

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**NARKOLEPSİ İLE İLİŞKİLİ OLABİLECEK GEN
POLİMORFİZMLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

SİNEM BETİNOĞLU

**TIBBİ BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

İZMİR-2009

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**NARKOLEPSİ İLE İLİŞKİLİ OLABİLECEK GEN
POLİMORFİZMLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

**TIBBİ BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

SİNEM BETİNOĞLU

Danışman Öğretim Üyesi: Doç. Dr. Sultan Cingöz

Bu araştırma Dokuz Eylül Üniversitesi, Bilimsel Araştırma Projeleri Şube Müdürlüğü tarafından 2008 K.B.SAG.013 sayı ile desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

Tabloların Listesi	I
Şekillerin Listesi	II
Kısaltmalar	IV
Teşekkür	V
Özet (Türkçe)	1
Özet (İngilizce)	2
Giriş ve Amaç	3
1.GENEL BİLGİLER	5
1.1 Tarihçesi	5
1.2 Epidemiyoloji	6
1.2.1 Narkolepsi Prevelansı	6
1.2.2 Genetik ve Çevresel Faktörler	6
1.3 Klinik Özellikler	7
1.3.1 Gündüz Aşırı Uyku Eğilimi (GAUE)	7
1.3.2 Katapleksi	8
1.3.3 Uyku Paralizi	9
1.3.4 Hipnogojik ve Hipnopompik Halüsinasyonlar	9
1.3.5 REM Uyku Fenomeni ve Narkolepsi	9
1.3.6 Diğer Semptomlar	11
1.4 Hastalığın Tanısı	12
1.4.1 Polisomnografi (PSG)	12
1.4.2 MSLT	12
1.5 Hastalığın Tedavisi	13
1.6 Narkolepsi Genetiği	14
1.6.1 HLA DQB1*0602 ve Narkolepsi ile İlişkisi	14
1.6.2 Hipokretin ve Narkolepsi ile İlişkisi	16
1.6.3 Narkolepsi İle İlişkili Bulunan Diğer Genler	18

2. GEREÇ VE YÖNTEMLER	22
2.1 Hasta-Kontrol Gruplarının Belirlenmesi ve Periferik Kan Örneklerinin Alımı	22
2.2 Alınan Kan Örneklerinden DNA İzolasyonu	22
2.3 İzole Edilen DNA'nın Konsantrasyonunun ve Saflığının Saptanması	24
2.4 PCR ile Belirlenen Gen Bölgelerinin Çoğaltılması	25
2.4.1 PCR'da Kullanılan Komponenteler	25
2.4.2 Primerlerin Dizayn Edilmesi	26
2.4.3 Primerlerin Hızırlanması	28
2.4.4 PCR'nin Hazırlanışı	28
2.4.4.1 CPT1B Gen Bölgelerinin Çoğaltılması.....	28
2.4.4.2 HLA DQB1*0602 Allelinin Çoğaltılması.....	32
2.4.5 PCR Ürünlerinin Agaroz Jelde Görüntülenmesinde Kullanılan Kimyasallar ve Gereçler	33
2.4.6 PCR Ürünlerinin Sekans Analizleri	35
2.4.6.1 Karşılaştırma (BLAST) Analizi.....	36
2.4.6.2 Dizi Analiz Programının Kullanılması.....	36
3. BULGULAR	37
3.1 Olgu Grubunun Oluşturulması	37
3.2 PCR Ürünlerinin Oluşturulması ve Görüntülenmesi	37
3.2.1 Çoğaltılan CPT1B Gen Bölgelerinin Jel Görüntüleri	37
3.2.2 Çoğaltılan HLA DQB1*0602 Allelinin Jel Görüntüsü.....	45
3.3 DNA Dizi Analizi Verileri	47
4. TARTIŞMA	56
SONUÇ VE ÖNERİLER	66
KAYNAKLAR	67
EK-1 Hasta Bilgilendirme Ve Onam Formu	
EK-2 Epworth Uyku Testi	

TABLO LİSTESİ

Tablo 2.1. Çoğaltılan bölgelerin ve kullanılan primer dizilerinin listesi	27
Tablo 2.2. CPT1B ekzonlarının (11. ekzon hariç) çoğaltılması için kurulan PCR işleminde kullanılan bileşenler ve miktarları.....	29
Tablo 2.3. CPT1B, 11. ekzonun çoğaltılması için kurulan PCR için kullanılan bileşenler ve miktarları.....	30
Tablo 2.4 CPT1B gen bölgelerinin çoğaltılması için kullanılan PCR profilleri	31
Tablo 2.5. HLA DQB1*0602 allelinin çoğaltılması için (602) ve pozitif kontrol olarak kullanılan (HGH1) primerlerin listesi.....	32
Tablo 2.6. DQB1*0602 allelinin çoğaltılması için kurulan PCR reaksiyonlarında kullanılan bileşenler ve miktarları	33
Tablo 2.7. DQB1 alleinin çoğaltılması için kullanılan PCR profili	33
Tablo 3.1. DQB1*0602 pozitifliği ve katapleksili narkolepsi hastaları.....	47
Tablo 3.2. Dizi analizi yapılan bölgelerde saptanan SNP'ler	48
Tablo 3.3. SNP'lerin olgu ve kontrol grubundaki genotip ve allel yüzdeleri	50
Tablo 4.1. Polimorfizmlerin görüldüğü Hastalar.....	58
Tablo 4.2. Hap Map ile belirlenen, SNP'lerin Avrupa popülasyonundaki genotip ve allelik frekansları.	63

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1.1 Gece boyunca uykuda görülen evreler	10
Şekil 1.2 HLA sınıflarının gösterimi	15
Şekil 1.3 Yağ asidi oksidasyonu.....	20
Şekil 1.4 CPT1B geninin genomik organizasyonu.....	21
Şekil 3.1 rs5770917 SNP'sini içeren bölgenin çoğaltılması.....	38
Şekil 3.2 CPT1B, 2. ekzon içeren bölgenin çoğaltılması.....	38
Şekil 3.3 CPT1B, 3. ekzonunu içeren bölgenin çoğaltılması.....	39
Şekil 3.4 CPT1B, 4. ekzon içeren bölgenin çoğaltılması.....	39
Şekil 3.5 CPT1B, 5. ekzon içeren bölgenin çoğaltılması.....	40
Şekil 3.6 CPT1B, 6. ve 7. ekzonu içeren bölgenin çoğaltılması	40
Şekil 3.7 CPT1B, 8. ve 9. ekzonu içeren bölgenin çoğaltılması	41
Şekil 3.8 CPT1B, 10. ekzonu içeren bölgenin çoğaltılması.....	41
Şekil 3.9 CPT1B, 11. ekzonu içeren bölgenin çoğaltılması.....	42
Şekil 3.10 CPT1B, 12. ve 13. ekzonlarını içeren bölgenin çoğaltılması	42
Şekil 3.11 CPT1B, 14. ve 15. ekzonlarını içeren bölgenin çoğaltılması	43
Şekil 3.12 CPT1B, 16. ekzonu içeren bölgenin çoğaltılması.....	43
Şekil 3.13 CPT1B, 17. ekzonu içeren bölgenin çoğaltılması.....	44
Şekil 3.14 CPT1B, 18. ve 19. ekzonları içeren bölgenin çoğaltılması	44
Şekil 3.15 HLA DQB1*0602 alelinin çoğaltılması	45
Şekil 3.16 rs3213445 SNP'sinin heterozigot durumda kromotogram görüntüsü.....	51
Şekil 3.17 rs8142477 SNP'sinin heterozigot durumda kromotogram görüntüsü.....	51
Şekil 3.18 rs470117 SNP'sinin heterozigot durumda kromotogram görüntüsü.....	52
Şekil 3.19 rs3213446 SNP'sinin heterozigot durumda kromotogram görüntüsü.....	52
Şekil 3.20 rs131759 SNP'sinin heterozigot durumda kromotogram görüntüsü.....	52
Şekil 3.21 rs2269383 SNP'sinin heterozigot durumda kromotogram görüntüsü.....	53
Şekil 3.22 rs131760 SNP'sinin heterozigot durumda kromotogram görüntüsü.....	53
Şekil 3.23 rs8137478 SNP'sinin heterozigot durumda kromotogram görüntüsü.....	53
Şekil 3.24 rs5770917 SNP'sinin heterozigot durumda kromotogram görüntüsü.....	54
Şekil 3.25 rs5770911 SNP'sinin heterozigot durumda kromotogram görüntüsü.....	54
Şekil 3.26 rs2073604 SNP'sinin heterozigot durumda kromotogram görüntüsü.....	54

Şekil 3.27 rs2073605 SNP'sinin heterozigot durumda kromotogram görüntüsü.....	55
Şekil 3. 28 rs12160714 SNP'sinin heterozigot durumda kromotogram görüntüsü.....	55
Şekil 4.1 Karnitin poloyiltransferaz sistemi	60
Şekil 4.2 CRAT ve CPT'nin protein benzerliklerine bağlı olarak ekzonlarında korunan bölgelerin gösterimi.....	63

KISALTMALAR

APC: Antijen Sunan Hücre

bp: Baz Çifti

CPT1B: Karnitin Palmotoltransferaz 1B

dNTP: Deoksiribonükleotit

GAUE: Gündüz Aşırı Uyku Eğilimi

HCRT: Hipokretin

HLA: İnsan Lökosit Antijeni

ICSD: Uluslararası Uyku Bozuklukları Sınıflandırılması

IgG: İmmünglobulin

kb: Kilo Baz

MSLT: Çoklu Uykuya Geçiş Testi

MHC: Major Doku Uyum Kompleksi

MZ: Monozigotik

OD: Optik Dansite

PCR: Polimeraz Zincir Reaksiyonu

PSG: Polisomnografi

RT-PCR: Eş zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu

SNP: Tek Nükleotid Polimorfizmi

SOREMP: REM başlangıçlı Uyku Periyodu

TBE: Tris-Borat-EDTA

TEŞEKKÜR;

Baş koyduğum bu yolun daha en başında duran biri olarak, bu yolda ilerlemem için, bilgisini ve desteğini hiçbir zaman esirgemeyen danışman Hocam Doç. Dr Sultan Cingöz'e teşekkür ederim.

Projemizde yer alan hastaların tanılarının konmasında ve proje için gerekli her türlü katkıyı sağlamaları nedeniyle, Prof. Dr. Barış Baklan, Doç Dr. İbrahim Öztura Hocama, Dr. Ahmet Evlice'ye ve tüm Nöroloji Anabilim Dalı çalışanlarına teşekkür ederim. Ayrıca çalışmamız için belirlenen kontrol grubu hastalarının kanlarının alımında bize karşılıksız olarak yardım eden Elif Özen'e çok teşekkür ederim.

Anabilim Dalı Başkanımız Neşe Atabey'e, bana ilk yolu göstermiş olan Prof. Dr. Meral Sakızlı'ya ve başım sıkıştığı anda düşünmeden yardım isteme özgürlüğünü tanıdıkları için tüm Anabilim Dalı öğretim üyelerine teşekkür ederim.

İyi ve kötü halimde aynı içtenlikle yanımda olan Kıprıslıma, kahve aralarında beni yalnız bırakmayan Emine'ye, hoş sohbetlerinden dolayı Peyda'ya, masadaşım Sanem'e ve tüm bölüm arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Ayrıca uzaktada olsa elimi tutmayı asla bırakmayan, her an yanımda olduğunu bana hissettiren ve varlığı bile destek nedenim olan Eray Ağılkaya' ya sonsuz teşekkürler.

Son olarak, her anımda karşılıksız arkamda olan ve bunu bana her an hissettiren aileme, en başta da herşeyim anneme bana her karanlık anımda ışık tuttuğu ve annem olduğu için teşekkürlerin yetmeyeceğini bilsem de sonsuz teşekkür ederim.

Sinem Betinoğlu

ÖZET

NARKOLEPSİ İLE İLŞKİLİ OLABİLECEK GEN

POLİMORFİZMLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Sinem Betinoğlu

Dokuz Eylül Üniversitesi, Tıp Fakóltesi, Tıbbi Biyoloji ve Genetik AD. Balçova- İZMİR

Narkolepsi; gündüz aşırı uyku eğilimi, katapleksi, halüsinasyon, uyku paralizisi, SOREMP görülmesi ve bölünen gece uykuları ile karakterize olan kronik nörolojik bir uyku bozukluğudur. Prevalansı %0,002-0,18 arasında olup, farklı populasyonlarda değişlik göstermektedir. Çalışmalar narkoleptiklerin 1.derece akrabalarında, narkolepsi oluşma riskinin normal populasyondan (10-40 kat) fazla olduğunu gösterirken, diğer yandan ise düşük konkordanslı monozigotik(MZ) ikizler rapor edilmiştir. Bu çalışmalar narkolepsinin etiyolojisinde çevresel ve genetik faktörlerin kompleks etkileşimlerinin yattığını göstermektedir. Narkolepsinin patofizyolojisinin hala bilinmemesine rağmen, köpek türlerindeki narkolepsi etiyolojisinde hipokretin reseptör-2 gen mutasyonunun rol oynadığını gösterilmiştir. İnsan narkolepsisinde böyle bir mutasyona rastlanılmamıştır fakat, beyin omurilik sıvısında (BOS) hipokretin seviyelerinin ve hipokretin üreten nöronların spesifik olarak sayılarının azaldığı bulunmuştur. Bilinen bir diğer bulgu, katapleksili narkolepsi ile HLA DQB1*0602 alt tipi arasındaki ilişkidir. Bu çalışmada, son zamanlarda artan assosiyasyon çalışmaları sonucu narkolepsiye yatkınlık ilişkisi saptanan karnitin palmitoiltransferaz 1B (CPT1B) genindeki polimorfizmler ve mutasyonlar araştırılmıştır. CPT1B ezimi kalp ve iskelet kasında gerçekleşen uzun zincirli yağ asidlerinin beta-oksidasyonunun kontrolündeki anahtar enzimdir. İlişkili Tek Nükleotid Polimorfizm (SNP) bölgeleri ve CPT1B'nin okunan tüm ekzonları ve ekzon intron sınırları PCR ile çoğaltılarak DNA dizi analizleri yapıldı. Otuz hasta ve 50 sağlıklı birey ile çalışıldı ve 13 SNP saptandı. Bazı ekzonlarının dizi analizleri hem olgu hemde kontrol grubunda gerçekleştirildi. İlgili SNP'ler ve gendeki diğer SNP'lerin genotipik ve allelik frekansları hesaplandı. Ayrıca katapleksisi bulunan ve bulunmayan narkolepsi hastalarında HLA DQB1*0602 alt tipinin bulunup bulunmadığı yine PCR yöntemi ile araştırıldı. Katapleksili narkolepsi hastalarında HLA DQB1*0602 pozitifliği %90.9 olarak bulunurken, kontrol grubunda bu oran %14 olarak bulundu.

ANAHTAR KELİMELER:Uyku bozukluğu, Karnitin Palmitoiltransferaz(CPT) Sistemi, Beta-Oksidasyon, İnsan Lökosit Antijeni (HLA).

ABSTRACT

IDENTIFICATION OF SINGLE NUCLEOTIDE POLIMORPHISMS ASSOCIATED WITH NARCOLEPSY

Sinem Betinoğlu

Department of Medical Biology and Genetics, Dokuz Eylöl University School of Medicine.
Balçova- İZMİR/ TURKEY sinem.betinoglu@gmail.com

Narcolepsy is a chronic neurological sleep disorder which is characterized by, excessive daytime sleepiness, cataplexy, hallucinations, sleep paralysis, SOREMPs and disturbed night time sleep. The prevalence is between %0,002-%0,18, and it shows difference in diverse populations. Studies revealed that the risk of a first-degree relative of a narcoleptic developing narcolepsy is higher risk (10-40 times) than in the general population, but on the other hand, monozygotic (MZ) twin pairs have been reported with a low concordance. These studies indicate a complex interaction of environmental and genetic factors has been implicated in the etiology of narcolepsy. The pathophysiology of the disorder is still unknown, recent findings showed a mutation of type 2 hypocretin receptor (Hcr2) plays a major role in the etiology of canine narcolepsy. Human narcolepsy is generally not due to Hcr2 gene mutations although profoundly reduced hypocretin levels in cerebrospinal fluid (CSF) and a specific reduction of hypocretin containing neurons has been described. The other studies showed a strong association with HLA DQB1*0602 allele. The present study, SNPs which is thought of susceptible to narcolepsy and mutations in the exons and exon-intron boundaries of carnitine palmitoyltransferase 1B (CPT1B) was screened. CPT1B is a key enzyme in the control of beta-oxidation of long-chain fatty acids in the heart and skeletal muscle. PCR amplifications followed by DNA sequence analyses of the regions include SNPs and all exons of the CPT1B which are translated. Thirty narcolepsy patients and 50 healthy individuals were included in the study. Some of the exons are sequenced in patient and control groups. Totaly 13 SNPs are revealed. Genotype and allelic frequencies were calculated. Additionally presence of HLA DQB1*0602 allele in patients with narcolepsy were studied. In study, presented that %90.9 of narcolepsy-cataplexy patients and %14 of control group were positive for HLA DQB1*0602.

KEY WORDS

Sleep Disorder, Carnitine Palmitoyltransferase (CPT) System, Human Leucocyte Antigen (HLA).

GİRİŞ ve AMAÇ

Narkolepsi başlıca, gündüz yaşanan aşırı uyku eğilimi ve neden olduğu uylu atakları, duygusal değişimlerle tetiklenen katapleksi, halüsinasyonlar ve uyku paralizi ile karakterize olan kronik nörolojik bir uyku bozukluğudur. Başlıca narkolepsi tetradı olarak kabul edilen bu dört semptomun yanı sıra bölünen gece uykuları ve genellikle uykuya erken dalmaları, REM başlangıçlı uyku periyodu (Sleep Onset REM Priods, SOREMPs) sergilemeleri de diğer semptomlardır. Narkolepsi, Uluslararası *Uyku Bozuklukları Sınıflandırılması-2* (ICSD-2) kararlarına göre; katapleksili narkolepsi, katapleksisiz narkolepsi ve tıbbi koşullara bağlı gelişen narkolepsi olmak üzere üç farklı gruba ayrılmıştır. Üç farklı tipteki en büyük ortak özellik gündüz yaşanan aşırı uyku eğilimidir. Bu rahatsızlığın semptomları bireylerin tüm hayatlarını etkilemektedir. Devamlı bitkin, yorgun ve uyuma isteği yaşayan hastalar karşı konulmaz uyku atakları yaşamaktadırlar. Bu uyku atakları günün herhangi bir saatinde (toplantı yaparken, araba kullanırken, konuşurken) gerçekleşebilir. Katapleksi ise kişilerde gerçekleşen ani duygu değişimleri sonucunda vücut kaslarındaki gevşemeler ile kendini gösterir. Halüsinasyonlar ve uyku paralizi ise kişilerin rahat uyku uymalarını önler ve oldukça rahatsız edicidir.

Narkolepsinin prevalansı popülasyondan popülasyona oldukça farklılık göstermektedir. Şimdiye kadar yapılan çalışmalarda en yüksek prevalans Japon'yada(%0,18), en düşüğü ise İsrail'de(%0,002) tespit edilmiştir. Amerika' sa ise 2000 kişide 1 gözlediği bilinmektedir. Belirlenen bu prevalanslarını aslında çok daha yüksek olduğu düşünülmektedir. Bazı hastaların narkolepsiyi ılımlı şekilde yaşamaları ya da kişilerin bilgilendirilme eksikleri nedeni ile semptomlar dayanılmaz hale gelene kadar narkolepsi olduklarının farkına varmamalarının, narkolepsi prevalansının olduğundan daha az tespit edilmesine neden olduğu düşünülmektedir.

Narkolepsinin temelinde gerçekte neyin yattığı hala tam olarak çözülememiştir. Genetik temeli bulma amaçlı yapılan 1. derece akraba çalışmalarında narkolepsi riskinin arttığı gözlemlenirken, monozigotik ikizler (MZ) ile yapılan çalışmalarda düşük konkordans gözlenmiştir. Kısacası narkolepsi temelinde hem genetik faktörlerin hem de çevresel faktörlerin rol oynadığı multifaktöriyel bir uyku bozukluğudur. Köpek cinslerinde ailesel narkolepsinin altında yatan temelin genetik olduğu ve Hcrt-2 geninin mutasyonunun

otozomal resesif kalıtı olarak ortaya çıktığı gösterilmiştir. Fakat insan narkolepsisinde böyle bir mutasyona rastlanmamıştır.

Narkolepsi ile ilgili bilinen diğer bir konu ise, katapleksili narkolepsi ile HLA allelleri arasında yakın ilişki bulunduğudur. Katapleksili narkolepsi hastalarının %90'ında HLA DQB1*0602 allelinin pozitif olduğun gösterilmiştir. Bu oran katapleksisiz narkolepsi hastalarında %40 civarındadır.

Ülkemizde narkolepsi ile ilgili yapılan çalışmaların azlığı dikkat çekmektedir. Türkiye'deki narkolepsi prevalansı ile ilgili geniş kapsamlı bir bilgi bulunmamaktadır. Populasyonlar arası narkolepsi prevalansının farklılık gösterdiğinin bilinmesi ve ülkemizde bu tarz çalışmaların olmaması nedeni ile ülkemiz populasyonunda narkolepsi çalışmaları ile ilgili bilgi toplamı oldukça azdır.

Bizim çalışmamızda, böylesine kompleks olan narkolepsinin anlaşılmasına katkı sağlanmak amaçlanmıştır. Katapleksilli narkolepsi ile ilişkisi olduğu gösterilen HLA DQB1*0602 allelinin, populasyonlar arası farklılık göstermesine bağlı olarak, Türkiye'deki narkolepsi hastalarının DQB1 HLA*0602 alleli ve klinik özellikleri arasındaki ilişkisi ortaya çıkarılmak istenmiştir.

Çalışmanın diğer bir kolunda, narkolepsinin genetik temelini ortaya çıkarmak amacı ile daha önce Miyagawa ve arkadaşları tarafından yapılan genom boyu assosiyasyon çalışmasından yola çıkılarak, narkolepsi ile ilişkili olduğu düşünülen rs5770917 polimorfizminin ve bu polimorfizmin bulunduğu karnitin palmitoiltransferaz (CPT1B) geninin ekzonlarının dizi analizi yöntemi ile araştırılması ve yeni nükleotid değişimlerinin varlığının ve frekanslarının saptanması amaçlanmıştır. Belirlenen polimorfizmlerin seçilen hasta grubunda ki ve narkolepsisi olmayan kontrol grubunda genotip ve allelik frekansları incelenip, klinik özellikleri ile kıyaslanarak oldukça kompleks bir bozukluk olan narkolepsi için spesifik tanısal işaretlerin belirlenmesi ve yeni tedavi protokollerinin gelişmesine katkı sağlanmak amaçlanmıştır.

Seçilen polimorfizm ve gen ile ilgili yapılan benzer başka bir yayına rastlanmamıştır. Bu neden ile Türkiye'de de ilk kez araştırılacak olan gen ve polimorfizmlerin sonucunda narkolepsi için yeni aydınlatıcı bilgilere ulaşılmak hedeflenmiştir.

1. GENEL BİLGİLER

1.1 Tarihçesi

Narkolepsi; gündüz aşırı uyku eğilimi (GAUE), katapleksi, uyku paralizi ve halüsinasyonlar ile karakterize olan kronik nörolojik bir bozukluktur(1,2,3).

Narkolepsinin tüm karakteristiğinin ortaya çıkması yıllar süresince araştırmacıların narkolepsili bireyleri gözlemlenmeleri ve farklı semptomların da farkına varılması ile gerçekleşmiştir. Öyle ki hala bu gözlemlere yenileri eklenerek artmaktadır.

Narkolepsi terimi ilk kez Fransız doktor Jean-Pabtiste-Edouard Gelineau tarafından 1880 yılında kullanılmıştır. Kökeni yunanca olan bu sözcük narke (hissizlik, uyuşma) ve lepsis (atak) sözcüklerinin birleşiminden oluşmaktadır. Gelineau, bu terimi şarap tüccarı hastasının genellikle uyukulu olan halinden ve kısa süreli yaşadığı uyku ataklarından yola çıkarak oluşturmuştur(4).

Narkolepsinin ilk tanımının 1880 yıllarında olmasına karşın literatürde geriye gidildiğinde 1877 ve 1878 yıllarında, sırası ile Alman doktor Westphal ve Fisher tarafından, uyku ataklarını, ani duygusal değişimler ile tetiklenen kas güçsüzlüğünü yaşayan bireyleri vaka raporları olarak yayınladıkları görülmektedir.(4).

Daha sonraki yıllarda narkolepsinin uykusuzluk durumu ve uyku atakları dışındaki semptomları olan katapleksi (Löwenfeld, 1902), uyku paralizi (Kinner Wilson 1928) ve halüsinasyonlar ayrı ayrı tanımlanmıştır.(4,5)

1957 yılında ise Yoss ve Daly, günümüzde hala geçerliliğini koruyan ve “narkoleptik tetrad” olarak adlandırılan dört semptomu birden tanımlamıştır: GAUE, katapleksi, uyku paralizi ve halüsinasyon(4,5).

Günümüzde narkolepsi Uluslararası Uyku Bozuklukları Sınıflandırılması (International Classification of Sleep Disorders, ICSD-2) tarafından, katapleksili narkolepsi, katapleksisiz narkolepsi ve tıbbi koşullar nedeniyle gelişen narkolepsi olmak üzere üç gruba ayrılmıştır. Her grubun ortak semptomu gündüz yaşanan uykusuzluk, uyuma eğilimi ve uyku ataklarıdır(6).

Aşağıda da açıklanacağı üzere zaman içerisinde narkolepsinin semptomları yapılan yeni gözlemler ile genişletilmiştir.

1.2 Epidemiyoloji

1.2.1 Narkolepsi Prevalansı

Narkolepsi prevalansı günümüze kadar birçok ülke ve etnik grupta araştırılmıştır ve bu araştırmalar sonucunda, etnik gruplara ve ülkelere göre narkolepsi frekansının farklılık gösterdiği saptanmıştır(1). Farklı frekanslara rağmen, İngiltere (7), Fransa (8), Çek Cumhuriyeti (2) ve ABD’de (9) hastalığın görülme yüzdesi birbirlerine yakın olup %0.02-0.067 arasındadır. En yüksek prevalans Japonya’da (%0,16-0,18) (1), en düşük prevalans ise İsrail’de (%0.002)(10) saptanmıştır. Katapleksili narkolepsi hastalarının frekansı, katapleksisiz narkolepsi hastalarından daha düşüktür. Katapleksili ve katapleksisiz narkolepsi prevalansları bazı toplumlarda *Multiple Sclerosis* (MS) prevalansına yaklaşmaktadır(11). MS hastalığının, narkolepsiye oranla farkındalığının yüksek olduğu açıktır, fakat prevalanslarının yakınlığı da gözden kaçırılmamalıdır.

Narkolepsi hastalığının ortaya çıkma yaşı çocukluk çağından ellili yaşlara kadar geniş bir dağılım göstermektedir. En sık başlama yaşı, 15 yaş ve 36 yaş civarındadır(12,2). Başlama yaşını bimodal dağılım göstermesinin nedeni bilinmemektedir. Hastalığın görülme sıklığında cinsiyet yönünden anlamlı bir farklılık olmayıp, kadınlarda ve erkeklerde yaklaşık olarak eşit sıklıkta görülmektedir(2).

1.2.2. Genetik ve Çevresel Faktörler

Narkolepsi tanısı konan kişilerin ailelerinde de benzer ya da aynı şikayetleri yaşayan bireylerin olduğu vakalar 19. yy’dan beri bilinmektedir. Yukarıda bahsedilen narkolepsili vaka tanımlarını ilk yapan kişiler olarak bilinen, Westpal’ın hastasının annesinde ve Fisher’ın hastasının kız kardeşinde, probanda benzer şikayetlerin yaşandığı not edilmiştir(1). O yıllardan itibaren bir çok ailesel hikayeye sahip narkolepsi vakası bildirilmiştir. Standart tanı kriterleri kullanılarak yapılan çalışmalarda ailesel vakalar Japonya’da %4.3(2), ABD’de %6(13), Fransa’da %7.6 ve Kanada’da %9.9(12)olarak belirlenmiştir(3). Bu çalışmalardaki oranların gerçekte daha yüksek olabileceği düşünülmektedir. Çünkü probandın akrabaları arasında, semptomların hepsini tam anlamıyla göstermeyip, orta ya da zayıf şiddette uyu

problemi yaşıyan kişilerin araştırma sırasında gözden kaçırılmış olabileceği düşünülmektedir(14). Ayrıca bu düşünce, bireylerin uyku problemlerini ciddi olarak yaşadıklarının ve narkolepsi hastası olduklarının bile farkına çok geç varmaları düşünüldüğünde oldukça olasıdır.

Birinci derece akrabalarda narkolepsi görülme riskinin %1-2 yani genel popülasyonda görülme riskinden 10-40 kat daha fazla olduğu gösterilmiştir(14,15,16). Bu sonuç narkolepside genetik temellerin varlığını göstermiştir. Narkolepsinin genetik temelli bir hastalık olup olmadığının daha iyi anlaşılması için narkoleptik monozigotik (MZ) ikizler ile yapılan çalışmada sadece %25-31 konkordans görülmüştür.(17,3). Narkolepsinin genetik geçişli olduğu düşünülürken saptanan bu düşük konkordans, hastalığın gelişiminde çevresel faktörlerin de önemli oranda rol oynadığına işaret etmiştir(1,18). Hem MZ ikizlerde görülen düşük konkordans hem de travma(19), uyuma alışkanlığındaki ani değişimler(20), enfeksiyon(1,21) gibi çevresel faktörler sonucunda da narkolepsinin ortaya çıktığı vakalar çevresel faktörlerin rol oynadığı fikrini desteklemektedir.

Tüm bu bulgular narkolepsinin, hem genetik hem de çevresel faktörlerin rol oynadığı multifaktöriyel bir hastalık olduğunu göstermektedir. Hastalık ile ilgili her gün yeni ve önemli bilgiler edinilmesine karşın, hem genetik hem de çevresel faktörlerin etkileri net olarak anlaşılmış değildir.

1.3 Klinik Özellikler

Narkolepsinin başlıca dört semptomu ve bu semptomların yanı sıra görülen semptomlar aşağıda açıklanmıştır. Semptomların fazla olmasına rağmen, çalışmalar narkolepsi hastalarının sadece %20-25'inde birden tüm semptomların görüldüğünü ortaya koymuştur(3).

1.3.1. Gündüz Aşırı Uyku Eğilimi (GAUE)

Gündüz aşırı uyku eğilimi narkolepsinin birincil ve ana semptomudur. ICSD-2 tarafından üç gruba ayrılan narkolepsinin hepsinin tanısında ortak özellik olarak GAUE bulunmaktadır(6). Narkoleptik kişiler kronik uykusuzluk, yorgunluk ve bitkinlik çekerler. Gün boyunca uykusuz hissedilmesi hastaların sedatif yaşam sürmelerine neden olur. Bu hisler, kişilerin kısa süreli uyumaları (15-30 dk) ile hafifletilebilir, fakat uyku ile kazanılan

yenilenme hissi çok uzun sürmemektedir. Bu durum, günlük hayatta insanların yaşadığı uykusuzluk yorgunluk durumundan çok daha ciddi boyutlardadır. Uykusuzluk hissi karşı konulamaz boyutlara ulaşması ile kişiler “uyku atakları” yaşamaktadırlar. Uyku atakları, önceden ön görülemeyecek biçimde yemek yerken, bisiklet sürerken, araba kullanırken, çok önemli bir toplantının ortasında, kısacası günün herhangi bir anında gerçekleşebilir(1,18). Uyku atakları sırasında kişiler tamamen bilinçsiz, uyku durumdadırlar. Bazı durumlarda bu ataklar yarı bilinçli olarak yaşanabilir ve kişiler o anki işlemlerine devam edebilirler (tutarsızca konuşma, yazma vb.). Bu durum, otomatik davranış olarak adlandırılmaktadır(1).

Kronik olarak GAUE yaşanması hastaların yaşam biçimlerini olumsuz yönde ve ciddi şekilde etkilemektedir. Kişilerde bitkinlik ve yorgunluk sonucu hayattan zevk alamama ve depresyon durumları gelişebilmekte, yaşanan uyku atakları ile de kişilerin hayatlarını sürdürebilmelerinde ciddi zorluklar oluşmaktadır(1,18).

1.3.2. Katapleksi

Katapleksi sözcüğü yunanca kökenli olup “gözlerin sabitleşmesi” anlamına gelmektedir(4).

Klinik açıdan katapleksi, duygusal değişimler ile tetiklenen ani kas güçsüzlüğü olarak tanımlanmaktadır(1). Duyguların olumlu yönde (gülme, eğlenme, mutlu olma, tuttuğu takımın gol atması, yolda arkadaşı ile karşılaşması) ya da olumsuz yöndeki (üzülme, korkma, tedirgin olma) değişimleri sonucu katapleksi tetiklenmektedir(21,22,7). Vücuttaki kaslarda, duygulardaki ani değişimler sonucu atoni yaşanır. Vücut kaslarındaki bu tutulum farklılık göstermektedir. Kaslardaki gevşemenin çoğunlukla, sadece dizlerde bükülme, baş düşmesi, yüz kaslarının titremesi, çenenin sarkması ve kollarda güçsüzlük olarak görülmesinin yanı sıra daha ileri katapleksi tutulumlarında tüm vücut kasları etkilenmekte ve bu durum kişinin yere yığılmasına (*collapse*) neden olmaktadır. Bu durum birkaç saniyeden birkaç dakikaya kadar sürebilir. Bu sırada kişi uyanıktır ve bilinç kaybı gerçekleşmez fakat refleksler tamamen yok olur(18). Görmede bulanıklaşma ve ptozis görülebilir.

Hastalarda nadir de olsa “status katapletikus” denilen durum gerçekleşebilir. Bu durumda, katapleksi atakları çok sık aralıklarla gerçekleşir ve kişinin yatağa bağımlı kalmasına neden olur (1).

1.3.3. Uyku Paralizi

Uyku paralizi, uyku sırasında, uykuya dalarken ya da uyanma sırasında gerçekleşen kısa süreli hareket edememe (uyku felci) durumudur(5). Narkolepsi hastalarının %20-50'sinde görülmekle birlikte normal populasyonun %5-40'ında da görülmektedir. Paraliz sırasında kişiler tamamen hareketsiz kalırlar ve isteseler de hareket edemez, parmaklarını bile kaldıramaz, ses çıkaramazlar. Bu durum birkaç saniyeden birkaç dakikaya kadar sürebilir. Kendiliğinden ya da dışarıdan gelen ses ve dokunma gibi uyarılarla sonlanabilir. Halk arasında karabasan olarak da adlandırılan bu durumlara halüsinasyonlar da eşlik edebilir. Bu gibi durumlar hastalar için oldukça korkutucu ve sıkıntı vericidir(5).

1.3.4. Hipnagogik Ve Hipnopompik Halüsinasyonlar

Halüsinasyonlar uykuya dalarken (hipnagogik) ya da uyanma sırasında (hipnopompik) gerçekleşebilirler(2-65). İşitsel, görsel olabileceği gibi senestezik (synesthetic) de olabilir. Görsel halüsinasyonlar renkli halkalar görme şeklinde basit olabileceği gibi, odanın içindeki eşyaların şekil değiştirmesi ya da olmayan canlıların görülmesi gibi daha karmaşık halde de ortaya çıkabilir. İşitsel halüsinasyonlar, sesler duyma, melodi işitme şeklinde olabilir. Senestezik halüsinasyonlar ise bedenin uzayda hareketi ya da yatağın üzerinde yüzüyor hissi şeklinde yaşanabilir(5).

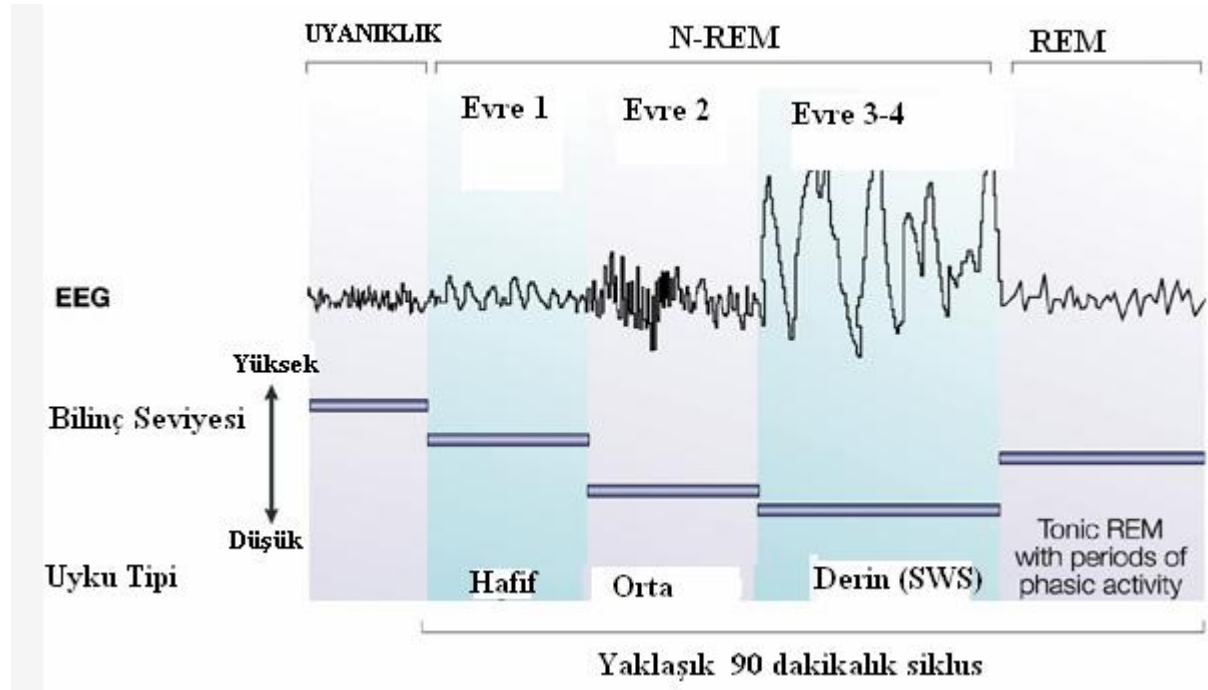
Halüsinasyonların narkoleptik kişilerde görülme sıklığı %20-65 iken, normal popülasyonda görülme sıklığı yaklaşık olarak %36'dır. Hipnagogik halüsinasyonlar, genellikle halüsinasyonların 2/3'ünü oluştururlar ve bundan dolayı narkolepsi için daha iyi indikatördür(5).

1.3.5. REM Uyku Fenomeni ve Narkolepsi

Günümüze kadar uyku ile ilgili birçok hipotez ve teori ortaya konmasına karşın uyku hala tam olarak anlaşılammış kompleks bir süreçtir. Ortalama olarak yaşam süremizin üçte birini uyku ile geçirdiğimiz düşünüldüğünde uyku ile ilgili yapılan tüm çalışmaların anlamı daha da büyümektedir.

Normal uyku, evreleri olan bir süreçtir. Yetişkin bireylerin normal uyku paternleri yaklaşık 90 dk'da bir tekrarlanan "non-rapid eye movement" (N-REM) ve "rapid eye

movement” (REM) süreçlerinden oluşmaktadır(5). N-REM, uykuya dalma ile başlayan ve dört fazı bulunan bir süreçtir. Birinci ve ikinci faz, hafif uyku olarak adlandırılırken, 3. ve 4. faz derin uyku ya da “slow wave sleep” (SWS) olarak adlandırılır. N-REM, elektroensefalogramda yavaşlamış, senkronize elektriksel aktivite gösterir ve bu süreçte vücutta kısmi kas gevşemesi yaşanır. N-REM’den sonra beyinin elektriksel aktivitesi tekrar yükselişe geçip uyanıklık sürecine benzer desenkronize, düşük amplitüdü aktivite gösterir.(23,3). Bu süreç de REM olarak adlandırılır. Rüyaların görülmesi, kasların tamamen relaksasyona uğrayıp tüm vücutta kas atonisinin yaşanması ve fazik göz hareketleri ile karakterizedir(5,3) Bütün bir uyku süresince NREM ve REM evreleri birbirlerini tekrarlayarak ilerlerler ve her tekrarlanışta SWS(derin uyku) süresi azalırken, REM süresi artmaktadır(5). Uykunun evreleri Şekil .1’de gösterilmiştir.



Şekil 1.1 Gece boyunca uykuda görülen evreler(24).

Uyku-uyanıklık fizyolojisinde genel olarak kabul gören nöroanatomikal model, uyku-uyanıklığın aminojerjik ve kolinerjik hücre gruplarının resiprokal inhibisyon ya da aktivasyonu ile düzenlendiğidir. Monoaminojerjik sistem uyanıklık sırasında aktif olup kolinerjik sistemin inhibisyonunu sağlar. Monoaminojerjik aktivitenin azalması ile kolinerjik sistem üzerindeki inhibisyon kalkar ve REM uykusuna geçiş sağlanır(25,23). Aminojerjik sistem uyanıklık

sırasında aktif iken REM sırasında inaktif, kolinerjik sistem ise en üst düzeyde aktiftir(23). Tüm bu süreçte, beyin sapı, talamus, bazal önbeyin başta olmak üzere birçok beyin bölgesi ve noradrenalin, serotonin, asetilkolin, histamin, hipokretin gibi birçok nörotransmitter rol oynamaktadır.(32)

Narkoleptik hastaların uyku düzenleri ise, normal olan uykunun dışında patern gösterir. N-REM ve REM siklusları açısından farklılıklar incelendiğinde, normal uyku N-REM ile başlayıp REM ile devam ederken, narkolepsi hastalarının uykuya REM uykusu ile başladıkları gösterilmiştir. Bu durum REM başlangıçlı uyku “Sleep Onset REM Sleep” (SOREMP) olarak adlandırılır. ICSD-2 kriterlerine göre, hastaların yaklaşık 15 dk’dan daha az sürede REM uykusuna geçiş yapmaları narkolepsi tanı kriteri olarak kabul edilmektedir. Uyku paternindeki bu değişiklik narkolepsi tanısında kullanılan kilit bir özelliktir(6). Diğer bir değişiklik ise başlangıçta kısa süreli olup uykunun ilerlemesiyle süresi artan REM uyku periyodu, narkolepsi hastalarında uykunun ilk başından itibaren uzun sürelidir ve uykunun ilerlemesiyle süresinde artma gözlenmez(5).

Halüsinasyon, paraliz ve katapleksi REM uyku fenomeni olarak da adlandırılmaktadır(3). Bazı araştırmacılara göre bu semptomların, uyuma ile uyanıklık arasında kalma ve vücudun tam olarak ne uykuya ne de uyanıklık durumuna senkronize olamamasından dolayı kaynaklandığı düşünülmektedir.

1.3.6. Diğer Semptomlar

Yukarıda anlatılan narkoleptik tetradın dışında hastalarda zamanla başka semptomların varlığı da gözlenmiştir. Bu semptomların hastalığın görüldüğü kişilerde homojen dağılım göstermemesi nedeni ile narkolepsi semptomları arasında bulunup bulunamayacakları tartışılmaktadır. Narkoleptik kişilerde gözlenen diğer bir semptom, gece uykularının sık sık ortaya çıkan uyanmalar ile bölünmesi sonucu yaşanan insomniyadır(1,5). Bu gibi durumlarda kişilerin gündüz istem dışı uyumalarının yanı sıra gece uyuyamamaları önemli bir paradoksu ortaya koymaktadır.(5). Genel olarak narkoleptik hastalar normal kişilerden daha kısa sürede uykuya dalarlar, gündüz kısa süreli uyku atakları geçirirler fakat normal kişilerden daha fazla uyumazlar(33).

Ayrıca, narkolepsi ile birlikte periyodik bacak hareketleri(34), REM davranış bozuklukları(35,36), diğer parasomniyalar ve obstruktif uyku apnesi(1), uyku terörü, uykuda konuşma-yürüme gibi rahatsızlıklar da gözlenebilir.

1.4 Hastalığın Tanısı

ICSD-2 içeriğinde belirtildiği üzere narkolepsinin tanısı başlıca iki yöntem kullanılarak yapılmaktadır: Poligrafik uyku incelemelerinden biri olan ve uykunun tüm gece boyunca kaydının yapıldığı nokturnal polisomnogram ve ertesi gün yapılması önerilen Çoklu Uykuya Geçiş Testi (Multiple Sleep Latency, MSLT)(6).

Bunun yanı sıra şikayeti olan kişilerde, Epworth Uyku Skala'sı (*Epworth Sleep Scale*) uygulanmaktadır. Bu skala gündüz aşırı uyku eğiliminin varlığını ortaya koymak amaçlı uygulanmakta ve genellikle dokuzun üzerinde alınan puanlar buna işaret etmektedir(37). Bu skala ek-2 olarak sunulmuştur.

1.4.1 Polisomnografi (PSG)

Polisomnografi, gece boyunca uykuda birçok fizyolojik parametrenin eşzamanlı kaydı, analizi ve yorumlanması amacıyla kullanılan bir yöntemdir. Poligrafik uyku incelemelerinde, uykunun nokturnal kaydı yapılmaktadır ve kişinin EEG, EMG, solunum düzeni ve vücut hareketleri, bağlanılan elektrotlar yardımı ile incelenir.

Nokturnal uyku polisomnografisinde, uyku apnesi, periyodik bacak hareketleri gibi GAUE'ne neden olan diğer uyku bozukluklarının olup olmadığı tespit edilebilmektedir ve böylece narkolepsi dışında diğer uyku bozuklukları dışlanabilmektedir(22).

Genellikle polisomnografinin uygulandığı günün hemen ardındaki gün hastaya MSLT testi uygulanır.

1.4.2 Çoklu Uykuya Geçiş Testi (MSLT)

Çoklu Uykuya geçiş testleri fizyolojik uykuya eğilimi değerlendirmede kullanılır.[4-19] Genellikle bu test yapılmadan önceki gece hastanın polisomnografisi çekilmiş olur. Gündüz uygulanan bu testte hastaya rahat, sessiz, karanlık bir oda sağlanarak, saat 10:00 dan itibaren

ikişer saat arayla hastalardan uyumaları istenir. Uyumaları istendikten sonra yirmişer dakikalık poligrafik monitörizasyon yapılır. Işıklar kapatıldıktan sonra uyku başlayana kadar olan zaman ölçülür. Uykuya geçiş süresi sekiz dakikanın altında ise bu değer patolojik olarak kabul edilmektedir. Uykuya geçiş süresinin dışında bu test süresince REM ve NREM kaydı da yapılır. Uykuya daldıktan sonraki ilk 15 dk içerisinde REM uykusuna geçiliyorsa bu SOREMP olarak değerlendirilir (38).

Bu teste en az 2 SOREMP görülmesi ve sekiz dakikadan önce uykuya geçişin görülmesi narkolepsi tanısında kullanılır(6).

Günümüz narkolepsi tanısında başlıca MSLT yöntemi kullanılmasına karşın %15 narkolepsi hastalarında negatif sonuç çıkabilmekte ya da başka uyku bozukluğu olan kişilerde test pozitif sonuç verebilmektedir(39). Bu gibi durumlarda hastalardan alınan anamnezin önemi artmaktadır.

1.5 Hastalığın Tedavisi

Narkolepsi tedavisi şüana kadar maalesef semptomatik tedavi olmaktan ileri gidememiştir. Hastalığın yaşanılan tüm semptomlarını tamamen ortadan kaldırılabilmesi ya da baş edilebilir hale gelmesi için birçok sınıf ilaç önerilmekte ve kullanılmaktadır(47).

GAUE'nin tedavisi için ilk başta önerilen mümkün olabildiği çerçevede hastaların gündüz belirli aralıklarla uyumalarıdır(88). Fakat bu öneri çalışan ve birçok sorumluluk taşıyan günümüz insanı için pek mümkün olmamaktadır. Uyku ataklarını önlemek ve uyanık kalmayı sağlamak için merkezi sinir sistemini (MSS) uyarıcı ilaçlar kullanılmaktadır. Bu ilaçların başında amfetamin ve amfetamin benzeri ilaçlar ile farklı yollar üzerinden etkisini gösteren modafinil, selejilin, kafein ve gamahidroksibutirat gelmektedir.

Amfetaminler etkilerini noradrenalin, dopamin ve serotoninin nörotransmisyonunu arttırarak gösterirlerken, modafinil ise noradrenerjik inhibisyonu arttırarak etki göstermektedir.(40)

Katapleksi tedavisi için tercih edilen ilaçlar antidepresanlardır. Bunların başında trisiklik antidepresanlar, serotonin geri alım inhibitörleri (41), monoamin oksidaz inhibitörler (42), viloksazin (43), reboksetin (44) gelmektedir. Başlıca etki mekanizmaları monoaminlerin geri alımlarını inhibe etmektir.

Fragmente gece uykularının verimli hale getirilebilmesi için ise benzodiazepin ve benzodiazepin olmayan hipnotikler kullanılmaktadır(45). Bu hipnotikler etkilerini, GABAerjik tonüsü arttırarak gösterirler.

İlk defa 1974 yılında narkolepsi semptomları için kullanılması önerilen gamahidroksibütirat ya da diğer adı ile sodyum oksibatın narkolepsinin tüm semptomları üzerinde olumlu etkilerinin gösterilmesi, tedavi sürecince en çok tercih edilen ilaç olmasını sağlamaya başlamıştır. Kendi reseptörüne bağlanarak etkisini gösteren bu metabolitin dopaminerjik nörotransmisyonu inhibe ederken, hipotalamik GABAerjik transmisyonu arttırarak(46), GAUE, katapleksi, halüsinasyonlar, paraliz ve fragmente gece uykusu üzerinde ki olumlu etkileri gösterilmiştir.(47,45)

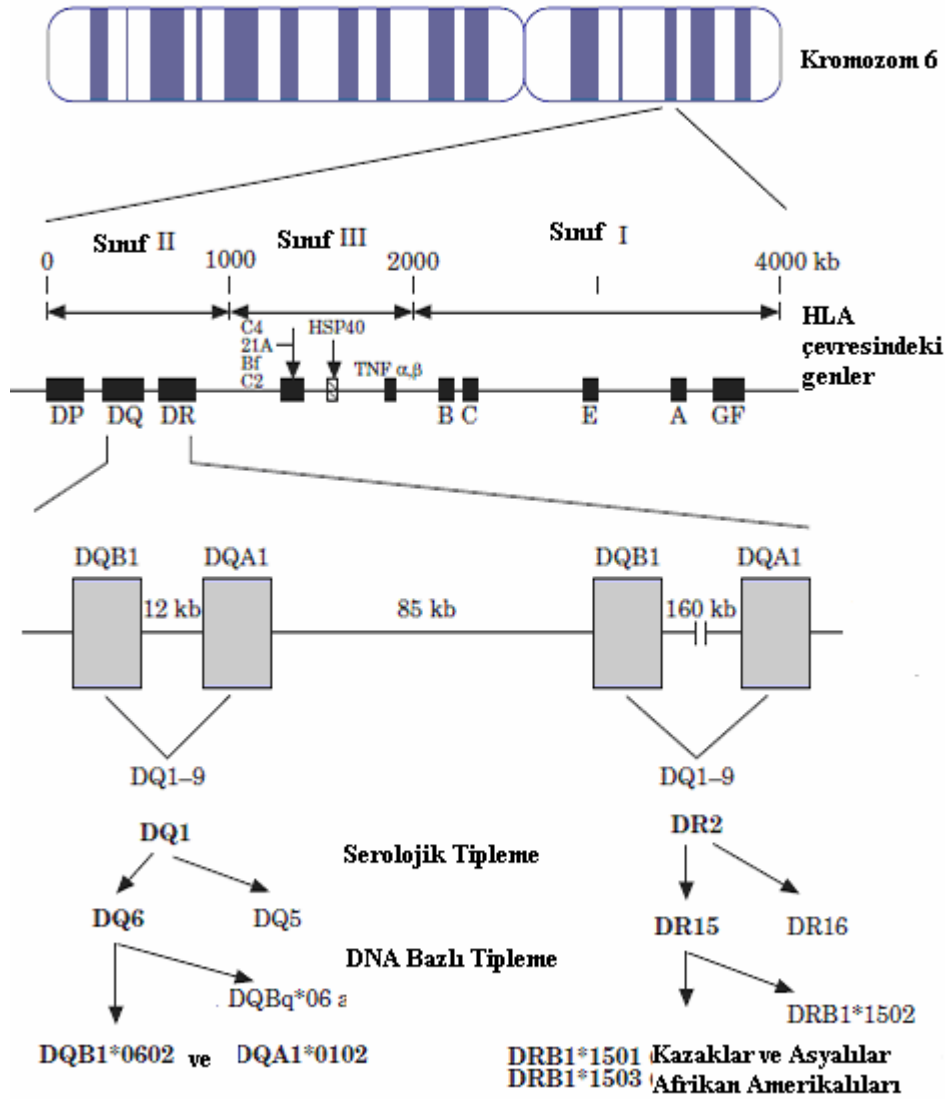
1.6 Narkolepsi Genetiği

1.6.1 HLA DQB1*0602 ve Narkolepsi İlişkisi

Bağışıklık sisteminin kendinden olanı ve olmayanı tanıması için gerekli olan doku antijenlerini kodlayan gen bölgesi, *Büyük Doku uyum Kompleksi* (Major Histocompatibility, *MHC*) olarak adlandırılır. İlk olarak beyaz kan hücrelerinde gösterilen bu genler, 6. kromozomun kısa kolunda yerleşmiş olup *Human Leukocyte Antigens*, HLA bölgesi olarak da adlandırılır. Çok sayıda immün ve immün olmayan genin yer aldığı yaklaşık 4000 kb büyüklüğündeki bu bölge, kodlanan proteinlerin özelliklerine göre *Sınıf I*, *II*, *III* olarak ayrılmaktadır(3).

HLA Sınıf II bölgesi Şekil 1.2’de gösterildiği gibi sentromere yakın yerleşmiş olup; HLA -DRA, -DRB, -DQA, -DQB,-DPA, -DPB, -DNA, -DMA, -DOB lokuslarını ve çeşitli psödogenleri içerir. HLA Sınıf II moleküller, kovalan olmayan bağlarla bir arada tutulan *alfa* ve *beta* olmak üzere iki adet transmembran glikoprotein zincirinden oluşan heterodimerlerdir. HLA-DQA1 alfa zincirini kodlarken HLA-DQB1 beta zincirini kodlar ve hem alfa hem de beta genlerindeki sayısız polimorfizmler ile benzersiz çeşitlilikte ürün oluştururlar(88). T lenfositlerde özgünlüğü sağlayan, T hücre reseptörleri (TCR) ve MHC molekülleridir. Sınıf II MHC molekülleri, peptidler ile dayanıklı kompleksler oluşturarak onların T lenfositler(CD4) tarafından tanınabilecek şekilde hücre yüzeyinde sergilenmesini sağlarlar ve bir dizi sinyal, hücre içine iletilir. Kısacası antijenin sunulması, MHC ye bağımlı bir olaydır ve Sınıf II MHC

molekülleri, B lenfositlerde, monosit, makrofaj, dentritik, timus epitelyumu gibi antijen sununan hücrelerin (APC) yüzeyinde bulunmaktadır(3). HLA alt birimlerinin insülin bağımlı diabetes mellitus, MS, romatoid artrit gibi birçok hastalıkla ilişkisi olduğu gösterilmiştir(48).



Şekil 1.2 HLA sınıflarının gösterimi(88).

Narkolepsinin HLA ile ilişkisi Japon popülasyonunda 1983'de bulunmuştur. Çalışmada tüm hastalarda DR2 pozitif olarak bulunurken, kontrol grubunda ise %33 pozitiflik gözlenmiştir(49). DR2 ile narkolepsinin ilişkisi Kafkaslarda benzer şekilde bulunurken(3-langdon), Afrikan-Amerikalı'larda (50) bu ilişki oldukça düşük bulunmuştur. Daha sonraki

çalışmalarda DR bölgesinden yaklaşık 80 kb kadar uzaklıkta bulunan DQ bölgesinin de narkolepsi ile ilişkisi olduğu gösterilmiştir(51). Çeşitli etnik gruplarda yapılan ve tekrlanan çalışmalarda, DQB1*0602'nin farklı etnik gruplar arasında narkolepsinin en specific belirteci olduğu ortaya konmuştur(17). Normal populasyonda DQB1*0602'nin pozitifliği %12-38 arasında iken katapleksi-narkolepsi hastalarında bu oranın %90 olduğu gösterilmiştir(17,3). Katapleksisiz narkolepsi hastalarında oran düşük olup %41'dir(3) Bu allelin homozigot olarak taşınmasının hastalığın gelişme riskini iki ile dört kat arası arttırdığı gösterilmiştir.(53) Bu allelin katapleksili narkolepsi için tanı kriteri olması düşünülürken, DQB1*0602'nin negatif olduğu narkolepsi-katapleksi hastaların varlığıve populasyonlar arası değişim gösterişi tartışılmaktadır(88).

Bütün bu bulgular narkolepsinin temelinde otoimmün bir bozukluğun rol alabileceğini ve DQB1 allelinin katapleksinin temelinde rol oynayabileceğini düşündürmüştür. Fakat bugüne kadar yapılan çalışmalarda bunu netleştirecek kesin bir kanıt bulunamamıştır. Tipik otoimmünite patolojisini gösteren eritrosit sedimantasyonu, serum Ig miktarı, C-reaktif protein seviyeleri, lenfosit kümelenme oranları normal bulunmuştur(14). Beyin omurilik sıvısında (BOS) IgG oligoklonal banda ya da hcrt spesifik IgG antikoruna bağlanma gözlenmemiştir(55,3). Kısacası hümorale ya da hücrel ümmünite açısından bir inflamasyon kanıtı elde edilememiştir.

1.6.2 Hipokretin ve Narkolepsi İlişkisi

Hipokretin nöropeptidi 1998 yılında Sakurai ve De Lecea yönetimindeki iki farklı grup tarafından eş zamanlı tanımlanmıştır(56,57). 17q21 bölgesinde bulunan hipokretin (Hcrt) geninin ürünü olan pre-prohipokretin (131 amino asit) öncül proteininin proteolitik kesilmesi sonucu hipokretin-1(oreksin A) (33 aminoasit) ve hipokretin-2 (oreksin B) lineer peptidi (28 aminoasit) olmak üzere iki ayrı peptid oluşmaktadır.(55,47). Bu iki farklı proteinin farklı G protein-bağlı reseptörü olan hcrt-1 ve hcrt-2 reseptörleri tanımlanmıştır(58).

Hipokretin üreten nöronların yerleşiminin yoğunlukla lateral, posterior ve perifornikal hipotalamusda yani vücuttaki çoğu homeostatik olayların düzenlendiği yerde bulunduğu gösterilmiştir.(59,58) Bu nöronlar beyinin beslenme ve uyku-uyanıklık siklusunda rol alan diğer bir çok alana projeksiyon yapmaktadırlar(3). Başlangıçta birincil rolünün beslenme mekanizmasını düzenlemek olduğu düşünölmekteydi fakat köpeklerde görölen narkolepsinin

çözümlemesi ile hipokretinin diğer bir önemli rolünün uyku ve uyanıklık döngüsünü düzenlemek olduğu anlaşıldı(58).

Köpek narkolepsi modeli ilk kez 1973 yılında tanımlanmıştır. Daha sonraki yıllarda yapılan çalışmalarda, pozisyonel klonlama yöntemi ile hcrtr-2 reseptörünü kodlayan gende (canarc-1) mutasyon olduğu ve bu mutasyonun ailesel canine narkolepsisine neden olduğu gösterilmiştir.(2,60) Doberman ve Labrador cinslerinde hastalığın otosomal resesif ve tam penetrans özellikte geçiş gösterdiği gösterilmiştir(88). Sporadik narkolepsili köpeklerde bu mutasyona rastlanılmamıştır fakat BOS hipokretin seviyeleri düşük bulunmuştur. Bu bilgiler ailesel ve sporadik narkolepsinin temellerinin farklı olabileceğini göstermiştir (2). Daha sonra çalışmalar pre-prohipokretin “knockout” farelerin üzerinde yoğunlaşmış ve bu özellikteki farelerin, insan narkolepsisi ile çok benzer semptomları yaşadıkları gözlemlenmiştir(61).

Canine narkolepsisinde Hcrtr-2 geninde mutasyonun bulunması narkolepsinin çözümlenmesi için çok önemli bir gelişme olmuştur ve insanlarda da hipokretin sistemi çalışmaya başlanmıştır(2). Günümüze kadar yapılan Hcrt gen mutasyon çalışmalarında sadece 6 aylık bebek olan atipik narkolepsi olgusunda transversiyona (T'nin G'ye değişimi ile lösinin, arjinin amino asidine) neden olan mutasyona rastlanmıştır(62). Köpek cinslerinde görülen narkolepsisinin monogenik yapısına rağmen insan narkolepsisinin multifaktöriyel bir rahatsızlık olduğu bu çalışmalarla daha da güçlenmiştir.

BOS'daki normal hipokretin-1 seviyesi yaklaşık olarak 200 pg/ml iken narkolepsi hastalarında bu seviye 100 pg/ml altında bulunmuştur. BOS sıvısındaki hipokretin-1 seviyesinin düşük olarak bulunması, hipokretin eksikliğinin ve anormal nörotransmisyonunun insan narkolepsisinde rol aldığını göstermiştir.(63,2). Aynı zamanda lateral hipotalamusta hipokretin üreten nöronların sayılarındaki azalma in-situ hibridizasyon yöntemi ile gösterilmiştir (64). Post-mortem beyin dokularında yapılan immünohistokimya ve radyoimmünojenik çalışmalar sonucunda düşük düzeylerde pre-prohipokretin RNA'sı ve hipokretin peptidinin eksikliği gösterilmiştir.(2, 15).

Beslenme dışında uyku-uyanıklık döngüsünde de rolü olduğuna tatmin olunan hipokretin nöronlarının uyanıklık sırasında yüksek olduğu ve uyanık kalmayı sağlayan diğer nöronları (aminerjik, dopaminerjik, histaminerjik) aktive ederek monoamin tonüsü arttırdığı ve uykunun başlamasını önlediği gösterilmiştir(23).

1.6.3. Narkolepsi İle İlişkili Bulunan Diğer Genler

Günümüze kadar birçok genin narkolepsi ile ilişkisi araştırılmıştır. Elde edilen bulguların ışığında, immün sistemde rol alan genler ve uyku regülasyonunda yer alan nörotransmitterlerin genleri üzerine yoğunlaşmıştır.

Uyku ve immün sistemin regülasyonunda rol alan monoamin oksidaz-A(MAO-A)(26), Tümör Nekrosis Faktör- α (TNF- α)(27), Tümör Nekrosis Faktör Reseptörü-2 (TNFR2)(28), Katekol-O-Metiltransferaz (COMT)(29), Hcrt ve hipokretin yolağında yer alan genlerinin narkolepsi ile ilişkileri polimorfizm ve mutasyon analizleri yapılarak araştırılmıştır. Bu genlerde birçok polimorfizm bulunmuştur.

Genom bağlantı analiz çalışmaları, narkolepsiden etkilenen geniş ailelerin bulunmasının zor olmasından dolayı sayılıdır. İlk genom bağlantı analizi 8 küçük Japon ailesi ile yapılmıştır ve sonuç olarak 4p13-q21 bölgesi narkolepsi ile ilişkili bulunmuştur(30). İkinci yapılan çalışmada ise 21q da bulunan 5 Mb'lık bölgenin narkolepsi ile ilişkilendirilmiştir(31). Her iki çalışmada da belirlenen bölgedeki genlerin narkolepsi ile ilişkilerinin araştırılmasının gerekliliği belirtilmiştir.

Son yıllarda genom boyu assosiyasyon çalışmaları sıklaşmış olup yeni bölgeler ve genler tanımlanmaya başlanmıştır. Bu çalışmalardan birinde 21q22.3 bölgesinde, polimorfizmin güçlü "linkage disequilibrium" gösterdiği bölgede tanımlanmamış 3 gen bulunmuştur ve "reporter-gene assay" çalışması ile bu bölgede bulunan genlerden NLC1-A aday geninin narkolepsi direnç geni olabileceği öne sürülmüştür(65). Diğer bir assosiyasyon çalışmasında T-hücre reseptör alfa lokusu(TRA@) ile narkolepsi ilişkilendirilmiştir(66).

Bizim çalışmamıza kaynak olan, yapılan genom boyu assosiyasyon çalışmasında karnitin palmitoiltransferaz 1B (carnitine palmitoyltransferase 1B, CPT1B) ve kolin kinaz beta (choline kinase beta, CHKB) genlerinin arasında bulunan rs5770917 *Tek Nükleotid Polimorfizmi'nin* (Single Nucleotide Polymorphism, SNP) narkolepsi ile ilişkili olduğu gösterilmiştir(67). Bu iki genden CPT1B'nin çalışılmasına karar verilmiştir. İlişkili bulunan bu SNP'nin CPT1B geninin başlama kodonunun yalnızca 1000bp yukarısında yerleşim göstermesi, güçlü LD saptanan diğer bir SNP (rs5770911)' nin CPT1B geninin 11. intronunda bulunması ve uyku regülasyonunda rol aldığını gösteren yayınlar nedeni ile bu gen çalışılmıştır.

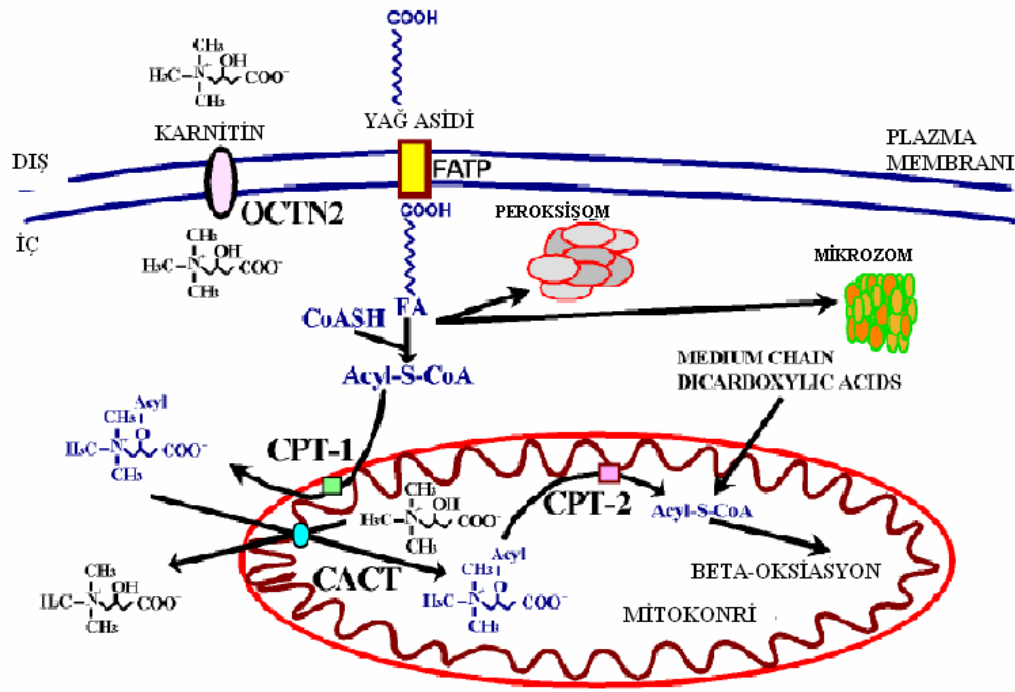
CPT1B Geni

CPT1B enzimi uzun zincirli yağ açıl-CoA'ların, beta-oksidasyonları için sitoplazmadan mitokondriye geçmelerini sağlayan enzimdir.

Yağ asitlerinin katabolizması büyük oranda mitokondri matriksinde gerçekleşen beta-oksidasyon yolu ile gerçekleşmektedir. Açlık ve uzun süreli egzersiz gibi durumlarda yağ asitlerinin mitokondriyal oksidasyonu vücudun enerji homeostasisi için elzem bir yoldur(68).

Mitokondriyal yağ asidi oksidasyonunun gerçekleşmesi için yağ asitlerinin hücre içerisine alındıktan sonra, sitoplazmadan mitokondri içerisine taşınmaları gerekmektedir. Orta ve kısa zincirli yağ asitleri basit difüzyon ile mitokondri membranını geçebilirken, uzun zincirli yağ asitleri (UZYA) geçemezler(68.) UZYA sitoplazmadan mitokondri matriksine geçmesinde CPT sistemi rol almaktadır. Bu enzimatik kompleks 2 farklı proteinden oluşmaktadır(68); mitokondri dış zarında(69) bulunan ve iki transmembran domaini olan (70,71) CPT1 ve mitokondri iç zarında bulunan CPT2. CPT2 tüm dokularda aynı formda bulunurken, CPT1'in dokulara spesifik üç farklı gen tarafından eksprese edilen 3 izoformu bulunmaktadır: Karaciğer tipi CPT-1A(72), kas-tipi CPT-1B(73) ve beyin tipi CPT-1C(74). Bu izoformların lokalizasyonları sırasıyla şöyledir; 11q13.1-q13.5, 22q13.31-q13.32, 19q13.33. UZYA'lerinin beta-oksidasyonunun anlaşılabilmesi için işlem basamakları aşağıda kısaca anlatılmıştır ve Şekil 1.3' de özetlenmiştir.

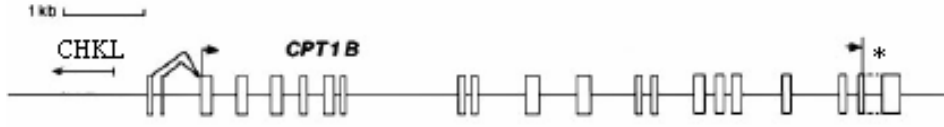
Yağ asitleri yağ dokusundan ayrılıp, spesifik membran taşıyıcılarına bağlanarak hücre içerisine alınırlar ve açıl CoA sentetaz enzimi ile koenzim A'ya bağlanırlar. Hücre sitoplazmasından mitokondri içerisine geçebilmeleri için öncelikle hidrofilik özellikte olan karnitin (β -hidroksi- γ -trimetilamonyum bütirat) molekülüne gereksinim duymaktadır(24). Karnitin yüksek enerjili ester bağı ile yağ asidinin karboksilik asit kısmına CPT1 enzimi ile bağlanır. Oluşan açilkarnitin dış zardan geçtikten sonra, mitokondrinin iç zarından açilkarnitin translokaz (CACT) yardımı ile geçer. Matrikse geçmesi sağlandıktan sonra, karnitinin CPT2 enzimi ile serbestleşmesi sağlanır. Serbestleşen karnitin, aynı zamanda kendisinin hücre içinde birikimini sağlayan CACT enzimi ile sitoplazmaya geri gönderilir. Yağ asidinin tekrar koenzim A ile konjuge olması ile beta-oksidasyon işlemi başlar(75).



Şekil 1.3 Yağ asidi oksidasyonu (75)

Mitokondriyal yağ asidi oksidasyonunda başlıca düzenleyici olan enzim CPT1 enzimidir(68). Bu özelliği, CPT1 inhibitörü malonil-CoA'ya olan duyarlılığından kaynaklanır(76). Açlık ve aşırı egzersiz durumlarında malonil-CoA miktarı azalmakta ve CPT1 üzerindeki inhibitör etkisi ortadan kalkmakta ve yağ asidi oksidasyonu artmaktadır. Besin alma durumunda ise bu düzen tam ters olarak işler ve malonil-CoA, CPT1B'yi inhibe eder(75).

22q13.31-q13.32'de lokalize olduğu FISH yöntemi ile gösterilen(72) CPT1B geninin, c-DNA'sı ilk kez 1995 yılında, genomik dizi analizi ise 1997 yılında yapılmıştır.(73). İçerdiği 21 ekzondan 18 tanesi kodlama yapmaktadır. Yaklaşık olarak 11 kb'lık bir dizidir. Genin 5' ucu analizinde CPT1B geninin ilk ekzonundan sadece 314 bp yukarsında CHKB geninin bulunduğu gösterilmiştir. Kodlanmayan ilk iki ekzonunun alternatif "splicing" işlemi(77) ile ayrıca 13. ve 19. intron bölgelerindeki prosesler ile farklı m-RNA'ların oluştuğu tespit edilmiştir.(77) Ayrıca UZYA tarafından regüle edilebilen 2 farklı promoter bölgesi gösterilmiştir.(68)



Şekil 1.4 CPT1B geninin genomik organizasyonu. CPT1B 19. intronunu *splicing* işleminden koruyan, alternatif poliadenilizasyonu “*” işareti ile gösterilmiştir. İçi boş olan kutucuklar ekzonları, başlama ve bitiş kodonları kısa oklarla gösterilmiştir(22).

Beta-oksidasyonunun ve karnitin sisteminin uyku regülasyonunda yer aldığını bildiren yayınlar bulunmaktadır. Bu yayınların başında hayvan deneyleri gelmektedir. Karnitin “*knock out*” olan *Slc22a5* farelerde, narkolepsi fenotipine benzer olarak uyanıklık ve REM süreçlerinin fragmente olduğu, lokomotor aktivitelerinin anlamlı derecede azaldığı gösterilmiştir. Diğer narkolepsi benzeri durum ise farelerin, narkolepsi tedavisinde kullanılan başlıca ilaç olan modofinil verilmesi ile tekrar aktifleşmelerinin sağlanmasıdır(78). Ayrıca bu farelerde *c-fos*-pozitif hipokretin nöronlarının yüzdesinde azalma, hipokretin ekspresyonunun lateral hipotalamusta baskılandığı ve BOS’da hipokretin-1 seviyesinin azaldığı gösterilmiştir(78,79). Başka bir çalışmada, beta-oksidasyonun ilk basamağında rol alan enzim olan açilCo-A dehidrojenaz enzimi “*knock out*” olan farelerde REM uyku sırasındaki teta frekansının anlamlı derecede yavaşladığı gösterilmiştir.

rs5770917 SNP’sinin, CPT1B ekspresyonunda azalmaya neden olduğunun saptanmış olması, ekspresyonunun azalmasının, beta-oksidasyonun azalmasına ve tüm bunların sonucunda hipokretin aktivitesinin düşmesine neden olabileceğini düşündürmektedir(67).

2. GEREÇ VE YÖNTEMLER

2.1. Hasta-Kontrol Gruplarının Belirlenmesi ve Periferik Kan Örneklerinin Alımı

Bu çalışmada, Dokuz Eylül Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Nöroloji Anabilim Dalı'na başvuran ve alınan anamnezler ile yapılan testler sonucu narkolepsi tanısı konulan kişiler olgu grubunu oluşturmaktadır. Tüm hastaların anamnezlerinin alınma işlemi ve uyku testleri aynı birim tarafından yapılmıştır. Kontrol grubu evreni ise, herhangi bir uyku bozukluğu olmadığı belirlenen kişiler tarafından oluşturuldu.

Olgu ve kontrol grubunu oluşturan tüm bireylere, yapılacak olan çalışmanın amacı ve detayları açık bir dille anlatıldı. Dokuz Eylül Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Etik komitesinin onay verdiği ve Ek-1'de sunulan bilgilendirilmiş onam formları imzalatılarak izinleri alındı. İzin alınan tüm bireylerden, EDTA'lı "vacutainer" tüplere ikişer ml periferik kan örnekleri alındı. Alınan kan örnekleri işlem göreceklere güne kadar -20°C'de muhafaza edildi.

2.2. Alınan Kan Örneklerinden DNA İzolasyonu

Periferik kan örneklerinden genomik DNA izolasyonu için kit kullanılmıştır(NucleoSpin® Blood L, 740954.20). Büyük hacimle çalışılabilir özellikte olan kit içerikleri ile 2ml kan örneğinden DNA izolasyonunu yapıldı.

Kit içeriğinde tanımlanmış olan protokol, en yüksek miktarda DNA eldesini sağlayacak şekilde modifiye edilerek hasta ve kontrol periferik kan örneklerine uygulandı. Her bir izolasyon işlemi en fazla 10'ar örnek ile yapıldı.

Kit ile DNA izolasyon işlemine başlamadan önce kit içeriği aşağıdaki şekilde hazırlandı; **Proteinaz K:** Kit içerisinde bulunan liyofilize durumdaki proteinaz K, kit tarafından sağlanan, 3.15ml proteinaz tamponu ile çözüldü.

BQ2 Tamponu; 20ml konsantre durumda gelen BQ2 tamponu, kit tarafından belirtilen şekilde 80 ml saf etanol (Appllichem, A3678) eklenerek seyreltildi

Kit için gerekli hazırlıklar yapıldıktan sonra aşağıdaki protokol izlenmiştir:

1. -20°C'de saklanan kan örneklerinin, oda sıcaklığında bırakılarak ergimesi sağlandı.

2. Oda sıcaklığına gelmiş olan kan örnekleri hafifçe vortekslenerek homojenize edildikten sonra 2ml kan örneği alınıp, 15 ml'lik steril tüplere aktarıldı.
3. Her bir kan örneğine, Proteinaz K solüsyonundan 150µl eklenip tüpler 10'ar saniye vortekslendi.
4. Tüplere, BQ1 tamponundan 2ml eklenildi ve 30 saniye vortekslendi.
5. Vortekslenen tüplerin kapakları parafilm ile sarıldıktan sonra, önceden 56°C'ye ayarlanmış olan su banyosunda 40 dakika bekletildi.
6. Tüpler tekrar vortekslenerek oda sıcaklığına gelene kadar yaklaşık 40 dakika bekletildi.
7. Oda sıcaklığına gelen tüplere, 2ml saf etanol eklendi ve 30 saniye vortekslendi.
8. Oluşan lizattan 2ml alınarak, 15 ml'lik toplama tüplerinin içine yerleştirilmiş olan kolona aktarıldı. Kolondan süzülme için, 4,500 rcf hızda 3 dakika santrifüj edildi. (Santrifüj cihazı; Sorvall RC 3C, Heraeus; Labofuge 4400R)
9. Kalan lizatta, kolon içerisine aktarıldı ve tekrar 4,500 rcf hızda 5 dakika santrifüj edildi.
10. Kolondan geçerek toplama tüpünde biriken lizat atıldı.
11. Kolonların yıkanması için üzerine BQ2 tamponundan 2'şer ml eklendi ve 4,500 rcf hızda 5 dakika santrifüj edildi.
12. Yıkama işlemi BQ2 tamponundan her bir tüpe 2'şer ml eklenerek tekrarlandı.
13. Kolonların yıkama işleminin ardından kurutulması için tüpler 4,500 rcf hızda 10 dakika santrifüj edildi.

14. Kolonlar yerleşik olduğu toplama tüplerinden çıkarılarak yeni steril toplama tüplerine yerleştirildi.

15. Yeni toplama tüplerine yerleştirilen ve DNA'nın tutulduğu kolonlara su banyosunda önceden bekletilerek 70°C'ye getirilmiş olan elüsyon tamponundan 100 µl eklendi ve 4,500 rcf hızda 3 dakika santrifüj edildi.

16. Elüsyon tamponunun eklenme ve santrifüj işlemi aynı şekilde bir kez daha tekrarlandı.

Toplam 200µl elüsyon tamponu içerisinde elde edilen DNA örnekleri, 1,5ml'lik steril tüplere alınarak stok DNA'lar hazırlanmış oldu. İzolasyonu yapılan DNA'ların miktar ve saflıklarının belirlenmesi için yapılacak spektrofotometrik ölçümlere kadar örnekler +4°C'de muhafaza edildi.

2.3. İzole Edilen DNA'nın Konsantrasyonunun ve Saflığının Saptanması

DNA'nın miktarı ve saflığı, spektrofotometre cihazında 260 ve 280 nm dalga boylarında elde edilen absorpsiyon değerlerinin birbirlerine oranları ile belirlenmektedir. DNA 260nm, protein ise 280nm dalga boylarında en yüksek absorpsiyon göstermektedir. Bundan dolayı saf DNA'nın $A_{260/280}$ oranı yaklaşık olarak 1.80 olmalıdır.

Optik dansitenin (OD), çift iplikli DNA için 50 µg/ml' ye karşılık gelmesi göz önünde bulundurularak her bir örneğin DNA konsantrasyonu şu şekilde hesaplanmıştır(80):

DNA konsantrasyonu(µg/ml) = 260 nm'deki Absorbans Değeri x Dilüsyon Oranı x 50 µg/ml

Elde edilen olgu ve kontrol grubu DNA'larının miktarlarının ve saflıklarının belirlenmesi için, elüsyon tamponu içerisinde bulunan DNA solüsyonundan 10µl alınıp, steril, distile su ile 500µl'ye tamamlanarak, 1:50 oranında dilüe edildi. Ölçüm için kullanılan kör ise, 10µl elüsyon tamponunun 490µl steril, distile su ile 500µl'ye tamamlanması ile hazırlandı. Toplam hacmin 500µl olmasının nedeni kuvvetlerin en az 500µl hacimde ölçüm yapılmasını sağlamalarıdır.

Konulan körün absorpsiyon değerlerine kıyasla elde edilen örneklerin absorpsiyon sonuçları, DNA miktarları ve saflıklarının belirlenmesi için yukarıda belirtilen formüle göre hesaplandı.

Daha sonra, tüm DNA örnekleri, intakt olup olmadıklarını kontrol etmek için %1'lik agaroz jelde yürütülerek görüntüledi. (Jel elektroforezi için detaylı bilgi ileri bölümlerde verilmiştir.)

Miktarları belirlenen tüm stok DNA örneklerinden, polimeraz zincir reaksiyonunda (Polymerase Chain Reaction, PCR) kullanılma sırasında standartizasyonu sağlamak için 25ng/µl konsantrasyonlu ara stoklar hazırlandı. Stok DNA örnekleri -20°C'de muhafaza edilmiştir. Ara stoklar ise OCR'da kullanılmak üzere +4°C'de muhafaza edildi.

2.4 PCR İle Belirlenen Gen Bölgelerinin çoğaltılması

Çalışmanın genelinde toplam 16 farklı primer çifti kullanılmıştır. 14 çift, CPT1B gen bölgeleri için diğer 2 çift ise HLA DQB1*0602 allelinin varlığının belirlenmesinde kullanıldı.

2.4.1 PCR'da Kullanılan Komponentler

Kurulan tüm reaksiyonların toplamında aşağıda belirtilen malzemeler kullanıldı. Kullanılan tüm malzemeler -20°C'de muhafaza edildi.

DNA Taq Polimeraz Enzimi: (Fermentas, EP0402)

Reaksiyon içerisinde yeni ürünlerin sentezini sağlayan enzim olarak rekombinant özellikteki DNA taq polimeraz enzimi kullanıldı. Konsantrasyonu 5U/µl olan enzimden, 30µl'lik reaksiyona için 1 ünite, 15µl reaksiyon için ise 0,5 ünite olacak şekilde eklendi.

10X Taq Tamponu (NH₄)₂SO₄ 'lü (MgCl₂ 'siz): (Fermentas, EP0402)

DNA Taq polimeraz enzimi ile birlikte gelen 10X Taq (NH₄)₂SO₄ 'lü tampon (MgCl₂'siz), CPT1B gen bölgelerinin çoğaltılmasında son konsantrasyonu 1X olacak şekilde kullanıldı.

10X Taq KCl'li (MgCl₂ 'siz) Tamponu: (Fermentas, EP0402)

Bu tampon HLA DQB1*0602 allelinin çoğaltılması için kurulan PCR reaksiyonlarında son konsantrasyonu 1X olacak şekilde kullanıldı.

25 mM MgCl₂ : (Fermentas, EP0402)

PCR optimizasyonu sırasında farklı her primer çifti için 1-4mM arasında farklı konsantrasyonlarda optimizasyon çalışmaları yapıldı ve optimize konsantrasyonları reaksiyon içerisine eklendi.

dNTP Karışımı Hazırlanması: (Fermentas, R0182)

100 mM konsantrasyonundaki her bir dNTP'den (dATP, dTTP, dCTP, dGTP) 10'ar µl alınıp 460 µl steril distile su ile 500µl'ye tamamlanarak 2mM konsantrasyonlu dNTP karışımı hazırlandı. 100'er µl küçük hacimlere bölünerek -20°C'de muhafaza edildi. Reaksiyonundaki son konsantrasyonu 0,2 mM olacak şekilde eklendi.

DMSO (Dimetil Sülfoksit) (Applichem;A3672)

CPT1B geninin 11. ekzonun çoğaltılmasında, PCR optimizasyonunu sağlamak için DMSO kullanılmıştır. Kalıp DNA'nın oluşturduğu ikincil yapıları çözmesi ve özellikle GC oranı yüksek olan hedef bölgelerin çoğaltılmasında verimliliği arttırdığı bilinmektedir.

2.4.2 Primerlerin Dizayn edilmesi

CPT1B geninin, eksprese olan tüm ekzonlarının ve rs5770917 SNP'sinin dizi analizlerini yapılabilmesi için, belirlenen bölgeler PCR işlemi ile çoğaltıldı. Çoğaltılacak bölgeye spesifik olan tüm primerler "Oligo" programı kullanılarak dizayn edilmiştir. CPT1B geni için kullanılan tüm primerlerin listesi Tablo 2.1 de özetlenmiştir.

Tablo 2.1. Çoğaltılan bölgelerin ve kullanılan primer dizilerinin listesi

Çoğalttığı Bölge	İçeren	Primer Adı	Primer Dizisi (5'-3')	PCR ürün uzunluğu(bp)
rs5770917 Bölge	İçeren	rs5770917F	GCCCCGTGCTGTGTATGTAAC	232
		rs5770917R	TCTCCTCCTCCCCAAGTCCT	
2. Exon		CPTE1F	ACTGGCTGGGGGCGTCTCG	358
		CPTE1R	TTCCACAACCTGTACCGGGCAGAA	
3. Exon		CPTE2F	GGAGCCAGTTCCTCAAGACTTC	335
		CPTE2R	CCCCGTGACTGCCAATG	
4. Exon		CPTE3F	CTTAGCCCTACATCCGCTCAT	416
		CPTE3R	CTGTCTGCCTCTCCCGTCTA	
5. Exon		CPTE4F	GGGAGTTGCTGGTTGGTT	281
		CPTE4R	CCCATTATTCTCAAGCCCTTA	
6.-7. Exon		CPTE5-6F	GGTGGGAAGAGGATTAAGATA	476
		CPTE5-6R	CCACGGAAGCTGCTACTA	
8.-9. Exon		CPTE7-8F	GCCCCCGAATAGATTGGTCCT	443
		CPTE7-8R	GAGACACTGGGGACGCTTGG	
10. Exon		CPTE9F	CCTGGTTTAGGACACACGGAT	478
		CPTE9R	CAATGCCCTCCCCTAGTT	
11. Exon		CPTE10F	ACCCACCCCATCTCC	443
		CPTE10R	CCTGCACTCAAGTGATCCACC	
12. ve 13. Exon		CPTE11-12F	AGGGTTAAAGGTTGGGGTTGC	555
		CPTE11-12R	TCCCTGAAGCCAGTTTGGACT	
14.-15. Exon		CPTE13-14F	AACGTCATGCCTCCTAGACA	569
		CPTE13-14R	GCAGAAGTAAAGGGGTGAAGA	
16. Exon		CPTE15F	CACAGTCGTCGGGTGAGGT	429
		CPTE15R	GGATGTTGCTCCTGCTCAGTC	
17. Exon		CPTE16F	GCAGCTCACACAAGCCTTATG	415
		CPTE16R	CAGGTCTGGGGTTATGCTCTC	
18. ve 19. Exon		CPTE17-18F	GGGCCCGTTCCTGCAACTCTT	567
		CPTE17-18R	GGACCTGCTGCCGGAGCTG	

2.4.3 Primerlerin Hazırlanması

Liyofilize olarak gelen primerler (TibMolbiol) çözülecekleri güne kadar +4°C'de muhafaza edildi. Liyofilize primerler 100 pmol/µl konsantrasyonda olacak şekilde, firmanın önerdiği miktarda steril distile su eklenerek çözüldü. Tüpler yaklaşık 30 saniye vortekslenildi ve 30 dakika buzun üzerinde bekletildiler. Primerlerin tamamen çözülmesi sağlandıktan sonra, 100 pmol/µl konsantrasyondaki primer ana stokları, 1:10 oranında dilüe edilerek 10 pmol/µl konsantrasyonlu ara stoklar hazırlandı. Hazırlanan ara stoklar 100'er µl hacimlerde bölünerek ana stoklar ile birlikte -20°C'de muhafaza edildi.

2.4.4 PCR'in Hazırlanışı

PCR reaksiyonu için kullanılacak olan tüm bileşenler 0,2µl hacimli steril ve tüm enzimlerden arındırılmış tüplere(Greiner; 683201) kondu. Farklı örneklerde aynı bölgelerin çoğaltılması durumunda bileşenlerden kalıp hariç diğerleri karışım halinde hazırlanıp daha sonra kalıbı önceden konmuş PCR tüplerine bölündü. Kurulan her bir PCR grubu için, mutlaka negatif kontrol olarak kalıp yerine suyun konulduğu reaksiyon ile deney kontrol edilmiştir.

Reaksiyon karışımı hazırlanırken, tüm bileşenler buz üzerinde muhafaza edildiler. Taq polimeraz enzimi karışıma en son eklendi. Karışım iyice homojenize edildikten sonra önceden kalıp eklenmiş PCR tüplerine bölündükten sonra, reaksiyon karışımı ile kalıbın iyice karışması sağlandı ve daha sonra tüpler otomatik sıcaklık döngüsü sağlayan cihaza yerleştirildi.

Her primerin optimizasyonu sağlanırken, cihazın gradient özelliği kullanıldı. Her kuyu farklı annealing sıcaklığına ayarlandı ve böylece en optimize annealing sıcaklığı kısa sürede belirlenmiş oldu.

2.4.4.1 CPT1B Gen Bölgelerinin Çoğaltılması:

DNA dizi analizi yapılacak olan CPT1B gen bölgelerinin ve rs5770917 SNP'sini içeren bölgelerin çoğaltılma işlemleri için total reaksiyon hacmi 30µl olacak şekilde hazırlandı. CPT1B geninin eksprese olan tüm ekzonları yani 2. ekzondan 20. ekzona kadar ekzonların

her biri için farklı primer çifti kullanılarak çoğaltıldı. 11. ekzon hariç diğer tüm CPT1B ekzonları için kurulan PCR reaksiyonları aşağıdaki tabloda gösterilmiştir.

Tablo 2.2. CPT1B ekzonlarının (11. ekzon hariç) çoğaltılması için kurulan PCR işleminde kullanılan bileşenler ve miktarları.

Bileşenler	İlk Konsantrasyon	Son Konsantrasyon	30µl Reaksiyon(µl)
Taq Tampon	10X	1X	3
MgCl ²	25 mM	2,5 mM	3
dNTP Karışımı	2mM	0,2mM	3
Taq Poimeraz Enzimi	5U/ µl	1U/30µl	0,2
İleri Primer	10 pmol/ µl	0.6 pmol/µl	2
Geri Primer	10 pmol/ µl	0,6 pmol/µl	2
DNA Kalıp	25 ng/µl	25 ng/µl	1
H ₂ O(Streil nükleaz içermeyen)	-	-	15,8

Diğer ekzonlardan farklı olarak 11.ekzonun PCR reaksiyonunda optimizasyon DMSO kullanılarak gerçekleştirilmiştir ve Tablo 2.3’de özetlenmiştir. 11. ekzon için kurulan PCR reaksiyonu aşağıdaki gibidir.

Tablo 2.3. CPT1B, 11. ekzonun çoğaltılması için kurulan PCR için kullanılan bileşenler ve miktarları.

Bileşenler	İlk Konsantrasyon	Son Konsantrasyon	30µl Reaksiyon(µl)
Taq Tampon	10X	1X	3
MgCl	25 mM	2,5 mM	3
dNTP Karışımı	2mM	0,2mM	3
Taq Poimeraz Enzimi	5U/ µl	1U/30µl	0,2
İleri Primer	10 pmol/ µl	0.6 pmol/µl	2
Geri Primer	10 pmol/ µl	0,6 pmol/µl	2
DMSO	-	%2	0,6
DNA Kalıp	25 ng/µl	25 ng/µl	1
H ₂ O(Streil nükleaz içermeyen)	-	-	15,2

Optimizasyon sonuçlarına göre belirlenmiş sıcaklıklarda ve sürelerde PCR profilleri kuruldu. Profiller Tablo 2.4’de özetlenmiştir.

Tablo 2.4 CPT1B gen bölgelerinin çoğaltılması için kullanılan PCR profilleri.

Primerler	CPTE1		CPTE2		CPTE3		CPTE4		CPTE5-6		CPTE7-8		CPTE17-18	
Basamaklar	Isı	Süre	Isı(°C)	Süre	Isı(°C)	Süre	Isı(°C)	Süre	Isı(°C)	Süre	Isı(°C)	Süre	Isı(°C)	Süre
Başlangıç														
Denatürasyonu	95	7dk	95	7dk	95	7dk	95	7dk	95	7dk	95	7dk	95	7dk
Denatürasyon	95	30sn	95	30sn	95	30sn	95	30sn	95	30sn	95	30sn	95	30sn
Annealing	69	30sn	65	30sn	58	30sn	58	30sn	55	30sn	69	30sn	67	30sn
Uzaman	72	30sn	72	30sn	72	30sn	72	30sn	72	30sn	72	30sn	72	30sn
Sonlanma Uzaması	72	7dk	72	7dk	72	7dk	72	7dk	72	7dk	72	7dk	72	7dk
Siklus	35		35		35		35		35		35		35	

Primerler	CPTE10		CPTE10		CPTE11-12		CPTE13-14		CPTE15		CPTE16		rs5770917	
Basamaklar	Isı(°C)	Süre	Isı(°C)	Süre	Isı(°C)	Süre	Isı(°C)	Süre	Isı(°C)	Süre	Isı(°C)	Süre	Isı(°C)	Süre
Başlangıç Denatürasyonu	95	7dk	95	7dk	95	7dk	95	7dk	95	7dk	95	7dk	95	5dk
Denatürasyon	95	30sn	95	30sn	95	30sn	95	30sn	95	30sn	95	30sn	95	20sn
Annealing	62	30sn	67	30sn	64	30sn	65	30sn	65	30sn	58	30sn	63	20sn
Uzaman	72	30sn	72	30sn	72	30sn	72	30sn	72	30sn	72	30sn	72	20sn
Sonlanma Uzaması	72	7dk	72	7dk	72	7dk	72	7dk	72	7dk	72	7dk	72	5dk
Siklus	35		35		35		35		35		35		37	

2.4.4.2 HLA DQB1*0602 Allelinin Çoğaltılması

HLA DQB*0602 allelinin taşınıp taşınmadığının gösterilmesi için, Mignot ve grubunun çalışmasında kullandığı primer çiftleri kullanılmıştır(81). Bu primer allelin varlığı durumunda bölgeyi çoğaltmakta, yokluğunda ise çoğaltmamaktadır. Çalışmanın kontrollü olması için, pozitif kontrol olarak “Human Growth Hormone (HGH)” gen bölgesine spesifik başka bir primer çifti daha reaksiyona eklendi. Multipleks PCR yapılarak her iki bölgeye spesifik primer çiftleri son hacmi 15µl olan aynı reaksiyon içerisinde kullanıldı. HLA DQB1 allelini taşıyan kişilerin jel görüntüsünde, 439bp ve 218bp uzunluğunda 2 bandın görülmesi beklendi. Alleli taşımayan kişilerin jel görüntülerinde ise sadece pozitif kontrol amaçlı bandın (439bp) gözlenmesi beklendi. Reaksiyonun optimizasyonu yapılarak tüm hasta ve kontrol grubunda reaksiyonlar kuruldu.

Allek bölgesi ve pozitif kontrol amaçlı kullanılan primer bilgileri Tablo 2.5’de gösterilmiştir.

Tablo 2.5. HLA DQB1*0602 allelinin çoğaltılması için (602) ve pozitif kontrol olarak kullanılan (HGH1) primerlerin listesi.

Çoğalttığı Bölge	Primer Adı	Primer Dizisi (5'-3')	PCR ürün uzunluğu (bp)
HLA DQB1*0602	602F	CCCGCAGAGGATTTCTGTGTT	218
	602R	AACTCCGCCCGGGTCCC	
HGH gen bölgesi (+ kontrol)	HGH1F	CAGTGCCTTCCCAACCATTCCCTTA	439
	HGH1R	ATCCACTCACGGATTTCTGTTGTGTTTC	

DQB1*0602 allelinin çoğaltılmasında kullanılan reaksiyon bileşen bilgileri Tablo 2.6’da ve profil bilgileri ise Tablo 2.7’de verilmiştir.

Tablo 2.6. DQB1*0602 allelinin çoğaltılması için kurulan PCR reaksiyonlarında kullanılan bileşenler ve miktarları.

Bileşenler	İlk Konsantrasyon	Son Konsantrasyon	15 µl Reaksiyon
Taq Tampon	10X	1X	1,5
MgCl ²	25 mM	2,5 mM	1,5
dNTP Karışımı	2mM	0,2mM	1,5
Taq Poimeraz Enzimi	5U/ µl	1U/15µl	0,1
İleri 602 Primeri	10 pmol/ µl	0,3 pmol/µl	0,5
Geri 602 Primeri	10 pmol/ µl	0,3 pmol/µl	0,5
İleri HGH1 Primeri	10 pmol/ µl	0.06 pmol/µl	0,1
Geri HGH1 Primeri	10 pmol/ µl	0,06 pmol/µl	0,1
DNA Kalıp	25 ng/µl	25 ng/µl	1
H ₂ O(Streil içermeyen)	nükleaz -	-	8,2

Tablo 2.7. DQB1 alleinin çoğaltılması için kullanılan PCR profili.

Primer	602 + HGH1	
Basamaklar	Isı	Süre
Başlangıç Denatürasyonu	95	7dk
Denatürasyon	95	30sn
Annealing	69	30sn
Uzama	72	30sn
Sonlanma Uzaması	72	7dk
Siklus	35	

2.4.5 PCR Ürünlerinin Agoroz Jelde Görüntülenmesinde Kullanılan Kimyasallar ve Gereçler

5X TBE (Tris Buffer EDTA) Stok Tampon Hazırlanışı:

1 lt 5X TBE tamponu hazırlamak için, 54 gr Tris- Base (Sigma, T6066), 27,5 gr Borik Asit (Sigma, B6768) ve aşağıda ayrıca hazırlanışı anlatılan 0.5M EDTA (pH 8) solüsyonundan 20 ml kullanıldı. Katı kimyasallar hassas terazi (Presica 205A SCS) kullanılarak tartıldı. Gerekli tüm kimyasallar mezür içerisine konuldu. Mezüre 1lt steril

distile su eklenerek magnetik karıştırıcı üzerinde karıştırılarak çözeltinin homojenize olması sağlandı.

0.5 M EDTA (pH:8) Hazırlanışı:

100 ml 0.5 M EDTA'nın hazırlanması için; 23,26 gr EDTA (Sigma, E5134) tartılarak üzerine 80 ml steril distile su eklendi. Magnetik karıştırıcı üzerinde çözeltinin pH'sı 8 olana kadar yaklaşık 2,5 gr NaOH pellet eklendi. pH ölçümü, magnetik karıştırıcı üzerinde karıştırılan çözeltinin içerisine daldırılan pH metre ile yapıldı ve pH değişimine dikkat edilerek çözelti hacmi 100 ml'ye tamamlandı.

Agaroz Jelin Hazırlanışı ve Jel Elektroforezi:

Agaroz jelin hazırlanması ve elektroforez tankının(Biorad-Sub-Cell GT) doldurması için 0.5X konsantrasyonlu TBE tampon hazırlandı. Bunun için 5X konsantrasyonunda hazırlananan stok TBE tamponu 1:10 oranında seyreltildi. Tankın içi, jeli örtecek kadar 0,5X TBE tampon ile dolduruldu.

Agaroz jel ise yürütülecek nükleik asit özelliğine göre değişik yüzdelerde hazırlandı. İzole edilen genomik DNA'nın intakt olup olmadığını kontrolü için %1'lik, PCR ürünlerinin gösterilmesi için ise %2'lik agaroz jeller hazırlandı.

%2'lik, 40 ml hacimli hazırlanan jel örneği üzerinden yapılan işlemler anlatılacak olursa: 40ml hacimli jel teknesi için 40ml 0,5X TBE tampon ile 0,8 gr agaroz tartılarak(Applichem, A2114) erlen içerisine konuldu. Mikrodalga yardımı ile agarozun tampon içerisinde tamamen çözülüp, sıvı hale gelmesi sağlandı ve oda sıcaklığında el yakmayacak kadar soğuması sağlandı. Daha sonra 3µl EB (Etidyum Bromür) ilave edilerek, EB'nin tamamen dağılması için erlen çalkalandı. Tamamen homojenize iken jel yatağına döküldü. Daha önceden konumları jel yatağına göre ayarlanmış olan taraklar jel teknesine yerleştirildi ve jel katılaşıncaya kadar oda sıcaklığında yaklaşık 10-15 dakika beklendi. Katılaştıktan sonra taraklar kuyulara zarar vermeden dikkatlice çıkarılıp, örneklerin yüklenmesi için 0,5X TBE tampon ile dolu jel tankına yerleştirildi.

Yükleme Tamponu Hazırlanışı:

10ml yüklem tamponu hazırlanması için; 0,025 gr bromofenol Blue (BF Blue) ve 0,025 gr xylene cyanol FF (XCFF) 15ml steril tüp içerisinde karıştırılarak, üzerine 3 ml gliserol

(Applichem, A0567) eklendi ve karışım steril distile su ile 10 ml'ye tamamlandı. Homojenize olana kadar yüksek devirde vortekslendi.

PCR Ürünlerinin Agaroz Jele Yüklenmesi:

PCR ürünlerinden 5µl ve yükleme tamponundan 2µl karıştırılarak örnekler kuyulara yüklendi. PCR ürünlerinin uzunluklarının kıyaslanması açısından PCR ürününün uzunluğuna göre ise 50 bp (Fermentas, SM0613) ya da 100 bp (Fermentas, SM0241) DNA belirteçlerinden biri kullanıldı. 1µl DNA belirteci, 2µl yükleme tamponu ve 4µl steril su ile birlikte kuyulara yüklendi.

Jele yüklenen PCR ürünleri, jel tank sistemi güç kaynağına (Biorad PowerPac Basic) bağlanarak, 80-120 V arası sabit gerilim ve 30-40mA arası akım koşullarında yürütüldü. Süre PCR ürünlerinin moleküler ağırlığına göre ve jelin konsantrasyonuna bağlı olarak ortalama 30-45 dakika arasında yürütüldü. Yürütülen PCR ürünleri ultraviyole ışık altında transilüminatör ile görüntülendi

2.4.6 PCR Ürünlerinin Sekans Analizleri

Dizi analizinin sorunsuz gerçekleşebilmesi için PCR ürünlerinin hepsi jel elektroforezi sonucu görüntülendi ve bantların temizliği kontrol edildi. PCR optimizasyonları temiz bant elde edilene kadar tekrarlandı.

CPT1B gen ekzonları ve rs5770917 polimorfizmini içeren bölgelerin PCR ürünlerinin hepsinin 30µl son hacimde olacak şekilde hazırlandığı yukarıda belirtilmiştir. PCR tüplerinin üzerine yazılan hasta ve primer kodları kontrol edildikten sonra kapakları parafilm ile iyice sarıldı. Örnekler "Macrogen" firmasının Güney Kore şubesine kargo yolu ile gönderildi ve bu gönderim ve dizi analizi hizmet alımı ile karşılandı.

Her gönderilen PCR ürünü için firma tarafından ilk önce saflaştırma işlemi gerçekleştirilmesi istendi. İlk aşamada; ileri primerler kullanılarak dizi analizi gerçekleştirildi. Daha sonraki aşamalarda ise rastlanan nükleotid değişimlerinden emin olmak için geri primerler kullanılarak tekrar dizi analizleri yapıldı.

Örneklerin Kore'ye gönderiminden sonra, 2 hafta süre içerisinde, firma tarafından elektronik posta yolu ile sekans sonuçları gönderildi. Sonuçlar; pdf, gif, ve metin formatlarında gönderildi. Dizi analizi için sırası ile aşağıdaki yöntemler uygulandı:

2.4.6.1 Karşılaştırma (BLAST) Analizi

Her hastanın gelen sekans sonuçları, "NCBI/Blast" veritabanı kullanılarak tüm genom dizisi ile karşılaştırıldı ve istenilen bölgenin PCR ile çoğaltılıp çoğaltılmadığı doğrulandı. Bu işlem için FASTA formatında gelen dizi ve www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi internet adresi kullanıldı. Nükleotid düzeyinde yapılan bu karşılaştırma işlemi ile homozigot veya heterozigot baz değişikliklerinin saptanması sağlandı.

2.4.6.2 Dizi Analiz Programının Kullanılması

Gelen kromotogram sonuçlarının analizini sağlayan "ChromasPro Version 1.34" programı kullanıldı. Kromotogram görüntülerindeki piklerin göz ile tek tek kontrol edilmesi, heterozigot baz değişimlerinin bulunması sağlandı. Bu yöntem ile heterozigot baz değişimleri yakalanırken, homozigot baz değişimlerini gözden kaçırmamak için blast işlemi de mutlaka yapıldı.

3. BULGULAR

3.1 Olgu Grubunun Oluşturulması

Dokuz Eylül Üniversitesi Hastanesi, Nöroloji Anabilim Dalı'na başvuran ve aynı anabilim dalı tarafından narkolepsi tanısı konulan bireyler olgu grubumuzu oluşturdu. Çalışmada olgu grubunu oluşturan bireylerin tüm klinik bilgilerine hasta dosyalarından, kişiler ile yüz yüze ya da telefon aracılığı ile yapılan konuşmalar aracılığı ile ulaşıldı. Kompleks bir uyku bozukluğu olması nedeni ile hastalığın tanısının konması için yapılan testlerin yanı sıra hastalardan alınan anamnezler de bir o kadar önemlidir.

Çalışmada, olgu grubuna 30 narkolepsi hastası, kontrol grubuna ise 50 sağlıklı birey dahil edildi. Olgu grubunun 14'ü (%46.7) kadın, 16'sı (%53.3) erkek bireylerden oluşmaktadır.

Olgu ve kontrol grubundaki tüm bireylerden EDTA'lı tüplere alınan 2'ser ml kan örnekleri, DNA izolasyonuna kadar -20°C'de muhafaza edildi. İzolasyonlarının ardından, spektrofotometrik ölçümleri yapıp konsantrasyon ve saflıkları belirlenen DNA örnekleri %1'lik (w/v) agaroz jelde yürütülüp transilüminatör ile de görüntülenip teyid edildi.

3.2 PCR Ürünlerinin Oluşturulması ve Görüntülenmesi

Spektrofotometrik ölçümleri yapıp, jel görüntüleri elde edilen DNA örneklerinden 25ng/µl konsantrasyonlu ara alikatlardan hazırlanıp, PCR için ara alikatlardan kalıp DNA kullanıldı Tüm PCR sonuçları %2'lik (w/v) agaroz jelde yürütüldü.

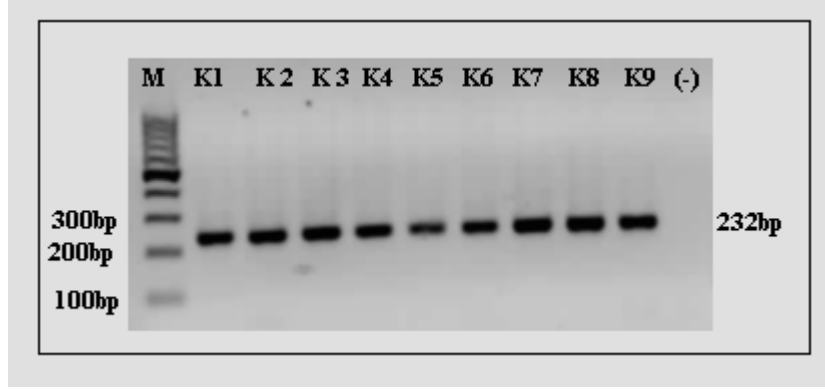
3.2.1 Çoğaltılan CPT1B Gen Bölgelerinin Jel Görüntüleri

CPT1B geninin okunan tüm ekzonları ile ekson-intron sınırları ve rs5770917 SNP'sini içeren bölgeler PCR ile çoğaltıldı. Çoğaltılan bölgelerin jel görüntüleri Şekil 3.1'de gösterilmiştir.

A

```
1 gcccgtgctggtatgtaacacaataaacaagcttcttcttcccaccctgtcctggccc
61 tctgagcagcagcagaaaagtaccaaaccgagcagtacacacaaagggactcttcagtgc
121 ttgggattgaaagtggtttagcgttcatgctgccagttgggggtccccatccctccccag
181 tcccctggctgcagcttagaataataaataactaggacttggggaggaggaga
```

B



Şekil 3.1 rs5770917 SNP'sini içeren bölgenin çoğaltılması. A, Çoğaltılan bölgenin genomik dizisi. Altı çizili olarak belirtilen dizi primerlerin oturma bölgeleridir B, Çoğaltılan bölgenin elektroforez jel görüntüleri. M; 100bp'lik DNA belirteci, (-); Negatif Kontrolü, K1-K9; kontrol örnek numaralarını göstermektedir.

A

```
1 actggctgggggctctcggcgcgggctggcgggcggggccggcctaagcgcgcccgcgcac
61 ccatctgcccccgctcctagGTGCCGACCAACCCCAAGGATGGCGGAAGCTCACCAGGCCG
121 TGGCCTTCCAGTTACGGTGACCCCAGACGGGGTCTGACTTCCGGCTCAGTCGGGAGGCC
181 TGAAACACGTCTACCTGTCTGGGATCAACTCCTGGAAGAAACGCCTGATCCGCATCAAGg
241 Tgcgcacaggtgcttctcccagagcgtaggcagaggccggctgtcagctgttaagcgctt
301 tgtaggggtccctcactgcctccttggctggcacttctgcccgggtacaggttgtggaa
```

B

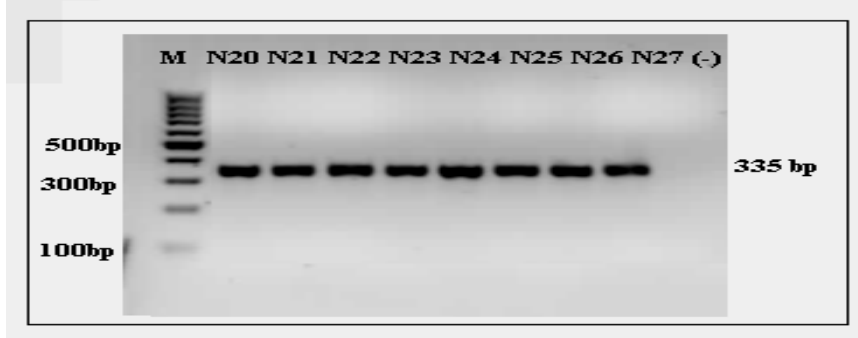


Şekil 3.2 CPT1B, 2. ekzon içeren bölgenin çoğaltılması. A, Çoğaltılan 2. ekzonun genomik dizisi. Altı çizili olarak belirtilen dizi primerlerin oturma bölgeleridir. Gölgeleme ile yazılan dizi başlama kodonudur. B, Çoğaltılan bölgenin jel görüntüleri. M; 100bp'lik DNA belirteci, N; Negatif Kontrolü, N19-N26; hasta örneklerinin numaralarını göstermektedir.

A

```
1 ggagccagttccaagacttcacagggcaggtaaacctcccgccttccgggtccataaggg  
61 cgcctgtttctgcccacagAATGGCATCCTCAGGGGCGTGTACCCTGGCAGCCCCACCAG  
121 CTGGCTGGTCGTCATCATGGCAACAGTGGGTTCTCCTTCTGCAACGTGGACATCTCCTT  
181 GGGGCTGGTCAGTTGCATCCAGAGATGCCTCCCTCAGGGGtaaggagtgaaactggaagg  
241 Gcacaggtgccaccagggagggtgggcccagctccaaggctgagggttctgagctggg  
301 cagatacaggacagcagccattggcagtcacgggg
```

B

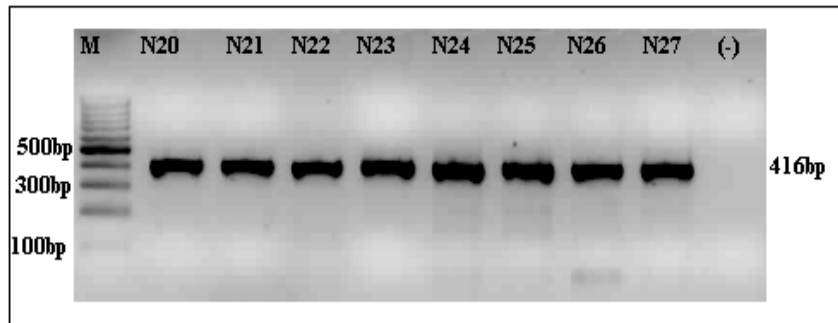


Şekil 3.3 CPT1B, 3. ekzonunu içeren bölgenin çoğaltılması. A, Çoğaltılan 3. ekzonun genomik dizisi. Altı çizili olarak belirtilen dizi primerlerin oturma bölgeleridir B, Çoğaltılan bölgenin jel görüntüleri. M; 100bp'lik DNA belirteci, (-); Negatif Kontrolü, N20-N27; hasta örnek numaralarını göstermektedir.

A

```
1 cttagccctacatccgcctcatttgatgcagtcagacatgagtggtgccagggaggttctt  
61 Ccccttggtgtctcccctgagacagttcacagccaccggaggctggcctcaagaggacc  
121 cctgcagcccttgcccctctccaatagGTGTGGCCCTACCAGACCCCGCAGACCCGGGC  
181 ACTTCTCAGCATGGCCATCTTCTCCACGGGCGTCTGGGTGACGGGCATCTTCTTCTTCCG  
241 CCAAACCCTGAAGCTGCTTCTCTGCTACCATGGGTGGATGTTTGAGATGCATGGCAAGAC  
301 CAGCAACTTGACCAGGATCTGGGCTgtgagcagcagccagtgagggggttcaggcacctg  
361 ggttgagactctttggactcctttgggggttctgagctagacgggagaggcagacag
```

B

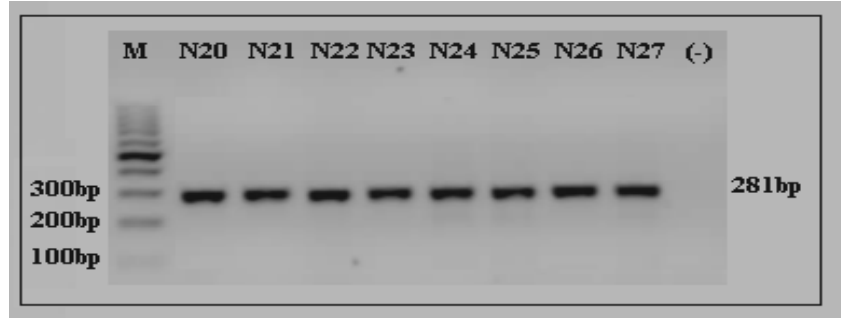


Şekil 3.4 CPT1B, 4. ekzon içeren bölgenin çoğaltılması. A, Çoğaltılan 4. ekzonun genomik dizisi. Altı çizili olarak belirtilen dizi primerlerin oturma bölgeleridir B, Çoğaltılan bölgenin jel görüntüleri. M; 100bp'lik DNA belirteci, (-); Negatif Kontrolü, N20-N27; hasta örnek numaralarını göstermektedir.

A

```
1 GggagttgctgggttgggtttccatTTTTTccactggctcccaccccagcactctgctctgt  
61 acccccagATGTGTATCCGCCTTCTATCCAGCCGGCACCCCTATGCTCTACAGCTTCCAGA  
121 CATCTCTGCCCAAGCTTCCTGTGCCAGGGTGTGAGCCACAATTCAGCGGgtgagggcct  
181 Cgcttgggcatcccagtgggcaggggaggttgattcaggagatgtttccaaatataag  
241 ttctgtgcaaagagtggccttaagggcttgagaataatggg
```

B

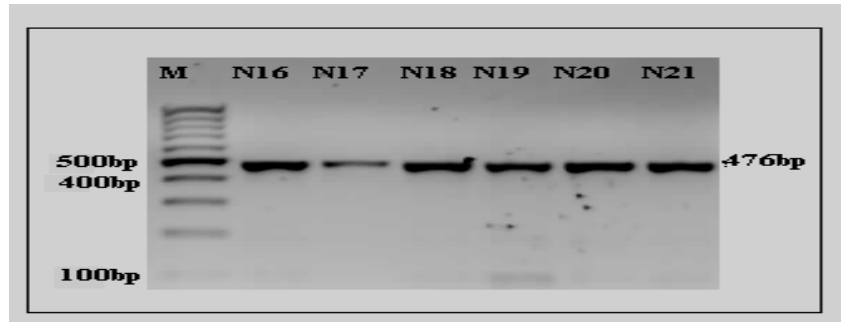


Şekil 3.5 CPT1B, 5. ekzon içeren bölgenin çoğaltılması. A, Çoğaltılan 5. ekzonun genomik dizisi. Altı çizili olarak belirtilen dizi primerlerin oturma bölgeleridir B, Çoğaltılan bölgenin jel görüntüleri. . M; 100bp'lik DNA belirteci, (-); Negatif Kontrolü, N20-N27; hasta örnek numaralarını göstermektedir.

A

```
1 ggtaggaagaggattaagatagaggcagcccttgccatctggccccacggatgataaac  
61 tggctggacagTACCTAGAGTCTGTGCGCCCCTTGTTGGATGATGAGGAATATTACCGCA  
121 TGGAGTTGCTGGCCAAAGAATTCAGGACAAGACTGCCCCAGGCTGCAGAAATACCTGG  
181 TGCTCAAGTCATGGTGGGCAAGTAACTATgtaagttcctgccccctgggctcactgtcacc  
241 tgccatgtgtcctggctGcaccgcgccccagctctaaccttccacctccccacagGTGAGG  
301 ACTGGTGGGAAGAGTACATCTACCTTCGAGGCAGGAGCCCTCTCATGGTGAACAGCAACT  
361 ATTATGTCATGgtatgaactagagccccaggtccccgcacgtgctcagctctgtcccag  
421 ctccaaggcaagggatctggaggacagcccagagctctagtagcagcttccgtgg
```

B

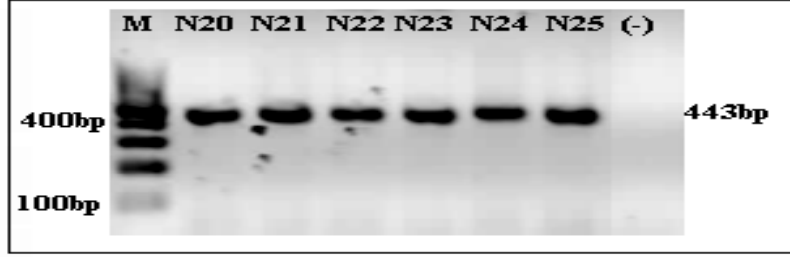


Şekil 3.6 CPT1B, 6. ve 7. ekzonu içeren bölgenin çoğaltılması. A, Çoğaltılan bölgenin genomik dizisi. Altı çizili olarak belirtilen dizi primerlerin oturma bölgeleridir. B, Çoğaltılan bölgenin jel görüntüsü. M; 100bp'lik DNA belirteci, N16-N21; hasta örnek numaralarını göstermektedir.

A

```
1 gccccgaatagattgggtccttgggtcagcaagactcaggtgacacccagacagaggccc  
61 ccaccccgcgggctctgttcctctgtagGACCTTGTGCTCATCAAGAATACAGACGTGCA  
121 GGCAGCCCGCCTGGGAAACATCATCCACGCCATGATCATGTATCGCCGTAAACTGGACCG  
181 TGAAGAAATCAAGCCTgtgagttgcgtcagggttgaaggtgggatgggaggggagacctG  
241 agtctgagccatgctgggccttccctcagGTGATGGCACTGGGCATAGTGCCTATGTGCT  
301 CCTACCAGATGGAGAGGATGTTCAACACCACTCGGATCCCGGGCAAGGACACAGgtaact  
361 gagccccctcgctgctacctgtgggcatctggctggctcgctgcctcctgctgctca  
421 tcaccaagcgtccccagtgtctc
```

B

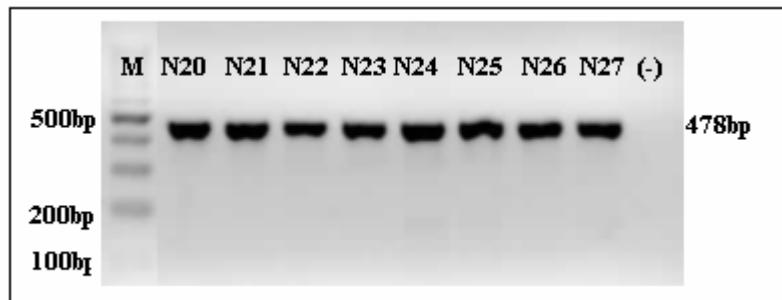


Şekil 3.7 CPT1B, 8. ve 9. ekzonu içeren bölgenin çoğaltılması. A, Çoğaltılan bölgenin genomik dizisi. Altı çizili olarak belirtilen dizi primerlerin oturma bölgeleridir. B, Çoğaltılan bölgenin jel görüntüsü. M; 100bp'lik DNA belirteci, (-); Negatif Kontrolü, N20-N25; hasta örnek numaralarını göstermektedir.

A

```
1 cctggtttaggacacacggatcccatccagggggcaggaaggccagggcagaggccgagc  
61 Aaaacagggctctgcaggggtcacctagtgcagggaggtgggccccttcccaggatgtagc  
121 tgggggccccgcctcagcttgcccgtggcctgtatcacagATGTGCTACAGCACCTCTCA  
181 GACAGCCGGCACGTGGCTGTCTACCACAAGGGACGCTTCTTCAAGCTGTGGCTCTATGAG  
241 GGCGCCCGTCTGCTCAAGCCTCAGGATCTGGAGATGCAGTTCCAGAGGATCCTGGACGAC  
301 CCCTCCCCACCTCAGCCTGGGGAGGAGAAGCTGGCAGCCCTCACTGCAGGAGGAAGgtat  
361 tggcctctaggaagggactgtccccaccctgagttcagggctccgtgaggagaggagcgt  
421 ggccctgctgcccaccctggaactggaggctggaggccacaactaggggaggggcattg
```

B

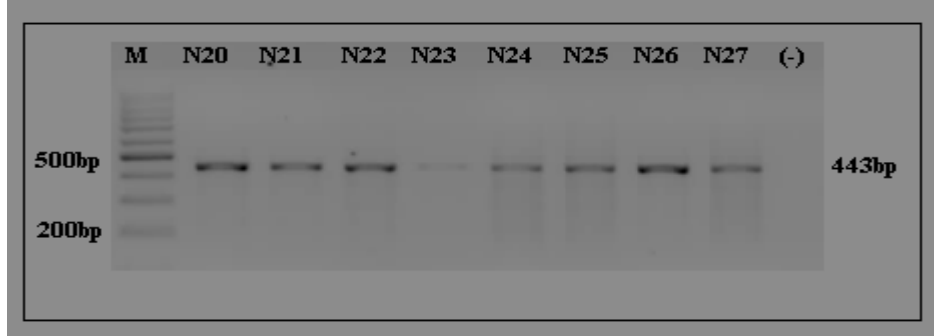


Şekil 3.8 CPT1B, 10. ekzonu içeren bölgenin çoğaltılması. A, Çoğaltılan bölgenin genomik dizisi. Altı çizili olarak belirtilen dizi primerlerin oturma bölgeleridir. B, Çoğaltılan bölgenin jel görüntüsü. M; 100bp'lik DNA belirteci, (-); Negatif Kontrolü, N20-N27; hasta örnek numaralarını göstermektedir.

A

```
1 acccccccccatctccaggtccagccagggcctcagagggcaccctcatcccaagtccac  
61 gtgcccactgcttaccctgccccatgcttcagGGTGGAGTGGGCGCAGGCACGCCAGGCC  
121 TTCTTTAGCTCTGGAAAGAATAAGGCTGCCTTGGAGGCCATCGAGCGTGCCGCTTCTTC  
181 GTGGCCCTGGATGAGGAATCCTACTCCTATGACCCCCGAAGATGAGGCCAGCCTCAGCCTC  
241 TATGGCAAGGCCCTGCTACATGGCAACTGCTACAACAGgtacggcagccccagccccaca  
301 ggttacagcttaaggttaaaagttagggttatggttagaggattaaagataaaagaaggt  
361 agggttatgagctgggtgagtgccacacacctgtgatcctagcactttgggggccaagg  
421 caggtggatcacttgagtgcagg
```

B

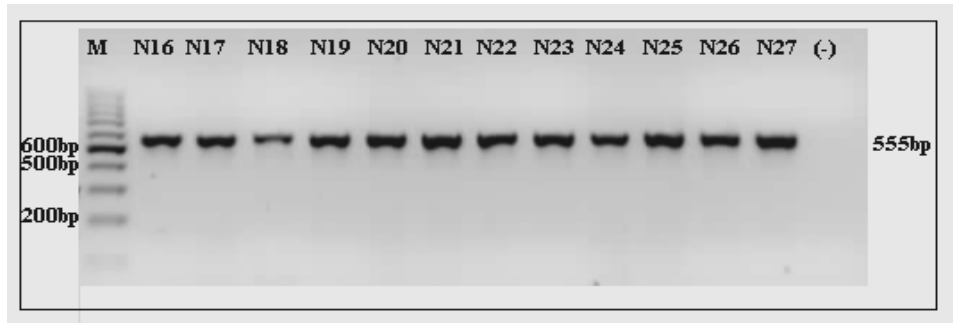


Şekil 3.9 CPT1B, 11. ekzonu içeren bölgenin çoğaltılması. A, Çoğaltılan bölgenin genomik dizisi. Altı çizili olarak belirtilen dizi primerlerin oturma bölgeleridir. B, Çoğaltılan bölgenin jel görüntüsü. M; 100bp'lik DNA belirteci, (-); Negatif Kontrolü, N20-N27; hasta örnek numaralarını göstermektedir.

A

```
1 aggggttaaaggttgggggtgaggtcagggcaccctctggacattcccagctttggttcttc  
61 atgtgtctactcttctcctgcagGTGGTTTGACAAATCCTTCACTCTCATTTCCTTCAAGAA  
121 TGGCCAGTTGGGTCTCAATGCAGAGCATGCGTGGGCAGATGCTCCCATCATTGGGCACCT  
181 CTGGGAGgtaatagccttgcagaggggaacctgcagggcagggctgtaggggatgaggccag  
241 cctctcagctcatcctctccctgcagTTTGTCTGTTGGGCACAGACAGCTTCCACCTGGGC  
301 TACACGGAGACCGGGCACTGCCTGGGCAAACCGAACCTGCGCTCGCACCTCCTACACGG  
361 CTGCAGTGGGACATTCCAAAACAGgtgggttgggaagctcccagagcaggtgtgagaccac  
421 aaagcagcaggtgggtacagccccgacgagggcctgagcctcctcctcccctgctggcctc  
481 actgctggcccagccctcggggaagggcacagggcacgtctcaggatacctgtagaggtcca  
541 aactggcttcagggga
```

B

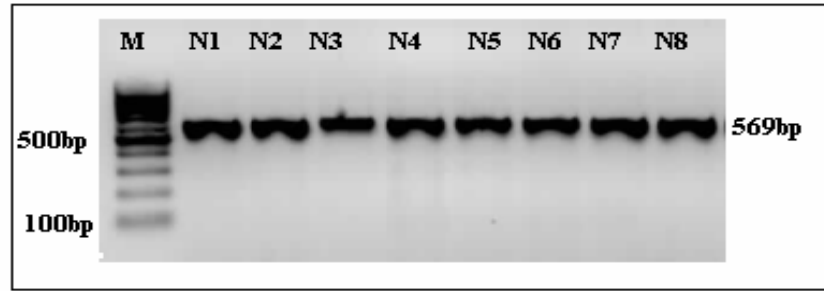


Şekil 3.10 CPT1B, 12. ve 13. ekzonlarını içeren bölgenin çoğaltılması. A, Çoğaltılan bölgenin genomik dizisi. Altı çizili olarak belirtilen dizi primerlerin oturma bölgeleridir. B, Çoğaltılan bölgenin jel görüntüsü. M; 100bp'lik DNA belirteci, (-); Negatif Kontrolü, N16-N27; hasta örnek numaralarını göstermektedir.

A

```
1 Aacgtcatgcctcctagacatgaccagagtcctgcttggagagccctaccctcagctga  
61 cccttcccatgtccttggcagTGCCAGGCGGTTCATCGAGAGTTCTACCAGGTGGCCAAGG  
121 CGTTGGCAGACGACGTGGAGTTGTACTGCTTCCAGTTCTGCCCCTTGGCAAAGGCCTCA  
181 TCAAGAAGTGCCGGACCAGCCCTGATGCCTTTGTGCAGATCGCGCTGCAGCTGGCTCACT  
241 TCCGGgtaggagccccgcctcccgctgctgagagggcaggggtggtaccaggggtccacctg  
301 ccagattcaccctctgtatatcccagGACAGGGGTAAGTTCTGCCTGACCTATGAGGCC  
361 TCAATGACCA GAATGTTCCGGGAGGGACGGACTGAGACTGTGCGTTCTGTACCAGCGA  
421 GTCCACAGCCTTTGTGCAGGCCATGATGGAGGGGTCCCACACAgtaagtgtcctctgccc  
481 Atgtgggggtcacagtcgctggggtgaggtgccccctctgcctcctgtctgcctggagggc  
541 cagggctactcttcacccctttacttctgc
```

B

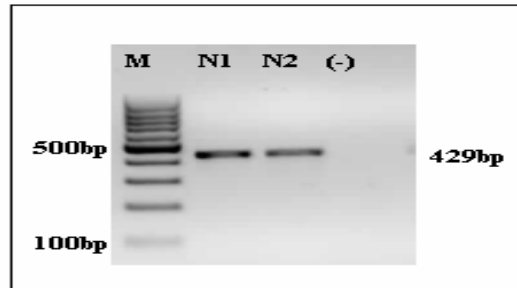


Şekil 3.11 CPT1B, 14. ve 15. ekzonlarını içeren bölgenin çoğaltılması. A, Çoğaltılan bölgenin genomik dizisi. Altı çizili olarak belirtilen dizi primerlerin oturma bölgeleridir. B, Çoğaltılan bölgenin jel görüntüsü. M; 100bp'lik DNA belirteci, N16-N27; hasta örnek numaralarını göstermektedir.

A

```
1 cacagtcgctcggggtgaggtgccccctctgcctcctgtctgcctggagggccagggctact  
61 cttcacccctttacttctgccccgcagAAAGCAGACCTGCGAGATCTCTTCCAGAAGGCT  
121 GCTAAGAAGCA CCAGAATATGTACCGCCTGGCCATGACCGGGGCAGGGATCGACAGGCA  
181 CCTCTTCTGCCTTTACTTGGTCTCCAAGTACCTAGGAGTCAGCTCTCCTTTCTTGCTGA  
241 Ggtcagcaccggttggtggggtgctgctcttctgcccactgcctcctacacgcagggcttgg  
301 gccatctcatgatggagcagggcctgttttctggttgcctcccctgaagctccctggag  
361 tgctgggcccagctttcccgcacacccccacctgggctgtggtcctgggactgagcagg  
421 agcaacatcc
```

B

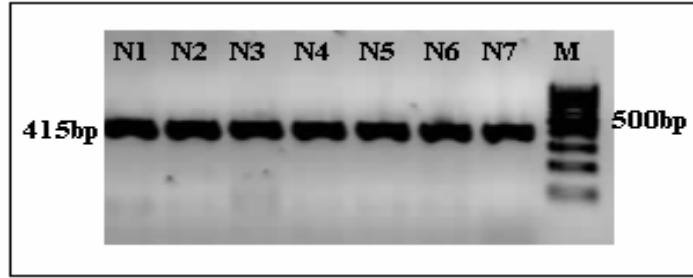


Şekil 3.12 CPT1B, 16. ekzonu içeren bölgenin çoğaltılması. A, Çoğaltılan bölgenin genomik dizisi. Altı çizili olarak belirtilen dizi primerlerin oturma bölgeleridir. B, Çoğaltılan bölgenin jel görüntüsü. M; 100bp'lik DNA belirteci, (-); Negatif Kontrol, N1-N2; hasta örnek numaralarını göstermektedir.

A

```
1 gcagctcacacaagccttatgtggcatgatgcacaggggaccacggggtggtggccaggg  
61 Agctcctgcaccctcagcagaaccgtgtctggctcagagtaggtcgcacacaccacgtgt  
121 tggacaggtgctttgggtatgtggcctctgaccagctgtggcctccattgcagGTGCTCT  
181 CGGAACCCTGGCGTCTCTCCACCAGCCAGATCCCCCAATCCCAGATCCGCATGTTGACC  
241 CAGAGCAGCACCCCAATCACCTGGGCGCTGGAGGTGGCTTTGGCCCTgtgagtgctcctg  
301 aagggggtgggtgggcagcaccagggccctgaggggttcagtggcgagtgcaggccctga  
361 ggtcagacgagagggcaggagcaccttgccttagaggagagcataaccccagacctg
```

B

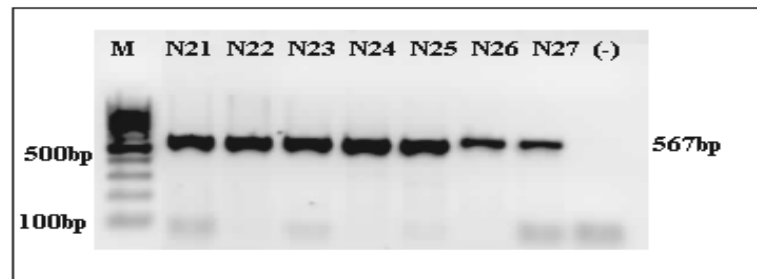


Şekil 3.13 CPT1B, 17. ekzonu içeren bölgenin çoğaltılması. A, Çoğaltılan bölgenin genomik dizisi. Altı çizili olarak belirtilen dizi primerlerin oturma bölgeleridir. B, Çoğaltılan bölgenin jel görüntüsü. M; 100bp'lik DNA belirteci, N1-N7; hasta örnek numaralarını göstermektedir.

A

```
1 gggcccgttcctgcaactccttgtgggaagaacaagtacaatatcagcttggctttcagat  
61 cttcaaggtttgatztatgccttcttcacccttcttggttgccctcagGTAGCAGATGATG  
121 GCTATGGAGTTTTCTACATGATTGCAGGCGAGAACACGATCTTCTTCCACATCTCCAGCA  
181 AGTTCTCAAGCTCAGAGACGgtgagtctcctgccacagctcaggcctgaggaaggggtgc  
241 cacctggggctgcccaggaacacaggtgtctttggctggggagggcatccttgccttgtggg  
301 aacagaggggtgggtacatatctgaaggtgcatctgaaactcttggctcccacagAACGCC  
361 CAGCGCTTTGGAAACCACATCCGCAAAGCCCTGCTGGACATTGCTGATCTTTCCAAGTT  
421 CCCAAGGCCTACAGCTGAAGgttggagaaatgccagctgccctttcgtcccacactgtg  
481 gaggaagggacctgtggcagctcacaggcctgaggggtggccgtgcacaggtgccaggc  
541 tccaaggacagctccggcagcaggtcc
```

B



Şekil 3.14 CPT1B, 18. ve 19. ekzonları içeren bölgenin çoğaltılması. A, Çoğaltılan bölgenin genomik dizisi. Altı çizili olarak belirtilen dizi primerlerin oturma bölgeleridir. Gölgelerndirme ile yazılan bölge ise bitiş kodonudur. B, Çoğaltılan bölgenin jel görüntüsü. M; 100bp'lik DNA belirteci, (-); Negatif Kontrol, N1-N2; hasta örnek numaralarını göstermektedir.

3.2.2 Çoğaltılan HLA DQB1 Allelinin Jel Görüntüsü

HLA DQB1*0602 allelinin hasta ve kontrol grubunda kaç kişide pozitif olduğunu belirlemek için bu bölge PCR ile çoğaltılmıştır. PCR’ da internal kontrol amaçlı olarak İnsan Büyüme Hormonu (Human Growth Hormone, HGH) gen bölgesine spesifik primerler de kullanılmıştır. DQB1*0602 allelinin taşıyan bireylerde kontrol kontrollü 439bp ve 218bp uzunluğunda iki bant görülmesi beklendi. Allelin olmaması durumunda ise sadece internal kotrole ait 439bp’lik bant gözlemlendi.

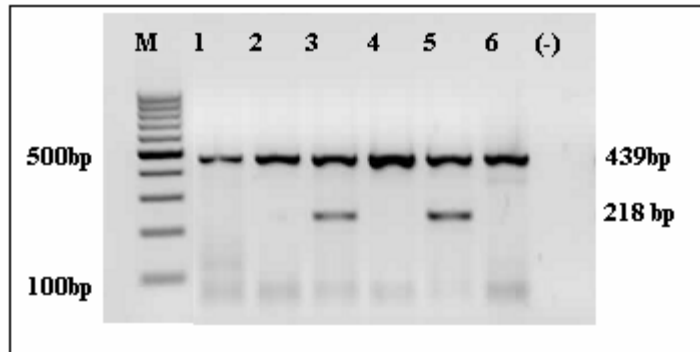
A

```
1 CccgcagAGGATTTTCGTGTTCCAGTTTAAGGGCATGTGCTACTTCACCAACGGGACGGAG
61 CGCGTGCCTTTGTGACCAGATACATCTATAACCGAGAGGAGTACGCGCGCTTCGACAGC
121 GACGTGGGGGTGTACCGCGCGGTGACGCCGAGGGGCGGCCTGATGCCGAGTACTGGAAC
181 AGCCAGAAGGAAGTCCTGGAGGGGACCCGGCGGAGTT
```

B

```
1 CAGTGCCTTCCCAACCATTCCCTTATCCAGGCTTTTTGACAACGCTATGCTCCGCGCCCAT
61 CGTCTGCACCAGCTGGCCTTTGACACCTACCAGGAGTTTgtaagctcttggggaatgggtg
121 Cgcatcaggggtggcaggaaggggtgactttcccccgctgggaaataagaggaggagacta
181 Aggagctcaggggtttttcccgaagcgaatgcagggcagatgagcacacgctgagtgaggt
241 Tcccagaaaagtaacaatgggagctgggtctccagcgtagaccttggggggcggctcttctc
301 ctagGAAGAAGCCTATATCCCAAAGGAACAGAAGTATTCATTCTGCAGAACCCCGAGACC
361 TCCCTCTGTTTCTCAGAGTCTATTCCGACACCCTCCAACAGGGAGGAAACACAACAGAAAT
421 CCgtgagtgat
```

C



Şekil 3.15 HLA DQB1*0602 alelinin çoğaltılması. Altı çizili olarak belirtilen dizi primerlerin oturma bölgeleridir. A, Çoğaltılan DQB1 (218) allelinin genomik dizisi. B, Pozitif kontrol amaçlı çoğaltılan HGH (439bp) gen bölgesinin genomik dizisi. C, Çoğaltılan bölgenin jel görüntüsü. M; 100bp’lik DNA belirteci, (-); Negatif Kontrol, 3. ve 5. kuyular; DQB1*0602 alleli pozitif olan örnekleri göstermektedir. 1, 2, 4, 6 nolu kuyular ise allelin taşınmadığını göster.

Katapleksili ve katapleksisiz narkolepsi hastalarından oluşan olgu grubunda ve sağlıklı bireylerden oluşan kontrol grubunda HLA DQB1*0602 allelinin varlığının belirlenmesi, katapleksili ve katapleksisiz narkolepsi hastaları arasında ki farkın ve kontrol grubunda ki yüzdesinin gösterilmesi amacı ile yapılmıştır.

DQB1*0602 allel pozitifliğinin ve hastaların katapleksili olup olmadıkları Tablo 3.1' de gösterilmiştir.

Tablo 3.1 Katapleksili ve katapleksisiz narkolepsi hastalarında DQB1*0602 allel pozitifliği.

Hasta No	HLA DQB1*0602	Katapleksi	Cinsiyet
1	Negatif	-	Kadın
2	Negatif	-	Erkek
3	Negatif	-	Kadın
4	Negatif	-	Erkek
5	Pozitif	+	Kadın
6	Negatif	-	Erkek
7	Negatif	-	Erkek
8	Pozitif	-	Erkek
9	Negatif	-	Kadın
10	Pozitif	+	Erkek
11	Negatif	-	Erkek
12	Negatif	-	Kadın
13	Negatif	-	Kadın
14	Negatif	-	Kadın
15	Negatif	-	Erkek
16	Pozitif	+	Erkek
17	Negatif	-	Erkek
18	Pozitif	+	Kadın
19	Pozitif	-	Kadın
20	Negatif	+	Kadın
21	Negatif	-	Kadın
22	Pozitif	+	Erkek
23	Pozitif	+	Erkek
24	Pozitif	+	Erkek
25	Negatif	-	Kadın
26	Negatif	-	Kadın
27	Pozitif	+	Kadın
28	Pozitif	+	Erkek
29	Pozitif	+	Erkek
30	Negatif	-	Erkek

3.3 DNA Dizi Analizi Verileri

Tüm olgu ve kontrol grubu bireylerin DNA dizi analizi değerlendirmesi sonucu bulunan SNP sonuçları Tablo 3.2’de verilmiştir. Bu sonuçlara göre, olgu grubunda daha önceden tanımlanmış olan toplam 13 SNP saptandı.

Bu SNP’lerden 4 tanesi ekzon üzerinde bulunup, amino asit değişikliğine neden olmaktadır. Diğer 6 tane SNP gen ekzonları arasındaki intron bölgelerinde, 2 tanesi ise genin başlangıç kodonundan yaklaşık olarak 1000bp yukarısında bulunmaktadır.

Tablo 3.2 Dizi analizi yapılan bölgelerde saptanan SNP'ler.

rs Numaras	Tip	Kodon	Amino Asit Pozisyonu	Amino Asit Değişimi	Nükleotid Değişimi	Kromozomal Pozisyon
rs5770917	5' ucu	-	-		A<G	49364219 (-)
rs8137478	5' ucu	-	-		C<G	49364162 (-)
rs3213445	missens	ATC⇒GTC	66	Ile[I] → Val[V]	A<G	49362704 (-)
rs3213446	intron	-	-		G<A	49362540 (-)
rs131759	intron	-	-		C<T	49362347 (-)
rs2269383	missens	GGC ⇒ GAC	320	Gly[G] → Asp[D]	G<A	49359641 (-)
rs131760	intron	-	-		A<G	49359641 (-)
rs8142477	missens	TCC ⇒ TGC	427	Ser[S] → Cys[C]	C<G	49358242 (-)
rs5770911	intron	-	-		G<A	49358107 (-)
rs470117	missens	GAG ⇒ AAG	531	Glu[E] → Lys[K]	G<A	49356819 (-)
rs2073604	intron	-	-		C<T	49355791 (-)
rs2073605	intron	-	-		C<T	49355716 (-)
rs12160714	intron	-	-		C<T	49354987 (-)

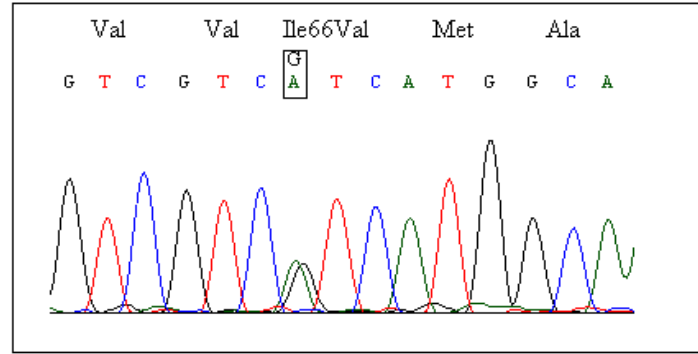
Toplam 7 ekzon (ekzon 3, 11, 8, 9, 12, 13, 17 ve ekzon-intron sınırları) ve rs5770917 içeren gen bölgesi hem olgu grubunda hem de kontrol grubunda çoğaltılmıştır. Dolayısı ile bu bölgeler içerisinde saptanan toplam 9 SNP (rs5770917, rs8137478, rs3213445, rs3213446, rs2269383, rs8142477, rs5770911, rs2073604, rs2073605) hem olgu hem de kontrol grubundaki sıklıkları saptanmış oldu ve Tablo 3.3’de özetlendi.

Tablo 3.3 SNP'lerin olgu ve kontrol grubundaki genotip ve allel yüzdeleri.

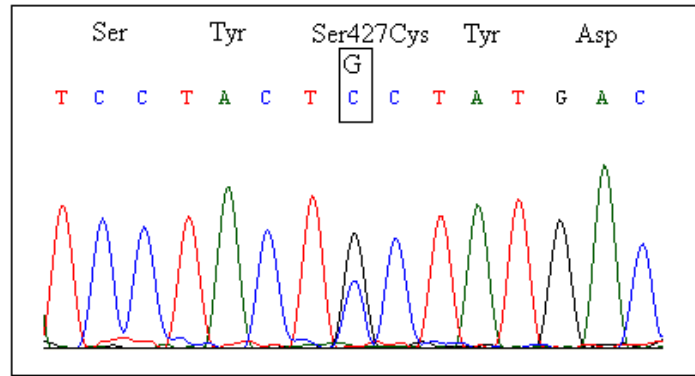
rsNumarası	Sayı	Genotip	Genotip	Genotip	Allelik Frekans	
rs5770917 A<G		A/A (%)	G/G (%)	A/G (%)	A (%)	G (%)
Hasta	30	27 (90)	1 (3.3)	2 (6.7)	56 (93.3)	4 (6.7)
Kontrol	50	47(94)	-	3 (6)	97 (97)	3 (3)
rs8137478 C<G		C/C (%)	G/G (%)	C/G (%)	C (%)	G (%)
Hasta	30	26 (86.7)	1 (3.3)	3 (10)	55 (91.7)	5 (8.3)
Kontrol	50	46 (92)	-	4 (8)	96 (96)	4 (4)
rs3213445 A<G		A/A (%)	G/G (%)	A/G (%)	A (%)	G (%)
Hasta	27	23 (81.2)	1 (3.7)	3 (11.1)	49 (90.7)	5 (9.3)
Kontrol	50	44 (88)	-	6 (12)	94 (94)	6 (6)
rs3213446 G<A		G/G (%)	A/A (%)	G/A (%)	G (%)	A (%)
Hasta	27	22 (81.5)	1 (3.7)	4 (14.8)	48 (88.9)	6 (11.1)
Kontrol	50	44 (88)	-	6 (12)	94 (94)	6 (6)
rs131759 C<T		C/C (%)	T/T (%)	C/T (%)	C (%)	T (%)
Hasta	30	11 (36.7)	6 (20)	13 (43.3)	35 (58.3)	25 (41.7)
Kontrol	-	-	-	-	-	-
rs2269383 G<A		G/G (%)	A/A (%)	G/A (%)	G (%)	A (%)
Hasta	30	29 (96.7)	-	1 (3.3)	59 (98.3)	1 (1.7)
Kontrol	49	47 (95.9)	-	2 (4.1)	96 (98)	2
rs131760 A<G		A/A (%)	G/G (%)	A/G (%)	A (%)	G (%)
Hasta	29	8 (27.6)	10 (34.5)	11 (37.9)	27 (46.6)	31 (53.4)
Kontrol	-	-	-	-	-	-
rs8142477 C<G		C/C (%)	G/G (%)	C/G (%)	C (%)	G (%)
Hasta	27	20 (74.1)	1 (3.7)	6 (22.2)	46 (85.2)	8 (14.8)
Kontrol	50	40 (80)	-	10 (20)	90 (90)	10 (10)
rs5770911 G<A		G/G (%)	A/A (%)	G/A (%)	G (%)	A (%)
Hasta	30	27 (90)	1 (3.3)	2 (6.7)	56 (93.3)	4 (6.7)
Kontrol	50	48 (96)	-	2 (4)	98 (98)	2 (2)
rs470117 G<A		G/G (%)	A/A (%)	G/A (%)	G (%)	A (%)
Hasta	30	12 (40)	6 (20)	12 (40)	36 (60)	24 (40)
Kontrol	-	-	-	-	-	-
rs2073604 C<T		C/C (%)	T/T (%)	C/T (%)	C (%)	T (%)
Hasta	30	26 (86.7)	1 (3.3)	3 (10)	55 (91.7)	5 (8.3)
Kontrol	48	44(91.7)	-	4 (8.3)	92	4
rs2073605 C<T		C/C (%)	T/T (%)	C/T (%)	C (%)	T (%)
Hasta	30	25 (83.4)	1 (3.3)	4 (13.3)	54 (90)	6 (10)
Kontrol	48	43 (89,6)	-	5 (10.4)	91 (94.8)	5 (5.2)
rs12160714 C<T		C/C (%)	T/T (%)	C/T (%)	C (%)	T (%)
Hasta	30	28 (93.3)	-	2 (6.7)	58 (96.7)	2 (3.3)
Kontrol	-	-	-	-	-	-

Dizi analizi yapılmak istenen ve PCR ile çoğaltılmış tüm bölgeler *MacroGen* firmasına gönderildikten sonra elektronik-posta yolu ile ulaşan dizi analiz sonuçlarının kromotogram görüntüleri incelenerek, SNP'ler ve diğer nükleotid değişiklikleri saptandı. Saptanan tüm SNP'lerin heterozigot olarak bulunduğu kromotogram örnekleri aşağıda sunulmuştur.

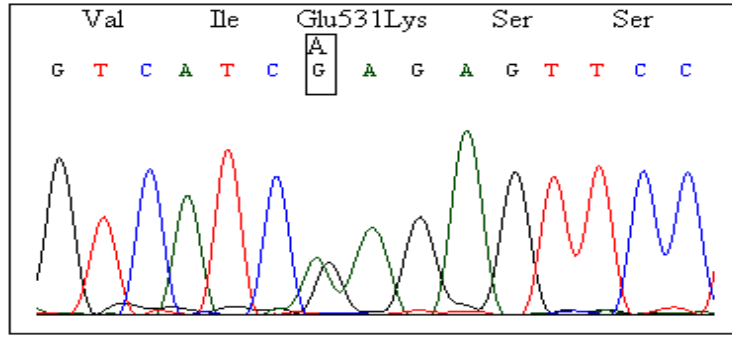
Amino asit değişikliğine neden olan 4 SNP'nin kromotogram görüntüleri Şekil 3.15-3.18 arasında verilmiştir.



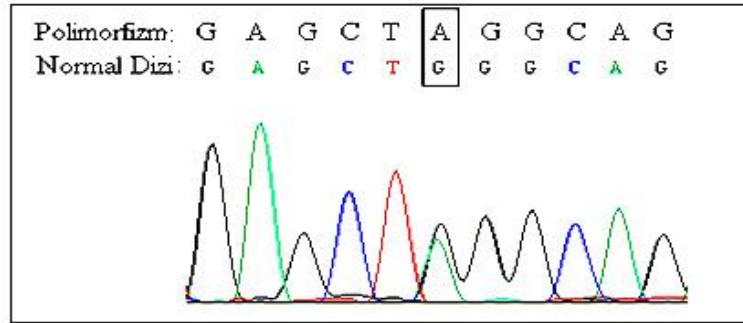
Şekil 3.16 rs3213445 SNP'sinin heterozigot durumda kromotogram görüntüsü.



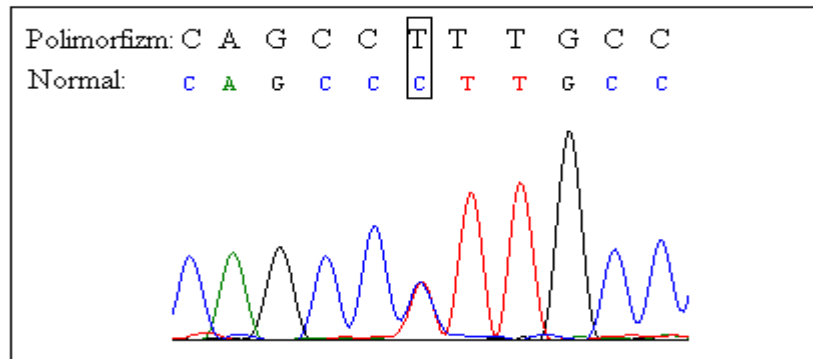
Şekil 3.17 rs8142477 SNP'sinin heterozigot durumda kromotogram görüntüsü.



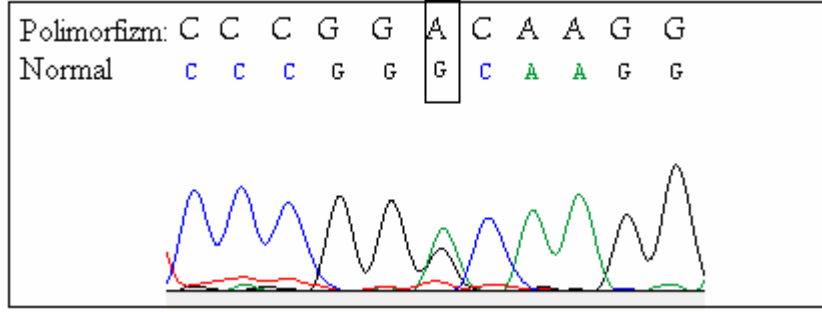
Şekil 3.18 rs470117 SNP'sinin heterozigot durumda kromotogram görüntüsü.



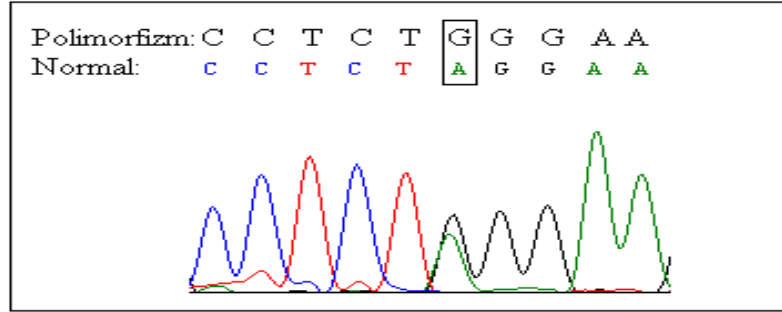
Şekil 3.19 rs3213446 SNP'sinin heterozigot durumda kromotogram görüntüsü.



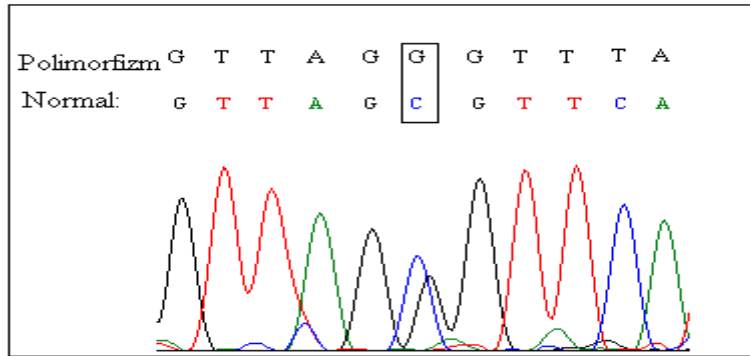
Şekil 3.20 rs131759 SNP'sinin heterozigot durumda kromotogram görüntüsü



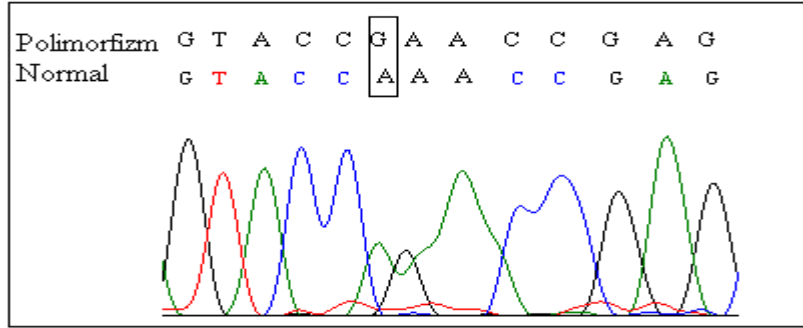
Şekil 3.21 rs2269383 SNP'sinin heterozigot durumda kromotogram görüntüsü.



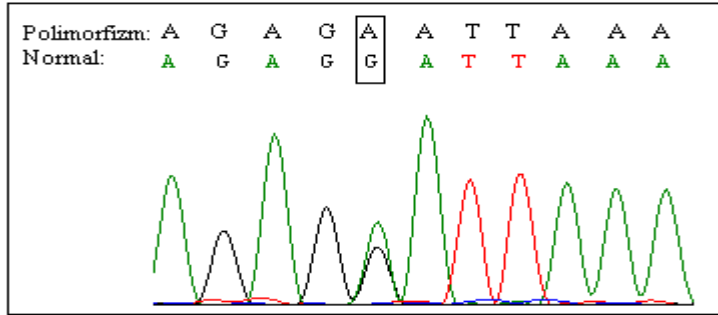
Şekil 3.22 rs131760 SNP'sinin heterozigot durumda kromotogram görüntüsü.



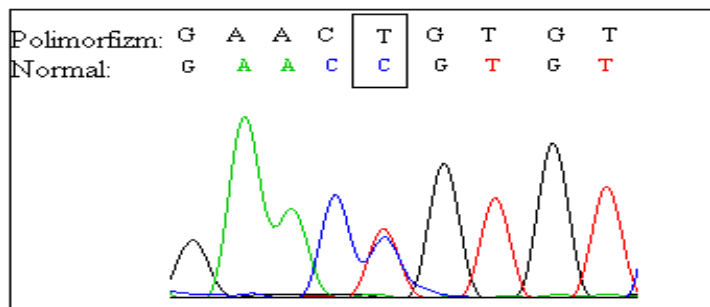
Şekil 3.23 rs8137478 SNP'sinin heterozigot durumda kromotogram görüntüsü.



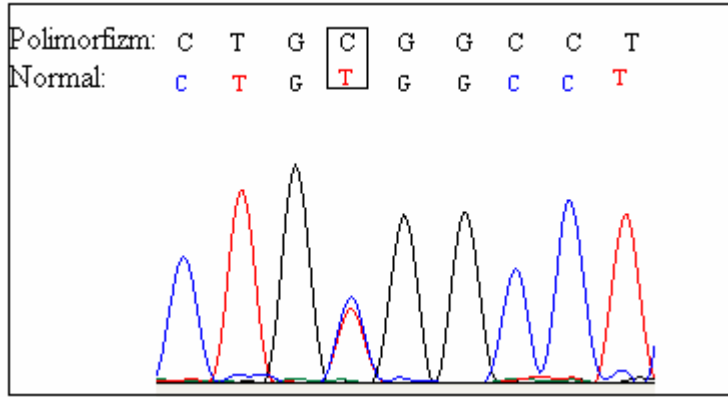
Şekil 3.24 rs5770917 SNP'sinin heterozigot durumda kromotogram görüntüsü.



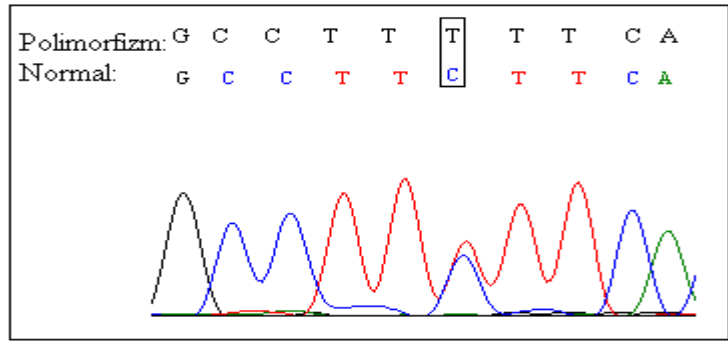
Şekil 3.25 rs5770911 SNP'sinin heterozigot durumda kromotogram görüntüsü.



Şekil 3.26 rs2073604 SNP'sinin heterozigot durumda kromotogram görüntüsü.



Şekil 3.27 rs2073605 SNP'sinin heterozigot durumda kromotogram görüntüsü.



Şekil 3. 28 rs12160714 SNP'sinin heterozigot durumda kromotogram görüntüsü.

4.TARTIŞMA

Narkoleptik bireylerin 2/3'ü araba kullanırken uyuya kalmakta, %78'i ise iş performanslarında düşüşten şikayet etmektedir(82). Hastaların %50'sinde ise depresyon gözlenmektedir(83). Hastalığın beraberinde getirdiği zorluklar doğrultusunda bireylerin sosyal yaşamları son derece kötü etkilenmekte, çalışma hayatlarında aksamalar, sosyal ortamlarda barınamama ve daha da önemlisi istem dışı uyku ve katapleksi atakları nedeni ile hayatlarını tehlikeye atıcı durumlar yaşamaktadırlar. Tedavi sürecinin sadece semptomatik olması ve kullanılan ilaçlara karşı toleransın gelişebilmesi, hastalığı daha da zor hale getirmektedir.

Narkolepsi ile yapılan aile çalışmalarında, hastalığın mekanizmasında genetik geçişin rol oynadığı öne sürülürken net kanıtların elde edilememesi ve ikiz çalışmalarında saptanan düşük korkordans çevresel faktörlerinde hastalığın oluşumunda önemli rolü bulunduğu göstermiştir(3). Özetle narkolepsi oldukça kompleks ve multifaktöriyel bir uyku rahatsızlığıdır. Bu hastalığın seçilmesindeki hedef böyle kompleks olan bir hastalığa katkıda bulunabilecek sonuçlar elde etmektir

Narkolepsinin genetik temelini ortaya çıkarılması için son yıllarda narkolepsili bireylerde yapılan assosiyasyon çalışmaları sıklaşmıştır. Bu çalışmalardan biri olan, Japon ve Kore popülasyonunda yapılan genom boyu assosiyasyon çalışmasında, CPT1B ve CHKB genleri arasında yerleşimi bulunan rs5770917 SNP'sinin katapleksili narkolepsiye yakınlık sağladığı öne sürülmüştür. Yine bu çalışmada rs5770917 SNP'sinin, rs5770911 SNP'si ile *güçlü linkage disequilibrium (LD)* gösterdiği belirlenmiştir. Yapılan eş zamanlı kantitatif PCR (RT-PCR) ile polimorfizmi heterozigot bulunduran bireylerde CPT1B ekspresyonunun anlamlı olarak düşük olduğu gösterilmiştir(67). Bu çalışmanın büyük sayılı gruplarla yapılması ve CPT1B geninin uyku regülasyonunda rol aldığını gösteren yayınların varlığı, bu gen ile çalışmamızı tetiklemiştir(78, 79, 67).

Bu çalışmada, olgu grubu bireylerinde CPT1B geninin okunan ekzonları ile bahsedilen çalışmada ilişkisi olduğu gösterilen rs5770917 ve rs5770911 SNP'lerini içeren bölgeler, PCR ile çoğaltıldı. Çoğaltılan gen bölgelerinin dizi analizi sonuçlarında, rs5770917 ve rs5770911 de dahil olmak üzere toplam 13 SNP saptandı (Tablo 3.2).

İlk gönderilen PCR ürünlerinin dizi analizleri sonuçlarına bağlı olarak, 7 ekzon ve rs5770917 içeren bölgeler hem olgu grubunda hem de kontrol grubunda çoğaltılıp dizi analizi yapıldı. Diğer bir değişle saptanan 9 SNP'nin (rs5770917, rs8137478, rs3213445, rs3213446,

rs2269383, rs8142477, rs5770911, rs2073604, rs2073605) hem olgu hem de kontrol grubundaki genotip ve allelik frekansları hesaplandı(Tablo 3.3).

Yaptığımız çalışma narkolepsi hastalarında rs5770917 SNP'sinin ve CPT1B genindeki nükleotid değişikliklerinin birlikte araştırılması açısından bir ilkdir. Şu ana kadar böyle bir yayına rastlanmamıştır. Daha önce, rs5770917 SNP'sinin, *essential* hipersomniya (EHS) hastalarında genotiplenmesi sonucunda, bu SNP'nin EHS' nin gelişiminde genetik risk belirteci olduğu gösterilmiştir(84). Katapleksili narkolepsi hastalarında olduğu gibi, rs5770917'nin EHS hastaları ile ilişkili bulunması ev EHS'nin GAUE semptomunu barındırırken katapleksiyi barındırmaması, rs5770917 SNP'sinin, GAUE ile ilişkili iken katapleksi ile ilişkisinin olmadığı yorumlarını akla getirmektedir(84).

Elde edilen dizi analizleri sonuçları ve yapılan yorumlar ileriki kısımlarda her bir SNP için ayrı ayrı yapılmıştır.

Narkolepsi ile ilişkisinin olduğu öne sürülen rs5770917A<G polimorfizminde normal genotip (A/A) frekansı olgu grubunda 0.900, kontrol grubunda 0.940 olarak saptanmıştır. Heterozigot genotip (A/G) fekansı olgu grubunda %6.7 bulunurken, kontrol grubunda %6 bulundu. Homozigot genotip (G/G) frekansı olgu grubunda %3.3 iken, kontrol grubunda homozigot polimorfizm genotipine rastlanmadı. A ve G allelik frekansları ise sırasıyla olgu grubunda 0.560, 0.067 iken kontrol grubunda yine sırasıyla 0.970 ve 0.030 olarak saptandı.

Narkolepsi ile ilişkili olabileceği önerilen diğer bir SNP olan rs5770911G<A polimorfizminde normal genotip (G/G) frekansı olgu grubunda 0.90, kontrol grubunda 0.960 olarak saptandı. Heterozigot genotip (G/A) fekansı olgu grubunda %6.7 bulunurken, kontrol grubunda %4 bulundu. SNP'nin homozigot (G/G) frekansı olgu grubunda (%3.3) iken, kontrol grubunda homozigot polimorfizm genotipine rastlanmadı. Ayrıca G allelik frekans olgu grubunda 0.933, kontrol grubunda 0.980 bulunurken, A allelik frekans olgu grubunda 0.670 iken kontrol grubunda 0.020 olarak saptandı.

Yukarıda frekansları verilen rs5770917 ve rs5770911 SNP'lerinin aynı hastalarda görüldüğü belirlenmiştir(Tablo4.1). Heterozigot ve homozigot olarak polimorfizmin bulunması açısından da hastalar aynıdır.

Tablo 4.1. Polimorfizmlerin görüldüğü Hastalar

rs Numarası	Polimorfizmi Taşıyan Hasta Numaraları	
	Heterezigot	Homozigot
rs5770917	8, 10	25
rs8137478	8, 10,24	25
rs3213445	8, 10, 24	25
rs3213446	8, 10, 17, 24	25
rs131759	1, 3, 4, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 19, 24, 26, 30	2, 5, 17, 20, 22, 27
rs2269383	24	-
rs131760	1, 3, 4, 6, 7, 12, 13, 18, 21, 23, 26	2, 8, 10, 17, 19, 20, 22, 24, 25, 27
rs8142477	8, 10, 21, 23, 24, 29	25
rs5770911	8, 10	25
rs470117	1, 3, 4, 6, 7, 8, 9, 15, 19, 24, 26, 30	2,5, 17, 20, 22, 27
rs2073604	8, 10, 24	25
rs2073605	8, 10, 11, 24	25
rs12160714	19,21	-

rs8137478 C<G polimorfizminde normal genotip (C/C) frekansı olgu grubunda 0.867, kontrol grubunda 0.920 olarak bulundu. Heterezigot genotip (C/G) fekansı olgu grubunda 0.100, kontrol grubunda 0.08 bulundu. SNP'nin homozigot (G/G) frekanssı olgu grubunda (%3.3) iken, kontrol grubunda homozigot polimorfizm genotipine rastlanmadı.

Ayrıca C allelik frekans olgu grubunda 0.917, kontrol grubunda 0.960 bulunurken, G allelik frekans olgu grubunda 0.083 iken kontrol grubunda 0.040 olarak saptandı.

rs3213446 G<A polimorfizminde normal genotip (G/G) frekans olgu grubunda 0.815, kontrol grubunda 0.880, heterozigot genotip (G/A) frekans olgu grubunda 0.148 bulunurken, kontrol grubunda 0.120 bulundu. Homozigot (G/G) frekans olgu grubunda 0.037) iken, kontrol grubunda homozigot polimorfizm genotipine rastlanmadı. Ayrıca G allelik frekans olgu grubunda 0.889, kontrol grubunda 0.940 bulunurken, A allelik frekans olgu grubunda 0.111 iken kontrol grubunda 0.060 olarak saptanmıştır.

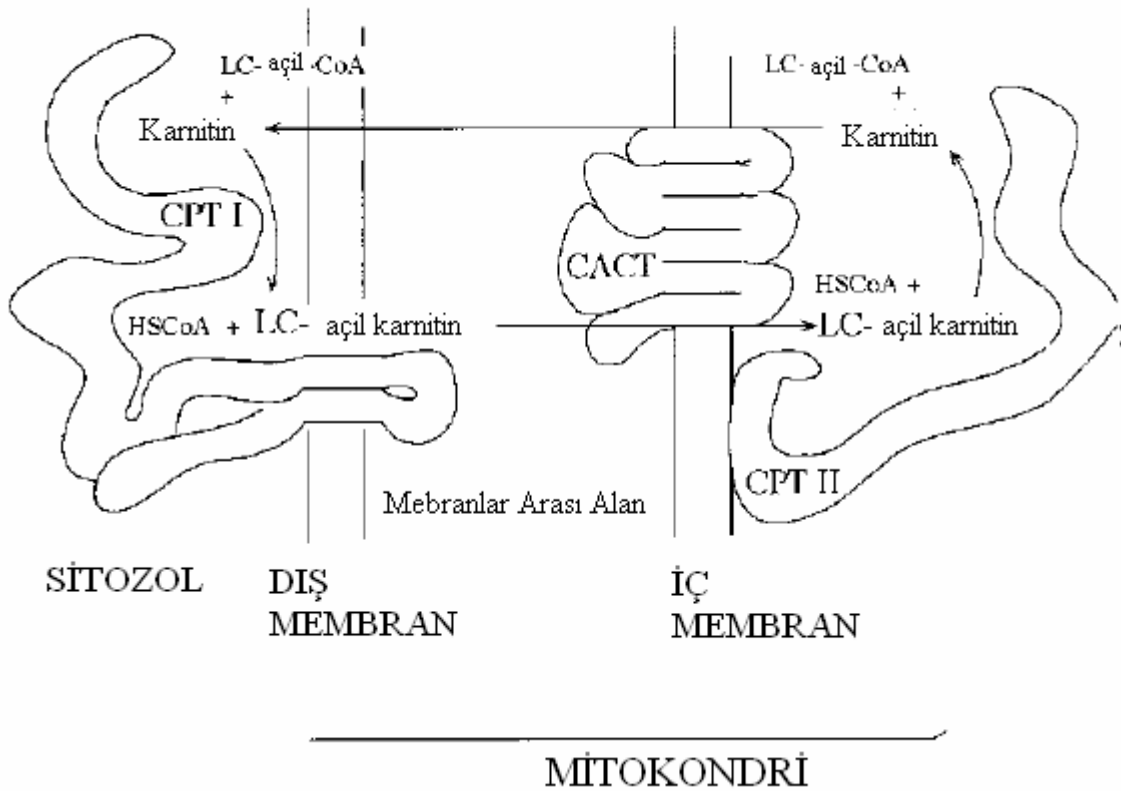
rs2073604 C<T polimorfizminde normal genotip (C/C) frekans olgu grubunda 0.867, kontrol grubunda 0.917 olarak saptandı. Heterozigot genotip (C/T) frekans olgu grubunda 0.100 bulunurken, kontrol grubunda 0.083 saptandı. SNP'nin homozigot (T/T) frekans olgu grubunda (%3.3) iken, kontrol grubunda homozigot polimorfizm genotipine rastlanmadı. Ayrıca C allelik frekans olgu grubunda 0.917, kontrol grubunda 0.920 bulunurken, T allelik frekans olgu grubunda 0.083 iken kontrol grubunda 0.040 olarak bulundu.

rs2073605 C<T polimorfizminde normal genotip (C/C) frekans olgu grubunda 0.834, kontrol grubunda 0.896 olarak saptandı. Heterozigot genotip (C/T) frekans olgu grubunda 0.133, kontrol grubunda 0.104 bulundu. SNP'nin homozigot (T/T) frekans olgu grubunda (%3.3) iken, kontrol grubunda homozigot genotipine rastlanmadı. Ayrıca C allelik frekans olgu grubunda 0.900, kontrol grubunda 0.948 bulunurken, T allelik frekans olgu grubunda 0.010 iken kontrol grubunda 0.052 olarak saptandı.

Ekzon içerisinde bulunan ve aminoasit değişimlerine neden olan 4 farklı SNP tanımlanmıştır (Tablo 3.2). Bu polimorfizmler missens özellikte olup, amino asitlerde değişiklik meydana getirmektedirler. Amino asit değişiklikleri dolayısıyla rastlanan bu tip SNP'ler, enziminin kimyasal ve 3 boyutlu yapısında değişikliğe neden olabilir. Yapısal olarak değişen enzimin aktivitesinde de değişiklikler olup işlevini bozabilir.

Genin 3. ekzonunda bulunan rs3213445 (A<G) SNP'si amino asit değişimine neden olan SNP'lerden biridir. Normal genotip (A/A) frekans olgu grubunda 0.812, kontrol grubunda %88 olarak bulundu. Heterozigot genotip (A/G) frekans olgu grubunda 0.111, kontrol grubunda 0.120 bulundu. Homozigot (G/G) frekans olgu grubunda 0.037 iken, kontrol grubunda homozigot polimorfizm genotipine rastlanmadı. Ayrıca A allelik frekans olgu grubunda 0.907, kontrol grubunda 0.940 bulunurken, G allelik frekans olgu grubunda 0.093 iken kontrol grubunda 0.060 olarak bulundu.

Bu SNP, 66. konumdaki izolösün amino asidinin valine değişimine neden olur. Her iki amino asitte hidrofobik özelliktedir. CPT1, proteinin N-ucunda bulunan iki transmembran domaini ile membranı geçmektedir. Hem N-ucu hem de C-ucu, sitozolik tarafa bakmaktadır ve C-ucu enzimin aktif tarafı olarak düşünölmektedir(70,71). CPT1 enziminin membrandaki yeri Şekil 4.1' de gösterilmiştir. N-ucu domaininde bulunan 66.amino asidindeki değişikliğinin aminoadidin hidrofobik özelliğini değiştirmediğinden dolayı enzim bütönlüğünü etkilemeyeceği olasılıklar arasındadır. İnsan dışındaki tüm memelilerde (fare,sıçan koyun) valin amino asidi olarak korunmuştur. Fakat bu residü insanlarda izolösün olarak bulunmaktadır. Bu yüzden dolayı insandaki bu amino asit değişikliği enzim yapısını etkileyebilir olabileceği düşünölmektedir(85).



Şekik 4.1 Karnitin poloyiltransferaz sistemi(22).

rs2269383 G<A normal genotip (G/G) frekansı olgu grubunda 0.967, kontrol grubunda 0.959 olarak bulunmuştur. Heterozigot (G/A) frekansı olgu grubunda 0.033, kontrol

grubunda 0.041 bulundu. Homozigot (A/A) genotipiner hem olgu grubunda hem de kontrol grubunda rastlanmadı. G allelik frekans olgu grubunda 0.983, kontrol grubunda 0.980 bulunurken, A allelik frekansı olgu grubunda 0.017 iken kontrol grubunda 0.020 olarak bulundu

Bu SNP, glisin olan 320. amino asidin asparjine dönüşmesine neden olur. Glisin apolar (hidrofobik) özelliكتedir. Asparjin ise polar yüksüz özelliğini taşımaktadır. Amino asidin özelliğinin kimyasal özelliğinin değişmesinden dolayı bu değişikliğin enzimin yapısında yansıyıp enzim fonksiyonunda değişikliklere neden olabilir.

rs8142477 C<G normal genotip (C/C) frekansı olgu grubunda 0.741, kontrol grubunda 0.800 bulundu. Heterozigot (C/G) fekans olgu grubunda 0.222, kontrol grubunda 0.200 bulundu. Homozigot polimorfizm (G/G) genotipi olgu grubunda 0.037 iken kontrol grubunda homozigot genotipe rastlanmadı. C allelik frekans olgu grubunda 0.852, kontrol grubunda 0.900 bulunurken, G allelik frekansı olgu grubunda 0.148 iken kontrol grubunda 0.100 olarak bulundu.

İnsanda serin olarak bulunan 427. amino asit, fare ve sığanda sistein, koyunda ise histidin olarak bulunmaktadır(85). rs8142477 SNP'si, serin amino asidinin sistein ile değiştiği gösterilmiştir. Sistein amino asidinin, proteinin ikincil yapısında yer alan disülfid bağlarının oluşumunda önemli rol oynamasından dolayı bu farklılık enzim yapısında değişikliğe neden olabilir(85). Ayrıca CRAT enziminin kristal yapısı baz alınarak, CPT1A enziminin üç boyutlu yapısının öngörüldüğü bir çalışmada, CPT1A'nın His⁴⁷³ ve Asp⁴⁷⁷ residüsünün enzimin katalitik aktivitesinde rol aldığını öngörülmüştür(86). Bu bölge aynı zamanda CPT1B enziminde de korunmuş bir bölgedir. CPT1B ile CPT1A'nın korunan bölgeleri Şekil 4.2'de gösterilmiştir. Bundan dolayı CPT1B enzimi içinde aynı görevi üstlenmiş olabileceği düşünülebilir. 427. amino asitte meydana gelen SNP katalitik olan bu bölgeye yakın olması nedeni ile enzimin katalitik aktivitesinde rol alan bir bölge olabilir.

rs470117 SNP'si 531. amino asit olan glutamik asidin lizin amino asidine dönüşmesine neden olmaktadır. Fare, sığan, koyun ve insanda bu bölge glutamik asit olarak korunmuştur(85). Glutamik asit polar asidik özellikteyken, lizin polar bazik özelliktedir. Amino asitlerin değişimi ile yük değişimi de gerçekleşmektedir ve bu durumda enzimin yapısını değiştirebilir. CPT1A ve CPT1B' de korunmuş olan Ser⁶⁸⁵ ve Thr⁶⁸⁶ residülerinin karnitin ve palmitoyil-CoA'nın bağlanması ve transferinde rol alan residüler olduğu öne

sürülmüştür(86). Bu bölge 531. amino asidin olduğu yere yakındır ve bu işlevini etkileyebileceği düşünülebilir.

Yukarıda amino asit değişimine neden olan polimorfizmlerin 3 tanesi (I66V, S427C ve E531K), metabolik bir bozukluk olan ve genel bitkinlik ile gözlenen Raynaud Sendromu'na sahip olan kişilerde de gözlenmiştir. Raynaud, el ve ayak parmaklarına giden kan akımında ki bozulma ile karakterize bir klinik durumdur. Bu üç polimorfizmin enzim aktivitesine olan etkileri araştırılmış ve anlamlı fark bulunamamıştır(85).

Kontrol grubunda dizi analizi yapılmayan gen bölgelerindeki polimorfizmlerin sadece olgu grubundaki genotipik ve allelik yüzdeleri belirlendi.

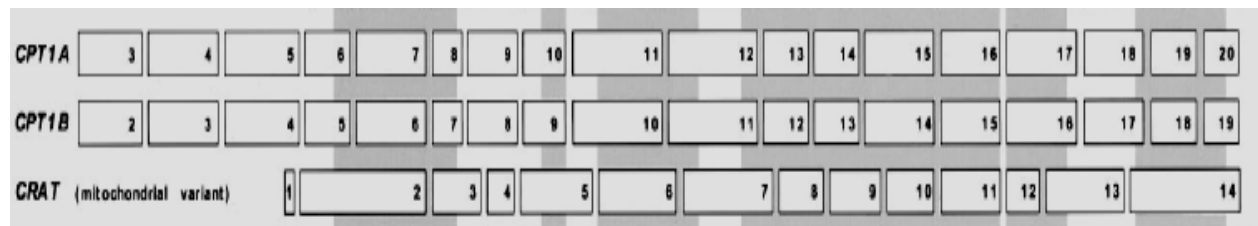
131759 C<T olgu grubundaki normal, heterzigot, homozigot genotip frekansları sırasıyla şöyledir: %36.7, %43.3, %20. C allelik frekansı %58.3, T allelik frekansı %41.7 olarak bulundu. rs131760 A<G olgu grubundaki normal, heterzigot, homozigot frekansları sırasıyla şöyledir: %27.6, %37.9, %34.5. A allelik frekansı %46.6, G allelik frekansı %53.4 olarak bulundu. rs470117 G<A olgu grubundaki normal, heterzigot, homozigot frekansları sırasıyla şöyledir: %40 %20, %40. G allelik frekansı 0.60, A allelik frekansı 0.40 olarak saptandı. rs12160714 C<T olgu grubundaki normal, heterzigot frekansları sırasıyla şöyledir: %93.3, %6.7, homozigot genotip ise saptanmıştır. C allelik frekansı 0.967, T allelik frekansı 0.0330 olarak saptandı.

Kontrol gruplarında da genotip ve allelik frekansları bulunan polimorfizmler “HapMap CEU” ile yapılan genotip ve allelik frekanslarla karşılaştırıldığında birbirlerine oldukça yakın frekansların bulunduğu gözlenmiştir. HapMap ile yapılan frekans çalışmaları Tablo 4.1’ de toplanmıştır(http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_ref.cgi?rs=5770917, http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_ref.cgi?rs=5770917).

Tablo 4.2 Hap Map ile belirlenen, SNP'lerin Avrupa popülasyonundaki genotip ve allelik frekansları.

rs Numarası	Genotip		Allelik Frekans(%)		Popülasyon (HapMap CEU)
	Genotip	Genotip	Allelik Frekans(%)	Allelik Frekans(%)	
rs5770917 A<G	A/A (%)	G/G (%)	A (%)	G (%)	Avrupa
	0.915	-	0.958	0.043	Avrupa
rs3213445 A<G	A/A (%)	G/G (%)	A (%)	G (%)	Avrupa
	0.816	-	0.908	0.092	Avrupa
rs3213446 G<A	G/G (%)	A/A (%)	G (%)	A (%)	Avrupa
	0.917	-	0.958	0.042	Avrupa
rs2269383 G<A	G/G (%)	A/A (%)	G (%)	A (%)	Avrupa
	0.842	-	0.921	0.079	Avrupa
rs8142477 C<G	C/C (%)	G/G (%)	C (%)	G (%)	Avrupa
	0.867	-	0.933	0.067	Avrupa
rs5770911 G<A	G/G (%)	A/A (%)	G (%)	A (%)	Avrupa
	0.814	-	0.907	0.907	Avrupa
rs2073604 C<T	C/C (%)	T/T (%)	C (%)	T (%)	Avrupa
	0.917	-	0.959	0.042	Avrupa
rs2073605 C<T	C/C (%)	T/T (%)	C (%)	T (%)	Avrupa

Belirlenen polimorfizmlerde olgu ve kontrol grupları arasındaki genotip ve allelik frekanslar arasında büyük farklar gözlenmemiştir. Dikkati çeken bir nokta kontrol grubu çalışılan SNP'lerden rs2269383 harcindeki diğer SNP'lerin, hastalarda homozigot genotipine rastlanırken, kontrol grubunda homozigot polimorfizm genotipine rastlanmamıştır.



Şekil 4.2 CRAT ve CPT'nin protein benzerliklerine bağlı olarak ekzonlarında korunan bölgelerin gösterimi. Koyu olarak gölgelendirilmiş kısımlar korunan kısımları temsil etmektedir(22).

Narkolepsinin, HLA DR2 ile ilişkili olduğu 1983 yılında Japon populasyonunda bulunmuştur ve bu çalışmada tüm hastalar DR2 pozitif iken kontrol grubunda ise %33 pozitiflik gözlenmiştir(49). Daha sonraki çalışmalarda HLA DQ bölgesinin de narkolepsi ile ilişkisi olduğu gösterilmiştir(51). Tekrallanan ve farklı etnik gruplarda yapılan çalışmalarda, DQB1*0602'nin farklı etnik gruplar arasında narkolepsinin en specific belirteci olduğu ortaya konmuştur(17).

Normal populasyonda DQB1*0602'nin pozitifliği %12-38 arasında iken katapleksi-narkolepsi hastalarında bu oranın %90 olduğu gösterilmiştir(52,3). Katapleksisiz narkolepsi hastalarında ise oran düşük olup %41'dir(3).

Bizim çalışmamızda, bulunan sonuçlar yukarıda özetlenen literatür ile paralel olmuştur. Olgu grubunda DQB1*0602 pozitif olan hastaların oranı %40, katapleksi-narkolepsi hasta oranı da %40'dır.

Tablo 3.1'de özetlendiği gibi, olgu grubundaki, 11 katapleksi-narkolepsi hastalarının, 10 tanesinde yani katapleksi-narkolepsi hastalarının %90.9'unda DQB1*0602 alleli pozitif olarak bulunmuştur.

Olgu grubunda DQB1*0602 allelini taşıyan 12 olgunun 10 tanesi katapleksi-narkolepsi hastasıdır yani HLA DQB1*0602 pozitif olan hastaların %83.3'ü katapleksi-narkolepsi hastasıdır.

Bu oranlar literatürde bulunan DQB1*0602 alleli ve katapleksi-narkolepsi arasında bulunan ilişkiyi doğrulamaktadır.

Kontrol grubunda, 50 kişiden 7 tanesi HLA DQB1*0602 pozitif bulundu yani HLA DQB1*0602 pozitifliği %14'dür. Normal populasyonda %12-38 arasında bulunduğunu gösteren yayınlar ile benzer sonuçlar elde edilmiştir.

Türk populasyonunda nadir yapılan narkolepsi araştırmalarından birinde, toplam 8 erken başlangıçlı katapleksi-narkolepsi olgusundan 7 (%87.5) tanesinin DQB1 0602 pozitif olduğu gösterilmiştir(87). Bulduğumuz sonuçlar bu çalışmayı da desteklemektedir.

Hastalarda rs5770917 SNP'si ile DQB1*0602 pozitifliği arasındaki ilişkiye bakıldığında, SNP'yi heterozigot olan taşıyan hastalar (No:8 ve 10) DQB1*0602 pozitifdir. Fakat bu polimorfizm ile birlikte diğer birçok polimorfizmi de homozigot olarak bulduran hastada(No:25) DQB1*0602 alleli yoktur. Bu bulgulara göre; rs5770917 SNP'sinin DQB1 allelinin varlığı ile bir ilişkisinin olduğu çıkarılabilir.

Literatüre göre, CPT1B geninde narkolepsi ile ilişkili bulunan SNP'ler ve gendeki diğer nükleotid değişikliklerinin araştırıldığı en kapsamlı araştırmadır.

Taşınan HLA alt tiplerinin populasyonlar arası farklılık göstermesi ve narkolepsi semptomlarının ayırıcı olması, narkolepsi ile HLA allel ilişkilerinin farklı popoulasyonlarda tekrarlanması gereğini doğurmaktadır. Ülkemizde de oldukça az bulunan bu çalışmalara, narkolepsi ile HLA DQB1*0602 allelinin pozitifliği araştırılarak, kompleks olan narkolepsi bilgilerine katkı sağlanmıştır.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Narkolepsi, hastalığa sahip bireylerin yaşamlarını tüm yönleriyle olumsuz yönde etkileyen bir uyku bozukluğudur. Yıllardır “Neden uyuyoruz?” sorularına karşılık olarak birçok teori ortaya konmuştur fakat yaşamımızın 1/3’ini geçirdiğimiz bu süreç hala tam olarak çözülememiştir. Dolayısı ile uyku bozukluklarının çoğunun net temelleri bilinmemekte ve kompleks rahatsızlıklar olarak araştırılmaya devam edilmektedir.

Narkolepsi prevalans sonuçlarının belirlenenden daha yüksek olduğu tahmin edilmektedir. Birçok insanın semptomları hafif şiddette yaşamaları ya da bilgi eksikliğinden kayaklanan açıklık ile bunun gelip geçici bir durum olduğunu düşünmeleri nedeni ile tanı almamış vakaların fazla olduğu düşünülmektedir. Ülkemizde narkolepsi için yapılmış bir prevalans çalışması bulunmamaktadır.

HLA allellerinin narkolepsi ile ilişkili bulunmaları, narkolepsinin otoimmün temelli olabileceğini düşündürmektedir. Ayrıca BOS hipokretin-1 seviyelerinin narkolepsi hastalarında düşük bulunması ve ardından hipokretin üreten nöronların hipotalamusta sayılarının azalmasının nedeninin otoimmün reaksiyonlar sonucu olduğu düşünülmektedir. Net olarak immünite ile ilgili bir kanıtı rastlanamamış olsada, immün sistemde rol alan birçok genin narkolepsi ile ilişkilerinin olup olmadığı araştırılmaya devam edilmektedir.

HLA alt tiplerinin farklı populasyonlarda farklı sıklıkta ve farklı alleller şeklinde taşındığı ve farklı klinik özelliklere neden olduğu gösterilmiştir. Yaptığımız çalışma, HLA DQB1*0602 allelinin sıklıklarının literatürü doğrulaması ile farklı etnik gruplarda klinik özellikler ve genetik olarak kompleks bir bozukluk olan narkolepsinin tanısına katkı sağlayacaktır.

HLA allelleri ve CPT1B geninin ve belirlenen SNP’lerin narkolepsi ile ilişkisinin tam anlamıyla ortaya çıkarılabilmesi için daha ileri düzeyde geniş hasta gruplarındaki çalışmalar ile narkolepsinin genetik temelleri üzerine daha net bilgiler edinileceğini düşünmekteyiz. Narkolepsi rahatsızlığını yaşayan kişilerin, Türkiye’de ne kadar sıklıkta olduğu bilinmemektedir. Elde edilen sonuçların daha iyi yorumlanabilmesi için, ilk olarak prevalans çalışmalarının yapılmasının gerekliliği açıktır. Diğer tüm kompleks hastalıklarda olduğu gibi narkolepside de, yapılan her bir çalışma daha sonraki çalışmaların ve tedavi protokollerinin geliştirilebilmesi önemli olacaktır.

KAYNAK LİSTESİ

1. Nishino S. Clinical and neurobiological aspects of narcolepsy. *Sleep Medicine*, 2007; 8: 373–399
2. Dauvilliers Y, Arnulf I, Mignot E. Narcolepsy with cataplexy. *Lancet*, 2007; 369: 499–511
3. Chabas D, Taheri S, Renier C, Mignot E. The genetics of narcolepsy. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet*, 2003; 4: 459–83
4. Mignot E. History of narcolepsy: A hundred years of research. *Arch. Ital. Biol*, 2001;139(3):207-20.
5. Plazzia G, Serraa L, Ferric R. Nocturnal aspects of narcolepsy with cataplexy. *Sleep Medicine Reviews*, 2008; 12: 109–128
6. Billiard M. Diagnosis of narcolepsy and idiopathic hypersomnia:An update based on the International Classification of Sleep Disorders, 2nd edition. *Sleep Med Rev*, 2007; 11(5): 377-88
7. Ohayon MM, Priest RG, Caulet M, Guilleminault C. Hypnagogic and hypnopompic hallucinations: pathological phenomena. *Br J Psychiatry*, 1996; 169(4): 459–67.
8. Ondze´ B, Lubin S, Lavandier B, Kohler F, Mayeux D, Billiard M. Frequency of narcolepsy in the population of a French department. *Sleep*, 1999; 22(Supplement): 121.
9. Dement WC, Carskadon M, Ley R. The prevalence of narcolepsy II. *Sleep Res*, 1973; 2: 147.
10. Lavie P, Peled R. Narcolepsy is a rare disease in Israel. *Sleep*, 1987; 10(6): 608–9.
11. Zeman A, Britton T, Douglas N, Hansen A. Narcolepsy and excessive daytime sleepiness. *BMJ* 2004; 329: 724-728
12. Dauvilliers Y, Montplaisir J, Molinari N, Carlander B, Ondze B, Besset A, et al. Age at onset of narcolepsy in two large populations of patients in France and Quebec. *Neurology*, 2001; 57: 2029–33.
13. Guilleminault C, Mignot E, Grumet FC. Familial patterns of narcolepsy. *Lancet*, 1989; 2(8676): 1376–9
14. Billiard M, Pasquie-Magnetto V, Heckman M, Carlander B, Besset A, Billiard M. Family studies in narcolepsy. *Sleep*, 1994; 17: 54–9.

15. Mignot, E,1998. Genetic and familial aspects of narcolepsy. *Neurology*, 1998; 50: 16–S22.
16. Ohayon MM, Ferini-Strambi L, Plazzi G, Smirne S, Castronovo V. Frequency of narcolepsy symptoms and other sleep disorders in narcoleptic patients and their first-degree relatives. *J Sleep Res*, 2005 Dec; 14(4): 437-45
17. Mignot E. Genetic and familial aspects of narcolepsy. *Neurology*, 1998; 50: 16–22.
18. Kadotani H, Faraco J, Mignot E. Genetic studies in the sleep disorder narcolepsy. *Genome Res*. 1998; 8: 427-434
19. Lankford DA, Wellman JJ, O’Hara C. Posttraumatic narcolepsy in mild to moderate closed head injury. *Sleep*, 1994; 17: S25–S28.
20. Orellana C, Villemin E, Tafti M, Carlander B, Beset A, Billiard M. Life events in the year preceding the onset of narcolepsy. *Sleep*, 1994; 17: 50–S53.
21. Bassetti C, Aldrich M.S. Narcolepsy. *Neurol. Clin.*1996; 14: 545–571.
22. Aldrich, M.S.The neurobiology of narcolepsy. *Neurosci*, 1991; 14: 235–239.
23. Alóe F, de Azevedo A. P, Hasan R. Sleep-wake cycle mechanisms. *Rev Bras Psiquiatr*, 2005; 27: 9-33
24. Penelope A. Bryant, Sick and tired: does sleep have a vital role in the immune system. John Trinder and Nigel Curtis *Nature Reviews Immunology* 4,June 2004; 457-467
25. Marcel Hungs and Emmanuel Mignot. Hypocretin/orexin, sleep and narcolepsy. *BioEssays*, 2001; 23:397-408
26. Koch H, Craig I, Dahlitz M, Denney R, Parkes D. Analysis of the monoamine oxidase genes and the Norrie disease gene locus in narcolepsy. *Lancet*, 1999; 353: 645–6.
27. Hohjoh H, Nakayama T, Ohashi J, Miyagawa T ve ark. Significant association of single nucleotide polymorphism in the tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) gene promoter with human narcolepsy. *Tissue Antigens*, 1999;54: 138–45.
28. Hohjoh H, Terada N, Kawashima M, Honda Y, Tokunaga K. Significant association of the tumor necrosis factor receptor 2 (TNFR2) gene with human narcolepsy. *Tissue Antigens*, 2000; 56: 446–8.
29. Dauvilliers Y, Neidhart E, Lecendreux M, Billard M, Tafti M. MAO-A and COMT polymorphisms and gene effects on narcolepsy. *Mol Psychiatry*, 2001; 6: 367–72.

30. Nakayama J, Miura M, Honda M, Miki T, Honda Y, Arinami T. Linkage of human narcolepsy with HLA association to chromosome 4p13-q21. *Genomics*, 2000; 65: 84–6.
31. Dauvilliers Y, Blouin JL, Neidhart E, Carlander B, Eliaou JF, Antonarakis SE. A narcolepsy susceptibility locus maps to a 5 Mb region of chromosome 21q. *Ann Neurol*, 2004; 56: 382–8.
32. Genetics of the sleep-wake cycle and its disorders Pavel Hamet⁴, Johanne Tremblay. *Metabolism Clinical and Experimental*, 2006; 55: 7–12
33. Montplaisir J, Billard M, Takahashi S, Bell IR, Guilleminault C, Dement WC. Twenty-four-hour recording in REM-narcoleptics with special reference to nocturnal sleep disruption. *Biol Psychiatry*, 1978; 13(1): 78–89.
34. Godbout R, Montplaisir J. Comparison of sleep parameters in narcoleptics with and without periodic movements of sleep. *Sleep* 1985: 380–2
35. Schenck CH, Mahowald MW. Motor dyscontrol in narcolepsy: rapid-eye-movement (REM) sleep without atonia and REM sleep behavior disorder. *Ann Neurol*, 1992; 32(1): 3–10.
36. Bonakis A, Robin S, Williams A. Narcolepsy presenting as REM sleep behaviour disorder. *Clinical Neurology and Neurosurgery*, 2008; 110: 518–520.
37. Johns MW, A new method for measuring daytime sleepiness: the Epworth sleepiness scale. *Sleep*, 1991 Dec; 14(6): 540-5.
38. Carskadon MA, Dement WC, Mitler MM, Roth T, Westbrook PR, Keenan S. Guidelines for the multiple sleep latency test (MSLT): a standard measure of sleepiness. *Sleep*, 1986; 9: 519-24.
39. Aldrich MS, Chervin RD, Malow BA. 1997. Value of the multiple sleep latency test (MSLT) for the diagnosis of narcolepsy. *Sleep*, 20: 620–29
40. Rye DB, Jankovic J. Emerging views of dopamine in modulating sleep/wake state from an unlikely source. *Neurology*, 2002; 58(3): 341-6.
41. Littner M, Johnson SF, McCall WV, Anderson WM, Davila D, Hartse K, et al. Practice parameters for the treatment of narcolepsy: an update for 2000. *Sleep* 2001; 24: 451–66.
42. Hohagen F, Mayer G, Menche A, Riemann D ve ark. Treatment of narcolepsy-cataplexy syndrome with the new selective and reversible MAO-A inhibitor brofaromine - a pilot study. *Journal of Sleep Research*, 1993; 4: 250 - 256
43. Mitler MM, Hajdukovic R, Erman M, Koziol JA. Narcolepsy. *Journal of Clinical Neurophysiology*, 1990;7:93–118.

44. Larrosa O, Llave Y, Barrio S, Granizo JJ ve ark. Stimulant and anticataplectic effects of reboxetine in patients with narcolepsy: a pilot study. *Sleep*, 2001;24:282–5.
45. Billiard M. Narcolepsy: current treatment options and future approaches. *Neuropsychiatr Dis Trea*, 2008 Jun; 4(3): 557-66.
46. Carai MAM, Colombo G, Brunetti G, Melis S, Serra S, Vacca G, et al. Role of GABA(B) receptors in the sedative/hypnotic effect of gammahydroxybutyric acid. *Eur J Pharmacol*, 2001; 428(3): 315-21.
47. Dauvilliers Y, Tafti M. Molecular genetics and treatment of narcolepsy. *Ann Med*, 2006; 38(4): 252-62.
48. Shiina T, Inoko H, Kulski J. K, An update of the HLA genomic region, locus information and disease associations: 2004. *Tissue Antigens*, 2004; 64: 631–649,
49. Juji, T. M. Satake, Y. Honda, Y. Doi. HLA antigens in Japanese patients with narcolepsy. All the patients were DR2 positive. *Tissue Antigens*, 1984; 24: 316–319.
50. Neely S, Rosenberg R, Antel J, Arnason B. HLA antigens in narcolepsy. *Neurology*, 1987; 37: 1858–1860.
51. Mignot, E, Hayduk R, Black J, Grumet FC, Guilleminault C. HLA DQB1*0602 is associated with cataplexy in 509 narcoleptic patients. *Sleep*, 1997; 20: 1012–1020.
52. Kadotani, H., Faraco, J., and Mignot, E. (1998). Genetic studies in the sleep disorder narcolepsy. *Genome Res*, 1998; 8: 427–434.
53. Pelin Z, Guilleminault C, Risch N, Grumet FC, Mignot E. HLA-DQB1*0602 homozygosity increases relative risk for narcolepsy but not disease severity in two ethnic groups. *Tissue Antigens*, 1998.; 51: 96–100
54. Black JL. Narcolepsy: a review of evidence for autoimmune diathesis. *3rd. Int Rev Psychiatry*, 2005 Dec; 17(6): 461-9.
55. Rafael J. Salin-Pascual MD. The Role of the Hypothalamic Neuropeptides Hypocretin/Orexin in the Sleep-Wake Cycle. *Imaj*, 2001;3
56. Sakurai T, Amemiya A, Ishii M, Matsuzaki I ve ark. Orexin and orexin receptors: a family of hypothalamic neuropeptides and G protein- coupled receptors that regulate feeding behavior. *Cell*, 1998;92:573±85.
57. De Lecea L, Kilduff TS, Peyron C, Gaos X-B, Foye PE, Danielson PE, Fukuhara C, Battenberg ELF, Gautvik VT, Bartlett II FS, Frankel WN, Van den Pol AN, Bloom FE, Gautvik KM, Sutcliffe JG. The hypocretins: hypothalamus-specific peptides with neuroexcitatory activity. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998; 95: 322±7.

58. Taheri S, Zeitzer JM, Mignot E. The role of hypocretins (orexins) in sleep regulation and narcolepsy. *Annu Rev Neurosci*, 2002; 25: 283-313.
59. Genetic Ablation of Orexin Neurons in Mice Results in Narcolepsy, Hypophagia, and Obesity. Hara J, Beuckmann C, Nambu T, Willie J. *Neuron*, 2001 May; 30: 345–354,
60. Lin, L., Faraco J, Li R, Kadotani H, Rogers W ve ark. The sleep disorder canine narcolepsy is caused by a mutation in the hypocretin (orexin) receptor 2 gene. *Cell*, 1999; 98: 365–376.
61. Chemelli RM, Willie JT, Sinton CM, et al. Narcolepsy in orexin knockout mice: molecular genetics of sleep regulation. *Cell*, 1999; 98: 437-451
62. Peyron C, Faraco J, Rogers W, et al. A mutation in a case of early onset narcolepsy and a generalized absence of hypocretin peptides in human narcoleptic brains. *Nat Med*, 2000; 6: 991–97.
63. Nishino, S., Ripley, B., Overeem, S., Lammers, G.J., and Mignot, E. Hypocretin (orexin) deficiency in human narcolepsy. *Lancet*, 2000; 355: 39–40.
64. Peyron C, Tighe D.K, Pol A.N, Lecea, L ve ark. Neurons containing hypocretin (orexin) project to multiple neuronal systems. *J.Neurosci.*, 1998; 18: 9996–10015.
65. Kawashima M, Tamiya G, Oka A, Hohjoh H. Genomewide association analysis of human narcolepsy and a new resistance gene. *Am. J. Hum. Genet*, 2006; 79: 252–263.
66. Hallmayer J, Faraco J, Lin L, Hesselson S ve ark. Narcolepsy is strongly associated with the T-cell receptor alpha locus. *Nat Genet*, 2009; 41(6):708-11.
67. Miyagawa T, Kawashima M, Nishida N, Ohashi J. Variant between CPT1B and CHKB associated with susceptibility to narcolepsy. *Nat Genet.*, 2008; 40(11):1324-8. .
68. Bonnefont J, Djouadi F, Prip-Buus C, Gobin S, Munnich A. Carnitine palmitoyltransferases 1 and 2: biochemical, molecular and medical aspects *Molecular Aspects of Medicine*, 2004; 25: 495–520
69. Murthy MS, Pande SV. Malonyl-CoA binding site and the overt carnitine palmitoyltransferase activity reside on the opposite sides of the outer mitochondrial membrane. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1987; 84: 378–382.
70. Van der Leij FR, Kram AM, Bartelds B, Roelofsen H, Smid GB, Takens J, Zammit VA, Kuipers JR. Cytological evidence that the C-terminus of carnitine palmitoyltransferase I is on the cytosolic face of the mitochondrial outer membrane. *Biochem J*, 1999; 341: 777–784
71. Fraser F, Corstorphine CG, Zammit VA. Topology of carnitine palmitoyltransferase I in the mitochondrial outer membrane. *Biochem J*, 1997; 323:711–718

72. Britton, C.H., Mackey, D.W., Esser, V., Foster, D.W., Burns, D.K., Yarnall, D.P., Froguel, P., McGarry, J.D. Fine chromosome mapping of the genes for human liver and muscle carnitine palmitoyltransferase I. *Genomics*, 1997; 40: 209–211.
73. Yamazaki, N., Yamanaka, Y., Hashimoto, Y., Shinohara, Y., Shima, A., Terada, H. Structural features of the gene encoding human muscle type carnitine palmitoyltransferase I. *FEBS Lett*, 1997; 409: 401–406.
74. Price, N.T., van der Leij, F.R., Jackson, V.N., Corstorphine, C.G., Thomson, R., Sorensen, A., Zammit, V. A novel brain-expressed protein related to carnitine palmitoyltransferase I. *Genomics*, 2002; 80: 433–442
75. Longo N, di San Filippo C. A, Pasquali M. Disorders of carnitine transport and the carnitine cycle. *Am J Med Genet C Semin Med Genet*, 2006 May 15; 142C(2): 77–85
76. McGarry, J. D., Leatherman, G. F., and Foster, D. W. *J. Biol. Chem.* 1978; 253: 4128–4136
77. Yu, GS, Lu YC, Gulick T. Co-regulation of tissue-specific alternative human carnitine palmitoyltransferase I b gene promoters by fatty acid enzyme substrate. *J. Biol. Chem.*, 1998; 273, 32901– 32909.
78. Fasting-induced reduction in locomotor activity and reduced response of orexin neurons in carnitine-deficient mice Goichiro Yoshida a,b,1, Meng Xian Li a,1, Masahisa Horiuchi a,* , Shiro Nakagawa c. *Neuroscience Research*, 2006; 55: 78–86
79. Kuwajima M, Fujihara H, Sei H, Umehara A, Sei M, Tsuda TT, Sukeno A, Okamoto T, Inubushi A, Ueta Y, Doi T, Kido H. Reduced carnitine level causes death from hypoglycemia: possible involvement of suppression of hypothalamic orexin expression during weaning period. *Endocr J.*, 2007; 54(6): 911-25.
80. Sambrook J and Russel DW. *Molecular Cloning: A Laboratory MAnnual*, 3rd edition New Tork Cold Spring Harbor Lab. Pres 2001
81. Mignot E, Young T, Lin L, Finn L. Nocturnal sleep and daytime sleepiness in normal subjects with HLA-DQB1*0602. *Sleep*, 1999; 22(3):347-52.
82. Broughton R, Ghanem Q, Hishikawa Y, Sugita Y. 1981. Life effects of narcolepsy in 180 patients from North America, Asia and Europe compared to matched controls. *Can. J. Neurol. Sci.*, 1981; 8: 299–304.
83. Alaila SL. Life effects of narcolepsy: measures of negative impact, social support and psychological well-being. *loss grief care*, 1992; 5:1–22.
84. Miyagawa T., Honda M., Kawashima M., Shimada M. Polymorphism located between CPT1B and CHKB, and HLA-DRB1*1501-DQB1*0602 Haplotype Confer Susceptibility to CNS Hypersomnias (Essential Hypersomnia) *PLoS One*, 2009; 4(4): e5394

85. Yamazaki N, Matsuo T, Kurata M, Suzuki M. Substitutions of Three Amino Acids in Human Heart/ Muscle Type Carnitine Palmitoyltransferase I Caused by Single Nucleotide Polymorphisms. *Biochem Genet*, 2008; 46:54–63
86. Morillas M, Eduardo L, Vwlencia A, Serra D. Structural model of carnitine palmitoyltransferase I based on the carnitine acetyltransferase crystal. *Biochem. J*, 2004; 379: 777–784
87. Pelin Z, Bozluolcay M, Kaynak D, Kaynak H. Turk Childhood onset of narcolepsy-cataplexy syndrome in Turkey: clinical and genetic study. *J Pediatr*, 2002 Oct-Dec; 44(4): 321-5
88. Nishino S, Okura M, Mignot E. Narcolepsy: genetic predisposition and neuropharmacological mechanisms. *Sleep Medicine Reviews*, 2000; 4: 57–99, 2000.