITF- Nöroloji)
Dahili hat: (0 212) 414 20 00 – 32327 (ITF-Tıbbi Genetik AD
Ulaşım Adresi: İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi
Tıbbi Genetik Anabilim Dalı
Millet Cad. 34390 Çapa – İSTANBUL
Elektronik Posta Adresi: hasmet@yahoo.com / o.uyguner@istanbul.edu.tr / fatihtepgec@yahoo.com

Adı Soyadı Doğum tarihi Tel No. İmza

Gönüllü /Yasal temsilcisi ----------

Gönüllü /Yasal temsilcisi ----------

Gönüllü /Yasal temsilcisi ----------

Gönüllü /Yasal temsilcisi ----------

# ETİK KURUL KARARI

T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ
KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU

Sayı : 2075 Tarih : 28.12.2015

Konu : Prof. Dr. Z. Oya UYGUNER

Sayın Prof. Dr. Z. Oya UYGUNER
Tıbbi Genetik Anabilim Dalı

İlgi :Tıbbi Genetik Anabilim Dalının 17/12/2015 gün ve 398476 sayılı yazısı

Sorumlu araştırıcılığını üstlendiğiniz ve Doktora öğrencisi Fatih TEPGEÇ in yürüteceği 2015/2056 dosya numaralı "Parkinson Hastalığına Neden Olan Bilinen ve Yeni Genlerde İlişkili Mutasyonların Araştırılması" başlıklı çalışma kurulumuzun 25/12/2015 tarih ve 22 sayılı toplantısında görüşülerek etik yönden uygun bulunmuş olup, tutanaklar ekte sunulmuştur.

Bilgilerinizi rica ederim.

Prof.Dr. A. Yağız ÜRESİN
İstanbul Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar
Etik Kurul Başkanı

Eki: İstanbul Tıp Fakültesi Klinik Araştırmaları Etik Kurulu Karar Formu

# PATENT HAKKI İZNİ

# İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI

## Parkinson Hastalığına Neden Olan Bilinen ve Yeni Genlerde İlişkili Mutasyonların Araştırılması

*Yazar* Fatih Tepgenç

**Gönderim Tarihi:** 08-Tem-2018 04:50PM (UTC+0300)
**Gönderim Numarası:** 981110901
**Dosya adı:** ilinen_ve_Yeni_Genlerde_li_kili_Mutasyonlar_n_Ara_t_r_lmas.docx (138.62K)
**Kelime sayısı:** 23587
**Karakter sayısı:** 164036

Parkinson Hastalığına Neden Olan Bilinen ve Yeni Genlerde İlişkili Mutasyonların Araştırılması

ORIJINALLIK RAPORU

| %12 | %1 | %1 | %11 |
|---|---|---|---|
| BENZERLIK ENDEKSI | İNTERNET KAYNAKLARI | YAYINLAR | ÖĞRENCI ÖDEVLERI |

BIRINCIL KAYNAKLAR

| | | |
|---|---|---|
| 1 | Submitted to Istanbul University<br>Öğrenci Ödevi | %11 |
| 2 | crunch.unibas.ch<br>İnternet Kaynağı | <%1 |
| 3 | hgdownload-test.cse.ucsc.edu<br>İnternet Kaynağı | <%1 |
| 4 | www.mdpi.com<br>İnternet Kaynağı | <%1 |
| 5 | www.students.informatik.uni-luebeck.de<br>İnternet Kaynağı | <%1 |
| 6 | www.biomedcentral.com<br>İnternet Kaynağı | <%1 |
| 7 | Submitted to Gaziantep Aniversitesi<br>Öğrenci Ödevi | <%1 |
| 8 | www.readbag.com<br>İnternet Kaynağı | <%1 |

# ÖZGEÇMİŞ

## Kişisel Bilgiler

| | | | |
|---|---|---|---|
| **Adı** | Fatih | **Soyadı** | Tepgeç |
| **Doğ.Yeri** | İstanbul | **Doğ.Tar.** | 21.04.1982 |
| **Uyruğu** | T.C. | **TC Kim No** | 16957191920 |
| **Email** | fatihtepgec@yahoo.com | **Tel** | 05354798338 |

## Eğitim Düzeyi

| | **Mezun Olduğu Kurumun Adı** | **Mez. Yılı** |
|---|---|---|
| **Doktora** | | |
| **Yük.Lis.** | İ.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü Genetik ABD | 2011 |
| **Lisans** | İ.Ü. Tıbbi Biyolojik Bilimler | 2008 |
| **Lise** | Kartal Anadolu Lisesi | 2000 |

## İş Deneyimi (Sondan geçmişe doğru sıralayın)

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

| **Yabancı Dilleri** | **Okuduğunu Anlama*** | **Konuşma*** | **Yazma*** | **KPDS/ÜDS Puanı** | **(Diğer) Puanı** |
|---|---|---|---|---|---|
| **İngilizce** | Orta | Orta | Orta | | |
| **Almanca** | Zayıf | Zayıf | Zayıf | | |

***Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin

| | **Sayısal** | **Eşit Ağırlık** | **Sözel** |
|---|---|---|---|
| **LES Puanı** | | | |
| **(Diğer) Puanı** | | | |

## Bilgisayar Bilgisi

| **Program** | **Kullanma becerisi** |
|---|---|
| | |
| | |
| | |

## Yayınları/Tebligleri Sertifikaları/Ödülleri

## Özel İlgi Alanları (Hobileri):