

Huntington Hastalığı'nın Moleküler Biyolojisi

Nagehan Ersoy, A. Nazlı Başak

Boğaziçi Üniversitesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, İSTANBUL

ÖZET

Bugüne kadar bilinen dokuz poliglutamin tekrarı hastalığı arasında en yaygını Huntington Hastalığı'dır. Batı Avrupa'da görülme sıklığı yaklaşık 3-7/100 000'dir. Otozomal dominant geçiş gösteren Huntington Hastalığı, santral sinir sistemine özgü nörodejeneratif bir hastalık olup, istemsiz hareketler, motor koordinasyon bozukluğu, hafıza kaybı ve çeşitli psikiyatrik bozukluklar ile karakterize edilir. Hastalığın en belirgin patolojik özelliği, beyin bazal ganglia bölgesindeki selektif nöron ölümüdür. 1993 yılında 4. kromozoma lokalize edilen Huntington Hastalığı geni (IT-15), 180 kb uzunluğunda ve 67 eksondan oluşan büyük bir genidir. IT-15 geni, 348 kDa'luk, henüz işlevi bilinmeyen huntingtin proteinini kodlar. Huntington Hastalığı'na yol açan mutasyon, IT-15 geninin birinci eksonundaki CAG tekrarlarının sayısındaki artıştır. Huntington Hastalığı Çalışma Grubu, dört temel CAG tekrar kategorisi tanımlamıştır: Buna göre, IT-15 geninde 26 ve daha az tekrar taşıyan bireyler sağlıklıdır, 27-35 CAG tekrarı taşıyan aleller nesiller arası instabilite gösterebilir, 36-39 tekrar taşıyan bireylerin sadece bir bölümü hastalığa yakalanır, 40 ve üzeri CAG tekrarı taşıyan bireyler eğer uzun yaşarlarsa mutlaka Huntington Hastalığı'na yakalanırlar. Huntington Hastalığı'nın moleküler tanısı, 1993 yılından itibaren doğrudan mutasyon analizi ile mümkün olmaktadır. Bu yöntemle, IT-15 geninde CAG tekrar sayısı içeren bölge polimeraz zincir reaksiyonu ile çoğaltılır ve radyoaktif ya da radyoaktif olmayan yöntemlerle saf CAG tekrar sayısı tanımlanır. Hastalığa yol açan genetik mutasyon on sene önce belirlendiyse de, bu mutasyonun hangi moleküler mekanizma/ lar ile selektif nörodejenerasyona yol açtığı halen kesinlik kazanmamıştır. Mutant proteinin proteolizi ve agregasyonu, normal olmayan protein etkileşimleri ve transkripsiyonel

Anahtar Kelimeler: Huntington Hastalığı, poliglutamin hastalıkları, CAG tekrarı, nörodejenerasyon

Yazışma Adresi: Prof. Dr. A. Nazlı Başak

Boğaziçi Üniversitesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, 34342 Bebek İstanbul
Tel: 0212 359 66 79 Faks: 0212 287 24 68 basak@boun.edu.tr

Dergiye Ulaşma Tarihi/Received: 23.11.2004

Kesin Kabul Tarihi/Accepted: 24.11.2004

disregülasyon olası mekanizmalar arasındadır. Bunların kesinlik kazanmasının, Huntington Hastalığı ile aynı patojenik mekanizmaları paylaştığı düşünülen, bir dizi nörodejeneratif hastalığın tedavisine de ışık tutacağı beklenmektedir.

ABSTRACT

Molecular Biology of Huntington's Disease

Huntington's Disease (HD) is the most common among nine known polyglutamine disorders. Its prevalence is estimated to be 3-7/100 000 in populations of Western European descent. HD is an autosomal dominantly inherited neurodegenerative disorder of the central nervous system, characterized by involuntary movements, impaired motor coordination, cognitive loss and various psychiatric abnormalities. The most prominent pathological finding is the selective neuron death in basal ganglia. The disease gene (IT-15), localized to chromosome 4 in 1993 and 180kb long, is composed of 67 exons. The gene product is a 348 kDa protein, called huntingtin, whose function is not known yet. The mutation causing HD is the expansion of the CAG triplet repeat in the first exon of the IT-15 gene. Huntington's Disease Working Group has identified four repeat intervals: People who carry 26 or less CAG repeats in the IT-15 gene are healthy, alleles with 27-35 repeats may show intergenerational instability, people carrying 36-39 CAG repeats may or may not develop the disease, however 40 or more CAG repeats definitely cause HD, if people live long enough. The molecular diagnosis of HD with direct mutation analysis has been available since 1993. In this method, the CAG repeat region on the IT-15 gene is PCR-amplified, and the repeat number is determined using radioactive

Keywords: Huntington's Disease, polyglutamine diseases, CAG repeats, neurodegeneration

or non-radioactive methods. Although the genetic mutation leading to HD has been identified ten years ago, the underlying molecular mechanism leading to selective neurodegeneration is not clear yet. Proteolytic cleavage and aggregate formation of the mutant protein, aberrant protein interactions and transcriptional dysregulation are possible pathogenic mechanisms. The understanding of HD pathogenesis will enlighten the way to a cure for several other neurodegenerative disorders, which are thought to share a common mechanism.

KLİNİK ÖZELLİKLERİ

Huntington Hastalığı (HH) ilk kez 1872 yılında Dr. George Huntington tarafından, dominant geçişli, geç-başlangıçlı, progresif ve ölümcül bir hastalık olarak tanımlandı⁽¹⁾. Bu tanımlama, hastalığın halen kabul gören temel özelliklerini özetlemekle kalmadı, aynı zamanda hastalığa yol açan nörodejeneratif mekanizmayı aydınlatma yolunda her geçen gün ivmelenen araştırmalara yön verdi.

Başlangıçta Huntington Koresi olarak adlandırılan Huntington Hastalığı, otozomal dominant geçişli ve santral sinir sistemini etkileyen kronik bir nörodejeneratif hastalıktır⁽²⁾. Batı Avrupa kökenli topluluklarda görülme sıklığı 3-7/100 000'dir. Huntington Hastalığı geç-başlangıçlı bir hastalık olarak bilinir. Klinik semptomlar genellikle 30-40'lı yaşlarda ortaya çıkar ve 10-20 sene içinde ölümlü sonuçlanır. Bununla birlikte, olguların %10'u erken başlangıçlı olup (juvenil form) hastalık daha şiddetli ve çabuk seyreder⁽³⁾.

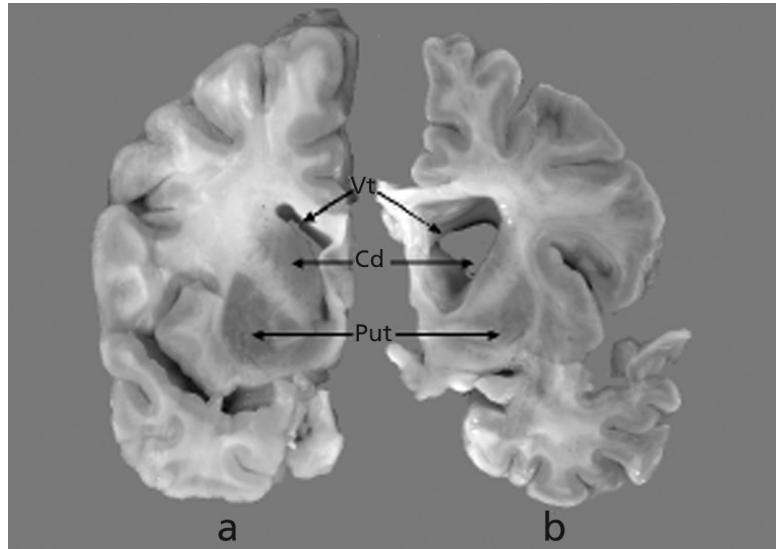
Huntington Hastalığı'nın en belirgin üç klinik özelliği, motor, psikiyatrik ve kognitif bozukluklardır. En çarpıcı motor bozukluk, ilk tanımlandığı yıllarda hastalığa adını veren kore (chorea)'dir. Kore formundaki istemsiz hareketler başlangıçta, proksimal ve distal ekstremitelerde düzensiz ve kısa amplitüdü olarak görülürken, hastalık ilerledikçe vücudun geneline yayılan, sürekli, şiddetli ve ani kasılmalara dönüşür⁽⁴⁾. Geç-başlangıçlı olgularda istemsiz hareketlerle birlikte, istemli hareketlerin koordinasyonunda da güçlük yaşanır. Diğer motor bulgular arasında düzensiz göz hareketleri, dizatri, ilerleyen evrelerde bradikinezi ve distoni sayılabilir. Hastalığın 20'li yaşlar ve daha öncesinde görülen juvenil formunda ise bradikinezi, distoni ve rijidite ön plana çıkar, kore hiç görülme-yebilir veya titreme ve epileptik nöbetler şeklinde olabilir⁽⁵⁾. Motor bozukluklardan daha önce ortaya çıkan fakat genellikle hastalık başlangıcını çağrıştırmayan davranış değişimleri, endişe, depresyon ve manik-depresif formunda duygulanım bozukluklarına Huntington Hastalığı'nda sıklıkla rastlanır ve bu durum hastanın yakın çevresi için büyük problem oluşturur. İleri evrelerde mental aktivitenin giderek yavaşlamasıyla başlayan kognitif bozukluklar, hastalık ilerledikçe çoğunlukla demansa yol açar⁽³⁾.

NÖROPATOLOJİK ÖZELLİKLERİ

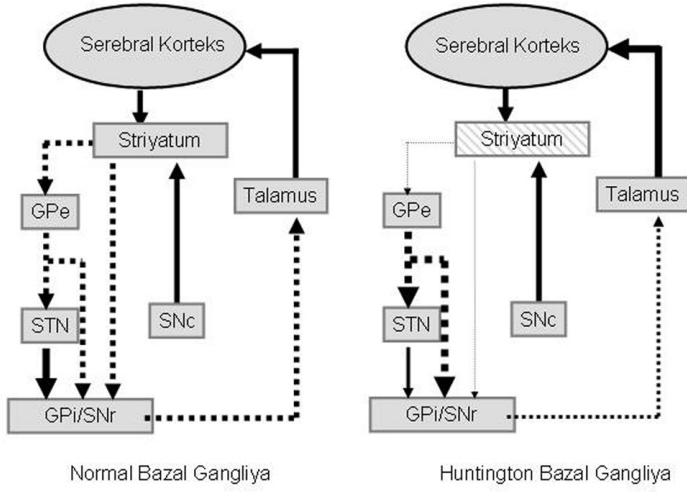
Huntington Hastalığı'nda beynin striatum bölgesine özgü nöron kaybı görülür. Substansiya nigra ve globus pallidus'a uzanan ve striatal nöronların %80'ini oluşturan GABA-erjik (gamma-amino-bütirik asit) orta boy dikensi projeksiyon nöronları, bu hastalıkta özgün olarak etkilenen nöron grubudur⁽⁶⁾. Hastalığın ilk klinik belirtileri, bu dikensi nöronlara lokalize olmuş striatal dopamin D1 ve D2 reseptörlerinin %30-40'ının kaybıyla açıklanabilir⁽⁷⁾. Huntington Hastalığı'nın son evrelerinde, yani kaudat-putamen nöronlarının %90'ından fazlası kaybedildiğinde ve striatumda atrofi ve gliyöz başladığında, serebral korteks, globus pallidus ve daha az oranda talamus, subtalamik çekirdek, akumbens çekirdeği, substansiya nigra, serebellum ve beyaz maddede de dejenerasyona rastlanabilir (Şekil 1)^(2,8). Ani ve kontrolsüz hareketler, vücut hareketlerinin kontrolünü sağlayan bazal gangliyatalamokorteks yollarındaki bozukluktan kaynaklanmaktadır (Şekil 2). Duygulanım bozuklukları ve kişilik değişimleri ise, özellikle prefrontal bölgedeki kortikal nöron disfonksiyonu ile ilişkilendirilebilir⁽⁹⁾.

BİYOKİMYASAL ÖZELLİKLERİ

PET (Pozitron Emisyon Tomografisi) ve NMR (Nükleer Manyetik Rezonans) teknolojileriyle yapılan araştırmalar, Huntington Hastalığı'nda enerji metabolizmasındaki değişimlerin gözardı edilemeyeceğini göstermiştir. Fakat bu değişimlerin hücreyi ölüme götüren nedenlerden biri mi, yoksa diğer defektlerin sonucu mu olduğu halen bilinmemektedir.



Şekil 1. Huntington hastası (b) ve aynı yaştaki (a) normal kontrole ait, fikse edilmiş serebral hemisferden koronal seviyede alınan rostral striyatam kesitleri. Kaudat çekirdek, putamen ve kortekste atrofi ve beyaz madde kaybı görülmektedir (Vt: lateral ventrikül, Cd: kaudat çekirdek, Put: Putamen)⁽²⁾.



Şekil 2. Sağlıklı hücrelerde ve Huntington Hastalığı patogenezinde bazal gangliya etkileşimleri. Düz çizgiler eksite edici, kesik çizgiler inhibe edici yolları, çizgilerin genişliği ise yolun göreceli aktivitesini göstermektedir (Gpe: Globus pallidus dış segmenti, Gpi: Globus pallidus iç segmenti, STN: subtalamik çekirdek, SNr: substansiya nigra pars retiküla, SNc: substansiya nigra pars kompakta)²

Huntington hastalarında bazal gangliya ve serebral kortekste glikoz metabolizmasının yavaşladığı saptanmıştır^(10,11). Kaudat hipometabolizması, hastaların bradikinezi, rijidite, demans ve işlevsel kapasitelerini ölçen klinik test skorlarındaki düşüşle paraleldir. Bununla birlikte, putaminal hipometabolizma, kore ve göz hareketlerindeki bozukluklar ile talamus hipometabolizması, hastada gözlemlenen distoni derecesiyle ilgilidir^(10,12). Daha çarpıcı diğer bir bulgu ise, Huntington Hastalığı'na yol açan genetik mutasyonu taşıyan bireylerin yaklaşık %50'sinin, belirtilerin başlangıcından yıllar önce metabolik değişimler göstermesidir^(13,14). Buna ek olarak, motor semptomlar henüz başlamadan, sadece psikolojik değişimler ve duygulanım bozukluklarından şikayet eden hastalarda, sıklıkla kortikal metabolizma değişikliklerine rastlanmıştır⁽¹⁰⁾.

Huntington hastalarında gözlemlenen glikoliz problemi, bazal gangliya ve oksipital kortekste artmış laktat üretiminin NMR ile görüntülenmesiyle desteklenmiştir^(15,16). Bununla birlikte, semptomatik bireylerde serebrospinal sıvıda pürüvat artışı ve kasta fosfokreatin/kreatin ve ATP/ fosfokreatin oranlarının azaldığı da saptanmıştır^(17,18).

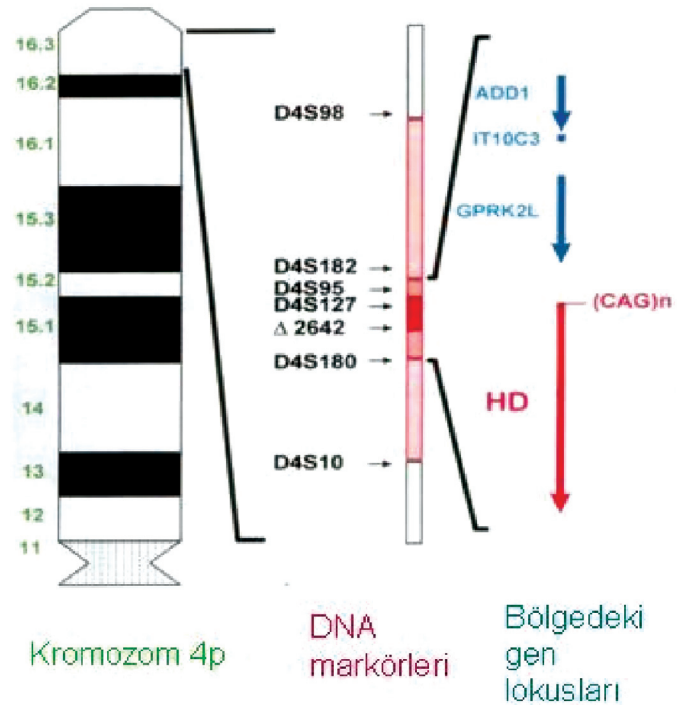
Postmortem hasta dokularında yapılan biyokimyasal analizler, etkilenen beyin bölgelerinde oksidatif fosforilasyon ve trikarboksilik asit döngüsünün önemli elemanlarının (pürüvat dehidrogenaz, kompleks II, III, IV, akonitaz) aktivitelerinin düştüğünü gösterir^(19,22). Huntington Hastalığı patogenezinde rolü olduğu düşünülen diğer bir metabolik enzim de GAPDH (Gliseralehit-tri-fosfat dehidrogenaz)'dir. GAPDH aktivitesi semptomatik bireylerde değişmezken, bu enzimin hücre içi lokalizasyonunun mutant huntingtin proteini varlığında

değiştirdiği gözlenmiştir⁽²³⁾.

GENETİK ÖZELLİKLERİ

1983 yılında, hastalığın tanımlanmasından bir yüzyıl sonra, Huntington geninin 4. kromozomda olduğu bağlantı analizi ile belirlenmiş⁽²⁴⁾ ve Huntington Hastalığı, DNA markörlerine bağlantı ile haritalanan ilk otozomal dominant geçişli hastalık olmuştur. Huntington Hastalığı'na yol açan mutasyonun tanımlanması ise, ABD ve İngiltere'deki altı laboratuvardan toplam 58 araştırmacının yoğun işbirliğine rağmen on sene sürmüştür. IT-15 adı verilen gen, 1993 yılında izole edilmiş ve hastalığa neden olan mutasyonun, bu gen üzerinde tekrar eden CAG nükleotidlerinin (nt) sayısındaki artış olduğu belirlenmiştir (Şekil 3)⁽²⁵⁾. Huntington Hastalığı'na özgü mutasyonun bulunması, moleküler biyolojideki dönüm noktalarından biri kabul edilir.

IT-15, 67 ekson ve 180 kb'den oluşan büyük bir genidir. Genin birinci eksonunda polimorfik CAG nt tekrarları bulunur. Bu tekrarları daha az polimorfik CCG dizileri izler; en sık görülen aleller 7, 10, 12 CCG'dir. Bazı bireylerde, kodon 2642'de delesyon (GAG) görülülebilir. Ancak, ne kodon delesyonu, ne de CCG dizileri hastalığa yol açar. Huntington Hastalığı'na sebep olan yegane mutasyon, genin birinci eksonundaki saf CAG tekrarlarının sayısının normalden fazla oluşudur. Bu gendeki CAG tekrarları



Şekil 3. Huntington Hastalığı geninin kromozom 4p16.3'e lokalizasyonu. Huntington Hastalığı 1983 yılında kromozom 4p'ye haritalandı ve bu bölge çeşitli DNA markörleriyle daraltılarak aday genler saptandı, 1993 yılında gen izole edildi ve hastalığa neden olan CAG tekrar mutasyonu belirlendi⁽¹⁰³⁾.

Tablo 1. Poliglutamin tekrarı hastalıklarında kodlanan proteinler ve normal ve patolojik CAG tekrar aralıkları (HD: Huntington Hastalığı, DRPLA: Dentatorubro Pallidoluysian Atrofi, SBMA: Spinobulbar Müsküler Atrofi, SCA: Spinocerebellar Ataksi, TBP: TATA-bağlayan protein, kDa: kilodalton)

Hastalık Adı	Protein	Proteinin büyüklüğü	Normal Aralık	İntermedya Aralık	Patolojik Aralık
HD	Huntingtin	348 kDa	6-35	36-39	40-121
DRPLA	Atrophin-1	190 kDa	3-36	36-49	49-88
SBMA	Androjen reseptör	99 kDa	11-38	—	38-62
SCA 1	Ataksin-1	87 kDa	6-39	39-41	41-83
SCA 2	Ataksin -2	140-150 kDa	14-32	32-34	34-77
SCA 3	Ataksin -3	48 kDa	12-40	40-62	62-86
SCA 6	α_{1A} -Ca ⁺⁺ kanalı	280 kDa	4-18	18-21	21-30
SCA 7	Ataksin -7	96 kDa	7-18	18-38	38->200
SCA 17	TBP	42 kDa	25-43	43-45	45-63

normal bireylerde de farklı sayılarda, yani polimorfik olmalarına rağmen, belli bir CAG eşik değerinin üzerinde hastalığa yol açarlar^(25,26).

Huntington Hastalığı, ilgili genlerin kodlayıcı bölgelerindeki CAG tekrar dizilerinin (CAG tripletleri) sayılarındaki artış ile ortaya çıkan, dokuz nörodejeneratif hastalıktan biridir. CAG tripletleri buldukları proteinde glutamin amino asitini (Gln veya Q) kodladığından dolayı, bu hastalıklar "Poliglutamin Hastalıkları (PoliGln veya PoliQ)" adı altında toplanır. Bugüne kadar tanımlanmış olan poliQ hastalıkları, kodladıkları proteinler ve normal ve patolojik CAG tekrar aralıkları Tablo 1'de özetlenmiştir. Poliglutamin hastalıkları, X-kromozomuna bağlı kalıtım gösteren SBMA (Spinal Bulbar Müsküler Atrofi) dışında, otozomal dominant geçişlidir, ve bir takım ortak özellikleri paylaşırlar: Polimorfik ve instabil CAG tekrarı, ebeveyn çelişkisi, yeni mutasyonlar, antisipasyon, ve tekrar sayısı ile hastalık başlangıç yaşı arasındaki ters orantı⁽²⁷⁾.

Polimorfik CAG tekrar sayısı: Bilinen dokuz poliglutamin hastalığında da normal ve patolojik tekrar aralıkları belirlenmiştir (Tablo 1). Tüm bu hastalık genlerindeki tekrar sayıları normal sınırların içinde ise birey sağlıklıdır; ancak tekrar sayıları her hastalığa özgü eşik değerini aştığında hastalığa neden olur⁽²⁷⁾.

İnstabilite: Polimorfik CAG tekrarları nesiller arası instabilite gösterir. Diğer bir deyişle, tekrarlar bir sonraki nesle aktarılırken sayıları artabilir, ya da azalabilir. İnstabilitenin moleküler mekanizması, DNA replikasyonu sırasında eski ve yeni oluşan DNA iplikçiklerinin birbiri ile tam örtüşmemesi ("replication slippage") ile açıklanabilir⁽²⁸⁾. Buna karşı, Huntington Hastalığı'nda somatik instabilite ancak bazı dokularda görülür. Lenfoblastlarda, koryon villüs ve beyin dışındaki somatik dokularda tekrar sayıları stabildir; ancak sperm ve santral sinir sisteminde mozaisizme rastlanır. İnstabilitenin en çok görüldüğü beyin bölgesi, bu hastalıkta özgün dejenerasyona uğrayan striyatumdur^(29,30).

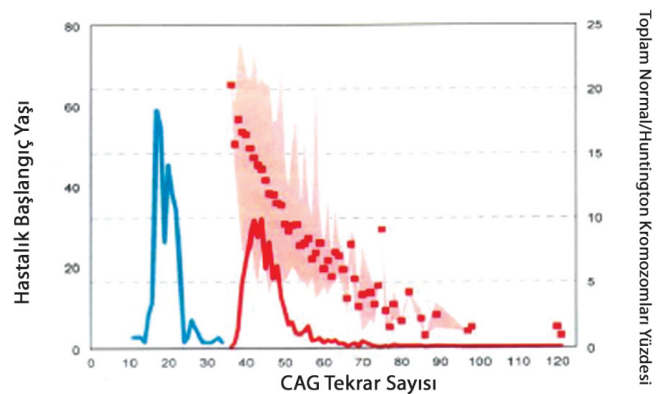
Yeni Mutasyon: Bir bireyin normal sayıdaki CAG tekrarları,

çocuklarına iletilirken artarak ve hastalık için gerekli olan eşik değerine ulaşarak hastalığa yol açabilir. Ailenin soygeçmişinde hastalık öyküsü olmamasına rağmen bireyde hastalık görüldüğü bu durum, yeni mutasyon olarak adlandırılır⁽³¹⁾.

Ebeveyn Çelişkisi: Bazı poliQ hastalıklarında CAG tekrarlarının artma ya da azalma eğilimi, aleli aktaran ebeveynin cinsiyetine bağlıdır, bu duruma ebeveyn çelişkisi adı verilir. Huntington Hastalığı'nda, özellikle babadan geçişte tekrar sayısının arttığı gözlemlenmiştir⁽³²⁾. Bu olay, erkekteki mayoz bölünme (spermatogenez) esnasındaki hatalardan kaynaklanıyor olabilir. Spermdeki mayotik instabilitenin, normalin üst sınırına yakın CAG tekrarı taşıyan aleller için daha fazla olduğu bilinmektedir. Anneden geçişte, tekrar sayısındaki değişim daha azdır (1-4 tekrar) ve hem azalma, hem de artma yönünde olabilir. Dolayısıyla, normal sayıda CAG tekrarı taşıyan aleller, sonraki nesle iletilirken sayıları artarak eşik değerine ulaşır hastalığa neden olabilirler; bu mutant alellerde daha da sıklıkla görülür. Ancak, hastalık alellerindeki tekrar sayılarının azalarak normal aralığa düştüğüne rastlanmamıştır.

Hastalık başlangıç yaşı: Tüm poliQ hastalıklarında ilgili genlerdeki CAG tekrar sayısı ve hastalık başlangıç yaşı ters orantılıdır (Şekil 4)⁽³³⁾. Diğer yandan, tekrar sayıları aynı olan bireylerde, aynı aileden olsalar bile, hastalık belirtileri farklı yaşlarda ortaya çıkabilir. Bu nedenle, CAG tekrar sayısı, hastalık başlangıç yaşını hesaplamak üzere kullanılamaz, sadece bir fikir verebilir. Huntington Hastalığı'nda genellikle, 40-50 CAG tekrarı olan bireylerde ilk hastalık belirtileri 30-50 yaşları arasında görülürken, juvenil olgularda tekrar sayısı ≥ 55 'tir⁽²⁾.

Antisipasyon: PoliQ hastalıklarının diğer bir ortak özelliği



Şekil 4. Normal (mavi) ve Huntington kromozomlarındaki (kırmızı) CAG tekrar sayısı, ve tekrar sayısı ile hastalık başlangıç yaşı arasındaki ilişki (kırmızı kutular)⁽¹⁰⁰⁾.

daha erken yaşlarda ortaya çıkar ve daha ağır seyreder. Huntington Hastalığı'nda özellikle babadan geçişte antisipasyon çok belirgindir⁽³²⁾.

HUNTINGTON HASTALIĞI'NDA GENOTİP-FENOTİP İLİŞKİSİ

IT-15 genindeki tekrar sayıları, "Huntington Hastalığı Genetik Test Çalışma Grubu" tarafından, ilişkilendirildikleri fenotiplere göre dört gruba ayrılmıştır (Şekil 5)⁽³⁴⁾:

Normal Alel: 26 ve daha az CAG tekrarı taşıyan aleller hiçbir şekilde Huntington Hastalığı ile bağlantılı değildir. Bu alellerin sonraki nesillerde uzayarak hastalığa yol açtığı durumlara da rastlanmamıştır.

Mayotik İstabilite Aralığı: IT-15 geninde 27-35 CAG tekrarı bulunan bireylerin kendileri Huntington Hastalığı'na yakalanmazlar, ancak bu alellerin mayotik instabilite göstererek bir sonraki nesilde sayılarının arttığı ve Huntington Hastalığı'na yol açtığı saptanmıştır⁽³⁵⁾. Örneğin, 38 CAG tekrarlı bir Huntington hastası olan ve soygeçmişinde hastalık öyküsü bulunmayan bir bireye, bu alelin sağlıklı ve IT-15 geninde 27 CAG tekrar taşıyan babası tarafından kalıtıldığı belirlenmiştir⁽³⁶⁾.

Azalmış Penetrans Aralığı (İntermedya Aralık): 36-39 CAG tekrarı taşıyan bireylerin sadece bir kısmı Huntington Hastalığı'na yakalanmaktadır; yani, bu aralıktaki tekrarlar tam penetrans göstermezler⁽³⁷⁾. Bununla birlikte, bu aralık içinde artan her tekrara karşı, penetrans da artar. Mutasyonu taşıyan bireylerin bir bölümü hastalık fenotipi göstermezlerse, bu durum ilgili genin azalmış penetransı olarak adlandırılır. Diğer yandan, hastalık başlangıcı sıklıkla geç ve bir hayli değişken olduğundan dolayı penetrans yaşa bağlıdır denilebilir. Sonuç olarak azalmış penetrans, mutasyonu kalıtan ve beklenen yaşam sürecini tamamlayan, fakat hastalık belirtilerini göstermeyen bireyler için kullanılmalıdır. Azalmış penetrans, mutant gen ekspresyonunda ekstrem

bir noktadır; bu, farklı genetik altyapı ve çevresel faktörlerin, aynı tip mutasyonun ifade edilmesindeki rolünü ortaya koyan açık bir kanıttır⁽³⁸⁾.

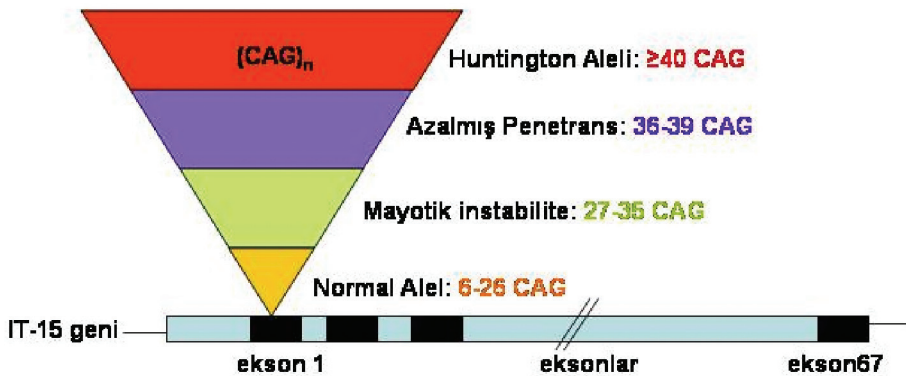
Huntington Hastalığı: 40 ve üzeri CAG tekrarı taşıyan bireyler, eğer daha evvel beklenmedik bir sebepten yaşamlarını kaybetmemişlerse, mutlaka Huntington Hastalığı'na yakalanırlar. Bu mutasyonu taşıyan bireylerin çocuklarına hastalığı kalıtma olasılığı % 50'dir.

HUNTINGTON HASTALIĞI'NIN MOLEKÜLER TANISI

Huntington Hastalığı'na yol açan mutasyonun belirlenmesi, hastalığın moleküler tanısını çok kolaylaştırmış, ve bu konuda belirlenen etik kuralların diğer otozomal dominant geçişli hastalıklara da uygulanmasını sağlamıştır. Mutasyonun bulunmasından önce bağlantı analizi yöntemiyle yapılan moleküler tanı, 1993 yılından beri doğrudan mutasyon analizi ile mümkündür.

Doğrudan mutasyon analizinde, IT-15 geninde CAG tekrar sayısı içeren bölge polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile çoğaltılır ve Southern Blot ya da radyoaktif olmayan yöntemlerle saf CAG tekrar sayısı tanımlanır⁽³⁴⁾. En güncel olan yöntemler; %6-8'lik denatüre edici poliakrilamid gel elektroforezi ya da floresan PCR'ların dizileme sisteminde direkt analizidir.

Huntington ve diğer poliQ hastalıklarının moleküler tanıları, bu hastalıklara tek tip bir mutasyonun (CAG tekrarı) neden olması dolayısıyla nisbeten kolaydır; ancak bu geç-başlangıçlı, dominant geçişli ve henüz tedavisi olmayan hastalıklarda genetik danışma çok önemlidir. Olumlu, ya da olumsuz, test sonucunun bireyin ve ailesinin yaşamını ne yönde etkileyeceği, moleküler testten önce detaylı olarak, birkaç seans halinde, tartışılmalıdır. Test sonucunun, ailenin test yaptırmamış presemptomatik/semptomatik bireylerini de etkileyebileceği özellikle vurgulanmalıdır. Presemptomatik tanı testlerinde, tanı öncesi belirli aralıklarla mutlaka genetik danışma verilmelidir. Yeterli genetik danışma almamış ve bu konuda bilinçlenmemiş bireylere, moleküler tanı verilmemesi, tanı merkezlerinin uyması gereken kuralların başında gelir. Moleküler tanı testi yaptırma kararını kişinin kendisi, hiçbir baskı altında kalmaksızın vermelidir. Uluslararası belirlenmiş etik kurallar çerçevesinde, test sonuçları, kişinin yazılı izni olmaksızın üçüncü kişilerle paylaşılmaz, posta ile ya da telefonda verilmez, kişinin kendisiyle ve partneriyle (ya da en güven duyduğu



Şekil 5. IT-15 geni ve CAG tekrar sayısı - fenotip ilişkisi⁽³⁴⁾.

kişiyile) karşılıklı görüşmede açıklanır. Etik kurallar gereği, 18 yaşından küçükler molekül test uygulanmaz⁽³⁹⁾.

HUNTINGTON HASTALIĞI'NA BENZER HASTALIKLAR

Benzer klinik semptomları ve/veya patolojik özellikleri sebebiyle Huntington Hastalığı'nı taklit eden birkaç hastalık, bazen yanlış klinik tanı koyulmasına sebep olabilir. Huntington Hastalığı'na klinik açıdan çok benzeyen hastalıklardan ilki, yine poliQ hastalıklarından biri olan DRPLA'dır. Klinik açıdan Huntington Hastalığı tanısı almış, fakat mutasyonu taşımayan bireylerin, özellikle DRPLA'nın sık görüldüğü toplumlarda (örneğin Japonya), DRPLA için genetik incelemeye alınması önerilir. Klinik olarak, önce Huntington Hastalığı ile bağdaştırılan, fakat daha sonra başka genlerdeki mutasyonların sorumlu olduğu saptanan hastalıklar HDL1 ("Huntington Disease-Like 1"), HDL2 ("Huntington Disease-Like 2") ve HDL3 ("Huntington Disease-Like 3")'tür. HDL1'in, kromozom 20p12'ye haritalanmış prion proteini genindeki (PrP) toplam 192 bazlık sekiz adet oktapeptid insersiyonuyla segregе olduğu bulunmuştur⁽⁴⁰⁾. HDL2'ye sebep olan mutasyon ise, JPH3 ("junctophilin-3") genindeki CTG tekrar artışıdır. HDL2 lokusundaki bu mutasyon, etiyojisi bilinmeyen Huntington olgularının %2'sini açıklayabilmektedir⁽⁴¹⁾. Otozomal resesif geçiş gösteren HDL-3 ise 4p15.3'e haritalanmıştır⁽⁴²⁾. İlginç bir başka nokta da, varyant Creutzfeld-Jacob Hastalığı (vCJD) olgularından birinin IT-15 geninde intermedya sayıda CAG tekrar sayısı olduğunun saptanmasıdır. Bu da, intermedya sayıda (36-39 CAG) tekrar taşıyan bireylerin vCJD'ye yakalanma risklerinin sorgulanmasına yol açmıştır fakat bu konu henüz kesinlik kazanmamıştır^(2, 43). Son olarak, farklı ailelerden beş kişide görülen ve hareket bozukluğu ve beyinde ferritin ve demir birikimi ile karakterize edilen, geç-başlangıçlı bir bazal gangliya hastalığına CAG mutasyonunun değil, ferritin hafif zincirindeki bir insersiyonun sebep olduğu gösterilmiştir⁽⁴⁴⁾. Dolayısıyla, ender rastlanan birkaç genetik hastalık, klinik olarak Huntington Hastalığı'nı taklit edebilir, fakat farklı genlerdeki mutasyonlardan kaynaklanıyor olabilir. Bununla birlikte, klinik olarak kesinlikle Huntington tanısı almış, fakat genetik açıdan bu hastalık mutasyonunu taşımayan ve diğer genlerdeki mutasyonlarla da henüz açıklanamayan olgular (fenokopi) da mevcuttur.

HUNTINGTON HASTALIĞININ MOLEKÜLER PATOLOJİSİ

Huntingtin Proteini

IT-15 geninin kodladığı "huntingtin" (htt) proteini, glutamin tekrar sayısına bağlı olmak kaydıyla, ortalama olarak 3144

amino asitten oluşan 348 kilodalton (kDa)'luk büyük bir proteindir⁽²⁵⁾. On sekizinci amino asitten başlayan poliQ dizisini, poliprolin (poliP) tekrarları takip eder. Proteindeki yaklaşık 40 amino asitlik ve ilk kez tanımlandığı proteinlerin baş harflerinden adını alan üç HEAT tekrarı (Huntingtin, Elongation factor 2, regulatory A subunit of the protein phosphase 2A, TOR1), huntingtin'in hücre-içi protein etkileşimlerinde rol oynamaktadır (Şekil 6)⁽⁴⁵⁾.

Huntingtin'in diğer proteinlerle yapısal bir homolojisi olmadığı için, işlevini belirlemek oldukça zordur ve bu proteinin işlevi hakkında bilinenler, çok yoğun araştırmalara rağmen birkaç ip ucunun ötesine geçememiştir. Huntington geninin inaktive edildiği knock-out farelerin yaşama bağdaşmaması, bu



Şekil 6. Huntingtin proteininin yapısı (Qn: poliglutamin tekrarı, Pro: prolin açısından zengin bölge)⁽²⁾.

proteinin embriyo gelişiminde önemli bir işlevi olduğunu düşündürmektedir⁽⁴⁶⁾. Bu fenotipin sadece mutant protein ekspresyonu ile yeniden kazanılıyor olması da, patojenik tekrarlara rağmen, huntingtin proteininin normal işlevini bir ölçüde koruduğunu gösterir⁽⁴⁷⁾. Diğer çalışmalar da huntingtin'in gelişimsel apoptoz, nörogenez ve hücre-içi trafficking mekanizmalarındaki olası rollerine dikkat çeker^(47,48). Bunlarla birlikte, hücrelerdeki huntingtin seviyesi de önem taşımaktadır, çok az miktarda huntingtin proteini üreten mutant farelerin gelişim anomalisi gösterdikleri kanıtlanmıştır⁽⁴⁹⁾. Huntingtin'in hücrelerde mikrotübül, vesikül ve sinaptik yapılarla ko-lokalize olması, bu proteinin hücre-içi transportta ve nörotransmisyonunda rolü olduğunu düşündürür⁽⁵⁰⁾.

Mutant PoliQ Proteinlerinin Özellikleri ve Olası Nörodejeneratif Mekanizmalar

PoliQ proteinleri tüm hücre ve dokularda yaygın olarak sentezlenirler, fakat sadece merkezi sinir sisteminde selektif nörodejenerasyona sebep olurlar. Nörodejenerasyonun moleküler mekanizması henüz tam olarak açığa kavuşmadıysa da, mutant poliQ proteinlerinin özellikleri patojenez mekanizması hakkında ipuçları verir.

PoliQ mutasyonunun ilk etkisi, mutant protein konformasyonunun değişimidir; yeni konformasyonun, mutant proteinlere toksik işlev kazandırdığı artık kabul görmüştür. Mutant poliQ proteinleri parçalanarak

agregasyona ve inklüzyon cisimciklerinin oluşmasına yol açar. Bu nedenle poliQ hastalıkları, Alzheimer Hastalığı (AD), Parkinson Hastalığı (PD), Creutzfeld-Jacob Hastalığı (CJD) ve Amiyotrofik Lateral Skleroz (ALS) gibi mutant proteinlerin neden olduğu "proteinopatiler" grubuna dahildir. Tüm bu hastalıklarda mutasyonlar, mutant protein birikimine ve toksisiteye yol açarlar. Übikitin (Ub) ile markalanmış poliQ agregatları, proteinlerin poliQ içeren toksik parçalarıyla birlikte, şaperonlar, proteozomlar ve çeşitli transkripsiyon faktörleri (TF) de içerirler. Bu özelliklerden yola çıkarak, mutant proteinlerin farklı konformasyonlarda farklı protein etkileşimlerine, transkripsiyon bozukluklarına, Ub-proteozom sisteminde (UPP) aksaklıklara yol açarak hücre ölümüne neden olduğu söylenebilir.

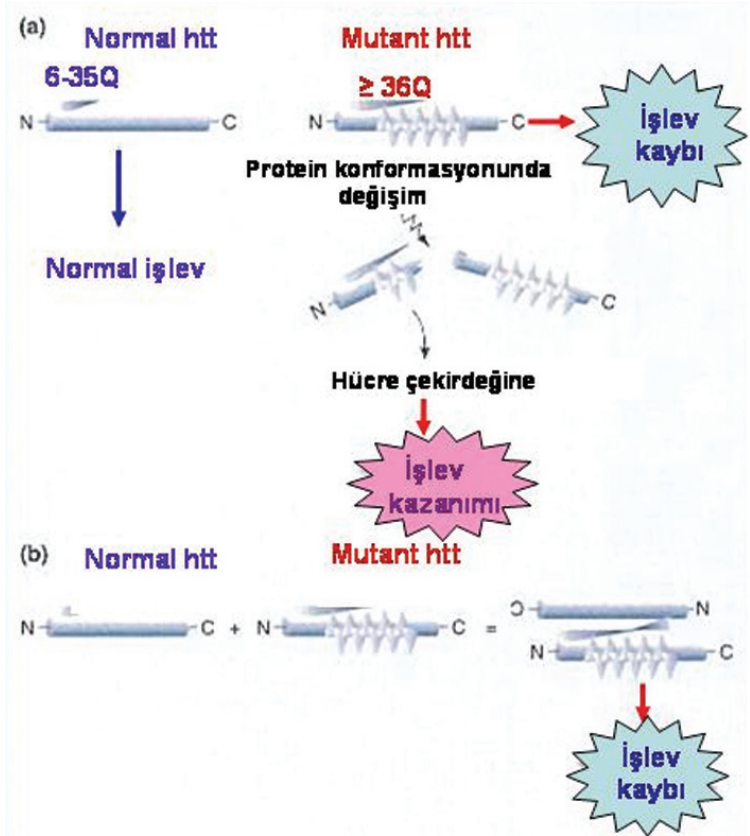
Toksisite Mekanizmaları: Toksik İşlev Kazanımı ve İşlev Kaybı

PoliQ hastalıklarının altında yatan moleküler mekanizma önceleri sadece mutant proteinin toksik işlev kazanımı modeli ile açıklandıysa da, yakın zamandaki çalışmalar, toksik işlev kazanımının yanısıra, normal proteinin işlev kaybının da bu mekanizmada rolü olduğuna işaret etmektedir.

Mutant poliQ proteinlerinin toksik işlev kazanımı hipotezi, hipoksantin fosforibozil transferaz (HPRT) genine 146 CAG tekrarı eklenen bir fare modeliyle gösterilmiştir. PoliQ hastalıklarıyla hiçbir ilişkisi olmayan bu gene CAG tekrarlarının eklenmesi, farelerde geç-başlangıçlı nörolojik fenotipe ve prematür ölüme yol açmıştır⁽⁵¹⁾. Buna ek olarak, hücrelerde yeşil floresan proteine (GFP) bağlanarak sentezlenen poliQ dizilerinin de hücre ölümünü tetiklediğinin belirlenmesi⁽⁵²⁾, poliQ tekrarlarının hücrelerde genel anlamda toksisite yaratmaya yeterli olduğunu açıklar. İnsanlarda normal IT-15 geninin heterozigot inaktivasyonunun Huntington Hastalığı fenotipine yol açmaması^(53,54) ve sadece tek kopya işlevsel geni olan farelerin Huntington Hastalığı özellikleri gösterme-meleri⁽⁵⁵⁾, poliQ patogenezinin, uzamış glutamin dizisinin proteinlere kazandırdığı toksik bir işlevin sonucu olduğunun göstergesidir.

Ancak, mutant huntingtin ve diğer poliQ proteinlerinin toksik işlev kazanımının sonucu olarak, hücrelerdeki normal proteinin işlevinin kaybedilmesi de olası mekanizmalar arasındadır⁽⁵⁶⁾. PoliQ agregatları, mutant proteinleri bulunmaları gereken yerlerden uzaklaştırarak hücre işlevlerinin yitirilmesine, ya da haplo-yetersizliğe sebep olabilirler. Bununla birlikte, normal proteinler mutant formlarıyla etkileşimde bulunup işlevlerini yerine getiremeyebilirler. Fakat genetik bulgular, poliQ

patogenezinde bu çeşit basit bir dominant negatif işlev kaybı, ya da haplo-yetersizlik olmadığı yönündedir⁽⁵⁶⁾. Buna rağmen işlev kaybı, patojenik mekanizmaya dolaylı olarak etki ediyor olabilir. Normal huntingtin'in apoptotik hücre ölümünü durdurması, BDNF ("Brain Derived Neurotrophic Factor") üretimini tetiklemesi ve nöron yaşamını uzatması, bu konuda alınan en dikkat çekici sonuçlardır. Apoptotik nöronlar mutant huntingtin sentezleyen transgenik hayvan modellerinde ve Huntington beyinlerinin striyatum ve korteks bölgelerinde gösterilmiş, bu bölgelerde BDNF seviyelerinin azaldığı görülmüştür⁽⁵⁷⁾. Tüm bunlar normal huntingtin fonksiyonunun kaybının nörodejenerasyonda etkisi olduğunu düşündürmektedir. Huntington Hastalığı'nda ve büyük olasılıkla diğer poliQ hastalıklarında işlev kazanma / işlev kaybetme mekanizmaları aynı anda etkin olabilir (Şekil 7).



Şekil 7. Huntington hastalığı'nda olası hücre ölüm mekanizmaları. Mutant huntingtin'in kesilmesi, proteinin poliQ taşıyan N-terminal parçasının hücre çekirdeğine girmesine ve toksik aktivitenin artmasına sebep olur (a). Aynı zamanda mutant proteindeki artmış poliQ dizileri direkt olarak (a), ya da normal proteinin fonksiyonunu engellemek yoluyla indirekt olarak (b) işlev kaybına neden olur⁽⁵⁶⁾.

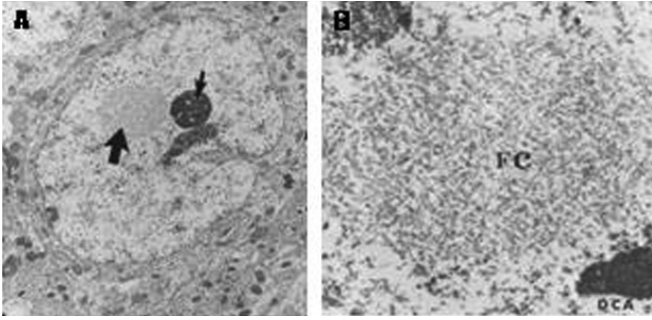
Mutant PoliQ Proteinlerinde Konformasyon Değişimi

Huntington Hastalığı ve diğer poliQ hastalıklarında, uzamış poliQ dizilerinin mutant protein konformasyonuna etkisini açıklamak üzere iki model geliştirilmiştir. *Transglutaminaz hipotezi*, poliQ dizilerinin transglutaminaz enzimi için substrat olduğunu ve glutamin amino asitlerinin, aynı ya

da farklı poliQ proteinlerindeki lizin amino asitleriyle izopeptid bağları oluşturabileceğini söyler⁽⁵⁸⁾. Mutant poliQ proteinleri transglutaminaz aktivitesini arttırarak agregasyona yol açar. Perutz'un *Polar Zipper* modeline göre, CAG tekrar sayısı eşik değerini aşınca, mutant protein kendi içinde, ya da glutamin tekrarlı diğer bir molekülle kovalent olmayan bir etkileşime girip, kıvrımlı tabaka (" *β -pleated sheet*") şeklinde bir ikincil yapı oluşturarak, çökebilir⁽⁵⁹⁾. In vitro ve Huntington beyinlerinde görülen agregatlardaki proteinlerin -kıvrımlı tabaka yapısında oldukları kanıtlanmıştır⁽⁶⁰⁾.

Mutant Protein Agregasyonu

Artmış sayıda glutamin tekrarı içeren proteinlerin agregasyon eğilimleri, ilk kez 1997 yılında huntingtin proteini ile gösterilmiştir. Normal sayıda glutamin tekrarı içeren huntingtin'in N-terminal ucu hücrelerde çözünebilir olmasına rağmen, mutant formunun -kıvrımlı tabaka yapısında çökmesi⁽⁶⁰⁾, *Polar Zipper* modelinin bir kanıtı olmuştur. Mutant huntingtin proteininin, nöron sitoplazmasında, perinükleer bölgede ve çekirdekte inklüzyonlar (NII-"*neuronal intranuclear inclusion*") oluşturduğu gösterilmiştir (Şekil 8). Geç-başlangıçlı olguların postmortem analizinde daha az



Şekil 8. Transgenik Huntington faresi striyatal nöronunda(A) ve bir post-mortem Huntington striyatal biyopsisinde(B) görülen çekirdek-içi inklüzyonlar (FC: filamentler ve ince granüller, DCA: yoğun kromatin agregatları)⁽²⁾.

nükleer, fakat daha çok sitoplazmik inklüzyon ve distrofik nöritler görülmesi, NII'ların yanı sıra, sitoplazmik agregatların da nöron disfonksiyonu ve toksisitesinde rol oynayabileceğini düşündürür⁽⁶¹⁾. Nöron uzantılarına lokalize olan agregatlar, aksonal nakli bloke ederek ve aksonal dejenerasyona sebep olarak nöron işlevini bozabilir⁽⁶²⁾.

Huntington geninde 113-156 CAG tekrarı taşıyan transgenik farelerde progresif nörolojik belirtiler, ve kortikal ve striyatal nöronlarda agregat oluşumu gözlenmiş ve inklüzyon oluşumu hücre ölümü ile bağdaşmıştır^(63,64). Ayrıca, inklüzyon formasyonu sıcak şok proteini ("*heat-shock protein*") HDJ1 ile engellendiğinde, in vitro hücre ölümünün azaldığı görülmüştür⁽⁶⁵⁾. Buna karşı, agregat oluşumu engellendiğinde, hücre ölümünün arttığına dair bulgular da vardır⁽⁶⁶⁾.

Agregasyonun Huntington Hastalığı ve diğer poliQ hastalıkları patogenezindeki rolü halen tartışmalıdır.

Agregatlar hücre-için toksik, koruyucu, ya da sadece bir yan ürün olabilir⁽⁶²⁾. Agregatların hücre ölümüyle bağdaştırıldığı çalışmalara dayanarak, poliQ agregatlarının toksik etki yarattığı kanısına varılabilir. Agregatlar mutant proteinlerin yanı sıra, etkileşime girdikleri diğer proteinleri ve transkripsiyon faktörlerini, şaperon, proteozom gibi çok çeşitli proteinleri de barındırırlar. Mutant proteinlerin poliQ bölgesi dışındaki bölgeleriyle etkileşimde bulunan proteinler de agregatlara dağılılabılır. PoliQ proteinleri, poliQ dizisi dışında birbirlerinden oldukça farklı olduğundan dolayı, ilgili agregatlara çok değişik protein grupları dahil olabilir. Bu da, değişik hastalıklarda farklı işlevlerin etkilenmesine ve farklı fenotiplere sebep olabilir. Hücrelerde bulunmaları gereken yerlerden uzaklaştırılan proteinler kendi işlevlerini yerine getiremeyip toksisiteye sebep olabilirler. Ancak, poliQ agregatlarının, poliQ proteinlerinin diğer hücre bileşikleriyle etkileşimini engelleyerek, poliQ toksisitesine karşı koruyucu olduğu da düşünülebilir. Ya da, agregatlar patolojik sürecin doğal bir yan ürünü olabilir. Her ne kadar agregasyon ve toksisite arasındaki bağlantı tam olarak çözülemediyse de, agregatların patolojik bir markör olduğu netleşmiştir.

Mutant PoliQ Proteinlerinin Proteolizi

Hücre kültürü, hayvan modelleri ve post-mortem analizler, poliQ proteinlerinin yıkıma (proteoliz) uğradığına işaret etmektedir⁽⁶⁷⁾. Huntingtin'in yıkımı, hücre kültürü düzeyinde, hayvan modelleriyle ve insan dokusu çalışmaları ile kanıtlanmıştır. PoliQ proteinlerinin parçalanmasında rol oynayan protein-spesifik enzimler, kaspazlar ve kalpainlerdir⁽⁶⁸⁾.

Kalpainler, kalsiyumla aktive olan sistein proteazlardır, sinir sisteminde proenzim heterodimer olarak bulunurlar⁽⁶⁸⁾. Kalpain aktivasyonu, kalpain inhibitörü olan kalpastatin'in kaspazlar tarafından kesilmesi ile gerçekleşir. Huntingtin'in kesilmesinde kalpain I, II ve m'nin görev aldığı gösterilmiştir. Kalpain kesim bölgeleri 535-537 ve 468-470 amino asitleri arasındadır ve mutant huntingtin kalpainler tarafından daha kolay kesilmektedir. Mutant huntingtin'in kalpain ile kesilmesi engellendiğinde, huntingtin agregatları ve toksisitenin azaldığı görülmüştür⁽⁶⁹⁾.

Kaspazlar, apoptoz ve enflamasyonda rol oynayan bir grup aspartat-özü sistein proteazlarıdır. Hücrelerde inaktif proenzim şeklinde bulunurlar, ve otoaktivasyonla ya da başka bir kaspaz tarafından kesilerek aktive edilirler⁽⁷⁰⁾. Apoptozun çeşitli kademelerinde farklı kaspazlar aktive olurlar. Kaspaz 8, 9 ve 10 apoptozun başlangıcında, kaspaz 3, 6 ve 7 apoptozun yönlendirilmesinde görev yapar. Kaspaz 8 ve 9 aktive olduğunda, kaspaz 3, 6, ve 7'yi aktive edebilir⁽⁷¹⁾. Kaspazların Huntington Hastalığı patogenezinde rol oynadığı, çeşitli deneylerle gösterilmiştir. Huntingtin

proteininde kaspaz 2, 3, 6 ve 7 için kesim bölgeleri tanımlanmıştır; mutant huntingtin'in kaspaz 8'i aktive ettiği, kaspaz 3 ve 9 aktivasyonunu arttırdığı ve kaspaz inhibitörlerinin, mutant huntingtin'in sebep olduğu, hücre ölümünü durdurduğu, hücre kültürü ve transgenik hayvan modellerinde gösterilmiştir⁽⁷¹⁾. Huntingtin'in poliQ dizisi içeren N-terminal kısmı, hücreler için daha toksiktir. N-terminal protein fragmanları kaspazları daha çok aktive eder, bu da daha çok toksik fragman oluşumunu tetikler ve bu döngü içine giren hücreler apoptoza uğrar^(72,73). Huntingtin'in kaspaz 1, 3 ve 6 ile kesilmesi engellendiğinde, hücrelerde apoptotik ölüm oranının azaldığı gözlemlenmiştir⁽⁷⁴⁾.

PoliQ hastalıklarındaki özgün patolojiyi açıklamayı hedefleyen modellerden biri, mutant proteinlerin, etkilenen beyin bölgesine özgü yıkımıdır. Dokuya özgü proteoliz birkaç yolla olabilir: Her normal poliQ proteini, her hastalıkta etkilenen beyin bölgelerine özgü proteazlar tarafından kesilebilir ve mutant proteinler söz konusu olduğunda proteoliz artabilir. Diğer yandan, artmış poliQ dizisi proteine yeni bir konformasyon kazandırırken, aynı zamanda korunmuş protein bölgelerinin yeni proteazlar tarafından tanınmasına sebep olabilir. Yeni toksik fragmanların oluşumu, ya da proteoliz artışı ile toksik fragmanın fazla miktarda oluşması, gözlemlenen bölgesel patolojiye sebep olabilir. Ancak bu kriterlere uygun proteazlar bulunmadığı gibi, kaspaz ve kalpainler tüm hücrelerde yaygın olarak sentezlenirler. Buna rağmen, dokuya özgü proteoliz Huntington Hastalığı'nda gösterilmiştir. Sağlıklı kontrol ve Huntington beyinlerinde farklılık olmaksızın, striyatum ve kortekste dokuya özgü proteoliz saptanmıştır⁽⁷⁵⁾.

Şaperonların ve Übikitin-Proteozom Sisteminin Rolü

Uzun poliQ tekrarı içeren proteinler, yapılarındaki değişiklik nedeniyle farklı bir konformasyon kazanırlar ve yanlış katlanma sonucu degradasyona direnç göstererek hücrede protein birikimine neden olurlar. Hücrelerde proteinlerin katlanmasına yardım eden ve yanlış katlanmış proteinlerin tanınması ve düzeltilmesinde görevli şaperonlar mevcuttur. Bunlardan HSP70 ve HSP40, hücre modellerinde oluşan agregatlarda saptanmıştır. HSP40 ve HSP70 şaperonları normalden fazla sentezlendiğinde agregatların azaldığı, ve bazı durumlarda poliQ toksisitesini baskıladığı gösterilmiştir⁽⁷⁶⁾. Şaperonlar, protein katlanması dışında übikitin-proteozom sisteminin (UPP) proteinleri degrade etmesine de yardım ederler. Şaperonların koruyucu etkileri, yanlış katlanmış proteinlerin apoptotik programı tetiklemesini, ya da protein degradasyon mekanizmalarının tıkanmasını engelleme yoluyla olabilir⁽⁷⁷⁾.

Doğru katlanmamış proteinler hücrelerde übikitin ile markalanır ve degradasyon için proteozomlara yönlendirilir.

Huntington beyinlerinde ve hücre modellerinde görülen intranükleer inklüzyonlar da übikitin (Ub) ile işaretlenmiştir ve proteozomları barındırır^(71,78). Proteinlerdeki poliQ bölgeleri, Ub ile markalanma aşamasında ya da markalanmayı takip eden proteoliz aşamasında protein yıkımını engelleyebilir. Agregatlardaki mutant proteinlerin Ub ile markalanmış olarak bulunması, markalanma aşamasının normal işlediğini gösterir, ancak Ub zincirinin uzunluğu da degradasyon sinyalinin tam olarak işlenmesi için önemlidir. Bununla birlikte, poliQ dizilerine bağlanan birçok proteinin ubiquitin-proteozom reaksiyon şelalesinin bir üyesi olduğu bilinmektedir. AD, PD gibi birçok nörodejeneratif hastalığın da, Ub ile markalanmış mutant protein agregasyonu ile paralellik göstermesi, protein ya da peptid yıkımındaki bozuklukların tüm bu hastalıklara sebep olabileceğine işaret etmektedir⁽⁷⁹⁾. Sonuç olarak poliQ ve diğer birçok nörodejeneratif hastalığın ortak özelliklerinden biri, mutant proteinlerin degradasyonunun zorlaşması, ya da UPP'nin tıkanması sonucu ortaya çıkan hatalı proteoliz olarak kabul edilebilir. Diğer yandan, proteozomların mutant poliQ proteinlerini degrade etmek üzere agregatlara dağılması, hücrede degrade edilmesi gereken ve özellikle de hücre-içi konsantrasyonları önemli olan proteinlerin birikmesine neden olarak apoptoza yol açabilir^(80,81).

Agregatlar, Nükleer Lokalizasyon ve Toksikite

PoliQ hastalıklarının patolojisinde, mutant proteinin hücre-içindeki yeri, agregat oluşumundan daha belirleyici bir faktör olabilir. Her ne kadar sitoplazma patolojisine dikkat çeken sonuçlar olsa da, daha çok sayıda bulgular çekirdeği işaret eder.

Çekirdek lokalizasyon sinyali (NLS-*"nuclear localization signal"*) mutasyona uğratılmış mutant poliQ proteini sentezleyen transgenik farelerde hastalık görülmemesi, ve çekirdek lokalizasyon sinyali kazandırılan proteinlerin hücrelerde daha fazla toksisiteye yol açtığına gösterilmesi, nükleer lokalizasyonun hücre-içi toksisitede agregasyonlardan daha önemli bir rolü olduğunu düşündürmektedir. Normalde sitoplazmada görülen huntingtin'in mutant formunun çekirdekte bulunduğu gösterilmiştir. Dolayısıyla, mutant proteinin hücre-içi lokalizasyonunun toksisitede rolü olması olasıdır.

Agregatların toksisitesi ve nükleer lokalizasyonu üzerine yakın zamanda yapılan çalışmalar, çarpıcı bulgularla sonuçlanmıştır^(82,83). Normal ve patojenik aralıkta, 20 ve 42 glutamin tekrarlı peptidler (Q20 ve Q42) belli bir konsantrasyona ulaştırılıp, soğuk şok uygulandığında, hücrelere girip sitoplazmada fibriler agregatlar oluşturmuşlardır. Normal ve mutant peptid agregatlarının lokalizasyonunu karşılaştırmak üzere bu peptidlere NLS

eklendiğinde, agregatlar çekirdeğe girmiş, ve hem normal, hem de mutant peptid agregatları hücre ölümüne yol açmış, fakat NLS'si olmayan sitoplazmik agregatlar toksisite yaratmamıştır. Q42 agregatlarının çekirdekte bulunduğu hücrelerin %65'inde 24 saat içinde hücre ölümü gözlemlenmiştir⁽⁸⁴⁾. Bu sonuçlardan, agregatların normal veya patolojik sayıda glutamin tekrarları içermesinden çok, hücre-içi lokalizasyonlarının önem taşıdığı öne sürülebilir. Kontrol olarak kullanılan ve amiloid fibril oluşturduğu bilinen CspB-1 bakteri soğuk şok proteinine NLS eklendiğinde, agregatların çekirdekte oluştuğu, fakat toksik olmadıkları görülmüştür. Bu da, intranükleer agregatların toksisitesinin poliQ dizisinden kaynaklandığını doğrulamaktadır⁽⁸⁵⁾.

Agregasyonun başlaması poliQ konsantrasyonunun kritik eşik değerine ulaşmasını gerektirir, bu da poliQ hastalıklarının geç-başlangıçlı oluşlarını açıklayabilir^(86,87). Buna ek olarak, agregasyon başlangıcının CAG tekrar sayısına bağlı olması, tekrar sayısı artışıyla birlikte hastalık başlangıç yaşının düşmesini açıklamak için yeterlidir. Agregat oluşumunu başlatan toksik fragmanın kritik konsantrasyona ulaşmasında, hücrelerin bölünme yetisi, hücreye özgü sentez düzeyi, hücre-içi kompartmantalizasyon, ve proteinin ayırıcı işleme özellikleri ("differential processing") gibi birçok önemli etken vardır Patogenik olmayan aralıktaki poliQ dizilerinin de fibriler agregatlar oluşturduğu⁽⁶⁵⁾ ve bu agregatların patogenik aralıktaki tekrarlar gibi toksik etki yarattığı gösterilmiştir. Normal CAG tekrarı içeren proteinlerin agregat oluşumu için daha yüksek bir kritik konsantrasyona gereksinim duyulması ve bu proteinlerde agregat oluşumunun çok yavaş oluşu, bu olayın normal yaşam süresi içinde gerçekleşmeyeceğini gösterir^(84,88).

Nükleer Lokalizasyon, Protein Etkileşimleri ve Transkripsiyonel Disregülasyon

PoliQ proteinlerinin kesilerek çekirdeğe girmesinin olası sonuçları arasında; çekirdek-içi mekanizmalar; gen anlatımı ve RNA'nın işlenmesindeki değişimler, çekirdek-içi protein döngüsünde aksaklıklar, ya da çeşitli çekirdek faktörleriyle etkileşimler ilk akla gelenlerdir.

Mutant protein fragmanlarının çekirdeğe girdiğinde hücre için daha toksik olduğunu kanıtlayan deneylerle, poliQ proteinlerinin transkripsiyonu etkilediği düşüncesine varılmış ve poliQ proteinlerinin 20'den fazla çekirdek transkripsiyon faktörüyle etkileşimde bulunduğu saptanmıştır^(89,90). Bunlardan birçoğu poliQ proteinindeki tekrar sayısına bağlı etkileşimlerdir. Agregasyonun ön şart olduğunu kabul ederek nörotoksitesiyi açıklamaya çalışan modeller de, poliQ dizileri içeren transkripsiyon faktörlerinin (örn. TBP-TATA bağlayan protein, CBP-CREB bağlayan protein) mutant poliQ proteinleri ile birlikte agregat olarak işlevlerinin bloke

edildiğini ve gen anlatımında değişikliklere yol açtığını savunur^(91,92).

Huntingtin normalde gen anlatımının düzenlenmesinde rol oynayan proteinlerle etkileşimde bulunmakta, ve bu proteinlerin sitoplazmik naklinde ve çekirdek-içi hareketlerinde rol oynamaktadır⁽⁹³⁾. Huntingtin ile etkileşimde bulunan proteinlerin Huntington Hastalığı patogenezinde olası etkilerini açıklamak üzere, gen anlatımındaki değişimler, apoptozun tetiklenmesi, metabolik zehirlenme, aksonal transportun bloke olması gibi birçok mekanizma ortaya atılmıştır.

Mutant huntingtin, bazı TF'lere özgün bağlanma ve bunları ortamdaki çekme yoluyla nörotoksik olabilir. Huntington Hastalığı patogenezinde rol oynayan en önemli TF'leri, *cAMP response element binding protein (CREBP)*, p53, ko-represöre bağlanan protein (CtBP), TAFII130, Sp1'dir⁽⁹⁴⁻⁹⁷⁾. Huntington Hastalığı hücre modelinde, mutant huntingtin'in CREBP'deki glutaminlerle etkileşime girip CREBP'nin agregatlara dağıldığı gösterilmiştir⁽⁶⁴⁾. CREBP aynı zamanda transgenik fare modelinde ve post-mortem hasta beyinlerinde Nil'larda saptanmıştır. Mutant huntingtin, aynı zamanda, CREBP'nin görev aldığı gen anlatımlarını da azaltmaktadır⁽⁹⁸⁾. Fonksiyonel CREBP'nin hücre-içi miktarının azalmasının patogenik etki yarattığı, hücre canlılığı testleri ile gösterilmiştir. Bu çalışma ile glutamin dizileri içeren transkripsiyon faktörlerinin hücredeki lokalizasyonlarının değişimi yoluyla, çekirdek inklüzyonlarının toksisiteye dolaylı etkisi kanıtlanmıştır⁽⁹⁹⁾.

Özgün Nöron Ölümü

Gerek normal, gerekse mutant huntingtin tüm hücre ve dokularda yaygın olarak sentezlenir, bu nedenle mutant proteinin sadece striyatuma özgü nöronlarda dejenerasyona sebep olması oldukça dikkat çekici ve halen anlaşılmamış bir konudur.

Bölünen hücrelerde, hücre bölünmesi esnasında, nükleer zarın bozulmasıyla çekirdekteki agregatlar sitoplazmaya dağılıp daha az toksisite gösterebilir; ya da her hücre bölünmesinde agregatlar yeni oluşan hücreler arasında paylaşılabilir. Fakat nöronlar gibi post-mitotik hücrelerde hücre bölünmesi olmadığından, agregatlar hücre çekirdeğinde yüksek konsantrasyonda sabit kalıyor olabilirler. Bu hipotez, mitoz inhibitörleri ve hücre farklılaşmasına yol açan faktörler uygulandığında poliQ toksisitesinin artışıyla gösterilmiştir⁽¹⁰⁰⁾ ve neden sadece nöronların zarar gördüğünü açıklayabilir.

Striyatuma özgü nöron dejenerasyonunu açıklayıcı sebeplerden biri ise, mutant huntingtin'in striyatuma özgü proteinlerle etkileşimde bulunması olabilir. Fakat araştırmalar, huntingtin'in etkileşimde bulunduğu proteinlerin striyatuma

özgü olmadığını ortaya koymuştur. Diğer bir olasılık, hastalık patogeneğinde, huntingtin'in striyatuma özgü anti-apoptotik etkilerini yitirmiş olmasıdır. Ancak huntingtin anti-apoptotik etki göstermesine rağmen, bu durum striyatuma özgü değildir. Bunlara alternatif olarak, striyatuma özgü transkripsiyonu düzenleyen proteinlerin, huntingtin'in işlev bozukluğuna daha duyarlı olması ve bunun sonucu olarak gelişen transkripsiyon aksaklıkları, özgün nöron ölümünün sebeplerinden biri olabilir⁽⁵⁶⁾. Ayrıca, transgenik Huntington farelerinde N-terminal huntingtin fragmanlarının striyatal nöronlarda ve bunların aksonal uzantılarında selektif birikiminin gösterilmesi⁽¹⁰¹⁾, proteinin striyatuma özgü protein yıkımına uğrayarak burada biriktiği fikrini desteklemektedir⁽¹⁰²⁾. Son olarak, mutant huntingtin'in, striyatuma uzantıları olan beyin bölgelerinde işlev kaybı ya da toksik işlev kazanımı ile aktivitesinin değişmesi özgün nöron ölümünü açıklayabilir⁽⁵⁶⁾.

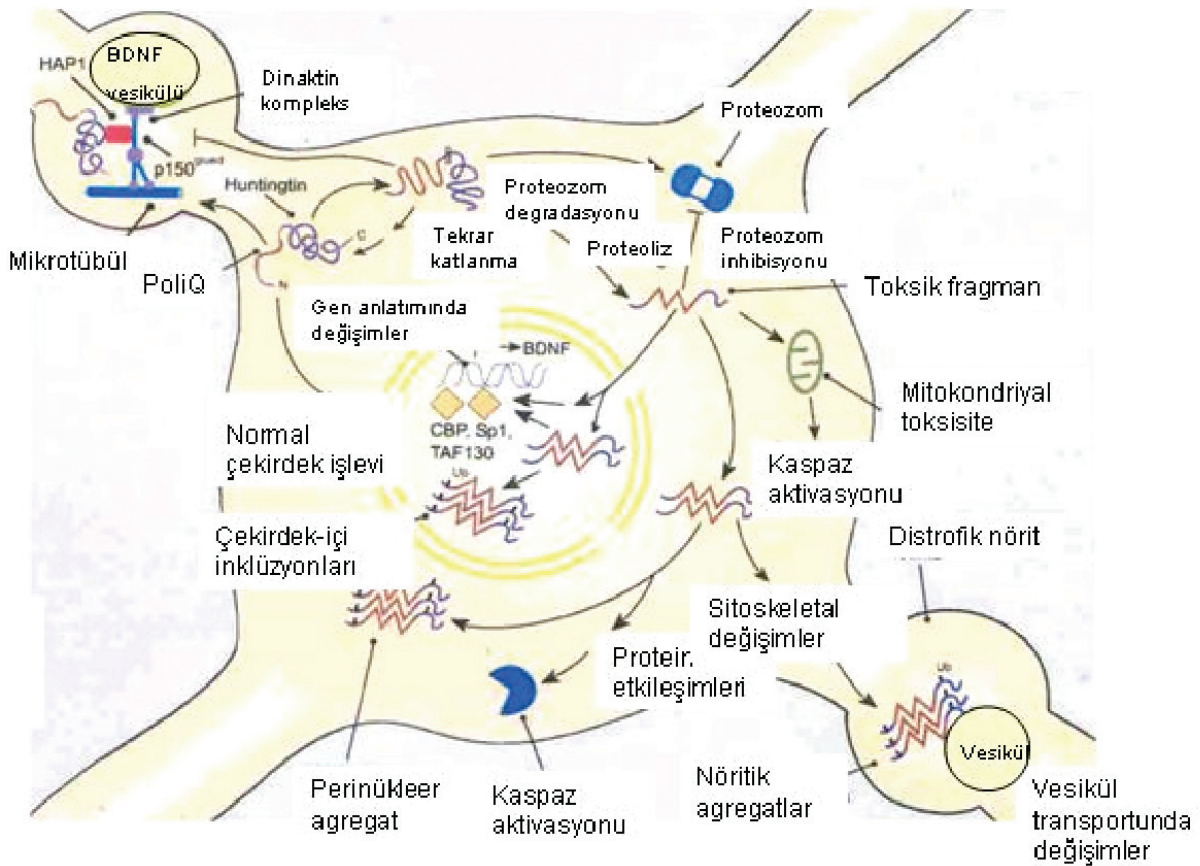
Huntington Hastalığı patogeneğinde rol oynadığı düşünülen hücre-içi biyokimyasal süreçler Şekil 9'da özetlenmiştir.

TEDAVİ VE GELECEKTEN BEKLENTİLER

Huntington Hastalığı'na neden olan genin 4. kromozoma bağlantı analizi ile haritalanması, tıpta ve moleküler biyolojide

bir dönüm noktasıdır. Bu önemli aşamadan sonra, genin izole edilmesi ve mutasyonun tanımlanması, yoğun araştırma ve uluslararası işbirliğine rağmen on yıl sürmüştür. Bugün bu mutasyonun neden olduğu moleküler patolojiye yönelik araştırma 1993'ten beri ivme kazanarak devam etmesine ve yöntemler çok gelişmiş olmasına rağmen, gen üzerindeki CAG tekrarı ile Huntington beynindeki özgün nöron ölümü arasındaki sır perdesi halen tam olarak aralanmamıştır; sabırsızlıkla beklenen kesin tedavi ancak bu perdenin kalkmasıyla mümkün olacaktır.

Hastalık patogeneğine yönelik bilgi birikimi, doku kültürü, maya, meyve sineği, ipliksi kurt, ve transgenik fare modelleri üzerindeki çalışmalar ile kazanılmıştır. Bugün kesin olarak bilinen iki şey vardır; birincisi tek tip bir mutasyonun hastalığı tetiklediği, bunu takiben birbiri ile etkileşim halindeki birçok farklı sürecin hastalığıdaki nöron ölümüne yol açtığıdır. İkinci önemli nokta ise, bu yazı çerçevesinde Huntington Hastalığı bağlamında tartışılan mekanizma ve süreçlerin birçoğunun tüm nörodejeratif hastalıkların ortak paydası olduğudur. Bunların arasında, saf Mendel tipi kalıtımla nesilden nesile aktarılan Huntington Hastalığı patogenezinin, AD, PD ve ALS'den daha az karmaşık olabileceği düşünüldüyse de, son yılların bize öğrettiği diğer önemli konu bunun böyle olmadığıdır. Huntington Hastalığı da dahil olmak üzere,

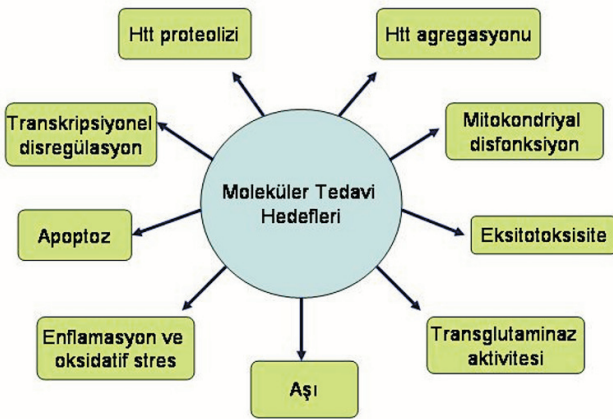


Şekil 9. Huntington Hastalığı patogeneğinde rol oynadığı düşünülen mekanizmalar⁽¹⁰⁴⁾.

bütün nörodejeneratif hastalıklar büyük olasılıkla tek bir vur-kaç türü tepkime ile değil, daha ziyade birkaç olay sonucu meydana gelen zincirleme bir süreç sonrasında oluşmaktadır. Bu sürece çevresel, epigenetik ve genetik olaylar da dahildir. Beyindeki protein agregasyonu, oksidatif ve nitrozatif stres, mitokondri hasarı, enfeksiyona cevap ve ağır metal birikiminden dolayı oluşan hasarı azaltarak, nörotrans-misyonu eski haline getirmek ve eksitotoksititeyi engellemek, birçok nörodejeneratif hastalığın tedavisinde etkili olacaktır.

Geleceğin moleküler sağaltımı, bu hastalıklara özgün olan, içiçe geçmiş karmaşık olayların engellenmesini hedefleyen, kombine tedaviler üzerine odaklanacaktır. Birçok aşamadan oluşan bir reaksiyon dizisinin tek bir aşamasını engellemenin, yetersiz olmasının yanı sıra, önemli riskleri de vardır. Geliştirilmiş olan in vitro ve in vivo modellerin, rasyonel tedavilerin yolunu açması umulmaktadır.

Huntington Hastalığı'nda tedaviye yönelik çalışmalar hücre kültürü ve transgenik hayvan modelleri üzerinde yoğun bir şekilde devam etmektedir. Mutant gen ekspresyonunun baskılanması, mutant protein yıkımının ve toksik fragmanların hücre çekirdeğine girmesinin engellenmesi, agregat oluşumunun önlenmesi ve transkripsiyonel disregülasyonun düzeltilmesi aşamalarında elde edilen sonuçlar oldukça umut verici ve tedavi sürecine yakın olduğumuzun göstergesidir (Şekil 10).



Şekil 10. Huntington Hastalığı'nda moleküler tedavi hedefleri (105).

İlaç tedavisine ve küçük-molekül kimyasına bakacak olursak, etkin bir ilacın, bilimsel olarak rasyonel, aynı patolojik mekanizmayı paylaşan diğer nörodejeneratif hastalıklarda da etkili, nöroprotektif etkisinin belirgin ve toksik olmaması gerekir. Diğer önemli kriterler beyne nüfuz etme ve farmakokinetik özelliklerdir. Birçok yeni çalışma, HDAC (histon deasetilaz) inhibitörleri, sistamin, kongo kırmızısı,

Rho'ya bağlı kinazın hem meyve sineği, hem de fare modellerinde poliQ toksisitesini azalttığını göstermiştir. Ama birçok soru şimdilik cevaplandırılmayı beklemektedir. Bu model organizmalardaki sonuçlar hastalara ne şekilde aktarılır ve ne kadar başarılı olur? İlaç tedavisinin zamanlaması nasıl olmalıdır? Hastalık belirtileri başlamadan evvel mi, sonra mı? Model sistemlerdeki başarı ölçütleri insanla nasıl kıyaslanacaktır?

Temel biyolojik araştırmada çok kısa bir sürede önemli bir devrime yol açan RNA interference (RNAi), şimdi de bazı hastalıklar için potansiyel bir tedavi olanağı gibi görülmektedir. Moleküler biyolojinin ana dogmasına göre, genetik bilgi DNA→RNA→ protein yönünde aktarılır. Son buluşlar, RNA'nın bu bilgi akışını her iki yönde regüle ettiği doğrultusundadır. Doğal ortamdaki RNA'ların, gerek beyinde, gerekse diğer organlarda gen ekspresyonunu kontrol ettikleri bilinmektedir. RNAi'de, hedef genlere komplementer olan küçük RNA düpleksleri, protein yapımını, mRNA translasyonunu engelleyerek, ya da mRNA'yı degrade ederek bloke ederler. Huntington ve SCA'ler gibi, patolojik CAG tekrarı olan hastalıkların hücre modellerinde, sentetik RNA'lar mutant poliQ proteinini, ya doğrudan CAG tekrar dizilerini, ya da komşu gen dizilerini hedef alarak inaktive ederler. Buradaki sorun, mutant genle birlikte, CAG tekrarı içeren sağlıklı genin de inaktive edilmesidir ki, bu da bu yöntemin CAG tekrarı hastalıkları için in vitro ortamda dahi henüz yeterli olgunluğa erişmediğini gösterir.

Moleküler tedavinin son aşaması kök hücre tedavisidir. Kök hücreler kendilerini yenileme kapasitesi olan ve kökenlerine göre, ya birçok yeni hücre tipine, ya da tüm hücrelere dönüşebilme potansiyeli olan farklılaşmamış hücrelerdir. Kök hücre veya türevlerinin hasta bireye transplantasyonu, ya da erişkin hasta beyindeki endojen kök hücrelerin aktive edilmesi, nörodejeneratif hastalıkların gelecekteki tedavilerinden en önemlisi olarak görülmektedir. Beynin yapısal ve işlevsel kompleksitesi düşünüldüğünde, nörodejenerasyon sonucu kaybedilmiş beyin hücrelerini işlevsel hücrelerle değiştirmek, gerçeğe çok uzak gelebilir. Ama, hayvan modellerinde yapılan araştırmalar nöron değişiminin mümkün olduğunu ve bozuk nöronal devrelerin kısmen de olsa rejenere edilebileceğini kanıtlamıştır. Transgenik hayvanlar üzerinde denenen implantlar olumlu sonuç vermiş ve yeni nöronların mevcut olan nöronlarla ağ kurdukları ve dejenerasyona uğramadığı gözlemlenmiştir. Bu olumlu sonuçlardan yola çıkılarak Huntington hastaları üzerinde fetal striatal doku implantasyonu çalışmaları başlatılmıştır, ve halen çeşitli Avrupa ülkelerinden 100'ü aşkın Huntington hastası takip edilmektedir. Alınacak sonuçların yakın gelecekte, Huntington Hastalığı için ikinci bir dönüm noktası olacağı ve diğer nörodejeneratif hastalıkların tedavisine de ışık tutacağı umulmaktadır.

KAYNAKLAR

- Huntington G. *Med Surg Reporter* 1872; 26: 317-321.
- Bates G, Harper P, Jones L. *Huntington's Disease*. 3. Baskı, Londra, Oxford Yayınları; 2002.
- Ho LW, Carmichael J, Swartz J, Wyttenbach A, Rankin J, Rubinsztein DC. The molecular biology of Huntington's Disease. *Psychological Medicine* 2001; 31: 3-14.
- Penney JB Jr, Young AB, Shoulson I, Starosta-Rubenstein S, Snodgrass SR, Sanchez-Ramos J, Romos-Arroyo M, Gomez F, Penchaszadeh G, Alvir J, Esteves J, DeQuiroz I, Marsol N, Moreno H, Conneally PM, Bonilla E, Wexler NS. Huntington Disease in Venezuela: 7 years of follow-up on symptomatic and asymptomatic individuals. *Movement Disorders* 1990; 5: 93-99.
- Van Dijk JF, Van der Velde EA, Roos RAC & Bruyn GW. Juvenile Huntington's disease. *Human Genetics* 1986; 73: 235-239.
- Reddy PH, Williams M, Tagle DA. Recent advances in understanding the pathogenesis of Huntington's disease. *Trends Neurosci.* 1999; 22: 248-255.
- Andrews TC, Weeks RA, Turjanski N, Gunn RN, Watkins LH, Sahakian B, Hodges J R, Rosser AE, Wood NW, and Brooks DJ. Huntington's disease progression: PET and clinical observations. *Brain* 1999; 122:2353-2363.
- Vonsattel, JPG and DiFiglia M. Huntington disease. *J Neuropathol Exp Neurol.* 1998; 57:369-384.
- Albin RL, Reiner A, Anderson KD, Penney JB, and Young AB. Striatal and nigral neuron subpopulations in rigid Huntington's disease: Implications for the functional anatomy of chorea and rigidity-akinesia. *Ann Neurol.* 1990; 27:357-365.
- Kuwert T, Lange HW, Langer K-J, Herzog H, Aulich A, and Feinendegen LE. Cortical and subcortical glucose consumption measured by PET in patients with Huntington's disease. *Brain* 1990; 113:1405-1423.
- Andrews, TC and Brooks DJ. Advances in the understanding of early Huntington's disease using the functional imaging techniques of PET and SPET. *Mol Med Today.* 1998; 4:532-539.
- Berent S, Giordani B, Lehtinen S, Markel D, Penney JB, Buchtel HA, Starosta Rubinstein S, Hiehwa R and Young AB. Positron emission tomographic scan investigations of Huntington's disease: Cerebral metabolic correlates. *Ann Neurol.* 1988; 23:541-546.
- Antonini A, Leenders KL, Spiegel R, Meier D, Vontobel P, Weigell-Weber M, Sanchez-Pemate R, de Yebenez JG, Boesiger P, Weindl A and Maguire RP. Striatal glucose metabolism and dopamine D2 receptor binding in asymptomatic gene carriers and patients. *Brain* 1996; 119:2085-2095.
- Feigin A, Leenders KL, Moeller JR, Missimer J, Kuenig G, Spetsieris P, Antonini A and Eidelberg D. Metabolic network abnormalities in early Huntington's disease: An [(18)F] FDG PET study. *J Nucl Med.* 2001; 42:1591-1595.
- Jenkins BG, Koroshetz W, Beal MF and Rosen B. Evidence for an energy metabolism defect in Huntington's disease using localized proton spectroscopy. *Neurology* 1993; 43:2689-2695.
- Jenkins G, Rosas HD, Chen YC, Makabe T, Myers R, MacDonald M, Rosen BR, Beal MF and Koroshetz WJ. ¹H NMR spectroscopy studies of Huntington's disease: Correlation with CAG repeat numbers. *Neurology* 1998; 50:1357-1365.
- Nicoli F, Vion-Dury J, Maloteaux JM, Delwaide C, Confort-Gouny S, Sciaky M and Cozzone PJ. CSF and serum metabolic profile of patients with Huntington's chorea: A study by high resolution proton NMR spectroscopy and HPLC *Neurosci Lett.* 1993;154:47-51.
- Lodi R, Schapira AH, Manners D, Styles P, Wood NW, Taylor DJ and Wamer TT. Abnormal in vivo skeletal muscle energy metabolism in Huntington's disease and dentatorubropallidolusian atrophy. *Ann Neurol.* 2000;48:72-76.
- Butterworth J, Yates CM and Reynolds GP. Distribution of phosphate-activated glutaminase, succinic dehydrogenase, pyruvate dehydrogenase, and gamma-glutamyl transpeptidase in post-mortem brain from Huntington's disease and agonal cases. *J Neurol Sci.* 1985;67:161-171.
- Browne SE, Bowling AC, MacGarvey U, Baik MJ, Berger SC, Muqit MMK, Bird E D and Beal MF. Oxidative damage and metabolic dysfunction in Huntington's disease: Selective vulnerability of the basal ganglia. *Ann Neurol.* 1997;41:646-653.
- Arenas J, Campos Y, Ribacoba R, Martin MA, Rubio JC, Ablanedo P and Cabello A. Complex I defect in muscle from patients with Huntington's disease. *Ann Neurol.* 1998;43: 397-400.
- Guidetti P, Charles V, Chen EY, Reddy PH, Kordower JH, Whetsell WO Jr, Schwarcz R and Tagle DA. Early degenerative changes in transgenic mice expressing mutant huntingtin involve dendritic abnormalities but no impairment of mitochondrial energy production. *Exp Neurol.* 2001;169:340-50.
- Mazzola JL, Sirover LA. Reduction of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase activity in Alzheimer's Disease and in Huntington's Disease fibroblasts *J Neurochem.* 2001;76: 442-449.
- Gusella JF, Wexler NS, Conneally PM, Naylor SL, Anderson MA, Tanzi RE, Watkins PC, Ottina K, Wallace MR, Sakaguchi AY. A polymorphic DNA marker genetically linked to Huntington's disease. *Nature* 1983;306: 234-238.
- Huntington's Disease Collaborative Research Group. A novel gene containing a trinucleotide repeat that is expanded and unstable on Huntington's disease chromosomes. *Cell* 1993;97:1-983.
- Gusella JF, MacDonald ME. *Seminars in Cell Biology* 1995;6: 21-28.
- Cummings CJ, Zoghbi HY. Fourteen and counting: unraveling trinucleotide repeat diseases. *Hum Mol Genet.* 2000; 9(6):909-916.
- Richards RI. Dynamic mutations: a decade of unstable expanded repeats in human genetic disease. *Human Molecular Genetics* 2001;10(20): 2187-2194.
- Wheeler VC, Auerbach W, White JK, Srinidhi J, Auerbach A, Ryan A, Duyao MP, Vrbancac V, Weaver M, Gusella JF, Joyner AL and MacDonald ME. Length-dependent gametic CAG repeat instability in the Huntington's disease knock-in mouse. *Hum Mol Genet.* 1999; 8, 115-122.
- Aronin N, Chase K, Young C, Sapp E, Schwarz C, Matta N, Kornreich R, Landwehrmeyer B, Bird E and Beal MF. CAG expansion affects the expression of mutant huntingtin in the Huntington's disease brain. *Neuron* 1995;15, 1193-1201.
- Kremer B, Almqvist E, Theilmann J, Spence N, Telenius H, Goldberg Y P and Hayden MR. Sex-dependent mechanisms for expansions and contractions of the CAG repeat on affected Huntington disease chromosomes. *American Journal of Human Genetics* 1995;57, 343-350.
- Ranen NG, Stine OC, Abbott MH, Sherr M, Codori A-M, Franz ML, Chao NI, Chung AS, Pleasant N, Callahan C, Kasch LM, Ghaffari M, Chase GA, Kazazian HH, Brandt J, Folstein SE and Ross CA. Anticipation and instability of IT-15 (CAG)_n repeats in parent-offspring pairs with Huntington's disease. *American Journal of Human Genetics* 1995;57, 593-602.
- Ross CA, Hayden MR. *Huntington's Disease: Analysis of Triplet Repeat Disorders.* Oxford Bios Scientific Publishers Yayın; 1998: 169-208.

34. The American College of Medical Genetics / American Society of Human Genetics Huntington Disease Genetic Testing Working Group. *Am J Hum Genet.* 1998;62: 1243-1247.
35. Telenius H, Almqvist E, Kremer B, Spence N, Squitieri F, Nichol K, Grandell U. Somatic mosaicism in sperm is associated with intergenerational (CAG)_n changes in Huntington disease. *Hum Mol Genet.* 1995;4: 189-195.
36. McGlennan RC, Allinson PS, Matthias-Hagen VL, Parker TL, Lovell MA, Kelley TA. Evidence of an unstable paternal 27 CAG repeat allele in the huntingtin gene giving rise to clinically overt Huntington disease in a patient with the genotype (17/38) *Am J Hum Genet Suppl.* 1995;57: A246.
37. 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 and 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.* 1996; 59: 16-22.
38. Wells RD, Warren ST. *Genetic Instabilities and Hereditary Neurological Diseases.* Academic Press Yayın.; California, 1998.
39. Crauford D. Huntington's Disease. *Prenatal Diagnosis* 1996;16: 1237-1245.
40. Goldfarb L, brown P, McCombie WR, Golgaber D, Swergold GD, Wills PR, Cervenakova L, Baron H, Gibbs CJ Jr, Gajdusek DC. Transmissible familial Creutzfeldt-Jacob disease associated with five, seven, and eight extra octapeptide coding repeats in the PRNP gene. *Proc Nat Acad Sci.* 1991; 88: 10926-10930.
41. Holmes SE, O'Hearn E, Rosenblatt A, Callahan C, Hwang HS, Ingersoll-Ashworth RG, Fleisher A, Stevanin G, Brice A, Potter NT, Ross CA, Margolis RL. A repeat expansion in the gene encoding junctophilin-3 is associated with Huntington disease-like 2. *Nat Genet.* 2001; 29: 377-378.
42. Kambouris M, Bohlega S, Al-Tahan A, Meyer BF. Localization of the gene for a novel autosomal recessive neurodegenerative Huntington-like disorder to 4p15.3. *Am J Hum Genet.* 2000; 66: 445-452.
43. Margolis RL, O'Hearn E, Rosenblatt A, Willour V, Holmes SE, Franz ML, Callahan C, Hwang HS, Troncoso JC, Ross CA. A disorder similar to Huntington's disease is associated with a novel CAG repeat expansion. *Ann Neurol.* 2001;50, 373-380.
44. Curtis AR, Fey C, Morris CM, Bindoff LA, Ince PG, Chinnery PF, Coulthard A, Jackson MJ, Jackson AP, McHale DP, Hay D, Barker WA, Markham AF, Bates D, Curtis A & Burn J. Mutation in the gene encoding ferritin light polypeptide causes dominant adult-onset basal ganglia disease. *Nat Genet.* 2001; 28: 350-354.
45. Andrade MA and Bork P. HEAT repeats in the Huntington's Disease protein. *Nat Genet.* 1995;11: 115-116.
46. Hilditch-Maguire P, Trettel F, Passani LA, Auerbach A, Persichetti F, MacDonald ME. Huntingtin: an iron-regulated protein essential for normal nuclear and perinuclear organelles. *Hum Mol Genet.* 2000;9: 2789-2797.
47. White JK, Auerbach W, Duyao MP, Vonsattel JP, Gusella JF, Joyner AL, MacDonald ME. Huntingtin function is required for mouse brain development and is not impaired by the Huntington's Disease CAG expansion mutation. *Nat Genet.* 1997;17: 404-410.
48. DiFiglia M, Sapp E, Chase K, Schwartz C, Meloni A, Young C, Martin E, Vonsattel J-P, Carraway R, Reeves SA, Boyce FM, Aronin N. Huntingtin is a cytoplasmic protein associated with vesicles in human and rat brain neurons. *Neuron* 1995;14: 1074-1081.
49. Auerbach W, Hurlbert MS, Hilditch-Maguire P, Wadghiri YZ, Wheeler VE, Cohen SI, Joyner AL, MacDonald ME, Turnbull DH. The HD mutation causes progressive lethal neurological disease in mice expressing reduced levels of huntingtin. *Hum Mol Genet.* 2001;10:2515-2523.
50. Tukamoto T, Nukina N, Ide K, Kanazawa I. Huntington's Disease gene product, huntingtin, associates with microtubules in vitro. *Brain Res Mol Brain Res.* 1997;51:8-14.
51. Ordway JM, Tallaksen-Greene S, Gutekunst CA, Bemstein EM, Cearley JA, Wiener HW, Dure LS, 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* 1997;91: 753-763.
52. De Cristofaro T, Affaitati A, Felieciello A, Awedimento EV, Varrone S. Polyglutamine-mediated aggregation and cell death. *Biochem and Biophys Res Comm.* 2000;272:816-821.
53. Harper PS. Huntington's disease. 2. Baskı, Londra, WB Saunders Yayın.; 1996.
54. 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. *Somatic Cell and Molecular Genetics* 1994;20:27-38.
55. 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 behavioural and morphological changes in heterozygotes. *Cell* 1995;81:811-823.
56. 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 in Neurosciences* 2001;24(3):182-188.
57. Zuccato C, Ciammola A, Rigamonti D, Leavitt BR, Goffredo D, Conti L, MacDonald ME, Friedlander RM, Silani V, Hayden MR, Timmusk T, Sipione S, Cattaneo E. Loss of huntingtin-mediated BDNF gene transcription in Huntington's disease. *Science* 2001; 293: 493-498.
58. Green H. Human genetic diseases due to codon reiteration: relationship to an evolutionary mechanism. *Cell* 1993;74:955-956.
59. Perutz MF, Johnson T, Suzuki M, Finch JT. Glutamine repeats as polar zippers: their possible role in inherited neurodegenerative diseases. *PNAS USA.* 1994;9:5355-5458.
60. 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* 1997;90:549-558.
61. Michalik A, Van Broeckhoven C. Pathogenesis of polyglutamine disorders: aggregation revisited. *Hum Mol Genet.* 2003;12(2): R173-R186.
62. Li, H, Li SH, Yu ZX, Shelbourne P and Li XJ. Huntingtin aggregate-associated axonal degeneration is an early pathological event in Huntington's disease mice. *J Neurosci.* 2001;21: 8473-8481.
63. 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* 1997;90:537-548.
64. Martindale D, Hackam A, Wieczorek A, Ellerby L, Wellington C, McCutcheon K, Singaraja R, Kazemi-Esfarjani P, Devon R, Kim SU, Bredesen DE, Tufaro F, Hayden MR. Length of huntingtin and its polyglutamine tract influences localization and frequency of

- intracellular aggregates. *Nat Genet.* 1998;18(2):150-4.
65. Chai Y, Stacia LK, Bonini NM, Paulson HL. Analysis of the role of heat shock protein (Hsp) molecular chaperons in polyglutamine disease. *Journal of Neuroscience.* 1999;19: 10338-10347.
66. 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* 1998;95: 55-66.
67. Tarlac V, Storey E. Role of proteolysis in polyglutamine disorders. *J Neurosci Res.* 2003;74: 406-416.
68. Chan SL, Mattson MP. Caspase and calpain substrates: roles in synaptic plasticity and cell death. *J Neurosci Res.* 1999;58:167-190.
69. Gafni JG, Hermel E, Young JE, Wellington CL, Hayden MR, Ellerby LM. Inhibition of calpain cleavage of htt reduces toxicity, accumulation of calpain/caspase fragments in the nucleus. *J Biol Chem.* 2004;279: 20211-20.
70. Thornberry NA, Lazebnik Y. Caspases: enemies within. *Science* 1998;281:1312-1316.
71. Qin ZH, Gu ZL. Huntingtin processing in pathogenesis of Huntington's Disease *Acta Pharmacol Sin.* 2004;25 (19): 1243-1249.
72. Wellington CL, Ellerby LM, Hackam AS, Margolis RL, Trifiro MA, Singaraja R, McCutcheon K, Salvesen GS, Propp SS, Bromm M, Rowland K, 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.* 1998;273:9158-9167.
73. Wellington CL, Leavitt BR, Hayden MR. Huntington Disease: new insights on the role of huntingtin cleavage. *J Neural Transm Suppl.* 2000;58: 1-17.
74. Wellington CL, Singaraja R, Enerby L, Savinji, 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.* 2000;275:19831-19838.
75. Toneff T, Mende-Mueller L, Wu Y, Hwang SR, Bunday R, Thompson LM, Chesselet MF, Hook V. Comparison of huntingtin proteolytic fragments in human lymphoblast cell lines and human brain. *J Neurochem.* 2002;82:84-92.
76. Chai Y, Koppenhafer SL, Bonini NM, Paulson HL. Analysis of the role of heat shock protein (Hsp) molecular chaperones in polyglutamine disease. *J Neurosci.* 1999;19(23):10338-47.
77. Opal P, Zoghbi HY. The role of chaperones in polyglutamine disease. *Trends in Molecular Medicine* 2002; 8(5):232-236.
78. Kalchman MA, Graham RK, Xia G, Koide HB, Hodgson JG, Graham K, Goldberg YP, Gietz RD, Piekart CM, Hayden MR. Huntingtin is ubiquitinated and interacts with a specific ubiquitin-conjugating enzyme. *The Journal of Biological Chemistry* 1996;271:19355-19394.
79. Kaytor MD, Warren ST. Aberrant protein deposition and neurological disease. *The Journal of Biological Chemistry* 1999;274:37507-37510.
80. Ding Q, Lewis JJ, Strum KM, Dimayuga E, Bruce-Keller AJ, Dunn JC, Keller JN . Polyglutamine expansion, protein aggregation, proteasome activity, and neural survival. *The Journal of Biological Chemistry* 2002;277:13935-13942.
81. 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. *Molecular Biology of the Cell* 2001;12:1393-1407.
82. Yang W, Dunlap JR, Andrews RB, Wetzel R. Aggregated polyglutamine peptides delivered to nuclei are toxic to mammalian cells. *Hum Mol Genet.* 2002;11:2905-17.
83. Chung KK, Dawson VL, Dawson TM. The role of the ubiquitin-proteasomal pathway in Parkinson's disease and other neurodegenerative disorders. *TINS.* 2001;24:S7-S14.
84. Chen S, Wetzel R. Solubilization and disaggregation of polyglutamine peptides *Protein Sci.* 2001;10:887-91.
85. Scherzinger E, Sittler A, Schweiger K, Lurz R, Lehrach H, Wanker EE. Self assembly of polyglutamine-containing huntingtin fragments into amyloid-like fibrils: implications for Huntington's disease pathology. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1999;96:4604-09.
86. Taylor JP, Hardy J, Fischbeck KH. Toxic proteins in neurodegenerative disease. *Science* 2002;296:1991-1995..
87. Chen S, Berthelie V, Yang W, Wetzel R. Polyglutamine aggregation behavior in vitro supports a recruitment mechanism of cytotoxicity. *J Mol Biol.* 2001;31:173-81.
88. Yang W, Dunlap JR, Andrews RB, Wetzel R. Aggregated polyglutamine peptides delivered to nuclei are toxic to mammalian cells. *Hum Mol Genet.* 2002;11:2905-17.
89. Okazawa H. Polyglutamine diseases: a transcription disorder? *Cell Mol Life Sci.* 2003 Jul;60(7):1427-39.
90. Lin X, Antalffy B, Kang D, Orr HT, Zoghbi HY. Polyglutamine expansion down-regulates specific neuronal genes before pathologic changes in SCA1. *Nat Neurosci.* 2000; 3(2):157-63.
91. Suhr ST, Senut MC, Whitelegge JP, Faull KE, Cuizon DB, Gage FH. Identities of sequestered proteins in aggregates from cells with induced polyglutamine expression. *J Cell Biol.* 2001;153:283-294.
92. Chai Y, Shao, Miller VM, Williams A, Paulson HL. Live-cell imaging reveals divergent intracellular dynamics of polyglutamine disease proteins and supports a sequestration model of pathogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2002;99:9310-9315.
93. Gerber HP, Seipel K, Georgiev O, Hofferer M, Hug M, Rusconi S, Schaffner W. Transcriptional activation modulated by homopolymeric glutamine and proline stretches. *Science* 1994;263(5148):808-11.
94. 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* 2001;413(6857):739-43.
95. Dunah AW, Jeong H, Griffin A, Kim YM, Standaert DG, Hersch SM, Mouradian MM, Young AB, Tanese N, Krainc D. Sp1 and TAFII130 transcriptional activity disrupted in early Huntington's disease. *Science* 2002;296(5576):2238-43.
96. Obrietan K, Hoyt KR. CRE-mediated transcription is increased in Huntington's disease transgenic mice. *J Neurosci.* 2004;24(4):791-6.
97. Sugars KL, Brown R, Cook LJ, Swartz J, Rubinsztein DC. Decreased cAMP response element-mediated transcription: an early event in exon1 and full-length cell models of Huntington's disease that contributes to polyglutamine pathogenesis. *J Biol Chem.* 2004; 279(6):4988-99.
98. Nucifora FC Jr, Sasaki M, Peters MF, Huang H, Cooper JK, Yamada M, Takahashi H, Tsuji S, Troncoso J, Dawson VL, Dawson TM, Ross CA. Interference by huntingtin and atrophin-1 with CBP-mediated transcription leading to cellular toxicity. *Science,* 2001;291(5512):2423-8.
99. Wyttenbach A, Swartz J, Kita H, Thykjaer T, Carmichael J, Bradley J, Brown R, Maxwell M, Schapira A, Orntoft TF. Polyglutamine

-
- expansions cause decreased CRE-mediated transcription and early gene expression changes prior to cell death in an inducible cell model of Huntington's disease. *Hum Mol Genet.* 2001;10: 1829–1845.
100. Moulder KL, Onodera O, Burke JR, Strittmatter WJ and Johnson EM Jr. Generation of neuronal intranuclear inclusions by polyglutamine-GFP: Analysis of inclusion clearance and toxicity as a function of polyglutamine length. *J Neurosci.* 1999;19: 705–715.
 101. Hodgson JG, Agopyan N, Gutekunst CA, Leavitt BR, LePiane F, Singaraja R, Smith DJ, Bissada N, McCutcheon K, Nasir J, Jamot L, Li XJ, Stevens ME, Rosemond E, Roder JC, Phillips AG, Rubin EM, Hersch SM, Hayden MR. A YAC mouse model for Huntington's disease with full-length mutant huntingtin, cytoplasmic toxicity, and selective striatal neurodegeneration. *Neuron* 1999;23(1):181-92.
 102. Li H, Li SH, Johnston H, Shelbourne PF, Li XJ. Amino-terminal fragments of mutant huntingtin show selective accumulation in striatal neurons and synaptic toxicity. *Nat Genet.* 2000;25(4):385-9.
 103. Gusella JF. Huntington's Disease: Two decades from mystery to models. *NeuroScience News* 2000; 3(2-3): 15-22.
 104. Ross CA. Huntington's Disease: New paths to pathogenesis. *Cell* 2004; 118:4-7.
 105. Beal FM and Ferrante R. Experimental therapeutics in transgenic mouse models of Huntington's Disease. *Nature Reviews Neuroscience* 2004; 5: 373-384.