T.C.
ESKİŞEHİR OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ GENETİK ANABİLİM DALI

RFC1 GENİ TEKRAR ARTIŞLARININ SPORADİK PARKİNSON İLE İLİŞKİSİNİN İNCELENMESİ

İlayda SÖNMEZ BAKİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN
Dr. Öğr. Üyesi Ebru ERZURUMLUOĞLU GÖKALP

ESKİŞEHİR, 2024

T.C.
ESKİŞEHİR OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ GENETİK ANABİLİM DALI

RFC1 GENİ TEKRAR ARTIŞLARININ SPORADİK PARKİNSON İLE İLİŞKİSİNİN İNCELENMESİ

İlayda SÖNMEZ BAKİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN
Dr. Öğr. Üyesi Ebru ERZURUMLUOĞLU GÖKALP

ESKİŞEHİR, 2024

Bu çalışma Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından TYL-2023-2870 no'lu proje kapsamında desteklenmiştir.

ÖZET

Başlık: *RFC1* Geni Tekrar Artışlarının Sporadik Parkinson ile İlişkisinin İncelenmesi

Amaç: Replikasyon faktörü C alt birimi 1 (*RFC1*) genindeki biallelik AAGGG tekrar dizisi artışlarının $(AAGGG)_{(eksp)}$, serebellar ataksi, nöropati ve vestibüler arefleksi sendromu (CANVAS) ve geç başlangıçlı ataksinin sık görülen bir nedeni olduğu yapılan çalışmalar ile gösterilmiştir. *RFC1* $(AAGGG)_{(eksp)}$ neden olduğu ek kinik etkiler tanımlanmaya devam etmektedir. Parkinson hastalığında (PH) *RFC1* tekrar artışlarının yaygınlığını araştıran sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır. Ülkemize ait herhangi bir veri bulunmamaktadır. Bu doğrultuda çalışmamızda PH'da *RFC1* AAGGG tekrar artışlarının profilinin çıkarılması amaçlanmıştır.

Yöntem: Çalışmada klinik olarak sporadik PH tanısı almış 200 hasta ve 100 kontrol bireyde *RFC1* AAGGG tekrar dizisi artışı açısından araştırılmıştır. AAGGG tekrar dizisi artışı uzun menzilli Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Long-Range PCR) ve Repeat-Primed PCR yöntemleri kullanılarak analiz edilmiştir.

Bulgular: Hasta grubunda bir vakada patojenik AAGGG motifinde homozigot ekspansiyon saptanmıştır (%0,5). Hasta grubunda patojenik AAGGG motifinde heterozigot ekspansiyon taşıyan olgu sıklığı %8,5 olarak belirlenmiştir. Kontrol grubunda ise bu oran %4,08'dir. Hasta ve kontrol grubu arasında patojenik $AAGGG_{(eksp)}$ motifi için istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmemiştir (p=0.193).

Sonuç: Çalışmamız sonucunda biallelik AAGGG tekrar dizisi artışı için elde ettiğimiz frekans değerleri literatür ile uyumludur. Parkinson hastalarında heterozigot taşıyıcıların (%8,5) daha yaygın bulunması bu taşıyıcılığın PH için bir risk faktörü olabileceğini düşündürmektedir. Saptanan kompleks motiflerin belirlenmesi ve elde edilen verilerin doğrulanması için daha geniş hasta serilerinde ileri sekanslama yöntemleriyle yeni çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır. Aynı zamanda *RFC1* geninde saptanmış yeni motiflerinde PH ile ilişkisinin incelenmesi gerekmektedir.

Anahtar Kelimeler: Parkinson hastalığı, *RFC1*, Tekrar sayısı artışları

ABSTRACT

Title: Investigation of *RFC1* Gene Repeat Expansions and Their Association with Sporadic Parkinson's Disease:

Aim: The increase of biallelic AAGGG repeat expansions in the replication factor C subunit 1 (*RFC1*) gene has been demonstrated through studies to be a common cause of cerebellar ataxia, neuropathy, and vestibular areflexia syndrome (CANVAS), as well as late-onset ataxia. The additional clinical effects caused by *RFC1* AAGGG expansions continue to be described. There are a limited number of studies investigating the prevalence of *RFC1* repeat expansions in Parkinson's disease (PD). Furthermore, no data specific to our country is available. Therefore, our study aims to profile the AAGGG repeat expansions in *RFC1* in individuals with PD.

Method: In the study, 200 individuals diagnosed with sporadic PD and 100 control subjects were investigated for *RFC1* AAGGG repeat expansions. The AAGGG repeat expansions were screened using Long-Range Polymerase Chain Reaction (PCR) and Repeat-Primed PCR techniques.

Results: In the patient group, a case of homozygous pathogenic AAGGG expansion was identified (0.5%). The frequency of cases carrying heterozygous pathogenic AAGGG expansions in the patient group was determined to be 8.5%, while in the control group, this rate was 4.08%. No statistically significant difference was observed between the patient and control groups for the pathogenic AAGGGexp motif ($p=0.193$).

Conclusion: The frequency values obtained for biallelic AAGGG expansions in our study are consistent with the literature. The higher prevalence of heterozygous carriers (8.5%) among PD patients suggests that this carrier status may be a risk factor for the disease. To confirm the identified complex motifs and validate the obtained data, further studies should be conducted with larger patient cohorts, and other motifs identified in the *RFC1* gene should also be investigated.

Keywords: *RFC1*, Parkinson's disease, Repeat expansions

İÇİNDEKİLER

KABUL ve ONAY SAYFASI.....

ETİK BEYAN.....

ÖZET……..…….....i

ABSTRACT.....ii

TABLOLAR DİZİNİ v

ŞEKİLLER DİZİNİ vi

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....vii

1. GİRİŞ VE AMAÇ..... 1

2. GENEL BİLGİLER 3

2.1. Parkinson Hastalığı 3

2.1.1. Parkinson hastalığının epidemiyolojisi 4

2.1.2.1. Genetik faktörler 4

2.1.2.1.1. SCNA (α-Synuclein) 4

2.1.2.1.2. Leucine-rich repeat kinase 2 (LRRK2)..... 5

2.1.2.1.3. PARK2 (PARKİN) 5

2.1.2.1.4. Diğer genler 6

2.1.2.2. Genetik risk faktörleri 7

2.1.2.3. Çevresel faktörler..... 8

2.1.3. Parkinson hastalığı patogenezi..... 8

2.1.3.1. Parkinson hastalığı ve mitokondriyal disfonksiyon 9

2.2. Replikasyon Faktörü C Alt Birimi 1 (*RFC1*) 9

2.2.1. Replikasyon faktörü C alt birimi 1 nöropatolojisi..... 11

2.2.2. Replikasyon faktörü C alt birimi 1 ve ilişkili hastalıklar 11

2.2.2.1. CANVAS'ın klinik özellikleri 11

2.2.2.2. İzole serebellar ataksi 13

2.2.2.3. Serebellar ataksi ve bileteral vestibulopati..... 13

2.2.3. *RFC1* patojenik mekanizması 13

3. GEREÇ VE YÖNTEM 16

3.1. Araştırma Grubu..... 16

3.2. Gereçler..... 18

3.2.1. Kullanılan aletler..... 18

3.2.2. Kullanılan sarf malzemeler 18
3.3. Yöntemler 18
3.3.1. Materyal alımı 18
3.3.2. Periferik kandan DNA izolasyonu 19
3.3.3. Elde edilen DNA'ların miktar ölçümü ve depolanması 19
3.3.4. *RFC1* geni tekrar sayısı artışlarının LR-PCR ile gösterilmesi 20
3.3.5. LR- PCR ürünlerinin jel elektroforoziyle gösterilmesi 22
3.3.5.1. Agaroz jelin hazırlanması 22
3.3.6. *RFC1* geni tekrar sayısı artışlarının RP-PCR ile gösterilmesi 23
3.3.6.1. Ürünlerin fragman analizi için cihaza yüklenmesi 27
4. BULGULAR 29
3.2. *RFC1* Geni Pentanükleotit Tekrar Artışlarına Ait Bulgular 29
5. TARTIŞMA 35
6. SONUÇ VE ÖNERİLER 39
7. KAYNAKLAR DİZİNİ 41
8. EKLER DİZİNİ 45
EK-1. Etik Kurul Onayı
EK-2. Benzerlik Raporu
9. ÖZGEÇMİŞ **53**
10. YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI **56**

TABLOLAR DİZİNİ

Tablo 2.1. Parkinson hastalığı ile ilişkili genler……..……6

Tablo 3.1. Bir LR-PCR reaksiyonu için gereken ürün ve miktarları……..18

Tablo 3.2. LR-PCR için gerekli PCR koşulları……..19

Tablo 3.3. *RFC1* geni primer dizileri…….....19

Tablo 3.4. Bir RP-PCR reaksiyonu için gereken ürün ve miktarları……21

Tablo 3.5. RP-PCR için gerekli PCR koşulları……21

Tablo 3.6. *RFC1* AAAAG motifi primer dizileri……22

Tablo 3.7. *RFC1* AAAGG motifi primer dizileri……..……22

Tablo 3.8. *RFC1* AAGGG motifi primer dizileri……23

Tablo 4.1. *RFC1* tekrar motiflerinin hasta ve kontrol olgularında dağılımı……25

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Parkinson hastalığının meydana gelme nedenleri ve parkinson hastalığı ile ilişkili temel genlerin gösterilmesi……...…...…3

Şekil 2.2. Replikasyon Faktörü C Alt Birimi 1 geni ve tekrar genişlemelerinin meydana geldiği intron 2'nin gösterilmesi……...……..10

Şekil 2.3. *RFC1* Geni, patojenik ve bening tekrar motiflerinin gösterimi……11

Şekil 2.4 Serebellar ataksi duyusal nöropati ve vestibüler arefleksi sendromu……...13

Şekil 2.5. *RFC1* geni olası patojenik mekanizmaları……...15

Şekil 2.6. *RFC1* tekrar motiflerinin saptanması için kullanılan moleküler yöntemler ve yöntemlerin avantaj-dezavantajları……...……...…….16

Şekil 3.1 Jel elektroforezi sonuçlarının bant profillerine göre değerlendirilmesi…..23

Şekil 3.2. Fragman analizi sonuçlarının motif profillerine ve tekrar sayılarına göre değerlendirilmesi……...……27

Şekil 4.1. Homozigot AAGGG$_{(eksp)}$ motifinin RP-PCR görüntüsü……..…31

Şekil 4.2. Heterozigot AAGGG(eksp) motifinin RP-PCR görüntüsü……..…32

Şekil 4.3. AAAAG$_{(komp)}$/AAGGG$_{(eksp)}$ motifinin RP-PCR ile görüntüsü…….…...32

Şekil 4.4. AAAAG$_{(n)}$/AAAAG$_{(n)}$ motifinin RP-PCR görüntüsü…….33

Şekil 4.5. AAAAG$_{(n)}$/AGAAG$_{(30)}$ motifinin RP-PCR ve sanger sekans görüntüsü….34

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

PH : Parkinson Hastalığı

SNCA : α-Sinüklein

LRRK2 : Lösin Açısından Zengin Tekrar Kinaz 2

SNP : Tek nükleotit polimorfizmi

UCHL1 : Ubikuitin Karboksi-terminal Hidrolaz L1

PINK1 : PTEN Kaynaklı Kinaz1

DJ-1 : Protein Deglikas1

ROS : Reaktif Oksijen Türleri

MPTP : 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridin

ATP : Adenozin Trifosfat

mtDNA : Mitokondriyal Deoksiriboz Nükleik Asit

ETC : Elektron Taşıma Sistemi

RFC1 : Replikasyon Faktörü C alt birimi1

DNA : Deoksiriboz Nükleik Asit

CANVAS : Serebellar Ataksi, Nöropati, Vestibüler Arefleksi Sendromu

CA : Serebellar Ataksi

MRI : Manyetik Rezonans Görüntüleme

HIT : Heparine ilişkili Trombositopeni

RNA : Ribonükleik Asit

LR-PCR : Long Range Polimeraz Zincir Reaksiyonu

RP-PCR : Repeat-Primed Polimeraz Zincir Reaksiyonu

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Parkinson hastalığı (PH) en sık görülen nörodejeneratif hareket bozukluğudur. Başlıca görülen motor semptomları arasında tremor, rijidite, bradikinezi/akinezi ve postural instabilite görülmektedir. Parkinson hastalığının patolojik özellikleri; substantia nigra pars kompaktadaki dopaminerjik nöronların kaybı ve Lewy cisimcikleri olarak adlandırılan sitoplazmik inklüzyonlarda bulunan yanlış katlanmış alfa-sinükleinlerin birikimleri ile karakterizedir (Klein C. vd., 2012).

Parkinson hastalığının tahmini prevalansı genel popülasyonda %0,3, 60 yaşından büyük kişilerde %1 ve 80 yaşından büyük kişilerde %3 oranındadır. Yaş, hastalık en için en büyük risk faktörü olarak görülmektedir. Pestisitlere maruz kalma ve kırsal yaşama bağlı olarak karşılaşılan çevresel faktörleri de PH'de risk faktörü olarak düşünülmektedir. Aynı zamanda aile öyküsü PH için önemli bir risk faktörüdür. PH vakalarının birinci derece akrabalarında rölatif risk kontrollere kıyasla iki ila üç kat yüksektir. Ailesel PH formları vakaların %5-15'ini oluşturmaktadır (Klein C. vd., 2012). Parkinson olgularının yaklaşık %85'inin sporadik formda görülmesi hastalık için yatkınlık faktörlerinin yoğun bir şekilde araştırılmasına neden olmuştur. Hastalık için genetik risk faktörlerinin belirlenmesine yönelik çalışmalar her geçen gün artmaktadır.

Replikasyon faktörü C alt birimi 1 (*RFC1*) geni, DNA replikasyonu ve onarımında rol oynayan pentamerik DNA polimeraz yardımcı proteini olan replikasyon faktörü C'nin büyük alt birimini kodlamaktadır. *RFC1*'in intron 2'sinde bialelik AAGGG tekrarlarının gözlenmesi serebellar ataksi, nöropati ve vestibüler arefleksi sendromu (CANVAS) ve geç başlangıçlı serebellar ataksinin (SA) bir nedeni olarak tanımlanmıştır (Stoker vd., 2018). *RFC1* genindeki AAGGG tekrarlarının tanımlanmasından bu yana CANVAS ve Lewy cisimcikli demansın özelliklerinin gösterildiği bir hastada, serebellar ataksi, vestibülopati ve levodopaya duyarlı parkinsonizmi olan bir hastada ve CANVAS ve levodopaya yanıt veren parkinsonizmi olan başka bir hastada rapor edilmiştir (Davies vd., 2022).

Replikasyon faktörü C altbirimi1 *(RFC1)* genindeki biallelik AAGGG tekrar dizisi artışlarının $(AAGGG)_{(eksp)}$, serebellar ataksi, nöropati ve vestibüler arefleksi sendromu (CANVAS) ve geç başlangıçlı ataksinin sık görülen bir nedeni olduğu yapılan çalışmalar ile gösterilmiştir (Cortese vd., 2019). Kytövuori ve arkadaşları 2022

yılında 569 Parkinson hastasından 3 hastada *RFC1* geni patojenik tekrar artışının ataksi ve CANVAS'ın karakteristikleri olmaksızın Parkinson ile ilişkisini göstermişlerdir. Ancak bu tekrar sayısı artışlarının PH ile ilişkisini araştıran sınırlı sayıda çalışma olması *RFC1* geninin bu hastalık üzerindeki etkisini tanımlamak için yeterli değildir (Kytövuori vd., 2020).

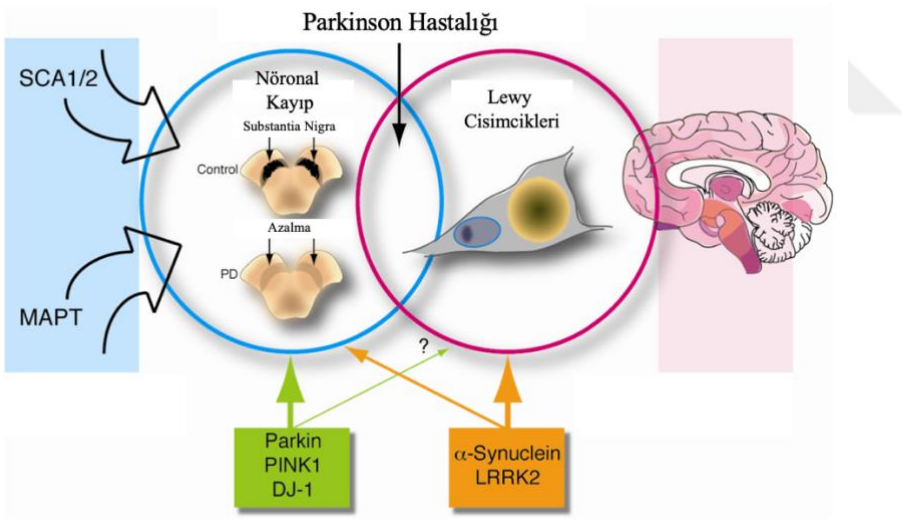
RFC1 $(AAGGG)_{(eksp)}$ neden olduğu ek klinik etkiler tanımlanmaya devam etmektedir. Ülkemize ait *RFC1* $(AAGGG)_{(eksp)}$ frekansının PH üzerindeki etkisini araştıran herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. Bu doğrultuda çalışmamızda PH'da *RFC1* patojenik AAGGG ve patojenik olmayan AAAAG/AAAGG tekrar sayılarının frekansının belirlenmesi ve hastalık üzerine etkisinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Parkinson Hastalığı

Parkinson hastalığı (PH); tremor, rijidite ve bradikinezi ile karakterize edilmiş, bazı hastalarda ise hastalığın ilerlediği durumlarda postüral instabilitenin ortaya çıktığı karmaşık ve kompleks bir nörodejeneratif hastalıktır. PH aynı zamanda birçok motor dışı semptom ile ilişkilidir ve bu semptomlar sıklıkla motor semptomlardan yıllar önce ortaya çıkmaktadır. 1817 yılında ilk kez James Parkinson tarafından tanımlanmış ve Jean-Martin Charcot tarafından yapılan çalışmalarla karakterize edilmiştir (Stoker vd., 2018).

PH patolojik olarak beyin sapı denilen bölgede substansiya nigra hasarı sonucunda dopamin salgılayan hücrelerin dejenerasyonu ya da kaybıyla karakterizedir (LM vd., 2006)(Şekil 2.1). Bu nörodejenerasyon yalnızca nigral dopaminerjik nöronlarla sınırlı olmayıp sinir ağının diğer bölgelerinde yer alan işlevsel hücreleride kapsamaktadır (Stoker vd., 2018).



Şekil 2.1. Parkinson Hastalığının meydana gelme nedenleri ve Parkinson Hastalığı ile ilişkili temel genlerin gösterilmesi.

2.1.1. Parkinson hastalığının epidemiyolojisi

Parkinson hastalığı, Alzheimer hastalığından sonra en sık gözlenen nörodejeneratif hastalıktır. Prevelansı, 65-69 yaş aralığında %0,5 ila 1 arasında iken 80 yaş ve üzeri kişilerde bu oran %1-3'e yükselmektedir (AJ vd., 2009). Yaşlanan nüfus ile birlikte PH'nin görülme sıklığının 2030 yılına kadar yaklaşık %30 oranında artması öngörülmektedir (Stoker vd., 2018).

2.1.2. Parkinson hastalığının etiyolojisi

2.1.2.1. Genetik faktörler

Herediter PH için yapılan genetik çalışmalar, tek gendeki hastalığa sebep olan mutasyonların yeni PH'nın monogenik formlarının tanımlanmasına yol açmıştır. Lewy cisimciklerinin ana bileşeni α-sinükleinlerdeki mutasyonların Nussbaum ve arkadaşları tarafından 1997 yılında karakterize edilmesiyle PH'de genetik faktörler üzerine yapılan çalışmalar hızlanmıştır (Nassbaum vd., 2003). Son yıllarda yapılan çalışmalar ve gelişen genetik testler ile otozomal dominant ve otozomal resesif kalıtım gösteren mutasyonlar ve risk lokusları tanımlanmıştır. Parkinson hastalığına sebep olan en yaygın genetik mutasyonlar *SNCA, LRRK2, VPS-35, PARK2, PINK1, PARK7 ve GBA* genlerinde lokalizedir (Jennet vd., 2003). Bu genlerdeki mutasyonlar tüm PH vakalarının %10'undan azını oluşturmasına rağmen PH etiyolojisindeki temel moleküler belirteçlerin ve süreçlerin tanımlanmasına yol açmışlardır.

2.1.2.1.1. SCNA (α-Synuclein)

PH'nin ilk monogenik nedeni tipik klinik özelliklerle ortaya çıkan fakat erken başlangıçlı otozomal dominant forma sahip bir İtalyan ailede keşfedilmiş ve yapılan çalışmalarla kromozom 4q bölgesi için yapılan gen dizi analizi sonucunda α-sinüklein geninde (*SNCA*) bir amino asit değişimine (p.A53T) neden olan bir varyant (c.209G>A) gösterilmiştir (Polymeropoulos et al., 1997).

α-sinüklein beyinde yüksek oranda eksprese edilmektedir. α-sinüklein'in Lewy cisimciklerinin ana bileşeni olduğu keşfi PH'nın genetik ve patolojik özellerinin arasında bağlantı olduğunu göstermiştir. Yapılan çalışmalar ile α-sinüklein'in anormal agregat oluşturarak nörotoksik birikimlere yol açtığı gösterilmiştir ve anormal agregatların konumuna bağlı olarak vakalarda farklı klinik özellikler ortaya çıkmaktadır (Camargos vd., 2009).

SNCA geni üzerinde meydana gelen mutasyonlar nokta mutasyonu, duplikasyon ve triplikasyon olarak meydana gelmektedir. Bu mutasyonlar doğal yolla katlanmayan ve ikincil yapı göstermeyen α-sinüklein'lerin oluşmasına yol açar. Yanlış anlamlı mutasyonlar α-sinüklein'in heliks yapısını bozarak toksik fonksiyon kazanmasına yol açmaktadır. *SNCA* geninde kopya sayısı artışları ise α-sinüklein'in agregasyonuna ve aşırı ekspresyonuna yol açarak patojenik etki göstermektedir (Stoker et al., 2018).

2.1.2.1.2. Leucine-rich repeat kinase 2 (LRRK2)

LRRK2, ROCO protein ailesinde bulunan 2527 amino asitten oluşan büyük bir proteini kodlar. Beyin dokusunda yüksek seviyede eksprese edilir ve dopaminerjik nöronların endoplazmik retikulum ile ilişkide olduğu beyin sapında lokalizedir. *LRRK2* genindeki mutasyonların kinaz aktivitesinin artışına sebep olarak PH'na yol açtığı bilinmektedir (Kim vd., 2012).

İlk olarak otozomal dominant, eksik penetrans gösteren geç başlangıçlı PH'li bir Japon ailede keşfedilmiştir (Funayama et al., 2002). İki yıl içerisinde gerçekleştirilen çalışmalarla ilgili lokus birkaç Avrupalı ailede de doğrulanmış ve daha ayrıntılı bir şekilde tanımlanmıştır. Günümüzde *LRRK2*'de görülen mutasyonlar herediter PH'nın bilinen en yaygın nedeni olarak kabul edilmektedir (Zimprich vd., 2004).

Bugüne kadar *LRRK2*'de 100'den fazla mutasyon rapor edilmiştir. Bu mutasyonların içerisinde p.G2019S değişimi en yaygın görülen mutasyon tipidir (Healy vd., 2008, Guedes vd., 2010). p.G2019S birçok popülasyonda görülmektedir ve etnik kökene bağlı olarak ailesel PH vakalarının %42 kadarında rapor edilmiştir. Bununla birlikte p.G2019S değişimi sporadik PH vakalarının da %10'unda görülmektedir (Healy vd., 2008).

2.1.2.1.3. PARK2 (PARKİN)

PARK2 geninden 465 aa olan Parkin proteini sentezlenmektedir. Birçok farklı toplumda çok sayıda *PARK2* mutasyonları tanımlanmıştır. *PARK2* geninde saptanan homozigot mutasyonlar erken başlangıçlı PH'nın en sık nedeni olarak gösterilmiştir (JM vd., 2011).

Şu ana kadar yapılan çalışmalarla 887 farklı mutasyon çeşidi tanımlanmıştır. Bu mutasyonların 293'ü nokta mutasyonları, 119'u küçük boyutta delesyonlar ve 475 tanesi ekzonlarda meydana gelen delesyon ya da duplikasyonlar olarak gösterilmiştir.

En sık görülen mutasyon tipi 3. ekzondaki delesyon ve 7. ekzondaki nokta mutasyonudur (Polymeropoulos vd., 1997).

PARK2 de meydana gelen mutasyonlar sonucu görülen Parkinson vakalarında en ayırıcı belirteç Lewy cisimciğinin bulunmamasıdır. Yapılan çalışmalar *PARK2* genindeki mutasyonların nöronları sitotoksik etkilere karşı açık hale getirdiğini göstermektedir (Trinh vd., 2013).

2.1.2.1.4. Diğer genler

PH ile ilişkili diğer genler ve kodladığı proteinlerle birlikte PH üzerindeki etkilerinin özeti Tablo 2.1'de verilmiştir.

Tablo 2.1. Parkinson hastalığı ile ilişkili genler

PARK	**Gen**	**OMIM Referans**	**Tanım**	**Klinik Özellikler**
PARK1	*SNCA*	168601	α-sinüklein	Klasik PH + Demans, E.B PH
PARK4	*SNCA*	168601	α-sinüklein	Klasik PH + Demans, E.B PH
PARK2	*PRKN*	600116	Parkin RBR E3 ubikuitin protein ligaz	E.B PH, yavaş ilerleme, PH+Distoni
PARK5	*UCHL1*	613643	Ubikuitin C-terminal hidrolaz L1	Klasik PH, tek vaka
PARK6	*PINK1*	605909	PTEN'in neden olduğu varsayılan kinaz 1	E.B PH, Yavaş ilerleme
PARK7	*DJ*-1	606324	Parkinsonizmle ilişkili degliaz	E.B PH, Yavaş ilerleme
PARK8	*LRRK2*	607060	Lösin açısından zengin tekrar kinaz 2	E.B PH, Yavaş ilerleme
PARK9	*ATP13A2*	606693	Katyon taşıyan ATPaz 13A2	E.B Demans + Atipik PH
PARK11	*GIGYF2*	607688	GRB10 etkileşimli GYF proteini 2	Klasik PH
PARK13	*HTRA2*	610297	GRB10 etkileşimli GYF proteini 2	Klasik PH
PARK14	*PLA2G6*	612593	Kalsiyumdan bağımsız fosfolipaz A2 enzimi	Distoni Parkinsonizm

Tablo 2.1. Parkinson hastalığı ile ilişkili genler (Devam Ediyor)

PARK15	*FBX07*	260300	F-kutusu proteini 7	Pallido-Piramidal Sendrom
PARK17	*VPS35*	614203	Vakuolar protein sınıflandırmayla ilişkili protein 35	Klasik PH
PARK18	*EIF4G1*	614251	Ökaryotik çeviri başlatma faktörü 4 gama 1	Klasik PH
PARK19	*DNAJC6*	615528	HSP40 Oksilin	E.B PH, Yavaş ilerleme
PARK20	*SYNJ1*	615530	Sinaptojanin 1	Distoni +PH+Bilişsel gerileme
PARK21	*DNAJC13*	616361	Reseptör aracılı endositoz 8	Klasik PH
PARK23	*VPS13C*	616840	Vakuolar protein sınıflandırmayla ilişkili protein 13C	E.B PH, Hızlı ilerleme

2.1.2.2. Genetik risk faktörleri

GBA (β-Glukoserebrozidaz) geni glukolipid metabolizmasında önemli görevi olan lizozomal bir enzim olan glukoserebrozidazı kodlamaktadır. Yapılan çalışmalar *GBA* geninde yaklaşık 300 patojenik mutasyon meydan geldiğini göstermektedir. *GBA* geninde meydana gelen mutasyonların PH'na yakalanma riskini 5 kat arttırdığı bilinmektedir. *GBA* geninde meydana gelen mutasyonların iki mekanizma ile PH'na yakalanma riskini arttırdığı düşünülmektedir. İlki, *GBA* genindeki mutasyon ile birlikte meydana gelen fonksiyon kaybının otofajik yolağı bozarak α-sinükleinin yetersiz yıkımı ve agregasyonuna neden olması şeklindedir. İkinci mekanizmada ise; α-sinükleinin glukozilseramid içeren glikosfingolipidlere bağlandığı bilinmektedir. *GBA* geninde meydana gelen mutasyonlar glukozilseramid birikimine yol açmakta ve bu sebeple α-sinükleinin agregasyonunu arttırmaktadır (Stoker vd., 2018).

2.1.2.3. Çevresel faktörler

PH'da genetik faktörlerle birlikte çevresel faktörler de büyük önem taşımaktadır. Yapılan çalışmalarda Parkinson hastalarının %90'ının sporadik olduğu ve bu durumda hastalığın alt yapısının yalnızca genetik ile açıklanamayacağı görülmüştür (SM vd., 2014). Bu bilgiler ışığında araştırmacılar Parkinson hastalarında genetik ve çevresel faktörlerin etkileşimi üzerine çalışmaya yönelmişlerdir.

Çevresel faktörlerin PH'na etkisinin araştırıldığı çalışmalar ile ilk olarak tarım ilaçlarının özellikle parakuat ve maneb'in genç başlangıçlı PH riskini arttırdığı görülmüştür. Yapılan bir çalışmada tarım ilaçlarına maruz kalmanın *SNCA* geninde meydana gelen mutasyonları tetiklediği ve hastalığın başlangıç yaşını etkilediği gösterilmiştir (NM vd., 2010).

PH riskini arttıran bir diğer çevresel faktör ise demir ve kurşun gibi ağır metallerdir. Bu ağır metallerin substantia nigra'da birikim göstererek oksidatif strese yol açtığı ve bununla birlikte PH'ye yatkınlık oluşturduğu bilinmektedir (Gatto vd., 2010).

Bu faktörler dışında sigara, alkol ve kahve gibi maddelerin PH'nı %30'a kadar önleme etkisi olduğu yapılan çalışmalarla gösterilmiştir. Ailesinde PH geçmişi olan ve PH belirtisi taşıyan ikizler üzerinde yapılan bir çalışmada daha fazla tütün ürünü tüketen ikiz kardeşte diğer kardeşe göre PH'nın görülme oranının düştüğü gösterilmiştir (CM vd., 2002).

2.1.3. Parkinson hastalığı patogenezi

PH'nın birkaç patofizyolojik özelliği bulunmaktadır. Bu patofizyolojik özelliklerden en önemlisi substantia nigra'da Lewy cisimciklerinin oluşumudur. Yanlış katlanmış alfa-sinüklein oligomerlerinin sebep olduğu Lewy cisimcikleri ciddi nöron kaybına sebep olmakta ve dopaminerjik hücre kaybıyla karakterize olan PH'nı meydana getirmektedir. Dopamin üretiminin bozulmasına yol açan faktörler arasında Lewy cisimciklerinin birikimi sonucunda oksidatif stres, aksonal ve sinaptik fonksiyon bozukluğu ve ubikuitin-proteazom sistemi bozulması gibi mekanizmalar rol oynamaktadır (Benito vd., 2020).

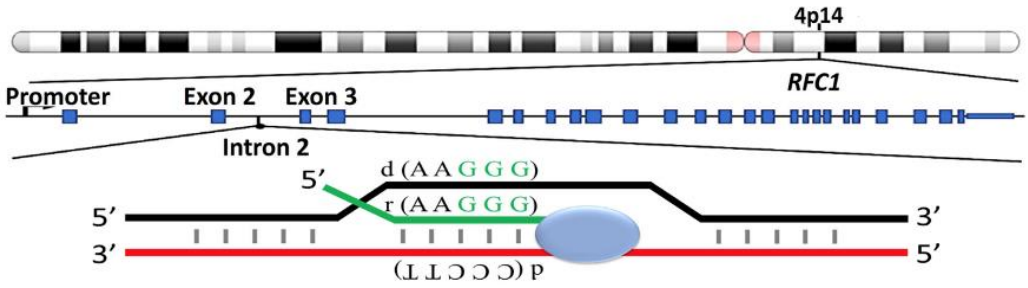
2.1.3.1. Parkinson hastalığı ve mitokondriyal disfonksiyon

Parkinson ve mitokondriyal disfonksiyon arasındaki ilişki ilk olarak 1983 yılında uyuşturucu maruziyeti olan hastalarda PH semptomları gösteren MPTP keşfiyle kurulmuş ve yapılan çalışmalar sonucu MPTP (1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridin) nörotoksisitesi primat modellerinde kanıtlanmıştır (Bender vd., 2006).

Mitokondriyal disfonksiyonun nedenleri aşırı ROS üretimi, ATP tükenmesi, mtDNA delesyonu ve ETC (Elektron Taşıma Sistemi) gibi bozulmalar olarak gösterilmiştir. Mitokondriyal disfonksiyonun oksidatif strese yol açarak hücre içi moleküllerin zarar görmesine ve hücre ölümüne neden olan hücresel yolaklara etki etmektedir (Stockum vd., 2016).

2.2. Replikasyon Faktörü C Alt Birimi 1 (*RFC1*)

Replikasyon Faktörü C Alt Birimi 1 (*RFC1*) geni, DNA onarımı ve DNA replikasyonunda rol oynayan pentamerik DNA polimeraz yardımcı proteini olan replikasyon faktörü C'nin büyük alt birimini kodlamaktadır. Yakın zamanda yapılan çalışmalar *RFC1* genin intron 2'sindeki biallelik AAGGG tekrar dizisi artışının serebellar ataksi, nöropati ve vestibüler arefleksi sendromuyla (CANVAS) ilişkisi olduğunu göstermiştir (Cortese vd., 2019)(Şekil 2.2.).

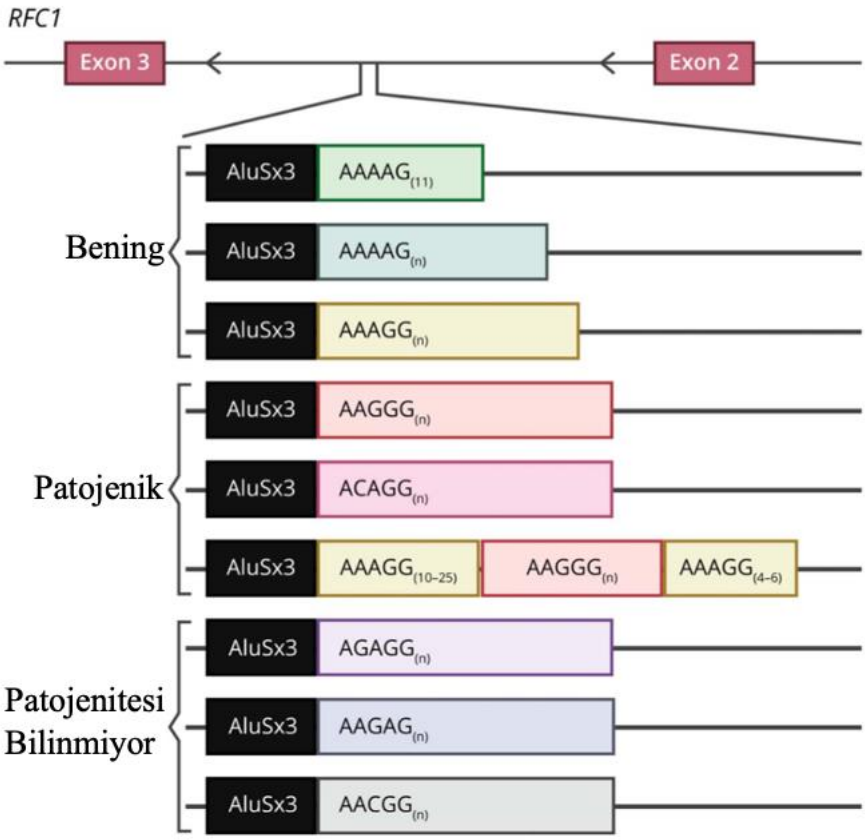


Şekil 2.2. Replikasyon Faktörü C Alt Birimi 1 geni ve tekrar genişlemelerinin meydana geldiği intron 2'nin gösterilmesi.

RFC1 tekrar lokusu oldukça polimorfiktir ve hem motif hem de tekrar boyutu açısından değişkenliğe sahiptir. Etkilenmemiş kontrol popülasyonlarıyla yapılan ilk çalışmada 4 farklı tekrar motifi tanımlanmıştır. Bu motifler referans $AAAAG_{(11)}$, $AAAAG_{(n)}$ ve $AAAGG_{(n)}$'nin patojenik olmayan tekrar genişlemeleri ve $AAGGG_{(n)}$'nin patojenik tekrar genişlemeleri olarak sınıflandırılmıştır. Etkilenmemiş bireylerdeki

allellerin yaklaşık %20'sini patojenik olmayan tekrar genişlemeleri oluşturmaktadır. Bu genişletilmiş motifler $AAAGG_{(n)}$ motifi için 40-1.000, $AAAAG_{(n)}$ motifi için 15-200 tekrar arasındadır (Cortese vd., 2019).

Bu motifler dışında son yıllarda $AAGAG_{(n)}$, $AGAGG_{(n)}$ ve $AACGG_{(n)}$ olmak üzere 3 motif daha tanımlanmıştır. Yapılan çalışmalar ile bu tekrar genişlemelerinin konformasyonları için homozigot bir bildiri yapılmadığından dolayı motiflerin potansiyel patojeniteleri bilinmemektedir (Akçimen vd., 2019)(Şekil 2.3.).



Şekil 2.3. *RFC1* Geni, patojenik ve bening tekrar motiflerinin gösterimi.

2.2.1. Replikasyon faktörü C alt birimi 1 nöropatolojisi

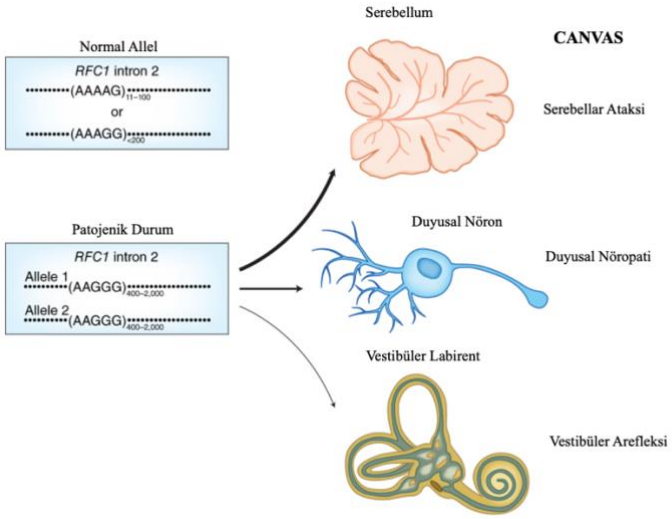
RFC1 tekrar genişlemelerinin patojenik mekanizması tam olarak aydınlatılmamıştır. Mevcut bilgiler klinik olarak CANVAS tanısı almış ve bialelik AAGGG tekrarları olan 5 kişi üzerinden yapılan post-mortem çalışmalar ile elde edilmiştir (Reyes-Leiva vd., 2022). Bu kişilerin beyin dokuları üzerinde yapılan histopatolojik çalışmalar en şiddetlisi vermiste olmak üzere serebellar purkinje hücrelerinde belirgin kayıplar olduğunu göstermiştir. CANVAS'a ek olarak parkinsonizm fenotipine sahip olan 2 hastada substantia nigra ve lokus seruleusta belirgin şekilde nöronal azalma olduğu gözlemlenmiştir (Huin V. vd., 2021). CANVAS ve kronik idiyopatik aksonal polinöropatisi olan ve *RFC1* tekrar artışı olan hastalardan alınan sinir biyopsileri üzerinde yapılan çalışmalar ile aksonal rejenerasyon olmadan miyelin liflerin tükendiği gösterilmiştir (Tagliapietra M. vd., 2021).

2.2.2. Replikasyon faktörü C alt birimi 1 ve ilişkili hastalıklar

RFC1'deki tekrar genişlemelerinin keşfedilmesiyle birlikte CANVAS dışındaki diğer fenotiplerin potansiyel spektrumunun tanımlanmasına büyük ilgi çekmiştir. Bu süreçte gelişen bir hastalığın keşif sürecinde CANVAS'ı tanımlamak için kullanılan yöntemlerin uygulanması ve hastalığın ayırt edici özelliklerinin belirlenmesi yeni hastalık sınıflandırılmasında önemini korumaktadır (Davies vd., 2022).

2.2.2.1. CANVAS'ın klinik özellikleri

CANVAS ilk olarak 2011 yılında, fenotipleme çalışmalarıyla SA (Serebellar Ataksi) ile bilateral vestibulopati kombinasyonu gösteren olguların bir özelliği olarak somatosensoriyel anormallik tanımlamasının ardından klinik bir vaka şeklinde tanımlanmıştır. Klinik olarak CANVAS, serebellar bozukluk, iki taraflı vestibüler hipofonksiyon ve somatosensoriyel kayıp ile karakterize edilmektedir (Şekil 2.4.). CANVAS'ın klinik tanısı, etkilenen bireylerin dikkatli fenotiplendirilmesinden sonra geliştirilen ayrıntılı okülomotor, elektrofizyolojik ve görüntüleme kriterleri kullanılarak yapılmaktadır (Szmulewicz vd., 2011).



Şekil 2.4 Serebellar Ataksi Duyusal Nöropati ve Vestibüler Arefleksi Sendromu.

CANVAS'lı bireyler anterior ve dorsal vermisi ve lateral ağırlıklı olarak crus 1 bölgesini içeren serebellar atrofi modeline sahiptirler. Bu model MRG'de görüntülenebilir ve patolojik örnekler üzerinde yapılan çalışmalar ile doğrulanmıştır (Szmulewicz vd., 2014). Etkilenmiş bireyler sakkadik görsel takip, bakışla uyarılan göz titremesi, serebellar dizartri ve ekstremite ataksisi dahil olmak üzere bir takım serebellar anormallikler göstermektedirler (Szmulewicz vd., 2014, 2011).

CANVAS'taki iki taraflı vestibüler arefleksi, vestibüler ganglion hücre sayılarında azalma gösteren ve mikroskobik olarak belirginlik gösteren vestibüler nöropatiden ortaya çıkmaktadır. Bu durum klinikte, HIT'te azalmış vestibülo-oküler refleks kazanımı olarak belirgin bir şekilde görülmektedir (Szmulewicz vd., 2011).

CANVAS'taki somatosensoriyel bozukluk, duyusal bir nöropati olarak ortaya çıkmaktadır (CM vd., 1997). Nöropatoloji dorsal kök ganglionlarda belirgin bir nöron kaybı ortaya çıkarır ve klinikte propriyosepsiyon ve duyu algısının zayıflaması olarak kendi göstermekte ve ayrıntılı elektrofizyolojik çalışmalar ile tanımlanmaktadır. Bu çalışmalar ile duyusal tutulumun varlığının belirlenmesi nöronopatiden ayrılmasını sağlamaktadır (Szmulewicz DJ vd., 2015).

Tüm bu bulgulara ek olarak CANVAS'tan etkilenmiş bireylerin fenotipinde değişken otonomik disfonksiyon ve kronik öksürük görülebilmektedir (Wu vd., 2014).

2.2.2.2. İzole serebellar ataksi

Saf serebellar ataksi diğer nörolojik sistemleri içermeyen, serebellar kökenli bir ataksi tipidir. Bugüne kadar yapılan çalışmalar ile ataksisi olan bireylerden oluşturulan kohortlarda *RFC1*'in patolojik tekrarlarının izole serebellar ataksinin nadir bir nedeni olduğu gösterilmiştir (Montaut vd., 2021).

2.2.2.3. Serebellar ataksi ve bileteral vestibulopati

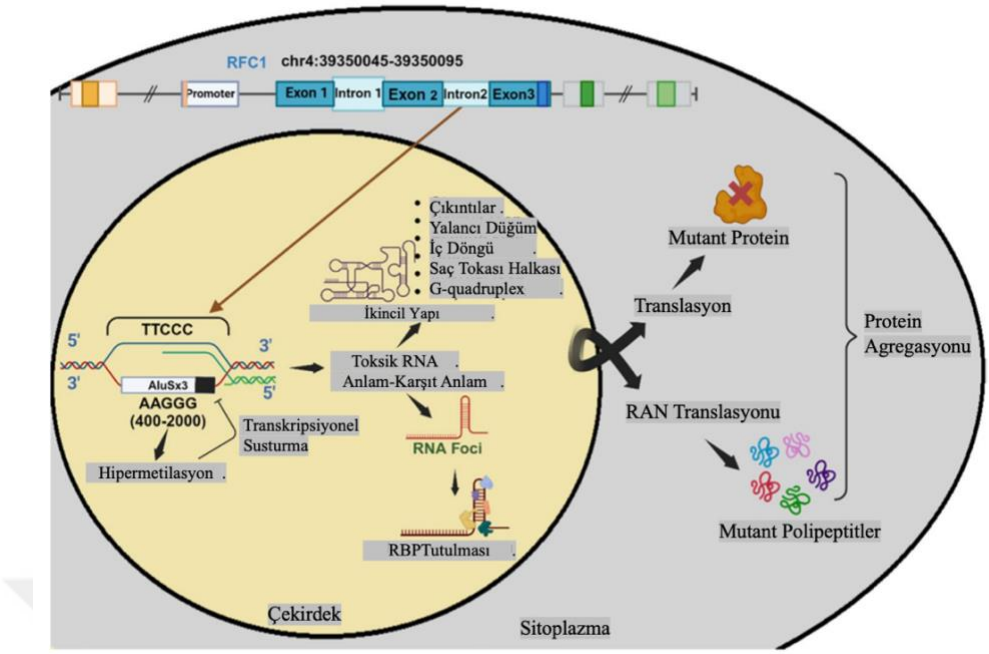
Serebellar ve iki taraflı periferik vestibüler bozukluğun kombinasyonu CANVAS'ın klinik tanımının temelini oluşturmuştur. Fakat *RFC1* ilişkisi hastalık için değişmez bir özellik olarak değerlendirilmemektedir (Baloh vd. 1997). Bu hastalığın fenotipini belirlemek zordur çünkü yapılan retrospektif çalışmalarda vestibüler fonksiyon ile ilgili veriler eksiktir ve periferik vestibüler hipofonksiyon varlığı yeterince farkedilmemektedir (Aboud Syriani vd., 2020).

Gisatulin ve ark. yaptığı bir çalışmada kohortun objektif vestibüler değerlendirmeye dahil edildiği fenotipik kombinasyonun gösterildiği tek çalışmadır

(Gisatulin vd., 2020).

2.2.3. *RFC1* patojenik mekanizması

Bialelik *RFC1* genişlemelerinin mekanizması halen bilinmemektedir. Fonksiyon kaybı/kazanımı, RNA bağlayıcı proteinin sekestrasyonu ve tekrarla ilişkili AUG olmayan (RAN) translasyon dahil olmak üzere bilinen birçok tekrar genişleme patogenez mekanizması üzerinde durulmaktadır (Malik vd., 2021)(Şekil 2.5).



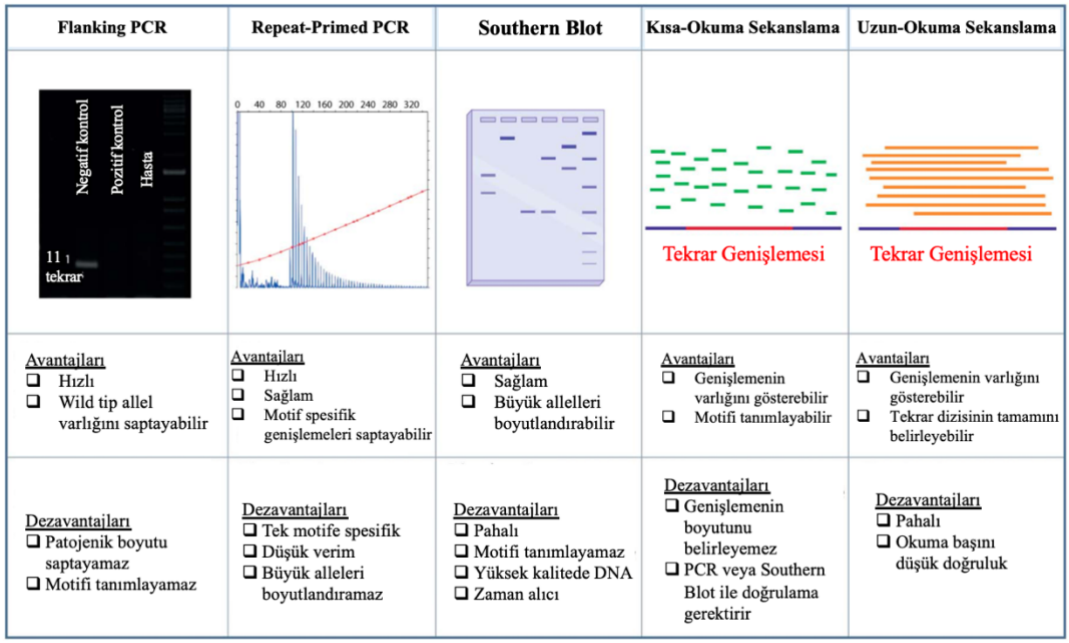
Şekil 2.5. *RFC1* geni olası patojenik mekanizmaları.

RAN translasyonu 10'den fazla tekrar genişleme bozukluğu ile ilişkilendirilmiş fakat bugüne kadar yapılan çalışmalarda *RFC1* tekrar dizisi artışlarıyla ilişkili bir kanıt bulunamamıştır (Cortese vd., 2019). *C9orf72* intronik tekrar genişlemesi ile ilişkili frontotemporal demansta intron tutulması, RAN proteinleri aracılı RNA birikimi gibi sonuçlar aşağı yakış yollarını etkilemektedir (Sznajder vd., 2018). Bugüne kadar yapılan çalışmalarda biallelik *RFC1* tekrar dizisi artışı olan kişilerde herhangi bir intron tutulması gözlemlenmemiştir.

Yapılan iki farklı çalışma ile anormal pre-mRNA işlenmesinin *RFC1* genişlemelerinin patojenik mekanizmalarında etkisi olabileceği düşünülmektedir fakat elde edilen sonuçlar henüz literatür için yeterli değildir (n=2 ve n=7) (Davies vd., 2022).

RFC1 tekrar lokusu, popülasyon içerisinde hem tekrar motifi hem tekrar boyutu açısından oldukça polimorfiktir. Tekrar boyutları patojenik olmayan $AAAAG_{(n)}$ için 15-200 ve $AAAGG_{(n)}$ için 40-1000 arasında olduğu bilinmektedir (Davies vd., 2022). $AAGGG_{(n)}$ dizisinin 400 tekrarı aşan genişlemelerinin patojenik olduğu bilinmektedir (Cortese vd., 2019).

RFC1 tekrar sayısı artışlarının saptanması için kullanılan birçok yöntem mevcuttur. Bu moleküler yöntemler arasında Flanking PCR, Repeat Primed PCR, Southern Blot, Kısa Okuma Sekanslama ve Uzun Okuma Sekanslama sayılmaktadır (Cortese ve ark. 2019) (Şekil 2.6).



Şekil 2.6. *RFC1* tekrar motiflerinin saptanması için kullanılan moleküler yöntemler ve yöntemlerin avantaj-dezavantajları.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Parkinson hastalarında *RFC1* Geni tekrar artış profillerinin değerlendirildiği çalışmamız, Tıp Fakültesi Nöroloji Anabilim Dalı işbirliğinde gerçekleştirilmiştir. Çalışmamız ESOGÜ BAP TYL-2023-2870 no'lu proje kodu ile desteklenmiştir. Çalışma Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı Moleküler Seksiyonunda gerçekleştirilmiştir. Çalışmamız için Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Uygulamalar Etik Kurulu'ndan 25.05.2023 tarih ve 32 sayılı onay alınmıştır.

3.1. Araştırma Grubu

Çalışma, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Nöroloji Polikliniğine başvuran ve CANVAS ya da ataksi kliniği göstermeyen 200 sporadik PH tanısı almış vaka ve nörodejeneratif ya da psikiyatrik hastalığı olmayan 100 kontrol olgusu ile gerçekleştirilmiştir.

Çalışma kapsamında hasta ve kontrol gruplarının dahil edilme/edilmeme kriterleri aşağıda listelenmiştir:

Hastalar için dahil olma kriterleri:

1. 18-75 yaş arasında olmak

2. Birleşik Krallik Parkinson Hastalığı Topluluğu Beyin Bankası Klinik Tanı Kriterlerine uygun olarak PH tanısı almış olmak

3. Tekrarlayan kafa travması, ensefalit öyküsü, tekrarlayan inme, mental retardasyon, basamaklı parkinsonyan bulgu ilerlemesi, okulojirik krizler, bakış parezisi varlığı gibi parkinsonizme yol açabilecek diğer durumların öyküde olmaması

4. Dökümante edilmiş, hastanın bulguları ile uyumlu, parkinsonizm yapan başka alternatif durum olmaması veya uzman doktor tarafından yapılan muayenede PH'ndan daha başka bir hastalık olduğunu düşündüren bulguların olmaması

5. Çalışmanın aydınlatılmış onam formunu okuyup çalışmaya dahil olmayı kabul etmesi

Hastalar için dışlama kriterleri:

1. 18 yaşından küçük, 75 yaşından büyük olmak

2. Tekrarlayan kafa travması, ensefalit öyküsü, tekrarlayan inme, beyinde yer kaplayan lezyon, basamaklı parkinsonyan bulgu ilerlemesi varlığı gibi parkinsonizme yol açabilecek diğer durumların öyküde olması

3. Dökümante edilmiş, hastanın bulguları ile uyumlu, parkinsonizm yapan başka alternatif durum olması veya uzman doktor tarafından yapılan muayenede PH'ndan daha başka bir hastalık olduğunu düşündüren bulguların olması

4. Psikiyatrik hastalık öyküsü olması

Kontrol grubu için dahil olma kriterleri:

1. 18-75 yaş arasında olmak

2. Birleşik Krallik Parkinson Hastalığı Topluluğu Beyin Bankası Klinik Tanı Kriterlerine uygun olarak Parkinson hastalığı tanısı ya da parkinsonizm düşündürecek klinik ve öykünün olmaması

3. Tekrarlayan kafa travması, ensefalit öyküsü, tekrarlayan inme, basamaklı parkinsoniyen bulgu ilerlemesi varlığı gibi Parkinsonizme yol açabilecek diğer durumların öyküde olmaması

4. Dökümante edilmiş, parkinsonizm yapan başka alternatif durum veya uzman doktor tarafından yapılan muayenede herhangi bir nörolojik hastalık olduğunu düşündüren bulguların olmaması

5. Ailede Amytrofik lateral skleroz ya da Frontotemporal demans tanı öyküsü olmaması

6. Çalışmanın aydınlatılmış onam formunu okuyup imzalaması

Kontrol grubu için dışlama kriterleri:

1. 18 yaşından küçük, 75 yaşından büyük olmak

2. Tekrarlayan kafa travması, ensefalit öyküsü, tekrarlayan inme, beyinde yer kaplayan lezyon, basamaklı parkinsoniyen bulgu ilerlemesi varlığı gibi parkinsonizme yol açabilecek diğer durumların öyküde olması

3. Dökümante edilmiş, hastanın bulguları ile uyumlu, parkinsonizm yapan başka alternatif durum olması veya uzman doktor tarafından yapılan muayenede herhangi bir nörolojik hastalık olduğunu düşündüren bulguların olması

3.2. Gereçler

3.2.1. Kullanılan aletler

- -20°C buzdolabı (Arçelik)
- -80°C buzdolabı (Panosonic MDF-U5386S-PE, Ultra- Low Tempature Freezer, Panosonic Healthcare Co, Ltd)
- +4°C buzdolabı (Arçelik)
- Mikrodalga (Arçelik)
- Vorteks (Heidolph Reax Control)
- Thermobrite (Leica)
- Mikrosantrifüj (Iso Lab)
- Spektrofotometre (ATCGene ASP-3700)
- Applied Biosystems 3500 Genetik Analyzer

3.2.2. Kullanılan sarf malzemeler

- Spin kolonu filtreler ve toplama tüpleri (2ml)
- Eppendorf tüp 1,5 ml
- Steril mikropipet uçları (10-100-200-1000 µl)
- Vascusera EDTA'li tüpü 9 ml (Disera)
- BioLabs Q5 PCR Kit
- DNA izolasyon kiti (Qiagen)

3.3. Yöntemler

3.3.1. Materyal alımı

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Nöroloji Polikliniğine başvuran ve sporadik PH tanısı alan 200 vaka ve nörolojik/psikiyatrik bulgusu bulunmayan 100 kontrol olgu çalışmaya dahil edilmiştir. Bütün araştırma ve kontrol grubu bireyleri ile görüşülmüş, çalışmanın amaç ve aşamaları anlatılarak kabul edenlerden onay formu alınmıştır.

3.3.2. Periferik kandan DNA izolasyonu

Hasta ve kontrol gruplarına dahil edilmiş bireylerden EDTA'lı tüpe alınmış 5 ml periferik kan örneklerinin DNA İzolasyonları 'Qiagen, DNeasy Blood & Tissue Kit' DNA İzolasyon kiti ile gerçekleştirilmiştir. DNA İzolasyon basamakları aşağıdaki şekilde gerçekleştirilmiştir:

1. 2 ml'lik santrifüj tüplerine 20 µl Proteinaz K eklenmiştir.
2. Santrifüj tüplerinin üzerine 250 µl vorteklenmiş periferik kan örnekleri eklenmiştir.
3. Proteinaz K ile vortekslenmiş periferik kan örneklerinin üzerine 300 µl Extraction Buffer eklenmiştir.
4. 20 saniye vorteks yapılmıştır.
5. 59 °C'de ısı bloğunda 15 dakika inkübasyon gerçekleştirilmiştir.
6. İnkübasyon sonrasında 300 µl Binding Buffer eklenmiştir.
7. 25 saniye vorteks yapılmıştır.
8. Örnekler spin kolona aktarılmıştır.
9. Örnekler 12.000 rpm'de 2 dakika süre ile santrifüjlenmiştir.
10. Spin kolon üzerine 500 µl Wash Buffer-1 eklenmiş, 12.000 rpm'de 2 dakika süre ile santrifüjlenmiştir.
11. Spin kolon üzerine 500 µl Wash Buffer-2 eklenmiş, 12.000 rpm'de 2 dakika süre ile santrifüjlenmiştir.
12. Spin kolonlar örneklerin aktarılacağı santrifüj tüpüne yerleştirilmiş ve kolon üzerine 50 µl Elution Buffer eklenerek 5 dakika oda sıcaklığında inkübasyon gerçekleştirilmiştir.
13. 12.000 rpm'de 2 dakika süre ile santrifüjlenmiştir.

3.3.3. Elde edilen DNA'ların miktar ölçümü ve depolanması

Periferik kandan izole edilmiş DNA'ların konsantrasyon ve saflık ölçülerinin belirlenmesi spektrofotometre (ATCGeneASP-3700) cihazı ile gerçekleştirilmiştir. DNA konsantrasyonu 100 ng/µl ve üzeri olan hastalar çalışmaya dahil edilmiştir. Çalışmaya dahil edilen DNA örneklerinin uygun koşullarda saklanması -20°C olan buzdolapları ile sağlanmıştır.

3.3.4. *RFC1* geni tekrar sayısı artışlarının LR-PCR ile gösterilmesi

Çalışmamız için kullanılan primer ve PCR termal profilleri Cortese ve arkadaşlarının kullandıkları yöntemler baz alınarak optimize edilmiştir (Cortese vd., 2022).

- Çalışma öncesi nanodrop ile ölçümü yapılarak çalışma koşulları için uygun bulunmuş ve -20°C ‘de depolanan DNA örnekleri oda sıcaklığına getirilmiştir.
- DNA örnekleri jel elektroforezi öncesinde PCR miksi oluşturularak optimize edilmiş PCR koşulları ile muamele edilmiştir. PCR miksi, PCR koşulları ve primer dizileri sırasıyla Tablo 3.1, 3.2 ve 3.3 de gösterilmiştir.

Tablo 3.1. Bir LR-PCR reaksiyonu için gereken ürün ve miktarları

Ürün Adı	Bir LR-PCR reaksiyonu için gerekli olan miktar (µl)
5X Reaksiyon Buffer	5 µl
10 mM dNTP Miks	0.5 µl
10 µM Forward Primer	1.25 µl
10 µM Reverse Primer	1.25 µl
Betain	2 µl
DNA Polimeraz (0.02U/µl)	0.25 µl
Örnek DNA’sı (100-200 ng/µl)	2 µl
Distile Su	12.75 µl
Toplam	25 µl

Tablo 3.2. LR-PCR için gerekli PCR koşulları

Sıcaklık (°C)	Süre (Dakika/Saniye)	Döngü Tekrarı
95 °C	3 dk	1x
95 °C 65 °C 72 °C	10 sn 15 sn 3 dk	18x
95 °C 57 °C 72 °C	10 sn 15 sn 3 dk	18x
72 °C	5 dk	1x
4 °C	∞	1x

Tablo 3.3. *RFC1* geni primer dizileri

Primer Yönü	Primer Dizisi
Forward Primer	TCAAGTGATACTCCAGCTACACCGTTGC
Reverse Primer	GTGGGAGACAGGCCAATCACTTCAG

3.3.5. LR- PCR ürünlerinin jel elektroforoziyle gösterilmesi

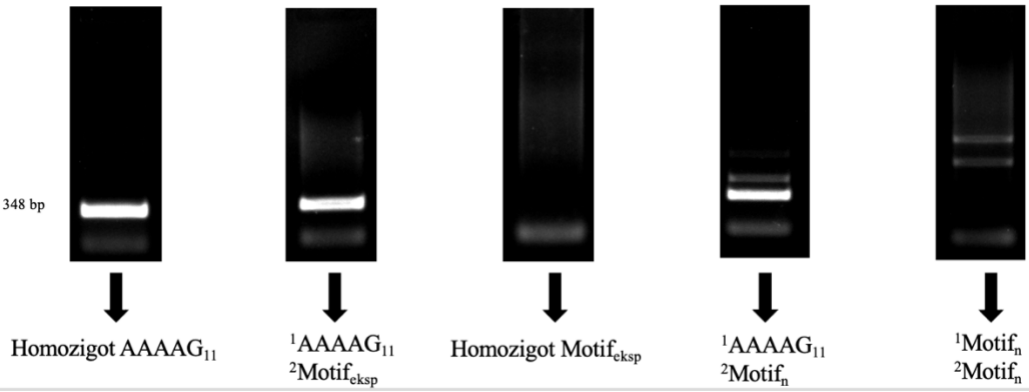
LR-PCR sonrasında elde edilen PCR ürünleri %1'lik agaroz jel hazırlanarak agaroz jel elektroforezi yöntemi kullanılarak incelenmiştir.

3.3.5.1. Agaroz jelin hazırlanması

%1'lik agaroz jel için 0.45 g Agaroz 45 ml TAE (TrisAsetik asit-EDTA) içerisinde mikrodalga fırın kullanılarak çözdürülmüştür. Çözeltiye 1 µl Etidyüm-Bromür eklenmiştir.

3.3.5.2. Jelin yüklenmesi ve örneğin görüntülenmesi

Agaroz jel taraklar yerleştirilerek hazırlanmış olan jel küvetine dökülmüş ve donması beklenmiştir. Jel donduktan sonra küvet tanka yerleştirilmiş ve tank 1XTAE Buffer ile doldurulmuştur. 5 µl PCR ürünü 1 µl yükleme boyası ile karıştırılmış ve kuyucuklara yüklenmiştir. Yükleme işlemi sonrasında PCR ürünleri 120 voltta 20 dakika yürütülmüştür. Yürütme işlemi tamamlandıktan sonra jel görüntüleme sistemi ile değerlendirilmiştir. Jel elektroforezi sonuçlarının değerlendirilme ve sınıflandırılma profilleri Şekil 3.1'de gösterilmiştir.



Şekil 3.1. Jel elektroforezi sonuçlarının bant profillerine göre değerlendirilmesi.

3.3.6. *RFC1* geni tekrar sayısı artışlarının RP-PCR ile gösterilmesi

Çalışmamızın RP-PCR aşamasında kullanılan primer ve PCR termal profilleri Cortese ve arkadaşları baz alınarak optimize edilmiştir (Cortese ve ark. 2022). Çalışmamızda *RFC1* geni pentanükleotit tekrar sayılarını değerlendirmek amacıyla 3 motif incelenmiştir; AAAAG, AAAGG, AAGGG. Bu tekrar sayıları yine Cortese ve arkadaşları tarafından önerilen şekilde AAAAG ve AAAGG motifleri polimorfik tekrar, AAGGG motifi tekrar sayısı artışı ise patojenik olarak sınıflandırılmıştır.

- Çalışma öncesi nanodrop ile ölçümü yapılarak çalışma koşulları için uygun bulunmuş ve -20°C ‘de depolanan DNA örnekleri oda sıcaklığına getirilmiştir.
- DNA örnekleri fragman cihazına yüklenmesi öncesinde PCR miksi oluşturularak optimize edilmiş PCR koşulları ile muamele edilmiştir. PCR miksi, PCR koşulları ve kullanılan primer dizileri sırasıyla Tablo 3.4, 3.5, 3.6, 3.7 ve 3.8’de gösterilmiştir.

Tablo 3.4. Bir RP-PCR reaksiyonu için gereken ürün ve miktarları

Ürün Adı	Bir LR-PCR reaksiyonu için gerekli olan miktar (µl)
5X Reaksiyon Buffer	5 µl
10 mM dNTP Miks	0.5 µl
10 µM Forward Primer	1.25 µl
10 µM Anchor Primer	1.25 µl
10 µM Reverse Primer-1	0.12 µl
10 µM Reverse Primer-2	0.12 µl
10 µM Reverse Primer-3	0.12 µl
Betain	1 µl

Tablo 3.4. Bir RP-PCR reaksiyonu için gereken ürün ve miktarları (Devam Ediyor)

DNA Polimeraz (0.02U/µl)	0.25 µl
Örnek DNA'sı (100-200 ng/µl)	2 µl
Distile Su	13.4 µl
Toplam	25 µl

Tablo 3.5. RP-PCR için gerekli PCR koşulları

Sıcaklık (°C)	Süre (Dakika/Saniye)	Döngü Tekrarı
98 °C	3 dk	1x
98 °C 65 °C 72 °C	10 sn 15 sn 1 dk	35x
72 °C	5 dk	1x
4 °C	∞	1x

Tablo 3.6 *RFC1* AAAAG motifi primer dizileri

Motif	Primer Yönü	Primer Dizisi
	Forward Primer	FAM-TCAAGTGATACTCCAGCTACACCGT
	Anchor Primer	CAGGAAACAGCTATGACC

Tablo 3.7. *RFC1* AAAGG motifi primer dizileri

Motif	Primer Yönü	Primer Dizisi
	Forward Primer	FAM-TCAAGTGATACTCCAGCTACACCGT
	Anchor Primer	CAGGAAACAGCTATGACC
AAAGG	Reverse Primer1	CAGGAAACAGCTATGACCAACAGAGCAAGACTCTGT TTCAAAAAAGGAAAGGAAAGGAAAGGAAA
	Reverse Primer2	CAGGAAACAGCTATGACCAACAGAGCAAGACTCTGT TTCAAAAAGGAAAGGAAAGGAAAGGAAA
	Reverse Primer3	CAGGAAACAGCTATGACCAACAGAGCAAGACTCTGT TTCAAAAGGAAAGGAAAGGAAAGGAAA

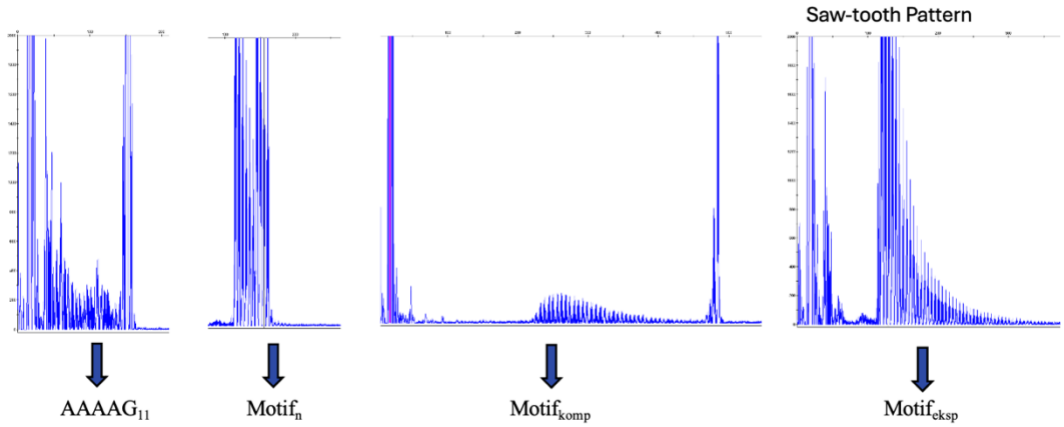
Tablo 3.8. *RFC1* AAGGG motifi primer dizileri

Motif	Primer Yönü	Primer Dizisi
	Forward Primer	FAM-TCAAGTGATACTCCAGCTACACCGT
	Anchor Primer	CAGGAAACAGCTATGACC
AAGGG	Reverse Primer1	CAGGAAACAGCTATGACCAACAGAGCAAGACTCTGT TTCAAAAAAGGGAAGGGAAGGGAAGGGAA
	Reverse Primer2	CAGGAAACAGCTATGACCAACAGAGCAAGACTCTGT TTCAAAAAGGGAAGGGAAGGGAAGGGAA
	Reverse Primer3	CAGGAAACAGCTATGACCAACAGAGCAAGACTCTGT TTCAAAAGGGAAGGGAAGGGAAGGGAA

3.3.6.1. Ürünlerin fragman analizi için cihaza yüklenmesi

2.5 µl RP-PCR ürünü 7.25 µl Formamide ve 0.25 µl 560 Size ile karıştırılarak ABI 3500 Genetik Analyzer cihazına yüklemek üzere plate'e dağıtılmıştır.

PCR ürünleri ABI 3500 Genetik Analyzer cihazı ile POP7 polimer ve 36 cm 32 kapiller kullanılarak 23s enjeksiyon süresi ile ayrıştırılmıştır. PCR ürünlerinin fragman boyutları 560 Size ile GeneMapper yazılımı kullanılarak belirlenmiştir. Fragman analizi sonuçlarının değerlendirilme ve sınıflandırılma profilleri Şekil 3.2'de gösterilmiştir.



Şekil 3.2. RP-PCR Ürünlerinin fragman analizi sonuçların değerlendirilme ve sınıflandırılma profilleri.

3.3.7. İstatistiksel analiz

Gruplar arasındaki istatistiksel analiz Pearson Ki Kare (Exact test) testi ile gerçekleştirilmiştir.

4. BULGULAR

Çalışmamızda Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Nöroloji Polikliniğine başvuran ve PH tanısı almış 200 hastada ve herhangi bir nörolojik ya da psikiyatrik bulgusu bulunmayan 100 kontrol bireyinde *RFC1* geni pentanükleotit tekrar sayısı artışları LR-PCR ve RP-PCR yöntemleri kullanılarak araştırılmıştır.

RFC1 genindeki pentanükleotit tekrar artışları hastaların klinik özellikleriyle değerlendirilmiş ve bu tekrar sayısı artışlarının PH üzerindeki riski belirlenmeye çalışılmıştır.

3.1 Olguların Demografik Özellikleri

Çalışmamıza dahil edilen 200 olgunun 104'ü kadın, 96'sı erkektir. Olguların ortalama yaşı 62 ± 3'tür. Dahil edilen 100 kontrol bireyinin 63'ü kadın 37'si erkektir. Kontrol bireylerinin ortalama yaşı 57 olarak belirlenmiştir.

3.2. *RFC1* Geni Pentanükleotit Tekrar Artışlarına Ait Bulgular

Çalışmamızda hasta grubu için 200 olgu, kontrol grubu için 100 olgu değerlendirilmiş ancak, kontrol grubu içerisinde 2 olgunun analizi gerçekleştirilememiş ve 98 olgudan sonuç alınmıştır.

Hasta grubunda 200 olgu içerisinde 87 hastada (%43,5), kontrol grubunda ise

98 olguda 47 olguda (%47,95) homozigot $AAAAG_{(11)}$ motifi saptanmıştır. Hasta grubunda bir vakada patojenik AAGGG motifinde homozigot ekspansiyon saptanmıştır (%0,5) (Şekil 4.1.) Ayrıca hasta grubunda patojenik AAGGG motifinde heterozigot ekspansiyon (Şekil 4.2) taşıyan olgu sıklığı %8,5 olarak belirlenmiştir. Kontrol grubunda ise bu oran %4,08'dir. Hasta ve kontrol grubu arasında patojenik $AAGGG_{(eksp)}$ motifi için hasta ve kontrol grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmemiştir (p=0.193).

RP-PCR sonucunda elde edilen verilere göre Parkinson hasta grubu için 25, kontrol olguları için 9 farklı tekrar motifi saptanmıştır. Kompleks $AAAAG_{(komp)}$/$AAGGG_{(eksp)}$ saptanan olgunun RP-PCR ve jel görüntüleri Şekil 4.3'te verilmiştir. Aynı zamanda kompleks AAAAG motif tekrarı bulunan 1 hasta Sanger sekans ile dizilenmiş ve sonucunda $AAAAG_{(n)}$ motifine ek olarak $AGAAG_{(n)}$ motifi tespit edilmiştir (Şekil 4.4). $AAAAG_{(n)}$ tekrar motifine sahip olan 1 hastada Sanger sekanslama ile $AAAAG_{(30)}$ pentanükleotit tekrarı olduğu gösterilmiştir (Şekil 4.5).

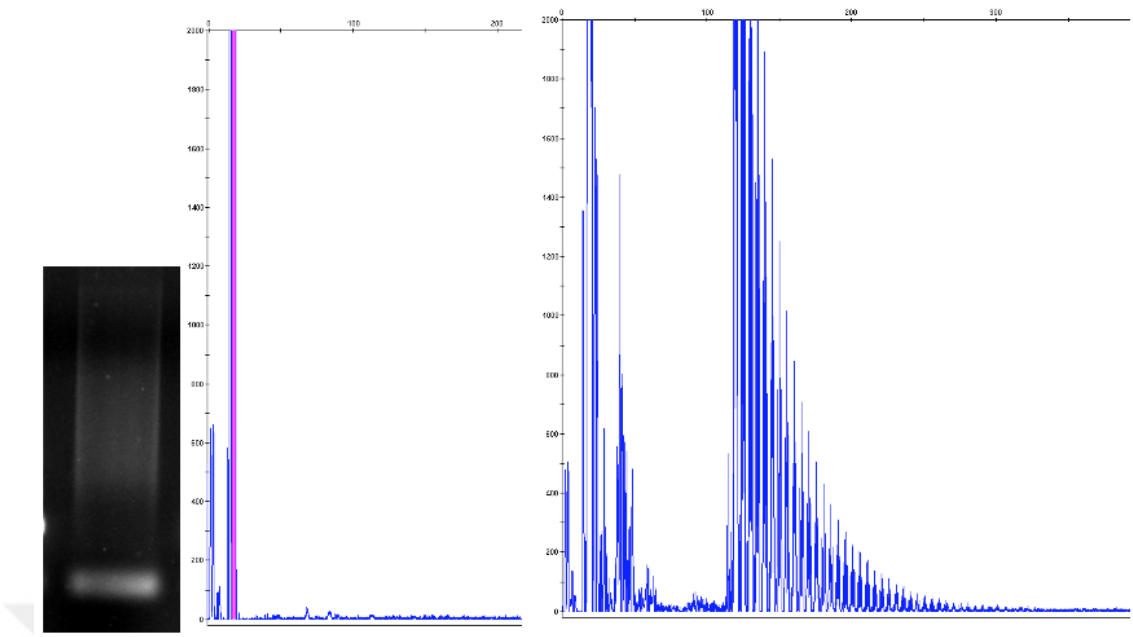
Saptanan motif genotipleri ve dağılımları tablo 4.1'de gösterilmiştir.

Tablo 4.1. *RFC1* tekrar motiflerinin hasta ve kontrol olgularında dağılımı

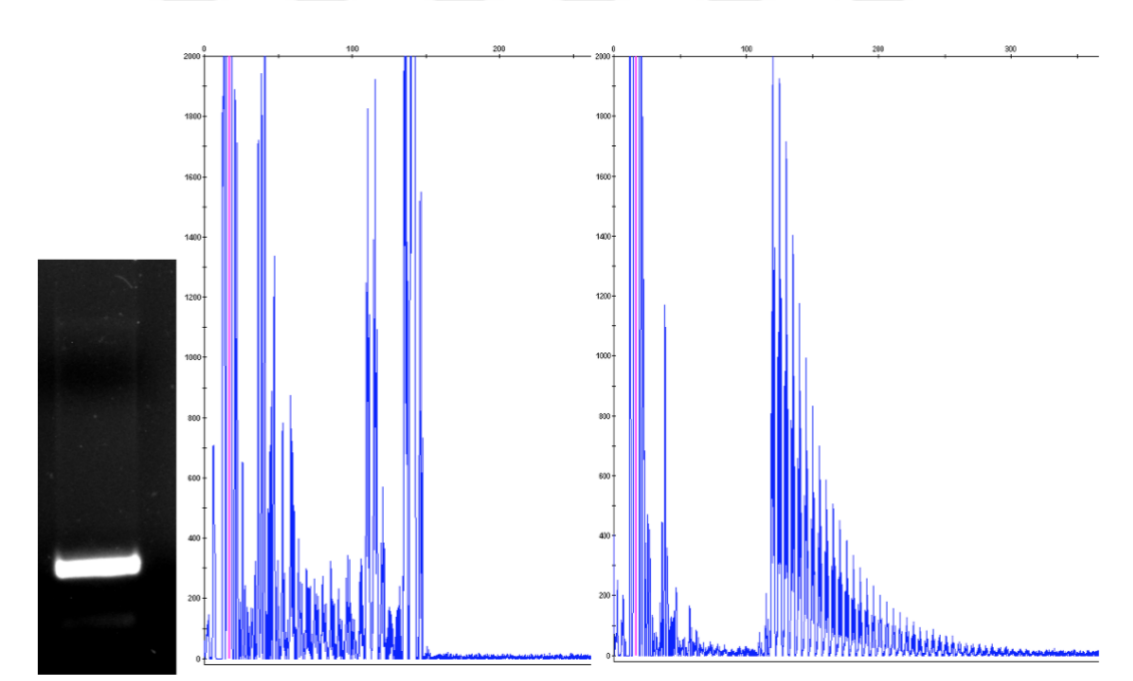
GENOTİPLER	PARKİNSON HASTA GRUBU		KONTROL GRUBU	
	Örnek Sayısı	Örnek Yüzdesi	Örnek Sayısı	Örnek Yüzdesi
AAAAG*(11)* /AAAAG*(11)*	87	%43,5	47	%47,95
AAAAG*(komp)*/AAAGG*(komp)*	38	%19	6	%6,12
AAGGG*(eksp)*/AAGGG*(eksp)*	1	%0,5	0	0
AAAAG*(komp)*/AAGGG*(eksp)*	3	%1,5	3	%3,06
AAAAG*(komp)*/AAAAG*(komp)*	3	%1,5	27	%27,55
AAAAG*(n)*/AAAGG*(eksp)*	4	%2	0	0
AAAAG*(11)*/AAGGG*(n)*	2	%1	0	0
AAAAG*(11)*/AAAGG*(komp)*	22	%11	11	%11,22
AAAGG*(n)*/AAGGG*(eksp)*	1	%0,5	1	%1,02
AAAAG*(11)*/AAGGG*(eksp)*	7	%3,5	0	0
AAAGG*(komp)*/AAAGG*(komp)*	2	%1	0	0

Tablo 4.1. *RFC1* tekrar motiflerinin hasta ve kontrol olgularında dağılımı (Devam Ediyor)

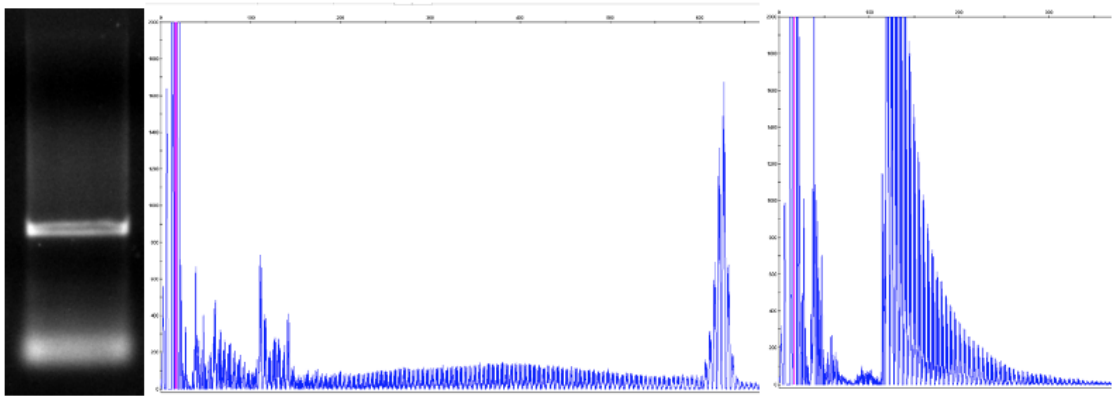
AAAAG*(11)*/AAAGG*(n)*	4	%2	1	%1,02
AAAAG*(komp)*/AAAGG*(komp)*/AAGGG*(komp)*	1	%0,5	0	0
AAAAG*(11)*/AAGGG*(komp)*	2	%1	0	0
AAAAG*(komp)*/AAAGG*(komp)*/AAGGG*(eksp)*	1	%0,5	0	0
AAAAG*(11)*/AAAGG*(komp)*/AAGGG*(n)*	2	%1	1	%1,02
AAAGG*(eksp)*/AAAGG*(eksp)*	1	%0,5	0	0
AAAAG*(11)*/AAAGG*(eksp)*	1	%0,5	0	0
AAAAG*(komp)*/AAAGG*(komp)*/AAGGG*(n)*	2	%1	0	0
AAAAG*(eksp)*/AAAGG*(komp)*	1	%0,5	0	0
AAAAG*(11)*/AAAAG*(n)*	9	%4,5	0	0
AAAAG*(komp)*/AAAGG(*komp)*/AAGGG*(n)*	2	%1	0	0
AAAAG*(eksp)*/AAAAG*(n)*	1	%0,5	0	0
AAAAG*(11)*/AAAGG*(n)*/AAGGG*(eksp)*	2	%1	0	0
AAAAG*(n)*/AGAAG*(30)*	1	%0,5	0	0
AAAAG*(komp)*/AAAGG*(n)*	0	0	1	%1,02
Toplam	200	%100	98	%100



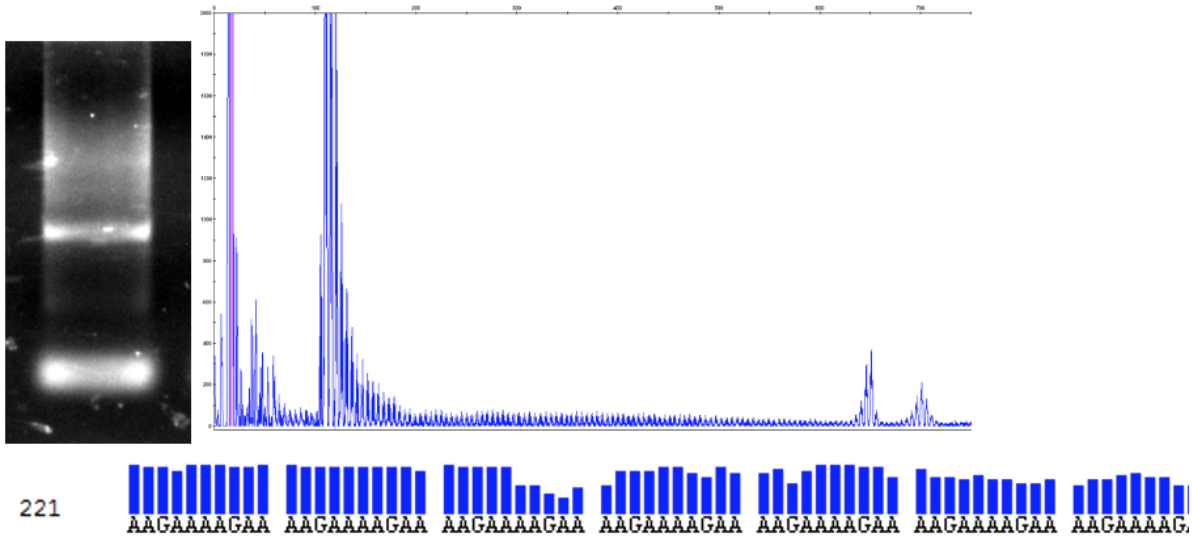
Şekil 4.1. Homozigot AAGGG*(eksp)* motifinin RP-PCR görüntüsü. Sırasıyla LR-PCR ürününün jel elektroforezi sonucu. RP-PCR ile AAGGG*(eksp)*/AAGGG*(eksp)* motifi verilmiştir.



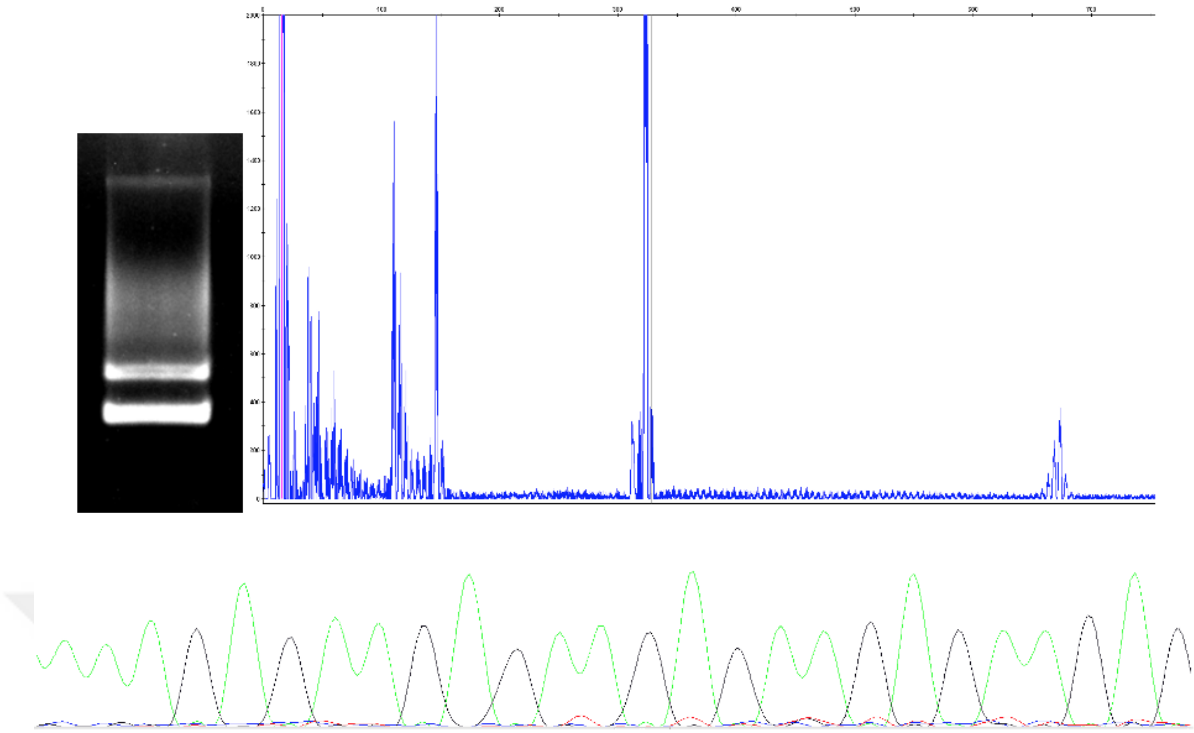
Şekil 4.2. Heterozigot AAGGG*(eksp)* motifinin RP-PCR görüntüsü. Sırasıyla LR-PCR ürününün jel elektroforezi sonucu. RP-PCR ile AAAAG*(11)* ve AAGGG*(eksp)*motifleri verilmiştir.



Şekil 4.3. AAAAG*(komp)*/AAGGG*(eksp)* motifinin RP-PCR ile görüntüsü. Sırasıyla LR-PCR ürününün jel elektroforezi sonucu. RP-PCR ile AAAAG*(komp)* ve AAGGG*(eksp)* motifleri verilmiştir.



Şekil 4.4. AAAAG*(n)*/AAAAG*(n)* motifinin RP-PCR görüntüsü. Sırasıyla LR-PCR ürününün jel elektroforezi sonucu. RP-PCR ile AAAAG*(n)* ve AAAAG*(30)* motifleri verilmiştir.



Şekil 4.5. AAAAG$_{(n)}$/AGAAG$_{(30)}$ motifinin RP-PCR ve Sanger Sekans görüntüsü. Sırasıyla LR-PCR ürününün jel elektroforezi sonucu,RP-PCR ile AAAAG$_{(n)}$ ve AGAAG$_{(30)}$ motifleri ve sanger sekans görüntüsü verilmiştir.

5. TARTIŞMA

PH, Alzheimer hastalığından sonra en sık karşılaşılan tremor, rijidite ve bradikinezi ile karakterize edilmiş, bazı hastalarda ise hastalığın ilerlediği durumlarda postüral instabilitenin ortaya çıktığı karmaşık ve kompleks bir nörodejeneratif hastalıktır (Stoker vd., 2018).

PH patolojik olarak beyin sapında substantia nigra hasarı sonucunda dopamin salgılayan hücrelerin dejenerasyonu ya da kaybıyla karakterizedir. Bu nörodejenerasyon yalnızca nigral dopaminerjik nöronlarla sınırlı olmayıp sinir ağının diğer bölgelerinde yer alan işlevsel hücreleride kapsamaktadır (LM vd., 2006).

CANVAS ilk olarak 2011 yılında serebellar bozukluk, iki taraflı vestibüler hipofonksiyon ve somatosensoriyel kayıp ile karakterize edilmiştir (Szmulewicz vd., 2011). Replikasyon Faktörü C Alt Birimi 1 (*RFC1*) geni, DNA onarımı ve DNA replikasyonunda rol oynayan pentamerik DNA polimeraz yardımcı proteini olan replikasyon faktörü C'nin büyük alt birimini kodlamaktadır. Cortese ve arkadaşları tarafından 2019 yılında yapılan çalışma ile *RFC1* geni intron 2'sindeki biallelik AAGGG tekrar dizisi artışlarının serebellar ataksi, nöropati ve vestibüler arefleksi sendromuyla (CANVAS) ilişkili olduğu gösterilmiştir (Cortese vd., 2019).

Kytövuori ve arkadaşları tarafından 2022 yılında yapılan bir çalışma ile *RFC1* geni intron 2'sindeki bialelik AAGGG tekrar dizisi artışlarının PH'nın ender bir nedeni olabileceği gösterilmiştir (Kytövuori vd., 2022).

Çalışmamızda *RFC1* geni intron 2'sindeki AAAAG, AAAGG, AAGGG pentanükleotit tekrar dizisi artışlarının PH üzerindeki etkisini ve frekansını araştırmak amacıyla Nöroloji Ana Bilim Dalında tarafından PH tanısı alan 200 hasta ve 100 kontrol olgusunda bu tekrar genişlemeleri araştırılmıştır.

RFC1 geni pentanükleotit genişlemelerinin PH ile ilişkisini gösteren ilk çalışma 2022 yılında yayımlanmıştır. Kytövuori ve arkadaşları Fin toplumundan 569 Parkinsonizmli olgu ve 269 kontrol olgusu kullanarak *RFC1* geni biallelik AAGGG tekrar dizisi artışlarının PH ile ilişkisinin değerlendirilmesi amacıyla yaptıkları çalışmada 9 Parkinsonizmli olguda biallelik AAGGG tekrar dizisi artışı saptamışlardır. 9 olgu içerisinden Kuzey Karelya eyaletinden olan 3 olgu ataksi ve CANVAS karakteristik özellikleri olmaksızın PH kriterlerini karşılamaktadır (%0,5) (Kytövuori

vd., 2022). Çalışma verilerimiz homozigot AAGGG tekrar dizisi artışı açısından Kytövuori ve ark. verileri tutarlı gözükmektedir (%0,5).

Ylikotila ve arkadaşlarının 2023 yılında yaptığı çalışmada erken başlangıçlı 273 Parkinson hastasında *RFC1* geni bialelik AAGGG tekrar dizisi artışları araştırılmıştır. Hiçbir nöropati veya ataksi olmaksızın PH kriterlerini karşılayan başlangıç yaş aralığı 40-48 olan 3 hastada biallelik AAGGG tekrar dizisi artışı saptanmıştır (%1,10) (Ylikotila vd., 2023). Çalışmamızdan elde ettiğimiz frekans (%0,5) Ylikotila ve arkadaşlarının frekans verilerine göre düşüktür. Bunun en önemli nedenlerinden birisi bazı patojenik tekrar sayılarının oldukça yüksek olması sebebiyle PCR'a dirençli olması olabilir. Aynı zamanda araya giren diğer motifler nadirde olsa bazı vakalarda net sonuçlar alınmasının önüne geçmektedir. Bununla birlikte popülasyonlar arasında bu frekansın değişebileceği de göz önünde bulundurulmalıdır.

Jerez ve arkadaşları 2024 yılında Finlandiyalı olmayan Avrupa kökenli 903 Parkinson hastası ve 706 kontrol olgusu ile yapılan çalışmada *RFC1* geni biallelik AAGGG tekrar dizisi artışlarını araştırmışlardır. Kısa okumalı tüm genom dizileme ile 5 hastanın biallelik AAGGG tekrar dizisi artışı taşıdığı tespit edilmiş fakat Oxford Nanopore Teknolojisi ile 5 hastadan birini yanlış pozitif olarak tanımlanmıştır. Parkinson hastalığı kriterlerini karşılayan 4 hastada biallelik AAGGG tekrar dizisi artışı olduğunu bildirmişlerdir (%0,43) (Jerez vd., 2024). 706 kontrol olgusunun hiçbirinde biallelik AAGGG tekrar dizisi artışı saptanmamıştır. Jerez ve arkadaşlarının çalışması sonucunda elde ettikleri frekans (%0,43) ile çalışmamızda elde ettiğimiz frekans (%0,5) uyumludur. Ancak çalışmamızda uzun okuma sekanslama gibi ileri moleküler yöntemler ile tekrar sayılarının belirlenmesi ve araya giren yeni motiflerin tanımlanması gerekmektedir.

Scriba ve arkadaşlarının 2023 yılında Avustralasya nörolojik hastalık kohortunda *RFC1* tekrar motiflerini araştırmak amacıyla yaptıkları çalışmada 82 olgudan 44 olguda (%53,7) RP-PCR sonucunda fragman analizinde elde edilen verilerde karakteristik olmayan motif profilleri saptamışlardır. Bu durum sonucunda birden fazla tekrar motifinden oluşan karmaşık allellerin varlığını düşünmüşlerdir. 44 olgudan 27'sinde RP-PCR verilerinde karşılaşılan boşluklar araştırılan motiflerin dışında farklı motiflerin varlığını göstermektedir. 27 olgu üzerinden yapılan uzun okuma sekanslaması sonucunda üç yeni tekrar motifi tanımlamışlardır. İki pentanükleotit tekrarı: AAGAC, AGGGG ve bir hekzanükleotit tekrarı AAAGGG.

Tanımlanan 3 yeni motif bilinen diğer tekrar motifleri ile birlikte görülmüştür (AAAAGkomp-AAAGGkomp). Scriba ve arkadaşları yaptığı çalışma sonucunda kompleks genotip gösteren olgu frekansı %53,7 bulunmuştur (Scriba vd., 2023). Çalışmamızda kompleks motif genotipi gösteren olgu sayısı 78 olgu frekansı %39 olarak belirlenmiştir. 78 olgu içerisinden 3 olguda (%1,5) kompleks motif patojenik AAGGG motifi içerisinde saptanmıştır. Çalışmamızın verileri literatür ile uyuşmaktadır. Kompleks motif için potansiyel 78 olgu için özelikle patojenik tekrar motifinde saptanan 3 olguda uzun okuma sekanslaması yapılması sonucunda literatüre yeni motifler kazandırılması olası görünmektedir.

Akçimen ve arkadaşlarının 2019 yılında Kanada ve Brezilya Ataksi kohortunda *RFC1* tekrar genişlemelerinin araştırılması amacıyla yaptıkları çalışmada 23 Brezilyalı ve 154 Kanadalı yetişkin başlangıçlı ataksi kohortu kullanmışlardır. Toplam 177 hasta olgusu içerisinde 22 olguda kompleks genotip saptamışlardır (%7). 22 olguda yapılan uzun okuma sekanslama ile AAGAG ve AGAAG olmak üzere iki yeni pentanükleotit tekrar genişlemesi göstermişlerdir (Akçimen vd., 2019). Çalışmamızda $AAAAG_{(n)}$ kompleks motifi gösteren 1 olguda yapılan Sanger sekanslama sonucunda 5 tekrarlı AAAAG motifi devamında 30 tekrarlı AGAAG motifi gösterilmiştir. Her ne kadar polimorfik tekrar dizisi arasında gözlense de AGAAG motifinin sadece ataksi için değil PH için de yeni bir motif olarak patojenitesinin değerlendirilebileceğine yönelik bu ilk verinin doğrulanması için ileri çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

Kytövuori ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada biallelik AAGGG tekrar dizisi artışı saptanan 3 hastanın Parkinson başlangıç yaşı 65, 59 ve 51 olarak belirtilmiştir. 3 hasta sporadik PH tanılı olarak bildirilmiştir. 3 hastadan ikisinde diskinezi pozitiftir. 3 hastanın ikisinde halüsinasyon olduğu belirtilmiştir. Hastaların tümünde diskinezi mevcuttur (Kytövuori vd., 2022). Ylikotila ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada biallelik AAGGG tekrar dizisi artışı saptanan 3 hastanın Parkinson başlangıç yaşı 47, 40, 48 olarak belirtilmiştir. 3 hastanın birinde aile öyküsü pozitiftir. Hastaların tümünde diskinezi mevcuttur (Ylikotila vd., 2023). Çalışmamızda bialelik AAGGG tekrar dizisi artışı saptanan hastanın başlangıç yaşı 44'tür. Olgumuzun aile öyküsü negatiftir. Olgumuzun kliniğinde bradikinezi, rijidite ve diskinezi pozitiftir, düşük doz ilaç alımına rağmen dürtü kontrol bozukluğu gelişmiştir. Olgumuzda halüsinasyon negatiftir. Olgumuz hem başlangıç yaşı hem klinik özellikleri açısından Ylikotila ve

arkadaşlarının yaptığı çalışma verileri ile daha tutarlı sonuçlar göstermektedir (Ylikotila vd., 2023).

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Yakın zamanda yapılan üç çalışma ile *RFC1* geni intron 2'sindeki biallelik AAGGG genişlemelerinin PH ile de ilişkili olabileceğine dikkat çekmiştir ((Kytövuori vd., 2022, Ylikotila vd., 2023, Scriba vd., 2024). Çalışmamızda Türk popülasyonu içerisinde *RFC1* geni AAGGG genişlemelerinin PH ile ilişkisinin araştırılması amaçlanmıştır. Bu doğrultuda 200 sporadik Parkinson hastası ve 100 kontrol olgusu çalışmaya dahil edilmiştir. Hasta ve kontrol gruplarının DNA materyalleri elde edilmiş ve AAAAG, AAAGG, AAGGG tekrar motifleri LR-PCR ve RP-PCR yöntemleri kullanılarak incelenmiştir. Hasta ve kontrol gruplarında bu motiflerin frekansları ve hastalık üzerindeki etkisi belirlenmiştir.

Çalışmamız sonucunda;

- 200 Parkinson hastasının 1'inde (%0,5) biallelik AAGGG tekrar dizisi artışı saptanmıştır. Kontrol grubunda AAGGG tekrar dizisi artışı saptanan olgu bulunmamaktadır.
- Hasta grubu içerisinde 17 olguda (%8,5) heterozigot AAGGG tekrar dizisi artışı saptanmıştır. Kontrol grubunda 4 olguda (%4,08) heterozigot AAGGG tekrar dizisi artışı belirlenmiştir.
- Hasta ve kontrol grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır (p=0.193).
- 78 Parkinson hastasında (%39) kompleks motif belirlenmiştir. 78 olgu içerisinden 3 olguda (%1,5) belirlenen kompleks motifin AAGGG patojenik tekrar motifi içerisinde olduğu saptanmıştır.
- Kontrol grubu olgularında patojenik AAGGG tekrarı için kompleks motif saptanmamıştır.

Çalışmamız sonucunda biallelik AAGGG tekrar dizisi artışı için elde ettiğimiz frekans değerleri literatür ile uyumludur. Parkinson hastalarında heterozigot taşıyıcıların (%8,5) daha yaygın bulunması bu taşıyıcılığın PH için bir risk faktörü olabileceğini düşündürmektedir. Saptanan kompleks motiflerin belirlenmesi için uzun okuma sekanslama gibi ileri moleküler yöntemlerin kullanılması olası yeni motiflerin belirlenmesi açısından oldukça büyük önem taşımaktadır. Elde edilen verilerin doğrulanması için daha geniş hasta serilerinde çalışılması gerekmektedir. Aynı

zamanda *RFC1* geninde saptanan yeni motiflerin de Parkinson olgularında incelenmesi bu genin olası etkilerinin belirlenmesi açısından önem arz etmektedir.

7. KAYNAKLAR DİZİNİ

C. Klein and A. Westenberger, "Genetics of Parkinson's disease," *Cold Spring Harb. Perspect. Med.*, 2012, doi: 10.1101/cshperspect.a008888.

S. T. Camargos *et al.*, "Familial Parkinsonism and early onset Parkinson's disease in a Brazilian movement disorders clinic: Phenotypic characterization and frequency of SNCA, PRKN, PINK1, and LRRK2 mutations," *Mov. Disord.*, 2009, doi: 10.1002/mds.22365.

T. B. Stoker, K. M. Torsney, and R. A. Barker, "Emerging treatment approaches for Parkinson's disease," *Front. Neurosci.*, vol. 12, no. OCT, pp. 1–10, 2018, doi: 10.3389/fnins.2018.00693.

B. Kim *et al.*, "Impaired inflammatory responses in murine lrrk2-knockdown brain microglia," *PLoS One*, 2012, doi: 10.1371/journal.pone.0034693.

N. Hattori and Y. Mizuno, "Mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease," *Nippon rinsho. Japanese J. Clin. Med.*, vol. 60 Suppl 4, no. 2, pp. 406–411, 2002, doi: 10.5607/en.2015.24.2.103.

A. Zimprich *et al.*, "Mutations in LRRK2 cause autosomal-dominant parkinsonism with pleomorphic pathology," *Neuron*, vol. 44, no. 4, pp. 601–607, 2004, doi: 10.1016/j.neuron.2004.11.005.

D. G. Healy *et al.*, "Phenotype, genotype, and worldwide genetic penetrance of LRRK2-associated Parkinson's disease: a case-control study," *Lancet Neurol.*, vol. 7, no. 7, pp. 583–590, 2008, doi: 10.1016/S1474-4422(08)70117-0.

C. Raza, R. Anjum, and N. ul A. Shakeel, "Parkinson's disease: Mechanisms, translational models and management strategies," *Life Sci.*, vol. 226, no. March, pp. 77–90, 2019, doi: 10.1016/j.lfs.2019.03.057.

J. Trinh and M. Farrer, "Advances in the genetics of Parkinson disease," *Nature Reviews Neurology*. 2013, doi: 10.1038/nrneurol.2013.132.

N. M. Gatto *et al.*, "α-synuclein gene may interact with environmental factors in increasing risk of Parkinson's disease," *Neuroepidemiology*, 2010, doi: 10.1159/000315157.

7. KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

M. Gómez-Benito, N. Granado, P. García-Sanz, A. Michel, M. Dumoulin, and R. Moratalla, "Modeling Parkinson's Disease With the Alpha-Synuclein Protein," *Front. Pharmacol.*, vol. 11, no. April, pp. 1–15, 2020, doi: 10.3389/fphar.2020.00356.

S. Von Stockum, A. Nardin, E. Schrepfer, and E. Ziviani, "Mitochondrial dynamics and mitophagy in Parkinson's disease: A fly point of view," *Neurobiol. Dis.*, 2016, doi: 10.1016/j.nbd.2015.11.002.

A. Cortese *et al.*, "Biallelic expansion of an intronic repeat in *RFC1* is a common cause of late-onset ataxia," *Nat. Genet.*, vol. 51, no. 4, pp. 649–658, 2019, doi: 10.1038/s41588-019-0372-4.

A. Cortese *et al.*, "Cerebellar ataxia, neuropathy, vestibular areflexia syndrome due to *RFC1* repeat expansion," *Brain*, vol. 143, no. 2, pp. 489–490, 2020, doi: 10.1093/brain/awz418.

F. Akçimen *et al.*, "Investigation of the *RFC1* Repeat Expansion in a Canadian and a Brazilian Ataxia Cohort: Identification of Novel Conformations," *Front. Genet.*, vol. 10, no. November, pp. 1–5, 2019, doi: 10.3389/fgene.2019.01219.

J. H. Yuan *et al.*, "Multi-type *RFC1* repeat expansions as the most common cause of hereditary sensory and autonomic neuropathy," *Front. Neurol.*, vol. 13, 2022, doi: 10.3389/fneur.2022.986504.

D. Perra *et al.*, "Alpha-synuclein seeds in olfactory mucosa and cerebrospinal fluid of patients with dementia with Lewy bodies," *Brain Commun.*, vol. 3, no. 2, pp. 1–11, 2021, doi: 10.1093/braincomms/fcab045.

D. J. Szmulewicz *et al.*, "Sensory neuropathy as part of the cerebellar ataxia neuropathy vestibular areflexia syndrome," *Neurology*, vol. 76, no. 22, pp. 1903–1910, 2011, doi: 10.1212/WNL.0b013e31821d746e.

D. J. Szmulewicz, C. A. McLean, H. G. Macdougall, L. Roberts, E. Storey, and G. M. Halmagyi, "CANVAS an update: Clinical presentation, investigation and management," *J. Vestib. Res. Equilib. Orientat.*, vol. 24, no. 5–6, pp. 465–474, 2014, doi: 10.3233/VES-140536.

7. KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

D. J. Szmulewicz, L. Roberts, C. A. McLean, H. G. MacDougall, G. Michael Halmagyi, and E. Storey, "Proposed diagnostic criteria for cerebellar ataxia with neuropathy and vestibular areflexia syndrome (CANVAS)," *Neurol. Clin. Pract.*, vol. 6, no. 1, pp. 61–68, 2016, doi: 10.1212/CPJ.0000000000000215.

T. Y. Wu *et al.*, "Autonomic dysfunction is a major feature of cerebellar ataxia, neuropathy, vestibular areflexia 'CANVAS' syndrome," *Brain*, 2014, doi: 10.1093/brain/awu196.

A. Traschütz *et al.*, "Natural History, Phenotypic Spectrum, and Discriminative Features of Multisystemic *RFC1* Disease," *Neurology*, 2021, doi: 10.1212/WNL.0000000000011528.

D. Aboud Syriani *et al.*, "Prevalence of *RFC1*-mediated spinocerebellar ataxia in a North American ataxia cohort," *Neurol. Genet.*, 2020, doi: 10.1212/NXG.0000000000000440.

M. Gisatulin *et al.*, "Clinical spectrum of the pentanucleotide repeat expansion in the *RFC1* gene in ataxia syndromes," *Neurology*, 2020, doi: 10.1212/WNL.0000000000010744.

I. Malik, C. P. Kelley, E. T. Wang, and P. K. Todd, "Molecular mechanisms underlying nucleotide repeat expansion disorders," *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2021, doi: 10.1038/s41580-021-00382-6.

Ł. J. Sznajder *et al.*, "Intron retention induced by microsatellite expansions as a disease biomarker," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 115, no. 16, pp. 4234–4239, 2018, doi: 10.1073/pnas.1716617115.

K. Davies, D. J. Szmulewicz, L. A. Corben, M. Delatycki, and P. J. Lockhart, "*RFC1*-related disease molecular and clinical insights," *Neurol. Genet.*, vol. 8, no. 5, 2022, doi: 10.1212/NXG.0000000000200016.

P. Ylikotila *et al.*, "Association of biallelic *RFC1* expansion with early-onset Parkinson's disease," *Eur. J. Neurol.*, 2023, doi: 10.1111/ene.15717.

P. Alvarez Jerez *et al.*, "Profiling complex repeat expansions in *RFC1* in Parkinson's disease," *npj Park. Dis.*, vol. 10, no. 1, pp. 8–11, 2024, doi: 10.1038/s41531-024-00723-0.

7. KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

C. K. Scriba *et al.*, “A novel *RFC1* repeat motif (ACAGG) in two Asia-Pacific CANVAS families,” *Brain*, vol. 143, no. 10, pp. 2904–2910, 2020, doi: 10.1093/brain/awaa263.