

154189

YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİR AİLEDE ARJP (OTOZOMAL RESESİF JUVENİL
PARKİNSON)
GEN LOKALİZASYONU

Biyolog Hüseyin ÖZDEN

FBE Biyoloji Anabilim Dalında
Biyoloji Programında
Hazırlanan

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Doç. Dr. Hülya YAZICI
Temel Onkoloji Anabilim Dalı

Prof. Dr. Mustafa Plöste
M. Plöste

Tez Danışmanı

: Prof. Dr. Gülay HERGENÇ (Y.T.Ü.)

İkinci Tez Danışmanı

: Prof. Dr. Aslı TOLUN (B.Ü.)

Prof. Dr. G. Hergenç
G. Hergenç

Prof. Dr. Aslı Tolun
A Tolun

İSTANBUL, 2004

Prof. Dr. Hülya Kuzun
H. Kuzun

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
KISALTMA LİSTESİ.....	iv
ŞEKİL LİSTESİ.....	v
ÇİZELGE LİSTESİ.....	vi
ÖNSÖZ.....	vii
ÖZET.....	viii
ABSTRACT.....	xi
1. GİRİŞ.....	1
2. LİTERATÜR BİLGİSİ.....	3
2.1 Parkinsonizm.....	3
2.2 Parkinson Hastalığının Belirtileri.....	3
2.3 Otozomal Resesif Juvenil Parkinson (ARJP).....	4
2.4 Parkinson Hastalığının Genetik Temelleri.....	4
2.4.1 Parkinson Genleri ve Lokusları.....	5
2.4.1.1 ARJP Hastalığına Neden Olan Gen ve Lokuslar.....	6
2.4.1.2 Otozomal Dominant Parkinsona Sebep Olan Gen ve Lokuslar.....	6
2.4.1.3 Yetişkinlerde (Late-Onset) Parkinson Hastalığına Sebep Olan Gen.....	7
2.4.1.4 Şüpheli Bölgeler.....	8
2.5 Genetik Haritalama.....	8
2.5.1 Gen Bağlantısı.....	8
2.5.2 İnsan Gen Haritası ve Bağlantı Analizi.....	9
2.5.3 Polimorfik Markır.....	10
2.6 Polimerazla Zincirleme Reaksiyon (PCR).....	11
2.7 Bağlantı ve LOD Skor.....	11
2.7.1 Multipoint LOD Skor.....	12
2.8 Homozigotluk Haritalaması.....	12
2.9 Genom Taraması.....	13
2.10 Aile.....	13
3. MATERYAL VE METOD.....	15
3.1 DNA Örnekleri.....	15
3.1.1 Bitki Materyali.....	15
3.1.2 Kimyasal Malzemeler.....	15
3.1.3 Tampon ve Solüsyonlar.....	15
3.1.3.1 Kandan DNA İzalasyonu.....	15
3.1.3.2 Polimerazla Zincirleme Reaksiyonu.....	15
3.1.3.3 Agaro Jel Elektroforezi.....	16
3.1.3.4 Poliakrilamid Jel Elektroforezi (PAGE).....	16
3.1.3.5 Gümüş Boyama.....	16
3.1.3.6 Enzimler.....	16
3.1.3.7 Mikrosatellit Markırlar.....	16
3.1.3.8 Bu Çalışma İçin Tasarlanan Markırlar.....	20

3.1.4	Alet ve Ekipmanlar.....	22
3.1.5	Elektronik Servisler.....	22
3.2	Metod.....	23
3.2.1	Polimerazla Zircirleme Reaksiyonu.....	23
3.2.2	PCR Ürünlerinin Analizi.....	23
3.2.2.1	Agaroz Jel Elektroforezi.....	23
3.2.2.2	Denatüre Poliakrilamid Jel Elektroforezi.....	24
3.2.2.3	Gümüş Boyama.....	24
4.	BULGULAR ve TARTIŞMA.....	15
4.1	Genom Taraması.....	25
4.1.1	Kromozom 12.....	25
4.1.2	Kromozom 13.....	27
4.1.3	Kromozom 14.....	27
4.1.4	Kromozom 15.....	27
4.1.5	Kromozom 16.....	28
4.1.6	Kromozom 17.....	29
4.1.8	Kromozom 18.....	30
4.1.9	Kromozom 19.....	30
4.1.10	Kromozom 20.....	31
4.1.11	Kromozom 21.....	31
4.1.12	Kromozom 22.....	32
4.2	Bilinen Lokuslarla Bağlantı Araştırması.....	32
4.2.1	PARK2, Parkin.....	32
4.2.1.1	Lod Skor Analizi.....	33
4.2.2	PARK6 ve PARK9.....	33
4.2.2.1	Lod Skor Analizi.....	34
4.2.3	PARK7.....	35
4.2.3.1	Lod Skor Analizi.....	36
4.3	16. Kromozomda İnce Haritalama.....	36
4.3.1	16. Kromozom İnce Haritalama Sonuçları.....	36
4.3.1.1	Lod Skor Analizi.....	39
4.3.1.2	Lod Skor Analizi Sonuçları.....	42
4.4	Simwalk Programı ile Multipoint LOD skor Sonuçları.....	45
4.5	TARTIŞMA.....	48
	KAYNAKLAR.....	50

KISALTMA LİSTESİ

ARJP	Autosomal Recessive Juvenile Parkinsonism
Mb	Baz Çifti
CHCL	Cooperative Human Linkage Center
cM	santi Morgan
DNA	Deoksiribonükleik asit
dPAGE	Denatüre Poliakrilamid Jel Elektroforezi
EDTA	Etilen Diamin Tetra Asetik Asit
LOD	Log of Odds
PCR	Polimerazla Zincirleme Reaksiyon
PD	Parkinson hastalığı
SDS	Sodyum Dodesil Sülfat
UV	Ultraviyole



ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 2.1 Aile ağacı.	14
Şekil 4.1 PAGE'de yürütüldükten sonra gümüş ile boyanan örnekler	26
Şekil 4.2 D12S1277 markırı ile PCR yapıldıktan sonra PAGE 'de yürütülen örneklerin gümüş boyama sonrası görüntüleri.	33
Şekil 4.3 D12S436 markırı ile PCR yapıldıktan sonra PAGE ile yürütülen örneklerin Gümüş boyama sonrası görüntüleri	34
Şekil 4.4 D12S548 markırı ile PCR yapıldıktan sonra PAGE ile yürütülen örneklerin Gümüş boyama sonrası görüntüleri.	36
Şekil 4.5 D16S690 markırı ile PCR yapıldıktan sonra PAGE 'de yürütülen örneklerin Gümüş boyama sonrası görüntüleri.	39
Şekil 4.6 D16H3070 markırı ile PCR yapıldıktan sonra PAGE 'de yürütülen örneklerin Gümüş boyama sonrası görüntüleri.....	39
Şekil 4.7 Multipoint Lod skor için "grup 1" haplotipleri.....	41
Şekil 4.8 Multipoint Lod skor için "grup 1" haplotipleri.....	42
Şekil 4.9 16. kromozomda multipoint lod skor sonuçları (Grup I).....	43
Şekil 4.10 16. kromozomda multipoint lod skor sonuçları (Grup II).....	44
Şekil 4.11 PARK2 genine bağlantı analizi multipoint LOD skor Sonuçları.....	45
Şekil 4.12 PARK6 ve PARK9 genlerine bağlantı analizi multipoint LOD skor sonuçları.....	46
Şekil 4.13 PARK7 genine bağlantı analizi multipoint LOD skor sonuçları	46
Şekil 4.14 16. kromozomda multipoint lod skor sonuçları	47

ÇİZELGE LİSTESİ

Çizelge 2.1 Parkinson hastalığına sebep olan genler.	5
Çizelge 3.1 Bu çalışmada kullanılmış olan mikrosatellit markırlar	17
Çizelge 3.2 Yeni tasarlanan mikrosatellit markırlar.....	21
Çizelge 4.1 12. kromozom için genom taraması sonuçları	25
Çizelge 4.2 13. kromozom için genom taraması sonuçları	27
Çizelge 4.3 14. kromozom için genom taraması sonuçları	27
Çizelge 4.4 15. kromozom için genom taraması sonuçları	28
Çizelge 4.5 16. kromozom için genom taraması sonuçları	28
Çizelge 4.6 17. kromozom için genom taraması sonuçları.	29
Çizelge 4.7 18. kromozom için genom taraması sonuçları	30
Çizelge 4.8 19. kromozom için genom taraması sonuçları	31
Çizelge 4.9 20. kromozom için genom taraması sonuçları	31
Çizelge 4.10 21. kromozom için genom taraması sonuçları	31
Çizelge 4.11 16. kromozom için genom taraması sonuçları	31
Çizelge 4.12 PARK2 genin çevresinde yer alan iki markırla yapılan incelemenin sonuçları .	33
Çizelge 4.13 PARK2 genine bağlantı analizi LOD skor sonuçları	33
Çizelge 4.14 PARK6 ve PARK9 genleri çevresinde yedi markırla yapılan haritalama	34
Çizelge 4.15 Pink-1 ve PARK9 genleri ile bağlantı analizi sonuçları	35
Çizelge 4.16 PARK7 geni çevresinde yer alan üç markırla yapılan incelemenin sonuçları	35
Çizelge 4.17 PARK7 geni ile bağlantı analizi sonuçları.	36
Çizelge 4.18 Ana set markırları için 16. kromozomda genom taraması sonuçları	37
Çizelge 4.19 D16S3253 markırı için aile.....	37
Çizelge 4.20 D16S764 ve D16S3253 markırları arasında ince haritalama.....	38
Çizelge 4.21 16. kromozomda multipoint LOD skor hesaplamak için seçilmiş markırlar.	42

ÖNSÖZ

Yüksek Lisans Tez çalışmam boyunca bilimsel alanda olduğu kadar hayatın diğer alanlarında da yardım ve desteklerini esirgemeyen sayın hocam Prof. Dr. Gülay Hergenç'e özellikle saygılarımı sunarım.

Tezim için gerekli deneyleri yapabilme olanağını ve bu tez konusu ile çalışmamı sağlayan Boğaziçi Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü öğretim üyesi sayın hocam Prof. Dr. Aslı Tolun'a teşekkür ederim.

Çalışmamla ilgili deneysel ve teorik konularda sorularımı hiç sıkılmadan yanıtlayıp cevap veren sevgili Sibel Aylin Uğur'a ve diğer çalışma arkadaşlarım Serdar Korur ve Ayşe Cörüt'e,

Birçok güzel ve mutlu anıyı benimle paylaşmış olan sevgili arkadaşlarım Melek Yaykın, Özkan Sarıkaya, ve adını sayamadığım tüm dostlarıma,

Yardımları için sevgili Metin Durmaz'a

Her zaman yanımda olan ve destekleriyle bugünlere gelmemi sağlayan aileme sonsuz sevgi ve şükranlarımı sunarım.



ÖZET

Bu tezde homozigotluk haritalaması yöntemi kullanılarak Otozomal Resesif Juvenil Parkinson (ARJP) hastalığına sebep olan bir genin yeri saptanmaya çalışılmıştır.

ARJP 25 yaşından küçüklerde rastlanan ve Parkinsonizm özellikleri gösteren bir hastalıktır.

Parkinsonizm nörodejeneratif özellik taşıyan bir tablonun genel adıdır. Bu hastalığı taşıyan bireylerde karakteristik olan belirtiler ise hareketlerde yavaşlama, kaslarda sertleşme ve belirli vücut kısımlarında titremedir.

Araştırma kapsamında büyük bir ARJP ailesi çalışılmıştır. Çalışmanın ilk bölümünde daha önceden rapor edilmiş ARJP hastalık lokusları çalıştığımız aile için irdelenmiştir. Bu lokusların hiçbirinin hastalık arasına bağlantı kurulmadığı gösterilmiştir.

Çalışmanın ikinci bölümünde ise genom taraması yöntemi kullanılarak ARJP için yeni bir lokus aranmıştır. Sonuçta 16. kromozomda uygun olduğunu düşündüğümüz bir bölge ortaya çıkarılmıştır.

Anahtar Kelimeler: ARJP, Parkinson, Genom Taraması, Homozigotluk Haritalaması, Bağlantı Analizi



ABSTRACT

A Gene responsible for Autosomal recessive Juvenile Parkinson (ARJP) disease was attempted to be localized by utilizing the method of homozygosity mapping.

ARJP disease is observed in individuals younger than 25 years and exhibits the features of Parkinsonism.

Parkinsonism is a general name for neurodegenerative clinical manifestation. The characteristic symptoms of the patients are the slowness of movement, postural rigidity and resting tremor in specific parts of the body.

Within the framework of this research, a large ARJP family was studied. In the first part, linkage to known ARJP loci was investigated and linkage to each locus was excluded.

In the second part of the study, a new locus for ARJP was searched by using the method of genome wide scan. At the end of the study, a region on chromosome 16 was assessed as a very good candidate.

Key Words: ARJP, Parkinson, Genome Wide Screen, Homozygosity Mapping, Linkage



1. GİRİŞ

Günümüzde biyoloji ve özel olarak genetik bilimi çok çeşitli alanlarda ilerleme göstermiştir. Bu alanlardan biri olan insan genomu haritalaması hastalık genlerinin saptanmasına yardımcı olarak insan sağlığı açısından önemli araştırmalara destek olmuştur. Son yıllarda insanlarda görülen hastalıkların pek çoğunun kalıtsal kökenleri ortaya çıkarılmıştır.

Parkinson hastalığı (PD, OMIM 168600) toplumda 65 yaşından büyük bireylerin %1.6'sından fazlasında görülen nörodejeneratif bir hastalıktır. İleri yaştaki hastaları etkileyen hastalıklar arasında 4. sırada yer almaktadır. Yalnızca ABD'de bir milyona yakın Parkinson hastası vardır (Greenamyre ve Hastings, 2004). Parkinson hastalığının asıl sebebi henüz bilinmemektedir. Tanımlanmış olmasına karşın, genetik faktörler hastalığın etiyolojisinde pek fazla rol oynamadığı düşünülmektedir. Hastaların çoğunun akrabaları arasında en az bir Parkinson hastası daha vardır. Ancak hastalığın toplum içinde görülme sıklığı bunun bir rastlantı olduğunu düşündürmektedir Ailesel Parkinson tipleri hastalığın genetik kaynağının anlaşılması açısından yararlı bilgiler vermektedir. Buna karşın Ailesel Parkinson hastaları, bütün PD hastalarının %10'undan daha küçük bir kısmını oluşturmaktadırlar. Ailesel Parkinson tiplerinden en yaygını Otozomal Resesif Juvenil Parkinson (ARJP)'dir. Tüm Ailesel Parkinson hastaları ele alındığında, bunların %50'si ARJP hastasıdır. Erken yaşlarda görülen Parkinson (Early Onset PD) %10'dan daha az görülürken, otozomal dominant form (AD) %41'i oluşturur (Imai vd., 2001 ve Folytine vd., 2002).

Parkinson kas hareketlerinin bozulması ile karakterizedir ve zamanla derecesi artan bu hastalığın kesin bir tedavisi bulunmamaktadır. Günümüzde kullanılan ilaçlar ancak belirli semptomların azaltılması açısından yararlı olmaktadır (Mycek vd., 1997).

Gerçekte Parkinson hastalığı terimi ile anlatılmak istenen Parkinsonizm adı altında sıralanan bir dizi belirtiyi gösteren ve sıklıkla nörodejenaratif özellik taşıyan bir klinik tablodur. Bu belirtiler hareketlerde yavaşlama, kaslarda sertleşme ve çeşitli vücut kısımlarında titremedir (Imai vd., 2001). Bu titreme "bradikinezi" olarak adlandırılır. Parkinson hastalarında bir diğer ortak nokta ise beynin substantia nigra olarak adlandırılan bölgesinin işlevinin azalmış ya da kaybolmuş olmasıdır.

Son yıllarda bazı Parkinson ve ARJP hastalarında, hastalık sebebi olarak gösterilen genler rapor edilmiştir. Özellikle akraba evliliği yapmış ailelerde ortaya çıkan hastalık genlerinin yerlerinin saptanması için homozigotluk haritalaması gibi teknikler kullanılarak aranılan genler daha kolay bulunabilmektedir. Gelişen bilgisayar teknolojisi ve uygun yazılımların kullanılması bu alanda çalışmayı oldukça kolaylaştırmaktadır (Donnai, 2002).

Bu çalışmamızda amaçlanan ise ARJP hastalığından sorumlu nadir bir genin yerinin saptanmasıdır. Bunun için akraba evlilikleri yapmış olan ve hasta çocuklara sahip geniş bir ailede genetik çalışma yapılmıştır. Bilinen gen lokuslarına bağlantı kurmayan ailede aday bölgeler incelenmiş ve 16. kromozom üzerinde ayrıntılı bir haritalama çalışması yapılmıştır.



2. LİTARATÜR BİLGİSİ:

2.1 Parkinsonizm:

Parkinson hastalığı karmaşık bir hastalıktır. Bir çok hastada beynin nigrostriatal yolunda yer alan dopaminerjik nöronların kaybı ve bu kaybın etkilerinin beynin diğer bölümlerine yayılması ile ilişkilidir. Ekstrapiramidal sistemin bir üyesi olan substantia nigra, yine beynin striatum bölgesinde sonlanan nöronlarının başlangıç noktasıdır. Substantia nigradan kaynaklanan uyarılar duyusal uyarılara yanıt olarak üretilmemektedir. Dolayısıyla dopaminerjik nöronların motor aktivite üzerinde sürekli bir etkisi vardır. Dopaminerjik nöronlar, striatumda substantia nigraya γ -aminbüterik asit (GABA) salan nöronlar ile bağlanmaktadır. GABA burada bir inhibitör transmitteri olarak görev yapmaktadır. Dopamin eksikliği sonucunda striatum üzerinde bulunan kontrol ortadan kalkacağı için kas hareketleri bozulmaktadır (Mycek vd., 1997, Foltynie vd., 2002, Dawson ve Dawson, 2003 ve Greenamyre ve Hastings, 2004). Dopamin aktivitesinin %80 azalması Parkinson belirtilerinin görülmeye başlandığı eşik değeri olarak kabul edilmektedir (Murray, 1996 ve Imai, 2004).

Parkinson hastalarında otopsi sonucunda beyinde Lewy cisimcikleri adı verilen siyah noktacıklar görülmüştür. Bu noktaların protein birikmesi sonucu olduğu düşünülmektedir. Bazı Parkinson tiplerinde Lewy cisimciklerinden ayrı olarak LBs adı verilen 10-14 nm çapında amyloid yapıda fibrillere de rastlanmaktadır.

Substantia nigrada yer alan dopaminerjik nöronların kaybı ile Parkinson hastalığı arasında bir ilişki olduğunun ilk kanıtı 1982 yılında uyuşturucu kullanan gençler arasında görülen Parkinsonizm tablosunun, eroinde bulunan 1-metil, 4 fenil, 1,2,3,6-terrahidroiridin (MPTP) ile ilişkili olduğunun ortaya çıkarılması ile olmuştur. Dopaminerjik nöronları öldürdüğü kanıtlanan MPTP benzeri nörotoksinlerin yanı sıra beyin dokusunda görülen tümör ve iltihap gibi patolojik durumlar da Parkinsona yol açmaktadır (Dawson ve Dawson, 2003 ve Bertoli-Avella vd., 2004).

2.2 Parkinson Hastalığının Belirtileri:

Parkinson ilerleyen bir hastalıktır ve dolayısıyla asıl başlangıç tarihinden çok daha sonra ortaya çıkar.

Hastalığın temel belirtisi titremedir (tremor) ve yukarıda anlatılan nedenlerden kaynaklanmaktadır. Genellikle tek tarafta ve el ya da ayakta ortaya çıkmaktadır. Uyurken ve titreyen organın hareketi sırasında titreme kaybolur.

Kas sertliği: Bir çok Parkinson hastasında kaslarda sertleşme (rijidite) görölmektedir. Hastalar tarafından genellikle hissedilmez, ancak doktor kontrolü sırasında fark edilebilir. Kas sertleşmesi nadiren ağrı verir.

Hareketlerde yavaşlama: Hareketlerde yavaşlama (bradikinezi) hastalığın ilerleyen evrelerinde giderek artmaktadır. Hatta hasta tamamen hareketsiz hale (akinezi) bile gelebilir.

Bu ana belirtilerden başka hastaların yalnız bir kısmında görölen duruş değışiklikleri ve konuşma biçiminde değışme gibi semptomlara da rastlanmaktadır (Murray vd., 1996; Takei vd., 1998; Dawson Dawson, 2003; Paviour, 2004).

2.3 Otozomal Resesif Juvenil Parkinson (ARJP):

ARJP yirmi beş yaş altı bireylerde görölmektedir. Hastalığa yol açan sebepler henüz bilinmemektedir. Ancak son yıllarda mutasyona uğradıkları zaman ARJP'ye neden olan genler bulunmuştur (Bertoli-Avella vd., 2004). Özellikle son yıllarda ubiquitin-proteazom yolunda yer alan parkin proteinini kodlayan parkin geni mutasyonları sonucu görölen ARJP fenotipi sıklıkla rapor edilmektedir (Dawson ve Dawson, 2003; Jimenez vd., 2004; Zou vd., 2004 ve West vd., 2004).

ARJP hastaları klasik Parkinsonizm tablosuna uyarlar. Ancak diğer Parkinson tiplerinden bağımsız olarak bu hastalarda Lewy cisimciklerine rastlanmaz (Hayashi vd., 2000 ve Valente vd., 2001).

2.4 Parkinson Hastalığının Genetik temelleri:

Kalıtsal özellik gösteren Parkinson tipleri genellikle erken yaşlarda ortaya çıkarlar. Bugüne kadar Parkinson hastalığı için çok sayıda genetik araştırma yapılmıştır. Bu araştırmaların sonucunda, ARJP için 4 gen lokusu ortaya çıkarılmıştır. Bunlar PARK2, PARK6, PARK7 ve PARK9'dur. PARK2, PARK6 ve PARK7'nin kodladığı proteinler bilinmektedir. PARK9'un ki ise henüz bulunamamıştır. Diğer Parkinson tipleri için ise toplam 7 lokus tarif edilmiştir. Bunların yanı sıra Parkinson'a sebep olabileceği düşünölen şüpheli genler de bulunmaktadır (Farrer vd., 2001; Foltynie vd., 2002; Fishman vd., 2002; Dawson ve Dawson, 2003; Bertolli-Avella vd., 2004 ve Mata vd., 2004).

2.4.1 Parkinson genleri ve lokusları:

Parkinson hastalığından sorumlu toplam 14 lokus bulunmuştur. Bunları 6 tanesinin geni belirlenmiştir ayrıca 3 şüpheli gen bilinmektedir. Lokuslar ve genler çizelge 2.1'de özetlenmiştir.

Çizelge 2.1 Parkinson hastalığına sebep olan genler

Gen	Lokus	Kromozom üzerinde yerleşimi	Genetik Geçiş Şekli
Alfa-synuclein	PARK1	4q21-q25	Otozomal dominant
Parkin	PARK2	6q25.2-27	Otozomal resesif
Bilinmiyor	PARK3	2p13	Otozomal dominant
Alfa-synuclein	PARK4	4q	Otozomal dominant
UchL1	PARK5	4p14	Otozomal dominant
Pink-1	PARK6	1p35-p36	Otozomal resesif
Dj-1	PARK7	1p36	Otozomal resesif
Bilinmiyor	PARK8	12p11q13.1	Otozomal dominant
Bilinmiyor	PARK9	1p36	Otozomal resesif
Bilinmiyor	PARK10	1p32	Late-onset
Bilinmiyor	PARK11	2q36-37	Otozomal dominant
NR4A2		2q22-23	Şüpheli
Sinfilin		5q23.1-23.3	Şüpheli
Tau		17q21	şüpheli

2.4.1.1 ARJP Hastalığına Sebep Olan Gen ve Lokuslar

PARK2, Parkin:

Parkin adıyla bilinen PARK2, 1997 yılında bağlantı analizi yapılarak Japon hastalarda ortaya çıkarılmıştır. Kalıtsal Parkinson için bulunan ikinci gen lokusudur. ARJP'ye yol açan çeşitli delesyonları ve nokta mutasyonları rapor edilmiştir (Matsumi vd., 1998; Kitada, 1998a, 1998b; Hattori vd., 1998; Hayashi vd., 2000; Shimura vd., 2001; Imaivd., 2004; Zou vd., 2004).

Parkin proteinini kodlayan ve 12 ekson içeren Parkin geni 6q25.2-27'de haritalanmıştır. Parkin proteini 465 amino asitten oluşmaktadır ve ubiquitin-proteozom yolunda görevlidir (Kitada vd., 1998).

PARK6, Pink-1:

PINK-1 ya da PTEN ile indüklenen kinaz 1 çok yakın zamanda PARK6 lokusu için bulunan gendir (Valente vd., 2004). Sicilyalı bir ailede 2003 yılında homozigotluk haritalaması ile 1p35-p36'da lokus haritalanmış, 2004 yılı içinde yapılan bir araştırma ile de gen tespit edilmiştir. PINK-1 mitokondriyal bir proteinaz olup, oksidatif stresi tamponlayan bir görev yapmaktadır (Valente vd., 2001,2004 ve Bertoli-Avella vd., 2004).

PARK7, Dj-1:

Dj-1, 1p35-p36'ya haritalanmıştır. İlk defa 2001 yılında Hollanda'da yaşayan izole bir toplulukta tespit edilmiştir (Van Duijn vd., 2001). PARK6'dan yaklaşık 25 cM uzaktadır. Çeşitli mutasyonları saptanmıştır. Beyinde ve çeşitli vücut dokularında Dj-1 gen ürününe rastlanmıştır. Oksidatif strese karşı yanıt ürettiği bilinmektedir (Van Duijn vd., 2001; Foltynie vd., 2002).

PARK9:

PARK9, 1p36'ya haritalanmıştır. Henüz bir gen tanımlanmamıştır (Foltynie vd., 2002 ve Bertolli-Avella vd., 2004).

2.4.1.2 Otozomal Dominant Parkinsona Sebep Olan Gen ve Lokuslar

PARK1, Alfa-synuclein:

Kalıtsal Parkinson için ilk bulunan gen lokusu olan PARK1, 1996 yılında geniş bir İtalyan ailesinde tanımlanmıştır. Gen 4p'de yerleşmiştir ve alfa-synuclein isimli bir proteini kodlamaktadır. Alfa-synuclein Lewy cisimciklerinin yapısında da bulunmaktadır. Bu

proteinin asıl görevi sitozolik vesiküllerle ilgilidir. Bu gendeki mutasyonların Parkinsona yol açtığı gösterilmiştir. Ayrıca proteininin fazla sentez edilmesinin Parkinson için risk faktörü olabileceği düşünülmektedir (Foltynie vd., 2002 ve Bertolli-Avella vd., 2004).

PARK3:

Alman ailelerde 2p13'e haritalanan PARK3 geninin yeri ve işlevi tam olarak bilinmemektedir (Dawson ve Dawson, 2003 ve Bertolli-Avella vd., 2004).

PARK4 Alfa-synuclein:

PARK 4, 4p'de haritalanmıştır. Değişik kökenli bir çok ailede gösterilmiştir. Alfa-synuclein proteini ile ilişkilidir (Dawson ve Dawson, 2003 ve Bertolli-Avella vd., 2004).

PARK5, UchL-1:

PARK5, 4p14'te haritalanmıştır. Ubikitin C-terminal hidrolaz geni, 1998 yılında Alman ailelerde tanımlanmıştır. Otozomal dominant geçiş gösterir. Çok çeşitli mutasyonları rapor edilmiştir. Lewy cisimciklerinde rastlanmaktadır. Mutasyonları genellikle enzim aktivitesinde bir azalmaya yol açmaktadır. En az rastlanan mutasyon tiplerindendir (Foltynie vd., 2002 ve Bertolli-Avella vd., 2004).

PARK8:

PARK8, 12p11.2-q13.1'e haritalanmıştır. İlk defa Japon bir ailede ortaya çıkarılmıştır. Hangi gen olduğu bilinmemektedir (Dawson ve Dawson, 2003 ve Bertolli-Avella vd., 2004).

PARK11:

PARK11, 2q36-37'de haritalanmıştır. Parkin mutasyonlarıyla ilişkili olduğu düşünülmektedir. Hastalıkla henüz kesin bir bağlantısı olduğu ispatlanamamıştır (Pankratz vd., 2003 ve Bertolli-Avella vd., 2004).

2.4.1.3 Yetişkinlerde (Late-Onset) Parkinson Hastalığına Sebep Olan Gen:

PARK10:

PARK10, 1p32'ye haritalanmıştır. Parkinson hastalığı için ilk bulunan şüpheli lokustur. Geç ortaya çıkan yetişkin (Late-Onset) Parkinson için tanımlanmıştır (Foltynie vd., 2002 ve Bertolli-Avella vd., 2004).

2.4.1.4 Şüpheli Genler:

Parkinson hastalığı için üç tane şüpheli gen bilinmektedir. Bunlar, 2q22-23'te haritalanan NR4A2 geni, 5q23,1-23,3'te haritalanan Sinfilin geni ve 17q21'de haritlanan Tau genleridir (Le vd., 2002; Hardy vd., 2003; Bertolli-Avella vd., 2004).

Bu genler üzerinde çalışmalar devam etmektedir.

2.5 Genetik Haritalama

İnsanda genetik hastalıklardan sorumlu genlerin haritalanması ilk defa hasta bireylerde bozuk olan gen ürünlerinin belirlenmesi ile başlamıştır. Bu bilgi sayesinde, hastalığa sebep olan mutasyon kolaylıkla ortaya çıkarılabilmektedir. Ancak insan genetik bozukluklarının büyük çoğunluğunda normal gen ve gen ürünü klinik bulgulardan yola çıkarak kestirilememektedir. Dolayısıyla DNA teknolojileri yaygınlaşmadan önce çok az genetik hastalığın temeli biliniyordu. Hastalık genlerinin haritalanmasında görülen gerçek ilerlemeler ancak son yıllarda mümkün olmuştur. İnsan genomu hakkındaki bilgilerimiz, bir hastalık geninin haritalanabilmesi için öncelikle gen ile bağlantılı bir genetik belirleyicinin (markır) tanımlanmasını zorunlu kılmaktadır. Bu bağlantı (linkaj) bilgisi bize genin konumunu vermektedir. Pek çok genin ve diğer genetik markırın birbirlerine göre bir kromozom boyunca diziliş sırasının haritalanmasıyla bir genin yerini bulmak veya bir organizmanın tüm genom haritasını çıkarmak mümkün olmaktadır (Strachan vd., 2000).

2.5.1 Gen Bağlantısı

Genler kromozomlar üzerinde taşınırlar ve bir kromozomda yüzlerce/binlerce gen bulunur. Kromozom üzerinde birbirine çok yakın bulunan genler “bağlantılı (linked)” genlerdir ve genetik çaprazlarda “bağlantı (linkaj)” gösterirler.

Mayoz bölünme esnasında aktarılan birim genlerin kendileri değil, kromozomlardır. Dolayısıyla bağlantılı genler, bağımsız bir dağılım gösteremezler. Teorik olarak bir kromozomda bulunan tüm aleller, gamet oluşumu sırasında birlikte aktarılması beklenmektedir. Çoğu zaman durum farklıdır. Özellikle birinci mayozun profaz evresinde homolog kromozomlar eşleştğinde (sinapsis), kromozom bölümlerinin karşılıklı değiş-tokuşu gerçekleşebilir. Krossingover adı verilen bu olay, alellerin homolog çiftler arasında yeniden kırılması ya da rekombinasyonu ile sonuçlanır. Krossingover bu anlamda gerçek bir fiziksel kırılma ve buna eşlik eden birleşme olayıdır.

Genlerin bu şekilde değiş tokuşu bir bireyin oluşturabileceği gametlerin çeşitliliğinin artması için çok fazla olanak sağlar.

Bir kromozom üzerinde bulunan herhangi iki bölge arasındaki Krossingover olasılığı aralarındaki uzaklık ile doğru orantılı olup bölgeler arasındaki uzaklık olarak adlandırılmaktadır. Dolayısıyla incelenen bölgeye bağlı olarak rekombinant gametlerin yüzdesi değişik olacaktır. Bu bilgi, genlerin kromozom üzerindeki göreceli yerleşimlerini belirten kromozom haritalarının oluşturmasına temel oluşturmaktadır (Strachan vd., 2000, Lopez-Bigas ve Ouzounis, 2004).

2.5.2 İnsan Gen Haritası ve Bağlantı Analizi:

Birçok organizma ve insan için genetik haritalama ve bu genlerin fonksiyonlarının anlaşılması tıbbi anlamda da oldukça önemlidir. Son yıllarda bu alanda yapılmış olan araştırmaların gelişen teknolojiyle birlikte artmış olması biyoloji ve tıp dünyası için oldukça fazla veri sağlamaktadır.

Gen haritalaması için iki farklı yaklaşım bulunmaktadır: Fiziksel haritalama ve genetik haritalama. Bu iki yaklaşım birbirinin zıttı olmayıp, birbirini destekler şekilde kullanılmaktadır.

Genetik Haritalama: Esas olarak mayoz bölünme ile beraber iki genin bir araya gelme olasılığının ölçümü olarak tanımlanabilir. Dolayısıyla bize genin fiziksel yerleşiminden çok mayoz bölünme esnasındaki davranışını anlatmaktadır. Yani genetik haritalama metodları mayoz esnasında allelleri taşıyan homolog kromozomların ayrışmasını incelemektedir. Genetik bağlantı analizi yöntemi ile oluşturulan haritalar bu nedenle genetik harita olarak adlandırılırlar. Genetik haritalar, moleküler biyolojik yöntemler kullanılarak elde edilen bulguların matematiksel hesaplamaları sonucunda ortaya çıkarlar.

Genetik bağlantı analizinin temel yapısını anlamak için kromozomların mayoz I esnasındaki davranışları iyi bilinmelidir. Mayoz bölünme esnasında homolog kromozom çiftleri arasında parça değişimleri olur ve sonuçta yeni allel kombinasyonları oluşur. Mayoz bölünme sonucu bir kromozom çiftinden dört tane kromatid meydana gelir ve bu kromatidler eşit olarak yeni oluşan hücrelere dağılır. Fakat krossingover sadece iki kromozom arasında oluşacağından krossingover'in etkisi sadece o iki kromatidde görülecektir.

İnsanda bulunan 23 kromozom ve bu kromozomlar üzerinde bulunan genler mayoz bölünme sonucunda çeşitli şekillerde ayrılabilirler:

Farklı homolog kromozomlar üzerinde bulunan genlerin alleleri birbirinden bağımsız olarak yeni hücrelere geçebilir.

Aynı kromozom üzerinde yeralan ve birbirine çok yakın olan genler bağlantılıdır ve ayrılmazlar.

Aynı kromozomda fakat birbirine uzak noktalarda bulunan genler crossingover ile oluşan rekombinasyon ile farklı kromozomlara gidebilirler. Burada oluşan kromatidlerin iki tanesi rekombinant ikisi ise nonrekombinanttır.

Bu genetik ayrılma aslında fiziksel ayrılmanın bir karşılığıdır. Rekombinasyon frekansı bir kromozom boyunca veya tüm genomda sabit bir değer değildir. Bu yüzden genetik ayrım (rekombinasyon yüzdesi olarak) ile fiziksel ayrım harita parametreleri olarak farklı anlamlar ifade ederler.

Genetik bağlantı için bir parçanın tanımlanmış olması onun genetik uzunluğunun belirlenmesidir. Bu değer normalde mayoz bölünme esnasında hesaplanabilmektedir. Bu değere crossingover olayını Drosophilada ilk gözlemleyen Thomas Morgan'a atfen cM (santiMorgan) denilmektedir. Bu değer bir uzunluk biriminden çok, aynı kromozom üzerindeki genlerin crossingover ile ayrılabilme frekansının göstergesidir. Bir cM %1'lik olasılıkla rekombinasyon görülebileceğini ifade eder. Bir cM kabaca olarak bir milyon baza karşılık gelmektedir. Ancak rekombinasyon frekansı yüksek bölgelerde 2-3 cM'lık uzaklıklar fiziksel olarak çok daha kısa olabilirler (Strachan vd., 2000 ve İsbir, 2000).

2.5.3 Polimorfik markır:

Haritalama yaparken kullanılacak olan markırlar (genetik işaretleyiciler) istenilen amaca uygun olarak seçilmelidirler. Haritalama amacıyla kullanılan markır çeşitlerinden bir tanesi mikrosatellit polimorfik markırdır.

Polimorfizm, genetik yapıda meydana gelen değişiklikleri ifade eden bir terimdir. Ancak polimorfizmler mutasyonlardan farklıdır. Mutasyonlar genetik hastalıklardan sorumludurlar ve popülasyonda nadir görülürler. Mutasyonların görülme sıklıkları yaklaşık olarak <0.0001 'dir. Polimorfik değişikliklere popülasyonda daha sık rastlanır ve bunlar çoğunlukla gözle görülür bir fenotipik değişiklik ortaya çıkarmazlar. Polimorfik bir karakterin frekansı 0.01'dir.

Bu çalışmada kullanılan markırlar polimorfik mikrosatellit markırlardır. Mikrosatellitler ökaryotik genomlar boyunca dağılmış bulunan ve ardışık olarak tekrarlanan 2-6 nükleotidlik

gruplardan oluşmaktadır. Mikrosatellitleri çevreleyen DNA dizileri genellikle aynı türün bireyleri arasında korunmuş olduklarından, PCR primerleri ile çoğaltılarak incelenebilmektedirler. Bazı tekrarlar yüksek polimorfik özellik göstermektedirler. PCR primerleri tasarlanırken genellikle dinükleotid, trinükleotid ya da tetranükleotid tekrarlar kullanılmaktadır. Çoğaltımları kolaydır. PCR reaksiyonu sonucunda çoğalan bölgeler denatüre edilerek poliakrilamid jel elektroforezi ile incelenebilir (Lander vd., 1987; Weissenbach vd., 1992).

2.6 Polimerazla Zincirleme Reaksiyon (PCR):

Polimerazla zincirleme reaksiyonu, belli bir DNA dizisinin çoğaltılması amacıyla uygulanan bir tüpte reaksiyondur. PCR ile çok kısa bir sürede özgün bir nükleotid dizisinin yüz binlerce kopyası sentez edilebilmektedir. PCR, DNA'nın belli bölgelerini çoğaltır ve bu işlem için DNA polimeraz enzimi kullanılır. Her çoğaltma döngüsünün sonunda, örnekte bulunan DNA miktarı iki katına çıkar. PCR işleminde hedef DNA'nın her iki tarafında bulunan nükleotid dizilerinin bilinmesi gerekir. Bu dizilerden primer adı verilen oligonükleotidler sentezlenerek reaksiyonda kullanılır. PCR reaksiyonu üç aşamadan oluşur: 1) DNA'nın denatürasyonu, böylece tek zincirli DNA'lar elde edilir. 2) Primer ile birleşme. 3) Zincirin uzatılması

Çoğaltılan DNA daha sonra çeşitli yöntemlerle incelenebilir (White vd., 1989; Erlich ve Arnheim, 1992; İşbir, 2000).

2.7 Bağlantı ve LOD skor

Bağlantı analizinde, bağlantılı bölgeler farklı şekillerde rekombinasyon geçirebilirler. Bu olasılıklar hesaplanabilmektedir. Hesaplama, farklı θ (teta) değerlerini göz önüne alır. Bu değer $\theta=0.0$ (rekombinasyon yok) $\theta=0.50$ (rasgele ayrılma)'ya kadar bir değer olabilir. LOD skor (Z) ise bağlantı saptanması olasılığının bağlantı gözlenmemesi olasılığına oranının logaritmik ifadesidir. Başka bir şekilde ifade edilirse, aranan genin test edilen kromozom lokusunda bulunması olasılığının lokusta bulunmaması olasılığına oranıdır. Logaritma kullanılmasının sebebi ise basit bir takım hesaplamalarla farklı ailelerden gelen verilerin birleştirilmesine izin vermesidir. Z'nin pozitif değerleri iki bölgenin birbiriyle bağlantılı olduğunu, buna karşılık negatif değerleri bağlantının daha az olasılık taşıdığını ve büyük olasılıkla bağlantılı olmadığını göstermektedir. Z'nin +3 veya daha büyük değerleri ise bölge ile gen lokusu arasında bağlantı olduğunun kesin kanıtıdır. Z'nin -2 ve daha küçük değerleri

ise kesin olarak bir bağlantı olmadığına kanıtı olarak kabul edilmektedir. Bu iki değer arasındaki sonuçlar anlamlı olmayıp, kesin bilgi vermezler. Bağlantının kesin olarak ispatlanabilmesi için başka işlemler yapılması gerekebilir (aile ve örnek sayılarının artırılması gibi) (Uğur, 2002; Akyüz, 2002; Lopez-Bigas ve Ouzounis, 2004).

2.7.1 Multipoint LOD Skor:

Günümüzde bağlantı analizi için çok çeşitli markırlar kullanılmaktadır. Mikrosatelit markırlar bunlardan en yaygın kullanılanlarıdır. Markırların genomdaki yerleşimleri bilindiği zaman ikiden fazla lokus için LOD skor hesaplanabilmektedir. Bu şekilde hesaplanan LOD skora “Multipoint LOD skor” adı verilmektedir. Multipoint LOD skor ile markırların bilgi vermedeki sınırlılığının üstesinden gelinebilmektedir. Multipoint LOD skoru hastalık geninin yerini saptamak amacıyla kullanılabileceği gibi, markırların yerlerinin karşılaştırılması yoluyla haritalama yapmak amacıyla da kullanılabilir.

Sonuç olarak LOD skor analizi parametrik bir testtir. Dolayısıyla çok iyi tanımlanmış parametrelere ihtiyaç duyar. Hastalığın kalıtım biçimi ve allelerin görülme sıklığı bu parametrelerin en önemlilerindendir.

LOD skor analizleri için bilgisayar programları kullanılmaktadır. En yaygın olarak kullanılan program J. Ott tarafından yazılmış ve geliştirilmiş olan LINKAGE paket programıdır. Bu program 4 tane alt programdan oluşmaktadır. Bu programlar MLINK, ILINK, LODSCORE ve LINKMAP programlarıdır. MLINK iki lokusun birbirlerine göre test edilmesi için kullanılmaktadır (two point). Eğer polimorfik nitelikte markırların birbirlerine göre lokalizasyonları ve sıraları saptanmak istenirse ILINK programı kullanılmaktadır. LODSCORE tüm olasılıkları değil, sadece maksimum olasılıkları hesaplamaktadır. Eğer multipoint bağlantı analizi yapılacaksa LINKMAP programı kullanılmaktadır (Passarge, 1995; Nyholt, 2000; Strachan vd., 2003).

2.8 Homozigotluk Haritalaması:

Homozigotluk, ortak bir atadan gelen soylarda belli markırların homozigotluğunu anlatmaktadır. Burada kullanılan haritalama kavramı ebeveynlerin otozomal resesif özelliklerini etkileyen durumlar üzerine temellendirilmektedir. Bu ebeveynler aynı zamanda akrabadırlar. Bu sebeple çoğu zaman rekombinasyona uğramayan ortak ve aynı atadan gelen homozigot bir haplotip gösterebilmektedirler. Dolayısıyla akraba evliliği sonucu doğan

çocukların otozomal resesif hastalık fenotipi taşıma ihtimali daha fazladır. Çoğu zaman belli bir karakterin frekansı akrabalıkla orantılı olarak artmaktadır. Bu bilgilerin gösterdiği üzere, yakın akraba evliliği sonucu oluşan aileler bağlantı analizi çalışmaları için büyük önem taşırlar. Tek bir aile önemli derecede yüksek LOD skorlar üretebilir (Lander, 1987).

Akraba evliliği özellikle Ortadoğu ülkelerinde yaygındır. Anadolu'da ise %21 gibi yüksek bir oranda akraba evliliği görülmektedir. Özellikle birinci dereceden kuzenler arası evliliklere çok sık rastlanmaktadır (Başaran, 19988 ve Uğur, 2002).

2.9 Genom Taraması (genome-wide scan):

Hastalığın hangi kromozomla ya da hangi aday gen ile ilişkili olacağı bilinmediği durumda, tüm genom 4-25 cM aralıklarla taranmaktadır. Bu tarama için belirli markır setleri kullanılmaktadır. Tarama sonucunda elde edilen bulgulardan istatistiksel olarak anlamlı bulunan lokuslar seçilerek daha ayrıntılı incelenir. Genom taraması yapılırken genellikle eldeki tüm DNA örnekleri kullanılmaz; istatistiksel olarak en fazla bilgiyi verecek bireylerden seçilmiş bir panel incelenir. Bu şekilde anlamlı bir bilgiye ulaşıldığı düşünüldüğünde, eldeki tüm bireyler bu markırlar için taranır. Böylece potansiyel lokuslar belirlenir ya da bölge daraltılmış olur. Bu çalışmada kullanılan markır seti "CHCL Human Screening Set/Version 8, a" dır [1].

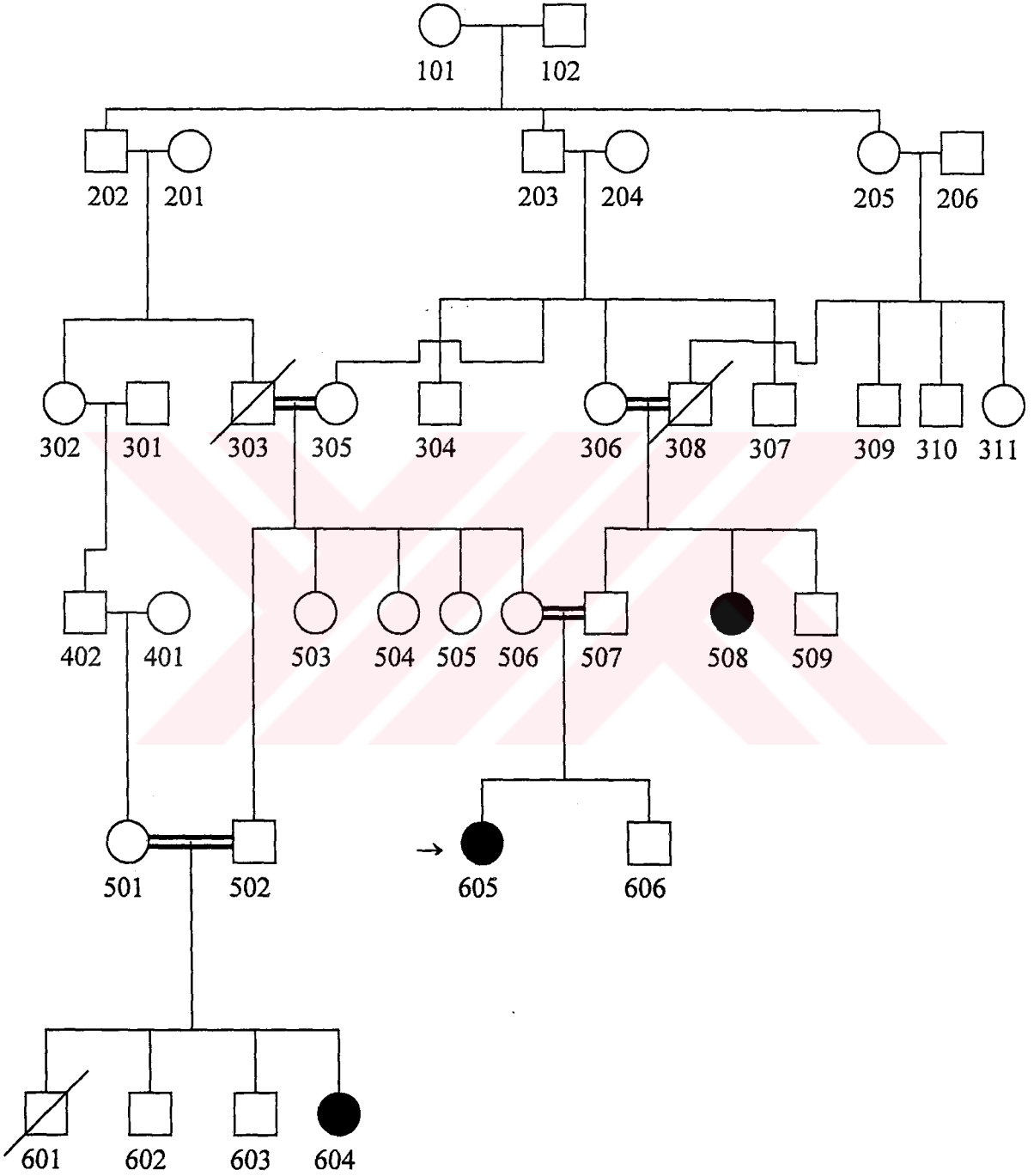
2.10 Aile

Şekil 2.1'de aile ağacında görüldüğü gibi ortak bir atadan gelen kuşaklarda ARJP hastalığı ortaya çıkmıştır. Hastaların klinik tabloları şu şekildedir:

605: On üç yaşında kız çocuğu. İlkokul dönemine kadar bir rahatsızlığı görülmeyen hastada ilk belirtiler öğrenme güçlüğü ile başlayarak bu dönemde ortaya çıkmış. Son bir-bir buçuk yıldır ise hareketlerde genel bir yavaşlama, tüm vücutta titreme, yürüme sorunları ile birlikte vücut yapısında bozulmalar ortaya çıkmış

508: 605'in 33 yaşında ki halası. Diğer hastalara benzer şekilde ilkokul yıllarında öğrenme güçlüğü ile birlikte ilk belirtiler ortaya çıkmış. On bir yaşında vücutta anormal titremeler başlamış. Beş yıl içinde hasta yürüyemez ve konuşamaz düzeye gelmiş. Şu an yatağa bağımlı ve dört ekstremitesinde de ileri derecede sertlik görülmektedir.

604: 605'in birinci dereceden kuzeni olan 18 yaşında bir genç kız. Onda da diğer hastalarda görülen klinik tablo görülmektedir.



Şekil 2.1 Aile Ağacı

3. MATERYAL VE METOD

3.1 Materyal

3.1.1 DNA Örnekleri:

Kan örnekleri daha önceden alınmış ve DNA'ları izole edilmişti. Hastalara ve onların akrabalarına ait kan örneklerinden izole edilen DNA'lar -20 derecede saklanmaktadır.

3.1.2 Kimyasal Malzemeler:

Bu çalışmada kullanılan bütün kimyasallar MERCK (Almanya) veya Sigma (USA) tarafından üretilmiştir. Diğer kimyasal malzemeler listede ayrıca belirtilmiştir.

3.1.3 Tampon ve Solüsyonlar:

3.1.3.1 Kandan DNA İzolasyonu:

Hücre Patlatma Tamponu: 155 mM NH_4Cl , 10 mM KHCO_3 , 0.1 mM Na_2EDTA (pH 7.4)

Hücre Çekirdeği Patlatma Tamponu: 400 mM NaCl , 2 mM Na_2EDTA , 10 mM Tris (pH 8.2)

Proteinaz K: 20 mg/ml Proteinaz K (Promega, ABD)

Sodyum dodesilsülfat (SDS): %10 SDS (w/v)

Amonyum Asetat: 7.5 M $\text{CH}_3\text{COONH}_4$

Etanol: Absolute ethanol (Carlo-Erba, Almanya)

TE Tamponu: 1mM EDTA, 20 mM Tris-HCl (pH 8.0)

3.1.3.2 Polimerazla Zincirleme Reaksiyonu:

10X PCR Tamponu: 15 mM MgCl_2 , 500 mM KCl , 100 mM Tris-HCl (pH 9.5) (Roche, Almanya)

10X Guy's Tamponu: 166 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 67 mM MgCl_2 , 1.7 mg/ml BSA, 670 mM Tris TO.1E

TO.1E: 0.1 mM EDTA, 20 mM Tris-HCl

MgCl_2 : 25 mM MgCl_2 (Promega, ABD)

dNTP: dH_2O içinde her birinden 12.5 mM dATP, dCTP, dGTP ve dTTP

Betain: 5 M betain (Promega, ABD)

3.1.3.3 Agaroz Jel Elektroforezi:

Agaroz: 0.5X TBE tamponunda %2'lik agaroz

10X TBE tamponu: 20 mM EDTA, 0.89 M Borik Asit, 0.89 M Trizma base (pH 8.3)

10X Yükleme tamponu: 2.5 mg/ml Bromofenol Blue, Gliserol içinde %1 SDS

Etidyum Bromür: 20 mg/ml

3.1.3.4 Poliakrilamid Jel Elektroforezi (PAGE):

%40 Akrilamid: (stok) %40 Akrilamid-bisakrilamid (19:1)

%8 Instajel: %(akrilamid-bisakrilamid (19:1), 8.3 M Üre, 1X TBE Tamponu

APS: %10 Amonyum Peroksodisülfat

TEMED: N,N,N,N- tetrametiletilenamid

3.1.3.5 Gümüş Boyama (Silver Staining):

Boyama tamponu (Tampon B): %0.1 AgNO₃

Tampon C: %1.5 NaOH, %0.01 NaBH₄, %0.015 formaldehit

Durdurma tamponu (Tampon D): %0.75 NaCO₃

3.1.3.6 Enzimler:

Taq DNA polimeraz : 5 Ünite/ µl (Promega [ABD] veya Roche [Almanya])

3.1.3.7 Mikrosatellit Markerlar:

Cooperative Human Linkage Center tarafından geliştirilmiş olan CHLC/Weber Human Screening Set Version 8a ile daha önce aile 1-11. kromozomlarda taranmıştı. Bu set otozomal kromozomlarda toplam 156 adet polimorfik mikrosatellit markır içermektedir ve yaklaşık 25cM aralıklarla genomu taramaktadır. Bu çalışmada ise 12. kromozomla 22. kromozom arasında ana sete ait toplam 62 adet markır kullanılmıştır. İnce haritalama için kullanılan diğer polimorfik mikrosatellit markırların çoğu Resgen (ABD)'den satın alınmış, bazıları ise İontek (Türkiye) tarafından sentezlenmiştir

Çizelge 3.1 Bu çalışmada kullanılan olan mikrosatellit markıları.

Marker	Ortalama Boy (Baz çifti [Mb])	Yineli Dizi	Bağlanma sıcaklığı (C ⁰)	Tampon
D1S548	172	tetra	51	Boehringer (Roche)
D1S508	73	di	54	Guy's
D1S1612	120	tetra	51	Boehringer (Roche)
D1S436	230	di	54	Boehringer (Roche)
D1S170	217	di	52	Boehringer (Roche)
D1S552	256	tetra	51	Boehringer (Roche)
D1S1674	200	tetra	51	Boehringer (Roche)
D1S2647	52	di	52	Boehringer (Roche)
D1S478	160	di	53	Boehringer (Roche)
D6S1579	150	di	48	Boehringer (Roche)
D6S1277	290	di	51	Boehringer (Roche)
D12S372	190	tetra	51	Boehringer (Roche)
D12S391	251	tetra	51	Boehringer (Roche)
D12S1042	51	tri	136	Boehringer (Roche)
D12S1301	110	tetra	52	Guy's
D12S297	205	tetra	49	Boehringer (Roche)
D12S398	130	tetra	52	Boehringer (Roche)
D12S375	175	tetra	51	Boehringer (Roche)
D12S1676	120	di	53	Boehringer (Roche)
D12S1722	240	di	53	Boehringer (Roche)
D12S1025	187	tetra	51	Boehringer (Roche)
D12S1040	210	tri	51	Boehringer (Roche)
D12S299	184	tetra	48	Boehringer (Roche)
D12S303	295	tetra	54	Guy's
D12S376	148	tetra	51	Boehringer (Roche)
D12S1052	151	tetra	52	Boehringer (Roche)
D12S350	189	di	51	Boehringer (Roche)
D12S326	261	di	50	Boehringer (Roche)
D12S824	245	tetra	51	Boehringer (Roche)
D12S1812	103	tetra	52	Boehringer (Roche)
D12S1064	180	tetra	52	Boehringer (Roche)
D12S1300	127	tetra	51	Boehringer (Roche)
PAH	243	tetra	51	Boehringer (Roche)
D12S395	230	tetra	51	Boehringer (Roche)
D12S97	270	di	54	Boehringer (Roche)
D12S392	141	tetra	54	Boehringer (Roche)
D13S787	267	tetra	48	Boehringer (Roche)

Marker	Ortalama Boy (Baz çifti [Mb])	Yineli Dizi	Bağlanma sıcaklığı (C°)	Tampon
D13S894	200	tetra	48	Boehringer (Roche)
D13S317	199	di	52	Boehringer (Roche)
D13S793	273	tetra	48	Boehringer (Roche)
D13S796	168	tetra	50	Boehringer (Roche)
D13S285	106	di	50	Boehringer (Roche)
D14S1280	301	tetra	49	Boehringer (Roche)
D14S306	210	tetra	51	Boehringer (Roche)
D14S592	240	di	52	Boehringer (Roche)
D14S606	282	tetra	50	Boehringer (Roche)
D14S617	173	tetra	48	Guy's
GATA136B01	157	tetra	50	Boehringer (Roche)
D15S822	306	tetra	51	Boehringer (Roche)
GATA50C03	240	tetra	48	Boehringer (Roche)
D15S643	225	tetra	48	Boehringer (Roche)
D15S655	252	tri	51	Boehringer (Roche)
D15S652	284	tri	48	Boehringer (Roche)
D15S657	360	tetra	48	Boehringer (Roche)
D15S87	78	di	50	Guy's
D15S642	218	tetra	48	Boehringer (Roche)
D16S2616	139	tri	50	Boehringer (Roche)
D16S764	116	tetra	48	Boehringer (Roche)
D16S497	160	di	51	Boehringer (Roche)
D16S535	200	di	48	Boehringer (Roche)
D16S3076	252	di	51	Boehringer (Roche)
D16S3133	185	di	54	Boehringer (Roche)
D16S3068	140	di	51	Boehringer (Roche)
D16S769	260	tetra	51	Boehringer (Roche)
D16S3100	170	di	53	Boehringer (Roche)
D16S3093	270	di	51	Boehringer (Roche)
D16S3145	140	di	51	Boehringer (Roche)
D16S313	141	di	53	Boehringer (Roche)
D16S690	264	tetra	49	Boehringer (Roche)
D16H2850	239	di	52	Boehringer (Roche)
D16H2870	215	di	52	Boehringer (Roche)
D16H2950	288	di	51	Boehringer (Roche)
D16H3000	249	tetra	53	Boehringer (Roche)
D16S685	123	tetra	49	Boehringer (Roche)
D16S3070	164	Tetra	48	Boehringer (Roche)

Marker	Ortalama Boy (Baz çifti [Mb])	Yineli Dizi	Bağlanma sıcaklığı (C ⁰)	Tampon
D16S753	276	tetra	50	Boehringer (Roche)
D16S3105	190	di	50	Boehringer (Roche)
D16S3044	190	di	51	Boehringer (Roche)
D16S409	140	di	49	Boehringer (Roche)
D16S477	290	tetra	51	Boehringer (Roche)
D16S540	240	tetra	51	Boehringer (Roche)
D16S682	292	tetra	52	Boehringer (Roche)
D16S3136	200	di	49	Boehringer (Roche)
D16S3396	157	tri	51	Boehringer (Roche)
D16S3253	187	tetra	49	Boehringer (Roche)
D16S624	143	tetra	51	Boehringer (Roche)
D16S2624	143	tetra	51	Boehringer (Roche)
D16S539	172	tetra	51	Boehringer (Roche)
D17S1308	310	tetra	51	Boehringer (Roche)
D17S1303	237	tetra	51	Boehringer (Roche)
D17S1293	290	tetra	51	Boehringer (Roche)
D17S1290	199	tetra	52	Boehringer (Roche)
D17S1301	150	tetra	47	Boehringer (Roche)
D17S928	165	di	47	Boehringer (Roche)
D18S481	190	di	51	Boehringer (Roche)
D18S843	191	tri	48	Boehringer (Roche)
D18S976	174	tetra	51	Boehringer (Roche)
D18S1158	105	di	53	Boehringer (Roche)
D18S542	185	tetra	52	Boehringer (Roche)
D18S869	189	tetra	49	Boehringer (Roche)
D18S877	137	tetra	52	Boehringer (Roche)
D18S535	140	tetra	55	Boehringer (Roche)
D18S858	195	tri	51	Boehringer (Roche)
D18S878	170	tetra	52	Boehringer (Roche)
D18S844	200	tri	52	Boehringer (Roche)
D19S591	103	tetra	48	Boehringer (Roche)
D19S586	250	tetra	51	Boehringer (Roche)
D19S561	300	tetra	51	Boehringer (Roche)
D19S405	110	di	48	Boehringer (Roche)
D19S178	180	di	49	Boehringer (Roche)
D19S246	200	tetra	48	Boehringer (Roche)
D19S254	130	tetra	51	Boehringer (Roche)
D20S482	152	Tetra	47	Boehringer (Roche)

Marker	Ortalama Boy (Baz çifti [Mb])	Yineli Dizi	Bağlanma sıcaklığı (C ⁰)	Tampon
D20S470	300	tetra	51	Boehringer (Roche)
D20S481	234	tetra	53	Boehringer (Roche)
D20S480	303	tetra	53	Boehringer (Roche)
D20S158	391	tetra	51	Boehringer (Roche)
D21S1432	155	tetra	53	Boehringer (Roche)
GATA129D11	153	tetra	50	Boehringer (Roche)
GATA188F04	193	tetra	50	Boehringer (Roche)
D21S1446	221	tetra	53	Boehringer (Roche)
D22S420	164	di	48	Boehringer (Roche)
D22S689	206	tetra	48	Boehringer (Roche)
D22S001	200	di	50	Boehringer (Roche)
D22S685	196	tetra	56	Boehringer (Roche)
D22S278	230	di	50	Boehringer (Roche)
D22S683	180	tetra	48	Boehringer (Roche)

3.1.3.8 Bu Çalışma İçin Tasarlanan Markırlar

Markırların primerleri kalın karakterde, tekrarlayan bölgeler italik karakterde gösterilmiştir. Markırlar tarafımızdan isimlendirilmiştir. Bunun için veri bankalarında bulunabilecek benzer isimli markırlardan farklıdırlar.

Çizelge 3.2 Yeni tasarlanan mikrosatellit markırlar

Markır: D16H2850

GGCAGAGAACCATTGTAAGCTGGGAGGCGGAGGTTGCAGTGAGCCGAGATCACACCACTG
TACTCCAGCCTGAGCGACAGAATGAGACTCTGTCTCTCACACACACACACACACACACAC
ACACACACACACACACAAGAATGACATGAGGCTGGCAGGTTGGCTCACTCCTGTAATCCCA
GCACTTTGGGAGGCCGAGGCAGGCGGATCACCTGAGGTCGGGAGTTTGAGAC

Markır: D16H2870

CCAAAGTGCTGGGATTACAGGAGTGAGCCACCGTGCCAGCCTCATGTCATTCTTGTGTGT
GT
CAGGCTGGAGTACAGTGGTGTGATCTCGGCTCACTGCAACCTCCGCTCCCAGCTTCAAACG
GTTCTCTGCCTCAGCCTCCCGAGTAGCTTGGATTACAGGCGC

Markır: D16H2950

TAAAGTGGCCAGGTGTGTTGACTCATGCCTGTAATCCCACCACTTTGGGTGCGAGGCAGGA
GGATCACTGGAGCCCAGGAGTTTGAAACGAGCCTAGGCAACAGAGTGAGACCCTGTCTCTA
TATTAAC
ACACAAAGGCAGCCAGACTATGCACTAGGAACTGCCCTGGGAATCTCTTTGTGTTCTCACA
CAATCCCATTTCACAGATGAAGAAACCTAGGCACAGAAA

Markır: D16H3000

AGAGGCTGAGGCAGGAGAATTGTTTGAACCTGGGAGGCAGAGGCTGTGGTGAGCCGAGAT
CACGCCATTGCACTCCAGCCTGGGCAACAAGAGTGAAACTCCGTCTCAAAATAAAATAAA
TAAATAAAATAAAATAAAATAAAATAAAATAAAATCATGAAAGGGTGTTTCAATTTTTCAAAGCC
TTTTCTGCATCAATTGAGATGACCATGTGTTTCTCCCCGGTTCATTCTA

Markır: D16S3070

ACAGAGTACAGGGAGGGGGTGAAGTGGTCACTTGAGATAGATAGATAGATAGATAGATAGA
TAGATAGATAGATAGATGATAGATATAGATGGAGTTCCGCTCATGTCACCTCAGGCTGGAGTAC
AATGGCACGATCTTGGCTCACTGCAACCTCTGTCTCCCTC

Markır: D22001

ATTGGCCAAGCTTTTCATTGACTTACAAGGAGAAAATTGGAGAAGAACTTTCACTGTTTT
ATTGCTTGTCTTTGCATTATCTTTTGAGCTTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGT
TGTATTTGGCTTAGGATTTAGAAAAAGCAGCAGTCTTAGAAACCTTGTATGACCAGAGTGT
GGGATAAGATTGAAGCAAGAAGTAATTAATGTGCTTTAATTATTAAGGCAGAAAATAG
TGCAGTGGTCACTTCTGGGTTCTGCT

3.1.4 Alet ve Ekipmanlar:

Otoklav: Model MAC-601 (Eyela, Japonya)

Terazi: Electronic Balance (GecAvery, İngiltere)

Santrifüj: Centrifuge 8 DuPont Instruments, ABD), 5415C (Eppendorf, Almanya)

Derin Dondurucular: -20°C (Bosch, Almanya), -20°C (AEG, Türkiye), -70°C (GFL, Almanya)

Dokümantasyon Sistemi: BioDOC Video Documentation System (Biometra, Almanya)

Elektroforez: Horizon 58, Model 200 (BRL, ABD), Sequi-Gen Sequencing Cell (Bio-Rad, ABD), Minicell EC320 (Thermo, ABD)

İnkübatör: Plus Series (Gallenkamp, Almanya)

Manyetik Karıştırıcı: Hotplate Magnetic Stirrer, HS31 (Chiltern, İngiltere)

Güç Kaynakları: Power Pac Model 3000 (Bio-Rad, ABD), Foto Force 250 (Fotodyne, ABD)

Buz Dolabı: +4°C (Arçelik, Türkiye)

Termal Döngü Cihazı (PCR): PTC-200 Peltier Thermal Cyclers (MJ Research, ABD), Techne (Progene, İngiltere)

Vorteks: Reax Top (Heidolph, ABD)

Distile Su Sistemi: Milipore (ABD)

3.1.5 Elektronik Servisler:

Genom dizisi, markır bilgileri ve veri bankaları için: <http://ncbi.nlm.nih.gov>
<http://www.marshfield.org> ve <http://www.gdb.org>

Hastalıklar ve hastalık lokusları için: Online Inheritance in Man,
<http://ncbi.nlm.nih.gov/Omim>

Mikrosatellit markır tasarlamak için: Tandem repeat finder, <http://tandem.bu.edu/tfr/tfr.html> ve The Biology WorkBench, <http://workbench.sdsc.edu>.

Veri bankaları ve Bağlantı analizi için kullanılan programlar için: <http://linkage.rockefeller.edu>

3. 2 METOD

3.2.1 Polimerazla Zincirleme Reaksiyon:

Mikrosatellit markırlar ile PCR reaksiyonu sonucunda istenilen bölgeler çoğaltılabilmektedir. Bu çalışmada toplam PCR reaksiyon karışımı hacmi 11 µl olacak şekilde kullanılmıştır. Reaksiyon karışımı 1X PCR tamponu, her tüp için dört dNTP'den 0.2 mM, 0.3 µ primer, 0.2 Ünite Taq DNA polimeraz enzimi ve 20 ng genomik DNA içerir. Optimizasyon için gerekli olduğu zaman 5M 2.5 µl Betain kullanılmıştır.

PCR döngüsü şu sırayı izlemektedir:

- 1) 95 °C 2 Dakika denatürasyon
- 35 kez

2) 94 °C 45 saniye
3) Bağlanma 30 saniye (sıcaklığı primere bağlı olarak değişmektedir).
4) 72 °C 1 dakika sentez
- 5) 72 °C 5 dakika yarım kalan zincirlerin uzatılması
- 6) 10 °C 5 dakika soğutma

İkinci, üçüncü ve dördüncü aşamalar 35 defa tekrarlanmaktadır.

3.2.2 PCR Ürünlerinin Analizi:

3.2.2.1 Agaroz Jel Elektroforezi:

Agaroz jel elektroforezi genomik DNA örnekleri, primer stokları ve PCR reaksiyonu ürünlerinin miktarını ve kalitesini kontrol etmek için kullanılır.

%2'lik 50 ml agaroz jel hazırlanması:

1 gr agaroz 100 ml dH₂O içinde ısıtılarak çözülür. Bu karışım daha sonra 2.5 µl etidyum bromür ile karıştırılır. Yürütme tamponu olarak 0.5X TBE kullanılır. Örnekler DNA ve primer çözeltileri için 2 µl, PCR ürünleri için ise 5 µl örneğe kendi hacimleri kadar yükleme tamponu eklenerek hazırlanır.

Örnekler kuyucuklara yüklendikten sonra 150 voltta örneğin boyuna göre 5 ile 15 dakika arasında yürütülür. Bantlar UV ışık altında gözlenir.

3.2.2.2 Denatüre Poliakrilamid Jel Elektrophorezi (dPAGE):

Poliakrilamid jel elektrophorezi PCR ürünleri arasındaki boy farkı esasına dayanan bir ayırım tekniğidir. Birbirlerinden bir baz çifti kadar farklı olan küçük DNA parçalarının ayrılabilmesini bile mümkün kılar.

%8'lik poliakrilamid jel hazırlanması: 35 ml %8'lik Insta jel bir beher içerisinde 300 µl %10 APS ve 30 µl TEMED ile iyice karıştırılır. Hemen ardından aralarında 0.4 mm'lik bir boşluk olacak şekilde daha önceden hazırlanmış elektrophorez camlarının arasına dökülür. Jel tarağı polimerizasyon başlamadan önce yerleştirilerek karışım polimerize olması için bırakılır. Polimerizasyon yaklaşık 1 saat sürmektedir.

Poliakrilamid jellerin yüklenmesi ve örneklerin yürütülmesi: Jel, polimerizasyon tamamlandıktan sonra, önceden ısıtılmış 1X TBE tamponu içinde yürütülür. Örnekler yüklenmeden önce jele 45 Vattta 15 dakika ön ısıtma yapılır. Ön ısıtma sonrası jelin sıcaklığı 40–45 °C olmalıdır. Jele yüklenecek örnekler 1:1 oranında yükleme tamponu ile karıştırıldıktan sonra, 95 °C'de en az 4 dakika denatüre edilir. Denatüre edilen örnekler denatürasyon sonrası hemen buz üzerine alınır. Yüklemeden hemen önce jel tarağı doğru pozisyona getirilir. Örnekler jel tarağının kuyucukları arasına 3 ya da 4 µl olacak şekilde yüklenir. Örnekler 35 Vattta, örneklerin boyuna bağlı olarak 45 dakika-4 saat arasında bir süre ile yürütülür.

3.2.2.3 Gümüş Boyama:

Gümüş boyama, poliakrilamid jel üzerinde ayrılmış olan örneklerin gözlenebilmesi amacıyla kullanılan bir boyama tekniğidir. Duyarlı ve güvenilir bir yöntemdir.

Boyanmadan önce poliakrilamid jel cam plakaların üzerinden dikkatli bir şekilde alınmalıdır. Bu işlem için filtre kağıdı kullanılır. Filtre kağıdı ile alınan jel uygun bir kaba alındıktan sonra boyama tamponu içinde 8 dakika bırakılır. Daha sonra fazla gümüşün uzaklaştırılması için jel dH₂O ile 2 kez yıkanır. Daha sonra bantlar iyice belirgin hale gelinceye kadar jel C tamponu içinde bekletilir. Son olarak boyama reaksiyonun durması için D tamponunu içine alınır. D tamponunda birkaç dakika bekletilen jel filtre kağıdı kullanılarak şeffaf dosya içine alınır ve saklanır (Kavaslar vd., 2000).

4. SONUÇLAR

4.1 Genom Taraması:

Otozomal Resesif Juvenil Parkinson daha önce Boğaziçi Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümde birinci kromozomdan başlayarak on birinci kromozoma kadar incelenmiştir. Bu çalışmada daha önce incelenen bölgelerden anlamlı bir sonuç elde edilemediğinden on ikinci kromozom ve yirmi ikinci kromozom arasında yer alan kromozomlar incelenmiştir. Sonuç olarak 16. kromozom üzerinde uygun bir bölge ortaya çıkarılmış, bu bölge üzerinde ayrıntılı incelemeler yapılmıştır.

Genom taraması için kullanılan ana markır seti CHCL Human Screening Set/Version 8,8a'dır. Genom taraması sonucu uygun bulduğumuz bölgelerde, ince haritalama için kullanılan diğer polimorfik mikrosatellit markırların bir kısmı tarafımızdan tasarlanmış ve İontek (Türkiye) tarafından sentezlenmiş bir kısmı ise Resgen (ABD)'den satın alınmıştır. İncelen her bir kromozom için sonuçlar ayrı ayrı gösterilmiştir. Bu çalışma yapılırken, ARJP hastalığı ile beraber Spinocerebellar Atrophy (SCA) hastalığı da incelendiği için bazı durumlarda allel ifadelerinde farklılıklar görülebilmektedir.

Genom taraması için öncelikle hasta bireyler kullanıldı. Hasta bireylerde uygun homozigot bölgelere rastlandığı durumlarda bölgeyi daraltmak amacıyla ana setten olmayan yeni markırlar kullanıldı. Bu şekilde daraltılan bölgelerde ince haritalama çalışmaları yapıldı.

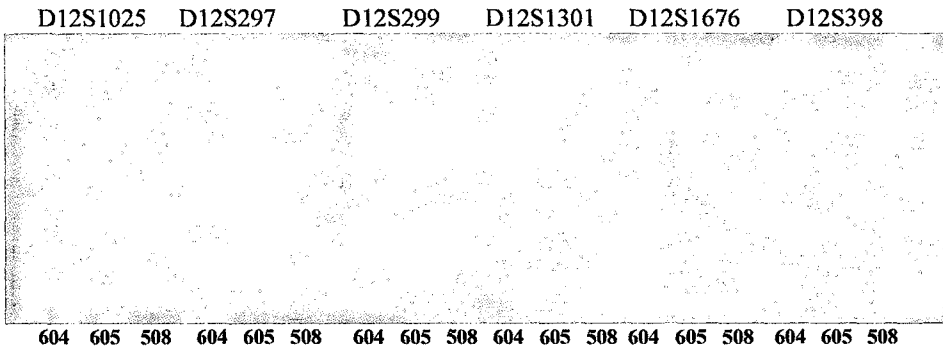
4.1.1 Kromozom 12:

Bu çalışma için kullanılan markırlar, yerleri ve genotipleri çizelge 4.1'de gösterilmiştir. Ana markır seti içinde bulunan markırlar kalın karakterde gösterilmiştir. Bu kromozomda uzun homozigot bölgeler her üç hasta için de bulunmaktadır. Ancak ince haritalama sonucunda görüldüğü üzere her üç hasta için ortak homozigot bir bölge bulunmamaktadır.

Çizelge 4.1 12. kromozom için genom taraması sonuçları Mb: baz çifti, cM: SantiMorgan

Markır	Mb	cM	Alleller		
			604	605	508
D12S372	3.45	6.42	1 3	1 2	2 2
D12S391	12.34	26.23	2 3	2 2	2 4
D12S1042	27.53	48.70	1 3	2 2	2 3
D12S1301	42.34	56.25	2 3	1 2	1 3
D12S297	50.89	64.96	1 2	2 3	2 3
D12S398	51.483	68.16	2 4	3 4	1 3

Markır	Mb	cM	Alleller		
			604	605	508
D12S1676	66.49	78.74	1 1	1 2	1 2
D12S375	67.23	80.52	2 2	1 1	1 1
D12S1722	69.29	82.12	1 1	1 2	1 2
D12S1025	69.40	-	1 1	1 3	2 3
D12S1040	71.22	83.19	3 3	1 2	1 1
D12S299	71.45	83.19	3 3	1 3	1 2
D12S303	72.32	-	2 2	1 2	2 3
D12S376	73.49	83.73	3 3	1 1	1 1
D12S1052	73.89	83.19	1 1	2 3	2 3
D12S350	75.84	86.40	1 1	1 2	1 2
D12S326	76.40	86.40	2 2	1 4	3 4
D12S824	80.81	91.46	1 3	1 3	2 3
D12S1812	87.90	-	1 1	1 2	1 1
D12S1064	89.32	95.03	2 3	1 1	1 1
D12S1300	97.00	104.12	2 3	1 2	2 3
PAH	101.79	109.47	3 4	2 2	2 2
D12S395	118.60	136.82	1 1	1 3	2 3
D12S97	128.75	160.68	2 3	2 3	2 3
D12S392	129.75	129.75	1 2	1 3	1 3



Şekil 4.1 PAGE’de yürütüldükten sonra gümüş ile boyanan örnekler.

4.1.2 Kromozom 13:

Bu çalışma için kullanılan markırlar, yerleri ve genotipleri çizelge 4.2’de gösterilmiştir. Bu kromozom için kullanılan tüm markırlar ana set içerisindeydir.

Çizelge 4.2 13. kromozom için genom taraması sonuçları. Mb: baz çifti, cM: SantiMorgan

Markır	Mb	cM	Alleller		
			604	605	508
D13S787	22.17	8.87	1 3	1 2	1 3
D13S894	36.53	32.90	1 2	1 3	3 4
D13S317	80.42	63.90		1 2	1 1
D13S793	96.49	76.26	1 3	1 2	3 3
D13S796	105.58	93.52	1 3	1 4	1 4
D13S285	110.74	110.55	1 2	1 2	

4.1.3 Kromozom 14:

Bu çalışma için kullanılan markırlar, yerleri ve genotipleri çizelge 4.3’de gösterilmiştir. Bu kromozom için kullanılan tüm markırlar ana set içerisindeydir.

Çizelge 4.3 14. kromozom için genom taraması sonuçları. Mb: baz çifti, cM: SantiMorgan

Markır	Mb	cM	Alleller		
			604	605	508
D14S1280	24.64	25.87	1 4	1 3	1 3
D14S306	37.39	44.06	2 3	1 3	3 3
D14S592	59.38	66.81	1 3	2 3	1 3
D14S606	81.32	91.62	1 2	2 2	2 3
D14S617	90.19	105.53	2 4	2 2	1 2
GATA136B01	98.60	125.88	1 2	2 3	1 3

4.1.4 Kromozom 15:

Bu çalışma için kullanılan markırlar, yerleri ve genotipleri çizelge 4.4’de gösterilmiştir. Ana set içinde bulunan markırlar kalın karakterde gösterilmiştir. Bu kromozomda D15S657 ve D15S642 markırlarında görülen homozigot bölgeler buranın uygun bir lokus olabileceğini

göstermekteydi. Ancak P5 için homozigotluğun farklı allelerde devam etmesi aradığımız bölgenin burası olamayacağını göstermektedir.

Çizelge 4.4 15. kromozom için genom taraması sonuçları. Mb: baz çifti, cM: SantiMorgan

Markır	Mb	cM	Alleller		
			604	605	508
D15S822	24.94	12.30	1 3	2 3	1 3
GATA50C03	-	34.83	1 2	1 4	2 4
D15S643	57.42	52.33	3 5	2 5	1 4
D15S655	85.70	82.84	2 2	1 3	1 2
D15S652	90.24	90.02	1 4	3 5	2 3
D15S657	94.43	104.86	1 2	1 2	2 2

4.1.5 Kromozom 16:

Bu çalışma için kullanılan markırlar, yerleri ve genotipleri çizelge 4.5’de gösterilmiştir. Ana set markırları kalın karakterde, bizim tasarladığımız markırlar italik karakterde, Resgen’den alınmış markırlar normal karakterde gösterilmiştir. Bu bölgede çok uzun homozigot bölgeler bulunduğu için aradığımız yer olduğunu düşünmekteyiz. Ancak LOD skor analizi sonucunda +3 değerine ulaşamamasına rağmen negatif bir değer de elde edilmemiştir. Bunun sebebi kullandığımız markırların bu aile için informatif olmamasıdır.

Çizelge 4.5 16. kromozom için genom taraması sonuçları. Mb: baz çifti, cM: SantiMorgan

Markır	Mb	cM	Alleller		
			604	605	508
D16S2616	11.46	6.2	1 2	1 2	1 2
D16S764	29.97	16.6	2 2	1 2	1 2
D16S497	11.04	20.7	2 2	1 2	1 2
D16S535	19.88	38.1		2 2	1 2
D16S3076	22.92	43.8	1 1	1 1	1 2
D16S3133	24.6	46.9	1 3	3 5	2 4
D16S3068	48.53	25.5	1 3	2 3	1 3

Markır	Mb	cM	Alleller		
			604	605	508
D16S769	50.60	26.1	1 2	2 2	2 2
D16S3100	52.26	26.5	1 2	2 2	2 2
D16S3093	52.26	26.7	2 2	2 2	2 2
D16S3145	52.26	26.8	1 2	1 1	1 1
D16S313	24.6	27.1	2 3	3 3	3 3
D16S690	57.79	27.9	3 4	4 4	4 4
D16H2850	-	28.5	1 1	1 1	1 1
D16H2870	-	28.7	1 1	1 1	1 1
D16H2950	-	29.5	1 2	2 2	2 2
D16H3000	-	30.0	1 1	1 1	1 1
D16S685	57.79	30.7	1 2	1 1	1 1
D16H3070	-	30.7	1 4	1 1	1 1
D16S753	57.79	31.3	1 2	2 2	2 2
D16S310	58.46	46.5	1 2	2 2	2 2
D16S3044	58.46	47.2	1 3	2 3	3 3
D16S409	58.46	48.5	1 2	1 2	1 1
D16S477	58.46	48.7	2 2	2 2	2 2
D16S540	57.79	48.9	2 3	2 3	2 2
D16S682	59.68	49.7	1 6	1 3	1 1
D16S3136	62.11	50.4	1 1	1 2	1 1
D16S3396	63.78	50.9	2 2	1 2	2 2
D16S3253	71.77	53.3	1 1	1 1	1 1
D16S624	87.62	71.5	1 3	1 2	2 4
D16S2624	87.62	71.5	1 3	1 2	2 4
D16S539	124.73	86.1	3 4	2 4	3 5

4.1.6 Kromozom 17:

Bu çalışma için kullanılan markırlar, yerleri ve genotipleri çizelge 4.6'de gösterilmiştir. Bu kromozom için kullanılan tüm markırlar ana set içerisindeydir

Çizelge 4.6 17. kromozom için genom taraması sonuçları. Mb: baz çifti, cM: SantiMorgan

Markır	Mb	cM	604	605	508
D17S1308	0.60	0.63	1 2	1 2	1 2
D17S1303	11.05	23.56	4 4	2 2	1 2

Markır	Mb	cM	604	605	508
D17S1293	32.70	56.48		1 3	1 2
D17S1290	56.80	82.00	1 1	2 3	2 3
D17S1301	73.27	100.02	3 5	1 2	2 5
D17S928	80.93	126.46	1 3	1 3	

4.1.7. Kromozom 18:

Bu çalışma için kullanılan markırlar, yerleri ve genotipleri çizelge 4.7’de gösterilmiştir. Ana sete ait markırlar kalın karakterde yazılmıştır. Bu kromozomda D18S877 ve D18S535 markırlarında görülen homozigot bölgeler buranın uygun bir lokus olabileceğini göstermekteydi. Ancak 508 için homozigotluğun farklı allelerde devam etmesi aradığımız bölgenin burası olamayacağını göstermektedir.

Çizelge 4.7 18. kromozom için genom taraması sonuçları. Mb: baz çifti, cM: SantiMorgan

Markır	Mb	cM	Alleller		
			604	605	508
D18S481	3.05	6.94		1 2	1 2
D18S976	5.2	12.81	3 3	2 2	2 3
D18S843	8.60	28.10	3 3	2 3	2 3
D18S1158	10.73	38.92		1 2	1 2
D18S542	11.48	41.24	1 2	2 2	3 3
D18S869	18.33	49.55	2 2	2 3	1 2
D18S877	24.97	54.40	2 2	2 2	1 1
D18S535	36.40	64.48	1 1	1 1	1 1
D18S858	53.04	80.41	3 4	4 5	4 4
D18S878	61.55	-	2 3	1 3	1 2
D18S844	72.48	116.44	1 2 1 2 2 3		

4.1.8 Kromozom 19:

Bu çalışma için kullanılan markırlar, yerleri ve genotipleri çizelge 4.8’de gösterilmiştir. Ana sete ait markırlar kalın karakterde yazılmıştır.

Çizelge 4.8 19. kromozom için genom taraması sonuçları. Mb: baz çifti, cM: SantiMorgan

Markır	Mb	cM	Alleller		
			604	605	508
D19S591	3.02	9.84	3 3	1 1	3 3
D19S586	9.66	32.94	3 4	2 3	1 2
D19S561	34.56	50.81	3 4	1 2	1 1
D19S405	35.41	51.88	1 2	1 1	1 2
D19S178	49.09	68.08	2 3	2 3	2 3
D19S246	55.6	78.08	2 3	1 1	1 3
D19S254	62.35	100.61	1 2	1 3	1 1

4.1.9 Kromozom 20:

Bu çalışma için kullanılan markırlar, yerleri ve genotipleri çizelge 4.9'de gösterilmiştir. Ana setten olan markırlar kalın karakterle gösterilmiştir.

Çizelge 4.9 20. kromozom için genom taraması sonuçları. Mb: baz çifti, cM: SantiMorgan

Markır	Mb	cM	Alleller		
			604	605	508
D20S482	4.05	12.12	1 2	1 2	1 1
D20S470	17.36	39.25	1 1	1 2	1 1
D20S481	43.2	62.32	1 3	3 3	3 3
D20S480	51.29	79.91	1 2	2 3	1 2
D20S158	55.02	86.98	2 3	1 1	2 3

4.1.10 Kromozom 21:

Bu çalışma için kullanılan markırlar, yerleri ve genotipleri çizelge 4.10'de gösterilmiştir. Bu kromozom için kullanılan tüm markırlar ana settendir.

Çizelge 4.10 21. kromozom için genom taraması sonuçları. Mb: baz çifti, cM: SantiMorgan

Markır	Mb	cM	604	605	508
D21S1432	16.26	2.99	1 3	1 3	2 2
GATA129D11	-	27	3 3	1 1	1 2
GATA188F04	40.11	40.49	4 4	2 5	5 5
D21S1446	46.89		1 3	1 3	1 3

4.1.11 Kromozom 22:

Ana setten olan markırlar kalın karakterde yazılmıştır. Tarafımızdan tasarlanan markırlar italik karakterde gösterilmiştir.

Çizelge 4.11 16. kromozom için genom taraması sonuçları. Mb: baz çifti, cM: SantiMorgan

Markır	Mb	cM	604	605	508
D22S420	16.23	4.06	1 2	1 2	1 2
D22S689	27.18	28.57	2 2	1 1	2 3
<i>D22S001</i>	29		2 3	2 3	1 3
D22S685	32.92	32.39	2 4	1 4	2 4
D22S278	34.67	36.22		2 3	1 2
D22S683	34.78	36.22	1 3	1 2	1 3

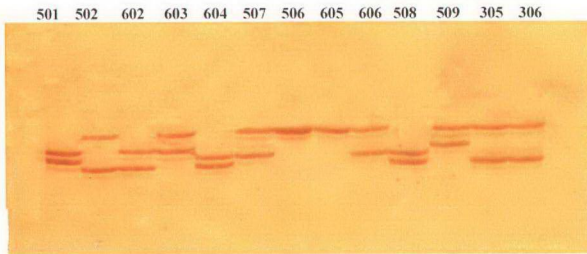
4.2 Bilinen Lokuslarla Bağlantı Araştırması:

ARJP için bugüne kadar 4 ayrı lokus rapor edilmiştir. Bunlar: PARK2, PARK6, PARK7 ve PARK9'dur. Bu bölgeler bu çalışmada incelenmiş ve bizim çalıştığımız ailede ARJP ile bu bölgeler arasında bir bağlantı olmadığı gösterilmiştir.

4.2.1 PARK2, Parkin:

Parkin geni, 6q25.2-27'de 162.537 K-162.884K baz çifti aralığındadır.

D6S1579 ve D6S1277 markırları kullanılarak yapılan incelemenin sonuçları aşağıdadır.



Şekil 4.2 D12S1277 markırı ile PCR yapıldıktan sonra PAGE'de yürütülen örneklerin Gümüş boyama sonrası görünüşleri.

Çizelge 4.12 PARK2 genin çevresinde yer alan iki markırla yapılan incelemenin sonuçları.

Mb: baz çifti, cM: SantiMorgan

MARKER	cM	Mb	Alleller												
			501	502	602	603	604	507	506	305	605	606	508	509	306
D6S1579	166.93	160.9	2 3	2 3	2 3	2 3	2 3	1 2	1 2	1 2	2 2	1 2	2 2	1 2	2 2
PARK 2		162													
D6S1277	173.31	164.2	2 3	1 4	1 3	3 4	1 2	2 4	4 4	1 4	4 4	2 4	1 2	3 4	1 4

4.2.1.1 Lod Skor Analizi:

PARK2 genine yakın noktalardan alınan iki markırla yapılan inceleme sonucunda maksimum LOD skor 0,94 olmuştur. Bu sonuç ailedeki hastalık ile PARK2 geni arasında bir bağlantı olmadığını göstermektedir.

Çizelge 4.13 PARK2 genine bağlantı analizi Lod skor sonuçları.

Markır	Lod Skor θ							Z_{max}	θ
	0.0	0.01	0.05	0.1	0.2	0.3	0.4		
D6S1579	-2.70	0.54	0.94	0.87	0.52	0.21	0.05	0.94	0.06
D6S1277	$-\infty$	-3.63	-1.66	0.91	-0.33	-0.12	-0.04	0	0.5

4.2.2 PARK6 ve PARK9

PINK-1 geni PARK6 lokusunda mitokondriyal bir proteazı kodlayan gendir. Mutasyonları ARJP'ye sebep olmaktadır. PARK6 20.482K-20.448K Mb aralığındadır.

PARK6 lokusu PARK9 lokusundan yaklaşık 2.5 cM uzaklıktadır. PARK9 için henüz bir gen tanımlanmamıştır. Maksimum LOD skor değerleri D1S170 ve D1S552 markırları arasında rapor edilmiştir.

Çizelge 4.14 PARK6 ve PARK9 lokusları çevresinde yer alan yedi markırla yapılan incelemenin sonuçları. Mb: baz çifti, cM: SantiMorgan

			Alleler													
MARKER	cM	Mb	501	502	602	603	604	507	506	305	605	606	508	509	306	
DIS436	37	15.23	3 3	1 1	1 3	1 3	1 3	1 2	1 3	1 2	1 3	1 2	1 2	1 2	1 2	
DIS170		16.67	1 3	2 2	1 2	1 2	1 2	1 1	1 3	1 2	1 2	1 2	1 3	1 3	1 3	
DIS552	45.33	18.73	1 2	2 2	1 2	1 2	1 2	1 2	1 2	1 2	1 1	1 2	1 1	1 2	1 2	
DIS1674		19.2	2 2	1 1	1 2	1 2	1 2	1 1	1 2	1 2	1 2	1 1	2 2	1 1	1 2	
DIS2647	46	19.3	2 3	2 2	2 2	2 2	2 2	1 3	2 2	2 2	1 2	1 2	2 2		2 3	
Pink 1 PARK 6		20.429														
		20.448														
DIS478	48.53	21.06	1 1	1 1	1 1	1 1	1 1	1 2	1 1	1 1	1 2	1 2	1 1	1 1		
DIS2743	70.41	40.12	2 3	1 1	1 2	1 2	1 2	1 1	1 1		1 1	1 1	1 2	1 1	1 1	

501 502 602 603 604 507 506 605 606 508 509 305 306



Şekil 4.3 D12S436 markırı ile PCR yapıldıktan sonra PAGE ile yürütülen örneklerin Gümüş boyama sonrası görünümüleri

4.2.2.1 Lod skor Analizi:

Çizelge 4.10'da görülen sonuçlar Pink-1 ve PARK9 genlerinin ailedeki ARJP hastalığına bir bağlantı kurmadığını göstermektedir.

Çizelge 4.15 Pink-1 ve PARK9 genleri ile bağlantı analizi sonuçları

Markır	Lod Skor θ							$Z_{\max}$	θ
	0.0	0.01	0.05	0.1	0.2	0.3	0.4		
DIS436	$-\infty$	-3.26	-1.32	-0.62	-0.13	-0.01	0.01	0.01	0.4
DIS170	-9.64	-3.08	-1.59	-0.94	-0.38	-0.15	-0.04	0	0.5
DIS1674	$-\infty$	-0.33	-0.16	0.16	0.21	0.09	0.01	0.23	0.16
DIS2647	$-\infty$	-0.67	-0.05	0.14	0.22	0.18	0.1	0.22	0.193
DIS478	$-\infty$	-0.21	0.35	0.47	0.42	0.27	0.13	0.48	0.12

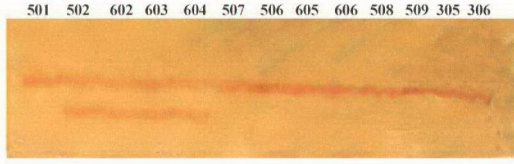
4.2.3 PARK7:

PARK7, Dujin ve arkadaşları tarafından Hollandalı bir topluluk üzerinde yapılan çalışmalar sonucunda rapor edilmişti. 7.328K-7.865 Mb arasında yer almaktadır.

Çizelge 4.16 PARK7 geni çevresinde yer alan üç markırla yapılan incelemenin sonuçları.

Mb: baz çifti, cM: SantiMorgan

			Alleller												
MARKER	cM	Mb	501	502	602	603	604	507	506	305	605	606	508	509	306
DIS548	15.13	7.15	2 2	1 2	1 2	1 2	1 2	1 1	1 1	1 1	1 1	1 1	1 1	1 1	1 1
DIS508	16.22	7.3	2 3	1 2	1 3	1 2	1 3	1 3	2 3	1 2	2 3	1 3	1 3	1 3	1 3
PARK 7 Dj-1		7.73													
DIS1612			3 4	1 1	1 4	1 3	1 4	2 3	1 2	1 4	1 3	2 2	4 4	4 4	3 4



Şekil 4.4 D1S548 markırı ile PCR yapıldıktan sonra PAGE ile yürütülen örneklerin Gümüş boyama sonrası görüntüleri

4.2.3.1 Lod Skor Analizi

Çizelge 4.10'da görüldüğü gibi PARK7 geni çalıştığımız aile için dışlanmıştır.

Çizelge 4.17 PARK7 geni ile bağlantı analizi sonuçları.

Markır	Lod Skor θ							Z_{max}	θ
	0.0	0.01	0.05	0.1	0.2	0.3	0.4		
D1S548	-3.40	-1.18	-0.55	-0.31	-0.13	-0.05	-0.01	0	0.5
D1S508	$-\infty$	-3.58	-1.47	-0.68	-0.15	-0.02	0.00	0	0.5
D1S1612	$-\infty$	-3.01	-1.13	-0.50	-0.13	-0.05	-0.02	0	0.5

4.3 16. Kromozomda İnce Haritalama

4.3.1 16. Kromozom İnce Haritalama Sonuçları:

Genom taraması sonucu ana set içerisinde bulunan markırlardan D16S753 ve D16S3253 markırları için istatistiksel açıdan anlamlı sonuçlarla karşılaştırıldı. Aralarındaki uzaklık yaklaşık 14 cM olan bu iki markır arasında ve çevresinde ayrıntılı incelemeler gerçekleştirildi.

Çizelge 4.18 3.1 Ana set markırları için 16. kromozomda genom taraması sonuçları.

Markır	Mb	cM	Alleler		
			604	605	508
D16S2616	6.2	11.46	12	12	12
D16S764	16.61	29.97	22	12	12
D16S753	31.3	57.79	12	22	22
D16S3253	53.34	71.77	12	11	11
D16S2624	71.51	87.62	13	12	24
D16S539	86.16	124.73	34	22	12

D16S764 markırı 604 numaralı hasta birey için homozigot, D16S753 markırı ise 605 ve 508 numaralı hasta bireyler için homozigot sonuçlar ortaya çıkardı. D16S3253 markırı ise benzer sonuçlar gösterdi. Ancak bu markır için ailenin tüm bireylerinin incelenmesi sonucu bu markırların, informatif olmadığı, dolayısıyla yeterli düzeyde bilgi vermediği görüldü. Sonuç olarak bölgede daha ayrıntılı çalışmalar yapmamız gerektiği ortaya çıktı.

Çizelge 4.19 D16S3253 markırı için aile bireyleri sonuçları.

Markır	Mb	cM	Alleler											
			604	605	508	501	502	602	603	507	506	606	509	305
D16S764	16.61	29.97	22	12	12									
D16S753	31.13	57.79	12	22	22									
D16S3253	53.34	71.77	12	11	11	22	12	12	12	11	11	11	11	11

16. kromozom üzerinde D16S764 ve D16S3253 markırları arasında yaklaşık 42 cM uzunluğunda bir bölgede ana sete ait üç markır dahil toplam 28 markırla ince haritalama

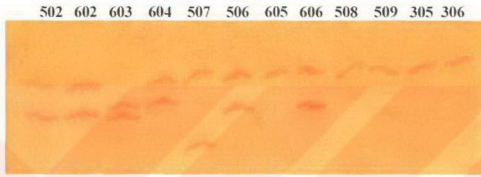
gerçekleştirildi. Bu markırları 5 tanesi tarafımızdan tasarlandı ve sentez ettirildi. Üç tanesi ana sete ait olan markırların geriye kalan 20 tanesi Resgen (USA) veya Iontek (Türkiye)'den sağlandı.

Çizelge 4.20 D16S764 ve D16S3253 markırları arasında gerçekleştirilen ince haritalamayı göstermektedir. Özellikle 508 numaralı hasta birey için D16S769'da başlayıp D16S682'ye kadar süren homozigotluk dikkat çekicidir. Aynı şekilde 605 numaralı hasta D16S769'da başlayan homozigotluk D16S3105'de son bulmaktadır. Diğer hasta olan 604 ise görece daha kısa bir homozigotluk sergilemektedir. Aranılan genin bu homozigot bölgelerin kesiştiği bir alanda olacağı düşünülebilir.

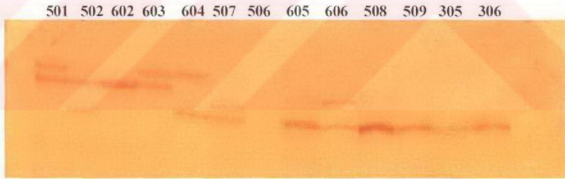
Çizelge 4.20 D16S764 ve D16S3253 markırları arasında ince haritalama. Ana set markırları normal karakter, Resgen(ABD) ve Iontek'ten (Türkiye) satın alınan markırlar italik karakter, tarafımızdan tasarlanan markırlar ise kalın karakterde yazılmıştır.

			Alleller												
Markır	Mb	cM	501	502	602	603	604	507	506	605	606	508	509	305	306
D16S497	11.04	20.77					2 2			1 2		1 2			
D16S764	16.61	29.97					2 2			1 2		1 2			
D16S535	19.88	38.51								2 2		1 2			
D16S3076	22.92	43.89					1 1			1 1		1 2			
D16S3133	24.6	46.94					1 3			3 5		2 4			
D16S3068	25.52	48.53					1 3			2 3		1 3			
D16S769	26.12	50.60	1 2	1 2	1 2		1 2	2 2	1 2	2 2	1 2	2 2	2 3	2 3	2 3
D16S3100	26.54	52.26	1 4	2 4	4 4	1 4	1 2	2 2	2 4	2 2	2 4	2 2	2 3		2 3
D16S3093	26.71	52.26	1 2	2 2	1 2	2 2	2 2	2 2	2 2	2 2	2 2	2 2	1 2		1 2
D16S3145	26.84	52.26	1 2	1 1	1 2		1 2	1 3	1 1	1 1	1 1	1 1	1 3	1 3	1 3
D16S313	27.13	-	1 2	(2 3)	2 3	2 2	2 3	1 3	2 3	3 3	2 3	3 3		3 3	3 3
D16S690	27.90	57.79		2 4	2 4	2 3	3 4	1 4	2 4	4 4	2 4	4 4	4 4	4 4	4 4
D16H2850	28.50	-	1 1	1 1	1 1	1 1	1 1	1 1	1 1	1 1	1 1	1 1	1 1	1 1	1 1
D16H2870	28.70	-	1 1	1 1	1 1	1 1	1 1	1 1	1 1	1 1	1 1	1 1	1 1	1 1	1 1
D16H2950	29.50	-	1 2	2 2	2 2		2 2	2 2		2 2		2 2	2 2	2 2	
D16H3000	30.00	-	1 1	1 1	1 1	1 1	1 1	1 1	1 1	1 1	1 1	1 1	1 1	1 1	1 1
D16S685	30.72	57.79	1 2	1 1	1 1	1 2	1 2	1 1	1 1	1 1	1 1	1 1	1 1	1 1	1 1
D16H3070	30.70	-	3 4	1 3	3 3	3 4	1 4	1 2		1 1	1 3	1 1	1 1	1 1	1 1
D16S753	31.13	57.79					1 2			2 2		2 2			
D16S3105	46.05	58.46					1 2			2 2		2 2			
D16S3044	47.20	58.46	1 3	2 3	3 3	1 2	1 3	3 3		2 3	2 3	3 3	3 3	3 3	3 3
D16S409	48.55	58.46					1 2			1 2		1 1			

Markır	Mb	cM	501	502	602	603	604	507	506	605	606	508	509	305	306
D16S477	48.70	58.46			1 2	2 2	2 2	2 2	2 2	2 2	2 2	2 2	2 2	2 2	2 2
D16S540	48.85	57.79	2 3	2 3	2 3	2 3	2 3	1 2	2 3	2 3	2 3	2 2	-	2 2	2 2
D16S682	49.76	59.68	4 6	1 3	3 4		1 6	1 5	2 3	1 3	1 3	1 1	1 2	1 2	
D16S3136	50.48	62.11	1 1	1 2	1 2	1 2	1 1	1 1	1 2	1 2	1 2	1 1	1 1		1 1
D16S3396	50.97	63.78	2 2	1 2	1 2	1 2	2 2		1 2	1 2	1 2	2 2	2 2	2 2	2 2
D16S3253	53.34	71.77	2 2	1 2	1 2	1 2	1 2	1 1	1 1	1 1	1 1	1 1	1 1	1 1	1 1
D16S624	71.75	87.62					1 3			1 2		2 4			



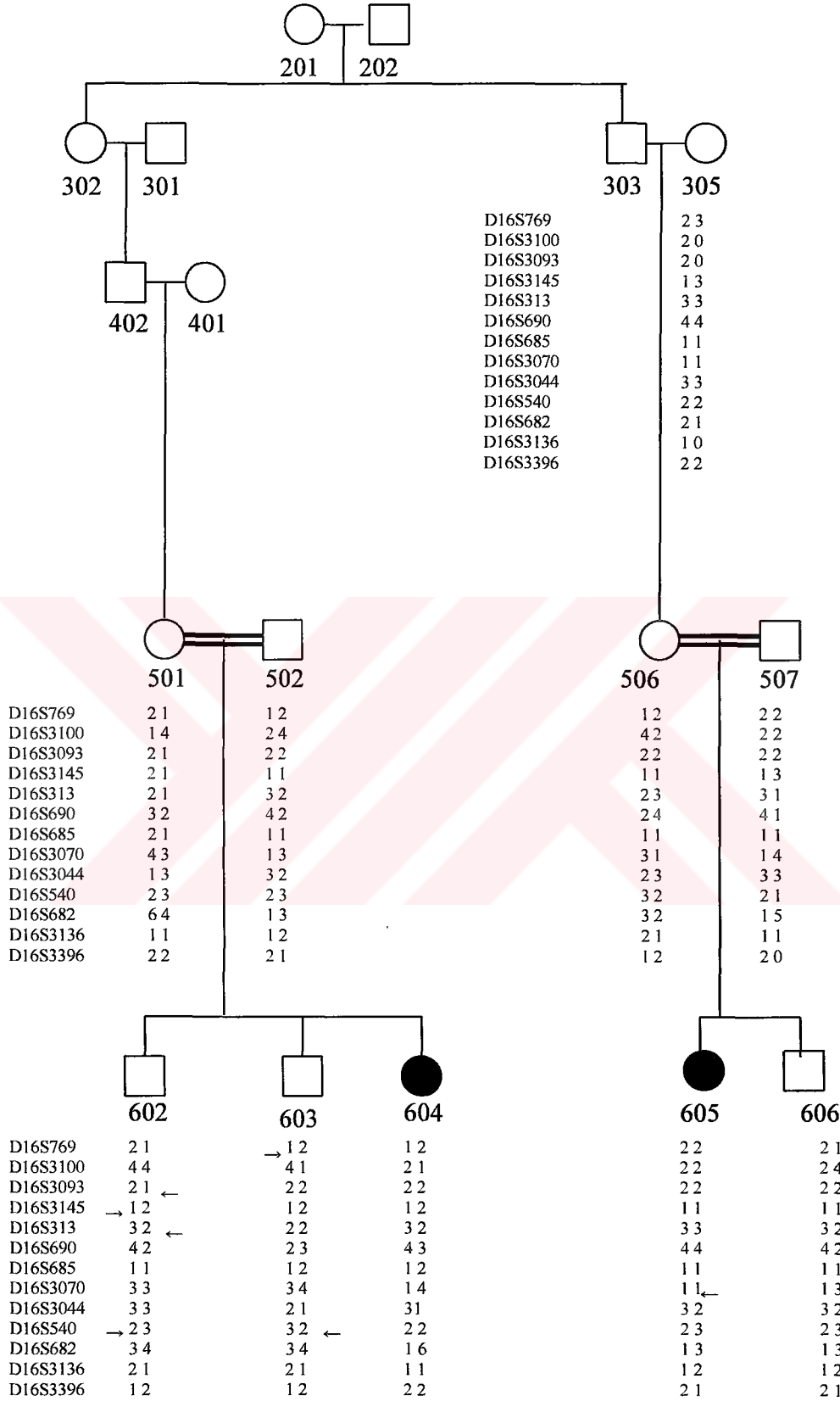
Şekil 4.5 D16S690 markırı ile PCR yapıldıktan sonra PAGE'de yürütülen örneklerin gümüş boyama sonrası görünümleeri



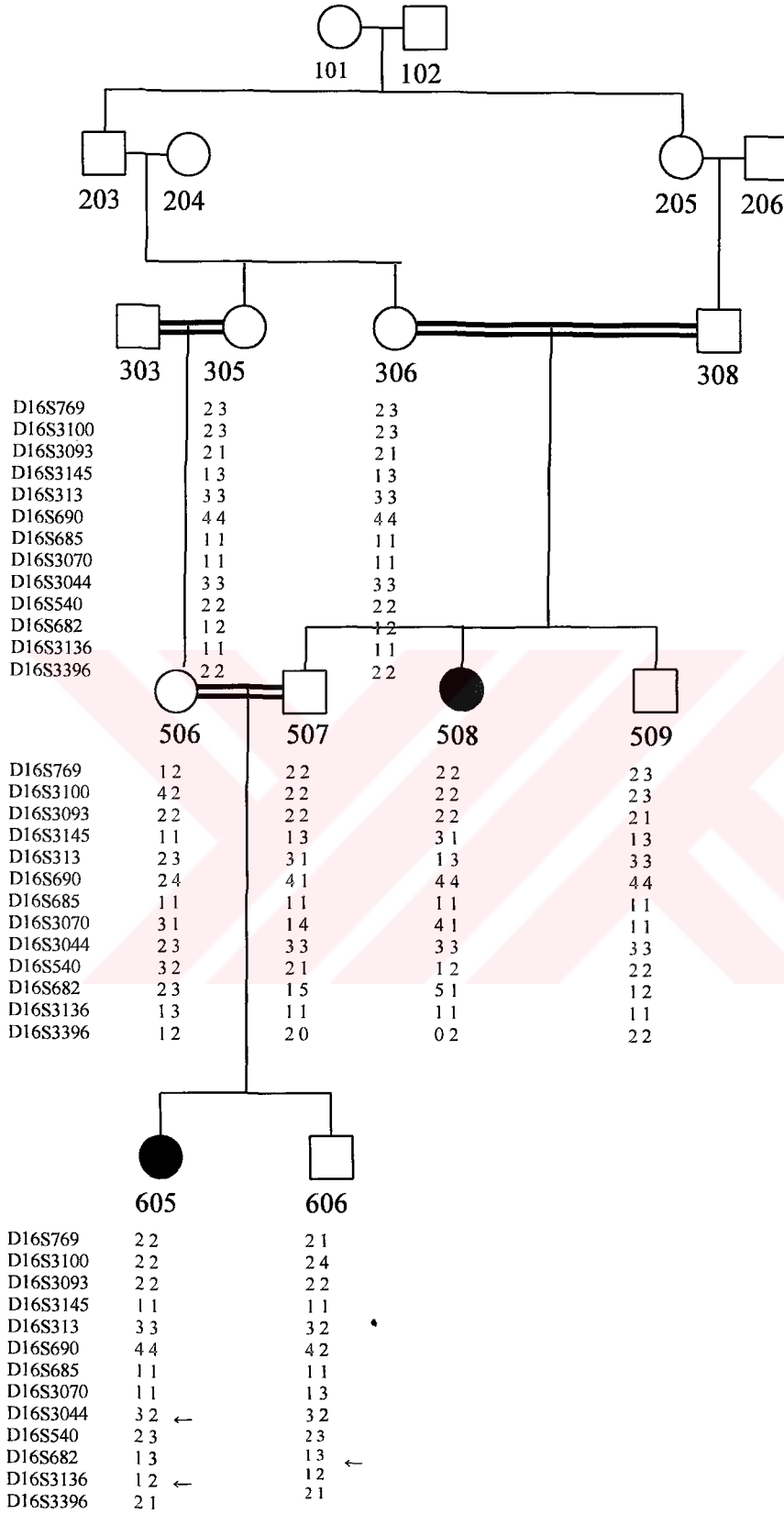
Şekil 4.6 D16H3070 markırı ile PCR yapıldıktan sonra PAGE'de yürütülen örneklerin gümüş boyama sonrası görünümleeri

4.3.1.1 LOD Skor Analizi:

On altıncı kromozomda yapılan ince haritalama sonrasında uygun olduğunu düşündüğümüz markırlar kullanılarak Multipoint LOD skor hesaplandı. Ancak aile çok büyük ve karışık olduğu için bilgisayar programı çalışmadı. Bilgisayar programının çalışabilmesi için aile uygun bir şekilde ikiye bölündü (Şekil 4.7 ve şekil 4.8).



Şekil 4.7 Multipoint Lod skor için “grup 1” haplotipleri



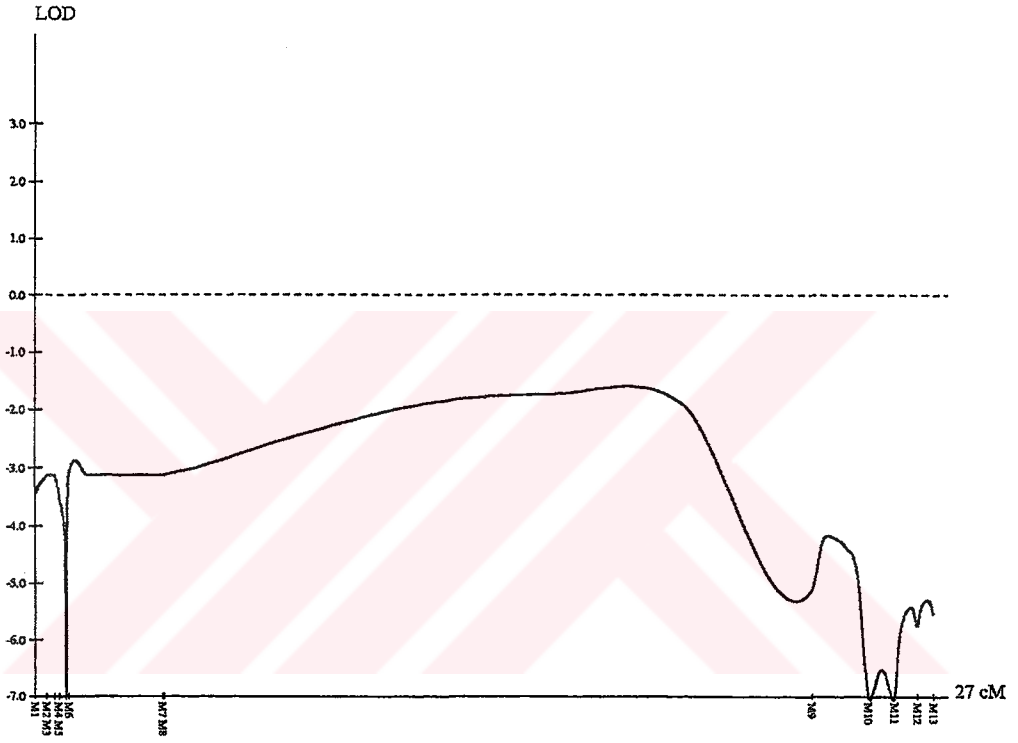
Şekil 4.8 Multipoint Lod skor için “grup 1” haplotipleri

4.3.1.2 LOD Skor analizi sonuçları:

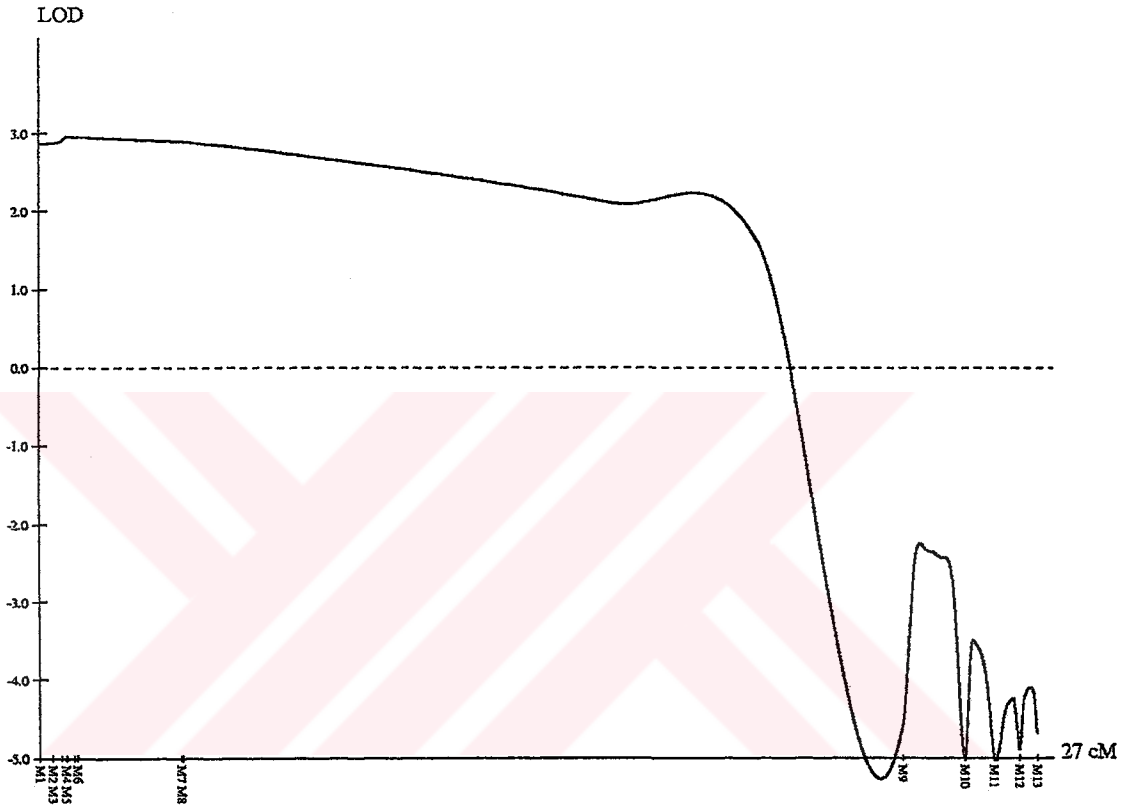
16. kromozomda Multipoint LOD skor analizi için görece informatif olan 13 tane markır seçildi. Bu markırlar Çizelge 4.21’de gösterilmektedir.

Çizelge 4.21 16 .kromozomda multipoint LOD skor hesaplamak için seçilmiş markırlar

Markır 1	D16S769
Markır 2	D16S3100
Markır 3	D16S 3093
Markır 4	D16S 3145
Markır 5	D16S 313
Markır 6	D16S 690
Markır 7	D16S 685
Markır 8	D16S 3070
Markır 9	D16S 3044
Markır10	D16S 540
Markır 11	D16S 682
Markır 12	D16S 3136
Markır 13	D16S 3396



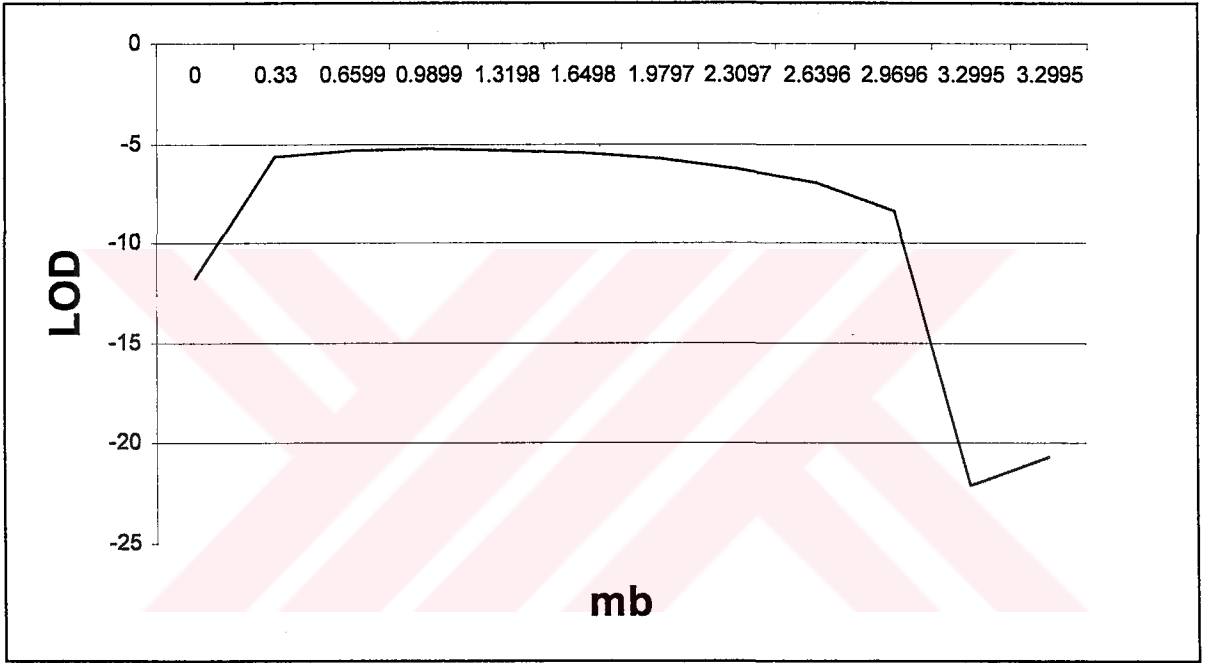
Şekil 4.9 16. kromozomda seçilmiş 13 markır için multipoint lod skor sonuçları (Grup I)



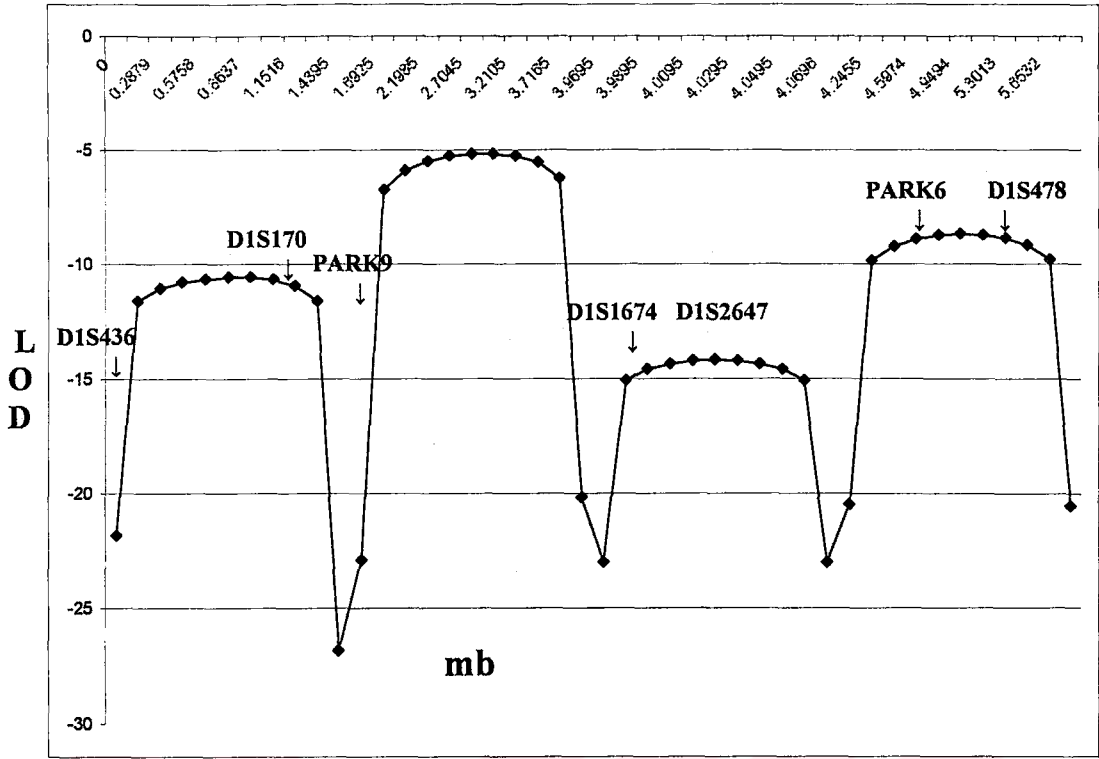
Şekil 4.10 16. kromozomda seçilmiş 13 markır için multipoint lod skor sonuçları (Grup II)

4.4 Simwalk Programı ile Multipoint LOD skor Sonuçları:

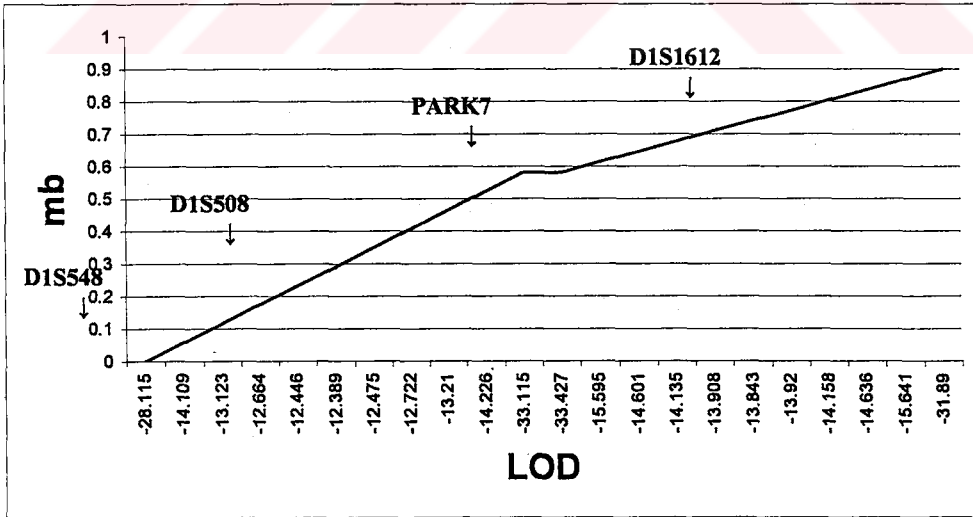
Linkage programı ile LOD skor hesaplamak için aileyi bölmemiz gerektiğinden aileyi bölmeden LOD skor hesaplamak için Simwalk isimli başka bir program kullandık. Bu program ile daha önceden bilinen lokuslar dahil olmak üzere elimizdeki verileri kullanarak Multipoint LOD skorları hesapladık. Yeni sonuçlar daha önceki bulgularımızı destekler şekildedir ve tablolar halinde gösterilmiştir.



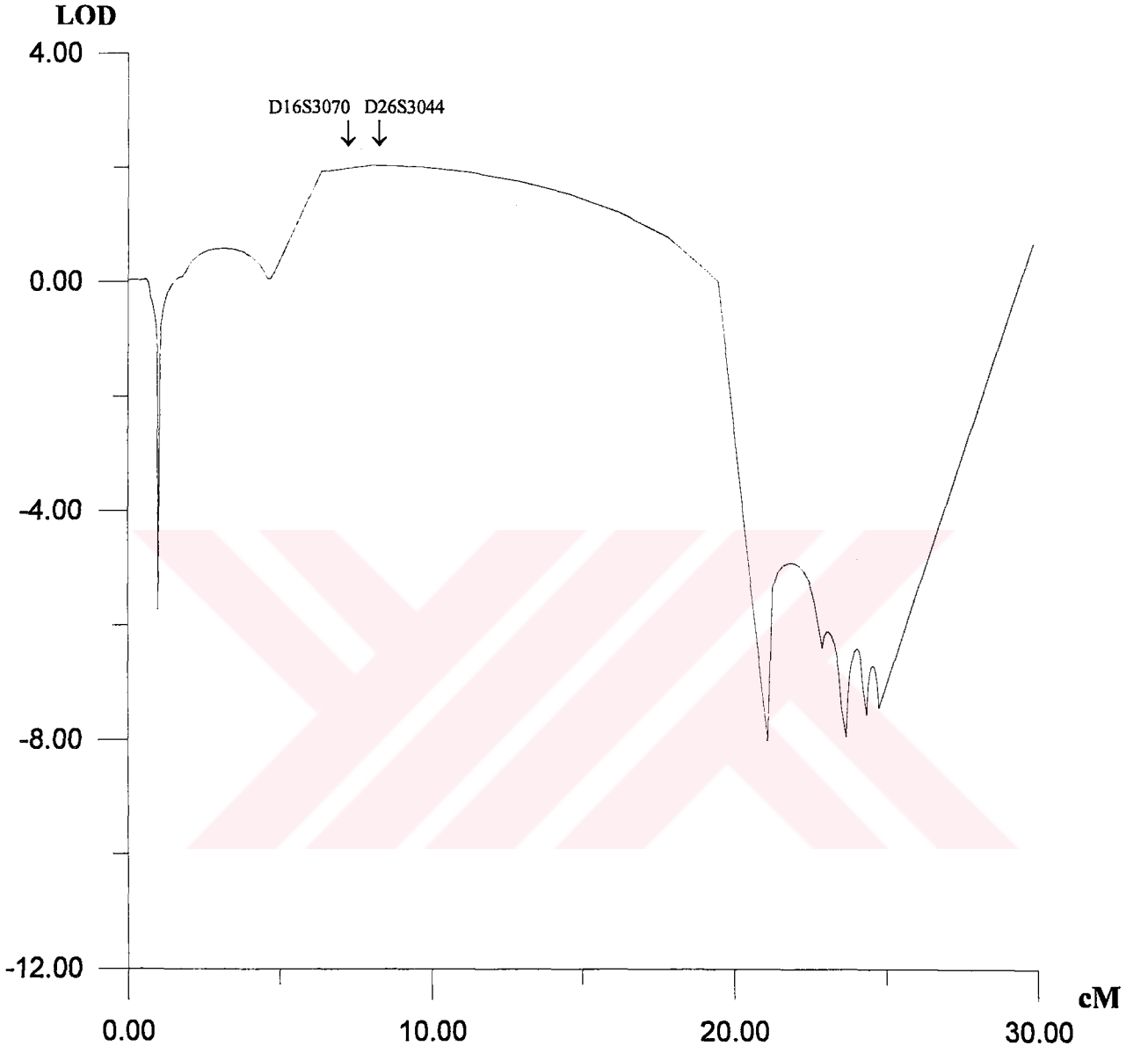
Şekil 4.11 PARK2 genine bağlantı analizi multipoint LOD skor sonuçları



Şekil 4.12 PARK6 ve PARK9 genlerine bağlantı analizi multipoint LOD skor sonuçları



Şekil 4.13 PARK7 genine bağlantı analizi multipoint LOD skor sonuçları



Şekil 4.14 16. kromozomda bağlantı analizi multipoint LOD skor sonuçları (Ailenin tamamı için)

4.5 TARTIŞMA:

ARJP için elimizde bulunan geniş ailede daha önceki yıllarda başka bir çalışmada 1. ve 11. kromozomlar arasında genom taraması yapılmıştır ve bu taranan kromozomlar üzerinde ARJP'ye bağlı bir lokus bulunamamıştır. Bu çalışmada ise öncelikle bilinen ARJP hastalık lokusları taranmış ve bu lokuslar bizim ailemiz için dışlanmıştır.

ARJP hastalığına sebep olan PARK2 geni için D6S1579 ve D6S1277 markırları kullanılmış ve yapılan hesaplama sonucunda LOD skor maksimum 0.94 olarak bulunmuştur (Çizelge 4.13). PARK6 ve PARK7 lokusları birbirlerine yakın oldukları için LOD skor hesaplanırken birlikte alınmışlardır. PARK6 birinci kromozom üzerinde 20.429-20.448 milyon baz çifti aralığında yer alırken PARK7 lokusu için bu bölgeye çok yakın olan D1S170 ve D1S552 markırlarında maksimum LOD skor rapor edilmiştir. Bizim yaptığımız çalışmada çizelge 4.15'de görüldüğü gibi lod skor her iki lokus için birlikte maksimum 0.48 olarak hesaplanmıştır. Yine birinci kromozom üzerinde yer alan PARK7 için D1S548, D1S508 ve D1S1612 markırları kullanılarak yapılan inceleme sonucu LOD skor maksimum 0 olarak hesaplanmıştır. Bu şekilde ARJP hastalığına sebep olduğu bilinen lokuslar dışlanmıştır.

Daha sonra bilinen lokusların dışında yeni bir lokus bulmak için genom taraması yöntemi kullanılmıştır. Genom taraması sonucunda hasta bireylerde 16. kromozom üzerinde oldukça uzun homozigot bölgeler ortaya çıkarılmıştır. Yaklaşık 40 cM'lık bir aralığa yayılmış olan bu homozigotluklar bize hastalık lokusunun bu bölgede olabileceğini işaret etmektedir. Yapılan ayrıntılı incelemeler de bu hipotezimizi doğrular niteliktedir. Öncelikle D16S3253 ve yakın çevresinden satın alınan D16S3396 ve D16S624 gibi markırlarla bu bölge üzerine yoğunlaşmıştır. Ancak bu alanın dışında kalan bölgenin de çok geniş olması, alanı daraltma konusunda çeşitli sorunların çıkmasına sebep olmuştur. Bu sorunlardan bir tanesi bölgenin sentromere yakın olması ve veri bankalarında gen dizilerin bazı aralıklarda bulunmaması olmuştur. Özellikle 16. kromozomda yaklaşık olarak 35 milyonuncu baz çiftiyle 46 milyonuncu baz çifti arasında yaklaşık 10 milyon bazlık bir boşluk bulunmaktadır. Bu bölge D16S753 ve D16S3105 isimli markırların arasında yer almaktadır. Bu bölgenin dizisinin bilinmemesi dolayısıyla bu aralıkta polimorfik mikrosatellite markırlar veri bankalarında yer almamaktadır. Ayrıca bu bölgeye yakın olan ve özellikle 508 ve 605 numaralı hastaların uzun homozigotluklar gösterdiği D16S690 civarında veri bankalarında polimorfik markırlar bulunmamaktadır. Dizisini veri bankalarında bulduğumuz bu alan için çeşitli polimorfik markırlar bu çalışma için tasarlanmıştır. D16H2850, D16H2870 ve D16H3000 bu

markırlardandır. Ancak bu markırlar PCR ile çoğaltılıp PAGE ile incelendiği zaman polimorfik olmadıkları ortaya çıkmıştır. Bu bölge için toplam beş tane mikrosatellit markır tasarlayıp sentez ettirmiş olmamıza karşın, burası için herhangi bir polimorfik markır elde edemedik ya da elde ettiğimiz polimorfizmler kısıtlı oldu. Aile bireylerinin ancak bir ya da iki tanesi farklı alleller gösterdi. Bizim tasarladığımız markırlar dışında veri bankalarından bulup satın aldığımız markırlar da çok fazla polimorfik özellik göstermediler. Özellikle D16S3093, D16S3145 gibi markırlar ailenin bir ya da iki üyesi için bilgi verdiler. Muhtemelen bu markırlar sentromere çok yakın bir bölgede çalıştığımız için polimorfik özellik göstermediler. Bu sebeplerden 16. kromozom üzerinde 27.9 milyonuncu baz ile 30.7 milyonuncu baz arasında yeterli inceleme yapılamamıştır. D16S690 ve D16S685'in arasında yaklaşık olarak henüz tanımlayamadığımız 2.1 milyon bazlık bölge aradığımız lokus için oldukça uygun gözükmektedir. Ayrıca kullandığımız markırların büyük çoğunluğu aynı contiglerde olmalarına karşın farklı klonlarda yer aldıkları için, zaman içinde veri bankalarının düzenlenmesi ve güncellenmesi ile birlikte yerlerinin değişebileceği de düşünülmelidir.

İncelediğimiz markırlar arasından seçtiğimiz 13 markır için multipoint LOD skor analizi yapıldığı zaman çalıştığımız ailenin büyüklüğü ve karışık akraba evlilikleri görüldüğü için LINKAGE programı LOD skorunu hesaplayamadı. Bunun üzerine aile uygun bir şekilde ikiye bölünerek Multipoint LOD skorlar hesaplandı. Tablo 4.1 ve 4.2'de görüldüğü şekilde ailenin I numara ile adlandırılan kısmı için negatif bir LOD skor değeri çıkarken II numara ile adlandırılan kısmı için 3'e çok yakın bir değer çıktı. D16S3145, D16S313 ve D16S690 markırları ailenin ikinci kısmı için maksimum LOD skorları ürettiler. Ailenin birinci kısmı ise -2 değerini D16H3070 ile D16S3044 markırları arasında geçebildi.

Simwalk programını kullanarak multipoint LOD skorları hesapladığımızda PARK2 geni için maksimum multipoint LOD skor -5.24 olarak bulundu. PARK6 ve PARK9 genleri için maksimum LOD skor -5.17 olarak hesaplandı. PARK7 geni için maksimum multipoint LOD skor ise -12.38 olarak hesaplandı. 16. kromozom üzerinde çalıştığımız bölgede ailenin bütün bireyleri için multipoint LOD skor değeri ise 2.039 olarak hesaplandı.

Sonuç olarak, çalışmış olduğumuz ailenin henüz ARJP hastalığına sebep olduğu ortaya çıkarılmamış bir lokus taşıdığını düşünüyoruz. Elimizdeki veriler bu bölgenin 16. kromozom üzerinde olabileceğini gösteriyor. Ancak 16. kromozomda çalıştığımız bölgenin gen dizisinin bilinmemesi ve bu bölgeler için polimorfik markırlar elde edemeyişimiz başlıca sorunlarımız oldu. Zaman içinde yukarıda bahsedilen veri açıklarının kapanması ve uygun markırların elde edilmesi ile bu bölge tekrar incelenmeye aday bir bölge olarak ortaya çıkarılmış oldu.

KAYNAKLAR

- Akyüz, E. İ., (2002), Genetic Analysis in Four Neurological Disorders, Yüksek Lisans Tezi, Boğaziçi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü (Yayımlanmamış).
- Atac, F.B., Elibol, B. ve Hattorini, N., (2003), "Otozomal Resesif Juvenil Parkinsonlu Türk Hastalarında PARK2 Geni Gen Dozaj Analiz Sonuçları", 8, Ulusal Tıbbi Biyoloji Kongresi, Adana
- Başaran, N., Sayılı, S., Başaran, A., Solak, M., Artan, S. Ve Stevenson, J., (1998), "Consanguineous Marriages in the Turkish Population", *Clinical Genetics*, 34:339-341.
- Bayoumi, R., Saar, K., Lee, Y., Nürnberg, G, Reis, A., Kamal, M. N. ve Al-Gazali, L., (2001), "Localisation of a gene for an autosomal recessive syndrome of macrocephaly, multiple epiphyseal dysplasia, and distinctive facies to chromosome 15q26", *J. Med. Genet.*, 38:369-373.
- Bertoli-Avella, A. M., Oostra, B. A. ve Heutink, P., (2004), "Chasing genes in Alzheimers's and Parkinson's disease", *Hum. Genet.*, 114:413-438.
- Bigas-Lopez, N.ve Ouzounis, C. A., (2004), "Genome-wide identification of genes likely to be involved in human genetic disease", *Nuclei Acids Research*, 32:3108-3114.
- Bomont, P., Watanabe, M., Gershoni-Barush, R., Shizuka, M., Tanaka, M., Sugano, J., Guiraud-Chaumeil, C. ve Michel, K., (2000), "Homozygosity mapping of spinocerebellar ataxia with cerebellar atrophy and peripheral neuropathy to 9q33-34, and with hearing impairment and optic atrophy to 6q21-23", *European Journal of Human Genetics*, 8:986-990.
- Dawson, T.M. ve Dawson, V. L., (2003), "Molecular pat ways of neurodegeneration in parkinson's disease", *Science*, 302:819-822.
- Donnai, D., (2002), "Genetic Services", *Clin. Genet.*, 61:1-6.
- Erlich, H. A. ve Arnheim, N., (1992), "Genetic analysis with the polymerase chain reaction", *Ann. Rev. Genet.*, 26:479-506.
- Farrer, M., Maraganore, D. M., Lockhart, P., Singleton, A., Lesnick, T.G., Andrade, M., West, A., Silva, R., Hardy, J. ve Hernandez, D., (2001), "α-synuclein gene haplotypes are associated with Parkinson's disease", *Human. Mol. Gen.*, 17:1847-1851.
- Fishman, P. S. ve Oyler, G. A., (2002), "Significance of the parkin gene and protein in understanding Parkinson's disease", *Curr. Neurol. Neurosci. Rep.*, 2:296-302.
- Foltynie T., Sawcer, S. ve Barker, R. A., (2002), "The Genetic basis of Parkinson's disease", *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry*, 73:363-70.
- Greenamyre, J. T. ve Hastings, T. G., (2004), "Parkinson's-Divergent Causes, Covergent Mechnisms", *Science*, 304: 1120-1122.
- Hardy, J., Cookson, M. R. ve Singeleton, A., (2003), "Genes and parkinsonism", *Lancet Neurology*, 2:221-28.
- Hattori, N., Matsumine, H., Asakawa, S., Kitada, T., Yoshino, H., Elibol, B., Brookes, A. J., Yamamura, Y., Kobayashi T., Wang, M., Yoritaka, A., Minoshima, S., Shimuzi, N. ve Mizuno, Y., (1998), "Point Mutations (Thr240arg and Ala311Stop) in the Parkin Gene", *Biochmical and Biophysical Reseach Communication*, 249:754-758.
- Hayashi, S., Wakabayashi, K., Ishikawa, A., Nagai, H., Satio, M., Maniyama, M., Takahashi, T., Ozawa, T., Tsuji S. ve Takahashi, H., (2000), "An Autopsly Case of Autosoma-Recessive Juvenile Parkinsonism With a Homozygous Exon 4 Deletion in the parkin Gene", *Mov. Disord.*, 15:884-888.

Imai, Y., Soda, M., Inoue, H., Hattori, N., Mizuno, Y. ve Takahashi, R., (2001), "An Unfolded Putative transmembrane polypeptide, which can lead to endoplasmic reticulum stress, is a substrate of parkin", *Cell*, 105:891-902.

Imai, Y. ve Takahashi, R., (2004), "How do Parkin Mutations result in neurodegeneration?", *Current Opinion in Neurology*, 14:384-389.

İşbir, T., (2000), Nükleik Asit Yapılarının Belirlenmesi, Biyokimyada Temel ve Modern Teknikler, Biyokimya Lisansüstü Yaz Okulu, İzmir

Jimenez, D. R. M., Moreno, S., Garcia-Ospina, G., Buritica, O., Uribe, C. S., Lopera, F. ve Velez-Pardo, C., (2004), "Autosomal recessive juvenile parkinsonism Cys212Tyr mutation in parkin renders lymphocytes susceptible to dopamine -and iron- mediated apoptosis", *Mov. Disord.*, 19: 324-30.

Jones, A. C., Yamamura, Y., Almasy, L., Bohlega, S., Elibol, B., Hubble, J., Kuzuhara, S., Uchida, M., Yanagi, T., Weeks, D. E. ve Nygaard, T. G., (1998), "Autosomal Recessive Juvenile Parkinsonism Maps to 6q25,2-q27 in Four Ethnic Groups: Detailed Genetic Mapping of the Linked Region", *Am. J. Hum. Genet.*, 63:80-87.

Kavaslar, G., Öngüt, S., Derman, O., Kaya, A. Ve Tolun, A., (2000), "The Novel Genetic Disorder Microhydranencephaly Maps to Chromosome 16p13.3-12.1", *Am. J. Hum. Genet.*, 66:1705-1709.

Kitada, T., Yoritaka, A. ve Mizuno, Y., (1998), "A microdeletion of D6S305 in a family of autosomal recessive juvenile parkinsonism (PARK2)", *Genomics*, 49:143-146.

Kitada, T., Asakawa, S., Hattori, N., Matsumine, H., Yamamura, Y., Minoshima, S., Yokochi, M. i., Mizuno, Y. ve Shimizu, N., (1998), "Mutations in the parkin gene cause autosomal recessive juvenile parkinsonism", *Nature*, 392: 605-608.

Lander, E. S. ve Bottstein, J. E., (1987), "Homozygosity Mapping: A Way Map Human Recessive Traits with the DNA of Inbred Children", *Science*, 236:1567-1574.

Le, W., Xu, P., Jankovic, J., Jiang, H., Appel, S. H., Smith, G. ve Vassilatis D. K., (2002), "Mutations in NR4A2 associated with familial Parkinson disease", *Nature Genetics*, 33:85-89.

Mata, I. F., Lockhart, P. J. ve Farrer, M. J., (2004), "Parkin genetics: one model for Parkinson's disease", *Hum. Mol. Genet.*, 13: 127-135.

Mizuno, Y., Hattori, N., Matsumine, H., Mori, H., Shimura, H., Kubo, S., Kobayashi, H., Asakawa, S., Minoshima, S. ve Shimizu, N., (2001), "Familial Parkinson's Disease. Alpha-synuclein and parkin", *Adv. Neurol.*, 86:13-21

Mouradian, M.M., (2002), "Recent advances in the genetics and pathogenesis of Parkinson disease", *Nature*, 58:179-185.

Murray, R. K., Granner, D. K., Mayes, P. A. Ve Rodwell V. W., (1996), *Harpers's Biochemistry*, Appleton and Lange, ABD.

Mycek M. J., Harvey, R. A. ve Champe, P. C., (1997), *Pharmacology*, Lippincott's Illustrated Review, Philadelphia.

Nyholt, D. R., (2000), "All LODs are not created Equal", *Am. J. Hum. Genet.*, 67:282-288.

Pankratz, N., Nichols, W. C., Uniacke, S. K., Halter, C., Rudolph, A., Shults, C., Conneally, P.M., Faroud, T. ve Parkinson Study Group, (2003), "Significant Linkage of Parkinson Disease to Chromosome 2q36-37", *Am. J. Hum. Genet.*, 72:1053-1057.

Passarge, E., (1995), *Color Atlas of Genetics*, New York

- Paviour, D. C., Surtees, R. A. ve Lees, A. J., (2004), "Diagnostic Considerations in Juvenile Parkinsonism", *Mov. Disord.*, 19:123-35.
- Shimura, H., Schlossmacher, M. G., Hattori, N., Frosch, M. P., Trockenbacher, A., Schneider, R., Mizuno, Y., Kosik, K. S. ve Selkoe, D. J., (2001), "Ubiquitination of a New Form of α -Synuclein by Parkin From Human Brain: Implications for Parkinson's Disease", *Science*, 293:263-269.
- Strachan, T. ve Read, A. P., (2000), *Human Molecular Genetics*, Bios, North Yorkshire.
- Takanashi, M., Mochizuki, H., Yokomizo, K., Hattori, N., Mori, H., Yamamura, Y. ve Mizuno, Y., (2001), "Iron Accumulation in the Substantia Nigra of Autosomal Recessive Juvenile Parkinsonism (ARJP)", *Rinsho Shinkeigaku*, 7:311-314.
- Takei, K., Yamamoto, T., Asano, Y., Iwasaki, S. ve Shimazu, K., (1998), "A Case of Autosomal Recessive Juvenile Parkinsonism (AR-JP) with Onset at the Age of 6 Years", *Genomics*, 40:596-9.
- Uğur, S. A., *Locus and Gene Analyses in Five Disorders, Yüksek Lisans Tezi, Boğaziçi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü (Yayımlanmamış)*.
- Valante, E. M., Bentivoglio, A. R., Dixon, P. H., Ferraris, A., Lalongo, T., Frontali, M., Albanese, A. ve Wood, N. W., (2001) "Localization of a Novel Locus for Autosomal Recessive Early-Onset Parkinsonism, PARK6, on Human Chromosome 1p35-p36", *Am. J. Hum. Genet.*, 68:895-900.
- Valente, E. M., Abou-Sleiman, P. M., Caputo, V., Muqit, M. M. K., Harvey, K., Gispert, S., Ali, Z. ve Turco, D. D., Bentivoglio A. G., Healy D. G., Albanese A., Nussbaum N., Gonzalez-Maldonado R., Deller T., Salvi S., Cortelli P., Giks V. P., Latchman D. S., Harvey D. J., Dallapiccola B., Auburger G. Ve Wood N. B., (2004), "Hereditary Early-Onset Parkinson's Disease Caused by Mutations in PINK1", *Science*, 304:1158-1160.
- Van Duijn, C. M., Dekker, C. J., Bonifati, V., Galjaard, R. J., Houwing-Duistermaat, J. J., Sijders, P. J. L. M., Testers, T. ve Heutink, P., (2001), "PARK7, a novel Locus for Autosomal Recessive Early-Onset Parkinsonism, on Chromosome 1p36", *Am. J. Hum. Genet.*, 69:629-634.
- Weissenbach J., Gyapay C., Dib C., Vignal A., Morissette J., Millasseau, P., Vaysseix, G. ve Lathrop, M., (1992), "A Second Generation Linkage Map of the Human Genome", *Nature*, 359:794-801.
- West, A. B. ve Maid, N. T., (2004), "Genetics of Parkin-linked disease", *Hum. Genet.*, 114:327-336.
- White, T. J., Arnheim N. ve Erlich H. A., (1989), "The Polymerase Chain Reaction", *Trends Genet.*, 5:85-189.
- Zou, H., Chen, B., Ma, Q., Li, X., Yang, J., Feng, X., Dong, X. M. Ve Li, Y. J., (2004), "New Polymorphism (IVS3-20 T>C) of the Parkin Gene Associated with the Early-onset Parkinson's Disease in Chinese", *Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi*, 21:219-23.

İNTERNET KAYNAKLARI

[1] <http://resgen.com/>

ÖZGEÇMİŞ

Doğum tarihi	18.11.1979	
Doğum yeri	Batman	
Lise	1992-1996	Özel Samsun Fen Lisesi
Lisans	1996-2000	İstanbul Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü
Yüksek Lisans	2000-2004	Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji. Anabilim Dalı

