

**T.C.
HALIÇ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK PROGRAMI**

**HUNTINGTON HASTALIĞI'NDA MODİFİYE EDİCİ
GENLERİN ARAŞTIRILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**Hazırlayan
Zeynep CEYLAN**

**Tez Danışmanı
Yrd. Doç. Dr. Nagehan ERSOY TUNALI**

İstanbul - 2010

T.C.
HALIÇ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜNE

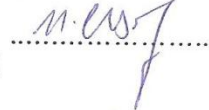
Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı Moleküler Biyoloji ve Genetik Programı Tezli Yüksek Lisans öğrencisi **Zeynep CE YLAN KAPAL** tarafından hazırlanan “**Huntington Hastalığında Modifiye Edici Gen Polimorfizmlerinin Araştırılması**” adlı bu çalışma jürimizce Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Sınav Tarihi : 21.07.2010

(Jüri Üyesinin Ünvanı , Adı , Soyadı ve Kurumu) :

İmzası :

Jüri Üyesi: Yrd.Doç.Dr.Nagehan ERSOY TUNALI
Danışman-HAL.Üniv.Mol.Biy.ve Gen.ABD Öğr.Üyesi



Jüri Üyesi : Yrd.Doç.Dr.Baki YOKEŞ
HAL.Üniv.Mol.Biy.ve Gen.ABD Öğr.Üyesi



Jüri Üyesi : Yrd.Doç.Dr.Hatice YORULMAZ
HAL.Üniv. Hemşirelik Yüksekokulu Öğr.Üyesi



Jüri Üyesi : Prof.Dr.Necmiye SABUNCU
HAL.Üniv. Hemşirelik Yüksekokulu Öğr.Üyesi (Yedek)

.....

Jüri Üyesi : Yrd.Doç.Dr.Burcu Irmak YAZICIOĞLU
HAL.Üniv.Mol.Biy.ve Gen.ABD Öğr.Üyesi (Yedek)

.....

ÖNSÖZ

Bu tez çalışması 2009-2010 yılları arasında T.C. Haliç Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü'nün bilimsel araştırma ve uygulama çalışmalarına verdiği destek ile hazırlanmıştır.

Öncelikle yüksek lisans eğitimim ve tez çalışmalarım sırasında hiçbir konuda yardımını esirgemeyen, her konuda vakit sınırlaması olmaksızın yol gösteren tez danışmanım Sayın Yrd. Doç. Dr. Nagehan ERSOY TUNALI'ya teşekkürlerimi sunarım.

Hasta örneklerinin temininde yardımcı olan İstanbul Üniversitesi DETAE Moleküler Genetik Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Nihan Erginel ÜNALTUNA ve İst. Üniv. İst. Tıp Fakültesi Nöroloji ABD öğretim üyesi Doç. Dr. Haşmet HANAĞASI'na teşekkür ederim.

Laboratuvar çalışmalarım esnasında bana her konuda yardımcı olan arkadaşım Özlem ÜLİÇ ÇATAR'a teşekkür ederim.

İstatistik analizler esnasında her işini bırakıp çalışmalarım ile ilgilenen arkadaşım Kutluhan İNCEKARA'ya teşekkür ederim.

Sağlıklı ve gönüllü bireylerin DNA örneklerinin toplanması konusunda yardımını esirgemeyen arkadaşım Ayşenur AKKAYA SAYILAN'a teşekkür ederim.

Bugüne kadar maddi ve manevi desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen anneme ve babama sonsuz teşekkürler. Bana okumak kadar paha biçilmez ve benim için bir o kadar da eşsiz bir hediye verdiğiniz için size minnettarım...

Zeynep CEYLAN

Haziran, 2010

İÇİNDEKİLER

Sayfa No.

ÖNSÖZ.....	I
İÇİNDEKİLER	II
ŞEKİL LİSTESİ	V
TABLO LİSTESİ	VI
KISALTMALAR.....	VII
ÖZET	VIII
ABTRACT	X
1.GİRİŞ	
1.1. Klinik Özellikler.....	1
1.2. Nöropatolojik Özellikler	2
1.3. Genetik Özellikler	3
1.3.1. Huntington Hastalığı'nın Moleküler Patolojisi	4
1.3.1.1. Htt Proteini ve İşlevi.....	4
1.3.2. Toksik İşlev Kazanımı ve Kaybı	4
1.3.3. İn vivo Huntingtin Protein Agregasyonu.....	5
1.3.4. Şaperonlar ve Proteozom.....	7
1.3.4.1. Agregasyonda Şaperonların ve Proteozomların Rolü.....	7
1.3.5. Transkripsiyonal Regülasyon	8
1.3.6. Huntington Hastalığı'nda Hücre Ölüm Mekanizmaları	9
1.3.7. Hastalık Başlangıç Yaşı ve Etkileyen Faktörler	10
1.4. Metilentetrahidrofolat Redüktaz Polimorfizmleri	13
2. AMAÇ	15
3. MATERYALLER	1

3.1. Çalışmada Kullanılan Örnekler	16
3.2. Kimyasallar	16
3.3. Tamponlar, Solüsyonlar ve Enzimler	16
3.3.1. Periferik Kandan DNA İzolasyon Tamponları	16
3.3.2. Yanak İçi Epitel Örneklerinden DNA İzolasyon Tamponları	17
3.3.3. Polimeraz Zincir Reaksiyonu Tamponları ve Enzimleri	17
3.3.4. Restriksiyon Enzimleri ve Reaksiyon Tamponları	18
3.3.5. Elektroforez Tamponları ve Jel Sistemleri	19
3.3.6. Oligonükleotid Primerler	19
3.3.7. DNA Büyüklük Markörleri	20
3.3.8. Cihazlar	20
4. KULLANILAN YÖNTEMLER.....	22
4.1. Periferik Kandan DNA İzolasyonu	22
4.2. Yanak İçi Epitel Örneklerinden DNA İzolasyonu.....	22
4.3. İzole Edilen DNA'nın Analizi	23
4.4. Polimeraz Zincir Reaksiyonu	23
4.5. Primerlerin Seçimi.....	24
4.6. Restriksiyon Fragmenti Uzunluk Polimorfizmi (RFLP)	25
4.7. Agaroz Jel Elektroforezi.....	25
4.8. PCR Ürünlerinin Saflaştırılması.....	27
4.9. Dizi Analizi	27
4.10. Fragment Analizi	28
4.11. MTHFR Gen Polimorfizmlerinin Analizi	29
4.11.1. MTHFR C677T Polimorfizminin Analizi	29
4.11.2. MTHFR A1298C Polimorfizminin Anazili.....	30
5. SONUÇLAR	32

5.1. Örneklerin Tanımı	32
5.2. DNA İzolasyonu.....	32
5.3. Huntington Hastalığı'nda CAG Tekrar Sayılarının Belirlenmesi.....	33
5.4. MTHFR Geni C677T Polimorfizminin Analizi	33
5.5. MTHFR Geni A1298C Polimorfizminin Analizi	36
5.6. Huntington Hastalarında Hastalık Başlangıç Yaşı	39
5.7. Verilerin İstatistiksel Analizi.....	40
5.7.1. Hardy-Weinberg Analizi ve Alel Frekansları.....	41
5.7.2. Çapraz Tablolar	42
5.7.3. CAG Tekrar Sayısı, MTHFR Polimorfizmleri ve Hastalık Başlangıç Yaşı İlişkisi	44
5.7.4. Genotiplerin Başlangıç Yaşına Etkileri	46
6. TARTIŞMA.....	50
6.1. Huntington Hastalığı ve Başlangıç Yaşı.....	50
6.2. Türk Huntington Hastalarında Başlangıç Yaşı	51
6.3. Hasta ve Kontrol Gruplarında SNP Genotiplemeleri	51
6.4. CAG Tekrarlarının ve SNP'lerin Başlangıç Yaşına Etkisi	52
7. KAYNAKLAR.....	54
8. ÖZGEÇMİŞ.....	59

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa No.

Şekil 1.1 : Normal ve HH Beyinlerinde Bazal Gangliya Bölgeleri.....	2
Şekil 1.2 : CAG Tekrar Sayısı ve Hastalık Başlangıç Yaşı İlişkisi.....	11
Şekil 1.3 : MTHFR Enzimi ve Fonksiyonu	13
Şekil 4.1 : PCR Döngüsü Basamakları.....	24
Şekil 4.2 : C677T ve A1298C Analizinde PCR ile Çoğaltılan Bölge ve Polimorfik Bazlar	25
Şekil 4.3 : Agaroz Jel Elektroforezi Bileşenleri	26
Şekil 4.4 : HH İçin Yapılan Fragment Analizi	29
Şekil 5.1 : İzole Edilen DNA Örneklerinin %1'lik Agaroz Jelde Görüntülenmesi	32
Şekil 5.2 : PCR ile Çoğaltılmış CAG Tekrar Bölgesinin %2'lik Agaroz Jelde Görüntülenmesi	33
Şekil 5.3 : C677T PCR Ürünlerinin %2'lik Agaroz Jelde Görüntülenmesi	34
Şekil 5.4 : <i>Hinf</i> I Kesimi Ürünlerinin %2'lik Agaroz Jelde Görüntülenmesi	34
Şekil 5.5 : Homozigot C677T Polimorfizmi (TT).....	35
Şekil 5.6 : Heterozigot C677T Polimorfizmi (CT).....	35
Şekil 5.7 : C677T Polimorfizmi Hasta ve Kontrol Grubu Genotip Frekansları (%).	36
Şekil 5.8 : A1298C PCR Ürünlerinin %2'lik Agaroz Jelde Görüntülenmesi	36
Şekil 5.9 : <i>Mbo</i> II Kesimi Ürünlerinin %3'lük Agaroz Jelde Görüntülenmesi	37
Şekil 5.10 : Homozigot A1298C Polimorfizmi (AA)	37
Şekil 5.11 : Heterozigot A1298C Polimorfizmi (AC).....	37
Şekil 5.12 : Homozigot A1298C Polimorfizmi (CC).....	38
Şekil 5.13 : A1298C Polimorfizmi Hasta ve Kontrol Grubu Genotip Frekansları (%).....	38
Şekil 5.14 : Huntington Hastalarında CAG Tekrar Sayısı ve Hastalık Başlangıç Yaşı İlişkisi.	40
Şekil 5.15 : Hasta Grubunda Başlangıç Yaşı ve Görülme Sıklığı	40
Şekil 5.16 : C677T Genotip – Başlangıç Yaş Ortalaması Grafiği.....	46
Şekil 5.17 : C677T Genotipleri ve İlişkili Başlangıç Yaşları	47
Şekil 5.18 : A1298C Genotip – Başlangıç Yaş Ortalaması Grafiği	48
Şekil 5.19 : A1298C Genotipleri ve İlişkili Başlangıç Yaşları.....	49

TABLO LİSTESİ

Sayfa No.

Tablo 3.1 : MTHFR Geni Polimorfizmlerinin PCR İşlemi İçin Kullanılan Primerler	19
Tablo 4.1. : C677T Polimorfizminde Beklenen PCR ve Restriksiyon Ürün Uzunlukları	30
Tablo 4.2 : A1298C Polimorfizminde Beklenen PCR ve Restriksiyon Ürün Uzunlukları.....	31
Tablo 5.1 : C677T Polimorfizmi Hasta ve Kontrol Grubu Genotip Frekansları	35
Tablo 5.2 : A1298C Polimorfizmi Hasta ve Kontrol Grubu Genotip Frekansları.....	38
Tablo 5.3 : CAG Tekrar Sayılarına Göre Hastalık Başlangıç Yaş Aralığı	39
Tablo 5.4 : C677T Allel Frekansları	41
Tablo 5.5. : A1298C Allel Frekansları	41
Tablo 5.6 : Hardy-Weinberg Uygunluk Testi.....	42
Tablo 5.7 : C677T - Grup Çapraz Tablosu.....	42
Tablo 5.8 : C A1298C - Grup Çapraz Tablosu.....	43
Tablo 5.9: Asosiyasyon Testi	44
Tablo 5.10: Regresyon Modelleri.....	45
Tablo 5.11: Polimorfizmlerin Çoklu Regresyon Analizleri	45
Tablo 5.12: CAG Tekrar Grupları ile Yapılan Çoklu Regresyon Analizi Sonuçları.....	46
Tablo 5.13: C677T Genotipleri ve İlişkili Başlangıç Yaşı İstatistikleri	47
Tablo 5.14 : A1298C Genotipleri ve İlişkili Başlangıç Yaşı İstatistikleri.....	48
Tablo 6.1. : Genotip ve Alel frekanslarının Karşılaştırılması.....	52
Tablo 6.2. : MTHFR Geninde İncelenen SNP'ler ve Özellikleri	52

KISALTMALAR LİSTESİ

A	: Adenin
bç	: Baz çifti
BDNF	: Brain Derived Neurotrophic Factor
C	: Sitozin
CAG	: Sitozin-Adenin-Guanin
CBP	: CREB- bağlanma proteini
CBS	: Sistasyonin Beta-Sintaz
CRE	: cAMP-yanıtlayıcı element
CREB	: CRE-bağlı protein
dNTP	: Deoksiribonükleotid
DRPLA	: DentatoRubroPallidoluysian Atrofi
EDTA	: Etilen diamintetraasetik asit
GABA	: Gama aminobütirik asit
GRIK2	: Glutamate Receptor İonotropic Kainate 2-GluR6
HD	: Huntington's Disease
HH	: Huntington Hastalığı
Hsp	: Isı Şok Proteini
htt	: Huntingtin
HW	: Hardy-Weinberg
IT-15	: Important Transcript 15
kDa	: Kilo Dalton
NII	: Nöronal İntranükleer İnküzyonlar
NMDA	: N-Metil-D-Aspartat
NRSE	: Nöron-Restriktif Susturucu Elementler
PCR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
Q	: Glutamin
RFLP	: Restriksiyon Fragman Uzunluk Polimorfizmi
RGDE	: Hızlı Genomik DNA İzolasyonu
SBMA	: Spino Bulbar Muskuler Artrofi
SCA	: Spino Serebellar Ataksi
SP1	: Spesifite Proteini 1
T	: Timin
TBP	: TATA bağlanma proteini
TOR	: Rapamisin Hedefi
U	: Ünite
UCHL	: Ubiquitin C-terminal Hidrolaz -L1
UPS	: Übikütin-Proteozom Sistemi
µl	: mikrolitre

GENEL BİLGİLER

Adı Soyadı : Zeynep CEYLAN
Anabilim Dalı : Moleküler Biyoloji ve Genetik
Programı : Moleküler Biyoloji ve Genetik
Tez Danışmanı : Yrd. Doç. Dr. Nagehan ERSOY TUNALI
Tez Türü ve Tarihi : Yüksek Lisans – Haziran 2010

HUNTINGTON HASTALIĞI'NDA MODİFİYE EDİCİ GENLERİN ARAŞTIRILMASI

ÖZET

Huntington Hastalığı (HH) otozomal dominant olarak kalıtılan, kendisini motor, psikiyatrik ve kognitif disfonksiyon ile gösteren, progresif nörodejeneratif bir hastalıktır. Huntington Hastalığı'nın karakteristik semptomları, hastalığın süreci boyunca kronik ve progresif olan istem dışı koreiform hareketler, kognitif bozukluk, duygudurum bozuklukları ve davranışsal değişikliklerdir. Başlangıçtan ölüme kadar sağkalım ortalaması 17-20 senedir.

Huntington Hastalığı'nın başlangıç yaşı, IT-15 genindeki CAG tekrarlarının anormal uzaması ile ilişkilidir; ancak, CAG tekrarlarının uzunluğu başlangıç yaşındaki varyasyonun %40-70'ini açıklayabilir. Çeşitli çalışmalar, diğer genetik faktörlerin de HH başlangıç yaşı varyasyonunda yer alabileceğini göstermiştir.

Yakın zamanda, metiltetrahidrofolat redüktaz (MTHFR) genindeki tek nükleotid polimorfizmi ile HH başlangıç yaşı arasında bir ilişki olduğu bildirilmiştir.

Bu tez çalışmasında MTHFR genindeki C677T ve A1298C polimorfizmlerinin Türk Huntington Hastalarında hastalık başlangıç yaşını modifiye edici rolleri incelenmiştir.

IT-15 genindeki uzamış CAG tekrarlarının başlangıç yaşını belirlemedeki katkısı %40.8 olarak ($R^2 = 0,408$ $p < 0,0001$) bulunmuştur. MTHFR polimorfizmlerinin başlangıç yaşı ile korelasyonu gösterilememiştir ($p > 0,05$).

Daha önce sunulan kanıtların aksine, MTHFR genindeki A1298C polimorfizmlerinin Türk Huntington hastalarında başlangıç yaşını etkilediği görülmemektedir.

Gelecekte bu çalışma hasta popülasyonu büyüklüğü artırılarak ve hastaların folat seviyeleri dikkate alınarak genişletilebilir.

Anahtar Kelimeler : Huntington Hatalığı, Trinükleotid Tekrarı, Modifiye Edici Genetik Faktör, MTHFR, Polimorfizm.

GENERAL KNOWLEDGE

Name and Surname : Zeynep CEYLAN
Field : Molecular Biology and Genetics
Program : Molecular Biology and Genetics
Supervisor : Assist. Prof. Dr. Nagehan ERSOY TUNALI
Degree Awarded and Date : Master – June 2010

ABSTRACT

INVESTIGATION OF MODIFIER GENES IN HUNTINGTON'S DISEASE

Huntington's Disease (HD) is an autosomal dominantly transmitted, progressive neuro-degenerative disease which presents itself with motor, psychiatric and cognitive dysfunction. The characteristic symptoms of HD are involuntary choreiform movements, cognitive impairment, mood disorders, and behavioral changes which are chronic and progressive over the course of the illness. Survival from onset to death averages 17–20 years.

Age at onset of HD is correlated with the size of the abnormal CAG repeat expansion in the HD gene; however, the length of CAG repeats can explain about 40-70% of the variation in age at onset. Several studies have indicated that other genetic factors also contribute to the variability in HD age at onset.

Recently, an association has been reported between a single nucleotide polymorphism (A1298C) in the methyltetrahydrofolate reductase (MTHFR) gene and AO of HD.

In this thesis, the modifier effects of C677T and A1298C polymorphisms of the MTHFR gene on age of onset of Turkish HD patients have been investigated.

The contribution of expanded CAG repeats in the IT-15 gene in identifying age of onset was determined to be 40.8% ($R^2 = 0,408$ $p < 0,0001$). None of the MTHFR polymorphisms were shown to be correlated to the age of onset ($p > 0,05$). Contrary to the previously described evidence, A1298C polymorphism in the MTHFR gene does not appear to modulate AO of Turkish HD patients.

In the future, this study can be expanded by increasing the patient population size and also by taking the folate levels of the patients into account.

Key Words: Huntington's Disease, Trinucleotide Repeat, Genetic Modifiers, MTHFR, Polymorphism

1. GİRİŞ

Huntington Hastalığı (HH) otozomal dominant geçiş gösteren, seçici nöron ölümleriyle bağlantılı olarak merkezi sinir sistemini etkileyen, koreiform hareketlere demans ve psikiyatrik belirtilerin de eşlik ettiği ilerleyici ve ölümcül bir hastalıktır (Bates ve diğ., 2002). Hastalığın belirgin özellikleri çeşitli doktorlar tarafından 19.yy'da belirtilmiştir, fakat ilk kez 1872 yılında Dr. George Huntington'ın güçlü tanımı hastalığın Huntington Hastalığı olarak adlandırılmasına yol açmıştır (White ve diğ.,1992). Hastalığa sebep olan genin keşfedilişi araştırmaları tetiklemiş, çalışmalar hastalığın moleküler mekanizmasına odaklanmıştır.

Huntington Hastalığı'nın Batı Avrupa'da görülme sıklığı 3-7/100.000 iken dünya genelinde görülme sıklığı 5-10/100.000'dir (Bradley ve diğ., 2004; Benell ve diğ., 2004; Landles ve diğ., 2004). 1983 yılında HH ile ilişkili gen (IT-15) 4. kromozomun kısa koluna lokalize edilmiştir (Gusella ve diğ., 1983). Hastalığa sebep olan mutasyon ise IT-15 genindeki artmış sayıda CAG (glutamin) trinükleotid tekrarları olarak belirlenmiştir (Huntington's Disease Collaborative Research Group, 1993). Huntington Hastalığı geç başlangıçlı bir hastalıktır ve belirtileri genellikle 30 – 50 yaşları arasında başlar, fakat çocukluktan 70 yaşa kadar olan yaş aralığında görülebilir (Haigh ve diğ., 2004). Yaşam süresi, hastalığın ortaya çıkışından itibaren ortalama 15 – 20 yıldır (Bates ve diğ., 2002).

Huntington Hastalığı'nın kesin patofizyolojik mekanizmaları çok az anlaşılmış olmakla birlikte, transgenik hayvan modellerinde yapılan araştırmalar nedensel faktörler ve potansiyel tedavilere ışık tutmaktadır.

1.1.Klinik Özellikler

Huntington Hastalığı ilk kez 1872 yılında Dr. George Huntington tarafından dominant geçişli, geç başlangıçlı, ilerleyici ve ölümcül bir hastalık olarak tanımlandı. Tanımlandığı ilk yıllarda "Huntington Koresi" olarak adlandırılan HH, otozomal

dominant geçiş gösteren ve santral sinir sistemini etkileyen kronik bir nörodejeneratif hastalıktır (Bates ve diğ., 2002).

Motor bozukluklar içinde en çok ne çıkan özellik hastalığa adını veren kore'dir.

Motor zellikler; istem dışı hareketler ve koordinasyon kaybı sebebi ile yürüme bozukluğu, aniden sıçrama, spastik, kontrolsüz, ani hareketlerdir. Muayenelerde tüm vücutta dans edermiŐ gibi görünen kore dikkati çeker. Stabil duruŐta bulgular hafifken hasta yürütüldüğü zaman ortaya çıkan kore, tanıyı kolaylaŐtırır. Hastalar normal yürüyemezler. Dans eder gibi ataksik yürüme, sallanma ve kolları gerektiği gibi sallayamama Şeklinde bulgular görülür. İlerleyen zamanlarda tendon reflekslerde artış gözlenir (Berrios ve diğ., 2001). Gençlerde (20 yaş öncesi) ve bazı yetiŐkinlerde kore belirtileri olmaksızın rijidite görülebilir. Bu tip bireylere yanlıŐlıkla Parkinson hastalığı, katatoni veya Őizofren teşhisi konulabilir. YavaŐlamıŐ düzensiz göz hareketleri genellikle bu hastalarda belirgindir (The Huntington's Disease Collaborative Research Group, 1993).

Psikiyatrik belirtiler de kiŐinin davranıŐlarındaki deęiŐim, kiŐilik değişimi, depresyon, sinirlilik hali, karamsarlık ve anti-sosyal davranıŐlar ile kendini gösterir. Depresyon tipiktir ve intihar, genel populusyona oranla % 5-10 daha fazla tahmin edilir. Manik ve psikotik semptomlar geliŐebilir (Craufurd ve diğ., 2002).

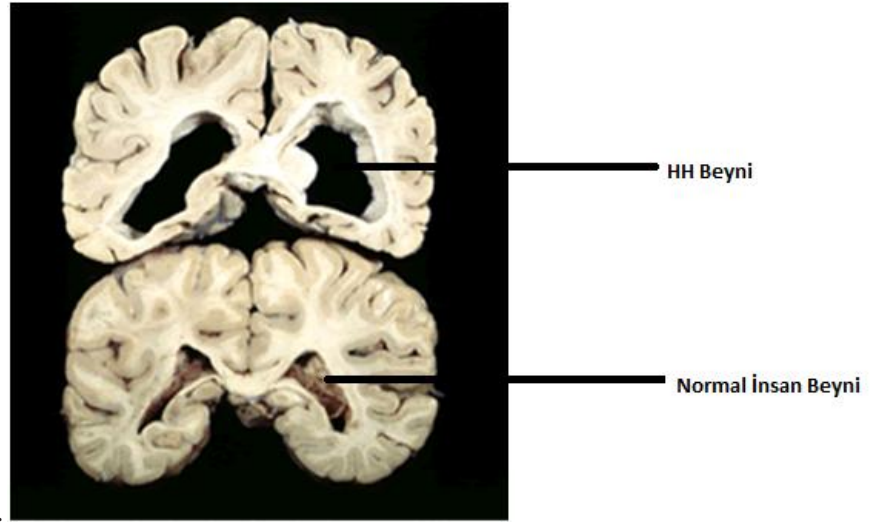
Huntington Hastalığı'nda kognitif disfonksiyon sıklıkla uzun süreli hafızaya etki eder ancak organizasyon, planlama, kontrol veya alternatifleri adapte etme gibi fonksiyonları bozar ve yeni motor yeteneklerinin edinilmesini geciktirir. Bu zellikler zamanla daha da kötüleŐir ve demans halini alır (Taylor., 1997).

Huntington Hastalığı'nın teşhisi, tipik semptomlu ve ailede geçmişi olan bireylerde kolaydır. Ancak, DentatoRubroPallidolusian Atrofi, Huntington Hastalığı benzeri-2 (siyah Amerikalı ve Güney Afrikalılarda sık) ve bira diğer ailesel hastalıkların fenotipik olarak bu hastalıktan ayırt edilmesi zordur. Buna ilaveten, hastaların %8'inde ailede bu hastalığa sahip bilinen bir birey yoktur. Nöroakantositoz da HH'nı taklit edebilir, ancak arefleksi, artmış kreatin kinaz ve akantosit¹ varlığı belirgindir. HH ile karşılaştırıldığında bu hastalıklar farklı zamanlama, ailesel olmama, motor bozukluğu olmaması ve kognitif azalma gibi özelliklere sahiptir (Kambouris ve diğ., 2000).

¹ **Akantosit:** insanda vldl (very low density lipoprotein) ve özellikle apolipoprotein b yetmezliği sonucu geliŐen membran defektine bağlı diken Şeklinde uzantılar gösteren alyuvarlara verilen isim

1.2.Nöropatolojik Özellikler

Huntington Hastalığı'ndan ölen hastaların beyinlerinde yapılan incelemeler sonucunda bazal gangliyada yoğun nöron kaybı gözlenmiştir (Şekil 1.1.). Özellikle de striyatım bölgesinin etkilendiği görülür (Vonsattel ve DiFiglia., 1998). Striyatumdaki nöronların %90 - 95'i GABA-erjik (gama aminobütirik asit) ortaboy dikensi projeksiyon nöronlarıdır (Wichman ve DeLong, 2006). İlerlemiş vakaların GABA-erjik orta boy dikensi projeksiyon nöronlarında %80 oranında, diğer nöronlarla birlikte ise toplam olarak nöronların %90 oranında kayıp saptanmıştır. Dolayısıyla GABA-erjik nöronlar, HH'dan spesifik olarak etkilenen nöron grubudur. İleri dönemlerde hasta, beyin hacminin yaklaşık %25'ini kaybeder (Macdonald ve Halliday, 2002). Hastalarda büyük oranda etkilenen diğer beyin bölgeleri arasında siyah cisim, 3., 5. ve 6. kortikal tabakalar, hipokampusun CA1 bölgesi sayılabilir (Jeste ve diğ., 1984).



Şekil 1.1. Normal ve HH beyinlerinde bazal gangliya bölgeleri

(www.stanford.edu/group/pandegroup/folding/pics/HD_effected.gif).

Hatalığın patolojik karakteristiklerinden biri de mutant huntingtin (htt) ve poliglutamin (poliQ) taşıyan nükleer ve sitoplazmik inklüzyonların görülmesidir. Her ne kadar patolojik poliQ işlenmesinin belirteci ve etkilenen bireylerde semptomların başlangıcından çok daha uzun zaman önce belirgin olsa da, giderek artan kanıtlar bu inklüzyonların hücresel disfonksiyon veya hastalık aktivitesinin belirteçleri

olmadıklarını göstermektedir (Davies ve diğ., 1997). Çeşitli hücre ve hayvan modelleri ile insan histopatolojik örneklerinde inklüzyonların görülmesi ile disfonksiyon veya nörolojik semptomların başlangıçları bakımından çok az korelasyon görülmüştür (Menalled ve diğ., 2003).

1.3.Genetik Özellikler

Huntington Hastalığı geni 4. kromozomun kısa kolunda 4p 16.3 bölgesinde lokalizedir. 67 ekson ve 180 kb'dan oluşan büyük bir gendir. Hastalığa sebep olan mutasyon, genin 1. eksonunda tekrar eden CAG trinükleotidlerinin sayısındaki artıştır. Normal bireylerde bu bölgedeki tekrar sayıları polimorfiktir. Ancak bu tekrar sayısı eşik değeri aştığında hastalığa sebep olur. CAG trinükleotidleri glutamin (Q, Gln) amino asitini kodladığından dolayı HH aynı tip mutasyonla seyreden "Poliglutamin Hastalıkları" ailesine mensuptur (Huntington's Disease Collaborative Research Group, 1993).

CAG trinükleotidlerinin sayısı hastalık için belirleyici olmaktadır. 26 ve daha az CAG tekrarı taşıyan bireyler normal fenotip gösterirken, 27-35 tekrar taşıyan bireyler genellikle HH fenotipi göstermezler, fakat mayotik instabilite nedeniyle bir sonraki nesilde bu hastalığın görülmesi olasıdır. Mayotik instabilite tekrar artışına (%73) ya da azalmasına (%23) sebep olabilir (Kremer ve diğ., 1995). İnstabilite ve tekrar artışı olasılığı oogeneze göre spermatogenezde daha fazladır. Juvenil olgularda paternal kalıtım ve birbirini izleyen jenerasyonlarda rastlanan erken başlangıç yaşı bu durumu açıklamaktadır (Trottier ve diğ., 1994). Negatif aile geçmişinin olduğu yeni başlangıçlı HH tipik olarak, sınırda veya normal aralıkta (28-35 CAG tekrarı) bir alelin CAG tekrar sayısının özellikle paternal tarafta artması nedeniyle meydana geldiği tespit edilmiştir. 35 veya daha az CAG tekrarı hastalık ile ilişkilendirilmese de Groen ve arkadaşlarının 2009 yılında yaptıkları bir çalışmada 27 – 35 arasında tekrara sahip ve HH fenotipi gösteren iki hasta bildirmişlerdir (Groen ve diğ., 2009). 36-39 tekrar taşıyan bireylerin sadece bir kısmı HH fenotipi gösterirken, 40 ve üzeri CAG tekrarı taşıyan bireylerin tamamı hastalıktan etkilenmişlerdir.

Huntington Hastalığı genindeki CAG tekrar sayısı ile hastalığın başlama yaşı ters ilişkilidir; CAG tekrar sayısı arttıkça hastalığın belirtilerinin ortaya çıktığı yaş küçülür. Hastalığın homozigot vakaları başlangıç yaşında önemli bir farklılık göstermez ancak progresyon hızında artış görülebilir (Gusella, 1995).

1.3.1. Huntington Hastalığı'nın Moleküler Patolojisi

1.3.1.1. Htt Proteini ve İşlevi

Huntingtin proteini, 348 kDa'luk bir proteindir ve amino (N) ucunda CAG trinükleotidlerinin kodladığı poliQ bölgesi bulunur. Mutant htt'deki uzun poliQ domaini, proteinde konformasyonel değişiklikleri indükleyerek intraselüler agregat oluşumuna sebep olur. Htt'nin hücredeki normal işlevlerini açığa çıkarmak zordur, çünkü bilinen diğer proteinlere homoloji göstermez. Bunun yanı sıra tüm dokularda ifade edilir ve birçok hücre altı kompartmanlarda lokalizedir (Harjes ve Wanker, 2003; Li ve Li, 2004). Htt nukleus, hücre gövdesi, dendrit ve nöronların sinir uçlarında mevcuttur ve Golgi cisimciği, endoplazmik retikulum ve mitokondriyi de içeren birçok organelle de ilişkilidir. Htt'nin fonksiyonunu ve patolojik etkilerini belirlemek için çeşitli yaklaşımlar kullanılmıştır (Harjes ve Wanker, 2003; Li ve Li, 2004). Htt, mikrotübüllerle birlikte lokalize olarak ve β -tübülin ile direkt olarak etkileşerek dinaktin kompleksinin bir kısmını oluşturur. Bu oluşum, vesikül taşınması ve/veya sitoskeletal bağlanmada bir role sahiptir. Htt'nin, aynı zamanda, klatrin aracılı endositoz, nöronal transport ve post-sinaptik sinyalleşmede de görev aldığı gösterilmiştir. Bunlara ilave olarak nöronal hücreleri apoptotik stresten koruyabilir ve dolayısıyla ön sağkalım rolünün de olabileceği düşünülmektedir (Rigamonti ve diğ., 2000). Görevi tam olarak bilinmese de sebep olduğu nörodejenerasyonla ilgili yapılan çalışmalar ışığında bazı olası mekanizmalar geliştirilmiştir.

1.3.2 Toksik İşlev Kazanımı ve Kaybı

Birçok çalışma, mutant htt proteininin toksik fonksiyon kazancına sebep olduğunu göstermektedir. Bu konu ile ilgili ikna edici kanıtlar, uzamış ve ifade edilen tekrarların sebep olduğu diğer sekiz nörodejeneratif hastalık SpinoSerebellar Ataksi tipleri (SCA) 1, 2, 3, 6, 7 ve 17; Dentato Rubro Pallidoluysian Atrofi (DRPLA) ve Spino Bulbar Musküler Atrofi (SBMA) için de geçerlidir (Piccioni ve diğ.,2001). Bu hastalıkların hiçbirinde haplo yetersizlik yönünde bir kanıt yoktur. Bu hastalıkların en belirgin özelliklerinden biri başlangıç yaşı ile poliQ tekrarları arasındaki ters

korelasyondur. Sonuçlar, poliQ tekrarlarının uzunluklarının, etkilenen genden bağımsız olarak hastalığın şiddetini belirlediğini göstermektedir (Margolis ve diğ., 2001).

Huntington Hastalığı'nda fonksiyon kazanımı için en ikna edici kanıt, poliQ zincirlerinin yapısal biyolojisidir. *In vitro* kanıtlar poliglutaminin başlangıçta dimer, trimer ve oligomerler oluşturarak agregre olmaya başlayacağını öngörmektedir (Chen ve diğ., 2001). Bu süreç, özgün konsantrasyonda protein ve minimum 37 ardışık glutamin gerektirir. Bu süreç, yüksek sayıda poliQ tekrarıyla daha hızlı işler. Bu bulgular hem hastalığın geç başlangıcını hem de poliQ uzunluğu ile yakın korelasyonu açıklayabilir. Agregasyon oranı, glutamin tekrar sayısı ile artar ve bu, tekrar uzunluğunun erken başlangıç yaşı ile ilişkili olduğu bilgisi ile uyumludur (Foroud, 1999).

Yüksek oranda mutant htt ifadesi sonucunda hücrenin başa çıkamayacağı miktarda agregatlar oluşur. Bu agregatların yapısına yabancı tip htt'nin de katıldığı belirlenmiştir. Hücrelerin, mutant htt üretimi ve agregat oluşumunun üstesinden proteozom veya otofajik vakuolizasyon ile gelebilecekleri öne sürülmektedir. Bu ve muhtemel diğer mekanizmalar yoluyla, mutant htt transkripsiyon, apoptoz, mitokondrial fonksiyon, tümör baskılanması, vesiküler ve nörotransmitter salgılanması ve aksonal taşınmayı düzenleyen çeşitli nükleer ve sitoplazmik proteinleri de etkiler. Bu şekilde mutant htt toksik işlev kazanımı ile beraber normal proteinlerin işlev kaybına da yol açabilir (Jones, 2002).

1.3.3. *In vivo* Huntingtin Protein Agregasyonu

Fibriler morfolojili htt protein agregatları ilk kez, patolojik aralıkta (115-156 Q) glutamin tekrarlı, htt ekzon 1 fragmanı eksprese eden bir transgenik HH fare modelinde keşfedilmiştir (Davies ve diğ., 1997). Bu farelerde çözünemeyen nöronal intranükleer inklüzyon (NII) oluşumu, HH'ye benzer semptomlar gösteren progresif bir nörolojik fenotip gelişimi öncesinde gözlenmiştir (Davies ve diğ., 1997). Bu sonuçlar, *in vivo* agregat oluşum sürecinin, HH'de nöronal disfonksiyon ve nörodejenerasyon gelişimi için gerekli olduğunu öne sürmüştür. Ultrayapısal ve immunositokimyasal çalışmalar, NII'ların anti-übikülin antikorları ile boyanabileceğini ve inklüzyon cisimciklerindeki htt proteininin übikülinlendiğini ve

übikütün-proteozom sistemi tarafından degrade edildiğini göstermiştir. Huntingtin protein fragmanları aynı zamanda transgenik farelerin akson ve akson terminallerinde bulunmuştur (Li ve diğ., 2000; Li ve diğ., 1999). Bu yapılar nöropil agregatları olarak adlandırılmışlardır ve aksonal taşınma ve nörotransmitter salınımı gibi özgün nöronal fonksiyonları etkiledikleri düşünülmektedir. Farklı transgenik fare modelleri ile de bu bulgular doğrulanmıştır (Hodgson ve diğ., 1999; Reddy ve diğ., 1998; Schilling ve diğ., 1999; Wheeler ve diğ., 2000).

Çözünemeyen htt protein agregatlarının transgenik hayvanlarda karakterize edilmesini takiben, hasta beyinlerinde agregatlar bulunmuştur (DiFiglia ve diğ., 1997). Transgenik farelerde olduğu gibi, übikütilenen amorf veya fibriler morfolojiye sahip nükleer ve sitoplazmik huntingtin agregatları gözlenmiştir. Buna ek olarak, agregat olmuş htt proteini içeren distrofik nöritler de saptanmıştır (DiFiglia ve diğ., 1997). Distrofik nöritlerin nöronal retrograd taşınmadaki bozukluktan kaynaklandıkları bilinmektedir. Hasta beyinlerinde NII'lar htt'inin N-ucuna yönlendirilen antikolarla saptanabilmektedir. Bunların, proteinin C-ucu için olan antikolar tarafından tanınmaması, tam uzunluktaki proteinden çok, N-uçlu htt fragmanlarının nöronal hücrelerde toplandıklarını göstermektedir (DiFiglia ve diğ., 1997).

Yakın zamanda yapılan çalışmalar, HH'da nöronal dejenerasyonun, yabanıl tip htt'de fonksiyon kaybı ile mutasyona uğramış htt'de fonksiyon kazanımının kombine etkilerinden meydana geldiğini önermiştir. HH allelinde delesyonu olan kişilerden elde edilen bilgiler, yabanıl tip htt'deki eksikliklerin nörodejenerasyonu tetiklediği fikrine karşı çıkmaktadır, çünkü bu hastalarda HH gelişmemiştir. Bununla birlikte, htt'nin farelerdeki ablasyonu, anormal beyin gelişimi ile 7.5. embriyonik günde ölüm ile sonuçlanmıştır ve htt'nin delesyonu nörodejenerasyona yol açmaktadır. Bu, htt'nin hücre sağkalımı için gerekli olduğunu ve fonksiyon kaybının da nörodejenerasyona yol açtığını kanıtlamaktadır (Bates ve Murphy, 2002). Mutant htt ve diğer poliQ hastalık proteinleri, her ne kadar agregasyonun poliQ hastalıkları patogenezindeki rolü tartışmalı olsa da, nöronlarda çözünemeyen agregatlar oluştururlar (Bates, 2003). Bazı araştırmacılar poliQ agregatlarının toksik olduğunu düşünürken, diğerleri patojenik sürecin doğal bir yan ürünü olduğunu düşünmektedirler. Bir başka grup ise agregatların nöroprotektif olduğunu savunmaktadır.

Bazı araştırmacılar, çok uzun poliQ'ların hastalığı indüklediği, hücrenel

proteinlerin normal fonksiyonlarını engellediği görüşünü savunmaktadırlar. Bu teoriyi destekleyen çalışmalar, mutant htt'nin, intranükleer agregat formasyonu veya önemli transkripsiyon faktörlerinin ayrılması şeklinde gen transkripsiyonunu bozduğunu belirtmişlerdir (Cha, 2000; Sugars ve Rubinsztein, 2003). Çeşitli çalışmalarda, p53, CREB-bağlanma proteini (CBP), spesifikite proteini 1 (SP1) ve TATA-bağlanma proteini (TBP) gibi transkripsiyon faktörlerinin intranükleer agregatlara toplanabildiği gösterilmiştir, dolayısıyla da HH'de transkripsiyonal disregülasyon hipotezi güçlenmektedir. Ayrıca, agregatlarda şaperonlar, proteozomlar ve übikütinin toplanması, yetersiz protein katlanması ve degradasyonun poliQ hastalık patogenezinde yer aldığını gösterir (Ciechanover ve Brundin, 2003; Sakahira ve diğ., 2002). İlginç olarak, übikütin ile işaretlenmiş proteinlerin merkezi sinir sisteminde anormal toplanması Parkinson ve Alzheimer gibi diğer nörodejeneratif hastalıklarda da vardır (Taylor ve diğ., 2002). Bu nedenle, poliQ hastalıklarının yanlış katlanma veya proteolizden, proteinlerin katlanma veya degrade olmak için zor hale gelmeleri veya übikütin-proteozom sisteminin (UPS) bozulması şeklinde meydana geliyor olmaları düşünülmüştür.

1.3.4. Şaperonlar ve Proteozom

1.3.4.1. Agregasyonda Şaperonların ve Proteozomların Rolü

Hücrelerin içerisinde yeni sentezlenen proteinlerin doğru konformasyonda katlanmaları, çeşitli moleküler şaperonların sıralı hareketlerini gerektirir, ancak bazen bu süreç başarılı olamayabilir (Fink, 1999). Doğru konformasyonda katlanmayan proteinlerin UPS tarafından degrade edilmeleri gereklidir (Voges ve diğ., 1999). Isı şok protein (Hsp) 70 ve Hsp40, katlanma sürecini kolaylaştıran ve polipeptidlerin çözülebilir konformasyonunu sağlayan iki ana sınıf moleküler şaperonlardır (Hartl ve Hayer-Hartl, 2002). Ancak agregasyon, anormal şekilde katlanan proteinlerin bir karakteristiğidir; bu nedenle eğer yanlış katlanan proteinlerin üretimi hücrenin yıkım kapasitesini aşarsa, bu polipeptidler çözülemeyen intraselüler agregatlar oluşturabilirler.

Diğer poliQ proteinleri gibi htt'nin de Hsp70 ve Hsp40 şaperon ailesi ile etkileştiği ve hem hücresel hem de hayvan poliQ hastalık modellerinde ve hasta doku örneklerinde agregatlarla birlikte lokalize olduğu gösterilmiştir. Bu, protein katlanma

bozukluğunun HH patolojisini tetiklediği düşüncesini ortaya atar (Sakahira ve diğ., 2000). Şaperonların agregatlara dağılması, hücrede var olan çözünebilir şaperon miktarını düşürür ve bu da anormal protein katlanmasını artırır (Hay ve diğ., 2004).

Şaperonlar anormal proteinleri doğru şekilde katlayamazlarsa, onları degradasyon için proteozoma yönlendiren übikütinasyon başlatılır. HH'nin diğer nörodejeneratif hastalıklarla bir diğer ortak özelliği, inklüzyonların übikütinlenmiş olması ve çeşitli proteozom alt ünitelerine de rastlanmış olmasıdır. Buna göre, hücrenin yıkım makinesindeki bir başarısızlıktan söz edilebilir (Ciechanover ve Brundin, 2003). Çeşitli kanıtlar, UPS'nin bozulmasının poliQ hastalığının patogenezinin merkezi olduğunu göstermiştir (Bence ve diğ., 2001).

1.3.5. Transkripsiyonal Regülasyon

Hem yabanıl tip hem de mutant htt çeşitli transkripsiyon faktörleriyle etkileşmektedir ve HH'da bazı transkripsiyonel yolların etkilendiği gösterilmiştir. HH'da etkilenen transkripsiyon yollarından cAMP-yanıtlayıcı element (CRE) ve SP1 aracılı yollar en çok araştırılan yollardır; çünkü nöronal sağkalımda gerekli olan genlerin ekspresyonunda yer alırlar.

Farelerde CRE-bağlı protein (CREB) ablasyonu, hipokampus ve striyatuma ilerleyici nörodejenerasyonun olduğu HH benzeri fenotip ile sonuçlanmaktadır (Mantamadiotis ve diğ., 2002). Ayrıca, CRE tarafından düzenlenen genlerin down-regülasyonu da HH'da saptanmıştır (Glass ve diğ., 2000). CRE yoluna olan ilgi CREB-bağlı protein (CBP) üzerinde odaklanmıştır. CBP agregatlara lokalize olur ve bu da, CBP'nin CRE-aracılı transkripsiyon için uygunluğunun bozulduğu fikrini destekler (Li ve diğ., 2004). Htt'nin, glutamince zengin ve asetil transferaz domainlerinin CBP ile etkileştiği gösterilmiştir. Bu veriler hastalığın poliQ modellerinde görülen CRE-aracılı transkripsiyon ve asetil transferaz aktiviteleri kaybında düşüşü açıklayabilir. Önemli olarak, asetil transferaz aktivitesindeki bu azalma, histon deasetilaz enzim inhibitörlerinin uygulanmasıyla tersine çevrilmiştir (Rubinsztein ve diğ., 2003).

Dunah ve arkadaşları, asemptomatik Huntington hastalarından elde edilen beyin ekstrelerinde mutant htt'nin SP1 ile artmış ilişkide olduğunu ve SP1'in TFAII 130 ile ilişkisinin HH beyinlerinde sağlıklı beyinlere kıyasla azaldığını göstermişlerdir (Dunah ve diğ., 2002). Buna ilaveten, mutant htt'nin SP1 ile artmış

ilişkisi SP1'in promotor bölgesine bağlanmasını bloke etmiştir. Dolayısıyla HH hastalarında aracı olduğu bilinen genlerin (dopamin-D2-reseptör geni gibi) SP1 aracılı transkripsiyonunu bozmuştur.

CBP ve SP1'e ek olarak, çeşitli diğer önemli transkripsiyon faktörlerinin nükleusta htt ile etkileşime girdiği görülmektedir. Bunlar arasında, Gln-Ala tekrarı transkripsiyonel koaktivatörü CA150'nin hem normal hem de mutant htt ile ilişkili olduğu bulunmuştur (Holbert ve diğ., 2001). HH beyin örneklerinde, hastalık derecesi arttıkça CA150 protein seviyelerinin de artmış olduğu tespit edilmiştir. Bu da CA150'nin htt agregasyonuna yanıt olarak toplandığını ve gen transkripsiyonunu engellediğini düşündürür. Ayrıca TBP, HH patolojisinde yer alabilir çünkü genel transkripsiyon faktörü nükleer inklüzyonlarda lokalizedir. Htt'nin aynı zamanda transkripsiyonel baskılayıcı olarak çalışabilmesi de ilginçtir. Maya iki-hibrid analizinde, htt'nin, poliQ bağımlı bir şekilde nükleer korepresör protein ve Sin3A içeren represör komplekslerle direkt olarak etkileşime girdiği gösterilmiştir (Boutell ve diğ., 1999). Nükleer korepresör protein ve Sin3A diğer transkripsiyonel DNA bağlayıcı proteinlerle bir arada çalışarak tiroid ve retinoik asit reseptörleri gibi nükleer reseptörlerin transkripsiyonal aktivasyonunu baskılar. Bu nedenle, mutant htt sadece nükleer korepresör protein ve Sin3A fonksiyonu ile değil, aynı zamanda nükleer reseptörleri içeren sinyalleşme yollarına da karışır.

Yakın zamanda, yabancı-tip htt'nin ayrıca nöron-restriktif susturucu elementler (NRSEs) içeren genlerin aktivitesini, düzenleyebildiği gösterilmiştir (Zuccato ve diğ., 2003).

1.3.6. Huntington Hastalığı'nda Hücre Ölüm Mekanizmaları

Huntington Hastalığı ve diğer PoliQ Hastalıklarında hücre ölümünün ağırlıklı olarak apoptoz ile gerçekleştiği bilinse de, son yıllarda yapılan araştırmalar otofajik mekanizmaların aktivasyonuna da dikkat çekmiştir.

Apoptotik yollarda görev alan enzimler kaspazlar ve kalpainlerdir. Kalpainler, kalsiyum ile aktive olan sistein proteazlardır ve proenzim heterodimeri olarak bulunurlar. Kalpain aktivasyonu, kalpain inhibitörü olan kalpastatinin kaspazlar tarafından kesilmesi ile meydana gelir. Huntingtin üzerinde kalpain kesim bölgeleri 535-537 ve 468-470 amino asitleri arasındadır. Mutant htt kalpainler tarafından daha kolay kesilir. Yapılan çalışmalarda mutant htt'in kalpainler tarafından kesilmesi

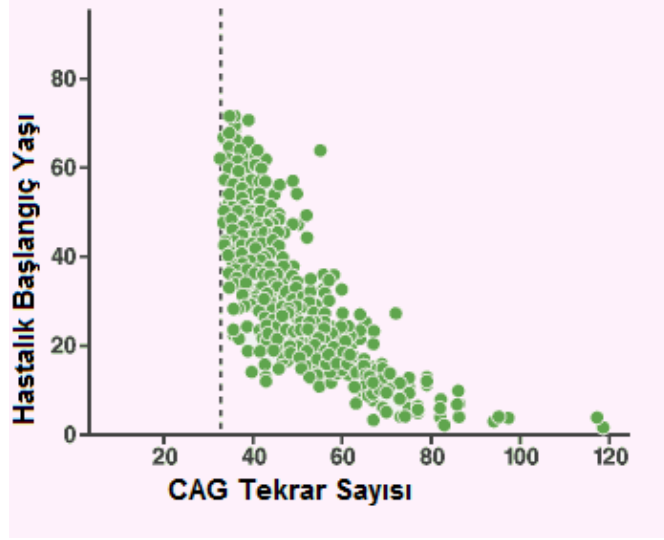
engellendiğinde htt agregatlarında azalma gözlenmiştir (Saudou ve diğ., 1998).

Kaspazlar aspartat-özgü sistein proteazlardır ve hücrelerde inaktif proenzim olarak bulunurlar. Diğer kaspazlar tarafından kesilerek veya otoaktivasyon ile aktive olurlar. Apoptozun farklı aşamalarında farklı kaspazlar aktive olur. Kaspaz 8, 9 ve 10 başlangıç aşamasında görev alır ve kaspaz 3,6,7'yi aktive ederek apoptozun yönlendirilmesini sağlar (Quin ve diğ., 2004). Kaspazların HH patogenezinde önemli rol oynadığı gösterilmiştir. Huntingtin için kaspaz 2, 3, 6 ve 7'nin kesim yaptığı bölgeler belirlenmiştir. Mutant htt'in kaspaz 3 ve 9 aktivasyonunu arttırdığı bilinmektedir. Özellikle poliQ içeren protein fragmanları kaspazları daha çok aktive eder ve hücreler apoptoza girer (Wellington ve diğ., 1998).

Otofajik yol, intraselüler organellerin ve uzun süreli proteinlerin geri dönüşümünden sorumlu önemli bir sitoplazmik süreç olmakla beraber hücre ölümünde de önemli bir role sahiptir. Toksik htt fragmanlarının dolaylı olarak otofajın indüksiyonuna yol açtığı belirlenmiştir. Ravikumar ve arkadaşları, mTOR molekülünün ("Mamalian Target Of Rapamycin") htt fragmanları ile agregat oluşturduklarını ve dolayısıyla, hücredeki kinaz aktivitesini azalttıklarını bildirmişlerdir. PoliQ hastalıklarında agregatların, otofajik yolun negatif düzenleyicisi olan mTOR aktivitesini baskılayarak otofajiyi indüklemeye anahtar role sahip oldukları görülmektedir (Ravikumar ve diğ., 2004).

1.3.7. Hastalık Başlangıç Yaşı ve Etkileyen Faktörler

Tüm poliQ hastalıklarında olduğu gibi HH'da da CAG tekrar sayısı ve hastalık başlangıç yaşı arasında ters orantı vardır (Şekil 1.2.). Ancak, aynı CAG tekrar sayısına sahip bireyler arasında da başlangıç yaşı farklılık gösterebilir. Dolayısıyla, sadece CAG tekrar sayısından yola çıkarak hastalık belirtilerinin ne zaman başlayacağını belirlemek mümkün değildir.



Şekil 1.2. CAG tekrar sayısı ve hastalık başlangıç yaşı ilişkisi
(http://johnhawks.net/graphics/huntington_repeat_onset.png)

Hastalık başlangıç yaşı ile tekrar sayısı arasındaki negatif ilişki, yüksek tekrarlar için daha güçlüdür. Ancak, patolojik aralıkta fakat düşük sayıdaki tekrar sayılarının başlangıç yaşını tahmin edici değeri düşüktür. Bu nedenle çevresel ve diğer genetik faktörlerin başlangıç yaşını ve hastalık sürecini modifiye edici etkisi olabileceği düşünülmüştür. Huntington Hastalığı'nın en yoğun olarak gözlemlendiği Venezuela soyunda yapılan detaylı araştırmalar, hastalık başlangıç yaşının %60 oranında CAG tekrarları haricindeki faktörlerden etkilendiğini ortaya koymuştur (Wexler, 2004). Bunun yanı sıra, transgenik Huntington farelerinin çevresel ortamlarının zenginleştirilmesinin semptom başlangıcını ertelediği gözlemlenmiştir (Hockley ve diğ., 2002). Çevresel zenginleştirmenin bazı özgün genlerin transkripsiyonunu artırdığı ve nörogenezde etkili olduğu düşünülmektedir.

Ebeveyn cinsiyetinin de nesiller arası CAG tekrar artışı ya da azalmasını etkileyerek başlangıç yaşını modifiye edebileceği bilinmektedir. Hastalık alellerinin babadan aktarıldığı durumlarda tekrar sayıları sıklıkla artış göstermekte, bu da sonraki nesilde antisipasyona neden olmaktadır (Ridley ve diğ., 1988). Maternal transmisyonlarda ise tekrar artışına daha az rastlanmaktadır (Kremer ve diğ., 1995).

CAG tekrar sayısı, hastalık başlangıç yaşındaki farklılıkların yaklaşık %30-%70'ini açıklayabilmektedir. Geriye kalan varyansın kuvvetle kalıtsal olduğu ortaya koyulmuştur (Djousse ve diğ., 2003). Dolayısıyla, IT-15 geni ya da diğer genlerdeki polimorfizmlerin HH başlangıç yaşında modifiye edici rolleri olabilir. Bu sebeple özellikle yabancı ve mutant htt'nin ilişkili olduğu proteinleri kodlayan genlerdeki

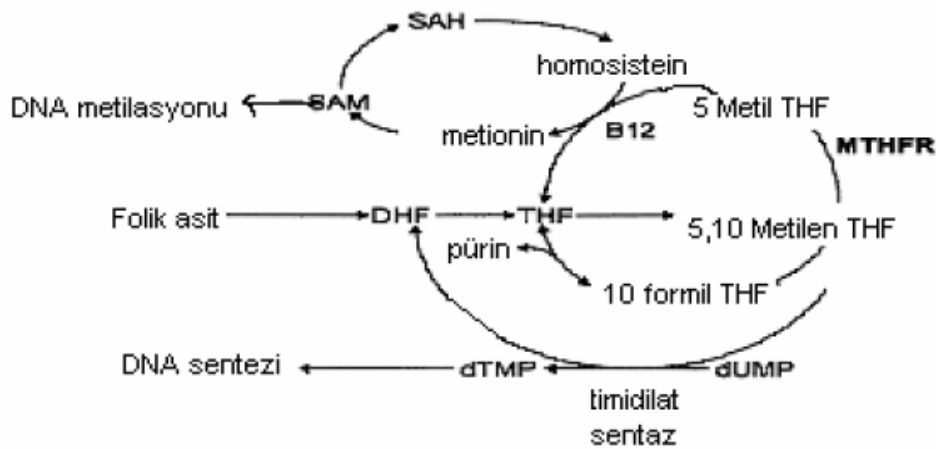
ve/veya hastalığa yol açabilecek moleküler mekanizmaların herhangi bir yolağında rol oynayan genlerdeki polimorfizmlerin hastalık başlangıç yaşını modifiye etmedeki rolleri araştırılmaya başlanmıştır. Üzerinde en çok çalışılan genler BDNF (“Brain Derived Neurotrophic Factor”), GRIK2 (“Glutamate Receptor Ionotropic Kainate 2-GluR6”), TBP (“TATA Binding Protein”), hCAD (“human Caspase-Activated DNase”), UCHL-1 (“Ubiquitin C-terminal Hydrolase-L1”), NMDA (“N-methyl-D-aspartate receptor subunit 2B”)’dir. Bu aday genler üzerinde birçok polimorfizm tanımlanmış, ancak yapılan sınırlı sayıdaki çalışmalar genellikle çelişkili sonuçlar vermiş ve aynı polimorfizmler bazı popülasyonlarda başlangıç yaşı ile ilişkili bulunurken diğerlerinde bulunamamıştır.

BDNF striyatal nöronların sağkalımı için önemli olduğu düşünülen bir proteindir. Yapılan çalışmalarda htt’in BDNF ekspresyonunu ve taşınmasını düzenlemede önemli bir role sahip olduğu tespit edilmiştir. Yabancıl tip htt, BDNF transkripsiyonunu ve BDNF içeren vesiküllerin mikrotübüller ile striyatal hücrelere taşınmasını arttırmaktadır. Mutant htt ise BDNF üretimini ve taşınmasını azaltır (Zucatto ve diğ., 2001; Schaffar ve diğ., 2004). Bununla birlikte son yıllarda örneğin, BDNF genindeki V66M polimorfizmi ile hastalık başlangıç arasında ilişki olduğunu bildiren çalışmalar olduğu kadar (Albrech ve diğ., 2005), ilişkili bulunmayan çalışmalar da bildirilmiştir (Metzger ve diğ., 2006; Kishikawa ve diğ., 2006). Diğer bir aday gen olan GRIK2’de incelenen mutasyon 3’ UTR bölgesinde bulunan TAA tekrar sayılarındaki değişimdir. 16-17 TAA tekrarına sahip bireylerde hastalığın beklenenden 5 yıl önce başladığı belirlenmiştir (MacDonald ve diğ., 1999) Bu mutasyon hastalık başlangıç yaşı için % 13’lük bir etkiye sahiptir. UCHL-1 genindeki S18Y polimorfizmi, 18. kodonda bulunan serin amino asitinin tirozine dönüşümüdür. Naze ve arkadaşlarının 2001 yılında 138 HH ve 136 kontrol ile yaptıkları çalışma sonucunda S18Y mutasyonu Huntington hastalarının %17’sinde tespit edilmiştir (Naze ve diğ., 2001). Diğer bir çalışmada ise Y/Y genotipli bireylerde hastalık belirtilerinin beklenenden 8 yıl önce ortaya çıktığı belirlenmiştir (Metzger ve diğ., 2005). hCAD genindeki R196K polimorfizminin incelendiği bir çalışmada bu polimorfizmin hastalık başlangıç yaşının %6’sını açıklayabildiği tespit edilmiş (Chattopadhyay ve diğ., 2005), ancak diğer bir çalışmada polimorfizmin hastalık başlangıç yaşına etkisi bulunmamıştır (Arning ve diğ., 2005).

1.4. Metilentetrahidrofolat redüktaz Polimorfizmleri

Metilentetrahidrofolat redüktaz (MTHFR) folat metabolizmasında görev almaktadır. Folat molekülünün başlıca fonksiyonu DNA metilasyonu ve DNA sentez reaksiyonlarında metil grubu taşıyıcılığıdır. MTHFR geni 1p36.3 de haritalanmış bir gendir. İnsan MTHFR geninin cDNA'sı 1994'te izole edilmiştir ve cDNA sekansının yaklaşık 22 kb büyüklüğünde olduğu ve 11 ekzon içerdiği saptanmıştır. Bu genin ürünü, katalitik aktivitesi olan, 77 kD ağırlığında 656 aminoasitten oluşan bir proteindir (Goyetteve diğ., 1998).

MTHFR geni, 5,10-metilentetrahidrofolat (5,10-metilen THF) molekülünü geri dönüşümsüz olarak 5-metiltetrahidrofolata (5-metil THF) dönüştüren enzimi kodlar. 5-metil-THF serum folatın primer formudur ve homosistein molekülünün metiyonine dönüştürülmesinde metil grubu vericisi olarak görev yapar. Metiyonin S-adenosilmetiyonine (SAM) dönüştürülür. SAM ise DNA üzerinde sitozin bazlarının metilasyonunda kullanılır (Schwahn ve diğ., 2001). 5-metil THF eksikliği DNA hipometilasyonu ile sonuçlanır. Folat 5,10-metilen THF formunda iken DNA sentezi sırasında urasil bazlarına metil grubu vererek timine dönüşmelerini sağlamaktadır. Ciddi MTHFR eksikliğinde periferal nöropati, gelişme geriliği, hipotoni, tromboz gibi klinik bulgular görülür. MTHFR eksikliğinin hafif olduğu durumlara popülasyon genelinde oldukça sık rastlanmakta olup, özellikle damar hastalıklarının oluşumunda risk faktörü olduğu ileri sürülmektedir (Boushey ve diğ., 1995).



Şekil 1.3. MTHFR enzimi ve fonksiyonu

C677T ve A1298C polimorfizmlerinin preeklempi ve spontan abortus gibi gebelik komplikasyonları için risk oluşturduğu gösterilmiştir. Son zamanlarda yapılan çalışmalar neticesinde yarı damaklılık, Down sendromu ve konjenital kalp defektlerinde (Wenstrom ve diğ., 2001) de bu polimorfizmin rol oynadığı görülmüştür. Ayrıca bu polimorfizmler, kardiyovasküler hastalıkların yanında nöral tüp defektleri içinde bir risk faktörüdür (Botto ve diğ., 2000).

Huntington Hastalığı homosistein metabolizmasında görevli birçok enzim ile ilişkilendirilmiştir. Örneğin sistasyonin Beta-sintaz (CBS) htt'ye spesifik olarak bağlanmaktadır. Homosistinüri CBS eksikliği ile birlikte merkezi sinir sisteminin de içinde bulunduğu bir çok fizyolojik sistemi etkilemektedir (Hansen ve diğ., 2005).

MTHFR genindeki C677T polimorfizmi proteindeki N-ucu katalitik bölgesini etkileyen 4. ekzonda bulunur. Bu polimorfizm MTHFR enzimini kodlayan gende 677. nükleotid olan C (Sitozin)'in T (Timin)'e dönüşmesi sonucu ortaya çıkan bir nokta mutasyonudur. Bu mutasyon, alanin aminoasitinin yerine valin aminoasitinin geçmesine neden olur ve MTHFR enzim aktivitesini azaltır (Goyette ve diğ.,1995). Bu gendeki diğer bir mutasyon da, 1298. nükleotid olan A (Adenin)'nın C (Sitozin)'e değişimi sonucu oluşan nokta mutasyonudur. Bu mutasyon sonucu MTHFR proteinin C-ucu bölgesinde glutamat alanine dönüşmektedir. Bu mutasyonda da diğer mutasyon tipinde olduğu gibi MTHFR aktivitesi azalır. A1298C polimorfizminin plazma homosistein konsantrasyonundaki artışı C677T polimorfizmi kadar etkilemediği ileri sürülür (Frosst ve diğ., 1995) ve bu polimorfizmin önemi henüz tam olarak açıklanamamıştır.

MTHFR C677T polimorfizmi sıklığı ırka ve coğrafi bölgeye göre büyük değişiklik gösterir. T677T oranı Amerika'daki siyah popülasyonda ve Güney Amerika'da %1 iken Avrupa'daki beyaz toplumda, Kuzey Amerika'da ve Avustralya'da %6-20'dir. Avrupa'da görülme sıklığı kuzeyden güneye doğru artmaya meyillidir. Türkiye'de yapılan diğer çalışmalarda homozigot mutasyon oranı %5, heterozigot mutasyon oranı ise %35 olarak bildirilmiştir. MTHFR A1298C polimorfizmi için, çeşitli ülkelerde C1298C genotip sıklığı %1-12 arasında değişir (Roiben ve diğ, 2003). Türkiye'de yapılan bir çalışmada C1298C genotip sıklığı %6 olarak tespit edilmiştir (Sazcı ve diğ., 2003).

2. AMAÇ

IT-15 genindeki CAG tekrar sayısı 40 ve üzerinde olduğunda, birey eğer uzun yaşarsa mutlaka HH belirtilerini gösterecektir. Hastalık başlangıç yaşı genellikle 30-50'li yaşlar olarak bilinmektedir, ancak tekrar sayısının çok arttığı durumlarda bireyler 20'li ve hatta daha erken yaşlarında da bu hastalığa yakalanabilmektedir. Ancak hastalık başlangıç yaşı sadece CAG tekrar sayısına bağlı olarak belirlenemez. Yapılan çalışmalar CAG tekrar sayısının başlangıç yaşını ortalama olarak % 40 oranında belirleyebildiğini ortaya koymuştur. Kalan varyans çevresel ya da genetik faktörlerle açıklanabilir.

Bu tez çalışmasında HH'nda hastalık başlangıç yaşına etkili olabileceği düşünülen modifiye edici aday genlerden MTHFR geni üzerindeki C677T ve A1298C polimorfizmleri incelenecektir. Öncelikle ilgili polimorfizmlere ait alel frekansları sağlıklı ve Huntington hastası popülasyonlarında belirlenecek ve karşılaştırılacaktır. Bunu takiben, hastalardaki CAG tekrar sayısının ve belirtilen polimorfizmlerin hastalık başlangıç yaşına katkıları belirlenecek, MTHFR polimorfizminin hastalıkla olan ilişkisi araştırılacak ve diğer popülasyon verileri ile karşılaştırılacaktır.

3. MATERYALLER

3.1.Çalışmada Kullanılan Örnekler

Hasta grubu, 1998-2010 yılları arasında İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi'nde HH klinik tanısı almış ve genetik analiz ile teşhisi kesinleşen 99 hastadan oluşmaktadır. Hastaların cinsiyet, yaş, hastalık başlangıç yaşı, aile hikayesi ve klinik özgeçmişleri incelenmiştir. Kontrol grubu ise kendilerinde ve ailelerinde herhangi bir nörodejeneratif hastalık bulunmayan 100 gönüllü bireyden oluşmaktadır. Her birey ile yapılan anketlerle demografik bilgileri elde edilmiştir. Hasta ve kontrol grubuna ait kan ve yanak içi epitel hücre örnekleri, bireylerin hastalık hakkında bilgilendirilmeleri ve onaylarının alınmasının ardından toplanmıştır. Bu çalışma T.C. Haliç Üniversitesi İnsan Araştırmaları Etik Kurulu izni ile gerçekleştirilmiştir.

3.2. Kimyasallar

Bu çalışmada kullanılan tüm katı ve sıvı kimyasallar moleküler biyoloji kalitesindedir, aksi belirtilmediği takdirde marka olarak Sigma (ABD) ya da Merck (ALMANYA) tercih edilmiştir.

3.3. Tamponlar, Solüsyonlar ve Enzimler

3.3.1. Periferik Kandan DNA İzolasyonu

Kan örneklerinden DNA izolasyonu Hızlı Genomik DNA Ekstraksiyonu “Rapid Genomic DNA Extraction (RGDE) metodu ile gerçekleştirilmiştir.

Hücre Lizis Tamponu (pH 8.0)

Tris HCL	10mm/L
Sükroz	%11 (w/v)
MgCl ₂	5mm/L
Triton X-100	%1 (w/v)

Çekirdek Lizis Tamponu (pH 8.0)

Tris HCL	10mm/L
SDS	%1 (w/v)
EDTA	10mm/L
Sodyum sitrat	10mm/L

3.3.2. Yanak içi Epitel Örneklerinden DNA İzolasyon Tamponları

Lizis Tamponu	50mM Tris pH 8.0 50mM EDTA 50mM sükroz 100mM NaCl %1 SDS
Proteinaz K	Steril dH ₂ O'da 10 mg/ml
Low-TE (pH 8.0) Tamponu	10mM Tris pH 8.0 0.1mM EDTA pH 8.0
NaOAc (Sodyum asetat)	3M
EtOH (Etanol)	%70
Fenol CHCl ₃ (Kloroform): IAA (İzoamil alkol)	(24:1)

3.3.3. Polimeraz Zincir Reaksiyonu Tamponları ve Enzimleri

10X MgCl ₂ içermeyen Tampon	200 mM (NH ₄) ₂ SO ₄ 750 mM Tris-HCl (pH 8,8) % 0,1 (v/v) Tween 20
--	---

MgCl ₂	(Fermentas LİTVANYA) dH ₂ O'da 25 mM
Deoksiribonükleotidler (dNTP)	(Fermentas, LİTVANYA) 100 mM dATP, dCTP, dGTP ve dTTP
Taq DNA Polimeraz	(Fermentas, LİTVANYA) 5U/μl (Fermentas, LİTVANYA)

3.3.4. Restriksiyon Enzimleri ve Reaksiyon Tamponları

<i>Hinf</i> I	10 U/μl (Fermentas LİTVANYA) Tanıma Dizisi 5'... G↓ANTC... 3' 5'... CTNA↑G...3'
<i>Hinf</i> I Reaksiyon Tamponu	1X Buffer R (Fermentas, LİTVANYA)
<i>Mbo</i> II	10 U/μl (Fermentas, LİTVANYA) Tanıma Dizisi 5'...GAAGA(N) ₈ ↓...3' 5'...CTTCT(N) ₇ ↑...3'
<i>Mbo</i> II Reaksiyon Tamponu	1X Buffer B (Fermentas, LİTVANYA)

3.3.5. Elektroferez Tamponları ve Jel Sistemleri

10X TBE (Tris-Borik asit-EDTA)	890 mM Tris-Base, 890 mM Borik Asit, 20mM Na ₂ EDTA.2H ₂ O, (pH 8.3)
10X Bromofenol Mavisi (BPB)	2.5 mg/ml BPB
Etidyum Bromid (EtBr)	10 mg/ml EtBr
% 1 veya 2'lik Agaroz Jel	0.5 X TBE Tamponunda % 1 veya % 2 (w/v) agaroz

3.3.6. Oligonükleotid Primerler

Bu çalışmada incelenen polimorfik bölgeleri çoğaltmak için kullanılan primer dizileri Tablo 3.1.'de gösterilmiştir. Kullanılan primerler "Integrated DNA Technologies" (IDT) firmasından temin edilmiştir.

Tablo 3.1. MTHFR geni polimorfizmlerinin PCR işlemi için kullanılan primerler
(F: İleri primer, R : Geri primer).

Polimorfizm	Primer Dizisi (5'→ 3')
C677T	C677T -F: TGAAGGAGAAGGTGTCTGCGG C677T -R: AGGACGGTGCCGGTGAGAGTG
A1298C	A1298C - F: ATGTGGGGGGAGGAGCTGAC A1298C -R: GTCTCCCACCTTACCCTTCTCCC
IT-15 CAG tekrar Bölgesi	P3F:5'-TCTGCTTTTACCTGCGGCC-3' HD3:5'-GGCGGTGGCGGCTGTTGCTGCTGCTGCTGC-3'

3.3.7. DNA Büyüklük Markörleri

GeneRuler 100 bp DNA markörü: 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000 baz çiftlik fragmentler içeren DNA markörü (Fermentas, LİTVANYA).

GeneRuler 50 bp DNA markörü: 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500 baz çiftlik fragmentler içeren DNA markörü (Fermentas, LİTVANYA).

3.3.8. Cihazlar

Otoklav	Dik Tip Otoklav (BES, TÜRKİYE)
Tartılar	Hassas Terazi, XB 220A (Presica, İSVİÇRE) Terazi, KB 400-2 (KERN, ALMANYA)
Santrifüjler	Mikrosantrifüj, MiniSpin Plus (Eppendorf, ALMANYA)
Derin Dondurucular	-20°C, 2021 D (Arçelik, TÜRKİYE) -20°C, GSD26410NE (Bosch, ALMANYA)
Dokümantasyon Sistemleri	Bio-RAD Universal Hood II (BIO-RAD, İTALYA)
Yatay Elektroforez Sistemleri	Flowgen (İNGİLTERE) Sub-Cell GT (BIO-RAD, İTALYA)

Güç Kaynakları	EPS 301 (Amersham Pharmacia Biotech, İSVEÇ) PowerPac Basic (BIO-RAD, İTALYA) PowerPac Universal (BIO-RAD, İTALYA)
Isı Bloğu	DB 2D (Techne, İNGİLTERE)
Manyetik Karıştırıcılar	MR 3001 (Heidolph, ALMANYA)
Buzdolapları	Beko 8742, Arçelik 3061 Plus (TÜRKİYE)
Spektrofotometreler	Schimadzu UV 1601 (JAPONYA)
Thermo-Cycler	Techne TC-512 (İNGİLTERE)
Vorteks	Heidolph REAX (ALMANYA)
Su Banyoları	Nüve BM 402 (TÜRKİYE)
Su Arıtma Sistemi	Millipore Milli Q Synthesis A10 (FRANSA)

4. YÖNTEMLER

4.1. Periferik Kandan DNA İzolasyonu

Bu tez çalışmasında RGDE metodu ile kan örneklerinden DNA izolasyonu yapılmıştır.

EDTA'lı tüplere toplanmış kan örneklerinden 500µl alınarak 1,5ml'lik Eppendorf tüplere aktarılır ve 1000 µl hücre lizis tamponu eklenir. Tüpler çalkalanarak tampon ve kan örneklerinin karışması sağlanır. 6000 rpm'de 2dk santrifüj edilir. Süpernatant atılır. Bu işlem tüplerde krem rengi pellet kalıncaya kadar birkaç kez tekrarlanır. Elde edilen pellet üzerine 300 µl çekirdek lizis tamponu eklenir. Pellet çözüldükten sonra 100 µl 5M NaCl ve 600 µl kloroform eklenir. Eklenen çözeltilerin karışması sağlanarak 6000 rpm'de 2 dk santrifüj edilir ve sonrasında iki faz oluşumu gözlenir. DNA üst kısımdaki fazda bulunduğu için bu faz mikropipet ile alınarak başka bir tüpe aktarılır. Üzerine 600 µl soğuk izopropanol eklenir ve tüpler birkaç kez elde çevrilerek DNA'nın çökmesi sağlanır. Tüpler 13.000 rpm'de 1 dk santrifüj edilir ve süpernatant atılır. Pellet 10-15 dk kurumaya bırakılır. Elde edilen DNA miktarına göre 50 µl-100 µl TE tamponu eklenerek DNA'nın çözülmesi için gece boyunca oda sıcaklığında bekletilir.

4.2. Yanak İçi Epitel Örneklerinden DNA İzolasyonu

Örnekler ucunda steril pamuk bulunan bir çubuk yardımıyla yanağın her iki kısmına yaklaşık 30 saniye sürülerek toplanır. Yanak içi epitel doku örneği taşıyan steril çubuk, 600-700 µl arası lizis tamponu içeren tüpe aktarılır. Tampon hacminin en az 500 µl olduğuna emin olunduktan sonra 50 µl 10mg/ml Proteinaz K ile 55°C'de 1 saat inkübe edilir. Tercihen gece boyu da inkübasyona bırakılabilir. Steril çubuk tüpün içinde çeperlere ve tüpün ağzına bastırılarak emdiği bütün tamponu hücrelerle beraber bırakması sağlanır ve tüpten çıkarılır.

Üzerine 300 µl fenol ve 600 µl kloroform eklenir. 12.000 g'de 2 dk. santrifüj edilir. Sulu faz yeni tüpe aktarılır. Yeni tüpe aktarılan sulu faza eşit hacimde (yaklaşık 500 µl) CHCl₃: IAA (24:1) eklenir. Tüp 12.000'g de 2dk. santrifüj edilir. Sulu faz yeni tüpe aktarılır ve 1:10 hacimde 3 M NaOAc eklenip karıştırılır. Üzerine toplam hacmin %6'sı kadar izopropanol eklenir. Tüpler -20°C'de gece boyu inkübe edilerek DNA'nın çökmesi sağlanır. İnkübasyondan sonra tüpler 12000 g'de 10 dk. santrifüjlenir ve DNA çöktürülür. DNA pelleti 500 µl %70 etanol ile 12000 g'de 5 dk. santrifüjlenerek yıkanır. Süpernatant atıldıktan sonra tüpler yaklaşık 15-20 dakika kurumaya bırakılır. DNA 50 µl Low-TE solusyonu içinde ve oda sıcaklığında 2-3 gün bırakılarak çözündürülür. DNA içeren tüpler -20°C derecede saklanabilir.

4.3. İzole Edilen DNA'nın Analizi

İzole edilen DNA'ların miktar tayininde absorpsiyon temeline dayanan spektrofotometrik yöntemler kullanılır. Nükleotidlerin heterosiklik halkaları 260 nm dalga boyunda maksimum absorpsiyon gösterir. Bu nedenle 260 nm'de ölçülen absorpsiyon değerleri (A_{260}) saf olarak elde edilen nükleik asitlerin µg düzeyinde miktarlarının belirlenmesinde kullanılır. Çift zincirli DNA molekülleri için 1 optik dansitenin (OD) 50 µl/ml'ye karşılık geldiği bilinmektedir. Buna göre çift zincirli DNA için miktar tayininde ;

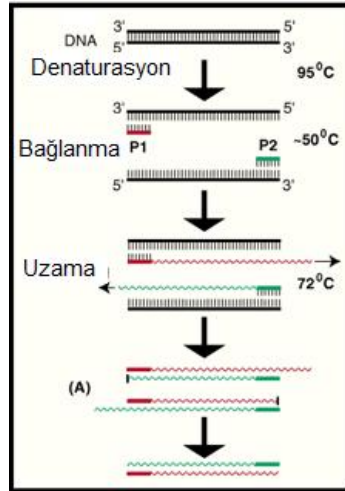
$$C (\mu\text{g/ml}) = A_{260} \times 50 \times \text{sulandırma faktörü} \quad \text{formülü kullanılır.}$$

Ayrıca izole edilen DNA'nın ne kadar saf olduğu da önemlidir. Bu sebeple protein kontaminasyon varlığı, her izolasyon işleminden sonra kontrol edilmesi gereken bir parametredir. Protein kontaminasyonunun yüksek olması, sonrasında uygulanacak PCR işleminde sorunlara sebep olur. Proteinler 280 nm dalga boyunda maksimum absorpsiyon gösterirler. Böylece 260 ve 280 nm'de ölçülen değerler kullanılarak A_{260}/A_{280} oranı hesaplanır. Saf DNA'da bu oran 1,75 – 1,80'in üzerinde olmalıdır. Ölçümlerde UV geçirgen kuvarz küvetler kullanılır.

4.4. Polimeraz Zincir Reaksiyonu

Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) dizisi bilinen iki bölge arasında uzanan bir DNA parçasını çoğaltmak için primerlerin kullanıldığı yapay bir tepkimedir.

Amplifikasyon için önce DNA iki oligonükleotid primer ve dört deoksिनुकлеотит trifosfatın (dNTP) varlığında 95°C'ye kadar ısıtılarak denatüre edilir. Daha sonra 55°-65°C arasında bir ısıya düşürülerek özgül primerlerin komplementer dizilerine yapışması sağlanır. Son olarak 72° C'de DNA polimeraz aktivitesi gösteren ve yüksek ısıdan etkilenmeyen Taq polimeraz enzimi ortamda bulunan dNTP'lerin 5'-3' yönünde eklenmesiyle zincirin uzamasını sağlar. Denatürasyon, bağlanma ve uzama döngüsü defalarca tekrarlanır (Şekil 4.1.). Amplifikasyonun bir döngüsünün ürünleri sonraki döngü için kalıp olduğundan dolayı her bir döngü ile DNA iki katına çıkmakta ve üssel olarak artmaktadır (White, 1993). Polimeraz zincir reaksiyonunun kesin koşulları ve döngünün her bir basamağının süresi kullanılan örneğe, amplifiye olacak hedef bölgenin uzunluğuna ve primer dizilerine bağlıdır. Tepkime koşulları değişken olup maksimum verim için optimizasyona gerek duyulur. Bu nedenle en uygun koşulların sağlanması için PCR bileşenlerinde düzenlemeler yapılır.



Şekil 4.1. PCR döngüsü basamakları

(<http://www.flmnh.ufl.edu/cowries/PCR.gif>).

4.5. Primerlerin Seçimi

MTHFR gen polimorfizmleri ile ilgili çalışmalar incelenerek kullanılacak primerler tespit edilmiştir. C677T ve A1298C polimorfizmlerinin bulunduğu MTHFR gen bölgesinin dizisi FASTA formatında elde edilmiş, daha sonra referans makalelerde kullanılan primerler (Bottiglieri ve diğ., 2001; De Marco ve diğ.,2002) internet tabanlı elektronik PCR ile test edilerek çoğaltılacak gen bölgesine

bağlandıkları doğrulanmıştır (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast>). Fasta formatta elde edilen dizi üzerinde primer bağlanması denenmiştir (Şekil 4.2.).

C677T
GGCCAGCCTCTCCTGACTGTCATCCCTATTGGCAGGTTACCCCAAAGGCCACCCCGAAGCAGGGAG CTTTGAGGCTGACCTGAAGCACTTGAAGGAGAAGGTGTCTGCGGAGCGATTTCATCATCACGC AGCTTTTCTTTGAGGCTGACACATTCTCCGCTTTGTGAAGGCATGCACCGACATGGGCATCACTTG CCCCATCGTCCCCGGGATCTTTCCCATCCAGGTGAGGGGCCAGGAGAGCCCATAAGCTCCCTCCA CCCACCTCACCACCGTCCCTTCATGTCTTGACAGGGCTACCACTCCCTTCGGCAGCTTGTA GCTGTCCAAGCTGGAGGTGCCACAGGAGATCAAGGACGTGATTGAGCCAATCAAAGACAACGATG
A1298C
ATGTGGGGGAGGAGCTGACAGTGAAGAAAGTGTCTTTGAAGTCTTCGTTCTTTACCTCTCGGG AGAACCAAACCGAATGGTCACAAAGTGAGTGATGTGGAGTGGGGACCTGGTTCATCCCTG CCCTGGCCTGACCCAGCTGCAGGCCAGGCTGCGGGGCTGTGACTTCCCATCCTGTGCCCTCCC TCCATGCTGTGGACATGGCAAAGGGAGAAGGGTAAGTTGGGAGAC

Şekil 4.2. C677T ve A1298C polimorfizmlerinin analizinde PCR ile çoğaltılan bölge ve polimorfik bazlar (kırmızı).

4.6. Restriksiyon Fragmenti Uzunluk Polimorfizmi (RFLP)

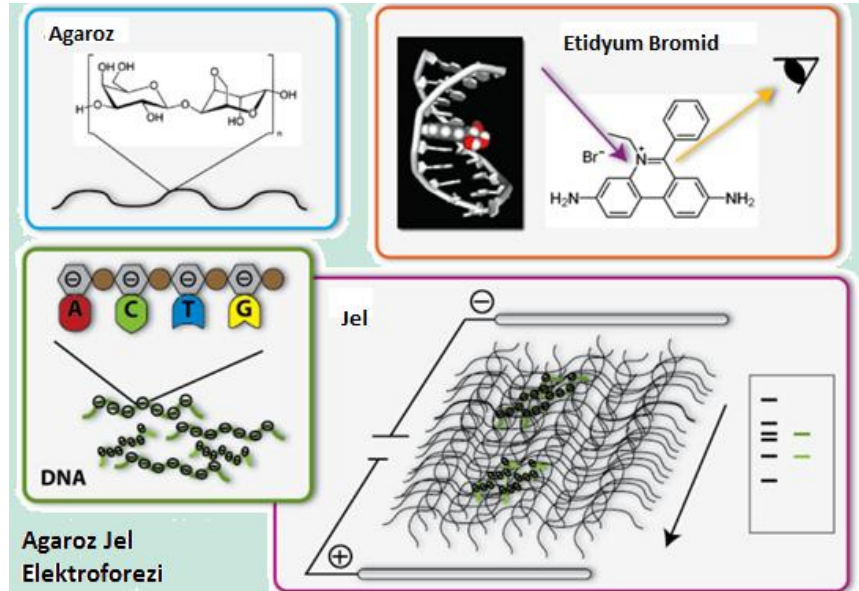
Tek nükleotid polimorfizmleri (“Single Nucleotide Polymorphisms”, “SNP”), genin DNA’da bazı gen bölgelerinde bir popülasyonun normal bireyleri arasında farklılık gösterdiği tek baz çifti değişiklikleridir (Mannsman ve diğ.,2005). Gen polimorfizmleri popülasyonda yaygın görülür ve etnik ve coğrafi farklılıklar gösterirler. Polimorfizm analizinde en sık kullanılan yöntem PCR ve bunu takiben Restriksiyon Fragmenti Uzunluk Polimorfizmi (RFLP) yöntemidir. Bu yöntem, polimorfizmi ortaya çıkaran baz değişiminin bir restriksiyon enzimi için yeni bir kesim yeri ortaya çıkarması veya mevcut olan bir kesim yerini ortadan kaldırmasına bağlı olarak, polimeraz zincir reaksiyonu ile çoğaltılan fragmentin enzim kesimi sonucunda normal alel ile polimorfik alel arasında uzunluk farklılıklarının izlenmesi esasına dayanır (Deligezer ve diğ., 2004).

4.7. Agaroz Jel Elektroforezi

Sulu bir çözelti içinde, süspanse ya da çözünmüş elektrik yüklü küçük parçacıkların, uygulanan bir elektrik alanın etkisi ile göç etmesi sürecine elektroforez denir. Ortamın pH’sına göre (+) veya (-) olarak yüklenen tanecikler, bir elektrik

aland, kendi net yüklerine zıt yük taşıyan anot veya katoda doğru farklı hızlarda yürürler.

Agaroz deniz yosunlarından elde edilen dallanmış zincirli bir polimerdir. Moleküllerin büyüklüklerine göre ayrılabilme özellikleri jel elektroforezinin pek çok amaç için kullanımına olanak sağlamıştır. Nükleik asit fragmentlerinin tanımlanması, saflaştırılması ve ayrılması için kullanılan en yaygın yöntemdir (Şekil 4.3.). Toz agaroz hazırlanmak istenen yüzde miktarına göre hesaplanır ve kullanılacak TBE veya Tris-Asetat-EDTA (TAE) tamponuyla karıştırılarak uygun cam kaptaki kaynatılır. Kaynatma işlemine agaroz tampon içinde çözünene kadar devam edilir. Tampon konsantrasyonu 0.5X veya 1X olabilir. Hazırlanan çözelti yaklaşık 50°C'ye soğuyuncaya kadar musluk altında soğutulur. Sonrasında 0,5 mg/ml EtBr eklenir. EtBr nükleik asitlerin bazıları arasına girerek DNA'ya bağlanır ve ultraviyole (UV) ışığı altında görünür olmasını sağlar. EtBr eklendikten sonra hafifçe karışması sağlanır ve elektroforez tepsisine dökülerek polimerize olması beklenir. Jel polimerize olduktan sonra kuyucuk oluşturmak için kullanılan taraklar çıkarılır, tanka tampon çözelti ilave edilir. Kuyucuklara örnekler yükleme tamponu ile karıştırılarak yüklenir ve cihaz güç kaynağına bağlanarak ve gerekli elektrik akımı uygulanarak yürütme işlemi gerçekleştirilir.



Şekil 4.3. Agaroz jel elektroforezi bileşenleri

(http://2008.igem.org/wiki/images/thumb/e/e0/Ag_e_en.png/900px-Ag_e_en.png).

1X agaroz jel hazırlamak üzere 0,6 gr agaroz ve 60 ml TBE tamponu 250 ml'lik erlen mayerde karıştırılır, mikrodalga fırında agaroz iyice eriyene kadar kaynatılır. Musluk altında hafif hareketler ile çalkalanarak soğutulur. Jel 50°C'ye soğuduktan sonra 0.5mg/ml son konsantrasyonunda EtBr eklenerek hafif hareketler ile karışması sağlanır ve elektroforez tepsisine dökülerek polimerize olması beklenir. Örnekler yükleme tamponu ile karıştırılarak jele yüklenir. 120V'da yaklaşık 20 dk yürütülür ve sonuçlar jel görüntüleme cihazında görüntülenir.

4.8. PCR Ürünlerinin Saflaştırılması

Dizi analizi yapılacak örnekler belirlenerek PCR ile amplifiye edilir. PCR ürünleri High Pure PCR Purification Kit (Roche) kullanılarak saflaştırılır. Filtreli tüpe 50 µl PCR ürünü ile 250 µl bağlanma tamponu eklenir. 1 dakika 14.000 rpm'de santrifüj edilir. Süpernatant atıldıktan sonra 250 µl yıkama tamponu eklenir ve 1400 rpm'de 1 dakika santrifüj edilir. Bu aşama ikinci kez 100 µl tampon eklenerek tekrarlanır ve sonrasında 100 µl elüsyon tamponu eklenerek 1 dakika bekletilir ve 14.000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildikten sonra süzüntü 0.2 µl'lik Eppendorf tüpe aktarılır. %2'lik agaroz jelde yürütülerek saflaştırılan PCR ürününün varlığı ve miktarı kontrol edilir.

4.9. Dizi Analizi

DNA dizi analizinde günümüzde birbirinden farklı iki yöntem kullanılmaktadır. Bu iki yöntem; Maxam ve Gilbert'in kimyasal kırılma yöntemi (Maxam ve diğ., 1977) ve Sanger-Coulson'un zincir sonlanma yöntemidir (Sanger ve diğ.,1977). En yaygın kullanılan yöntem ise Sanger-Coulson yöntemidir. Bu yöntem enzimatik DNA sentezine dayanır Bu yöntemde dizisi saptanacak olan DNA zinciri yeni sentezlenecek iplik için kalıp olarak kullanılır. DNA sentezini sağlamak için Klenow, Taq DNA polimeraz, ters transkriptaz ya da sekuenaz enzimlerinden birisi kullanılabilir. Yöntemin temeli DNA polimerazın dNTP'lerin yanı sıra deoksiribozun 3'pozisyonunda OH grubu taşımayan dideoksiribonükleozit trifosfatları (ddNTP) da substrat olarak kullanabilmesine dayanır. Sentezlenen DNA'ya bir ddNTP'nin katılması 3' pozisyonunda OH grubu olmadığı için sentezi durdurur. Dizi analizi yapılırken dört ayrı reaksiyon karışımı hazırlanır. Her bir karışım kalıp DNA zinciri,

bir primer, dNTP'lerin dördü ve az miktarda ddNTP'lerden birini içerir. Özgül zincirin sonlanması için her bir reaksiyonda farklı bir ddNTP bulunur. Reaksiyonların her birinde çok az miktarda modifiye nükleotit kullanıldığı için yeni zincir sentezi rastgele sonlanarak bir dizi DNA fragmenti meydana gelir (Klug ve diğ., 2000).

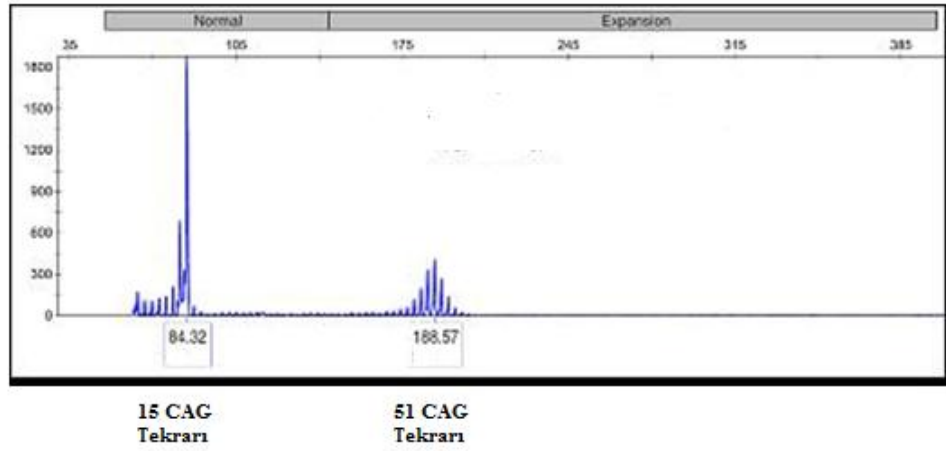
Reaksiyonlar sonucu elde edilen DNA parçalarına elektroforez uygulanarak jel üzerinde yanyana yürütülür. Uygulanan elektriksel alanın etkisi ile DNA parçacıkları en kısası en önde olmak üzere jel üzerinde bir merdiven görüntüsü oluşturur. İşaretleme yöntemine göre jel üzerinde, tespit edilen parçacıklar reaksiyon karışımına konulan ddNTP' nin tipine göre okunur (Klug ve diğ., 2000).

Günümüzde dizi analizlerinde otomatik dizileme sistemleri kullanılmaktadır. Otomatik DNA dizi analizleri zaman kazancı yanında, standart çalışma koşulları ve elde edilen sonuçların değerlendirilmesinde de yarar sağlamıştır. Otomatik analizde de Sanger'in enzimatik DNA sentezine dayanan zincir sonlanma yöntemi kullanılır. Otomatik DNA dizi analiz cihazları basit olarak, sabit bilgisayarda yüklü programlar ile bu programların yönettiği elektroforez sistemini içerir. Elektroforetik ünitelerde bulunan lazer ışık kaynağı ile monokromatik bir ışık oluşturulur. Söz konusu DNA'nın bulunduğu jel matrisi bu monokromatik ışık ile taranır. Elektroforez süresince DNA'ya bağlanan floresan boya ışık ile taranan bölgeye geldiğinde uyarılır. Uyarılan boya kendisi için karakteristik olan dalga boyunda ışığı geri yansıtır. Yansıyan bu ışık demeti bir dedektör tarafından kaydedilir. Kaydedilen veriler bilgisayar programları ile değerlendirilerek sonuçlar grafiksel ya da matematiksel olarak bilgisayar ekranına aktarılır. DNA dizi analizi cihazlarında 6 bazdan 1000 baza kadar güvenli okuma yapılabilmektedir (Sambrook et al., 1989). Bu tez çalışmasında dizi analizi işlemleri İontek A.Ş. tarafından yapılmıştır.

4.10. Fragment Analizi

Fragment analizi, PCR ürünlerinin uzunluğunu ve miktarlarını belirlemek için uygulanır. Bu analiz oto analizörlerde kapiller elektroforez sistemleri kullanılarak yapıldığı için yapılan PCR işleminde floresan işaretli primerler kullanılır. Fragmentler kapiller sistemde ilerlerken floresan uyarımı ile tespit edilir. Analiz sonuçları Peak Scanner v.1.0 programı ile incelenir. Program fragmentleri tepcıklar

şeklinde gösterir (Şekil 4.4.). Analizde kullanılan büyüklük markörü kullanılarak standart eğri çizilir ve örneklerin boyu bu eğriye göre hesaplanır.



Şekil 4.4. HH için yapılan fragment analizi

(http://www.bwhct.nhs.uk/hd_frag_analysis_pic_annot2.jpg&imgrefurl).

4.11. MTHFR Gen Polimorfizmlerinin Araştırılması

MTHFR polimorfizm analizi, C677T ve A1298C polimorfik bölgelerinin PCR ile çoğaltılmasının ardından RFLP yöntemi, genotiplerin belirlenmesi ve sonuçların dizi analizi ile doğrulanması aşamalarından oluşur.

4.11.1. MTHFR C677T Polimorfizminin Analizi

C677T polimorfizminin bulunduğu 198 bp uzunluğundaki MTHFR gen bölgesi PCR işlemi ile çoğaltılır. Kullanılan PCR bileşenleri 12,5 pmol C677T F ve C677T R primerleri (Tablo 3.1.), 2.0 mM MgCl₂, 0,8 mM dNTP, 1X Taq Polimeraz Tamponu ve 1U Taq polimeraz enzimidir. Toplam hacim 25µl olacak şekilde PCR reaksiyonu gerçekleştirilir. PCR reaksiyonunda kullanılan program; 95 °C'de 5 dakika ilk denatürasyon, 30 döngü boyunca 94 °C'de 30 saniye denatürasyon, 61°C'de 30 saniye bağlanma, 72°C'de 45 saniye uzama ve 72 °C 5 dakika son uzamadır. Elde edilen PCR ürünleri %2'lik agaroz jel elektroforezinde yürütülerek jel dökümantasyon cihazında görüntülenir.

Görüntülenen PCR örnekleri C677T mutasyon bölgesi için seçilen *Hinf*I enzimi ile kesim işlemine tabi tutulur. PCR ürünlerinden 8 µl alınarak, 1X Buffer R ve 1U *Hinf* I enzimi ile toplam hacim 25 µl'ye steril su ile tamamlanarak 37 °C'de 2 saat

inkübe edilir. Elde edilen kesim ürünleri agaroz jel elektroforezinde yürütülerek jel dökümantasyon cihazında görüntülenir. PCR ürünlerinin kesilme ve kesilmeme durumuna göre genotipleri tespit edilir. Polimorfik bölgede C bazı varlığında enzim kesim yapmazken, T bazı varlığı *Hinf* I enzimi için tanıma bölgesi oluşturur. Kesim işlemi sonunda genotiplere göre beklenen kesim ürünleri Tablo 4.1.'de gösterilmiştir.

Tablo 4.1. C677T polimorfizminde beklenen PCR ve restriksiyon ürün uzunlukları.

GEN	Polimorfizm	PCR ürünü	Kesim Enzimi	CC Genotip Fragment Uzunlukları	CT Genotip Fragment Uzunlukları	TT Genotip Fragment Uzunlukları
MTHFR	C677T	198 bç	<i>Hinf</i> I	198 bç	198 bç 175 bç 23 bç	175 bç 23 bç

Agaroz jel üzerinde tanımlanan genotiplerin doğrulanması amacıyla PCR ürünleri saflaştırılarak dizi analizi için hazırlanır.

4.11.2. MTHFR A1298C Polimorfizminin Analizi

A1298C polimorfizmi için MTHFR geninde polimorfizmin bulunduğu 241 bç'lik bölge PCR işlemi ile çoğaltılır. Kullanılan PCR bileşenleri; 12,5 pmol A1298C F ve R primerleri (Tablo 3.1.), 1,5mM MgCl₂, 0,8 mM dNTP, 1X Taq Polimeraz Tamponu ve 1U Taq polimeraz enzimidir. Toplam hacim 25µl olacak şekilde PCR reaksiyonu gerçekleştirilir. PCR reaksiyonunda kullanılan program; 95 °C 5 dakika ilk denatürasyon, 30 döngü olarak; 94 °C 30 saniye denatürasyon, 62,2 °C 45 saniye bağlanma, 72 °C 1 dakika uzama ve 72 °C 5 dakika son uzamadır. Elde edilen PCR ürünleri %2'lik agaroz jel elektroforezinde yürütülerek jel dökümantasyon cihazında görüntülenir.

Görüntülenen PCR örnekleri A1298C polimorfik bölgesi için seçilen *Mbo*II enzimi ile kesim işlemine tabi tutulur. PCR ürünlerinden 8 µl alınarak, 1X Buffer B ve 1U *Mbo*II enzimi ile toplam hacim 25 µl'ye steril su ile tamamlanarak 37 °C'de 3 saat inkübe edilir. Elde edilen kesim ürünleri agaroz jel elektroforezinde yürütülerek jel dökümantasyon cihazında görüntülenir. PCR ürünlerinin kesilme ve kesilmeme durumuna göre genotipleri tespit edilir. Polimorfik bölgede A bazı varlığı enzim için tanıma bölgesi oluşturur. C bazı varlığında tanıma bölgesi değiştiği için enzim kesim

yapamaz. Kesim işlemi sonunda genotiplere göre beklenen kesim ürünleri Tablo 4.2.'de gösterilmiştir.

Tablo 4.2. A1298C polimorfizminde beklenen PCR ve restriksiyon ürün uzunlukları.

GEN	Polimorfizm	PCR ürünü	Kesim Enzimi	AA Genotip Fragment Uzunlukları	AC Genotip Fragment Uzunlukları	CC Genotip Fragment Uzunlukları
MTHFR	A1298C	241 bç	<i>MboII</i>	204 bç 37 bç	241 bç 204 bç 37 bç	241 bç

Agaroz jel üzerinde tanımlanan genotiplerin doğrulanması amacıyla PCR ürünleri saflaştırılarak dizi analizi için hazırlanır.

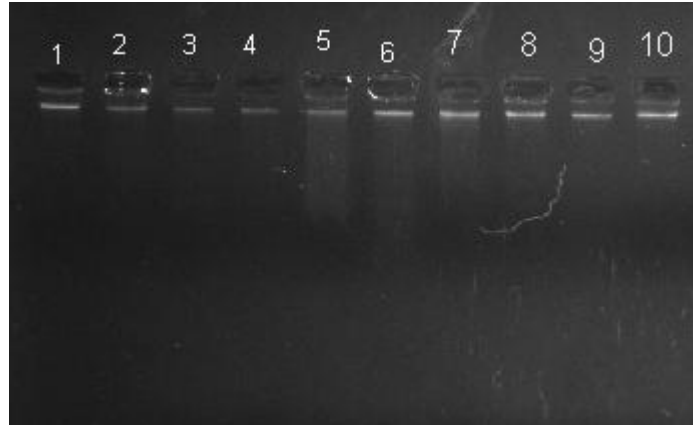
5.SONUÇLAR

5.1.Örneklerin Tanımı

Bu tez çalışmasında MTHFR geni C677T ve A1298C polimorfizmlerinin incelemesinde el ve ayaklarda istem dışı hareketler, denge kurma ve yürümede güçlük, unutkanlık ve depresyon şikayetleri ile nöroloji uzmanına başvuran ve HH teşhisi konulan 99 kişi (54 kadın, 45 erkek) C677T polimorfizm analizi hasta grubuna, 98 kişi (53 kadın, 45 erkek) de A1298C polimorfizm analizi hasta grubuna dahil edildi. HH görülmeyen ve ailesinde HH ve Alzheimer Hastalığı gibi nörodejeneratif geçmişi bulunmayan 100 kişi (32 kadın, 68 erkek) kontrol grubuna dahil edildi. Hastaların hastalık başlangıç yaşı aralığı 16 – 80 yaş arasındadır ve başlangıç yaşı ortalaması 40,01 yaş olarak hesaplanmıştır.

5.2.DNA İzolasyonu

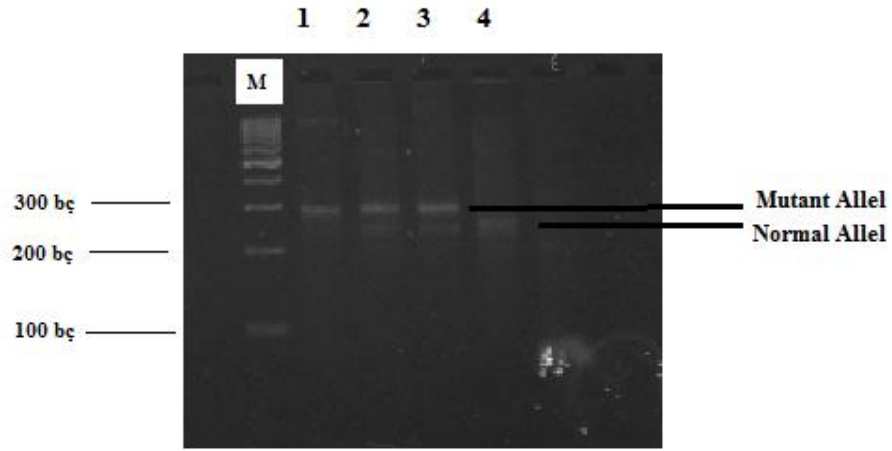
Hasta ve kontrol grubundan alınan kandan ve yanak içi epitel hücrelerinden DNA izolasyonu yapıldı. DNA örneklerinin saflık ve konsantrasyon analizleri %1'lik agaroz jel elektroforezi ve spektrofotometrik ölçüm ile gerçekleştirildi (Şekil 5.1.).



Şekil 5.1. İzole edilen DNA örneklerinin %1'lik agaroz jelde görüntülenmesi.

5.3.Huntington Hastalığı'nda CAG tekrar Sayılarının Belirlenmesi

Bu çalışmada HH teşhisi konulan fakat CAG tekrar sayıları bilinmeyen örnekler için, gen üzerinde CAG tekrarlarının bulunduğu bölge çoğaltacak şekilde FAM işaretli primer kullanılarak PCR yapıldı. CAG tekrar bölgesinin çoğaltılması için P3F ve HD3-FAM (Tablo 3.1.) primerleri kullanıldı. PCR ürünleri %2'lik agaroz jelde incelendikten sonra (Şekil 5.2.) fragment analizine tabi tutuldu. Sonuçlar Peak Scanner v.1.0 programı ile incelenerek CAG tekrar sayıları belirlendi.

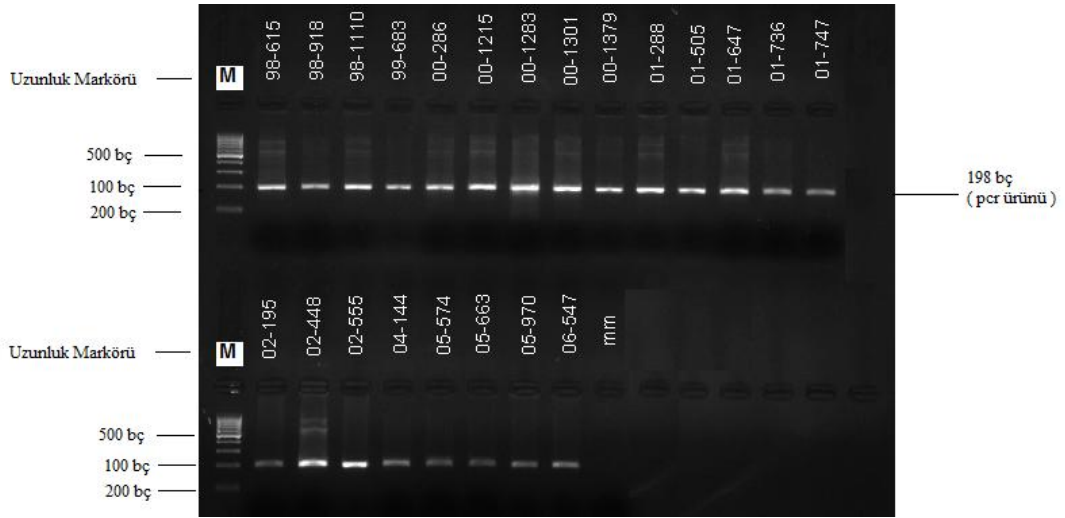


Şekil 5.2. PCR ile çoğaltılmış CAG tekrar bölgesinin %2'lik agaroz jelde görüntülenmesi (1,2,3 numaralı örnekler HH bireylere; 4 numaralı örnek sağlıklı bireye aittir).

Elde edilen sonuçlara göre 39-75 CAG tekrarına sahip 22 mutant alel belirlenmiştir. En sık görülen aleller 14 kişide 47 CAG tekrarı, 12 kişide 43CAG tekrarı ve 10 kişide 44 CAG tekrarıdır.

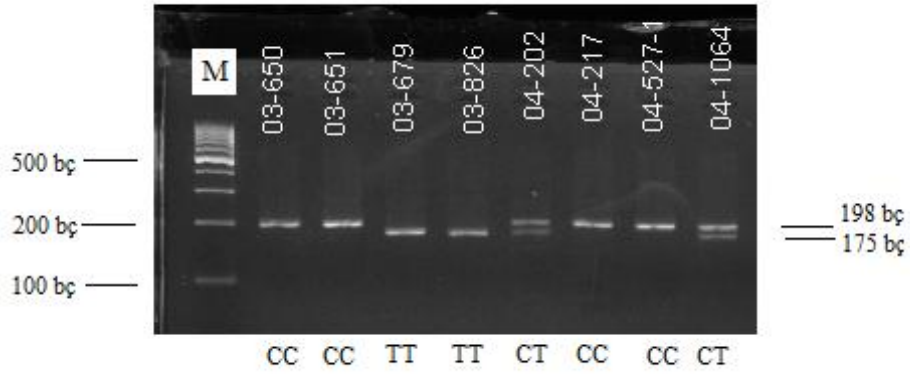
5.4.MTHFR Geni C677T Polimorfizminin Analizi

İzole edilen hasta ve kontrol DNA'larındaki polimorfik C677T bölgesi çoğaltıldı ve elde edilen 198 bp'lik PCR ürünleri 100 bp'lik markör kullanılarak %2'lik agaroz jelde görüntülendi (Şekil 5.3.).



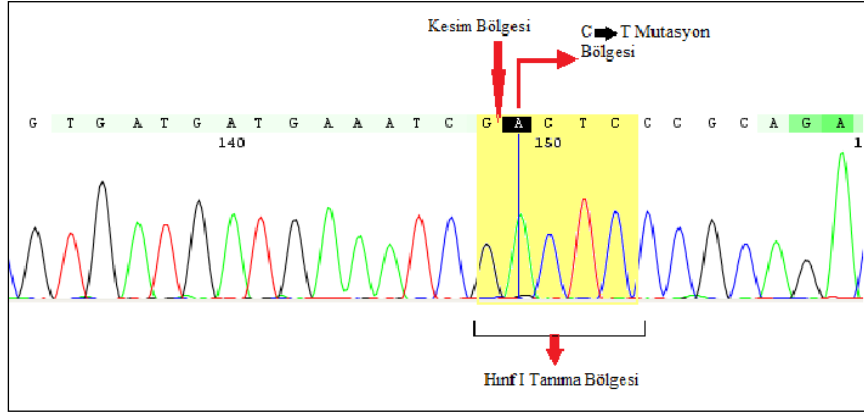
Şekil 5.3. C677T PCR ürünlerinin %2'lik agaroz jelde görüntülenmesi
(M: 100 bç DNA uzunluk markörü, mm: master miks)

Başarılı olarak çoğaldığı belirlenen PCR ürünleri *Hinf*I enzimi ile Bölüm 4.11.1.'de belirtilen şartlarda kesime tabi tutuldu.

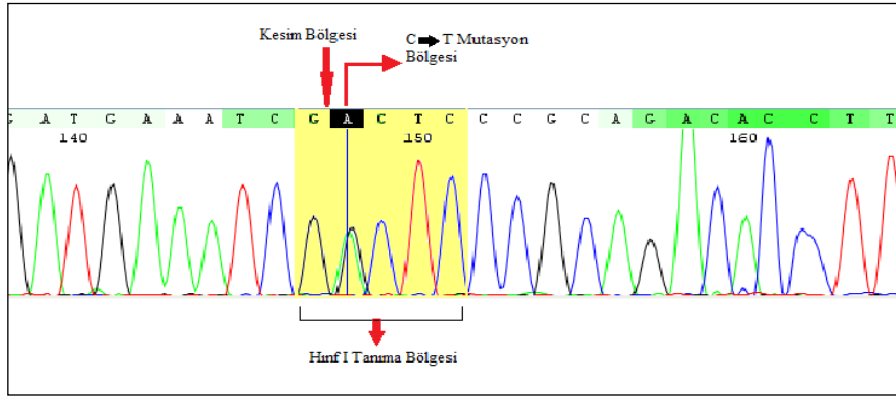


Şekil 5.4. *Hinf*I kesimi ürünlerinin %2'lik agaroz jelde görüntülenmesi
(M: 100 bç DNA uzunluk markörü).

Sonuçların doğruluğunun kanıtlanması için genotip tespiti yapılan örneklerin PCR ürünleri saflaştırılarak geri primerler ile dizi analizi yapılmak üzere İontek A.Ş.'ye gönderildi. Sonuçlar Codoncode aligner programı ile değerlendirildi (Şekil 5.5., Şekil 5.6.).



Şekil 5.5.Homozigot C677T polimorfizmi (TT)

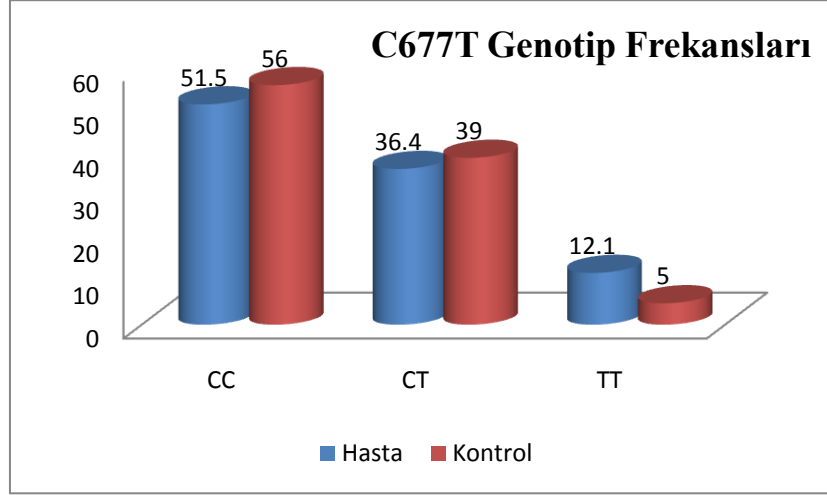


Şekil 5.6. Heterozigot C677T polimorfizmi (CT)

Elde edilen sonuçlar doğrultusunda genotipler belirlenerek (Tablo 5.1.) frekansları hesaplandı (Şekil 5.7.).

Tablo 5.1. C677T polimorfizmi hasta ve kontrol grubu genotip frekansları

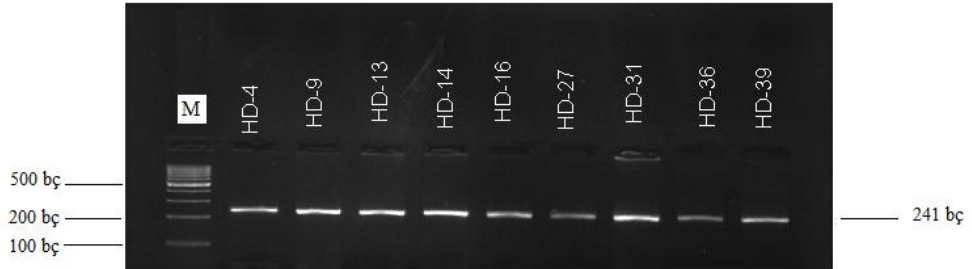
	CC	CT	TT
Hasta n (%)	51 (51,5)	36 (36,4)	12 (12,1)
Kontrol n (%)	56 (56)	39 (39)	5 (5)



Şekil 5.7. C677T polimorfizmi hasta ve kontrol grubu genotip frekansları (%).

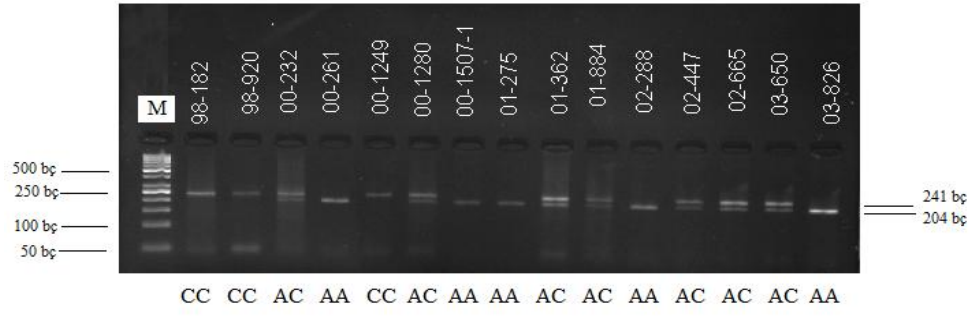
5.5.MTHFR A1298C Polimorfizminin Analizi

İzole edilen hasta ve kontrol DNA'larındaki polimorfik A1298C bölgesi çoğaltıldı. Elde edilen 241bç'lik PCR ürünleri 100 bç'lik markör kullanılarak %2'lik agaroz jelde görüntüledi (Şekil 5.8.).



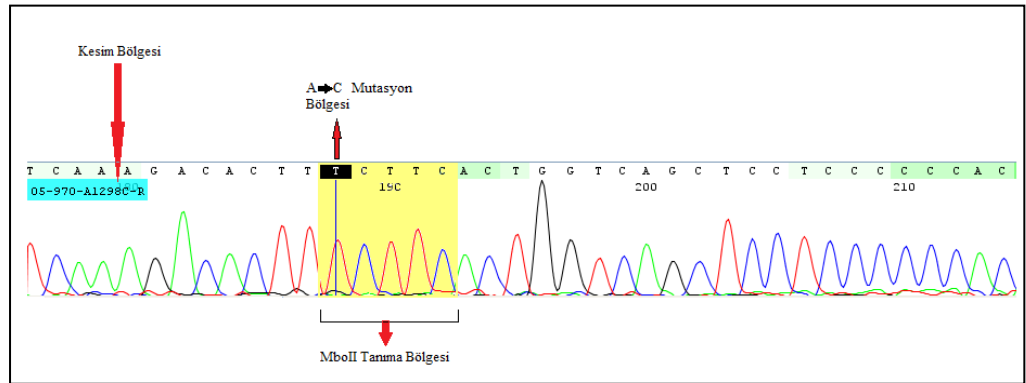
Şekil 5.8. A1298C PCR ürünlerinin %2'lik agaroz jelde görüntülenmesi
(M: 100 bç DNA uzunluk markörü)

Başarılı olarak çoğaldığı belirlenen PCR ürünleri *MboII* enzimi ile Bölüm 4.11.2.'de belirtilen şartlarda kesime tabi tutuldu (Şekil 5.9).

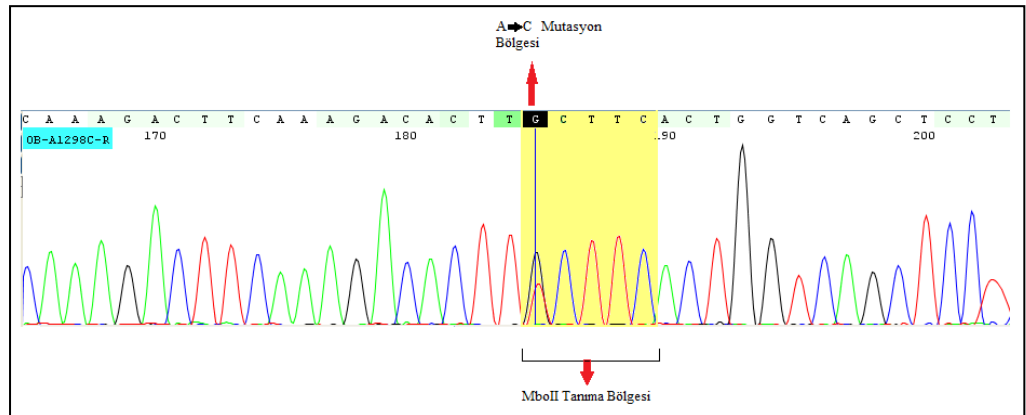


Şekil 5.9. MboII kesimi ürünlerinin %3'lük agaroz jelde görüntülenmesi
(M: 50 bç DNA markörü)

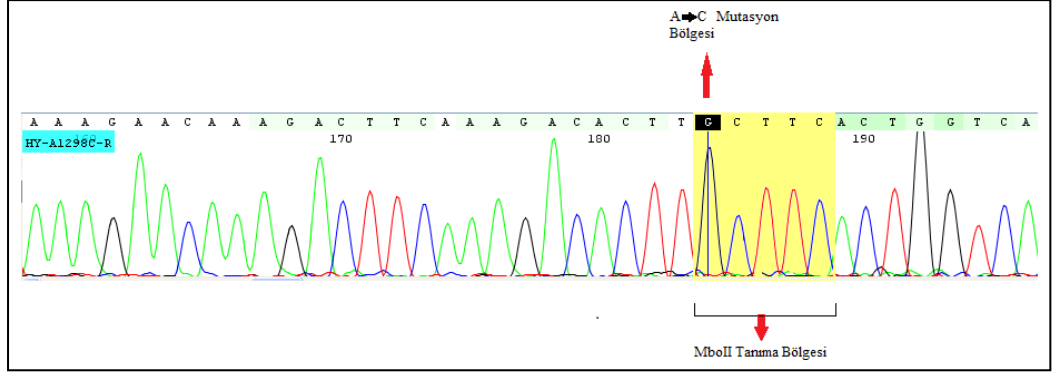
Sonuçların doğruluğunun kanıtlanması için genotip tespiti yapılan örneklerin PCR ürünleri saflaştırılarak dizi analizi yapılmak üzere İontek A.Ş.'ye gönderildi. Sonuçlar Codoncode aligner programı ile değerlendirildi (Şekil 5.10 - 5.12.).



Şekil 5.10. Homozigot A1298C polimorfizmi (AA)



Şekil 5.11. Heterozigot A1298C polimorfizmi (AC)

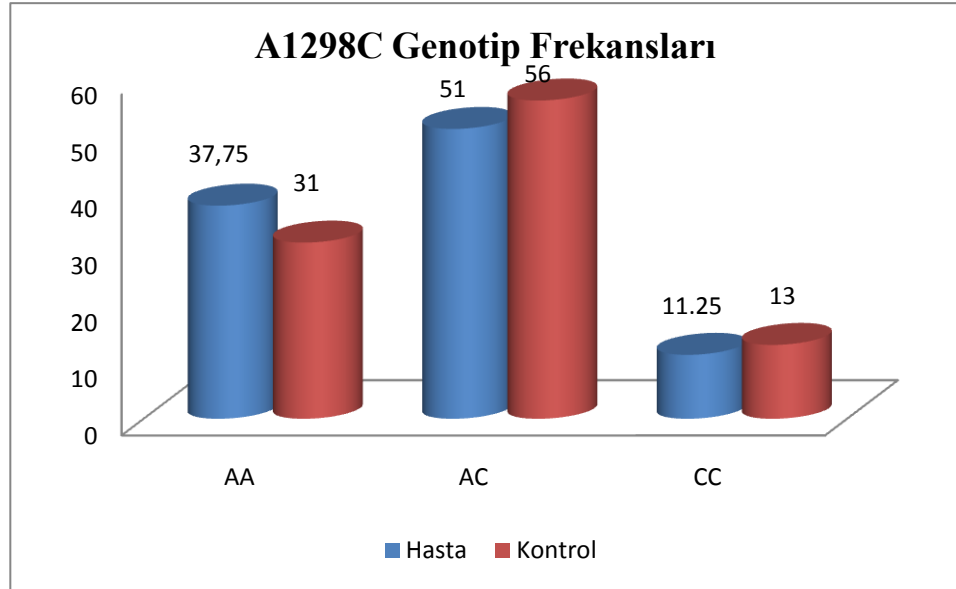


Şekil 5.12. Homozigot A1298C polimorfizmi (CC)

Elde edilen sonuçlar doğrultusunda genotipler belirlenerek (Tablo5.2.) frekansları hesaplandı (Şekil 5.13.).

Tablo 5.2. A1298C polimorfizmi hasta ve genotip frekansları

	AA	AC	CC
Hasta n (%)	37 (37,75)	50 (51)	11 (11,25)
Kontrol n (%)	31 (31)	56 (56)	13 (13)



Şekil 5.13. A1298C Polimorfizmi hasta ve kontrol grubu genotip frekansları (%)

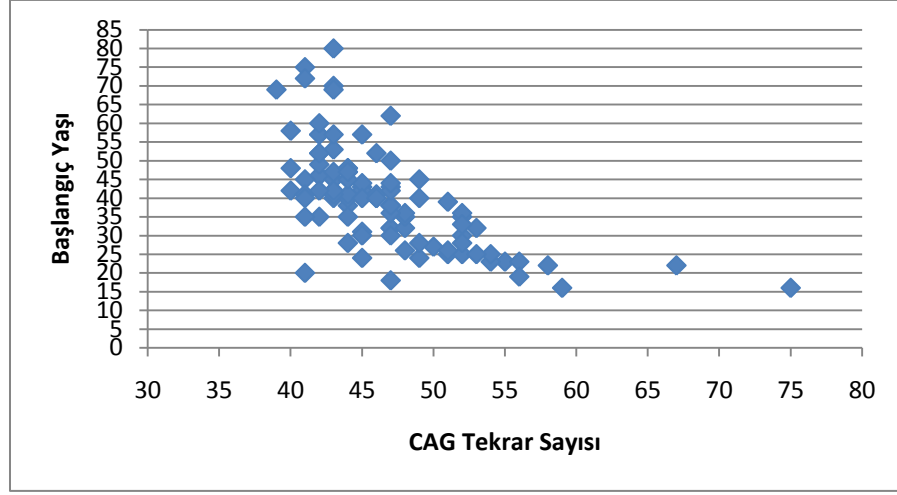
5.6. Huntington Hastalarında Hastalık Başlangıç Yaşı

Tez çalışmasına dahil edilen hastaların hastalık başlangıç yaşı ortalamaları 40,01 yaş olarak hesaplandı. Sahip oldukları CAG tekrar sayılarına göre hastalık

başlangıç yaş aralığı Tablo 5.3.'te gösterilmiştir. CAG tekrar sayıları ve başlangıç yaşları arasındaki ilişki Şekil 5.14'te, başlangıç yaşı ve görülme sıklığı da Şekil 5.15.'te gösterilmiştir.

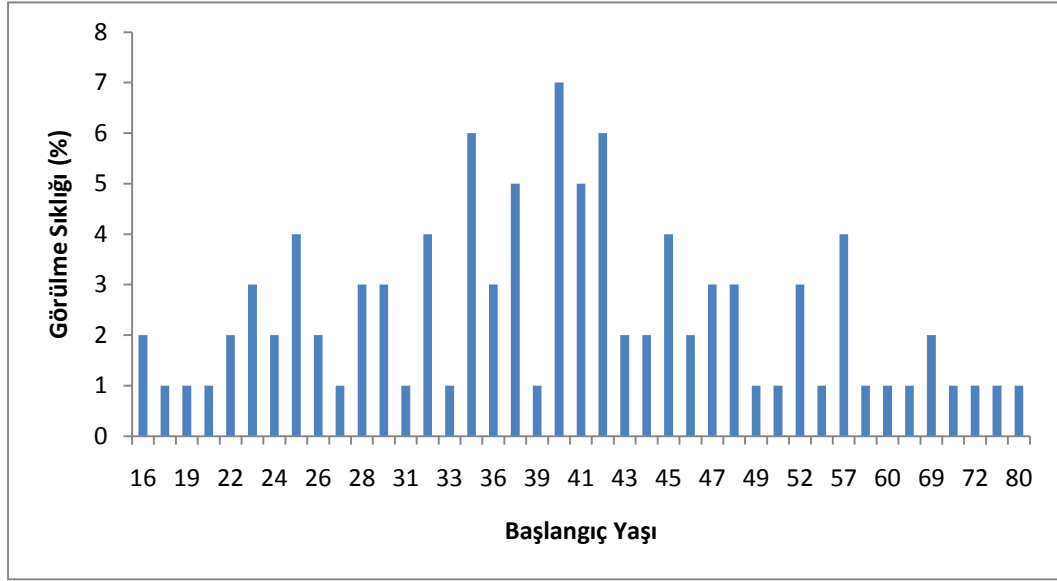
Tablo 5.3 CAG tekrar sayılarına göre hastalık başlangıç yaş aralığı.

CAG Tekrar sayısı	Hastalık Başlangıç Yaş Aralığı	Birey Sayısı	Başlangıç Yaşı Ortalaması
39	69	1	69
40	42-58	3	49,3
41	20-75	7	46,8
42	35-60	10	49,6
43	40-80	12	52,25
44	35-48	10	41,7
45	31-57	8	38,87
46	40-52	4	43,25
47	18-62	14	38,64
48	26-36	5	32,8
49	24-45	4	34,25
50	27	1	27
51	25-39	3	30
52	25-36	6	31,16
53	25-32	2	28,5
54	23-25	2	24
55	23	1	23
56	19-23	2	21
58	22	1	22
59	16	1	16
67	22	1	22
75	16	1	16



Şekil 5.14. Huntington Hastalarında CAG tekrar sayısı ve hastalık başlangıç yaşı ilişkisi.

Bu grafikten de anlaşıldığı gibi hastalık başlangıç yaşı ve CAG tekrar sayısı arasında negatif ilişki bulunmaktadır.



Şekil 5.15. Hasta grubunda başlangıç yaşı ve görülme sıklığı.

5.7. Verilerin İstatistiksel Analizi

Üzerinde çalışılan hasta ve kontrol popülasyonlarının gözlenen ve beklenen genotip frekansları belirlenerek Hardy-Weinberg Dengesi'ne uygunluğu kontrol edildi. Hastalardaki CAG tekrar sayılarının başlangıç yaşına etkisi dorusal regresyon analizi ile, C677T ve A1298C polimorfizmlerinin katkısı ise çoklu doğrusal regresyon ile değerlendirildi. İstatistiksel analizler PLINK v1.06 ve SPSS 11.0

programını kullanılarak yapıldı. $P < 0.05$ değeri istatistiksel olarak önemli kabul edildi.

5.7.1. Hardy-Weinberg Analizi ve Alel Frekansları

C677T ve A1298C polimorfizmlerine ait gözlenen genotip frekanslarından yola çıkarak alel frekansları hesaplandı (Tablo 5.4., Tablo 5.5.).

Tablo 5.4. C677T alel frekansları.

	C	T
HH	0,70	0,30
Kontrol	0,755	0,245
Toplam	0,73	0,27

Tablo 5.5. A1298C alel frekansları.

	A	C
HH	0,63	0,37
Kontrol	0,59	0,41
Toplam	0,61	0,39

Daha sonra beklenen genotip frekansları hesaplanarak PLINK programı ile Ki-kare uygunluk testi yapıldı (Tablo 5.6.). CHR polimorfik genin bulunduğu kromozom numarasını, TEST analiz yapılan grubu, A1 minör aleli, A2 majör aleli, GENO genotip sayılarını, O(HET) heterozigot genotipler için gözlenen frekansı, E(HET) heterozigotlar için beklenen frekansı ifade etmektedir. Bu analiz sonucunda p değeri $> 0,05$ olan gruplar Hardy-Weinberg (HW) Dengesi'ne uygun kabul edilmiştir. Yapılan bu çalışmada hasta ve kontrol gruplarının HW dengesine uygun olduğu görülmektedir.

Tablo 5.6. Hardy-Weinberg Uygunluk Testi

CHR	SNP	TEST	A1	A2	GENO	O(HET)	E(HET)	P
1	C677T	Toplam	T	C	17/75/107	0,3769	0,3977	0,4765
1	C677T	Hasta	T	C	12/36/51	0,3636	0,4224	0,1603
1	C677T	Kontrol	T	C	5/39/56	0,39	0,37	0,7875
1	A1298C	Toplam	C	A	24/106/68	0.5354	0.4753	0.09964
1	A1298C	Hasta	C	A	11/50/37	0.5102	0.4648	0.3911
1	A1298C	Kontrol	C	A	13/56/31	0.56	0.4838	0.1498

5.7.2. Çapraz Tablolar

Hasta ve kontrol grupları ile oluşturulan çapraz tablolar Tablo 5.7.- 5.8.'de gösterilmektedir.

Tablo 5.7. C677T-Grup çapraz tablosu

		C677T			
Grup		CC	CT	TT	Toplam
Hasta	Sayı	51	36	12	99
	% Grup içinde	51,5	36,4	12,1	100
	% C677T içinde	47,7	48	70,6	49,7
	% Toplamda	25,6	18,1	6	49,7
Kontrol	Sayı	56	39	5	100
	% Grup içinde	56	39	5	100
	% C677T içinde	52,3	52	29,4	50,3
	% Toplamda	28,1	19,6	2,5	50,3
Toplam	Sayı	107	75	17	199
	% Grup içinde	53,8	37,7	8,5	100
	% C677T içinde	100	100	100	100
	% Toplamda	53,8	37,7	8,5	100

Tablo 5.8. A1298C Çapraz Tablosu

		A1298C			
Grup		AA	AC	CC	Toplam
Hasta	Sayı	37	50	11	98
	% Grup içinde	37,5	51	11,25	100
	% A1298C içinde	54,4	47,2	45,8	49,5
	% Toplamda	18,7	25,3	5,6	49,5
Kontrol	Sayı	31	56	13	100
	% Grup içinde	31	56	13	100
	% A1298C içinde	45,6	52,8	54,2	50,5
	% Toplamda	15,7	28,3	6,6	50,5
Toplam	Sayı	68	106	24	198
	% Grup içinde	34,3	53,5	12,1	100
	% A1298C içinde	100	100	100	100
	% Toplamda	34,3	53,5	12,1	100

Hasta ve kontrol gruplarında gözlenen farklılıkların istatistiksel olarak önemli olup olmadığı PLINK programında asosiyasyon testi ile değerlendirildi. A1 minör alel, A2 majör alel, F_A minör alelin hasta gruplardaki frekansı, F_U minör alelin kontrol gruplarındaki frekansı, CHISQ Ki-kare değeri, P bu analizdeki p değeri, OR (“Odds Ratio”) görelî orantıyı ifade eder. L95 ve U95 %95 güven aralığındaki alt ve üst sınırlardır. $P > 0.05$ olduğu için çalışılan polimorfizmler ile hastalık arasında bir ilişki saptanamamıştır.

Tablo 5.9. Asosiyasyon Testi

CHR	SNP	A1	F_A	F_U	A2	CHISQ	P
1	C677T	T	0,303	0,245	C	1,685	0,194
1	A1298C	C	0.3673	0.41	A	0.7578	0.384

5.7.3. CAG tekrar sayısı, MTHFR Polimorfizmleri ve Hastalık Başlangıç Yaşı İlişkisi

Regresyon analizi sayısal değişkenler arasındaki ilişkinin derecesini veren bağıntı analizine ek olarak, değişkenlerden biri bilindiğinde, diğerinin değerini tahmin edebilmemizi sağlayan bir istatistik analiz tekniğidir. Tahmin yürütmemizi sağlayan eşitliğe regresyon modeli adı verilir. Regresyon modeli şu şekildedir:

$$Y = a + bX \text{ veya } Y = \beta_0 + \beta_1 X$$

Bu eşitlikte “Y”, bağımlı değişken, yani hakkında tahmin yapılacak değişkendir. “X” bağımsız değişkendir yani Y’nin tahmininde yararlanılacak değişkendir. “a” dikey eksenin kesim noktasıdır. “b” ise regresyon doğrusunun eğimidir. “a”nın “0”dan farklı olması önemlidir. Eğer p değeri <0,05 ise bu a’nın 0 olmadığı sonucunu verir. İki değişken arasındaki ilişkiyi esas olarak “b” değeri verir. “b”nin 0’den farklı olup olmadığı önemlidir.

Birden fazla değişkenin olduğu durumlarda çoklu doğrusal regresyon analizleri kullanılır ve çoklu doğrusal regresyonda oluşturulan model

$$Y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \dots + \beta_n X_n \text{ dir.}$$

Yapılan analizler sonucunda bağımlı değişken olan X’in bağımlı değişken olan Y’yi hangi oranda etkilediğini veren katsayı R²’dir. R² değeri 1’e yaklaştıkça Y’ye etkisi de o kadar çoktur demektir. Analizi yapılan değişkenlerin etkisini belirlemek için hesaplanan R²’ler arasındaki fark incelenir.

Bu analiz için genotip verileri matematiksel verilere dönüştürülürken öncelikle atasal genotip The National Center for Biotechnology Information (NCBI) internet sitesinden SNP veri tabanına polimorfizm numarası (rs) girilerek tespit

edilir. Buna göre atasal homozigot genotipe “0” , heterozigot genotipe “1” , mutant homozigot genotipe “2” değeri verilerek genotip tablosu hazırlanır. C677T için atasal gen “C” , A1298C için atasal gen “A” olarak belirlenmiştir.

Öncelikle C677T polimorfizmi için IT-15 CAG tekrar sayısı ve hastalık başlangıç yaşı verileri kullanılarak doğrusal regresyon analizi yapıldı. Daha sonra da IT-15 CAG tekrarı ve diğer polimorfizmlerin birlikte hastalık başlangıç yaşına etkisi çoklu regresyon analizi ile belirlendi ve regresyon modelleri oluşturuldu (Tablo 5.10.).

Tablo 5.10. Regresyon Modelleri

IT-15 CAG	BY=110,832 – 1,519 CAG
IT-15 CAG + C677T	BY=110,086 – 1,515 CAG + 0,897 C677T
IT-15 CAG + A1298C	BY=110,668 – 1,505 CAG - 0,700 A1298C

Uygulanan doğrusal regresyon analizi sonucunda $p < 0,0001$ ve R^2 değeri 0,408 olarak bulundu. Bu değer, CAG tekrar sayısının açıklayabildiği hastalık başlangıç yaşına olan etkinin %40,8 olduğunu anlatmaktadır (Tablo 5.11.).

Çoklu doğrusal regresyon analizleri sonucunda elde edilen p değerinin 0,05’ten büyük olduğu saptandı. Bu nedenle incelenen polimorfizmlerin hastalık başlangıç yaşını belirlemede katkısı olmadığı tespit edildi (Tablo 5.11.).

Tablo 5.11. Polimorfizmlerin Çoklu Regresyon Analizleri

Gen	R^2	ΔR^2	% Ek Varyans	P
IT-15 CAG	0,408	-	-	0.000
IT-15 CAG+C677T	0,410	0,002	0,1184	0,552
IT-15 CAG+A1298C	0,407	0,001	0,0593	0,671

Daha anlamlı modeller elde edebilmek amacıyla CAG tekrarları gruplandırılarak analizler tekrarlandı. Buna göre CAG tekrar sayısı <45 olan bireyler, 45-50 olan bireyler ve >45 olan bireyler belirlenerek genotip dağılımları hesaplandı ve çoklu regresyon analizleri tekrar uygulandı; ancak yine anlamlı sonuçlar elde edilemedi (Tablo 5.12.).

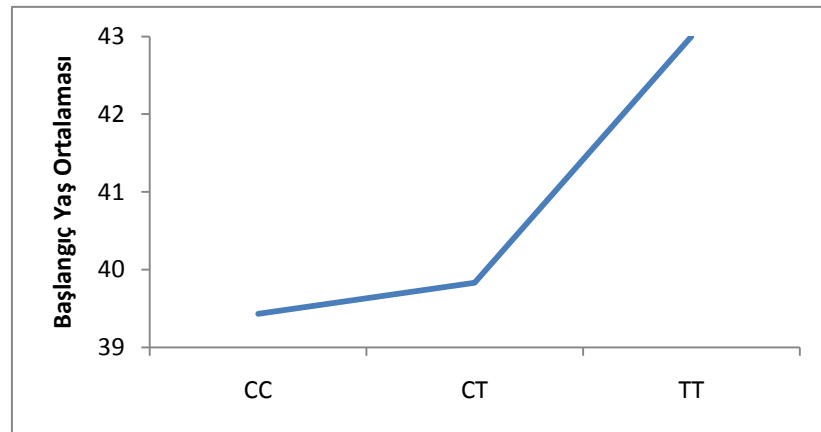
Tablo 5.12. CAG Tekrar Grupları ile Yapılan Çoklu Regresyon Analizi Sonuçları

Polimorfizm	Grup	Regresyon Modeli	R ²	p
C677T	< 45 CAG	BY=135,711 - 2,100 CAG + 3,157 C677T	0,72	0,279
C677T	45- 50 CAG	BY=127,664 - 1,917 CAG - 0,253 C677T	0,82	0,901
C677T	> 50 CAG	BY=60,611 - 0,636 CAG + 1,374 C677T	0,422	0,442
A1298C	< 45 CAG	BY=148,232 - 2,272 CAG - 5,110 A1298C	0,102	0,119
A1298C	45- 50 CAG	BY=116,750 - 1,718 CAG + 2,062 A1298C	0,106	0,344
A1298C	> 50 CAG	BY=61,015 - 617 CAG - 0,881 A1298C	0,405	0,738

5.7.4. Genotiplerin Başlangıç Yaşına Etkileri

İncelenen her iki polimorfizmin de hastalık başlangıç yaşına katkıları istatistiksel olarak anlamlı bulunmasa da, farklı genotiplerdeki hasta bireylerin başlangıç yaşları analiz edilmiştir.

C677T polimorfizminde genotiplere göre başlangıç yaşları ortalamaları değerlendirildiğinde TT genotipine sahip bireylerin CC genotipine göre yaklaşık 3 yıl daha geç hastalık başlangıcı gösterdikleri belirlenmiştir (Şekil 5.15.).



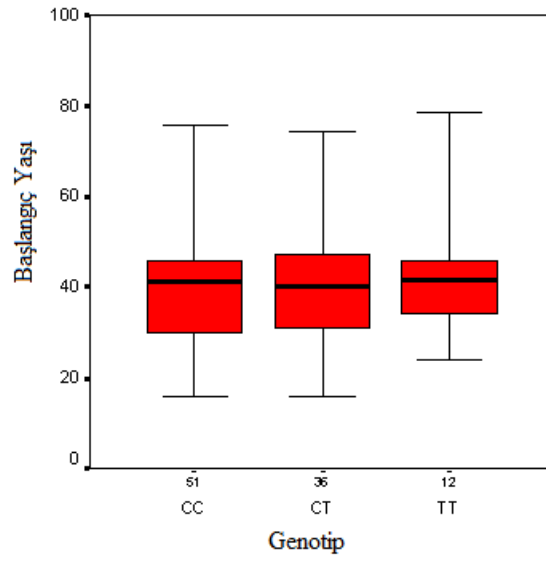
Şekil 5.15. C677T Genotip – Başlangıç Yaş Ortalaması Grafiği

C677T genotipleri ile ilişkili başlangıç yaşlarına ait istatistiki veriler Tablo 5.13.'te, ilgili kutu-bıyık grafiği ise Şekil 5.16'da gösterilmiştir. TT genotipli bireyler yaklaşık üç yıl daha geç başlangıçlı oldukları halde bu genotipin incelenen

popülasyonda istatistiki olarak önemli olmamasının sebebi TT frekansının az olması olabilir.

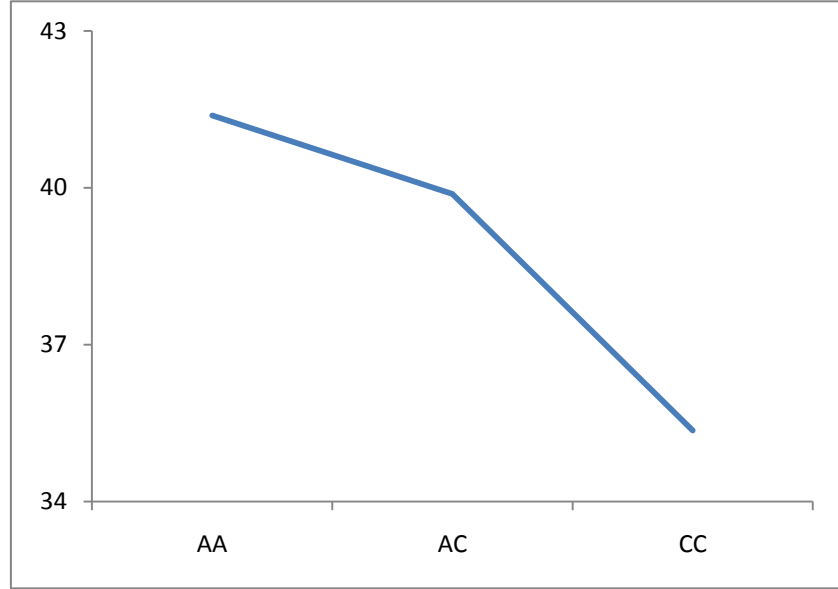
Tablo 5.13. C677T genotipleri ve ilişkili başlangıç yaşı istatistikleri

C677T	N	Minimum	Maksimum	Ortalama	Medyan	Standart Sapma
CC	51	16	75	39,43	41	12,668
CT	36	16	72	39,83	40	13,814
TT	12	24	80	43,00	41,5	15,492



Şekil 5.16. C677T genotipleri ve ilişkili başlangıç yaşları.

A1298C polimorfizminde ise CC genotipe sahip bireylerin başlangıç yaşı ortalamasının AA genotipine göre yaklaşık 6 yıl daha erken olduğu bulunmuştur (Şekil 5.17.).

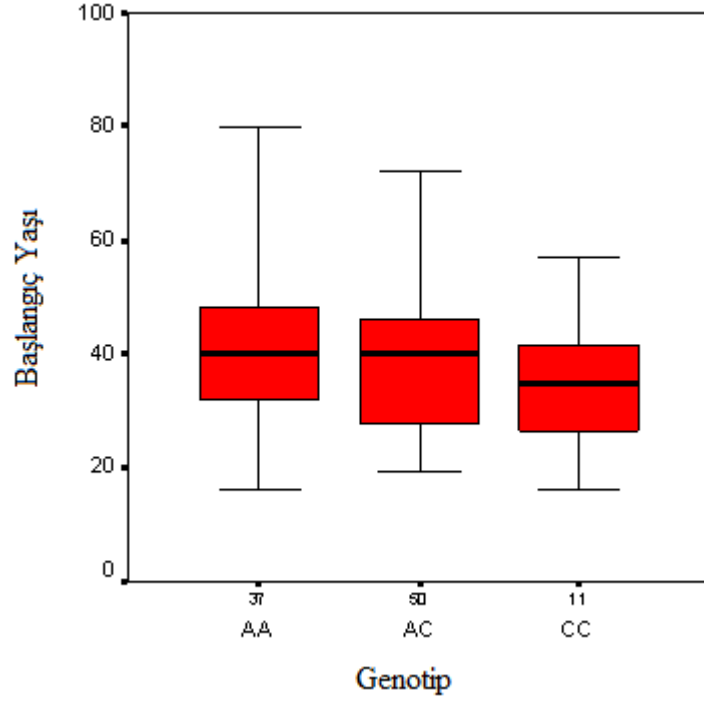


Şekil 5.17. A1298C Genotip – Başlangıç Yaşı Ortalaması Grafiği

A1298C genotipleri ile ilişkili başlangıç yaşlarına ait istatistiki veriler Tablo 5.14.'te, ilgili kutu-bıyık grafiği ise Şekil 5.18'de gösterilmiştir.

Tablo 5.14. A1298C genotipleri ve ilişkili başlangıç yaşı istatistikleri

A1298C	N	Minimum	Maksimum	Ortalama	Medyan	Standart Sapma
AA	37	16	80	41,38	40	13,232
AC	50	19	75	39,88	39,88	13,682
CC	11	16	57	35,36	35	12,793



Şekil 5.18. A1298C genotipleri ve ilişkili başlangıç yaşları.

6.TARTIŞMA

6.1.Huntington Hastalığı ve Başlangıç Yaşı

Huntington Hastalığı otozomal dominant geçiş gösteren, ilerleyici ve nörodejeneratif bir hastalıktır. Hastalığa sebep olan mutasyon IT-15 geninde 1. eksonda bulunan CAG tekrarlarının sayısındaki artıştır. HH geç başlangıç gösterir ve hastalığın ortaya çıkış yaşı geniş bir aralığa sahiptir. CAG tekrar sayısı hastalık başlangıç yaşında en önemli faktör olsa da hastalığın başlangıç yaşının tespitinde yetersiz kalır. Hastalığın başlangıcı ile CAG tekrar sayısı arasında negatif ilişki vardır. CAG tekrar sayısı normal aralığa ne kadar yakınsa hastalık o kadar geç başlangıç gösterir. Fakat bu durum ile ilgili istisnai vakalar da görülmektedir (Groen ve diğ., 2009). Bu da CAG tekrarlarından farklı diğer faktörlerin HH başlangıcında etkili olduğunu düşündürmektedir.

CAG tekrar sayısı hastalık başlangıç yaşının yaklaşık %30-70'ini açıklayabilmektedir (Djousse ve ark., 2003). Açıklanamayan kısım için, geni aktaran ebeveynin cinsiyeti, çevresel faktörler veya HH geni ile etkileşim içinde bulunan genlerin etkisi olduğu düşünülmektedir (Wexler ve diğ., 2004). Yapılan tek yumurta ikizi çalışmalarında aynı CAG tekrarına sahip ikizlerde farklı başlangıç yaşı gözlenmesi hastalığı modifiye eden başka faktörlerin bulunduğuna işaret eder (Sudarsky ve diğ., 1983). Ayrıca Joseph ve arkadaşlarının 2005 yılında yaptıkları ikiz çalışmasında 71 yaşında 39 CAG tekrarına sahip iki kız kardeşin hastalık başlangıç yaşları arasında altı yıl fark olduğu bildirilmiştir (Joseph ve diğ., 2005).

Huntington Hastalığı'nın başlangıç yaşı ile ilgili olarak uzun yıllardır sürdürülen çalışmalar sonucunda bu hastalıkta modifiye edici etkiye sahip olabileceği düşünülen genler ve bu genler ile ilgili polimorfizmler bulunmuştur. Belirlenen modifiye edici aday genler çoğunlukla htt ile ilgili yolaklarda görev alan proteinlerin genleridir. Hastalık başlangıç yaşını açıklamada kanıtlanabilmiş modifiye edici genlerin etkisi hala çok düşük düzeydedir, bu alanda yapılacak daha fazla araştırmaya ihtiyaç vardır.

6.1.Türk Huntington Hastalarında Başlangıç Yaşı

Bu tez çalışmasında yapılan değerlendirmeler sonucunda Türk populasyonunda HH başlangıç yaşı ortalaması 40.01 olarak hesaplanmıştır. Hastalarda görülen her CAG tekrar sayısına karşılık gelen başlangıç yaşları, Tablo 5.3.'te de görüldüğü gibi oldukça büyük farklılıklar göstermektedir.

Hastalık başlangıç yaşlarına göre hastaların sahip oldukları CAG tekrar sayıları değerlendirildiğinde, her başlangıç yaş aralığında diğer gruplara benzer CAG tekrar sayıları gözlenmiştir. Tam tersi olarak CAG tekrar sayılarını gruplandığımızda da her grup için birbirine benzer başlangıç yaşları gözlemlenmiştir. Örneğin 47 CAG tekrarına sahip hastalarda başlangıç yaşı ortalaması 38,64 yaş iken, bu tekrara sahip hastalar 18 ile 62 yaş arasında başlangıç gösterebilmektelerdir. Diğer bir örnekte ise 80 ve 40 yaşlarında hastalık semptomlarını göstermeye başlayan bireyler aynı tekrar sayısına (43 CAG) sahip olabilmektelerdir. Bu durum başlangıç yaşına CAG tekrarları haricinde başka modifiye edici faktörlerin etkili olduğunu göstermektedir.

6.2.Hasta ve Kontrol Gruplarında SNP Genotiplenmeleri

Bu tez çalışmasında araştırılan polimorfizmlerle ilişkili tüm genotipler hasta ve kontrol gruplarında gözlenmiştir. Kontrol grubu için gözlenen genotip ve alel frekansları şimdiye kadar bu polimorfizmler açısından incelenen diğer populasyon çalışmaları ile karşılaştırıldığında C677T alel frekanslarının Avrupa popülasyonu ile aynı olduğu, A1298C alel frekanslarının da Beyaz ırka (Caucasian) benzerlik gösterdiği görülmüştür. (Tablo 6.1.)

Tablo 6.1. Genotip ve Alel frekanslarının Karşılaştırılması

Polimorfizm	Popülasyon	Genotip Frekansları			Allel Frekansları	
		CC	CT	TT	C	T
C677 T	Kontrol	56	39	13	0,75	0,24
	Beyaz Irk (Avrupa)	45,8	50	0,4	0,71	0,29
A1298C	Kontrol	31	56	13	0,59	0,41
	Beyaz Irk (Avrupa)	41	45	13	0,64	0,36

6.2.CAG tekrarlarının ve SNP'lerin Başlangıç Yaşına Etkisi

CAG tekrarlarının başlangıç yaşını açıklamadaki etkisi doğrusal regresyon ile hesaplanmış ve % 40,8 olarak bulunmuştur. Bu değer dünya üzerinde incelenen diğer popülasyonlara ait verilerle uyumludur (Arning ve diğ., 2007; Chattopadhyay 2005, cannella 2004, Metzger 2006). Ayrıca, oluşturulan regresyon modelleri sonucunda her bir CAG tekrarının hastalık başlangıcını yaklaşık 1,5 yıl öne aldığı sonucuna varılmıştır.

Huntington Hastalığı'nda başlangıç yaşını modifiye edici etkisi olduğu düşünülen birçok SNP araştırılmıştır. Bu SNP'ler arasından, bu tez çalışmasında incelenmek üzere MTHFR C677T ve A1298C polimorfizmleri seçilmiştir (Tablo 6.2).

Tablo 6.2. MTHFR Geninde incelenen SNP'ler ve Özellikleri

SNP	Lokasyon	Atasal Alel	Polimorfizm	aa. Değişimi
C677T rs 1801133	1p36.3	C	677 C/T	A (Ala) → V(Val)
A1298C rs 1801131	1p36.3	A	1298A/C	E(Glu) → A(Ala)

Türk Huntington hastalarında bu polimorfizmlerin başlangıç yaşına katkıları çoklu regresyon analizi yapılarak değerlendirilmiş; ancak sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Dolayısıyla Türk Huntington Hastalarının başlangıç yaşı, MTHFR polimorfizmlerinden etkilenmemektedir. CAG tekrarlarının tekrar aralıklarına göre gruplandırılarak analizin tekrarlanması da yine aynı sonucu vermiştir.

Bu tez çalışmasında incelenen polimorfizm analizlerine göre C677T’de CC genotipli bireylerin başlangıç yaş ortalaması 39,43 iken CT genotipli bireylerde 39,83 olarak hesaplanmıştır. TT genotipli bireylerin ise başlangıç yaş ortalaması ise 43’tür. A1298C için yapılan analiz sonucunda AA genotipli bireylerin başlangıç yaş ortalaması 41,38; AC genotipli bireylerin 39,88; CC genotipli bireylerin ise 35,36 yaş olarak hesaplanmıştır.

Genotiplerin başlangıç yaşlarına göre gruplandırılması ile yapılan analizde, istatistiki öneme ulaşmamasına rağmen, C677T polimorfizminde TT genotipe sahip bireylerde CC genotipine sahip bireylere göre hastalığın yaklaşık 3 yıl daha geç, A1298C polimorfizminde de CC genotipe sahip bireylerin AA genotipe sahip bireylere göre 6 yıl daha erken başladığı görülmüştür.

MTHFR polimorfizmlerinin hastalık başlangıç yaşına etkisi sadece iki araştırmada incelenmiştir (Brune ve diğ., 2004; Hansen ve diğ., 2005). Brune ve diğ. A1298C polimorfizmi için CC genotipi taşıyan bireylerde hastalığın daha erken başladığını belirlemişlerdir ($p= 0,024$). Ancak bu çalışmada 27 hasta bireyin akrabalık ilişkisi olduğu ve bazılarının da hareket bozukluklarının gözlenmeye başladığı yaşları bilinmediğinden bu özellikteki hastalar çalışma grubundan çıkarılmış ve 23 yeni hasta eklenerek 167 Huntington hastası ile çalışma tekrar edilmiştir. Hansen ve diğ.’nin yaptığı bu araştırmada, hastalık başlangıç yaşı ile C677T veya A1298C polimorfizmleri arasında bir ilişki saptanamamıştır ($p= 0,828$). Türk popülasyonu ile yapılan bu tez çalışmasından elde edilen veriler Hansen ve diğ.’nin sonuçları ile uyumludur.

7. KAYNAKLAR

Almqvist, E., Adam, S., Bloch, M., Fuller, A., Welch, P., Eisenberg, D., Whelan, D., Macgregor, D., Meschino, W., Hayden, M. R. (1997). Risk reversals in predictive testing for Huntington disease. *Am. J. Hum. Genet.* 61, 945-952.

Ambrose, C. M., Duyao, M. P., Barnes, G., Bates, G. P., Lin, C. S., Srinidhi, J., Baxendale, S., Hummerich, H., Lehrach, H., Altherr, M., Wasmuth, J., Buckler, A., Church, D., Housman, D., Berks, M., Micklem, G., Durbin, R., Dodge, A., Read, A., Gusella, J., MacDonald, M. E. (1994). Structure and expression of the Huntington's disease gene: evidence against simple inactivation due to an expanded CAG repeat. *Somat. Cell Molec. Genet.* 20, 27-38.

Andrew, S. E., Goldberg, Y. P., Kremer, B., Telenius, H., Theilmann, J., Adam, S., Starr, E., Squitieri, F., Lin, B., Kalchman, M. A., Graham, R. K., Hayden, M. R. (1993). The relation ship between trinucleotide (CAG) repeat length and clinical features of Huntington's disease. *Nature Genet.* 4, 398-403.

Arning, L., Saft, C., Wieczorek, S., Andrich, J., Kraus, P. H., Epplen, J. T. (2007). NR2A and NR2B receptor gene variations modify age at onset in Huntington disease in a sex-specific manner *Hum Genet.* 122, 175-82.

Aronin, N., Chase, K., Young, C., Sapp, E., Schwarz, C., Matta, N., Kornreich, R., Landwehrmeyer, B., Bird, E., Beal, M. F., Vonsattel, J. P., Smith, T., Carraway, R., Boyce, F. M., Young, A. B., Penney, J. B., DiFiglia, M. (1995). CAG expansion affects the expression of mutant huntingtin in Huntington's disease brain. *Neuron* 15, 1193-1201.

Bates G, Harper P, Jones L. Huntington's Disease. 3. Bask, Londra, Oxford Yayınlar; 2002

Berrios G. E., Wagle A. C., Markova I. S., et al. (2001). Psychiatric symptoms and CAG repeats in neurologically asymptomatic Huntington's disease gene carriers. *Psychiatry Res.* 102, 217-25.

Bottiglieri T., Et al. (2001). Plasma Total homosisteine levels and the C677T mutation in MTHFR gene, Mechanism of Ageing and Development. 122, 2013-2023.

Botto L. D., Yang Q. (2000). 5,10-Methylen tetrahydrofolate reductase gene variants and congenital anomalies: HuGE review. *American Journal of Epidemiology*, 151, 862-877.

Brune N., Andrich J., Gencik M., Saft C., Müller T., Valentin S., Przuntek H. (2004). Methyltetrahydrofolate Reductase polymorphism influences onset of Huntington's disease. *J Neural Transm Suppl.* 68, 105-110.

Chen, S., Ferrone, F. A., Wetzel, R. (2002). Huntington's disease age-of-onset linked to polyglutamine aggregation nucleation. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 99, 11884-11889.

Chen, Z., Songming, Z., Wetzel, K. Ronald, P. (2001). Solubilization and disaggregation of polyglutamine peptides, *Protein Science*, 10, 887 – 891.

Collins, F. S., Richards, J. E., Cole, J. L., Gilliam, T. C., Gusella, J. F. (1987). Chromosome jumping from D4S10 (G8) toward the Huntington disease gene. *Cytogenet. Cell Genet.* 46, 597.

Conneally, P. M. (1984). Huntington disease: genetics and epidemiology. *Am. J. Hum. Genet*, 36, 506-526.

Craufurd D., Snowden J. (2002). Uropsychological and neuropsychiatric aspects of Huntington's disease. *Oxford University Press*, 62-94.

Critchley, M. (1984). The history of Huntington's chorea. *Psych. Med*, 14, 725-727.

Davies S. W., Turmaine M., Cozens B. A., et al. (1997). Formation of neuronal intranuclear inclusions underlies the neurological dysfunction in mice transgenic for the HD mutation. *Cell*, 90, 537-48.

DiFiglia, M., Sapp, E., Chase, K. O., Davies, S. W., Bates, G. P., Vonsattel, J. P., Aronin, N. (1997). Aggregation of huntingtin in neuronal intranuclear inclusions and dystrophic neurites in brain. *Science*, 277, 1990-1993.

Djousse, L., Knowlton, B., Hayden, M., Almqvist, E. W., Brinkman, R., Ross, C., Margolis, R., Rosenblatt, A., Durr, A., Dode, C., Morrison, P. J., Novelletto, A. (2003). Interaction of normal and expanded CAG repeat sizes influences age at onset of Huntington disease. *Am. J. Med. Genet*, 119A, 279-282.

Dure, L. S., Landwehrmeyer, G. B., Golden, J., McNeil, S. M., Ge, P., Aizawa, H., Huang, Q., Ambrose, C. M., Duyao, M. P., Bird, E. D., DiFiglia, M., Gusella, J. F., MacDonald, M. E., Penney, J. B., Young, A. B., Vonsattel, J.P. (1994). IT15 gene expression in fetal human brain. *Brain Res*. 659, 33-41.

Duyao, M., Ambrose, C., Myers, R., Novelletto, A., Persichetti, F., Frontali, M., Folstein, S., Ross, C., Franz, M., Abbott, M., Gray, J., Conneally, P. (1993). Trinucleotide repeat length instability and age of onset in Huntington's disease. *Nature Genet*, 4, 387-392.

Epplen, J. T. (2004). Methyltetrahydrofolate Reductase polymorphism influences onset of Huntington's disease. *J Neural Transm Suppl*, 68,105

Farrer, L. A., Conneally, P. M., Yu, P. (1984). The natural history of Huntington disease: possible role of 'aging genes.'. *Am. J. Med. Genet*, 18, 115-123.

Farrer, L. A., Cupples, L. A., Wiater, P., Conneally, P. M., Gusella, J. F., Myers, R. H. (1993). The normal Huntington disease (HD) allele, or a closely linked gene, influences age at onset of HD. *Am. J. Hum. Genet*, 53, 125-130.

Folstein, S. (1989). Huntington's disease: a disorder of families. *The Johns Hopkins University Press*,

Frosst, P., Blom, H. J., Milos, R., Goyette, P., Sheppard, C. A., et al. (1995). A candidate genetic risk factor for cardiovascular disease: a common mutation at the methylenetetrahydrofolate locus. *Natt Genet*, 10, 111-113.

Gilliam, T. C., Tanzi, R. E., Haines, J. L., Bonner, T. I., Faryniarz, A. G., Hobbs, W. J., MacDonald, M. E., Cheng, S. V., Folstein, S. E., Conneally, P. M., Wexler, N. S., Gusella, J. F. (1987). Localization of the Huntington's disease gene to a small segment of chromosome 4 flanked by D4S10 and the telomere. *Cell*, 50, 565-571.

Goyette, P., Pai, A., Milos, R., Tran, P., Chen, Z., Chan, M., Rozen, R. (1998). Gene structure of human and mouse methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR). *Mammalian Genome*, 9, 652-656.

Gusella, J. F., Wexler, N. S., Conneally, P. M., Naylor, S. L., Anderson, M. A., Tanzi, R. E., Watkins, P. C., Ottina, K., Wallace, M. R., Sakaguchi, A. Y., et al. ((1983). A polymorphic DNA marker genetically linked to Huntington's disease *Nature*. 2, 234-8.

- Gusella, J. F., McNeil, S., Persichetti, F., Srinidhi, J., Novelletto, A., Bird, E., Faber, P., Vonsattel, J. P., Myers, R. H., MacDonald, M. E. (1996). Huntington's disease. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 61, 615-626.
- Harding, A. E. (1981). Genetic aspects of autosomal dominant late onset cerebellar ataxia *J. Med. Genet.* 18, 436-441.
- Harper, P. S. (1984). Localization of the gene for Huntington's chorea. *Trends Neurosci.* 7, 1-2.
- Harper, P. S. (1992). The epidemiology of Huntington's disease. *Hum. Genet.* 89, 365-376.
- Hansen, W., Saft, C., Andrich, J., Müller, T., Wiczorek, S., Epplen J. T., Arning, L. (2005). Failure to confirm influence of Methyltetrahydrofolate reductase (MTHFR) polymorphisms on age at onset of Huntington disease. *Journal of Negative Results in BioMedicine*, 4, 12.
- Huntington G. On chorea. *Med Surg Rep* 1872; 26: 317–21
- Jeste, D. V., Barban, L., Parisi, J. (1984). Reduced Purkinje cell density in Huntington's disease. *Exp Neurol*, 85, 78–86.
- Justus, L., Elisabeth, M. J., Raymund A. C., Klaus, L. (2008). Late-onset Huntington disease with intermediate CAG repeats: true or false?, *Neurol Neurosurg Psychiatry*, 81, 228-230.
- Kambouris, M., Bohlega, S., Al-Tahan, A., Meyer, B. F. (2000). Localization of the gene for a novel autosomal recessive neurodegenerative Huntingtonlike disorder to 4p15,3. *Am J Hum Genet*, 66, 445–52.
- Kennedy, L., Evans, E., Che, C. M., Craven, L., Detloff, P. J., Ennis, M., Shelbourne, P. F. (2003). Dramatic tissue-specific mutation length increases are an early molecular event in Huntington disease pathogenesis. *Hum. Molec. Genet.* 12, 3359-3367.
- Kishikawa, S., Li, L. J., Gillis, T., Hakky, M. M., Warby, S. (2006). Brain-derived neurotrophic factor does not influence age at neurologic onset of Huntington's disease. *Neurobiology of Disease*, 24, 280-285.
- Kremer, B., Almqvist, E., Theilmann, J., et al. (1995). Sex-dependent mechanisms for expansions and contractions of the CAG repeat on affected Huntington disease chromosomes. *Am J Hum Genet*, 57, 343–50.
- Sudarsky, L., Myers, R. H., Walshe T. M. (1983). Huntington's disease in monozygotic twins reared apart. Monozygotic Twins Discordant for Huntington Disease After 7 Years *J Med Genet*, 20, 408-411.
- Landles, C., Bates, P. G. Huntingtin and the molecular pathogenesis of Huntington's disease, *EMBO reports*, 5, 10.
- Li, H., Li, S. H., Johnston, H., Shelbourne, P. F., Li, X. J. (2000). Amino-terminal fragments of mutant huntingtin show selective accumulation in striatal neurons and synaptic toxicity. *Nature Genet*, 25, 385-389.
- Macdonald, V., Halliday, G., (2002). Pyramidal cell loss in motor cortices in Huntington's disease. *Neurobiol Dis*, 10, 378–86.
- MacDonald, M. E., Vonsattel, J. P., Shrinidhi, J., Couropmitree, N. N., Cupples, L. A., Bird, E. D., Gusella, J. F., Myers, R. H. (1999) Evidence for the GluR6 gene associated with younger onset age of Huntington's disease. *Neurology*, 53, 1330-1332.

Mansmann, U., Meister, R. (2005). Testing Differential Gene Expression in Functional Groups. *Methods Inf Med*, 44, 449-453

Matthews, E. G., Vanoni, M. A., Hainfeld, J. F., Wall, J. (1984). Methyltetrahydrofolate reductase. Evidence for spatially distinct subunit domains obtained by scanning transmission electron microscopy and limited proteolysis. *J Biol Chem*, 259, 11640-11647.

Maxam, A., Gilbert, W. (1977). A new method of sequencing DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 74, 560-4.

Menalled, L. B., Sison, J. D., Dragatsis, I., Zeitlin, S., Chesselet, M. F. (2003). Time course of early motor and neuropathological anomalies in a knockin mouse model of Huntington's disease with 140 CAG repeats. *J Comp Neurol*, 465, 11-26.

Paulson, H. L., Bonini, N. M., Roth, K. A. (2000). Polyglutamine disease and neuronal cell death. *Proc. Nat. Acad. Sci*, 97, 12957-12958.

Phillips, L. (2004). Genes & Environment Affect Age of Onset of Huntington Disease. *Neurology*, 4, 21-22.

Ravikumar, B., Vacher, C., Berger, Z., Davies, J. E., Luo, S., Oroz, L. G., Scaravilli, F., Easton, D. F., Duden, R., O'Kane, C. J., Rubinsztein, D. C. (2004). Inhibition of mTOR induces autophagy and reduces toxicity of polyglutamine expansions in fly and mouse models of Huntington disease. *Nat Genet*, 36(6), 585-95.

Reddy PH, Williams M, Tagle DA. Recent advances in understanding the pathogenesis of Huntington's disease. *Trends Neurosci*. 1999; 22: 248-255

Roiben, K., Ulrich, C. M. (2003). 5,10-Methylen tetrahydrofolate reductase polymorphisms and Leukemia Risk. *American Journal of Epidemiology*, 157(7), 571-82.

Rubinsztein, D. C., Amos, W., Leggo, J., Goodburn, S., Ramesar, R. S., Old, J., Bontrop, R., McMahon, R., Barton, D. E., Ferguson-Smith, M. A. (1994). Mutational bias provides a model for the evolution of Huntington's disease and predicts a general increase in disease prevalence. *Nature Genet*. 7, 525-530.

Sambrook, J., Fritsch, E. F., Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning, a laboratory manual*. Cold spring harbor laboratory Press New York.

Sanger, f., Nicklen, S., Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 74, 5463-7.

Sazcı, A., Ergul, E., Guzelhan, Y., Kaya, G., Kara, I. (2003). Methyltetrahydrofolate reductase gene polymorphisms in patients with schizophrenia. *Molecular Brain Research*, 10, 117(1), 104.

Schwahn, B., Rozen, R. (2001). Polymorphisms in the methyltetrahydrofolate reductase gene: clinical consequences. *Am J Pharmacogenomics*, 1, 189-201.

Taylor, N., Bramble, D., (1997). Sleep disturbance and Huntington's disease. *Br J Psychiatry*, 171, 393.

The Huntington's Disease Collaborative Research Group A novel gene containing a trinucleotide repeat that is expanded and unstable on Huntington's disease chromosomes. *Cell* 1993; 72: 971-83).

Trottier, Y., Biancalana, V., Mandel, J. L. (1994). Instability of CAG repeats in Huntington's disease: relation to parental transmission and age of onset. *J Med Genet*, 31, 377-82.

Vonsattel, J. P., DiFiglia, M. (1998). Huntington disease. *J Neuropathol Exp Neurol*, **57**, 369–84.

Wenstrom KD, Johanning GL, Johnston KE, DuBard M. Association of the C677T methylenetetrahydrofolate reductase mutation and elevated homocysteine levels with congenital cardiac malformations. *Am J Obstet Gynecol*, 2001; 184: 806-812.

WEXLER, N. S., Lorimer, J., Porter, J., Gomez, F., Moskowitz, C., Shackell, E., Marder, K., Penchaszadeh, G., Roberts, S. A., Gayán, J., Brocklebank, D., Cherny, S. S., Cardon, L. R., Gray, J., Dlouhy, S. R., Wiktorski, S., Hodes, M. E., Conneally, P. M., Penney, J. B., Gusella, J., Cha, J. H., Irizarry, M., Rosas, D., Hersch, S., Hollingsworth, Z., MacDonald, M., Young, A. B., Andresen, J. M., Housman, D. E., De Young, M. M., Bonilla, E., Stillings, T., Negrette, A., Snodgrass, S. R., Martinez-Jaurrieta, M. D., Ramos-Arroyo, M. A., Bickham, J., Ramos, J. S., Marshall, F., Shoulson, I., Rey, G. J., Feigin, A., Arnheim, N., Acevedo-Cruz, A., Acosta, L., Alvir, J., Fischbeck, K., Thompson, L. M., Young, A., Dure, L., O'Brien, C. J., Paulsen, J., Brickman, A., Krch, D., Peery, S., Hogarth, P., Higgins, D. S., Landwehrmeyer B. (2004). U.S.-Venezuela Collaborative Research Project. Venezuelan kindreds reveal that genetic and environmental factors modulate Huntington's disease age of onset. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 101, 3498-503.

Zuhlke, C., Riess, O., Bockel, B., Lange, H., Thies, U. (1993). Mitotic stability and meiotic variability of the (CAG)_n repeat in the Huntington disease gene. *Hum. Molec. Genet.* 2, 2063-2067.

8.ÖZGEÇMİŞ

1979 yılında İstanbul'da doğan Zeynep CEYLAN, orta öğretimini Fatih Kız Lisesi'nde, lise eğitimini Kabataş Erkek Lisesi'nde tamamladı.

Lisans öğrenimini T.C. Haliç Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü'nde yapan Zeynep CEYLAN, 2005 yılında mezun oldu.

Yüksek Lisans eğitimine T.C. Haliç Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü'nde devam etti.