

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

**TÜRK TOPLUMUNDA CAG TEKRARLI SPİNO SEREBELLAR ATAKSİ**  
**LOKUSLARININ MOLEKÜLER ANALİZİ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Hazırlayan**  
**MUSTAFA ÖMÜR KÖSE**

**Tez Danışmanı**  
**Yrd. Doç. Dr. NAGEHAN ERSOY**

**EKİM, 2008**  
**İSTANBUL**

## ÖNSÖZ

Bu çalışma 2006-2008 yılları arasında T.C. Haliç Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü'nün bilimsel araştırmalarım ve uygulama çalışmalarım verdiği destek ile hazırlanmıştır.

Yüksek lisans eğitimim ve tez çalışmalarım süresince danışmanlığımı üstlenen, T.C. Haliç Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölüm Başkanı Sayın Yrd. Doç. Dr Nagehan Ersoy'a gösterdiği destek ve yardımlarından dolayı teşekkür ederim.

Yüksek lisans tezi yazım ve çalışmalarım süresince yardımlarından dolayı Aysun Acar'a ve Arş. Gör. Kutluhan İncekara'ya en içten teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmam süresince her zaman yanımda olan ve desteklerini esirgemeyen aileme teşekkür ederim.

**İÇİNDEKİLER**

	<b><u>Sayfa No.</u></b>
ÖNSÖZ .....	I
İÇİNDEKİLER .....	II
ŞEKİLLER LİSTESİ .....	VI
TABLolar LİSTESİ .....	VII
KISALTMALAR LİSTESİ.....	VIII
ÖZET .....	X
SUMMARY .....	XII
1. GİRİŞ .....	1
1.1. Üçlü Nükleotid Tekrar Hastalıkları.....	1
1.1.1. Poliglutamin Tekrar Hastalıkları .....	2
1.1.2. Kalıtsal Ataksiler .....	3
1.1.2.1. Otozomal Dominat Serebellar Ataksiler.....	4
1.1.2.1.1. Klinik Sınıflandırılma .....	5
1.1.2.1.2. Klinik Özellikleri .....	5
1.1.2.1.3. Tekrar İnstabilitesi ve Genetik Testler .....	9
1.1.2.2. Spinoserebellar Ataksi Tip 3.....	10
1.1.2.2.1. Klinik Özellikleri .....	11
1.1.2.2.2. Nöropatolojik Özellikleri .....	12
1.1.2.2.3 Moleküler Genetik Özellikleri .....	13
1.1.2.3. Spinoserebellar Ataksi Tip 6.....	15
1.1.2.3.1.Klinik Özellikleri .....	15
1.1.2.3.2. Nöropatolojik Özellikleri .....	16
1.1.2.3.3. Moleküler Genetik Özellikleri .....	16
1.1.2.4. Spinoserebellar Ataksi Tip 7.....	18

1.1.2.4.1. Klinik Özellikleri .....	18
1.1.2.4.2. Nöropatolojik Özellikleri .....	19
1.1.2.4.3. Moleküler Genetik Özellikleri .....	20
1.1.2.5. Spinoserebellar Ataksi Tip 17.....	21
1.1.2.5.1. Klinik Özellikleri .....	22
1.1.2.5.2 Nöropatolojik Özellikleri .....	22
1.1.2.5.3. Moleküler Genetik Özellikleri .....	23
2. AMAÇ .....	26
3. GEREÇLER .....	27
3.1. Kimyasallar .....	27
3.2. Tamponlar, Solüsyonlar ve Enzimler .....	27
3.2.1. DNA İzolasyonu .....	27
3.2.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu Tamponları ve DNA Polimeraz Enzimleri	28
3.2.3. Oligonükleotid Primerler .....	28
3.2.4. DNA Büyüklük Markörleri .....	29
3.2.5. Elektroforez Tamponları ve Jel Sistemleri .....	29
3.2.6. Denatüre Edici Polikarilamid Jel Elektroforezi.....	29
3.2.7. Gümüş Boyama Solüsyonları .....	30
3.3.8. Cihazlar.....	30
4. YÖNTEMLER .....	32
4.1. Kandan DNA İzolasyonu .....	32
4.2. İzole Edilen DNA'nın Kantitatif ve Kalitatif Analizi .....	32
4.3. Polimeraz Zincir Reaksiyonu .....	33
4.4. Primer Dizayını .....	34
4.5. Agaroz Jel Elektroforezi.....	34
4.6. Denatüre Edici Poliakrilamid Jel Elektroforezi.....	34

4.7. Gümüş Boyama .....	35
4.8. Alel Uzunluklarının Hesaplanması .....	36
4.9. ADCA'ların Moleküler Analizi .....	37
5. SONUÇLAR .....	40
5.1. Örneklerin Tanımlanması .....	40
5.2. DNA İzolasyonu .....	40
5.3. CAG Tekrarlı SCA'ların Moleküler Analizi .....	41
5.3.1. SCA3'ün Moleküler Analizi .....	41
5.3.2. SCA6'nın Moleküler Analizi .....	44
5.3.3. SCA7'nin Moleküler Analizi .....	46
5.3.4. SCA17'nin Moleküler Analizi .....	48
6. TARTIŞMA .....	51
6.1. Metodoloji .....	52
6.1.1. PCR Amplifikasyonu .....	53
6.1.2. Jel Elektroforezi ve Alel Uzunluklarının Hesaplanması .....	55
6.2. Moleküler Analiz .....	56
6.2.1. SCA3 Lokusunun Moleküler Analizi .....	57
6.2.2. SCA6 Lokusunun Moleküler Analizi .....	58
6.2.3. SCA7 Lokusunun Moleküler Analizi .....	59
6.2.4. SCA17 Lokusunun Moleküler Analizi .....	60
6.2.5. Genel Değerlendirme .....	61
7. KAYNAKLAR .....	62
7.1. Kitaplar .....	62
7.2. Tezler .....	62
7.3. Makaleler .....	62
7.4. Web Sayfaları .....	77

8. ÖZGEÇMİŞ .....	78
-------------------	----

## ŞEKİLLER LİSTESİ

	<u>Sayfa No.</u>
Şekil 1.1. SCA tiplerinin dünyadaki dağılımı .....	5
Şekil 1.2. ADCA'larda tekrar sayıları .....	9
Şekil 1.3. Ataksin 3 Domaini .....	15
Şekil 1.4. P/Q tipli kasiyum kanalının alfa 1A alt ünitesinin yapısı ve mutasyonları meydana geldiği bölgeler .....	18
Şekil 1.5. SCA7'de retina ve ponsda nükleer inklüzyonlar .....	21
Şekil 1.6. Transkripsiyon başlatıcı kompleks .....	24
Şekil 1.7. TBP genindeki CAA ve CAG tekrarları .....	25
Şekil 4.1. Quantity-one programı kullanılarak alel uzunluklarının hesaplanması .....	36
Şekil 5.1. DNA izolasyonu sonrasında örneklerin %1'lik agaroz jelde görüntülenmesi .....	40
Şekil 5.2. SCA3 PCR ürünlerinin %2'lik agaroz jeldeki görüntüsü .....	41
Şekil 5.3. SCA3 PCR ürünlerinin %10'luk dPAGE görüntüsü .....	42
Şekil 5.4. ATXN3 gen lokusundaki CAG tekrarlarının dizi analiziyle belirlenmesi. ....	42
Şekil 5.5. Sağlıklı Türk bireylerinin ATXN3 gen lokusundaki tekrar sayısı .....	43
Şekil 5.6. ATXN3 gen lokusundaki tekrar sayısı dağılımı .....	43
Şekil 5.7. SCA6 PCR ürünlerinin %2'lik agaroz jelde görüntülenmesi .....	44
Şekil 5.8. SCA6 PCR ürünlerinin %12'lik dPAGE görüntüsü .....	44
Şekil 5.9. Sağlıklı Türk bireylerinin CACNA1A gen lokusundaki tekrar sayısı .....	45
Şekil 5.10. CACNA1A gen lokusundaki tekrar sayısı dağılımı .....	45
Şekil 5.11. SCA7 PCR ürünlerinin %2'lik agaroz jelde görüntülenmesi .....	46
Şekil 5.12. SCA7 PCR ürünlerinin %8'lik dPAGE görüntüsü .....	46
Şekil 5.13. ATXN 7 gen lokusundaki CAG tekrarlarının dizi analiziyle belirlenmesi .....	47
Şekil 5.14. Sağlıklı Türk bireylerinin ATXN7 gen lokusundaki tekrar sayısı .....	47
Şekil 5.15. ATXN7 gen lokusundaki tekrar sayısı dağılımı .....	48
Şekil 5.16. SCA17 PCR ürünlerinin %2'lik agaroz jelde görüntülenmesi .....	48
Şekil 5.17. SCA17 PCR ürünlerinin %8'lik dPAGE görüntüsü .....	49
Şekil 5.18. TBP gen lokusundaki CAG tekrarlarının dizi analiziyle belirlenmesi .....	49
Şekil 5.19. Sağlıklı Türk bireylerinin TBP gen lokusundaki tekrar sayısı .....	50
Şekil 5.20. TBP gen lokusundaki tekrar sayısı dağılımı .....	50

**TABLolar LİSTESİ****Sayfa No.**

<b>Tablo 1.1.</b> Üçlü Nükleotid Tekrar Hastalıkları.....	2
<b>Tablo 1.2.</b> Otozomal Dominant Ataksilerin Ayırıcı Klinik Özellikleri.....	7
<b>Tablo 1.3.</b> ADCA'ların Gen Lokusları ve Ürünleri .....	8
<b>Tablo 3.1.</b> Bu Çalışmada İncelenen Polimorfik Bölgeleri Çoğaltmak İçin Kullanılan Primer Dizileri.....	28
<b>Tablo 4.1.</b> Primerlerin Genomik DNA Dizilerine Bağlanma Bölgeleri .....	37
<b>Tablo 4.2.</b> PCR Komponentleri .....	38
<b>Tablo 4.3.</b> PCR Döngü Şartları.....	39



## KISALTMALAR LİSTESİ

<b>µl</b>	: Mikrolitre
<b>µm</b>	: Mikrometre
<b>µm</b>	: Mikromolar
<b>Aa</b>	: Amino asit
<b>ADCA</b>	: Otozomal dominant serebellar ataksi
<b>ADSA</b>	: Otozomal dominant spastik ataksi
<b>APS</b>	: Amonyum persülfat
<b>ARCA</b>	: Otozomal resesif serebellar ataksi
<b>ATXN</b>	: Ataksin
<b>Bç</b>	: Baz çifti
<b>BPB</b>	: Bromofenol mavisi
<b>CRX</b>	: Kon-rod homeobox protein
<b>DM</b>	: Miyotonik distrofi
<b>dNTP</b>	: Deoksiribonükleotid
<b>dPAGE</b>	: Denatüre edici poliakrilamid jel elektroforezi
<b>DRPLA</b>	: Dentatorubropallidoluysian atrofi
<b>EA</b>	: Episodik ataksi
<b>EA2</b>	: Episodik ataksi tip 2
<b>EDTA</b>	: Etilen diamintetraasetik asit
<b>EEG</b>	: Elektroensefalografi
<b>EtBr</b>	: Etidyum bromid
<b>FHM</b>	: Ailesel hemiplejik migren
<b>FRAXA</b>	: Frajil X sendromu
<b>FRAXE</b>	: Frajil XE sendromu
<b>FRDA</b>	: Friedreich ataksi
<b>HD</b>	: Huntington hastalığı
<b>IA</b>	: İntermedya allel
<b>Kd</b>	: Kilo dalton
<b>LANP</b>	: Lösence zengin asidik nükleer protein
<b>MJD</b>	: Machado-Joseph hastalığı

<b>MRI</b>	: Manyetik rezonans görüntüleme
<b>NaCl</b>	: Sodyum klorür
<b>NI</b>	: Nükleer inklüzyonlar
<b>PCR</b>	: Polimeraz zincir reaksiyonu
<b>PET</b>	: Pozitron emisyon tomografi
<b>PoliQ</b>	: Poliglutamin
<b>R<sub>f</sub></b>	: Göreceli göç mesafesi
<b>SCA1</b>	: Spinoserebellar ataksi 1
<b>SCA10</b>	: Spinoserebellar ataksi 10
<b>SCA17</b>	: Spinoserebellar ataksi 17
<b>SCA2</b>	: Spinoserebellar ataksi 2
<b>SCA3</b>	: Spinoserebellar ataksi 3
<b>SCA6</b>	: Spinoserebellar ataksi 6
<b>SCA7</b>	: Spinoserebellar ataksi 7
<b>SCA8</b>	: Spinoserebellar ataksi 8
<b>SDS</b>	: Sodyum dodesil sülfat
<b>SMBA</b>	: Spinobulbar musküler atrofi
<b>TBE</b>	: Tris-Borik asit-EDTA
<b>TBP</b>	: TATA kutusu bağlanma proteini
<b>TEMED</b>	: N',N',N',N'-tetrametilenetilendiamin
<b>UIM</b>	: Ubikütin ile etkileşim yapan motifler
<b>UTR</b>	: Translasyona uğramayan bölge
<b>UV</b>	: Ultraviyole
<b>Vbm</b>	: Voksel tabanlı morfometri

**T.C.**  
**HALIÇ ÜNİVERSİTESİ**  
**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**  
**MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANA BİLİM DALI**  
**MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK PROGRAMI**  
**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**TÜRK TOPLUMUNDA CAG TEKRARLI SPİNOSEREBELLAR ATAKSİ**  
**LOKUSLARININ MOLEKÜLER ANALİZİ**

**Hazırlayan**  
**Mustafa Ömür KÖSE**

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

**Ekim, 2008**

**ÖZET**

DNA üzerinde bulunan polimorfik üçlü tekrarlardaki anormal artmalar nörolojik hastalıklara sebep olmaktadır. Üçlü nükleotid tekrar artışının neden olduğu 16 hastalık saptanmıştır. Bunlar arasında, CAG tekrar artışlarının sebep olduğu 9 nörodejeneratif hastalık tanımlanmıştır. Bu hastalıklar Huntington hastalığı (HD), Spinoserebellar Ataksi tipleri (SCA1, 2, 3, 6, 7, 17), Dentatorubral-Pallidoluysian Atrofi (DRPLA), Spinobulbar Müsküler Atrofi'dir (SBMA). SBMA hariç diğerleri otozomal dominant kalıtım gösterir. Tüm poliglutamin hastalıklarında CAG tekrar sayısındaki artışlar genlerin kodlayan bölgelerinde olmaktadır. Bu hastalıkların henüz kesin bir tedavisi olmadığından moleküler tanı büyük önem taşımaktadır. Moleküler tanı protokollerinin oluşturulması için her topluma özgü normal ve patolojik tekrar sayılarının belirlenmesi gereklidir.

70 sağlıklı birey ile yapılan bu çalışmada, Türk toplumunda SCA 3, 6, 7, 17 lokuslarındaki alel dağılımları incelenmiş ve normal CAG tekrar sayıları belirlenmiştir. ATXN 3, 6, 7 ve 17 lokuslarında en sık görülen alellerin 17, 14, 15 ve 38 CAG tekrarlı olduğu saptanmıştır. Tüm lokuslardaki alel dağılımlarının dünya genelinde rastlanan dağılımlarla örtüştüğü gözlenmiştir. Türk populusyonunda bu hastalıkların prevalans analizi yapılmamasına rağmen, uzun normal alellerin az olmasından yola çıkılarak bu hastalıkların görülme sıklığının dünya genelinden daha fazla olmayacağı söylenebilir.

**Anahtar Kelimeler:** SCA3, SCA6, SCA7, SCA17, poliglutamin hastalıkları

## SUMMARY

Abnormal increases in the polymorphic triplet repeat regions on DNA are known to cause neurological diseases. Sixteen diseases caused by triplet repeats have been stated. Among them, nine are caused by CAG repeat expansions. These are Huntington's Disease (HD), Spinocerebellar Ataxia types (SCA1, 2, 3, 6, 7, 17) Dentato-Rubral Pallidolusian Atrophy (DRPLA), Spinal and Bulbar Muscular Atrophy (SBMA). All have autosomal dominant inheritance, except SBMA. In all polyglutamine diseases, CAG repeat expansions are observed in the exonic regions of the genes. Molecular diagnosis of the polyQ diseases is of great importance since there is no certain cure yet. In order to establish the molecular diagnostic criteria, normal and pathological repeat numbers, specific to each population, should be identified.

In this study, allele distribution and normal repeat sizes of 70 healthy Turkish people at the SCA 3, 6, 7, 17 loci have been determined. According to the results, the most frequent alleles at ATXN3, ATX6, ATXN7 and ATXN17 loci are found to contain 17, 14, 15 and 38 CAG repeats, respectively. All the allele distributions are proved to match the world-wide accepted distribution patterns. Although there is no accurate prevalence analysis regarding Turkish population, the overall distribution of the ADCAs are not expected to be higher than the general prevalence, since long normal alleles are not widely presented in the population.

**Key words:** SCA3, SCA6, SCA7, SCA17, polyglutamine diseases

## 1. GİRİŞ

1990'lı yılların başında, genomdaki üçlü nükleotid tekrarlarının sayısındaki anormal artmaların nörolojik hastalıklara sebep olabileceği belirlendi. Önceleri bu tekrarların genomdaki sıradan diziler olduğu düşünülmekteydi. Ancak, nörodejeneratif hastalıklarla ilgili yapılan çalışmalar, bu hastalıkların bir kısmına yol açan genetik mutasyonların üçlü nükleotid (trinükleotid) tekrar sayılarındaki artışla ilgili olduğunu ortaya koydu. Bu da moleküler biyolojiye dinamik mutasyonlar kavramını kazandırdı. Dinamik mutasyonlar polimorfiktir, fakat belirli bir eşik değerinin altında olan üçlü nükleotid tekrarlarının sayıca artış göstererek hastalıklara sebep olabildiği mutasyonlardır. Bu gruptaki hastalıkların moleküler mekanizması hakkında çok fazla çalışma yapılmasına rağmen tekrar artışlarının sebep olduğu toksite mekanizmaları günümüzde hala tam olarak aydınlatılamamıştır. Bu nedenle bu hastalıklar için kesin bir tedavi yöntemi uygulanamamaktadır. Trinükleotid tekrar lokuslarında farklı etnik popülasyonlara ait normal ve patolojik tekrar aralıklarının belirlenmesi moleküler teşhis kriterlerinin oluşturulması, hastalık mekanizmalarının aydınlatılması ve moleküler tedavi yöntemlerinin belirlenmesine katkıda bulunacaktır.

### 1.1. Üçlü Nükleotid Tekrar Hastalıkları

DNA üzerindeki polimorfik üçlü tekrar bölgelerindeki anormal artmalar nörodejeneratif hastalıklara sebep olmaktadır. Üçlü nükleotid tekrar artışının neden olduğu 16 hastalık saptanmıştır. (Tablo 1.1.) Trinükleotid tekrarları genlerin kodlamayan intronik bölgelerinde, 5' UTR ve 3' UTR bölgelerinde ve kodlayan ekzonik bölgelerde meydana gelebilir. Genlerin kodlamayan bölgelerdeki tekrar artışları gen transkripsiyonunu ve translasyonunu etkiler. Kodlayan gen bölgelerinde ise tekrar sayısındaki artış santral sinir sisteminin özgün bölgelerinde nörodejenerasyona sebep olur (Schöls vd., 2004).

Tablo1.1. Üçlü nükleotid tekrar hastalıkları

HASTALIK ADI	GEN LOKUSU	KALITIM TÜRÜ
Huntington Hastalığı (HD)	4p16	Otozomal dominant
Spinobulbar Müsküler Atrofi (SBMA)	Xq11-q12	X'e bağlı resesif
Miyotonik Distrofi (DM)	19q13.3	Otozomal dominant
Dentatorubral Pallidoluysian Atrofi (DRPLA)	12p13	Otozomal dominant
Frajil X Sendromu (FRAXA)	Xq27.3	X'e bağlı resesif
Frajil XE Sendromu(FRAXE)	Xq28	X'e bağlı dominant
Friedreich Ataksi (FRDA)	9q13	Otozomal resesif
Spinocerebellar Ataksi Tip 1 (SCA1)	6p23	Otozomal dominant
Spinocerebellar Ataksi Tip 2 (SCA2)	12q24	Otozomal dominant
Spinocerebellar Ataksi Tip 3 (SCA3)	14q24.3-q31	Otozomal dominant
Spinocerebellar Ataksi Tip 6 (SCA6)	19p13	Otozomal dominant
Spinocerebellar Ataksi Tip 7 (SCA7)	3p21.1-p12	Otozomal dominant
Spinocerebellar Ataksi Tip 8 (SCA8)	13q21	Otozomal dominant
Spinocerebellar Ataksi Tip 12 (SCA12)	5q31-q33	Otozomal dominant
Spinocerebellar Ataksi Tip 17 (SCA17)	6q27	Otozomal dominant

### 1.1.1. Poliglutamin Tekrarı Hastalıkları

Trinükleotid tekrarları arasında en geniş grubu CAG tekrarları oluşturur. CAG kodonları glutamin amino asitini kodladığından dolayı bu tekrarlar poliglutamin (poliQ) tekrarları olarak adlandırılır. Genlerin kodlayan bölgelerindeki CAG tekrar sayılarındaki artışların sebep olduğu dokuz nörodejeneratif hastalık saptanmıştır. Bu hastalıklar Huntington Hastalığı (HD), Spinocerebellar Ataksi Tipleri (SCA1, 2, 3, 6, 7, 17) Dentatorubral-Pallidoluysian Atrofi (DRPLA) ve Spinobulbar Müsküler Atrofi'dir (SBMA). SBMA hariç diğerleri otozomal dominant kalıtım gösterir. Tüm poliglutamin hastalıklarında CAG tekrar sayısındaki artışlar genlerin kodlayan bölgelerinde olmaktadır.

Poliglutamin hastalıkları orta yaşlarda başlayan, ilerleyici ve selektif nöronal dejenerasyon ile tanımlanır. Bu hastalıklarda nöronal kayıplar ve gliyoz gözlemlenir. Serebellar korteks, bazal gangliya, beyin kökü çekirdeği, serebellar dentat nükleus ve serebellumdaki Purkinje hücrelerinin poliQ toksisitesi sonucu etkilendikleri gözlenmiştir (Cummings vd., 2000).

Klinik semptomlar 40 yaş civarında görünmeye başlasa da, tekrar sayısının uzunluğuna bağlı olarak daha erken yaşlarda da hastalık semptomları görülebilir. Hastalık başlangıç yaşı tekrar uzunluğuyla ters orantılıdır. Tekrar sayısı artıkça, hastalık daha erken yaşta ortaya çıkar, daha hızlı ve daha şiddetli bir seyir izler. Bu olay antisipasyon olarak tanımlanır.

Poliglutamin alellerinin CAG tekrar sayıları, yol açtıkları fenotipe göre normal, intermedya ve patolojik aralık olarak üç gruba ayrılır. Normal aralıkta CAG tekrarına sahip bireyler sağlıklıdır. İntermedya aralıkta CAG tekrarına sahip bireyler kendileri hastalık semptomları göstermemelerine karşın bir sonraki jenerasyonda CAG tekrar sayılarının artarak patolojik aralığa ulaşma riskleri vardır. Patolojik aralık, bireylerde hastalık oluşturabilecek tekrar sayısını ifade etmektedir. SCA3'te 60 ve üzeri CAG tekrarı hastalığa neden olmaktadır. SCA 17'de ise CAG tekrarları arasında CAA dizileri bulunur. Bu bölmeler DNA dizisinin stabilitesini artırır. SCA17'de hastalığın ortaya çıkabilmesi için bölücü dizilerin kaybolması veya saf CAG tekrar sayısının 48 ve üzeri olması gerekmektedir.

Artmış sayıda glutamin tekrarı içeren proteinler agregasyona eğilimlidirler ve nöronların çekirdeğinde inklüzyon cisimcikleri oluştururlar. PoliQ hastalıklarındaki mutasyonların mutant protein birikimine ve bunu takip eden toksisiteye neden olarak hücre ölümüne sebep oldukları söylenebilir.

### **1.1.2. Kalıtsal Ataksiler**

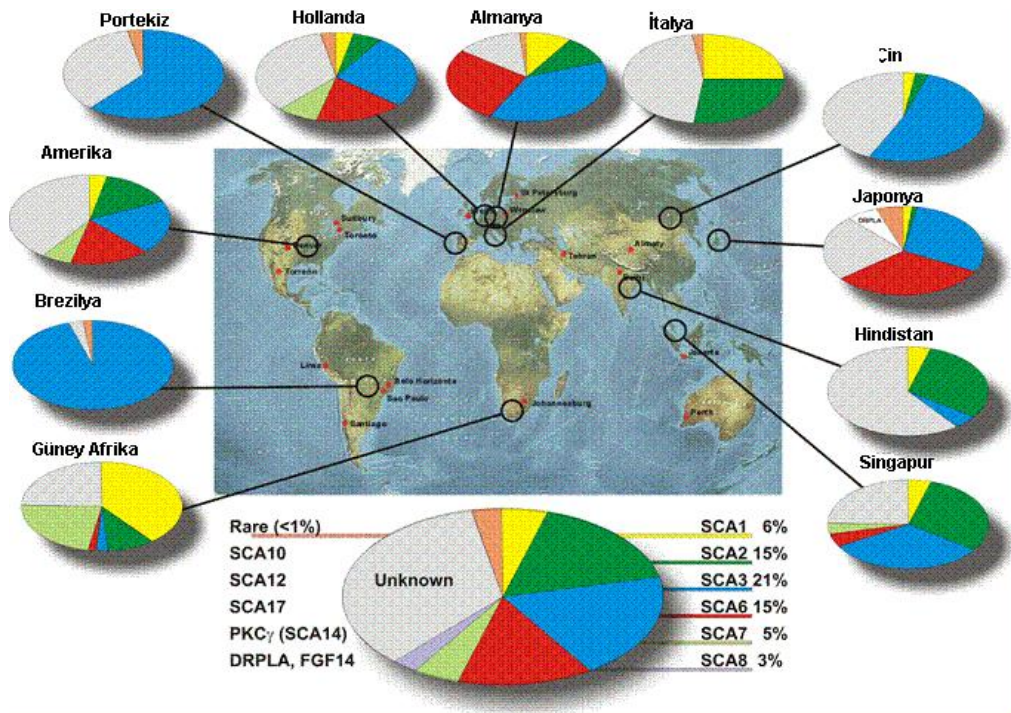
Kalıtsal ataksiler geniş bir hastalık grubunu kapsamakla birlikte konuşma, yürüyüş ve ellerde meydana gelen koordinasyon bozuklukları gibi ortak klinik belirtileri paylaşır. Kalıtsal ataksilerin dağılımı 3–27/100.000 arasında değişkenlik gösterir. Ataksilerin patolojisi nöronal kayıplar ve gliyoz gibi nöronal dejenerasyonlarla karakterize edilmektedir. Harding'in sınıflandırma kriterleri bu hastalıkları açıklamada ve ayırmada yardımcı olmasına rağmen, klinik belirtilerin örtüşmesi kliniksel tabanda ayrımı zorlaştırır (Harding, 1983). Kalıtsal ataksiler



kalıtım biçimine göre dört ana grupta toplanır. Bu gruplar otozomal dominant ataksileri (ADCA), otozomal resesif ataksileri (ARCA), mitokondriyal ataksileri ve X'e bağılı ataksileri kapsar (Harding, 1983; Furtado vd., 1998).

### 1.1.2.1. Otozomal Dominant Serebellar Ataksiler

Otozomal dominant ataksiler genetik sınıflandırmada spinoserebellar ataksiler olarak da adlandırılırlar. ADCA'lar serebellum ve beyin kökünde çeşitli derecelerdeki dejenerasyonlara göre sınıflandırılırlar. Bu dejenerasyonlar sonucunda pons, olives, bazal ganglia ve serebellumda farklı derecelerde nöronal kayıplar meydana gelir. Hastalık başlangıç yaşı çok değişkenlik gösterebilir; çocukluk dönemi veya çok ileri yaşlarda görülebilen geniş bir spektrumda yer alır. Yapılan vaka gözlemlerinde ortalama hastalık başlangıç yaşının 30–40 yaşları arasında olduğu belirlenmiştir. Otozomal dominant ataksilerin görülme sıklığı 3/100.000 olarak tahmin edilmektedir. ADCA'lar çok heterojen bir gruptur, farklı etnik popülasyon grupları arasında spesifik alt tiplerinin dağılımı farklılık gösterir. Bugüne kadar yapılan araştırmalarda SCA3' ün en yaygın tip olduğu bulunmuştur, bunu SCA2, 6, 1 ve 7 takip etmektedir. SCA tiplerinin dünyadaki dağılımı Şekil 1.1.'de gösterilmektedir.



Şekil 1.1. SCA tiplerinin dünyadaki dağılımı (www.geneclinics.org)

### 1.1.2.1.1. Klinik Sınıflandırma

ADCA'lar, hastalarda ataksiyle birlikte görülen nörolojik semptomlara göre Harding tarafından üç gruba ayrılmıştır (Harding, 1993):

1. ADCA tip I: Bu gruptaki hastalıklar serebellar sendromlarla tanımlanır ve hastalık başlangıç yaşı genellikle 15 ile 65 yaş arasında değişkenlik gösterir. Bu gruptaki hastalıklarda genel olarak gibi klinik belirtilerle tanımlanır. Ayrıca ADCA tip I' de çok yaygın olarak görünmese de oftalmopleji, optik atrofi, demans ve ekstrapiramidal sinyaller de gözlenir. Yapılan nöropatolojik çalışmalarda ve MRI değerlendirmelerinde serebellar atrofi ve beyin kökü atrofisi belirlenmiştir. SCA1, 2, 3, 4, 5 ve DRPLA, ADCA I ailesi kategorisinde sınıflandırılır (Harding, 1993, Furtado vd., 1998).

2. ADCA tip II: Bu gruptaki hastalıklarda ilerleyici makular dejenerasyonla birlikte serebellar ataksiler görülür. Hastalarda ataksi belirtisi görülmeden önce makular dejenerasyon görünebilir. Vakalarda görülen hastalık başlangıç yaşı genellikle 15–35 yaş grubu arasındadır. Bu grupta görülen oftalmopleji, demans, ekstrapiramidal sinyaller ADCA tip 1 ile klinik olarak örtüşmeler gösterse bile makular dejenerasyon varlığıyla ADCA tip 1'den ayrılır. ADCA tip II grubuna sadece SCA7 hastalığı dahildir (Harding, 1993; Furtado vd., 1998).

3. ADCA tip III: Bu gruptaki hastalıklar saf serebellar sendromlarla tanımlanmıştır. Bu ADCA tipinin karakteristik özelliği geç başlangıçlı olması ve genellikle hastalık belirtilerinin 50'li yaşlardan sonra ortaya çıkmasıdır. SCA6, 8, 12, 13, 14, 15, 16 ve 17 bu kategoride sınıflandırılır. (Harding, 1993; Furtado vd., 1998; Soong, 2002)

### 1.1.2.1.2. Klinik ve Genetik Özellikleri

ADCA'larda ayak ataksisi, uzuvlarda gözlenen ataksiler, serebellar dizartri, serebellar okülomotor bozukluklar, retinopati, optik atrofi, periferik nöropati, spastisite, epilepsi, ekstra-piramidal hareket bozuklukları gibi çeşitli geniş nörolojik semptomlar gözlenir. ADCA tiplerinin gösterdiği özellikler birbiriyle örtüşebildikleri gibi bazı özellikleri sayesinde diğer ADCA tiplerinden ayrılırlar. Mesela SCA7'de görülen okülomotor sinyaller diğer SCA tiplerinden ayrılmasını sağlar (Schöls vd., 2004). ADCA tiplerinin ayırıcı klinik özellikleri Tablo1.2. de özetlenmiştir.

Bu zamana kadar yapılan araştırmalarda 34 ADCA tipi (SCA1–23, 25–28, DRPLA, EA1–4, ADSA ve 16q22 ile ilişkili SCA) belirlenmiştir. ADCA'lar moleküler mekanizmaları açısından poliglutamin hastalıkları (SCA1, 2, 3, 6, 7, 17, DRPLA), kanal bozuklukları hastalıkları (EA1, EA2 ve SCA6) ve gen anlatımı bozuklukları (SCA 8, 10, 12) olarak üç büyük grup halinde incelenebilir. Bunların dışında etiyolojisi bilinmeyen birçok ADCA tipi vardır (SCA4, 5, 9, 11, 16, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 25, 26, 27, 28, EA3, EA4, ADSA). Bu hastalıkların genleri, lokalize oldukları bölgeler ve bu genleri ürünleri Tablo 1.3.'te gösterilmiştir.

Üçlü nükleotid tekrar artışları genin kodlamayan intronik (SCA10) bölgelerinde, 5' UTR (SCA12) ve 3' UTR (SCA8) bölgelerinde ve kodlayan ekzonik bölgelerinde meydana gelebilir. SCA1 hastalığı 6p23 kromozomunda lokalize olan ATXN1 geninde meydana gelir. ATXN1 geni 9 ekzona sahiptir ve genin 8. ve 9. ekzonunda CAG tekrar artışı gözlenir. SCA1'de patolojik alel uzunlukları 41 CAG tekrarından 83 CAG tekrarına kadar değişir. SCA2 hastalığı 12q24 kromozomunda bulunan ATXN2 genindeki tekrar sayısının artışından meydana gelir. ATXN2 geni 25 ekzondan oluşur ve tekrar artışları genin birinci ekzonunda meydana gelir. SCA2'de patolojik aleller 34 CAG tekrarından 77 CAG tekrarı arasında değişir. SCA1 ve SCA2 genlerinde CAG tekrar dizilerinin arasında sırasıyla CAA ve CAT tekrarları bulunur ve bu tekrarlar DNA dizisinin stabilitesini arttırır. SCA3 hastalığında CAG tekrar artışı 11 ekzona sahip MJD1 geninin C-terminal bölgesinde meydana gelir. SCA3'te patolojik alel frekansı 55-86 CAG tekrarı arasında değişir. SCA7 hastalığı 3p21.1-p12 kromozomunda lokalize olan ATXN7 genindeki CAG tekrar sayısının artışından kaynaklanır. CAG tekrar artışları bu genin 5' ucunda kodlanan bölgede ilk ekzonunda olur. Patolojik aralık 38 ve üzeri CAG tekrarıdır. SCA17 6q27 kromozomunda telomerik bölgeye yakın olan TBP genindeki CAA/CAG tekrar sayılarındaki artıştan meydana gelir. SCA17'de patolojik aralık ise 45 ile 68 CAG tekrarı arasında değişir. SCA 12 hastalığı PPPR2R2B geninin 5' UTR bölgesinde CAG tekrar sayısının 66 ve üzerinde olduğundan kaynaklanır. SCA 10 hastalığı fonksiyonu henüz detaylı olarak belirlenmemiş ataksin-10 geninin dokuzuncu intronundaki ATTCT beşli nükleotid tekrar sayılarındaki artış sonucu ortaya çıkar, patolojik sınır ise 800 ile 4000 ATTCT nükleotidi arasında değişir (şekil 1.2.)

Tablo 1.2. Otozomal dominant ataksilerin ayırıcı klinik özellikleri

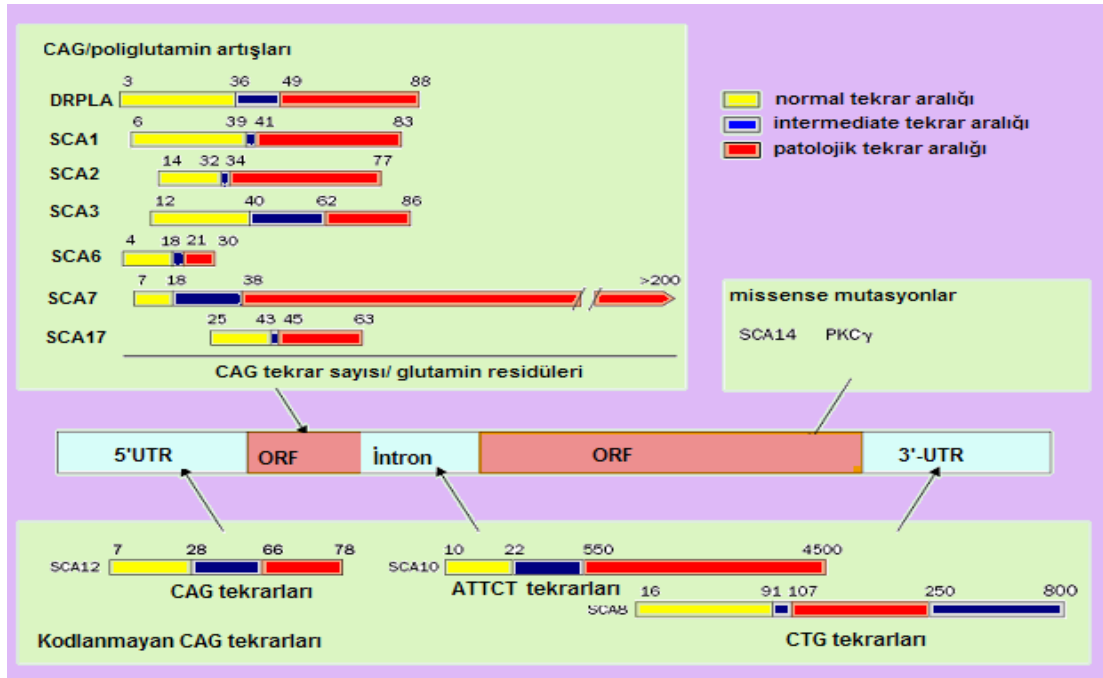
Hastalık	Ayırıcı klinik özellikler
SCA1	Piramidal sinyaller, periferik nöropati
SCA2	Yavaş sakkadik göz hareketleri, periferik nöropati, azalmış tendon refleksleri, demans
SCA3	Piramidal ve ekstra-piramidal sinyaller, göz kapağının çekilmesi, nistagmus, azalmış sakkadik hareketler, amiyotrofi fasikülasyonu, duyuusal kayıplar
SCA4	Duyusal aksonal nöropati, sağırılık
SCA5	Erken başlangıçlı, yavaş ilerleme
SCA6	Genellikle episodik ataksi, çok yavaş progresyon
SCA7	Retinopati ile görsel kayıplar
SCA8	Azalmış vibrasyon duygusu, nadir olarak kognitif bozukluklar
SCA10	Genellikle felç
SCA12	Yavaş bir progresyon izler, 30 yaşlarda tremor , demans
SCA13	Hafif mental retardasyon ve kısa boy
SCA14	Erken aksiyal miyoklonus
SCA15	Saf ataksi, çok yavaş progresyon
SCA16	Baş tremoru
SCA17	Mental retardasyon, miyoklonus, distoni ve kore
SCA19	Kognitif düzensizlik, miyoklonus ve tremor
SCA20	Erken dizartri, spazmodik disfoni, hiperrefleksi, bradikinezi
SCA21	Hafif kognitif düzensizlik
SCA22	Yavaş ilerleyen ataksi
SCA23	Dizartri, anormal göz hareketleri, azalmış vibrasyon ve pozisyon duygusu
SCA25	Duyusal nöropati
SCA26	Dizartri ve düzensiz göz hareketleri
SCA27	Erken başlangıçlı tremor, diskinezi, idrak kaybı
SCA28	Nistagmus, pitozis ve artmış derin tendon refleksler
DRPLA	Kore, felç, demans ve miyoklonus
EA1	Miyokimi, irkilme

Tablo 1.3. ADCA'ların gen lokusları ve ürünleri

Hastalık	Gen	Lokus	Gen Ürünü
SCA1	<i>ATXN1</i>	6p23	Ataksin-1
SCA2	<i>ATXN2</i>	12q24	Ataksin-2
SCA3	<i>ATXN3</i>	14q24.3-q31	Ataksin-3, Machado-Joseph hastalığı proteini-1
SCA4	<i>PLEKHG4</i>	16q22.1	Puratropin-1
SCA5	<i>SPTBN2</i>	11p13	Spektrin beta zinciri, beyin 2
SCA6	<i>CACNA1A</i>	19p13	Voltaja bağımlı P/Q-tipli kalsiyum kanalının alfa-1A alt ünitesi
SCA7	<i>ATXN7</i>	3p21.1-p12	Ataksin -7
SCA8	<i>KLHL1AS</i>	13q21	---
SCA9	---	---	---
SCA10	<i>ATXN10</i>	22q13	Ataksin -10
SCA11	<i>SCA11</i>	15q14-q21.3	Tau-tübülün kinaz 2
SCA12	<i>PPP2R2B</i>	5q31-q33	Serin/trionin protein fosfataz 2A'nın 55-kd'luk düzenleyici b alt ünitesi
SCA13	<i>KCNC3</i>	19q13.3-q13.4	Voltaj kapılı potasyum kanalı C alt ailesinin 3. üyesi
SCA14	<i>PRKCG</i>	19q13.4	Protein kinaz C, gama tipi
SCA15	<i>SCA15</i>	---	İnositol trifosfat 1,4,5-trifosfat reseptörü 1
SCA16	<i>SCA16</i>	8q22.1-q24.1	Kontaktin
SCA17	<i>TBP</i>	6q27	TATA-kutusuna bağlanan protein
SCA18	<i>SCA18</i>	7q22-q32	---
SCA19	<i>SCA19</i>	1p21-q21	---
SCA20	<i>SCA20</i>	11cen	---
SCA21	<i>SCA21</i>	7p21-15	---
SCA22	---	1p21-q23	---
SCA23	---	20p13-12.3	---
SCA25	<i>SCA25</i>	2p21-p13	---
SCA26	---	19p13.3	---
SCA27	<i>FGF14</i>	13q34	Fibroblast büyüme faktörü 14
SCA28		18p11.22-q11.2	---
DRPLA	<i>DRPLA</i>	12p13.31	Atrofin-1 ilişkili protein
EA1	<i>KCNA1</i>	12p13	Voltaj kapılı potasyum kanalı alfa alt ailesinin 1. üyesi
EA2	<i>CACNA1A</i>	19p13	Voltaja bağımlı P/Q-tipli kalsiyum kanallarının alpha-1A alt ünitesi
	<i>CACNB4</i>	2q22-q23	Voltaja bağımlı L-tipli kalsiyum beta-4 alt ünitesi
HSA	<i>SAX1</i>	12p13	---

### 1.1.2.1.3. Tekrar İnstabilitesi ve Genetik Testler

SCA tiplerinde tekrar uzunluklarıyla hastalık başlangıç yaşı ters orantılıdır. Normal tekrar uzunluğuna sahip bireyler tamamen sağlıklıdır. İntermedya tekrarlar ise bir sonraki nesile aktarılırken artma eğilimi gösterirler. Bu nedenle intermedya aralığa sahip bireylerde küçük artmalar premütasyon özelliği gösterirler ve böylece hastalık bir sonraki nesilde aile hikayesinden bağımsız sporadik kökenli mutasyonları ortaya çıkarabilir. Araştırmacılar SCA2 ve SCA6 genlerindeki tekrar artışının %8'den fazlasının sporadik kökenli olduğu bulmuşlardır (Schöls vd., 2002; Moseley vd., 1998; Schöls vd., 2004). Uzamış tekrarlar stabil değildir ve uzamaya meyilli olduklarından bir sonraki jenerasyonda hastalığın erken yaşta başlamasına ve şiddetli bir fenotip ile görünmesine neden olurlar. Tekrarların jenerasyonlar arasında aşırı derecede artması hastalıkların çocukluk çağında başlamasına sebep olur. Bundan dolayı presemptomatik testler hastalık başlangıç yaşı için bir tahmin vermez. SCA7 ve SCA2 hastalığı görülen bireylerin spermelerinde uzamış tekrarlar tespit edilmiştir (Maciel vd., 1997; Monckton vd., 1999; Benton vd., 1998; Schöls vd., 2004).



Şekil 1.2. ADCA'larda tekrar sayıları (Schöls vd., 2004).

Birçok SCA tipinde genlerinin kodlayan bölgelerindeki CAG tekrar sayısındaki artış nedeniyle bu genlerin ürünleri olan proteinler de etkilenmektedir. SCA6 ve 17 haricindeki diğer SCA tiplerinin proteinlerinin fonksiyonları bilinmemektedir. Poliglutamin tekrar artışının sebep olduğu etkilenmiş proteinler ortak bir zincir ve domaine sahip değildir. Bu yüzden patogenezin direkt olarak uzamış poliglutamin zinciriyle ilişkili olduğu kabul edilmektedir. Transgenik farelerde yapılan çalışmalarda uzamış poliglutamin tekrarları eksprese olduğunda poliglutamin hastalıklarına benzer nörolojik özellikler gösterdikleri tespit edilmiştir (Zhuchenko vd., 1997; Koide, vd., 1999; Nakamura vd., 2001; Zoghbi vd., 2000; Ordway vd., 1997). Uzamış CAG tekrarı içeren mutant proteinler hücrenin çekirdeğinde çözünmeden biriken inklüzyonlar oluştururlar. SCA2 beyin örneklerinde agregatlar nükleus ve sitoplazmada bulunurken, SCA 6 agregatlarına sadece sitoplazmada rastlanmıştır (Ishikawa vd., 1999; Schöls vd., 2004). Nöron uzantılarına lokalize olan agregatlar aksonal trafiği bloke ederek nörodejenerasyona sebep olmaktadır (Gunawardena vd., 2003; Szebenyi vd., 2003). Ayrıca mutant genle etkileşimde olan bazı proteinler spesifik hücre ölümüne sebep olmaktadır. SCA1 hastalarında LANP (lösence zengin asidik nüklear protein) proteiniyle ataksin 1'in interaksyonu sonucunda Purkinje hücrelerinde nörodejenerasyona sebep olurlar (Matilla, 1997). SCA7 hastalarında CRX (kon-rod homeobox) proteiniyle interaksyon yapan ataksin7'nin retinal dejenerasyona neden olduğu bulunmuştur (La Spada, 2001). Yapılan nöropatolojik çalışmalarda Purkinje hücreleri, substansiya nigra, inferyor olive, bazal ganglia ve serebellar korteks gibi beyin bölgelerinin etkilendiği bulunmuştur (Sasaki vd., 1995; Schöls vd., 1996; Sequeiros ve Coutinho, 1993; Matsumura, 1997; Enevoldson, 1994) .

### **1.1.2.2. Spinoserebellar Ataksi Tip 3**

SCA3, Machado-Joseph hastalığı (MJD) , Azor tipi ataksi olarak da tanımlanan bir otozomal dominant serebellar ataksidir. 1970'li yıllarda Amerika'da, Portekiz'in Azor adalarından göç eden üç farklı ailede (Machado, Thomas ve Joseph aileleri) farklı sendromlarla tanımlanmıştır (Nakano vd., 1972; Woods ve Schaumburg, 1972; Rosenberg vd., 1972). Araştırmacılar bu üç ailede benzer polimorfik hastalık olduğunu belirlemişlerdir (Coutinho ve Andrade, 1978; Romanul vd, 1977). Daha sonraları araştırmacılar bu hastalığın sadece Portekizlilerle sınırlı olmadığını, etnik ve coğrafik

olarak uzakta bulunan Avustralya'daki Aborjinlerde, Japonlarda, Kanadalılarda, Çinli ve Hintli popülasyonlarında da görüldüğünü belirtmiştir (Sequeiros ve Coutinho, 1993). Hastalık 14q24.3-q31 kromozomunda CAG tekrar sayılarındaki artış sonucu ortaya çıkar (Takiyama vd., 1994). SCA3 ilerleyici bir serebellar ataksidir ve distonik-rijid, ekstra-piramidal sendromlar veya periferik amiyotrofi gibi çeşitli piramidil sinyallerle tanımlanır (Lima ve Coutinho, 1980).

#### **1.1.2.2.1. Klinik Özellikleri**

SCA 3, başlangıç yaşı değişken olmakla birlikte genellikle 20–50 yaşları arasında görülür. Portekizli hastalarda yapılan çalışmalarda hastalığın ortalama başlangıç yaşı 37 olarak belirlenmiştir. SCA3 lokusundaki CAG tekrar sayıları ile hastalık başlangıç yaşı kesin olarak ilişkilendirilememektedir. SCA3 hastalarında yürüme ve konuşma zorlukları, hantallık, görme bulanıklıkları ve diplopi gibi klinik belirtiler gözlenir. Hastalık semptomları erken yaşlarda başlayan hastalarda ilerleyici ataksi, hiper refleks, nistagmus ve dizartridir (Coutinho ve Andrade, 1978; Sequeiros ve Coutinho, 1993; Klockgether, 2000; Soong, 2002; Schöls vd., 1995).

Hastalık ilerledikçe hareket zorluğu yaşanır ve 10–15 yıl sonra hastalar tekerlekli sandalye gibi yardımcı aletlere ihtiyaç duyarlar. Hastalarda sakkadik göz hareketleri yavaşlar, görme bozuklukları ve sabit bakış gelişir. Diskonjuge göz hareketleri sonucunda diplopi başlar ve aynı zamanda beyin kökünde çeşitli sinyaller gelişerek temporal fasiyal atrofi, perioral seğirmeler gibi karakteristik hareketleri indüklerler. Ek olarak dil atrofisi, disfaji, öksürme zorluğu gözlemlenir. Genellikle hastalık başlangıcında motor nöron sinyallerinin arttığı belirgin olarak tespit edilmiştir. Hastalığın ileri safhalarında distal duyumlarda kayıplarla birlikte periferik polinöropatiler görülmektedir. Ayak bileklerinde refleks azalması ile birlikte diğer reflekslerde azalma başlar, kaslarda belli derecelerde hareket kaybı gözlenir. Ses teli paralizisi, vestibular disfonksiyon, mesane ve termo-regülasyon bozukluklarını içeren otonomik problemler, uyku düzensizliği, hızlı göz hareketi, davranış bozuklukları ve huzursuz bacak sendromu gibi belirtiler de gözlemlenebilir (Isozaki vd., 2002; Yoshizawa vd., 2004; Yeh, vd., 2005; Friedman, 2002; van Alfen vd., 2001; Friedman vd., 2003).



MJD hastalığı, Azor popülasyonunda yaygın olarak görülen ekstra-piramidal ve oftalmolojik bulgular temel alınarak üç alt grupta sınıflandırılmıştır (Coutinho ve Andrade, 1978).

Tip I: SCA3 tipleri arasında hastaların %13'ü bu gruba girer. Genç yaşlarda başlayan bir hastalıktır (10–30 yaş). İlk olarak Joseph ailesinde 5 yaşındaki bir bireyde görülmüştür (Rosenberg vd., 1972). Hızlı bir seyir izleyen hastalık çeşitli derecelerde serebellar fonksiyon bozuklukları, belirgin ekstra-primidal ve piramidal anormalliklerle karakterize edilir. Genellikle kollarda, bacaklarda ve yüzde distoni, rijidite ve hafif ataksiler bu grubun klinik özellikleridir (Lu vd., 2004).

Tip II: SCA3 tipleri arasında hastaların %57'si bu gruba girer. Genellikle 30–50 yaşlar arasında görünür. İlerleyici ataksilerle birlikte piramidal sinyaller ve beyin kökünde fonksiyon bozukluklarıyla karakterize edilmiştir. Bu grupta Tip I'de görülen ekstra-primidal sinyaller gözlenmez. Spastik yürüme bozukluğu, hiperaktif refleks, klonus, ekstensor plantar cevaplar ve spinal otomotizm genel klinik belirtileridir (Landau vd., 2000).

Tip III: SCA3 tipleri arasında hastaların %30'u bu gruba girer. Hastalık semptomları ilerlemiş yaşlarda (40–70 yaş) gözlenir. İlk olarak Machado ailesinde gözlenmiştir. Bu gruptaki hastalarda distal simetrik periferik nöropatiler, kas krampları, motor nöronların kaybı, distal kayıplar ve duyumsal nöropatiler göze çarpar.

Bu alt tipler arasındaki ayırım çok belirgin olmasa da bu sınıflandırma, geniş bir fenotip yelpazesi olan SCA3/MJD'de, araştırmacılar ve klinisyenler açısından ayırimda yardımcıdır. Bazı araştırmacılar Parkinsonizm tipi bulguları göz önünde bulundurarak MJD hastalığını dört gruba ayırır (Klockgether, 2000).

#### **1.1.2.2.2. Nöropatolojik Özellikleri**

Patolojik belirtiler olarak gliyöz ve nöronal kayıplar sonucu özgün bölgelerde dejenerasyon gözlenir. Dejenerasyon sonucunda globus pallidus, kara cisim, subtalamik nükleus, dentat nükleus, pontine nükleus, çeşitli kranial sinir nükleusları (III, IV, VI, VII, VIII ve X), anteryor horn hücreleri ve klark kolonları etkilenir. İlerlemiş yaşlarda başlayan hastalıklarda periferik nöropatiler yaygın olmasına rağmen çok çeşitlidir ve genellikle simetriktir (Takiyama vd., 1994; Sachdev vd., 1982; Durr vd., 1996; Cancel vd., 1995; Rub vd., 2002, 2004a, 2004b, 2006).

Manyetik rezonans görüntüleme (MRI) bulguları; SCA3/MJD hastalarında patolojik özelliklerin geniş bir oranda olması MRI anormalliklerinin oluşmasını sağlar. SCA3/MJD’de yaygın olarak gözlenen anormallikler dördüncü ventriküldeki genişlemelerle belirlenir. (Burk vd., 1996; Onodera vd.,1998). Bu genişleme beyin kökü ve serebellumdaki atrofilerin varlığını kanıtlamaktadır. MRI bazlı bir volumetrik çalışmada putaminal kaudat atrofi gözlemlenmiştir. (Klockgether vd.,1998).

### 1.1.2.2.3. Moleküler Genetik Özellikleri

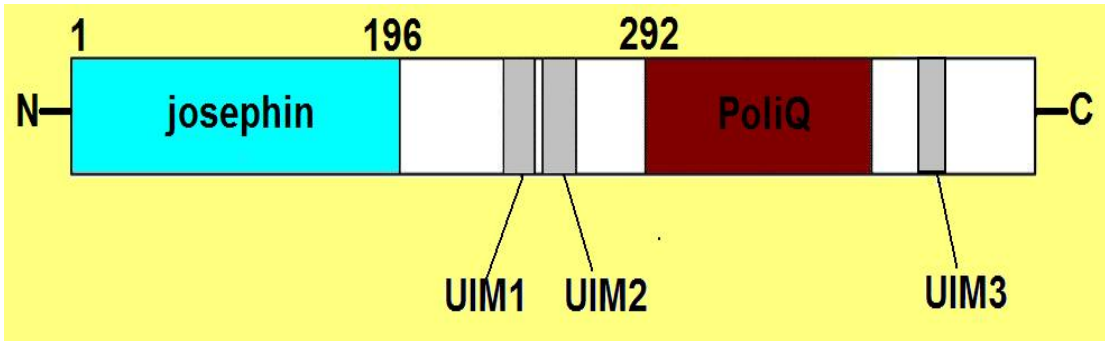
SCA3, 14q24.3-q31 kromozomunda CAG tekrar sayılarındaki artış sonucu ortaya çıkar (Takiyama vd.,1994; Kawaguchi vd., 1997). SCA3 normal alellerinin %93,5’inde gözlenen tekrar sayısı 31’den daha az tekrar içerir. İntermedya aralık ise şu ana kadar ortaya çıkan fenotiplerle belirlenememiştir. İndirgenmiş penetrans aralığındaki bireyler 45–51 CAG tekrarı taşırlar ve bazı bireylerde hastalık ortaya çıkmasına rağmen diğer bazı bireylerde görülmez. Patolojik aralık ise 55’den fazla CAG tekrarı içerir (Padiath vd., 2005; Gu vd., 2004).

Diğer CAG hastalıkları gibi SCA3’te de hastalık başlangıç yaşı ile tekrar sayısının uzunluğu arasında negatif korelasyon vardır. Bu da antisipasyonun varlığına işaret etmektedir. SCA3’te CAG tekrarları mayotik instabilite gösterir. Tekrar instabilitesi için yapılan birçok çalışmada babadan veya anneden geçen mutasyonlarda bir farklılık gözlemlenmemiştir (Durr vd., 1996; Cancel vd., 1995; Soong, 2002). Fakat bazı araştırmacılar babadan aktarılan mutasyonlarda instabilitenin arttığını belirtmişlerdir (Maciel, 2001).

ATXN3 geni 11 ekzona sahip, 1776 bç uzunluğunda bir ORF bölgesi içerir (Ichikawa, Y. 2001; Kawaguchi, Y. 1994). Polimorfik CAG tekrarları C-terminal bölgesine yakın olan 4. ekzonda bulunur ve 3’ kodlanmayan bölgede Alu tekrar dizileri tarafından takip edilir. Birçok çalışmada normal bireylerde yaygın olarak gözükten CAG tekrar sayısının 14 ve 23 CAG tekrarı olduğu bulunmuştur (Rubinsztein vd., 1995; Limprasert vd., 1996). Farklı populasyonlardaki poliQ bölgelerinin analizinde CAG tekrarlarına komşu olan guaninin, sitozin ile yer değiştirdiği belirlenmiştir. Bu nedenle sitozinin poliQ zincirlerinin instabilitesinde önemli rol oynadığı düşünülmektedir (Rubinsztein, D.C. Lego, J. 1995, Limprasert, P. 1996).

Ataksin 3 proteininin moleküler ağırlığının 42 kDa olduğu tahmin edilmektedir. Western blot analizlerinde eksprese edilmiş proteinin 72 kDa olduğu bulunmuştur. Geniş bir spektrumda eksprese edilen Ataksin3, birçok hücre tipinin hem nükleusunda hem de sitoplazmasında bulunur ve nöronlarda sitoplazmik bir proteindir (Paulson vd.,1997). Bu moleküler farklılıklar glutamin tekrar uzunluğuna ve nükleotitdeki 1118 (A>C) polimorfizmine bağlıdır. Bu polimorfizm ile birlikte, stop kodonundaki 16 amino asidlik tirozin kalıntılarının uzamasının hastalıkla ilişkili olduğu belirlenmiştir (Paulson vd., 1997). Ataksin3 ubikütün zincirlerine bağlanan ve kesen spesifik ubikütün proteazdır (Burnett ve Li, 2003; Berke vd.,2005). Sistein proteazlardan papain süper ailesine ait iyi derecede korunmuş amino terminalinde, “Josephin” domainde katalitik amino asit -Cys, His, Asn-triatları içerdiği bulunmuştur (Nicastro vd., 2005). Bu Josephin domaini ataksin3’ün fonksiyonel bölgesindedir ve hem patolojik hem de normal protein fonksiyonlarında görev alır. Yapılan çalışmalarda josephin domaininin HHR23A, HHR23B proteozom bağlanma faktörleri, proteozomla ilişkili olan Rad23 ve histonlar gibi ataksin3 partnerlerine sıkı bir şekilde bağlandığı gözlemlenmiştir (Nicastro vd., 2005; Chow vd., 2004). Proteinin karboksil ucunda poliubikütün zincirine sıkı bir şekilde bağlanan ubikütün ile etkileşim yapan motifler (UIMs) içerir. PoliQ dizisi UIM2 ve UIM3 arasında yer alır, fakat proteinin enzimatik fonksiyonuna nasıl etki ettiği bilinmemektedir (Şekil 1.3.). Ataksin 3’ün N-terminal bölgesi stabil bir yapıya sahipken C-terminal bölgesinin stabil olmayan bir yapıya sahip olduğu belirlenmiştir (Masino vd., 2004; Chow vd., 2004).

Hastalık mekanizmasında ataksin 3 proteinindeki poliQ sayısındaki artışa bağlı olarak mutant ataksin 3 proteini yanlış katlanır ve agrege olur. Bu proses çeşitli hücre modelleri, transgenik hayvan modelleri gibi *in vitro* çalışmalarda modellenmiştir (Cemal vd., 2002; Evert vd., 2006; Evert vd., 1999). Farklı uzunluklarda CAG tekrarına sahip transgenik farelerle yapılan çalışmalar mutant protein eksprese eden farelerin pontin ve dentat nükleuslarında inklüzyon cisimcikleri oluşturduğu ve hücre ölümünün meydana geldiği belirtmiştir. Bu farelerde periferal sinir demiyelinazasyonu ve aksonal kayıplar tespit edilmiştir (Cemal vd., 2002). Meyve sinekleriyle yapılan deneylerde normal ataksin3 proteininin poliQ dejenerasyonunu baskıladığı ve yanlış katlanmış proteinleri agrezoma gönderdiği gözlemlenmiştir. Sonuç olarak hücrede ataksin3 proteinin kalite kontrol yollarında görev aldığı düşünülmektedir (Nicastro vd., 2005; Chow vd., 2004).



Şekil 1.3. Ataksin 3 domaini

### 1.1.2.3. Spinocerebellar Ataksi Tip 6

SCA 6, ADCA III ailesinde sınıflandırılan bir otozomal dominant serebellar ataksidir. Yetişkinlerde görülen bu hastalık dizarti, nistagmus ve yavaş ilerleyen bir serebellar ataksi ile karakterize edilir. SCA 6'nın dağılımı coğrafi bölgelere ve kurucu etkilere göre çeşitlilik gösterir ancak SCA 6 dağılımı 0.02–0.31/ 100.000 arasında kabul edilir (Geschwind vd., 1997; Ikeuchi vd., 1997; Matsumura vd., 1997). SCA6 otozomal dominant kalıtım gösterir ve 19p13 kromozomunda CACNA1A genindeki CAG tekrarlarının artması sonucunda meydana gelir. Hastalık başlangıç yaşı 19–71 yaşları arasında değişkenlik göstermekle birlikte, genellikle 50'li yaşlardan sonra ortaya çıkar (Zhuchenko vd.,1997; Ishikawa, K. 1997).

#### 1.1.2.3.1 Klinik Özellikleri

SCA6 hastalarının %90'ında başlangıç semptomları olarak yürüyüş bozuklukları ve denge kaybı gözlenirken ek olarak bazı hastalarda dizartri de gözlenir. Semptomlar yavaş ilerler, bütün hasta kişilerde yürüyüş ataksisi, eklemlerde koordinasyon bozuklukları ve tremor görünür. Bazı hasta gruplarında ise disfaji gözlemlenmiştir (Zhuchenko vd., 1997; Ishikawa vd., 1997; Gomez vd., 1997; Geschwind vd.,1997; van de Warrenburg vd., 2005).

SCA 6 hastalarının %50'sinde diplopi görülür ve bu hastaların hareket eden objelere odaklanmakta zorluk çektikleri gözlemlenmiştir. Horizontal sabit nistagmus hastaların hemen hemen tamamında görülürken, vertikal nistagmus hastaların yarısından fazlasında görülür. Bazı hastalarda da dismetrik sakkadik hareket gibi

farklı serebellar okülomotor bulgular bulunmuştur. (Hashimoto vd., 2003; Buttner vd., 1998; Yabe vd.,2003)

Ayrıca SCA6 hastalarının %40–50’ sinde kortokospinal yollarda hiperrefleks ve ayak kaslarında resposlar gözlenmiştir. Hasta bireylerin %25’inden fazlasında distoni ve blefarospasm gibi basal gangliya sinyalleri bulunmuştur. Ayrıca SCA 6 hastalarında kognitif yeteneğin korunduğu gözlemlenmiş ve nörofizyolojik testlerde algılama yeteneğinde bir zarar meydana geldiği saptanmamıştır (Globas vd., 2003).

#### **1.1.2.3.2. Nöropatolojik Özellikleri**

SCA 6 patolojisi genelde serebellar kortekste Purkinje hücrelerinin dejenerasyonu ile ilişkilidir (Zhuchenko vd., 1997; Gomez vd., 1997). SCA 6 hastalarının beyinlerinde yapılan postmortem analizlerde serebellar atrofiye bağlı olarak Purkinje hücrelerinde selektif dejenerasyon gözlemlenmiştir (Ishikawa vd., 1999; Restituito vd., 2000). Ayrıca serebellumun vermal bölgesinin orta kısımlarında aşırı derecede dejenerasyon gözlemlenmiştir (Restituito vd., 2000). Hastalık ilerledikçe granül hücrelerinde dejenerasyon başladığı saptanmıştır (Kordasiewicz ve Gomez, 2007).

#### **1.1.2.3.3. Moleküler Genetik Özellikleri**

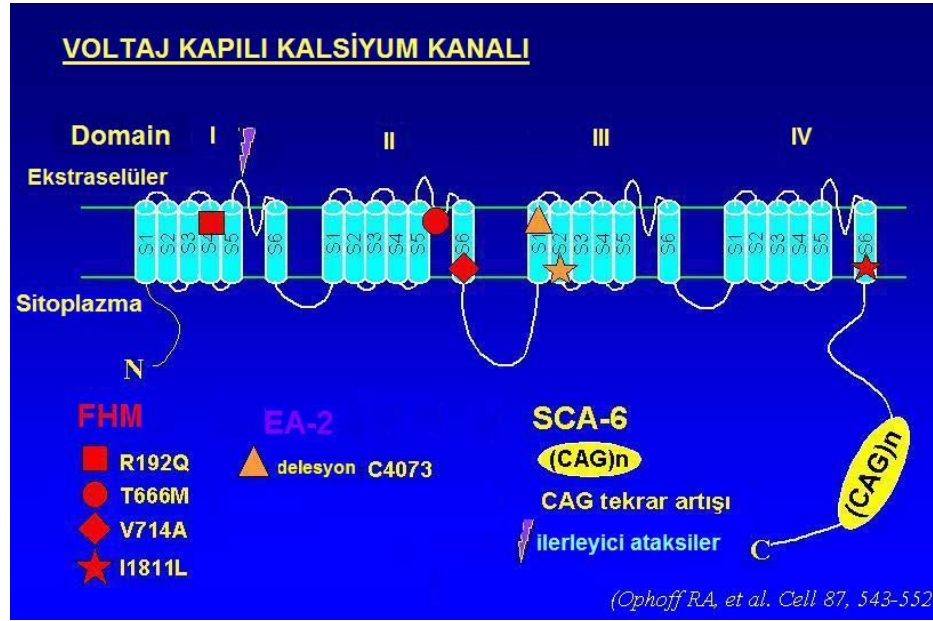
CACNA1A geni 47 ekzon içerir ve CAG tekrarları genin 3’ ucunda bulunur.  $\alpha_{1A}$  voltaja bağımlı kalsiyum alt ünitesini kodlayan CACNA1A genindeki tekrar artışı sonucu SCA 6 hastalığı meydana gelir. Normal CAG tekrar aralığı 18 veya daha azdır (Shizuka vd., 1998). 19 CAG tekrarı intermedya aralık olarak kabul edilmiştir, fakat bu tekrar sayısının klinik açıdan anlamı tam olarak belirgin değildir. (Shimazaki vd., 2001; Mariotti vd., 2001). 19 CAG tekrarına sahip bir bireyin hastalık belirtileri gösterdiği tespit edilmiştir (Mariotti, C. 2001). SCA6’ da patolojik tekrar aralığı 20–33’ tür (Jodice vd., 1997; Yabe vd., 1998). Ortalama olarak hastalığa sebep olan tekrar sayısı ise 22 CAG tekrarıdır. Hastalığın semptomları genellikle 50’li yaşlarda başlar.

Heterozigot bireylerde SCA6 semptomları görülme yaşı ile CAG tekrar uzunluğu arasında negatif bir korelasyon olmasına rağmen homozigot bireyler için bir yorum yapılamamaktadır (Gomez vd., 1997; Schöls vd., 1998). Maysuma ve Yabe’nin yaptığı çalışmada CAG tekrar uzunluğu 30 ve 33 olan iki homozigot

bireyde tekrar sayısı 22 olan homozigot bireylere göre daha ileriki yaşlarda hastalık başladığı rapor edilmiştir (Matsuyama vd., 1997; Yabe vd., 1998).

Voltaj kapılı kalsiyum kanalları, por formundaki  $\alpha_1$  alt ünitesi, regülatör ve yapısal alt üniteleri ile multimerik kompleks yapıdadır ( $\alpha_2/\delta_2$ ,  $\beta$  ve  $\gamma$ ). Farklı genlerin kodladığı A-E, G-I ve S gibi  $\alpha_1$  alt ünitesi ailesi belirlenmiştir (Catterall, 2000).  $\alpha_{1A}$  alt ünitesi beynin hemen hemen her bölgesinde eksprese edilirken serebelar purkinje hücrelerinde ise çok fazla miktarda eksprese edilir (Fletcher vd.,1998).  $\alpha_{1A}$  alt ünitesi 4 homolog domain (I den IV kadar) ve altı tane de membran aralıklı domain (S1-S6) içerir (Zhuchenko vd., 1998). I-IV domainlerinin segmentleri por yapısındadır ve S5-S6 arasında yer alır. Bu kanalın görevi membran depolarizasyonuna bağlı olarak selektif kalsiyum permeabilitesini sağlamaktır.

CACNA1A genindeki mutasyonların 4 tip nörolojik hastalıkla ilişkili olduğu bilinmektedir (Şekil 1.4.). Birinci tip mutasyon genin 3'ucunda CAG tekrarları sayısındaki artmalardır. Bu mutasyon SCA 6 hastalığına yol açar. İkinci tip mutasyon tek bir amino asitte değişikliğin olduğu sessiz mutasyonlardır. Sessiz mutasyonlar ailesel hemiplejik migrene (FHM) sebep olurlar. Bazı FHM hastalarında serebellar atrofi ve hafif interiktal ataksi gelişir. Ek olarak hızlı ilerleyen şiddetli ataksili hastalarda sessiz mutasyonların kanal porlarının fonksiyonunu bozduğu düşünülmektedir (Kraus vd., 1998; Battistini vd., 1999; Hans vd., 1999, Kordasiewicz ve Gomez, 2007). Üçüncü tip mutasyon çeşidi anlamsız mutasyondur ve kesilmiş kanal proteinlerini oluşturduğu tahmin edilir. Bu mutasyonlar EA-2 ailelerinde bulunmuştur. Anlamsız mutasyon taşıyan bazı hastalar da FHM özelliklerine sahiptir. Dördüncü tip mutasyon CACNA1A genindeki p.Gly293Arg ve p.Arg1664Gln bölgelerinde meydana gelen yanlış anlamlı mutasyonlardır (Yue vd., 1997). Bu gruba dominant kalıtılan ataksiler girer. SCA 6 ile benzer özellikler göstermelerine rağmen klinik semptomları SCA6'ya göre daha şiddetlidir (Kraus vd.; 1999).



Şekil 1.4. P/Q tipli kalsiyum kanalının alfa 1A alt ünitesinin yapısı ve mutasyonların meydana geldiği bölgeler (Ophoff vd., 1996).

#### 1.1.2.4. Spinocerebellar Ataksi Tip 7

SCA7, olivo-ponto-serebellar atrofi tip III (OPCA III) veya ADCA tip II olarak da tanımlanan ilerleyici makular dejenerasyonla ilişkili otozomal dominant serebellar ataksi tipidir (Konigsmark ve Weiner, 1970; Harding, 1982, 1983). Hastalık 3p21.1-p12 kromozomu lokusunda CAG tekrar sayılarındaki artış sebebiyle meydana gelir. Yetişkin hastalarda dizartri ve disfaji gözlenir. Hastalarda kon-rod ve retinal distrofi santral görme kayıplarına sebep olur. Görme kayıpları sonucunda hastalarda körlük meydana gelir (Enevoldson vd., 1994). Birçok SCA7 hastasında retinopatilerin görülmesinden dolayı, SCA7 diğer ADCA tiplerinden ayrılır.

##### 1.1.2.4.1. Klinik Özellikleri

Klinik olarak yetişkinlerde 30-40'lı yaşlarda görülen hastalığın ortalama başlangıç yaşı 30'lu yaşlardır. (Martin vd., 1994; Holmberg vd., 1995; Jöbssis vd., 1997; Gouw vd.,1995). Bebeklik veya çocukluk döneminde ataksi açıkça belli olmayabilir ama kas zayıflığı, halsizlik ve hipotoni yaygın olarak gözlenir ve hastalık seyri hızlı ilerlemektedir (Enevoldson vd., 1994). Bunlara ek olarak 180, 200, 306 CAG tekrarına sahip hastalarda neonatal hipotonik gelişim bozukluğu, disfaji,

konjestif kalp bozukluğu, serebral ve serebellar atrofi ve retinal bozukluklar gözlemlenmiştir (Ansorge vd., 2004; Benton vd., 1998).

Yetişkinlerde gözlenen retinal dejenerasyon sonucunda santral görme keskinliğinde ve renkleri ayırt edebilme yetisinde anormallikler meydana gelir. Bu anormallikler serebellar bulgular olmadan önce, genellikle ergenlik çağlarının son dönemlerinde gözlenir. Retinal dejenerasyonlar ilerleyicidir ve kon-rod distrofisi sonucunda körlük meydana gelir (Aleman vd., 2002). Yetişkinlerde retinal dejenerasyonun erken evrelerinde semptomlar gözükmebilir fakat makulada küçük granüler değişimler ve tritan aksiste bozukluklar meydana gelir. Başlangıçta fotopik cevap azalır ve bunu takiben de skotopik cevapta da azalmalar meydana gelir. Bu kon fonksiyonundaki önemli azalma, görsel keskinlikte azalmalara neden olur ve sonuçta makulada değişiklikler gözlenir. Böylece renk ayırımı yetisi kaybolur ve sonuçta nihai olarak körlük meydana gelir (To vd., 1993; Ahn vd., 2005). Bilinç kaybı ve psikoz çok yaygın gözükmebilir fakat birkaç hastada bu semptomlar gözlemlenmiştir (Benton vd., 1995). SCA7 hastalığının kendisine özgü klinik ve patolojik bulguları olmasına rağmen diğer SCA tipleriyle klinik özellikleri bakımından örtüşebilir. SCA7'nin ayırt edici en önemli özelliği retinal dejenerasyondur.

#### **1.1.2.4.2. Nöropatolojik Özellikleri**

Nöropatolojik çalışmalarda serebellum ve serebellumla ilişkili inferiyör oliv, serebellar korteks, dentat nükleus, pontin nükleus, bazal ganglia ve spinal kord'da nöronların aşırı kaybı ve gliyoz gözlemlenmiştir (Enevoldson vd., 1994; Martin vd., 1994; Gouw vd., 1994; Cancel vd., 2000) Purkinje hücrelerindeki dejenerasyon sonucunda dentat nükleusta hafif hücrel kayıplar meydana gelir. İnferyör oliv de astrositik gliyozla belirlenen aşırı derecede nöronal kayıplar gözlemlenmiştir (Lebre ve Brice, 2003).

SCA7'nin ayırıcı nöropatolojik özellikleri retinal, optik yollarda meydana gelen dejenerasyonlardır. Retinal dejenerasyon sonucunda optik sinirler ve pregenikülat görsel yollar etkilenir. Retinadaki patolojik çalışmalar özellikle parafoveal ve foveal bölgelerdeki, granüler hücrelerde ve bipolar fotoreseptörlerde dejenerasyonların meydana geldiğini göstermiştir. İlerleyen aşamalarda epitelyal pigment hücrelerinde düzensiz kayıplar meydana geldiği belirlenmiştir (Lebre ve Brice, 2003).



### 1.1.2.4.3. Moleküler Genetik Özellikleri

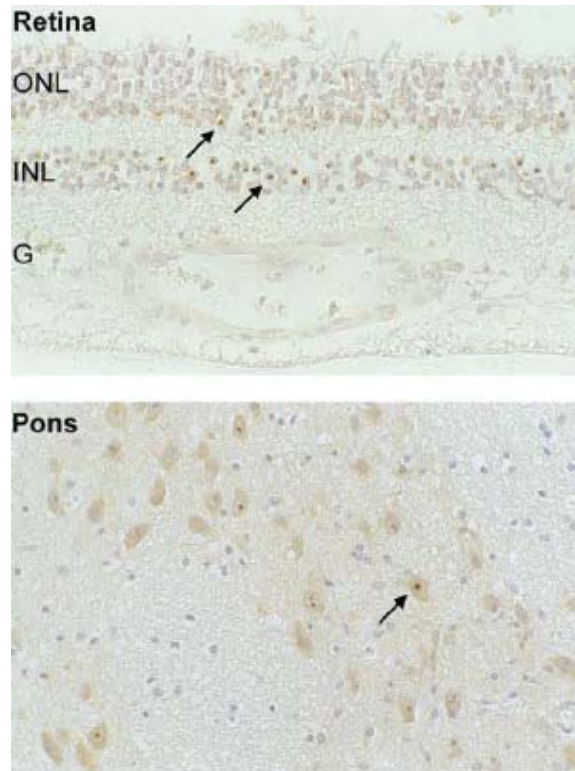
SCA7’ de normal aleller 19 veya daha düşük CAG tekrarı içerir. Normal alellerin %75’i 10 CAG tekrarına sahiptir. İntermedya aralık mayotik olarak stabil değildir ve 30–35 CAG tekrara sahip aleller bir sonraki jenerasyonda artma eğilimi gösterirler. (Lebre ve Brice, 2003, Mittal ve Roy, 2005). Patolojik alel frekansı 36 CAG tekrardan 460 CAG tekrara kadar değişebilir (Nardacchione vd., 1999; van de Warrenburg vd., 2001).

CAG ekspansiyonları ile hastalık başlangıç yaşı arasında kuvvetli bir negatif korelasyon vardır. SCA7’nin fenotipi diğer poliQ hastalıklarıyla karşılaştırıldığında hastalıkla diğer genetik ve çevresel faktörlerin çok az rolü olduğu belirlenmiştir. ADCAIİ ailelerinde uzamış CAG tekrarlarının babadan aktarıldığı tespit edilmiş ve her jenerasyon sonrası semptomların şiddetlenerek arttığı belirlenmiştir (Andrew vd., 1997).

136.094 baz uzunluğundaki Ataksin 7 geni 892 aa’lık proteini kodlar. Polimorfik CAG dizisi genin 5’ ucunda kodlanan bölgede ilk ekzonda gözlenir ve normal alelde 4–19 tekrar arasında bulunur. Ataksin 7 poliglutamin tekrarının alt bölgesinde proteinlerle etkileşim gösteren SH3 bağlanma domainleri bulunur. Ataksin 7 geni 378-394 amino asitleri arasında nükleer lokalizasyon sinyali ve 357-412 amino asitleri arasında nükleolus lokalizasyon sinyalleri barındırır (Kaytor vd., 1999; Zander vd., 2001) . Ataksin7 geni fosforile olmuş aktif G protein çifti reseptörlerine seçici olarak bağlanan arestinle homolog motifler içeren kısa motiflere sahiptir (Mushegian vd., 2000; Gurevich vd., 1995).

SCA7 geninin ürünü olan ataksin 7, 95 kDa’ luk bir proteindir. Mutant protein ilk olarak SCA7 hastalarının lenfoblastlarındaki nükleuslarında rapor edilmiştir (Trottier vd., 1995). Lenfoblastlarda ve serebral kortekste yapılan western blot analizinde 1C2 monoklonal antikolar kullanılarak poliglutamin tekrarına sahip mutant proteinin 130 kDa olduğu saptanmıştır (Trottier vd., 1995; Stevanin vd., 1996). Ataksin 7’nin nöronlardaki subselüler lokalizasyonu çok komplekstir. Genellikle sitoplazmik, bazen nükleer, nadir olarak da her iki şekilde lokalize olabilir (Einum vd., 2001; Jonasson vd., 2002; Cancel vd., 2000). Diğer poliglutamin hastalıklarında olduğu gibi mutant ataksin7 proteini hem inferior oliv hem de retinal reseptörlerde nükleer inklüzyonlar (NI) oluşturur (Şekil 1.5.).

97 CAG tekrarına sahip transgenik farelerde yapılan çalışmada retinada konrod distrofisi gözlemlenmiştir. İki hibrit maya sistemi kullanılarak yapılan çalışmada CRX ile ataksin 7'nin interaksiyon yaptığı ve retinal fotoreseptör hücrelerinde nükleer transkripsiyon faktörü olarak eksprese edildiği belirlenmiştir (La Spada vd., 2001). Ayrıca glutamat taşıma mekanizmasındaki bozuluktan dolayı serebellumdaki Bergman gangliyada dejenerasyon gözlemlenmiştir (Custer vd., 2000).



Şekil 1.5. SCA7'de retina ve pons'da nükleer inklüzyonlar (G: ganglion hücre tabakası; INL: iç nükleer tabaka; ONL: dış nükleer tabaka) (Michalik vd., 2004).

#### 1.1.2.5. Spinocerebellar Ataksi Tip 17

SCA17, HDL-4 olarak da adlandırılan; ADCA III grubunda sınıflandırılan otozomal dominant serebellar ataksilerdendir. Hastalık 6q27 kromozomunda bulunan TATA kutusu bağlanma proteini (TBP) genindeki CAA/CAG tekrar sayılarındaki artıştan meydana gelir. Bu hastalığın başlangıç semptomları olarak ataksi ve demans gözlenir (Imbert vd., 1994; Koide vd., 1999; Zühlke vd., 2001).

### 1.1.2.5.1. Klinik Özellikleri

Bütün hastaların genelinde olmasa da birçok hastada başlangıç semptomları olarak yürüyüş ataksisi ve dizartriden oluşan serebellar bulgular tanımlanmıştır (Koide vd., 1999; Zühlke vd., 2001; Stevanin vd., 2003; Maltecca vd., 2003). Bir çok hastada kişilik değişimi, depresyon, psikoz halüsinasyon görme, agresif davranışlar gibi psikiyatrik sendromlar, kognitif bozukluklar ve distoni, kore, rijidite ve akinezi dahil olmak üzere bazal gangliya fonksiyon bozuklukları gibi semptomlar görülebilir. Bu belirtiler tek başına ya da kombine halde serebellar ataksilerle birlikte görülebilir. Bugüne kadar saptanan hastalık başlangıç yaşı 3–55 yaşları arasında gözükmeyle birlikte hastalık semptomları 30 yaş civarında belirtilerini göstermeye başlar. (Koide vd.,1999, Zühlke vd., 2001; Stevanin vd.,2003). Yapılan çalışmalarda aynı soydan olan juvenil vakalarda büyüme geriliğinin olduğu, hastalığın hızlı bir seyir izlediği gözlemlenmiştir (Maltecca vd., 2003; De Michele vd., 2003; Rolfs vd., 2003) .

Serebellar semptomlar görülen hastaların % 67–100’ünde uzuvlarda gözlenen ataksi ve yürüyüş ataksisi gözlemlenmiştir. Hastalarda dizarti çeşitli şekillerde görülebilir, bir vakada sadece motor semptomlar olarak görülmüştür (Günther vd., 2004; Zühlke vd., 2007). Hastalarda hipometrik sakkadik hareketler, sabit bakış kaybı ve nistagmus gibi okülomotor semptomlar gözlenir (Zühlke vd., 2003; Rolfs vd., 2003).

SCA 17 hastalarında demans etnik kökene bağlı olarak dağılım gösterdiği saptanmıştır. Yapılan çalışmalarda SCA17 hastalarının %80–100’ünde kognitif bozukluklar gözlenmiştir. Hastaların bazılarında uykusuzluk, istemsiz hareketler, kişilik değişimi, paranoya, kendine zarar verme gibi psikiyatrik semptomlar görülür (Zühlke vd., 2007).

Ayrıca SCA 17 hastalarında hastalık süresince distonik veya koreik hareketler gelişir. Parkinson hastalığına özgü rijidite, postural reflekslerde zayıflama, akinezi gibi belirtiler görülür (Zühlke vd., 2007). Birçok hastada idrar tutamama sorunu, şiddetli kas atrofisi, miyoklonus, işitme kaybı görülmüştür (Bruni vd., 2004).

### 1.1.2.5.2 Nöropatolojik Özellikleri

SCA 17 hastalarında total beyin hacminde serebellum ve serebral korteks atrofisine bağlı olarak önemli derecede azalmalar meydana gelir (Bruni vd., 2004;

Rolfs vd., 2005). Serebellumdaki Purkinje hücrelerinde kayıplarla birlikte Bergmann's gliyozu, maküler katman ve dentat nükleusta da gliyoz meydana gelir. Ayrıca kaudat ve medyal talamik nükleusta nöronal kayıplar ve gliyoz gözlemlenmiştir (De Michele vd., 2003; Bruni vd., 2004).

Elektrofizyolojik özelliklerin çeşitliliği hastalığın kliniksel farklılığını yansıtmaktadır. Elektroensefalografi (EEG) bulgularında epileptik akışın normalden fazla ve yavaş olduğu bulunmuş, birçok vakada görsel motor potansiyeli normal görünürken somatosensör ve beyin kökü odiotori potansiyeli anormal bulunmuştur (Bruni vd., 2004).

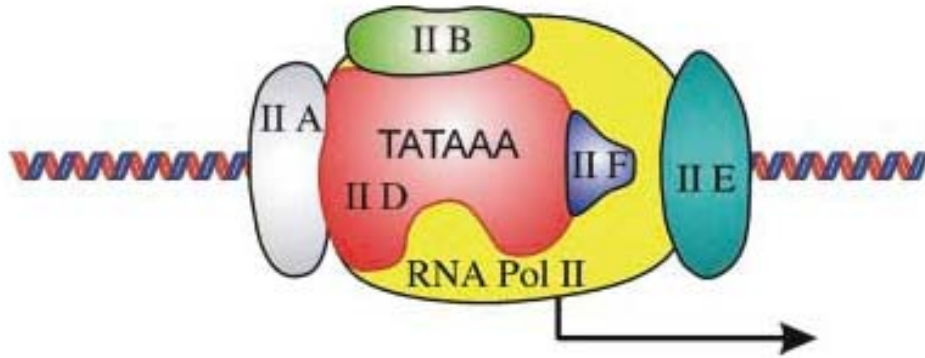
MRI bulguları serebral korteks, serebellum, beyin kökü ve Kaudat nükleus atrofilerini içerir (Craig vd., 2005; Maltecca vd., 2003; Toyoshima vd., 2004). Voksel tabanlı morfometri (VBM) yöntemi kullanarak klinik ve MRI özellikleri arasındaki ilişkiyi tanımlanmış ve bazal gangliya ve serebellumda bulunan gri bölgenin motor semptomlarla ilişkili olduğunu singulum, kuneus, frontal ve temporal lobların içindeki degenerasyonda psikiyatrik sonuçlarla ilişkili olduğunu göstermişlerdir (Lasek vd., 2006). Pozitron emisyon tomografi (PET) çalışmaları putamen, serebellum, kaudat nükleus, inferior ve superior pariyatal korteksde 18F-FDG sinyalinin azaldığını göstermiştir. Ayrıca fonksiyonel görüntüleme çalışmalarında dopaminerjik sistemde pre- ve post- sinaptik anormalliklerin olduğu bulunmuştur (Günther vd., 2004; Minnerop vd., 2005; Salvatore vd., 2006).

### 1.1.2.5.3. Moleküler Genetik Özellikleri

SCA 17 otozomal dominant geçişlidir. Antisipasyon tam olarak açıklık kazanmasa da, anneden kalıtımda tekrar sayısının 1, babadan aktarımda tekrar sayısının 3, 4, 13 tekrar arttığı tespit edilmiştir (Zühlke vd., 2005). Bu çalışma diğer ADCA'larda olduğu gibi SCA17'de antisipasyonun etkili olabileceğini düşündürmektedir. SCA1 ve SCA2'de CAG tekrar bölgesini bölen ve stabilizasyonu sağlayan elementlerin kaybında olduğu gibi SCA 17'de de jenerasyonlar arası instabilite sonucunda CAG tekrarları arasındaki CAA kodonlarının kaybedildiği düşünülmektedir. (Zühlke vd., 2007).

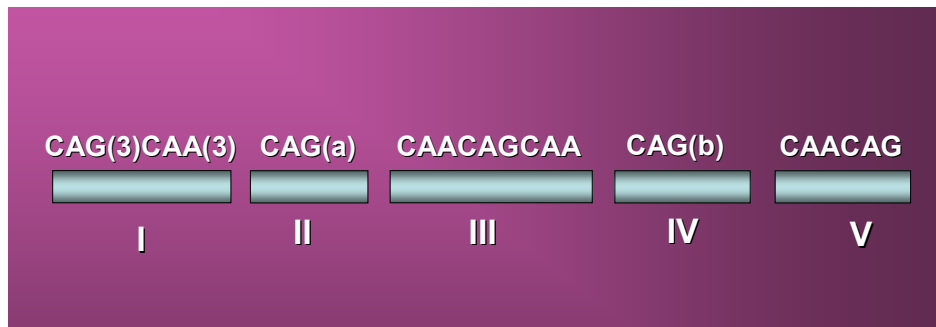
Hastalık 6q27 kromozomunda telomerik bölgeye yakın olan TATA kutusu bağlanma proteini (TBP) genindeki CAA/CAG tekrar sayılarındaki artıştan meydana gelir (İmbert, G. 1994). Bu gen 18528 baz uzunluğundadır ve 8 ekzondan oluşur.

ATG başlangıç kodunu 2. ekzonda, TAA stop kodunu 8. ekzondadır ve polimorfik bölge ise 3. ekzonda yer alır (Polymeropoulos vd., 1991). Yabanıl tip protein amino terminal bölgesinde normal aralıklarda 25-44 CAG tekrarı içerebilir. Genellikle 32-39 CAG tekrarları çok yaygın olarak bulunmuştur (Imbert vd., 1994, Koide vd., 1999, Zühlke vd., 2001). TBP, transkripsiyon faktörü olarak iş görür ve TATA kutusu bölgesine bağlanarak RNA Pol II'nin bağlanacağı transkripsiyon başlatıcı kompleksin (Şekil 1.6.) oluşmasını sağlar (Zühlke vd., 2007)



Şekil 1.6. Transkripsiyon başlatıcı kompleks (Zühlke vd., 2007).

Yabanıl tipte poliQ kodlayan sekans, iki polimorfik bölge içeren beş bölümden oluşur (Şekil 1.7.). İkinci ve dördüncü bölgedeki CAG tekrarlarının sayısında artış meydana gelir. Avrupa ve Japonya orijinli sporadik veya ailesel kökenli vakalarda 43–63 CAG tekrarının hastalığa sebep olduğu tanımlanmıştır. Klinik olarak mutlaka hastalığa sebep olan aleller henüz belirlenmemiştir. Bu yüzden de intermedya aralık 43–48 CAG tekrarı olarak tanımlanmıştır. İntermedya aralıktaki homozigot bireylerin bir kısmında hastalık saptanmıştır (Silveira vd., 2005; Oda vd., 2005).



Şekil 1.7. TBP genindeki CAA ve CAG tekrarları.

DNA'nın düzenlenmesi sırasında TBP geninde (CAA)(CAG)(CAA)(CAG)n sekansındaki duplikasyonların veya insersiyonların sporadik ve ailesel SCA17'ye sebep olduğu bulunmuştur (Koide vd., 1999; Zühlke vd., 2001; Shatunov vd., 2004).

SCA17 hastalarında anormal proteinin fonksiyonunda bir azalma olmadığı fakat Purkinje hücrelerinde NI oluşturduğu saptanmıştır (Toyoshima vd., 2004). SCA17 mutant proteininin fonksiyonu henüz detaylı olarak bilinmemektedir.

## 2. AMAÇ

Nörodejeneratif hastalıklar grubundan olan poliglutamin tekrar hastalıkları ilgili genlerin kodlayan bölgelerinde bulunan CAG tekrarlarının artması sonucunda meydana gelir. CAG tekrarlı ADCA hastalıkları da bu grup altında incelenir. Bu hastalıkların klinik belirtilerinin ve patolojik bulgularının örtüşmesi hastalığın klinik teşhisini zorlaştırır. Bununla birlikte, aynı lokustaki tekrar sayıları coğrafi ve etnik varyasyonlar gösterebilir. Dolayısıyla CAG tekrarlı ADCA hastalıklarının tanıları sadece klinik değerlendirmeye dayalı olarak yapılamaz. ADCA hastalıkları ile örtüşen genlerin karakterizasyonu ve mutasyonların keşfi, DNA analizi için moleküler test prosedürlerinin geliştirilebilmesine olanak sağlamıştır. Klinik veriler ve genetik test bulguları birlikte kullanılması sayesinde bireylerdeki patolojinin doğru tanımlanması ve yeterli genetik danışmanlığın verilebilmesi sağlanır.

CAG tekrar sayıları etnik varyasyon gösterdiğinden dolayı, moleküler tanı protokollerinin oluşturulabilmesi amacıyla her toplumun ilgili gen lokuslarındaki normal ve patolojik tekrar aralıkları belirlenmelidir. Literatür taramaları sonucunda CAG tekrarlı ADCA lokuslarındaki alel dağılımlarının Türk toplumunda incelenmediği ortaya koyulmuştur. Bu tez çalışmasında, kendilerinde ve ailelerinde ataksi ve diğer nörodejeneratif hastalıklara rastlanmayan 70 sağlıklı Türk bireyinde SCA3, SCA6, SCA7 ve SCA17 lokuslarındaki CAG tekrar sayılarının belirlenmesi amaçlanmıştır. Bu sayede ADCA lokuslarında sağlıklı Türk popülasyonuna ait alel dağılımları incelenmiş olacak ve Türk toplumuna ait genetik tanı kriterlerinin oluşturulmasına katkıda bulunulacaktır.

### 3. GEREÇLER

#### 3.1. Kimyasallar

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

#### 3.2. Tamponlar, Solüsyonlar ve Enzimler

##### 3.2.1. DNA İzolasyonu

Hücre Lizis Tamponu	155 mM NH <sub>4</sub> Cl 10 mM KHCO <sub>3</sub> 0.1 mM Na <sub>2</sub> EDTA (pH 7.4)
Nükleus Lizis Tamponu	400 mM NaCl 10 mM Tris-HCl (pH 8.0) 2 mM Na <sub>2</sub> EDTA (pH 7.8)
TE Tamponu	2.0 mM Tris-HCl (pH 8.0) 0.1 mM Na <sub>2</sub> EDTA (pH 8.0)
Sodyum dodesil sülfat (SDS)	dH <sub>2</sub> O'da %10 SDS (mg/ml) (pH 7.2)
Proteinaz K	dH <sub>2</sub> O'da 20 mg/ml
Sodyum klorür	dH <sub>2</sub> O'da 5 M NaCl
Etanol	%100 etanol



### 3.2.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu Tamponları ve DNA Polimeraz Enzimleri

10X MgCl <sub>2</sub> 'süz Tampon	500 mM KCl 100 mM Tris-HCl (pH 9.0) % 0.8 Nonidet P40 (Roche, ALMANYA)
MgCl <sub>2</sub>	dH <sub>2</sub> O'da 25 mM (Roche, ALMANYA)
Deoksiribonükleotidler (dNTP)	100 mM dATP, dCTP, dGTP ve dTTP (Roche, ALMANYA)
Taq DNA Polimeraz	Fast Start DNA polimeraz (Roche, ALMANYA) Rekombinant Taq DNA Polimeraz (Fermentas, LİTVANYA) GoTaq® Hot Start Polymerase (Promega, ABD)

### 3.2.3. Oligonükleotid Primerler

Tablo 3.1. Bu çalışmada incelenen polimorfik bölgeleri çoğaltmak için kullanılan primer dizileri (F: ileri primer, R: Geri primer)

Lokus	Primer Dizisi (5' → 3')	
SCA3	MJD 25:	TGG CCT TTC ACA TGG ATG TGA A
	MJD 52:	CCA GTG ACT ACT TTG ATT CG
SCA6	S5F1:	CAC GTG TCC TAT TCC CCT GTG ATC C
	S5R1:	TGG GTA CCT CCG AGG GCC GCT GGT G
SCA7	4U1024:	TGT TAC ATT GTA GGA GCG GAA
	4U716:	CAC GAC TGT CCC AGC ATC ACT T
SCA17	TATA-BF:	GAC CCC ACA GCC TAT TCA GA
	TATA-BR:	TTG ACT GCT GAA CGG CTG CA

### 3.2.4. DNA Büyüklük Markörleri

GeneRuler 50 bp DNA markörü:	50, 100, 150, 200, 250, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000 baz çiftlik fragmentler içeren DNA markörü (Fermentas, LİTVANYA)
GeneRuler 100 bp DNA markörü:	100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000 baz çiftlik fragmentler içeren DNA markörü (Fermentas, LİTVANYA)
PhiX174 DNA/HinfI Marker:	726, 713, 553, 427/417/413, 311, 249, 200, 151, 140, 118, 100, 82, 66, 48, 42 baz çiftlik fragmentler içeren DNA markörü (Fermentas, LİTVANYA)

### 3.2.5. Elektroforez Tamponları ve Jel Sistemleri

10X Bromofenol Mavisi (BPB)	: 2.5 mg/ml BPB
Etidyum Bromid (EtBr)	: 10 mg/ml
% 1 veya 2'lik Agaroz Jel	: 0.5 X TBE Tamponunda %1 veya %2 (w/v) agaroz

### 3.2.6. Denatüre Edici Poliakrilamid Jel Elektroforezi

10X TBE Tamponu (Tris-Borik asit-EDTA)	: 890 mM Tris-Base : 890 mM Borik Asit : 20 mM Na <sub>2</sub> EDTA.2H <sub>2</sub> O, (pH 8.3)
Formamid yükleme boyası	: 10 ml formamid : 200 µl 0.5M EDTA (pH 8.0) : 15 mg xylene cyanol : 3 mg BPB

Akrilamid /bisakrilamid	: %19 Akrilamid %1 N, N'-Metilen bisakrilamid
Yükleme jeli solusyonu	: %8, 10, 12'lik Akrilamid solüsyonu 8 M üre 1X TBE Tamponu (pH 8.3)
Amonyum persülfat (APS)	: %10'luk Amonyum persülfat (mg/ml)
TEMED	: N',N',N',N'-tetrametilenetilendiamin

### 3.2.7. Gümüş Boyama Solüsyonları

Tampon 1	: %10'luk EtOH
Tampon 2	: %2'lik Gümüş Nitrat (AgNO <sub>3</sub> )
Tampon 3	: %1,5'luk Sodyum Hidroksit (NaOH) %37'lik Formaldehid 0,0025 gr Sodyum Boro Hidrat (NaBH <sub>4</sub> )

### 3.3.8. Cihazlar

Otoklav	: Dik Tip Otoklav (BES, TÜRKİYE)
Tartular	: 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)
Dikey Elektroforez Sistemleri	Protean II xi (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	: Shimadzu 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. Kandan DNA İzolasyonu

10 ml periferik kan örneği steril vakumlu EDTA'lı tüplere alınıp izolasyon çalışmasına kadar 4°C'de muhafaza edildi. İzolasyon çalışması için periferik kan örnekleri 50 ml'lik Falkon tüplere aktarıldı ve her tüpe 30 ml lizis tamponu eklendi. Eritrositlerin hücre zarlarının ozmatik basınç etkisiyle lizis olması için örnekler 4°C'de 15 dakika bekletildi. Örnekler daha sonra 4°C'de ve 5000 rpm'de 10 dk santrifüj edildi ve lökositler çöktürüldü. Bu işlem lökositleri daha saf elde etmek için üç kez tekrar edildi. Daha sonra tüpe 3ml soğuk nükleus lizis tamponu eklenip vortekslendi. Tüpe çekirdek zarını parçalaması için 50 µl SDS, proteinleri parçalaması için 30 µl Proteinaz K eklenip sıcak su banyosu içerisinde 56 °C'de 3 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrası proteinlerin çözünmez hale getirilmesi için 5 ml 5M NaCl ve 5 ml dH<sub>2</sub>O eklenip tüpler yavaş bir şekilde elde çalkalandı. Çalkalama işlemi sonrası çözünmez hale getirilen proteinlerin çöktürülmesi için oda sıcaklığında 10000 rpm'de 20 dakika santrifüj yapıldı. Santrifüj işlemi sonrası DNA içeren süpernatant temiz falkon tüplere alındı. DNA'yı presipite etmek için üzerine süpernatantın iki katı hacminde etanol eklendi ve DNA görünür hale gelinceye kadar tüp yavaşca elle sallandı. Elde edilen DNA ependorf tüpe alınıp üzerine çözülmesi için 1000 µl TE tamponu eklendi.

### 4.2. İzole Edilen DNA'nın Kantitatif ve Kalitatif Analizi

DNA'nın kantitatif ve kalitatif analizi elde edilen genomik DNA'nın miktarını ve saflığını belirlemek için yapılır. Genomik DNA %1'lik agaroz jelde yürütülerek fragmantasyonların olmadığı, DNA'nın yoğun ve tek bir bant halinde olduğu UV ışığı altında gözlemlenir. Elde edilen genomik DNA'nın saflığını ölçmek için spektrofotometrik analiz yapıldı. DNA örnekleri 1/50 oranında distile su ile seyreltilip optik yoğunlukları 260 ve 280 nm'de analiz edilir. Nükleotidlerin heterosiklik halkaları 260 nm dalga boyunda maksimum absorbands gösterir ve bu özellik nükleik asitlerin miktarının belirlenmesinde kullanılır. Çift zincirli bir DNA

molekülü için, 260 nm’de 1 optik dansite 50 µg/ml’ ye denk gelir ve DNA miktarını belirlemek için aşağıdaki formül kullanılır.

$$\text{DNA konsantrasyonu } (\mu\text{g/ml}) = A_{260} \times 50\mu\text{g/ml} \times \text{Seyreltme oranı}$$

260 nm’de elde edilen değerler DNA’yı ve RNA’yı birbirinde kesin olarak ayırt etmeye yeterli değildir. Bunun için proteinlerin maksimum absorpsiyon verdiği 280nm’de de değerleri ölçülür ve  $A_{260}/A_{280}$  oranına bakılarak DNA’nın saflığı belirlenir. Elde edilen oran 1.8’den büyükse RNA kontaminasyonu, küçükse protein kontaminasyonu olduğu anlamına gelir.

### 4.3. Polimeraz Zincir Reaksiyonu

Polimeraz zincir reaksiyonu, istenilen DNA dizisinin *in vitro* ortamda enzimatik olarak sentezlenmesidir. Polimeraz zincir reaksiyonu çift iplikli bir DNA molekülünde hedef dizilere iki sentetik oligonükleotid primerin bağlanması ve zincirin uzaması esasına dayanır. Primerler, kalıp DNA molekülü yüksek sıcaklık derecelerinde denatüre edildikten sonra, tek iplikli DNA molekülleri üzerinde kendilerine tamamlayıcı olan bölgelere bağlanırlar. Taq polimeraz enzimi, uygun tampon ve dNTP’ler varlığında primerlerin 3’ ucundan uzamasını sağlar ve böylece yeni bir DNA dizisi sentezlenmiş olur. Bir PCR döngüsü denatürasyon, bağlanma ve uzamadan oluşan üç aşamadan oluşur. Her bir siklus sonucunda DNA miktarı üssel olarak artar.

PCR, kalıp DNA molekülü, Taq polimeraz enzimi, dNTP karışımı, primerler, enzim tamponu ve MgCl<sub>2</sub> gibi temel bileşenlerden oluşur. Mg<sup>+2</sup> iyonları dNTP’lerle çözünebilir kompleksler oluştururlar, polimeraz aktivitesini stimüle ederler ve DNA-primer etkileşimlerini sağlarlar. Deoksiribonükleozid trifosfatlar dATP, dGTP, dTTP, dCTP karışımında hazırlanırlar ve Taq polimeraz enzimi tarafından kalıp DNA iplikğine göre sentezlenen yeni DNA ipliklerine yerleştirilirler. Kullanılan enzim tamponu, Taq polimeraz enziminin en iyi şekilde çalışabilmesi uygun ortam sağlar. Ayrıca G-C bölgelerinin amplifikasyonunu sağlamak için 10XGC-rich solüsyonu veya DMSO kullanılır.

Bu tez çalışmasında yapılan PCR’larda GoTaq® Hot Start, Fast Start Taq ve Recombinant Taq Polimeraz enzimleri kullanılmıştır. GC-zengin bölgeleri çoğaltmak

için 95°C’de aktivitesini kaybetmeyen GoTaq® Hot Start ve Fast Start Taq enzimleri kullanılmıştır. Bu enzimler PCR kalitesinin artmasına yardımcı olmuştur.

#### 4.4. Primer Dizaynı

Çalışmamızda kullanılan primerler referans makalelerde tanımlanmış primer dizileridir (Matilla T, McCall A; 1995, David, G., Abbas, N., Stevanin; 1997, Zhuchenko O, Bailey J; 1997, Koide R, Kobayashi S; 1999). Bu primerlerin ilgili genler üzerinde bağlandıkları bölgeler internet tabanlı elektronik PCR ile kontrol edilmiştir.

#### 4.5. Agaroz Jel Elektroforezi

Agaroz jel elektroforezi DNA parçalarının moleküler ağırlıklarına göre ayrılmasını sağlar. Jeli hazırlamak için agaroz (0,01g/ml) 0,5 X TBE solüsyonunda yüksek sıcaklıkta çözündürülür. Çözelti 50°C’ye kadar soğutulup içine Etidyum bromür (0.5mg/ml) eklenir. Etidyum bromür DNA bazları arasına bağlanarak UV ışığı altında floresan etki gösterir ve DNA’ların belirlenmesine yardımcı olur. EtBr eklendikten sonra çözelti jel kasetine dökülür. Örneklerin yüklenebilmesi için taraklar yardımıyla kuyucuklar oluşturulur. Örnekler BFB ile karıştırılıp polimerize olan jele yüklenir ve 150 V elektrik akımında 15 dk yürütülür. Elektroforez sonrası bantların boyları jel dokümantasyon cihazında UV ışığı altında belirlenir.

#### 4.6. Denatüre Edici Poliakrilamid Jel Elektroforezi (dPAGE)

Poliakrilamid jeller 1 kb’dan daha küçük olan DNA fragmentlerinin analizini yapmak için kullanılır. Hazırlanan farklı poliakrilamid konsantrasyonlarına (%5-%20) bağlı olarak DNA örneklerinin analizi sahip oldukları fragment uzunluklarına göre yapılır. Düşük konsantrasyonda hazırlanan jellerde büyük porlar oluşur ve büyük DNA fragmentlerinin ayrımı yapılabilir, yüksek konsantrasyonlarda ise daha küçük porlar oluşacağı için daha küçük DNA fragmentlerinin analizi yapılabilir. Akrilamid ve çapraz bağlayıcı N,N’-metilen-bisakrilamid katalizör ve başlatıcı kimyasallar yardımıyla poliakrilamid jellerin polimerizasyonu sağlanır. Kimyasal polimerizasyonda amonyum persülfat (APS) serbest radikalleri oluşturarak katalizör görevi yapar. TEMED ise serbest radikaller stabilize ederek polimerizasyonu başlatır.

Bu çalışmada %8, %10, %12'lik denatüre edici poliakrilamid jeller kullanılmıştır. %12'lik yükleme jelinin solusyonunu hazırlamak için %40 akrilamid stok solusyonundan 37.5 ml, 10X TBE stok tamponundan 12,5 ml ve 62,5 gr üre alınır ve son hacim 125 ml olacak şekilde dH<sub>2</sub>O eklenir. Hazırlanan yükleme jeli solusyonundan 30 ml alınıp, 160 µl APS ve 16 µl TEMED ile karıştırılıp jel çözeltisi hazırlanır. Jel çözeltisi önce steril su ile temizlenmiş ve 0.75mm'lik plastik ayrıcılarla ayrılmış camların arasına dökülür. Daha sonra örneklerin yüklenebilmesi için taraklar yardımıyla kuyucuklar oluşturulur. Bu işlemler sonrasında jelin polimerize olması için 1 saat beklenilir. Polimerizasyondan sonra taraklar çıkarılır ve jel elektroforez sistemine yerleştirilir. Jelin alt kısmıyla üst kısmı arasında elektrik akımı sağlanması için 1X TBE tamponu eklenir. Örnekler yüklenmeden önce sabit sıcaklık sağlanması için sistem 400V'ta 30 dk çalıştırılır. Daha sonra kuyucuklar kalan tuzların ve polimerize olmamış akrilamidin uzaklaştırması için tamponla yıkanır. Örnekler yükleme işlemi öncesinde eşit hacimde formamidli boya ile karıştırılarak 95°C'de 5 dk denatüre edilir ve DNA ipliklerinin tekrar birleşmemesi için buz içerisinde bekletilir. Örnekler kuyucuklara yüklenir ve uzunluklarının belirlenmesi için DNA boy markörleri (PhiX174 DNA/HinfI ve 100 bp) jelle yüklenir. Yükleme işlemi sonrası 400V'ta 8-11 saat elektroforez yapılır. Elektroforez işlemi tamamlandıktan sonra jel camlar arasından çıkartılıp, DNA fragmentlerinin boylarını belirlemek için gümüş boyama tekniği ile boyanır.

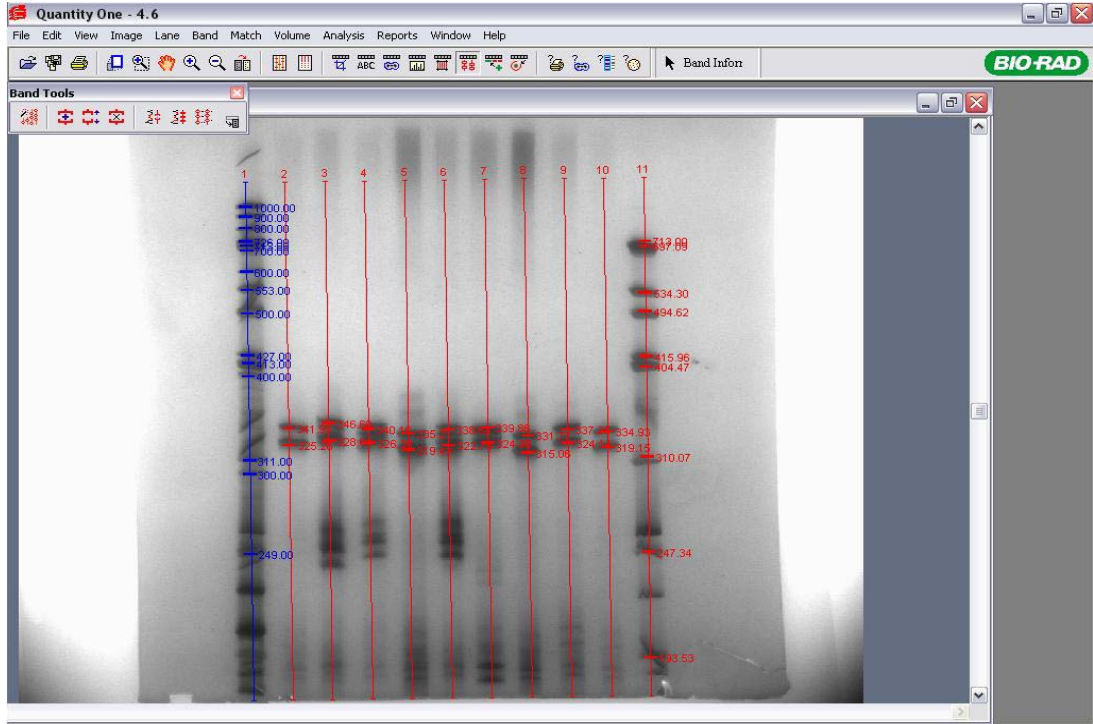
#### **4.7. Gümüş Boyama**

Gümüş boyama tekniği; gümüş iyonlarının nükleik asitlere bağlanıp DNA fragmentlerinin boyanmasını sağlar. Elektroforez işlemi sonrasında poliakrilamid jel tampon 1 içeren kaba alınır ve DNA'nın jelden difüzyonunun önlenmesi için tampon 1 içinde 5dk bekletilir. Daha sonra jel 1 dk dH<sub>2</sub>O'da yıkanır ve üzerine tampon 2 eklenir. Jel, tampon 2 içerisinde 30 dk bekletilir, bu sürede gümüş iyonlarıyla nükleik asitler bağlanır. Daha sonra jel 1 dk dH<sub>2</sub>O'da yıkanır, tampon 3 eklenir ve bantlar ortaya çıkıncaya kadar jel çalkalayıcıda bırakılır. Bantlar ortaya çıktıktan sonra jel 1 dk dH<sub>2</sub>O'da yıkanır ve jel dökümantasyon cihazında Quantity-one programı kullanılarak örneklerin baz uzunlukları tespit edilir.



#### 4.8. Alel Uzunluklarının Hesaplanması

PCR ürünlerinin poliakrilamid jelde oluşturduğu bantlar jel dokümantasyon cihazında beyaz ışık altında Quantity-one programı kullanılarak incelenir. Jel görüntüsü üzerinde “hat” sekmesi kullanılarak her bir bandın jelde yürüdüğü alan belirlenir ve programa tanıtılır. Bu işlem sonrası bant belirleme sekmesi kullanılarak bantlar belirlenip programa girilir. Standart eğri grafiği oluşturmak için, DNA markörlerinin fragment uzunlukları “standart oluştur” sekmesi kullanılarak girilir. Bu işlem sonrasında, DNA markörlerinin jeldeki göç mesafelerine ( $R_f$ ) ve markörü oluşturan DNA fragmentlerinin uzunluklarının logaritmasına göre program tarafından bir standart eğri grafiği oluşturulur. Daha sonra “analiz” seçeneği kullanılarak belirlenen grafik üzerinden alellerin  $R_f$  değerlerine karşılık gelen değerlerin anti-logaritması alınarak alellerin fragment uzunlukları program tarafından hesaplanır. Fragment uzunlukları üzerinden, her bir lokus için CAG tekrar sayısı hesaplanır (Şekil 4.1.).



Şekil 4.1. Quantity-one programı kullanılarak alel uzunluklarının hesaplanması

#### 4.9. ADCA'ların Moleküler Analizi

Periferik kandan DNA izolasyonundan sonra CAG tekrarlı SCA hastalıklarıyla ilişkili olan CAG tekrar bölgelerinin çoğaltılması için Tablo 3.1.'de verilen primerler kullanılmıştır. Bu primerlerin genomik DNA dizisine bağlanma bölgeleri Tablo 4.1'de gösterilmiştir. PCR komponentleri Tablo 4.2.'de ve PCR şartları Tablo 4.3.'de gösterilmiştir.

Tablo 4.1. Primerlerin genomik DNA dizilerine bağlanma bölgeleri

<p><b>SCA3</b></p> <p style="text-align: center;"><b>MJD 52</b> →</p> <p>ACTAACTGCTCTTGCATTCTTTTAATAACAGTGACTACTTTGATTTCGTGAAACAATGTAT            TTTCTTATGAATAGTTTTTCTCATGGTGTATTTATTCTTTTAAGTTTTGTTTTTAAATAT            ACTTCACTTTTGAATGTTTCAGACAGCAGCAAAAGCAGCAACAGCAGCAGCAGCAGCA            GCAGCAGGGGGACCTATCAGGACAGAGTTCACATCCATGTGAAAGGCCAGCCACCAGT            TCAGGAGCACTTGGGAGT</p> <p style="text-align: center;">← <b>MJD 25</b></p>
<p><b>SCA6</b></p> <p style="text-align: center;"><b>S5F1</b> →</p> <p>CCACACGTGTCCTATTCCCCTGTGATCCGTAAGGCCGGCGGCTCGGGGCCCCGCAGCA            GCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGGCGGTGGCCAGGCCGGGGCCGGGC            GGCCACCAGCGGCCCTCGGAGGTACCCAGGCCCCACGGCCGAGCCT</p> <p style="text-align: center;">← <b>S5R1</b></p>
<p><b>SCA7</b></p> <p style="text-align: center;"><b>4U1024</b> →</p> <p>TTCCCCCTTTTTTTTGTACATTGTAGGAGCGGAAAGAATGTCGGAGCGGGCCGCGGAT            GACGTCAGGGGGGAGCCGCGCCGCGCGGCGGCGGCGGGCGGAGCAGCGGCCGCG            GCCGCCCGGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCCGCCCTCCGCAGCCCC            AGCGGCAGCAGCACCCGCCACCGCCGCCACGGCGCACACGGCCGGAGGACGGCGGGCC            CGGCGCCGCCCTCCACCTCGGCCGCCGAATGGCGACGGTTCGGGGAGCGCAGGCCTCTG            CCCAGTCCTGAAGTGATGCTGGGACAGTCGTGGAAT</p> <p style="text-align: center;">← <b>4U716</b></p>
<p><b>SCA17</b></p> <p style="text-align: center;"><b>TATABF</b> →</p> <p>GTCCAATGATGCCTTATGGCACTGGACTGACCCACAGCCTATTCAGAACACCAATAGT            CTGTCTATTTTGAAGAGCAACAAAGGCAGCAGCAGCAACAACAACAGCAGCAGCAGC            AGCAGCAGCAGCAACAGCAACAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGC            AGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAACAGGCAGTGGCAGCTGCAGCCGTTTTCAGCAGTCAAC            GTCCAGCAGGC</p> <p style="text-align: center;">← <b>TATABR</b></p>

PCR reaksiyonunu kontrol etmek amacı ile 7 µl PCR örneği 3 µl yükleme tamponuyla karıştırılarak %2'lik agaroz jele yüklenir. Elektroforez sonrasında jele UV ışığı altında bakılarak bantlar kontrol edilir. Örneklerin boylarının belirlenmesi için örnekler %8'lik (SCA7 için), %10'luk (SCA3 ve SCA17 için) ve %12'lik (SCA6 için) poliakrilamid jellerde yürütülür. Elektroforez sonrası DNA fragmentlerinin uzunlukları DNA boy markörlerinin yardımıyla Quantity-one programında hesaplanır.

Tablo 4.2. PCR komponentleri

<b>Malzemeler</b>	<b>SCA3</b>	<b>SCA6</b>	<b>SCA7</b>	<b>SCA17</b>
PCR Tamponu	1X (Taq pol tamponu)	1X (GoTaq® Hot Start Polymerase tamponu)	1X (Fast Start Taq tamponu)	1X (Taq pol tamponu)
dNTP	0.8 mM	0.8 mM	0.8 mM	0.8 mM
Primer	12.5 pmol	12.5 pmol	12.5 pmol	12.5 pmol
GC- rich solüsyonu	1X	1X	1X	1X
MgCl <sub>2</sub>	2.0 mM	2.0 mM	2.0 mM	2.0 mM
Taq Polimeraz	1U (Taq pol)	1U (GoTaq® Hot Start Polymerase )	1U (Fast Start Taq)	1U (Taq pol)
DNA	150–200 ng	150–200 ng	150–200 ng	150–200 ng
Toplam Hacim	25 µl	25 µl	25 µl	25 µl

Tablo 4.3. PCR döngü şartları

<p><b><u>SCA3</u></b></p> <p>94 °C, 5 dk</p> <p>94 °C, 30 sn</p> <p>50 °C, 1 dk</p> <p>72 °C, 1 dk</p> <p>72 °C, 5 dk</p> <p style="text-align: right;">} 40 döngü</p>	<p><b><u>SCA6</u></b></p> <p>95 °C, 4 dk</p> <p>95 °C, 30 sn</p> <p>64 °C, 45 sn</p> <p>72 °C, 90 sn</p> <p>72 °C, 5 dk</p> <p style="text-align: right;">} 35 döngü</p>
<p><b><u>SCA7</u></b></p> <p>95 °C, 4 dk</p> <p>95 °C, 1 dk</p> <p>54 °C, 1 dk</p> <p>72 °C, 1 dk</p> <p>72 °C, 5 dk</p> <p style="text-align: right;">} 35 döngü</p>	<p><b><u>SCA17</u></b></p> <p>94 °C, 5 dk</p> <p>94 °C, 1 dk</p> <p>58 °C, 1 dk</p> <p>72 °C, 1 dk</p> <p>72 °C, 5 dk</p> <p style="text-align: right;">} 35 döngü</p>

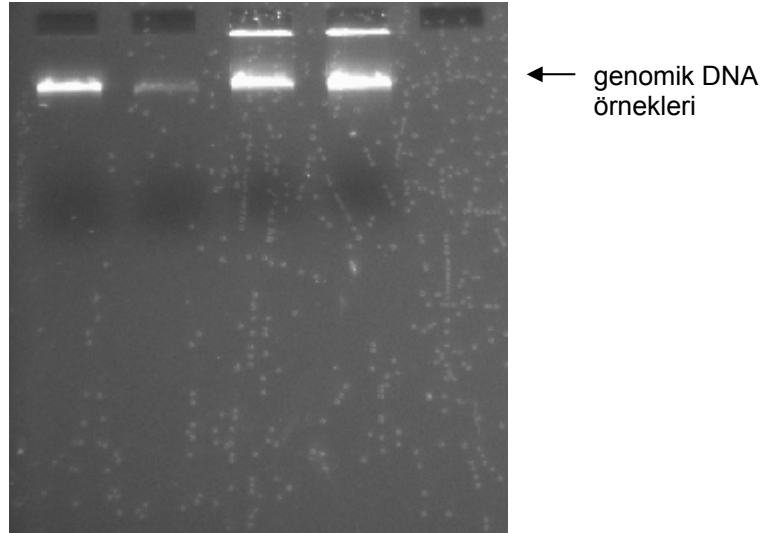
## 5. SONUÇLAR

### 5.1. Örneklerin Tanımlanması

Bu tez çalışmasına nörolojik olarak sağlıklı 35 erkek (%50) ve 35 kadın (%50) olmak üzere toplam 70 birey dahil edilmiştir. Bireylerin yaş aralığı 9-71 yaşları arasında olup, ortalama yaş 42 olarak belirlenmiştir. Çalışmanın kapsamı bireylere açıklanarak yazılı onayları alınmış ve kendi rızaları dahilinde periferik kan örnekleri toplanmıştır.

### 5.2. DNA İzolasyonu

Sağlıklı bireylerden alınan kan örnekleri EDTA'lı tüplerde toplanmış ve sodyum klorür metoduyla DNA izolasyonu yapılmıştır. İzolasyon sonrası DNA örnekleri %1'lik agaroz jelde incelenmiş ve DNA'nın parçalanmadan elde edildiği gösterilmiştir (Şekil 5.1.). DNA örneklerinin saflık ve konsantrasyon analizleri spektrofotometrik yöntemlerle belirlenmiştir.



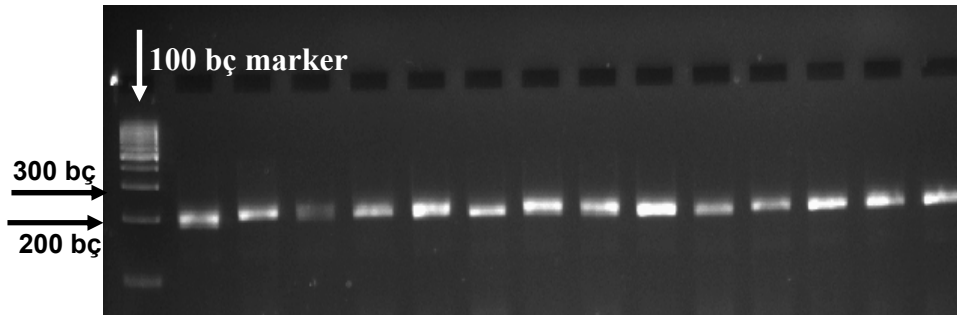
Şekil 5.1. DNA izolasyonu sonrasında örneklerin %1'lik agaroz jelde görüntülenmesi

### 5.3. CAG Tekrarlı SCA'ların Moleküler Analizi

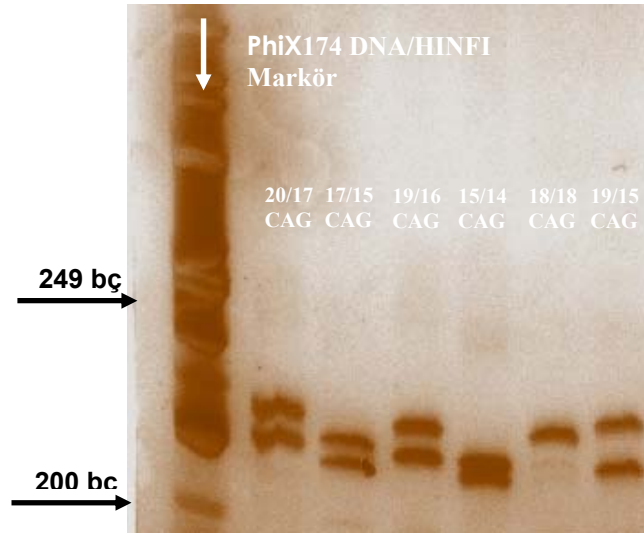
70 sağlıklı bireye ait DNA örneklerinde SCA3, SCA6, SCA7 ve SCA17 lokuslarına ait CAG tekrar bölgeleri Bölüm 4.3'te belirtilen PCR şartlarıyla çoğaltılmıştır. Çoğaltılan gen ürünleri agaroz jel elektroforezine tabi tutulduktan sonra UV ışığı altında görüntülenmiştir. Başarılı bir şekilde çoğaltıldığı tespit edilen PCR örnekleri denatüre edici poliakrilamid jellere yüklenerek aleller ayrılmış ve bunu takiben gümüş boyama ile aleller görünür hale getirilmiştir. Alel uzunlukları Quantity-one programı kullanılarak hesaplanmıştır.

#### 5.3.1. SCA 3'ün Moleküler Analizi

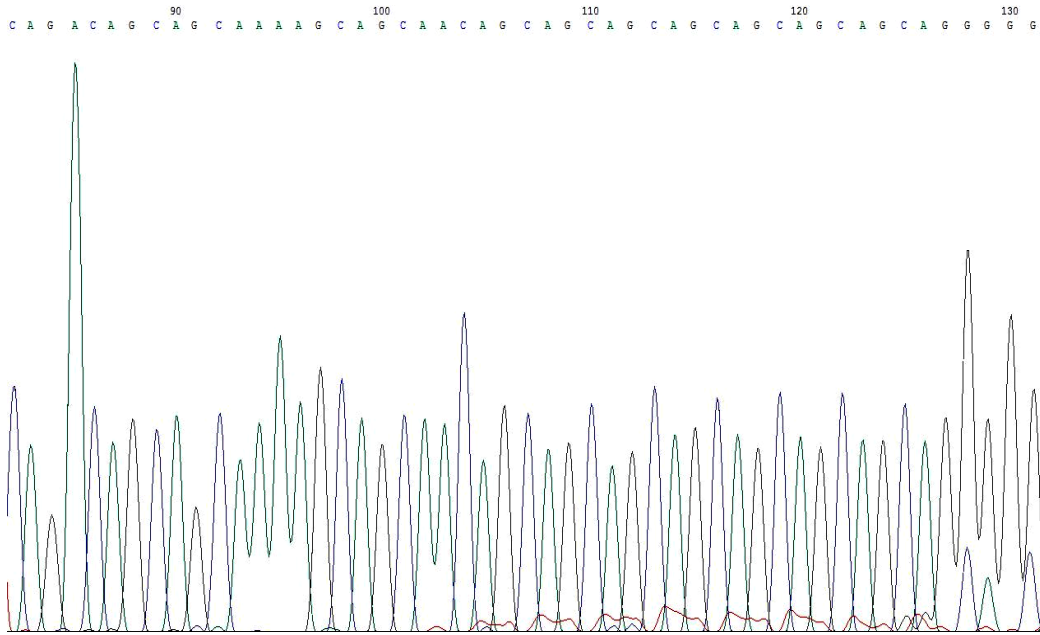
Toplam 70 sağlıklı bireyin 14q24.3-q31 kromozomundaki CAG tekrar sayılarını belirleyebilmek için ATXN3 geni, MJD25 ve MJD52 primerleri kullanılarak PCR ile çoğaltılmıştır. PCR ürünleri % 2'lik agaroz jelde yürütülerek kontrol edilmiştir (Şekil 5.2.). Daha sonra PCR ürünleri %10'luk denatüre edici poliakrilamid jelde yürütülmüş ve gümüş boyama ile boyanmıştır (Şekil 5.3.). Quantity one programı ile SCA3 lokusundaki CAG tekrar sayıları tespit edilmiştir. Ayrıca elde edilen sonuçların doğruluğunu kontrol etmek amacıyla PCR örneklerinin dizi analizi yapılmış ve tekrar bölgeleri incelenmiştir (Şekil 5.4.).



Şekil 5.2. SCA3 PCR ürünlerinin %2'lik agaroz jeldeki görüntüsü.



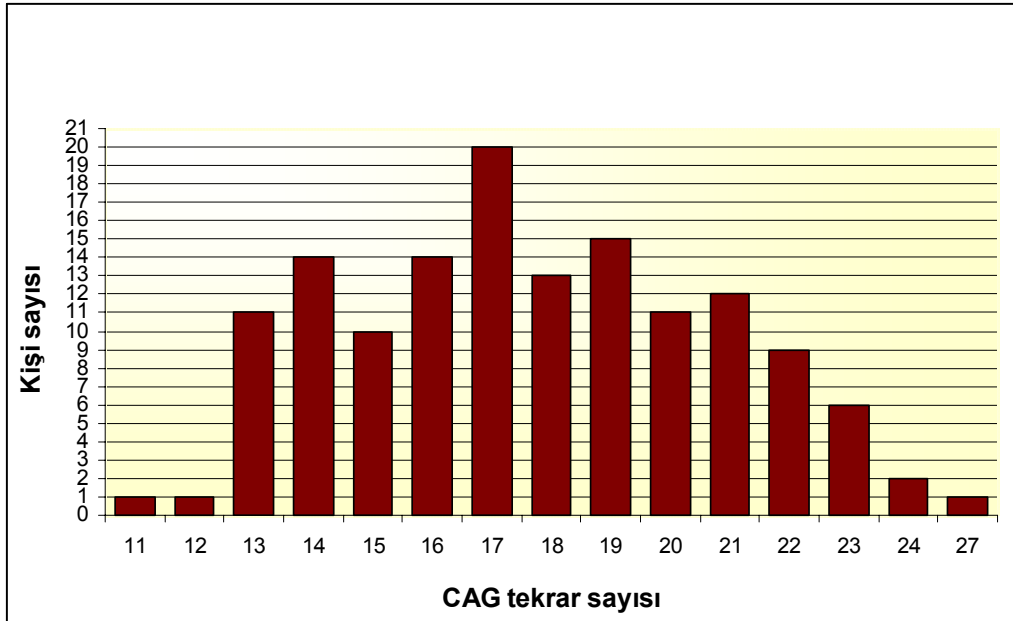
Şekil 5.3. SCA3 PCR ürünlerinin %10'luk dPAGE görüntüsü



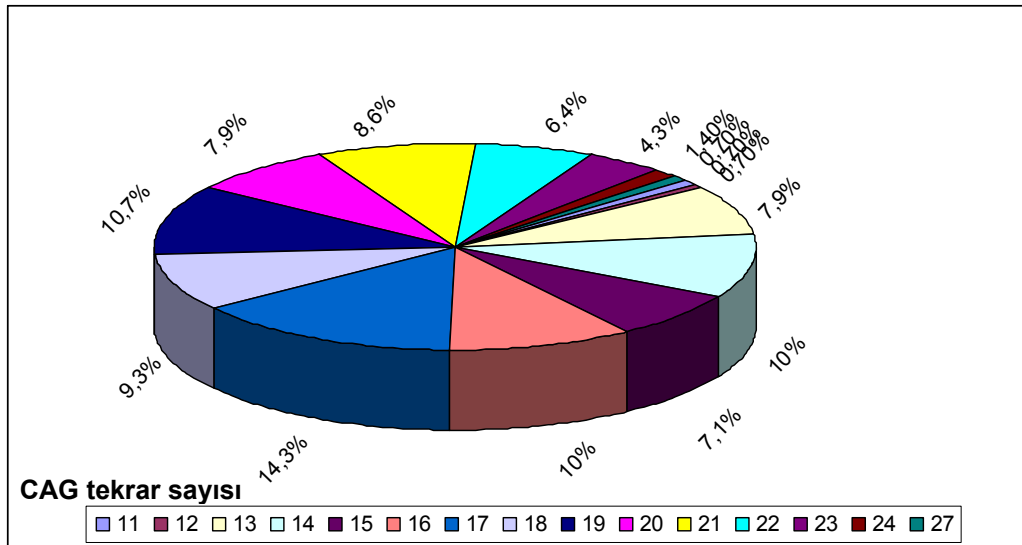
Şekil 5.4. ATXN3 gen lokusundaki CAG tekrarlarının dizi analiziyle belirlenmesi

Sonuçlar doğrultusunda sağlıklı Türk bireylerinde ATXN3 genindeki CAG tekrar sayısı aralığının 11 ile 27 CAG tekrarı arasında değiştiği ve en sık gözlenen alellerin 13 ile 23 CAG tekrar sayısı aralığında olduğu belirlenmiştir (Şekil 5.5.). İncelenen bireylerde 15 farklı alel saptanmıştır. Heterozigotluk oranı %95,3'tür. 14, 15 ve 16 CAG tekrarlı alellerde homozigotluğa rastlanmıştır. ATXN3 geninde en sık

görülen 17 tekrarlı (%14,3) aleldir, bunu 19 (%10,7), 14 (%10) ve 16 (%10) tekrarlı aleller takip etmektedir (Şekil 5.6.).



Şekil 5.5. Sağlıklı Türk bireylerinin ATXN3 gen lokusundaki tekrar sayısı

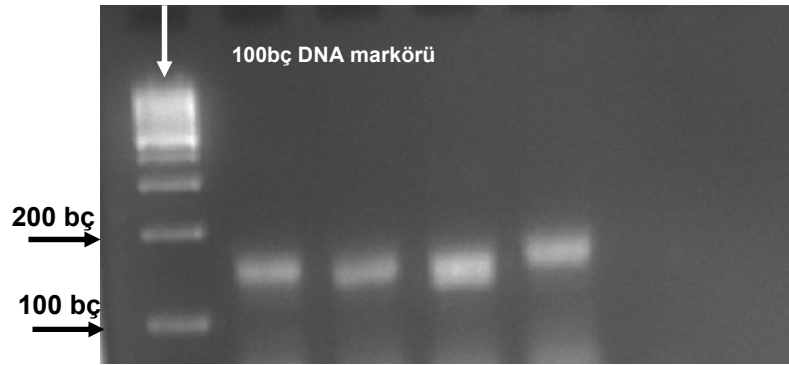


Şekil 5.6. ATXN3 gen lokusundaki tekrar sayısı dağılımı

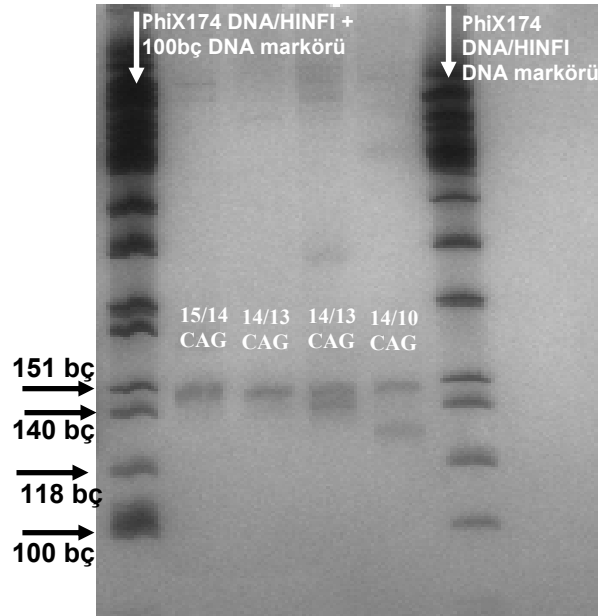


### 5.3.2. SCA6'nın Moleküler Analizi

70 sağlıklı bireyin 19p13 kromozomunda yer alan CACNA1A genindeki CAG tekrar bölgesi S5F1 ve S5R1 primerleri kullanılarak PCR ile çoğaltılmıştır. PCR ürünleri % 2'lik agaroz jelde kontrol edildikten sonra (Şekil 5.7.) %12'lik denatüre edici poliakrilamid jelde yürütülmüş ve gümüş boyama yöntemi ile boyanmıştır (Şekil 5.8.). Quantity-one programı ile CAG tekrar sayıları tespit edilmiştir.



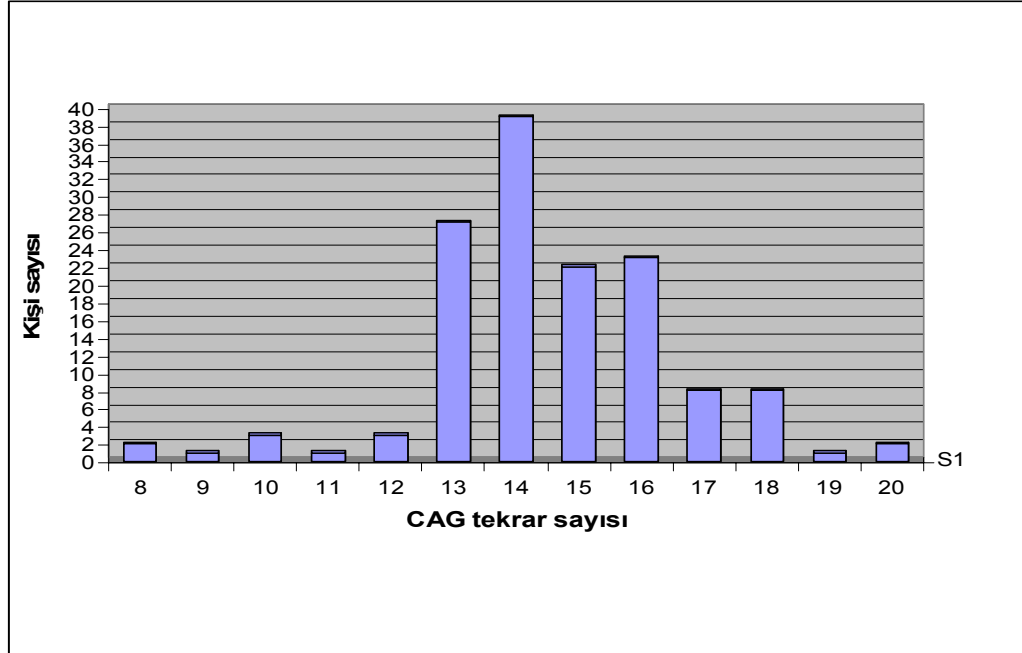
Şekil 5.7. SCA6 PCR ürünlerinin %2'lik agaroz jelde görüntülenmesi



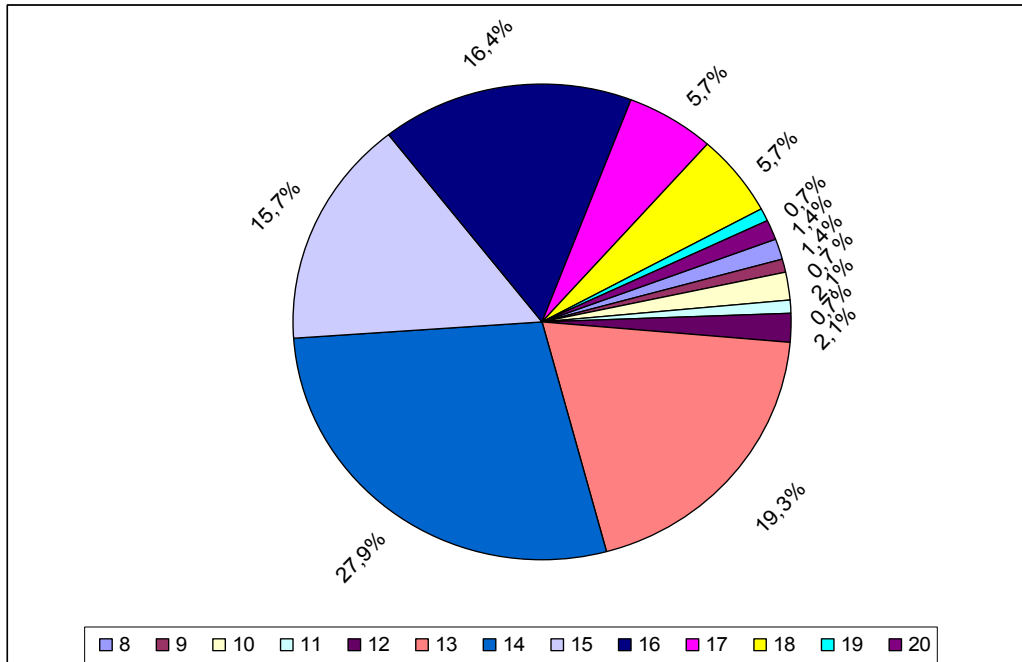
Şekil 5.8. SCA6 PCR ürünlerinin %12'lik dPAGE görüntüsü

Sonuçlar doğrultusunda sağlıklı Türk bireylerinde CACNA1A genindeki CAG tekrar sayısı aralığının 8 ile 20 CAG tekrarı arasında değiştiği ve en sık gözlenen alel

aralığının 13 ile 16 CAG tekrar sayısı aralığı olduğu belirlenmiştir (Şekil 5.9.). İncelenen bireylerde 13 farklı alel saptanmıştır. Heterozigotluk oranı %100'dür. ATXN6 geninde 14 CAG (%27,9) tekrarı en sık görülen aleldir, bunu 13 (%19,3) ve 16 (%16,4) tekrarlı aleller takip etmektedir (Şekil 5.10.).



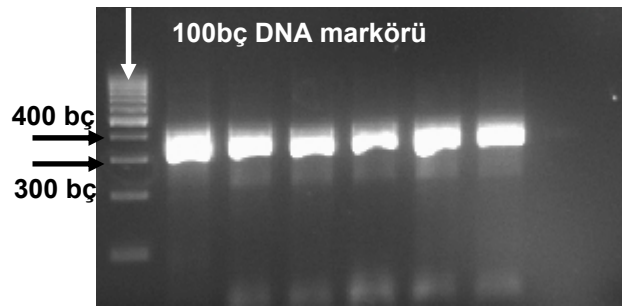
Şekil 5.9. Sağlıklı Türk bireylerinin CACNA1A gen lokusundaki tekrar sayısı



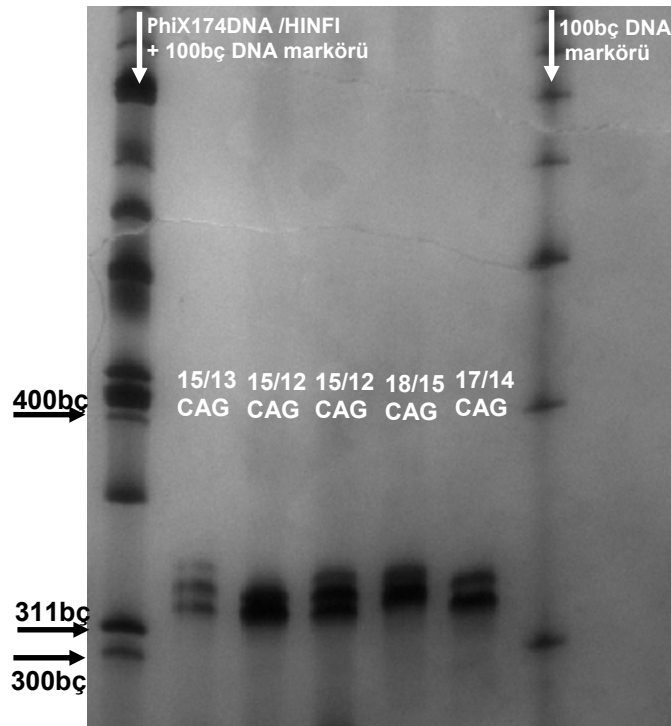
Şekil 5.10. CACNA1A gen lokusundaki tekrar sayısı dağılımı

### 5.3.3. SCA 7'nin Moleküler Analizi

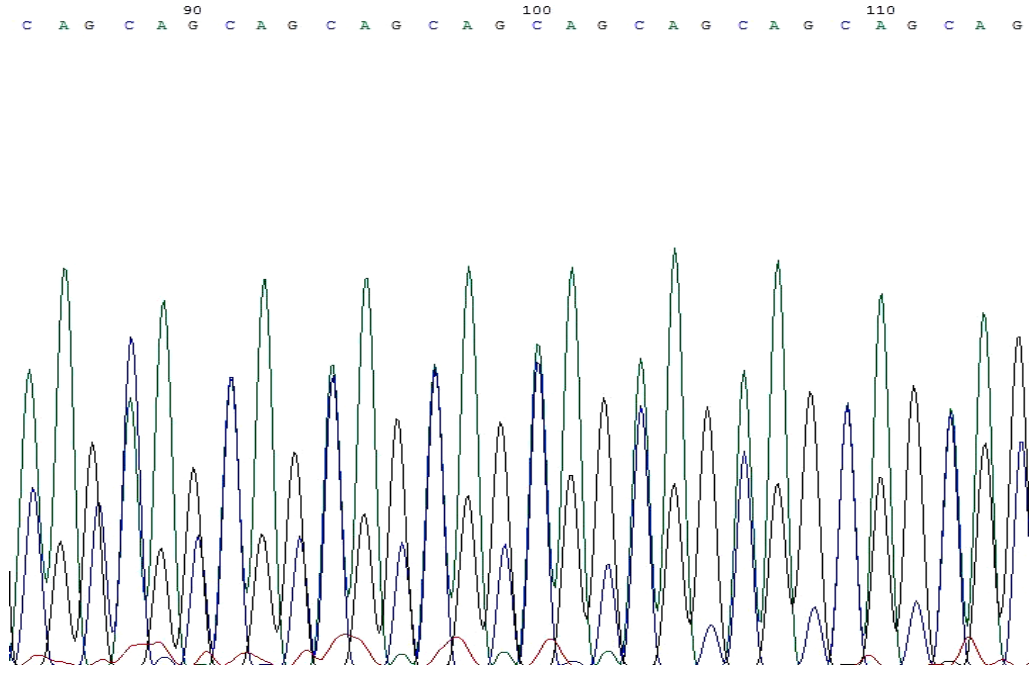
70 sağlıklı bireyin 3p21.1-p12 kromozomunda yer alan ATXN7 geni üzerindeki CAG tekrar bölgesi 4U716 ve 4U1024 primerleri kullanılarak PCR ile çoğaltılmıştır. PCR ürünleri % 2'lik agaroz jelde yürütülerek kontrol edilmiş (Şekil 5.11.) ve başarılı PCR örnekleri %8'lik denatüre edici poliakrilamid jelde yürütülerek gümüş boyama ile boyanmıştır (Şekil 5.12.). Alel uzunlukları Quantity-one programı kullanılarak tespit edilmiştir. Ayrıca elde ettiğimiz sonuçların doğruluğunu kontrol etmek amacıyla SCA7 PCR örneklerinin dizi analizi yapıp tekrar sayıları belirlenmiştir (Şekil 5.13.).



Şekil 5.11: SCA7 PCR ürünlerinin %2'lik agaroz jelde görüntülenmesi

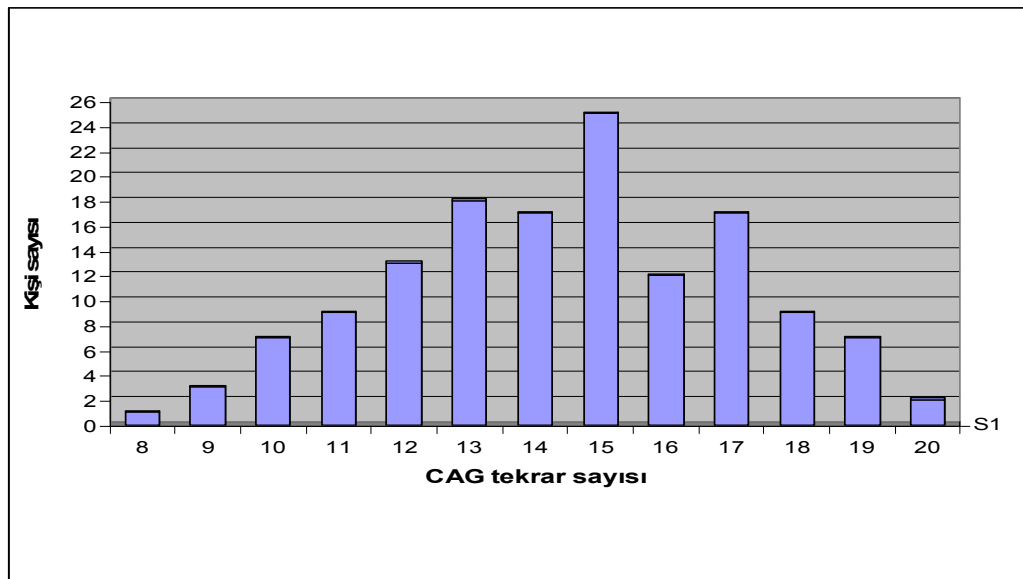


Şekil 5.12. SCA7 PCR ürünlerinin %8'lik dPAGE görüntüsü

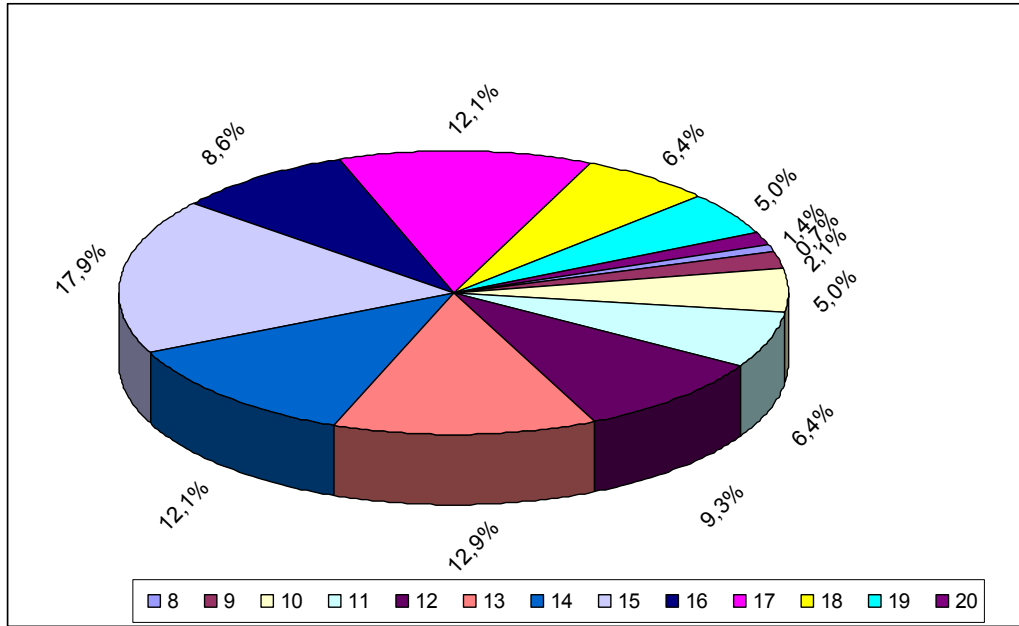


Şekil 5.13: ATXN 7 gen lokusundaki CAG tekrarlarının dizi analiziyle belirlenmesi

Sonuçlar doğrultusunda sağlıklı Türk bireylerinde ATXN7 genindeki CAG tekrar sayısı aralığının 8 ile 20 CAG tekrarı arasında değiştiği ve en sık gözlenen alel aralığının 13 ile 17 CAG tekrar sayısı aralığı olduğu belirlenmiştir (Şekil 5.14.). İncelenen bireylerde 13 farklı alel saptanmıştır ve heterozigotluk oranı %100 dür. ATXN7 geninde 15 CAG tekrarlı alel en sık görülen (%17,9) aleldir, bunu 13 (%12,9), 14 (%12,1) ve 17 (%12,1) tekrarlı aleller takip etmektedir (Şekil 5.15.).



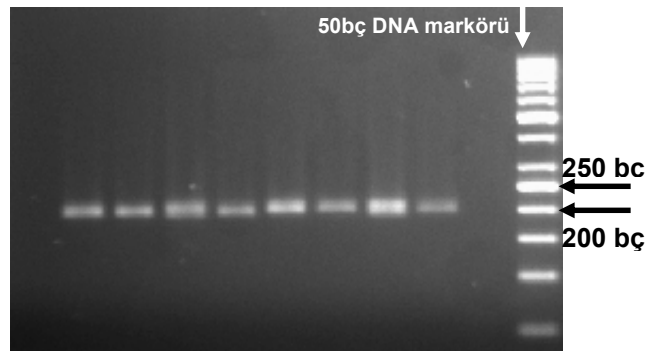
Şekil 5.14. Sağlıklı Türk bireylerinin ATXN7 gen lokusundaki tekrar sayısı



Şekil 5.15. ATXN7 gen lokusundaki tekrar sayısı dağılımı

#### 5.3.4. SCA 17'nin Moleküler Analizi

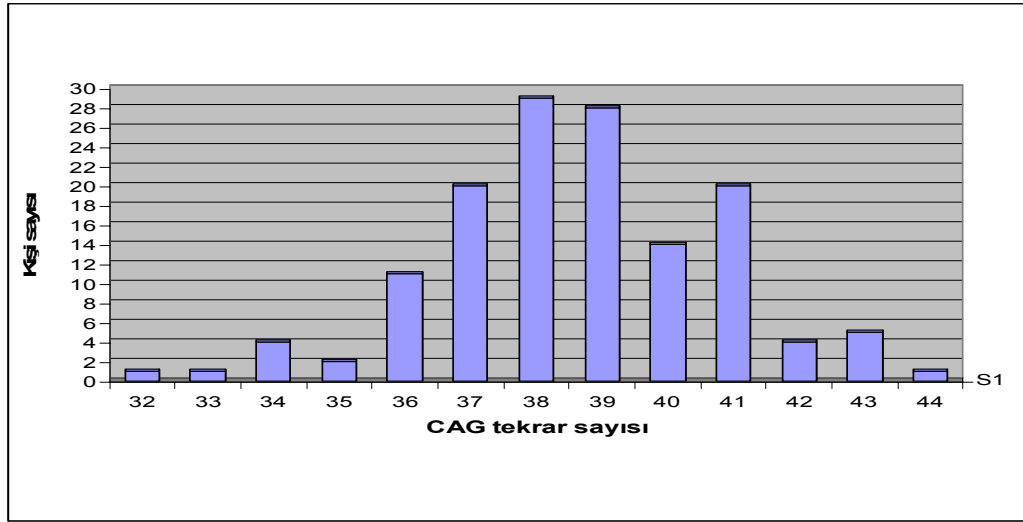
Toplam 70 sağlıklı bireyin 6q27.3 kromozom bölgesinde bulunan TBP geni CAG tekrar sayılarını belirleyebilmek için TBP geni TATABF ve TATABR primerleri kullanılarak PCR ile çoğaltılmıştır. PCR ürünleri % 2'lik agaroz jelde yürütülerek kontrol edilmiş (Şekil 5.16.) ve PCR ürünleri %10'luk poliakrilamid jelde yürütülerek gümüş boyama tekniği ile boyanmıştır (Şekil 5.17.). Boyama işlemi sonrası Quantity one programı kullanılarak CAG tekrar sayıları tespit edilmiştir. Ayrıca elde edilen sonuçların doğruluğunu kontrol etmek amacıyla SCA17 PCR örneklerinin dizi analizi yapıpı tekrar sayıları belirlenmiştir (Şekil 5.18.).



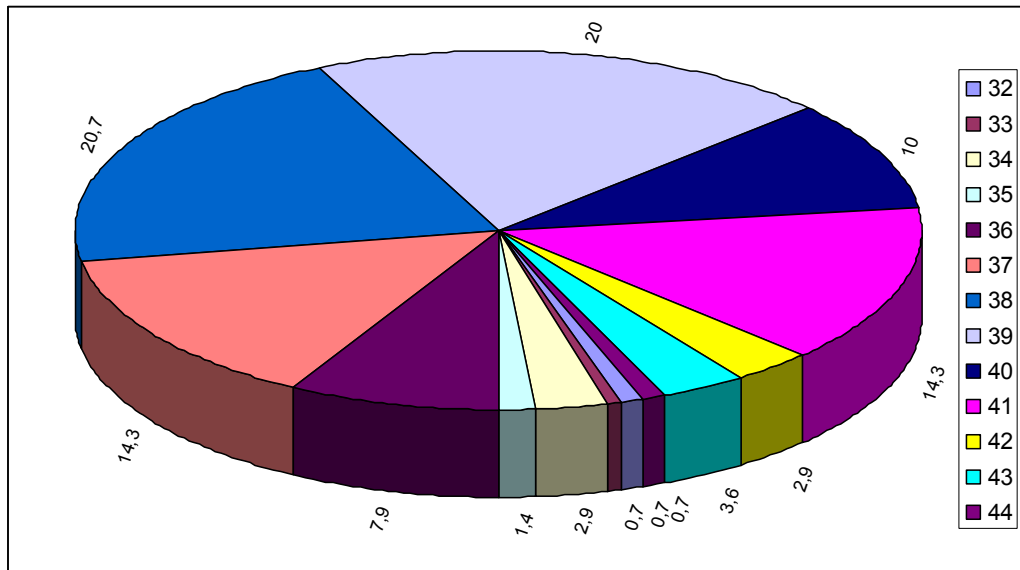
Şekil 5.16. SCA17 PCR ürünlerinin %2'lik agaroz jelde görüntülenmesi



edilmiştir. En sık görülen aleller 38 (%20,7), 39 (%20) ve 41 tekrarlı (%14,3) alellerdir (Şekil 5.20.).



Şekil 5.19. Sağlıklı Türk bireylerinin TBP gen lokusundaki tekrar sayısı



Şekil 5.20. TBP gen lokusundaki tekrar sayısı dağılımı

## 6. TARTIŞMA

SCA ve ADCA hastalıkları, birçok alt tipleri bulunan, klinik ve genetik açılarından oldukça kompleks bir grup hastalıktır. Bu kompleksliğin en önemli sebepleri; hastalıkların çok geniş fenotipik çeşitlilik göstermesi, hastalık semptomlarının büyük ölçüde örtüşmesi, bir alt tip içinde, hatta aynı alt tip hastalığa sahip aile üyeleri arasında bile klinik semptomların çok çeşitli olabilmesidir. Bunlara ek olarak EA, HSP, HD, tremor, HSMN gibi fenotipik açıdan spinoserebellar ataksiye benzeyen hastalıklar da mevcuttur. Dolayısıyla spinoserebellar ataksi hastalıklarının tanılarının sadece klinik değerlendirmeye dayalı olarak yapılması uygun değildir. Yalnız klinik veriler doğrultusunda yapılacak tanılarda yanlış tanı koyulması olasılığı büyüktür.

Spinoserebellar ataksi ile örtüşen genlerin moleküler karakterizasyonu ve bunu takiben SCA ve ADCA'lara sebep olan mutasyonların keşfi, DNA analizi için özgün ve duyarlı moleküler test protokollerinin geliştirilebilmesine olanak sağlamıştır. DNA analizi klinik tanının doğrulanmasına olanak verir, ayırıcı tanı yapılabilmesi sağlar ve prediktif tanı ile bireylerin hastalığa yakalanma olasılıklarını ortaya koyar. Bu şekilde, bireylerdeki patolojinin doğru tanımlanması, uygun tedavinin yapılabilmesini ve yeterli genetik danışmanlığın verilebilmesini sağlar.

CAG tekrarlı ADCA'ların moleküler DNA tanısı oldukça kolaydır, çünkü sadece ilgili tek bir gende CAG tekrar sayısının hesaplanmasıyla mutasyon analizi yapılır. Ancak, herhangi bir popülasyonda moleküler tanı kriterlerinin oluşturulabilmesi için ilgili ADCA lokuslarındaki normal CAG tekrar uzunluklarının belirlenmesi gerekir. Bunun sebebi, aynı lokustaki tekrar sayılarının coğrafi ve etnik varyasyonlar göstermesidir.

Bu doğrultuda yapılan bu tez çalışmasında, kendilerinde ve ailelerinde ataksi ve diğer nörodejeneratif hastalıklara rastlanmayan 70 Türk bireyinin SCA3, SCA6, SCA7 ve SCA17 lokuslarındaki CAG tekrar sayıları belirlenmiştir. Literatür taramaları sonucunda, CAG tekrarlı ADCA lokuslarındaki alel dağılımlarının Türk toplumunda incelenmediği ortaya koyulmuştur. Sadece SCA1 ve SCA2 lokuslarındaki normal tekrar sayıları incelenmiştir (Ersoy, 2005). Yapılan bu tez



çalışması ile tüm CAG tekrarlı ADCA lokuslarında sağlıklı Türk populasyonu incelemesi tamamlanmış olacaktır.

### 6.1. Metodoloji

Bu tez çalışmasında sağlıklı bireylerden alınan kan örneklerinden DNA izolasyonu yapılmış, ilgili gen bölgeleri PCR reaksiyonu ile çoğaltılmış ve sonrasında poliakrilamid jel elektroforezi ve gümüş boyama ile aleller belirlenmiştir. Bunu takiben, alel uzunlukları jel dokümantasyon cihazında değerlendirilmiş ve alel uzunlukları quantity-one programı kullanılarak jel üzerinde hesaplanmıştır.

CAG tekrarları taşıyan gen bölgelerinin G ve C nükleotidleri bakımından zengin olması ve bu bölgelerin kendi üzerlerinde katlanarak ikincil yapılar oluşturması sebepleriyle ilgili genlerin amplifikasyonu ve bunu takip eden moleküler analiz yöntemlerinde zorluklar yaşanmaktadır. Buna ek olarak, birçok gen lokusu için sağlıklı ve hasta popülasyonlarında normal ve patolojik tekrar sayısı aralıkları birbirine çok yakındır; bu durum da alel uzunluklarının çok az hata payı ile hesaplanmasını gerektirir.

Trinükleotid tekrar sayılarının belirlenmesinde Southern blot, poliakrilamid jel elektroforezi, kapiler elektroforez ve DNA sekans analiz yöntemi gibi farklı teknikler kullanılabilir. Southern blot yöntemi genomik DNA'nın restriksiyon enzimleriyle kesimi ya da PCR ile amplifikasyonu sonrasında sekanslama jellerinde elektroforeze tabii tutulması ve sonrasında jellerin  $^{32}\text{P}$ ,  $^{35}\text{S}$  gibi radyoaktif  $(\text{CAG})_n$  problemleriyle inkübe edildikten sonra görüntünün otoradyogramlara aktarılması ve film üzerinde CAG tekrar uzunluklarının hesaplanması ilkesine dayanır. Ancak bu yöntemde elektroforez ve hibridizasyon aşamaları birkaç gün zaman alır. Radyoaktif sinyalin çok kuvvetli ya da zayıf olduğu durumlarda deneyin tekrar edilmesi gerekmektedir. Buna ek olarak radyoaktif maddelerle çalışmanın getirmiş olduğu zorluklar ve tehlikeler bu yöntemin dezavantajlarıdır. Bu nedenlerle Southern blotlama tekniği ancak 1000 tekrar ve üzeri uzunlukların görüldüğü lokusların analizinde kullanılabilir. Kapiler elektroforez yönteminde ise floresan primerlerle PCR yapıldıktan sonra ürünler dizi analizi cihazlarında ve kapiler tüplerde jellerden farklı bir polimer ortamında elektroforeze tabi tutulur ve aleller GeneScan yazılımı ile değerlendirilir. Çok hassas ve güvenilir bir metod olan kapiler elektroforez yönteminin tek dezavantajı maliyetinin yüksek olmasıdır. DNA sekans analizi

yöntemi ise PCR amplifikasyonu sonrasında, çoğaltılmış olan bölgenin baz dizilişini ortaya koyar, bu sayede tekrar sayıları belirlenir. Bu yöntemi uygulamak için PCR ürünlerinin fazla miktarda hazırlanması ve pürifikasyonu gerekmektedir, ayrıca dizileme maliyeti de yüksektir. Bu nedenlerle, dizi analizi yöntemi diğer metodlarla elde edilen sonuçların doğrulanması için kullanılabilir. Populasyonlarda CAG tekrar sayılarının taranması için kullanılacak en doğru yöntem PCR sonrası jel elektroforezi yapılarak alel uzunluklarının jel üzerinde belirlenmesidir. Bu yöntem uygulanırken de örneklerin denatüre edici koşullarda ve jelde homojen akım dağılımı sağlanarak yapılması ve DNA uzunluk markörleriyle yapılacak kıyaslamalarla alel uzunluklarının belirlenmesi önemlidir

### 6.1.1. PCR Amplifikasyonu

Alel uzunluklarının en doğru şekilde hesaplanması için ilk adım PCR amplifikasyonunun başarılı bir şekilde gerçekleştirilmesidir. CAG tekrarları içeren genlerin çoğaltılması, GC-zengin bölgeler içermelerinden dolayı oldukça zordur. Bu nedenle öncelikle PCR reaksiyonlarında başlangıç denatürasyon sıcaklığı 94°C'nin üzerinde tutularak GC-zengin DNA çift sarmalının tam olarak ayrılması sağlanır. Buna ek olarak DMSO, gliserol veya GC-zengin solüsyonu ile bu bölgelerin ikincil yapılar oluşturmasını engellenerek PCR amplifikasyonunun kalitesi artırılabilir. PCR kalitesinin sağlanmasında en önemli kriterlerden biri de polimeraz enzimidir. GC-zengin bölgelerin çoğaltılmasında genellikle rutin olarak kullanılan Taq polimeraz enzim çeşitleri yetersiz kalır. Bunun en önemli sebebi, Taq polimeraz enzimlerinin 94°C üzerindeki sıcaklıklara dayanıksız oluşudur. CAG tekrar bölgelerinin çoğaltılmasında çoğunlukla "Hot start" DNA polimerazlar kullanılır. Bu enzimler sadece 95°C ve üzeri sıcaklıklarda aktive olurlar ve bu sıcaklıklarda bir PCR reaksiyonunun tamamlanması için gereken süre boyunca dayanıklıdırlar. Bu şekilde ikincil yapıların yüksek sıcaklıklarda düzeltilmesi mümkün olur. Bu tez çalışması çerçevesinde CAG tekrar bölgelerinin PCR reaksiyonu ile çoğaltılabilmesi için Taq DNA polimeraz, Long PCR Taq polimeraz ve Hot start polimeraz enzim çeşitlerinden toplam 13 adet enzim denenmiştir.

Hot start polimeraz enzimleri;

- GoTaq<sup>®</sup> Hot Start Polymerase: 5'→3' ekzonükleaz özelliğine sahip olup, 95 °C'de 2 dakikada aktive olmaktadır (Promega),

- Fast Start Taq DNA polymerase: 5'→3' ekzonükleaz özelliğine sahip olup, 95 °C'de 4 dakikada aktive olmaktadır (Roche),
- True Start Taq: 5'→3' DNA polimeraz özelliğine sahip olup, 95 °C'de 2 dakikada aktive olmaktadır (Fermentas),
- Hot Start Taq: 5'→3' DNA polimeraz özelliğine sahip olup 95°C'de 4 dakikada aktive olmaktadır (Fermentas),
- Ex Taq: 5'→3' DNA polimeraz özelliğine olup 95°C'de 5 dakikada aktive olmaktadır (Takara),
- Accuzyme DNA Polymerase: 5'→3' DNA polimeraz özelliğine sahip olup, 94-97 °C'de 5 dakikada aktive olmaktadır (Bioline).
- BİOTAQ DNA Polymerase: 5'→3' ekzonükleaz özelliğine sahip olup, 94-96 °C'de 5 dakikada aktive olmaktadır (Bioline).
- HotStarTaq Plus DNA Polymerase: 5'→3' DNA polimeraz özelliğine sahip olup 95°C'de 5 dakikada aktive olmaktadır (Qiagen).

Taq DNA polimeraz enzimleri;

- Taq DNA Polymerase: 5'→3' DNA polimeraz özelliği sahip olup, 94°C'de 4 dakikada aktive olmaktadır (Fermentas).
- Taq DNA Polymerase: 5'→3' DNA polimeraz özelliğine sahip olup, 94°C'de 4 dakikada aktive olmaktadır (Roche),

Long PCR Taq polimeraz enzimleri;

- Expand High Fidelity PCR System: 5'→3' DNA polimeraz ve 3'→5' ekzonükleaz özelliğine sahip olup 95°C'de 4 dakikada aktive olmaktadır (Roche).
- Expand High Fidelity Taq Polymerase: 5'→3' DNA polimeraz ve 3'→5' ekzonükleaz özelliğine sahip olup 95°C'de 5 dakikada aktive olmaktadır (Fermentas).

Belirtilen enzimlerin her biri çeşitli Mg<sup>+2</sup> iyon konsantrasyonlarında ve farklı tampon içerikleriyle birlikte kullanılarak her lokusun çoğaltılabilmesi için en iyi PCR şartları belirlenmeye çalışılmıştır. Denenmiş olan enzimler arasında en iyi sonuç alınan enzim GoTaq® Hot Start Polymerase (Promega) enzimidir. Bu enzim iki dakika gibi çok kısa bir sürede aktive olarak PCR içeriğinin yüksek sıcaklıklara en az maruz kalacak şekilde ve çok az bir miktar (0,2 U) kullanılarak başarılı bir amplifikasyon sağlamaktadır. GoTaq® Hot Start Polymerase enzimi, amplifikasyonu

en zor lokus olan SCA6 tekrar bölgesinin çoğaltılmasında kullanılmıştır. Denenen diğer hiçbir enzimle SCA 6 bölgesi çoğaltılamamıştır. Amplifikasyonu daha kolay olan SCA7 ve SCA3 tekrar bölgeleri, Fast Start Taq DNA polymerase (Roche) ve HotStarTaq Plus DNA Polymerase (Qiagen) enzimleriyle çoğaltılabilmiş, ancak bu bölgeler normal DNA polimeraz enzimleriyle amplifiye edilememiştir. SCA17 bölgesi ise Taq DNA Polymerase (Fermentas) enzimi ile çoğaltılmıştır, fakat Taq DNA Polymerase enzimi (Roche) ve Hot Start grubu enzimlerle amplifikasyon sağlanamamıştır. Long PCR Taq polimeraz enzimleri kuvvetli olmalarına rağmen SCA3, SCA6 ve SCA7 gen bölgelerinin çoğaltılmasında yetersiz kalmıştır; bunun bir sebebi, bu grup enzimlerin 1000bç ve üzeri PCR amplifikasyonlarında daha etkili olması olabilir.

### **6.1.2. Jel Elektroforezi ve Alel Uzunluklarının Hesaplanması**

PCR reaksiyonu sonrasında, çoğaltılmış olan alellerdeki tekrar sayısını belirlemek için denatüre edici poliakrilamid jel elektroforezi uygulanmıştır. Jel elektroforezi esnasında CAG tekrarları içeren amplifikasyon ürünleri heterodupleks oluşturup alel uzunluklarının yanlış hesaplanmasına yol açabilir. Bunu önlemek için PCR ürünlerinin 95<sup>0</sup>C'de denatürasyonu yapılarak ipliklerin birbirinden ayrılması sağlanmış ve 10 dk kar buzda bekletilerek renatürasyon engellenmiştir. Bu işlemlerden sonra PCR ürünleri denatüre edici poliakrilamid jeline yüklenerek denatüre edici koşulların sürekli sağlanmasına yardımcı olacak sıcak tampon eşliğinde elektroforez yapılmıştır. dPAGE sonrası jel, gümüş boyama tekniğiyle boyanarak aleller görünür hale getirilmiş ve alel uzunlukları jel dokümantasyon cihazında quantity-one programı ile belirlenmiştir. Gümüş boyama tekniğinde, kullanılan gümüş miktarının ayarlanması, alel bantlarının görüntülenme kalitesinde önemlidir. Gümüş miktarı fazla jelin üzerine yapışarak alellerin belirlenmesine engel olabilir. Karşılaşılan başka bir sorun ise katalizör olarak kullanılan kimyasal maddelerdir. Bu kimyasal maddeler gümüşü indirgeyerek, DNA'ya bağlanan gümüşün metalik gümüşe çevrilmesini sağlar. Bu çalışmada sodyum tiyosülfat ve sodyum boro hidrür katalizör olarak denenmiştir, sodyum boro hidrürün daha hızlı bir katalizör olarak işlev yaptığı, fakat sodyum tiyosülfatın jel yüzeyini daha az boyadığı saptanmıştır.

Alel uzunlukları, PCR ürünlerinin jelde oluşturduğu bantların jel dokümantasyon cihazında incelenmesi ve quantity-one programı ile hesaplama yapılması ile belirlenmiştir. Quantity-one programı standart olarak kullanılan markörlerin jeldeki göç mesafelerine (Rf) ve markörü oluşturan DNA fragmentlerinin uzunluklarının logaritmasına göre bir standart eğri grafiği oluşturur. Bu grafik üzerinden jeldeki alellerin Rf değerlerine karşılık gelen baz uzunlukları hesaplanır ve her bir lokus için CAG tekrar sayısına çevrilir.

## 6.2 Moleküler Analiz

DNA üzerindeki stabil olmayan polimorfik üçlü tekrar bölgelerinde meydana gelen anormal tekrar artışlarının birçok nörolojik hastalığa sebep olduğu bilinmektedir. Bunlar arasında en büyük grubu da birçok nörodejeneratif hastalığa sebebiyet veren CAG tekrar artışları oluşturur. Ekzonik bölgelerde CAG üçlü nükleotid tekrar artışlarının sebep olduğu dokuz poliQ hastalığı belirlenmiştir, bunlardan SCA1, 2, 3, 6, 7, ve 17, diğer 28 dominant kalıtmıli ataksi hastalığının da dahil olduğu ADCA grubuna girer. Bu hastalıkların moleküler mekanizmasını aydınlığa kavuşturmak yönünde çok fazla çalışma yapılmasına rağmen mutant poliglutamin proteinlerinin hücre içinde dahil olduğu mekanizmalar halen tam olarak aydınlatılamamıştır. Bu nedenle bu hastalıklar için kesin bir tedavi yöntemi yoktur, sadece semptomları hafifletmek amacıyla tedavi uygulanmaktadır (Schöls vd., 2004).

İlgili mutasyonlar ve mutasyonların bulunduğu gen bölgelerinin belirlenmesi, günümüzde bu hastalıkların moleküler tanılarının yapılabilmesine olanak sağlamaktadır. Dünya genelinde en yaygın gözlenen tip SCA3 (%21)'tür, bunu SCA2 (%15), SCA6 (%15), SCA1 (%6) ve SCA7(%5) dağılımlarının takip ettiği belirlenmiştir. Diğer otozomal ataksi tiplerine daha nadir olarak rastlanmaktadır. Diğer yandan, ADCA'ların % 30'nun genetik etiyolojisi saptanamamıştır (Schöls vd., 2004). Klinik teşhisi tamamlayıcı olarak, bireylerin nörolojik semptomlarına ve etnik kökenlerine göre farklı öncelikler verilerek genetik tanı testlerin yapılması önerilmektedir. Çinliler'de, Brezilyalılar'da ve Portekizliler'de öncelikle SCA3 testi uygulaması gerekir, Japonlarda SCA6 ve DRPLA, Finliler'de SCA7, Yugoslavlar'da ise SCA17 testlerine öncelik verilir.

Bu şekilde, her populasyon için moleküler tanı protokollerinin oluşturulabilmesi amacıyla özgün populasyonlara ait normal ve patolojik tekrar

sayılarının belirlenmesi gerekir. Bu çalışmada sağlıklı Türk toplumu için daha önce tanımlanmamış olan SCA3, 6, 7 ve 17 lokuslarındaki tekrar dağılımları incelenmiştir. Bu amaçla klinik olarak nörolojik semptomlara sahip olmayan 70 sağlıklı bireyden alınan periferik kan örneklerinden elde edilen DNA örneklerinin belirtilen lokuslarındaki CAG tekrar sayıları saptanmıştır.

### 6.2.1. SCA3 Lokusunun Moleküler Analizi

SCA3, 14q24.3-q31 kromozomunda bulunan CAG tekrar sayılarındaki artış sonucu ortaya çıkar ve otozomal dominant ataksiler arasında dünya çapında en yaygın görülenidir. SCA3 normal alellerinin %93,5'inde gözlenen tekrar sayısı 31 CAG tekrarıdır. İntermedya aralık ise şu ana kadar ortaya çıkan fenotiplerle belirlenememiştir. İndirgenmiş penetrans aralığındaki bireyler 45–51 CAG tekrarına sahiptir. Bu tekrarlara sahip bireyler yaşam süreleri boyunca hasta olma riski taşımaktadır. Patolojik aralık ise 55 veya daha fazla CAG tekrarı içerir (Padiath vd., 2005; Gu vd., 2004).

SCA3 dağılımının Kanada'da %17, Kore'de %15, Tayvan'da %32, Almanya'da %50, Çin'de %48, Portekiz'de %74, Azorlar'da %89 olduğu belirlenmiştir.

Sağlıklı bireylerde SCA3 lokusunda bulunan CAG tekrar sayılarını belirlemek için yapılan popülasyon çalışmaları tekrar sayılarının Çinliler'de 13-38 arasında değiştiğini ve yaygın olarak 30 CAG tekrarı bulunduğunu, Japonlarda 14–47 tekrar arasında değiştiğini ve yaygın olarak 15 CAG tekrarı bulunduğunu, Finlilerde 13-34 tekrar arasında değiştiğini ve yaygın olarak 14 ve 23 CAG tekrarı bulunduğunu, Hintlilerde 6–38 CAG tekrarı arasında değiştiğini ve yaygın olarak 22 ve 26 CAG tekrarı bulunduğunu, Korelilerde 14-42, İtalyanlarda 13-47, Tayvan popülasyonunda 13-44 CAG tekrar arasında değiştiğini göstermiştir (Brusco vd., 2004; Juvonen vd., 2005; Alluri vd., 2007; Kim vd., 2001; Tsai vd., 2004; Tang vd., 2000).

Bu tez çalışması verileri doğrultusunda Türk toplumundaki sağlıklı bireylerde SCA3 genindeki CAG tekrar sayısı aralığının 15 farklı alelde 11 ile 27 CAG tekrarı arasında olduğu saptanmıştır. En sık rastlanan tekrar sayısı 17 (%14,3), ortalama tekrar sayısı ise 17,7 olarak bulunmuştur. Alellerin %96'sı 13-23 tekrar sayısı aralığındadır. İncelenen alellerde % 4.3 oranında homozigotluk saptanmıştır,

homozigot aleller 20, 21 ve 22 CAG tekrarıdır. Bu lokusta görülen minimum CAG tekrar sayısı dünya genelinde 14'tür, bu sayı Brezilyalılarda 12, Güney Hintlilerde ise 6'dır. En yüksek normal tekrar sayısı ise dünya genelinde 34 CAG tekrarı olup, bu sayı sadece Koreliler'de 42'ye ulaşmıştır (Alluri vd., 2007; Kim vd., 2001). Uzun normal alellerin varlığının bir populasyondaki hastalık frekansı ile ilişkili olduğu bulunmuştur. Bunun sebebi, uzun normal alellerin mutasyona uğrayıp patolojik uzunluğa ulaşma olasılığının populasyon ortalamasında bulunan alellerden daha yüksek oluşudur. Bizim toplumumuzda en fazla 27 CAG tekrarının görülmesi, SCA3 hastalığına dünya genelinde daha az rastlanacağı anlamını taşıyabilir.

### 6.2.2. SCA6 Lokusunun Moleküler Analizi

SCA 6, 19p13 kromozomunda bulunan CACNA1A genindeki CAG tekrarlarının sayısındaki artış sebebiyle meydana gelir. Yapılan çalışmalar SCA6 patolojik aralığının 21-33 CAG tekrarı arasında olduğunu ve hastalarda yaygın olarak 22 CAG tekrarının bulunduğunu göstermiştir (Schöls vd., 1998; Matsumura vd., 1997; Takahasi vd., 2004; Yabe vd., 1998 ). Yapılan bir çalışmada sağlıklı bireylerde CAG tekrar sayısı aralığının 5–20 CAG tekrarı arasında olduğu ve 18-20 CAG tekrarına sahip bireylerde nörolojik semptomlar görülmediği belirtilmiştir. Başka bir çalışmada ise 19 CAG tekrarına sahip bir bireylerde ataksi semptomları görülmüştür (Shimazaki, 2001) Bu çalışmada 19 CAG tekrarına sahip homozigot bir bireyin alellerindeki toplam CAG sayısının 38 (19/19) olmasının gen dozajı etkisi yapmış olabileceğinden bahsedilmektedir (Mariotti C., 2001) ancak bu yorum durumun açıklanmasında yetersiz kalmaktadır. Etnik varyasyonlar ve indirgenmiş penetrans sebebiyle 19 CAG tekrarı SCA6'ya sebebiyet vermiş olabilir.

Sağlıklı bireylerin CACNA1A geni lokusundaki CAG tekrar sayısı aralığını belirlemek için yapılan çalışmalar sonucunda; İtalyanlar'da bu aralığın 4–18, Finliler'de 4–15, Japonlar'da 6–17 arasında olduğu bulunmuştur (Brusco vd., 2004; Juvonen vd., 2005; Matsuyama vd., 1997). Japonya'nın doğusundaki Chugoku bölgesinde yapılan çalışmalar hastaların büyük çoğunluğunda 15 ve üzeri CAG tekrarı olduğunu tespit etmiştir Chugoku bölgesi SCA6 hastalığının fazla olarak görüldüğü bölgedir. Normal tekrar sayısı aralığının çok yüksek olmasının bu hastalığın yaygın olarak görülmesine sebep olduğunu yansıtmaktadır (Matsuyama vd., 1997).

Bu çalışmada sağlıklı Türk populasyonunda CACNA1A genine ait 13 farklı alelde 8-20 arasında CAG tekrarı olduğu belirlenmiştir. En sık rastlanan tekrar sayısı 14 (%27,9), ortalama tekrar sayısı ise 14,54 olarak bulunmuştur. Alellerin %79'u 13-16 tekrar sayısı aralığındadır. İncelenen bireylerin tümü heterozigot bulunmuştur. Bu lokusta görülen maksimum CAG tekrar sayısı 20'dir. Bu değer dünya genelinde normal ve patolojik sınırı belirleyen bir değerdir. Buradan yola çıkılarak Türk toplumunda SCA6'ya rastlanma olasılığının yüksek olduğu söylenebilir.

### 6.2.3. SCA7 Lokusunun Moleküler Analizi

SCA7, 3p21.1-p12 kromozomunda bulunan CAG tekrar sayılarındaki artış sebebiyle meydana gelir. SCA7' de normal aleller 19 veya daha düşük CAG tekrarı içerir. 30–35 CAG tekrarına sahip alellerdeki tekrar sayıları bir sonraki jenerasyonda artma eğilimi gösterirler. Bir çalışmada 38-44 CAG tekrarına sahip bireylerin taşıyıcı olduğu ve bazı bireylerde hafif makular dejenerasyon gözlemlendiği belirtilmiştir (Martin vd., 1999). Bu sonuçlara benzer diğer bir çalışmada da, 34 CAG tekrarına sahip bir bireyde hafif makular dejenerasyon gözlemlenmiştir (Koob vd., 1999). Patolojik alellerin ise 36 CAG tekrarından 460 CAG tekrarına kadar değişebileceği saptanmıştır (van de Warrenburg vd., 2001). Ayrıca 54 CAG tekrarı ve üzerindeki artışların hastalık başlangıç yaşıyla negatif korelasyon gösterdiği belirlenmiş ve antisipasyonun varlığı gösterilmiştir. Buna ek olarak intermedya aralıkta tekrara sahip hasta bireylerde hastalık başlangıç yaşının değişkenlik gösterdiği de saptanmıştır (Martin vd., 1999). Bu sonuçlar doğrultusunda, en düşük patolojik tekrarın 34 olduğu söylenebilir.

Sağlıklı bireylerin SCA7 lokusundaki CAG tekrar sayısı aralığını belirlemek için yapılan çalışmalar sonucunda bu aralığın Çinlilerde 9–19, Hintlilerde 3-20, Belçikalılarda 4-18, İspanyollarda 5-15, Korelilerde 7–16, İsveçlilerde 7–15 ve Finlilerde 7–13 CAG tekrarı arasında değiştiği belirlenmiştir (Martin vd., 1999; Alluri vd. 2007; Kim vd., 2001; Pujana vd., 1999; Juvonen vd ., 2005, Johansson vd. 1998)

Türk populasyonu ile yapılan bu çalışmada ise ATXN 7 genindeki CAG tekrar sayısı aralığının 13 farklı alelde 8 ile 20 CAG tekrarı arasında değiştiği belirlenmiştir. En sık rastlanan tekrar sayısı 15 (%17,9), ortalama tekrar sayısı ise 14,45 olarak bulunmuştur. Alellerin %73'ü 12-17 tekrar sayısı aralığındadır.



İncelenen bireylerin tümü heterozigot bulunmuştur. Bu lokusta görülen minimum ve maksimum CAG tekrar sayıları dünya geneliyle örtüşmektedir. Türk toplumunda sağlıklı bireylerin %17'sinde 15 CAG tekrarı gözlenmiştir. Yapılan çalışmalarda ise 10 CAG tekrarına sahip bireylerin çoğunlukta oldukları vurgulanmıştır (Martin vd., 1999; Pujana vd., 1999; Juvonen vd., 2005). Fakat Hintlilerde 15 CAG tekrarının yaygın gözüktüğü belirtilmiştir. (Alluri vd., 2007). Buradan Türk ve Hintli popülasyonlarının ATXN7 genlerinin benzer özellik gösterebileceği düşünülebilir.

#### 6.2.4. SCA17 Lokusunun Moleküler Analizi

SCA17, 3p21.1-p12 kromozomundaki TBP genindeki CAG tekrar sayılarındaki artış sebebiyle meydana gelir. Hastalarda 45-66 CAG tekrarı belirlenmiştir. Ayrıca indirgenmiş penetrans aralığının 44 ile 48 CAG tekrar aralığında olduğu düşünülmektedir. Fakat 43 CAG tekrarına sahip bir bireyde de hastalık görülmüştür. İlginç olarak ise 39 CAG tekrarına sahip olan bir bireyde hastalık semptomları belirlenmiş ve yapılan moleküler testler sonucunda CAA/CAG dizisindeki CAA dizinin kaybolmasıyla saf CAG tekrarlarının hastalığa sebep olduğu ortaya koyulmuştur.

Sağlıklı bireylerin CAG tekrar sayısı aralığının belirlemek için yapılan çalışmalar normal tekrarların 25-44 CAA/CAG arasında olduğunu ve 32-39 CAA/CAG tekrarlarının yaygın olarak görüldüğüne işaret etmiştir. Kafkasya kökenli sağlıklı bireylerde tekrarların 25-42, Japonlarda 31-42 / 29-42, Almanlarda 27-44, Fransız, Hollandalı ve Yugoslavlarda 25-42 aralığında olduğu belirlenmiştir. Yugoslav popülasyonunda sağlıklı bireylerin %72,1'inde 37-39 CAG tekrarı gözlemlenmiştir (Nakamura vd., 2001; Fujigaashi vd., 2001; Zulkhe C vd., 2001; Alendar vd., 2004; Koide vd., 1999).

Bu çalışmada Türk toplumundaki sağlıklı bireylerde TBP genindeki CAG tekrar sayısı aralığının 32 ile 44 CAG tekrarı arasında değiştiği ve 13 farklı alel olduğu bulunmuştur. En sık rastlanan tekrar sayısı 38 (%20,8), ortalama tekrar sayısı ise 38,63 olarak bulunmuştur. Alellerin %87'si 36-42 tekrar sayısı aralığındadır. İncelenen bireylerin 10 tanesi 37, 38, 39, 41, 43 CAG tekrarları için homozigot bulunmuştur. Bireylerin %3.1'i 42 ve 43, %0.8'i ise 44 CAG tekrarı taşımaktadır. 44 CAG tekrarı bazı çalışmalarda indirgenmiş penetransın gözlemlenmeye başladığı tekrar sayısı, bazı çalışmalarda ise normal olarak bulunmuştur. Türk toplumunda da

nadiren görülen bu tekrar sayısının normal aralığın sınırı olarak kabul edilebilir, ancak yine de dikkatli değerlendirilmesi gerekir.

### **6.2.5. Genel Değerlendirme**

Üçlü nükleotid tekrarı hastalıklarında, tekrar sayısı artışının hastalık sebebi olduğu bulunmasına rağmen bu artmalar sonucunda mutant proteinlerin nasıl bir mekanizmayla hastalığa yol açtığı tam olarak aydınlatılamamıştır. Bu mekanizmaların bulunmasıyla üçlü nükleotid tekrarı hastalıklarının herhangi birine uygulanabilecek bir tedavinin diğer nörodejeneratif hastalıklarının tedavisi için de yol gösterici olması beklenmektedir. Günümüzde uygulanan tedavi yöntemleri sadece semptomatiktir. Ölümcül ve henüz kesin tedavisi olmayan bu hastalıkların moleküler tanıların yapılarak kesin olarak teşhis edilmesi, semptomatik hastalarda ayırıcı tanının yapılabilmesine olanak sağlar ve ailelerde ve toplumda bu hastalıkların yaygınlaşmasını engelleyebilir. Moleküler tanı protokollerin oluşturulabilmesi amacıyla her toplumunun ilgili gen lokuslarındaki normal ve patolojik tekrar aralıkları belirlenmelidir.

Bu çalışmada da ADCA lokuslarından SCA3, 6, 7 ve 17'deki normal tekrar sayıları belirlenmiştir. Türk toplumu üzerinde ilk kez yapılan bu çalışma ile ilgili konuda literatüre katkıda bulunulacaktır. Türk populasyonunda bu hastalıkların prevalans analizi de yapılamamıştır, ancak bu çalışma çerçevesinde uzun normal alellerin az olmasından yola çıkılarak bu hastalıkların görülme sıklığının dünya genelinden daha fazla olmayacağı söylenebilir.

## 7. KAYNAKLAR

### 7.1. Kitaplar

Klockgether, T. Handbook of Ataxia Disorders. Marcel Dekker Inc. *Vol. 50 New York*. 2000

### 7.2. Tezler

Ersoy N., “Molecular Analysis of Polyglutamine Diseases and Investigation of the Interaction Between Huntingtin and Nuclear Receptor Corepressor”, Doktora Tezi, Boğaziçi Üniversitesi, İstanbul, 2005

### 7.3. Makaleler

AHN, J.K., Seo, J.M., Chung, H., Yu, H.G. Anatomical and functional characteristics in atrophic maculopathy associated with spinocerebellar ataxia type 7. **Am J Ophthalmol** **139** (2005): 923-5.

ALEMAN, T.S., Cideciyan, A.V., Volpe, N.J., Stevanin, G., Brice, A., Jacobson, S.G. Spinocerebellar ataxia type 7 (SCA7) shows a cone-rod dystrophy phenotype. **Exp Eye Res** **74** (2002): 737-45.

ALLURI RV, Komandur S, Wagheray A, Chaudhuri JR, Sitajayalakshmi, Meena AK, Jabeen A, Chawda K, Subhash K, Krishnaveni A, Hasan Q. Molecular analysis of CAG repeats at five different spinocerebellar ataxia loci: correlation and alternative explanations for disease pathogenesis. **Mol Cells** **24(3)** (2007): 338-42.

ANDREW, S.E., Goldberg, Y.P., Hayden, M.R. Rethinking genotype and phenotype correlations in polyglutamine expansion disorders. **Hum Mol Genet** (1997): 2005-10.

ANSORGE, O., Giunti, P., Michalik, A., Van Broeckhoven, C., Harding, B., Wood, N., Scaravilli, F. Ataxin-7 aggregation and ubiquitination in infantile SCA7 with 180 CAG repeats. **Ann Neurol** **56** (2004): 448-52.

BATTISTINI S, Stenirri S, Piatti M, Gelfi C, Righetti PG, Rocchi R, Giannini F, Battistini N, Guazzi GC, Ferrari M, Carrera P. A new CACNA1A gene mutation in acetazolamide-responsive familial hemiplegic migraine and ataxia. **Neurology** **53** (1999): 38-43.

BENOMAR, A., Le Guern, E., Dürr, A., Ouhabi, H., Stevanin, G., Yahyaoui, M., Chkili, T., Agid, Y., Brice, A.: Autosomal- dominant cerebellar ataxia with retinal

degeneration (ADCA type II) is genetically different from ADCA type I. **Ann Neurol** **35**(1994): 439–444.

BENTON, C.S., de Silva, R., Rutledge, S.L., Bohlega, S., Ashizawa, T., Zoghbi, H.Y. Molecular and clinical studies in SCA-7 define a broad clinical spectrum and the infantile phenotype. **Neurology** **51** (1998): 1081

BERKE, S.J., Chai, Y., Mars, G.L., Wen, H., Paulson, H.L. Defining the role of ubiquitin-interacting motifs in the polyglutamine disease protein, ataxin-3. **J Biol Chem** **280** (2005): 32026-34.

BRUNI, A.C., Takahashi-Fujigasaki, J., Maltecca, F., Foncin, J.F., Servadio, A., Casari, G., D'Adamo, P., Maletta, R., Curcio, S.A., De Michele, G., Filla, A., El Hachimi, K.H., Duyckaerts, C. Behavioral, disorder, dementia, ataxia, and rigidity in a large family with TATA box-binding protein mutation. **Arch Neurol** **61** (2004): 1314–20.

BURK, K., Abele, M., Fetter, M., Dichgans, J., Skalej, M., Laccone, F., Didierjean, O., Brice, A., Klockgether, T. Autosomal dominant cerebellar ataxia type I clinical features and MRI in families with SCA1, SCA2 and SCA3. **Brain** **119** (Pt 5) (1996):1497-505.

BURNETT, B., Li, F., Pittman, R.N. The polyglutamine neurodegenerative protein ataxin-3 binds polyubiquitylated proteins and has ubiquitin protease activity. **Hum Mol Genet** **12**(23) (2003):3195-205.

BRUSCO A, Gellera C, Cagnoli C, Saluto A, Castucci A, Michielotto C, Fetoni V, Mariotti C, Migone N, Di Donato S, Taroni F. Molecular genetics of hereditary spinocerebellar ataxia: mutation analysis of spinocerebellar ataxia genes and CAG/CTG repeat expansion detection in 225 Italian families. **Arch Neurol** **61**(5) (2004): 727-33.

BUTTNER, N.; Geschwind., D., Jen, J. C., Perlman, S., Pulst, S. M., Baloh, R. W. Oculomotor phenotypes in autosomal dominant ataxias. **Arch. Neurol.** **55** (1998): 1353-1357.

CANCEL, G., Abbas, N., Stevanin, G., Durr, A., Chneiweiss, H., Neri, C., Duyckaerts, C., Penet, C., Cann, H. M., Agid, Y., Brice, A. Marked phenotypic heterogeneity associated with expansion of a CAG repeat sequence at the spinocerebellar ataxia 3/Machado-Joseph disease locus. **Am. J. Hum. Genet.** **57** (1995): 809-816.

CANCEL, G., Duyckaerts, C., Holmberg, M., Zander, C., Yvert, G., Lebre, A.S., Ruberg, M., Faucheux, B., Agid, Y., Hirsch, E., Brice, A. Distribution of ataxin-7 in normal human brain and retina. **Brain** **123** (2000): 2519– 2530.

CATTERALL, W.A. Structure and regulation of voltage-gated Ca<sup>2+</sup> channels. **Annu Rev Cell Dev Biol** **16** (2000):521–555.

CEMAL, C.K., Carroll, C.J., Lawrence, L., Lowrie, M.B., Ruddle, P., Al-Mahdawi, S., King, R.H., Pook, M.A., Huxley, C., Chamberlain, S. YAC transgenic mice carrying pathological alleles of the MJD1 locus exhibit a mild and slowly progressive cerebellar deficit. **Hum Mol Genet** **11** (2002):1075-94

CHOW, M.K., Mackay, J.P., Whisstock, J.C., Scanlon, M.J., Bottomley, S.P. Structural and functional analysis of the Josephin domain of the polyglutamine protein ataxin-3. **Biochem Biophys Res Commun** **322** (2004): 387-94

CHOW, M.K., Paulson, H.L., Bottomley, S.P. Destabilization of a non-pathological variant of ataxin-3 results in fibrillogenesis via a partially folded intermediate: a model for misfolding in polyglutamine disease. **J Mol Biol** **335** (2004): 333-41

COUTINHO, P., Andrade, C. Autosomal dominant system degeneration in Portuguese families of the Azores Islands: a new genetic disorder involving cerebellar, pyramidal, extrapyramidal and spinal cord motor functions. **Neurology** **28** (1978): 703-709.

CRAIG, K., Keers, S.M., Archibald, K., Curtis, A., Chinnery, P.F. Molecularepidemiology of spinocerebellar ataxia type 6. **Ann Neurol** **55** (2004): 752-755.

CRAIG, K., Keers, S.M., Walls, T.J., Curtis, A., Chinnery, P.F. Minimum prevalence of spinocerebellar ataxia 17 in the North east of England. **J Neurol Sci.** **239** (2005): 105-9.

CUSTER, S.K., Garden, G.A., Gill, N., Rueb, U., Libby, R.T., Schultz, C., Guyenet, S.J., Deler, T., Westrum, L.E., Sopher, B.L., La Spada, A.R. Bergmann glia expression of polyglutamine-expanded ataxin-7 produces neurodegeneration by impairing glutamate transport. **Nat Neurosci** **9** (2006): 1302-11.

DAVID, G., Abbas, N., Stevanin, G., Dürr, A., Yvert, G., Cancel, G., Weber, C., Imbert, G., Saudou, F., Antoniou, E., Drabkin, H., Gemmill, R., Giunti, P., Benomar, A., Wood, N., Ruberg, M., Agid, Y., Mandel, J.L., Brice, A. Cloning of the SCA7 gene reveals a highly unstable CAG repeat expansion. **Nature Genet** **17** (1997): 65-70.

DE MICHELE, G., Maltecca, F., Carella, M., Volpe, G., Orio, M., De Falco, A., Gombia, S., Servadio, A., Casari, G., Filla, A., Bruni, A. Dementia, ataxia, extrapyramidal features, and epilepsy: Phenotype spectrum in two Italian families with spinocerebellar ataxia type 17. **Neurol Sci** **24** (2003): 166-7.

DEL-FAVERO, J., Krols, L., Michalik, A., Theuns, J., Lofgren, A., Goossens, D., Wehnert, A., Van den Bossche, D., Van Zand, K., Backhovens, H., van Regenmorter, N., Martin, J.J., Van Broeckhoven, C. Molecular genetic analysis of autosomal dominant cerebellar ataxia with retinal degeneration (ADCA type II) caused by CAG triplet repeat expansion. **Hum Mol Genet** **7** (1998): 177-86.

DURR, A., Stevanin, G., Cancel, G., Duyckaerts, C., Abbas, N., Didierjean, O., Chneiweiss, H., Benomar, A., Lyon-Caen, O., Julien, J., Serdaru, M., Penet, C.,

Agid, Y., Brice, A. Spinocerebellar ataxia 3 and Machado-Joseph disease: clinical, molecular, and neuropathological features. **Ann. Neurol.** **39** (1996): 490-499.

EINUM, D.D., Townsend, J.J., Ptacek, L.J., Fu, Y.H. Ataxin-7 expression analysis in controls and spinocerebellar ataxia type 7 patients. **Neurogenetics** **3** (2001): 83– 90.

ENEVOLDSON, T.P., Sanders, M.D., Harding, A.E. Autosomal dominant cerebellar ataxia with pigmentary macular dystrophy: A clinical and genetic study of eight families. **Brain** **117** (1994): 445-460.

EVERT, B.O., Wullner, U., Schulz, J.B., Weller, M., Groscurth, P., Trottier, Y., Brice, A., Klockgether, T. High level expression of expanded full-length ataxin-3 in vitro causes cell death and formation of intranuclear inclusions in neuronal cells. **Hum Mol Genet** **8** (1999): 1169-76

EVERT, B.O., Schelhaas, J., Fleischer, H., de Vos, R.A., Brunt, E.R., Stenzel, W., Klockgether, T., Wullner, U. Neuronal intranuclear inclusions, dysregulation of cytokine expression and cell death in spinocerebellar ataxia type 3. **Clin Neuropathol** **25** (2006): 272-81.

FLETCHER, C.F., Lutz, C.M., O'Sullivan, T.N. Absence epilepsy in tottering mutant mice is associated with calcium channel defects. **Cell** **87** (1996):607– 617.

FRIEDMAN, J.H. Presumed rapid eye movement behavior disorder in Machado-Joseph disease (spinocerebellar ataxia type 3). **Mov Disord** **17** (2002): 1350-3

FRIEDMAN, J.H., Fernandez, H.H., Sudarsky, L.R. REM behavior disorder and excessive daytime somnolence in Machado-Joseph disease (SCA 3). **Mov Disord** **18** (2003): 1520-2.

FROMENT, J., Bonnet, P., Colrat, A. Heredo-dégénération rétinienne et spinocérébelleuses: variantes ophtalmoscopiques et neurologiques présentées par trois générations successives. **J Med Lyon** **22** (1937): 153–163.

FUJIGASAKI, H., Martin, J.J., De Deyn, P.P., Camuzat, A., Deffond, D., Stevanin, G., Dermaut, B., Van Broeckhoven, C., Durr, A., Brice, A. CAG repeat expansion in the TATA box-binding protein gene causes autosomal dominant cerebellar ataxia. **Brain** **124** (2001): 939–1947.

FURTADO, S., Das, S. Suchowersky, O., A review of the inherited ataxias: recent advances in genetics, clinical and neuropathological aspects. **Parkinsonism Related Disorders** **4** (1998): 161-169.

GESCHWIND, D.H., Perlman, S., Figueroa, K.P., Karim, J., Baloh, R.W., Pulst, S.M. Spinocerebellar ataxia type 6. Frequency of the mutation and genotype-phenotype correlations. **Neurology** **49** (1997): 1247–1251.

GIUNTI, P., Stevanin, G., Worth, P., David, G., Brice, A., Wood, N.W. Molecular and clinical study of 18 families with ADCA type II: evidence for genetic heterogeneity and de novo mutation. **Am J Hum Genet** **64** (1999): 1594–1603.

GLOBAS, C., Bosch, S., Zühlke, C.h., Daum, I., Dichgans, J., Burk, K. The cerebellum and cognition. Intellectual function in spinocerebellar ataxia type 6 (SCA6). **J Neurol** **250** (2003): 1482-7.

GOMEZ, C. M., Thompson, R. M., Gammack, J. T., Perlman, S. L., Dobyns, W. B., Truwit, C. L., Zee, D. S., Clark, H. B., Anderson, J. H. Spinocerebellar ataxia type 6: gaze-evoked and vertical nystagmus, Purkinje cell degeneration, and variable age of onset. **Ann. Neurol.** **42** (1997): 933-950.

GOUW, L.G., Digre, K.B., Haris, C.P., Haines, J.H., Ptacek, L.J. Autosomal dominant cerebellar ataxia with retinal degeneration: clinical neuropathologic and genetic analysis of a large kindred. **Neurology** **44** (1994): 1441– 1447.

GOUW, L.G., Kaplan, C.D., Haines, J.H., Digre, K.B., Rutledge, S.L., Matilla, A., Leppert, M., Zoghbi, H.Y., Ptacek, L.J. Retinal degeneration characterizes a spinocerebellar ataxia mapping to chromosome 3p. **Nature Genet** **10** (1995): 89–93.

GOUW, L.G., Castaneda, M.A., McKenna, C.K., Digre, K.B., Pulst, S.M., Perlman, S., Lee, M.S., Gomez, C., Fischbeck, K., Gagnon, D., Storey, E., Bird, T., Jeri, F.R., Ptacek, L.J. Analysis of the dynamic mutation in the SCA7 gene shows marked parental effects on CAG repeat transmission. **Hum Molec Genet** **7** (1998): 525–532.

GU, W., Ma, H., Wang, K., Jin, M., Zhou, Y., Liu, X., Wang, G., Shen, Y. The shortest expanded allele of the MJD1 gene in a Chinese MJD kindred with autonomic dysfunction. **Eur Neurol** **52** (2004): 107-11.

GUREVICH, V.V., Dion, S.B., Onorato, J.J., Ptasienski, J., Kim, C.M., Sterne-Marr, R., Hosey, M.M., Benovic, J.L. Arrestin interactions with G protein-coupled receptors. Direct binding studies of wild type and mutant arrestins with rhodopsin beta 2-adrenergic and m2 muscarinic cholinergic receptors. **J Biol Chem** **270** (1995): 720–731.

GUNAWARDENA S, Her LS, Brusch RG, et al. Disruption of axonal transport by loss of huntingtin or expression of pathogenic polyQ proteins in *Drosophila*. **Neuron** **40** (2003): 25–40.

GÜNTHER, P., Storch, A., Schwarz, J., Sabri, O., Steinbach, P., Wagner, A., Hesse, S. Basal ganglia involvement of a patient with SCA 17 – a new form of autosomal dominant spinocerebellar ataxia. **J Neurol** **251** (2004): 896–7.

HANS, M., Luvisetto, S., Williams, M.E., Functional consequences of mutations in the human alpha1A calcium channel subunit linked to familial hemiplegic migraine. **J Neurosci** **19** (1999): 1610 –1619.

HARDING, A.E. The clinical features and classification of the late onset autosomal dominant cerebellar ataxias. A study of 11 families including descendants of the “the Drew family of Walworth”. **Brain** **105** (1982):1– 28.

HARDING, A.E. Classification of hereditary ataxias and paraplegias. **Lancet** **1** (1983): 1151-1154.

HARDING, A.E. The clinical features and classification of inherited cerebellar ataxias: **Adv Neurol** **61** (1993): 1–14.

HASHIDA, H., Goto, J., Kurisaki, H., Mizusawa, H., Kanazawa, I. Brain regional differences in the expansion of a CAG repeat in the spinocerebellar ataxias: dentatorubral-pallidolusian atrophy, Machado- Joseph disease, and spinocerebellar ataxia type 1. **Ann Neurol** **41** (1997): 505-11.

HASHIMOTO, T., Sasaki, O., Yoshida, K., Takei, Y., Ikeda, S. Periodic alternating nystagmus and rebound nystagmus in spinocerebellar ataxia type 6. **Mov Disord** **18** (2003): 1201-4.

HILLMAN, D., Chen, S., Aung, T.T., Cherksey, B., Sugimori, M., Llinas, R.R. Localization of P-type calcium channels in the central nervous system. **Proc Natl Acad Sci USA** **88** (1991): 7076 –7080.

HOLMBERG, M., Johansson, J., Forsgren, L., Heijbel, J., Sandgren, O., Holmgren, G. Localization of autosomal dominant cerebellar ataxia associated with retinal degeneration and anticipation to chromosome 3p12→p21.1. **Hum Molec Genet** **4** (1995): 1441– 1445.

HOLMES, S.E., O’Hearn, E.E., McInnis, M.G. Expansion of a novel CAG trinucleotide repeat in the 5’ region of PPP2R2B is associated with SCA12. **Nat Genet** **23** (1999): 391–92.

ICHIKAWA, Y., Goto, J., Hattori, M., Toyoda, A., Ishii, K., Jeong, S.Y., Hashida, H., Masuda, N., Ogata, K., Kasai, F., Hirai, M., Maciel, P., Rouleau, G.A., Sakaki, Y., Kanazawa, I. The genomic structure and expression of MJD, the Machado-Joseph disease gene. **J Hum Genet** **46** (2001): 413-22.

IKEUCHI T, Takano H, Koide R, Horikawa Y, Honma Y, Onishi Y, Igarashi S, Tanaka H, Nakao N, Sahashi K, Tsukagoshi H, Inoue K, Takahashi H, Tsuji S. Spinocerebellar ataxia type 6: CAG repeat expansion in alpha1A voltage- dependent calcium channel gene and clinical variations in Japanese population. **Ann Neurol.** **42** (1997): 879–84.

IMBERT, G., Trottier, Y., Beckmann, J., Mandel, J.L. The gene for the TATA binding protein (TBP) that contains a highly polymorphic protein coding CAG repeat maps to 6q27. **Genomics** **21** (1994):6 67–8.

ISHIKAWA, K., Fujigasaki, H., Saegusa, H.. Abundant expression and cytoplasmic aggregations of [alpha]1A voltage-dependent calcium channel protein associated with neurodegeneration in spinocerebellar ataxia type 6. **Hum Mol Genet** **8** (1999): 1185–1193

ISHIKAWA, K., Tanaka, H., Saito, M., Ohkoshi, N., Fujita, T., Yoshizawa, K., Ikeuchi, T., Watanabe, M., Hayashi, A., Takiyama, Y., Nishizawa, M., Nakano, I., Matsubayashi, K., Miwa, M., Shoji, S., Kanazawa, I., Tsuji, S., Mizusawa, H. Japanese families with autosomal dominant pure cerebellar ataxia map to



chromosome 19p13.1-p13.2 and are strongly associated with mild CAG expansions in the spinocerebellar ataxia type 6 gene in chromosome 19p13.1. **Am J Hum Genet** **61** (1997): 336-346.

ISOZAKI, E., Naito, R., Kanda, T., Mizutani, T., Hirai, S. Different mechanism of vocal cord paralysis between spinocerebellar ataxia (SCA 1 and SCA 3) and multiple system atrophy. **J Neurol Sci** **197** (2002): 37-43.

JODICE, C., Mantuano, E., Veneziano, L., Trettel, F., Sabbadini, G., Calandriello, L., Francia, A., Spadaro, M., Pierelli, F., Salvi, F., Ophoff, R.A., Frants, R.R., Frontali, M. Episodic ataxia type 2 (EA2) and spinocerebellar ataxia type 6 (SCA6) due to CAG repeat expansion in the CACNA1A gene on chromosome 19p. **Hum Mol Genet** **6** (1997): 1973-8.

JOHANSSON J, Forsgren L, Sandgren O, Brice A, Holmgren G, Holmberg M. Expanded CAG repeats in Swedish spinocerebellar ataxia type 7 (SCA7) patients: effect of CAG repeat length on the clinical manifestation. **Hum Mol Genet** **7** (1998): 171-6.

JONASSON, J., Strom, A.L., Hart, P., Brannstrom, T., Forsgren, L., Holmberg, M. Expression of ataxin-7 in CNS and non-CNS tissue of normal and SCA7 individuals. **Acta Neuropathol (Berl)** (2002): 104: 29– 37.

JÖBSIS. G.J., Weber, J.W., Barth, P.G., Keizers, H., Baas, F., van Schooneveld, M.J., van Hilten, J.J., Troost, D., Geesink, H.H., Bolhuis, P.A. Autosomal dominant cerebellar ataxia with retinal degeneration (ADCAII): clinical and neuropathological findings in two pedigrees and genetic linkage to 3p12→p21.1. **J Neurol Neurosurg Psychiatry** **62** (1997): 367–371.

JUVONEN V, Hietala M, Kairisto V, Savontaus ML. The occurrence of dominant spinocerebellar ataxias among 251 Finnish ataxia patients and the role of predisposing large normal alleles in a genetically isolated population. **Acta Neurol Scand** **111(3)** (2005 Mar): 154-62

KAWAGUCHI, Y., Okamoto, T., Taniwaki, M., Aizawa, M., Inoue, M., Katayama, S., Kawakami, H., Nakamura, S., Nishimura, M., Akiguchi, I., Kimura, J., Narumiya, S., Kakizuka, A. CAG expansions in a novel gene for Machado-Joseph disease at chromosome 14q32.1. **Nature Genet** **8** (1994): 221-228.

KAYTOR, M.D., Duvick, L.A., Skinner, P.J., Koob, M.D., Ranum, L.P., Orr, H.T. Nuclear localization of the spinocerebellar ataxia type 7 protein ataxin-7. **Hum Molec Genet** **8** (1999): 1657–1664.

KIM JY, Park SS, Joo SI, Kim JM, Jeon BS. Molecular analysis of Spinocerebellar ataxias in Koreans: frequencies and reference ranges of SCA1, SCA2, SCA3, SCA6, and SCA7. **Mol Cells** **12(3)** (2001): 336-41.

KLOCKGETHER, T., Skalej, M., Wedekind, D., Luft, AR., Welte, D., Schulz, J.B., Abele, M., Bürk, K., Laccone, F., Brice, A., Dichgans, J. Autosomal dominant

cerebellar ataxia type I. MRI-based volumetry of posterior fossa structures and basal ganglia in spinocerebellar ataxia types 1, 2 and 3. **Brain** **121**(PT9) (1998):1687-93.

KOIDE, R., Kobayashi, S., Shimohata, T., Ikeuchi, T., Maruyama, M., Saito, M., Yamada, M., Takahashi, H., Tsuji, S. A neurological disease caused by an expanded CAG trinucleotide repeat in the TATA-binding protein gene: a new polyglutamine disease? **Hum. Molec Genet** **8** (1999): 2047-2053.

KONIGSMARK, B.W., Weiner, L.P. The olivopontocerebellar atrophies: a review. **Medicine (Baltimore)** **49** (1970): 227– 241.

KORDASIEWICZ, H.B., Gomez, C.M. Molecular pathogenesis of spinocerebellar ataxia type 6. **Neurotherapeutics** **4** (2007): 285–294.

KOOB, M.D., Moseley, M.L., Schut, L.J., Benzow, K.A., Bird, T.D., Day, J.W. and Ranum, L.P. An untranslated CTG expansion causes a novel form of spinocerebellar ataxia (SCA8). **Nat Genet** **21**(1999): 379–384.

KRAUS, R.L., Sinnegger, M.J., Glossmann, H., Hering, S., Striessnig, J. Familial hemiplegic migraine mutations change alpha1A Ca<sub>2</sub> channel kinetics. **J Biol Chem** **273** (1998): 5586 –5590.

LA SPADA, A.,R., Fu, Y.-H., Sopher, B. L., Libby, R. T., Wang, X., Li, L. Y., Einum, D. D., Huang, J., Possin, D. E., Smith, A. C., Martinez, R. A., Koszdin, K. L., Treuting, P. M., Ware, C. B., Hurley, J. B., Ptacek, L. J., Chen, S. Polyglutamine-expanded ataxin-7 antagonizes CRX function and induces cone-rod dystrophy in a mouse model of SCA7. *Neuron* 31: 913-927, 2001. Note: Erratum: **Neuron** **32** (2001): 957-958.

LANDAU, W.M., Schmidt, RE., McGlennen, R.C., Reich, S.G. Hereditary spastic paraplegia and hereditary ataxia, Part 2: A family demonstrating various phenotypic manifestations with the SCA3 genotype. **Arch Neurol** **57** (2000): 733-9.

LASEK, K., Lencer, R., Gaser, C., Hagenah, J., Walter, U., Wolters, A., Kock, N., Steinlechner, S., Nagel, M., Zühlke, C., Nitschke, M.F., Brockmann, K., Klein, C., Rolfs, A., Binkofski, F. Morphological basis for the spectrum of clinical deficits in spinocerebellar ataxia 17 (SCA17). **Brain** **52** (2006): 2341.

LEBRE, A.S., Brice, A. Spinocerebellar ataxia 7 (SCA7). **Cytogenet Genome Res** **100** (2003):154–163.

LERER, I., Merims, D., Abeliovich, D., Zlotogora, J., Gadoth, N. Machado-Joseph disease: correlation between the clinical features, the CAG repeat length and homozygosity for the mutation. **Eur J Hum Genet** **4** (1996): 3-7.

LIMA, L., Coutinho, P. Clinical criteria for diagnosis of Machado-Joseph disease: report of a non-Azorean Portuguese family. **Neurology** **30** (1980): 319–322.

LIMPRASERT, P., Nouri, N., Heyman, R.A., Nopparatana, C., Kamonsilp, M., Deininger, P.L., Keats, B.J. Analysis of CAG repeat of the Machado-Joseph gene in

human, chimpanzee and monkey populations: a variant nucleotide is associated with the number of CAG repeats. **Hum Mol Genet** **5** (1996): 207-13.

LOY, C.T., Sweeney, M.G., Davis, M.B., Wills, A.J., Sawle, G.V. Lees AJ, Tabrizi SJ. Spinocerebellar ataxia type 17: Extension of phenotype with putaminal rim hyperintensity on magnetic resonance imaging. **Mov Disord** **20** (2005): 1521.

LU, C.S., Chang, H.C., Kuo, P.C., Liu, Y.L., Wu, W.S., Weng, Y.H., Yen, T.C., Chou, Y.H. The parkinsonian phenotype of spinocerebellar ataxia type 3 in a Taiwanese family. **Parkinsonism Related Disorders** **10** (2004): 369-73.

MACIEL, P., Costa, M.C, Ferro, A., Rousseau, M., Santos, C.S., Gaspar, C., Barros, J., Rouleau, G.A., Coutinho, P., Sequeiros, J. Improvement in the molecular diagnosis of Machado-Joseph disease. **Arch Neurol** **58** (2001): 1821-7.

MACIEL P., Lopes-Cendes, I., Kish, S., Sequeiros, J., Rouleau, G.A. Mosaicism of the CAG repeat in CNS tissue in relation to age at death in spinocerebellar ataxia type 1 and Machado-Joseph disease patients. **Am J Hum Genet** **60** (1997): 993–96.

MALTECCA, F., Filla, A., Castaldo, I., Coppola, G., Fragassi, N.A., Carella, M., Bruni, A., Coccozza, S., Casari, G., Servadio, A., De Michele, G. Intergenerational instability and marked anticipation in SCA-17. **Neurology** **61** (2003): 1441–3.

MARIOTTI, C., Gellera, C., Grisoli, M., Mineri, R., Castucci, A., Di Donato, S. Pathogenic effect of an intermediate-size SCA-6 allele (CAG)(19) in a homozygous patient. **Neurology** **57** (2001): 1502-4.

MARTIN, J.J., Van Regemorter, N., Krols, L., Brucher, J.M., deBarys, T., Szliwowski, H., Evrard, P., Ceuterick, C., Tassignon, M.J., Smet-Dieleman, H., Hayez-Delatte, F., Willems, P.J., Van Broeckhoven, C. On an autosomal dominant form of retinal-cerebellar degeneration: an autopsy study of five patients in one family. **Acta Neuropathol (Berl)** **88** (1994): 277–286.

MARUYAMA, H., Nakamura, S., Matsuyama, Z., Sakai, T., Doyu, M., Sobue, G., Seto, M., Tsujihata, M., Oh-i, T., Nishio, T., Sunohara, N., Takahashi, R., Hayashi, M., Nishino, I., Ohtake, T., Oda, T., Nishimura, M., Saida, T., Matsumoto, H., Baba, M., Kawaguchi, Y., Kakizuka, A., Kawakami, H. Molecular features of the CAG repeats and clinical manifestation of Machado-Joseph disease. **Hum Molec Genet** **4** (1995): 807-812.

MASINO L, Nicastro G, Menon RP, Dal Piaz F, Calder L, Pastore A. Characterization of the structure and the amyloidogenic properties of the Josephin domain of the polyglutamine-containing protein ataxin-3. **J Mol Biol** **344** (2004): 1021–35.

MATSUMURA R, Futamura N, Fujimoto Y, et al. Spinocerebellar ataxia type 6. Molecular and clinical features of 35 Japanese patients including one homozygous for the CAG repeat expansion. **Neurology** **49** (1997): 1238–43.

MATSUYAMA Z, Kawakami H, Maruyama H, Izumi Y, Komure O, Udaka F, Kameyama M, Nishio T, Kuroda Y, Nishimura M, Nakamura S. Molecular features of the CAG repeats of spinocerebellar ataxia 6 (SCA6). **Hum Mol Genet** 6 (1997 Aug) 1283-7.

MICHALIK, A., Martin, J-J. and Broeckhoven, C.V. Spinocerebellar ataxia type 7 associated with pigmentary retinal dystrophy. **European Journal of Human Genetics** 12 (2004): 2-15.

MINNEROP, M., Joe, A., Lutz, M., Bauer, P., Urbach, H., Helmstaedter, C., Reinhardt, M., Klockgether, T., Wu, U. Putamen dopamine transporter and glucose metabolism are reduced in SCA17. **Ann Neurol** 58 (2005):490-1.

MITTAL, U., Roy, S., Jain, S., Srivastava, A.K., Mukerji, M. Post-zygotic de novo trinucleotide repeat expansion at spinocerebellar ataxia type 7 locus: evidence from an Indian family. **J Hum Genet** 50 (2005):155-7

MONCKTON, D.G., Cayuela, M.L., Gould, F.K., Brock, G.J., Silva, R., Ashizawa, T. Very large (CAG)(n) DNA repeat expansions in the sperm of two spinocerebellar ataxia type 7 males. **Hum Mol Genet** 8 (1999): 2473-78.

MOSELEY, M.L., Benzow, K.A., Schut, L.J. Incidence of dominant spinocerebellar and Friedreich triplet repeats among 361 ataxia families. **Neurology** 51 (1998): 1666-71.

MUSHEGIAN, A.R., Vishnivetskiy, S.A., Gurevich, V.V. Conserved phosphoprotein interaction motif is functionally interchangeable between ataxin-7 and arrestins. **Biochemistry** 39 (2000):6809-6813.

NAKAMURA, K., Jeong, S.Y., Uchihara, T., Anno, M., Nagashima, K., Nagashima, T., Ikeda, S., Tsuji, S., Kanazawa, I. SCA17, a novel autosomal dominant cerebellar ataxia caused by an expanded polyglutamine in TATA-binding protein. **Hum Molec Genet** 10 (2001):1441-8.

NAKANO, K.K., Dawson, D. M., Spence, A. Machado disease: a hereditary ataxia in Portuguese emigrants to Massachusetts. **Neurology** 22 (1972): 49-55.

NARDACCHIONE, A., Orsi, L., Brusco, A., Franco, A., Grosso, E., Dragone, E., Mortara, P., Schiffer, D., De Marchi, M. Definition of the smallest pathological CAG expansion in SCA7. **Clin Genet** 56 (1999):232-4.

NICASTRO, G., Menon, R.P., Masino, L., Knowles, P.P., McDonald, N.Q., Pastore, A. The solution structure of the Josephin domain of ataxin-3: structural determinants for molecular recognition. **Proc Natl Acad Sci USA** 102 (2005):10493-8.

ODA, M., Maruyama, H., Komure, O., Morino, H., Terasawa, H., Izumi, Y., Imamura, T., Yasuda, M., Ichikawa, K., Ogawa, M., Matsumoto, M., Kawakami, H. Possible reduced penetrance of expansion of 44 to 47 CAG/CAA repeats in the TATA-binding protein gene in spinocerebellar ataxia type 17. **Arch Neurol** 61. (2004):209-12.

ONODERA, O., Idezuka, J., Igarashi, S., Takiyama, Y., Endo, K., Takano, H., Oyake, M., Tanaka, H., Inuzuka, T., Hayashi, T., Yuasa, T., Ito, J., Miyatake, T., Tsuji, S. Progressive atrophy of cerebellum and brainstem as a function of age and the size of the expanded CAG repeats in the MJD1 gene in Machado-Joseph disease. **Ann Neurol** **43** (1998):288-96.

ORDWAY, J.M., Tallaksen-Greene, S., Gutekunst, C.A. Ectopically expressed CAG repeats cause intranuclear inclusions and a progressive late onset neurological phenotype in the mouse. **Cell** **91** (1997): 753–63.

PADIATH, Q.S., Srivastava, A.K., Roy, S., Jain, S., Brahmachari, S.K. Identification of a novel 45 repeat unstable allele associated with a disease phenotype at the MJD1/SCA3 locus. **Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet** **133** (2005):124-6.

PAULSON, H.L., Das, S.S., Crino, P.B., Perez, M.K., Patel, S.C., Gotsdiner, D., Fischbeck, K.H., Pittman, R.N. Machado-Joseph disease gene product is a cytoplasmic protein widely expressed in brain. **Ann Neurol** **41** (1997):453-62

PERUTZ, M.F., Johnson, T., Suzuki, M., Finch, J.T. Glutamine repeats as polar zippers: their possible role in inherited neurodegenerative diseases. **Proc Natl Acad Sci USA** (1994): 5355–58.

POLYMEROPOULOS, M.H., Rath, D.S., Xiao, H., Merrill, C.R. Trinucleotide repeat polymorphism at the human transcription factor IID gene. **Nucleic Acids Res** (1991):19:4307.

PUJANA MA, Corral J, Gratacòs M, Combarros O, Berciano J, Genís D, Banchs I, Estivill X, Volpini V. Spinocerebellar ataxias in Spanish patients: genetic analysis of familial and sporadic cases. The Ataxia Study Group. **Hum Genet** **104** (1999): 516-22.

RESTITUITO, S., Thompson, R.M., Eliet, J. The polyglutamine expansion in spinocerebellar ataxia type 6 causes a beta subunitspecific enhanced activation of P/Q-type calcium channels in *Xenopus* oocytes. **J Neurosci** **20** (2000):6394–6403.

ROLFS, A., Koeppen, A.H., Bauer, I., Bauer, P., Buhlmann, S., Topka, H., Schöls, L., Riess, O. Clinical features and neuropathology of autosomal dominant spinocerebellar ataxia (SCA17). **Ann Neurol** **54** (2003):367–75.

ROMANUL, F. C. A., Fowler, H. L., Radvany, J., Feldman, R. G., Feingold, M. Azorean disease of the nervous system. **New Eng. J. Med.** **296** (1977): 1505-1508.

ROSENBERG, R. N., Nyhan, W. L., Bay, C., Shore, P. Autosomal dominant striatonigral degeneration: a clinical, pathologic and biochemical study of a new genetic disorder. **Neurology** **26** (1976): 703-714.

RUB, U., de Vos, R.A., Schultz, C., Brunt, E.R., Paulson, H., Braak, H. Spinocerebellar ataxia type 3 (Machado-Joseph disease):severe destruction of the lateral reticular nucleus. **Brain** **125** (2002): 2115-24.

RUB, U., Brunt, E.R., de Vos, R.A., Del Turco, D., Del Tredici, K., Gierga, K., Schultz, C., Ghebremedhin, E., Burk, K., Auburger, G., Braak, H. Degeneration of the central vestibular system in spinocerebellar ataxia type 3 (SCA3) patients and its possible clinical significance. **Neuropathol Appl Neurobiol** **30** (2004a):402-14.

RUB, U., Burk, K., Schöls, L., Brunt, E.R., de Vos, R.A., Diaz, G.O., Gierga, K., Ghebremedhin, E., Schultz, C., Del Turco, D., Mittelbronn, M., Auburger, G., Deler, T., Braak, H. Damage to the reticulotegmental nucleus of the pons in spinocerebellar ataxia type 1, 2, and 3. **Neurology** **63** (2004b):1258-63.

RUB, U., de Vos, R.A., Brunt, E.R., Sebesteny, T., Schöls, L., Auburger, G., Bohl, J., Ghebremedhin, E., Gierga, K., Seidel, K., den Dunnen, W., Heinsen, H., Paulson, H., Deler, T. Spinocerebellar ataxia type 3 (SCA3): thalamic neurodegeneration occurs independently from thalamic ataxin-3 immunopositive neuronal intranuclear inclusions. **Brain Pathol** **16** (2006): 218-27.

RUBINSZTEIN, D.C., Lego, J., Coetzee, G.A., Irvine, R.A., Buckley, M., Ferguson-Smith, M.A. Sequence variation and size ranges of CAG repeats in the Machado-Joseph disease, spinocerebellar ataxia type 1 and androgen receptor genes. **Hum Mol Genet** **4** (1995):1585-90.

SACHDEV, H. S., Forno, L. S., Kane, C. A. Joseph disease: a multisystem degenerative disorder of the nervous system. **Neurology** **32** (1982): 192-195.

SALVATORE, E., Varrone, A., Sansone, V., Nolano, M., Bruni, A.C., De Rosa, A., Santoro, L., Pappata, S., Filla, A., De Michele, G. Characterization of nigrostriatal dysfunction in spinocerebellar ataxia 17. **Mov Disord** **21** (2006): 872–5.

SASAKI, H., Wakisaka, A., Fukazawa, T., Iwabuchi, K., Hamada, T., Takada, A., Mukai, E., Matsuura, T., Yoshiki, T., Tashiro, K. CAG repeat expansion of Machado-Joseph disease in the Japanese: analysis of the repeat instability for parental transmission, and correlation with disease phenotype. **J Neurol Sci** **133** (1995):128–33

SCHERZINGER, E., Lurz, R., Turmaine, M., et al. Huntingtin encoded polyglutamine expansions form amyloid-like protein aggregates in vitro and in vivo. **Cell** **90** (1997): 549–58.

SCHÖLS, L., Vieira-Saecker, A., M. M., Schöls, S., Przuntek, H., Epplen, J., T., Riess, O. Trinucleotide expansion within the MJD1 gene presents clinically as spinocerebellar ataxia and occurs most frequently in German SCA patients. **Hum Molec Genet** **4** (1995): 1001-1005.

SCHÖLS, L.; Amoiridis, G.; Buttner, T.; Przuntek, H.; Epplen, J. T.; Riess, O. : Autosomal dominant cerebellar ataxia: phenotypic differences in genetically defined subtypes? **Ann. Neurol** **42** (1997): 924-932.

SCHÖLS, L., Szymanski, S., Peters, S. Genetic background of apparently idiopathic sporadic cerebellar ataxia. **Hum Genet** **107** (2000): 132–37.

SCHÖLS, L., Bauer, P., Schmidt, T., Schulte, T., and Riess, O. Autosomal dominant cerebellar ataxias: clinical features, genetics, and pathogenesis. **Lancet Neurol** **3** (2004): 291–304.

SEQUEIROS, J., Coutinho, P. Epidemiology and clinical aspects of Machado-joseph disease. **Advances in Neurology. Vol 61.** (1993): 139-153.

SZEBENYI G, Morfini GA, Babcock A, et al. Neuropathogenic forms of huntingtin and androgen receptor inhibit fast axonal transport. **Neuron** **40** (2003): 41–52.

SHATUNOV, A., Fridman, E.A., Pagan, F.I., Leib, J., Singleton, A., Hallet, M., Goldfarb, L.G. Small de novo duplication in the repeat region of the TATA-box-binding protein gene manifest with a phenotype similar to variant Creutzfeldt- Jakob disease. **Clin Genet** **66** (2004):496–501.

SHIMAZAKI, H., Takiyama, Y., Sakoe, K., Amaike, M., Nagaki, H., Namekawa, M., Sasaki, H., Nakano, I., Nishizawa, M. Meiotic instability of the 8CAG repeats in the SCA6/CACNA1A gene in two Japanese SCA6 families. **J Neurol Sci** **185** (2001):101-7.

SHIZUKA, M., Watanabe, M., Ikeda, Y., Mizushima, K., Okamoto, K., Shoji, M. Molecular analysis of a de novo mutation for spinocerebellar ataxia type 6 and (CAG)<sub>n</sub> repeat units in normal elder controls. **J Neurol Sci** **161** (1998):85-7.

SILVEIRA, I., Miranda, C., Guimaraes, L., Moreira, M.C., Alonso, I., Mendonca, P., Ferro, A., Pinto-Basto, J., Coelho, J., Ferreirinha, F., Poirier, J., Parreira, E., Vale, J., Januario, C., Barbot, C., Tuna, A., Barros, J., Koide, R., Tsuji, S., Holmes, S.E., Margolis, R.L., Jardim, L., Pandolfo, M., Coutinho, P., Sequeiros, J. Trinucleotide repeats in 202 families with ataxia: A small expanded (CAG)<sub>n</sub> allele at the SCA17 locus. **Arch Neurol** **59** (2002):623–9.

SOONG, B.W. The genetics and clinical features of Autosomal dominant Cerebellar Ataxias. **Acta Neurologica Taiwanica** **11** (2002):49-65.

STEVANIN, G., Fujigasaki, H., Lebre, A.S., Camuzat, A., Jeannequin, C., Dode, C., Takahashi, J., San, C., Bellance, R., Brice, A. Du`rr A. Huntington's disease-like phenotype due to trinucleotide repeat expansions in the TBP and JPH3 genes. **Brain** **126**. (2003):1599–603.

TAKAHASHI, H., Ishikawa, K., Tsutsumi, T., Fujigasaki, H., Kawata, A., Okiyama, R., Fujita, T., Yoshizawa, K., Yamaguchi, S., Tomiyasu, H., Yoshii, F., Mitani, K., Shimizu, N., Yamazaki, M., Miyamoto, T., Orimo, T., Shoji, S., Kitamura, K., Mizusawa, H. A clinical and genetic study in a large cohort of patients with spinocerebellar ataxia type 6. **J Hum Genet** **49** (2004):256-64.

TAKANO, H., Cancel, G., Ikeuchi, T. Close associations between prevalences of dominantly inherited spinocerebellar ataxias with CAG-repeat expansions and

frequencies of large normal CAG alleles in Japanese and Caucasian populations. **Am J Hum Genet** **63** (1998): 1060–66.

TAKIYAMA, Y., Oyanagi, S., Kawashima, S., Sakamoto, H., Saito, K., Yoshida, M., Tsuji, S., Mizuno, Y., Nishizawa, M. A clinical and pathologic study of a large Japanese family with Machado-Joseph disease tightly linked to the DNA markers on chromosome 14q. **Neurology** **44** (1994): 1302-1308.

TAKIYAMA, Y., Igarashi, S., Rogaeva, E. A., Endo, K., Rogaev, E. I., Tanaka, H., Sherrington, R., Sanpei, K., Liang, Y., Saito, M., Tsuda, T., Takano, H., Ikeda, M., Lin, C., Chi, H., Kennedy, J. L., Lang, A. E., Wherrett, J. R., Segawa, M., Nomura, Y., Yuasa, T., Weissenbach, J., Yoshida, M., Nishizawa, M., Kidd, K. K., Tsuji, S., St George-Hyslop, P. H. Evidence for inter-generational instability in the CAG repeat in the MJD1 gene and for conserved haplotypes at flanking markers amongst Japanese and Caucasian subjects with Machado-Joseph disease. **Hum Molec Genet** **4** (1995): 1137-1146.

TANG B, Liu C, Shen L, Dai H, Pan Q, Jing L, Ouyang S, Xia J. Frequency of SCA1, SCA2, SCA3/MJD, SCA6, SCA7, and DRPLA CAG trinucleotide repeat expansion in patients with hereditary spinocerebellar ataxia from Chinese kindreds. **Arch Neurol** **57** (2000): 540-4.

TO, K.W., Adamian, M., Jakobiec, F.A., Berson, E.L. Olivopontocerebellar atrophy with retinal degeneration. An electroretinographic and histopathologic investigation. **Ophthalmology** **100** (1993) :15-23.

TOYOSHIMA, Y., Yamada, M., Onodera, O., Shimohata, M., Inenaga, C., Fujita, N., Morita, M., Tsuji, S., Takahashi, H. SCA17 homozygote showing Huntington's disease-like phenotype. **Ann Neurol** **55** (2004):281–6.

TROTTIER, Y., Lutz, Y., Stevanin, G., Imbert, G., Devys, D., Cancel, G., Saudou, F., Weber, C., David, G., Tora, L. Polyglutamine expansion as a pathological epitope in Huntington's disease and four dominant cerebellar ataxias. **Nature** **378** (1995):403-6.

TSAI HF, Liu CS, Leu TM, Wen FC, Lin SJ, Liu CC, Yang DK, Li C, Hsieh M. Analysis of trinucleotide repeats in different SCA loci in spinocerebellar ataxia patients and in normal population of Taiwan. **Acta Neurol Scand.** **10** (2004); 355-60.

USDIN,D. DNA repeat expansion and human diseases. **Cel Mol Life Sci** **57**. (2000): 914-931.

VAN ALFEN, N., Sinke, R.J., Zwarts, M.J., Gabreels-Festen, A., Praamstra, P., Kremer, B.P., Horstink, M.W. Intermediate CAG repeat lengths (53,54) for MJD/SCA3 are associated with an abnormal phenotype. **Ann Neurol** **49** (2001):805-7.



VAN DE WARRENBURG, B.P., Frenken, C.W., Ausems, M.G., Kleefstra, T., Sinke, R.J., Knoers, N.V., Kremer, H.P. Striking anticipation in spinocerebellar ataxia type 7: the infantile phenotype. **J Neurol** **248** (2001):911-4.

VAN DE WARRENBURG, B.P., Hendriks, H., Durr, A. Age at onset variance analysis in spinocerebellar ataxias: a study in a Dutch- French cohort. **Ann Neurol** **57** (2005):505-512.

WOODS, B., T., Schaumburg, H. H. Nigro-spino-dentatal degeneration with nuclear ophthalmoplegia: a unique and partially treatable clinico-pathological entity. **J Neurol Sci** **17** (1972): 149-166.

YABE, I., Sasaki, H., Matsuura, T., Takada, A., Wakisaka, A., Suzuki, Y., Fukazawa, T., Hamada, T., Oda, T., Ohnishi, A., Tashiro, K. SCA6 mutation analysis in a large cohort of the Japanese patients with late-onset pure cerebellar ataxia. **J Neurol Sci** **156** (1998): 89-95

YABE, I., Sasaki, H., Takeichi, N., Takei, A., Hamada, T., Fukushima, K., Tashiro, K. Positional vertigo and macroscopic downbeat positioning nystagmus in spinocerebellar ataxia type 6 (SCA6). **J Neurol** **250** (2003): 440-3.

YEH, T.H., Lu, C.S., Chou, Y.H., Chong, C.C., Wu, T., Han, N.H., Chen, R.S. Autonomic dysfunction in Machado-Joseph disease. **Arch Neurol** **62** (2005): 630-6.

YOSHIZAWA, T., Nakamagoe, K., Ueno, T., Furusho, K., Shoji, S. Early vestibular dysfunction in Machado-Joseph disease detected by caloric test. **J Neurol Sci** **221** (2004):109-11.

YUE Q, Jen JC, Nelson SF, Baloh RW. Progressive ataxia due to a missense mutation in a calcium-channel gene. **Am J Hum Genet** **61** (1997): 1078-87.

YVERT, G., Lindenberg, K.S., Picaud, S., Landwehrmeyer, G.B., Sahel, J.A., Mandel, J.L. Expanded polyglutamines induce neurodegeneration and trans-neuronal alterations in cerebellum and retina of SCA7 transgenic mice. **Hum Mol Genet** **9** (2000): 2491-506.

ZANDER, C., Takahashi, J., El Hachimi, K.H., Fujigasaki, H., Albanese, V., Lebre, A.S., Stevanin, G., Duyckaerts, C., Brice, A. Similarities between spinocerebellar ataxia type 7 (SCA7) cell models and human brain: proteins recruited in inclusions and activation of caspase- 3. **Hum Molec Genet** **10** (2001): 2569-2579.

ZHOU, Y.X., Takiyama, Y., Igarashi, S., Li, Y.F., Zhou, B.Y., Gui, D.C., Endo, K., Tanaka, H., Chen, Z.H., Zhou, L.S., Fan, M.Z., Yang, B.X., Weissenbach, J., Wang, G.X., Tsuji, S. Machado-Joseph disease in four Chinese pedigrees: molecular analysis of 15 patients including two juvenile cases and clinical correlations. **Neurology** **48** (1997): 482-5.

ZHUCHENKO, O., Bailey, J., Bonen, P., Ashizawa, T., Stockton, D.W., Amos, C., Dobyns, W.B., Subramony, S.H., Zoghbi, H.Y., Lee, C.C. Autosomal dominant

cerebellar ataxia (SCA6) associated with small polyglutamine expansions in the alpha 1A-voltage-dependent calcium channel. **Nat Genet** **15** (1997): 62-9.

ZOGHBI, H.Y., Orr, H.T. Glutamine repeats and neurodegeneration. **Annu Rev Neurosci** **23** ( 2000): 217-47.

ZÜHLKE, C., Gehlken, U., Hellenbroich, Y., Schwinger, E., Burk, K. Phenotypical variability of expanded alleles in the TATA-binding protein gene. Reduced penetrance in SCA17? **J Neurol** **250** (2) (2003):161-3.

ZÜHLKE, C., Spranger, M., Spranger, S., Voigt, R., Lanz, M., Gehlken, U., Hinrichs, F., Schwinger, E. SCA17 caused by homozygous repeat expansion in TBP due to partial isodisomy 6. **Eur J Hum Genet** **11**. (2003):629-32.

ZÜHLKE, C., Hellenbroich, Y., Dalski, A., Kononowa, N., Hagenah, J., Vieregge, P., Riess, O., Klein, C., Schwinger, E. Different types of repeat expansion in the TATA-binding protein gene are associated with a new form of inherited ataxia. **Europ. J. Hum. Genet.** **9** (2001): 160-164.

ZÜHLKE, C., Dalski, A., Schwinger, E., Finckh, U. Spinocerebellar ataxia type 17: Report of a family with reduced penetrance of an unstable Gln49 TBP allele, haplotype analysis supporting a founder effect for unstable alleles and comparative analysis of SCA17 genotypes. **BMC Med Genet** **6** (2005):27.

ZÜHLKE, C., Bürk K. Spinocerebellar ataxia type 17 is caused by mutations in the TATA-box binding protein. **The Cerebellum** **6** ( 2007): 300-307.

#### **7.4. Web Sayfaları**

<http://geneclinics.org/servlet/access?db=geneclinics&site=gt&id=8888891&key=SjqUqq5PmdC1O&gry=&fcn=y&fw=fE14&filename=/profiles/sca6/index.html>

## 8. ÖZGEÇMİŞ

1982 yılında Kastamonu’ da doğan Mustafa Ömür KÖSE ilk, orta ve lise öğrenimini Kastamonu’da tamamladı.

Yüksek Öğrenimini Haliç Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümün’de gören Mustafa Ömür KÖSE, üniversite eğitimini 2005 yılında tamamladı.

Mustafa Ömür KÖSE halen Haliç Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümün’de Araştırma Görevlisi olarak çalışmaktadır.