

T.C.
SÜLEYMAN DEMİREL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ISPARTA SÜLEYMAN DEMİREL ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ NÖROLOJİ
POLİKLİNİĞİNE BAŞVURAN PARKİNSON TANISI KONMUŞ BİREYLERDE
GENETİK POLİMORFİZM ÇALIŞMASI

Arş. Gör. Barış YAŞAR

TIBBİ BİYOLOJİ ve GENETİK ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

Danışman
Yrd. Doç. Dr. Nilüfer ŞAHİN CALAPOĞLU

Bu Tez Süleyman Demirel Üniversitesi Araştırma Fonu Tarafından
1243 Nolu Proje ile Desteklenmiştir.

2007-İSPARTA

KABUL VE ONAY	i
ÖNSÖZ	ii
İÇİNDEKİLER	iii
ŞEKİLLER ve TABLOLAR DİZİNİ	v
KISALTMALAR DİZİNİ	vi
ÖZET	vii
1.GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. PARKİNSON HASTALIĞININ KLİNİĞİ	3
2.1.1 Titreme (Tremor)	3
2.1.2 Kas sertliği (Rijidite)	3
2.1.3 Hareketlerde yavaşlama (Bradikinezi)	3
2.1.4 Parkinson Hastalığında Diğer Belirtiler	3
2.2 PARKİNSON HASTALIĞININ FİZYOPATOLOJİSİ	4
2.3 PARKİNSON HASTALIĞININ GENETİĞİ	8
2.4 KEMOKİN VE KEMOKİN RESEPTÖRLERİ	13
2.4.1 Kemokinlerin Yapı ve Fonksiyonları	14
2.4.2 Kemokin Reseptörleri	17
2.4.3 Kemokinler ve İnflamasyon	19
2.5 Polimeraz Zincir Reaksiyonu Tekniği	21
2.5.1 Polimeraz Zincir Reaksiyonu Bileşenleri	22
2.5.1.1 Kalıp DNA	23
2.5.1.2 Deoksiribonükleotid Fosfatlar	23
2.5.1.3 Magnezyum Derişimi PCR Tamponu (Buffer)	23
2.5.1.4 Oligonükleotidler (Primerler)	23
2.5.1.5 Taq DNA Polimeraz	24
2.6 DNA Jel Elektroföresi	24
2.7 Genetik Polimorfizm	26

2.7.1 Restriksiyon parça uzunluk polimorfizmi (Restriction Fragment Length Polymorphism; RFLP)	27
3. GEREÇ VE YÖNTEMLER	28
3.1 Çalışma Grubunun Toplanması	28
3.2 Kimyasallar	29
3.3 Gereçler	30
3.4. Solüsyonlar	31
3.4.1 DNA İzolasyon Tamponları	31
3.4.2 Agaroz Jel Elektroforez Solüsyonları	34
3.5 Kandan DNA İzolasyonu	35
3.6 İzole Edilen DNA'nın İntaklığı	36
3.7 DNA'nın Spektrofotometrede Konsantrasyonunun Ölçümü	36
3.8 Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)	36
3.9 PCR/RFLP (Polimeraz Zincir Reaksiyonu/Parça Uzunluk Polimorfizmi İşlemleri	39
3.10 PCR/RFLP Ürünlerinin Agaroz Jelde Yürütülmesi	40
3.11 Genotiplendirme	40
3.12 İstatistik Analizleri	41
4. BULGULAR	42
4.1 MCP-1 Geni -2518 A>G Polimorfizm Sonuçları	42
4.2 RANTES Geni -403 G>A Polimorfizm Sonuçları	44
4.3 CCR5 Geni - Δ 32 Polimorfizm Sonuçları	45
4.4 CCR2 Geni – 64 V>I Polimorfizm Sonuçları	47
4.5 IL-8 Geni – 251 A>T Polimorfizm Sonuçları	49
5. TARTIŞMA SONUÇ	51
6. KAYNAKLAR	59

TABLolar VE ŞEKİLLER İNDEKSİ

Şekil 1: Presinaptik Bölgede Dopamin Salınımı	6
Şekil 2: Ubiquitin Proteozom Sisteminin (UPS) alıŐma mekanizması	7
Şekil 3: Kemokinlerin moleköl yapılarına göre sınıflandırılmaları	15
Şekil 4: Kemokin Reseptörlerinin Hücre Zarındaki Temel Yapısı	17
Şekil 5: MCP-1 PvuII enzim kesimi elektroforez sonu agaroz jel fotoğrafı	43
Şekil 6: RANTES MnlI enzim kesim polimorfizmi agaroz jel görüntüsü	47
Şekil 7: CCR5 EcoRI enzim kesim polimorfizmi agaroz jel görüntüsü	51
Şekil 8: CCR5 geni amplifiye edilen bölgenin baz dizilimi	51
Şekil 9: CCR2 enzim kesimi elektroforez sonu agaroz jel fotoğrafı	55
Şekil 10: CCR2 geni amplifiye edilen bölgenin baz dizilimi	55
Şekil 11: IL-8 MfeI enzim kesimi elektroforez sonu agaroz jel fotoğrafı	59
Şekil 12: IL-8 geni amplifiye edilen bölgenin baz dizilimi	59
Tablo 1: Parkinson hastalığıyla ilişkili olduğu düşünölen lokuslar	9
Tablo 2: Kemokinler, hedef hücreleri ve biyolojik aktiviteleri	16
Tablo 3: Kemokinler ve ligandları	18
Tablo 4: Parkinson hastalarının klinik özellikleri	28
Tablo 5: CCR2, CCR5, RANTES1, MCP-1 ve IL-8 genleri üzerindeki polimorfik bölgelerin amplifikasyonu için gerekli primerler ve PCR ürünlerinin uzunlukları.....	37
Tablo 6: Polimorfizm çalışmasında kullanılan restriksiyon enzimleri, kesim ve agaroz jel oranları.....	41
Tablo 7: Enzim kesimi sonucu oluşın bant paternlerinin büyüklüğü.....	41

Tablo 8: MCP-1 geni -2518 A>G polimorfizm allel frekansları.....	44
Tablo 9: MCP-1 geni -2518 A>G polimorfizm genotip frekansları.....	44
Tablo 10: <i>MCP-1</i> PvuII enzim kesimi sonuçlarına göre hasta ve kontrol bireylerdeki genotip ve allel frekanslarının cinsiyete göre dağılımı.....	45
Tablo 11: Yaş ve <i>MCP-1</i> -2518 A>G polimorfizmi genotip ve allel frekansları.....	46
Tablo 12: RANTES geni -403 G>A polimorfizm allel frekansları.....	48
Tablo 13: <i>RANTES</i> -403 A>G polimorfizmi genotip frekansları.....	48
Tablo 14: RANTES MnlI enzim kesim polimorfizmi sonuçlarına göre hasta ve kontrol bireylerdeki genotip ve allel frekanslarının cinsiyete göre dağılımı.....	50
Tablo 15: CCR5 Geni - Δ 32 polimorfizmi allel frekansları.....	52
Tablo 16: CCR5 Geni - Δ 32 polimorfizmi genotip frekansları.....	52
Tablo 17: CCR5 Geni - Δ 32 polimorfizmi sonuçlarına göre hasta ve kontrol bireylerdeki genotip ve allel frekanslarının cinsiyete göre dağılımı.....	54
Tablo 19: CCR2 geni -64 V>I polimorfizm allel frekansları.....	56
Tablo 20: CCR2 geni -64 V>I polimorfizm genotip frekansları.....	56
Tablo 21: CCR2 geni -64 V>I polimorfizm sonuçlarına göre hasta ve kontrol bireylerdeki genotip ve allel frekanslarının cinsiyete göre dağılımı.....	57
Tablo 22: Yaş ve <i>CCR2</i> -64 V>I polimorfizm genotip ve allel frekansları.....	58
Tablo 23: IL-8 Geni -251 A>T polimorfizm allel frekansları.....	60
Tablo 24: IL-8 Geni -251 A>T polimorfizm genotip frekansları.....	61
Tablo 25: IL-8 Geni -251 A>T polimorfizm sonuçlarına göre hasta ve kontrol bireylerdeki genotip ve allel frekanslarının cinsiyete göre dağılımı.....	62

KISALTMALAR

PH	: Parkinson hastalığı
TH	: Tirozin hidroksilaz
ODPH	: Otozomal dominant Parkinson hastalığı
ORPH	: Otozomal dominant Parkinson hastalığı
RFLP	: Restriksiyon parça uzunluk polimorfizmi
PCR	: Polimeraz zincir reaksiyonu
TNF- α	: Tumor nekroz faktör- α
kD	: kiloDalton
CCR5	: CC Chemokine Receptor 5
CCR2	: CC Chemokine Receptor 5
RANTES	: Regulated on activation normal T cells expressed and secreted
IL-8	: İnterlökin 8
MCP-1	: Monocyte chemoattractant protein-1

ÖNSÖZ

Lisansüstü eğitimim boyunca yardımını ve desteğini esirgemeyen, tez çalışmam süresince değerli yorum ve önerileri ile büyük katkıda bulunan tez danışmanım sayın Yrd.Doç Dr. Nilüfer ŞAHİN CALAPOĞLU'na,

Tez çalışmalarım sırasında hasta grubunun oluşturulmasında, hasta bilgilerinin ve kanlarının toplanmasında büyük emeği olan tez izleme komitesi ve Nöroloji Anabilim Dalı Öğretim üyesi Doç.Dr.Serpil DEMİRCİ'ye ve Nöroloji Anabilim Dalı Araştırma Görevlilerine,

Başta Araştırma Görevlisi Mustafa SOYÖZ olmak üzere laboratuvar çalışmalarında emeği geçen tüm çalışma arkadaşlarıma, Sağlık Bilimleri Enstitüsü personeline ve bu çalışmaya destek veren Süleyman Demirel Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimine,

Hayatım boyunca hem maddi hem de manevi tüm desteklerini esirgemeyen, her zaman yanımda olan aileme teşekkür ederim.

1.GİRİŞ VE AMAÇ

Parkinson Hastalığı (PH), Alzheimer hastalığından sonra görülen en yaygın nörodejeneratif hastalıktır. İlk olarak 1817 yılında İngiliz hekim James Parkinson tarafından “shaking palsy” (titrek felç) olarak tanımlanmıştır (1). PH, 65 yaş üstü populasyonun yaklaşık %1-2 lik kısmını etkilemektedir (2).

Hastalık, beynin substantia nigra tabakasının pars kompakta bölgesindeki dopaminerjik nöronların kaybı ve “Lewy cisimcikleri” adı verilen protein agregatlarının varlığı ile karakterizedir. Dopaminerjik nöronların yaklaşık %60-65’ inin kaybı sonucu dopamin seviyesinde meydana gelen %80-85’lik azalma motor fonksiyonlarda bozukluklara yol açar. Bu bozukluklar ise istirahat tremoru, bradikinezi, kaslarda sertlik (rijidite) ve duruş bozukluğu gibi semptomların ortaya çıkmasına sebep olur (3, 4).

Parkinson hastalığının temel bir klinik tanımlaması yapılamamıştır. Çevresel, genetik ve mekanik etkilerin yanı sıra travma, PSP (Progressive Supranuclear Palsy) ve MSA (Multiple System Athropy) gibi diğer nörodejeneratif hastalıklar ve intoksikasyonların da (rotenon, MPTP (1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine), toluen) hastalığın oluşmasında rolü olduğu düşünülmektedir (5).

Parkinson hastalığının yaklaşık %85’i sporadik, %10-15’i ise ailesel formdadır ve hastalığın ancak %5’lik kesimi tek gene bağlı (Mendel tipi kalıtım) bozukluklardan kaynaklanmaktadır (6). Son dönemde yapılan araştırmalar, genetik değişimlerin hastalığın patolojisinde rol oynadığını açıkça ortaya koymaktadır (7).

Dopaminerjik nöron kaybının sebeplerinin araştırılması için yapılan moleküler çalışmalar sırasında birçok mutasyon ve polimorfizmin Parkinson hastalığının oluşumunda rol aldığı görülmüştür. Bu çalışmalar sonucu *alfa-sinüklein*, *PARK*, *DJ-1*, *PINK1*, *LRRK2* gibi birçok gende mutasyonlar bulunmuş ve hastalık ile ilişkili oldukları saptanmıştır (8-16).

Alzheimer hastalığı ile ilgili yapılan bir çalışmada çöken protein agregatlarının beyinde inflamatuvar bir yanıt oluşturduğu gösterilmiştir (17). Son yıllarda yapılan birçok çalışma ile Parkinson hastalığında da benzer bir inflamatuvar yanıtın oluştuğu ortaya konmuştur (18-23).

İnflamasyon mekanizmasının araştırılması sırasında kemokin ve kemokin reseptörlerinin sekresyonunun önemli derecede artış gösterdiği görülmüştür. İnflamasyonda deri, beyin, eklem, meninges, akciğer, böbrek, gastrointestinal sistem gibi birçok dokuda kemokinlerin varlığı tespit edilmiştir (24).

İnflamasyonla seyreden hastalıklarda kemokin ve kemokin reseptörlerinin çok önemli rolü bulunmaktadır. Kemokinler lökositlerin kandan dokuya geçişine, inflamasyonun bulunduğu yerde birikimine ve aktivasyonuna yol açmaktadır. Mukozalara nötrofillerin, monositlerin ve makrofajların gelmesi, yerleşmesi ve inflamatuvar sürece katılmaları da yine büyük oranda kemokin ve kemokin reseptörlerine bağlıdır (24) .

Bu çalışmanın temel amacı; kemokin ve kemokin reseptörleri olan *RANTES*, *MCP-1*, *CCR2*, *CCR5*, *IL-8* genlerindeki polimorfik değişimlerin Parkinson hastalığının patogenezi ile ilişkisinin olup olmadığını araştırmaktır. Yaptığımız literatür araştırmalarında, Türkiye’de kemokin ve kemokin reseptörleri ile Parkinson hastalığı ile ilgili bir polimorfizm çalışmasına rastlanmamıştır. Bu çalışmamız, Türk popülasyonunda yapılacak diğer moleküler genetik araştırmalara ışık tutması bakımından da önemlidir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. PARKİNSON HASTALIĞININ KLİNİĞİ

2.1.1 Titreme (Tremor)

Parkinson hastalığının titreme, kas sertliği ve hareket azlığı ile şekillenen üç temel belirtisinden en belirgin olan titreme genellikle hastanın doktora en sık başvurma nedenidir. Parkinson hastalarının yaklaşık %80'inde titreme ortaya çıkmaktadır.

2.1.2 Kas sertliği (Rijidite)

Normalde kasların dinlenme halinde yumuşak ve gevşek olmaları gerekirken, rijidite varlığında dinlenme halinde bile sabit biçimde gergin ve elle hissedilebilecek derecede belirgin bir sertlikte oldukları görülür. Parkinson hastalığında rijidite en sık el, ayak bileği, dirsek veya diz gibi eklemlerde saptanır.

2.1.3 Hareketlerde yavaşlama (Bradikinezi)

Parkinson hastalığının belki de özürülük yaratan en temel belirtisi olan hareketlerdeki yavaşlama yani bradikinezi, erken veya geç olarak her hastada gelişir. Hareket yavaşlığı günlük yaşamdaki faaliyetlerin tümünün belli bir yavaşlıkta olmasına yol açar. Hareketlerin ardı sıra tekrarı ve eklemlerin hareket açıklığı azalmıştır. Hastaların basit günlük işlerini yapma sırasında örneğin; düğme ilikleme, kravat ve ayakkabı bağlama, yazı yazma ve çatal-bıçak kullanma gibi incelik isteyen işlerde başlangıçta hafif derecede hissettikleri güçlük giderek artar.

2.1.4 Parkinson Hastalığında Diğer Belirtiler

Parkinson hastalarının çoğu öne doğru hafif eğik durma eğilimindedir. Yürürken ve ayakta dururken bu durum daha belirgin olur. Yürüme zamanla bozular. Yürürken otomatik olarak yapılan kol sallama hareketi azalır ve zamanla kaybolur. Parkinson hastalığında konuşma bozukluğu, nadiren hastalığın başlangıcında ortaya çıkar. Hastaların konuşmalarında her heceyi

aynı tonda vurgulama söz konusudur. Kelimeler arasında alışılmış aralar yoktur ve kelimeler iç içe girermişçesine söylenir ve dolayısıyla konuşma anlaşılmaz hale gelebilmektedir. Tanımlanan bu konuşma özelliği Parkinson hastalığı için tipiktir.

Parkinson hastalığında, yutma kaslarının hareket azlığına bağlı olarak gıdaları yutma güçlüğü ortaya çıkabilir. Hareket yavaşlığı ön planda olan Parkinson hastalarının el yazılarında harfler küçülme eğilimindedir. Harflerin şekilleri normaldir ama yazı yazdıkça giderek küçülür ve okunamayacak hale gelebilir. Bu duruma “mikrografi” adı verilir (25).

Her Parkinson hastasında mental değişim görülmez. Fakat hastaların büyük çoğunluğunda depresyon görülür (26).

2.2 PARKİNSON HASTALIĞININ FİZYOPATOLOJİSİ

Parkinson hastalığının kesin nedeni tam olarak bilinmemektedir. Mekanik ve çevresel faktörler, kalıtsal etmenler, toksinler, oksidatif stres ve bazı nörodejeneratif hastalıkların Parkinson hastalığının patogenezi üzerine etkisi olduğu düşünülmektedir (5).

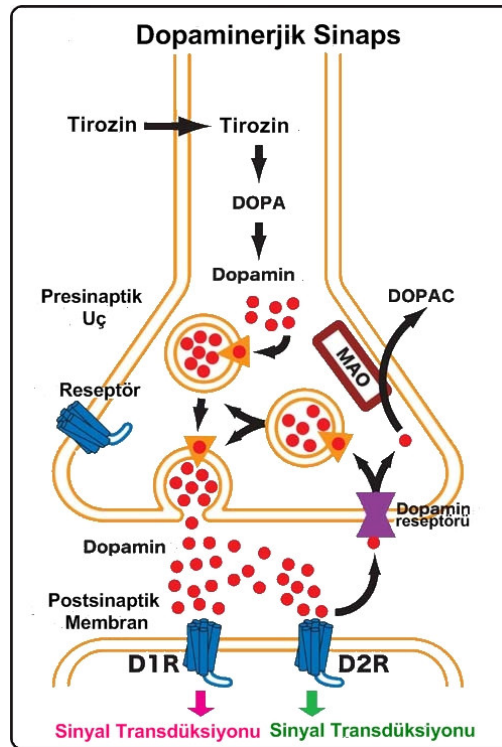
Parkinson hastalığında görülen hücresel patoloji “genetik geçişli Parkinson” ve “sporadik Parkinson” arasında patolojik açıdan büyük farklar olmadığını göstermiştir. Her iki formda da ortak nokta dopaminerjik nöronların kaybı ve Lewy cisimciklerinin varlığıdır (3).

Lewy cisimcikleri, içeriğinde alfa-sinüklein, parkin, ubiquitin ve nörofilamentler gibi birçok proteini barındıran sitoplazmik agregatlardır (27). Alfa-sinüklein, parkin ve ubiquitin proteosome system (UPS)’deki mutasyonlar Parkinson hastalığının patogenezinde büyük önem arz etmektedir (28) .

4q21-22 bölgesinde lokalize olan insan *α-sinüklein* geni, 140 amino asit içeren presinaptik bir proteini kodlar. En çok beyinde, az miktarda ise kalp, iskelet kası ve böbrekte de eksprese edilmektedir. Görevi tam olarak bilinmemekle birlikte ;

1. Nöron sitoplazmasında yağ asitlerini taşıma,
2. Nörotransmitter veziküllerin, taşıyıcıların ve belli enzimlerin fonksiyonlarını düzenleme,
3. Dopamin biyosentezinde rol oynayarak dopamin salınımını kontrol etme gibi görevlerinin olduğu düşünülmektedir.

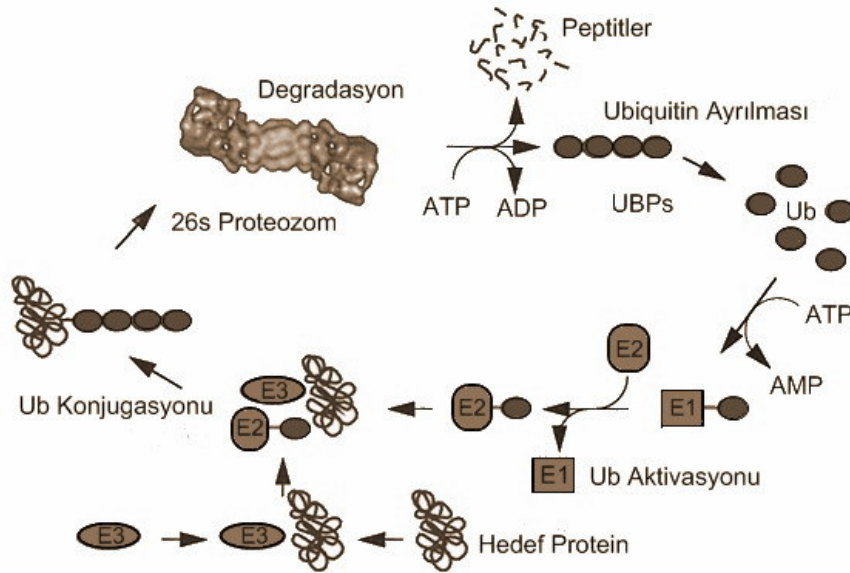
Dopamin çok önemli bir nörotransmitter maddedir ve nigrostriyatal nöronlar üzerinde inhibisyon etkisi yapar. Dopamin presinaptik membranda üretilir ve daha sonra veziküller halinde postsinaptik membrana aktarılır. Alfa-sinükleinin dopamin salınımını kontrol etmedeki rolü büyüktür. Bu olayda öncelikle tirozin hidroksilaz (TH) enzimi aktive olur. Aktifleşen TH, tirozini L-DOPA'ya dönüştürür. DOPA ise aromatik amino asit dekarboksilaz (AADC) enzimi ile dopamine çevrilir ve vesiküllere depolanır (Şekil 1). Alfa-sinüklein ise TH'a bağlanarak TH aktivasyonunu veya fosforilasyonunu inhibe eder ve dopamin sentezini yavaşlatır. Bu olay sonucunda dopamin sentezi dengede kalır (29).



Şekil 1: Presinaptik Bölgede Dopamin Salınımı (modifiye)

α-sinüklein'de oluşan mutasyonlar veya *α-sinüklein* eksikliği sonucu dopamin sentezi kontrol edilemez. Aşırı dopamin sentezi toksik yapılar oluşturur ve bu toksik yapılar protein, lipid ve DNA yapısını bozarak hücre ölümüne neden olur (30).

Parkin proteini bir ubiquitin ligaz (E3) olup, *α-sinüklein*'in ubiquitin proteosom sisteminde (UPS) yıkılmasını düzenleyerek gereğinden fazla birikmesini önler. Genel olarak E3 ligaz enzimlerinin işlevi, ubiquitin-aktive-edicisi-enzim E1 tarafından aktive edilip ubiquitin-konjüge-edicisi enzim E2'ye aktarılan ubiquitin monomerlerini substrat proteine eklemektir. Bu şekilde ubiquitin ile işaretlenmiş proteinler proteozom tarafından yıkılırlar. Dolayısıyla parkin, bir E3 ligaz olarak, hücredeki protein yıkımında kilit bir rol üstlenmektedir (Şekil 2). Ayrıca parkindeki “RING-finger” bölgeleri ile In between ring finger (IBR) bölgesi ubiquitin konjüge edici enzim E2 ile etkileşim için uygun bir ara yüz oluşturmaktadır (28, 29).



Şekil 2: Ubiquitin Proteozom Sisteminin (UPS) çalışma mekanizması (Modifiye)

Parkin geninde meydana gelen mutasyonlar α -sinükleini bu sisteme sunamadığından, α -sinüklein birikimine neden olarak Parkinson hastalığı oluşumunda etkin rol oynar. Halen 60 farklı *Parkin* geni mutasyonu bilinmekle beraber, yaşlı insanlarda görülen Parkinson hastalığında mutasyonların etkisi nadirdir (29,31).

Ubiquitin C-Terminal Hidrolaz L-1 (UCHL-1) ise ubiquitin proteozom sisteminde (UPS) enzim olarak görev yapar ve polimerik ubiquitinden monomerik ubiquitinin çıkarılmasını sağlar. Ubiquitin ünitelerinin çıkarılması için UCHL-1, ubiquitinin karboksil uçlarını keserek hidroliz eder. Hidrolize olan poliubiquitin monoubiquitin olarak yeniden döngüye katılır. Bu katılım monoubiquitin taşıdığı internalizasyon sinyali sayesinde olur.

UCH-L1'i kodlayan gende meydana gelen Ile93Met nokta mutasyonunun, UCH-L1'in monoubiquitin oluşturma aktivitesini yaklaşık %50 oranında azalttığı bulunmuştur (32-34).

Dopaminin yıkılmasında monoamin oksidaz A ve B (MAO-A,B) ve katekol-O-metiltransferaz (COMT) enzimleri görevlidir. Dopamin parçalanırken hidrojen peroksit açığa çıkmaktadır. Hidrojen peroksit bir oksijen radikali olup hücreye zarar vermektedir. *MAO-A,B* ve *COMT* genlerinde meydana gelebilecek genetik değişimlerin de Parkinson hastalığının oluşmasında etkili olduğu yapılan çalışmalarla gösterilmiştir. (35-38).

2.3 PARKİNSON HASTALIĞININ GENETİĞİ

Genetik geçişli Parkinson hastalığı otozomal dominant (ODPH) ve otozomal resesif (ORPH) olmak üzere iki gruba ayrılır. Otozomal dominant PD geç başlangıçlı olup ortalama 52 yaşlarında ortaya çıkarken, otozomal resesif PD'da başlangıç yaşı 45'den düşüktür. Bu gruba dahil edilen juvenil PH'nin başlangıç yaşı ise 21'in altındadır (3).

Parkinson hastalığı ile ilgili ilk ailesel çalışma Gowers tarafından 1888 yılında yapılmıştır (39). Gowers'dan beri hastalığın patolojisinde genetik faktörlerin rol aldığı düşünülmüş ve çok çeşitli çalışmalar yapılmıştır.

Bugüne kadar yapılan çalışmalar sonucu PD oluşumuna neden olduğu öne sürülen birçok gen belirlenmiştir. Fakat içlerinde tanımlanan ve en çok çalışılan genler; *alfa-sinüklein*, *parkin*, *UCHL-1*, *PINK1*, *DJ-1* ve *LRRK2* genleridir (Tablo1).

İlk defa 1996 yılında İtalyan kökenli geniş bir ailedeki ODPH olgularının incelenmesiyle tanımlanan alfa-sinüklein'e ait A53T mutasyonu genetik geçişli PH'da bulunan ilk mutasyondur. A53T mutasyonunu taşıyan α -sinüklein proteini protofibril oluşumunu tetiklemekte ve bu protofibriller de sinaptik veziküllerin zarlarının parçalanmasına neden olabilmektedir. Bu durumda da veziküllerdeki dopamin hücre içine salınmakta ve oksidatif stres yaratarak toksisiteye neden olmaktadır. Bu görüş açısından bakıldığında, α -sinüklein içeren protein agregatları yıkılması gerektiği halde yıkılamadığı için hücrede toksik bir etki yaratmaktadır (7). İkinci mutasyon olan A30P mutasyonu ise Alman bir ailede tanımlanmıştır (4). A30P mutasyonunun klinik tablosunun sporadik PH'ye çok benzediği bulunmuştur (50). Bulunan son mutasyon ise E36K mutasyonudur ve bu mutasyona sahip bireylerin klinik tablosunda demans ön plana çıkmaktadır (7).

Tablo 1: Parkinson hastalığıyla ilişkili olduğu düşünülen lokuslar

Lokus	Lokalizasyonu	Protein	Kalıtım Biçimi	Başlangıç yaşı	Süreç	Kaynak
PARK1	4q-21-22	α -sinüklein	OD	46-60	Hızlı	40
PARK2	6q25-27	Parkin	OR	<20	Çok yavaş	41
PARK3	2p13	?	OD	60>	Yavaş	42
PARK4	4p15	?	OD	20-45	Hızlı	43
PARK5	4p14	UCH-L1	OD	46-60	?	44
PARK6	1p35-36	PINK-1	OR	20-45	Yavaş	45
PARK7	1p36	DJ-1	OR	20-45	Yavaş	46
PARK8	12p11-q13.1	LRRK2	OD	46-60	?	47
PARK9	1p36	?	OR	20-45	?	4
PARK10	1p32	?	OD	60>	?	4
PARK11	2q34	?	OD	60>	?	4
Nurr1	2q22-23	NR4A2	OD	60>	?	48
Synphilin-1	5q23	SNCAIP	OD	60>	?	49

1998 yılında Japonya’da jüvenil başlangıçlı otozomal resesif geçiş gösteren ailesel PH olgularında bağlantı analizi ve pozisyonel klonlama yöntemleri ile bulunan *parkin* geni yaklaşık 500 kilobazlık (kb) bir bölgeyi kaplayan ve 12 kodlayıcı ekzonu bulunan bir gendir. Şimdiye kadar bu gende 39 nokta mutasyonu ve 29 farklı, ekzon içi değişiklik (delesyonlar, duplikasyonlar ve triplikasyonlar) tanımlanmıştır. *Parkin*’e bağlı PH olgularındaki en belirgin özellik, olguların çok büyük kısmında PH’nın nöropatolojik olarak ayırıcı özelliği olan Lewy cisimciklerinin yokluğudur. (3)

Jüvenil PH vakalarının %49’unda ve 45 yaş altı sporadik vakaların %18’inde *Parkin* mutasyonu tespit edilmiştir. Ayrıca jüvenil Parkinson hastalarının %77’sinin 20 yaş altı, %26’sının 21-30 yaş arası ve %3’ünün 30 yaş üstü olduğu araştırmalarla belirlenmiştir (4).

Ubiquitin C-terminal hidrolaz L1 (UCH-L1) büyük oranda beyinde ifade edilen bir protein olup, ubiquitin polimerlerini hidroliz yoluyla monomerik forma geri dönüştüren bir enzimdir. Bu görevi nedeniyle de ubiquitin-proteozom sisteminde önemli bir rol oynar. Şimdiye kadar bu proteini kodlayan gende bir nokta mutasyonu (I93M) ve bir de koruyucu polimorfizm (S18Y) tespit edilmiştir. I93M mutasyonu hastalığın otozomal dominant formuna neden olmakta, koruyucu polimorfizm ise sporadik PH riskini azaltmaktadır. I93M mutasyonu UCH-L1 enziminin aktivitesini düşürmekte, dolayısıyla “işlev kaybı” mekanizmasına işaret etmektedir. Ayrıca UCH-L1 dimerleşerek ubiquitin ligaz aktivitesi de göstermektedir ki, I93M mutasyonu bu işlevi de azaltmakta, S18Y polimorfizmi ise ligaz aktivitesini arttırmaktadır. Son çalışmalar UCH-L1’in aynı zamanda proteaz aktivitesi olduğunu da kanıtlamıştır (7).

PINK-1 (PTEN- tarafından indüklenen kinaz 1) geni yaklaşık 1.8 kb’lik bir alanı kaplayan ve sekiz kodlayıcı ekzon içeren bir gendir. Bu gen 581 amino asitten oluşan ve yaygın olarak ifade edilen bir proteini kodlamaktadır. *PINK-1*, serin/treonin kinazların Ca^{+2} /kalmomodulin ailesine

büyük benzerlik göstermekte ve mitokondriyal hedefleme motifi içermektedir. Hücre kültüründen yapılan çalışmalarda PINK-1'in lokalizasyonunu mitokondriyi işaret etmektedir (7).

İkisi İtalyan, biri İspanyol kökenli, akraba evliliği yapmış üç ailede görülen ORPH nedeni olarak, *PINK-1* genindeki G309D ve W437Stop nokta mutasyonları belirlenmiştir. Her üç ailenin de aynı haplotipi taşıyor olması, bu mutasyonlar için bir ortak-atayı göstermektedir. G309D mutasyonu proteinin yüksek oranda korunmuş kinaz bölgesinde iken, W437Stop mutasyonu ise kinaz bölgesinin C-terminalinde bulunan 145 amino asidin eksikliğine yol açmaktadır. Her iki mutasyonun da, proteinin kinaz aktivitesini azalttığı ya da substrat tanıma yeteneğini etkilediği düşünülmektedir. Bu da mutasyonların proteinin “işlev kaybına” yol açtığına işaret etmektedir (4).

Erken-başlangıçlı ORPH'ya neden olan genlerden biri de PARK7 lokusunda bulunan *DJ-1* genidir. DJ-1 proteini, homodimerik bir protein olup, kemirgenlerde infertilite ile ilgili bir multiprotein kompleksinin parçası olarak bulunmuş ve c-myc proteini ile etkileşim yoluyla mRNA'ların stabilizasyonunda görev aldığı gösterilmiştir. Ayrıca DJ-1, oksidatif stresi algılayıp antioksidan bir molekül olarak davranabilmektedir (7).

DJ-1 geni ile ilgili ilk genetik çalışma Hollanda'da yapılmıştır (4). L166P mutasyonu taşıyan DJ-1 proteini üzerindeki çalışmalar, bu mutasyonun proteinin katlanmasını etkilediğini ve bunun sonucunda da proteinin homodimer oluşturamadığını göstermiştir. Bu şekilde yanlış katlanmış ve stabilitesi düşmüş mutant DJ-1, protein yıkım sisteminden kurtularak sitotoksositeye neden olabilmektedir. *DJ-1* geninde tanımlanan E64D ve M26I mutasyonlarının etkileri ise daha farklıdır. Bu iki mutasyonu taşıyan proteinin stabilitesi azalmakta, ancak L166P mutasyonunu taşıyan DJ-1 kadar düşmemektedir (7).

LRRK2 (Leucine rich repeat kinase 2) geni ilk olarak Funuyama ve arkadaşları tarafından Japon bir ailede tanımlanmıştır. Otozomal dominant

parkinsonizm ile alakalı olan bu gen 12p11.2-q13.1 bölgesinde haritalanmıştır. G2019S mutasyonu, Aşkenazi Yahudileri ve Kuzey Afrika Araplarında en sık rapor edilen en yaygın ailesel ve sporadik PH mutasyonudur (3).

Bahsedilen genlerden başka, sitokrom P450 izoenzimleri (*CYP1A1*, *CYP1A2* ve *CYP2D6*), N-Asetiltransferaz 2 (NAT 2), Monoamin oksidaz A ve B (*MAO-A* ve *MAO-B*), Dopamin Transporter (*DAT*), Glutasyon-S-transferazlar (*GST M1*, *P1*, *T1* ve *Z1*), dopamin reseptör genleri (*D2*, *D4*), Anjiyotensin dönüştürücü enzim (*ACE*) ve mitokondriyal kompleks I ile ilgili çalışmalar yapılmış fakat bu aday genler ve PH arasında anlamlı bir ilişki bulunamamıştır. Bu genlerde bulunan polimorfizmler ve sporadik PH arasındaki ilişki, popülasyonlar arası farklılıklar göstermekte ve istatistiksel anlamlılık büyük ölçüde değişmektedir (4,7)

İnflamasyonun Parkinson hastalığının patogenezi üzerine etkili olduğunun bulunmasıyla, bu alanda çok sayıda polimorfizm ve mutasyon taraması çalışmaları yapılmaya başlanmıştır. Bunlardan bazıları TNF- α , IL-1 α , IL-1 β ve IL-10 gibi inflamasyonda görevli moleküller üzerine yapılan çalışmalardır (51-54). Yapılan araştırmalar sonucunda anlamlı istatistiksel sonuçların bulunması, bilim insanlarının inflamasyonda görevli olan diğer molekülleri araştırmaya yönlendirmiştir. Bu moleküllerden biri de kemokinler ve kemokin reseptörleridir.

2.4 KEMOKİN VE KEMOKİN RESEPTÖRLERİ

İmmün sistemin antijenik ve otoimmün reaksiyonlar gibi olaylara karşı yanıt geliştirmesi kemokinlerin lökositleri doğru yere yönlendirmelerine ve doğru zamanda aktive etmelerine bağlıdır (55). Kemokinler inflamasyonda ve homeostazda lökositlere ve kök hücrelere kemotaksi yaptıran sitokinlerdir (56). Kemokinlerin lökositlerle olan etkileşimi; iyon akışı, transmembran potansiyeli, integrin aviditesi ve hücrede şekil değişikliğinin yanı sıra

lizozomal enzimlerin sekresyonu, süperoksit anyonlarının oluşumu gibi birçok hücrel ve biyokimyasal olayların başlamasını sağlar (57).

Kemokinler lökosit-endotelyal hücre ilişkilerinde, T ve B hücre olgunlaşmasında, immün denetim, tolerans ve immüitenin oluşmasının yanı sıra T-B hücre iletişimde ve primer immün cevabın oluşmasında etkin olmaktadır.

Ayrıca, dendritik hücre fonksiyonlarında, T hücre farklılaşması ve fonksiyonlarının sağlanmasında, efektör T hücre cevabı ve inflamatuvar hastalıklarda, mukozal immüitede ve HIV-1 virüsünü de içeren çeşitli virüsler tarafından konakçı immün cevabı baskılayan olaylarda da rol oynamaktadırlar (56).

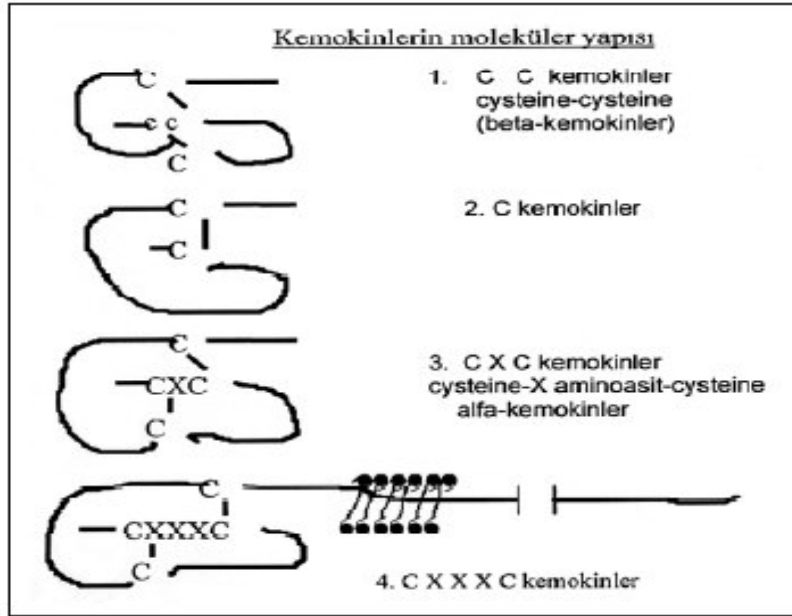
2.4.1 Kemokinlerin Yapı ve Fonksiyonları

Kemokinler, 8-12 kD moleküler ağırlığa sahip, çok sayıda domainleri bulunan protein yapıda moleküllerdir. Kemokin genleri spesifik lokuslarda yer almaktadırlar. CC kemokin genleri 17q11.2-12 ve CXC kemokin genleri de 4q13 lokusunda bulunurlar (57).

1987 yılında IL-8'in tanımlanmasıyla kemokinlerin yapı ve fonksiyonlarına açıklık getirilmeye başlanmıştır. Bugüne kadar yapılan çalışmalarda, insanlarda yaklaşık olarak 50 kemokin ve 20 kemokin reseptörü tanımlanmıştır (57).

Kemokinler, heparin bağlayan moleküller olup amino asit dizileri bakımından %20-75 oranında homoloji göstermektedirler. Kemokinler, yapılarında bulunan sistein (cysteine=C) rezidülerinin bulunduğu molekülün N-terminal ucundaki yerleşim pozisyonlarına göre CXC, CX₃C, CC ve C olmak üzere 4 gruba ayrılmaktadırlar. Fakat bu gruplardan sadece iki tanesi detaylı olarak karakterize edilmiştir. Alfa ve beta kemokinler, yapılarında 4 sistein içermekte olup kemokinlerin en büyük grubunu oluşturmaktadırlar.

Alfa kemokinlerin yapılarında bulunan ilk 2 sistein rezidüsü tek bir aminoasit ile ayrılır ve CXC (Cysteine-X amino asit-Cysteine) olarak adlandırılırlar. Buna karşılık beta kemokinlerin ilk iki sistein rezidüsü birbirileriyle yan yana bulunur ve CC (Cysteine-Cysteine) kemokin olarak sınıflandırılırlar (Şekil 3). Bunlardan farklı olan CXXXC yapısındaki fraktalkin, ilk iki sistein rezidüsü üç aminoasitle ayrılmış membran bağımlı bir glikoproteindir (56).



Şekil 3 : Kemokinlerin molekül yapılarına göre sınıflandırılmaları (56)

α -kemokinler nötrofillere etki ederken lenfositlere karşı etki göstermezler. β -kemokinler ise genellikle nötrofillere karşı etki göstermezken, monosit, eozinofil, bazofil ve lenfositlere değişik derecelerde etki ederler.

CXC kemokinler, N terminallerinde glutamik asit-lösin-arginin (Glu-Leu-Arg) dizilimi gösterenler (ELR kemokinler) ve göstermeyenler (non-ELR kemokinler) olarak 2 alt gruba ayrılırlar. Glu-Leu-Arg diziliminin yokluğu nötrofilere karşı olan etkilerinin zayıf olmasına neden olur. Bu grupta PF-4

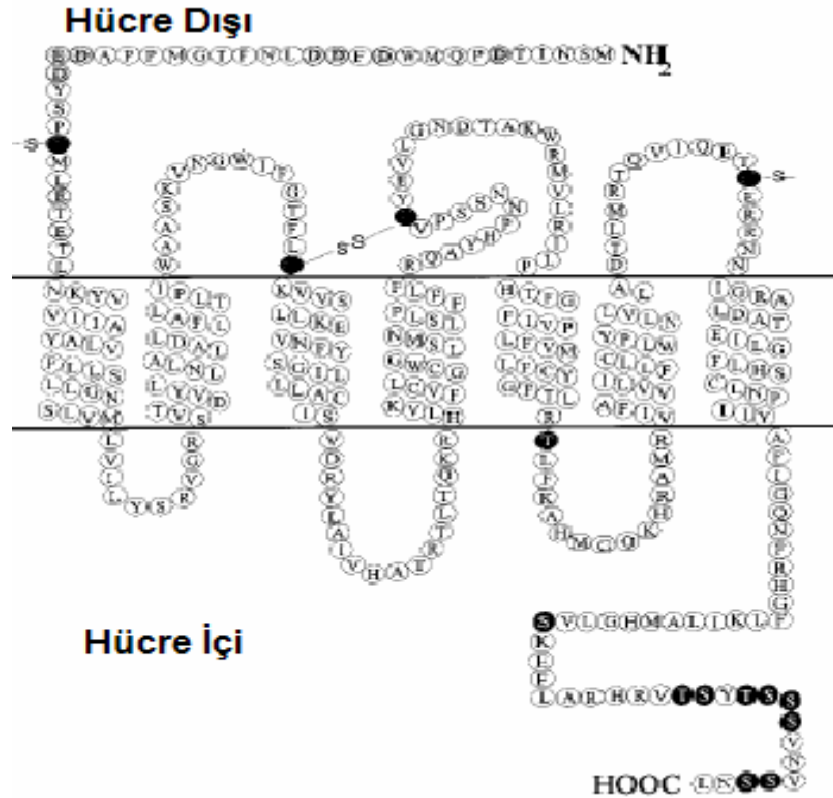
(Platelet factor), IP-10 (Gamma interferon inducible protein) ve MIG (Monokin induced by interferon gamma) bulunmaktadır. PF-4'ün N terminali Glu-Leu-Arg olarak değişirse IL-8 reseptörlerine bağlanabilmekte ve nötrofillere karşı güçlü etki göstermektedir (Tablo 2) (58).

Tablo 2: Kemokinler, hedef hücreleri ve biyolojik aktiviteleri (58)

KEMOKINLER	HEDEF HÜCRE	BIYOLOJİK AKTİVİTELERİ
<i>CXC Kemokin</i>		
<i>ELR</i>		
IL-8	Nötrofil, T lenfosit, bazofil, endotel hücresi (?)	Kemotaksis, adezyon, süperoksit, histamin ve grantil salınımı, mitogenezis, anjiogenezis
GRO- α (MGS)	Nötrofil, melanosit, endotel hücresi (?)	Kemotaksis, adezyon, aktivasyon, anjiogenezis
GRO- β (MIP-2 α)	Nötrofil, endotel hücresi (?)	Kemotaksis, adezyon, aktivasyon, anjiogenezis
GRO- γ (MIP-2 β)	Nötrofil, endotel hücresi (?)	Kemotaksis, adezyon, aktivasyon, anjiogenezis
ENA-78	Nötrofil	Kemotaksis, aktivasyon
GCP-2	Nötrofil	Kemotaksis
Platelet basic protein		
CTPA-III	Fibroblast	Kemotaksis
B-Tromboglobülin	Fibroblast	Kemotaksis
NAP-2	Nötrofil	Kemotaksis
<i>Non-ELR</i>		
Platelet factor-4	Fibroblast, endotel hücresi, aktive T lenfosit	Kemotaksis, anjiogenez inhibisyonu
IP-10	Endotel hücresi (?), NK hücresi	Kemotaksis, sitolitik aktivite, anjiogenez inhibisyonu
MIG	Aktive T lenfosit	Kemotaksis
SDF-1 α	T lenfosit, CD34(+) progenitör, B lenfosit(?)	Kemotaksis
SDF-1 β	?	?
<i>CC Kemokin</i>		
MCP-1	Monosit, Memory-T lenfosit, bazofil, NK hücresi, Hematopoietik progenitörler, dendritik hücre (?)	Kemotaksis, adezyon, süperoksit, histamin salınımı, lökotrien sentezi, araşidonik asit aktivasyonu
MCP-2	Monosit, Memory-T lenfosit, eozinofil, bazofil, NK hücresi	Kemotaksis, histamin salınımı
MCP-3	Monosit, Memory-T lenfosit, eozinofil, bazofil, NK hücresi, dendritik hücre	Kemotaksis, araşidonik asit aktivasyonu, histamin salınımı
MCP-4	Monosit, T-lenfosit, eozinofil	Kemotaksis
MIP-1 α	Monosit, T-lenfosit, NK hücresi, bazofil, eozinofil, dendritik hücre, hematopoietik progenitörler	Kemotaksis, adezyon, kollajenaz, histamin ve katyonik protein salınımı, tümör sitotoksitesi
MIP-1 β	Monosit, T-lenfosit, Dendritik hücre, NK hücresi, Hematopoietik progenitörler	Kemotaksis, adezyon, anjiogenez inhibisyonu
RANTES	Memory T-lenfosit, eozinofil, bazofil, NK hücresi, dendritik hücre	Kemotaksis, adezyon, histamin ve katyonik protein salınımı
Eotaksin	Eozinofil	Kemotaksis
1309	Monosit	Kemotaksis
HCC-1	Monosit, Hematopoietik progenitörler	?
TARC	T-lenfosit	?
MIP-3 α LARC	?	?
MIP-3 β	?	?

2.4.2 Kemokin Reseptörleri

Tüm kemokin reseptörleri membran bağımlı moleküller olup, yapılarında 7-transmembran domainleri bulunmakta ve G-proteinleri ile çiftler oluşturmaktadırlar. Kemokin reseptörleri, “G-protein-coupled protein” yapısındadır ve lökositler üzerinde eksprese olmaktadır. Kemokinler, hedef hücreler üzerindeki spesifik G-protein-coupled hücre yüzey reseptörlerine bağlanarak hücre içi sinyali başlatırlar, devamında da hücre göçü ve aktivasyonunun indüklenmesine yol açarlar. Bu güne kadar 20 kadar kemokin reseptörü tanımlanmıştır (56).



Şekil 4 : Kemokin reseptörlerinin hücre zarındaki temel yapısı (57)

Kemokinlerin aracılık ettikleri hücre göçü ve aktivasyonu için bu moleküllerin hücre üzerindeki özgül reseptörlerine bağlanmaları gerekir.

Bugüne kadar 4 tane CXC (CXCR1-CXCR4), 8 tane CC (CCR1- CCR8) ve 1 tane de CX3C (CX3CR) kemokin reseptörü tanımlanmıştır. Bazı reseptörler tek bir hücrede yoğunlaşırken (CXCR1 sıklıkla nötrofilde); diğer reseptörler farklı hücrelerde görülürler (CCR2 monosit, T lenfosit, NK hücre, dendritik hücre ve bazofilde). CCR1 ve CCR2 özellikle monositlerde bulunurken; sadece IL-2 uyarımından sonra lenfositlerde belirir (58).

Birçok kemokin reseptörü birden fazla kemokinle bağlanmakta ise de; CC reseptörleri sadece CC kemokinleri, CXC reseptörleri de CXC kemokinlerini bağlamaktadırlar. Bu reseptör-ligand sınırlılığı muhtemelen primer, sekonder ve tersiyer yapıları benzer ancak kuaterner yapıları birbirinden farklı olan CC ve CXC kemokinlerin yapısal farklılığından kaynaklanmaktadır (58) (Tablo 3).

Tablo 3: Kemokinler ve ligandları (58).

Reseptör	Ligand
CCR1	CCL3,CCL5,CCL7,CCL13,CCL14,CCL15,CCL16,CCL23
CCR2	CCL2,CCL7,CCL8,CCL13,CCL16
CCR3	CCL5,CCL7,CCL8,CCL11,CCL13,CCL15,CCL16,CCL24,CCL26,CCL28
CCR4	CCL17,CCL22
CCR5	CCL3,CCL4,CCL5,CCL8,CCL11,CCL14,CCL16
CCR6	CCL20
CCR7	CCL19,CCL21
CCR8	CCL1
CCR9	CCL25
CCR10	CCL27,CCL28
CXCR1	CXCL6,CXCL7,CXCL8
CXCR2	CXCL1,CXCL2,CXCL3,CXCL5,CXCL6,CXCL7,CXCL8
CXCR3-A	CXCL9,CXCL10,CXCL11
CXCR3-B	CXCL4,CXCL9,CXCL10,CXCL11
CXCR4	CXCL12
CXCR5	CXCL13
CXCR6	CXCL16
CXCR7	CXCL12
XCR1	XCL1,XCL2
CX ₃ CR1	CX ₃ CL1
CCX-CKR	CCL19,CCL21,CCL25
D6	CCL2,CCL3L1,CCL4,CCL5,CCL7,CCL8,CCL11,CCL13,CCL14,CCL17, CCL22
DARC/Duffy	CCL2,CCL7,CCL8,CCL11,CCL13,CCL14,CCL16,CCL17,CXCL1,CXCL5, CXCL6,CXCL7,CXCL8,CXCL9,CXCL11,CXCL13

Bazı kemokin reseptörleri nöronlar, astrositler, epitelyal hücrelerde de bulunur. Bu da kemokin sisteminin lökosit göçü dışında diğer sistemlerde de bir takım fonksiyonları olduğunu düşündürmektedir (58).

2.4.3 Kemokinler ve İnflamasyon

Birçok akut ve kronik inflamatuvar hastalıkta kemokinlerin ilgili ortama salgılandıkları gösterilmiştir. Bu hastalıklarda kemokinler dokuda lökositlerin toplanmasını ve aktivasyonunu sağlamaktadır (59).

İnflamasyonla seyreden hastalıklarda kemokinlerin çok önemli görevleri bulunmaktadır. İnflamasyonda kemokinler lökositlerin kandan dokuya geçişine dolayısıyla da inflamasyonun bulunduğu yerde birikimine ve aktivasyonuna yol açmaktadır (24).

İnflamatuvar süreçte kemokinlerin sentezi ve salınımindaki belirgin artım lökositlerin inflamasyonlu dokuya geçişlerinde önemli rol oynamaktadır. Uygun uyarılar altında deri, beyin, eklemler, akciğerler, kan damarları, böbrekler ve meningesler gibi dokularda kemokinlerin sentezinin artışı gözlenmiştir (24).

Allerjik veya otoimmün inflamasyonlarda immün sistem ve inflamatuvar yanıtıdan sorumlu hücrelerin inflamasyon alanında birikimi kemokinlerin etkisi sonucu oluşmaktadır. Mukozalara nötrofillerin, monositlerin ve makrofajların gelmesi, yerleşmesi ve inflamatuvar sürece katılımları da yine büyük oranda kemokinlerin katkısına bağlıdır (24).

İnsan ve hayvanlar üzerinde yapılan çalışmalarda görülmüştür ki; Romatoid Artrit (RA) gibi kronik eklem hastalıklarında sinoviyal fibroblastlar ve doku makrofajlarından Monocyte Chemoattractant Protein (MCP-1) ve Macrophage Inflammatory Protein-1 α (MIP-1 α) salınımı artmakta ve hastalığın patogenezinde rol oynamaktadır (59, 60)

Böbrek hastalıklarından proliferatif glomerülonefritte glomerüllerin histokimyasal incelemesinde MCP-1 kemokini bulunmuştur (61). Aynı şekilde IgA nefropatisi, membranoproliferatif glomerülonefrit ve krioglobülinemide, glomerül ve tubulointerstisyumda RANTES, MCP-1, IL-8'in varlığı saptanmıştır (62, 63). Glomerülonefritlerde üriner IL-8 ve MCP-1 atılımı ve lökosit infiltrasyonu arasında pozitif bir ilişki bildirilmiştir. Böbrek transplant rejeksiyonunda da RANTES, IL-8, MCP-1 ve ENA-78 seviyeleri artmış olarak bulunmuştur (58).

Multiple Skleroz (MS), demans, Alzheimer Hastalığı (AD) ve Spinocerebellar Ataksi Tip 3 (SCA/MJD) gibi nörodejeneratif hastalıklarda inflamasyonun rolünün bulunması ilgiyi bu yöne çekmiştir (64, 65). 1988' de Mc Geer ve arkadaşlarının, Parkinson hastalarının substantia nigra tabakasında human leukocyte antigen-DR (HLA-DR) positive mikroglia hücrelerinin bulunduğunu rapor etmesi, PH patogenezinde de inflamatuvar reaksiyonların etkili olabileceği kanısını akla getirmiştir (66, 67).

Yapılan diğer bir çalışmada ise, substantia nigra tabakasında yüksek oranda TNF- α pozitif mikroglia hücreleri tespit edilmiştir (68). Bu ve benzeri çalışmalarda görülüyor ki, inflamatuvar yanıtta temel hücre tipi mikroglialardır. Aynı yaşta kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, Parkinson hastalarında aktive mikroglia hücre sayısının daha çok olduğu ve bu aktive mikroglia hücrelerinin kültüre edilmiş dopaminerjik nöronların dejenerasyonunu indüklediği yapılan çalışmalarla gösterilmiştir (69, 70)

Substantia Nigra (SN) bölgesi beynin diğer bölgelerine kıyasla mikroglia açısından daha zengindir. Buna rağmen, SN tabakası beynin diğer bölgelerine oranla daha düşük glutatyon seviyesine sahip olduğu için oksidatif stres ve mikroglial hasara karşı daha açıktır (69).

Mikroglial hasara sebep olan en önemli faktörler çeşitli hücre kalıntıları (Lewy cisimcikleri, β -amiloid plaklar), toksinler (MPTP, rotenone, 6-OHDA), lipopolisakkaritler (LPS), travmalar ve infeksiyöz ajanlardır (70).

Mikroglialar beyindeki en ufak değişikliklere karşı hassastır ve aktive olduklarında B ve T lenfositler, proinflamatuvar sitokinler (interlökinler IL-1 α /1 β ; tümör nekroz faktör (TNF α / β); transforming growth factor (TGF α / β)), koloni stimüle faktörler ve kemokinlerin salınımını gerçekleştirirler. Bu inflamatuvar medyatörler; reaktif oksijen radikalleri, reaktif nitrojen radikalleri (RNS), nitrik oksit (NO) oluşumuna sebep olur ki bu faktörler nörodejenerasyonun en önemli sebeplerindendir (70). Yapılan çeşitli araştırmalar da bu hasar gösterilmiştir (71-75).

Son yıllarda Parkinson hastalığının patogenezi üzerine inflamasyonun etkisinin çalışılması inflamasyonda görevli olan yapılara ait genlerin mutasyon taraması ve polimorfizm araştırmalarının yapılmasına aracılık etmiştir. Kemokin ve kemokin reseptörlerinin Parkinson hastalığı ile arasındaki ilişkinin yavaş yavaş açığa çıkarılması da araştırmamızı bu yöne sevk etmiştir. Bu sebeple tez çalışmamızın inflamasyonda rol oynayan kemokin ve kemokin reseptörleri olan IL-8, MCP-1, RANTES, CCR2 ve CCR5'i kodlayan genlerde polimorfizm çalışması yapmayı uygun gördük. Bu alanda yapılan çalışmaların azlığı nedeniyle, yaptığımız bu araştırmanın hastalığın patogenezinin açığa çıkarılmasında önemli olacağı kanaatindeyiz.

2.5 Genetik Polimorfizm

İnsan genomunun bütün bölgeleri boyunca DNA yapısında zararsız kalıtsal varyasyonlar vardır. Yani bir bireyin genomu her 100-200 nükleotid de 1-2 baz değişimi içermekte fakat bu durum kişilerde önemli bir hastalığa yol açmamaktadır. İnsan genomundaki bu değişikliklere “polimorfizm” olarak nitelendirilmektedir.

DNA sekanslarında gözlenen bu değişiklikler çok çeşitli olabilir; bunlar tek bir nükleotiddeki değişiklikler (single nucleotide polymorphism, SNP) olabileceği gibi, pek çok baz çiftini etkileyen insersiyon yada delesyonlar

şeklinde de olabilir. Bu tip değişiklikler, genomun önemli bir bölümünü oluşturmasına rağmen herhangi bir proteine dönüşmeyen intron kısımlarında veya genler arasındaki DNA parçalarında da meydana gelebilir.

İnsan genomunda baz değişikliklerine oldukça sık rastlanmaktadır. Bazılarına göre bu sıklık her 100 baz çiftinde bir olarak ortaya çıkmaktadır. En sık görülen değişiklikler tekrarlayan baz dizileridir. Bilindiği gibi insan genomunda birçok ardışık tekrarlayan DNA dizisi vardır ve bu tekrar dizilerinin sayısı bireylere göre değişmektedir.

İnsan genomunda yer alan DNA polimorfizm örnekleri genel olarak 3 grup altında değerlendirilebilir:

- Restriksiyon parça uzunluk polimorfizmi (Restriction Fragment Length Polymorphism; RFLP)
- Basit dizi tekrarları (Simple Sequence Repeats; SSR)
- Değişken sayıda ardışık dizi tekrarları (Variable Number of Tandem Repeats; VNTR)

2.6 Polimeraz zincir reaksiyonu restriksiyonu/Parça uzunluk polimorfizmi (PCR/RFLP)

Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Polymerase Chain Reaction:PCR) dizisi bilinen iki bölge arasında uzanan bir DNA parçasının çoğaltılması için uygulanan bir tekniktir. İki oligonükleotid, bir DNA polimeraz tarafından katalizlenen bir seri tepkimenin primerleri olarak kullanılır. Bu oligonükleotidler tipik olarak farklı farklı dizilere sahiptir ve kalıp DNA'nın karşı dizilerinde uzanan ve çoğaltılacak olan DNA'nın parçası yanında bulunan dizilere komplementerdir.

Bir PCR reaksiyonun gerçekleşebilmesi için;

- Kalıp DNA
- Deoksiribonükleotid Fosfatlar (dNTP)
- Magnezyum Derişimi ve PCR Tamponu (Buffer)
- Oligonükleotidler (Primerler)
- Taq DNA polimeraz'a ihtiyaç vardır.

Restriksiyon endonükleaz (RE) enzimleri, kısa DNA dizilerini özgül olarak tanıyan ve bu dizilere yakın bölgelerden yada bu diziler içindeki spesifik bölgelerden DNA'yı kesen yapılardır. Kesim sonucunda DNA'da oluşturdukları uçların motiflerine göre "yapışkan uç" ve "küt uç" kesim yapan enzimler olmak üzere 2 gruba ayrılırlar. Yapışkan uçların ligasyon etkinlikleri yüksektir ve bu sebeple klonlama çalışmalarında tercih edilirler.

DNA sarmalı özgül restriksiyon enzimi ile (RE) kesildiği zaman farklı uzunlukta fragmantlar oluşur ve bu fragmanlar jel elektroforezinde gözlenir. Bazen RFLP sonucu varolan kesim noktası da ortadan kalkabilir.

RFLP yöntemi genel olarak 4 adımda gerçekleştirilir; İlgili DNA bölgesinin PCR ile çoğaltılması, PCR ürününün spesifik RE ile kesimi, kesilen PCR ürününün elektroforez ile yürütülmesi ve UV ışık altında görüntülenmesi.

Elektroforezde; farklı nükleotid uzunluğuna sahip DNA parçalarının farklı göç hızlarına sahip olmaları prensibinden faydalanılarak, polimorfik değişiklik gösteren sekanslar (polimorfizmler) kolaylıkla belirlenebilmektedir. RFLP, genlerin normal kopyalarını mutant kopyalarından ayırmada kullanılan en yaygın yöntemlerdendir.

Hedef gen bölgesindeki değişim, çoğaltılan DNA bölgesine spesifik restriksiyon enziminin tanıma bölgesine özgülse mutasyonlu üründe kesim gözlenirken normal üründe kesim gerçekleşmez. Kesim işleminden sonra örneklerin kesim özelliğine göre homozigot normal, heterozigot veya

homozigot mutant değerlendirilmesi yapılır. Bu durumda, kesim gerçekleşmeyen örnekler homozigot normal, kesim gerçekleşenler ise homozigot mutant olarak adlandırılır. Bir alleli kesime uğrayıp diğeri uğramayan örnekler ise heterozigot olarak adlandırılır.

3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

3.1. Çalışma Grubunun Toplanması

Isparta Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi ve Isparta Devlet Hastanesi Nöroloji Anabilim Dalı Polikliniklerine başvuran, Parkinson hastalığı tanısı konmuş, yaşları 43-79 arasında değişen ve yaş ortalamaları 64.8 ± 9.4 olan 14 erkek ve 16 bayan toplam 30 birey tez çalışmasına dahil edilmiştir. Çalışmaya dahil edilen hastaların seçilme kriteri; elde veya ayakta istirahat tremoru varlığı, bradikinezi ve daha önce Parkinson tanısı konulmuş olma olarak belirlenmiştir. Kontrol grubu ise yaşları 38-79 arası değişen, yaş ortalamaları 57.5 ± 8.3 olan 18 erkek ve 42 kadın toplam 60 bireyden oluşmaktadır. Kontrol grubu belirlenirken, özellikle hasta grubunun yaş ortalamasına yakın olmasına ve Parkinson hastalığı tanı kriterlerine sahip olmamasına dikkat edilmiştir.

Hasta grubu Isparta ve çevre illerde ikamet eden bireylerden oluşturulmuştur. Tablo 4'de Parkinson hastaları ve klinik özellikleri verilmiştir.

Tablo 4: Parkinson hastalarının klinik özellikleri

Hasta No	Yaş	Cinsiyet	İlk Görülme Yaşı	Başvuru Şikayeti	İkamet Yeri
1	62	K	59	Yürüyememe	Isparta/Senirkent
2	62	E	60	Yürüyememe	Isparta/Gelendost
3	66	E	63	Hareketlerde Yavaşlama	Isparta/Keçiborlu
4	66	E	63	Yürüyememe	Isparta
5	62	K	59	Sağ el titreme ve Yazma Güçlüğü	Isparta
6	38	E	37	Hareketlerde Yavaşlama	Isparta
7	72	E	69	Yürüyememe	Isparta/İslamköy
8	65	K	62	Yürüyememe	Isparta
9	69	E	67	Yürüyememe	Isparta
10	76	E	72	Hareketlerde Yavaşlama	Isparta
11	78	K	74	Hareketlerde Yavaşlama	Isparta/Yalvaç
12	56	K	55	Yürüyememe	Isparta/Eğirdir
13	79	E	76	El ve Ayaklarda Titreme	Burdur
14	79	E	77	Yürüyememe	Isparta
15	57	K	74	Hareketlerde Yavaşlama	Isparta

16	59	K	57	Yazı ve Konuşmada Güçlük	Burdur
17	58	E	56	Hareketlerde Yavaşlama	Burdur
18	61	K	59	Hareketlerde Yavaşlama	Isparta
19	63	E	61	Yürüyememe	Isparta
20	69	K	66	Yürüyememe	Isparta/Uluborlu
21	67	K	65	Yürüyememe	Isparta
22	43	K	42	Hareketlerde Yavaşlama	Isparta
23	68	E	66	El ve Ayaklarda Titreme	Isparta/Gelendost
24	65	E	64	El ve Ayaklarda Titreme	Isparta/Sav
25	67	K	66	El ve Ayaklarda Titreme	Isparta/Yalvaç
26	73	K	70	Yürüyememe	Isparta
27	74	K	71	Yürüyememe	Afyon
28	62	E	61	Yazı ve Konuşmada Güçlük	Isparta/Sütçüler
29	74	E	71	Yürüyememe	Isparta
30	67	E	64	El ve Ayaklarda Titreme	Burdur

3.2 Kimyasallar

- Sodyum EDTA (Na₂EDTA) (C₁₀H₁₄N₂O₈Na₂.2H₂O)
(Amresco 0105-1KG)
- Tris base (Trizma baz) (C₄H₁₁NO₃) (Amresco 0826-1KG)
- Sodyum klorür (NaCl) (Merck 1.06404.1000)
- Trizma hydrochloride (Tris HCl) (C₄H₁₁NO₃.HCl)
(Amresco 0234-500G)
- Kalsiyum klorür (CaCl₂) (J.T.Baker 0070)
- Proteinaz K (Sigma)
- Sodyum dodesil sülfat (SDS) (Merk 8.22050.1000)
- Amonyum asetat (NH₄C₂H₃O₂)
- Etil alkol (C₂H₅OH) (Tekel)
- *Taq* DNA Polimeraz (BioBasic D0081)
- Deoxynucleotide Triphosphates (dNTP) (Larova 0090)
- Oligonucleotide primer (BioBasic)
- Agaroz (PeqLab)
- Etidium bromide (C₁₂H₂₀N₃Br) (Amresco X328-10M)
- DNA Marker (Amresco K180-250UL)
- Etilen-diaminetetra-acetic acide (EDTA) (Serva 11278)
- EcoRI restriksiyon enzimi (Fermentas)
- BseGI restriksiyon enzimi (Fermentas)
- MNII restriksiyon enzimi (Fermentas)
- MunI restriksiyon enzimi (Fermentas)
- PvuII restriksiyon enzimi (Fermentas)

3.3 Gereçler

- 10 mL EDTA'lı tüp
- Ependorf tüpler
- Buzdolabı (Beko) (Türkiye)

- Hassas terazi (Mettler Toledo) (İsviçre)
- Manyetik karıştırıcı (IKA) (Brezilya)
- pH metre (Hana) (Portekiz)
- Otoklav (Hirayama) (Japonya)
- Whatman filtre (Ederol) (Almanya)
- Laminar flow (ESCO) (Singapur)
- Deiyonize su cihazı (Millipore) (Fransa)
- Distile su cihazı (Simplicity) (Fransa)
- Etüv (Binder) (Fransa)
- Vortex (Elektro-Mag) (Türkiye)
- Pastör fırını (Binder) (Fransa)
- Yüksek devirli santrifüj (Hettich) (Almanya)
- Spektrofotometre (Shimadzu) (Japonya)
- Derin Dondurucu (-80) (Bosch) (Almanya)
- Buz makinesi (Hoshizaki) (Japonya)
- Termocycler (PeqLab) (Almanya)
- Yatay elektroforez düzeneği (CLP) (ABD)
- Doğru akım güç kaynağı (500 volt) (CLP) (ABD)
- Ultraviole transillüminatör (UltraLum Inc) (ABD)
- Digital kamera (Canon) (Japonya)

3.4. Solüsyonlar

3.4.1 DNA İzolasyon Tamponları

1. Nuclei Lizis Tamponu (pH:8.2)

Protokol:

10 mM	Tris base
400 mM	NaCl
2 mM	Na ₂ EDTA

Hazırlanışı:

1.21 gr	Tris base
23.4 gr	NaCl
0.74 gr	Na ₂ EDTA

800 ml deiyonize suda çözüldü. pH:8.2'ye ayarlandı. Son hacim 1000 ml'ye tamamlandı. 121°C'de 1 atm basınçta 25 dakika otoklavlandı. +4°C'de saklandı.

2. Proteinaz K Seyreltme Tamponu (pH:8.0)

Protokol:

0.05 M	Tris HCl
0.9 mM	CaCl ₂

Hazırlanışı:

0.788 gr	Tris HCl
9.99 gr	CaCl ₂

80 ml deiyonize suda çözüldü. pH:8.0'a ayarlandı. Son hacim 100 ml'ye tamamlandı. 121°C'de 1 atm basınçta 25 dakika otoklavlandı. +4°C'de saklandı.

3. Proteinaz K Çözeltisi (10 mg/ml)

Protokol:

100 mg	Proteinaz K
10 ml	Proteinaz K seyreltme tamponu

Hazırlanışı:

100 mg Proteinaz K 10 ml Proteinaz K seyreltme tamponunda çözülerek Proteinaz K çözeltisi hazırlandı. İşlem buz üzerinde yapıldı. Proteinaz K çözeltisi 1000 µl olacak şekilde 1.5 ml'lik ependorf tüplere bölündü ve -20°C'de saklandı.

4. %10 (w/v)'luk Sodyum Dodesil Sülfat (SDS) Solüsyonu

Protokol:

10 gr	SDS
90 ml	dH ₂ O

Hazırlanışı:

Solüsyon 68°C'de ısıtılarak çözüldü. Son hacmi 100 ml'ye tamamlandı. Whatman filtreden süzildükten sonra oda ısısında saklandı.

5. Amonyum Asetat (9 M = satire) Çözeltisi

Protokol:

74 gr	Amonyum asetat
	dH ₂ O

Hazırlanışı:

20 ml steril dH₂O içerisinde 74 gr amonyum asetat çözüldükten sonra son hacim 100 ml'ye tamamlandı. Whatman filtreden süzildükten sonra +4°C'de saklandı.

6. 0.1 M Na₂EDTA (pH:8.0) Çözeltisi

Protokol:

37,22 gr	Na ₂ EDTA
	dH ₂ O

Hazırlanışı:

700 ml dH₂O içinde 37.22 gr Na₂EDTA çözüldü. 10 M'lık NaOH ile pH:8.0'a ayarlandı. Son hacim 1000 ml'ye tamamlandı. 121°C'de 1 atm basınçta 25 dakika otoklavlandı. +4°C'de saklandı.

7. 1 M Tris HCl (pH:7.4) Çözeltisi

Protokol:

157,6 gr Tris HCl
dH₂O

Hazırlanışı:

800 ml dH₂O'da 157,6 gr Tris HCl çözüldü. pH:7.4'e ayarlandı. Son hacim 1000 ml'ye tamamlandı. 121°C'de 1 atm basınçta 25 dakika otoklavlandı. +4°C'de saklandı.

8. TE Tamponu

Protokol:

10 mM Tris HCl
1 mM Na₂EDTA
dH₂O

Hazırlanışı:

5 ml 1 M Tris HCl
5 ml 0.1 M Na₂EDTA

490 ml steril dH₂O içerisine daha önceden ayrı ayrı hazırlanmış çözeltilerden 5'er ml ilave edilerek hacim 500 ml'ye tamamlandı. 121°C'de 1 atm basınçta 25 dakika otoklavlandı. +4°C'de saklandı.

3.4.2 Agaroz Jel Elektroforez Solüsyonları

1. TAE Elektroforez Tamponu (pH: 8.0-8.5)

50X Stok Solüsyon Hazırlanışı

Protokol:

242 gr	Tris base
37,2 gr	Na ₂ EDTA.2H ₂ O
57,1 ml	Glacial asetik asid
	dH ₂ O

Hazırlanışı:

800 ml dH₂O'da tümü çözülür. Manyetik karıştırıcı üzerinde bir taraftan karıştırılarak içerisine atılan NaOH pelletleri ile pH'sı ayarlandı. Son hacim 1000 ml'ye tamamlandı.

Çalışma solüsyonu olarak, dH₂O ile sulandırılmış *IX solüsyonu* kullanıldı.

2. Etidium Bromide Solüsyonu

Protokol:

Etidium Bromide
dH ₂ O

Hazırlanışı:

10 mg/ml olacak şekilde dH₂O kullanılarak hazırlandı. Işıktan korumak için koyu renkli cam şişede, +4°C'de saklandı.

3.5 Kandan DNA İzolasyonu

DNA, 9 ml'lik EDTA'lı tüplere alınan periferik kandan izole edildi (kaynak). EDTA'lı kan 50ml'lik falcon tüplere boşaltıldı ve üzerine 40ml 121°C'de 1 atm basınçta 30 dakika otoklavlandıktan sonra buzdolabında bekletilen soğuk distile su eklenerek eritrositlerin parçalanması için 10 dakika bekletildi. 2500 rpm'de 15' santrifüj edilerek süpernatant kısmı atıldı. Bu yıkama işlemi iki kez tekrarlandıktan sonra pellet üzerine 3ml nükleus lizis tampon, 200 µl %10'luk SDS ve 150 µL proteinaz K (10 mg/mL) eklenerek bir gece (O/N) 37°C'lik etüvde bekletildi. Etüvden çıkartılan tüplere 1-1,5 mL 9M amonyum asetat çözeltisi eklenerek iyice çalkalanıp 10dk oda sıcaklığında bekletildikten sonra 4500 rpm'de 20 dk santrifüj edildi. Süpernatant temiz bir tüpe alındı ve üzerine 3 katı kadar hacimde (~30ml) %96'lık soğuk (~-20°C) etanol döküldü. Tüp hafifçe alt-üst edilerek DNA'nın presipite olması sağlandı. Presipite olan DNA pipet ucuyla alınarak %70'lik soğuk (~-20°C) etanolde yıkandı ve 1,5 ml'lik eppendorf tüpe aktarıldı. Eppendorf tüp içine alınan DNA 65°C'lik etüvde 20 dakika kurutulduktan sonra üzerine 500 µL TE tamponu ilave edilerek içerisinde çözüldü.

3.6 İzole Edilen DNA'nın İntaklığı

İzole edilen DNA'ların 1/50 dilüsyonları hazırlandı. Her bir DNA'nın sağlamlığı %0,4'lük agaroz jelde elektroforez edilerek kontrol edildi.

1/50 dilüsyon DNA'dan 2 µL alınarak 8 µL dH₂O'nun içerisine ilave edildi. Jele yüklenmeden önce üzerine 5 µL loading buffer ilave edildi ve tamamı jele yüklenerek 60 Voltta yürütüldü. Transilimünatör üzerinde jele bakıldığında DNA'ların tümü aynı hizada ve tek bant olarak görüldüler.

3.7 DNA'nın Spektrofotometrede Konsantrasyonunun Ölçümü

İzole edilen DNA'ların 1/100 dilüsyonları hazırlandı ve 260 nm ve 280 nm dalga boyundaki absorban değerleri okundu. 1 OD'nin 50 µg/mL DNA miktarına

eşitliğinden gidilerek 260 nm dalga boyunda okunan absorpsiyon değerlerinden örneklerdeki DNA konsantrasyonu hesaplandı. Polimeraz zincir reaksiyonunda kullanılmak üzere DNA'lar steril deiyonize su kullanarak 25 ng/μL olacak şekilde sulandırıldı.

3.8 Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)

Çalışmanın amacı; Parkinson hastalığı tanısı konmuş bireylerde hastalık ile *CCR5*(-Δ32), *CCR2*(-64 V>I), *RANTES* (-403 G>A), *MCP-1*(-2518 A>G) ve *IL-8* (-251 A>T) gen polimorfizmleri arasında ilişki olup olmadığını belirlemektir. Genlere ait nükleotid dizileri www.ensemble.org internet sitesinden bulunarak literatürlerde verilen primer dizilerinin doğruluğu kontrol edildi ve amplifiye edilecek bölgenin uzunluğu hesaplandı. Amplifikasyon için gerekli primerler ve amplifikasyon ürünlerinin uzunlukları Tablo 5'de verilmiştir. Amplifikasyon 200μl'lik ependorf tüpler içinde 25 μl'lik toplam hacimde gerçekleşti. Reaksiyon karışımını buz üzerinde hazırlandı.

<i>Master Mix</i>	<u>1x</u>
Buffer (10X)	2,5 μl
MgCl ₂	2 μl
dNTP (2.5 mm)	1 μl
Primer (forward)(10pmol/μl)	0,6 μl
Primer (reverse))(10pmol/μl)	0,6 μl
Genomik DNA (25 ng/μl)	2 μl
<i>Taq</i> DNA polimeraz (5U/μl)	0,3 μl
dH ₂ O	16 μl

	25 μl

Tablo 5: *CCR2*, *CCR5*, *RANTES1*, *MCP-1* ve *IL-8* genleri üzerindeki polimorfik bölgelerin amplifikasyonu için gerekli primerler ve PCR ürünlerinin uzunlukları

Gen:	<u>CCR2</u>	
Primer:	Forward	5'- GGATTGAACAAGGACGCATTTCCCC-3'
	Reverse	5'- TTGCACATTGCATTCCCAAAGACCC-3'
PCR ürünü	380 bp	
Gen:	<u>CCR5</u>	
Primer:	Forward	5'- CCTGGCTGTCGTCCATGCTG-3'
	Reverse	5'- CTGATCTAGAGCCATGTGCACAACCTCT-3'
PCR ürünü	735 bp	
Gen:	<u>RANTES-1</u>	
Primer:	Forward	5'- ACAGAGACTCGAATTTCCGGA-3'
	Reverse	5'- CCACGTGCTGTCTTGATCCTC-3'
PCR ürünü	173 bp	
Gen:	<u>MCP-1</u>	
Primer:	Forward	5'- CCGAGATGTTCCCAGCACAG- 3'
	Reverse	5'- GGCTTCTGAGTGTTGGAAGCA- 3'
PCR ürünü	380 bp	
Gen:	<u>IL-8</u>	
Primer:	Forward	5'- GATTCTGCTCTTATGCCTCCA-3'
	Reverse	5'- CCCAAGCTTGTGTGCTCTGCTGTC-3'
PCR ürünü	816 bp	

CCR5 PCR Şartları:

94°C	5 dakika	
93°C	1 dakika] 30 döngü
57°C	1 dakika	
72°C	1 dakika	
72°C	6 dakika	
4°C	∞	

CCR2 PCR Şartları:

94°C	5 dakika	
94°C	1 dakika] 40 döngü
61°C	1 dakika	
72°C	1 dakika	
72°C	10 dakika	
4°C	∞	

RANTES PCR Şartları:

94°C	5 dakika	
94°C	1 dakika] 35 döngü
62°C	1 dakika	
72°C	1 dakika	
72°C	5 dakika	
4°C	∞	

MCP-1 PCR Şartları:

94°C	4 dakika	
95°C	30 saniye] 30 döngü
61°C	50 saniye	
72°C	1 dakika	
72°C	5 dakika	
4°C	∞	

IL-8 PCR Şartları:

94°C	5 dakika	
95°C	1 dakika] 35 döngü
55°C	1 dakika	
72°C	1 dakika	
72°C	5 dakika	
4°C	∞	

3.9 PCR/RFLP (Polimeraz Zincir Reaksiyonu / Parça Uzunluk Polimorfizmi) İşlemleri

CCR2 (-64 V>I) polimorfizmini belirleyebilmek için BseGI, CCR5 (-Δ32) için *EcoRI*, RANTES (-28 C>G) için *MnII*, IL-8 (-251 A>T) için *MfeI* ve MCP-1 (-2518 A>G) için *PvuII* restriksiyon enzimleri kullanılmıştır. Genlere ait nükleotid dizileri www.ensemble.org sitesinden bulunduktan sonra primer dizileri belirlendi. Restriksiyon enzimlerinin hangi bölgeyi tanıdıkları ve hangi nükleotitten kesim yaptıkları ise www.fermentas.org sitesinden bulundu ve genlere ait nükleotid dileri üzerinden kontrol edildi. Enzimler ile gelen ezim kesimi protokolü uygulandı. Enzim kesim karışımı; 16 µl PCR ürünü, 11 µl ultrapure distile su, 2 µl 10X Buffer ve 1 µl restriksiyon enzimi şeklindedir.

3.10 PCR/RFLP Ürünlerinin Agaroz Jelde Yürütülmesi

Enzim kesim ürünlerini görüntülemek için 14x10 cm boyutunda jel tabağına sahip midi yatay elektroforez cihazı kullanıldı.

%2'lik Agaroz jel çözeltisi hazırlamak için 0,75 gram agaroz, 45 ml 1X TAE tamponu içinde, ısıtmalı manyetik karıştırıcı üzerinde çözelti berrak bir hal alıncaya kadar ısıtıldı. Berraklaşan çözelti yaklaşık 50-60⁰ C' ye soğutuldu. Üzerine 10 mg/mL ethidium bromide çözeltisinden 3 µl eklenerek karıştırıldı. Elektroforez tabağının iki tarafı kağıt bant ile kapatıldı ve tarak yerleştirildi.

Jel çözeltisi tabağa boşaltıldıktan sonra çözelti oda ısısında 30-40 dakika kadar soğumaya bırakıldı. Jelde hava kabarcığı kalmamasına özellikle dikkat edildi.

Elektroforez tankı dolun çizgisine kadar 1X TAE tamponu ile dolduruldu. Polimerleşen jelden tarak çıkarıldı ve jel yabağı elektrorofez tankına yerleştirildi. 8 µl PCR/RFLP örneği 2 µl loading buffer ile karıştırılarak tarağın meydana getirdiği kuyucuklara yüklendi. Kuyucukların birine 100 bp marker ve diğer 15 kuyucuğa ise bireylere ait örnekler yüklendi. 80 V'da 45 dakika yürütme işlemi yapıldı ve daha sonra UV transsilimünatörde görüntülendi.

3.11 Genotiplendirme

Örnekler transsilimünatöre konulup 260 nm dalga boyu UV ışık altında değerlendirildi. Gözlenen bantların moleküler uzunlukları, marker ile karşılaştırılarak yaklaşık olarak belirlendi. Her gene ait amplifikasyon ürünlerinin enzim kesimi sonunda verdikleri bant paternleri ve enzim kesim şartları Tablo 6 ve Tablo 7'de verilmiştir.

Tablo 6: Polimorfizm çalışmasında kullanılan restriksiyon enzimleri, enzim tanıma bölgeleri, kesim sıcaklıkları ve agaroz jel oranları

Gen ve Polimorfik Bölge	Restriksiyon Enzimi	Enzim Tanıma Bölgesi	Kesim Sıcaklığı	Agaroz Jel Oranı (%)
<i>CCR-5 (-Δ32)</i>	<i>EcoRI</i>	G↓AATTC	37°C	2
<i>CCR-2 (-64 V>I)</i>	<i>BseGI</i>	GGATGNN↓	55°C	2.5
<i>RANTES (-28 C>G)</i>	<i>MnII</i>	CCTC(N)7↓	37°C	3
<i>MCP-1 (-2518 A>G)</i>	<i>PvuII</i>	CAG↓CTG	37°C	2.5
<i>IL-8 (-251 A>T)</i>	<i>MfeI</i>	C↓AATTG	55°C	2

Tablo 7: Enzim kesimi sonucu oluşan bant paternlerinin büyüklüğü

Gen	Normal (bç)	Homozigot polimorfik (bç)
<i>CCR-5</i>	403+332	371+332
<i>CCR-2</i>	380	215+165
<i>RANTES</i>	126+27+20	146+ 27
<i>MCP-1</i>	380	225+155
<i>IL-8</i>	296+520	810

3.12 İstatistik Analizleri

İstatistiksel değerlendirmeler için SPSS 10.0 paket programı kullanıldı. Tanımlayıcı analizler, paket programı içindeki “descriptive” fonksiyonu ile yapıldı. Parkinson hastaları ve kontrol grubu genotip ve fenotip allel frekans karşılaştırmalarında standart “kikare” ve “Fischer Exact” testleri kullanıldı. $p<0,05$ değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

4. BULGULAR

Bu çalışmada, Parkinson hastalığı ile kemokin ve kemokin reseptörleri olan *MCP-1*, *CCR5*, *CCR2*, *RANTES* ve *IL-8* genlerine ait polimorfizmler arasında ilişki olup olmadığı araştırılmıştır. Bu amaçla 30 Parkinson hastası ve 60 kontrol bireye ait DNA örneklerinden PCR-RFLP yöntemi ile ilgili polimorfizmlerin allel ve genotipleri belirlenmiştir. Çalışmamızda hastalarımızın genel yaş ortalaması alındığında ortalaması 65 olarak belirlenmiştir. İstatistiki değerlendirmeler için 65 yaş altı erken dönem, 65 yaş üstü ise geç dönem olarak kabul edilmiştir.

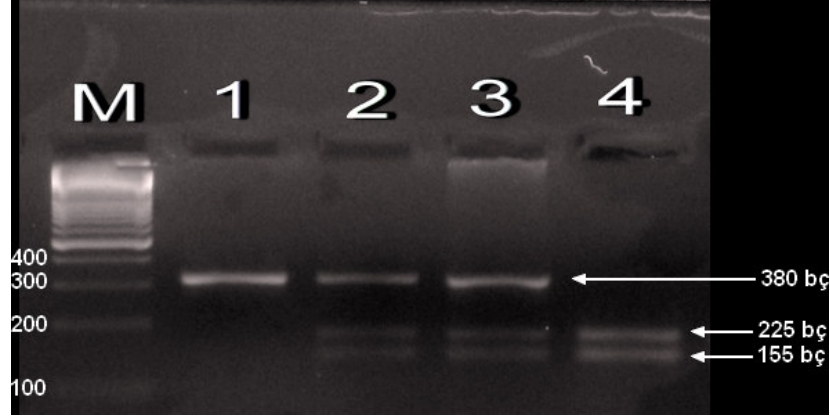
4.1 *MCP-1* -2518 A>G Polimorfizmi Sonuçları

Isparta Süleyman Demirel Üniversitesi ve Devlet Hastanesi Nöroloji Polikliniklerince Parkinson tanısı konmuş 30 hasta ve 60 kontrol bireyin *MCP-1* üzerinde yer alan -2518 A>G polimorfizmini belirleyebilmek için ilgili bölge polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile çoğaltıldı ve *PvuII* enzimi kullanılarak amplifikasyonun üzerinden enzim kesimi gerçekleştirildi.

CCGAGATGTTCCCAGCACAGCCCCATGTGAGAGCTCCCTGGCTCC
GGGCCAGTATCTGGAATGCAGGCTCCAGCCAAATGCATTCTCTTC
TACGGGATCTGGGAACTTCCAAAGCTGCCTCCTCAGAGTGGGAATT
TCCACTCACTTCTCTCACGCCAGCACTGACCTCCCAGCGGGGAGGG
CATCTTTTCTTGACAGAGCAGAAGTGGGAGGCAGACAGCTATCACT
TTCCAGAAGACTTTCTTTTCTGATTCATACCCTTCACCTTCCCTGTGT
TACTGTCTGATATATGCAAAGGCCAAGTCACTTTCCAGAGATGAC
AACTCCTTCC**TGAAGTAGAGACATGCTTCCAACACTCAGAAGCC**

Şekil 5: *MCP-1* geni amplifiye edilen bölgenin baz dizilimi. Kalın ve altı çizili harfler primer dizileri, büyük harfler ise ekzonik diziyi ifade etmektedir.

Agaroz jel elektroforezi sonucunda normal (AA) bireyler de 380 bç bant görülürken, homozigot (GG) bireylerde 225 ve 155 bç bantlar, heterozigot (AG) bireylerde ise 380, 225 ve 155 bç bantlar gözlemlendi.



Şekil 6: MCP-1 PvuII enzim kesim polimorfizmi agaroz jel görüntüsü

Şekil 6'da PD grubuna ait 4 bireyin agaroz jel elektroforezinin UV altında görüntüsü verilmiştir. 1 numaralı bireye ait bant 380 bç hizasında bulunmakta ve bireyin normal (AA) genotipine sahip olduğunu göstermektedir. 4 numaralı birey ise homozigot olup, 225 ve 155 bç hizasında bant vermiştir. 2 ve 3 numaralı bireylerde ise 380, 225 ve 155 bç bantlar gözlenmiştir ve bu bireylerin heterozigot olduğu belirlenmiştir. M 100 bç'lik markeri göstermektedir.

Deneyler sonucunda, 30 Parkinson hastasından oluşan grupta MCP-1 - 2518 A>G polimorfizmi açısından, 46 adet A alleli (%76.6) ve 18 adet G alleli (%30) olduğu tesbit edildi. Kontrol grubunda ise 71 adet A alleli (%59.2) ve 49 adet G alleli (%40.8) olduğu görüldü. Hasta ve kontrol grubu allel frekansı açısından istatistiksel olarak değerlendirildiğinde anlamlı bir farklılık tesbit edilememiştir ($p= 0.622$).

Tablo 8: *MCP-1* -2518 A>G polimorfizmi allel frekansları (N: allel sayısı)

GRUP	<i>MCP-1</i> ALLELLERİ				
	A		G		TOPLAM
	N	Oran	N	Oran	
HASTA	46	%76.6	18	%30	60
KONTROL	71	%59.2	49	%40.8	120
	$p= 0.622$				

$p= P$ değeri

Genotipik olarak incelendiğinde, -2518 A>G polimorfizmi hastaların %30'unda kontrollerin ise %45'inde tesbit edilmiştir. 30 Parkinson hastasının 4'ünün (%13.3) G alleli için heterozigot, 5'inin (%16.6) homozigot olduğu belirlenirken, kontrol grubunun 22'sinin (%36,67) G alleli için heterozigot, 5'inin (% 8,33) homozigot olduğu gözlenmiştir. Hasta ve kontrol grubu genotip frekansı açısından istatistiksel olarak değerlendirildiğinde anlamlı bir farklılık tesbit edilememiştir ($p=0,55$).

Tablo 9: *MCP-1* -2518 A>G polimorfizmi genotip frekansları (N: birey sayısı)

GRUP	<i>MCP-1</i> GENOTİPLERİ						
	AA		AG		GG		TOPLAM
	N	Oran	N	Oran	N	Oran	
HASTA	21	%70	4	%13.3	5	%16.6	30

KONTROL	33	%55	22	%36.67	5	%8.33	60
	$p= 0,55$						

$p= P$ değeri

Tablo10'da görüldüğü gibi, *MCP-1* -2518 A>G polimorfizminin genotip frekansı, hasta grubundaki kadın ve erkekler arasında istatistiksel olarak anlamlı değildir ($p=0,123$). Kontrol grubundaki kadın ve erkekler arasında ise istatistiksel bir anlam bulunmuştur ($p=0$). Allel frekansı açısından ise hasta ve kontrol grubu arasında istatistiksel olarak bir anlam bulunamamıştır ($P^c=0,254$, $P^d=0,642$).

Tablo 10: *MCP-1 PvuII* enzim kesimi sonuçlarına göre hasta ve kontrol bireylerdeki genotip ve allel frekanslarının cinsiyete göre dağılımı

Genotip	Kontrol		Hasta		Allel	Kontrol		Hasta	
	Erkek	Kadın	Erkek	Kadın		Erkek	Kadın	Erkek	Kadın
AA	3 (16,7)	30 (71,4)	11 (78,6)	10 (62,5)	A	18 (50)	70 (83,3)	22 (78,5)	24 (75)
GG	3 (16,7)	2 (4,8)	3 (21,4)	2 (12,5)					
AG	12 (66,7)	10 (23,8)	-	4 (25)	G	18 (50)	14 (16,7)	6 (22,5)	8 (25)
Toplam	18	42	14	16	Toplam	36	84	28	32
	$P^a= 0$ $P^b=0,123$					$P^c= 0,254$ $P^d=0,642$			

P^a : Kontrol grubu ile cinsiyetin karşılaştırılması sonucu P değeri P^b : Hasta grubu ile cinsiyetin karşılaştırılması sonucu P değeri P^c : Kontrol grubu ile cinsiyetin karşılaştırılması sonucu allel frekansı P değeri P^d : Hasta grubu ile cinsiyetin karşılaştırılması sonucu allel frekansı P değeri Parantez içinde yüzde frekanslar verilmiştir.

Hasta grubunun yaş ortalaması baz alınarak, 65 yaş altı bireyler erken dönem, 65 yaş üstü bireyler ise geç dönem olarak belirlendi ve bir yaş grubu oluşturuldu. Yapılan istatistiksel analizler sonucunda, *MCP-1* -2518 A>G polimorfizmi genotip ve allel frekansları ile yaş grubu arasında herhangi bir istatistiksel anlam bulunamamıştır ($p^a= 0,802$), ($P^b=0,816$).

Tablo 11: Yaş ve *MCP-1* -2518 A>G polimorfizmi genotip ve allel frekansları

Genotip	Yaş		Allel	Yaş	
	Erken	Geç		Erken	Geç
AA	11 (73,3)	10 (66,7)	A	24 (80)	22 (73,3)
GG	2 (13,3)	3 (20)			
AG	2 (13,3)	2 (13,3)	G	6 (20)	8 (26,7)
	$P^a= 0,802$			$P^b= 0,816$	

P^a : Genotip frekansı ile yaş grubunun karşılaştırılması sonucu P değeri P^b : Allel frekansı ile yaş grubunun karşılaştırılması sonucu P değeri. Parantez içinde yüzde frekanslar verilmiştir

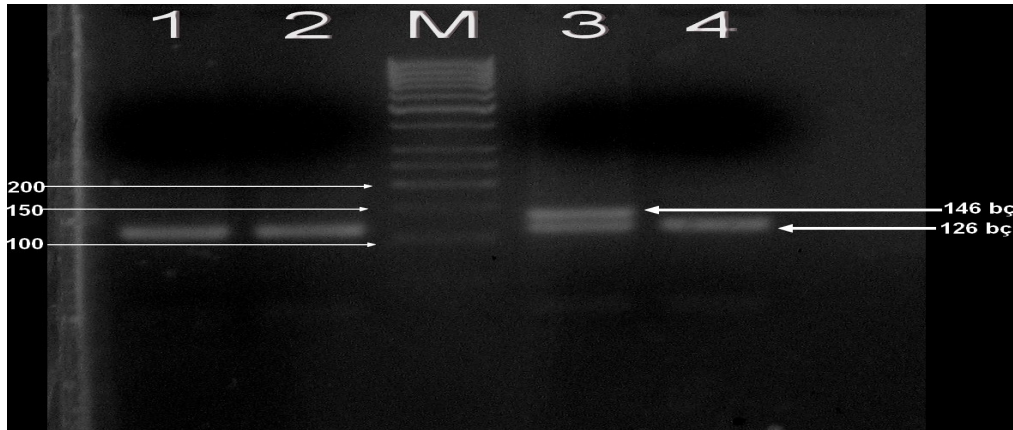
4.2. *RANTES* -28 C>G Polimorfizmi Sonuçları

30 hasta ve 60 kontrol bireyin *RANTES* -28 C>G polimorfizmini belirleyebilmek için ilgili bölge PCR ile çoğaltıldı ve *MnII* enzimi kullanılarak amplifikasyonun üzerinden enzim kesimi gerçekleştirildi.

ACAGAGACTCGAATTTCGGAGGGCTATTTTCAGTTTTCTTTCCGTTTTGT
GCAATTTCACTTATGATACCGGCCAATGCTTGGTTGCTATTTTGGAAACTC
CCCTTAGGGGATGCCCCTCAACTGGCCCTATAAAGGGCCAGCCTGAGCTG
CAGAGGATTCCTGCAGGAGGATCAAGACAGCACGTGG

Şekil 7: *RANTES* geni amplifiye edilen bölgenin baz dizilimi. Kalın ve altı çizili harfler primer dizileri, büyük harfler ise ekzonik diziyi ifade etmektedir.

RANTES -28 C>G polimorfizmi için uygulanan PCR-RFLP yöntemi sonucunda normal (CC) bireyler de 146 ve 27 bç'lik iki bant gözlenirken, homozigot (GG) bireylerde 126, 27 ve 20 bç bantlar, heterozigot (CG) bireylerde ise 146, 126, 27 ve 20 bç bantlar gözlenmiştir.



Şekil 8: *RANTES* *MnII* enzim kesim polimorfizmi agaroz jel görüntüsü

Şekil..8'de PD grubuna ait 4 bireyin agaroz jel elektroforezinin UV altında görüntüsü verilmiştir. 1,2 ve 4 numaralı bireylere ait bant 126 bç

hizasında bulunmakta ve bireylerin normal (CC) genotipine sahip olduğunu göstermektedir. 3 numaralı birey ise heterozigottur (CG) ve 146 bç bir bant daha gözlenmiştir, M 50 bç'lik markeri göstermektedir.

Çalışma sonucunda, 30 Parkinson hastasından oluşan grupta *RANTES* -28 C>G polimorfizmi açısından, 51 adet C alleli (% 85) ve 9 adet G alleli (%15) olduğu tesbit edildi. Kontrol grubunda ise 120 adet C alleli (%100) görülürken ve G alleli tesbit edilemedi. Hasta grubu allel frekansı açısından istatistiksel olarak değerlendirildiğinde anlamlı bir farklılık tesbit edilmiştir ($p=0,042$). Kontrol grubu ile allel frekans arasında ise bir anlam bulunamamıştır.

Tablo 12: *RANTES* geni -28 C>G polimorfizm allel frekansları (N: allel sayısı)

GRUP	<i>RANTES</i> ALLELLERİ				
	C		G		TOPLAM
	N	Oran	N	Oran	
HASTA	51	%85	9	%15	60
KONTROL	120	%100	-	-	120
	$p=0,042$				

Genotipik olarak incelendiğinde, *RANTES* -28 C>G polimorfizmi hastaların %12.5'inde gözlenirken, kontrol grubunda gözlenmemiştir. 30 Parkinson hastasının 3'ü (%10) C alleli için heterozigot, 3'ü (%10) homozigot olarak belirlenmiş, kontrol grubunun ise tamamı normal (%100) olarak bulunmuştur. Hasta ve kontrol grubu genotip frekansı açısından istatistiksel olarak değerlendirildiğinde anlamlı bir farklılık tesbit edilmiştir ($p=0$).

Tablo 13: *RANTES* -28 C>G polimorfizmi genotip frekansları (N: birey sayısı)

GRUP	<i>RANTES</i> GENOTİPLERİ						
	CC		CG		GG		TOPLAM
	N	Oran	N	Oran	N	Oran	
HASTA	24	%80	3	%%10	3	%10	30
KONTROL	60	%100	-	-	-	-	60
	$p=0$						

$p=P$ değeri

RANTES -28 C>G polimorfizmi genotip frekansı hasta ve kontrol grubu açısından cinsiyet ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak bir anlam bulunamadı. Hasta ve kontrol grubunun normal genotipte görülmesi sonucu herhangi bir istatistiksel hesaplama yapılmamıştır. Allel frekansı açısından değerlendirildiğinde ise istatistiksel açıdan bir anlam bulunamamıştır ($P^c=0,65$), ($P^d=0,892$)

Tablo 14: *RANTES MnlI* enzim kesim polimorfizmi sonuçlarına göre hasta ve kontrol bireylerdeki genotip ve allel frekanslarının cinsiyete göre dağılımı

Genotip	Kontrol		Hasta		Allel	Kontrol		Hasta	
	Erkek	Kadın	Erkek	Kadın		Erkek	Kadın	Erkek	Kadın
CC	18 (100)	42 (100)	10 (71,4)	12 (75)	C	36 (100)	84 (100)	22 (78,5)	27
GG	-	-	2	1					

			(14,3)	(6,3)					
CG	-	-	2 (14,3)	3 (18,8)	G	-	-	6 (21,4)	5
Toplam	18	42	14	16	Toplam	36	84	28	32
	P ^a = - P ^b = -					P ^c = 0,65 P ^d = 0,892			

P^a: Kontrol grubu ile cinsiyetin karşılaştırılması sonucu P değeri P^b: Hasta grubu ile cinsiyetin karşılaştırılması sonucu P değeri. P^c : Kontrol grubu ile cinsiyetin karşılaştırılması sonucu allel frekansı P değeri P^d : Hasta grubu ile cinsiyetin karşılaştırılması sonucu allel frekansı P değeri Parantez içinde yüzde frekanslar verilmiştir

Yapılan istatistiksel analizler sonucunda, *RANTES* -28 C>G polimorfizmi genotip ve allel frekansları ile yaş grubu arasında herhangi bir istatistiksel anlam bulunamadı (p^a= 0,802), (P^b=0,626).

Tablo 15: Yaş ve *RANTES* -28 C>G polimorfizmi genotip ve allel frekansları

Genotip	Yaş		Allel	Yaş	
	Erken	Geç		Erken	Geç
GG	10 (66,7)	12 (80)	G	22 (73,3)	27 (90)
AA	3 (20)				
GA	2 (13,3)	3 (20)	A	8 (26,7)	3 (10)
	P ^a = 0,802			P ^b =0,626	

P^a: Genotip frekansı ile yaş grubunun karşılaştırılması sonucu P değeri P^b: Allel frekansı ile yaş grubunun karşılaştırılması sonucu P değeri. Parantez içinde yüzde frekanslar verilmiştir

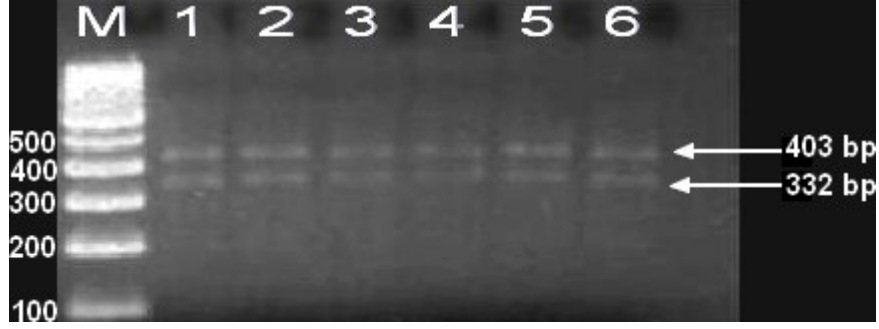
4.3 CCR5 - Δ 32 Polimorfizmi Sonuçları

30 hasta ve 60 kontrol bireyin CCR5 - Δ 32 polimorfizmini belirleyebilmek için ilgili bölge PCR ile çoğaltıldı ve *EcoRI* enzimi kullanılarak amplifikasyonun üzerinden enzim kesimi gerçekleştirildi.

**CCTGGCTGTCGTCCATGCTGTGTTTGCTTTAAAAGCCAGGACGGT
CACCTTTGGGGTGGTGACAAGTGTGATCACTTGGGGTGGTGGCTGTG
TTTGCGTCTCTCCCAGGAATCATCTTTACCAGATCTCAAAAAGAAG
GTCTTCATTACACCTGCAGCTCTCATTTTCCATACAGTCAGTATCAA
TTCTGGAAGAATTTCCAGACATTAAGATAGTCATCTTGGGGCTGG
TCCTGCCGCTGCTTGTCATGGTCATCTGCTACTCGGGAATCCTAAAA
ACTCTGCTTCGGTGTGCGAAATGAGAAGAAGAGGCACAGGGCTGTG
AGGCTTATCTTCACCATCATGATTGTTTATTTTCTTCTTGGGCTCCC
TACAACATTGTCCTTCTCCTGAACACCTTCCAGGAATTCTTTGGCCT
GAATAATTGCAGTAGCTCTAACAGGTTGGACCAAGCTATGCAGGTG
ACAGAGACTCTTGGGATGACGCACTGCTGCATCAACCCCATCATCT
ATGCCTTTGTCGGGGAGAAGTTCAGAACTACCTCTTAGTCTTCTTC
CAAAGCACATTGCCAAACGCTTCTGCAAATGCTGTTCTATTTTCC
AGCAAGAGGCTCCCGAGCGAGCAAGCTCAGTTTACACCCGATCCA
CTGGGGAGCAGGAAATATCTGTGGGCTTGTGACACGGACTCAAGT
GGGCTGGTGACCCAGTCAGAGTTGTGCACATGGCTCTAGATCAG**

Şekil 9: CCR5 geni amplifiye edilen bölgenin baz dizilimi. Kalın ve altı çizili harfler primer dizileri, büyük harfler ise ekzonik diziyi ifade etmektedir.

CCR5 -Δ32 polimorfizmi için uygulanan PCR-RFLP yöntemi sonucunda normal (AA) bireyler de 403 ve 332 bp'lik iki bant gözlenirken, homozigot (DD) bireylerde 371 ve 332 bp bantlar, heterozigot (AD) bireylerde ise 403, 371 ve 332 bp'lik 3 bant gözlenmiştir.



Şekil 10: *CCR5 EcoRI* enzim kesim polimorfizmi agaroz jel görüntüsü

Şekil 10’da PD grubuna ait 6 bireyin agaroz jel elektroforezinin UV altında görüntüsü verilmiştir. Bireylerin hepsi normaldir (AA), 403 ve 332 bp hizasında bantlar vermiştir. M 100 bp’lik markeri göstermektedir.

Deneyle sonuçunda, 30 Parkinson hastasından oluşan grupta *CCR5* - Δ 32 polimorfizmi açısından, 60 adet A alleli (% 100) görülmüş fakat D alleli rastlanmamıştır. Hasta ve kontrol grubunun tamamında A alleli görüldüğü için istatistiksel bir hesaplama yapılmamıştır.

Tablo 16: *CCR5* - Δ 32 polimorfizmi allel frekansları (N: allel sayısı)

GRUP	<i>CCR5</i> ALLELLERİ				TOPLAM
	A		D		
	N	Oran	N	Oran	
HASTA	60	%100	-	-	60
KONTROL	120	%100	-	-	120
	$p = (-)$				

Genotipik olarak incelendiğinde, CCR5 Geni - Δ32 polimorfizmi hasta ve kontrol bireylerde gözlenmemiştir. 30 Parkinson hastasının 30'u (%100) A alleli için normal olarak belirlenmiştir. Kontrol grubunda da aynı şekilde - Δ32 polimorfizmi gözlenmemiştir. Hasta ve kontrol grubunun tamamının normal genotipe sahip olması nedeniyle, hasta ve kontrol grubu genotip frekansı açısından istatistiksel olarak değerlendirildiğinde bir anlam bulunamamıştır (P= -).

Tablo 17: CCR5 - Δ32 polimorfizmi genotip frekansları (N: birey sayısı)

GRUP	CCR5 GENOTİPLERİ						TOPLAM
	AA		AD		DD		
	N	Oran	N	Oran	N	Oran	
HASTA	30	%100	-	-	-	-	30
KONTROL	60	%100	-	-	-	-	60
	$p = (-)$						

$p = P$ değeri

CCR5 - Δ32 polimorfizmi genotip ve allel frekansları, hasta ve kontrol grubu açısından cinsiyet ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak bir anlam bulunamamıştır. Hasta ve kontrol grubunun normal genotip ve allellere sahip olması sonucu herhangi bir istatistiksel hesaplama yapılmamıştır.

Tablo 18: *CCR5* - $\Delta 32$ polimorfizmi sonuçlarına göre hasta ve kontrol bireylerdeki genotip ve allel frekanslarının cinsiyete göre dağılımı

Genotip	Kontrol		Hasta		Allel	Kontrol		Hasta	
	Erkek	Kadın	Erkek	Kadın		Erkek	Kadın	Erkek	Kadın
AA	18 (100)	42 (100)	14 (100)	116 (100)	A	36 (100)	84 (100)	36 (100)	84 (100)
DD	-	-	-	-					
AD	-	-	-	-	D	-	-	-	-
Toplam	18	42	14	16	Toplam	36	84	28	32
	P ^a = - P ^b = -					P ^c = - P ^d = -			

P^a: Kontrol grubu ile cinsiyetin karşılaştırılması sonucu P değeri P^b: Hasta grubu ile cinsiyetin karşılaştırılması sonucu P değeri. P^c : Kontrol grubu ile cinsiyetin karşılaştırılması sonucu allel frekansı P değeri P^d : Hasta grubu ile cinsiyetin karşılaştırılması sonucu allel frekansı P değeri Parantez içinde yüzde frekanslar verilmiştir

Yapılan istatistiksel analizler sonucunda, *CCR5* - $\Delta 32$ polimorfizmi genotip ve allel frekansları ile yaş grubu arasında herhangi bir istatistiksel anlam bulunamamıştır (p^a= -).

Tablo 19: Yaş ve *CCR5* - $\Delta 32$ polimorfizmi genotip ve allel frekansları

Genotip	Yaş		Allel	Yaş	
	Erken	Geç		Erken	Geç
AA	15 (100)	15 (100)	A	30 (100)	30 (100)

DD	-	-			
AD	-	-	D	-	-
	P ^a = -			P ^b =-	

P^a: Genotip frekansı ile yaş grubunun karşılaştırılması sonucu P değeri P^b: Allel frekansı ile yaş grubunun karşılaştırılması sonucu P değeri. Parantez içinde yüzde frekanslar verilmiştir

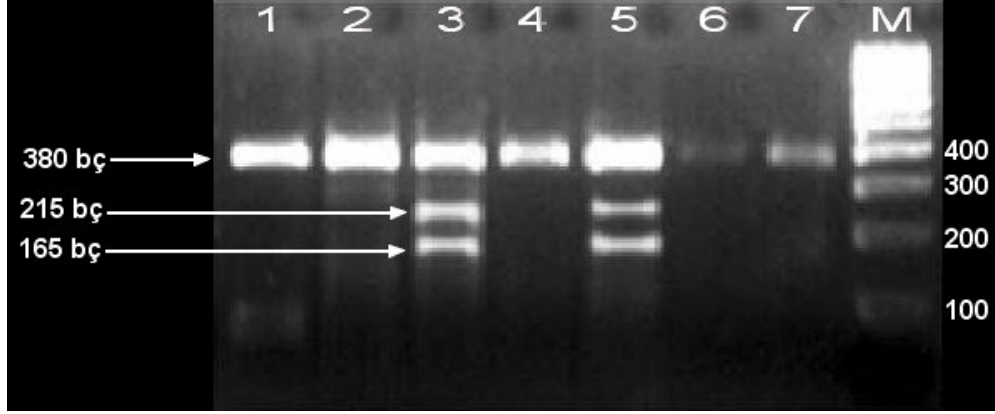
4.4. CCR2 -64 V>I Polimorfizmi Sonuçları

30 hasta ve 60 kontrol bireyin CCR2 -64 V>I polimorfizmini belirleyebilmek için ilgili bölge PCR ile çoğaltıldı ve *BseGI* enzimi kullanılarak amplifikasyonun üzerinden enzim kesimi gerçekleştirildi.

GGATTGAACAAGGACGCATTTCCCCAGTACATCCACAACATGCT
GTCCACATCTCGTTCTCGGTTTATCAGAAATACCAACGAGAGCGGT
GAAGAAGTCACCACCTTTTTTGATTATGATTACGGTGCTCCCTGTCA
TAAATTTGACGTGAAGCAAATTGGGGCCCAACTCCTGCCTCCGCTC
TACTCGCTGGTGTTTCATCTTTGGTTTTGTGGGCAACATGCTGGTCGT
CCTCATCTTAATAAACTGCAAAAAGCTGAAGTGCTTGACTGACATT
TACCTGCTCAACCTGGCCATCTCTGATCTGCTTTTTTCTTACTCTC
CCATTGTGGGCTCACTCTGCTGCAAATGAGTGGGTCTTTGGGAAT
GCAATGTGCAA

Şekil 11: CCR2 geni amplifiye edilen bölgenin baz dizilimi. Kalın ve altı çizili harfler primer dizileri, büyük harfler ise ekzonik diziyi ifade etmektedir.

CCR2 -64 V>I polimorfizmi için uygulanan PCR-RFLP yöntemi sonucunda normal (VV) bireyler de 380 bp'lik tek bant gözlenirken, homozigot (II) bireylerde 215 ve 165 bp'lik iki bant, heterozigot (VI) bireylerde ise 380, 215 ve 165 bp'lik 3 bant gözlenmiştir.



Şekil 12: *CCR2* *BseGI* enzim kesim polimorfizmi agaroz jel görüntüsü

Şekil 12’de PD grubuna ait 7 bireyin agaroz jel elektroforezinin UV altında görüntüsü verilmiştir. 1, 2, 4, 6, 7 numaralı bireylere ait bant 380 bç hizasında bulunmakta ve bireyin normal (VV) genotipine sahip olduğunu göstermektedir. 3-5 numaralı bireylerde ise 380, 215 ve 165 bç’lik 3 bant gözlenmiştir ve bu bireyler heterozigottur. M 100 bç’lik markeri göstermektedir.

Deneyler sonucunda, 30 Parkinson hastasından oluşan grupta *CCR2* -64 V>I polimorfizmi açısından, 53 adet V alleli (%88.3) ve 14 adet I alleli (%23.3) olduğu tesbit edilmiştir. Kontrol grubunda ise 76 adet V alleli (%63.3) ve 44 adet G alleli (%36.6) olduğu belirlenmiştir.

Tablo 20: *CCR2* -64 V>I polimorfizmi allel frekansları (N: allel sayısı)

GRUP	<i>CCR2</i> ALLELLERİ				
	V		I		TOPLAM
	N	Oran	N	Oran	
HASTA	53	%88.3	14	%23.3	60

KONTROL	76	%63.3	44	%36.6	120
	$p=0,653$				

$p = P$ değeri

Genotipik olarak incelendiğinde, *CCR2* -64 V>I polimorfizmi hastaların %23.3'ünde, kontrollerin ise %36.6'sında görülmüştür. 30 Parkinson hastasının 7'si (%23.3) V alleli için heterozigot, kontrol grubunun ise 22'si (%36,6) V alleli için heterozigot olarak bulunmuştur. Hasta ve kontrol grubu genotip ve allel frekansı açısından istatistiksel olarak değerlendirildiğinde anlamlı bir farklılık tesbit edilememiştir ($p=0,786$) ($p=0,653$).

Tablo 21: *CCR2* -64 V>I polimorfizm genotip frekansları (N: birey sayısı)

GRUP	<i>CCR2</i> GENOTİPLERİ						TOPLAM
	VV		VI		II		
	N	Oran	N	Oran	N	Oran	
HASTA	23	%76.6	7	%23.3	-	-	30
KONTROL	38	%63.3	22	%36.67	-	-	60
	$p=0,786$						

$p= P$ değeri

CCR2 -64 V>I polimorfizmi genotip frekansı, hasta grubu açısından cinsiyet ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak bir anlam bulunamamıştır

($P= 0,399$). Genotip frekansı, kontrol grubunda karşılaştırıldığında da istatistiksel olarak bir anlam bulunamamıştır ($P=0,74$). Allel frekansı olarak karşılaştırıldığında ise hasta ve kontrol grupları ile cinsiyet arasında istatistiksel olarak bir anlam bulunamamıştır ($P^c=0,678$), ($P^d=0,703$)

Tablo 22: *CCR2* -64 V>I polimorfizmi sonuçlarına göre hasta ve kontrol bireylerdeki genotip ve allel frekanslarının cinsiyete göre dağılımı

Genotip	Kontrol		Hasta		Allel	Kontrol		Hasta	
	Erkek	Kadın	Erkek	Kadın		Erkek	Kadın	Erkek	Kadın
AA	14 (77,8)	34 (81)	12 (85,7)	11 (68,8)	A	32 (88,8)	76 (90,4)	26 (92,8)	27 (84,3)
DD	-	-	-	-					
AD	4 (22,2)	8 (19)	2 (14,3)	5 (31,3)	D	4 (12,2)	8 (9,6)	2 (7,2)	5 (16,7)
Toplam	18	42	14	16	Toplam	36	84	28	32
	$P^a= 0,74$ $P^b= 0,399$					$P^c= 0,678$ $P^d= 0,703$			

P^a : Kontrol grubu ile cinsiyetin karşılaştırılması sonucu P değeri P^b : Hasta grubu ile cinsiyetin karşılaştırılması sonucu P değeri. P^c : Kontrol grubu ile cinsiyetin karşılaştırılması sonucu allel frekansı P değeri P^d : Hasta grubu ile cinsiyetin karşılaştırılması sonucu allel frekansı P değeri Parantez içinde yüzde frekanslar verilmiştir

Yapılan istatistiksel analizler sonucunda, *CCR2* -64 V>I polimorfizm genotip ve allel frekansları ile yaş grubu arasında herhangi bir istatistiksel anlam bulunamamıştır ($p^a= 1.00$) ($P^b=0,902$).

Tablo 23: Yaş ve *CCR2* -64 V>I polimorfizm genotip ve allel frekansları

Genotip	Yaş		Allel	Yaş	
	Erken	Geç		Erken	Geç
VV	12 (80)	11 (73.3)	A	27 (90)	26 (86.6)
II	-	-			
VI	3 (20)	4 (26.7)	D	3 (10)	4 (13.6)
	P ^a = 1.00			P ^b =0,902	

P^a: Genotip frekansı ile yaş grubunun karşılaştırılması sonucu P değeri P^b: Allel frekansı ile yaş grubunun karşılaştırılması sonucu P değeri. Parantez içinde yüzde frekanslar verilmiştir

4.5. *IL-8* -251 A>T Polimorfizmi Sonuçları

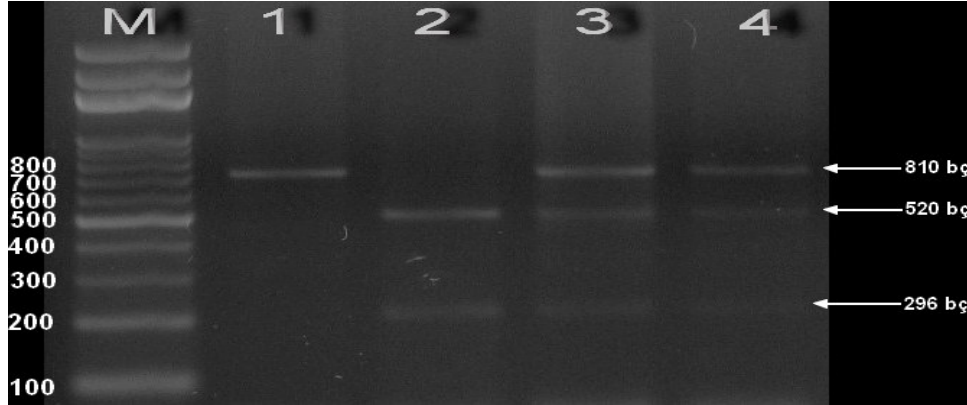
30 hasta ve 60 kontrol bireyin *IL-8* -251 A>T polimorfizmini belirleyebilmek için ilgili bölge PCR ile çoğaltıldı ve *MfeI* enzimi kullanılarak amplifikasyonun üzerinden enzim kesimi gerçekleştirildi.

GATTCTGCTCTTATGCCTCCACTGGAATTAATGTCTTAGTACCAC
TTGTCTATTCTGCTATATAGTCAGTCCTTACATTGCTTTCTTCTTCTG
ATAGACCAAACCTTTAAGGACAAGTACCTAGTCTTATCTATTTCTA
GATCCCCACATTACTCAGAAAGTTACTCCATAAATGTTTGTGGAA
CTGATTTCTATGTGAAGCACATGTGCCCTTCACTCTGTAAACATGC
ATTAGAAAACATAAATCTTTTGAAAAGTTGTAGTATGCCCCCTAAGA
GCAGTAACAGTTCCTAGAACTCTCTAAAATGCTTAGAAAAAGATT
TATTTTAAATTACCTCCCCAATAAAAATGATTGGCTGGCTTATCTTCA
CCATCATGATAGCATCTGTAATTAAGTAAAAAATAATTATGCC

ATTAAAAGAAAATCATCCATGATCTTGTCTAACACCTGCCACTCT
AGTACTATATCTGTCACATGGTACTATGATAAAGTTATCTAGAAAT
AAAAAAGCATAACAATTGATAATTCACCAAATTGTGGAGCTTCAGTA
TTTTAAATGTATATTTAAAATTAAATTATTTTAAAGATCAAAGAAAA
CTTTCGTCATACTCCGTATTTGATAAGGAACAAATAGGAAGTGTGA
TGACTCAGGTTTGCCCTGAGGGGATGGGCCATCAGTTGCAAATCGT
GGAATTCCTCTGACATAATGAAAAGATGAGGGTGCATAAGTTCTC
TAGTAGGGTGATGATATAAAAAGCCACCGGAGCACTCCATAAGGC
ACAAACTTTCAGAGGACAGCAGAGCACACAAGCTTGGG

Şekil 13: *IL-8* geni amplifiye edilen bölgenin baz dizilimi. Kalın ve altı çizili harfler primer dizileri, büyük harfler ise ekzonik diziyi ifade etmektedir

IL-8 -251 A>T polimorfizmi için uygulanan PCR-RFLP yöntemi sonucunda normal (AA) bireyler de 296 ve 520 bp iki bant gözlenirken, homozigot (TT) bireylerde 810 bp tek bir bant, heterozigot (AT) bireylerde ise 810, 520 ve 296 bp üç farklı bant gözlenmektedir.



Şekil 14: *IL-8* *MfeI* enzim kesimi elektroforez sonu agaroz jel fotoğrafı

Şekil 14'de PD grubuna ait 4 bireyin agaroz jel elektroforezinin UV altında görüntüsü verilmiştir. 1, numaralı bireye ait bant 810 bp hizasında bulunmakta ve bireyin homozigot (TT) genotipine sahip olduğunu

göstermektedir. 2 numaralı birey ise 520 ve 296 bç bantlar gözlenmiştir ve bu bireyler normal (AA) dir. 3-4 no'lu bireyler ise 810, 520 ve 296 bç hizasında bant vermiştir ve heterozigottur (AT). M ise 100 bç'lik markeri göstermektedir.

Deneyle sonuçunda, 30 Parkinson hastasından oluşan grupta *IL-8* -251 A>T polimorfizmi açısından, 32 adet A alleli (% 53.3) ve 28 adet T alleli (%46.6) olduğu tesbit edildi. Kontrol grubunda ise 38 adet A alleli (%31.6) ve 82 adet T alleli (%68.3) olduğu görüldü. Hasta ve kontrol grubu allel frekansı açısından istatistiksel olarak değerlendirildiğinde anlamlı bir farklılık tesbit edilememiştir ($p=0,34$)

Tablo 24: *IL-8* -251 A>T polimorfizmi allel frekansları (N: allel sayısı)

GRUP	<i>IL-8</i> ALLELLERİ				
	A		T		TOPLAM
	N	Oran	N	Oran	
HASTA	32	%53.3	28	%46.6	60
KONTROL	38	%31.6	82	%68.3	120
	$p=0,34$				

$p=$ P değeri

Genotipik olarak incelendiğinde, *IL-8* -251 A>T polimorfizmi hastaların %63.3'ünde, kontrollerin ise %86.6'sında görülmüştür. 30 Parkinson hastasının 9'u (%30) A alleli için heterozigot, 10'u homozigot (%33.3), kontrol grubunun ise 22'si (%36,6) V alleli için homozigot, 30'u ise heterozigot (%50) olarak bulunmuştur. Hasta ve kontrol grubu genotip

frekansı açısından istatistiksel olarak değerlendirildiğinde anlamlı bir farklılık tesbit edilememiştir ($P=0,12$).

Tablo 25: *IL-8* -251 A>T polimorfizmi genotip frekansları (N: allel sayısı)

GRUP	<i>IL-8</i> GENOTİPLERİ						TOPLAM
	AA		AT		TT		
	N	Oran	N	Oran	N	Oran	
HASTA	11	%36.6	9	%30	10	%33.3	16
KONTROL	8	%13.3	39	%50	22	%36,6	60
	$p=0,12$						

$p= P$ değeri

IL-8 -251 A>T polimorfizmi genotip frekansları, hasta grubu açısından cinsiyet ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak bir anlam bulunmuştur ($p=0,009$). Genotip frekansı, kontrol grubunda karşılaştırıldığında ise istatistiksel olarak bir anlam bulunamamıştır ($P=0,527$). Allel frekansı olarak karşılaştırıldığında ise hasta ve kontrol gurubu ile cinsiyet arasında istatistiksel olarak bir anlam tesbit edilemedi ($P^c=0,76$), ($P^d=0,83$)

Tablo 26: *IL-8* -251 A>T polimorfizmi sonuçlarına göre hasta ve kontrol bireylerdeki genotip ve allel frekanslarının cinsiyete göre dağılımı

Genotip	Kontrol		Hasta		Allel	Kontrol		Hasta	
	Erkek	Kadın	Erkek	Kadın		Erkek	Kadın	Erkek	Kadın
AA	14 (77,8)	34 (81)	12 (85,7)	11 (68,8)	A	32 (88,8)	76 (90,4)	26 (92,8)	27 (84,3)
TT	-	-	-	-					
AT	4 (22,2)	8 (19)	2 (14,3)	5 (31,3)	T	4 (12,2)	8 (9,6)	2 (7,2)	5 (16,7)
Toplam	18	42	14	16	Toplam	36	84	28	32
	P ^a = 0,527 P ^b = 0,009					P ^c = 0,76 P ^d = 0,83			

P^a: Kontrol grubu ile cinsiyetin karşılaştırılması sonucu P değeri P^b: Hasta grubu ile cinsiyetin karşılaştırılması sonucu P değeri. P^c : Kontrol grubu ile cinsiyetin karşılaştırılması sonucu allel frekansı P değeri P^d : Hasta grubu ile cinsiyetin karşılaştırılması sonucu allel frekansı P değeri Parantez içinde yüzde frekanslar verilmiştir

Yapılan istatistiksel analizler sonucunda, *IL-8* -251 A>T polimorfizm genotip ve allel frekansları ile yaş grubu arasında herhangi bir istatistiksel anlam bulunamamıştır (p^a= 0.186) (P^b=0,892).

Tablo 27: Yaş ve *IL-8* -251 A>T polimorfizmi genotip ve allel frekansları

Genotip	Yaş		Allel	Yaş	
	Erken	Geç		Erken	Geç
AA	7 (46.7)	4 (26.7)	A	17 (56.6)	14 (46.6)

TT	5 (33.3)	5 (33.3)			
AT	3 (20)	6 (40)	D	13 (43.4)	16 (53.3)
	$P^a = 0,186$			$P^b = 0,892$	

P^a : Genotip frekansı ile yaş grubunun karşılaştırılması sonucu P değeri P^b : Allel frekansı ile yaş grubunun karşılaştırılması sonucu P değeri. Parantez içinde yüzde frekanslar verilmiştir

5. TARTIŞMA SONUÇ

Parkinson Hastalığı (PH) Alzheimer hastalığından sonra görülen ikinci en yaygın nörodejeneratif hastalık ve en sık görülen hareket bozukluğudur. PH'nın görülme sıklığı 65 yaş üzeri toplum kesiminde %2'dir. Yaş ile birlikte sıklığında artış görülmesi PH'nın yaşlanma ile doğrudan ilişkili bir hastalık olduğu gerçeğini ortaya koymaktadır. İlerleyici bir hastalık olan PH, klinik olarak istirahat tremoru, bradikinezi, kaslarda sertlik (rijidite) ve duruşsal (postural) dengesizlik ile karakterize edilebilir (6).

Hastalık, beynin substantia nigra tabakasının pars kompakta bölgesindeki dopaminerjik nöronların kaybı ve Lewy cisimcikleri adı verilen protein agregatlarının varlığı ile karakterizedir. Dopaminerjik nöronların yaklaşık %60-65'inin kaybı sonucu dopamin seviyesinde meydana gelen %80-85'lik azalma motor fonksiyonlarda bozukluklara yol açar. Bu bozukluklar ise istirahat tremoru, bradikinezi, kaslarda sertlik (rijidite) ve duruş bozukluğu gibi semptomların ortaya çıkmasına sebep olur (6).

Parkinson hastalığının kesin nedeni tam olarak bilinmemektedir. Mekanik ve çevresel faktörler, kalıtsal etmenler, toksinler, oksidatif stres ve bazı nörodejeneratif hastalıkların bu hastalığın patogenezi üzerine etkisi olduğu düşünülmektedir (5).

Parkinson hastalığında görülen hücresel patoloji genetik geçişli Parkinson ve sporadik Parkinson arasında patolojik açıdan büyük farklar olmadığını göstermiştir. Her iki formda da ortak nokta dopaminerjik nöronların kaybı ve Lewy cisimciklerinin varlığıdır (Parkinson genetik ve molekuler).

Dopaminerjik nöron kaybının sebeplerinin araştırılması için yapılan moleküler çalışmalar sırasında birçok mutasyon ve polimorfizmin Parkinson hastalığının oluşumunda rol aldığı görülmüştür. Bu çalışmalar sonucu *alfa-sinüklein*, *PARK*, *DJ-1*, *PINK1*, *LRRK2* gibi birçok gende mutasyonlar bulunmuş ve hastalık ile ilişkili oldukları bulunmuştur (8-16)

Mata ve arkadaşlarının İspanyol populasyonunda yaptıkları çalışmada *LRRK2* G2019S mutasyonu ile Parkinson arasındaki ilişki araştırılmıştır. Yapılan bu çalışmada meydana gelen mutasyonun *LRRK2* proteininin MAPKKK bölgesinde lokalize olduğu ve proteinin kinaz aktivitesinde önemli bir etkiye sahip olduğu tesbit edilmiştir (78).

Bugüne kadar *Parkin* geniyle ilgili birçok polimorfizm rapor edilmiş ve bunların içinde en çok görülenleri S/N 167, R/W 366 ve V/L 380 olmuştur. Bunların arasında, S/N 167 frekansının Asya populasyonu ile Avrupa populasyonu arasında farklılık gösterdiği bulunmuş ve *Parkin* genindeki bu frekans farklılığının da coğrafik ve ırksal değişikliklerden kaynaklandığı düşünülmektedir (79).

Hattori ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, Asya populasyonu ile Avrupa populasyonu arasındaki yukarıda bahsedilen polimorfizmlerin allel frekansları karşılaştırılmış ve anlamlı sonuçlar bulunmuştur. Bu sonuçlara göre, etnik farklılıkların allel frekans dağılımına etki ettiği ve değişik populasyonlardaki allel frekans dağılımlarının incelenmesinin yararlı olacağı vurgulanmıştır (79).

Parkinson hastalığı ile ilgili yapılan diğer bir çalışma da *serotonin transporter (SERT)* gen polimorfizmi ile depresyon arasındaki ilişkinin araştırıldığı çalışmadır. Serotonin merkezi sinir sistemindeki en önemli nörotransmitterlerden biridir. Bu sebeple, Parkinson hastalarındaki serotonerjik nöron kaybının depresyona sebep olduğu düşünülmektedir. Bilindiği üzere depresyon Parkinson hastalarının yaklaşık %50'sinde görülmekte ve hastaların yaşam kalitesini olumsuz yönde etkilemektedir. Burn ve arkadaşlarının yaptığı bu çalışmada 5' HTTLPR promotor bölgesindeki polimorfizm ile depresyon arasında bir ilişki bulunamamıştır (80).

Ülkemizde de Parkinson hastalığında *SERT* gen polimorfizmlerinin araştırıldığı bir çalışma bulunmaktadır ve bu çalışma yüksek lisans tezi olarak sunulmuştur. Yapılan çalışmada, genin 2. intronun'da bulunan 15-18 bç'lik VNTR polimorfizmi ve promotor bölgede (5'-HTTLPR) 20-22 bç'lik ikili

tekrarlardan oluşan delesyon/insersiyon polimorfizmi ile PH arasında bir ilişki olup olmadığı araştırılmıştır. Çalışma sonucunda, polimorfizmlere ait genotip dağılımı hasta ve kontrol bireyleri arasında kısmen farklılık göstermesine karşın, bu farklılığın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı sonucuna varılmıştır (81).

Kemokinler inflamasyonda ve homeostazda lökositlere ve kök hücrelere kemotaksi yaptıran sitokinlerdir. Kemokinlerin lökositlerle olan etkileşimi; iyon akışı, transmembran potansiyeli, integrin aviditesi ve hücrede şekil değişikliğinin yanı sıra lizozomal enzimlerin sekresyonu, süperoksit anyonlarının oluşumu gibi birçok hücrenel ve biyokimyasal olayların başlamasını sağlar (56).

Kemokinler lökosit-endotelyal hücre ilişkilerinde, T ve B hücre olgunlaşmasında, immün denetim, tolerans ve immüntenin oluşmasının yanı sıra T-B hücre iletişimde ve primer immün cevabın oluşmasında etkin olmaktadır (57).

Birçok akut ve kronik inflamatuvar hastalıkta kemokinlerin ilgili ortama salındıkları gösterilmiştir. Bu hastalıklarda kemokinler dokuda lökositlerin toplanmasını ve aktivasyonunu sağlamaktadır. İnflamatuvar süreçte kemokinlerin sentezi ve salınımındaki belirgin artım lökositlerin inflamasyonlu dokuya geçişlerinde önemli rol oynamaktadır (59).

Merkezi sinir sisteminde kemokin reseptörleri mikroglia, astrosit ve endotel gibi farklı birçok hücreden sentezlenmektedir. Beta kemokin reseptörü olan CCR5 Alzheimer hastalarının beyin dokusunda bulunmuş ve β -amiloid plaklarıyla ilişkili olduğu görülmüştür. İnflamatuvar fonksiyonlarının yanı sıra CCR5, HIV virüsü için bir koreseptör olarak görev yapmaktadır. The regulated on activation normal T expressed and secreted protein (RANTES) ise CCR5'in ligandı olarak fonksiyon görür. CCR2 ise monosit kemotaksisine aracılık eden MCP'in reseptörüdür (58).

Yukardaki bilgiler göz önünde tutulduğunda, inflamasyonun ve inflamasyona görevli olan kemokin ve kemokin reseptörlerinin Parkinson hastalığının oluşumunda önemli rol oynadığı görülmektedir. Kemokin ve kemokin reseptörlerinin inflamasyonda görevli olması sebebiyle çalışmaların büyük çoğunluğu inflamatuvar hastalıklar üzerinde yapılmış olup Parkinson hastalığı patogenezi ile ilgili yapılan çalışmalar sınırlı sayıdadır.

Çalışmamızda, Parkinson hastalığı tanısı konmuş bireylerde hastalık ile *CCR5*, *CCR2*, *RANTES1*, *MCP-1* ve *IL-8* genleri üzerine yer alan genetik polimorfizmler arasında ilişki olup olmadığı belirlenmeye çalışılmıştır. Bu amaçla 30 hasta ve 60 kontrol bireylerden elde edilen DNA'lar üzerinden ilgili polimorfizmlere bakılarak her iki grup arasında allel ve genotip dağılımı açısından farklılık olup olmadığı incelenmiştir.

Yapılan deneyler sonucunda, *MCP-1* -2518 A>G polimorfizmi hastaların %30'unda kontrollerin ise %45'inde görüldü. 30 Parkinson hastasının 4'ünün (%13.3) G alleli için heterozigot, 5'i (%16.6) homozigot olduğu belirlenirken, kontrol grubunun 22'sinin (%36,67) G alleli için heterozigot, 5'inin (% 8,33) homozigot olduğu gözlenmiştir. Hasta ve kontrol grubu genotip ve allel frekansı açısından istatistiksel olarak değerlendirildiğinde anlamlı bir farklılık tesbit edilememiştir ($p=0,55$), ($p=0,62$).

CCR5-Δ32 polimorfizmi için hasta ve kontrol grubundaki tüm bireylerin normal (AA) (%100) genotipine sahip olduğu belirlenmiştir. Hasta ve kontrol grubunda farklılık olmadığı için istatistiksel bir değerlendirme yapılamamıştır.

CCR2 geni -64 V>I polimorfizmi hastaların %23.3'ünde kontrollerin ise %36.6'sında görülmüş, 30 Parkinson hastasının 7'si (%23.3), kontrol grubunun ise 22'si (%36,6) V alleli için heterozigot olarak belirlenmiştir. Hasta ve kontrol grubu genotip ve allel frekansı açısından istatistiksel olarak

değerlendirildiğinde anlamlı bir farklılık tesbit edilememiştir ($p=0,786$), ($p=0,653$).

RANTES -28 C>G polimorfizmi hastaların %12.5'inde gözlenirken, kontrol grubundaki bireylerin hiçbirinde gözlenmemiştir. 30 Parkinson hastasının 3'ü (%10) C alleli için heterozigot, 3'ü (%10) homozigot olarak belirlenmiş, kontrol grubunun ise tamamı normal (%100) olarak bulunmuştur. Hasta ve kontrol grubu genotip ve allel frekansı açısından istatistiksel olarak değerlendirildiğinde anlamlı bir farklılık olduğu tesbit edilmiştir ($p=0$), ($p=0,26$).

T hücreleri, eozofil ve bazofil gibi hücreler için kemotaktik özellikte olan *RANTES* proteinini kodlayan gen 17q11.2-q12 bölgesinde lokalize olmuştur. Protein, lökositlerin inflamasyon bölgesine göçünde önemli rol oynamaktadır. Yapılan çalışmalarda *RANTES* -28 C>G polimorfizminin NF- κ B bağlanma bölgesinde olduğu tesbit edilmiştir. *RANTES* -28 G allelinin NF- κ B bağlanmasını arttırdığı ve artan promotor aktivitesi sayesinde transkripsiyonel aktivite ve protein ekspresyonunda artış meydana geldiği belirlenmiştir. Transkripsiyonel aktivite sonucunda monosit ve makrofaj gibi hücrelerde *RANTES* ekspresyonunun arttığı in vitro çalışmalarla da gösterilmiştir. Yüksek seviyelerdeki *RANTES* ise inflamasyonu tetiklemekte ve diğer inflamatuvar kemokin ve sitokinlerin salınımını arttırmaktadır.

IL-8 -251 A>T polimorfizmi hastaların %63.3'ünde, kontrollerin ise %86.6'sında görülmüştür. 30 Parkinson hastasının 9'u (%30) A alleli için heterozigot, 10'u homozigot (%33.3), kontrol grubunun ise 22'si (%36,6) V alleli için homozigot, 30'u ise heterozigot (%50) olarak bulunamamıştır. Hasta ve kontrol grubu genotip ve allel frekansı açısından istatistiksel olarak değerlendirildiğinde anlamlı bir farklılık tesbit edilememiştir ($p=0,12$), ($p=0,34$).

Nishimura ve arkadaşlarının Japon popülasyonunda yaptığı çalışmada *MCP-1*'e ait -2518 A>G polimorfizmi ile Parkinson hastalığı arasında bir

ilişki bulunamamıştır (82). 171 hasta ve 340 kontrol üzerinde yapılan bu çalışmada *MCP-1* -2518 A>G polimorfizmi hastaların %52.7'sinde görülmüştür. 171 Parkinson hastasının 71'i (%42) G alleli için homozigot, 80'i ise (%47.3) heterozigot olarak belirlenmiştir. İstatistiksel olarak anlam bulunmasa da bu polimorfizmin *MCP-1* ekspresyon seviyesini arttırdığı ve daha yüksek mikroglia aktivasyonuna sebep olduğu düşünülmektedir.

Ayrıca bu polimorfizmin ırksal olarak heterojeniteye de sahip olduğu düşünülmektedir. Japon ve Meksika populasyonunda G alleli frekansı sırasıyla %64 ve %47 iken, Amerika ve Avrupa populasyonunda bu oran %21 ile %29 arasında değişmektedir (83). Benzer şekilde Pola ve arkadaşlarının İtalyan popülasyonunda Alzheimer hastaları üzerinde yaptıkları çalışmada da hastalık ile polimorfizm arasında bir ilişki gözlenmemiştir (84).

Bugüne kadar Parkinson ve Alzheimer gibi nörodejeneratif hastalıklardan *MCP-1*'in -2518 A>G polimorfizmi dışında farklı bir polimorfizm çalışılmamıştır. Szalai ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada ise -2518 A>G polimorfizmi ile astım hastalığı arasında ilişki gözlenmiştir (85).

RANTES genindeki polimorfizmlerin HIV virüsünün sebep olduğu AIDS hastalığı arasında bir ilişkinin bulunduğu yapılan çalışmalarda gösterilmiştir. Liu ve Gonzalez'in yaptığı çalışmalarda *RANTES* -403 G>A ve -28 C>G polimorfizmlerinin AIDS hastalığının ilerleyişinde gecikmeye sebep olduğu bildirilmiştir (86).

Yiğit ve arkadaşlarının Türk populasyonunda yaptığı bir çalışmada ise *CCR5* ve *CCR2* genlerindeki *CCR2* V64I, *CCR5* -59029A/G, *CCR5* -Δ32 polimorfizmleri ile renal transplantasyondaki başarı arasındaki ilişki araştırılmıştır. 85 hastada yapılan bu çalışmada transplantasyon başarısı ile *CCR2* V64I, *CCR5* -Δ32 polimorfizmleri arasında bir ilişki bulunamamıştır. *CCR5* -59029A/G polimorfizminin ise promotor aktivitesini arttırdığı ve bunun sonucu olarak *CCR5* ekspresyonunun arttığı gözlenmiştir. A allelindeki homozigositenin akut red ile ilişkili olabileceği düşünülmektedir (75).

IL-8 ile ilgili yapılan çalışmaların çoğunu astım gibi solunum yolu rahatsızlıkları oluşturmaktadır. -251 A>T polimorfizmine sahip bireylerin solunum yolu epitel hücrelerinde *IL-8* proteini seviyelerinin daha yüksek olduğu ve bunun da sigara bağımlılığıyla ilişkili olduğu Mio ve arkadaşlarını yaptığı çalışmada gösterilmiştir (76). Heinzman ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada ise *IL-8* -251 A>T polimorfizmi ile astım arasında bir ilişki gözlenmiştir. Bu polimorfizme sahip bireylerde astım hastalığının şiddeti arasında pozitif bir ilişki bulunmuştur (77).

IL-8 ile ilgili yapılan diğer bir çalışmada, -251 A>T polimorfizminin Japon, Türk, Mongol ve Kore populasyonlarındaki dağılımı araştırılmıştır. Fujihara ve arkadaşlarının yaptığı bu çalışmada T alleli (T/T) Japon populasyonunda %67, Türk populasyonunda %56, Mongol populasyonunda %36, Kore populasyonunda ise %37 olarak bulunmuştur. Mutant allel frekansının diğer populasyonlar ile karşılaştırılması sonucunda ise değişik sonuçlar gözlenmiştir. Caucasian topluluğunda benzer sonuçlar elde edilmiştir. Almanya, İrlanda, İspanya, İngiliz, Amerikan populasyonları arasında bu frekans %47-57 arasında değiştiği belirtilmiştir. Japon populasyonu haricindeki Asya populasyonunda ise bu frekans %59-61 arasında görülmüştür. En yüksek mutant allel frekansı ise Japon ve Türk populasyonunda sırasıyla %80 ve %75 olarak bulunmuştur (77).

Bahsedilen genler ve polimorfizmler ile ilgili birçok hastalık araştırılmıştır. Bunlar arasında ateroskleroz, romatoid artrit, iskemi, gastrik karsinom gibi birçok hastalık bulunmaktadır. Romatoid Artrit (RA) gibi kronik eklem hastalıklarında sinoviyal fibroblastlar ve doku makrofajlarından Monocyte Chemoattractant Protein (MCP-1) ve Macrophage Inflammatory Protein-1 α (MIP-1 α) salınımı artmakta ve bunlar hastalığın patogenezinde rol oynamaktadır (59, 60)

Böbrek hastalıklarından proliferatif glomerülonefritte glomerüllerin histokimyasal incelemesinde MCP-1 kemokini bulunmuştur (61). Aynı şekilde

IgA nefropatisi, membranoproliferatif glomerülonefrit ve krioglobülinemide, glomerül ve tubulointerstisyumda RANTES, MCP-1, IL-8'in varlığı saptanmıştır (62,63). Glomerülonefritlerde üriner IL-8 ve MCP-1 atılımı ve lökosit infiltrasyonu arasında pozitif bir ilişki bildirilmiştir. Böbrek transplant rejeksiyonunda da RANTES, IL-8, MCP-1 ve ENA-78 seviyeleri artmış olarak bulunmuştur (65).

Sonuç olarak, Isparta popülasyonunda Parkinson hastalığının *MCP-1*, *CCR5*, *CCR2*, *RANTES* ve *IL-8* genlerindeki polimorfizmler ile bağlantısını araştırdığımız bu çalışmanın Türk popülasyonu frekansını belirlemeye yardımcı olacağı kanaatindeyiz. Bu çalışma, Türk popülasyonunda yapılan ilk çalışma olması sebebiyle de ayrı bir önem arz etmektedir. Devam edecek olan çalışmalarımızda, inflamasyonla ilgili diğer aracı proteinleri kodlayan genleri de tarayarak Parkinson hastalığı ile inflamasyonun ilişkisini daha ayrıntılı olarak ortaya koymayı amaçlamaktayız.

6. KAYNAKLAR

1. Wood-Kaczmar A., Gandhi S., Wood N.W Understanding the molecular causes of Parkinson's disease. *TRENDS in Molecular Medicine*.12;11 2006
2. Maral Mouradian M. Recent advances in the genetics and pathogenesis of Parkinson disease. *Neurology* 2002;58:179–185
3. OZANSOY M., Nazlı BAŞAK A.Parkinson Hastalığının Genetiği ve Nörodejenerasyonun Moleküler Biyolojisi *Parkinson Hast. Hareket Boz. Der.*, 2004;7(2): 109-120
4. Lester J, Otero-Siliceo E, Parkinson's Disease and Genetics. (*The Neurologist* 2006;12: 240–244)
5. Calne D. A definition of Parkinson's disease. *Parkinsonism and Related Disorders* 11 (2005) S39–S40
6. Cordato DJ, Chan DKY., Genetics and Parkinson's disease. *Clin Neurosci*, 2004; 11(2): 119-123)
7. Gwinn-Hardy K. Genetics of parkinsonism. *Mov Disord* 2002;17:645– 656.
8. Kitada T, Asakawa S, Hattori N, et al. Mutations in the parkin gene cause autosomal recessive juvenile parkinsonism. *Nature* 1998;392:605– 608.
9. Lucking CB, Durr A, Bonifati V, et al. Association between early-onset Parkinson's disease and mutations in the parkin gene. French Parkinson's Disease Genetics Study Group. *N Engl J Med* 2000;342:1560 – 1567.
10. Bonifati V, Rizzu P, van Baren MJ, et al. Mutations in the DJ-1 gene associated with autosomal recessive early-onset parkinsonism. *Science* 2003;299:256 –259.

11. Valente EM, Abou-Sleiman PM, Caputo V, et al. Hereditary early-onset Parkinson's disease caused by mutations in PINK1. *Science* 2004;304:1158–1160.
12. Valente EM, Salvi S, Ialongo T, et al. PINK1 mutations are associated with sporadic early-onset parkinsonism. *Ann Neurol* 2004;56:336–341.
13. Paisan-Ruiz C, Jain S, Evans EW, et al. Cloning of the gene containing mutations that cause PARK8-linked Parkinson's disease. *Neuron* 2004;44:595–600.
14. Zimprich A, Biskup S, Leitner P, et al. Mutations in LRRK2 cause autosomal-dominant parkinsonism with pleomorphic pathology. *Neuron* 2004;44:601–607.
15. Funayama M, Hasegawa K, Ohta E, et al. An LRRK2 mutation as a cause for the parkinsonism in the original PARK8 family. *Ann Neurol* 2005;57:918–921.
16. Lucking CB, Durr A, Bonifati V, et al. Association between early-onset Parkinson's disease and mutations in the parkin gene. French Parkinson's Disease Genetics Study Group. *N Engl J Med* 2000;342:1560–1567.
17. McGeer EG, McGeer PL. Inflammatory processes in Alzheimer's disease. *Prog Neuro-Psychopharmacol Biol Psychiatry* 2003;27:741–9
18. McGeer PL, Yasojima K, McGeer EG. Inflammation in Parkinson's disease. *Adv Neurol* 2001;86:83–9.
19. Hirsch EC, Breidert T, Rousselet E, Hunot S, Hartmann A, Michel PP. The role of glial reaction and inflammation in Parkinson's disease. *Ann N Y Acad Sci* 2003;991:214–28.

20. Beal MF. Mitochondria, oxidative damage, and inflammation in Parkinson's disease. *Ann N Y Acad Sci* 2003;991:120–31.
21. Wullner U, Klockgether T. Inflammation in Parkinson's disease. *J Neurol* 2003;250(Suppl 1):I35–8.
22. Orr CF, Rowe DB, Halliday GM. An inflammatory review of Parkinson's disease. *Prog Neurobiol* 2002;68(5):325–40.
23. Liu B, Hong JS. Role of microglia in inflammation-mediated neurodegenerative diseases: mechanisms and strategies for therapeutic intervention. *J Pharmacol Exp Ther* 2003;304:1–7.
24. Çağlar M, Kansu E, Kemokinler, kemokin reseptörleri ve inflamasyon. *ANKEM Derg* 2004; 18 (Ek 2):164-168.
25. <http://www.parkinsonderneği.org/digerbelirtileri.html>
26. Markers for depression in Parkinson Disease. Leentjens AFG, Lousberg R, Verhey FRJ. *Acta Psychiatr Scand* 2002; 106[3]: 196-201
27. Dauer W, Przedborski S. Parkinson's disease: mechanisms and models. *Neuron* 2003;39:889–909
28. Betarbet R, Sherer T B, Greenamyre J. T, Ubiquitin–proteasome system and Parkinson's diseases. *Experimental Neurology* 191 (2005) S17–S27
29. Prof. Dr. Ayşe Başaran Parkinson Ve A-Sinüklein Tıbbi Biyoloji Kongresi
30. Lee F.J.S., Liu F., Pristupa Z.B., Niznik H.B.: Direct Binding and Functional Coupling of α -Synuclein to the Dopamine Transporters Accelerate Dopamine-Induced Apoptosis 2001
31. Tolosa E, Schulz J.B, Mckeith I.G, Et Al,: Neurodegenerative Disorders Associated with α -Synuclein Pathology *Ars Medica SPAIN*, 2002

32. Dev .K., Hofele K., Barbieri S., BUCHMAN V.L., Putten H.: α -Synuclein and Its Molecular Pathophysiological Role in Neurodegenerative disease. . *Neuropharmacology* 45 : 1445-1454, 2003
33. Lansbury P.T., Brice A.: Genetics of Parkinson's Disease and Biochemical Studies of Implicated Gene Products. . *Current opinion in Cell Biology* 14: 653-660, 2002.
34. Rachakonda V., Pan T.H., Le W.D.: Biomarkers of Neurodegenerative Disorders : How good are they ? *Cell Research* , 14(5): 349-360, 2004
35. Mellick GD, Buchanan DD, McCann SJ, James KM, Johnson AG, Davis DR et al. Variations in the monoamine oxidase B (MAOB) gene are associated with Parkinson's disease. *Mov Disord* 14:219-224, 1999.
36. Wu RM, Cheng CW, Chen KH et al. The COMT L allele modifies the association between MAOB polymorphism and PD in Taiwanese. *Neurology* 2002;56:375-82
37. Hernan MA, Checkoway H, O'Brien R et al. MAOB intron 13 and COMT codon 158 polymorphisms, cigarette smoking, and the risk of PD. *Neurology* 2002;58:1381-7.
38. Shih JC, Zhu QS, Grimsby J, Chen K. Identification of human monoamine oxidase (MAO) A and B gene promoters. *J Neural Transm* 1994;41(Suppl.):27-33.
39. Spacey SD, Wood NW. The genetics of Parkinson's disease. *Curr Opin Neurol.* 1999;12:427-432
- 40-Valente EM, Brancati F, Ferraris A, Graham EA, Davis MB, Breteler MM et al. PARK6-linked parkinsonism occurs in several European families. *Ann Neurol* 51:14-18, 2002.

41. van Duijn CM, Dekker MCJ, Bonifati V, Galjaard RJ, Houwing-Duistermaat JJ, Snijders PJ et al. PARK7, a novel locus for autosomal recessive early-onset parkinsonism, on chromosome 1p36. *Am J Hum Genet* 69:629–634, 2001.
42. Bonifati V, Rizzu P, van Baren MJ, Schaap O, Breedveld GJ, Krieger E et al. Mutations in the DJ-1 gene associated with autosomal recessive early-onset parkinsonism. *Science* 299:256–259, 2003.
43. Nagakubo D, Taira T, Kitaura H, Ikeda M, Tamai K, Iguchi-Ariga SM et al. DJ-1, a novel oncogene which transforms mouse NIH3T3 cells in cooperation with ras. *Biochem Biophys Res Commun* 231:509–513, 1997.
44. Wagenfeld A, Gromoll J, Cooper TG. Molecular cloning and expression of rat contraception associated protein 1 (CAP1), a protein putatively involved in fertilization. *Biochem Biophys Res Commun* 251:545–549, 1998.
45. Okada M, Matsumoto K, Niki T, Taira T, Iguchi-Ariga SM, Ariga H. DJ-1, a target protein for an endocrine disrupter, participates in the fertilization in mice. *Biol Pharm Bull* 25:853–856, 2002.
46. Mitsumoto A, Nakagawa Y. DJ-1 is an indicator for endogenous reactive oxygen species elicited by endotoxin. *Free Radic Res* 35:885–893, 2001.
47. Leroy E, Boyer R, Auburger G, Leube B, Ulm G, Mezey E et al. The ubiquitin pathway in Parkinson's disease. *Nature* 395:451–452, 1998.
48. Wintermeyer P, Kruger R, Kuhn W, Muller T, Voitalla D, Berg D et al. Mutation analysis and association studies of the UCHL1 gene in German Parkinson's disease patients. *NeuroReport* 11:2079–2082, 2000.
49. Pickart CM. Ubiquitin in chains. *Trends Biochem Sci* 25:544–548, 2000.

50. Kruger R, Kuhn W, Muller T, et al. Ala30Pro mutation in the gene coding alpha-synuclein in Parkinson's disease. *Nat Genet.* 1998;18:106–108.
51. R.C. Dodel, F. Lohmuller, Y. Du, B. Eastwood, P. Gocke, W.H.Oertel, T. Gasser, A polymorphism in the intronic region of the IL-1alpha gene and the risk for Parkinson's disease, *Neurology* 56 (2001)982–983.
52. K.M. Mattila, J.O. Rinne, T. Lehtimaki, M. Roytta, J.P. Ahonen, M.Hurme, Association of an interleukin 1B gene polymorphism (2511) with Parkinson's disease in Finnish patients, *J. Med. Genet.* 39 (2002) 400–402
53. P.L. McGeer, K. Yasojima, E.G. McGeer, Association of interleukin-1 beta polymorphisms with idiopathic Parkinson's disease, *Neurosci.Lett.* 326 (2002) 67–69.
54. Masataka Nishimura, Ikuko Mizuta, Eiji Mizuta, Shunzou Yamasaki, Mitsuhiro Ohta, Ryuji Kaji, Sadako Kuno, Tumor necrosis factor gene polymorphisms in patients with sporadic Parkinson's disease, *Neuroscience Letters* 311 (2001) 1-4
55. Miller DW, Ahmad R, Hague S, et al. L166P mutant DJ-1, causative for recessive Parkinson's disease, is degraded through the ubiquitin-proteasome system. *J Biol Chem* 2003;278:36588–36595.
56. Canet-Aviles RM, Wilson MA, Miller DW, et al. The Parkinson's disease protein DJ-1 is neuroprotective due to cysteinesulfinic acid-driven mitochondrial localization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101:9103–9108.
57. Menzies FM, Yeniseti SC, Min KT. Roles of Drosophila DJ-1 in survival of dopaminergic neurons and oxidative stress. *Curr Biol* 2005;15:1578 –1582.
58. Meulener M, Whitworth AJ, Armstrong-Gold CE, et al. Drosophila DJ-1 mutants are selectively sensitive to environmental toxins associated with Parkinson's disease. *Curr Biol* 2005;15:1572–1577.

59. Park J, Kim SY, Cha GH, et al. *Drosophila* DJ-1 mutants show oxidative stress-sensitive locomotive dysfunction. *Gene* 2005; 361:133–139.
60. Yang Y, Gehrke S, Haque ME, et al. Inactivation of *Drosophila* DJ-1 leads to impairments of oxidative stress response and phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;102:13670–13675.
61. Kim RH, Smith PD, Aleyasin H, et al. Hypersensitivity of DJ-1-deficient mice to 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) and oxidative stress. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005; 102:5215–5220.
62. Rogaeva E, Johnson J, Lang AE, et al. Analysis of the PINK1 gene in a large cohort of cases with Parkinson disease. *Arch Neurol* 2004;61:1898–1904.
63. Beilina A, Van Der Brug M, Ahmad R, et al. Mutations in PTEN-induced putative kinase 1 associated with recessive parkinsonism have differential effects on protein stability. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;102:5703–5708.
64. Valente EM, Salvi S, Ialongo T, et al. PINK1 mutations are associated with sporadic early-onset parkinsonism. *Ann Neurol* 2004;56:336–341.
65. Deng H, Jankovic J, Guo Y, et al. Small interfering RNA targeting the PINK1 induces apoptosis in dopaminergic cells SHSY5Y. *Biochem Biophys Res Commun* 2005;337:1133–1138.
66. Petit A, Kawarai T, Paitel E, et al. Wild-type PINK1 prevents basal and induced neuronal apoptosis, a protective effect abrogated by Parkinson disease-related mutations. *J Biol Chem* 2005;280:34025–34032.
67. Greene JC, Whitworth AJ, Kuo I, et al. Mitochondrial pathology and apoptotic muscle degeneration in *Drosophila* parkin mutants. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100:4078–4083.
68. Pesah Y, Pham T, Burgess H, et al. *Drosophila* parkin mutants have decreased mass and cell size and increased sensitivity to oxygen radical stress. *Development* 2004;131:2183–2194.

69. Teismann P, Schulz J B., Cellular pathology of Parkinson's disease: astrocytes, microglia and inflammation, *Cell Tissue Res* (2004) 318: 149–161
70. Wersinger C, Sidhu A, An Inflammatory Pathomechanism for Parkinson's Disease?, *Current Medicinal Chemistry*, 2006, 13, 591-60271.
Darios F, Corti O, Lucking CB, et al. Parkin prevents mitochondrial swelling and cytochrome c release in mitochondriaindependent cell death. *Hum Mol Genet* 2003;12:517–526.
72. Cha GH, Kim S, Park J, et al. Parkin negatively regulates JNK pathway in the dopaminergic neurons of *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;102:10345–10350.
73. Greene JC, Whitworth AJ, Andrews LA, et al. Genetic and genomic studies of *Drosophila* parkin mutants implicate oxidative stress and innate immune responses in pathogenesis. *Hum Mol Genet* 2005;14:799–811.
74. Whitworth AJ, Theodore DA, Greene JC, et al. Increased glutathione S-transferase activity rescues dopaminergic neuron loss in a *Drosophila* model of Parkinson's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;102:8024–8029.
75. Goldberg MS, Pisani A, Haburcak M, et al. Nigrostriatal dopaminergic deficits and hypokinesia caused by inactivation of the familial Parkinsonism-linked gene DJ-1. *Neuron* 2005;45: 489–496.
76. Shendelman S, Jonason A, Martinat C, et al. DJ-1 is a redoxdependent molecular chaperone that inhibits alpha-synuclein aggregate formation. *PLoS Biol* 2004;2:e362.
77. Zhou W, Zhu M, Wilson MA, et al. The oxidation state of DJ-1 regulates its chaperone activity toward alpha-synuclein. *J Mol Biol* 2006;356:1036 –1048.
78. Mata I., F. Rossa O. A, Kachergus J., Huerta C., Ribacoba R., Moris G., Blazquez M., Guisasola L. M., Salvador C., Martinez C., Farrera M.

, Alvarez V. LRRK2 mutations are a common cause of Parkinson's disease in Spain, *European Journal of Neurology* 2006, 13: 391–394

79. Li X, Kitami T, Wang M, Mizuno Y, Hattori N, Geographic and ethnic differences in frequencies of two polymorphisms (D/N394 and L/I272) of the parkin gene in sporadic Parkinson's disease, *Parkinsonism and Related Disorders* 11 (2005) 485–491

80.. Burn D J, Tiangyou W, Allcock L M., Davison J, Chinnery P F., Allelic variation of a functional polymorphism in the serotonin transporter gene and depression in Parkinson's disease, *Parkinsonism and Related Disorders* 12 (2006) 139–141

81. Ozkaya M., Parkinson Hastalarında Serotonin Transporter Gen Polimorfizmlerinin Araştırılması, Yüksek Lisans Tezi, 2003

82. M. Nishimura, S. Kuno, I. Mizuta, M. Ohta, H. Maruyama, R. Kaji, H. Kawakami, Influence of monocyte chemoattractant protein1 gene polymorphism on age at onset of sporadic Parkinson's disease, *Mov. Disord.* 18 (2003) 953–955.

83. Combarrosa O, Infante J, Llorca J, Berciano J, No evidence for association of the monocyte chemoattractant protein-1 (22518) gene polymorphism and Alzheimer's disease, *Neuroscience Letters* 360 (2004) 25–28

84. Pola R, Flex A, Gaetani E, Proia S A., Papaleo P, Giorgio A, Straface G, Pecorini G, Serricchio M, Pola P, Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) gene polymorphism and risk of Alzheimer's disease in Italians, *Experimental Gerontology* (2004) 1249–1252

85. Szalai, C., Kozma, G.T., Nagy, A., Bojszko, A., Krikovszky, D., Szabo, T., Falus, A., 2001. Polymorphism in the gene regulatory region of MCP-1 is associated with asthma susceptibility and severity. *J. Allergy Clin. Immunol.* 108, 375–381

86. Suresh P., Wanchu A., Sachdeva R K, Bhatnagar A. Gene Polymorphisms in CCR5, CCR2, CX3CR1, SDF-1 and RANTES in Exposed but Uninfected Partners of HIV-1 Infected Individuals in North India