

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

**GRIN1, GRIN2A, GRIN2B ve TP53 LOKUSLARINDAKİ  
POLİMORFİZMLERİN HUNTINGTON  
HASTALIĞI'NIN BAŞLANGIÇ YAŞINA ETKİLERİ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Hazırlayan  
Aysun AÇAR**

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

**İstanbul, 2009**

**T.C.**  
**HALIÇ ÜNİVERSİTESİ**  
**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜNE**

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı Moleküler Biyoloji ve Genetik Programı Yüksek Lisans öğrencisi **Aysun AÇAR** tarafından hazırlanan **“GRIN 1, GRIN 2A, GRIN 2B VE TP53 Lokuslarındaki Polimorfizmlerin Huntington Hastalığının Başlangıç Yaşına Etkileri”** adlı bu çalışma jürimizce Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Sınav Tarihi : 02.07.2009

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

İmzası :

Jüri Üyesi: Yrd.Doç.Dr.Nagehan ERSOY  
Danışman–HAL.Üni.Mol.Biy.ve Gen.ABD Öğr.Üyesi

.....  
*N. Ersoy*

Jüri Üyesi : Doç.Dr.Haşmet HANAĞASI  
İst.Üniv.İst.Tıp Fak.Nöroloji ABD Öğr.Üyesi

.....  
*H. Hanağasi*

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

.....  
*B. Yokeş*

Jüri Üyesi : Doç.Dr.Ece ŞEN  
HAL.Üni. Mol.Biy.ve Gen.ABD Öğr.Üyesi (Yedek)

.....  
*E. Şen*

Jüri Üyesi : Yrd.Doç.Dr.Nevin Gül KARAGÜLER  
İ.T.Ü. Mol.Biy.ve Gen.ABD Öğr.Üyesi (Yedek)

.....  
*N. Karagüler*

## ÖNSÖZ

Bu çalışma 2007 – 2009 yılları arasında T.C. Haliç Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü'nün bilimsel araştırma ve uygulama çalışmalarına verdiği destek ile hazırlanmıştır.

Öncelikle yüksek lisans eğitimim ve tez çalışmalarım süresince yardımlarını esirgemeyen ve ihtiyacım olan her konuda yol gösteren tez danışmanım Sayın Yrd. Doç. Dr. Nagehan Ersoy'a çok teşekkür ederim. Hasta bilgi ve örneklerini temin eden İstanbul Üniversitesi DETAE Moleküler Genetik Anabilim Dalı Başkanı Sayın Nihan Erginel Ünaltuna'ya, İstanbul Üniversitesi Tıp Fakültesi Nöroloji Anabilim Dalı Davranış Nörolojisi ve Hareket Bozuklukları Birimi Öğretim Üyesi Sayın Doç. Dr. Haşmet Hanağası'na ve Davranış Nörolojisi ve Hareket Bozuklukları Birimi sekreteri Sayın Aysun Dülger'e çalışmamıza katkıları için teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmam boyunca bana laboratuvar çalışmalarında yardımcı olan arkadaşım Arş. Gör. Mustafa Ömür Köse'ye ve özellikle istatistiksel hesaplamalarda yardımını esirgemeyen arkadaşım Arş. Gör. Kutluhan İncekara'ya da teşekkürü bir borç bilirim.

Son olarak beni hayatım boyunca destekleyen ve her zaman yanımda olan sevgili anne ve babama, hayatıma girdiği andan itibaren her ihtiyacım olduğunda bana moral veren ve özellikle tez çalışması süresince bana sonsuz anlayış gösteren sevgili eşim Murat Hazer'e teşekkür ederim.

Aysun Açar  
Haziran, 2009

## İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No.</u>
<b>ÖNSÖZ</b> .....	I
<b>İÇİNDEKİLER</b> .....	II
<b>ŞEKİLLER LİSTESİ</b> .....	V
<b>TABLolar LİSTESİ</b> .....	VII
<b>KISALTMALAR</b> .....	IX
<b>ÖZET</b> .....	X
<b>SUMMARY</b> .....	XII
<b>1. GİRİŞ</b> .....	1
1.1. Huntington Hastalığı'nın Tarihçesi .....	1
1.2. Huntington Hastalığı'nın Epidemiyolojisi .....	2
1.3. Huntington Hastalığı'nın Klinik Özellikleri .....	2
1.4. Huntington Hastalığı'nın Genetiği.....	4
1.4.1. IT-15 Geni .....	4
1.4.2. Kalıtım ve Mutasyon .....	4
1.4.3. Hastalık Başlangıç Yaşı.....	6
1.4.3.1. Çevresel Faktörlerin Hastalık Başlangıç Yaşına Etkisi ....	6
1.4.3.2. Ebeveynin Cinsiyetinin Başlangıç Yaşına Etkisi.....	7
1.4.3.3. Gen Polimorfizmlerinin Hastalık Başlangıç Yaşına Etkisi .....	7
1.4.3.4. IT-15 Genindeki Polimorfizmlerin Başlangıç Yaşına Etkisi .....	8
1.4.3.5. Hastalık Başlangıç Yaşını Etkileyen Diğer Polimorfizmler .....	10
1.4.3.5.1. NMDAR Alt Ünitelerinde Görülen Polimorfizmler .....	10
1.4.3.5.2. TP53 R72P Polimorfizmi .....	12
1.5. Huntingtin Proteininin Özellikleri .....	13
1.5.1. Huntingtin Proteininin İşlevi .....	15
1.5.2. Mutant Huntingtin Proteininin Özellikleri .....	15
1.6. Huntington Hastalığı'nın Moleküler Patolojisi: Fonksiyon Kazanımı ve Kaybı.....	16
1.7. Huntington Hastalığı'nın Nöropatolojisi ve Hücre Kaybı Modelleri .....	18
1.7.1. Eksitotoksisite .....	19



1.7.1.1. Eksitotoksisitenin ve NMDAR'lerin Hastalık Patogenezinin Etkisi .....	21
1.7.2. Oksidatif Stres.....	22
1.7.3. Bozulmuş Enerji Metabolizması.....	23
1.7.4. Apoptoz.....	24
1.7.4.1. p53'ün Huntington Hastalığı'ndaki Rolü .....	25
1.8. Huntington Hastalığı'nda Terapötik Yaklaşımlar.....	27
<b>2. AMAÇ</b> .....	29
<b>3. GEREÇLER</b> .....	30
3.1. Örneklerin Tanımı.....	30
3.2. Kimyasallar .....	30
3.3. Tamponlar, Solüsyonlar ve Enzimler .....	30
3.3.1. Hızlı Genomik DNA İzolasyonu (RGDE) Metodu ile Kandan DNA İzolasyonunda Kullanılan Tamponlar ve Solüsyonlar .....	30
3.3.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) Tamponları ve DNA Polimeraz Enzimleri .....	31
3.3.3. Restriksiyon Enzimleri ve Reaksiyon Tamponları.....	32
3.3.4. Elektroforez Tamponları ve Jel Sistemleri .....	33
3.3.5. Oligonükleotid Primerler .....	34
3.3.6. DNA Büyüklük Markörleri .....	34
3.3.7. Cihazlar .....	34
<b>4. YÖNTEMLER</b> .....	37
4.1. Periferik Kan Örneklerinden DNA İzolasyonu.....	37
4.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu .....	37
4.3. Primer Dizayını .....	39
4.4. Agaroz Jel Elektroforezi .....	39
4.5. Restriksiyon endonükleaz kesimi .....	40
4.6. PCR Saflaştırma.....	40
4.7. Dizi analizi .....	41
4.8. Fragment Analizi .....	42
4.9. Tek Nükleotid Polimorfizmlerinin (SNP) Tespiti .....	43
4.10. IT-15 Genindeki CAG Tekrarının Moleküler Analizi .....	44
<b>5. SONUÇLAR</b> .....	49
5.1. Örneklerin Tanımı.....	49

5.2. DNA İzolasyonu .....	49
5.3. Huntington Hastalarının CAG Tekrar Sayılarının Belirlenmesi.....	50
5.4. SNP'lerin PCR-RFLP Metoduyla Belirlenmesi .....	51
5.4.1. NR1 rs6293 SNP'sinin Belirlenmesi.....	52
5.4.2. NR2A rs1969060 SNP'sinin Belirlenmesi.....	54
5.4.3. NR2B rs1806201 SNP'sinin Belirlenmesi .....	55
5.4.4. NR2B rs1042339 SNP'sinin belirlenmesi.....	57
5.4.5 NR2B rs890 SNP'sinin Belirlenmesi .....	59
5.4.6. TP53 R72P SNP'sinin Belirlenmesi.....	61
5.5. NMDAR ve TP53 Genlerindeki SNP'lerin Dizi Analizi ile Doğrulanması.....	62
5.6. SNP Analizi Sonuçlarının Değerlendirilmesi .....	64
5.7. Huntington Hastalarında Başlangıç Yaşı.....	65
5.8. Verilerin İstatistiksel Analizi .....	66
5.8.1. Hardy-Weinberg Analizi ve Alel Frekansları.....	67
5.8.2. Çapraz Tablolar .....	69
5.8.3. Doğrusal Regresyon ile Başlangıç Yaşı - CAG Tekrar Sayısı ve Diğer Polimorfizmler İlişkisinin Değerlendirilmesi .....	73
5.8.4. Polimorfizmlerin HH'nın Başlangıç Yaşı ile İlişkilendirilmesi..	76
<b>6. TARTIŞMA .....</b>	<b>86</b>
6.1. Huntington Hastalığı ve Başlangıç Yaşı .....	86
6.2. Huntington Hastalarının Klinik Değerlendirmesi.....	88
6.3. Huntington Hastalarında CAG Tekrar Mutasyonu Analizi .....	89
6.4. Huntington Hastalarında Başlangıç Yaşı.....	89
6.5. CAG Tekrar Mutasyonunun Başlangıç Yaşına Etkisi .....	92
6.6. Kontrol ve Hasta Gruplarında SNP Genotiplenmeleri.....	94
6.7. SNPlerin Başlangıç Yaşına Etkisi.....	98
6.7.1. NMDAR Polimorfizmlerinin Başlangıç Yaşına Etkisi .....	100
6.7.2. TP53 Polimorfizmlerinin Başlangıç Yaşına Etkisi .....	105
6.8. Genel Değerlendirme .....	108
<b>7. KAYNAKLAR.....</b>	<b>110</b>

## ŞEKİLLER LİSTESİ

	<u>Sayfa No.</u>
Şekil 1.1. Huntingtin proteininin yapısı .....	14
Şekil 1.2. Huntington Hastalığı'nda hücrel patogenezi modeli .....	19
Şekil 5.1. DNA izolasyonu sonrasında örneklerin %1'lik agaroz jelde görüntülenmesi .....	49
Şekil 5.2. IT-15 PCR ürünlerinin %2'lik agaroz jelde görüntülenmesi .....	50
Şekil 5.3. CAG tekrar uzunluklarının fragment analizi ile belirlenmesi .....	50
Şekil 5.4. Huntington hastalarında belirlenen artmış CAG tekrar sayıları .....	51
Şekil 5.5. GRIN1 rs 6293 PCR ürünlerinin %2'lik agaroz jelde görüntülenmesi ...	52
Şekil 5.6. NR1 rs6293 PCR ürünlerinin %2'lik agaroz jelde MspI analizi .....	53
Şekil 5.7. GRIN1 rs6293 genotip frekansları (%).....	53
Şekil 5.8. GRIN2A rs1969060 PCR ürünlerinin %2'lik agaroz jelde görüntülenmesi .....	54
Şekil 5.9. GRIN2A rs1969060 PCR ürünlerinin %2'lik agaroz jelde DdeI analizi.	55
Şekil 5.10. GRIN2A rs1969060 genotip frekansları (%).....	55
Şekil 5.11. GRIN2B rs1806201 PCR ürünlerinin %2'lik agaroz jelde görüntülenmesi .....	56
Şekil 5.12. GRIN2B rs1806201 PCR ürünlerinin %2'lik agaroz jelde PstI analizi.	56
Şekil 5.13. GRIN2B rs1806201 genotip frekansları .....	57
Şekil 5.14. GRIN2B rs1042339 PCR ürünlerinin %2'lik agaroz jelde görüntülenmesi .....	58
Şekil 5.15. GRIN2B rs1042339 ürünlerinin %2'lik agaroz jelde PsyI analizi .....	58
Şekil 5.16. GRIN2B rs1042339 genotip frekansları (%).....	59
Şekil 5.17. GRIN2B rs890 PCR ürünlerinin %2'lik agaroz jelde görüntülenmesi...	59
Şekil 5.18. GRIN2B rs890 ürünlerinin %2'lik agaroz jelde PstI analizi .....	60
Şekil 5.19. GRIN2B rs890 genotip frekansları (%).....	60
Şekil 5.20. TP53 R72P PCR ürünlerinin %2'lik agaroz jelde görüntülenmesi .....	61
Şekil 5.21. TP53 R72P PCR ürünlerinin %2'lik agaroz jelde Bsh1236I analizi .....	61
Şekil 5.22. TP53 R72P genotip frekansları (%).....	62
Şekil 5.23.a. Heterozigot (G/A) NR1 rs6293 polimorfizmi.....	62
Şekil 5.23.b. NR2A rs1969060 (CC) polimorfizmi.....	63
Şekil 5.23.c. Heterozigot (C/T) NR2B rs1806201 polimorfizmi.....	63
Şekil 5.23.d. Homozigot (GG) NR2B rs1042339 polimorfizmi.....	63

<b>Şekil 5.23.e.</b> Heterozigot (C/A) NR2B rs890 polimorfizmi .....	64
<b>Şekil 5.23.f.</b> Heterozigot (G/C) TP53 R72P polimorfizmi .....	64
<b>Şekil 5.24.</b> Huntington hastalarının başlangıç yaşı dağılımları.....	66
<b>Şekil 5.25.</b> Huntington hastalarında CAG tekrar sayısı -başlangıç yaşı ilişkisi.....	66
<b>Şekil 5.26.</b> GRIN2A rs1969060-Genotiplere ait başlangıç yaşı ortalaması grafîği .....	78
<b>Şekil 5.27.</b> GRIN2B rs1806201-Genotiplere ait başlangıç yaşı ortalaması grafîği .....	80
<b>Şekil 5.28.</b> TP53 R72P-Genotiplere ait başlangıç yaşı ortalaması grafîği.....	83
<b>Şekil 6.1.</b> NR1 rs6293 genotipleri ve başlangıç yaşlarına ait kutu-bıyık grafîği ...	101
<b>Şekil 6.2.</b> NR2A rs1969060 genotipleri ve başlangıç yaşlarına ait kutu-bıyık grafîği .....	102
<b>Şekil 6.3.</b> NR2B rs1806201 genotiplerinin başlangıç yaşına ait kutu-bıyık grafîği .....	103
<b>Şekil 6.4.</b> NR2B rs890 genotipleri ve başlangıç yaşlarına ait kutu-bıyık grafîği ..	104
<b>Şekil 6.5.</b> TP53 R72P genotiplerinin başlangıç yaşına ait kutu-bıyık grafîği.....	108



## TABLOLAR LİSTESİ

Sayfa No.

<b>Tablo 1.1.</b> Başlangıç yaşını etkileyen genler ve polimorfizmler .....	11
<b>Tablo 1.2.</b> Başlangıç yaşına etkisi araştırılan NMDAR polimorfizmleri ve sonuçları .....	12
<b>Tablo 1.3.</b> TP53 R72P polimorfizminin HH başlangıç yaşına etkisini araştıran çalışmalar .....	13
<b>Tablo 3.1.</b> Polimorfik bölgeleri çoğaltmak için kullanılan primer dizileri.....	34
<b>Tablo 4.1.</b> NR1, NR2A, NR2B ve TP53 lokuslarındaki SNP'ler .....	44
<b>Tablo 4.2.</b> Primerlerin genomik DNA dizilerine bağlanma bölgeleri ve SNP'lerin çoğaltılan bölge içinde gösterilmesi .....	45
<b>Tablo 4.3.</b> PCR döngüsü şartları.....	46
<b>Tablo 4.4.</b> PCR komponentleri .....	47
<b>Tablo 4.5.</b> Restriksiyon analizi şartları .....	48
<b>Tablo 5.1.</b> NR1 rs6293 genotiplerine göre oluşan fragment uzunlukları .....	52
<b>Tablo 5.2.</b> GRIN2A rs1969060 genotiplerine göre oluşan fragment uzunlukları ...	54
<b>Tablo 5.3.</b> GRIN2B rs1806201 genotiplerine göre oluşan fragment uzunlukları ...	56
<b>Tablo 5.4.</b> GRIN2B rs1042339 genotiplerine göre oluşan fragment uzunlukları ...	58
<b>Tablo 5.5.</b> GRIN2B rs890 genotiplerine göre oluşan fragment uzunlukları .....	60
<b>Tablo 5.6.</b> TP53 R72P genotiplerine göre oluşan fragment uzunlukları .....	61
<b>Tablo 5.7.</b> Huntington hastalarının genotipleri.....	65
<b>Tablo 5.8.</b> Kontrol grubunun genotipleri.....	65
<b>Tablo 5.9.</b> NR1 rs6293 alel frekansları.....	67
<b>Tablo 5.10.</b> NR2A rs1969060 alel frekansları.....	67
<b>Tablo 5.11.</b> NR2B rs1806201 alel frekansları.....	68
<b>Tablo 5.12.</b> NR2B rs1042339 alel frekansları.....	68
<b>Tablo 5.13.</b> NR2B rs890 alel frekansları.....	68
<b>Tablo 5.14.</b> TP53 R72P alel frekansları .....	68
<b>Tablo 5.15.</b> Örneklerin Hardy-Weinberg Uygunluk Testi.....	69
<b>Tablo 5.16.</b> Grup-NR1 rs6293 çapraz tablosu .....	70
<b>Tablo 5.17.</b> Grup-NR2A rs1969060 çapraz tablosu .....	70
<b>Tablo 5.18.</b> Grup-NR2B rs1806201 çapraz tablosu .....	71
<b>Tablo 5.19.</b> Grup-NR2B rs1042339 çapraz tablosu .....	71
<b>Tablo 5.20.</b> Grup-NR2B rs890 çapraz tablosu .....	72

<b>Tablo 5.21.</b> Grup-TP53 R72P çapraz tablosu.....	72
<b>Tablo 5.22.</b> Asosiyasyon testi.....	73
<b>Tablo 5.23.</b> Regresyon modelleri.....	74
<b>Tablo 5.24.</b> Çalışılan polimorfizmler ile çoklu doğrusal regresyon analizleri .....	75
<b>Tablo 5.25.</b> Gruplara göre anlamlı polimorfizmler .....	76
<b>Tablo 5.26.</b> CC-(CT+TT) genotipleri çapraz tablosu .....	77
<b>Tablo 5.27.</b> CC-(CT+TT) genotipleri arasında risk değerlendirmesi .....	77
<b>Tablo 5.28.</b> Başlangıç yaşı-genotip istatistikleri.....	78
<b>Tablo 5.29.</b> Varyansların eşitliği için Levene testi .....	78
<b>Tablo 5.30.</b> Bağımsız Örnekler T testi.....	79
<b>Tablo 5.31.</b> Başlangıç yaşı-genotip istatistikleri.....	80
<b>Tablo 5.32.</b> Varyansların eşitliği için Levene testi .....	80
<b>Tablo 5.33.</b> Bağımsız Örnekler T testi.....	81
<b>Tablo 5.34.</b> GG-(GC+CC) genotipleri çapraz tablosu.....	82
<b>Tablo 5.35.</b> GG-(GC+CC) genotipleri arasında risk değerlendirmesi .....	82
<b>Tablo 5.36.</b> Başlangıç yaşı-genotip istatistikleri.....	83
<b>Tablo 5.37.</b> Varyansların eşitliği için Levene testi .....	83
<b>Tablo 5.38.</b> Bağımsız Örnekler T testi.....	84
<b>Tablo 5.39.</b> GG-(AA+AG) genotipleri çapraz tablosu .....	85
<b>Tablo 5.40.</b> GG-(AA+AG) genotipleri arasında risk değerlendirmesi .....	85
<b>Tablo 6.1.</b> CAG tekrar sayılarına göre hastalık başlangıç yaşlarının gruplandırılması.....	90
<b>Tablo 6.2.</b> Hastalık başlangıç yaşı ve CAG tekrar sayıları.....	91
<b>Tablo 6.3.</b> Çeşitli popülasyonlarda CAG tekrarlarının başlangıç yaşına etkisi.....	92
<b>Tablo 6.4.</b> CAG tekrar grupları ve tekrarların başlangıç yaşına katkısı .....	93
<b>Tablo 6.5.</b> Hasta ve Kontrol grubunda gözlenen ve beklenen değerler.....	95
<b>Tablo 6.6.</b> Genotipik ve Alelik frekansların SNPdb verileri ile karşılaştırılması....	97
<b>Tablo 6.7.</b> Araştırılan SNP'lere ait bilgiler.....	99
<b>Tablo 6.8.</b> NR1 rs6293 genotipleri ve ilişkili başlangıç yaşı .....	101
<b>Tablo 6.9.</b> NR2A rs1969060 genotipleri ve ilişkili başlangıç yaşı .....	102
<b>Tablo 6.10.</b> NR2B rs1806201 genotipleri ve ilişkili başlangıç yaşı.....	103
<b>Tablo 6.11.</b> NR2B rs890 genotipleri ve ilişkili başlangıç yaşı .....	104
<b>Tablo 6.12.</b> TP53 R72P genotipleri ve ilişkili başlangıç yaşı .....	107

## KISALTMALAR LİSTESİ

<b>µl</b>	mikrolitre
<b>µm</b>	mikrometre
<b>GRIN</b>	<i>Glutamate receptor, ionotropic, N-methyl D-aspartate</i>
<b>8-OHdG</b>	8-hidroksi-deoksiguanozin
<b>AA</b>	Amino Asit
<b>bç</b>	Baz çifti
<b>BY</b>	Başlangıç yaşı
<b>CAG</b>	Sitozin-adenin-guanin
<b>dNTP</b>	Deoksiribonükleotid
<b>EDTA</b>	Etilen diamintetraasetik asit
<b>HD</b>	<i>Huntington's Disease</i>
<b>HH</b>	Huntington Hastalığı
<b>htt</b>	huntingtin
<b>HW</b>	<i>Hardy-Weinberg</i>
<b>IT-15</b>	<i>Important Transcript 15</i>
<b>kDa</b>	Kilo Dalton
<b>MDA</b>	Malondialdehit
<b>MSN</b>	Orta boy dikensi striatal nöronlar
<b>MSS</b>	Merkezi Sinir Sistemi
<b>mtDNA</b>	Mitokondriyal DNA
<b>NMDA</b>	N-Metil-D-Aspartat
<b>NMDAR</b>	N-Metil-D-Aspartat Reseptörü
<b>PCR</b>	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
<b>PoliQ</b>	Poliglutamin
<b>RFLP</b>	Restriksiyon Fragman Uzunluk Polimorfizmi
<b>RGDE</b>	Hızlı Genomik DNA İzolasyonu
<b>U</b>	Ünite
<b>UPS</b>	Übikülin-Proteozom Sistemi
<b>UV</b>	Ultraviyole

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

**GRIN1, GRIN2A, GRIN2B ve TP53 LOKUSLARINDAKİ  
POLİMORFİZMLERİN HUNTINGTON HASTALIĞI'NIN  
BAŞLANGIÇ YAŞINA ETKİLERİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Hazırlayan  
Aysun AÇAR

Tez Danışmanı  
Yrd. Doç. Dr. Nagehan ERSOY

**ÖZET**

Huntington Hastalığı (HH) istemsiz hareketler, bilişsel kayıplar ve duygusal bozukluklar ile karakterize edilen, otozomal dominant kalıtmımlı nörolojik bir hastalıktır. Hastalığa sebep olan mutasyon, IT-15 geninin 1. eksonundaki artmış CAG tekrarlarıdır. Hasta bireylerde başlangıç yaşı, hastalık süreci ve semptomlar farklılık gösterebilir. CAG tekrarlarının uzunluğu HH'nin başlangıç yaşının belirlenmesinde en önemli faktördür, fakat salt CAG sayısı ile başlangıç yaşındaki varyansın sadece %40-70'i açıklanabilir. Başlangıç yaşını etkileyen birçok genetik ve çevresel faktörler ileri sürülmüştür. Çok sayıda araştırma NMDA glutamat reseptörlerinin (NMDAR) HH'nda nörodejenerasyona katkıda bulunduğunu ortaya koymuştur. Bu reseptörler kalsiyum akışını sağlarlar ve aşırı aktive olduklarında proteazları, lipazları ve DNazları aktive ederek nöronal hücre ölümüne yol açabilirler. Apoptoz da HH'nda görülen olası hücre ölümü mekanizmalarındandır.



TP53 R72'nin apoptozu hücre kültürü modellerinde arttırdığı bulunmuştur. Bu yüzden NMDA reseptörleri ve TP53 genleri HH'nda başlangıç yaşını etkileyebilecek önemli adaylardır.

Bu çalışmada IT-15 CAG tekrarlarının, NMDAR genlerindeki NR1 rs 6293, NR2A rs1969060, NR2B rs1806201, rs1042339, rs890 ve TP53 genindeki R72P polimorfizmlerinin Türk Huntington hastalarında başlangıç yaşına etkisinin araştırılması hedeflenmiştir. Türk Huntington hastalarıyla ilk defa gerçekleştirilen bu çalışmada CAG tekrar sayısının başlangıç yaşına etkisi % 41.8 olarak belirlenmiştir. Diğer taraftan rs6293, rs1969060, rs1806201, rs1042339, rs890 polimorfizmlerinin başlangıç yaşına modifiye edici bir etkilerinin olmadığı bulunmuştur. TP53 R72P varyasyonunun ise başlangıç yaşına önemli etkisinin olduğu gösterilmiş ve başlangıç yaşını belirlemedeki katkısı %2.9 olarak belirlenmiştir. Bu polimorfizm, başlangıç yaşında gözlemlenen ve CAG tekrar sayısı dışında açıklanamayan varyansın % 4.98'ini açıklayabilmektedir.

**Anahtar Kelimeler:** Huntington Hastalığı, başlangıç yaşı, NMDA reseptörü, TP53, polimorfizm

## SUMMARY

Huntington's disease (HD) is an autosomal dominantly transmitted neurological disorder characterized by involuntary movements, cognitive impairment and emotional disturbances. The underlying mutation is the expansion of the CAG repeats in the exon 1 of the IT-15 gene. The patients may differ in their age of onset (AO), disease duration and symptoms. The length of the CAG repeats is the most important factor in determining the AO of HD; however, only about 40–70% of the variance in AO is explained by the CAG repeats alone. Evidence has been provided for genetic modifiers as well as for environmental factors affecting AO. Numerous studies have suggested that the NMDA glutamate receptors (NMDAR) might contribute to neurodegeneration in HD. These receptors permit influx of calcium, and when over-activated, can lead to neuronal death by activating proteases, lipases, and DNAses. Also, apoptosis is one of the possible mechanisms for neuronal cell death in HD. It has been shown that TP53 R72 increased apoptosis in cell culture models. Thus, the polymorphisms in NMDAR and TP53 genes are the likely candidates affecting AO in HD.

We aimed to investigate the effects of IT-15 CAG repeats, NR1 rs 6293, NR2A rs1969060, NR2B rs1806201, rs1042339, rs890 and TP53 R72P on AO in Turkish HD patients. In this very first study with Turkish HD patients, contribution of the CAG repeat length on AO was found to be 41.8%. On the other hand, rs6293, rs1969060, rs1806201, rs1042339, rs890 polymorphisms were shown not to have a modifier effect AO in HD. We obtained a significant influence of the TP53 R72P variation, and the contribution of this polymorphism to the variation in AO was found to be 2.9%. This polymorphism can explain 4.98% of the the remaining variation in AO.

**Key words:** Huntington's Disease, age of onset, NMDA receptor, TP53, polymorphism

# 1. GİRİŞ

## 1.1. Huntington Hastalığı'nın Tarihçesi

Huntington Hastalığı (HH) beyinde striyatal nöron kayıplarına bağlı olarak görülen koreik hareketler, bilişsel kayıplar ve psikolojik bozukluklarla ortaya çıkan, otozomal dominant kalıtmımlı nörolojik bir hastalıktır (Gusella ve MacDonald, 1995). Huntington Hastalığı ilk kez Amerikalı hekim George Huntington tarafından 1872 yılında "On Chorea" isimli makalesinde tanımlanmıştır. Bu makalede hastalığın kalıtsal doğası, yetişkinlik döneminde ortaya çıkması ve kişilerin akıl hastalığına ve intihara yatkınlıkları gibi önemli özellikleri belirtilmiş ve böylece hastalık kore ile belirgin olan diğer hareket bozukluklarından ayrılmıştır (Huntington, 1872). Dr. George Huntington bu hastalığa Kalıtsal Kore adını vermiş olmasına rağmen, hastalık daha sonra kendi adıyla anılmıştır. Hastalığın tanımlanmasından yaklaşık 100 yıl sonra, 1983 yılında, ilgili genin (IT-15) 4. kromozomun kısa kolunda lokalize olduğu belirlenmiştir. IT-15 geni pozisyonel klonlama yöntemi ile klonlanan ilk dominant geçişli gendir. (Gusella vd., 1983). IT-15 geninin tanımlanması, klonlanması ve karakterizasyonu 1993 yılında gerçekleştirilmiş ve hastalığa sebep olan mutasyonun bu gendeki CAG baz tekrarlarının normalden daha fazla sayıda olması olduğu açıklanmıştır (Huntington's Disease Collaborative Research Group, 1993). Günümüze kadar Huntington Hastalığı'na yol açan moleküler mekanizmalar, başlangıç yaşı, gen penetransı ve huntingtin proteini ile ilgili bir çok çalışma gerçekleştirilmiştir. Hastalığın anlaşılmasında önemli gelişmeler olmasına rağmen, patolojik mekanizması tam olarak açıklanamamış ve henüz etkin bir tedavi yöntemi geliştirilememiştir.

## 1.2.Huntington Hastalığı'nın Epidemiyolojisi

Huntington Hastalığı çeşitli coğrafik bölgelerde ve çeşitli etnik popülasyonlarda gözlenir. Genel Avrupa popülasyonunda görülme sıklığı sabit ve 1/10 000'dir (Morrison vd., 1995). Güney Avrupa'da ve Doğu İngiltere'de göreceli olarak yüksek prevalans (4-8/100 000) gözlemlenmektedir (Caro, 1977). Japon, Çin ve Fin popülasyonlarında görülme oranı ise daha düşüktür (1/100 000). Amerikan siyahi popülasyonu ve Afrika popülasyonları da benzer olarak düşük prevalans gösterirler (Harper 1992, Walker 2007).

Popülasyonlarda en sık rastlanan aleller 15-20 CAG tekrarına sahiptir (Rubinsztein vd., 1996). Batı Avrupa popülasyonlarındaki tekrar dağılımı daha uzun alellere doğru kayma göstermiştir. Bunun aksine, Afrika ve Asyalılarda uzun aleller daha nadir görülür (Watkins vd., 1995). Bu durum, artmış CAG tekrarlı alellerin uzun-normal alellerden türediğini ortaya koymaktadır ve bu sebeple genin Batı Avrupa orijinine sahip olduğu düşünülmektedir (Squitieri vd., 1994). Yeni mutasyonların görülmesi ise oldukça nadirdir (Myers, 1993). Hastalığın görülme sıklığında herhangi bir cinsiyet eğilimi belirtilmemiştir.

## 1.3. Huntington Hastalığı'nın Klinik Özellikleri

Huntington hastalarında klinik belirtiler ve belirtilerin ortaya çıktığı yaş oldukça farklılık gösterir (James vd., 1994). Erken klinik belirtilerin çok çeşitli olması ve bazen de atipik başlangıcı olmasından dolayı Huntington Hastalığı'nın klinik tanısı özellikle erken aşamalarında zordur (Squitieri vd., 2000). İlk klinik belirtilerin 30-40'lı yaşlarda görülmesi sebebiyle HH geç başlangıçlı bir hastalık olarak tanımlanır. Hastalık, başlangıç yaşından sonra 15-20 yıl kadar devam eder ve hastanın kaybıyla sonlanır. En sık görülen ölüm nedeni koreik hareketler sonucu gelişen halsizliği takiben görülen kardiyovasküler rahatsızlıklar ve pnömonidir. Yemek yerken boğulma ve intihar da sıklıkla görülen ölüm nedenleri arasında sayılabilir (Sorensen vd., 1992; Warby vd., 2007).



Huntington Hastalığı aleli taşıyan risk altındaki bireyler hastalığın başlangıcından önce belirlenebilir klinik özellikler göstermezler. Presemptomatik olarak adlandırılan bu evrede motor ve kavrama yeteneklerinde ve kişilikte göze çarpmayan değişiklikler olduğu da ileri sürülmüştür. Huntington Hastalığı belirtileri hastalar arasında değişiklik göstermekle birlikte (Myers, 2004; Walker, 2007) temel özellikler hareket bozukluğu, bilişsel bozukluklar ve davranış değişiklikleri olmak üzere üç ana grupta toplanabilir.

İstemsiz, sıçramalar şeklinde düzensiz, kore tarzındaki hareketlerden meydana gelen ve kore adı verilen hareket bozukluğu, hastalığın ana işaretidir. Bunun yanı sıra parkinsonizm, ataksi ve distoni gibi başlangıç semptomları da gözlenebilir (Emre vd., 2003; Revilla ve Grutzendler, 2008; Squitieri vd., 2000; Warby vd., 2007;). Bilişsel bozukluklar da HH'nın karakteristik özellikleri arasında yer alır fakat progresyon hastalar arasında farklı derecelerde olabilir. Demans ve psikiyatrik bozukluklar da fonksiyonel bozukluğun erken ve önemli belirteçleridir. Kavramanın yavaşlaması, entelektüel fonksiyonların azalması ve hafıza problemleri hastalığın daha ileri aşamalarında gözlenir (Revilla ve Grutzendler, 2008, Warby vd., 2007;). Psikiyatrik semptomlar arasında depresyon daha sık gözlenirken, hastaların az bir kısmı bipolar bozukluğun karakteristik bir özelliği olan episodik nöbetler geçirirler. Huntington hastalarında ayrıca psikoz, obsesif-kompulsif semptomlar, uyku bozuklukları ve kişilik değişimleri gözlenir. Presemptomatik ve semptomatik bireylerde depresyon görülme oranı normal popülasyondan iki kat fazladır (Marshall vd, 2007; Paulsen vd., 2005); intihar ve intihar fikri hasta bireylerde yaygındır (Almqvist vd., 1999; Larsson vd., 2006).

Juvenil HH ise hastalığın 21 yaşından önce görülen tipidir ve tüm vakaların %5-10'unu oluşturur (Nance ve Myers, 2001; Gonzalez-Alegre vd., 2006). Juvenil HH sıklıkla paternal kalıtım ve çok sayıda CAG tekrarıyla (60 ve daha fazla) ilişkilidir (Telenius vd., 1993). Bu durumda daha az koreik hareketler görülürken, daha progresif rijitide, distoni ve nöbetlere rastlanır. Erişkin hastalarda olduğu gibi motor, bilişsel ve psikiyatrik bozukluklar juvenil hastalarda da görülür, ancak hastalığın seyri daha hızlıdır.

## 1.4. Huntington Hastalığı'nın Genetiği

### 1.4.1. IT-15 Geni

IT-15 geni 180 kb büyüklüğünde, uzunlukları 48-341 bç arasında değişen (ortalama 138 bç) 67 eksondan meydana gelen bir genidir (Ambrose vd., 1994). Genin 10.3 kb ve 13,7 kb büyüklüklerinde, farklı poliadenilasyondan kaynaklanan iki alternatif transkripti vardır. Bu transkriptler çeşitli fatal ve erişkin dokularda değişen oranlarda ifade edilir (Lin vd., 1993). 567 bç'den oluşan 1. eksonda ATG start kodonundan 17 kodon sonra polimorfik bir CAG tekrar bloğu bulunmaktadır (Huntington's Disease Collaborative Research Group, 1993). CAG tekrarlarının sayısındaki normalden fazla artış HH'na yol açar. Bu bölgeden sonra daha az polimorfik olan ve prolin kodlayan CCG tekrarları (7-12 tekrar) bulunmaktadır (Andrew vd., 1993). 58. eksonda kodon-kayıbı polimorfizmi ( $\Delta 2642$  GAG) de nadir olarak görülmektedir. Bu kayıp için homozigot olan normal bireyler bulunduğundan, bu polimorfizmin hastalıkla ilişkili olduğu düşünülmemektedir. (MacDonald vd., 1992, Vuillaume vd., 1998).

Huntingtin geni transkripti çok sayıda omurgalı ve omurgasız türlerde karakterize edilmiştir, maya ve düşük ökaryotlarda bulunmamaktadır. İnsan IT-15 geni türler arasında yüksek derecede korunmuştur. Fare (Barnes vd., 1994), sıçan (Schmitt vd., 1995), kirpi balığı (Baxendale vd., 1995), zebra balığı (Karlovič vd., 1998) ve domuzda (Matsuyama vd., 2000) %80-95 homoloji göstermektedir. *D. melanogaster*'de bulunan huntingtin ise daha az korunmuştur (Li vd., 1999).

### 1.4.2. Kalıtım ve Mutasyon

Huntington Hastalığı otozomal dominant şekilde ve tam penetransla kalıtlıdır (Myers, 2004). Etkilenmiş bireylerin artmış geni çocuklarına aktarma ihtimali %50'dir. Etkilenmiş homozigotlar klinik olarak heterozigotlarla aynı özellikleri gösterdiğinden dolayı HH kalıtımında gerçek dominant patterni gösterir (Gusella ve MacDonald, 2006). Huntington Hastalığı'na sebep olan mutasyon, IT-15 geninin 1.

eksonunda bulunan ve ileri derecede polimorfik olan CAG tekrarlarının sayısındaki artıştır.

Normal kromozomlar 6-35 CAG tekrarı içerir ve sağlıklı bireylerde CAG tekrar sayısı ortalama olarak 18-19'dur. Hastalık kromozomları ise 36-250 CAG tekrarı taşır (Huntington's Disease Collaborative Research Group, 1993). Normal aleller stabildir ve böylece Mendel kalıtımı ile iletilirken CAG tekrar sayıları sabit olarak kalır. 26 ve daha az sayıda tekrara sahip bu aleller hastalıkla ilişkili değildir ve sayıca artış göstererek hastalık meydana getirmezler (ACMG/ASHG Statement 1998; Duyao vd., 1993).

27-35 tekrar taşıyan bireylerde HH görülmez, fakat bu aralıkta tekrara sahip aleller mayotik instabilite gösterdiklerinden bir sonraki jenerasyonda artışa uğrayıp hastalığa sebep olabilirler. Bu aleller dinamik mutasyonla bir sonraki jenerasyonda hastalık aleline dönüşebildiklerinden intermedya alel adını almışlardır (ACMG/ASHG Statement, 1998; Rubinstein vd., 1996; Telenius vd., 1995). Bu instabilitenin replikasyon, rekombinasyon ve tamir fonksiyonlarındaki hatalardan kaynaklandığı ileri sürülmektedir (Goldberg vd., 1995; MacDonald vd., 1993; Telenius vd., 1993; 1994; 1995;). Transmisyon sırasında aleli aktaran ebeveynin cinsiyeti de tekrar sayısı değişiklikleri üzerinde etkilidir. Alel anne tarafından aktarıldığında tekrar sayısı ortalama olarak aynı kalma eğiliminde, fakat baba tarafından aktarıldığında uzama eğilimindedir (Myers, 1983). Büyük ekspansiyonlar (>7 CAG tekrarı artışı) neredeyse tamamen paternal transmisyonla gerçekleşir. Juvenil başlangıçlı HH'na sahip olan bireyler ekspansiyon olmuş aleli genellikle babalarından, nadiren annelerinden alırlar (Nahhas vd., 2005).

36-39 tekrar arası ise HH riskiyle belirli ölçülerde ilişkilendirilmiştir Bu aralıkta penetrans tam değildir ve tekrar sayısı arttıkça penetrans da artar (McNeil vd., 1997; Rubinstein vd., 1996; Quarrell vd., 2007). 40 ve daha fazla CAG tekrarına sahip bireyler kesinlikle HH patolojisi geliştirirler (Huntington's Disease Collaborative Research Group, 1993). Huntington Hastalığı direkt moleküler tanısı mümkün olan ilk geç başlangıçlı hastalıktır. Direkt mutasyon analizinde IT-15 genindeki CAG tekrar bölgesi PCR ile amplifiye edilir ve ürünlerin boyu

elektroforezle belirlenir. CAG tekrarlarının kesin sayısı fragment analizi veya Southern blotlama yöntemleri ile belirlenir (ACMG/ASHG statement, 1998; Ersoy, 2007; Margolis ve Ross, 2003).

### **1.4.3. Hastalık Başlangıç Yaşı**

CAG tekrar sayısı ile başlangıç yaşı arasında güçlü bir negatif ilişki vardır. CAG uzunluğu arttıkça semptomlar daha erken yaşlarda başlar ve en fazla tekrar sayılarına juvenil Huntington hastalarında rastlanır. Başlangıç yaşının daha erken olması ile birlikte daha ağır seyreden hastalık fenomenine antisipasyon adı verilir (Ranen vd., 1995). Hastalık başlangıç yaşı ile tekrar sayısı arasındaki negatif ilişki, yüksek tekrar sayıları için daha güçlü ve daha düşük tekrar sayıları için daha zayıftır. Bu durum da CAG tekrar uzunluğunun juvenil başlangıçta ana belirleyici olmasına rağmen, geç başlangıçlı Huntington hastalarında CAG tekrar uzunluğundan başka faktörlerin de başlangıç yaşını etkileyebileceğine işaret etmektedir (Nance, 1996). Bunun yanı sıra, CAG tekrar sayısı ile hastalık süresi arasında bir ilişki yoktur. Bu da semptomların başlangıcından ölüme kadar işleyen mekanizmalardan ziyade, HH patogenezi başlatan mekanizmaların CAG tekrar sayısına bağlı olduğunu düşündürmüştür (Gusella ve MacDonald, 2006).

#### **1.4.3.1. Çevresel Faktörlerin Hastalık Başlangıç Yaşına Etkisi**

Artmış CAG tekrarlarının başlangıç yaşına etkisi açıktır, fakat ara değerler için tahmin edici değeri düşüktür. Bu yüzden çevresel faktörler, cinsiyet veya diğer etkileşen genlerin de başlangıç yaşını ve hastalık sürecini değiştirebileceği ileri sürülmüştür. Örneğin Venezuela soyu için tahmin edilen diğer genetik faktörleri ve paylaşılan ve paylaşılmayan çevreyi de göz önünde bulundurarak oluşturulan modelde başlangıç yaşındaki CAG tekrarlarından kalan varyansın %60'ının çevresel olduğu belirlenmiştir (Wexler, 2004). Transgenik fare modellerinden gelen kanıtlar da bu hipotezi desteklemektedir. Transgenik R6/1 ve R6/2 HH farelerinin çevresel ortamlarının zenginleştirilmesi motor semptomlarının başlangıcının ve serebral

hacim kaybının gecikmesine neden olmuştur (Hockley vd., 2002; van Dellen vd., 2000;). Disakkarit yapısında olan trehaloz maddesinin koruyucu rolü de çevresel faktörlerin başlangıç yaşı üzerinde etkileri olduğu hipotezini desteklemektedir (Metzger vd., 2006). Kanabinoidler de çeşitli çalışmalarda koruyucu etki göstermişlerdir (Aiken vd., 2004; Sagredo vd., 2007). Çevresel zenginleştirmenin sinaptik plastisiteyi etkilediği ve spesifik genlerin transkripsiyonunu arttırdığı, böylece nörogenezi etkilediği düşünülmektedir. Çevresel stimülasyon tabanlı terapi uygulanan Huntington hastalarında fiziksel, mental ve sosyal fonksiyonların arttığı görülmüştür. Böylece gen-çevre etkileşimleri ile ilişkili terapötik uygulamaların geliştirilebileceği ortaya koyulmuştur (Coppede vd., 2006).

#### **1.4.3.2. Ebeveynin Cinsiyetinin Başlangıç Yaşına Etkisi**

Nesiller arası transmisyon sırasında mutant aleli aktaran ebeveynin cinsiyeti, tekrar sayısı değişiklikleri üzerinde etkilidir; bu yüzden HH'nda başlangıç yaşını da etkileyebileceği düşünülmektedir. Örneğin aktarım anne tarafından gerçekleştirildiğinde tekrar sayısı ortalama olarak aynı kalmakta, fakat alel baba tarafından aktarıldığında tekrar sayısında sıklıkla artış görülmekte ve dolayısıyla başlangıç yaşı babaya göre daha erken olmaktadır (Ridley vd., 1988; Went vd., 1984). Genelde baba-çocuk çiftlerinin %69'u, anne-çocuk çiftlerinin de %32'si CAG tekrar ekspansiyonları göstermiştir. Maternal transmisyonların %2'sinden azı beş tekrardan fazlasını aktarırken, paternal transmisyonların %21'i yediden fazla tekrar artışı göstermiştir (Kremer vd., 1995). Bir çalışmada başlangıç yaşının anne tarafından aktarılan, aynı patolojik uzunluğa sahip tekrarın, baba tarafından aktarılması durumundan iki yıl geç olduğu bulunmuş, fakat normal alelin herhangi bir önemli etkisi görülmemiştir (Duyao vd., 1993).

#### **1.4.3.3. Gen Polimorfizmlerinin Hastalık Başlangıç Yaşına Etkisi**

Bir çok çalışmada HH'nın başlangıç yaşını etkileyebilecek olası genlerde çok sayıda polimorfizm tanımlanmıştır. Bu genlerdeki polimorfizmlerin sağlıklı

bireylerde bir etki göstermezken, hasta bireylerde hastalık seyrini etkiliyor olabileceği düşünülmektedir (Metzger vd., 2006). Başlangıç yaşını etkileyen faktörleri belirleyebilmek için genom taramaları yapılmış veya hastalığın patogenezinde rol aldığı düşünülen genlerin analizleri yapılmıştır. Bağlantı analizleri vasıtası ile hastalık başlangıç yaşıyla ilişkilendirilebilecek çeşitli kromozomal bölgeler tanımlanmış ve kromozom 4p16, 6q22, 5p14 ve 5q32 lokuslarının ilişkili olabileceği belirlenmiştir (Gaya'n vd., 2008). 629 kişide yapılan tüm genom taramasında ise LOD skoru 1,5'tan büyük olan altı bölge (2q33, 4p16, 5q31-32, 6p22, 6q23-24, 18q22) tanımlanmıştır (Li vd., 2003). Bu bulguları onaylamak için yapılan diğer bir çalışmada ise 6q23-24 ve 18q22 lokusları için kanıt bulunurken, 2q33, 4p16, 5q31-32 ve 6p22.3 için kanıt bulunamamıştır (Li vd, 2006).

#### **1.4.3.4. IT-15 Genindeki Polimorfizmlerin Başlangıç Yaşına Etkisi**

Genom taramaları HH'nın başlangıç yaşıyla bağlantılı en yüksek LOD skorlardan birini 4p16'da gösterdiğinden dolayı IT-15 geninin CAG tekrar bölgesi haricindeki bölgelerinin de başlangıç yaşına etkisi olabileceği düşünülmüştür. Örneğin Huntington hastaları D4S10 lokusundaki çeşitli polimorfizmler için genotiplenmiş ve benzer başlangıç yaşına sahip kardeşlerin normal ebeveyninden aynı D4S10 alelini aldığı gözlenmiştir (Farrer vd., 1993).

Huntington Hastalığı'nda normal alelin uzunluğunun etkisi çeşitli çalışmalarla araştırılmıştır (Andrew et al. 1993; Duyao vd., 1993; Rubinsztein vd., 1996; Snell vd., 1993;). Normal alelin uzunluğunun başlangıç yaşı üzerine etkisi Galler popülasyonunda anne tarafından kalıtım durumunda (normal alelin babadan geldiği) rapor edilmiştir (Snell vd., 1993). Bu bulguları onaylayan başka çalışmalar da bulunmaktadır. (Kehoe vd., 1999). Patolojik tekrar uzunluğunun normal tekrar uzunluğuna oranı, normal tekrar uzunluğunun olduğu gibi başlangıç yaşı için önemli olabilir. Huntingtin proteini diğer çeşitli proteinlerle poliglutamin uzunluğuna bağlı olarak etkileşir ve daha uzun tekrarlı huntingtin bazı proteinlere daha güçlü bağlanır (Li vd., 1995). Eğer hastalık fenotipi HH'nda daha yüksek bağlanma afinitesinden ortaya çıkıyorsa daha uzun normal poliglutamin bloğu (daha küçük

normal/ekspansiyon oranı) ekspansiyon olmuş proteinle daha iyi yarışabilir ve böylece daha az anormal etkileşime neden olup, başlangıç yaşını geciktirebilir (Kehoe vd., 1999).

IT-15 genindeki polimorfik CCG tekrarları, CAG tekrarına komşu bir prolin tekrar bölgesi kodlar ve huntingtinin diğer proteinlerle etkileşiminde rolü olabileceği düşünülmüştür. Chattopadhyay ve ark. tarafından yapılan çalışmada CCG tekrar polimorfizminin de başlangıç yaşına küçük fakat istatistiksel olarak önemli bir etki gösterdiği bulunmuştur. (Chattopadhyay vd., 2003). CCG polimorfizminin çeşitli klinik özellikler üzerine etkisini değerlendirmek amacıyla yapılan bir çalışmada bu polimorfizmin semptomların doğasını değiştirmede fakat başlangıç yaşını etkilediği görülmüştür (Vuillaume vd., 1998). Farklı bir çalışmada 176 bp haricindeki CCG-zengin aleller Huntington hastalarında daha az bulunmuş fakat bu alellerin başlangıç yaşına etkisi ise belirlenmemiştir (Novelletto vd., 1994). Bu korelasyon Venezuela örneklerinde de tekrar edilememiştir (Wexler vd., 2004). (CCG)<sub>7</sub> homozigotları daha yüksek başlangıç yaşı göstermesine rağmen bu bulgu istatistiksel öneme ulaşamamıştır (Andresen vd., 2006).

HH geninde  $\Delta 2642$  polimorfizminin iki aleli vardır (Ambrose vd., 1994). İnsersiyon aleli 2642. kodonda başında dört glutamin kodlar, delesyon aleli ise 3 glutamin kodlar. Delesyon aleli normal kromozomların %7'sinde bulunurken, hasta kromozomlarında %38 oranında bulunur. Böylece  $\Delta 2642$  polimorfizmi için heterozigot olan Huntington hastalarının %89'u delesyonu hasta kromozomda taşımaktadır. Bu nedenle başlangıç yaşı için bir aday polimorfizm olarak araştırılabilir (Rubinsztein vd., 1997). IT-15 geninde  $\Delta 2642$  glutamik asit polimorfizmlerinin çeşitli klinik özellik üzerine etkisini değerlendirmek amacıyla yapılan bir çalışmada polimorfizmin semptomların doğasını değiştirmede, fakat başlangıç yaşını etkiledikleri görülmüştür (Vuillaume vd., 1998). Diğer bir çalışmada ise  $\Delta 2642$  ile başlangıç yaşı arasında bir ilişki bulunmamıştır (Djousø vd., 2004). Bir replikasyon çalışmasında da  $\Delta 2642$  polimorfizmi başlangıç yaşına ek bir katkı göstermemiştir, heterozigotlarla homozigot bireyler arasında başlangıç yaşı farklı bulunmamıştır (Andresen vd., 2006).

### 1.4.3.5. Hastalık Başlangıç Yaşını Etkileyen Diğer Polimorfizmler

Çeşitli çalışmalarda HH'nin başlangıç yaşını etkileyebilecek birçok aday gen ortaya koyulmuş ve bu genlerde birçok polimorfizm tanımlanmıştır. Huntington Hastalığı ile ilişkili olabilecek genetik polimorfizmler ve alınan sonuçlar Tablo 1.1.'de özetlenmiştir.

#### 1.4.3.5.1. NMDAR Alt Ünitelerinde Görülen Polimorfizmler

Huntington Hastalığı'nda beyindeki nöronlar, özellikle de orta boy dikensi striatal nöronlar (MSN) dejenerasyon prosesine hassastır. Nöronal ölüm, neokorteks ve lateral hipotalamus dahil olmak üzere beyin çeşitli bölgelerinde GABA-erjik orta boy dikensi projeksiyon nöronlarının dramatik kaybı ile görülür. Bu nöronlar korteksten glutamaterjik ve substantia nigradan dopaminerjik giriş alırlar. Huntington Hastalığı'nda bu nöronların kaybını açıklamak üzere kortikal aferentlerden glutamat salınımı ve glutamat reseptörlerinin aktivasyonu aracılığıyla eksitotoksik hücre ölümü öne sürülmüştür (Schwarcz vd., 1976). Çeşitli araştırmalar glutamat reseptörlerinin NMDA alt kümesinin HH'nda nörodejenerasyona katkıda bulunduğunu ileri sürmüştür. Bu reseptörler kalsiyum akışına izin verir ve gereğinden fazla aktive olduklarında protezları, lipazları ve DNazları aktive ederek nöronal ölüme yol açabilirler.

NMDA reseptörü (NMDAR) kodlayan genlerin multimerik komplekslerinin HH başlangıç yaşını modüle edebilecek adaylar olup olmadığı araştırılmıştır (Andresen vd., 2006; Arning vd., 2005a; Arning vd., 2007;). NR1 alt ünitesini kodlayan GRIN1 genindeki rs6293 polimorfizmi (789 A/G), NR2A alt ünitesini kodlayan GRIN2A genindeki rs1969060 (1430216 C/T) ve GRIN2A promotorundaki (GT)<sub>n</sub> tekrarı, NR2B alt ünitesini kodlayan GRIN2B geninde rs1806201 (C2664T), rs1042339 (3501G/A), rs890 (5072 T/G), NR2C alt ünitesini kodlayan GRIN2C genindeki rs690533 polimorfizmleri ve GRIN2D genindeki (TG)<sub>n</sub> tekrarının HH başlangıç yaşı ile ilişkisi değerlendirilmiştir. Bu çalışmalarda NR2A ve NR2B alt ünitelerini kodlayan GRIN2A ve GRIN2B lokuslarındaki ilgili



polimorfizmlerin başlangıç yaşında gözlemlenen varyanslara katkıda bulunduğu ortaya koyulmuştur. Tablo 1.2.'de başlangıç yaşına etkisi araştırılan NMDAR polimorfizmleri ve bulunan sonuçlar verilmiştir.

**Tablo 1.1.** Başlangıç yaşını etkileyen genler ve polimorfizmler

Gen/Polimorfizm	Sonuç	Kaynak
MSX1 (dinükleotid tekrarı) 173/173 bç	+	Djoussé vd., 2004
BJ56 (dinükleotid tekrarı)	-	Djoussé vd., 2004
hCAD / R196K	+	Chattopadhyay vd., 2004
	-	Andresen vd., 2006
	-	Arning vd., 2005
ApoE / ε2, ε3, ε4	ε2ε3 +	Kehoe vd., 1999
	ε4 +	Panas vd., 1999
	-	Saft vd., 2004
	-	Andresen vd., 2006
BDNF / Val66Met	-	Kishikawa vd., 2006
	+	Alberch vd., 2005
	-	Metzger vd., 2006
	-	Maria vd., 2006
	-	Mai vd., 2006
GRIK2 / TAA tekrarı	+	MacDonald vd., 1996
	+	Rubinsztein vd., 1997
	-	Zeng vd., 2006
	-	Arning vd., 2005
	-	Andresen vd., 2006
	+	Naze vd., 2002
UCHL1 / S18Y	+	Naze' vd., 2002
	-	Metzger vd., 2005
	-	Andresen vd., 2006
MTHFR / A1298C	+	Brune vd. 2004
	-	Hansen vd., 2005
TCERG1 / Gln-Ala tekrarı	+	Chattopadhyay vd., 2003
	+	Holbert vd., 2001
	-	Andresen vd., 2006
GSTO1 / rs4925, GSTO2 / rs2297235	-	Arning vd., 2004
HIP14(ZDHHHC17) N384S, g-886A>C, g-844G>T	-	Metzger vd., 2006
TBP / CAG tekrarı	-	Metzger vd., 2006
Presenilin-1	-	Panas vd., 1999
PGC-1α rs7665116 T>C	+	Taherzadeh-Fard vd., 2009
CtBP	(Bağlantı analizi) +	Li vd., 2003
ASK1 rs5880308	+	Arning vd., 2007
MAP2K6 rs2521354	+ (Erkeklerde)	Arning vd., 2007
HAP1 M441	+	Metzger vd., 2008

**Tablo 1.2.** Başlangıç yaşına etkisi araştırılan NMDAR polimorfizmleri ve sonuçları

NMDAR alt ünitleri genleri Gen/Polimorfizm	Sonuç	Kaynak
GRIN1 rs6293	-	Arning vd., 2005
GRIN2A rs1969060	+	
GRIN2A (GT) <sub>n</sub>	-	
GRIN2B rs1806201	+	
GRIN2B rs890	+	
GRIN2C rs690533	-	
GRIN2D (TG) <sub>n</sub> tekrarı	-	
GRIN2A rs1969060	+	Andresen vd., 2006
GRIN2B rs1806201	-	
GRIN2A rs8057394/ +	+	Arning vd., 2007
GRIN2A rs2650427/ +	+	
GRIN2B rs1806201/ +	+	

#### 1.4.3.5.2. TP53 R72P Polimorfizmi

Kromozom 17p13.1'de bulunan ve p53 proteinini kodlayan TP53 geni memelilerde en önemli tümör süpresör genidir. Çeşitli hücre içi stres sinyaller TP53'ü aktive eder ve tamir fonksiyonlarının stimülasyonu ile hücre döngüsünün geçici olarak durmasına neden olur ya da apoptozu başlatır (Vogelstein vd., 2000). p53 ve CREB binding protein (CBP) gibi huntingtin ile etkileşen birçok proteinin mutant huntingtinin oluşturduğu agregatlarda ko-lokale oldukları bulunmuştur (Steffan vd., 2000). TP53, HH başlangıç yaşını etkileyen faktörler arasında yer almak üzere ilgi çekici bir adaydır. Mutant huntingtinin patojenik poliglutaminleri barındıran N-terminal bölgesi nükleer transkripsiyon faktörleriyle etkileşime girer ve muhtemelen TP53 ile indüklenen transkripsiyonel işlevleri modüle eder (Arning vd., 2005; Steffan vd., 2000). TP53 geninde 72. kodondaki varyasyonun (R72P - Arg/Pro) hücrel transformasyonu ve apoptozu indüklemeye rolü vardır (Bonafe' vd., 2004; Thomas vd., 1999). Bir hücre modelinde tümör süpresör proteini p53'ün 72. kodonundaki arjinin kalıntısının aynı yerdeki prolin kalıntısına oranla artmış

apoptoza neden olduğu gösterilmiştir (Dumont vd., 2003). Böylece TP53 genindeki Arg72Pro polimorfizminin apoptozu ve böylece HH başlangıç yaşını değiştirebileceği düşünülmüş, ancak buna yönelik yapılan deneyler tartışmalı sonuçlar vermiş ve deneyler tekrar edilememiştir (Andresen vd., 2006; Arning vd., 2005b; Chattopadhyay vd., 2004) (Tablo 1.3.).

**Tablo 1.3.** TP53 R72P polimorfizminin HH başlangıç yaşına etkisini araştıran çalışmalar

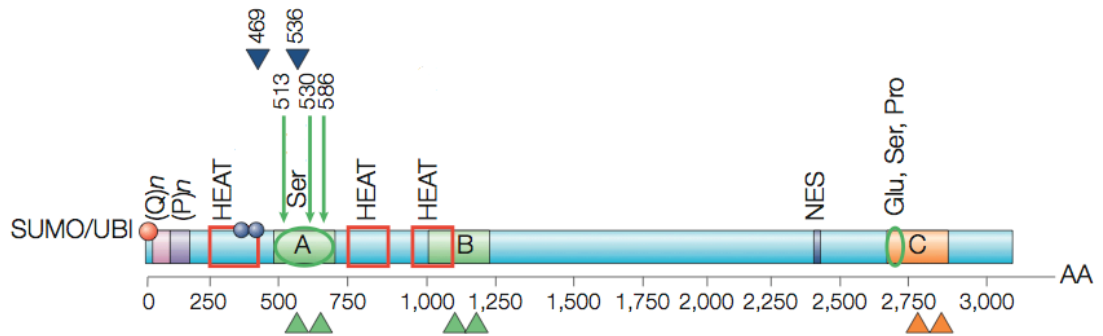
Gen/Polimorfizm	Sonuç	Kaynak
TP53 / R72P	+	Chattopadhyay vd., 2004
	-	Arning vd., 2005b
	-	Andresen vd., 2006

### 1.5. Huntingtin Proteininin Özellikleri

Huntingtin proteini 3144 amino asitten oluşan 348 kDa'luk büyük bir proteindir. Huntingtin proteini merkezi sinir sisteminde, periferel dokularda ve embriyonik gelişim sırasında tüm insan ve memeli hücrelerinde eksprese olur (Bhide vd., 1996; DiFiglia vd., 1995; Gutekunst vd., 1995; Li vd., 1993; Strong vd., 1993). Özellikle beyin ve testislerde en yüksek konsantrasyonda, karaciğer, kalp ve akciğerlerde ise orta seviyede eksprese edilir (DiFiglia vd., 1995). Beyinde ana ekspresyon bölgeleri neokorteks, serebellar korteks, striyatım ve hipokampüstür. Ancak huntingtinin beyinde ve striyatımdaki dağılımı hücre-spesifik dejenerasyonu açıklamamaktadır (Fusco vd., 1999).

Huntingtin proteininin fonksiyonel olarak en önemli kısmı, birçok transkripsiyon faktöründe de bulunan poliglutamin bölgesidir. Glutamin amino asitlerinin yan zincir ve ana zincir amidleri arasında hidrojen bağlarıyla *polar zipper* adı verilen  $\beta$ -tabakası yapıları oluşturmak üzere katlanma yaptıkları kanıtlanmış (Perutz vd., 1994) ve proteinin amiloid fibril yapısında agrege olduğu gösterilmiştir (Scherzinger vd., 1997). Poliglutamin bölgesini takiben 10 ve 11 prolin amino asiti içeren iki prolin tekrarı bölgesi gelir. Prolin dizilerini HEAT ("Huntingtin,

Elongation factor 3, protein phosphatase 2A, TOR”) tekrarları takip eder. Bu tekrarlar hidrofobik alfa heliksler oluşturan yaklaşık 40 amino asitlik sekanslardır (Andrade ve Bork, 1995; Harjes ve Wanker, 2003). HEAT motifi korunmuş bir tekrar ünitesidir ve fonksiyonu kesin olmamasına rağmen protein-protein etkileşiminde görev aldığı düşünülmektedir. Bu yapı huntingtinin multi-fonksiyonel bir protein olduğuna işaret etmektedir (Takano ve Gusella, 2002). Huntingtin proteininin C-terminal ucunda fonksiyonel olarak aktif bir çekirdek eksport sinyali (NES) bulunmuştur, fakat klasik bir çekirdek lokalizasyon sinyali (NLS) bulunamamıştır. Bu fragment hastalık patogenezi sırasında proteolitik olarak kesildiğinden dolayı (Xia vd., 2003) eksport sinyali HH’da önemli olabilir. Şekil 1.1.’de huntingtin proteininin yapısı gösterilmiştir.



**Şekil 1.1.** Huntingtin proteininin yapısı. Şekilde (Q)n poliglutamin kuyruğunu, (P)n ise poliglutamin sekansını göstermektedir. Ana HEAT tekrar kümeleri kırmızı kareler ile gösterilmiştir. Oklar kaspaz kesim yerlerini ve aminoasit noktalarını, mavi okuçları ise kapain kesim noktalarını ve aminoasit pozisyonlarını göstermektedir. B, serebral kortekste, C striyatumda ve A da ikisinde de seçici olarak kesilen bölgeleri işaret etmektedir. Yeşil ve turuncu okuçları proteaz kesimi bölgelerini göstermektedir. Mavi ve kırmızı çemberler posttranslayonal modifikasyon yerlerini gösterir: Übikütinasyon (UBI), sumolasyon (SUMO) ve serin 421 ve 434’te fosforilasyon gerçekleşir. Glutamik asit (Glu), serin (Ser) ve prolin (Pro) açısından zengin bölgeler de gösterilmiştir. NES ise nuklear eksport sinyalini işaret etmektedir (Cattaneo vd., 2005).

Huntingtin kaspaz ve kalpainler için kesim bölgeleri içerir. Mutant huntingtinin proteolize uğrayarak bu bölgelerden kesilmesinin hastalık patogenezi içinde önemli rolü

olduğu bilinmektedir (Lunkes vd., 2002; Wellington vd., 1998; Wellington vd., 2000;). Huntingtinin post-translasyonel modifikasyona da uğradığı belirlenmiştir. Örneğin amino terminal uçtaki lizinler (K6, K9 ve K15) sumolasyon ve ubikütinasyon için yarışmalar (Kalchman vd., 1996; Steffan vd., 2004;). Serin 421 ve 434 fosforilasyonu kesim ve toksisiteyi etkiler. Huntingtin ayrıca bir palmitoil transferaz olan HIP14 tarafından palmitoillenir. Palmitoilasyon vesiküler trafikte önerilen rol ile tutarlıdır, çünkü palmitoillenmiş proteinler sıklıkla vesikül trafiğini ve sinaptik vesikül fonksiyonunu kontrol eden komponentlerin dinamik toplanmasına katkı sağlar (Cattaneo vd., 2005; DiFiglia vd., 1995; Huang vd., 2004).

### 1.5.1. Huntingtin Proteininin İşlevi

Huntingtin proteininin hücrel görevleri kesinleşmiş olmasa da, bu konuda ileri sürülen görüşler ve kuvvetli kanıtlar bulunmaktadır. *Knock-out* fare kullanılarak yapılan çalışmalarda huntingtin proteini sentezleyemeyen farelerin gastrulasyondan ve sinir sisteminin oluşumundan önce, gelişimlerinin ilk 8,5 gününde ölmeleri nedeniyle, proteinin embriyonik gelişimde önemli bir rol sahibi olduğu belirlenmiştir (Duayo vd., 1995; Nasir vd., 1995; Zeitlin vd., 1995). Mutant memeli huntingtin proteininin, huntingtin *knock-out* fareyi embriyonik ölümden kurtarması (Leavitt vd., 2001) ve iki mutant alele sahip homozigot hastaların gelişimlerinin normal olması, CAG tekrarlarının embriyonik gelişim sırasında proteinin fonksiyonunu etkilemediğini göstermiştir (Myers vd., 1989; Wexler vd., 1987). Huntingtin proteinindeki poliglutamin bloğunun normal fonksiyonda önemli olmadığı ise bu dizinin evrimsel olarak korunmadığının belirlenmesiyle ileri sürülmüştür. Örneğin sıçanda 8, farede 7 glutamin bulunmaktadır ve bir CAA kodonuyla bölünmüştür. Kirpi balığında ise 2 CAG ve 2 CAA kodonları tarafından kodlanan sadece dört glutamin bulunmaktadır (Cattaneo vd., 2001; Harjes ve Wanker 2003).

### 1.5.2. Mutant Huntingtin Proteininin Özellikleri

Ekspanse olmuş poliglutamin zinciri nedeniyle proteinin katlanması ve uzaysal

konformasyonu değişir. Glutamin polar bir molekül olduğundan dolayı, fazla miktarda bulunması protein içinde ve proteinler arasında bağlantıların kurulmasına neden olur. Huntingtin molekülleri protein agregatları olarak bilinen karmaşık ve rijid gruplar oluştururlar. Mutant huntingtin agregat oluşumuna benzer şekilde sitoplazmik ve nöronal (NII) inklüzyonlar olarak bilinen protein paketlenmelerine de neden olur (DiFiglia vd., 1997). İnkluzyon cisimciklerinin disfonksiyon ve nörodejenerasyona yol açıp amadıkları ya da nöronal hücreleri yanlış katlanmış proteinlerin toksisitesinden korumak için bir savunma mekanizması olup olmadığı tartışmalıdır. Saudou (1998) ve Klement (1998) inklüzyon cisimciklerinin nöronal hücreler için non-toksik, hatta yararlı olduğunu ileri sürmüşlerdir (Klement vd., 1998; Saudou vd., 1998). Buna karşıt olarak da agregat oluşumunun hastalık progresyonu ve nöronal semptomlarla ilişkili olduğu gösterilmiştir (Davies vd., 1997; Ona vd., 1999; Yamamoto vd., 2000). Yamamoto (2000) mutant huntingtin ekson 1 proteininin ekspresyonunun septomatik farede inklüzyon cisimciği oluşumuna ve progresif motor disfonksiyonuna neden olduğunu belirlemiştir. Huntingtin ekson 1 ekspresyonunun septomatik farede engellenmesi ise inklüzyonların ve fenotipin ortadan kaybolmasına yol açmıştır. Böylece inklüzyon cisimciği oluşumunun hastalık progresyonu ile ilişkisi açık olarak gösterilmiştir (Yamamoto vd., 2000).

### **1.6. Huntington Hastalığı'nın Moleküler Patolojisi: Fonksiyon Kazanımı ve Kaybı**

Mutant huntingtin proteininin, poliglutamin bloğu nedeniyle toksik fonksiyon kazandığı ileri sürülmüştür. Fonksiyon kazanımı hipotezi, farelerde hiçbir tekrar hastalığıyla ilişkili olmayan HPRT genine patolojik sayıda CAG tekrarları eklenmesi ve bunun nörotoksik etkiye yol atığının gösterilmesiyle kanıtlanmıştır. Bu fare modeli insan CAG tekrar hastalıklarına benzer fenotip geliştirmiş, etkilenmiş farelerde nöronal inklüzyonlar da gözlenmiştir (Ordway, 1997).

Buna bağlı olarak, huntingtin fonksiyon kaybının da hastalık patogenezi katkıda bulunduğu yönünde önemli kanıtlar vardır. Fonksiyon kaybı daha çok şaperonlar ve übikülin-proteozom sistemi (UPS) ile açıklanabilir Mutant huntingtinin

oluşturduğu nöronal inklüzyonların ubikütinlenmiş olduğu bulunmuştur (Davies vd., 1997; DiFiglia vd., 1997; Sapp vd., 1997). Hücreler yanlış katlanmış proteinleri proteozomlarda degradasyon için übikütinle işaretler. Bu da, mutant huntingtin proteininin degradasyon için işaretlendiğini fakat degradasyona karşı dirençli olduğunu düşündürür. Ayrıca protein agregatlarının UPS'yi sistemini bozduğu, bu şekilde de normalde temizlenmesi gereken proteinlerin biriktiği ve hücre fonksiyonları bozarak nöronların ölümüne neden olduğu da ileri sürülmüştür (Waelter vd., 2001). Übikütin haricinde Hsp40, Hsp70 gibi ısı şoku proteinleri (HSP) de poliglutamin inklüzyonlarıyla ko-lokale bulunmuştur (Davies vd., 1997; Waelter vd., 2001). Agregatlarda bu moleküler şaperonların bulunması, proteinlerin katlanmasına yardımcı olan proteinlerin de agregatlara çekildiklerinden dolayı normal görevlerini yerine getiremeyeceklerini düşündürmektedir (Cha, 2000; Waelter vd., 2001).

Huntingtin proteininin ilk 550 aminoasit dizisi içinde kaspaz-3 (Goldberg vd., 1996; Kim vd., 2001; Sun vd., 2002) ve calpain (Gafni ve Ellerby, 2002; Kim vd., 2001; Sun vd., 2002) için kesim bölgeleri tanımlamıştır ve proteolizisin uzun poliglutamin kuyruklarının varlığında arttığı gösterilmiştir (Gafni ve Ellerby, 2002; Sun vd., 2002). Mutant huntingtinin kaspaz-3 ve calpain ile proteolizisinin daha toksik N-terminal fragmentler oluşturduğu ve bunların da agregat olmaya daha yatkın oldukları gösterilmiştir (Kim vd., 2001). Bu fragmentler daha fazla proteazı agregatlara çekebilir ve daha fazla aktive olmalarına neden olabilir. Bu da pozitif geri-besleme döngüsü oluşturup daha fazla agregasyona ve proteolitik kesime neden olup hücre ölümüne katkıda bulunabilir.

Mutant huntingtin anormal protein-protein etkileşimlerine yol açarak (Borrell-Pagès vd., 2006) çeşitli nükleer proteinleri ve transkripsiyon faktörlerini agregatlara çekebilir ve transkripsiyonel aktivitelerini inhibe edebilir. Çeşitli transkripsiyon faktörlerinin mutant huntingtin ile etkileştiği bildirilmiştir. Bunların çoğu mutant huntingtin ile ekspanse olmuş poliglutamin kuyruğu aracılığıyla etkileşir (Sugars ve Rubinsztein, 2003; Tobin ve Signer, 2000).

Huntingtin proteininin HAP1 ile etkileşerek aksonal transportta görev aldığı

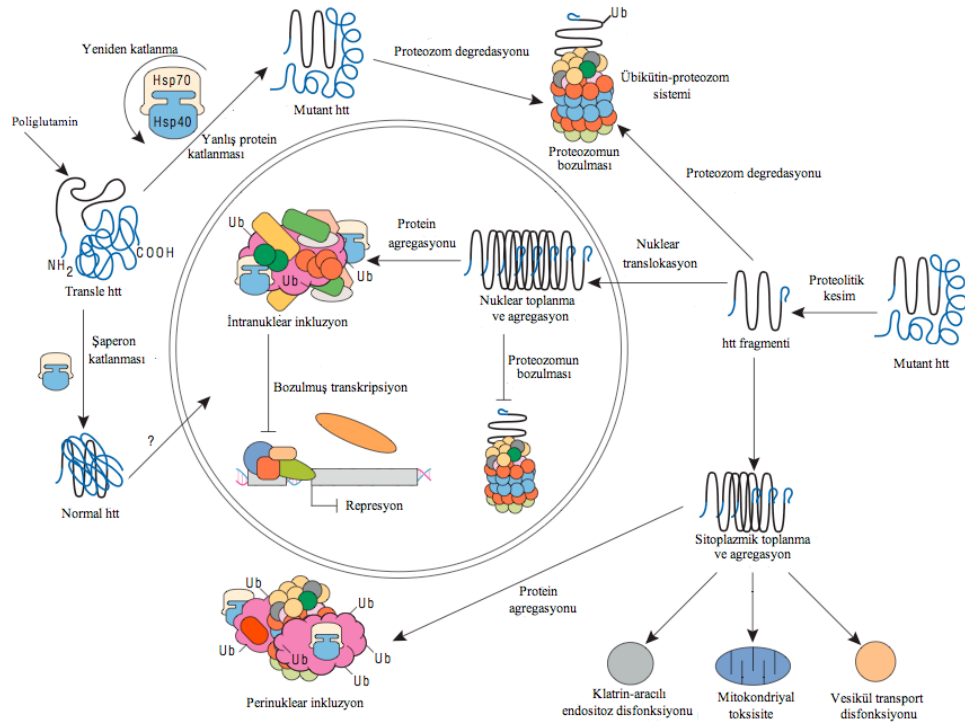
gösterilmesi ve nöropil agregatlarının oluşumu da HH'nda aksonal transportun da bozulacağını düşündürmüştür (McGuire vd., 2006). Ekspansiyon olmuş poliglutamin zinciri bu fonksiyonu inhibe edebilir ve kargoları akson boyunca çift yönlü taşınmasına ve normal huntingtinin fonksiyonuna engel olabilir (Gunawardena ve Goldstein, 2005). Alternatif olarak agregatlar fiziksel olarak dar aksonal terminallerde transportu bloke edebilir (Gunawardena ve Goldstein, 2005). Aksonal transportun doğrudan bir sonucu olarak nöronal sinaptik transmisyon da zarar görür. Bu durum sinaptik vesiküllerin ve vesikül geri dönüşümüne ya da reseptör endositoza katılan proteinlerin eksikliği ile gerçekleşebilir. Ayrıca mutant huntingtin çeşitli sinaptik proteinlerin erişilebilirliğini de değiştirerek sinaptik disfonksiyona neden olabilir (Li vd., 2003; Smith vd., 2005).

### **1.7. Huntington Hastalığı'nın Nöropatolojisi ve Hücre Kaybı Modelleri**

Huntington Hastalığı'nın patolojisi beyne özgüdür, beynin sadece belirli bölgelerinde seçici nöronal kayıp gözlenir. En sık gözlenen nöropatolojik özellikler striatal nöronların kaybı ve striyatuma (kaudat-putamen) astroglioz gelişimidir. Tüm dokularda yaygın dağılımına rağmen, mutant huntingtin özellikle striyatuma ve korteksin derin tabakalarında erken dönemde seçici nörodejenerasyona neden olur. Daha ileri safhalarda hipokampus, hipotalamus, serebellum, amigdala ve bazı talamik nükleuslar da etkilenmiş olur (Li ve Li, 2006; Sharp ve Ross, 1996). Hastalık sırasında en ciddi olarak korpus striyatuma etkilenir. Etkilenen nöronlar ise aksonlarını çeşitli beyin bölgelerine gönderen MSN projeksiyon nöronlarıdır. Bunlar GABA-erjik orta boy dikensi nöronlardır (MSN) ve striyatal nöronların yaklaşık %95'ini oluştururlar. İlerlemiş hastalık evrelerinde korpus striyatuma kesitsel alanında da yaklaşık %60 azalma gözlenir. Neokortekste daha az göze çarpan atrofi ile birlikte striyatal hacimdeki azalma beyin ağırlığının %25-30 kaybına yol açar. Bazal gangliya tüm beynin rölatif olarak küçük bir kısmını kaplar; böylece, genel atrofi muhtemelen daha büyük olan serebral korteks ve altında yatan beyaz maddedeki değişimlerden meydana gelir (Sharp ve Ross, 1996).



Nörodejeneratif hastalıklar spesifik sinir hücresi popülasyonlarının zamansız ölümü ile karakterize edilirler. Bununla birlikte hangi hücre ölümü mekanizmalarının görev aldığı kesin değildir. HH ile ilişkili çeşitli deneysel nörodejenerasyon modelleri ileri sürülmüştür. Eksitotoksisite ve oksidatif stresin nörodejeneratif hastalıklarda hücre ölümüne neden olan önemli iki yol olduğu düşünülmektedir. Bu prosesler hücrelerin enerji eksikliğine neden olan mitokondriyal fonksiyonun bozulmasıyla ilişkilidir. Apoptozun da nörodejeneratif hastalıklarda hücre ölümüne neden olan önemli bir yol olduğu ve HH'da görülen striyatal hücre kaybıyla direkt ilişkili olduğu fikri ortaya atılmıştır. Bu yüzden HH'da nöronal hücre kaybı modelleri eksitotoksisite, oksidatif stres, bozulmuş enerji metabolizması ve apoptoz olmak üzere dört ana başlık altında incelenebilir. Şekil 1.2'de Huntington hastalığında hücresel patogenezi için bir model verilmiştir.



Şekil 1.2. Huntington Hastalığı'nda hücresel patogenezi modeli

(Landles ve Bates, 2004)

### 1.7.1. Eksitotoksisite

Eksitotoksisite terimi ilk defa 1969 yılında enjekte edildikleri bölgede

nöronlara zarar veren eksitatör amino asitlerin nörotoksik etkileri sebebiyle hücre ölümünü tanımlamak için kullanılmıştır (Olney, 1969). Glutamat da memeli MSS'de ana eksitatör nörotransmitter olduğu için (Hebb, 1970), nöronal eksitotoksiste, glutamata uzun süre maruz kalma ve böylece iyonların ve suyun hücreye aşırı girişinden meydana gelen nöron ölümünü anlatmak için kullanılır. Oluşan aşırı  $Ca^{2+}$  yükü özellikle nörotoksiktir, bu da proteinleri, membranları ve nükleik asitleri degrade eden enzimlerin aktivasyonuna neden olur (Berliocchi vd., 2005). Glutamatın bağlanmasıyla aktiflenen iki post-sinaptik reseptör vardır; iyon kanallarını kontrol eden iyonotrofik reseptörler (N-metil-D-aspartat (NMDA) reseptörü, amino-3-hidroksi-5-metil-4-isoksaloz propiyonat (AMPA) reseptörü, kainik asit reseptörü) ve G-proteinlerle eşleşmiş metabotrofik reseptörler (mGlu1A, 2, 3, 5A, 6-8)

Fonksiyonel NMDA reseptörleri (NMDAR) iki NR1 ve en az iki NR2 alt ünitesinden meydana gelen tetramerik yapıdadır (Laube vd., 1998). Bu reseptörler kalsiyuma yüksek derecede geçirgendir, glutamat ve glisin tarafından ko-aktive edilirler (sırasıyla NR1 ve NR2 alt ünitelerine bağlanırlar) ve  $Zn^{2+}$ ,  $H^+$  ve  $Mg^{2+}$  gibi çeşitli katyonların modülasyonuna karşı hassastırlar. NR1 alt ünitesinin sekiz splice varyantı tanımlanmıştır. NR2 alt ünitesini ise gelişimsel ve bölgesel regülasyonla dört farklı gen kodlar (NR2A, B, C ve D). NR1 splice varyantlarının ve NR2 altünitelerinin farklı kombinasyonları farklı fonksiyonel karakteristikte NMDAR komplekslerinin oluşumunu sağlar. Yetişkin ön beyninde sıklıkla eksprese edilen NR2 alt üniteleri NR2A ve NR2B'dir. NR1/NR2A ve NR1/NR2B, aynı şekilde triheteromerik NR1/NR2A/NR2B, tek kanal iletkenliğinde, kalsiyum geçirgenliği ve  $Mg^{2+}$  bloğu hassasiyetinde benzerlikler gösterebilirler de kanal geçiş özelliklerinde ve agonist-antagonistlere hassasiyette farklılık gösterirler. Ön beynin diğer bölümleriyle karşılaştırıldığında striyatum NR2B'nin ekspresyonu göreceli olarak diğer NR2 alt ünitelerine oranla daha fazladır (Dingledine vd., 1999; Monyer vd., 1994; Ozawa vd., 1998;).

### 1.7.1.1. Eksitotoksisitenin ve NMDAR'lerin Hastalık Patogenezine Etkisi

Eksitotoksisite ve HH'nın ilişkilendirilmesi ilk kez 1976 yılında, glutamat reseptörlerinin kainat/kuiskolat altkümesinin bir agonisti olan kainik asitin intrastriatal enjeksiyonunun HH'da gözlenen benzer lezyonlar oluşturduğu keşfedildiğinde olmuştur (Coyle ve Schwarcz 1976; McGeer vd., 1978). HH için bu hipotez glutamat reseptörlerinin aşırı aktivasyonunu öngörür, bu da kortikal aferentlerden artmış glutamat salınımı, gliya tarafından azalmış alınımı ya da striyatal projeksiyon nöronlarındaki post-sinaptik glutamat reseptörlerinin hipersensitivitesi yüzünden olabilir. Muhtemelen değişmiş intraselüler kalsiyum homeostazı ve mitokondriyal disfonksiyondan meydana gelen glutamat reseptörü aşağı sinyali ile kombine olarak nöronal disfonksiyona ve striatal MSN'lerin ölümü gerçekleşir (Fan ve Raymond, 2007).

Çoğu GABA-erjik MSN projeksiyon nöronları yüksek seviyede NR2B alt ünitesi eksprese eder. Huntingtin proteinindeki poliglutamin artışı ve NMDAR aktivitesi arasındaki etkileşim ilk olarak NMDAR altünitelerinin geçici olarak normal (15Q) veya ekspansiyon olmuş (138Q) poliglutamin içeren tam uzunluktaki insan huntingtin proteini ile birlikte eksprese olduğu heterolog HEK293 hücre hattı kullanılan bir çalışmada tanımlanmıştır (Chen vd., 1999). Bu çalışmada NMDAR'lerden NR1/NR2B-tipinin 138Q ile ko-ekspresyonunun 15Q ile olduğundan daha büyük NMDAR aracılı akıma neden olduğunu göstermiştir. Bundan başka bu etki hücreler NR1/NR2A tipi ile transfekte olduklarında 15Q veya 138Q içeren huntingtin ile ko-eksprese olduklarında benzer akımlara sahip olduklarından daha büyük akımın NR2B alt tipi için seçici olduğu belirlenmiştir (Chen vd., 1999). Bu hipoteze uygun olarak in vitro çalışmalar mutant huntingtin ve NR1 ve NR2B'nin apoptotik özelliklerle eksitotoksik hücre ölümünü arttırdığı gösterilmiştir (Zeron vd., 2001). NR2B alt ünitesi de reseptör kanal geçirgenliğini artırır ve glisine ve  $Mg^{2+}$  bloğuna hassasiyeti ve kanal de-aktivasyon zamanını belirler. Korunan inter-nöronlar bu alt ünitenin çok daha az düzeylerini eksprese ederler böylece onlar için çok daha yüksek bir aktivasyon eşiği bulunmaktadır (Gil ve Rego, 2008; Sieradzan ve Mann, 2001; Zeron vd., 2001).

NR2B içeren reseptörler öğrenme, hafıza işlenmesi, beslenme davranışı ve acı algısı gibi bir çok biyolojik proseste rol alır; ayrıca HH haricinde şizofreni, Alzheimer Hastalığı, Parkinson Hastalığı, hipoksi/iskemi, inme, ve diyabet (Loftis ve Janowsky 2003; Waxman ve Lynch, 2005) gibi hastalık proseslerine de katıldıkları düşünülmektedir. NR2B içeren NMDAR'lerin mutant huntingtin ile spesifik artışı böylece öğrenme ve hafıza altında yatan sinaptik plastisitenin dengesini bozabilir ve HH'da görülen bilişsel bozukluklara katkıda bulunabilir (Milnerwood vd., 2006). Mutant huntingtin ile indüklenen NMDAR aktivitesindeki ve/veya alt ünite kompozisyonundaki değişimlerin sadece aşağı akım efektör yollarında değil ayrıca başlangıç yaşı belirlenmesinde de derin etkileri olabileceği ileri sürülmektedir (Fan ve Raymond, 2007).

### 1.7.2. Oksidatif Stres

Serbest radikaller tek veya daha fazla eşleşmemiş elektron içerirler. Aerobik metabolizmanın yan ürünü olarak üretilirler, fakat elektron transport zinciri inhibisyonu ya da moleküler defektlerin olduğu durumlarda üretimleri artar (Browne vd., 1999). Aşırı miktarda bulduklarında ise oksidatif stres ortaya çıkar (Dugan, vd., 1995). Oksidatif stres mitokondriyal bozukluk veya eksitotoksisite nedeniyle oluşabilir ve belli şartlar altında apoptozu tetikleyebilir (Beal, 1995; Schulz, vd., 1995). Oksidatif stresin HH beyinlerinde de gerçekleştiği ileri sürülmüştür (Browne vd., 1999; Coyle ve Puttfarcken, 1993). Bu durum mitokondriyal bozulmanın ya da eksitotoksisitenin sonucu olabilir. DNA zincirlerinin kırılması ve malondialdehit (MDA), 3-nitrotirozin, 8-hidroksi-deoksiguanozin (8-OHdG), ve hem-oksijenaz gibi oksidatif hasar ürünlerinin artmış düzeyleri HH beyinlerinin dejenerasyona uğrayan bölgelerinde görülmüştür (Browne vd., 1999). Ayrıca artmış 8-OHdG seviyesi de HH parietal korteksin mtDNAsında bulunmuştur (Polidori vd., 1999). Bu da artmış oksidatif hasar bölgelerinin hastalık progresyonu ile dejenerasyona uğradığını iler sürmektedir. İnaktivasyonu oksidatif stresin belirteci olan mitokondriyal akonitaz aktivitesi de hastaların striyatumlarında önemli ölçüde azalmıştır (Tabrizi vd., 1999). Bununla birlikte diğer bir çalışmada postmortem HH beyninde lipid peroksidasyonuna, 8-OHdG artışına ya da diğer DNA oksidatif hasar belirteçlerine

rastlanmamıştır, ayrıca protein karbonillerin seviyesi de kontrol post-mortem beyinleriyle farklılık göstermemiştir ve oksidatif stresin HH patojenezinin ana komponenti olmayabileceğini ileri sürülmüştür (Alam vd., 2000; Mancuso vd., 2006).

### 1.7.3. Bozulmuş Enerji Metabolizması

Mitokondriyal mutasyon saptanan birçok nörodejeneratif hastalığın bulunması nedeniyle mitokondriyal enzimlerdeki değişimlerin HH'da enerji metabolizmasının bozulmasında rol oynayabileceği fikri doğmuştur (Beal, 1993; Yang vd., 2008). Bozulmuş enerji metabolizması glutamat toksisitesi için eşiği düşürür ve eksitotoksik mekanizmaların aktivasyonuna neden olur, ayrıca reaktif oksijen türlerinin de üretimini artırır (Beal vd, 1992; Coyle ve Puttfarcken, 1993; Novelli vd., 1988). Huntington Hastalığı nükleer DNA'daki bir mutasyonun sonucu olsa da, huntingtinin mitokondriyal fonksiyonun regülasyonuna ya da mutant proteinin hücre sel solunuma etki edebileceği düşünülmektedir. Magnetik rezonans spektroskopisi (MRS) kullanılarak Huntington hastalarının beyinde metabolik değişimler olduğu belirlenmiştir. Biyokimyasal çalışmalar da azalmış pirüvat dehidrojenaz aktivitesini hasta beyinlerin bazal gangliyasında ve hipokampusunda göstermiştir, fakat diğer beyin bölgelerinde buna rastlanmamıştır. Azalmış kompleks II/III aktivitesi kaudatta görülürken putamende veya kortekste görülmemiştir. Huntington hastalarının trombositlerinde azalmış kompleks-I aktivitesi belirlenirken, risk altındaki aile üyelerinde görülmemiştir. Çeşitli çalışmalar striyatunun metabolik disfonksiyona karşı seçici olarak daha hassas olduğunu ortaya çıkarmıştır (Beal, 1992; Browne vd., 1997; Gu vd., 1996; Mann vd., 1990). Ayrıca erken HH'da korteks ve striyatunda glukoz hipometabolizması olduğu görülmüş ve hastaların bazal gangliyasında ve oksipital kortekslerinde artmış laktat düzeyleri gözlenmiştir. Hastaların serebrospinal sıvılarında da artmış laktat/pirüvat oranı tespit edilmiştir (Kuwert vd., 1990; Petersen vd., 1999) Diğer bir çalışmada da presemptomatik ve erken evrelerde hasta beyinlerinde mitokondriyal kompleksler I-V'in aktivitelerinde değişiklik gözlenmediğinden mitokondriyal değişimlerin hastalığın ileriki aşamalarında gözlendiği düşünülmüştür. (Guidetti vd., 2001).

#### 1.7.4. Apoptoz

Huntington Hastalığı gibi nörodejeneratif hastalıklarda apoptoz adı verilen programlı hücre ölümünün de önemli bir rolü olduğu düşünülmektedir. DNA zinciri kırıklarını tespit etmek için kullanılan bir *in-situ* metod olan TUNEL'in ("terminal transferase-mediated deoxyuridine triphosphate–biotin nick end labeling") apoptotik hücreleri seçici olarak tespit edebileceği belirtilmiştir (Thomas vd., 1995). Çeşitli gruplar (Portera-Cailliau vd., 1995; Thomas vd., 1995.) Huntington hastalarında striyatum ve orta frontal korteks nöronları TUNEL ile işaretlenebilmiştir. İzole edilmiş MSN'ler en yoğun olarak putamende boyanmıştır, bunu globus pallidus ve kaudat takip etmiştir. İşaretleme, hastalığın ilerlediği vakalarda daha da artmıştır. Bununla birlikte, ilerlemiş vakalarda bile sadece çok az miktarda hücre TUNEL ile işaretlenmiştir (Portera-Cailliau vd., 1995). Bu veri HH'daki hücrelerin apoptotik yolakla öldüklerini ileri sürer, fakat apoptozun HH'da hangi prosesler tarafından tetiklendiği ya da primer bir olay olup olmadığı açık değildir.

Çeşitli araştırmalar kaspazların da direkt nöronal ölüme karıştığını göstermiştir. Kaspazlar çeşitli hedef proteinleri apoptotik hücre ölümü sırasında sistein-aspartattan kesen proteazlardır. Çeşitli hücre sistemlerinde huntingtinin kaspaz 3 için bir substrat olduğu ve anormal olarak uzamış poliglutamin kuyruğun kaspaz 3'ün huntingtini kesme kapasitesini arttırdığı gösterilmiştir (Goldberg vd., 1996). Huntington Hastalığı patogeneğinde kaspaz 3 ve 8 aktive olmaktadır. Kaspazlar intrasellüler agregatlar nedeniyle artmış poliglutamin tekrarı eksprese eden nöronal hücrelerde aktiflenir. Hücresel bir sistemde kaspaz inhibisyonu hücre ölümünü önler, fakat inklüzyon oluşumunu engellemez. Aktiflenmiş kaspaz-8 Huntington hastalarının beyinlerinin çözünmeyen fraksiyonlarında tespit edilmiştir, fakat kontrol beyinlerinde görülmemiştir.

Diğer taraftan, ölen nöronların nöronal inklüzyonlara, sitoplazma ve nükleusun kondenzasyonuna ve plazma membranının büzülmesine sahip olduğunu fakat hücrelerin nükleus veya sitoplazmasında kabarcıklanma olmadığını, apoptotik cisimciklerin gelişmediğini veya DNA fragmenasyonu olmadığını bildiren çalışmalar da mevcuttur. Bu yüzden nöronal hücre ölümünün apoptoz ya da nekroz

olmadığı, hastalığın kendine özgü bir hücre ölümü prosesine sahip olduğu da düşünülmektedir (Graeber ve Moran, 2002; Turmaine vd., 2000).

#### **1.7.4.1. p53'ün Huntington Hastalığı'ndaki Rolü**

Son zamanlarda yapılan araştırmalar HH patogenezinde p53'ün önemli bir rolü olduğuna işaret etmiştir. p53 farklı mekanizmalarla aktive ve stabilize edilen, çeşitli aşağı akım molekülleri etkileyen bir proteindir (Spada ve Morrison, 2005), anormal hücrelerde oluşan çeşitli hücre sel streslere cevap olarak problemi düzeltmeye ya da apoptozu başlatmaya yönelik olayları tetikler (Spada ve Morrison, 2005; Vousden, 2000;), DNA tamirinde, transkripsiyonda, genom stabilitesinde ve apoptozda rol oynar (Choisy-Rossi vd., 1998; Eskenazi vd., 2007; Levine, 1997).

Hayvan modellerinde yapılmış çalışmalar p53'ün HH'daki rolü hakkında fikirler vermiştir. Huntingtin ve p53'ün 293T hücrelerinde ve Huntington hastalarının lenfoblastlarında birbirlerine bağlandıkları gösterilmiştir (Steffan vd., 2000). Huntingtin ve p53'ün bağlanması poliglutamin ekspansiyonuyla artar. Ekspansiyon p53'ün regülatör proteinleriyle etkileşimini bozar, bu da p53'ün stabilizasyonuna neden olur. Ayrıca mutant huntingtin proteininin p53 de dahil olmak üzere birçok intraselüler proteinle agregatlar oluşturduğu belirtmiştir (Becher vd., 1998; Davies vd., 1997; DiFiglia vd., 1997). Huntingtin-p53 agregatlarının pro-apoptotik proteinin hücrede tanınmasını engelleyerek transkripsiyonel değişimlerin meydana gelmesine neden olduğu düşünülmektedir. Böylece hücre sel apoptozun normal düzeyleri Huntington hastalarının striyatal nöronlarında artmış olabilir (Bae vd., 2005; Eskenazi vd., 2007; Jana vd., 2001; Wyttenbach vd., 1999).

p53 ile regüle eden proteinlerin büyük bir bölümünün mutant huntingtin ile transfekte hücre kültürlerinde upregüle olduğu bulunmuştur (Bae vd., 2005; Sipione vd., 2002;). Buna zıt olarak p53'le regüle edilen promotorların mutant huntingtin ile baskılandığı rapor edilmiştir (Steffan vd., 2000). Mutant huntingtin transgenik sinek ve fare modelleri ile de p53'ün HH patolojisinde spesifik bir rol oynadığı gösterilmiştir. *Drosophila*'da p53 delesyonu mutant huntingtin transgeni ile ilişkili

nörotoksisiteden güçlü bir koruma sağlamıştır. Farelerde p53'ün farmakolojik veya genetik baskılaması solumun kompleks-IV aktivitesini normalize eder ve çeşitli tipik HH davranışsal bozukluklarını hafifletir. Kemirgen HH genindeki dominant bir mutasyon da p53 mutasyonlarının yaşam üzerine bazı etkilerini geri döndürür. Bu durum da HH proteininin artmış poliglutamin bölgesinin p53'ten yoksun ve proliferasyon oluşturan hücrelerde artmış apoptotik etkisine bağlanmıştır (Ryan ve Scrabble, 2007). Bu sonuçlar p53'ün mitokondriyal disfonksiyonu, hücre ölümü ve davranışsal anormallikleri *in vivo* modüle ettiğini gösterir. Ayrıca Huntington hastalarında daha düşük kanser insidansı rapor edilmiştir (Sorensen vd., 1999). p53 bir tümör süpresör olduğundan artmış regülasyonu da HH dokusunda azalmış karsinogenez ile alakalı olabilir.

p53 çeşitli mitokondriyal genleri regüle eden nükleer transkripsiyon faktörü olduğundan ve HH'da mitokondriyal disfonksiyonun önemli olduğu bulunmuş olduğundan, bu bulgular nükleustaki bozuklukların ve mitokondrinin HH'daki mekanizmaları arasında bir bağlantı sağlamaktadır (Bae vd., 2005). Mutant huntingtin-p53 aracılı mitokondriyal fonksiyon bozukluklarındaki aşağı yollara bakılırsa, p53 HH hücre modellerinde mitokondriyal membran depolarizasyonuna neden olan Bax ve Puma gibi çeşitli aşağı hedefleri indükler (Vogelstein vd., 2000).

p53 cevaplayıcı genlerinin tespiti için yeni bir algoritma geliştirilmiştir (Hoh vd., 2002). İnsan ve farede p53 hedef genleri için yapılan genom boyu aramada da bu algoritma kullanılmıştır. İlginç olarak huntingtin geninin tahmini p53 bağlanma bölgeleri içerdiği belirlenmiştir. p53 proteininin huntingtin genindeki p53-cevaplayıcı elementlerle etkileştiği *in vivo* ve *in vitro* gösterilmiştir. Bundan başka hem kültürlenmiş hücrelerde hem de fare beyin dokusunda p53 huntingtin geninin DNA hasarından sonra tetiklenen regülasyonuna aracılık eder. Bu sonuçlar p53 proteininin huntingtin genini regüle ettiğini de göstermiştir, bu da bir p53 stres cevabının HH prosesinin bir modulatörü olabileceğini öne sürer (Feng vd., 2005).



## 1.8. Huntington Hastalığı'nda Terapötik Yaklaşımlar

Huntington Hastalığı için kesin bir sağıltım yöntemi ya da hastalığın progresyonunu yavaşlatacak etkili nöroprotektif terapiler bulunmadığından, uygulanan tedavi semptomları hafifletme ve komplikasyonları engelleme üzerine odaklanmıştır. HH fenotipini taklit eden transgenik ve *knock-in* fare modellerinin geliştirilmesi potansiyel terapötik adayların tanımlanması için yapılan çalışmalarda yararlı olmuştur. Mutant huntingtinin kaspaz ve kalpain aracılı kısmi kesimi huntingtin agregasyonunu ve hücrel toksisiteyi başlattığından huntingtinin kısmi kesiminin inhibitörleri terapötik değere sahip olabilirler (Gafni vd., 2004; Wang vd., 2003; Wellington vd., 2000). Huntington Hastalığı'nda hücrel toksisiteye neden olan mutant huntingtin proteolitik fragmentlerinin agregasyonunu inhibe eden küçük moleküller umut vaatmektedir (Desai vd., 2006; Ignatova ve Gierasch, 2006). Transglutaminazlar bir protein/peptid substratın glutamin kalıntısının çapraz bağı kataliz eden proteinlerin ailesine benzer bir aileye üyedir. Bu bağlar agregatların oluşumu ve mutant huntingtinin toksisitesi için önemli olabilir. Bu da transglutaminazı potansiyel bir hedef haline getirip transglutaminaz inhibitörlerinin terapötik olarak önemli olabileceklerini düşündürmektedir (Karpuj vd., 2002; Raamsdonk vd., 2005). Şaperonlar da proteinlerin daha kararlı konformasyonlar almalarına neden olurlar, agregasyonu önlerler ve sıcak-şok cevaplarda üretimleri arttırır. Şaperonların HH hücre modellerinde indüklenmesi mutant huntingtinin neden olduğu hücrel toksisiteyi inhibe etmiştir (Sittler vd., 2001). Mutant protein üretiminin susturulması mümkün değilse de, temizlenmesini arttırmak alternatif bir yöntem olacaktır. Otofajinin artmış regülasyonunu içeren bu strateji hücrelerde, *Drosophila* ve fare modellerinde umut vaatmiştir (Ravikumar vd., 2004). Apoptoz da HH patogenezine katkıda bulunur. Bu sebeple terapötik bir hedef olarak görülmektedir (Smith vd., 2003; Wang vd., 2003). Mutant huntingtin ve transkripsiyon faktörleri arasındaki direkt etkileşimin de HH'daki transkripsiyonel disregülasyona ve böylece hücrel fonksiyonların bozulmasına, protektif mekanizmaların işleyememesine ve sonuçta nöronal ölüme neden olduğu düşünülmektedir, bu yüzden bu süreç de önemli bir terapötik hedef olabilir (Ferrante vd., 2005; Stack vd., 2007). Histonlar da transkripsiyonu regüle eden önemli nükleer proteinlerdir. Histon asetilasyonu gen aktivasyonunun bir belitecidir ve HH'da

azalmıştır. Histon deasetilazlar nükleozom yapısını lokal olarak değiştirirler ve transkripsiyonu inhibe ederler. Bu yüzden HDAC inhibitörleri de terapötik ajanlar olarak değer kazanmıştır (Ferrante vd., 2003; Steffan vd., 2001;). Çeşitli çalışmalar Huntington hastalarının ve HH model sistemlerinin mitokondriyal disfonksiyon/enerji yetersizliğine işaret ettiğinden oksidatif stress yolları da umut veren terapötik yollarda yer alabilir. Mitokondriyal stabiliteyi arttıran bileşikler de araştırılmaktadır (Ferrante vd., 2000; Varma vd., 2007). Nöronal enerji bozukluğunu tamponlayabilen bileşikler de terapötik önem kazanmaktadır (Bonelli ve Wenning, 2006; Ferrante vd., 2005; Stack vd., 2006). HH'da eksitotoksik hücre ölümünün NMDA reseptörlerinin artmış hassasiyeti nedeniyle olduğu düşünülmektedir. Bu yüzden NMDA reseptör antagonistlerine potansiyel terapötik ajan olarak ilgi gösterilmektedir (Ferrante vd., 2005; Landwehrmeyer vd., 2007; Wu vd., 2006;).

Huntington Hastalığı için diğer bir potansiyel terapötik metod ise gen terapisi'dir. İntraselüler antikolar ve RNA interference (RNAi) gen terapisi için kullanılabilir iki yöntemdir (Imarisio vd., 2008). Nörotrofik faktörler nörogelişim ve nöronal sağkalıma ve olgun nöronların plastisitesine destek sağlar. Böylece nörotrofik faktörlerin nörodejeneratif hastalıklar için aday olabilecekleri düşünülmüştür (Alberch vd., 2002; Franich vd., 2008). Nöronal kaybı tedavi etmenin bir yöntemi de transplantasyondur. Fetal striatal grafların ya da sağlıklı korteksin HH fare modellerine transplantasyonu graft sağkalımı ve fenotipte bazı değişimler için umut vaatetmiştir (Dellen vd., 2001; Dunnett vd., 1999). Çevre zenginleştirmesinin de HH üzerine olumlu etkileri olduğunu gösteren çalışmalar da vardır. Bu ortamda büyütülen farelerle yapılan çalışmalar zengin ortamın serebral hacmin kaybının önlenmesinde ve motor semptomların başlamasının ertelenmesinde yardımcı olabileceğini ileri sürmüştür (Dellen vd., 2000).

## 2. AMAÇ

Huntington Hastalığı'na sebep olan tek mutasyon, IT-15 geninde tekrar eden CAG bazlarının sayısında normalden fazla görülen artıştır. Hastalık başlangıç yaşı çok geniş bir aralığa yayılmış durumdadır. Başlangıç yaşını büyük oranda IT-15 genindeki CAG tekrarlarının sayısı belirler ve başlangıç yaşı ile CAG tekrar sayısı arasında güçlü bir negatif korelasyon bulunmaktadır. Ancak, hastalığın ortaya çıkış yaşı sadece CAG tekrar sayısına bağlı olarak belirlenemez. Bireyin maruz kaldığı çevresel faktörler ve diğer genlerdeki mutasyon ya da polimorfizmlerin HH başlangıç yaşını etkileyen faktörler arasında olabileceği ileri sürülmüştür. Gen polimorfizmlerinin HH başlangıç yaşına etkisinin araştırılması az sayıda çalışmada ve kısıtlı popülasyon gruplarıyla sınırlı kalmıştır; bazı çalışmaların sonuçları da doğrulanamamıştır. Bu nedenle, farklı gen polimorfizmlerinin HH başlangıç yaşına ve dolayısıyla hastalığın seyrine olan etkisi geniş bir popülasyon yelpazesinde araştırılmalı ve popülasyonlar arası olası farklılık ve benzerlikler ortaya koyulmalıdır. Hastalık belirtileri genellikle 30-50 yaşları arasında ortaya çıkar, bu yaş aralığı da bireylerin hayatlarında aile kurma ve meslek edinme gibi açılardan önemli bir dönemi temsil eder. Bu yüzden hastalara klinik ve moleküler tanı sonuçları ile birlikte, hastalığın başlangıç yaşını ve beklenen seyrini daha belirgin olarak açıklayabilmek önemlidir.

Bu tez çalışmasında Türk Huntington hastalarında NMDAR alt ünitelerini kodlayan genlerdeki rs6293, rs1969060, rs1806201, rs1042339 ve rs890 polimorfizmlerinin ve TP53 genindeki R72P polimorfizminin başlangıç yaşına olan etkisinin araştırılması hedeflenmiştir.

### **3. GEREÇLER**

#### **3.1. Örneklerin Tanımı**

Bu araştırmadaki hasta grubunu İstanbul Tıp Fakóltesi DETAE Moleküler Genetik Anabilim Dalı ve İstanbul Tıp Fakóltesi Nöroloji Ana Bilim Dalı'na 1998-2009 yılları arasında başvuran ve Huntington Hastalığı tanısı konulan 102 birey oluşturmaktadır. Hastaların cinsiyet, yaş, başlangıç yaşı, klinik özellikleri ve aile hikayesi gibi bilgileri de elde edilmiştir. Kontrol grubu ise kendilerinde ve ailelerinde nörodejeneratif bir hastalık gözlemlenmeyen 102 gönüllü denekten oluşmaktadır. Her birey ile yapılan anketlerle cinsiyet, yaş, doğum yeri, meslek gibi demografik bilgiler toplanmıştır. Hasta ve kontrol grubuna ait kan örnekleri ve ağız içi epitel hücreleri, bireylerin çalışma hakkında bilgilendirilmesi ve yazılı onaylarının alınmasından sonra toplanmıştır. Bu çalışma T.C. Haliç Üniversitesi İnsan Araştırmaları Etik Kurulu izni ile gerçekteştirilmiştir.

#### **3.2. Kimyasallar**

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

### 3.3. Tamponlar, Solüsyonlar ve Enzimler

#### 3.3.1. Hızlı Genomik DNA İzolasyonu (RGDE) Metodu ile Kandan DNA İzolasyonunda Kullanılan Tamponlar ve Solüsyonlar

Hücre Lizis Tamponu (pH 8.0):	10 mm/L Tris-HCl, % 11 (w/v) Sükroz, 5 mm/L MgCl <sub>2</sub> % 1 (v/v) Triton X-100
Hücre Çekirdeği Lizis Tamponu (pH 8.0):	10 mm/L Tris-HCl, % 1 (w/v) SDS, 10 mm/L EDTA, 10 mm/L Sodyum Sitrat
Sodyum Klorür (NaCl):	dH <sub>2</sub> O'da 5M
Kloroform (CHCl <sub>3</sub> ) :	Saf kloroform (%100)
İzopropanol (C <sub>3</sub> H <sub>8</sub> O):	Saf izopropanol (%100)
TE Tamponu:	20 mM Tris-HCl (pH 8.0), 0.1 mM EDTA (pH 8.0)

#### 3.3.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) Tamponları ve DNA Polimeraz Enzimleri

10X MgCl <sub>2</sub> 'süz Tampon:	200 mM (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 750 mM Tris-HCl, (pH 8.8) % 0.1 Tween 20, (Fermentas, LİTVANYA)
------------------------------------	---

MgCl <sub>2</sub> :	dH <sub>2</sub> O'da 25 mM (Fermentas, LİTVANYA)
Deoksiribonükleotidler (dNTP):	100 mM dATP, dCTP, dGTP ve dTTP (Fermentas, LİTVANYA)
Taq DNA Polimeraz:	Rekombinant Taq DNA Polimeraz (Fermentas, LİTVANYA)

### 3.3.3. Restriksiyon Enzimleri ve Reaksiyon Tamponları

DdeI:	10 U/μl (Fermentas, LİTVANYA)
Reaksiyon Tamponu:	Buffer Tango 33 mM Tris-asetat (pH 7.9), 10 mM magnezyum asetat, 66mM potasyum asetat, 0.1 mg/ml BSA
PstI:	10 U/μl (Roche, ALMANYA)
Reaksiyon Tamponu :	SuRE/Cut Buffer H 500 mM Tris-HCl, 100 mM MgCl <sub>2</sub> , 1 M NaCl, 10 mM Dithioeritritol, pH 7.5
PsyI:	10 U/μl (Fermentas, LİTVANYA)
Reaksiyon Tamponu:	Buffer B 10 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl <sub>2</sub> , 0.1 mg/ml BSA

PsuI:	5 U/ $\mu$ l (Fermentas, LİTVANYA)
Reaksiyon Tamponu :	Buffer B 10 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl <sub>2</sub> , 0.1 mg/ml BSA
Bsh1236I:	10 U/ $\mu$ l (Fermentas, LİTVANYA)
Reaksiyon Tamponu :	Buffer R 10 mM Tris-HCl (pH 8.5), 10 mM MgCl <sub>2</sub> , 100 mM KCl, 0.1 mg/ml BSA
MspI:	10 U/ $\mu$ l (Roche, ALMANYA)
Reaksiyon Tamponu:	SuRE/Cut Buffer L 100 mM Tris-HCl, 100 mM MgCl <sub>2</sub> , 10 mM Dithioeritritol, pH 7.5

### 3.3.4. Elektroforez Tamponları ve Jel Sistemleri

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

### 3.3.5. Oligonükleotid Primerler

**Tablo 3.1.** Polimorfik bölgeleri çoğaltmak için kullanılan primer dizileri

Lokus	Primer Dizisi (5'→3')
GRIN1	NR1F: 5'-CGTTCTTGCCGTTGATGA-3' NR1R: 5'-GTAAGAGCCAGCAACGGAG-3'
GRIN2A (rs19690600)	2A rs1969060F:5'-GGTTTTAAGATTTGTGCCAGG-3' 2A rs1969060R:5'-CTTAGACCGAGTTGGCAACA-3'
GRIN2B 5072T/G (rs890)	2B rs890F:5'-GCTGTCAGCCATTCCTGTT-3' 2B rs890R 5'-CATGAATTTAGCCAGAGCCTC-3'
GRIN2B 3501G/A (rs1042339)	2B rs1042339F:5'-GACCACAAGCGCTACTTCAG-3' 2B rs1042339R:5'-TGTCATACAGGTTGCCTGCT-3'
GRIN2B C2664T (rs1806201)	2B rs1806201F:5'-AGACTATTCGCTTCATGC-3' 2B rs1806201R:5'-GTGTGTTGTTTCATGGCTG-3'
TP53 R72P (rs1042522)	TP53 F:5'-GAGGACCTGGTCCTCTGACT-3' TP53 R:5'-GTAGGTTTTCTGGGAAGGGA-3'
IT-15 CAG tekrarı	P3F:5'-TCTGCTTTTACCTGCGGCC-3' HD3:5'-GGCGGTGGCGGCTGTTGCTGCTGCTGCTGC-3'

### 3.3.6. DNA Büyüklük Markörleri

GeneRuler 100 bp DNA markörü : 80, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000 baz çiftlik fragmentler içeren DNA markörü (Fermentas, LİTVANYA)

### 3.3.7. Cihazlar

Thermo-Cycler : Techne TC-512 (İNGİLTERE)

Santrifüjler : Mikrosantrifüj, MiniSpin Plus (Eppendorf, ALMANYA)



Derin Dondurucular :	-20°C, 2021 D (Arçelik, TÜRKİYE) -20°C, GSD26410NE (Bosch, ALMANYA)
Yatay Elektroforez Sistemleri :	Flowgen (İNGİLTERE) Sub-Cell GT (BIO-RAD, İTALYA)
Güç Kaynakları :	EPS 301 (Amersham Pharmacia Biotech, İSVEÇ) PowerPac Basic, PowerPac Universal (BIO-RAD, İTALYA)
Isı Bloğu :	DB 2D (Techne, İNGİLTERE)
Dökümantasyon Sistemi :	Bio-RAD Universal Hood II (BIO-RAD, İTALYA)
Manyetik Karıştırıcılar :	MR 3001 (Heidolph, ALMANYA)
Buzdolapları :	Beko 8742, Arçelik 3061 Plus (TÜRKİYE)
Spektrofotometreler :	Schimidzu UV 1601 (JAPONYA)
Su Banyoları :	Nüve BM 402 (TÜRKİYE)
Su Arıtma Sistemi :	Millipore Milli Q Synthesis A10 (FRANSA)
Otoklav :	Dik Tip Otoklav (BES, TÜRKİYE)
Vorteks :	Heidolph REAX (ALMANYA)

Tartılar :

Hassas Terazı, XB 220 A

(Presica, İSVİÇRE)

Terazi, KB 400-2

(KERN, ALMANYA)

## 4. YÖNTEMLER

### 4.1. Periferik Kan Örneklerinden DNA İzolasyonu

Bu tez çalışmasında hasta ve kontrol grubu kanlarından DNA izolasyonu için Hızlı Genomik DNA İzolasyon (*Rapid Genomic DNA Extraction-RGDE*) metodu kullanılmıştır. Bu yöntemde, EDTA'lı tüplerde toplanmış kan örneklerinden 500'er µl alınarak 1,5 ml'lik tüplere aktarılır ve üzerine 1 ml hücre lizis tamponu eklenir. Tüp hafifçe çalkalanarak örnek ve tamponun karışması sağlanır ve 6000 rpm'de 2 dakika santrifüj yapılır. Süpernatant atıldıktan sonra pellete tekrar 1 ml hücre lizis tamponu eklenir, çözülmesi sağlanır ve 6000 rpm'de 2 dakika santrifüj işlemi yapılır. Bu aşama açık renk pellet elde edilene kadar tekrarlanır. Daha sonra pellet üzerine 300 µl hücre çekirdeği lizis tamponu eklenir ve pelletin çözülmesi sağlanır. 100 µl 5 M NaCl ve 600 µl kloroform eklenerek tüp hafifçe çalkalanır ve 6000 rpm'de 2 dakika santrifüj yapılır. Bu aşamanın ardından tüpte iki faz görülür. Üstteki faz mikropipet ile dikkatlice alınarak yeni bir tüpe aktarılır ve üzerine 600 µl soğuk izopropanol eklenerek tüp bir kaç defa çevrilir. Bu aşamada DNA yoğunlaşarak iplikçikler şeklinde görülmeye başlar. DNA'nın çökmesi için 13000 rpm'de 1 dakika santrifüj yapılır. Süpernatant atılarak tüp 10-15 dakika oda sıcaklığında kurumaya bırakılır. DNA 50-100 µl TE tamponunda çözülerek 4°C veya -20°Cde saklanır.

### 4.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu

Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR), belli bir DNA dizisinin *in vitro* ortamda enzimatik olarak sentezlenmesini ve DNA molekülünün çok sayıda kopyasının elde edilmesini sağlayan bir yöntemdir. Reaksiyon çift iplikli bir DNA molekülünde hedef dizilere iki sentetik oligonükleotid primerin bağlanması ve zincirin uzaması esasına dayanır. PCR'da döngüler halinde tekrarlanan üç basamak bulunmaktadır. İlk basamak olan denatürasyon aşamasında kalıp DNA molekülü yüksek sıcaklık

derecelerinde denatüre edilir. Genellikle 94-95°C denatürasyon için uygundur. Primerlerin tek iplikli DNA molekülleri üzerinde kendilerine tamamlayıcı olan bölgelere bağlanması ikinci basamağı oluşturur ve bu bağlanma sıklıkla 55-60°C'de gerçekleşir. Üçüncü basamakta ise Taq polimeraz enzimi, uygun tampon ve dNTP'ler (deoksiribonükleotid trifosfat) varlığında primerlerin 3' ucundan uzamasını sağlar ve böylece yeni bir DNA dizisi sentezlenmiş olur. Zincir uzaması Taq polimeraz aktivitesinin en yüksek olduğu 70-75°C arasında gerçekleştirilir. Her bir döngü sonucunda DNA miktarı üssel olarak artar. Döngü sayısı da kalıp DNA miktarına göre belirlenir ve PCR'da genellikle 25-40 döngü uygulanır.

Bir PCR döngüsü için gerekli olan temel bileşenler kalıp DNA molekülü, yüksek ısıya dayanıklı Taq polimeraz enzimi, dNTP karışımı, primerler, uygun pH ve iyon koşullarını sağlayan enzim tamponu ve  $MgCl_2$ 'dir.  $Mg^{2+}$  iyonu, primer ile DNA arasındaki bağlanmayı ve DNA polimerazın kalıp-primer kompleksi ile birleşerek oluşturduğu replikasyon kompleksini stabilize eder. Taq DNA polimeraz, tamamlayıcı DNA dizisinin sentezi sırasında serbest dNTP'ye ihtiyaç duymaktadır. Deoksiribonükleozid trifosfatlar dATP, dGTP, dTTP, dCTP karışımı olarak hazırlanırlar ve Taq DNA Polimeraz enzimi, ortamdaki dNTP'leri kullanarak kalıp DNA iplikçesine tamamlayıcı bir DNA ipliğini meydana getirecek sentez reaksiyonunu katalizler. Enzim, tamamlayıcı DNA sentezini başlatmak için primerlere ihtiyaç duymaktadır. Primerler çoğaltılmak istenen bölgenin iki ucuna özgü, bu bölgedeki baz dizilerine tamamlayıcı özellikte 18-25 baz uzunluğunda olan oligonükleotidlerdir. Sentezin yönü 5' ucundan 3' ucuna doğru olup, primerin serbest 3' hidroksil ucuna ortamdaki dNTP'lerin fosfodiester bağları ile bağlanması sonucu yeni DNA ipliğinin polimerizasyonu sağlanır. Kullanılan enzim tamponu ise Taq polimeraz enziminin en iyi şekilde çalışabilmesi için uygun ortamı sağlar. Ayrıca GC-zengin bölgelerinin amplifikasyonunu sağlamak için 10X GC-rich solüsyonu, %10 DMSO veya Q solüsyonu da kullanılır.

### 4.3. Primer Dizaynı

Çalışmada kullanılan primerler referans makalelerde tanımlanmış primer dizileridir (Arning vd., 2005a). Bu primerlerin ilgili genler üzerinde bağlandıkları bölgeler internet tabanlı elektronik PCR ile kontrol edilmiştir (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sutils/e-pcr/reverse.cgi>).

### 4.4. Agaroz Jel Elektroforezi

PCR'ın ardından elde edilen amplifikasyon ürünlerinin değerlendirilmesi agaroz jel elektroforez yöntemi ile yapılmaktadır. Agaroz jel elektroforezi DNA parçalarının moleküler ağırlıklarına göre ayrılmasını sağlar. Jeli hazırlamak için agaroz 0,5X TBE solüsyonunda yüksek sıcaklıkta çözündürülür. Agaroz tamamen çözüldükten sonra 55°C'ye soğuması beklenir ve solüsyona Etidyum bromür (EtBr) eklenir (0.5 mg/ml). Etidyum bromür DNA bazları arasına girerek UV ışığı altında floresan ışımaya yapar. EtBr güçlü bir mutajenik ajan olduğu için jel dökme işleminin, havalandırılması uygun odalarda ya da çeker ocaklı kabinler içerisinde yapılması tavsiye edilir. EtBr eklendikten sonra çözelti jel kasetine herhangi bir kabarcık kalmamasına dikkat edilerek dökülür. Örneklerin yükleneceği kuyucuklar ise taraklar yardımıyla oluşturulur. Agaroz jel bu şekilde 15–30 dakika polimerize olduktan sonra kullanılabilir. Örnekler yükleme solüsyonu ile karıştırılıp polimerize olan jele yüklenir ve 150 V elektrik akımında 15-20 dk yürütülür. Yükleme solüsyonu örneklerin jel kuyucuklarına oturmasını ve elektroforez sırasında örneğin takip edilmesini sağlar. Elektroforez sonrası bantların boyları jel dökümantasyon cihazında UV ışığı altında belirlenir.

Agaroz jel elektroforezinde kullanılan agaroz konsantrasyonu %0,5–3,0 arasında değiştirilerek jelin por çapı ayarlanabilir. Bu şekilde hazırlanan yüksek konsantrasyonlu jeller ile küçük, düşük konsantrasyonlu jeller ile de büyük DNA fragmanlarının en uygun şekilde jelde yürütülmesi sağlanır. Agaroz jel konsantrasyonu elektroforezi yapılacak ürünün büyüklüğüne uygun olarak belirlenir.

#### 4.5. Restriksiyon endonükleaz kesimi

Sınıf II restriksiyon endonükleazları DNA örneklerini 4-8 nükleotid uzunluğunda özgün palindromik dizilerden tanıyan ve aynı bölgeden kesen enzimlerdir. Böylece bir restriksiyon tanıma ve kesim bölgesini değiştiren, yani bir kesim bölgesi oluşturan ya da varolan kesim bölgesini ortadan kaldıran nokta mutasyonlarını tespit etmek için kullanılabilirler. Mutasyon noktasını çevreleyen primerler ile gerçekleştirilen PCR reaksiyonunun ardından tek nokta mutasyon bölgesinden kesen bir enzim seçilerek analiz edilir.

DNA moleküllerinin restriksiyon endonükleazları ile kesilmesine restriksiyon kesimi adı verilir. Restriksiyon kesimi sonrasında enzimin tanıma ve kesme bölgesinin varlığına göre DNA örnekleri fragmentlere ayrılır. Oluşan DNA fragmentleri uzunluklarına göre agaroz jel elektroforezinde ayrılır ve UV altında görüntülenir. Mutasyonların varlığı oluşan DNA fragmentlerinin uzunluğuna bakılarak tespit edilir.

#### 4.6. PCR Saflaştırma

DNA dizi analizinden önce, PCR ile amplifiye olmuş DNA'nın diğer kontaminantlardan ayrılması amacıyla PCR saflaştırılması işleminin gerçekleştirilmesi gerekmektedir. Kaotropik tuz guanidin tiosiyanat varlığında PCR ile çoğaltılan DNA filtreli tüpteki özel cam fiberlere seçici olarak bağlanır. Özel cam fiber sadece minimum 100 bp uzunluğunda olan DNA fragmentlerini bağlar, böylece oligonükleotidler ve dimerize olmuş primerler PCR reaksiyonlarından seçici olarak uzaklaştırılır. İlk aşamada PCR ürünü bağlama tamponuyla karıştırılır. Böylece ürün filtreli tüpte cam fiberlere bağlanır. Daha sonra bağlanan DNA kontaminantların uzaklaştırılması amacıyla yıkama tamponuyla yıkanır ve saflaştırmış DNA ayrıştırma tamponuyla geri kazanılır. Bağlanmış DNA böylece hızlı yıkama ve döndürme aşamaları ile kontamine eden primerlerden, nükleotidlerden ve tuzlardan arındırılmış olur. Bu metod organik solvent ekstraksiyonlarına ve DNA presipitasyonuna ihtiyacı ortadan kaldırır ve örneklerin hızlı pürifikasyonunu sağlar.

Saflaştırılmış DNA 100 bç'den küçük DNA fragmentlerinden ve mineral yağı, primerler, tuzlar, nükleotidler ve proteinler (termostabil enzimler) gibi diğer kontaminantlardan arındırılmıştır.

#### 4.7. Dizi analizi

DNA dizi analizi, DNA örneklerindeki baz dizilerinin sırasını belirleme yöntemidir. DNA dizi analizinde günümüzde birbirinden farklı iki yöntem kullanılmaktadır. Bu iki yöntem; Maxam ve Gilbert'in kimyasal kırılma yöntemi (Maxam vd.,1977) ve Sanger-Coulson'un zincir sonlanma yöntemidir (Sanger vd.,1977). Maxam ve Gilbert'in geliştirdikleri yöntemin prensibi hidrazin, dimetil sülfat ya da formik asit 'in, DNA' da bulunan bazıları özgül olarak değiştirmesine ve daha sonra eklenen piperidinin değişikliğe uğramış nükleotitlerin bulunduğu noktalardan zinciri kırmasına dayanır. Sanger Yöntemi ise zincir sonlandırılması yöntemidir. Bu yöntem enzimatik DNA sentezine dayanır ve günümüzün en yaygın kullanılan DNA dizi analizi tekniğidir. Bu yöntemde dizisi saptanacak olan DNA ipliği yeni sentezlenecek iplik için kalıp olarak kullanılır. DNA sentezini sağlamak için Klenow, Taq DNA polimeraz, ters transkriptaz ya da sekuenaz enzimlerinden birisi kullanılabilir. Yöntemin temeli DNA polimerazın dNTP'lerin yanısıra deoksiribozun 3' pozisyonunda OH grubu taşımayan ddNTP'leri (dideoksiribonükleozit trifosfat) de substrat olarak kullanabilmesine dayanır. Sentezlenen DNA'ya bir ddNTP'nin katılması 3' pozisyonunda OH grubu olmadığı için sentezi durdurur. Dizi analizi yapılırken dört ayrı reaksiyon karışımı hazırlanır. Her bir karışım kalıp DNA zinciri, bir primer, dNTP'lerin dördü ve ddNTP'lerden birini az miktarda içerir. Özgül zincir sonlanması için her bir reaksiyonda farklı bir ddNTP bulunur. Reaksiyonların her birinde çok az miktarda modifiye nükleotit kullanıldığı için yeni zincir sentezi rastgele sonlanarak bir dizi DNA fragmenti meydana gelir (Klug vd., 2000). Reaksiyonlar sonucu elde edilen DNA parçalarına elektroforez uygulanarak jel üzerinde yanyana yürütülür. Uygulanan elektriksel alanın etkisi ile DNA parçacıkları en kısası en önde olmak üzere jel üzerinde bir merdiven görüntüsü oluşturur. İşaretleme yöntemine göre jel üzerinde, tespit edilen parçacıklar reaksiyon karışımına konulan ddNTP'nin tipine göre okunur (Klug vd.,

2000). Bu yöntem, jel elektroforezi yerine kapiler elektroforez sisteminin uygulanması ile geliştirilmiştir. Kapiler elektroforez biyomolekülleri ayırmak için hidrofilik ya da hidrofobik fazla kaplı küçük silika kapilerler kullanır. Voltaj uygulandığında analitler yük/büyükük oranına da orantılı olan elektroforetik hareketliliğe göre birbirlerinden ayrılır. Elektroforez kapiler tüpün içinde gerçekleşir. Bu yöntemde yönteminde boya terminasyon işaretleme adı verilen bir metod kullanılarak farklı bazlarda sonlanan DNA sentez ürünlerine floresan işaretli boyalar iliştilir. Elektroforez, örnekler bir kapillerden geçirilirken uygulanır. Floresan işaretli boyaları uyarmak için bir lazer, boyaların yaydığı ışığı toplamak içinse bir CCD kamera kullanılır. Böylece, lazer uyarımının ardından dört boya tarafından yayılan farklı dalga boylarındaki ışık tek kulvarda ayırdedilebilir. Floresan miktarlarının ölçülmesi ve yorumlanmasının ardından DNA örneğindeki baz dizisi saptanır. Bu tez çalışması çerçevesinde yapılan dizi analizi reaksiyonları İontek A. Ş. tarafından kapiler elektroforez işlemine tabi tutulmuştur. Dizileme sonuçları Chromas-v1.45 programı ile görüntülenmiş ve analiz edilmiştir.

#### **4.8. Fragment Analizi**

Fragment analizi, floresan işaretli primerlerle çoğaltılan PCR örneklerinin uzunluğunu ve miktarlarını belirlemek için kullanılan bir kapiller elektroforez yöntemidir. Fragment analizi için yapılan PCR'da floresan işaretli primerler kullanılır ve böylece DNA fragmentlerinin elektroforez esnasında lazer uyarımı ile tespit edilmesi sağlanır. Analiz sonuçlarının yorumlanmasına yardımcı olmak üzere geliştirilmiş olan Peak Scanner v.1.0 yazılımı ile fragmentlerin uzunlukları bir grafik üzerinde tepelikler olarak görüntülenir. Her analizde internal büyükük markörü (örn. TAMRA) kullanılarak bir standart eğri çizilir, örneklerin boyu bu eğriye göre hesaplanır.



#### 4.9. Tek Nükleotid Polimorfizmlerinin (SNP) Tespiti

Bu tez çalışmasında Tablo 4.1.'de verilen NMDAR alt üniteleri ve TP53'teki SNP'lerin belirlenmesi amacıyla, önce söz konusu polimorfizm bölgeleri Tablo 3.1.'de belirtilen primerler kullanılarak PCR yöntemi ile çoğaltılmıştır. Polimorfik bölgeleri çoğaltmak için kullanılan primerlerin genomik DNA dizisine bağlanma bölgeleri Tablo 4.2.'de gösterilmiştir. PCR şartları Tablo 4.3.'te ve PCR komponentleri Tablo 4.4.'te belirtilmiştir. PCR reaksiyonu ürünlerini kontrol etmek amacı ile 5 µl PCR ürünü 3 µl yükleme tamponuyla karıştırılarak %2'lik agaroz jele yüklenmiş ve örnekler 100V'ta 15-20 dakika yürütülmüştür. Elektroforez sonrasında jel, dökümantasyon cihazında UV ışığı altında incelenmiş ve Quantity-one programı kullanılarak bantlar analiz edilmiştir.

Başarılı PCR ürünleri SNP'lerin belirlenmesi için ilgili restriksiyon enzimleri ile kesilmiştir. Bu çalışmada yapılan restriksiyon reaksiyonları için kullanılan enzimler, enzimlerin tanıma ve kesme bölgeleri ve inkübasyon şartları Tablo 4.5'te verilmiştir. Reaksiyon reaksiyonu PCR metoduyla çoğaltılmış DNA, restriksiyon enzimi, üretici tarafından tavsiye edilen tampon ve deiyonize su içerir. DNA örnekleri için reaksiyon karışımı hacmi 25 µl olacak şekilde hazırlanmış ve her örnek için 1-2 U enzim kullanılmıştır. İnkübasyondan sonra 15 µl reaksiyon karışımı agaroz jelde 15-20 dk yürütülmüş, örnekler jel dökümantasyon cihazında görüntülenmiş ve ilgili polimorfik bölge analiz edilmiştir.

Restriksiyon kesimi ile elde edilen sonuçların doğrulanması için dizi analizi yöntemi uygulanmıştır. Dizi analizi gerçekleştirilecek örneklerin kontaminantlardan uzaklaştırılması amacıyla ise önce PCR ürünlerinin saflaştırılması gerçekleştirilmiştir. Bu tez çalışmasında PCR ürünlerinin saflaştırılması Roche High Pure PCR Purification Kit kullanılarak 45 µl PCR ürünü ile yapılmıştır. PCR ürünlerinin üzerine 250 µl bağlanma tamponu eklenmiş, filtrelili tüpe aktarıldıktan sonra maksimum hızda bir dakika santrifüj yapılmış ve böylece DNA'nın filtreye bağlanması sağlanmıştır. Santrifüjden sonra üst sıvı atılarak 250 µl yıkama tamponu eklenmiş ve santrifüj işlemi yapılmıştır. Yıkama basamağı bir kez daha tekrarlanarak

DNA'nın diğer kontaminantlardan ayrılması sağlanmıştır. Filtreye 60 µl ayrıştırma tamponu eklenerek santrifüj işlemi tekrarlanmış ve bu şekilde DNA'nın filtreden geri kazanılması sağlanmıştır. Saflaştırma işleminin kontrolü için PCR ürünü %2'lik agaroz jelde yürütülmüş ve jel dökümantasyon cihazında değerlendirilmiştir. Saflaştırılan PCR ürünleri dizi analizine tabi tutularak restriksiyon kesimi ile elde edilen sonuçlar doğrulanmıştır.

#### 4.10. IT-15 Genindeki CAG Tekrarının Moleküler Analizi

Klinik olarak Huntington Hastalığı tanısı koyulmuş, ancak gendeki CAG tekrar sayıları bilinmeyen örneklerin IT-15 genindeki CAG tekrar bölgesi HD3 ve P3F primerleri (Tablo 3.1.) ile çoğaltılmıştır (Tablo 4.3.). CAG tekrar sayılarının fragment analizi yöntemi ile hesaplanabilmesi için floresan işaret taşıyan primer kullanılmıştır (HD3-FAM). Floresan işaretli PCR ürünlerinin boyu Peak Scanner™ Software v1.0 programı ile incelenerek tekrar sayıları hesaplanmıştır.

**Tablo 4.1.** NR1, NR2A, NR2B ve TP53 lokuslarındaki SNP'ler

Lokus	Polimorfik bölgeler (5' → 3')
<b>GRIN1 rs6293</b>	CCTGCGCTACGCCCC[A/G]GACGGTGAGTGCTGG
<b>GRIN2A rs1969060</b>	TTTATAGAGCCCTGC[C/T]TCAGTTGGATGAGTT
<b>GRIN2B rs1806201</b>	GTTGTTTCATGGTTGC[A/G]GTGGGGGAGTTCATT
<b>GRIN2B rs1042339</b>	TTTAAGCGCGACTCC[A/G]TCAGCGGAGGAGGGC
<b>GRIN2B rs890</b>	TAGCTTTTCCCAAAC[G/T]GATCTTTTCATTTAG
<b>TP53 R72P</b>	CAGAGGCTGCTCCCC[C/G]CGTGGCCCCTGCACC



**Tablo 4.3.** PCR döngüsü şartları

<b>Lokus</b>	<b>Döngü şartları</b>	<b>Döngü sayısı</b>
<b>IT-15 CAG tekrarı</b>	95 °C, 5dk Hot start 80°C 94 °C, 30sn 63°C, 45 sn 72 °C, 1 dk	40
<b>GRIN1</b>	94 °C, 5 dk 94 °C, 1dk 60.3 °C, 1 dk 72 °C, 1 dk 72 °C, 10 dk	35
<b>GRIN2A</b> <b>rs1969060</b>	94 °C, 5 dk 94 °C, 1dk 60.3 °C, 1 dk 72 °C, 1 dk 72 °C, 10 dk	35
<b>GRIN2B</b> <b>rs1806201</b>	94 °C, 5 dk 94 °C, 1dk 48.3 °C, 1 dk 72 °C, 1 dk 72 °C, 10 dk	35
<b>GRIN2B</b> <b>rs1042339</b>	94 °C, 5 dk 94 °C, 1dk 53.7 °C, 1 dk 72 °C, 1 dk 72 °C, 10 dk	35
<b>GRIN2B</b> <b>rs890</b>	94 °C, 5 dk 94 °C, 1dk 57.1 °C, 1 dk 72 °C, 1 dk 72 °C, 10 dk	35
<b>TP53 R72P</b>	94 °C, 5 dk 94 °C, 1dk 60.3 °C, 1 dk 72 °C, 1 dk 72 °C, 10 dk	35



**Tablo 4.5.** Restriksiyon analizi şartları

Lokus	Enzim	Kesim bölgesi	İnkübasyon sıcaklığı	İnkübasyon süresi
<b>GRIN1</b>	MspI	5'-C <sup>^</sup> C G G-3' 3'-G G C <sup>^</sup> C-5'	37°C	2 h
<b>GRIN2A</b> rs1969060	DdeI	5'-C <sup>^</sup> T N A G-3' 3'-G A N T <sup>^</sup> C-5'	37°C	2 h
<b>GRIN2B</b> rs1806201	PstI	5'-C T G C A <sup>^</sup> G-3' 3'-G <sup>^</sup> A C G T C-5'	37°C	2 h
<b>GRIN2B</b> rs1042339	PsyI	5'-G A C N <sup>^</sup> N N G T C-3' 3'-C T G N N <sup>^</sup> N C A G-5'	37°C	2 h
<b>GRIN2B</b> rs890	PsuI	5'-R <sup>^</sup> G A T C Y-3' 3'-Y C T A G <sup>^</sup> R-5'	37°C	2 h
<b>TP53 R72P</b>	Bsh1236I	5'-C G <sup>^</sup> C G-3' 3'-G C <sup>^</sup> G C-5'	37°C	2 h

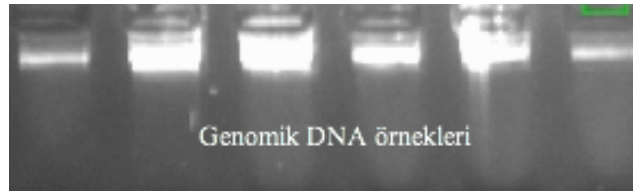
## 5. SONUÇLAR

### 5.1. Örneklerin Tanımı

Bu tez çalışmasına 46 erkek ve 56 kadın olmak üzere toplam 102 Huntington hastası ve nörolojik olarak sağlıklı 56 erkek ve 46 kadın olmak üzere toplam 102 sağlıklı birey dahil edilmiştir. Sağlıklı bireylerin yaş ortalaması 49,46'dır. Huntington Hastaları ise 21-95 yaşları arasında olup, ortalama yaş 52,27 olarak belirlenmiştir. Hastaların başlangıç yaşları 16-80 yaş arasında değişmektedir ve başlangıç yaşı ortalaması 40,75 yaş olarak hesaplanmıştır.

### 5.2. DNA İzolasyonu

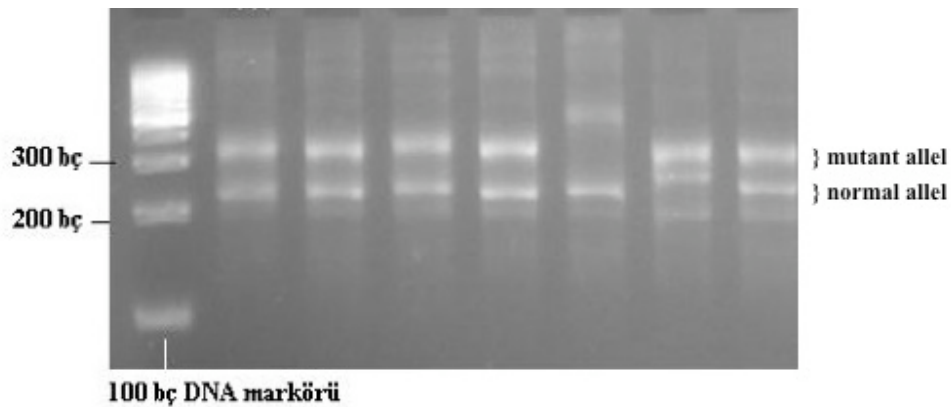
Bireylerden alınan kan örnekleri EDTA'lı tüplerde toplanmış ve RGDE metoduyla DNA izolasyonu yapılmıştır. İzolasyon sonrasında DNA örnekleri %1'lik agaroz jelde incelenmiş ve DNA'nın parçalanmadan elde edildiği gösterilmiştir (Şekil 5.1.). DNA örneklerinin saflık ve konsantrasyon analizleri spektrofotometrik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



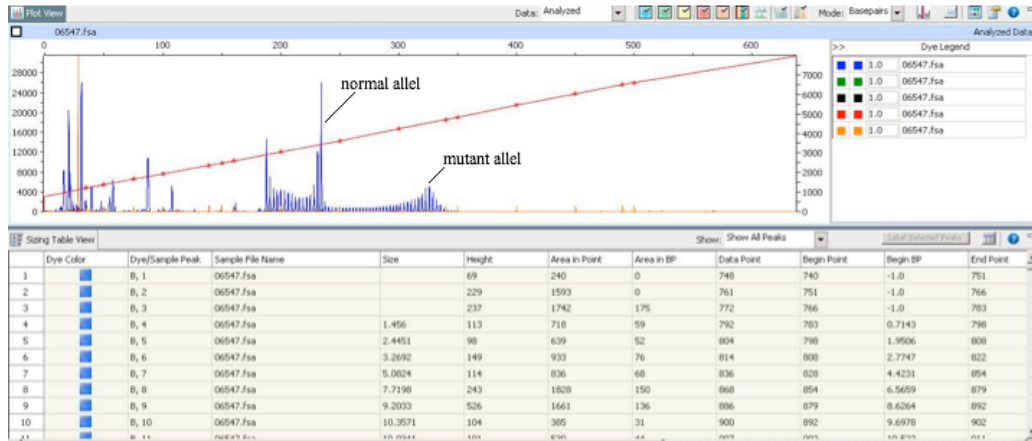
**Şekil 5.1.** DNA izolasyonu sonrasında örneklerin %1'lik agaroz jelde görüntülenmesi

### 5.3. Huntington Hastalarının CAG Tekrar Sayılarının Belirlenmesi

Huntington hastalarında IT-15 genindeki CAG tekrar sayılarını belirlemek için ekson 1'deki CAG tekrar bölgesi HD3FAM ve P3F primerleri kullanılarak çoğaltılmıştır. PCR ürünleri % 2'lik agaroz jelde yürütülerek normal ve artmış sayıda CAG tekrarı taşıyan aleller belirlenmiştir (Şekil 5.2.). Bunu takiben örnekler kapiler elektroforez ile fragment analize tabi tutulmuş ve alel uzunlukları Peak Scanner v1.0 programıyla değerlendirilmiştir (Şekil 5.3.).



Şekil 5.2. IT-15 PCR ürünlerinin %2'lik agaroz jelde görüntülenmesi

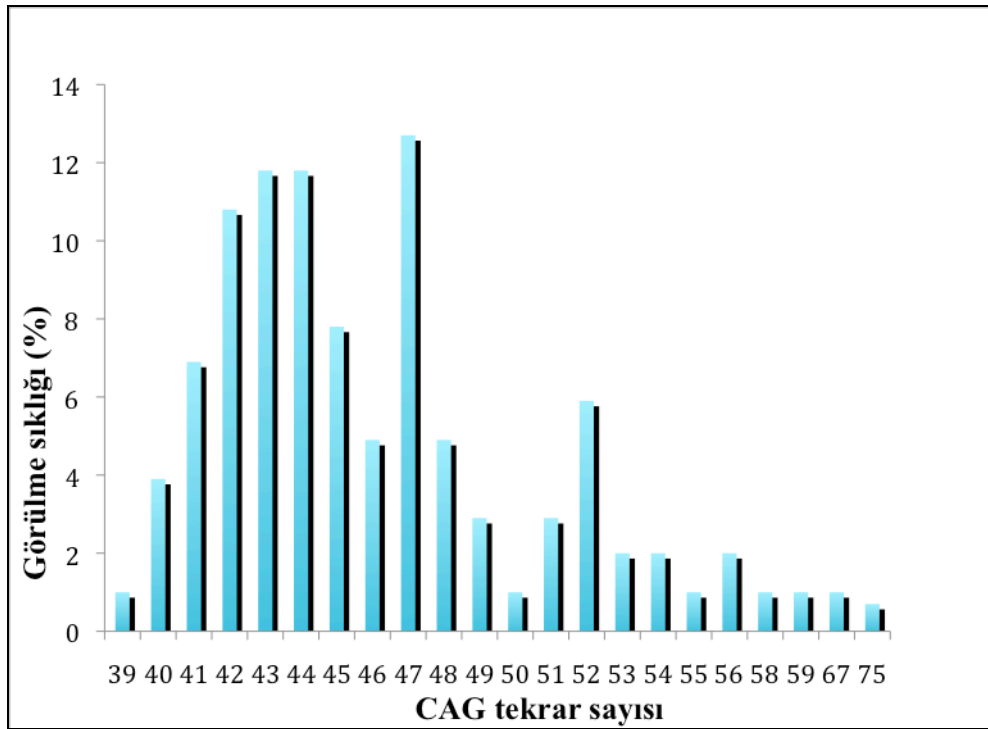


Şekil 5.3. CAG tekrar uzunluklarının fragment analizi ile belirlenmesi

Sonuçlar doğrultusunda Huntington hastalarında 39 ile 75 CAG tekrarı arasında değişen 22 farklı mutant alel belirlenmiştir. En sık gözlenen aleller 42 ile 47 CAG tekrar sayısı aralığındadır. Heterozigotluk oranı % 100'dür. En sık görülen alel



47 CAG (%12.7) tekrarlıdır, bunu 43 (%11.8) ve 44 (%11,8) tekrarlı aleller takip etmektedir (Şekil 5.4.).



Şekil 5.4. Huntington hastalarında belirlenen artmış CAG tekrar sayıları

Huntington hastalarının normal alellerindeki CAG tekrar sayısının ise 12-29 tekrar arasında değiştiği ve en sık gözlenen alel aralığının 17-20 CAG tekrar aralığı olduğu belirlenmiştir. İncelenen bireylerde 16 farklı normal alel saptanmıştır. 17 CAG tekrarı en sık (%27.5) görülen aleldir, bunu 18 (%25.5) ve 19 (%12.7) tekrarlı aleller takip etmektedir.

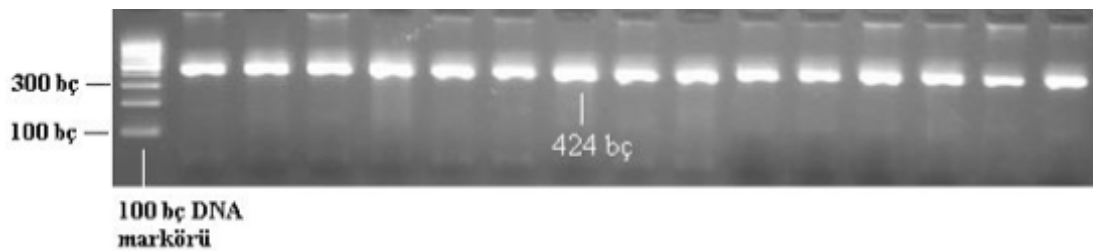
#### 5.4. SNP'lerin PCR-RFLP Metoduyla Belirlenmesi

102 sağlıklı ve 102 hasta bireye ait DNA örneklerinde NR1 rs6293, NR2A rs1969060, NR2B rs1806201, rs1042339 ve rs890 ve TP53 R72P polimorfik bölgeleri Bölüm 4.9.'da belirtilen PCR şartlarıyla çoğaltılmıştır. Çoğaltılan PCR ürünleri agaroz jel elektroforezine tabi tutulduktan sonra UV ışığı altında görüntülenmiştir. Başarılı bir şekilde çoğaltıldığı tespit edilen PCR örnekleri, özgün olarak SNP bölgesini tanıyan ve kesen restriksiyon enzimleri ile kesilmiş ve kesim

ürünleri agaroz jel elektroforezinde yürütülmüştür. Kesimden sonra farklı uzunluklarda bulunan fragmentler jelin dökümantasyon cihazında Quantity-one programı ile analizinin yapılmasıyla tespit edilmiştir. Böylece SNP pozisyonlarındaki bazların ve ilgili alellerin belirlenmesi mümkün olmuştur.

#### 5.4.1. NR1 rs6293 SNP'sinin Belirlenmesi

NMDA reseptörünün NR1 alt ünitesini kodlayan GRIN1 geni kromozom 9q34.3'te yer alır. Toplam 102 sağlıklı ve 102 hasta bireyde NR1 alt ünitesini kodlayan GRIN1 genindeki rs6293 SNP bölgesinin çoğaltılması NR1F ve NR1R primerleri ile Bölüm 4.9'da verilen şartlar kullanılarak gerçekleştirilmiştir. 424 baz çiftlik PCR ürünleri % 2'lik agaroz jelde yürütülerek kontrol edilmiştir (Şekil 5.5.).

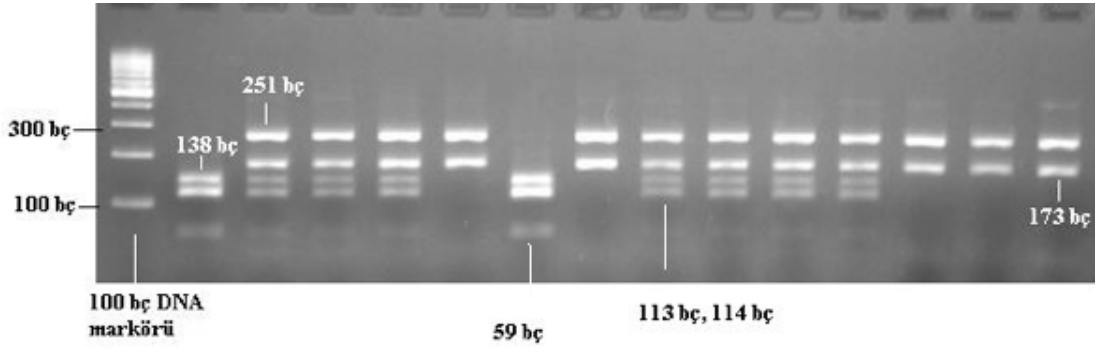


Şekil 5.5. GRIN1 rs 6293 PCR ürünlerinin %2'lik agaroz jelde görüntülenmesi

Polimorfik bölgede G bazı bulunduğunda MspI enzimi için bir tanıma ve kesme noktası oluşur. Bu alel, yine bir MspI kesim bölgesi içeren rs28687864 G aleli ile bağlantılıdır. Dolayısıyla, rs6293 ve rs28687864 polimorfik bölgeleri aynı PCR reaksiyonunda çoğalmıştır ve G alelleri varlığında iki MspI kesim bölgesi oluşmaktadır. Genotiplere göre beklenen fragment uzunlukları Tablo 5.1.'de verilmiştir. GRIN1 rs6293 SNP'sinin MspI enzimi ile kesimiyle oluşan fragmentlerin jel görüntüsü ise Şekil 5.6.'da verilmiştir.

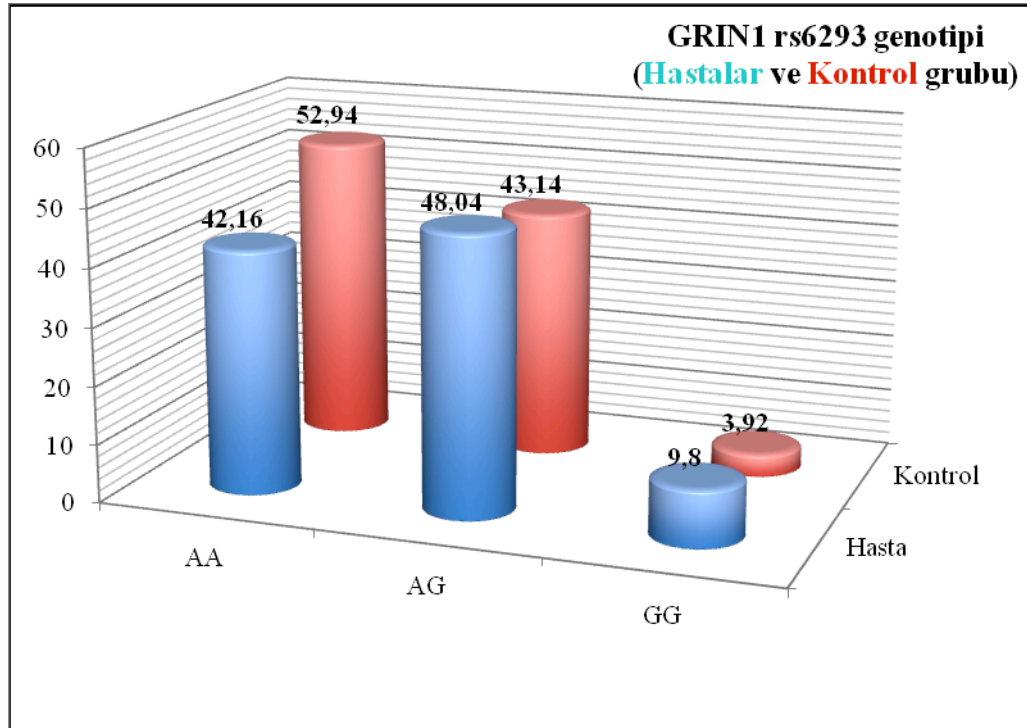
Tablo 5.1. NR1 rs6293 genotiplerine göre oluşan fragment uzunlukları

Genotip	Fragment uzunlukları
AA	251 bp +173 bp
AG	251 bp +173 bp + 138 bp + 59 bp + 114 bp + 113 bp
GG	138 bp + 59 bp + 114 bp + 113 bp



Şekil 5.6. NR1 rs6293 PCR ürünlerinin %2'lik agaroz jelde MspI analizi

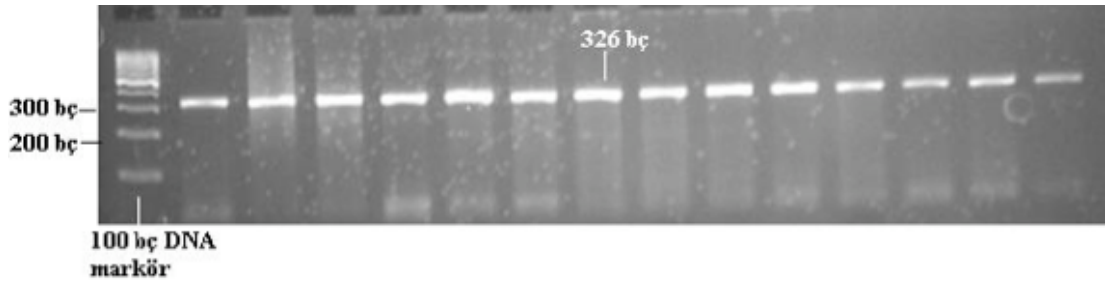
Sonuçlar doğrultusunda HH'na sahip bireylerde GRIN1 genindeki rs6293 polimorfizminde en sık görülen genotipin AG olduğu belirlenmiştir. AG genotipini sırasıyla AA ve GG genotipleri takip etmektedir. Sağlıklı kontrol grubunda ise en sık görülen AA genotipi olmuştur. Sırasıyla AG ve GG genotipleri AA genotipini takip etmişlerdir. Söz konusu genotiplere ait frekanslar Şekil 5.7.'de verilmiştir.



Şekil 5.7. GRIN1 rs6293 genotip frekansları (%)

#### 5.4.2. NR2A rs1969060 SNP'sinin Belirlenmesi

NR2A alt ünitesini kodlayan GRIN2A geni kromozom 16p13.2'de yer alır. Toplam 102 sağlıklı ve 102 hasta bireyin bu gendeki rs1969060 SNP bölgesinin çoğaltılması 2A rs1969060R ve 2A rs1969060F primerleri kullanılarak PCR ile gerçekleştirilmiştir. 325 baz çiftlik PCR ürünleri % 2'lik agaroz jelde yürütülerek kontrol edilmiştir (Şekil 5.8.).

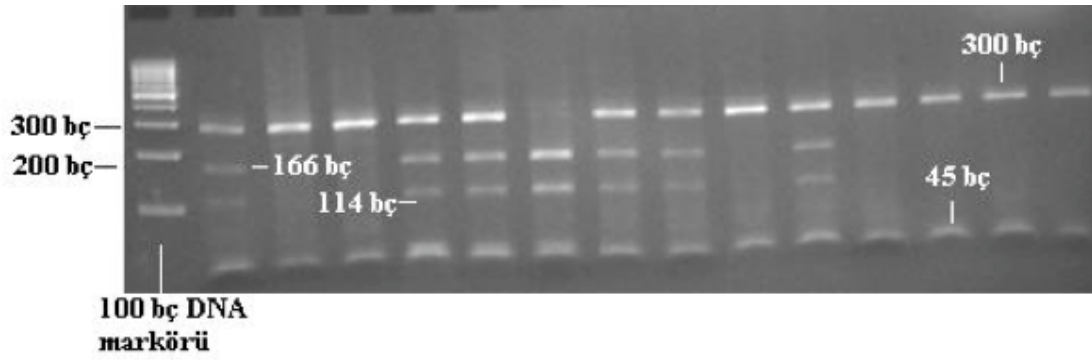


Şekil 5.8. GRIN2A rs1969060 PCR ürünlerinin %2'lik agaroz jelde görüntülenmesi

DdeI enzimi örneklerin çoğaltılan bölgesinde, araştırılan polimorfizm dışında da bir kesim bölgesine sahiptir. Polimorfizm bölgesinde C bazı bulunduğu enzim için yeni bir tanıma ve kesme noktası oluşur. Genotiplere göre oluşan fragment uzunlukları Tablo 5.2.'de, fragmentlerin jel görüntüsü ise Şekil 5.9.'da verilmiştir.

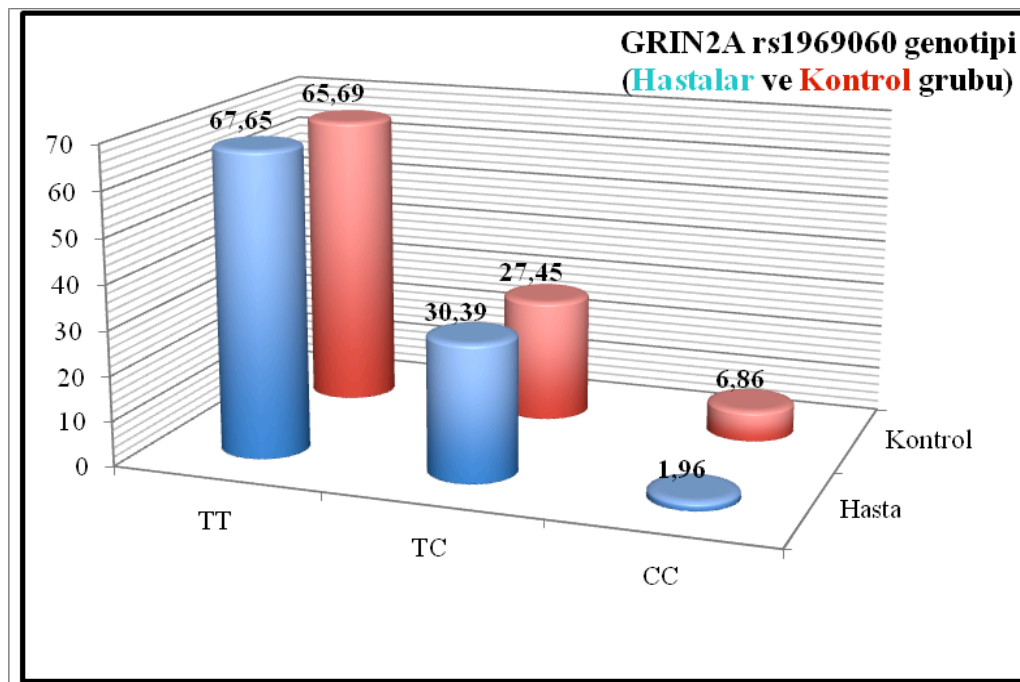
Tablo 5.2. GRIN2A rs1969060 genotiplerine göre oluşan fragment uzunlukları

Genotip	Fragment uzunlukları
TT	280bp + 45 bp
CT	280 bp + 166 bp + 114 bp + 45 bp
CC	166 bp + 114 bp + 45 bp



**Şekil 5.9.** GRIN2A rs1969060 PCR ürünlerinin %2'lik agaroz jelde DdeI analizi

Sonuçlar doğrultusunda Huntington hastalığına sahip bireylerde ve sağlıklı kontrol grubunda GRIN2A genindeki rs1969060 polimorfizminde en sık görülen genotipin TT olduğu belirlenmiştir. TT genotipini sırasıyla CT ve CC genotipi takip etmektedir (Şekil 5.10.).

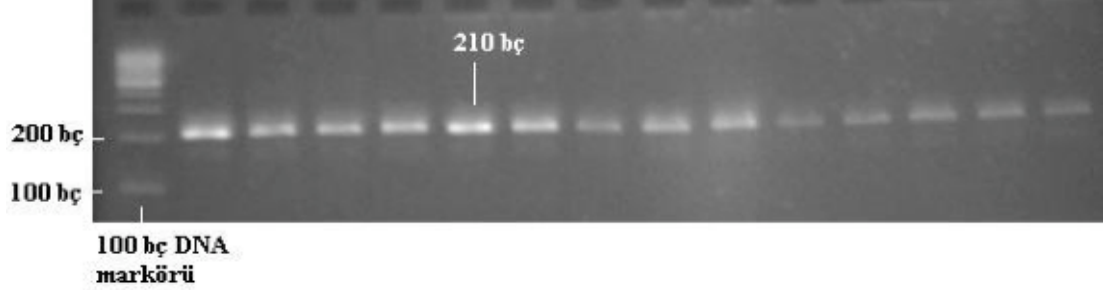


**Şekil 5.10.** GRIN2A rs1969060 genotip frekansları (%)

#### 5.4.3. NR2B rs1806201 SNP'sinin Belirlenmesi

NR2B alt ünitesini kodlayan GRIN2B geni 12p12 kromozom bölgesinde yer alır. Toplam 102 sağlıklı bireyin ve 102 hasta bireyin rs1806201 SNP bölgesinin

çoğaltılması 2B rs1806201R ve 2B rs1806201F primerleri kullanılarak PCR ile yapılmıştır. 210 baz çiftlik PCR ürünleri % 2'lik agaroz jelde yürütülerek kontrol edilmiştir (Şekil 5.11.).

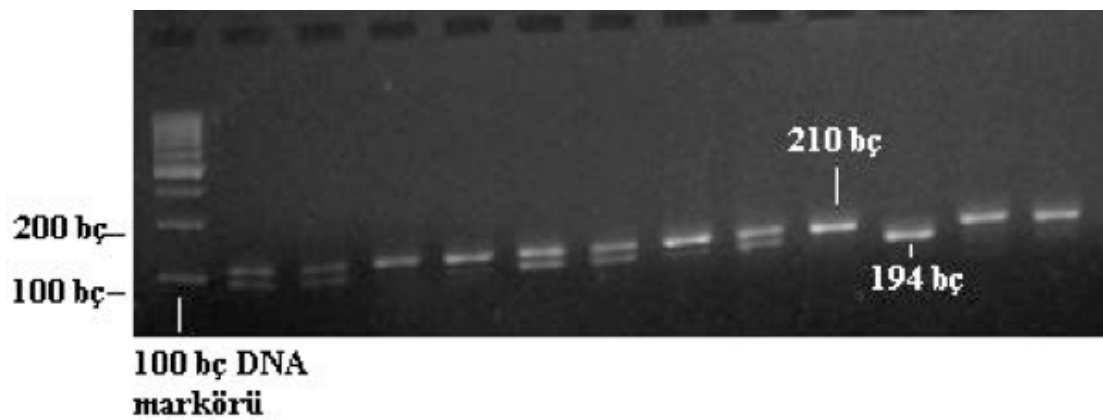


**Şekil 5.11.** GRIN2B rs1806201 PCR ürünlerinin %2'lik agaroz jelde görüntülenmesi

Örneklerin polimorfizm bölgesinde T bazı bulunduğu PstI enzimi için yeni bir tanıma ve kesme noktası oluşur. Genotiplere göre oluşan fragment uzunlukları Tablo 5.3.'te, restriksiyon analizi sonuçları ise Şekil 5.12.'de verilmiştir.

**Tablo: 5.3.** GRIN2B rs1806201 genotiplerine göre oluşan fragment uzunlukları

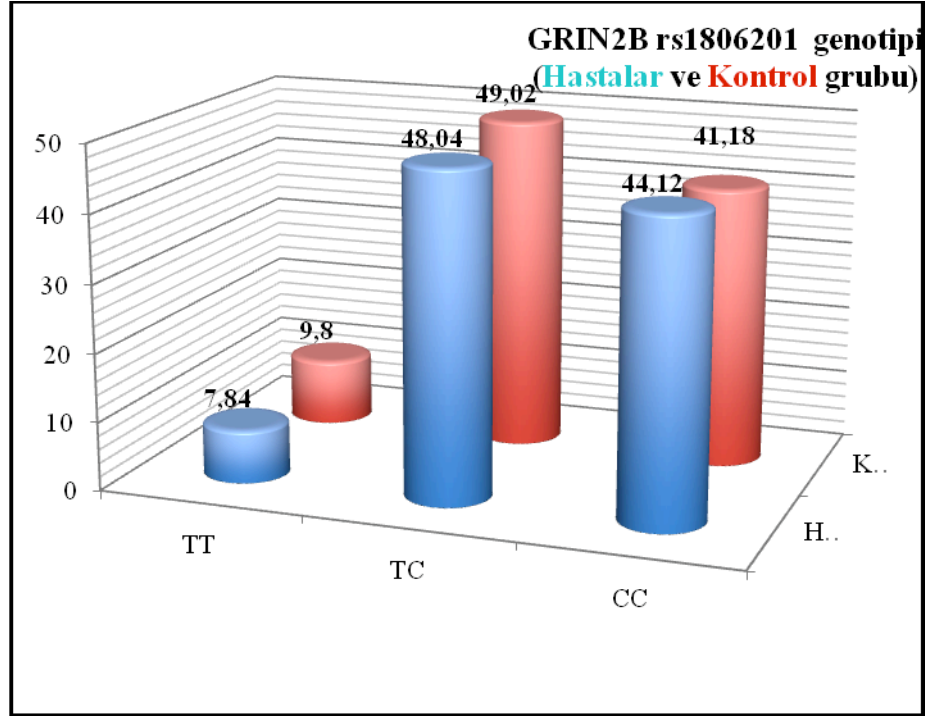
Genotip	Fragment uzunlukları
CC	210 bp
CT	210 bp + 194 bp + 16 bp
TT	194 bp + 16 bp



**Şekil 5.12.** GRIN2B rs1806201 PCR ürünlerinin %2'lik agaroz jelde PstI analizi

Sonuçlar doğrultusunda Huntington hastalığına sahip bireylerde ve sağlıklı

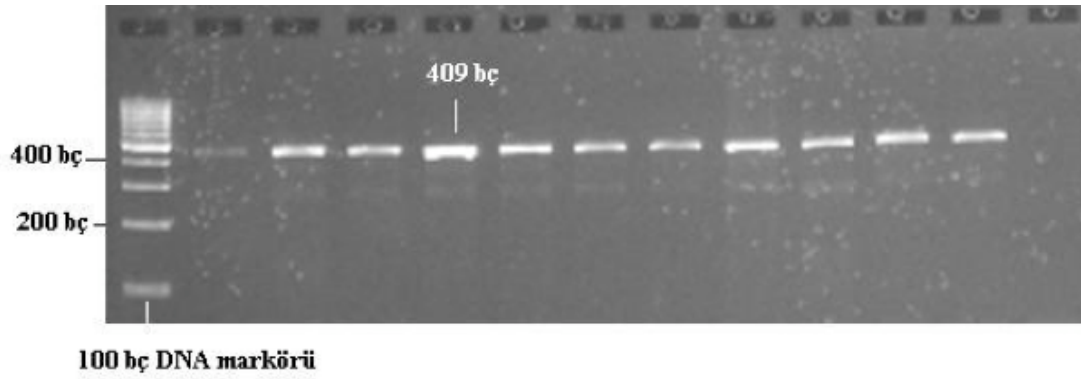
kontrol grubunda GRIN2B genindeki rs1806201 polimorfizminde en sık görülen genotipin CT olduğu belirlenmiştir. CT genotipini sırasıyla CC ve TT genotipleri takip etmektedir (Şekil 5.13.)



Şekil 5.13. GRIN2B rs1806201 genotip frekansları

#### 5.4.4. NR2B rs1042339 SNP'sinin belirlenmesi

Toplam 102 sağlıklı bireyin ve 102 hasta bireyin GRIN2B genindeki rs1042339 SNP bölgesinin çoğaltılması 2B rs1042339R ve 2B rs1042339F primerleri kullanılarak PCR ile gerçekleştirilmiştir. 409 baz çiftlik PCR ürünleri % 2'lik agaroz jelde yürütülerek kontrol edilmiştir (Şekil 5.14.).

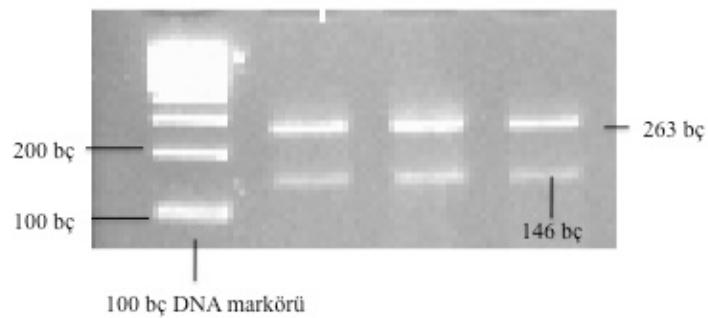


**Şekil 5.14.** GRIN2B rs1042339 PCR ürünlerinin %2'lik agaroz jelde görüntülenmesi

PsyI enzimi örneklerin polimorfizm bölgesinde G bazı bulunduğunda yeni bir tanıma ve kesme noktası oluşturur. Genotiplere göre oluşan fragment uzunlukları Tablo 5.4.'te, fragmentlerin jel görüntüsü ise Şekil 5.15.'de verilmiştir.

**Tablo 5.4.** GRIN2B rs1042339 genotiplerine göre oluşan fragment uzunlukları

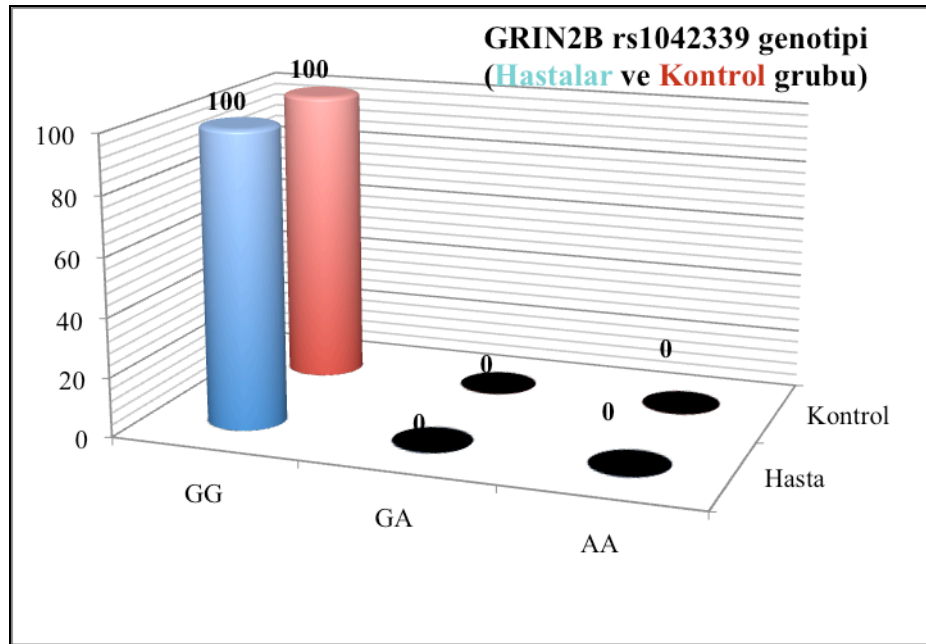
Genotip	Fragment uzunlukları
GG	263 bp + 146 bp
GA	409 bp + 263 bp + 146 bp
AA	409 bp



**Şekil 5.15.** GRIN2B rs1042339 ürünlerinin %2'lik agaroz jelde PsyI analizi

Sonuçlar doğrultusunda Huntington hastalarında ve sağlıklı kontrol grubunda sadece GG genotipi gözlemlenmiştir ( Şekil 5.16.).

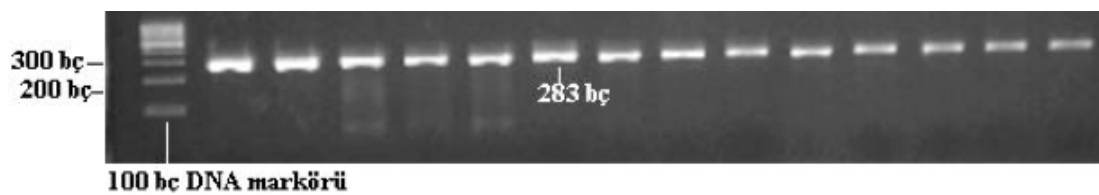




Şekil 5.16. GRIN2B rs1042339 genotip frekansları (%)

#### 5.4.5 NR2B rs890 SNP'sinin Belirlenmesi

Toplam 102 sağlıklı bireyin ve 102 hasta bireyin GRIN2B genindeki rs890 SNP bölgesinin çoğaltılması 2B rs890R ve 2B rs890F primerleri kullanılarak PCR ile yapılmıştır. 283 baz çiftlik PCR ürünleri % 2'lik agaroz jelde yürütülerek kontrol edilmiştir (Şekil 5.17.).

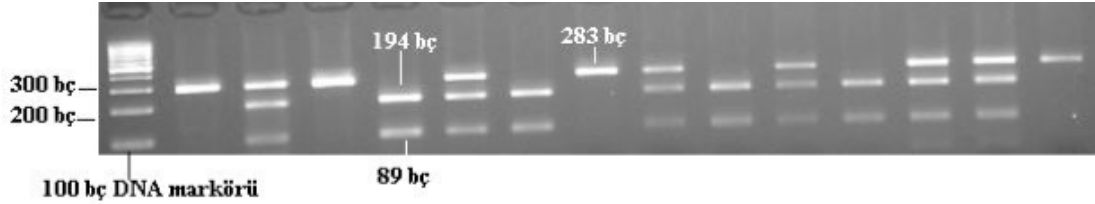


Şekil 5.17 GRIN2B rs890 PCR ürünlerinin %2'lik agaroz jelde görüntülenmesi

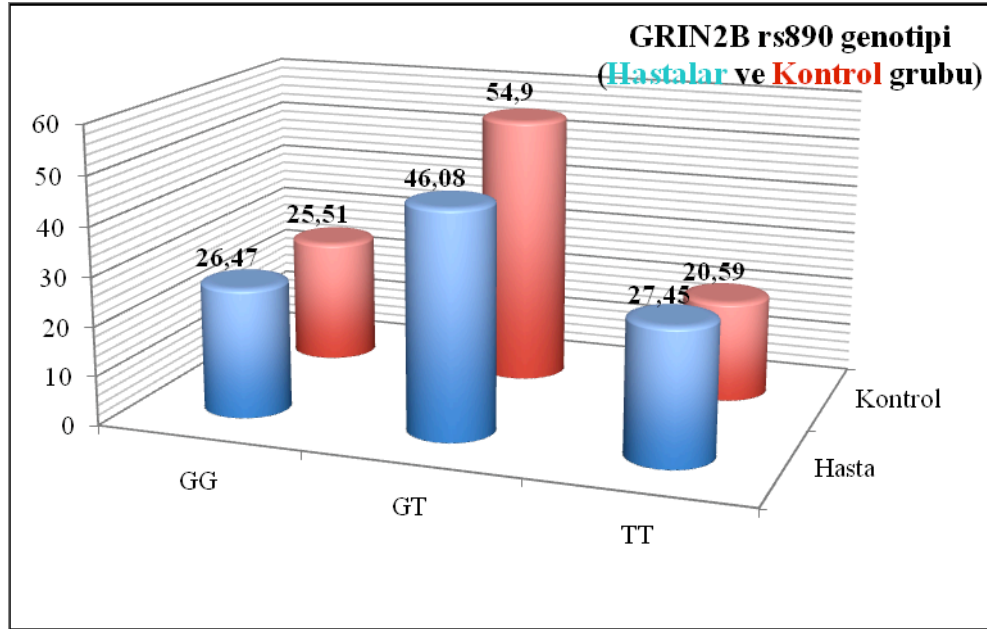
PsuI enzimi örneklerin polimorfik bölgesinde T bazı bulunduğunda yeni bir tanıma ve kesme noktası oluşturur. Genotiplere göre oluşan fragment uzunlukları Tablo 5.5.'te, fragmentlerin jel görüntüsü ise Şekil 5.18.'de verilmiştir.

**Tablo 5.5.** GRIN2B rs890 genotiplerine göre oluşan fragment uzunlukları

Genotip	Fragment uzunlukları
GG	283 bp
GT	283 bp + 194 bp + 89 bp
TT	194 bp + 89 bp

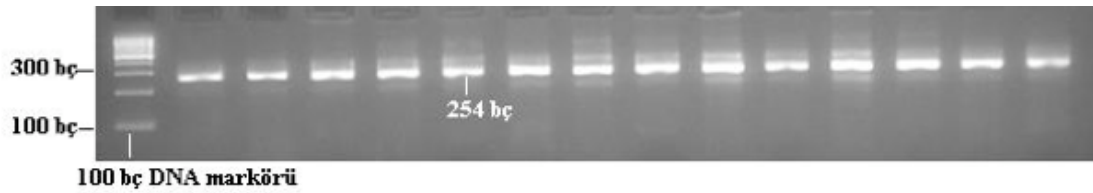
**Şekil 5.18.** GRIN2B rs890 ürünlerinin %2'lik agaroz jelde PvuII analizi

Sonuçlar doğrultusunda Huntington Hastalığına sahip bireylerde ve sağlıklı kontrol grubunda GRIN2B genindeki rs890 polimorfizminde en sık görülen genotipin GT olduğu belirlenmiştir. Huntington hastalarında GT genotipini sırasıyla TT ve GG genotipi takip etmektedir. Sağlıklı kontrol grubunda ise GT genotipini sırasıyla GG ve TT genotipleri takip etmektedir (Şekil 5.19.).

**Şekil 5.19.** GRIN2B rs890 genotip frekansları (%)

#### 5.4.6. TP53 R72P SNP'sinin Belirlenmesi

Toplam 102 sağlıklı ve 102 hasta bireyde p53'ü kodlayan TP53 genindeki R72P SNP bölgesinin çoğaltılması TP53 R72P-F ve TP53 R72P-R primerleri kullanılarak PCR ile yapılmıştır. 254 baz çiftlik PCR ürünleri % 2'lik agaroz jelde yürütülerek kontrol edilmiştir (Şekil 5.20.).

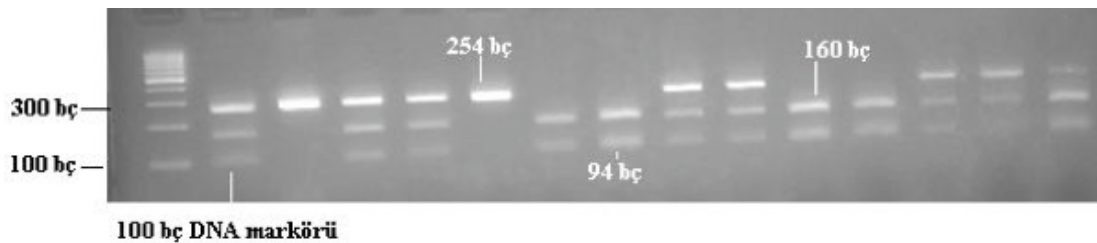


**Şekil 5.20.** TP53 R72P PCR ürünlerinin %2'lik agaroz jelde görüntülenmesi

Bsh1236I enzimi örneklerin polimorfik bölgesinde G bazı bulunduğunda yeni bir tanıma ve kesme noktası oluşturur. Genotiplere göre oluşan fragment uzunlukları Tablo 5.6.'da, fragmentlerin jel görüntüsü ise Şekil 5.21.'de verilmiştir.

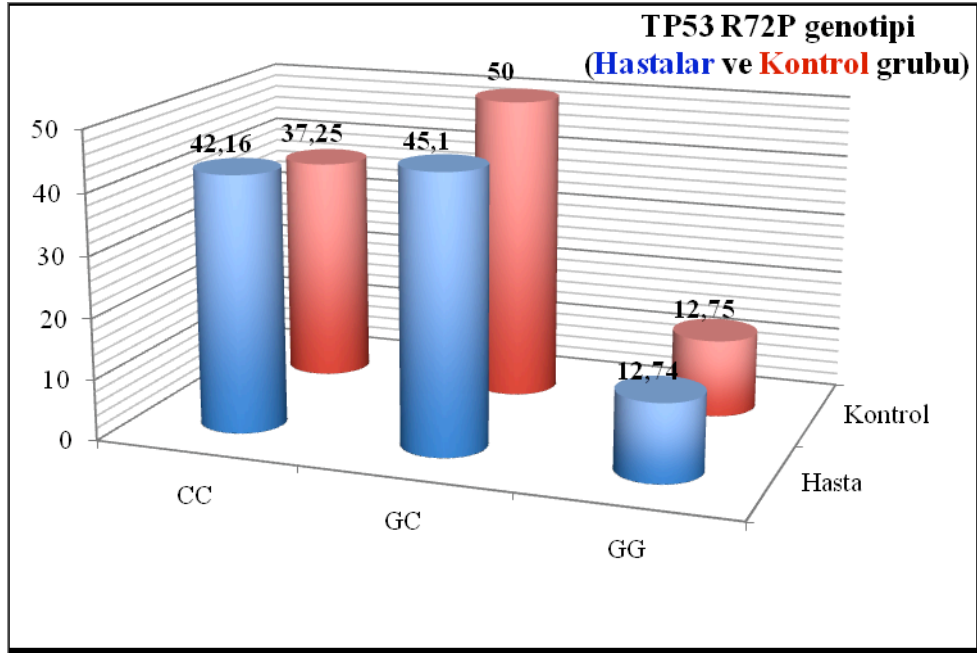
**Tablo 5.6.** TP53 R72P genotiplerine göre oluşan fragment uzunlukları

Genotip	Fragment uzunlukları
CC	254 bp
GC	254 bp + 160 bp + 94 bp
GG	160 bp + 94 bp



**Şekil 5.21** TP53 R72P PCR ürünlerinin %2'lik agaroz jelde Bsh1236I analizi

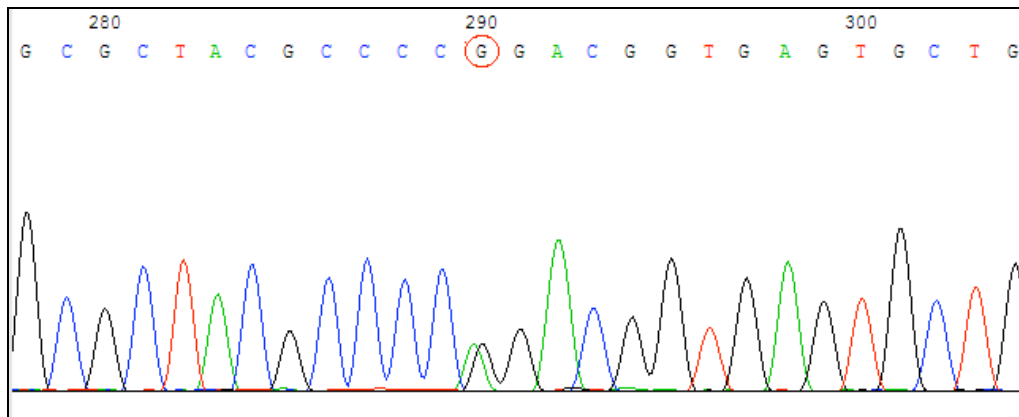
Huntington hastalarında sağlıklı kontrol grubunda TP53 genindeki R72P polimorfizminde en sık görülen genotipin GC olduğu belirlenmiştir. GC genotipini sırasıyla CC ve GG genotipi takip etmektedir (Şekil 5.22.).



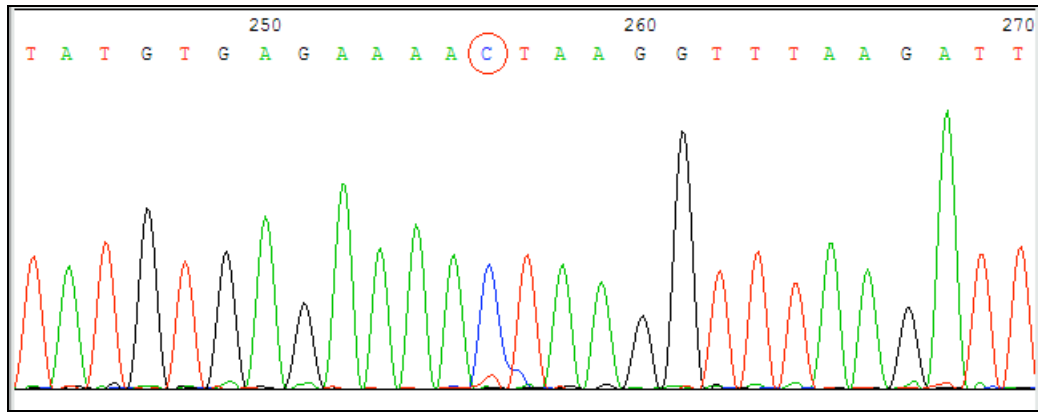
**Şekil 5.22.** TP53 R72P genotip frekansları (%)

### 5.5. NMDAR ve TP53 Genlerindeki SNP'lerin Dizi Analizi ile Doğrulanması

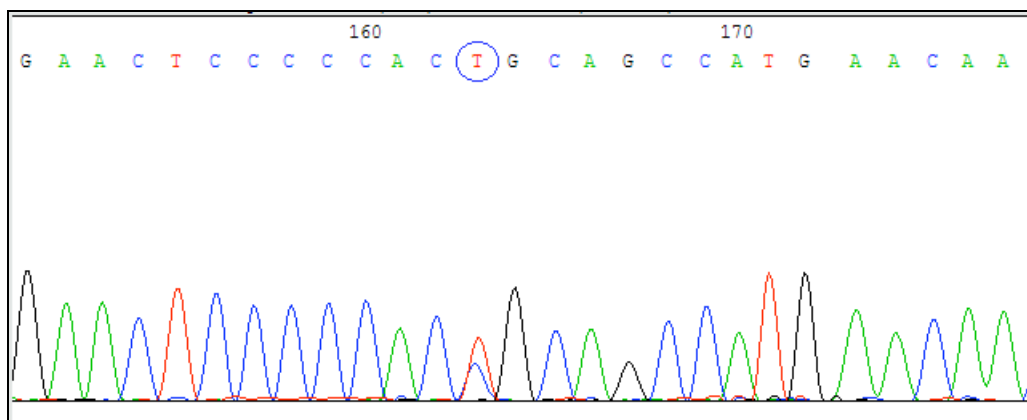
NMDAR ve TP53 genlerindeki SNP'lerin restriksiyon analizi sonuçları, dizi analizi ile doğrulanmıştır (Şekil 5.23.a-f).



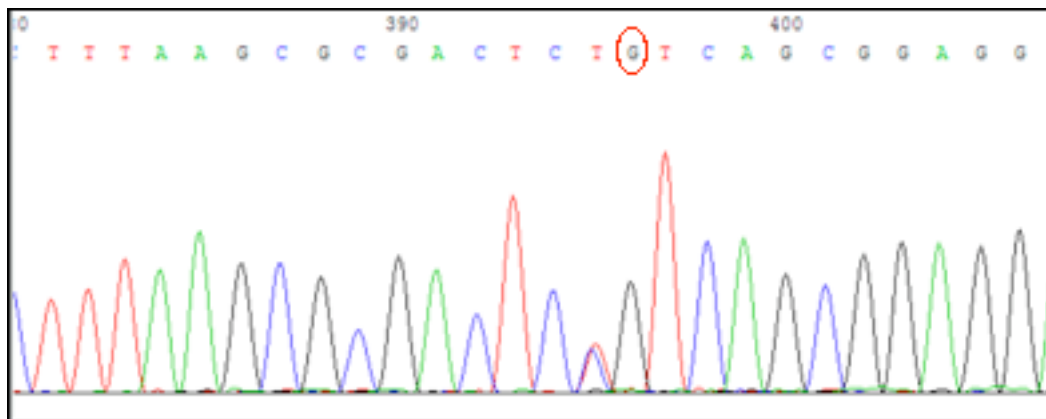
**Şekil 5.23.a.** Heterozigot (G/A) NR1 rs6293 polimorfizmi



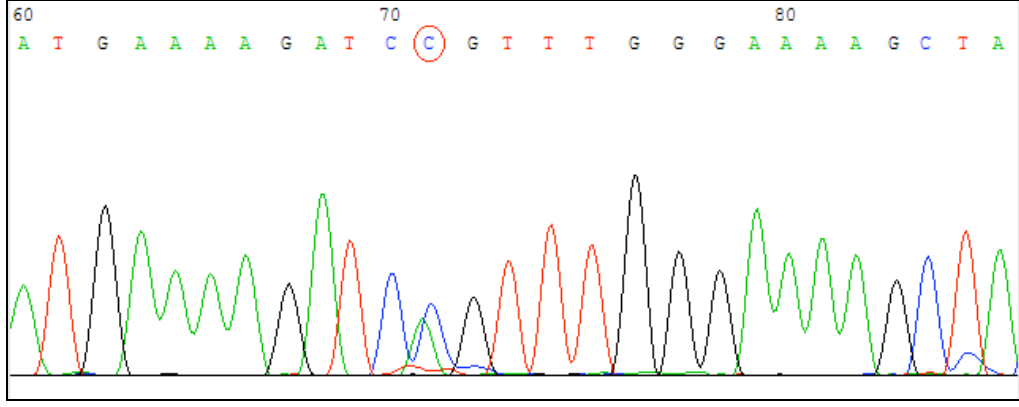
Şekil 5.23.b. NR2A rs1969060 (CC) polimorfizmi



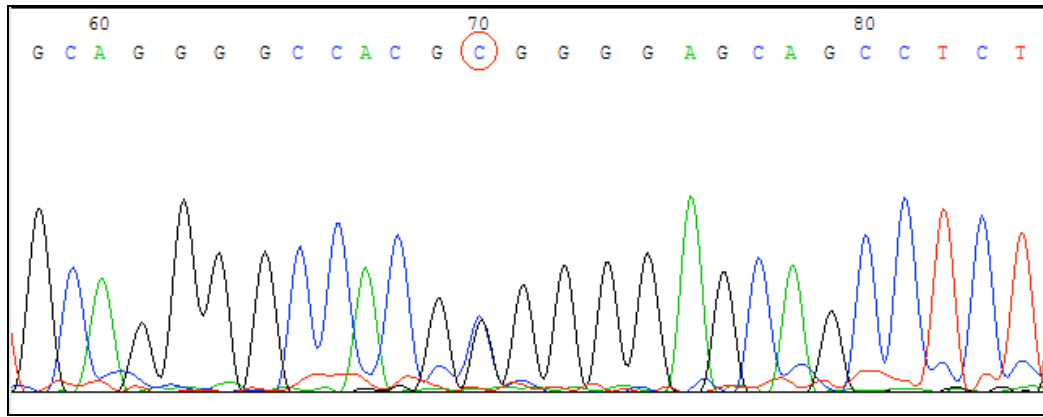
Şekil 5.23.c. Heterozigot (C/T) NR2B rs1806201 polimorfizmi



Şekil 5.23.d. Homozigot (GG) NR2B rs1042339 polimorfizmi



Şekil 5.23.e. Heterozigot (C/A) NR2B rs890 polimorfizmi



Şekil 5.23.f. Heterozigot (G/C) TP53 R72P polimorfizmi

## 5.6. SNP Analizi Sonuçlarının Değerlendirilmesi

Huntington hastalarında ve sağlıklı kontrol grubunda incelenen her polimorfik lokusa ait genotiplerin görülme sıklıkları Tablo 5.7. ve 5.8.'de özetlenmiştir.

**Tablo 5.7.** Huntington hastalarının genotipleri

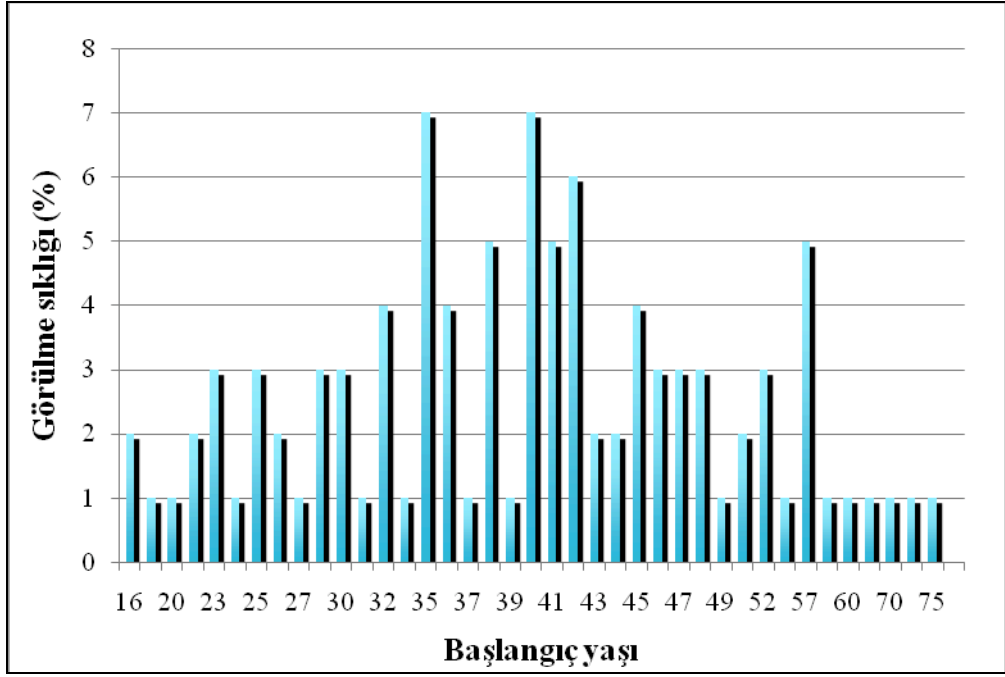
<b>rs6293</b>	<b>rs1969060</b>	<b>rs1806201</b>	<b>rs890</b>	<b>rs1042339</b>	<b>TP53</b>
<b>% (n)</b>	<b>% (n)</b>	<b>% (n)</b>	<b>% (n)</b>	<b>% (n)</b>	<b>% (n)</b>
42.16 (43)	1.96 (2)	44.12 (45)	26.47 (27)	0.0 (0)	42.16 (43)
AA	CC	CC	GG	AG	CC
48.04 (49)	30.39 (31)	48.04 (49)	46.08 (47)	100 (102)	45.10 (46)
AG	CT	CT	GT	GG	GC
9.80 (10)	67.65 (69)	7.84 (8)	27.45 (28)	0 (0)	12.74 (13)
GG	TT	TT	TT	AA	GG
Toplam:	Toplam:	Toplam:	Toplam:	Toplam:	Toplam:
102	102	102	102	102	102

**Tablo 5.8.** Kontrol grubunun genotipleri

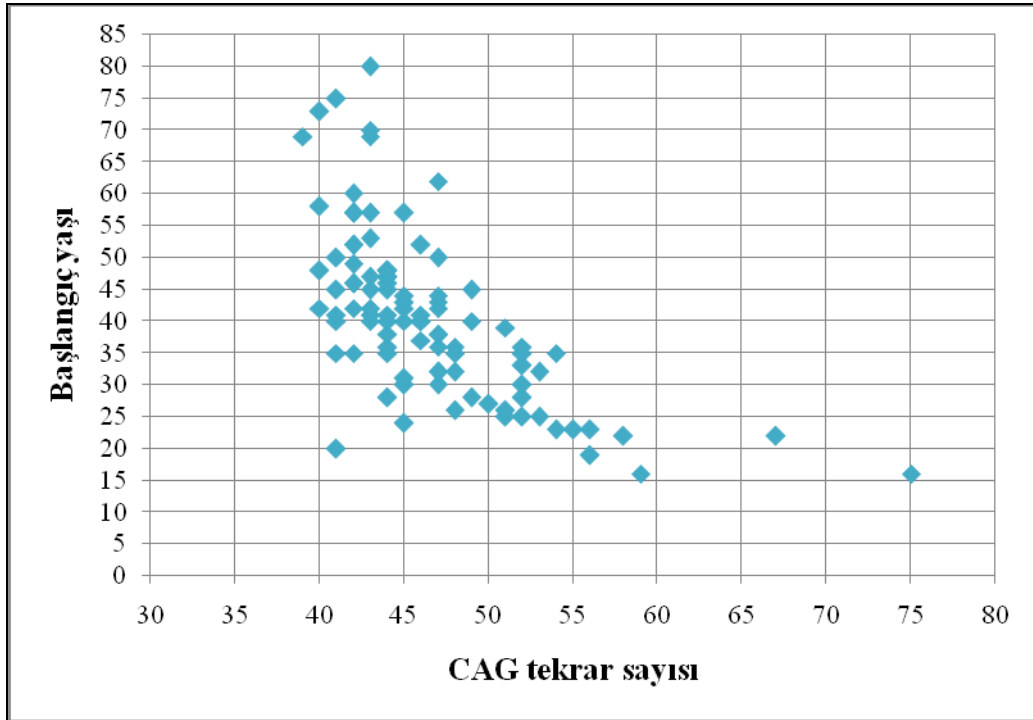
<b>rs6293</b>	<b>rs1969060</b>	<b>rs1806201</b>	<b>rs890</b>	<b>rs1042339</b>	<b>TP53</b>
<b>% (n)</b>	<b>% (n)</b>	<b>% (n)</b>	<b>% (n)</b>	<b>% (n)</b>	<b>% (n)</b>
52.94 (54)	6.86 (7)	41.18 (42)	24.51 (25)	0.0 (0)	37.25 (38)
AA	CC	CC	GG	AG	CC
43.14 (44)	27.45 (28)	49.02 (50)	54.90 (56)	100 (102)	50 (51)
AG	CT	CT	GT	GG	GC
3.92 (4)	65.69 (67)	9.80 (10)	20.59 (21)	0 (0)	12.75 (13)
GG	TT	TT	TT	AA	GG
Toplam:	Toplam:	Toplam:	Toplam:	Toplam:	Toplam:
102	102	102	102	102	102

### 5.7. Huntington Hastalarında Başlangıç Yaşı

Çalışmaya dahil edilen 102 Huntington hastasının yaş ortalaması 52,27 yaş olarak belirlenmiştir. Başlangıç yaşı ortalaması ise 40,75 yaş olarak hesaplanmıştır. Hastaların başlangıç yaşları dağılımı Şekil 5.24.'te, CAG tekrar sayısı ve başlangıç yaşı ilişkisi ise Şekil 5.25.'te gösterilmiştir.



Şekil 5.24. Huntington hastalarının başlangıç yaşı dağılımları



Şekil 5.25. Huntington hastalarında CAG tekrar sayısı -başlangıç yaşı ilişkisi

## 5.8. Verilerin İstatistiksel Analizi

IT-15 genindeki CAG tekrar sayısının ve bu CAG tekrar sayısı ile birlikte



GRIN1, GRIN2A, GRIN2B ve TP53 genlerindeki polimorfizmlerin HH'nın başlangıç yaşına etkisi istatistiksel olarak değerlendirilmiştir. CAG tekrar sayıları ayrıca aralarında gruplandırılmış ve istatistiksel analizler tekrar edilmiştir. Hesaplamalar yapılırken cinsiyet de göz önünde bulundurulmuştur. CAG tekrar sayılarının başlangıç yaşına etkisi hesaplanırken doğrusal regresyon, genotiplerin başlangıç yaşına etkisi değerlendirilirken ise çoklu doğrusal regresyon analizi kullanılmıştır. Ayrıca genotipler ve bu genotiplerin oluşturduğu alel frekansları hasta ve kontrol grubunda karşılaştırılmıştır. Her polimorfizme ait genotip frekanslarının Hardy-Weinberg Dengesi'ne uygunluğu da istatistiksel olarak test edilmiştir. İstatistiksel analizler SPSS 17.0 ve PLINK v1.06 programları ile yapılmıştır.

### 5.8.1. Hardy-Weinberg Analizi ve Alel Frekansları

Her polimorfizme ait gözlemlenen genotip frekanslarından yararlanılarak alel frekansları (Tablo 5.9. – 5.14.) ve beklenen genotip frekansları Hardy-Weinberg prensibine göre hesaplanmış ve ki-kare uygunluk testi ile değerlendirilmiştir. Ancak ki-kare testi için oluşturulan tablolarda bazı değerler beşten küçük olduğundan dolayı sonuçlar Fisher's Exact Test ile düzeltilmiştir. Bu amaçla Hardy-Weinberg Testi için PLINK programı kullanılmıştır (Tablo 5.15.).

**Tablo 5.9.** NR1 rs6293 alel frekansları

rs6293	A	G
Hasta	0.652	0.348
Kontrol	0.745	0.255
Toplam	0.703	0.297

**Tablo 5.10.** NR2A rs1969060 alel frekansları

rs19690606	T	C
Hasta	0.828	0.172
Kontrol	0.794	0.206
Toplam	0.811	0.189

**Tablo 5.11.** NR2B rs1806201 alel frekansları

rs1806201	C	T
Hasta	0.686	0.314
Kontrol	0.667	0.333
Toplam	0.669	0.331

**Tablo 5.12.** NR2B rs1042339 alel frekansları

rs1042339	G	A
Hasta	1.0	0.0
Kontrol	1.0	0.0
Toplam	1.0	0.0

**Tablo 5.13.** NR2B rs890 alel frekansları

rs890	G	T
Hasta	0.495	0.505
Kontrol	0.520	0.480
Toplam	0.493	0.507

**Tablo 5.14.** TP53 R72P alel frekansları

R72P	C	G
Hasta	0.647	0.353
Kontrol	0.623	0.377
Toplam	0.635	0.365

**Tablo 5.15.** Örneklerin Hardy-Weinberg Uygunluk Testi

CHR	SNP	TEST	A1	A2	GENO	O(HET)	E(HET)	P
9	rs6293	Toplam	G	A	15/93/96	0.4559	0.4212	0.3178
9	rs6293	Hasta	G	A	11/49/42	0.4804	0.4538	0.6646
9	rs6293	Kontrol	G	A	4/44/54	0.4314	0.3799	0.2938
12	rs1806201	Toplam	T	C	18/98/88	0.4804	0.4411	0.266
12	rs1806201	Hasta	T	C	8/48/46	0.4706	0.4306	0.4896
12	rs1806201	Kontrol	T	C	10/50/42	0.4902	0.4508	0.5096
12	rs1042339	Toplam		G	0/0/204	0	0.	1
12	rs1042339	Hasta		G	0/0/102	0	0	1
12	rs1042339	Kontrol		G	0/0/102	0	0	1
12	rs890	Toplam	T	G	49/103/52	0.5049	0.4999	1
12	rs890	Hasta	T	G	28/47/27	0.4608	0.5	0.4324
12	rs890	Kontrol	T	G	21/56/25	0.549	0.4992	0.4269
16	rs1969060	Toplam	C	T	9/59/136	0.2892	0.3062	0.4903
16	rs1969060	Hasta	C	T	2/31/69	0.3039	0.2843	0.7298
16	rs1969060	Kontrol	C	T	7/28/67	0.2745	0.327	0.1255
17	R72P	Toplam	G	C	26/97/81	0.4755	0.4637	0.7645
17	R72P	Hasta	G	C	13/46/43	0.451	0.4567	1
17	R72P	Kontrol	G	C	13/51/38	0.5	0.47	0.6732

Tablo 5.15.'de görülen TEST test edilen grubu, A1 minör, A2 majör alelleri, GENO genotip sayılarını, O(HET) ve E(HET) sırasıyla heterozigotlar için gözlenen ve beklenen frekanslarını temsil etmektedir. Bu analiz sonucunda p değeri 0.05'ten büyük olan grupların Hardy-Weinberg Dengesi'ne uygun olduğu kabul edilmiştir.

### 5.8.2. Çapraz Tablolar

Hasta ve kontrol grupları ile oluşturulan çapraz tablolar Tablo 5.16.-5.21 ile gösterilmiştir. Tablolar kontrol ve hasta gruplarında ve toplamda genotiplere ait birey sayılarını ve yüzdelerini göstermektedir.

**Tablo.5.16.** Grup-NR1 rs6293 çapraz tablosu

**Çapraz Tablo**

			rs6293			
			AA	AG	GG	Toplam
Grup	Hasta	Sayı	43	49	10	102
		% Grup içinde	42,2%	48,0%	9,8%	100,0%
		% rs6293 içinde	44,3%	52,7%	71,4%	50,0%
		% Toplamda	21,1%	24,0%	4,9%	50,0%
Kontrol	Sayı	54	44	4	102	
		% Grup içinde	52,9%	43,1%	3,9%	100,0%
		% rs6293 içinde	55,7%	47,3%	28,6%	50,0%
		% Toplamda	26,5%	21,6%	2,0%	50,0%
Toplam	Sayı	97	93	14	204	
		% Grup içinde	47,5%	45,6%	6,9%	100,0%
		% rs6293 içinde	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%
		% Toplamda	47,5%	45,6%	6,9%	100,0%

**Tablo.5.17.** Grup-NR2A rs1969060 çapraz tablosu

**Çapraz Tablo**

			rs1969060			
			TT	CT	CC	Toplam
Grup	Hasta	Sayı	69	31	2	102
		% Grup içinde	67,6%	30,4%	2,0%	100,0%
		% rs1969060 içinde	50,7%	52,5%	22,2%	50,0%
		% Toplamda	33,8%	15,2%	1,0%	50,0%
Kontrol	Sayı	67	28	7	102	
		% Grup içinde	65,7%	27,5%	6,9%	100,0%
		% rs1969060 içinde	49,3%	47,5%	77,8%	50,0%
		% Toplamda	32,8%	13,7%	3,4%	50,0%
Toplam	Sayı	136	59	9	204	
		% Grup içinde	66,7%	28,9%	4,4%	100,0%
		% rs1969060 içinde	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%
		% Toplamda	66,7%	28,9%	4,4%	100,0%

**Tablo.5.18.** Grup-NR2B rs1806201 çapraz tablosu

**Çapraz Tablo**

			rs1806201			
			CC	CT	TT	Toplam
Grup	Hasta	Sayı	45	49	8	102
		% Grup içinde	44,1%	48,0%	7,8%	100,0%
		% rs1806201 içinde	51,7%	49,5%	44,4%	50,0%
		% Toplamda	22,1%	24,0%	3,9%	50,0%
Kontrol		Sayı	42	50	10	102
		% Grup içinde	41,2%	49,0%	9,8%	100,0%
		% rs1806201 içinde	48,3%	50,5%	55,6%	50,0%
		% Toplamda	20,6%	24,5%	4,9%	50,0%
Toplam		Sayı	87	99	18	204
		% Grup içinde	42,6%	48,5%	8,8%	100,0%
		% rs1806201 içinde	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%
		% Toplamda	42,6%	48,5%	8,8%	100,0%

**Tablo.5.19.** Grup-NR2B rs1042339 çapraz tablosu

**Çapraz Tablo**

			rs1042339	Toplam
			GG	
Grup	Hasta	Sayı	102	102
		% Grup içinde	100,0%	100,0%
		% rs1042339 içinde	50,0%	50,0%
		% Toplamda	50,0%	50,0%
Kontrol		Sayı	102	102
		% Grup içinde	100,0%	100,0%
		% rs1042339 içinde	50,0%	50,0%
		% Toplamda	50,0%	50,0%
Toplam		Sayı	204	204
		% Grup içinde	100,0%	100,0%
		% rs1042339 içinde	100,0%	100,0%
		% Toplamda	100,0%	100,0%

**Tablo.5.20.** Grup-NR2B rs890 çapraz tablosu

**Çapraz Tablo**

			rs890			
			TT	GT	GG	Toplam
Grup	Hasta	Sayı	28	47	27	102
		% Grup içinde	27,5%	46,1%	26,5%	100,0%
		% rs890 içinde	57,1%	45,6%	51,9%	50,0%
		% Toplamda	13,7%	23,0%	13,2%	50,0%
Kontrol	Sayı	21	56	25	102	
		% Grup içinde	20,6%	54,9%	24,5%	100,0%
		% rs890 içinde	42,9%	54,4%	48,1%	50,0%
		% Toplamda	10,3%	27,5%	12,3%	50,0%
Toplam	Sayı	49	103	52	204	
		% Grup içinde	24,0%	50,5%	25,5%	100,0%
		% rs890 içinde	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%
		% Toplamda	24,0%	50,5%	25,5%	100,0%

**Tablo.5.21.** Grup-TP53 R72P çapraz tablosu

**Çapraz Tablo**

			tp53			
			CC	CG	GG	Toplam
Grup	Hasta	Sayı	43	46	13	102
		% Grup içinde	42,2%	45,1%	12,7%	100,0%
		% tp53 içinde	53,1%	47,4%	50,0%	50,0%
		% Toplamda	21,1%	22,5%	6,4%	50,0%
Kontrol	Sayı	38	51	13	102	
		% Grup içinde	37,3%	50,0%	12,7%	100,0%
		% tp53 içinde	46,9%	52,6%	50,0%	50,0%
		% Toplamda	18,6%	25,0%	6,4%	50,0%
Toplam	Sayı	81	97	26	204	
		% Grup içinde	39,7%	47,5%	12,7%	100,0%
		% tp53 içinde	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%
		% Toplamda	39,7%	47,5%	12,7%	100,0%

Hasta ve kontrol gruplarında gözlenen farklılıkların istatistiksel olarak önemli olup olmadığı PLINK programı ile asosiyasyon testi yapılarak değerlendirilmiştir (Tablo 5.22.). A1 minor aleli, A2 major alelini gösterir. F\_A minor allelin hastalardaki, F\_U ise kontrollerdeki frekansdır. CHISQ ki kare testini ifade ederken, P de bu test için p değerini verir. OR (*Odds ratio*) görelî orantı değerini gösterir. L95 ve U95 görelî orantı için %95 güven aralığındaki alt ve üst sınırları belirtir. Aynı şekilde 0,05'ten küçük p değerleri test edilen SNP'lerde hasta ve kontrol grubundaki farklılıkların istatistiksel olarak önemli olduğunu ifade etmektedir NR1 rs6293 polimorfizmi için hasta ve kontrol grubunda istatistiksel olarak anlamlı farklılık görülmüştür (p=0.01478).

**Tablo 5.22.** Asosiyasyon testi

CHR	SNP	A1	F_A	F_U	A2	CHIQ	P	OR	L95	U95
9	rs6293	G	0.348	0.2321	A	5.942	<b>0.01478</b>	1.766	1.115	2.796
12	rs1806201	T	0.3137	0.3333	C	0.171	0.6792	0.9143	0.5979	1.398
12	rs890	T	0.5049	0.4804	G	0.2452	0.6205	1.103	0.7481	1.626
16	rs1969060	C	0.1716	0.2059	T	0.7844	0.3758	0.7988	0.4856	1.314
17	R72P	G	0.3529	0.3775	C	0.2643	0.6072	0.8996	0.6011	1.346

### 5.8.3. Doğrusal Regresyon ile Başlangıç Yaşı - CAG Tekrar Sayısı ve Diğer Polimorfizmler İlişkisinin Değerlendirilmesi

CAG tekrar sayısının başlangıç yaşına etkisi SPSS 17.0 programı kullanılarak doğrusal regresyon analizi ile hesaplanmıştır. Doğrusal regresyon için başlangıç yaşı bağımlı değişken, CAG tekrar sayısı ve genotipler bağımsız değişken olarak seçilmiştir. Genotipler 0, 1 ve 2 şeklinde kodlanarak nominal değişken olarak kullanılmıştır.

Y bağımlı değişken ve X bağımsız değişken olmak üzere iki değişken arasındaki sebep-sonuç ilişkisini doğrusal bir model olarak ortaya koyan yönteme basit doğrusal regresyon adı verilir. İki değişken arasındaki neden-sonuç ilişkisi,  $Y=\alpha+\beta X$  biçiminde ifade edilen bir denklem ile ortaya koyulur. Bu model Y'nin

değişiminin X tarafından ne kadar belirlendiğini gösterir ve Y'nin tahmin edilmesini sağlar.  $\alpha$  değeri doğrunun Y eksenini kestiği noktanın ordinat değeri  $X=0$  için Y'nin değeridir.  $\beta$  ise doğrunun eğimi, regresyon katsayısı, X değişkenindeki bir birim değişmeye karşılık Y'deki değişme miktarı olarak tanımlanır.

Bir değişkeni etkileyen birden fazla değişken varsa çoklu doğrusal regresyon analizinin yapılması gereklidir. Çoklu doğrusal regresyonda model  $Y=\beta_0+\beta_1X_1+\beta_2X_2+\dots+\beta_nX_n$  şeklinde ifade edilir. Tablo 5.23.'te IT-15 CAG tekrarının ve IT-15 CAG tekrarı ile birlikte diğer polimorfizmlerin HH başlangıç yaşına etkisini ifade eden regresyon modelleri oluşturulmuştur.

**Tablo 5.23.** Regresyon modelleri

IT 15 CAG	BY=110,375-1,500 CAG
NR1 rs6293	BY= 110,37-1,502 CAG + 0,162 rs6293
NR2A rs1969060	BY= 110,072-1,515 CAG + 2,897 rs1969060
NR2B rs1806201	BY=110,375-1.488 CAG - 1,327 rs1806201
NR2B rs890	BY=110,811-1,498 CAG - 0,530 rs890
TP53 R72P	BY=112,639-1,499 CAG - 3,251 R72P

Bağımsız değişken X'in regresyon modeli ile bağımlı değişken Y'i ne kadar açıklayabildiğini görmek için bir ölçüt olan karar katsayısı,  $R^2$  (*coefficient of determination*) kullanılır.  $R^2$  değerinin 1'e yaklaştıkça regresyonun belirleyiciliği artar. Araştırılan polimorfizmlerdeki genotiplerin de başlangıç yaşına olan katkısını belirlemek için  $R^2$  farkı ( $\Delta R^2$ ) hesaplanır. P değeri 0.05'ten küçük olan değerler istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir. Tablo 5.24.'te doğrusal regresyon analizi sonuçları verilmiştir.



**Tablo 5.24.** Çalışılan polimorfizmler ile çoklu doğrusal regresyon analizleri

Gen	R <sup>2</sup>	ΔR <sup>2</sup>	% ek varyans	p
HD CAG	.418		-	<b>.000</b>
HD CAG + GRIN1 (rs6293)	.418	.000	0	.917
HD CAG + GRIN2A (rs1969060)	.431	.013	2.22	.132
HD CAG + GRIN2B (rs1806201)	.422	.004	0.007	.406
HD CAG + GRIN2B (rs890)	.419	.001	0.002	.695
HD CAG + TP53 R72P	.447	<b>.029</b>	<b>4.98</b>	<b>.024</b>

Başlangıç yaşı ve CAG tekrarı arasındaki ilişki için oluşturulan modelde  $p < 0.05$  olduğundan bu model açıklayıcıdır ve CAG tekrarlarının Türk Huntington hastalarında başlangıç yaşına etkisi % 41.8 olarak belirlenmiştir. Polimorfizmlerin başlangıç yaşına etkisi incelendiğinde ise, TP53 R72P polimorfizmi için elde edilen modelde  $p < 0.05$  olduğundan regresyon anlamlı bulunmuştur. R72P polimorfizminin Türk Huntington hastalarında hastalık başlangıç yaşını belirlemedeki katkısı %2.9'dur. Diğer taraftan bu polimorfizm, başlangıç yaşında gözlemlenen ve CAG tekrar sayısı dışında açıklanamayan varyansın % 4.98'ini açıklayabilmektedir. Diğer polimorfizmler için p değeri  $< 0.05$  olmadığından oluşturulan regresyon modelleri açıklayıcı bulunmamışlardır.

Daha anlamlı regresyon modelleri elde edebilmek amacıyla CAG tekrar sayıları ayrıca gruplara bölünmüş ve her grup için kadınlar ve erkekler ayrı olarak hesaplanmıştır. CAG tekrar sayıları 40-45, >45, 40-50 ve >50 olmak üzere 4 grupta incelenmiştir. Her grubun regresyon modelleri genel olarak oluşturulmuş, daha sonra cinsiyete göre ayırım yapılmıştır. TP53 R72P tüm CAG sayılarının değerlendirildiği grupta olduğu gibi >45 CAG ( $p=0.048$ ) ve 40-50 CAG tekrar sayısı grubunda da başlangıç yaşına etki ediyor görünmektedir ( $p=0.024$ ). Diğer gruplarda bu etki tekrarlanamamıştır. Ayrıca 50'den büyük CAG tekrar sayılarının değerlendirildiği grupta rs6293 polimorfizmin regresyon modeli de anlamlı bulunmuştur ( $p=0.016$ ). Cinsiyetlerin ayrı ayrı değerlendirilmesinde kadın hastalardaki 40-50 arasındaki CAG tekrar sayılarını içeren grupta rs1969060 ( $p=0.049$ ) ve R72P polimorfizminin

( $p=0.031$ ) başlangıç yaşını etkilediği bulunmuştur (Tablo 5.25.). Diğer gruplar ile anlamlı regresyon modelleri elde edilememiştir.

**Tablo 5.25.** Gruplara göre anlamlı polimorfizmler

Polimorfizm	Grup /cinsiyet	Regresyon modeli	p
NR1 rs6293	>50 CAG/ genel	58,430-,505 CAG-5,565 rs6293	<b>0.016</b>
NR2A rs1969060	40-50 CAG/ kadınlar	84,497-,989 CAG+5.254 rs1969060	<b>0.049</b>
TP53 R72P	>45 CAG/ genel	93,611-1,147 CAG-2,944 R72P	<b>0.048</b>
	40-50 CAG/ genel	134,033-1,991 CAG-3,846 R72P	<b>0.024</b>
	40-50 CAG/ kadınlar	90,501-0.997 CAG-4.534 R72P	<b>0.031</b>

#### 5.8.4. Polimorfizmlerin Huntington Hastalığı'nın Başlangıç Yaşı ile İlişkilendirilmesi

GRIN2A rs1969060 polimorfizminin hastalık başlangıç yaşı ile ilişkisi istatistiksel olarak önemli bulunmasa da, çoklu doğrusal regresyonda p değeri trend gösterdiğinden ( $p=0.132$ ) ve Tablo 5.24.'teki regresyon modelinde görüldüğü üzere CC genotipi başlangıç yaşını geciktirici bir etkiye sahip olduğundan, bu genotipin hastalık için koruyucu olup olmadığını görmek amacıyla retrospektif hasta-kontrol çalışması yapılmıştır. Bu amaçla öncelikle 2x2 tablosu hazırlanmış (Tablo 5.26.) ve CC genotipi grubu diğer iki genotipin birleştirilmesi ile oluşturulan grupla karşılaştırılmıştır. CC genotipinin göreceli orantı değeri 0.271 bulunmuştur. Rölatif risk ise 0.433 olarak hesaplanmıştır (Tablo 5.27.). Bu durum CC genotipinin Huntington hastalarında koruyucu olabileceğini belirtmektedir.

**Tablo 5.26.** CC-(CT+TT) genotipleri çapraz tablosu

**rs1969060 \* Grup Çapraz Tablosu**

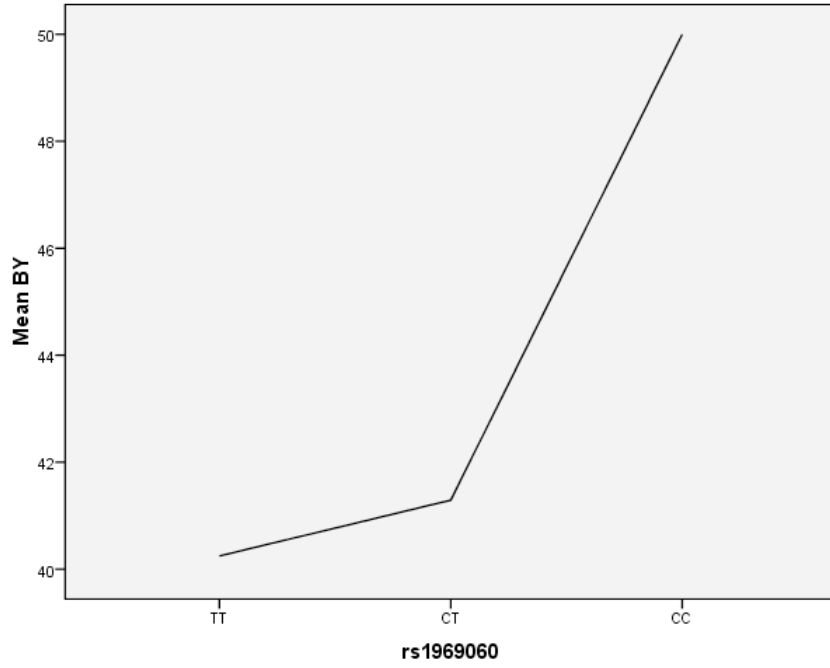
	Grup		Toplam
	Hasta	Kontrol	
rs1969060 CC	2	7	9
CT TT	100	95	195
Toplam	102	102	204

**Tablo 5.27.** CC-(CT+TT) genotipleri arasında risk değerlendirmesi

**Risk Değerlendirmesi**

	Değer	%95 Güven Aralığı	
		Alt	Üst
rs1969060 (CC / CT TT) için Görelî Orantı	,271	,055	1,340
Grup kohort = Hasta	,433	,127	1,482
Grup kohort = Kontrol	1,596	1,094	2,329
N	204		

Ayrıca hastaların başlangıç yaşı ortalamalarına bakıldığında CC genotipine sahip bireylerin başlangıç yaşı ortalamasının diğer genotiplerden yaklaşık 9-10 yıl daha geç olduğu görülmektedir. (Şekil 5.26.). Bu farkın istatistiksel olarak önemli olup olmadığı t testi ile hesaplanmıştır. Bağımsız örnekler t testi (*Independent-Samples T test*) için TT ve CT genotipleri birlikte alınıp 2X2 tablosu hazırlanmıştır ve CC genotipi ile karşılaştırılmıştır (Tablo 5.28.). Levene varyansların eşitliği testi de iki grubun varyans eşitliğini hesaplamak için yapılmıştır (Tablo 5.29.). 0,272 ( $p>0.05$ ) değeri grupların varyans eşitliğine uydukları anlamına gelmektedir. Eşit varyanslar elde edildiğinden önemlilik 0,311 ( $p>0.05$ ) olarak hesaplanmıştır (Tablo 5.30.) ve bu da CC genotipinin başlangıç yaşının diğer genotiplerden 9-10 yıl geç olmasının istatistiksel bir önemi olmadığını göstermektedir.



**Şekil 5.26.** GRIN2A rs1969060-Genotiplere ait başlangıç yaşı ortalaması grafiği

**Tablo 5.28.** Başlangıç yaşı-genotip istatistikleri

Grup İstatistikleri					
	Genotip	N	Ortalama	Std. Sapma	Std. Hata Ort.
BY	CT, TT	100	40,57	13,029	1,303
	CC	2	50,00	4,243	3,000

**Tablo 5.29.** Varyansların eşitliği için Levene testi

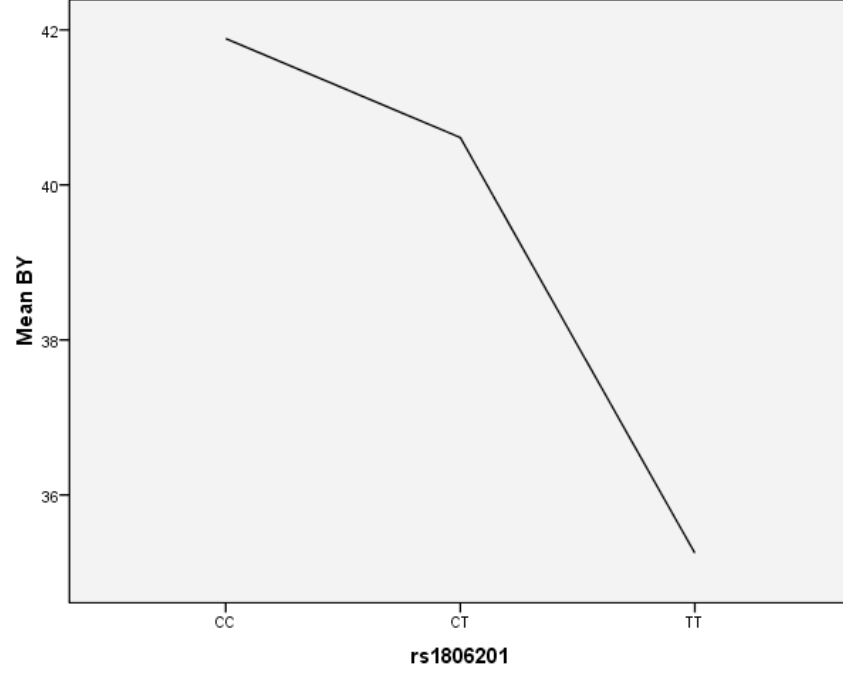
Bağımsız Örnekler Testi					
		Varyansların Eşitliği için Levene Testi		Ortalama Eşitliği için t-testi	
		F	Anl.	t	sd
BY	Eşit varyanslar	1,220	,272	-1,018	100
	Eşit olmayan varyanslar			-2,883	1,412

**Tablo 5.30. Bağımsız Örnekler T testi**

		Bağımsız Örnekler Testi		
		Ortalama Eşitliği için t-test		
		Anl. (2-yönlü)	Ort. Farkı	Std. Hata Farkı
BY	Eşit varyanslar	,311	-9,430	9,263
	Eşit olmayan varyanslar	,150	-9,430	3,271

		Bağımsız Örnekler Testi	
		Ortalama Eşitliği için t-testi	
		Farkın %95 Güven Aralığı	
		Alt	Üst
BY	Eşit varyanslar	-27,808	8,948
	Eşit olmayan varyanslar	-30,914	12,054

GRIN2B rs 1806201 polimorfizminin Huntington hastalığının başlangıç yaşına etkisi istatistiksel olarak ispatlanamamış olsa da TT genotipine sahip bireylerin başlangıç yaşı ortalamasının diğer genotiplere göre yaklaşık 5 yıl erken olduğu görülmüştür (Şekil 5.27.). Bu farkın istatistiksel olarak önemli olup olmadığı ise t testi ile hesaplanmıştır. Bağımsız örnekler t testi için CC ve CT genotipleri birlikte alınıp 2X2 tablosu hazırlanmıştır ve TT genotipi ile karşılaştırılmıştır (Tablo 5.31.). Levene varyansların eşitliği testi de iki grubun varyans eşitliğini hesaplamak için yapılmıştır (Tablo 5.32.). 0,927 ( $p>0.05$ ) değeri grupların varyans eşitliğine uydukları anlamına gelmektedir. Eşit varyanslar elde edildiğinden önemlilik 0,226 ( $p>0.05$ ) olarak hesaplanmıştır (Tablo 5.33.) ve bu da TT genotipinin başlangıç yaşının diğer genotiplerden 5 yıl erken olmasının istatistiksel bir önemi olmadığını göstermektedir.



Şekil 5.27. GRIN2B rs1806201-Genotiplere ait başlangıç yaşı ortalaması grafiği

Tablo 5.31. Başlangıç yaşı-genotip istatistikleri

Grup İstatistikleri					
	Genotip	N	Ortalama	Std. Sapma	Std. Hata Ort.
BY	CC, CT	95	41,18	12,968	1,330
	TT	7	35,00	12,530	4,736

Tablo 5.32. Varyansların eşitliği için Levene testi

Bağımsız Örnekler Testi					
		Varyans Eşitliği için Levene Testi		Ortalama Eşitliği için t-testi	
		F	Anl.	t	sd
BY	Eşit varyanslar	,009	,927	1,219	100
	Eşit olmayan varyanslar			1,256	6,982

**Tablo 5.33. Bağımsız Örnekler T testi**

		Bağımsız Örnekler Testi		
		Ortalama Eşitliği için t-testi		
		Anl. (2-yönlü)	Ort. Farkı	Std. Hata Farkı
BY	Eşit varyanslar	,226	6,179	5,069
	Eşit olmayan varyanslar	,249	6,179	4,919

		Bağımsız Örnekler Testi	
		Ortalama Eşitliği için t-testi	
		Farkın %95 Güven Aralığı	
		Alt	Üst
BY	Eşit varyanslar	-3,877	16,235
	Eşit olmayan varyanslar	-5,459	17,817

R72P polimorfizminin Huntington hastalığının başlangıç yaşı ile ilişkili bulunmasından dolayı ( $p=0.024$ ) bu polimorfizmdeki mutant genotip olan GG'nin hastalık için risk faktörü oluşturup oluşturmadığını anlamak için retrospektif hasta-kontrol çalışması yapılmıştır. Tablo 5.15.'te verildiği üzere hasta ve kontrol grubu Hardy–Weinberg dengesine uygundur. İki grup arasındaki genotip frekanslarını karşılaştırmak için görel orantı değerleri hesaplanmıştır. Bu amaçla öncelikle 2x2 tablosu hazırlanmış (Tablo 5.34.) ve GG genotip grubu diğer iki genotipin birleştirilmesi ile oluşturulan grupla karşılaştırılmıştır. Tablo 5.35.'te görüldüğü üzere görel orantı değeri 1 çıktığından, TP53 R72P polimorfizmindeki GG genotipinin hasta ve kontrol grubunda farklı olmadığı, böylece hiçbir genotipin hastalık için risk faktörü oluşturmadığı görülmüştür.

**Tablo 5.34.** GG-(GC+CC) genotipleri çapraz tablosu

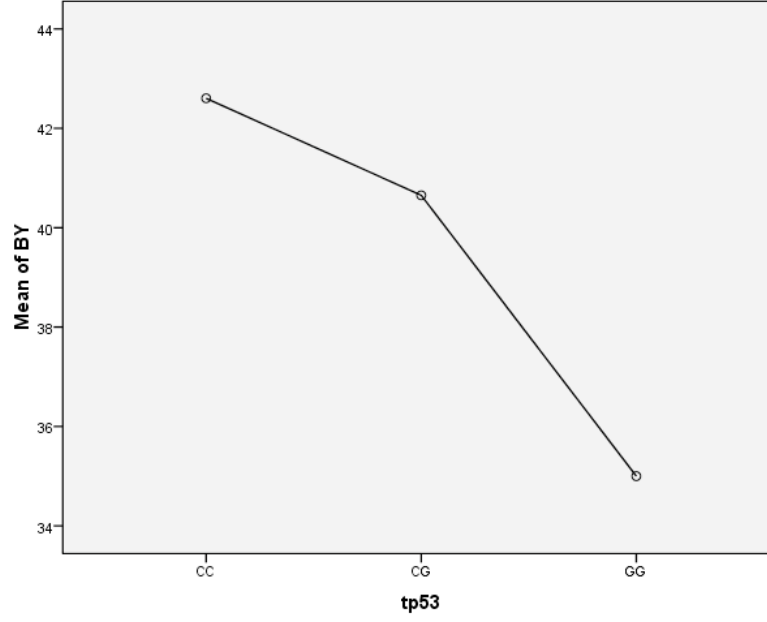
		Grup		Toplam
		Hasta	Kontrol	
R72P	GG	13	13	26
	GC CC	89	89	178
Toplam		102	102	204

**Tablo 5.35.** GG-(GC+CC) genotipleri arasında risk değerlendirme

	Değer	%95 Güven Aralığı	
		Alt	Üst
R72P (GG / GC CC) için Görelî Orantı	1,000	,439	2,277
Grup kohort = Hasta	1,000	,663	1,509
Grup kohort = Kontrol	1,000	,663	1,509
N	204		

Bununla birlikte hastaların başlangıç yaşı ortalamalarına bakıldığında GG genotipine sahip bireylerin başlangıç yaşı ortalamasının diğer genotiplerden yaklaşık 5-7 yıl erken olduğu görülmektedir. (Şekil 5.28.). Bu farkın istatistiksel olarak önemli olup olmadığı t testi ile hesaplanmıştır. Bağımsız örnekler t testi için GC ve CC genotipleri birlikte alınıp 2X2 tablosu hazırlanmıştır ve GG genotipi ile karşılaştırılmıştır (Tablo 5.36.). Levene varyansların eşitliği testi de 2 grubun varyans eşitliğini hesaplamak için yapılmıştır (Tablo 5.37.). 0,191 ( $p>0.05$ ) değeri grupların varyans eşitliğine uydukları anlamına gelmektedir. Eşit varyanslar elde edildiğinden  $p=0,087$  ( $p>0.05$ ) olarak hesaplanmıştır (Tablo 5.38.) ve bu da GG genotipinin başlangıç yaşının diğer genotiplerden 5-7 yıl erken olmasının istatistiksel bir önemi olmadığını göstermektedir.





Şekil 5.28. TP53 R72P-Genotiplere ait başlangıç yaşı ortalaması grafiği

Tablo 5.36. Başlangıç yaşı-genotip istatistikleri

Grup İstatistiği					
Genotip		N	Ortalama	Std. Sapma	Std. Hata Ort.
BY	GG	13	35,00	8,746	2,426
	CG+CC	89	41,60	13,309	1,411

Tablo 5.37. Varyansların eşitliği için Levene testi

Bağımsız Örnekler Testi					
		Varyansların Eşitliği için Levene Testi		Ortalama eşitliği için T-testi	
		F	Anl.	t	sd
BY	Equal variances assumed	1,730	,191	-1,729	100
	Equal variances not assumed			-2,350	21,160

**Tablo 5.38.** Bağımsız Örnekler T testi

		Bağımsız Örnekler Testi		
		Ortalama Eşitliği için t-testi		
		Anl. (2-kuyruklu)	Ortalama Farkı	Std. Hata Farkı
BY	Eşit varyanslar	,087	-6,596	3,815
	Eşit olmayan varyanslar	,029	-6,596	2,806

		Bağımsız Örnekler Testi	
		Ortalama Eşitliği için t-testi	
		Farkın 95% Güven Aralığı	
		Alt	Üst
BY	Eşit varyanslar	-14,164	,973
	Eşit olmayan varyanslar	-12,429	-,762

Yapılan assosiyasyon testinde NR1 rs6293 polimorfizminde p değeri 0.01478 bulunduğundan mutant GG genotipinin risk faktörü analizi yapılmıştır. Tablo 5.15.'te verildiği üzere hasta ve kontrol grubu Hardy–Weinberg dengesine uygundur. İki grup arasındaki genotip frekanslarını karşılaştırmak için göreceli orantı değerleri hesaplanmıştır. Bu amaçla öncelikle GG genotipi için 2x2 tablosu hazırlanmıştır (Tablo 5.39.). GG genotip grubu diğer iki genotipin birleştirilmesi ile oluşturulan grupla karşılaştırılmıştır. Tablo 5.40.'ta görüldüğü üzere GG genotipi için göreceli orantı değeri 2,663 ve rölatif risk 1,475 bulunmuştur Göreceli orantı değerinin 1'den fazla olması, GG genotipinin risk faktörü olabileceğini belirtmektedir.

**Tablo 5.39.** GG-(AA+AG) genotipleri çapraz tablosu

**rs6293 GG \* Grup apraz Tablosu**

		Grup		Toplam
		Hasta	Kontrol	
rs6293	GG	10	4	14
	AG AA	92	98	190
	Toplam	102	102	204

**Tablo 5.40.** GG-(AA+AG) genotipleri arasında risk değerlendirmesi

**Risk Değerlendirmesi**

	Değer	95% Güven Aralığı	
		Alt	st
rs6293 için Grelil Orantı (GG / AG AA)	2,663	,807	8,788
Grup kohort= Hasta	1,475	1,027	2,119
Grup kohort= Kontrol	,554	,239	1,283
N	204		

## 6. TARTIŞMA

### 6.1. Huntington Hastalığı ve Başlangıç Yaşı

Huntington Hastalığı otozomal dominant olarak kalıtılan, progresif, nörodejeneratif bir hastalıktır ve huntingtin proteinini kodlayan IT-15 geninin 1. eksonundaki CAG tekrar bloğunun normalden daha uzun olmasından kaynaklanır. Hastalığın başlangıç yaşı, hastalık süreci, fiziksel ve mental semptomların ortaya çıkma sırası bireylerde çeşitlilik gösterir. Ayrıca HH genellikle geç başlangıçlı bir hastalıktır ve başlangıç yaşı çok geniş bir yaş aralığına yayılmıştır. Gendeki CAG tekrarlarının uzunluğu, HH'nin başlangıç yaşının belirlenmesinde en önemli faktördür. CAG tekrar sayısı ne kadar fazla ise, hastalık o kadar erken yaşta ortaya çıkar ve en fazla tekrar sayıları juvenil formda gözlenir. Tekrar sayısı-başlangıç yaşı korelasyonu güçlü olmasına rağmen, tekrar sayısının başlangıç yaşını tahmin etme kesinliği zayıftır (Myers 2004). Bu negatif korelasyon, daha yüksek tekrar sayıları (ve daha düşük başlangıç yaşı) için daha güçlü ve daha az tekrar sayıları (daha geç başlangıç yaşı) için daha zayıftır. Bu da, CAG tekrar uzunluğunun özellikle juvenil başlangıçlı hastalarda ana belirleyici olmasına rağmen, CAG tekrar uzunluğundan başka faktörlerin de ileri yaşlarda HH başlangıcına önemli katkıda bulunabileceğini öne sürmektedir (Nance, 1996).

Tekrar sayısı uzunluğu ile başlangıç yaşı arasındaki korelasyonu araştıran çalışmalar sonucunda CAG tekrar sayısının başlangıç yaşındaki değişime %30-73 arasındaki oranlarda katkıda bulunduğu gösterilmiştir (Andrew vd., 1993; Brinkman vd., 1997; Stine vd., 1993). Bununla birlikte, başlangıç yaşının CAG tekrar sayısına göre tahmininin kesinliğinin az olması nedeniyle klinikte kullanımı kısıtlıdır (Langbehn vd., 2004). Örneğin 52'den az tekrara sahip bireylerde CAG tekrar sayısının başlangıç yaşına katkısı %20 civarındadır (Duyao vd., 1993). Kısa ekspansiyon olmuş tekrar sayılarında başlangıç yaşını tahmin etmek daha zordur (Stine vd., 1993). 80-90 yaşına kadar teşhis edilmemiş, 36-39 tekrar sayısına sahip bireylerde

ise tahmin çok daha zayıftır (Rubinsztein vd., 1996; Rubinsztein vd., 1997). Bu yüzden çevresel faktörler, mutant geni kalıtan ebeveynin cinsiyeti veya diğer etkileşen genlerin de hastalık gidişatını değiştirebileceği ileri sürülmektedir (The U.S.–Venezuela Collaborative Research Project ve Wexler, 2004). Örneğin, aynı ailenin bireylerinde ve aynı tekrar sayısına sahip farklı bireylerin hastalık başlangıç yaşında önemli farklılıklar gözlemlenmiştir; bu da hastalığı modifiye eden diğer faktörlerin varlığına işaret eder. Modifiye edici bu faktörlerin büyük oranda ailesel olabileceği, benzer hastalık sürecinin kardeşlerde gözlenmesiyle ortaya koyulmuştur (Rosenblatt, vd., 2001). Yine de bu metodolojiler söz konusu etkinin genlerden ya da paylaşılan çevreden kaynaklandığını kesin olarak belirleyemez. Başlangıç yaşındaki CAG tekrarı kaynaklı olmayan etkinin, primer olarak genetik veya çevresel faktörlerden ya da ikisinin kombinasyonundan etkilendiği açık değildir. Bu gibi bağımsız faktörlerin belirlenmesinin HH'nın patolojisi ile ilgili ipuçları vereceği düşünülmektedir.

Bir çok çalışmada HH'nın başlangıç yaşını etkileyebilecek olası genlerde çok sayıda polimorfizm tanımlanmıştır. Aday genler arasında sıklıkla normal veya mutant huntingtin ile etkileşen proteinleri ve hastalık patogenezinde rol aldıkları düşünülen faktörleri kodlayan genler bulunmaktadır. Bu genlerdeki polimorfizmlerin sağlıklı bireylerde bir etkisi olmazken Huntington hastalarında hastalık seyrini etkileyebilecekleri düşünülmektedir (Metzger vd., 2006).

Çevre faktörlerinin de HH başlangıç yaşına katkısı olduğu kabul edilmektedir. Venezuela soyunda başlangıç yaşının CAG tekrarından kalan varyansının %40'ı HH geni dışındaki genlere ve çevre faktörlerine atfedilmiştir (The U.S.–Venezuela Collaborative Research Project ve Wexler, 2004). Çevre zenginleştirmesinin HH üzerine olumlu etkileri olduğunu gösteren çalışmalar bu hipoteze destek olmuştur. Transgenik fare modelleriyle elde edilen kanıtlar da çevresel etkinin varlığını desteklemektedir. Örneğin, patojenik sayıda poliQ kodlayan transgenik R6/1 ve R6/2 farelerinin yaşam çevrelerinin zenginleştirilmesi, motor semptomlarının başlangıcının ve serebral hacim kaybının gecikmesini sağlamıştır (Hockley vd., 2002; van Dellen vd. 2000).

## 6.2. Huntington Hastalarının Klinik Değerlendirmesi

Bu tez çalışması kapsamında Türkiye'nin çeşitli coğrafi bölgelerinde ikamet eden 102 Türk Huntington hastası incelenmiştir. Hastaların klinik semptomları irdelendiğinde ilk sırada el ve ayaklarda istemsiz koreik hareketler ve denge problemleri yer almaktadır. Konuşmada bozukluklar, uyku sorunları, unutkanlık, koreoatetoz, demans, manik çıkışlar, entellektüel ve bilişsel gerileme, psikoz, dikkat eksikliği şikayetleri de bildirilmiştir. Hastaların nörolojik muayenelerinde kore, diskinezi, motor impersistans, sakkadik göz hareketlerinde bozukluklar, ataksik yürüme, defektif verbal ve görsel dikkat fonksiyonları, defektif hafıza fonksiyonları, distoni ve depresyon tespit edilmiştir. Bu bulgulara göre hastalara klinik olarak HH teşhisi koyulmuş ve daha sonra klinik tanı moleküler tanı ile kesinleştirilmiştir. Sadece bir hastada klinik olarak HH ve Wilson Hastalığı arasında ayırım yapılamamış, moleküler test sonucunda bireyin Huntington hastası olduğu tespit edilmiştir.

Hastaların patolojik bulgularına bakıldığında, kortikal ve subkortikal atrofi, bilateral kaudat nükleus atrofisi, lentiform nükleusları atrofisi, bilateral ventriküler boynuzlarda genişleme, ventriküler sistemde atrofi, beyaz maddede sinyal artışı, genel serebral atrofi, lateral ventriküllerde kelebek şekli ve frontal atrofi gözlenmektedir.

Hastaların çoğunda aile hikayesinin pozitif olduğu gözlenmiştir, sadece iki hasta ailesinde HH öyküsü saptanmamıştır. Aile arasındaki iletişim eksikliği nedeniyle bireyler ailelerinde bu hastalığın varlığından haberdar olmayabilirler, ya da indeks vakalarda HH yeni mutasyonla, aileden kalıtılan tekrar sayılarının artış göstermesiyle ortaya çıkmış olabilir. Bu durum ancak asemptomatik aile bireylerinin mutasyon analizi yaptırımlarıyla açıklığa kavuşabilir.

### 6.3. Huntington Hastalarında CAG Tekrar Mutasyonu Analizi

İncelenen hastalarda 39-75 CAG tekrarı arasında 22 farklı mutant alel tespit edilmiştir. Heterozigotluk oranı %100'dür. Mutant alellerde en sık gözlenen tekrar aralığı 42-47 CAG tekrarı arasındadır. İncelenen hasta grubunda en sık 47 CAG tekrarı (%12.7) gözlenirken, bunu 43-44 tekrar (%11.8) ve 42 tekrar (%10.8) takip etmektedir. Hasta bireylerin normal alellerinde ise CAG tekrar sayısının 12 ile 30 CAG tekrarı arasında değiştiği ve en sık gözlenen alel aralığının 17-20 CAG tekrarı aralığı olduğu belirlenmiştir. IT-15 geninde 17 CAG (%32,4) tekrarı en sık görülen aleldir, bunu 18 (%29,4) ve 19 (%22,5) tekrarlı aleller takip etmektedir. Genel olarak popülasyonlarda en sık rastlanan normal huntingtin alelleri 15-20 CAG tekrarına sahiptir (Rubinsztein vd., 1996). Batı Avrupa popülasyonlarındaki tekrar dağılımı normal sınırlar içerisinde olmakla birlikte, daha uzun alellere doğru kayma göstermiştir. Afrika ve Asya popülasyonlarında daha uzun aleller daha nadir görülür (Watkins vd., 1995). Bu çalışmada belirlenen normal ve artmış CAG tekrar sayıları literatürle uyumludur.

### 6.4. Huntington Hastalarında Başlangıç Yaşı

Çalışmaya dahil edilen 102 Huntington hastası bireyin mutant alellerinde taşıdıkları tekrar sayıları, her bir tekrar grubunda görülen başlangıç yaşı aralığı, her gruptaki birey sayısı ve başlangıç yaşı ortalaması Tablo 6.1.'de gösterilmiştir. Bu tablodaki değerler, her bir tekrar sayısı grubundaki bireylerin başlangıç yaşları arasındaki farklılıkları ortaya koymaktadır. Örneğin, 47 tekrar sayısına sahip bireylerin başlangıç yaş ortalaması 40.23 yaş olarak hesaplanmıştır. Fakat bu grupta görülen en düşük başlangıç yaşı 30, en yüksek başlangıç yaşı ise 62'dir. Diğer bir örnek ise, hastalığın 80 yaşında başladığı bir bireyde ve 40 yaşında başladığı diğer bir bireyde aynı sayıda CAG tekrarı bulunmasıdır. Bu farklılıklar başlangıç yaşına sadece CAG tekrarının değil, diğer genetik ve çevresel faktörlerin de etki edebileceğini açıkça ortaya koymaktadır.

**Tablo 6.1.** CAG tekrar sayılarına göre hastalık başlangıç yaşlarının gruplandırılması

CAG tekrar sayısı	Başlangıç yaşı aralığı	Birey sayısı	Başlangıç yaşı ortalaması
39	69	1	69
40	42-73	4	55.25
41	20-75	7	43.71
42	35-60	11	50.27
43	40-80	12	52.25
44	28-48	12	41.58
45	24-57	8	38.88
46	37-52	5	42
47	30-62	13	40.23
48	26-36	5	32.8
49	28-45	3	37.6
50	27	1	27
51	25-39	3	30
52	25-36	6	31.17
53	25-32	2	28.5
54	23-35	2	29
55	23	1	23
56	19-23	2	21
58	22	1	22
59	16	1	16
67	22	1	22
75	16	1	16
<b>Genel</b>	16-75	102	40.75

Tablo 6.2. ise başlangıç yaşlarına göre bireylerin sahip oldukları farklı CAG tekrar sayılarını vurgulamaktadır. Tablo incelendiğinde, her bir başlangıç yaşı grubu için benzer sayıda CAG sayısı olduğu görülmektedir. Bu durum CAG tekrar sayısının başlangıç yaşı üzerindeki etkisini gözler önüne sermektedir. Bununla birlikte, aynı grup içinde birbirinden çok farklı tekrar sayıları da gözlemlenebilmektedir. Örneğin, başlangıç yaşı 22 olan bireylerde 58 ve 67 CAG tekrar sayıları bulunmuştur. Tekrar sayısı farkı 9 olmasına rağmen, bu bireylerin başlangıç yaşları aynıdır. Ayrıca, 59 ve 75 CAG tekrar sayılarına sahip iki bireyin de başlangıç yaşları 16'dır. Bu iki bireyin tekrar sayıları arasındaki fark 16 olmasına rağmen, her ikisi de aynı başlangıç yaşına sahiptirler. Bu durum da, CAG tekrar sayısı haricinde diğer modifiye edici faktörlerin de başlangıç yaşını etkileyebileceğine işaret etmektedir.



**Tablo 6.2.** Hastalık başlangıç yaşı ve CAG tekrar sayıları

<b>Başlangıç yaşı</b>	<b>CAG tekrar sayıları</b>
80	43
75	41
73	40
70	43
69	39, 43
62	47
60	42
58	40
57	42, 43, 45
53	43
52	42, 46
50	41, 47
49	42
48	40, 44
47	43, 44
46	42, 44
45	41, 43, 44, 49
44	45, 47
43	45, 47
42	40, 42, 43, 45, 47
41	41, 43, 44, 46
40	41, 43, 44, 45, 46, 49
39	51
38	44, 47
37	46
36	44, 47, 48, 52
35	41
35	42, 44, 48, 52, 54
33	52
32	47, 48, 53
31	45
30	45, 47, 52
28	44, 49, 52
27	50
26	48, 51
25	51, 52, 53
24	45
23	54, 55, 56
22	58, 67
20	41
19	56
16	59, 75

### 6.5. CAG Tekrar Mutasyonunun Başlangıç Yaşına Etkisi

CAG tekrarlarının HH'nın başlangıç yaşına etkisi doğrusal regresyon analizi ile hesaplanmıştır. Regresyon modellerinin anlamlılığını arttırabilmek amacıyla, CAG tekrar sayıları 40-45, >45, 40-50 ve >50 olmak üzere 4 grupta incelenmiştir. Ayrıca, her tekrar grubu cinsiyet alt gruplarına ayrılarak analiz tekrar edilmiş ve her alt grubun regresyon modelleri elde edilmiştir.

Gruplara ayrılmaksızın tüm CAG tekrar sayılarının hesaplamalara katıldığı durumda, CAG tekrarlarının başlangıç yaşına etkisi %41.8 olarak hesaplanmıştır. Diğer çalışmalara bakıldığında CAG tekrar sayısı etkisinin % 30.8 ile % 73 arasında belirlendiği görülmüştür (Tablo 6.3.). Bu araştırmadan elde edilen sonuçlar, literatürdeki diğer çalışmalarla uyum göstermektedir.

**Tablo 6.3.** Çeşitli popülasyonlarda CAG tekrarlarının başlangıç yaşına etkisi

Popülasyon	Popülasyon büyüklüğü (kişi)	CAG tekrar sayısının başlangıç yaşına etkisi (%)	Referans
Alman	250	58	Arning vd., 2007
Hintli	77	68.3	Chattopadhyay vd., 2005
Alman	167	30.8	Arning vd., 2005a
Beyaz Irk	980	52.74	Metzger vd., 2006
İngiliz	239	69.3	Rubinsztein vd., 1997
İtalyan	600	68	Cannella vd., 2004
Alman	>400	73	Taherzadeh-Fard vd., 2009

Tablo 6.4.'te CAG tekrar sayısı gruplarıyla başlangıç yaşlarına etkilerinin yüzde değerleri verilmiştir. CAG tekrar sayısı azaldıkça, başlangıç yaşına etkisinin de azaldığı görülmektedir. CAG tekrar sayısının başlangıç yaşına en fazla etki ettiği grup, 45'ten yüksek CAG sayılarına sahip olan grup olmuştur. En düşük etki ise 40-45 tekrar sayısı grubunda görülmüştür. CAG tekrar sayılarının etkisinin düşük olması, diğer genetik ve çevresel modifiye edici faktörlerin başlangıç yaşına etkisinin daha yüksek olabileceğine işaret edebilir. Tekrar sayısı arttıkça başlangıç yaşına etkisi de artıyor görünmektedir. >50 CAG tekrarı grubunda (21 kişi) gözlenen etkinin, >45 CAG tekrar grubundaki (55 kişi) etkiden daha düşük çıkmasının nedeni ise bu gruptaki birey sayısının az olmasından kaynaklanıyor olabilir.

**Tablo 6.4.** CAG tekrar grupları ve tekrarların başlangıç yaşına katkısı

<b>CAG tekrar sayısı</b>	<b>Başlangıç yaşına katkısı (%)</b>
40-45 CAG	9
40-50 CAG	19.9
>45 CAG	45.6
>50 CAG	38.7
<b>Genel</b>	<b>41.8</b>

CAG ve başlangıç yaşı arasındaki önemli ilişki, diğer modifiye edici faktörlerin yüksek tekrar sayısına (CAG sayısı >45) sahip bireylerde daha az etkili olduğunu göstermektedir. Bunun nedeninin, poliQ zinciri uzunluğunun etkisinin, daha kısa zincire oranla daha fazla olduğu düşünülebilir (Langbehn vd., 2004). PoliQ zinciri uzadıkça huntingtin ile etkileşen bir çok proteinin etkileşimindeki değişiklikler, veya poliQ zinciri uzadıkça proteinin agregasyona eğiliminin artması hastalığın daha erken zamanda ortaya çıkmasına neden olabilir. Bu durumda, diğer modifiye edici faktörler glutaminin etkisi tarafından baskılanabilir. Bununla birlikte, daha az sayıdaki tekrarlarda modifiye edici faktörlerin başlangıç yaşı üzerinde daha belirleyici olduğu ileri sürülmektedir. Buna kanıt olarak, 41-45 CAG tekrarına sahip Huntington hastalarıyla yapılan bir araştırmada CAG tekrar sayısının başlangıç yaşına etkisi daha düşük (%30.8) bulunmuştur (Arning vd., 2005a), böylece bu tekrar grubunda diğer modifiye edici faktörlerin başlangıç yaşına etki etmesi olasılığının

yüksek olduğu sonucuna varılmıştır. Aynı grup tarafından 2007 yılında yapılan diğer bir çalışmada ise CAG tekrarlarının başlangıç yaşına etkisi hem tüm CAG tekrarları için, hem de 39-45 CAG tekrar grubunda hesaplanmıştır. Bu iki grupta CAG tekrar sayılarının başlangıç yaşına etkisi sırasıyla %58 ve %39 olarak bulunmuştur (Arning vd., 2007). Bu sonuçlar da daha düşük tekrar sayılarında CAG etkisinin daha az olduğu hipoteziyle uyumludur. CAG tekrar sayısının az olduğu durumlarda başlangıç yaşına etkisi de daha az olacaktır ve böyle durumlarda diğer faktörlerin daha belirleyici olmasına imkan doğabilir.

Bu tez çalışmasındaki CAG tekrar grupları cinsiyetlere göre alt gruplara ayrıldığında, genel CAG tekrar grubunda kadınlarda (56 birey) başlangıç yaşına etki %36.4 olarak görülürken, erkeklerde (46 birey) bu etki %50.1 olarak hesaplanmıştır ve aradaki fark istatistiksel olarak anlamlıdır ( $p<0.05$ ).  $>45$  CAG tekrar sayısı grubunda ise kadınlarda (21 birey) CAG tekrar sayısının başlangıç yaşına etkisi %49.5 olarak hesaplanırken, erkeklerde (22 birey) bu etki %43.8 olmuştur ve bu karşılaştırmada da aradaki fark istatistiksel olarak anlamlıdır ( $p<0.05$ ). Diğer tekrar sayısı gruplarında ise p değerleri 0.05'ten büyük olduğundan sonuçlar dikkate alınmamıştır. Cinsiyet ayrımı yapılmaksızın hesaplanan etkilere bakıldığında da genel CAG tekrar sayısının etkisi %41.8,  $>45$  grubunun etkisi ise %45.6 olarak bulunmuştur ( $p<0.05$ ), bu durum da cinsiyet ayrımı ile yapılan hesaplamalarla uygundur. Diğer gruplarda p değerlerinin yüksek çıkması ile bulunan sonuçların istatistiksel olarak anlamlı olmadığı sonucu çıkarılmaktadır. Bunun nedeni ise cinsiyet ayrımı yapıldığında grubun parçalanarak örnek sayılarının azalması olabilir. Yüksek sayıda örneğe sahip gruplarla tekrar edilecek çalışmalar daha kesin sonuçlar bulmaya yardımcı olacaktır.

## 6.6. Kontrol ve Hasta Gruplarında SNP Genotiplenmeleri

Bu çalışmada araştırılan polimorfizmlerin genotiplerine bakıldığında NR2B rs1042339 polimorfizmi hariç diğer polimorfizmlerindeki tüm sözkonusu genotipler görülmüştür. NR2B rs1042339 polimorfizmine bakıldığında AA ve AG genotiplerine hasta ve kontrol grubunda rastlanmamıştır. Bu sonuç, Alman paopülasyonu ile

gerçekleştirilen çalışma sonuçlarıyla uyumludur (Arning vd., 2005) Çalışmaya dahil edilen tüm sağlıklı kontrol ve hasta bireylerin altı SNP lokusu için belirlenen beklenen genotip frekansları SPSS 17.0 ile hesaplanmıştır (Tablo 6.5.).

**Tablo 6.5.** Hasta ve kontrol grubunda gözlenen ve beklenen değerler

Polimorfizm	rs1969060	rs1806201	rs1042339	rs890	rs6293	Tp53
<b>Hasta</b>						
Gözlenen Değerler	69 TT 31 CT 2 CC	45 CC 49 CT 8 TT	102 GG	28 TT 47 GT 27 GG	43 AA 49 AG 10 GG	43 CC 46 GC 13 GG
Beklenen Değerler	68 TT 29,5 CT 4,5 CC	43,5 CC 49,5 CT 9 TT	102 GG	24,5 TT 51,5 GT 26 GG	48,5 AA 46,5 AG 7 GG	40,5 CC 48,5 CG 13 GG
<b>Kontrol</b>						
Gözlenen Değerler	67 TT 28 CT 7CC	42 CC 50 CT 10 TT	102 GG	21 TT 56 GT 25 GG	54 AA 44 AG 4 GG	38 CC 51 GC 13 GG
Beklenen Değerler	68 TT 29,5 CT 4,5 CC	43,5 CC 49,5 CT 9 TT	102 GG	24,5 TT 51,5 GT 26 GG	48,5 AA 46,5 AG 7 GG	40,5 CC 48,5 CG 13 GG

GRIN1 rs6293 polimorfizmi haricinde hasta ve kontrol grubu arasında istatistiksel bir fark gözlenmemiştir. Bu polimorfizmde hasta ve kontrol grubunda istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunduğundan genotiplerin risk faktörü olup olmadıkları değerlendirilmiştir ve GG genotipinin göreceli oranı değeri 2,663 bulunmuştur. 102 kişilik hasta grubunda 10 kişide GG genotipi görülürken 102 kişilik kontrol grubunda sadece 4 kişide bu genotip gözlenmiştir. Böylece bu çalışmanın sonucuna göre GG genotipi HH'nda bir risk faktörü olarak değerlendirilebilir. GRIN1 genindeki polimorfizmlerin şizofreni ve bipolar bozuklukla ilişkili olduğu ileri sürülmüştür (Mundo vd., 2003; Qin vd., 2005). Bu

yüzden bu genin nörodejeneratif bir hastalık olan HH'nda da bir rol oynaması muhtemel olabilir. GRIN1 genindeki rs6293 polimorfizmi bu çalışmada başlangıç yaşını etkiliyor görünmese de, hasta ve kontrol grubundaki genotiplerin farklı oranlarının anlamı ileride yapılacak araştırmalarla açıklanabilir.

Tablo 6.6.'da NMDAR alt ünitelerini ve p53'ü kodlayan genlerin gözlenen genotipik ve alelik frekansları, SNP veritabanından elde edilen diğer popülasyon verileri ile karşılaştırılmıştır. NR1 rs6293, NR2A rs1969060, NR2B rs1806201, rs1042339 ve rs890 beyaz ırk frekanslarıyla uyum göstermektedir. TP53 R72P polimorfizminde ise frekanslar beyaz ırk popülasyonundan çok Asya ve Afrika popülasyonunda görülen frekanslarla uyum göstermektedir.

**Tablo 6.6.** Genotipik ve Alelik Frekansların SNPdb Verileri ile Karşılaştırılması

Polimorfizm	Popülasyon	Genotipik			Alelik	
		AA	AG	GG	A	G
NR1 rs6293	Kontrol grubu	0.529	0.431	0.040	0.745	0.255
	Beyaz Irk	0.467	0.383	0.150	0.658	0.342
NR2A rs1969060		<b>TT</b>	<b>CT</b>	<b>CC</b>	<b>T</b>	<b>C</b>
	Kontrol grubu	0.657	0.275	0.068	0.794	0.206
	Beyaz Irk	0.717	0.233	0.050	0.833	0.167
NR2B rs1806201		<b>CC</b>	<b>CT</b>	<b>TT</b>	<b>C</b>	<b>T</b>
	Kontrol grubu	0.412	0.490	0.098	0.667	0.333
	Beyaz Irk	0.583	0.400	0.017	0.783	0.217
NR2B rs1042339		<b>GG</b>	<b>AG</b>	<b>AA</b>	<b>G</b>	<b>A</b>
	Kontrol grubu	0.480	0	0	1.000	0
	Beyaz Irk	1.000	0	0	1.000	0
	Asyalı	1.000	0	0	1.000	0
NR2B rs890		<b>GG</b>	<b>GT</b>	<b>TT</b>	<b>G</b>	<b>T</b>
	Kontrol grubu	0.245	0.549	0.206	0.520	0.480
	Beyaz Irk	0.333	0.467	0.200	0.567	0.433
TP53 R72P		<b>CC</b>	<b>CG</b>	<b>GG</b>	<b>C</b>	<b>G</b>
	Kontrol grubu	0.373	0.500	0.127	0.647	0.353
	Beyaz Irk	0.083	0.300	0.617	0.233	0.767
	Asyalı	0.227	0.568	0.205	0.511	0.489
	Afrika- Amerikan	0.323	0.435	0.242	0.540	0.460
Sub-Sahara Afrikalı	0.441	0.440	0.119	0.661	0.339	

### 6.7. SNP'lerin Başlangıç Yaşına Etkisi

Polimorfizmler bir populasyonda ayırt edilebilir sıklıkla gerçekleşen genetik sekans değişimleridir. Mutasyon ise DNA ya da kromozom yapısında bir değişiklik oluşturur. Polimorfizmler, mutasyonlardan populasyonda daha sık varyant aleller olarak bulunmalarıyla ayrılırlar. Mutasyonlar hastalık nedeni olabilirken polimorfizmler ise hastalığa yatkınlık nedeni olabilirler. Farklı tipteki SNP'ler, bir proteinin fonksiyonunu, regülasyonunu ve ekspresyonunu değiştirebilir. Bununla birlikte genomdaki çoğu SNP gen fonksiyonlarını etkilememektedir. SNP'ler, kişiler arasında sekanslarında değişiklik olan genlerden kodlanan proteinlerin birbirlerinden farklı olmalarıyla biyolojik çeşitlilik de oluştururlar. DNA sekansındaki değişimler bireylerin hastalık geliştirmelerini, patojenlere, kimyasallara, ilaçlara, aşılarla ve diğer ajanlara cevap vermelerini etkiler.

Kanser türleri, kardiyovasküler hastalıklar, Alzheimer gibi bir çok konuda epidemiyolojik ve biyomedikal araştırmalarda farklı populasyonlardan hasta ve sağlıklı kontrol gruplarında SNP tayini ve karşılaştırılması yapılmaktadır. Çeşitli hastalıklara özgü SNP profilleri çıkarılmıştır. Bu profiller kullanılarak hastalıklara yatkınlık taraması yapmak mümkündür ve SNP taramalarında, hangi varyant alellerin hastalıkla yakın ilişkili olduğu belirlenebilmektedir. SNP'ler hakkında elde edilen bilgiler hastalık mekanizmalarının aydınlatılmasında da önemli rol oynamaktadırlar. Huntington Hastalığı'nda ise özellikle başlangıç yaşını etkileyen SNP'ler hakkında birçok çalışma yapılmıştır. Çalışmalardan sıklıkla farklı sonuçlar elde edilse de, SNP'lerin hastalık patogenezi hakkında bilgi verebileceği ve ileride tedavi amaçlı kullanılacakları düşünülmektedir. Bu çalışmada incelenen polimorfizmlerin özellikleri Tablo 6.7.'de verilmiştir.



**Tablo 6.7.** Araştırılan SNP'lere ait bilgiler

SNP	Lokasyonu	Değişen nükleotid	Atasal Alel	Amino asit değişimi
GRIN1 rs6293	9q34.3	789 A/G	G	Pro[P]→Pro[P]
GRIN2A rs1969060	16p13.2	1430216 C/T	C	-
GRIN2B rs1806201	12p12	2664 C/T	C	Thr[T]→Thr[T]
GRIN2B rs1042339	12p12	3499A/G	G	Val[V]→Ile[I]
GRIN2B rs890	12p12	409 G/T	T	-
TP53 R72P	17p13.1	412 C/G	C	Pro[P]→Arg[R]

Belirtilen SNP genotiplerinin Türk Huntington hastalarında görülme frekansları ve bu genotiplerin başlangıç yaşı ile ilişkilendirilmesi irdelenmiş ve diğer popülasyon verileri ile karşılaştırılmıştır. Daha sonra, çalışma kapsamında incelenen SNP'lerin başlangıç yaşına katkısı çoklu doğrusal regresyonla hesaplanmıştır. Çalışılan her bir polimorfizme ait  $R^2$  değerleri HH kromozomlarındaki CAG tekrarlarının etkisi ile birlikte hesaplanmıştır. Başlangıç yaşını değiştirmeye aday bu lokusların  $R^2$  değerlerindeki değişimin ( $\Delta R^2$ ) hesaplanması için genotiplerin etkisi ve CAG tekrarının tek başına etkisi karşılaştırılmıştır (Tablo 5.24.). Genel CAG tekrar grubunda, artan her CAG tekrarı başlangıç yaşını yaklaşık 1.5 yıl düşürmüştür.

### 6.7.1. NMDAR Polimorfizmlerinin Başlangıç Yaşına Etkisi

Eksitotoksitenin HH patogenezinde etkili olduğu kabul edilmektedir. Çeşitli araştırmalar glutamat reseptörlerinin NMDAR alt kümesinin HH nörodejenerasyonunda rol aldığını ileri sürmüştür. Bu reseptörler hücre içi kalsiyum akışına izin vererek gereğinden fazla aktive olduklarında protezları, lipazları ve DNazları aktive ederek nöronal ölüme yol açabilirler. Bu nedenle NMDAR varyasyonlarının HH'nin başlangıç yaşını etkileyebilecek faktörler arasında oldukları düşünülmektedir. Günümüzde dikensi striyatal nöronların hücre ölümüne hassasiyetinin mutant htt ile artması ve NMDAR hassasiyetinin bu prosese katkısının olup olmadığı ise açık değildir. Yapılacak çalışmalar HH patogenezi hakkında yeni bilgiler ortaya çıkardıkça HH'nin tedavisi ya da başlangıç yaşının geciktirilmesi mümkün olabilecektir.

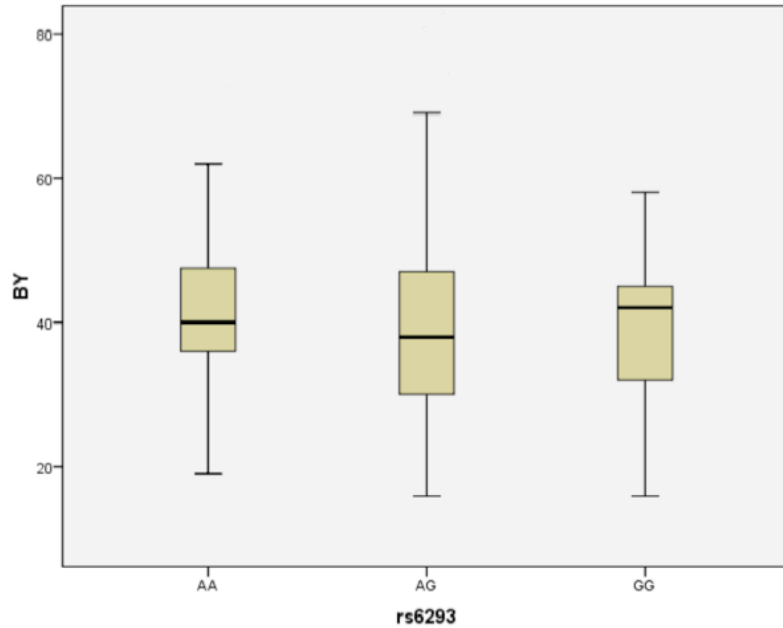
NMDAR polimorfizmleri ve HH ilişkisi literatürde sadece Arning vd. tarafından 2005 ve 2007 yıllarında Alman Huntington hastalarında incelenmiştir. Yapılan ilk çalışmada NR2A ve NR2B glutamat reseptör alt ünitelerindeki değişikliklerin HH'nda başlangıç yaşını belirleyici olabileceği gösterilmiş (Arning vd., 2005), daha sonra GRIN2A'da rs1969060 ve GRIN2B'de rs1806201 (C2664T) SNP'lerini içeren bölgelerde daha detaylı araştırılma yapılmıştır. GRIN2A lokusunda yapılan tarama intron 2 bölgesini en güçlü bağlantı bölgesi olarak belirlemiştir; GRIN2B'de ise C2664T değişiminin etkisinin kanıtını pekiştirmiştir. Hastaların cinsiyete göre sınıflandırılması ise C2664T ve rs8057394/rs2650427 varyasyonlarında farklılık göstermiştir. C2664T için cinsiyete özgü etki, bayanlarda azalmış CC genotipi frekansı göstermiştir. Genel olarak CC genotipine sahip bayan hastalarda diğer genotiplere oranla hastalığın daha geç başladığı görülmüştür. Bu çalışmada GRIN2A ve GRIN2B genotip varyasyonları, HH başlangıç yaşındaki ek varyansının %7.2'sini açıklamıştır (Arning vd., 2007).

Bu bulgular ışığında, NMDAR'de bugüne kadar belirlenmiş NR1 rs6293, NR2A rs1969060 ve NR2B rs1806201, rs1042339, rs890 SNP'lerinin HH ile ilişkili olabileceği düşünülerek, bu çalışmada Türk Huntington hastalarında ilgili SNP genotipleri ve hastalık başlangıç yaşı ile ilişkisi incelenmiştir.

NR1 rs6293 polimorfizminde genotiplere ait başlangıç yaşı ortalaması, standart sapma ve medyan değerleri Tablo 6.8.'de verilmiştir. Şekil 6.1.'de ise başlangıç yaşı ile rs6293 genotipleri ilişkisini gösteren kutu-bıyık grafiği gösterilmiştir. Kutu bıyık grafikleri veri setinin yayılımı, konumu, çarpıklığı hakkında bilgi vermeleri açısından önemlidir. Her genotip için medyan başlangıç yaşı siyah çizgi olarak gösterilmiş, dördüncü kutu olarak belirtilmiş ve kenarlar ise sınır başlangıç yaşlarını göstermektedir.

**Tablo 6.8.** NR1 rs6293 genotipleri ve ilişkili başlangıç yaşı

Başlangıç yaşı (BY) * rs6293						
BY						
rs6293	N	Minimum	Maksimum	Ortalama	Medyan	Std. Sapma
AA	43	19	70	41,88	40,00	10,894
AG	49	16	80	40,04	38,00	14,714
GG	10	16	58	39,40	42,00	13,015
Total	102	16	80	40,75	40,00	12,973



**Şekil 6.1.** NR1 rs6293 genotipleri ve başlangıç yaşlarına ait kutu-bıyık grafiği

NR2A rs1969060 genotiplerini gösteren Tablo 6.9. ve Şekil 6.2.'ye bakıldığında CC genotipine sahip bireylerin başlangıç yaşı ortalamasının ve medyan değerinin diğer genotiplere oranla daha yüksek olduğu (9-10 yıl), yani bu bireylerin

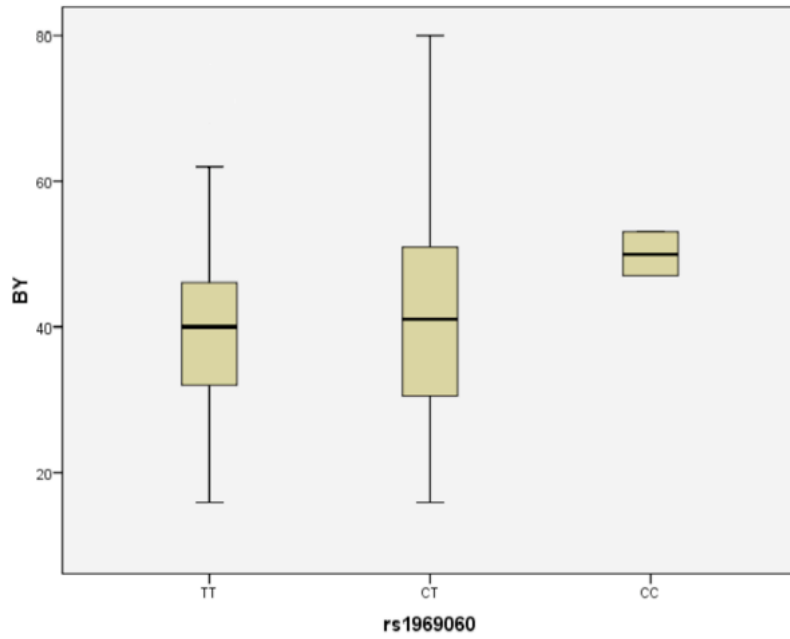
daha geç başlangıç yaşına sahip oldukları görülmektedir. Fakat bu durumun istatistiksel öneme ulaşmaması ( $p>0.05$ ), CC genotipine sahip bireylerin çok az olması nedeniyle normal kabul edilebilir.

**Tablo 6.9.** NR2A rs1969060 genotipleri ve ilişkili başlangıç yaşı

**BY \* rs1969060**

BY

rs1969060	N	Minimum	Maksimum	Ortalama	Medyan	Std. Sapma
TT	69	16	75	40,25	40,00	12,178
CT	31	16	80	41,29	41,00	14,943
CC	2	47	53	50,00	50,00	4,243
Total	102	16	80	40,75	40,00	12,973



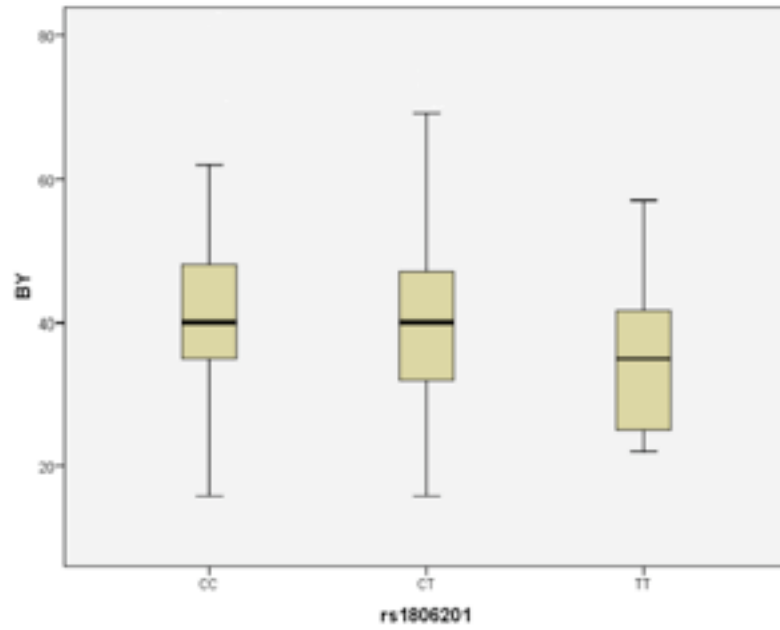
**Şekil 6.2.** NR2A rs1969060 genotipleri ve başlangıç yaşlarına ait kutu-bıyık grafiği

NR2B rs rs1806201 polimorfizmi için TT genotipine sahip olan hastaların başlangıç yaşlarının diğer genotiplerden yaklaşık 5 yıl erken olduğu belirlenmiş (Tablo 6.10. ve Şekil 6.3.), ancak bu veri istatistiksel olarak öneme ulaşamamıştır ( $p>0.05$ ).

**Tablo 6.10.** NR2B rs1806201 genotipleri ve ilişkili başlangıç yaşı**BY \* rs1806201**

BY

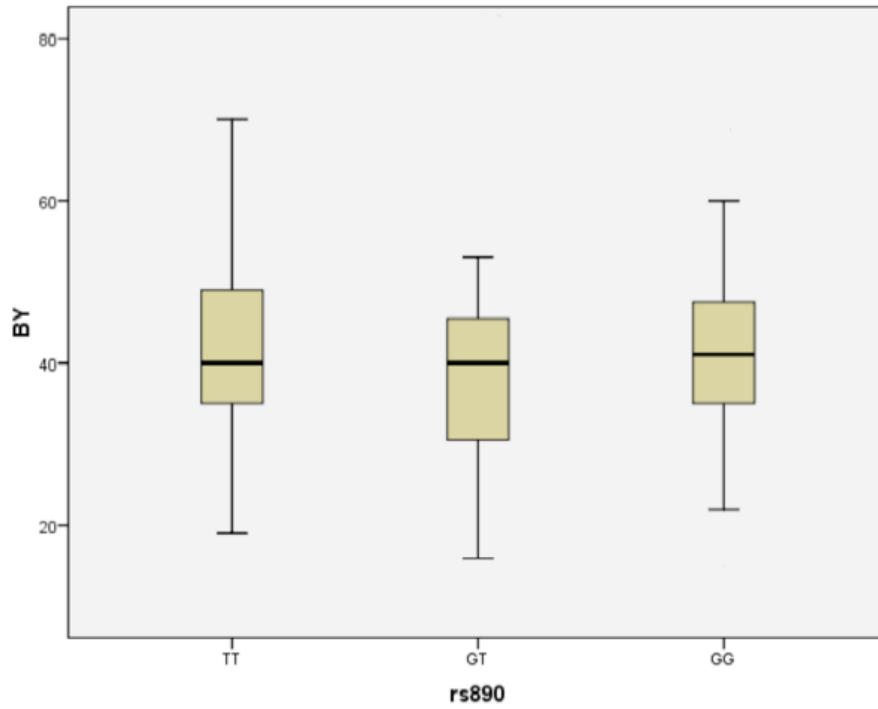
rs1806201	N	Minimum	Maksimum	Ortalama	Medyan	Std. Sapma
CC	45	16	80	41,89	40,00	12,678
CT	49	16	75	40,61	40,00	13,447
TT	8	22	57	35,25	35,00	11,622
Total	102	16	80	40,75	40,00	12,973

**Şekil 6.3.** NR2B rs1806201 genotiplerinin başlangıç yaşına ait kutu-bıyık grafiği

NR2B rs890 polimorfizmindeki genotipler (Tablo 6.11., Şekil 6.4.) için de HH başlangıç yaşı için önemli farklılıklar bulunmamıştır.

**Tablo 6.11.** NR2B rs890 genotipleri ve ilişkili başlangıç yaşı**BY \* rs890**

rs890	N	Minimum	Maksimum	Ortalama	Medyan	Std. Sapma
TT	28	19	75	42,61	40,00	13,401
GT	47	16	80	39,53	40,00	12,941
GG	27	16	69	40,96	41,00	12,829
Total	102	16	80	40,75	40,00	12,973

**Şekil 6.4.** NR2B rs890 genotipleri ve başlangıç yaşlarına ait kutu-bıyık grafiği

167 ve 250 Alman hasta (Arning vd., 2005a; Arning vd., 2007) ve 308 Venezuelalı hasta (Andresen vd., 2006) ile yapılmış çalışmalarda NR2A rs1969060 polimorfizminin başlangıç yaşını etkilediği bulunmuştur. Bununla birlikte NR2B rs1806201 polimorfizmi çalışılmış olduğu iki araştırmada (Arning vd., 2005, Arning vd., 2007 ) başlangıç yaşını etkiliyor görünürken diğer bir çalışmada ise bu etki gözlenmemiştir (Andresen vd., 2006). NR2B rs890 polimorfizminin de başlangıç yaşını etkilediği belirlenmiştir (Arning vd., 2005a). Çalışmamızdan elde edilen sonuçlar desteklemese de, NMDAR komplekslerindeki varyasyonlara sebep olan genetik polimorfizmlerin HH'daki klinik değişimlere katkıda bulunması olasıdır.

Türk Huntington hastalarında tüm CAG tekrar sayıları göz önünde bulundurulduğunda NMDAR komplekslerini kodlayan GRIN1, GRIN2A ve GRIN2B genlerindeki NR1 rs6293, NR2A rs1969060 ve NR2B rs1806201, rs1042339, rs 890 polimorfizmlerinin Huntington hastalığının başlangıç yaşına önemli bir katkısı bulunamamıştır ( $p>0.05$ ). Bununla birlikte, p değeri 0.05'ten büyük olmasına rağmen ( $p=0.132$ ) rs1969060 polimorfizminin doğrusal regresyon modeline bakıldığında ( $AO= 110,072-1,515 \text{ CAG} + 2,897 \text{ rs1969060}$ ) bu polimorfizminin başlangıç yaşını geciktirmeye eğilimli olduğu görülmüştür. İstatistiksel olarak önemli olmasa da, rs1969060 polimorfizminde CC genotipine sahip bireylerin başlangıç yaşının diğer genotiplere oranla daha geç olduğu bulunmuştur (Tablo 5.28.). rs1806201 genotipinde ise TT genotipine sahip bireylerin başlangıç yaşı ortalamasının, istatistiksel öneme ulaşmasa da, diğer genotiplerin ortalamasından yaklaşık 5 yıl erken olduğu görülmüştür.

40-50 CAG tekrarına sahip kadınlardan oluşan grupta rs1969060 polimorfizminin ( $p=0.049$ ) ve  $>50$  CAG genel grubunda ise rs6293 polimorfizminin ( $p=0.016$ ) HH hastalığının başlangıç yaşına etkisi olduğu görülmüştür. Bununla birlikte, farklı gruplarda da istatistiksel öneme ulaşmasa da p değeri 0.05'e yakın olan regresyon modelleri de elde edilmiştir. Örneğin rs890 polimorfizminde  $>45$  CAG genel grubunun regresyon modelinde p değeri 0.056 bulunmuştur. Bu veriler, tüm CAG tekrarlarının hesaplandığı durumda NMDAR varyasyonlarının HH başlangıç yaşına önemli bir katkısının olmadığını ileri sürse de, daha yüksek sayı içeren kohortlarda ve farklı popülasyonlarda benzer çalışmaların tekrar edilmesi gerekmektedir.

### **6.7.2. TP53 Polimorfizmlerinin Başlangıç Yaşına Etkisi**

Memelilerde en önemli tümör süpresör geni olan ve çeşitli hücre içi stres sinyalleri ile aktive olan p53, tamir aktivitelerinin stimülasyonu ile hücre döngüsünün geçici olarak durmasına neden olur ya da apoptozu başlatır. Mutant huntingtinin poliQ tekrarları içeren N-terminal kısmının nöronlarda TP53 yolağı için önemli sonuçları olabilecek fonksiyonel özellikler kazandığı ileri sürülmüştür.

Mutant huntingtinin patojenik domaininin nükleer transkripsiyon faktörleriyle etkileşime girdiği ve muhtemelen TP53 ile indüklenen transkripsiyonal olayları modüle ettiği ileri sürülmüştür. Bu durumda p53'ün HH başlangıç yaşını modüle etmesi olasıdır. TP53 geninde 72. kodonda 2 varyasyonun (Arg/Pro) (R72P) hücrel transformasyonu ve apoptozu indüklemeye farklı yetenekleri olduğu belirlenmiştir (Bonafe' vd., 2004; Thomas vd., 1999;). Bir hücre modelinde tümör supresör proteini p53'ün 72. kodonundaki arjinin kalıntısının aynı yerdeki prolin kalıntısına oranla artmış apoptoza neden olduğu gösterilmiştir (Dumont vd., 2003). Böylece TP53 genindeki Arg72Pro polimorfizminin apoptozu ve böylece HH başlangıç yaşını değiştirebileceği düşünülmüştür. Bir çalışmada bu değişimin başlangıç yaşını etkilediği görülmüştür (Chattopadhyay vd., 2004). Bununla birlikte diğer çalışmalardan aksi yönde sonuçlar da gelmektedir. Arning ve ark.tarafından yapılan bir çalışmada bu sonuç tekrar edilememiştir (Arning vd., 2004). Chattopadhyay vd. tarafından yapılan çalışma Hint kökenli hastalar arasında yapılırken, Arning tarafından yapılan çalışmada Avrupa kökenli hastalar yer almıştır. Bu tez çalışmasında da Türk Huntington hastalarında TP53 genindeki R72P değişiminin HH başlangıç yaşını etkilediği sonucuna varılmıştır. Çelişkili sonuçlar R72P genotiplerinin çeşitli popülasyonlarda farklı frekans değerleri göstermesi nedeniyle olabilir. Sonuçlar arasında birlik olmamasına rağmen, TP53'teki bu değişim HH'nda başlangıç yaşını etkileyecek en önemli adaylar arasındadır ve bu etkiyi apoptozu tetikleyen mekanizmaları modüle ederek yaptığı düşünülmektedir.

Bu çalışmada R72P ve HH başlangıç yaşı arasındaki ilişki anlamlı bulunmuştur ( $p=0.024$ ) ve bu varyasyonun başlangıç yaşını %4.98 oranında etkilediği gösterilmiştir. Chattopadhyay tarafından yapılan çalışmada da bu etki %6 olarak bulunmuştur (Chattopadhyay vd., 2004). Yapılan diğer çalışmada ise bu etki ispatlanamamıştır (Arning vd., 2004). Bu durum, R72P genotip ve alel frekanslarının popülasyonlar arasında farklı olmasından kaynaklanıyor görünmektedir (Tablo 6.6.).

Ayrıca yapılan bu tez çalışmasında GG genotipine sahip olan bireylerin hastalık başlangıç yaşlarının diğer genotiplere sahip olan bireylerden yaklaşık 5-7 yıl erken olduğu gözlenmiş (Şekil 6.5.) ancak bu gruplar arası fark istatistiksel öneme ulaşamamıştır (t-test,  $p=0.087$ ). Chattopadhyay vd. tarafından yapılan çalışmada da



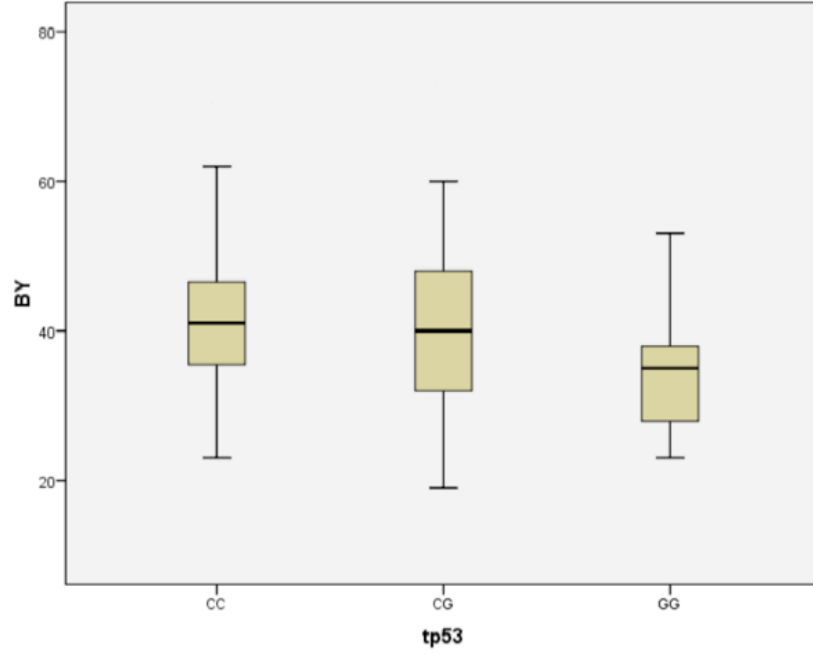
R72P polimorfizminin HH başlangıç yaşına etki ettiğinin ve GG genotipinin de bir risk faktörü olduğunun bulunmasına rağmen GG genotipine sahip bireylerin başlangıç yaşlarının ortalaması ( $38.7 \pm 11.8$  yaş) ve diğer genotiplere sahip bireylerin başlangıç yaşları ortalaması ( $39.9 \pm 13.0$  yaş) arasındaki fark istatistiksel olarak önemli bulunmamıştır (Chattopadhyay vd., 2004). Bu çalışmadaki başlangıç yaşı ortalaması farkı (Tablo 6.12.) daha belirgin olmasına rağmen, istatistiksel olarak önemli olamamasının nedeni GG genotipine sahip birey frekansının az olması olabilir. Bununla birlikte, bu çalışmada GG genotipi Chattopadhyay vd.'nin çalışmasının aksine, hasta ve kontrollerde aynı frekansta görüldüğünden risk faktörü oluşturmamaktadır (Tablo 5.35.).

**Tablo 6.12.** TP53 R72P genotipleri ve ilişkili başlangıç yaşı

BY \* tp53

tp53	N	Minimum	Maksimum	Ortalama	Medyan	Std. Sapma
CC	43	16	75	42,60	41,00	13,616
CG	46	19	80	40,65	40,00	13,095
GG	13	23	53	35,00	35,00	8,746
Total	102	16	80	40,75	40,00	12,973

Sonuç olarak bu çalışmada TP53 R72P polimorfizminin Türk Huntington hastalarında başlangıç yaşına etki ettiği görülmektedir. Başlangıç yaşında GG genotipi ve diğer genotipler arasındaki fark istatistiksel öneme ulaşmamasına rağmen, bu fark 5-7 yıl olarak bulunmuştur. Bununla birlikte, bu SNP'deki hiçbir genotip hastalık için bir risk faktörü oluşturmamaktadır. Örnek sayısı artırılarak diğer popülasyonlarda da bu gibi çalışmaların tekrar edilmesi daha kesin bilgilerin elde edilmesi için yararlı olacaktır.



**Şekil 6.5.** TP53 R72P genotiplerinin başlangıç yaşına ait kutu-bıyık grafiği

## 6.8. Genel Değerlendirme

Huntington Hastalığı artmış CAG tekrarı sebebiyle meydana gelen nörolojik hastalıklar için bir prototip olmuştur (Harper, 1999). HH'na neden olan genin bulunmasından bu yana geçen 15 yılda hastalığın biyolojisini anlamada ve hayvan modellerinde çalışan çeşitli terapötik stratejiler geliştirilmesinde çok büyük ilerlemeler sağlanmıştır. Günümüze kadar HH'nın moleküler mekanizmaları, başlangıç yaşı, gen penetransı ve sorumlu olan huntingtin proteini hakkında bir çok çalışma gerçekleştirilmiştir. Hastalığın anlaşılmasında önemli gelişmeler olmasına rağmen, hastalık mekanizması dahil hala açıklanmamış bir çok yönü bulunmaktadır ve henüz etkin bir tedavi yöntemi geliştirilememiştir. Bu zorluk önümüzdeki yıllarda laboratuvarlarda elde edilen bilginin insanlara uygun klinik ve presemptomatik tedavilere dönüştürülmesine çabalanarak yenilebilir (Imarisio vd., 2008).

Huntington Hastalığı'nda hastalık başlangıç yaşını etkileyen faktörlerin incelenmesi çok az sayıda ve birbiriyle çelişkili sonuçlar veren çalışmalarla sınırlı kalmıştır. Bu çalışmada NMDA reseptörleri lokuslarındaki incelenen değişimlerin

HH başlangıç yaşına önemli bir katkıda bulunmadığı, fakat TP53 genindeki R72P değişiminin başlangıç yaşını etkilediği bulunmuştur. İstatistiksel öneme ulaşamamasına rağmen ( $p=0.087$ ) GG genotipine sahip bireylerde başlangıç yaşının ortalama 5-7 yıl erken olduğu hesaplanmıştır. Ayrıca CAG tekrar sayıları aralarında gruplandırıldığında ve cinsiyete göre de ayırım yapıldığında R72P polimorfizmi 40-50 CAG tekrarına sahip kadınlarda ( $p=0.045$ ) ve CAG >45 genel grubunda ( $p=0.048$ ) da hastalığın başlangıç yaşını etkiliyor görünmektedir.

NR1, NR2A, NR2B ve TP53 ve ayrıca bu genlerle ilişkili genlerdeki değişimlerin sonuçlarını tanımlayabilmek HH'nı ve hastalık sürecinde rol oynayan mekanizmaları açıklayabilmek için yardımcı olabilir. Bu yüzden, bu gibi çalışmaların daha büyük ve farklı genetik altyapıya sahip popülasyonlarda tekrar edilmesi ve diğer aday genlerin ortaya çıkarılması önem taşımaktadır. Türk Huntington hastalarıyla ilk kez yapılan bu çalışma ile literatüre katkıda bulunulacaktır.

## 7. KAYNAKLAR

### 7.1. Kitaplar

ÖZDAMAR Kazım, **SPSS ile Biyoistatistik**, Kaan Kitabevi, Eskişehir, 2003

### 7.2. Makaleler

ACMG/ASHG statement. Laboratory guidelines for Huntington disease genetic testing. The American College of Medical Genetics/American Society of Human Genetics Huntington Disease Genetic Testing Working Group. **Am J Hum Genet.** **62** (1998):1243-7.

AIKEN CT, Tobin AJ, Schweitzer ES. A cell-based screen for drugs to treat Huntington's disease. **Neurobiol Dis.** **16** (2004):546-55.

ALAM ZI, Halliwell B, Jenner P. No evidence for increased oxidative damage to lipids, proteins, or DNA in Huntington's disease. **J Neurochem.** **75** (2000):840-6.

ALBERCH J, Pérez-Navarro E, Canals JM. Neuroprotection by neurotrophins and GDNF family members in the excitotoxic model of Huntington's disease. **Brain Res Bull.** **57** (2002):817-22.

ALMQVIST EW, Bloch M, Brinkman R, Craufurd D, Hayden MR. A worldwide assessment of the frequency of suicide, suicide attempts, or psychiatric hospitalization after predictive testing for Huntington disease. **Am J Hum Genet.** **64** (1999):1293-304.

AMBROSE CM, Duyao MP, Barnes G, Bates GP, Lin CS, Srinidhi J, Baxendale S, Hummerich H, Lehrach H, Altherr M. Structure and expression of the Huntington's disease gene: evidence against simple inactivation due to an expanded CAG repeat. **Somat Cell Mol Genet.** **20** (1994):27-38.

ANDRADE MA, Bork P. HEAT repeats in the Huntington's disease protein. **Nat Genet.** **11** (1995):115-6.

ANDRESEN JM, Gayán J, Cherny SS, Brocklebank D, Alkorta-Aranburu G, Addis EA; US-Venezuela Collaborative Research Group, Cardon LR, Housman DE, Wexler NS. Replication of twelve association studies for Huntington's disease residual age of onset in large Venezuelan kindreds. **J Med Genet.** **44** (2006):44-50.

ANDREW SE, Goldberg YP, Kremer B, Telenius H, Theilmann J, Adam S, Starr E, Squitieri F, Lin B, Kalchman MA. The relationship between trinucleotide (CAG) repeat length and clinical features of Huntington's disease. **Nat Genet.** **4** (1993):398-403.

ARNING L, Kraus PH, Saft C, Andrich J, Epplen JT. Age at onset of Huntington disease is not modulated by the R72P variation in TP53 and the R196K variation in the gene coding for the human caspase activated DNase (hCAD). **BMC Med Genet.** **6** (2005.a):35.

ARNING L, Kraus PH, Valentin S, Saft C, Andrich J, Epplen JT. NR2A and NR2B receptor gene variations modify age at onset in Huntington disease. **Neurogenetics.** **6** (2005.b):25-8.

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

BAE BI, Xu H, Igarashi S, Fujimuro M, Agrawal N, Taya Y, Hayward SD, Moran TH, Montell C, Ross CA, Snyder SH, Sawa A. p53 mediates cellular dysfunction and behavioral abnormalities in Huntington's disease. **Neuron.** **47** (2005):29-41.

BARNES GT, Duyao MP, Ambrose CM, McNeil S, Persichetti F, Srinidhi J, Gusella JF, MacDonald ME. Mouse Huntington's disease gene homolog (Hdh). **Somat Cell Mol Genet.** **20** (1994):87-97.

BAXENDALE S, Abdulla S, Elgar G, Buck D, Berks M, Micklem G, Durbin R, Bates G, Brenner S, Beck S. Comparative sequence analysis of the human and pufferfish Huntington's disease genes. **Nat Genet.** **10** (1995):67-76.

BEAL MF, Brouillet E, Jenkins B, Henshaw R, Rosen B, Hyman BT. Age-dependent striatal excitotoxic lesions produced by the endogenous mitochondrial inhibitor malonate. **J Neurochem.** **61** (1993):1147-50.

BEAL MF, Brouillet E, Jenkins BG, Ferrante RJ, Kowall NW, Miller JM, Storey E, Srivastava R, Rosen BR, Hyman BT. Neurochemical and histologic characterization of striatal excitotoxic lesions produced by the mitochondrial toxin 3-nitropropionic acid. **J Neurosci.** **13** (1993):4181-92.

BEAL MF, Hyman BT, Koroshetz W. Do defects in mitochondrial energy metabolism underlie the pathology of neurodegenerative diseases? **Trends Neurosci.** **16** (1993):125-31.

BEAL MF. Aging, energy, and oxidative stress in neurodegenerative diseases. **Ann Neurol.** **38** (1995):357-66.

BEAL MF. Does impairment of energy metabolism result in excitotoxic neuronal death in neurodegenerative illnesses? **Ann Neurol.** **31** (1992):119-30..

BECHER MW, Kotzuk JA, Sharp AH, Davies SW, Bates GP, Price DL, Ross CA

Intranuclear neuronal inclusions in Huntington's disease and dentatorubral and pallidolusian atrophy: correlation between the density of inclusions and IT-15 CAG triplet repeat length. **Neurobiol Dis.** **4** (1998):387-97.

BERLIOCCHI L, Bano D, Nicotera P. Ca<sup>2+</sup> signals and death programmes in neurons. **Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.** **360** (2005):2255-8.

BHIDE PG, Day M, Sapp E, Schwarz C, Sheth A, Kim J, Young AB, Penney J, Golden J, Aronin N, DiFiglia M. Expression of normal and mutant huntingtin in the developing brain. **J Neurosci.** **16** (1996):5523-35.

BONAFÉ M, Salvioli S, Barbi C, Trapassi C, Tocco F, Storci G, Invidia L, Vannini I, Rossi M, Marzi E, Mishto M, Capri M, Olivieri F, Antonicelli R, Memo M, Uberti D, Nacmias B, Sorbi S, Monti D, Franceschi C. The different apoptotic potential of the p53 codon 72 alleles increases with age and modulates in vivo ischaemia-induced cell death. **Cell Death Differ.** **11** (2004):962-73.

BONELLI RM, Wenning GK. Pharmacological management of Huntington's disease: an evidence-based review. **Curr Pharm Des.** **12** (2006):2701-20.

BORRELL-PAGÈS M, Zala D, Humbert S, Saudou F. Huntington's disease: from huntingtin function and dysfunction to therapeutic strategies. **Cell Mol Life Sci.** **63** (2006):2642-60.

BRINKMAN RR, Mezei MM, Theilmann J, Almqvist E, Hayden MR. The likelihood of being affected with Huntington disease by a particular age, for a specific CAG size. **Am J Hum Genet.** **60** (1997):1202-10.

BROWNE SE, Bowling AC, MacGarvey U, Baik MJ, Berger SC, Muqit MM, Bird ED, Beal MF. Oxidative damage and metabolic dysfunction in Huntington's disease: selective vulnerability of the basal ganglia. **Ann Neurol.** **41** (1997):646-53.

BROWNE SE, Ferrante RJ, Beal MF. Oxidative stress in Huntington's disease. **Brain Pathol.** **9** (1999):147-63.

BRUNE N, Andrich J, Gencik M, Saft C, Müller T, Valentin S, Przuntek H, Epplen JT. Methyltetrahydrofolate reductase polymorphism influences onset of Huntington's disease. **J Neural Transm Suppl.** (2004):105-10.-abstract

CARO AJ. The prevalence of Huntington's chorea in an area of East Anglia. **J R Coll Gen Pract.** **27** (1977):41-5.

CATTANEO E, Rigamonti D, Goffredo D, Zuccato C, Squitieri F, Sipione S. Loss of normal huntingtin function: new developments in Huntington's disease research. **Trends Neurosci.** **24** (2001):182-8.

CATTANEO E, Zuccato C, Tartari M. Normal huntingtin function: an alternative approach to Huntington's disease. **Nat Rev Neurosci.** **6** (2005):919-30.

CHA JH. Transcriptional dysregulation in Huntington's disease. **Trends Neurosci.** **23** (2000):387-92.

CHATTOPADHYAY B, Baksi K, Mukhopadhyay S, Bhattacharyya NP. Modulation of age at onset of Huntington disease patients by variations in TP53 and human caspase activated DNase (hCAD) genes. **Neurosci Lett.** **374** (2004):81-6.

CHATTOPADHYAY B, Ghosh S, Gangopadhyay PK, Das SK, Roy T, Sinha KK, Jha DK, Mukherjee SC, Chakraborty A, Singhal BS, Bhattacharya AK, Bhattacharyya NP. Modulation of age at onset in Huntington's disease and spinocerebellar ataxia type 2 patients originated from eastern India. **Neurosci Lett.** **345** (2003):93-6.

CHEN N, Luo T, Wellington C, Metzler M, McCutcheon K, Hayden MR, Raymond LA. Subtype-specific enhancement of NMDA receptor currents by mutant huntingtin. **J Neurochem.** **72** (1999):1890-8.

CHOISY-ROSSI C, Reisdorf P, Yonish-Rouach E. Mechanisms of p53-induced apoptosis: in search of genes which are regulated during p53-mediated cell death. **Toxicol Lett.** **102-103** (1998):491-6.

COPPEDE` F, Mancuso M, Siciliano G, Migliore L, Murri L, Genes and the Environment in Neurodegeneration. **Biosci Rep** (2006):341–367.

COYLE JT, Schwarcz R. Lesion of striatal neurones with kainic acid provides a model for Huntington's chorea. **Nature.** **263** (1976):244-6.

COYLE JT, Puttfarcken P. Oxidative stress, glutamate, and neurodegenerative disorders. **Science.** **262** (1993):689-95.

DAVIES SW, Turmaine M, Cozens BA, DiFiglia M, Sharp AH, Ross CA, Scherzinger E, Wanker EE, Mangiarini L, Bates GP. Formation of neuronal intranuclear inclusions underlies the neurological dysfunction in mice transgenic for the HD mutation. **Cell.** **90** (1997):537-48.

DESAI UA, Pallos J, Ma AA, Stockwell BR, Thompson LM, Marsh JL, Diamond MI. Biologically active molecules that reduce polyglutamine aggregation and toxicity. **Hum Mol Genet.** **15** (2006):2114-24.

DI MARIA E, Marasco A, Tartari M, Ciotti P, Abbruzzese G, Novelli G, Bellone E, Cattaneo E, Mandich P. No evidence of association between BDNF gene variants and age-at-onset of Huntington's disease. **Neurobiol Dis.** **24** (2006):274-9.

DIFIGLIA M, Sapp E, Chase K, Schwarz C, Meloni A, Young C, Martin E, Vonsattel JP, Carraway R, Reeves SA. Huntingtin is a cytoplasmic protein associated with vesicles in human and rat brain neurons. **Neuron.** **14** (1995):1075-81.

DIFIGLIA M, Sapp E, Chase KO, Davies SW, Bates GP, Vonsattel JP, Aronin N. Aggregation of huntingtin in neuronal intranuclear inclusions and dystrophic neurites in brain. **Science.** **277** (1997):1990-3.

DINGLELINE R, Borges K, Bowie D, Traynelis SF. The glutamate receptor ion channels. **Pharmacol Rev.** **51** (1999):7-61.

DJOUSSE L, Knowlton B, Hayden MR, Almqvist EW, Brinkman RR, Ross CA, Margolis RL, Rosenblatt A, Durr A, Dode C, Morrison PJ, Novelletto A, Frontali M, Trent RJ, McCusker E, Gómez-Tortosa E, Mayo Cabrero D, Jones R, Zanko A, Nance M, Abramson RK, Suchowersky O, Paulsen JS, Harrison MB, Yang Q, Cupples LA, Mysore J, Gusella JF, MacDonald ME, Myers RH. Evidence for a modifier of onset age in Huntington disease linked to the HD gene in 4p16. **Neurogenetics.** **5** (2004):109-14.

DUGAN LL, Sensi SL, Canzoniero LM, Handran SD, Rothman SM, Lin TS, Goldberg MP, Choi DW. Mitochondrial production of reactive oxygen species in cortical neurons following exposure to N-methyl-D-aspartate. **J Neurosci.** **15** (1995):6377-88.

DUMONT P, Leu JI, Della Pietra AC 3rd, George DL, Murphy M. The codon 72 polymorphic variants of p53 have markedly different apoptotic potential. **Nat Genet.** **33** (2003):357-65.

DUNNETT SB, Carter RJ, Watts C, Torres EM, Mahal A, Mangiarini L, Bates G, Morton AJ. Striatal transplantation in a transgenic mouse model of Huntington's disease. **Exp Neurol.** **154** (1999):31-40.

DUYAO M, Ambrose C, Myers R, Novelletto A, Persichetti F, Frontali M, Folstein S, Ross C, Franz M, Abbott M. Trinucleotide repeat length instability and age of onset in Huntington's disease. **Nat Genet.** **4** (1993):387-92.

DUYAO MP, Auerbach AB, Ryan A, Persichetti F, Barnes GT, McNeil SM, Ge P, Vonsattel JP, Gusella JF, Joyner AL. Inactivation of the mouse Huntington's disease gene homolog Hdh. **Science.** **269** (1995):407-10.

ERSOY N. Molecular genetics of Huntington's Disease: When size does matter. **Journal of Cell and Molecular Biology** **6** (2007): 1-8.

ESKENAZI BR, Wilson-Rich NS, Starks PT. A Darwinian approach to Huntington's disease: subtle health benefits of a neurological disorder. **Med Hypotheses.** **69** (2007):1183-9.

FAN MM, Raymond LA. N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor function and excitotoxicity in Huntington's disease. **Prog Neurobiol.** **81** (2007):272-93.

FARRER LA, Cupples LA, Wiater P, Conneally PM, Gusella JF, Myers RH. The normal Huntington disease (HD) allele, or a closely linked gene, influences age at onset of HD. **Am J Hum Genet.** **53** (1993):125-30.

FENG Z, Jin S, Zupnick A, Hoh J, de Stanchina E, Lowe S, Prives C, Levine AJ. p53 tumor suppressor protein regulates the levels of huntingtin gene expression. **Oncogene.** **25** (2005):1-7.



FERRANTE RJ, Andreassen OA, Jenkins BG, Dedeoglu A, Kuemmerle S, Kubilus JK, Kaddurah-Daouk R, Hersch SM, Beal MF. Neuroprotective effects of creatine in a transgenic mouse model of Huntington's disease. **J Neurosci.** **20** (2000):4389-97.

FERRANTE RJ, Kubilus JK, Lee J, Ryu H, Beesen A, Zucker B, Smith K, Kowall NW, Ratan RR, Luthi-Carter R, Hersch SM. Histone deacetylase inhibition by sodium butyrate chemotherapy ameliorates the neurodegenerative phenotype in Huntington's disease mice. **J Neurosci.** **23** (2003):9418-27.

FERRANTE RJ. Current Therapeutic Strategies in Huntington's Disease. **Business Briefing: US Neurology Review** (2005):33-5

FRANICH NR, Fitzsimons HL, Fong DM, Klugmann M, During MJ, Young D. AAV vector-mediated RNAi of mutant huntingtin expression is neuroprotective in a novel genetic rat model of Huntington's disease. **Mol Ther.** **16** (2008):947-56.

FUSCO FR, Chen Q, Lamoreaux WJ, Figueredo-Cardenas G, Jiao Y, Coffman JA, Surmeier DJ, Honig MG, Carlock LR, Reiner A. Cellular localization of huntingtin in striatal and cortical neurons in rats: lack of correlation with neuronal vulnerability in Huntington's disease. **J Neurosci.** **19** (1999):1189-202.

GAFNI J, Ellerby LM. Calpain activation in Huntington's disease. **J Neurosci.** **22** (2002):4842-9.

GAFNI J, Hermel E, Young JE, Wellington CL, Hayden MR, Ellerby LM. Inhibition of calpain cleavage of huntingtin reduces toxicity: accumulation of calpain/caspase fragments in the nucleus. **J Biol Chem.** **279** (2004):20211-20.

GAYÁN J, Brocklebank D, Andresen JM, Alkorta-Aranburu G; US-Venezuela Collaborative Research Group, Zameel Cader M, Roberts SA, Cherny SS, Wexler NS, Cardon LR, Housman DE. Genomewide linkage scan reveals novel loci modifying age of onset of Huntington's disease in the Venezuelan HD kindreds. **Genet Epidemiol.** **32** (2008):445-53.

GIL JM, Rego AC. Mechanisms of neurodegeneration in Huntington's disease. **Eur J Neurosci.** **28** (2008):2156.

GOLDBERG YP, McMurray CT, Zeisler J, Almqvist E, Sillence D, Richards F, Gacy AM, Buchanan J, Telenius H, Hayden MR. Increased instability of intermediate alleles in families with sporadic Huntington disease compared to similar sized intermediate alleles in the general population. **Hum Mol Genet.** **4** (1995):1911-8.

GOLDBERG YP, Nicholson DW, Rasper DM, Kalchman MA, Koide HB, Graham RK, Bromm M, Kazemi-Esfarjani P, Thornberry NA, Vaillancourt JP, Hayden MR. Cleavage of huntingtin by apopain, a proapoptotic cysteine protease, is modulated by the polyglutamine tract. **Nat Genet.** **13** (1996):442-9.

GONZALEZ-ALEGRE P, Afifi AK. Clinical characteristics of childhood-onset

(juvenile) Huntington disease: report of 12 patients and review of the literature. **J Child Neurol.** **21** (2006):223-9.

GU M, Gash MT, Mann VM, Javoy-Agid F, Cooper JM, Schapira AH. Mitochondrial defect in Huntington's disease caudate nucleus. **Ann Neurol.** **39** (1996):385-9.

GUIDETTI P, Charles V, Chen EY, Reddy PH, Kordower JH, Whetsell WO Jr, Schwarcz R, Tagle DA. Early degenerative changes in transgenic mice expressing mutant huntingtin involve dendritic abnormalities but no impairment of mitochondrial energy production. **Exp Neurol.** **169** (2001):340-50.

GUNAWARDENA S, Goldstein LS. Polyglutamine diseases and transport problems: deadly traffic jams on neuronal highways. **Arch Neurol.** **62** (2005):46-51.

GUSELLA JF, Macdonald ME. Huntington's disease: seeing the pathogenic process through a genetic lens. **Trends Biochem Sci.** **31** (2006):533-40.

GUSELLA JF, MacDonald ME. Huntington's disease. **Semin Cell Biol.** **6** (1995):21-8.

GUSELLA JF, Wexler NS, Conneally PM, Naylor SL, Anderson MA, Tanzi RE, Watkins PC, Ottina K, Wallace MR, Sakaguchi AY, et al. A polymorphic DNA marker genetically linked to Huntington's disease. **Nature.** **306** (1983):234-8.

GUTEKUNST CA, Levey AI, Heilman CJ, Whaley WL, Yi H, Nash NR, Rees HD, Madden JJ, Hersch SM. Identification and localization of huntingtin in brain and human lymphoblastoid cell lines with anti-fusion protein antibodies. **Proc Natl Acad Sci U S A.** **19** (1995):8710-4.

HANSEN W, Saft C, Andrich J, Müller T, Wiczorek S, Epplen JT, Arning L. Failure to confirm influence of methyltetrahydrofolate reductase (MTHFR) polymorphisms on age at onset of Huntington disease. **J Negat Results Biomed.** **4** (2005):12

HARJES P, Wanker EE. The hunt for huntingtin function: interaction partners tell many different stories. **Trends Biochem Sci.** **28** (2003):425-33.

HARPER PS. The epidemiology of Huntington's disease. **Hum Genet.** **89** (1992):365-76.

HEBB C. CNS at the cellular level: identity of transmitter agents. **Annu Rev Physiol.** **32** (1970):165-92.

HOCKLY E, Cordery PM, Woodman B, Mahal A, van Dellen A, Blakemore C, Lewis CM, Hannan AJ, Bates GP. Environmental enrichment slows disease progression in R6/2 Huntington's disease mice. **Ann Neurol.** **51** (2002):235-42.

HOH J, Jin S, Parrado T, Edington J, Levine AJ, Ott J. The p53MH algorithm and its application in detecting p53-responsive genes. **Proc Natl Acad Sci U S A.** **99**

(2002):8467-72.

HOLBERT S, Denghien I, Kiechle T, Rosenblatt A, Wellington C, Hayden MR, Margolis RL, Ross CA, Dausset J, Ferrante RJ, Néri C. The Gln-Ala repeat transcriptional activator CA150 interacts with huntingtin: neuropathologic and genetic evidence for a role in Huntington's disease pathogenesis. **Proc Natl Acad Sci U S A.** **98** (2001):1811-6.

HUANG K, Yanai A, Kang R, Arstikaitis P, Singaraja RR, Metzler M, Mullard A, Haigh B, Gauthier-Campbell C, Gutekunst CA, Hayden MR, El-Husseini A. Huntingtin-interacting protein HIP14 is a palmitoyl transferase involved in palmitoylation and trafficking of multiple neuronal proteins. **Neuron.** **44** (2004):977-86.

HUNTINGTON G. On chorea. **Medical and Surgical Reporter.** **26** (1872):320-321.

HUNTINGTON'S DISEASE COLLABORATIVE RESEARCH GROUP. A novel gene containing a trinucleotide repeat that is expanded and unstable on Huntington's disease chromosomes. **Cell.** **72** (1993):971-83.

IGNATOVA Z, Gierasch LM. Inhibition of protein aggregation in vitro and in vivo by a natural osmoprotectant. **Proc Natl Acad Sci U S A.** **103** (2006):13357-61.

IMARISIO S, Carmichael J, Korolchuk V, Chen CW, Saiki S, Rose C, Krishna G, Davies JE, Ttofi E, Underwood BR, Rubinsztein DC. Huntington's disease: from pathology and genetics to potential therapies. **Biochem J.** **412** (2008):191-209

JAMES CM, Houlihan GD, Snell RG, Cheadle JP, Harper PS. Late-onset Huntington's disease: a clinical and molecular study. *Age Ageing.* **23** (1994):445-8.

JANA NR, Zemskov EA, Wang Gh, Nukina N. Altered proteasomal function due to the expression of polyglutamine-expanded truncated N-terminal huntingtin induces apoptosis by caspase activation through mitochondrial cytochrome c release. **Hum Mol Genet.** **10** (2001):1049-59.

KALCHMAN MA, Graham RK, Xia G, Koide HB, Hodgson JG, Graham KC, Goldberg YP, Gietz RD, Pickart CM, Hayden MR. Huntingtin is ubiquitinated and interacts with a specific ubiquitin-conjugating enzyme. **J Biol Chem.** **271** (1996):19385-94.

KARLOVICH CA, John RM, Ramirez L, Stainier DY, Myers RM. Characterization of the Huntington's disease (HD) gene homologue in the zebrafish *Danio rerio*. **Gene.** **217** (1998):117-25.

KARPUJ MV, Garren H, Slunt H, Price DL, Gusella J, Becher MW, Steinman L. Transglutaminase aggregates huntingtin into nonamyloidogenic polymers, and its enzymatic activity increases in Huntington's disease brain nuclei. **Proc Natl Acad Sci U S A.** **96** (2002):7388-93.

KEHOE P, Krawczak M, Harper PS, Owen MJ, Jones AL. Age of onset in

Huntington disease: sex specific influence of apolipoprotein E genotype and normal CAG repeat length. **J Med Genet.** **36** (1999):108-11.

KIM YJ, Yi Y, Sapp E, Wang Y, Cuiffo B, Kegel KB, Qin ZH, Aronin N, DiFiglia M. Caspase 3-cleaved N-terminal fragments of wild-type and mutant huntingtin are present in normal and Huntington's disease brains, associate with membranes, and undergo calpain-dependent proteolysis. **Proc Natl Acad Sci U S A.** **98** (2001):12784-9.

KISHIKAWA S, Li JL, Gillis T, Hakky MM, Warby S, Hayden M, MacDonald ME, Myers RH, Gusella JF. Brain-derived neurotrophic factor does not influence age at neurologic onset of Huntington's disease. **Neurobiol Dis.** **24** (2006):280-5.

KLEMENT IA, Skinner PJ, Kaytor MD, Yi H, Hersch SM, Clark HB, Zoghbi HY, Orr HT. Ataxin-1 nuclear localization and aggregation: role in polyglutamine-induced disease in SCA1 transgenic mice. **Cell.** **95** (1998):41-53.

KREMER B, Almqvist E, Theilmann J, Spence N, Telenius H, Goldberg YP, Hayden MR. Sex-dependent mechanisms for expansions and contractions of the CAG repeat on affected Huntington disease chromosomes. **Am J Hum Genet.** **57** (1995):343-50.

KUWERT T, Lange HW, Langen KJ, Herzog H, Aulich A, Feinendegen LE. Cortical and subcortical glucose consumption measured by PET in patients with Huntington's disease. **Brain.** **113** (1990):1405-23.

LA SPADA AR, Morrison RS. The power of the dark side: Huntington's disease protein and p53 form a deadly alliance. **Neuron.** **47** (2005):1-3.

LANDLES C, Bates GP, Huntingtin and the molecular pathogenesis of Huntington's disease. **EMBO Rep.** (2004):958-63.

LANDWEHRMEYER GB, Dubois B, de Yébenes JG, Kremer B, Gaus W, Kraus PH, Przuntek H, Dib M, Doble A, Fischer W, Ludolph AC; European Huntington's Disease Initiative Study Group. Riluzole in Huntington's disease: a 3-year, randomized controlled study. **Ann Neurol.** **62** (2007):262-72.

LANGBEHN DR, Brinkman RR, Falush D, Paulsen JS, Hayden MR; International Huntington's Disease Collaborative Group. A new model for prediction of the age of onset and penetrance for Huntington's disease based on CAG length. **Clin Genet.** **65** (2004):267-77.

LARSSON MU, Luszcz MA, Bui TH, Wahlin TB. Depression and suicidal ideation after predictive testing for Huntington's disease: a two-year follow-up study. **J Genet Couns.** **15** (2006):361-74.

LAUBE B, Kuhse J, Betz H. Evidence for a tetrameric structure of recombinant NMDA receptors. **J Neurosci.** **18** (1998):2954-61.

LEAVITT BR, Guttman JA, Hodgson JG, Kimel GH, Singaraja R, Vogl AW,

Hayden MR. Wild-type huntingtin reduces the cellular toxicity of mutant huntingtin in vivo. **Am J Hum Genet.** **68** (2001):313-24.

LEVINE AJ. p53, the cellular gatekeeper for growth and division. **Cell.** **88** (1997):323-31.

LI JL, Hayden MR, Almqvist EW, Brinkman RR, Durr A, Dodé C, Morrison PJ, Suchowersky O, Ross CA, Margolis RL, Rosenblatt A, Gómez-Tortosa E, Cabrero DM, Novelletto A, Frontali M, Nance M, Trent RJ, McCusker E, Jones R, Paulsen JS, Harrison M, Zanko A, Abramson RK, Russ AL, Knowlton B, Djoussé L, Mysore JS, Tariot S, Gusella MF, Wheeler VC, Atwood LD, Cupples LA, Saint-Hilaire M, Cha JH, Hersch SM, Koroshetz WJ, Gusella JF, MacDonald ME, Myers RH. A genome scan for modifiers of age at onset in Huntington disease: The HD MAPS study. **Am J Hum Genet.** **73** (2003):682-7.

LI JL, Hayden MR, Warby SC, Durr A, Morrison PJ, Nance M, Ross CA, Margolis RL, Rosenblatt A, Squitieri F, Frati L, Gómez-Tortosa E, García CA, Suchowersky O, Klimek ML, Trent RJ, McCusker E, Novelletto A, Frontali M, Paulsen JS, Jones R, Ashizawa T, Lazzarini A, Wheeler VC, Prakash R, Xu G, Djoussé L, Mysore JS, Gillis T, Hakky M, Cupples LA, Saint-Hilaire MH, Cha JH, Hersch SM, Penney JB, Harrison MB, Perlman SL, Zanko A, Abramson RK, Lechich AJ, Duckett A, Marder K, Conneally PM, Gusella JF, MacDonald ME, Myers RH. Genome-wide significance for a modifier of age at neurological onset in Huntington's disease at 6q23-24: the HD MAPS study. **BMC Med Genet.** **7** (2006):71.

LI JY, Plomann M, Brundin P. Huntington's disease: a synaptopathy? **Trends Mol Med.** **9** (2003):414-20.

LI S, Li XJ. Multiple pathways contribute to the pathogenesis of Huntington disease. **Mol Neurodegener.** **1** (2006):19.

LI SH, Schilling G, Young WS 3rd, Li XJ, Margolis RL, Stine OC, Wagster MV, Abbott MH, Franz ML, Ranen NG. Huntington's disease gene (IT-15) is widely expressed in human and rat tissues. **Neuron.** **11** (1993):985-93.

LI YJ, Oliveira SA, Xu P, Martin ER, Stenger JE, Scherzer CR, Hauser MA, Scott WK, Small GW, Nance MA, Watts RL, Hubble JP, Koller WC, Pahwa R, Stern MB, Hiner BC, Jankovic J, Goetz CG, Mastaglia F, Middleton LT, Roses AD, Saunders AM, Schmechel DE, Gullans SR, Haines JL, Gilbert JR, Vance JM, Pericak-Vance MA, Hulette C, Welsh-Bohmer KA. Glutathione S-transferase omega-1 modifies age-at-onset of Alzheimer disease and Parkinson disease. **Hum Mol Genet.** **12** (2003):3259-67.

LI Z, Karlovich CA, Fish MP, Scott MP, Myers RM. A putative Drosophila homolog of the Huntington's disease gene. **Hum Mol Genet.** **8** (1999):1807-15.

LIN B, Rommens JM, Graham RK, Kalchman M, MacDonald H, Nasir J, Delaney A, Goldberg YP, Hayden MR. Differential 3' polyadenylation of the Huntington disease gene results in two mRNA species with variable tissue expression. **Hum Mol Genet.** **2** (1993):1541-5.

LOFTIS JM, Janowsky A. The N-methyl-D-aspartate receptor subunit NR2B: localization, functional properties, regulation, and clinical implications. **Pharmacol Ther.** **97** (2003):55-85.

LUNKES A, Lindenberg KS, Ben-Haïem L, Weber C, Devys D, Landwehrmeyer GB, Mandel JL, Trottier Y. Proteases acting on mutant huntingtin generate cleaved products that differentially build up cytoplasmic and nuclear inclusions. **Mol Cell.** **10** (2002):259-69.

MAI M, Akkad AD, Wieczorek S, Saft C, Andrich J, Kraus PH, Epplen JT, Arning L. No association between polymorphisms in the BDNF gene and age at onset in Huntington disease. **BMC Med Genet.** **7** (2006):79.

MACDONALD ME, Barnes G, Srinidhi J, Duyao MP, Ambrose CM, Myers RH, Gray, Conneally PM, Young, A, Penney J, Shou Ison I, Hollingsworth Z, Koroshetz W, Bird E, Vonsattel JP, Bonilla E, Moscowitz C, Penchaszadeh G, Brzustowicz L, Alvir J, Bickham J, Conde, Cha J-H, Dure L, Gomez F, Ramos-Arroyo M, Sanchez-Ramos J, Snodgrass SR, MacFarlane MN SH, Anderson MA, Jenkins B, Gusella JF. Gametic but not somatic instability of CAG repeat length in Huntington's disease. **Med Genet.** **30** (1993):982-6

MACDONALD ME, Novelletto A, Lin C, Tagle D, Barnes G, Bates G, Taylor S, Allitto B, Altherr M, Myers R, et al. The Huntington's disease candidate region exhibits many different haplotypes. **Nat Genet.** **1** (1992):99-103.

MANCUSO M, Coppede F, Migliore L, Siciliano G, Murri L. Mitochondrial dysfunction, oxidative stress and neurodegeneration. **J Alzheimers Dis.** **10** (2006):59-73.

MANN VM, Cooper JM, Javoy-Agid F, Agid Y, Jenner P, Schapira AH. Mitochondrial function and parental sex effect in Huntington's disease. **Lancet.** **336** (1990):749.

MARGOLIS RL, Ross CA. Diagnosis of Huntington disease. **Clin Chem.** **49** (2003):1726-32.

MARSHALL J, White K, Weaver M, Flury Wetherill L, Hui S, Stout JC, Johnson SA, Beristain X, Gray J, Wojcieszek J, Foroud T. Specific psychiatric manifestations among preclinical Huntington disease mutation carriers. **Arch Neurol.** **64** (2007):116-21.

MATSUYAMA N, Hadano S, Onoe K, Osuga H, Showguchi-Miyata J, Gondo Y, Ikeda JE. Identification and characterization of the miniature pig Huntington's disease gene homolog: evidence for conservation and polymorphism in the CAG triplet repeat. **Genomics.** **69** (2000):72-85.

MCGUIRE JR, Rong J, Li SH, Li XJ. Interaction of Huntingtin-associated protein-1 with kinesin light chain: implications in intracellular trafficking in neurons. **J Biol Chem.** **281** (2006):3552-9.

MCNEIL SM, Novelletto A, Srinidhi J, Barnes G, Kornbluth I, Altherr MR, Wasmuth JJ, Gusella JF, MacDonald ME, Myers RH. Reduced penetrance of the Huntington's disease mutation. **Hum Mol Genet.** 6 (1997):775-9.

METZGER S, Bauer P, Tomiuk J, Laccone F, Didonato S, Gellera C, Mariotti C, Lange HW, Weirich-Schwaiger H, Wenning GK, Seppi K, Melegh B, Havasi V, Balikó L, Wiczorek S, Zaremba J, Hoffman-Zacharska D, Sulek A, Basak AN, Soydan E, Zidovska J, Kebrdlova V, Pandolfo M, Ribai P, Kadasi L, Kvasnicova M, Weber BH, Kreuz F, Dose M, Stuhmann M, Riess O. Genetic analysis of candidate genes modifying the age-at-onset in Huntington's disease. **Hum Genet.** 120 (2006):285-92.

METZGER S, Bauer P, Tomiuk J, Laccone F, Didonato S, Gellera C, Soliveri P, Lange HW, Weirich-Schwaiger H, Wenning GK, Melegh B, Havasi V, Balikó L, Wiczorek S, ARNING L, Zaremba J, Sulek A, Hoffman-Zacharska D, Basak AN, Ersoy N, Zidovska J, Kebrdlova V, Pandolfo M, Ribai P, Kadasi L, Kvasnicova M, Weber BH, Kreuz F, Dose M, Stuhmann M, Riess O. The S18Y polymorphism in the UCHL1 gene is a genetic modifier in Huntington's disease. **Neurogenetics.** 7 (2006):27-30.

MILNERWOOD AJ, Cummings DM, Dallérac GM, Brown JY, Vatsavayai SC, Hirst MC, Rezaie P, Murphy KP. Early development of aberrant synaptic plasticity in a mouse model of Huntington's disease. **Hum Mol Genet.** 15 (2006):1690-703.

MONYER H, Burnashev N, Laurie DJ, Sakmann B, Seeburg PH. Developmental and regional expression in the rat brain and functional properties of four NMDA receptors. **Neuron.** 12 (1994):529-40.

MORRISON PJ, Johnston WP, Nevin NC. The epidemiology of Huntington's disease in Northern Ireland. **J Med Genet.** 32 (1995):524-30.

MYERS RH, Goldman D, Bird ED, Sax DS, Merrill CR, Schoenfeld M, Wolf PA. Maternal transmission in Huntington's disease. **Lancet.** 1 (1983):208-10.

MYERS RH, Leavitt J, Farrer LA, Jagadeesh J, McFarlane H, Mastromauro CA, Mark RJ, Gusella JF. Homozygote for Huntington disease. **Am J Hum Genet.** 45 (1989):615-8.

MYERS RH, MacDonald ME, Koroshetz WJ, Duyao MP, Ambrose CM, Taylor SA, Barnes G, Srinidhi J, Lin CS, Whaley WL. De novo expansion of a (CAG)<sub>n</sub> repeat in sporadic Huntington's disease. **Nat Genet.** 5 (1993): 168-73.

MYERS RH. Huntington's disease genetics. **NeuroRx.** 1 (2004):255-62.

NAHHAS FA, Garbern J, Krajewski KM, Roa BB, Feldman GL. Juvenile onset Huntington disease resulting from a very large maternal expansion. **Am J Med Genet A.** 137A (2005):328-31.

NANCE MA, Myers RH. Juvenile onset Huntington's disease--clinical and research

perspectives. **Ment Retard Dev Disabil Res Rev.** 7 (2001):153-7.

NANCE MA. Huntington disease--another chapter rewritten. **Am J Hum Genet.** 59(1996):1-6.

NASIR J, Floresco SB, O'Kusky JR, Diewert VM, Richman JM, Zeisler J, Borowski A, Marth JD, Phillips AG, Hayden MR. Targeted disruption of the Huntington's disease gene results in embryonic lethality and behavioral and morphological changes in heterozygotes. **Cell.** 81 (1995):811-23.

NAZÉ P, Vuillaume I, Destée A, Pasquier F, Sablonnière B. Mutation analysis and association studies of the ubiquitin carboxy-terminal hydrolase L1 gene in Huntington's disease. **Neurosci Lett.** 328 (2002):1-4.

NOVELLETTO A, Persichetti F, Sabbadini G, Mandich P, Bellone E, Ajmar F, Squitieri F, Campanella G, Bozza A, MacDonald ME. Polymorphism analysis of the huntingtin gene in Italian families affected with Huntington disease. **Hum Mol Genet.** 3 (1994):1129-32.

NOVELLI A, Reilly JA, Lysko PG, Henneberry RC. Glutamate becomes neurotoxic via the N-methyl-D-aspartate receptor when intracellular energy levels are reduced. **Brain Res.** 451 (1988):205-12.

OLNEY JW. Brain lesions, obesity, and other disturbances in mice treated with monosodium glutamate. **Science.** 164 (1969):719-21.

ONA VO, Li M, Vonsattel JP, Andrews LJ, Khan SQ, Chung WM, Frey AS, Menon AS, Li XJ, Stieg PE, Yuan J, Penney JB, Young AB, Cha JH, Friedlander RM. Inhibition of caspase-1 slows disease progression in a mouse model of Huntington's disease. **Nature.** 399 (1999):263-7.

ORDWAY JM, Tallaksen-Greene S, Gutekunst CA, Bernstein EM, Cearley JA, Wiener HW, Dure LS 4th, Lindsey R, Hersch SM, Jope RS, Albin RL, Detloff PJ. Ectopically expressed CAG repeats cause intranuclear inclusions and a progressive late onset neurological phenotype in the mouse. **Cell.** 91 (1997):753-63.

OZAWA S, Kamiya H, Tsuzuki K. Glutamate receptors in the mammalian central nervous system. **Prog Neurobiol.** 54 (1998):581-618.

PANAS M, Avramopoulos D, Karadima G, Petersen MB, Vassilopoulos D. Apolipoprotein E and presenilin-1 genotypes in Huntington's disease. **J Neurol.** 246 (1999):574-7.

PAULSEN JS, Hoth KF, Nehl C, Stierman L. Critical periods of suicide risk in Huntington's disease. **Am J Psychiatry.** 162 (2005):725-31.

PERUTZ MF, Johnson T, Suzuki M, Finch JT. Glutamine repeats as polar zippers: their possible role in inherited neurodegenerative diseases. **Proc Natl Acad Sci U S A.** 91 (1994):5355-8.



PETERSÉN A, Mani K, Brundin P. Recent advances on the pathogenesis of Huntington's disease. **Exp Neurol.** **157** (1999):1-18.

POLIDORI MC, Mecocci P, Browne SE, Senin U, Beal MF. Oxidative damage to mitochondrial DNA in Huntington's disease parietal cortex. **Neurosci Lett.** **272** (1999):53-6.

PORTERA-CAILLIAU C, Hedreen JC, Price DL, Koliatsos VE. Evidence for apoptotic cell death in Huntington disease and excitotoxic animal models. **J Neurosci.** **15** (1995):3775-87.

QUARRELL OW, Rigby AS, Barron L, Crow Y, Dalton A, Dennis N, Fryer AE, Heydon F, Kinning E, Lashwood A, Losekoot M, Margerison L, McDonnell S, Morrison PJ, Norman A, Peterson M, Raymond FL, Simpson S, Thompson E, Warner J. Reduced penetrance alleles for Huntington's disease: a multi-centre direct observational study. **J Med Genet.** **44** (2007):e68.

RANEN NG, Stine OC, Abbott MH, Sherr M, Codori AM, Franz ML, Chao NI, Chung AS, Pleasant N, Callahan C. Anticipation and instability of IT-15 (CAG)<sub>n</sub> repeats in parent-offspring pairs with Huntington disease. **Am J Hum Genet.** **57** (1995):593-602.

RAVIKUMAR B, Vacher C, Berger Z, Davies JE, Luo S, Oroz LG, Scaravilli F, Easton DF, Duden R, O'Kane CJ, Rubinsztein DC. Inhibition of mTOR induces autophagy and reduces toxicity of polyglutamine expansions in fly and mouse models of Huntington disease. **Nat Genet.** **36** (2004):585-95

RIDLEY RM, Frith CD, Crow TJ, Conneally PM. Anticipation in Huntington's disease is inherited through the male line but may originate in the female. **J Med Genet.** **25** (1988):589-95.

ROSENBLATT A, Brinkman RR, Liang KY, Almqvist EW, Margolis RL, Huang CY, Sherr M, Franz ML, Abbott MH, Hayden MR, Ross CA. Familial influence on age of onset among siblings with Huntington disease. **Am J Med Genet.** **105** (2001):399-403.

RUBINSZTEIN DC, Leggo J, Chiano M, Dodge A, Norbury G, Rosser E, Crauford D. Genotypes at the GluR6 kainate receptor locus are associated with variation in the age of onset of Huntington disease. **Proc Natl Acad Sci U S A.** **94** (1997):3872-6.

RUBINSZTEIN DC, Leggo J, Coles R, Almqvist E, Biancalana V, Cassiman JJ, Chotai K, Connarty M, Crauford D, Curtis A, Curtis D, Davidson MJ, Differ AM, Dode C, Dodge A, Frontali M, Ranen NG, Stine OC, Sherr M, Abbott MH, Franz ML, Graham CA, Harper PS, Hedreen JC, Hayden MR. Phenotypic characterization of individuals with 30-40 CAG repeats in the Huntington disease (HD) gene reveals HD cases with 36 repeats and apparently normal elderly individuals with 36-39 repeats. **Am J Hum Genet.** **59** (1996) :16-22.

RYAN A, Scrable H. Mutant alleles of HD improve the life span of p53(-/-) mice. **Mech SAPP E**, Schwarz C, Chase K, Bhide PG, Young AB, Penney J, Vonsattel JP,

Aronin N, DiFiglia M. Huntingtin localization in brains of normal and Huntington's disease patients. **Ann Neurol.** **42** (2007):604-12.

SAFT C, Andrich JE, Brune N, Gencik M, Kraus PH, Przuntek H, Epplen JT. Apolipoprotein E genotypes do not influence the age of onset in Huntington's disease. **J Neurol Neurosurg Psychiatry.** **75** (2004):1692-6.

SAGREDO O, García-Arencia M, de Lago E, Finetti S, Decio A, Fernández-Ruiz J. Cannabinoids and neuroprotection in basal ganglia disorders. **Mol Neurobiol.** **36** (2007):82-91

SAUDOU F, Finkbeiner S, Devys D, Greenberg ME. Huntingtin acts in the nucleus to induce apoptosis but death does not correlate with the formation of intranuclear inclusions. **Cell.** **95** (1998):55-66.

SAPP E, Schwarz C, Chase K, Bhide PG, Young AB, Penney J, Vonsattel JP, Aronin N, DiFiglia M. Huntingtin localization in brains of normal and Huntington's disease patients. **Ann Neurol.** **42** (1997):604-12.

SCHERZINGER E, Lurz R, Turmaine M, Mangiarini L, Hollenbach B, Hasenbank R, Bates GP, Davies SW, Lehrach H, Wanker EE. Huntingtin-encoded polyglutamine expansions form amyloid-like protein aggregates in vitro and in vivo. **Cell.** **90** (1997):549-58.

SCHMITT I, Bächner D, Megow D, Henklein P, Hameister H, Epplen JT, Riess O. Expression of the Huntington disease gene in rodents: cloning the rat homologue and evidence for downregulation in non-neuronal tissues during development. **Hum Mol Genet.** **4** (1995):1173-82.

SCHULZ JB, Henshaw DR, Siwek D, Jenkins BG, Ferrante RJ, Cipolloni PB, Kowall NW, Rosen BR, Beal MF. Involvement of free radicals in excitotoxicity in vivo. **J Neurochem.** **64** (1995):2239-47

SCHWARCZ R, Bennett JP Jr, Coyle JT Jr. Loss of striatal serotonin synaptic receptor binding induced by kainic acid lesions: correlations with Huntington's Disease. **J Neurochem.** **28** (1976):867-9.

SHARP AH, Ross CA. Neurobiology of Huntington's disease. **Neurobiol Dis.** **3** (1996):3-15.

SIERADZAN KA, Mann DM. The selective vulnerability of nerve cells in Huntington's disease. **Neuropathol Appl Neurobiol.** **27** (2001):1-21.

SIPIONE S, Rigamonti D, Valenza M, Zuccato C, Conti L, Pritchard J, Kooperberg C, Olson JM, Cattaneo E. Early transcriptional profiles in huntingtin-inducible striatal cells by microarray analyses. **Hum Mol Genet.** **11** (2002):1953-65.

SITTLER A, Lurz R, Lueder G, Priller J, Lehrach H, Hayer-Hartl MK, Hartl FU, Wanker EE. Geldanamycin activates a heat shock response and inhibits huntingtin aggregation in a cell culture model of Huntington's disease. **Hum Mol Genet.** **10**

(2001):1307-15.

SMITH DL, Woodman B, Mahal A, Sathasivam K, Ghazi-Noori S, Lowden PA, Bates GP, Hockly E. Minocycline and doxycycline are not beneficial in a model of Huntington's disease. **Ann Neurol.** **54** (2003):186-96.

SMITH R, Brundin P, Li JY. Synaptic dysfunction in Huntington's disease: a new perspective. **Cell Mol Life Sci.** **62** (2005):1901-12.

SNELL RG, MacMillan JC, Cheadle JP, Fenton I, Lazarou LP, Davies P, MacDonald ME, Gusella JF, Harper PS, Shaw DJ. Relationship between trinucleotide repeat expansion and phenotypic variation in Huntington's disease. **Nat Genet.** **4** (1993):393-7.

SØRENSEN SA, Fenger K, Olsen JH. Significantly lower incidence of cancer among patients with Huntington disease: An apoptotic effect of an expanded polyglutamine tract? **Cancer.** **86** (1999):1342-6.

SØRENSEN SA, Fenger K. Causes of death in patients with Huntington's disease and in unaffected first degree relatives. **J Med Genet.** **29** (1992):911-4.

SQUITIERI F, Andrew SE, Goldberg YP, Kremer B, Spence N, Zeisler J, Nichol K, Theilmann J, Greenberg J, Goto J. DNA haplotype analysis of Huntington disease reveals clues to the origins and mechanisms of CAG expansion and reasons for geographic variations of prevalence. **Hum Mol Genet.** **3** (1994) :2103-14.

SQUITIERI F, Berardelli A, Nargi E, Castellotti B, Mariotti C, Cannella M, Lavitrano ML, de Grazia U, Gellera C, Ruggieri S. Atypical movement disorders in the early stages of Huntington's disease: clinical and genetic analysis. **Clin Genet.** **58** (2000):50-6.

STACK EC, Dedeoglu A, Smith KM, Cormier K, Kubilus JK, Bogdanov M, Matson WR, Yang L, Jenkins BG, Luthi-Carter R, Kowall NW, Hersch SM, Beal MF, Ferrante RJ. Neuroprotective effects of synaptic modulation in Huntington's disease R6/2 mice. **J Neurosci.** **27** (2007):12908-15.

STACK EC, Smith KM, Ryu H, Cormier K, Chen M, Hagerty SW, Del Signore SJ, Cudkowicz ME, Friedlander RM, Ferrante RJ. Combination therapy using minocycline and coenzyme Q10 in R6/2 transgenic Huntington's disease mice. **Biochim Biophys Acta.** **1762** (2006):373-80.

STEFFAN JS, Agrawal N, Pallos J, Rockabrand E, Trotman LC, Slepko N, Illes K, Lukacsovich T, Zhu YZ, Cattaneo E, Pandolfi PP, Thompson LM, Marsh JL. SUMO modification of Huntingtin and Huntington's disease pathology. **Science.** **304** (2004):100-4.

STEFFAN JS, Bodai L, Pallos J, Poelman M, McCampbell A, Apostol BL, Kazantsev A, Schmidt E, Zhu YZ, Greenwald M, Kurokawa R, Housman DE, Jackson GR, Marsh JL, Thompson LM. Histone deacetylase inhibitors arrest polyglutamine-dependent neurodegeneration in *Drosophila*. **Nature.** **413** (2001):739-

43.

STEFFAN JS, Kazantsev A, Spasic-Boskovic O, Greenwald M, Zhu YZ, Gohler H, Wanker EE, Bates GP, Housman DE, Thompson LM. The Huntington's disease protein interacts with p53 and CREB-binding protein and represses transcription. **Proc Natl Acad Sci U S A.** **97** (2000):6763-8.

STINE OC, Pleasant N, Franz ML, Abbott MH, Folstein SE, Ross CA. Correlation between the onset age of Huntington's disease and length of the trinucleotide repeat in IT-15. **Hum Mol Genet.** **2** (1993):1547-9.

STRONG TV, Tagle DA, Valdes JM, Elmer LW, Boehm K, Swaroop M, Kaatz KW, Collins FS, Albin RL. Widespread expression of the human and rat Huntington's disease gene in brain and nonneural tissues. **Nat Genet.** **5** (1993):259-65.

SUGARS KL, Rubinsztein DC. Transcriptional abnormalities in Huntington disease. **Trends Genet.** **19**(2003):233-8.

SUN Y, Savanenin A, Reddy PH, Liu YF. Polyglutamine-expanded huntingtin promotes sensitization of N-methyl-D-aspartate receptors via post-synaptic density 95. **J Biol Chem.** **276** (2002):24713-8.

TABRIZI SJ, Cleeter MW, Xuereb J, Taanman JW, Cooper JM, Schapira AH. Biochemical abnormalities and excitotoxicity in Huntington's disease brain. **Ann Neurol.** **45** (1999):25-32.

TAHERZADEH-FARD E, Saft C, Andrich J, Wiczorek S, Arning L, PGC-1alpha as modifier of onset age in Huntington disease. **Mol Neurodegener.** (2009):10.

TAKANO H, Gusella JF. The predominantly HEAT-like motif structure of huntingtin and its association and coincident nuclear entry with dorsal, an NF- $\kappa$ B/Rel/dorsal family transcription factor. **BMC Neurosci.** **3** (2002):15.

TELENIUS H, Kremer B, Goldberg YP, Theilmann J, Andrew SE, Zeisler J, Adam S, Greenberg C, Ives EJ, Clarke LA. Somatic and gonadal mosaicism of the Huntington disease gene CAG repeat in brain and sperm. **Nat Genet.** **6** (1994):409-14.

TELENIUS H, Kremer HP, Theilmann J, Andrew SE, Almqvist E, Anvret M, Greenberg C, Greenberg J, Lucotte G, Squitieri F. Molecular analysis of juvenile Huntington disease: the major influence on (CAG) $n$  repeat length is the sex of the affected parent. **Hum Mol Genet.** **2** (1993):1535-40.

THOMAS LB, Gates DJ, Richfield EK, O'Brien TF, Schweitzer JB, Steindler DA. DNA end labeling (TUNEL) in Huntington's disease and other neuropathological conditions. **Exp Neurol.** **133** (1995); :265-72.

THOMAS M, Kalita A, Labrecque S, Pim D, Banks L, Matlashewski G. Two polymorphic variants of wild-type p53 differ biochemically and biologically. **Mol**

**Cell Biol.** **19** (1999):1092-100.

TOBIN AJ, Signer ER Huntington's disease: the challenge for cell biologists. **Trends Cell Biol.** **10** (2000):531-6.

van DELLEN A, Blakemore C, Deacon R, York D, Hannan AJ. Delaying the onset of Huntington's in mice. **Nature.** **404** (2000):721-2.

van DELLEN A, Deacon R, York D, Blakemore C, Hannan AJ. Anterior cingulate cortical transplantation in transgenic Huntington's disease mice. **Brain Res Bull.** **56** (2001):313-8.

van RAAMSDONK JM, Pearson J, Bailey CD, Rogers DA, Johnson GV, Hayden MR, Leavitt BR. Cystamine treatment is neuroprotective in the YAC128 mouse model of Huntington disease. **J Neurochem.** **95** (2005):210-20.

VOGELSTEIN B, Lane D, Levine AJ. Surfing the p53 network. **Nature.** **408** (2000):307-10.

VOUSDEN KH. p53: death star. **Cell.** **103** (2000):691-4.

VUILLAUME I, Vermersch P, Destée A, Petit H, Sablonnière B. Genetic polymorphisms adjacent to the CAG repeat influence clinical features at onset in Huntington's disease. **J Neurol Neurosurg Psychiatry.** **64** (1998):758-62

WAELTER S, Boeddrich A, Lurz R, Scherzinger E, Lueder G, Lehrach H, Wanker EE. Accumulation of mutant huntingtin fragments in aggresome-like inclusion bodies as a result of insufficient protein degradation. **Mol Biol Cell.** **12** (2001):1393-407.

WALKER FO. Huntington's disease. **Lancet.** **369** (2007) :218-28.

WANG X, Zhu S, Drozda M, Zhang W, Stavrovskaya IG, Cattaneo E, Ferrante RJ, Kristal BS, Friedlander RM. Minocycline inhibits caspase-independent and -dependent mitochondrial cell death pathways in models of Huntington's disease. **Proc Natl Acad Sci U S A.** **100** (2003):10483-7.

WARBY SC, Graham RK, Hayden MR, Huntington Disease in **GeneReviews**, son güncelleme, 2007

WATKINS WS, Bamshad M, Jorde LB. Population genetics of trinucleotide repeat polymorphisms. **Hum Mol Genet.** **4** (1995): 1485-91.

WAXMAN EA, Lynch DR. N-methyl-D-aspartate receptor subtypes: multiple roles in excitotoxicity and neurological disease. **Neuroscientist.** **11** (2005):37-49.

WELLINGTON CL, Ellerby LM, Hackam AS, Margolis RL, Trifiro MA, Singaraja R, McCutcheon K, Salvesen GS, Propp SS, Bromm M, Rowland KJ, Zhang T, Rasper D, Roy S, Thornberry N, Pinsky L, Kakizuka A, Ross CA, Nicholson DW, Bredesen DE, Hayden MR. Caspase cleavage of gene products associated with triplet

expansion disorders generates truncated fragments containing the polyglutamine tract. **J Biol Chem.** **273** (1998):9158-67.

WELLINGTON CL, Singaraja R, Ellerby L, Savill J, Roy S, Leavitt B, Cattaneo E, Hackam A, Sharp A, Thornberry N, Nicholson DW, Bredesen DE, Hayden MR. Inhibiting caspase cleavage of huntingtin reduces toxicity and aggregate formation in neuronal and nonneuronal cells. **J Biol Chem.** **275** (2000):19831-8.

WENT LN, Vegter-van der Vlis M, Bruyn GW. Parental transmission in Huntington's disease. **Lancet.** **1** (1984):1100-2.

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

WEXLER NS, Young AB, Tanzi RE, Travers H, Starosta-Rubinstein S, Penney JB, Snodgrass SR, Shoulson I, Gomez F, Ramos Arroyo MA. Homozygotes for Huntington's disease. **Nature.** **326** (1987):194-7.

WU J, Tang T, Bezprozvanny I. Evaluation of clinically relevant glutamate pathway inhibitors in in vitro model of Huntington's disease. **Neurosci Lett.** **407** (2006):219-23.

WYTTENBACH A, Carmichael J, Swartz J, Furlong RA, Narain Y, Rankin J, Rubinsztein DC. Effects of heat shock, heat shock protein 40 (HDJ-2), and proteasome inhibition on protein aggregation in cellular models of Huntington's disease. **Proc Natl Acad Sci U S A.** **97** (1999):2898-903.

XIA J, Lee DH, Taylor J, Vandelft M, Truant R. Huntingtin contains a highly conserved nuclear export signal. **Hum Mol Genet.** **12** (2003):1393-403.

YAMAMOTO A, Lucas JJ, Hen R. Reversal of neuropathology and motor dysfunction in a conditional model of Huntington's disease. **Cell.** **101** (2000):57-66.

YANG JL, Weissman L, Bohr VA, Mattson MP. Mitochondrial DNA damage and repair in neurodegenerative disorders. **DNA Repair (Amst).** **7** (2008):1110-20.

ZEITLIN S, Liu JP, Chapman DL, Papaioannou VE, Efstratiadis A. Increased apoptosis and early embryonic lethality in mice nullizygous for the Huntington's disease gene homologue. **Nat Genet.** **11** (1995):155-63.

ZENG W, Gillis T, Hakky M, Djoussé L, Myers RH, MacDonald ME, Gusella JF. Genetic analysis of the GRIK2 modifier effect in Huntington's disease. **BMC Neurosci.** 7 (2006):62.

ZERON MM, Chen N, Moshaver A, Lee AT, Wellington CL, Hayden MR, Raymond LA. Mutant huntingtin enhances excitotoxic cell death. **Mol Cell Neurosci.** 17 (2001):41-53.

### 7.3. İnternet kaynakları

EMRE M, Hanağası HA, Şahin, HA, Yazıcı J. Hareket bozuklukları. son güncelleme 2003, erişim: HYPERLINK "http://www.itfnoroloji.org/norodej/harboz.htm" <http://www.itfnoroloji.org/norodej/harboz.htm> 10.12.2008

REVILLA JF. eMedicine Specialties, Neurology, Movement and Neurodegenerative disorders, Huntington Disease Erişim: <http://emedicine.medscape.com/article/1150165-overview> (10.12.2008)

## 8. ÖZGEÇMİŞ

1983 yılında İstanbul'da doğan Aysun Açar, orta ve lise eğitimini İstanbul'da Sankt Georg Avusturya Lisesi'nde tamamladı.

Yüksek öğrenimini Haliç Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü'nde yapan Aysun Açar, üniversite öğrenimini 2006 yılında tamamladı.

Yüksek Lisans eğitimine Haliç Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü'nde devam etti.