

Parkinson Hastalığı Tanısında Proteomiks Yaklaşımlarının Yeri ve Biyobelirteç Arayışları

Proteomics Approaches to Parkinson's Disease and Search for Potential Biomarkers: Review

Murat KASAP,^a
Gürler AKPINAR^a

^aTıbbi Biyoloji AD,
Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi,
Klinik Araştırmalar Birimi
Proteomiks Araştırma Laboratuvarı,
Kocaeli

Geliş Tarihi/Received: 14.10.2010
Kabul Tarihi/Accepted: 25.03.2011

Yazışma Adresi/Correspondence:
Murat KASAP
Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi,
Tıbbi Biyoloji AD,
Klinik Araştırmalar Birimi
Proteomiks Araştırma Laboratuvarı,
Kocaeli,
TÜRKİYE/TURKEY
mkasap@vt.edu

ÖZET Parkinson hastalığı (PH) sonuçları itibarı ile birçok insanın yaşam standardını düşüren, ölümlle sonuçlanabilen, ekonomik olarak tedavisi maliyetli ve yaşlı nüfus arttıkça görülme sıklığı artan bir sinir sistemi hastalığıdır. Beynin substantia nigra pars kompakta bölgesinde dopamin üreten ve hareketlerin kontrolünden sorumlu olan motor nöronların zaman içerisinde ölmesi sonucu ortaya çıkar. PH teşhisinde kullanılan klasik semptomlar arasında titreme, kaslarda sertlik, hareketlerde yavaşlama ve postural bozukluklar sayılabilir. Tüm bu belirtiler ortaya çıksa bile, iyi bir nörolog dahi hastalık teşhisini yüzde yüz doğrulukta ortaya koyamayabilir çünkü PH çoklu sistem atrofisi ve Lewy cisimli demans gibi diğer bazı nörolojik hastalıklarla karıştırılmaktadır. Bunlara ilaveten, hastalığın belirtileri ortaya çıkmadan erken teşhisi şu an için mümkün olmayıp, varlığı motor nöronların %70'den fazlası kaybedildikten ve fiziksel belirtiler ortaya çıktıktan sonra anlaşılmaktadır. Bu nedenle fiziksel belirtiler ortaya çıkmadan, PH'nın erken teşhisinde kullanılabilecek bir biyobelirteç veya biyobelirteç grubunun bulunması oldukça önemlidir. Proteomiks yaklaşımlar biyobelirteç keşfi amaçlı yapılan çalışmalarda sıklıkla kullanılırlar. Proteomiks kısaca hücre veya biyolojik sıvılardaki proteinlerin varlıklarının gösterilmesi, ortam veya biyolojik şartlara bağlı olarak organizmada oluşan değişikliklerin protein seviyesinde incelenmesi diye tarif edilebilir. Genom araştırmaları sonrası çağı olarak da görülen bu alan, hücrede asıl görev yapıcı moleküller olan proteinlerin tanımlanmasından fonksiyonlarına kadar çok geniş bir yelpazede araştırma yapma olanağı sağlamaktadır. Bu makalemizde Parkinson hastalığının teşhisinde kullanılabilecek biyobelirteçlerin keşfi amaçlı yapılan proteomiks çalışmalarını gözden geçirerek, önemli noktaları vurgulamaya çalıştık. Henüz belirlenmiş bir biyobelirteç olmamasına rağmen, aday biyobelirteçlerin bulunması yakın gelecek adına ümit vermektedir.

Anahtar Kelimeler: Parkinson hastalığı; biyolojik belirleyiciler; proteomiks

ABSTRACT Parkinson's disease (PD) is a neurodegenerative disorder, which may affect lives of many people by lowering their life quality and expectancy. PD is an expensive to treat disorder and increasingly encountered as the number of elderly increases. The disease is believed to be caused by the death of movement-controlling motor neurons present in substantia nigra pars compacta part of the midbrain. PD is usually diagnosed with the emergence of the classical symptoms namely bradykinesia, rigidity, tremor and postural instability. Diagnosis of PD is mostly a challenging task even for an experienced physician because several other neurological diseases display similar symptoms such as multiple system atrophy and Lewy body dementia. Early diagnosis of PD is not possible, yet essential because PD is diagnosed after the symptoms appear and more than 70% of the motor neurons have been lost. Therefore, discovery of a biomarker or a biomarker array that can be used for early diagnosis of PD would be a great help for patients as well as for the physicians. Proteomics approaches are often used in biomarker discovery. Proteomics can be briefly described as the study of proteoms in cells or in biological fluids and investigates the changes in proteoms under various physiological conditions. Proteomics sometimes referred to be the postgenomic era covers a broad range of research field from description of proteins to the functions of proteins. In this article, we aimed at reviewing and emphasizing the importance of proteomic studies carried out to discover a biomarker or a biomarker array in order to diagnose PD. Although there is no validated biomarker or a biomarker array for diagnosis of PD, promising results have been obtained.

Key Words: Parkinson's disease; biological markers; proteomics

doi:10.5336/medsci.2010-21522

Copyright © 2011 by Türkiye Klinikleri

Türkiye Klinikleri J Med Sci 2011;31(3): 691-701

PARKİNSON HASTALIĞI

Parkinson hastalığı (PH) bir sinir sistemi hastalığıdır. Dünyada en az altı milyon insan bu hastalıkla mücadele etmekte ve her yıl binlerce insan bu hastalığa yakalanmaktadır.¹ PH için verilen insidans ve prevalans oranları ülkelere, ırk, etnisiteye ve yapılan çalışmanın zamanına göre farklılık göstermektedir. Yapılan literatür taraması sonucunda karşılaşılan makaleler içerisinde Van Den Eeden ve ark. Parkinson insidansı üzerine yapmış oldukları çalışmada hastalık insidansının en yüksek oranda Hispaniklerde, daha sonra Hispanik olmayan beyazlar, Asyalılar ve Siyahlar şeklinde sıralandığı bildirilmiştir.² Değişik ülkelerde yapılan çalışmalarda farklı insidans sonuçları ortaya çıkmış olsa da, yıllık insidansın 4.5-21/100000 olduğu düşünülmektedir. Prevelans için ise 18-328/100000 arasında değişen oranlar verilmektedir.³ Avrupada yapılan bir çalışmada Parkinsonizm prevalansı %1.6 olarak bulunmuştur.⁴ Karşımıza çıkan diğer iki çalışmada ise Parkinsonizm'in prevalansı 10000'de 360, insidansı 10000'de 18 olarak verilmektedir.^{5,6} Türkiye için verilen prevalans değeri ise 100000'de 111'dir.⁷

Klinik olarak incelendiğinde hastalığa özgü birçok belirti mevcuttur. Bunlar arasında dinlenme anında titreme (istirahat tremoru), kas sertliği (rijidite), hareketlerde yavaşlama (bradikinezi) ve postür bozukluğu (postural insitabilite) sayılabilir.⁸ Tüm bu belirtilerin arkasında yatan patolojik sebep beyin substantia nigra pars kompakta (SNpC) kısmındaki dopaminerjik nöronların dejenere olarak ölmesi gösterilmektedir.⁹ Patolojik olarak PH'nın klasik tanısı otopsi sonrası alınan beyin dokularında Lewy cisimlerinin bulunması ile yapılır. Lewy cisimleri ise alfa-sinüklein pozitif protein ve lipid çökeltileri olarak tanımlanırlar.^{10,11} Ancak diğer bazı nörolojik hastalıklarda da PH benzeri semptomların ve Lewy cisimleri birikiminin olduğu gösterilmiştir (Lewy Body Dementia Association : <http://www.lewybodydementia.org/>). Bu nedendir ki Lewy cisimlerinin yalnız başına varlıkları doğrudan PH tanısında kullanılamaz. PH'nın arkasında yatan biyokimyasal ve genetik faktörler daha güvenilir teşhis konulabilmesi için mutlaka detaylı bir şekilde araştırılmalıdır.

PH gelişimini tek bir neden üzerinden değerlendirmek doğru değildir. Bugüne kadar hastalığa neden olan birçok faktör tarif edilmişse de bunlar arasında öne çıkanları kısaca çevresel ve genetik faktörler şeklinde sınıflandırmak mümkündür. Çevresel faktörler daha subjektif ve kontrolü toplum bağımlı olduğundan, hastalığın oluşumundaki etkileri dolaylıdır. Genetik faktörler ise hastalığın oluşumunda doğrudan tanımlanabilecek faktörlerdir. Ailesel Parkinsonizm'e neden olan bir mutasyonun 1997 yılında belirlenmesi ile PH genetiğinde yeni bir dönem başlamış ve o zamandan günümüze en az sekiz farklı genin hastalıkla ilişkisi tanımlanmıştır (Tablo 1).¹² Bu bölgeler arasında 6. kromozomun kısa kolunda q25-27'de bulunan bölge özellikle ilginçtir. Bu bölge Parkin proteinini kodlayan (Swiss-Prot erişim numarası: O60260) *Park2* genini içerir (GenBank erişim numarası: EF375726.1). *Park2* geni genomda 1.3 Mb bir alan kaplayan ve 12 ekzon içeren bir genidir. *Park2* geni üzerindeki mutasyonların PH'ya sebep olabileceği ilk kez Kitada ve ark. tarafından gösterilmiştir.¹³ *Park2* üzerinde 1998'den bu yana birçok mutasyon bulunmuş ve bu mutasyonların erken başlayan Parkinsonizme sebep olabileceği gösterilmiştir.¹⁴

PARKİNSON TANISI VE TANIDA YAŞANILAN ZORLUKLAR

Parkinson hastalığının klinik tanısında kullanılan klasik belirtileri yukarıda kısaca özetledik. Bu yazımızın amacı PH'yı klinik açıdan incelemek olmadığı için tanı kriterleri üzerinde durmayacağız. Detaylı bilgi için okuyucu ilgili kaynaklardan faydalanabilir.¹⁵⁻¹⁹ Ancak burada bilinen bir gerçeği vurgulamakta fayda vardır ki, o da hastalığın tanısının hiç de kolay olmadığıdır. Maalesef Parkinson tanısı konulan her 100 hastadan sadece 76 tanesi tanıya uygun ölçütleri sağlamaktadır.^{20,21} Tablo 2'de PH ile sıklıkla karıştırılan hastalıklar verilmiştir. Bu hastalıklar arasında özellikle ilaç kullanımı ile tetiklenen PH (IKTPH) ve Kortikal Lewy Cisimi (KLC) hastalığı en sık rastlanılanlarıdır. İlaç kullanımı ile tetiklenen PH'ya dopamin saklanması ve salınımını engelleyen herhangi bir ilaç sebep olabileceği gibi, kalsiyum vazodilatörleri veya antihistaminik bazı ilaçlar da yol açabilir. KLC hastalığı

TABLO 1: Parkinson hastalığının genetiğinde rol oynayan genler ve fenotipik karşılıkları

Bölge	Gen	Protein Fonksiyonu	Fenotip	Kaynak
PARK1	SNCA	Sinaptik	PH Difüz Lewy Cisimciği hastalığı	12
PARK2 (Otozomal resesif)	Park2	E3 ligaz	Erken başlayan ve yavaş gelişen ve PH	13
PARK3 (Otozomal dominant)	Bilinmiyor (Kromozomun 2p13 kolunda)	Bilinmiyor	PH	59
PARK4 (Otozomal dominant)	Park4	Sinaptik	Hızla gelişen ve başlangıç yaşı 30 ile 60 arasında olabilen PH	61
PARK5 (Otozomal Dominant)	UCHL1	Ubiquitin hidrolaz/ligaz	Tipik PH. Bilinmeyen patoloji ve başlangıcı 50 yaş sonrası	61
PARK6 (Otozomal resesif)	PINK1	Protein Kinaz	Tipik PH. Bilinmeyen patoloji ve başlangıcı 30-50 yaş arası	62
PARK7 (Otozomal resesif)	DJ-1	Oksidatif strese cevap	Yavaş ilerleyen, bilinmeyen patolojisi olan PH. Başlangıcı 30-50 yaş arası.	62
PARK8 (Otozomal resesif)	LRRK2	Protein Kinaz	Yavaş ilerleyen, değişken patolojisi olan PH. Başlangıcı 40-60 yaş arası	63

PH: Parkinson Hastalığı.

PH ile sıklıkla karıştırılan bir hastalıktır. Bu hastalıkta gözlemlenen Lewy cisimleri seyrek bir dağılıma sahiptir ve postmortem incelemelerde beyin süngerimsi bir yapı aldığı görülmüştür.²¹ Hastalık ileri dönemlerinde sebep olduğu halisünasyonlar ile PH'dan ayrılmaktadır.

PH'nın belirtilerinin ortaya çıkışı beyindeki dopaminerjik nöronların %70'den fazlasının ölümü tamamlandıktan sonra olmaktadır. Bugüne dek yapılan çalışmalarda neden özellikle beyinin SNpC bölgesindeki nöronların etkilendiğine dair kesin deliller bulunamamıştır. Varsayılan, beyin bu bölgeden üretilen dopaminin yapısal kararsızlığı sonucu oluşturduğu yan ürünlerin proteinleri modifiye ettiğidir.²² Bunun yanında, uygun olmayan mitokondri aktivitesi ve reaktif oksijen türlerinin üretilmesi de PH'nın moleküler nedenleri arasında sayılmaktadır. Mitokondrial aktivitedeki düşüşün PH'ya yol açtığına dair kanıtlar 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridin (MPTP) ve rotenon gibi kompleks I inhibitörleri ile yapılan deneyler sonucunda anlaşılmıştır.^{23,24} Tüm bu yapılan araştırmalarda karşılaşılan en ciddi sorun elde edilen bulguların sebep mi yoksa sonuç mu olduğunun anlaşılabilmesidir. Örneğin, "Lewy cisimlerinin PH'lı hastaların beyindeki varlığı hastalığın oluşumuna sebep midir, yoksa bu cisimler hastalık oluşumunun bir sonucu mudur?",

TABLO 2: Parkinson hastalığı ile sıklıkla karıştırılan diğer nörodejeneratif hastalıklar.²¹

Hastalıklar	Yüzdeleri
İlaç kullanımı ile tetiklenen PH (IKTPH)	>%76
Kortikal Lewy Cisimi (KLC)	>%76
İdiyopatik Parkinson Hastalığı	%76
Alzheimer's Hastalığı	%3
İlerleyici supranükleer felç	%6
Çoklu sistem atrofisi	%5
Striatali kapsayan Alzheimer tipi patoloji	%3
Lacunar durum	%2
Nigral atrofi	%1
Postensefalitik Parkinsonizm	%1
Essential tremor	%1

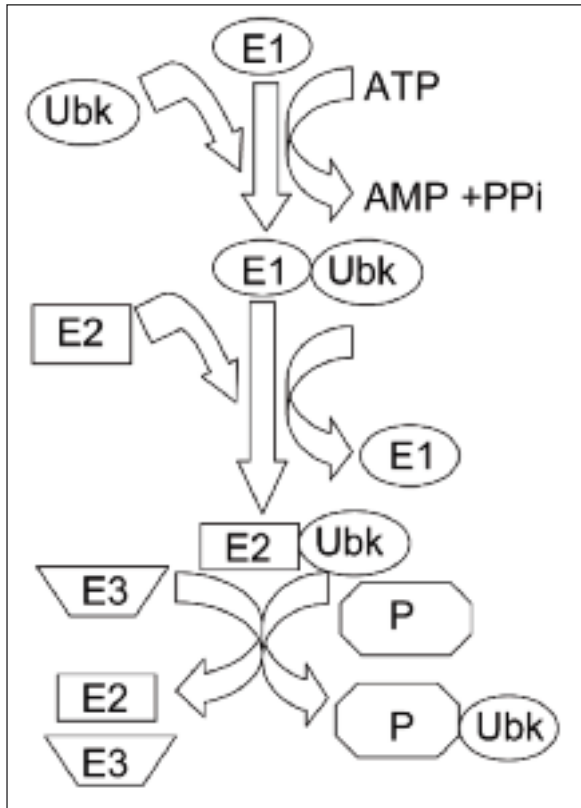
bilinmemektedir. Lewy cisimlerinde UCH-L1 gibi protein katlanmasına yardımcı olan şaperon (chaperon) proteinlerin bulunması hücrenin Lewy cisimlerinin oluşumunu engellemede son bir gayret içerisinde olduğunu düşündürmektedir. Şekil 1'de PH oluşumuna katkısı olduğu düşünülen faktörler şematik olarak gösterilmiştir. Bu faktörler arasındaki kayıp bağlantıların ortaya çıkartılması PH için uygun tanı ve tedavilerin geliştirilmesi açısından önem taşımaktadır. Bugüne dek yapılan çalışmalar sonucunda öğrendiğimiz tek gerçek var ki, o da PH'nın bir proteinopati hastalığı olduğudur.^{25,26} Başka bir ifa-



ŞEKİL 1: Parkinson hastalığına sebep olduğu düşünülen temel metabolik yollar ve aralarındaki henüz açıklanmamış ilişki.

deyle PH bir protein yanlış katlanma hastalığıdır. Pek çok nörodejeneratif hastalık hatalı katlanmış proteinlerin nöron hücreleri içerisinde veya hücreler arası boşlukta birikmesiyle karakterize edilirler. Bu aşırı hatalı protein birikimi nöronal bağlantıyı ve plastisiteyi negatif yönde etkilemekte, apoptozis sinyallerini tetiklemektedir. Bunların en iyi bilinen örnekleri; PH'da gözlenen α -sinüklein (α -synuclein) ve sinipilin-1'in (synphilin-1) hatalı katlanması, birikimi ve agregatlar oluşturmalarıdır. Benzer şekilde Alzheimer hastalığında da β -amiloid (β -amyloid) peptidlerin senil plaklar oluşturarak hücreler arası boşlukta birikmesi ve aşırı fosforillenmiş tau proteinlerinin hücreler içerisinde nörofibriler yumaklar oluşturması ile karakterizedir. Parkinson hastalığının gelişiminde rol aldığı düşünülen Lewy cisimcikleri protein ve yağların heterojen bir karışım şeklinde birikmesiyle oluşmaktadır. İnklüzyonun merkezini lipidler oluştururken çevresel filamentsel yapıları; ubikitin, nörofilamentler, çeşitli proteosomal elementler ve α -sinüklein gibi proteinler meydana getirebilmektedir. Bozuk, yanlış katlanmış proteinlerin birikimi ve agregat oluşturmaya yatkınlıkları hücre içerisinde genelde iki şekilde olmaktadır. Bunlardan birincisi mutasyonlu, anormal ve okside olmuş proteinlerin degrede edilemeyecek kadar fazla olmaları, ikincisi ise proteozomal fonksiyonun azalması veya bozulmasıdır.²⁷⁻²⁹ Özellikle α -sinüklein Parkinson hastalığıyla ilişkili olduğu düşünülen proteinler arasında dikkat çekmektedir.²⁶

Hücrelerde yanlış katlanmış proteinlerden kurtulmanın birden fazla yolu vardır. Genel olarak, normal şartlar altında hücresel kontrol mekanizmaları sağlıklı nöronlarda protein agregatlarının oluşmasına müseade etmezler. Burada kısaca iki önemli mekanizmadan bahsetmek yerinde olacaktır. Bunlarda ilki şaperonlardır, şaperonlar yanlış katlanmış proteinlerin hücresel toksik etkilerine karşı bir savunma mekanizması görevi yapmaktadırlar. Şaperonlar hücresel stresten kaynaklanabilecek bir proteinin peptidleri arasındaki yanlış katlanmaları, bu bölgelere bağlanarak yeniden uygun şekilde katlanmalarını sağlayarak engel olabilirler. Şaperonların hücresel kalite kontrollerine ek olarak ubikitin-proteozom sistemi (Ubiquitin-proteasome system; UPS) ve oto-faji/lizozomal degradasyon bozuk proteinlerin temizlenmesinde görev almaktadır. Şaperonlar yanlış katlanmış proteinleri tamir edemedikleri zaman, yıkım için proteozom sistemi devreye girer. Nörodejeneratif hastalıklarda, hücre içerisinde veya hücreler arası boşlukta protein agregatlarının birikmesi bu sistemlerde meydana gelen bozukluklardan dolayı oluşmaktadır.²⁹ Bunlar arasında proteozomal yol özellikle PH oluşumunda doğru çalışmaması veya yetersiz kalması ile rol oynamaktadır.³⁰ Kısaca açıklamak gerekirse proteozomal parçalanma yolunda yanlış katlanmış proteinler 76 amino asitlik ubikitin adı verilen bir protein ile işaretlendikten sonra parçalanarak ortadan kaldırılırlar. İşaretlemede görev alan üç temel protein grubu vardır (Şekil 2). Bunlardan ilki E1 olarak da bilinen ubikitin aktive edici enzimdir ve hücrede tek tipi bulunur. Aktive olan ubikitin, ubikitin-E1 kompleksi üzerinden E2 olarak da bilinen ubikitin konjuge edici enzim üzerine aktarılır. Hücrede bir düzine E2 enziminin varlığı bilinmektedir. Konjuge edilmiş ubikitin en nihayetinde E3 olarak da bilinen ubikitin ligaz yardımı ile parçalanacak proteine aktarılır. Poli-ubikitinlenmiş olan protein 20/26S proteozomal kompleks tarafından parçalanarak degrede edilir. Hücrede E1'den fazla miktarda E2, E2'den daha fazla da E3 ubikitin bulunmaktadır. Her basamakta fazlaşan bu sayı bir sonraki spesifik bağlanmayı artırmaktadır.^{27,28,31-33}



ŞEKİL 2: Protein ubiquitinasyonu ve rol alan enzimler.
Kısaltmalar: Ubk, Ubikutin; E1, Ubikutin aktive edici enzim;
E2, Ubikutin konjuge edici enzim; E3, Ubikutin ligaz; P, protein.

PARKİNSON HASTALIĞI VE PROTEOMİK

PH üzerinde yapılan araştırmalar altı farklı alt başlığa ayrılabilir. Bu alt başlıklar sırası ile (1) PH'ya yatkınlık, (2) PH'nın ortaya çıkması, (3) PH'nın ilerlemesi, (4) Güvenilir, teşhis (5) Terapötik biyobelirteçler ve (6) Hastalığın seyrini değiştiren yaklaşımlar olarak verilebilir. Bu başlıklar arasında özellikle güvenilir teşhis ve terapötik biyobelirteçler önemlidir, çünkü nöronların bozulması hastalığın belirtileri ortaya çıkmadan çok önce gerçekleşmekte (muhtemelen beş ile 10 yıl önce) ve nöronların %70'i kaybedilmeden hastalık belirtileri ortaya çıkmamaktadır. Güvenilir bir biyobelirteç ya mRNA seviyesinde ya da protein seviyesinde bulunabilir.³⁴ PH'nın protein temelli bir senaryosu olduğu düşünülürse (alfa-sinüklein, Parkin, DJ-1 ve LRRK2 gibi proteinler) kullanılacak en akıllı yaklaşım protein biyobelirteçlerinin aranmasıdır. Bu amaçla kullanılacak en ilişkili me-

todoji de proteomiks metodolojisidir. Bu derlemede proteomiks nedir, hangi teknolojiler nasıl kullanılır genel bir çerçeve içerisinde açıklanacak ve Parkinson hastalığında proteomiks yaklaşımları ile biyobelirteç arayışları özetlenecektir.

PROTEOMİK NEDİR VE HANGİ TEKNOLOJİLER NASIL KULLANILIRLAR?

Proteomiks araştırmalarının tarihi protein çalışmaları ile başlasada bilinen anlamı ile metod olarak kökleri 1975'li yıllara uzanmaktadır.³⁵ "Proteom" terimi ise ilk defa 1994 yılında bir sempozyumda Marc Wilkins ve ark. tarafından bir genomun ifade ettiği tüm proteinleri tanımlamak için önerilmiş (PROTEin-genOME) ve 1995 yılında doktora tezinin bir parçası olarak bilim dünyasına kazandırılmıştır.³⁶ Genel bir tanımlama ile proteom, belirli bir an da hücrenin sahip olduğu tüm proteinlerin tanımlamak için kullanılan bir terimdir. Bir organizmada genomun değişmeyen doğasının tam tersi şekilde proteomun içeriği dokudan dokuya hatta bir hücreden diğer bir hücreye farklılaşabilmekte, çevresel faktörler, yaş, cinsiyet, hastalıklar ve fizyolojik durumlar (hücre döngüsü, apoptoz gibi) gibi iç ve dış faktörlere bağımlı olarak değişebilmektedir.

Proteom çalışmalarına duyulan ihtiyaç iki nedenden dolayıdır. (1) RNA seviyesindeki regülasyonlar proteine yansımayaabilir. Örneğin 23 farklı insan hücre hattında yapılan bir çalışmada 1066 gen ürününe ait RNA ve protein profilleri karşılaştırılmış ve aradaki ilişkinin tüm iyimserliğe rağmen %33'ü geçmediği görülmüştür.³⁷ (2) Genomiks, hastalıklar ve ilgili genler arasındaki ilişkinin bir kısmını ortaya koymasına rağmen son ürün olan proteinlerin çoğunun maruz kaldığı transkripsiyon sonrası modifikasyonları (TSM) öngöremez ve bunlarla hastalıklar arasındaki ilişkiyi kuramaz. Başka bir ifadeyle DNA/RNA elde edilmesi ve çalışılması kolay örnekler olmasına rağmen, bunlardan elde edilen bilgide sınırlamalar mevcuttur. Ribozomlarda sentezleri sonrası proteinler basit kimyasal grupların veya kompleks moleküllerin eklenmesi ile transkripsiyon sonrası modifikasyonlara uğrarlar. En çok gözlenen modifikasyonlar proteinlere karbohidrat ve fosfat gruplarının eklenmesi ile olmaktadır. Başlıcaları fosforilasyon, glikolizasyon,

asetilasyon, deaminasyon, sülfasyon, palmitoylasyon olan 300'den fazla TSM belirlenmiştir.

Genom projesinin tamamlanmasının ardından insanda yaklaşık 20000 ile 25000 arasında protein kodlayan genin var olduğu tahmin edilmektedir. Alternatif splicing ve TSM'ler göz önüne alındığında bu sayı 2000000 milyon protein veya protein fragmentine ulaşabilmektedir.³⁷⁻⁴⁰ Nöroproteomiks açısından bakıldığında da bu rakamlar ilgi çekici seviyede karmaşıktır. Yaklaşık 10^{12} nöronun, 10^{120} glia hücrelerinin, 10^{15} sinaptik bağlantının bulunduğu erişkin beyninde 12000 ile 14000 genin eksprese olduğu, sentezlenen proteinlerin %90'dan fazlasının izoformunun üretildiği düşünülürse, yaklaşık 250000 ile 300000 arasında protein nöronal sistemde görev almaktadır.⁴¹

Proteomiks denildiğinde sadece proteinlerin adlandırılması anlaşılmalıdır. Yaşlanma, strese ve ilaçlara verilen cevaplarda, hastalık durumlarında değişen protein profillerinin belirlenmesi, proteinlerin miktar tayinlerinin yapılması, hücre, doku ve organ seviyesinde lokalizasyonları, sahip oldukları translayon sonrası modifikasyonların karakterizasyonu, yapı ve fonksiyonlarının ortaya çıkarılmasının yanında mümkün olan protein-protein ilişkilerinin ortaya konması, proteomiks çalışmalarının başlıca alt başlıkları arasındadır. Özellikle klinik proteomiks, hastalık ve sağlık koşullarında farklı şekilde eksprese olan proteinlerin belirlenmesi, araştırılması ve tanımlanması için çok geniş bir fırsat sunmuştur. Bu alana odaklanmış olan çalışmalar sayesinde daha iyi diagnostik ve prognostik biyobelirteçlerin geliştirilmesi, yeni terapötik hedeflerin keşfi ve en sonunda kişiye özel tedavilerin geliştirilmesi mümkün olacaktır. Patolojik duruma bağlı olarak değişimleri gözlenebilen bir biyobelirteç, yüksek risk altındaki bireyleri izleme imkanı verdiği gibi, hastalığın tedavi edilebilir erken safhasında teşhisini de kolaylaştırmaktadır. İdeal bir biyobelirtecin şu özelliklere sahip olması beklenmektedir.⁴² (a) Belirli bir hastalığa yüksek derecede özgün olmalıdır (b) Yüksek hassasiyete sahip olmalıdır (c) Kolay kullanımı olmalıdır (d) Standart sonuç vermelidir (e) Kullanılacak örnek mümkün olduğu kadar kolay elde edilmelidir (f) Değerlendirici olan klinisyen için açık ve kolay anlaşılabilir

olmalıdır. Bütün bu sayılanlar bir biyobelirtecin klinik kullanımını etkileyecek faktörlerdir. Teorik olarak her bir hastalık kendine özel biyobelirteç ile karakterize edilebilir ve tanımlanabilir olmalıdır. Ancak çoğu hastalık durumu için birden fazla biyobelirteç kullanılmaktadır.

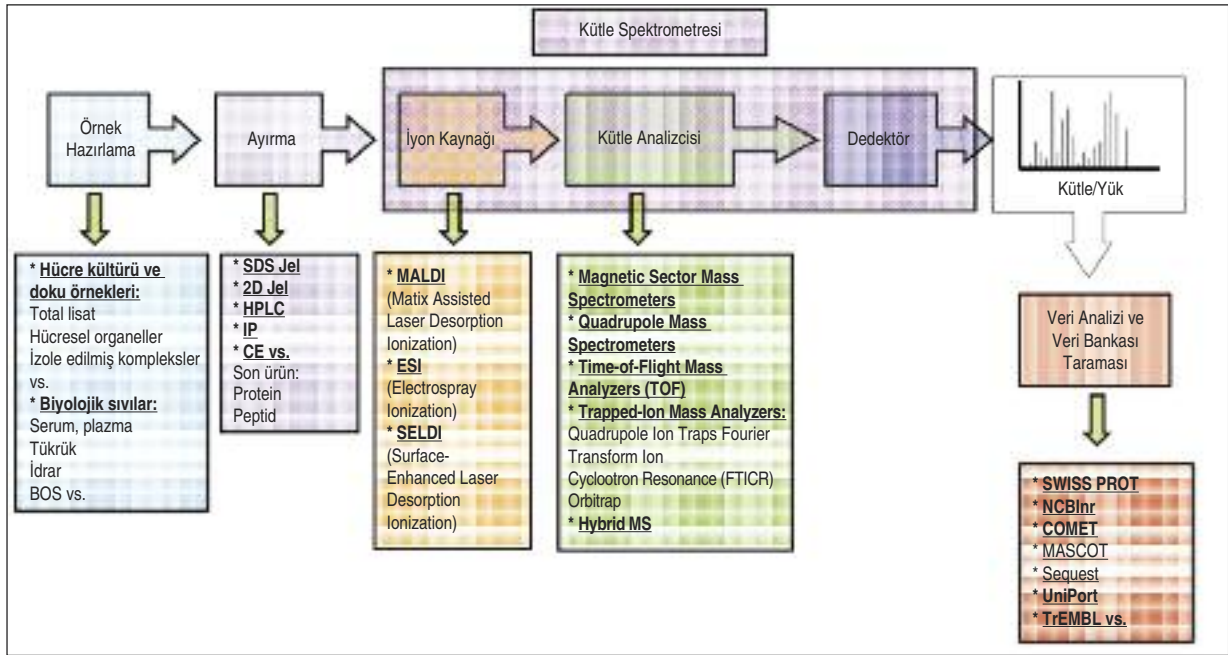
Bir proteomiks çalışmasında en önemli aşama araştırmanın yapılacağı konuya uygun örnek materyalin seçilmesi ve bu materyalden protein özütünün elde edilmesidir. Klinik proteomiks çalışmaları göz önüne alındığında karşımıza en sık kullanılan üç örnek materyali çıkmaktadır: (1) Biyolojik sıvılar, (2) Doku materyali, (3) Hücre kültürü örnekleri. Çalışılacak örneğin kaynağına ve kullanılacak proteomiks yaklaşımına bağlı olarak protein özütünün elde edilme metodu farklıdır. Klasik bir proteomiks çalışmasında takip edilecek adımlar şu şekilde sıralanabilir (Şekil 3).

1. Örnek hazırlama: Örnekler hücre kültüründen, dokulardan veya biyolojik sıvılardan hazırlanabilir. Her bir örneğin hazırlanmasında o örnek için geliştirilmiş bir protokol kullanılmalıdır.

2. Ayırıştırma: Proteinlerin veya peptidlerin MS analizi öncesi ayırıştırılmaları gerekmektedir. Ayırıştırma ya jel üzerinde ya da jelsiz ortamda gerçekleştirilebilir. Jel üzerinden ayırıştırma agaroz ve poliakrilamid jeller kullanılarak yapılırken, jelsiz ayırıştırmada kromatografik metodlardan yararlanılmaktadır.

3. Kütle analizi: Kütle analiz cihazları ile yapılır. Kütle analiz cihazları örneğin iyonizasyon şekline ve analizatöre göre farklılık göstermektedir.

4. Verilerin değerlendirilmesi: Elde edilen verilerin değerlendirilmesi proteomiks çalışmalarının biyoinformatikle ilişkili olan basamağıdır. Değerlendirilmesi gerekli olan iki tip veri vardır. Bunlar peptidlerin m/z oranları veya elde edilen amino asit dizileridir. Değerlendirmeler veri bankalarından ve arama motorlarından karşılaştırmalı olarak yapılabilir. Analizler sonucunda protein tanımlanmasına gidilmektedir. Ayrıca TSM'lerin belirlenmeside yine yapılan analizler sonucunda mümkündür. Bu amaçlara uygun olarak geliştirilmiş pek çok yazılım ücretli ya da ücretsiz olarak araştırmacıların hizmetine sunulmuştur.



ŞEKİL 3: Klasik bir proteomiks çalışmasında takip edilecek adımların ana çerçevesi. Kısaltmalar: BOS; Beyin Omurilik Sıvısı, SDS; Sodyum Dedosil Sülfat, 2D; iki boyutlu, HPLC; High-performance Liquid Chromatography, IP; Immunoprecipitation, CE; Capillary electrophorsis, TOF; Time of Flight, MS; Mass spectrometer.

PARKINSON HASTALIĞINA PROTEOMİKS YAKLAŞIMLAR

PH'nın erken teşhisinde kullanılacak nörokimyasal, biyokimyasal ya da genetik temelli bir biyobelirtecin keşfi araştırmacıların uzun zamandır uğraş verdikleri bir konu olmuştur, çünkü PH belirtilerinin ortaya çıkmasından çok önce başlayan ve belirtileri ortaya çıktıktan sonra ise yapılacak çok fazla şeyin kalmadığı bir hastalıktır. Günümüzde uygulanan tedavilerin çoğu semptomatik olup, yan etkileri uzun vade de yıkıcı olan tedavilerdir. Malesef PH'nın teşhisinde kullanılan tek bir biyobelirtecin varlığından bahsetmek mümkün değildir. Böyle işlevsel tek bir biyobelirteç arayışı da aslında pek akıllıca bir yaklaşım değildir. Doğru olan tek bir biyobelirteç yerine bir biyobelirteç paneli oluşturulmasıdır.

PH teşhisinde kullanılacak biyobelirteç arayışlarında ilk adım biyobelirtecin hangi kaynaktan çalışılarak elde edileceğidir. Bu amaçla kullanılacak biyolojik materyalleri alt başlıklar halinde tartışmakta fayda vardır.

PLAZMA/SERUM

Plazma protein içeriği açısından oldukça zengindir.⁴³ İçerdiği proteinleri beş farklı kaynaktan alabilir. Birincil kaynak karaciğer ve bağırsaklarca salınan proteinler olup, serumda en çok bulunanlarıdır (albumin gibi). Bu proteinlere ek olarak plazmada geçici süre bulunan proteinler de vardır. Bu gruba lizozomlarda parçalanacak olan ve hücreler üzerindeki reseptörleri aracılığı ile hücre içine alınan proteinler örnek verilebilir. Plazmada bulunan bir başka grup protein ise hasarlı dokulardan plazmaya sızmış olan proteinlerdir. Bu proteinler normalde plazmada bulunmaz doku veya hücre hasarı oluşturan bir hastalık durumunda plazmaya karışırlar. Bu proteinlerin biyobelirteç olarak değeri çok yüksektir ve bazıları hali hazırda teşhis amaçlı kullanılmaktadırlar (kardiak tropoinleri, kreatin kinaz, ALS, ALT gibi). Bir üçüncü grup protein çoklukla tümör dokuları tarafından seruma salgılanan ve kanser belirteçleri olarak kullanılan proteinlerdir. Son grupta ise enfeksiyon kaynaklı olan ve yabancı organizmalara ait olan proteinler bulunmaktadır. Basit bir mantıkla düşü-

nüldüğünde PH'ya ait bir biyobelirteç proteinin serumda aranması yanlış bir yaklaşımdır, çünkü PH bir nörodejeneratif hastalıktır ve doğrudan beyni ilgilendirir. Bu açıdan bakıldığında proteinlerin kan-beyin bariyerini aşarak plazmaya karışmasını beklemek doğru olmayabilir. Ancak yapılan çalışmalar hem PH hem de diğer bazı nörodejeneratif hastalıklar için plazma da biyobelirteç arayışının doğru olduğunu göstermektedir.^{14,44}

Plazma ya da serumda biyobelirteç arayışlarında karşılaşılan zorluk plazma veya serumda fazla miktarda bulunan proteinlerin varlığıdır. Bu proteinler analizler sırasında potansiyel biyobelirteç proteinleri maskeliyerek tespit edilmelerini engellerler. Bu noktada karşımıza çıkan proteinler arasında albumin, seruplazmin, transferin, haptoglobulin, IgG hafif ve ağır zincirlerini saymak mümkündür. Özellikle 2D temelli jel elektroforeslerinde bu proteinler plazma ve serumdan indirgenerek çalışmalar tasarlanmalıdır. Bu amaçla kullanılan BlueJel gibi albumin indirgeyici öncül teknolojiler yerini daha spesifik ve verimli çalışan MARS (Agilent Teknolojileri) gibi antikör bazlı teknolojilere bırakmaktadır.

BEYİN OMURİLİK SIVISI

Beyin omurilik sıvısı (BOS) beynin etrafını saran, beyin dokusu ile direk temas halinde olan ve bir kısmı da beyin dokusu tarafından üretilen bir sıvıdır. Bu nedenle beyinde meydana gelen değişiklikleri takip etme adına en güvenilir sonuçların alınabileceği kaynaktır. Bunun yanında nispeten lomber ponksiyon gibi zor olmayan bir prosedürle elde edilebilir olması ve istenilen miktarda tekrarlanabilir biçimde ve hasta yaşadığı sürece alınabilmesi, BOS'u ilgi çeken bir biyolojik kaynak haline getirmiştir. Ancak her biyolojik kaynaktaki olduğu gibi BOS ile çalışmanın da zorlukları vardır. Bunlar arasında BOS'un yüksek tuz konsantrasyonu (150 mM), düşük protein konsantrasyonu, plazma/serumdaki gibi aşırı miktarda bazı proteinleri içermesi, lomber ponksiyon prosedürünün hastaya acı verici oluşu ve BOS alımı sırasında BOS'un kan ile kirlenmesi ihtimali sayılabilir. Bu nedenle BOS çalışmaları bu dezavantajlar göz önüne alınarak gerçekleştirilmelidir.

DOKU

Nörodejeneratif hastalıkların proteomiks yaklaşımla çalışılmasında insan beyin dokusu ulaşılabilirliğindeki zorluk, postmortem çalışmalarda karşılaşılan protein parçalanma problemleri ve parçalanmaya bağlı yanlış yönlendirici biyobelirteç proteinlerin bulunması nedeni ile az sayıda çalışmada kullanılmıştır. Hayvan modellerinden alınan dokular ile yapılan çalışmaların insana uygulanabilirliğindeki yetersizlikler hayvan modeli çalışmalarının zayıf yönü olmuştur. Tüm bunlara rağmen yinede doku çalışmalarından elde edilen yol gösterici veriler literatürde mevcuttur.^{45,46} Dokudan protein eldesinin kolaylığı, elde edilen protein örneğinin proteince zengin oluşu ve özellikle 2D jel örneklerinde temiz, tanımlanabilir binlerce protein spotunun bulunması deneysel olarak dokuya yönelimi artırmaktadır. Bunlara ek olarak beyinden alınan dokunun nöropatolojik inceleme ve kesin tanı koymada kullanılabilirliği, doku örneklerinden istenilen bölgenin kesilerek çalışılabilmesi ve PH gelişimi ile oluşmuş yapıların (mesela Lewy cisimlerinin) direk olarak incelenebilmesi de doku çalışmalarında çok önemli bir avantaj teşkil etmektedir.

HÜCRE KÜLTÜRÜ

Hücre kültürü çalışmaları hastalardan biyolojik madde alımının zor olduğu ve hastalığın biyokimyasal ve genetik mekanizmasının (gen susturma ve enzim assayleri gibi) anlaşılmasının istendiği durumlarda tercih edilmektedir. Yapılan çalışmalarda çoğunlukla primer hücre kültürü yerine ticari olarak eldesi kolay hücreler kullanılmaktadır. Bu hücreler arasında PH çalışmalarında özellikle tercih edilmesi gerekli olan hücre tipi, dopaminerjik nöron reseptörlerini eksprese eden SH-SY5Y hücreleridir. Hücre kültürü çalışmalarında dikkat edilmesi gerekli en önemli nokta elde edilen verilerin *in vitro* ortamda elde edildiğinin unutulmaması ve hücre tipi dikkate alınarak değerlendirilmesidir. Dolayısı ile elde edilen sonuçlara dikkatle yaklaşılmalı ve yorumlar gerektiğince abartılmadan yapılmalıdır. Bizim bu konudaki deneyimiz hücre kültürü çalışmalarının özellikle protein ekspresyonu, hücre içi lokalizasyon ve pro-

tein-protein etkileşimlerinin çalışılması konusunda faydalı olduğu yönündedir.

Kısaca elde edilen bilginin ifade ettiği değer açısından biyolojik materyalleri sıralamak gerekirse; canlı doku, post-mortem doku, hayvan modeli ve hücre kültürü şeklinde bir sıralama yapmak uygundur.

PROTEOMİKS ÇALIŞMALARINDAN ÇIKARTILAN SONUÇLAR

Parkinson üzerine yapılan proteomiks çalışmalarını ve biyobelirteç arayışlarını bir noktada toplamak oldukça güçtür. Bunun en temel nedeni yapılan çalışmalarda kullanılan biyolojik materyalin, metotların ve bunlara bağlı olarak da çıkan sonuçların farklı oluşudur. Bu duruma verilecek en güzel örneği son üç yıl içerisinde yapılan ve aynı biyolojik maddeyi kullanan üç farklı çalışma oluşturmaktadır. Ekim 2008'de tamamlanan bir çalışmada, Sinha ve ark. beyin omurilik sıvısını inceledikleri 14 Parkinson hastasında 2D-jel elektroforezi ve kütle spektrometresi kullanarak altı proteinin (Serum Albumin Precursor, Serum Albumin Chain-A, Hemoglobin b-Fragment, Mutant Globin, Proline Rich Repeat 14, Serum Transferin N-Terminal Lobe) biyobelirteç özelliği taşıyabileceğini göstermişlerdir.⁴⁷ Aynı yılın Aralık ayında yayınlanan bir başka çalışmada Guo ve ark. 14 adet Parkinson hastasında yedi farklı proteinin (Apolipoprotein E, Autotaxin, Complement C4a ve üç farklı SOD1 izoformu, Pigment Epithelium-Derived Factor) biyobelirteç özelliği taşıyabileceğini 2D-jel elektroforezi ve LC-MS/MS kullanarak göstermişlerdir.⁴⁸ Bunu takip eden 2010 yılı çalışmasında ise Constantinescu ve ark. 56 Parkinson hastasında yaptıkları çalışmada dört farklı proteinin (Ubiquitin, Microglobulin, iki adet Secretogranin Fragments) biyobelirteç özelliği taşıyabileceğini SELDI-TOF kullanarak tespit etmişlerdir.⁴⁹ İlginç olan bu çalışmalarda bulunan biyobelirteç proteinlerin hiçbirinin aynı olmayışıdır. Benzer şekilde insan substantia nigrasından gerçekleştirilen proteom analizinde iki farklı grup birbirinden tamamen farklı biyobelirteç proteinler tanımlamışlardır. Her iki grubun kullanmış oldukları biyolojik materyalin (SNpC) ve metotların (2D-jel elektroforezi ve

MALDI-TOF-MS) aynı oluşu uyumsuzluğun nedenini açıklama da araştırmacıları zor durumda bırakmaktadır.^{45,46} En genel manada belirtmek gerekirse, laboratuvarlar arası örtüşmeyen sonuçlar proteomiks çalışmalarının en zayıf noktasıdır. Bell ve ark. tarafından 2009 yılında gerçekleştirilen bir çalışmada 20 farklı laboratuvara gönderilen aynı örnek sadece yedi farklı laboratuvar tarafından doğru olarak analiz edilebilmiştir.⁵⁰ Bu nedenle validasyonu eksik veriler üzerinden güçlü yorumlar çıkarılırken çok dikkat edilmeli ve yanlış yönlendirici yorumlardan kaçınılmalıdır.

Hücre kültürü temelli çalışmaların değeri protein ekspresyonlarının hücre üzerindeki etkilerini anlamaktan kaynaklanmaktadır. Özellikle alfa-sinüklein adlı proteinin hücre toksisitesine yol açtığı ve toksisitenin mekanizması hücre kültürü üzerinden ortaya çıkartılmıştır.^{51,52} Bir diğer yaklaşımda ise hücre üzerinde toksik etki yaptığı düşünülen ve Parkinsonizme yol açan ajanlarının (6-OH dopamin, Rotenon, Dopamin, MPTP gibi) bu etkilerini nasıl gösterdiklerini anlamada kullanılmaktadır.⁵³

Doku temelli çalışmalara dokunun elde edilmesindeki zorluk nedeni ile pek sık rastlamıyoruz. Tüm beyin dokusunun çalışılması biyobelirteç protein bulunması açısından fayda sağlamayacağından, özellikle beyin hasar almış bölgesi çalışmalıdır ki bu bölge Parkinson hastalarında SNpC bölgesidir. Beynin küçük olan bu bölgesinin cerrahi yolla çıkartılması deneyim gerektirmekte ve özellikle hasarsız dokudan uzaklaştırılmış dokunun çalışılması gerekmektedir. Aksi takdirde elde edilen datanın validasyonu imkânsız hale gelmektedir. Doku çalışmalarında uygulanacak en akıllı yaklaşım lazer diseksiyonu yardımı ile elde edilen dokuların kullanılmasıdır. Lazer diseksiyonu yapılarak elde edilen dokudan çalışmış gen ekspresyon çalışmalarına literatürde rastlasak da, bu dokularla yapılmış pretom analizlerine rastlamadık.⁵⁴

Hayvan modelleri PH çalışmalarında sıklıkla kullanılmaktadır ve hayvan modelleri üzerinden elde edilen bulgular sayesinde PH oluşumunun moleküler mekanizması hakkında ciddi ipuçları elde edilmiştir.⁵⁵ Özellikle parkin-nakavt farelerle yapılan çalışmalar proteosomal yoldaki eksiklikle-

rin hücre metabolizmasını nasıl etkilediğini ve hücreyi nasıl bir strese maruz bıraktığını açıklar niteliktedir.⁵⁶ Alfa sinüklein eksik fareler ile yapılan çalışmalar alfa-sinükleinin neden motor nöronlara toksik etki yaptığını açıklar niteliktedir.⁵⁷ Kimyasal ajanlar kullanılarak oluşturulmuş PH hayvan modelleri ile gerçekleştirilmiş proteom çalışmaları bu ajanların neden PH'ya sebep olduğunu ortaya çıkarmıştır.⁵⁵ Bu çalışmalarda özellikle mitokondriyal metabolizmadaki bozuklukların ve oksidatif stressin PH oluşumdaki önemini ortaya çıkarılması vurguya değerlidir. PH çalışmalarında *Drosophila* modeli de kullanılmıştır. Özellikle A30P alfa sinüklein mutantını eksprese eden *Drosophila*, mitokondrinin ve hücre iskeleti elementlerinin PH oluşumundaki rolünü güçlendirmiştir.⁵⁸ Sonuç olarak altı çizilmesi gerekli olan en can alıcı nokta, bu modellerin faydalı çalışmalara ön ayak olmasının yanı sıra hiçbirisinin PH'yı taklit etme açısından birebir olmadığıdır. Dolayısı ile elde edilen tüm ve-

riler mutlaka insanda onanmalı ve dikkatle analiz edilmelidir.

SONUÇ

PH'nın doğru ve erken tanısı ancak doğru ve uygun bir biyobelirtecin veya biyobelirteç grubunun bulunması ile mümkün olacaktır. Böyle bir belirtecin bulunmasına giden yol ise proteomik çalışmalarından geçmektedir. Eğer kullanılan teknolojiler ve protokoller üzerinde laboratuvarlar arası bir birlik oluşturulabilirse, farklı araştırmacıların elde ettiği verileri karşılaştırmak ve doğrulamak mümkün olacaktır. Her ne kadar HUPPO (İnsan Proteom Organizasyonu) bu konuda ciddi adımlar atmışsa da, henüz böyle bir birliğin varlığından bahsetmek mümkün değildir. Bu duruma PH'nın karmaşık ve multifaktöryel yapısı da katkıda bulunmaktadır. Her şeye rağmen sarf edilen çabanın ümit verici sonuçları yakın gelecekte ortaya çıkacaktır.

KAYNAKLAR

- Morgan JC, Mehta SH, Sethi KD. Biomarkers in Parkinson's disease. *Curr Neurol Neurosci Rep* 2010;10(6):423-30.
- Van Den Eeden SK, Tanner CM, Bernstein AL, Fross RD, Leimpeter A, Bloch DA, et al. Incidence of Parkinson's disease: variation by age, gender, and race/ethnicity. *Am J Epidemiol* 2003;157(11):1015-22.
- Rajput AH, Birdi S. Epidemiology of Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord* 1997;3(4):175-86.
- de Rijk MC, Tzourio C, Breteler MM, Dartigues JF, Amaducci L, Lopez-Pousa S, et al. Prevalence of parkinsonism and Parkinson's disease in Europe: The EUROPARKINSON Collaborative Study. European Community Concerted Action on the Epidemiology of Parkinson's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1997;62(1):10-5.
- Langston JW. Epidemiology versus genetics in Parkinson's disease: progress in resolving an age-old debate. *Ann Neurol* 1998;44(3 Suppl 1):45-52.
- Siderowf A. Parkinson's disease: clinical features, epidemiology and genetics. *Neurol Clin* 2001;19(3):565-78.
- Torun Ş, Uysal M, Gücüyener D, Özdemir G. Parkinson's disease in Eskişehir, Turkey. *Eur J Neurol* 1995;2(Suppl 1):44-5.
- Rao SS, Hofmann LA, Shakil A. Parkinson's disease: diagnosis and treatment. *Am Fam Physician* 2006;74(12):2046-54.
- Halliday GM, McCann H. The progression of pathology in Parkinson's disease. *Ann N Y Acad Sci* 2010;1184:188-95.
- Elilbol B. [Parkinson's disease and cognitive functions]. *Türkiye Klinikleri J Neurol-Special Topics* 2008;1(4):131-8.
- Engelender S. Ubiquitination of alpha-synuclein and autophagy in Parkinson's disease. *Autophagy* 2008;4(3):372-4.
- Polymeropoulos MH, Lavedan C, Leroy E, Ide SE, Dehejia A, Dutra A, et al. Mutation in the alpha-synuclein gene identified in families with Parkinson's disease. *Science* 1997;276(5321):2045-7.
- Kitada T, Asakawa S, Hattori N, Matsumine H, Yamamura Y, Minooshima S, et al. Mutations in the parkin gene cause autosomal recessive juvenile parkinsonism. *Nature* 1998;392(6676):605-8.
- Kasap M, Akpınar G, Sazci A, Idrisoglu HA, Vahaboglu H. Evidence for the presence of full-length PARK2 mRNA and Parkin protein in human blood. *Neurosci Lett* 2009;460(3):196-200.
- Kızıltan G. [Motor symptoms and signs in Parkinson's disease]. *Türkiye Klinikleri J Neurol-Special Topics* 2008;1(4):23-30.
- Gaenslen A, Berg D. Early diagnosis of Parkinson's disease. *Int Rev Neurobiol* 2010;90:81-92.
- Niehaus L, Boelmans K. Diagnosis of Parkinson's disease--transcranial sonography in relation to MRI. *Int Rev Neurobiol* 2010;90:63-79.
- Reichmann H. Clinical criteria for the diagnosis of Parkinson's disease. *Neurodegener Dis* 2010;7(5):284-90.
- Grosset DG, Macphie GJ, Nairn M. Diagnosis and pharmacological management of Parkinson's disease: summary of SIGN guidelines. *BMJ* 2010;340:b5614.
- Kutukcu Y. [The differential diagnosis of Parkinson's disease]. *Türkiye Klinikleri J Neurol-Special Topics* 2008;1(4):6-14.
- Perkin DG. Parkinson's disease. An Illustrated Pocketbook of Parkinson's Disease and Related Disorders. 1st ed. New York: Parthenon Publishing; 2003. p.1-73.
- Jenner P. Molecular mechanisms of L-DOPA-induced dyskinesia. *Nat Rev Neurosci* 2008;9(9):665-77.

23. Jin J, Meredith GE, Chen L, Zhou Y, Xu J, Shi FS, et al. Quantitative proteomic analysis of mitochondrial proteins: relevance to Lewy body formation and Parkinson's disease. *Bra in Res Mol Brain Res* 2005;134(1):119-38.
24. Jin J, Hulette C, Wang Y, Zhang T, Pan C, Wadhwa R, et al. Proteomic identification of a stress protein, mortalin/mthsp70/GRP75: relevance to Parkinson disease. *Mol Cell Proteomics* 2006;5(7):1193-204.
25. Robinson PA. Protein stability and aggregation in Parkinson's disease. *Biochem J* 2008;413(1):1-13.
26. Tan JM, Wong ES, Lim KL. Protein misfolding and aggregation in Parkinson's disease. *Antioxid Redox Signal* 2009;11(9):2119-34.
27. Cuervo AM, Wong ES, Martinez-Vicente M. Protein degradation, aggregation, and misfolding. *Mov Disord* 2010;25(Suppl 1):49-54.
28. Betarbet R, Sherer TB, Greenamyre JT. Ubiquitin-proteasome system and Parkinson's diseases. *Exp Neurol* 2005;191(Suppl 1):17-27.
29. Nakamura T, Lipton SA. Cell death: protein misfolding and neurodegenerative diseases. *Apoptosis* 2009;14(4):455-68.
30. Gundersen V. Protein aggregation in Parkinson's disease. *Acta Neurol Scand Suppl* 2010;(190):82-7.
31. Hampe C, Ardila-Osorio H, Fournier M, Brice A, Corti O. Biochemical analysis of Parkinson's disease-causing variants of Parkin, an E3 ubiquitin-protein ligase with monoubiquitylation capacity. *Hum Mol Genet* 2006;15(13):2059-75.
32. Cookson MR. The biochemistry of Parkinson's disease. *Annu Rev Bioche* 2005;74:29-52.
33. Güney Y, Bilgihan A. [Ubiquitin system]. *Turkiye Klinikleri J Med Sci* 2002;22(6):616-9.
34. Henley S, Bates GP, Tabrizi SJ. Biomarkers for neurodegenerative diseases. *Turkiye Klinikleri J Neurol* 2008;3(2):77-86.
35. O'Farrell PH. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J Biol Chem* 1975;250(10):4007-21.
36. Wasinger VC, Cordwell SJ, Cerpa-Poljak A, Yan JX, Gooley AA, Wilkins MR, et al. Progress with gene-product mapping of the Mollicutes: *Mycoplasma genitalium*. *Electrophoresis* 1995;16(7):1090-4.
37. Gry M, Rimini R, Strömberg S, Asplund A, Pontén F, Uhlén M, et al. Correlations between RNA and protein expression profiles in 23 human cell lines. *BMC Genomics* 2009;10:365.
38. International Human Genome Sequencing Consortium. Finishing the euchromatic sequence of the human genome. *Nature* 2004;431(7011):931-45.
39. Kosak ST, Groudine M. Gene order and dynamic domains. *Science* 2004;306(5696):644-7.
40. Cho WC. Proteomics technologies and challenges. *Genomics Proteomics Bioinformatics* 2007;5(2):77-85.
41. Tannu NS, Hemby SE. Methods for proteomics in neuroscience. *Prog Brain Res* 2006;158:41-82.
42. Tambor V, Fucíková A, Lenco J, Kacerovský M, Reháček V, Stulík J, et al. Application of proteomics in biomarker discovery: a primer for the clinician. *Physiol Res* 2010;59(4):471-97.
43. Anderson NL, Polanski M, Pieper R, Gatlin T, Tirumalai RS, Conrads TP, et al. The human plasma proteome: a nonredundant list developed by combination of four separate sources. *Mol Cell Proteomics* 2004;3(4):311-26.
44. Waragai M, Nakai M, Wei J, Fujita M, Mizuno H, Ho G, et al. Plasma levels of DJ-1 as a possible marker for progression of sporadic Parkinson's disease. *Neurosci Lett* 2007;425(1):18-22.
45. Basso M, Giraud S, Corpillo D, Bergamasco B, Lopiano L, Fasano M. Proteome analysis of human substantia nigra in Parkinson's disease. *Proteomics* 2004;4(12):3943-52.
46. Werner CJ, Heyny-von Haussen R, Mall G, Wolf S. Proteome analysis of human substantia nigra in Parkinson's disease. *Proteome Sci* 2008;6:8.
47. Sinha A, Srivastava N, Singh S, Singh AK, Bhushan S, Shukla R, et al. Identification of differentially displayed proteins in cerebrospinal fluid of Parkinson's disease patients: a proteomic approach. *Clin Chim Acta* 2009;400(1-2):14-20.
48. Guo J, Sun Z, Xiao S, Liu D, Jin G, Wang E, et al. Proteomic analysis of the cerebrospinal fluid of Parkinson's disease patients. *Cell Res* 2009;19(12):1401-3.
49. Constantinescu R, Andreasson U, Li S, Podust VN, Mattsson N, Anckarsäter R, et al. Proteomic profiling of cerebrospinal fluid in parkinsonian disorders. *Parkinsonism Relat Disord* 2010;16(8):545-9.
50. Bell AW, Deutsch EW, Au CE, Kearney RE, Beavis R, Sechi S, et al. A HUPO test sample study reveals common problems in mass spectrometry-based proteomics. *Nat Methods* 2009;6(6):423-30.
51. Tanaka Y, Engelender S, Igarashi S, Rao RK, Wanner T, Tanzi RE, et al. Inducible expression of mutant alpha-synuclein decreases proteasome activity and increases sensitivity to mitochondria-dependent apoptosis. *Hum Mol Genet* 2001;10(9):919-26.
52. Tabrizi SJ, Orth M, Wilkinson JM, Taanman JW, Warner TT, Cooper JM, et al. Expression of mutant alpha-synuclein causes increased susceptibility to dopamine toxicity. *Hum Mol Genet* 2000;9(18):2683-9.
53. Fasano M, Bergamasco B, Lopiano L. The proteomic approach in Parkinson's disease. *Proteomics Clin Appl* 2007;1(11):1428-35.
54. Simunovic F, Yi M, Wang Y, Macey L, Brown LT, Krichevsky AM, et al. Gene expression profiling of substantia nigra dopamine neurons: further insights into Parkinson's disease pathology. *Brain* 2009;132(Pt 7):1795-809.
55. Sowell RA, Owen JB, Butterfield DA. Proteomics in animal models of Alzheimer's and Parkinson's diseases. *Ageing Res Rev* 2009;8(1):1-17.
56. Periquet M, Corti O, Jacquier S, Brice A. Proteomic analysis of parkin knockout mice: alterations in energy metabolism, protein handling and synaptic function. *J Neurochem* 2005;95(5):1259-76.
57. Ubhi K, Rockenstein E, Mante M, Inglis C, Adame A, Patrick C, et al. Alpha-synuclein deficient mice are resistant to toxin-induced multiple system atrophy. *Neuroreport* 2010;21(6):457-62.
58. Xun Z, Sowell RA, Kaufman TC, Clemmer DE. Protein expression in a Drosophila model of Parkinson's disease. *J Proteome Res* 2007;6(1):348-57.
59. Gasser T, Müller-Myhok B, Wszolek ZK, Oehlmann R, Calne DB, Bonifati V, et al. A susceptibility locus for Parkinson's disease maps to chromosome 2p13. *Nat Genet* 1998;18(3):262-5.
60. Farrer M, Gwinn-Hardy K, Muentner M, DeVriese FW, Crook R, Perez-Tur J, et al. A chromosome 4p haplotype segregating with Parkinson's disease and postural tremor. *Hum Mol Genet* 1999;8(1):81-5.
61. Liu Y, Fallon L, Lashuel HA, Liu Z, Lansbury PT Jr. The UCH-L1 gene encodes two opposing enzymatic activities that affect alpha-synuclein degradation and Parkinson's disease susceptibility. *Cell* 2002;111(2):209-18.
62. Tang B, Xiong H, Sun P, Zhang Y, Wang D, Hu Z, et al. Association of PINK1 and DJ-1 confers digenic inheritance of early-onset Parkinson's disease. *Hum Mol Genet* 2006;15(11):1816-25.
63. Dachsel JC, Farrer MJ. LRRK2 and Parkinson disease. *Arch Neurol* 2010;67(5):542-7.