

**ALZHEİMER HASTALARINDA *PSEN1* GENİ MUTASYON  
TARAMASI VE *APOE* GENOTİPLENDİRMESİ**

**SCREENING FOR MUTATIONS IN *PSEN1* GENE AND  
*APOE* GENOTYPING IN ALZHEIMER PATIENTS**

**TUĞÇE KARADUMAN**

**PROF. DR. HATİCE MERGEN**  
**Tez Danışmanı**

Hacettepe Üniversitesi  
Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin  
Biyoloji Anabilim Dalı İçin Öngördüğü  
YÜKSEK LİSANS TEZİ  
olarak hazırlanmıştır.

**TUĞÇE KARADUMAN**'ın hazırladığı “**Alzheimer Hastalarında PSEN1 Geni Mutasyon Taraması ve APOE Genotiplendirmesi**” adlı bu çalışma aşağıdaki jüri üyeleri tarafından **BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**'nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Erol AKSÖZ

Başkan

.....

Prof. Dr. Hatice MERGEN

Danışman

.....

Prof. Dr. Afife İZBIRAK

Üye

.....

Prof. Dr. Sibel SÜMER

Üye

.....

Doç.Dr. Erdal EROĞLU

Üye

.....

Bu tez Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tarafından **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak onaylanmıştır.

Prof. Dr. Fatma SEVİN DÜZ

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

**Canım babaannem ve  
biricik kardeşime...**

## ETİK

Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- tez içindeki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda ilgili eserlere bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu,
- atıfta bulunduğum eserlerin tümünü kaynak olarak gösterdiğimi,
- kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
- ve bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya başka bir üniversitede başka bir tez çalışması olarak sunmadığımı

beyan ederim.

22/01/2014

TUĞÇE KARADUMAN

## ÖZET

# ALZHEİMER HASTALARINDA PSEN1 GENİ MUTASYON TARAMASI VE APOE GENOTİPLENDİRMESİ

**Tuğçe KARADUMAN**

**Yüksek Lisans, Biyoloji Anabilim Dalı**

**Tez Danışmanı: Prof. Dr. Hatice MERGEN**

**Ocak 2014, 117 sayfa**

Demans, hatırlama, düşünme ve akıl yürütme becerisinde zamanla artan kayıp demektir. Yaşlı popülasyonda en sık görülen demans nedeni olan Alzheimer Hastalığı (AH), yüksek sıklıkla genetik ve çevresel faktörlerin etkileşimi sonucu ortaya çıkan nörodejeneratif bir hastalıktır. Daha nadir görülen erken başlangıçlı AH (EBAH), otozomal dominant Mendelyen geçişle belirlenen basit nedensellik gösterir. Hastalığın en sık görülen biçimi olan sporadik geç başlangıçlı AH (GBAH) ise multifaktöriyeldir, bu nedenle kompleks bir nedenselliğe sahiptir.

Presenilin-1 (*PSEN1*) geninde yanlış anlamlı mutasyonların varlığı, EBAH olgularında agresif ilerlemeden sorumludur. Ailesel EBAH sürecine yaptığı katkıların dışında *PSEN1* proteininin, GBAH olgularının büyük çoğunluğunda rolü olup olmadığı açık değildir. Yapılan çalışmalar, *PSEN1* proteininin yer aldığı bu biyolojik yolağın oldukça önemli olduğunu ve bu yolaktaki bozuklukların GBAH patogeneze katkıda bulunabileceğini düşündürmektedir.

GBAH'da gen mutasyonlarının mutlak belirleyiciliği yerine gen polimorfizmlerinin risk oluşturulması söz konusudur. Özellikle genom çapında ilişkilendirme çalışmalarının yaygınlaşması sonrasında çok sayıda risk geni belirlenmişse de, bunların hiçbiri GBAH için bulunan ilk risk geni olan Apolipoprotein-E (*APOE*)'de yer alan polimorfizmin sunduğu risk düzeyine yaklaşmamıştır.

Bu çalışma kapsamında, Alzheimer tanısı almış 30 hasta bireyde, *PSEN1* geni kodlayıcı bölgeleri DNA dizi analizi ile taranmıştır. Ayrıca hasta grubu ile demans öyküsü bulunmayan 40 kontrol bireyde *APOE*  $\epsilon_2$ ,  $\epsilon_3$  ve  $\epsilon_4$  polimorfizmlerinin genotip ve alel frekansları belirlenmiştir.

Hasta grubunda *PSEN1* geni kodlayıcı bölgelerinin DNA dizi analizi sonucunda herhangi bir mutasyona rastlanmamış, yalnızca *PSEN1* intron 8 bölgesinde rs165932 (G/T) polimorfizm varlığı belirlenmiştir. Polimorfizmin hastalıkla ilişkisini değerlendirmek üzere bu bölge sağlıklı kontrol bireylerde de DNA dizi analizi yöntemiyle incelenmiştir; ancak hasta ve kontrol gruplarında rs165932 (G/T) polimorfizmine ilişkin genotip ve alel frekansları dağılımı açısından farklılık gözlenememiştir ( $p>0.05$ ).

Çalışmamızda  $\epsilon_3/\epsilon_3$  genotip frekansı kontrol grubunda,  $\epsilon_3/\epsilon_4$  genotip frekansı ise hasta grubunda anlamlı düzeyde yüksek bulunmuştur ( $p<0.05$ ).  $\epsilon_3$  alel frekansının kontrol grubunda,  $\epsilon_4$  alel frekansının ise hasta grubunda anlamlı düzeyde yüksek olduğu belirlenmiştir ( $p<0.05$ ). Ailesinde demans öyküsü bulunan AH bireylerde  $\epsilon_4$  alel varlığı, demans öyküsü bulunmayan AH bireylere göre anlamlı derecede yüksek bulunmuştur ( $p<0.05$ ).

Hasta grubumuzda *PSEN1* genotipleri dağılımı ve  $\epsilon_4$  aleli taşıyıcılığı birlikte değerlendirildiğinde anlamlı bir farklılık bulunamamıştır ( $p>0.05$ ).

Sonuç olarak, çalışmamız kapsamında, Alzheimer Hastalığı ile *APOE*  $\epsilon_4$  aleli arasında güçlü bir bağlantı varken, *PSEN1* geni rs165932 (G/T) polimorfizmi ile hastalık patogenezi arasında bir ilişki olmadığı belirlenmiştir.

**Anahtar kelimeler:** Alzheimer Hastalığı, genetik polimorfizm, mutasyon, PZR-RFLP, DNA dizi analizi, *PSEN1*, *APOE*.

## **ABSTRACT**

# **SCREENING FOR MUTATIONS IN *PSEN1* GENE AND *APOE* GENOTYPING IN ALZHEIMER PATIENTS**

**TUĞÇE KARADUMAN**

**Master of Science, Department of Biology**

**Supervisor: Prof. Dr. Hatice MERGEN**

**January 2014, 117 pages**

Dementia means that the increasing losses of anamnesis, thinking and judgment skills with the passing of time. Alzheimer's Disease (AD) which is the most common dementia reason in elderly population, is a neurodegenerative disease and mostly appears as a combination of genetic and environmental factors. Early onset familial Alzheimer's Disease (EOAD) is rare and shows autosomal dominant Mendelian inheritance. The most common form of Alzheimer's Disease is late onset sporadic Alzheimer's Disease (LOAD) which is multifactorial, so it is more complex.

The presence of missense mutations in *PSEN1* gene is responsible for aggressive progression of early onset familial Alzheimer's Disease. It is not clear that the role of *PSEN1* on the most of LOAD case except the contributions to familial EOAD. Recent studies show that the biological pathway in which *PSEN1* play role is quite important and defects in this pathway could contribute to LOAD pathogenesis.

Instead of absolute determination of the disease by the gene mutations as in EOAD, gene polymorphisms present risk for the development of disease in LOAD. Although a large number of risk genes have already been shown for LOAD, particularly after the multiplication of genome-wide association studies (GWAS), none of them can approach the risk presented by the polymorphism of the apolipoprotein E gene (*APOE*), the first risk gene found for LOAD.

In this study, *PSEN1* gene coding regions were screened by using DNA sequence analysis in 30 patients with Alzheimer's Disease. Additionally, genotype and allele frequencies  $\epsilon 2$ ,  $\epsilon 3$  and  $\epsilon 4$  polymorphisms of *APOE* gene were determined in patient group and 40 controls without dementia story.

As a result of DNA sequence analysis any mutations have not been found in *PSEN1* gene encoding regions in patient group but rs165932 (G/T) polymorphism was found in *PSEN1* intron 8. To assess the relationship between this polymorphism and AD, this region were screened by DNA sequence analysis in the control group, but there is no significant differences in rs165932 (G/T) polymorphism's genotype and allele frequencies between control group and patients ( $p > 0.05$ ).

In our study, the results showed that  $\epsilon 3/\epsilon 3$  genotype frequency significantly higher in the control group and  $\epsilon 3/\epsilon 4$  genotype frequency significantly higher in patient group ( $p < 0.05$ ). While statistically significant  $\epsilon 3$  allele frequency was detected in the control group,  $\epsilon 4$  allele frequency were significantly higher among the patients with Alzheimer's Disease ( $p < 0.05$ ). When we compared to AD individuals with familial dementia history and without familial dementia history according to presence of  $\epsilon 4$  allele,  $\epsilon 4$  allele frequency were significantly higher AD individual with familial dementia history ( $p < 0.05$ ).

When we consider together *PSEN1* genotype distribution and  $\epsilon 4$  allele carriage in our patient group, it was not found any significance between them ( $p > 0.05$ ).

Consequently, in our study, while there was a strong association between Alzheimer's Disease and *APOE*  $\epsilon 4$  allele, there was no relation between *PSEN1* gene rs165932 (G/T) polymorphism and disease pathogenesis.

**Keywords:** Alzheimer's Disease, genetic polymorphism, mutation, PCR-RFLP, DNA sequence analysis, *PSEN1*, *APOE*.



## TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim ve bu çalışmanın her aşamasında, bilgi ve tecrübesiyle beni yönlendiren, hiçbir zaman desteğini benden esirgemeyen, akademik kişiliği ve çalışma prensipleri ile bana örnek olan, birlikte çalışmaktan her zaman mutluluk duyacağım değerli danışmanım Sn. Prof. Dr. Hatice MERGEN'e,

Tez çalışmam için gerekli klinik her türlü desteği sağlayan Sn. Doç.Dr. Erdal EROĞLU'na,

Öğütleri ve manevi desteğiyle her zaman yanımda olan hocam Sn.Uzm.Hasan ÜNAL'a,

Çalışmam süresince bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım Dr.İ. Çağatay KARAASLAN'a,

Laboratuvar çalışmalarım ve tez yazım aşamasında desteklerini esirgemeyen Dr. Emel SAĞLAR ve Arş. Gör. Beril ERDEM'e,

Desteğini o uzaklardayken de yanımda hissettiğim, tezimin şekillenmesine ve verilerimin istatistiksel analizlerinin gerçekleşmesine yardımcı olan Arş. Gör. Sibel KÜÇÜKYILDIRIM'a,

Motivasyon kaynağım, dostluğu ve yardımseverliği ile her zaman yanımda olan sevgili arkadaşım Arş. Gör. S. Elvan ÖZTÜRK'e, muhalefetleri ile fikir darlığına düşmemi engelleyen, çalışma ortamımızı anlamlı kılan, her zaman yanımda olan ve o istediği sürece her zaman yanında olacağım değerli arkadaşım Arş. Gör. Hayriye AKEL'e, tez düzenleme sürecime katkıda bulunan lisans öğrencisi Ofcan OFLAZ'a, çalışmalarına maddi destek sağlayan TÜBİTAK ve Hacettepe Üniversitesi ÖYP birimine,

Hayatımın her aşamasında daima yanımda olup beni yüreklendiren, destek, hoşgörü ve sevgisini asla esirgemeyen anneme ve süper babama, bir tebessümüyle tüm üzüntülerimi unutturan, hayattaki en büyük şansım, Yusuf Arda KARADUMAN'a, böylesi zamanlarda yokluğunu daha çok hissettiğim, beni yetiştiren ve benimle her zaman gurur duyduğuna inandığım canım babaanneme en içten teşekkürlerimi sunarım.

Tuğçe KARADUMAN

Ankara, Ocak 2014

# İÇİNDEKİLER

## Sayfa

ÖZET .....	i
ABSTRACT .....	iii
TEŞEKKÜR.....	v
İÇİNDEKİLER.....	vi
SİMGELER VE KISALTMALAR .....	x
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xiii
TABLolar DİZİNİ .....	xv
1.GİRİŞ .....	1
2.GENEL BİLGİLER.....	4
2.1. Demans ve Alzheimer Hastalığı .....	4
2.2. Alzheimer Hastalığı'nın Epidemiyolojisi.....	5
2.3. Alzheimer Hastalığı'nın Nöropatolojisi ve Patogenezi .....	5
2.3.1. Nörofibriler Yumaklar (NFY) .....	6
2.3.2. Amiloid Plaklar (AP) .....	7
2.4. Alzheimer Hastalığı'nın Klinik Özellikleri .....	10
2.5. Alzheimer Hastalığı'nın Etiyolojisi .....	11
2.5.1. Alzheimer Hastalığı'nda Genetik Risk Faktörleri .....	14
2.6. Alzheimer Hastalığı'nın Genetiği .....	14
2.6.1. Erken Başlangıçlı Alzheimer Hastalığı İle İlişkili Genler .....	15
2.6.2. Geç Başlangıçlı Alzheimer Hastalığı İle İlişkili Genler .....	16
2.7. <i>PSEN1</i> Geni ve Proteini .....	18
2.8. <i>PSEN1</i> Fonksiyonu .....	20
2.9. Gama Sekretaz ( $\gamma$ -Sekretaz) Kompleksi .....	22
2.9.1. $\gamma$ -Sekretazların $\epsilon$ - ve $\gamma$ - Bölgelerinde Ayrımı.....	23

2.10. <i>PSEN1</i> Geni Değişimleri ve Etkileri.....	25
2.11. <i>PSEN1</i> ve Diğer Metabolik Yolaklar .....	31
2.11.1. <i>PSEN1</i> ve Notch Sinyal Yolağı .....	31
2.11.2. <i>PSEN1</i> ve $\beta$ -katenin, Kaderin İlişkisi .....	32
2.11.3. <i>PSEN1</i> ve Kalsiyum Homeostazisi İlişkisi .....	34
2.11.4. <i>PSEN1</i> ve Otofaji .....	35
2.11.5. <i>PSEN1</i> ve Sinaptik Geçiş.....	36
2.11.6. <i>PSEN1</i> ve Apoptoz .....	36
2.11.7. <i>PSEN1</i> ve Etkileşimde Olduğu Diğer Mekanizmalar .....	37
2.12. <i>PSEN1</i> ve İlişkili Hastalıklar .....	38
2.12.1. Dilate Kardiyomiyopati.....	38
2.12.2. Ailesel Akne İnversa.....	38
2.13. Apolipoproteinler ve Apolipoprotein-E (Apo-E).....	39
2.13.1. Fonksiyon ve Metabolizma.....	39
2.13.2. <i>APOE</i> Geni ve Apo-E Proteini.....	40
2.14. Alzheimer Hastalığı'nda Apo-E İzoformlarının Mekanizması.....	44
2.14.1. Amiloid $\beta$ ( $A\beta$ ) Metabolizması, Birikimi ve Apo-E .....	45
2.14.2. Beyin Atrofisi ve Apo-E .....	46
2.14.3. tau Hiperfosforilasyonu, Nörotoksitite ve Apo-E .....	46
2.14.4. Lipid Metabolizması ve Apo-E.....	47
2.14.5. Sinaptik Plastisite, Omurga Bütünlüğü ve Apo-E .....	48
2.14.6. Nöroinflamasyon, Nörogenez ve Apo-E .....	49
2.15. Apo-E: İlişkili Olduğu Diğer Hastalıklar.....	49
2.15.1. Tip III Hiperlipoproteinemi (Ailesel Disbeta Lipoproteinemi).....	49
2.15.2. İnme ve Beyin Hasarı Sonrası İyileşme, İnflamasyon .....	50
2.15.3. Kardiyovasküler Hastalıklar.....	50

2.15.4. Diğer Nörodejeneratif Hastalıklar ve Apo-E.....	52
2.16. <i>APOE</i> Genotipi ve A $\beta$ İmmunterapisi .....	52
2.16.1. $\epsilon$ 4 Taşıyıcılarında Bilişsel Zayıflamanın Engellenmesi.....	53
2.16.2. Apo-E-A $\beta$ İlişkisinin Blokasyonu.....	53
2.16.3. Diğer Apo-E Temelli Terapötik Yaklaşımlar.....	53
3. MATERYAL VE METOT.....	55
3.1. Kan Örneklerinin Toplanması.....	55
3.2. Kandan Genomik DNA İzolasyonu.....	55
3.2.1. Fenol-Kloroform Ekstraksiyonu .....	55
3.2.2. İzole Edilen Genomik DNA'ların Agaroz Jel Elektroforezi İle Kontrolü .....	57
3.3. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) .....	58
3.3.1. <i>PSEN1</i> Geni 3-12. Ekzonlarının PZR ile Çoğaltılması .....	59
3.3.2. <i>PSEN1</i> Geni 3-12. Ekzon Bölgeleri PZR Ürünlerinin Agaroz Jel Elektroforezi ile Kontrolü .....	60
3.3.3. PZR Ürününün Temizlenmesi .....	61
3.3.4. Otomatik DNA Dizi Analizi.....	62
3.3.5. <i>APOE</i> Geninin Alellerinin PZR İle Çoğaltılması.....	63
3.3.6. <i>APOE</i> Geni Alelleri PZR Ürünlerinin Agaroz Jel Elektroforezi İle Kontrolü.....	64
3.3.7. Restriksiyon Fragment Uzunluk Polimorfizmi (RFLP).....	65
3.3.8. Poliakrilamid Jel Elektroforezi (PAGE) .....	66
3.4. Verilerin İstatiksel Analizi .....	67
4. BULGULAR.....	68
4.1. <i>PSEN1</i> Geni (3-12.ekzonlar) PZR Ürünlerinin Jelde Görüntülemesi.....	68
4.2. <i>PSEN1</i> Geni Amplifikasyon Bölgelerinin DNA Dizi Analizi Kromatogramları .....	69

4.3. <i>PSEN1</i> Geni İtron 8 Bölgesinde Tespit Edilen rs165932 (G/T) Polimorfizminin DNA Dizi Analizi Kromatogramında Gösterimi .....	72
4.4. <i>PSEN1</i> Geni İtron 8 Polimorfizminin (rs165932 G/T) Oluşturduğu Genotip ve Alel Frekansı .....	72
4.5. <i>APOE</i> Geni Alellerinin PZR Ürünlerinin Jelde Görüntülenmesi .....	74
4.6. <i>APOE</i> PZR Ürünlerinin <i>HhaI</i> Restriksiyon Enzimi İle Kesim Sonuçları .....	75
4.7. <i>APOE</i> Geni $\epsilon 2$ , $\epsilon 3$ ve $\epsilon 4$ Polimorfizmlerinin Genotip ve Alel Frekansı .....	78
4.8. <i>PSEN1</i> Geni İtron 8 (rs165932 G/T) ve <i>APOE</i> $\epsilon 2$ , $\epsilon 3$ ve $\epsilon 4$ Polimorfizmlerinin Birlikte Değerlendirilmesi.....	81
5. TARTIŞMA ve SONUÇ .....	83
5.1. <i>PSEN1</i> Varyasyonları ve Alzheimer Hastalığı'nın İlişkisi .....	83
5.2. <i>APOE</i> Geni $\epsilon 2$ , $\epsilon 3$ ve $\epsilon 4$ Polimorfizmleri ile Alzheimer Hastalığı'nın İlişkisi .....	88
KAYNAKLAR.....	98
EKLER .....	117
ÖZGEÇMİŞ .....	118

## SİMGELER VE KISALTMALAR

AAH	Ailesel Alzheimer Hastalığı
ABD	Amerika Birleşik Devletleri
AH	Alzheimer Hastalığı
APOE	Apolipoprotein-E
AP	Amiloid plak
APP	Amiloid prekürsör protein
AICD	APP hücre içi domeyni
APS	Amonyum persülfat
A $\beta$ /A $\beta$ -42	Amiloid beta peptit
bç	Baz çifti
BOS	Beyin omurilik sıvısı
°C	Celcius
CDK 5	Siklin bağımlı kinaz 5
COS-7	Maymun böbrek hücresi kökenli fibroblast benzeri hücre hattı
CQ	Clioquinol
CREB	Siklik AMP yanıt elementi bağlanma proteini
CTF	C-terminal fragment
C99	APP C-terminal fragmenti
ddNTP	Dideoksinükleotid trifosfat
DMSO	Dimetilsülfoksit
DNA	Deoksiribonükleik asit
dNTP	Deoksinükleotid trifosfat
DSM-IV	Tanısal ve İstatiksel El Kitabı-IV
EBAH	Erken Başlangıçlı Alzheimer Hastalığı
EDTA	Etilendiamintetraasetik asit
F	İleri primer (forward primer)
G	Gram
GBAH	Geç Başlangıçlı Alzheimer Hastalığı
GOO	Göreceli olasılıklar oranı
GSK3A	Glikojen sentaz kinaz-3- $\alpha$
g/cm <sup>3</sup>	Gram / santimetreküp

I-CLiPs	Aspartil transmembran ayırıcı proteazlar
IP3	İnositol-3-fosfat
SPP	Sinyal peptit peptidazlar
<i>PSEN1</i>	Presenilin-1
<i>PSEN2</i>	Presenilin-2
Kb	Kilobaz
KVH	Kardiyovasküler hastalık
LRP1	Low Density Lipoprotein Receptor Protein-1
LTP	Uzun süreli potensiasyon
M	Molar
M <sub>a</sub>	Moleküler ağırlık
ml	Mililitre
mM	Milimolar
mRNA	Messenger RNA (Elçi RNA)
MDCK	Madin-Darby canine kidney hücresi
NaCl	Sodyum klorür
NFY	Nörofibriler yumak
NINCDS-ADRA	Nörolojik ve Bilişsel Hastalıklar Ulusal Enstitüsü, İnme, Alzheimer Hastalığı ve İlişkili Hastalıklar Birliği
nm	Nanometre
NMDA	N-metil D-aspartat
NICD	Notch hücre içi domeyni
NTF	N-terminal fragment
p	İstatistiksel anlamlılık değeri
PAGE	Poliakrilamid Jel Elektrofrezisi
pmol	Pikomol
PZR	Polimeraz zincir reaksiyonu
R	Geri primer (revers primer)
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism (Kesilmiş parça uzunluk polimorfizmi)
RNA	Ribonükleik asit
rpm	Dakika başına devir sayısı ( round per minute)
RyR	Ryanodin reseptörü
sAPP-A $\beta$ 40	Çözülebilir amiloid beta peptit

sdH <sub>2</sub> O	Steril distile H <sub>2</sub> O
SDS	Sodyumdodesilsülfat
SERCA	Ca <sup>+2</sup> –ATPaz
TBE	Tris-Borat-EDTA
TE	Tris-EDTA
TEMED	N, N, N', N'-tetrametiletildiamin
TM	Transmembran domeyn
TRH	Tiroid salgılatıcı hormon
TSH	Tiroid düzenleyici hormon
U	Ünite
UV	Ultraviyole
V	Volt
$\chi^2$	Ki kare testi sonucunda elde edilen ki kare değeri
$\mu$ g	Mikrogram
$\mu$ l	Mikrolitre
% T	Total akrilamid
% C <sub>bis</sub>	Bisakrilamidin monomere oranı



## ŞEKİLLER DİZİNİ

### Sayfa

<b>Şekil 2.1.</b> AH nöropatolojisinde görülen amiloid plak ve nörofibriler yumak oluşumları .....	6
<b>Şekil 2.2.</b> Amiloid kaskad hipotezi .....	8
<b>Şekil 2.3.</b> AH patogenezinde amiloid plak ve nörofibriler yumak oluşum mekanizması .....	9
<b>Şekil 2.4.</b> AH tanısında DSM-IV kriterleri .....	11
<b>Şekil 2.5.</b> AH etyolojisi .....	11
<b>Şekil 2.6.</b> Presenilin-1 proteini yapısı .....	19
<b>Şekil 2.7.</b> $\gamma$ -sekretaz kompleksi ve PSEN1 katalitik yapısının oluşumu .....	22
<b>Şekil 2.8.</b> APP ve Notch 1 substratlarının $\gamma$ -sekretaz kompleksi tarafından ayırım bölgeleri .....	24
<b>Şekil 2.9.</b> $\gamma$ -sekretaz substratlarının ayırım ürünleri .....	24
<b>Şekil 2.10.</b> Presenilin fonksiyonları .....	31
<b>Şekil 2.11.</b> Apo-E variantları ve alel bazında farklılıklar .....	41
<b>Şekil 2.12.</b> Apo-E4 ve Apo-E3 proteinleri .....	42
<b>Şekil 2.13.</b> Beyinde apolipoprotein-E ve amiloid $\beta$ metabolizması .....	44
<b>Şekil 2.14.</b> Apo-E4 ve Apo-E3 proteinlerinin metabolizma düzeyinde etkinlik farklılıkları .....	45
<b>Şekil 4.1.</b> <i>PSEN1</i> geni (3-12.ekzonlar) PZR ürünlerinin jelde görüntülenmesi.....	68
<b>Şekil 4.2.</b> <i>PSEN1</i> geni ekzon 3 bölgesi DNA dizi analizi kromatogramı .....	69
<b>Şekil 4.3.</b> <i>PSEN1</i> geni ekzon 4 bölgesi DNA dizi analizi kromatogramı .....	69
<b>Şekil 4.4.</b> <i>PSEN1</i> geni ekzon 5 bölgesi DNA dizi analizi kromatogramı .....	69
<b>Şekil 4.5.</b> <i>PSEN1</i> geni ekzon 7 bölgesi DNA dizi analizi kromatogramı .....	70

<b>Şekil 4.6.</b> <i>PSEN1</i> geni ekzon 8 bölgesi DNA dizi analizi kromatogramı .....	70
<b>Şekil 4.7.</b> <i>PSEN1</i> geni ekzon 9 bölgesi DNA dizi analizi kromatogramı .....	70
<b>Şekil 4.8.</b> <i>PSEN1</i> geni ekzon 10 bölgesi DNA dizi analizi kromatogramı .....	71
<b>Şekil 4.9.</b> <i>PSEN1</i> geni ekzon 11 bölgesi DNA dizi analizi kromatogramı .....	71
<b>Şekil 4.10.</b> <i>PSEN1</i> geni ekzon 12 bölgesi DNA dizi analizi kromatogramı .....	71
<b>Şekil 4.11.</b> 1/1 Genotipine sahip bireyin DNA dizi analizi kromatogramı (TT) .....	72
<b>Şekil 4.12.</b> 1/2 Genotipine sahip bireyin DNA dizi analizi kromatogramı (TG).....	72
<b>Şekil 4.13.</b> 2/2 Genotipine sahip bireyin DNA dizi analizi kromatogramı (GG) .....	72
<b>Şekil 4.14.</b> Kontrol ve hasta gruplarında <i>PSEN1</i> genotip frekanslarının dağılımı .....	74
<b>Şekil 4.15.</b> <i>APOE</i> geni alellerinin PZR ürünlerinin jelde görüntülenmesi .....	74
<b>Şekil 4.16.</b> <i>APOE</i> geni PZR ürünü dizisi .....	75
<b>Şekil 4.17.</b> <i>HhaI</i> enzimi tanıma dizisi .....	75
<b>Şekil 4.18.</b> <i>HhaI</i> enzimi kesim noktaları ve kesim sonucunda elde edilen <i>APOE</i> genotiplerinin şematik görünümü .....	76
<b>Şekil 4.19.</b> <i>HhaI</i> enzim kesimi sonucu elde edilen <i>APOE</i> genotiplerinin %10'luk PAGE'de görüntülenmesi .....	77
<b>Şekil 4.20.</b> Kontrol ve hasta gruplarında <i>APOE</i> genotip frekanslarının dağılımı .....	79
<b>Şekil 4.21.</b> Kontrol ve hasta gruplarında <i>APOE</i> alel frekanslarının dağılımı .....	79
<b>Şekil 4.22.</b> Kontrol ve hasta gruplarında <i>APOE</i> ε4 varlığı ya da yokluğu.....	80

## TABLolar DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
<b>Tablo 2.1.</b> EBAH ile ilişkili genler .....	16
<b>Tablo 2.2.</b> GBAH ile ilişkili bazı genler .....	17
<b>Tablo 3.1.</b> Kontrol ve hasta gruplarının demografik özellikleri .....	55
<b>Tablo 3.2.</b> <i>PSEN1</i> geni 3-12 ekzon bölgelerinin çoğaltımı için kullanılan primer çiftleri.....	59
<b>Tablo 3.3.</b> <i>PSEN1</i> geni 3-12 ekzon bölgelerinin çoğaltımını gerçekleştirmek üzere belirlenen reaksiyon bileşen miktarları .....	60
<b>Tablo 3.4.</b> PZR ürününün temizlenme basamağını gerçekleştirmek üzere belirlenen reaksiyon bileşen miktarları .....	61
<b>Tablo 3.5.</b> Temizlenmiş PZR ürünlerinin işaretleme reaksiyonlarını gerçekleştirmek üzere kullanılan reaksiyon bileşen miktarları.....	62
<b>Tablo 3.6.</b> <i>APOE</i> geni alellerinin PZR ile çoğaltılması aşamasında kullanılan primer çifti ve ürün boyutunun gösterimi .....	63
<b>Tablo 3.7.</b> <i>APOE</i> geninin alellerinin çoğaltılması için kullanılan reaksiyon bileşen miktarları .....	64
<b>Tablo 3.8.</b> RFLP analizi için hazırlanan reaksiyon bileşen miktarları .....	65
<b>Tablo 4.1.</b> <i>PSEN1</i> intron 8 polimorfizminin (rs165932 G/T) genotip ve alel frekanslarının kontrol ve hasta gruplarında dağılımı .....	73
<b>Tablo 4.2.</b> <i>APOE</i> genotip ve alel frekanslarının kontrol ve hasta gruplarında dağılımı .....	78
<b>Tablo 4.3.</b> Kontrol ve hasta gruplarında <i>APOE</i> ε4 alelinin varlığı ya da yokluğu.....	80

<b>Tablo 4.4.</b> Hasta grubunda ailesinde demans öyküsü bulunan ve bulunmayan bireylerde <i>APOE</i> alellerinin dağılımı .....	81
<b>Tablo 4.5.</b> $\epsilon 4$ aleli taşıyan ve taşımayan AH bireylerde <i>PSEN1</i> 1/1, 1/2 ve 2/2 genotiplerinin karşılaştırılması .....	82
<b>Tablo 5.1.</b> Farklı çalışmalar temelinde <i>APOE</i> genotip ve alel frekansları bulguları .....	95
<b>Tablo 5.2.</b> Tüm yayınlanan ilişki çalışmalarında <i>PSEN1</i> alel ve genotip dağılımının özeti (etnik grup temelinde) .....	96
<b>Tablo 5.3.</b> <i>PSEN1</i> AlzGene meta-analiz verileri .....	97

# 1. GİRİŞ

Alzheimer Hastalığı (AH), klinik olarak bellek, konuşma, yüksek serebral işlevler ve görsel-uzaysal beceriler gibi birden çok sistemi etkileyen, bilişsel işlevlerde ilerleyici kayıp ile seyreden, nörolojik açıdan sinaps ve nöron kaybı, gliozis, amiloid plak ve nörofibriler yumak oluşumları ile karakterize nörodejeneratif bir hastalıktır [1].

AH, yaşa bağımlı ve geri dönüşümsüz bir beyin hastalığıdır. Yaşlı bireylerde demansın (kişinin bilişsel ve entellektüel işlevlerinin normal dışı azalması) en sık görülen nedenidir. Toplum bazında sıklığı 65 yaşın altında % 4 iken, 85 yaş ve üzerinde ise % 38 olarak bildirilmiştir [2].

AH, daha çok kalıtsal olan ve ailede birinci derece akrabalarda demans görülmesiyle tarif edilen “Ailesel Alzheimer Hastalığı (AAH)” ve aile hikâyesi olmaksızın kendiliğinden oluşan “Sporadik Alzheimer Hastalığı” olarak ikiye ayrılır. Ayrıca başlangıç yaşı 65 yaş altı olan hastalık için “ Erken Başlangıçlı Alzheimer Hastalığı (EBAH)” tanımlaması, başlangıç yaşı 65 yaş üstü olan hastalık için “Geç Başlayan Alzheimer Hastalığı (GBAH)” tanımlaması kullanılmaktadır [3]. Günümüzde AH için kalıtım durumuna göre, otozomal dominant geçişli ailesel AH, Mendel kalıtımına uymayan ailesel yığılma gösteren AH ve sporadik AH olmak üzere üç formda gruplandırma mevcuttur [4].

AH’ın patolojisi, klinik ilerlemesi ve teşhis-tedavi süreci ile ilişkilendirilmiş faktörler ve bu faktörlerinin oluşumunda rol oynayan genetik mekanizmalar son yıllarda araştırmaların ilgi odağı olmuştur [4].

AH, kompleks genetiğe sahip bir hastalıktır. Günümüze kadar AH’ın genetik temelinde yer aldığı düşünülen dört lokus kesin olarak tanımlanmıştır. Bunlar 21.kromozomdaki amiloid prekürsör protein (*APP*), 14.kromozomda yer alan presenilin-1 (*PSEN1*), 1.kromozomdaki presenilin-2 (*PSEN2*) ve 19.kromozomdaki apolipoprotein-E (*APOE*) lokuslarıdır [4].

*PSEN1* dokuz transmembran birimi taşıyan bir proteindir ve  $\gamma$ -sekretaz kompleksinin katalitik bileşenidir. Presenilin-1 proteininin fonksiyonları,  $\gamma$ -sekretaz bağımlı ve  $\gamma$ -sekretaz bağımsız fonksiyonlar olmak üzere ikiye

ayrılmıştır.  $\gamma$ -sekretaz bağımlı fonksiyonlarına APP ve Notch işlenmesinde ardışık ayırım süreci örnek gösterilebilirken,  $\gamma$ -sekretaz bağımsız fonksiyonları ise Wnt sinyal yolağında  $\beta$ -katenin stabilizasyonu, kalsiyum homeostazisinin düzenlenmesi ve sinaptik geçiş etkileşimleri gibi süreçleri kapsamaktadır [1].

Presenilin-1'in en iyi bilinen rolü beyin ve diğer dokularda üretimi gerçekleştirilen APP'nin işleme sürecindeki rolüdür. Araştırmacılar PSEN1'in APP'yi daha küçük peptidlere bölmek üzere başka enzimlerle birlikte çalıştığını ileri sürmektedir. Bu peptidlerden bir tanesi çözünebilir amiloid beta peptit iken (sAPP-A $\beta$ -40), bir diğeri AH patolojisinde yer alan amiloid plakların temel bileşeni olan daha toksik forma sahip amiloid beta (A $\beta$ -42)'dir [5].

Erken başlangıçlı ailesel Alzheimer hastalığına sahip bireylerde 180'den fazla *PSEN1* mutasyonu tanımlanmıştır [6]. Tüm durumların % 70'inden fazlasında etkili olan *PSEN1* genindeki mutasyonlar, ailesel EBAH'ın en yaygın nedenidir [5].

Ailesel EBAH sürecine yaptığı katkıların dışında PSEN-1 proteininin, GBAH olgularının büyük çoğunluğunda rolü olup olmadığı açık değildir. *PSEN1* geninde yanlış anlamlı mutasyonların varlığı, EBAH olgularında agresif ilerlemeden sorumludur. Bu gözlemler PSEN1 proteininin yer aldığı bu biyolojik yolağın oldukça önemli olduğunu ve bu yolaktaki bozuklukların AH patogeneze katkıda bulunduğunu göstermektedir. Presenilinlerin yeni metabolik yollardaki görevleri ortaya çıkarıldığında GBAH olgularına olan etkisi de daha net belirlenecektir [5].

Başlıca karaciğer tarafından sentezlenen ve kolesterol taşınmasında görevli olan bir plazma proteinini kodlayan *APOE* geni  $\epsilon 2$ ,  $\epsilon 3$  ve  $\epsilon 4$  olmak üzere üç ayrı alelik forma sahiptir. Sporadik AH ile *APOE*  $\epsilon 4$  aleli arasında güçlü bir bağlantı olduğu pek çok çalışmada gösterilmiştir.  $\epsilon 4$ , AH riskini doza bağılı bir şekilde artırır ve hastalık başlangıç yaşını düşürür.  $\epsilon 4$  heterozigotlarında ( $\epsilon 2/\epsilon 4$  ve  $\epsilon 3/\epsilon 4$ ) AH riski,  $\epsilon 4$  taşımayanlara ( $\epsilon 3/\epsilon 3$ ,  $\epsilon 2/\epsilon 3$  ve  $\epsilon 2/\epsilon 2$ ) göre 2-3 kat artmıştır. Öte yandan,  $\epsilon 4$  homozigotlarında ise, hastalık  $\epsilon 4$  heterozigotlarına göre daha erken yaşta başlar.  $\epsilon 4$ 'ün AH patogenezindeki rolü tam anlamıyla ortaya konamamıştır; ancak hem amiloid  $\beta$ 'nin patolojik şaperonu olarak "senil plak oluşumunda" hem de tau proteininin patolojik hiperfosforilasyonuna katkıda

bulunarak “nörofibriler yumak oluşumunda” rol oynadığına ilişkin kanıtlar vardır. Apo-E'nin nöronal plastisite, rejenerasyon ve onarımda rol oynadığı, bu işlevlerde  $\epsilon 4$ 'ün,  $\epsilon 2$  ve  $\epsilon 3$ 'e göre daha başarısız olduğuna ilişkin kanıtlar da mevcuttur. Kafa travması, serebrovasküler hastalık gibi beyin hasarlarından sonra  $\epsilon 4$  taşıyıcıları daha kötü prognoz gösterirler. *APOE*  $\epsilon 4$  varlığı, AH patolojisine katkıda bulabilecek bir dizi faktör (düşük glukoz kullanımı, mitokondriyel anomaliler ve hücre iskelet bozuklukları) ile ilişkilidir [7].

Bu çalışmada, Alzheimer tanısı almış 30 birey ve aynı yaş grubunda yer alan, demans öyküsü bulunmayan 40 sağlıklı bireyde AH'ın özellikle ailesel erken başlangıçlı formu ile ilişkili olan *PSEN1* geninin kodlayıcı bölgelerinde mutasyon taraması yapılması ve AH' a yatkınlık ile ilişkili olan *APOE* genine ait  $\epsilon 2$ ,  $\epsilon 3$  ve  $\epsilon 4$  alellerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

Son yıllarda yapılan çok sayıda araştırma sonucunda hastalığın klinik özellikleri, nöropatolojisi, genetiği ve tedavisi hakkında yeni bilgi birikimleri oluşmuştur. Alzheimer Hastalığı ile ilişkili olan genlerin ve bunların etkilerinin araştırılması yalnızca tedavi yaklaşımları için yeni ipuçları sağlamakla kalmayacak, geri dönüşümsüz hastalığın erken teşhisi ve ilerlemesinin önlenmesi için önemli bir ön koşul olan bu yeni genetik yatkınlık profilleme stratejilerinin gelişmesine katkıda bulunacaktır.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Demans ve Alzheimer Hastalığı

Demans kelimesi Latince "mens" (zihin) kelimesinden türetilmiştir. Bu terim 'kişinin bilinç dışında olması' anlamına gelir ve kişinin daha önceki durumuna oranla bilişsel ve entelektüel işlevlerinde meydana gelen azalmayı anlatmak amacıyla kullanılır. Demans yaşlanmanın doğal bir sonucu değildir, bir hastalık olarak kabul edilir ve normal yaşlanma ile görülen bilişsel ve psikolojik değişikliklerden ayırt edilmesi gerekmektedir [8]. Alzheimer hastalığı (AH), en sık görülen demans nedeni olup, tüm demans vakalarının % 50-70'ini oluşturmaktadır [9].

AH, 1907 yılından bu yana bilinen, bilişsel işlevlerde bozulma , günlük yaşam aktivitelerinde azalma, davranışsal ve psikolojik bozukluklarla sonuçlanan ilerleyici bir nörodejeneratif hastalıktır. Kesin tanı, progresif demans bulguları olan vak'alarda biyopsi ya da otopsi ile AH'a özgü, nörofibriler yumaklar, nörotik plaklar, sinaps kaybı, nöron kaybı, granülovakuolar dejenerasyon ve Meynertin bazal nukleus'unda kolinerjik hücre kaybı ve aterosklerotik değişiklikler gibi patolojik bulguların saptanması ile konulabilir [9].

Hastalığın klinik olarak ortaya çıkarılması ise değişkendir. Alzheimer hastaları klinik olarak incelendiğinde, yeni bilgileri öğrenmek veya daha önce öğrenilmiş olan bilgiyi hatırlama becerisinde bozulma, konuşma bozukluğu (örneğin; doğru kelimeyi bulma güçlüğü), motor işlevlerin korunuyor olmasına rağmen motor etkinliklerinin yapılamaması, duyu işlevleri korunuyor olmasına rağmen objelerin tanınamaması, planlama, organizasyon, dikkati odaklama, görünümün altında kalanı kavrama gibi işlevlerde bozulma olduğu gözlenmektedir. Bu belirtiler kişinin sosyal ve mesleki yaşamında hastalık öncesine göre belirgin bozulmalara neden olur. Hastalığın en ileri evresinde Alzheimer hastasının 24 saat bakıma ihtiyacı olabilir. Hastalar, beslenme, temizlik, tuvalet ihtiyacını dahi karşılayamayacak duruma gelebilmektedirler [2].

AH, başlangıç yaşı ve kalıtım durumuna göre gruplandırılabilir. Olguların % 90'ı 65 yaşın üzerinde ve sporadik olarak ortaya çıkar. Olguların % 10'unu ise 30-65



yaşları arasındaki hasta grubu oluşturur. Bu durum genellikle aileseldir ve otozomal dominant kalıtım biçimine uygunluk göstermektedir [10].

## **2.2. Alzheimer Hastalığı'nın Epidemiyolojisi**

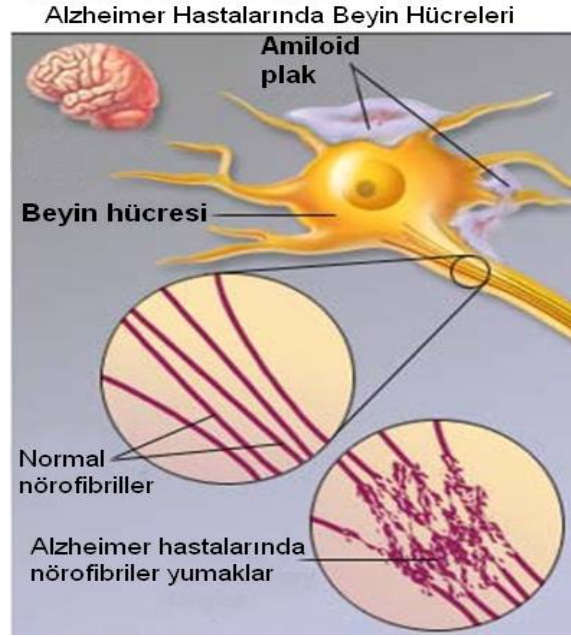
Demans hastalıkları popülasyonlarda ilerleyen yaşla birlikte artmaktadır. Yapılan bir çalışmada, yaşlılıktaki demans prevalansının Kuzey Amerika ve Batı Avrupa'da % 6,4-% 5,4 ile en yüksek değere sahip olduğu, bunları Latin Amerika (% 4,9), Çin ve gelişmekte olan Batı-Pasifik komşularının (% 4) izlediği görülmüştür. Bu ülkelerdeki yıllık insidans oranları ise, Kuzey Amerika için % 1.05, Batı Avrupa için % 0.88, Latin Amerika için % 0.92, Çin ve gelişmekte olan Batı-Pasifik komşuları için % 0.8 olarak belirlenmiştir. Demans hastalarının yarısından fazlasının AH ile ilişkili olduğu bildirilmiştir [11].

AH, yaşla ilgili demansın en yaygın formudur, prevalansı ve insidansı yaş ile oldukça bağlantılıdır. Amerika Birleşik Devletleri'nde gerçekleştirilen çalışmada, AH prevalansının 65 yaşın altında % 4, 65-74 yaş arasında %13, 75-84 yaş arasında % 44 ve 85 yaşın üzerinde % 38 olduğu belirlenmiştir. Hastalığın insidansı 60-70 yaş grubunda %1 iken, 85 yaşın üzerinde insidans % 6-8'dir. Dünyada 24,2 milyondan fazla Alzheimer hastası birey olduğu ve her yıl 5 milyonun üzerinde yeni vak'a rapor edildiği bilinmektedir [3]. Ülkemizde yapılmış kapsamlı epidemiyolojik bir çalışma bulunmamakla birlikte yaklaşık 500 bin Alzheimer hastası bulunduğu tahmin edilmektedir [12].

Hastaların yaşam süresi, prevalans ve insidans oranları ile ilişkilidir. AH'ın başlangıcından sonra ilerlemesi 2 ile 16 yıl arasında değişmekle birlikte, ortalama yaşam süresi yapılan son çalışmalarda 3-7 yıl olarak belirtilmiştir. AH, ABD'de genel ölüm nedenleri arasında 6. sırada iken, 65 yaş ve üzerindeki bireylerin ölüm nedenleri arasında 5. sıradadır [2].

## **2.3. Alzheimer Hastalığı'nın Nöropatolojisi ve Patogenezi**

Alzheimer Hastalığı'nda histopatolojik olarak amiloid plak (AP) ve nörofibriler yumak (NFY) oluşumu, sinaps ve nöron kaybı ve beyinde belirgin bir atrofi mevcuttur. Her iki lezyon da, hem normal yaşlanmada hem de bazı başka nörodejeneratif hastalıklarda görülebilir; ancak AH'ın kesin tanısı için lezyonların belirli bir nöroanatomik dağılım göstermesi ve belirli bir miktarda olması gerekmektedir [13] [Şekil 2.1.].



**Şekil 2.1.** AH nöropatolojisinde görülen amiloid plak ve nörofibriler yumak oluşumları. 23 numaralı kaynaktan değiştirilerek alınmıştır. [23]

Normal bir insanda, altmışlı yaşlardan itibaren, neokortekste plaklar ve limbik sistemde de NFY'ler oluşmaya başlar. Ancak çalışmalar NFY'lerin neokortekste, AP'lerin ise limbik sistemde ve nörotik plak olarak görünür olmalarının AH için %100'e yaklaşan duyarlılık ve özgüllük gösterdiğini ortaya koymuştur [13].

### **2.3.1. Nörofibriler Yumaklar ( NFY )**

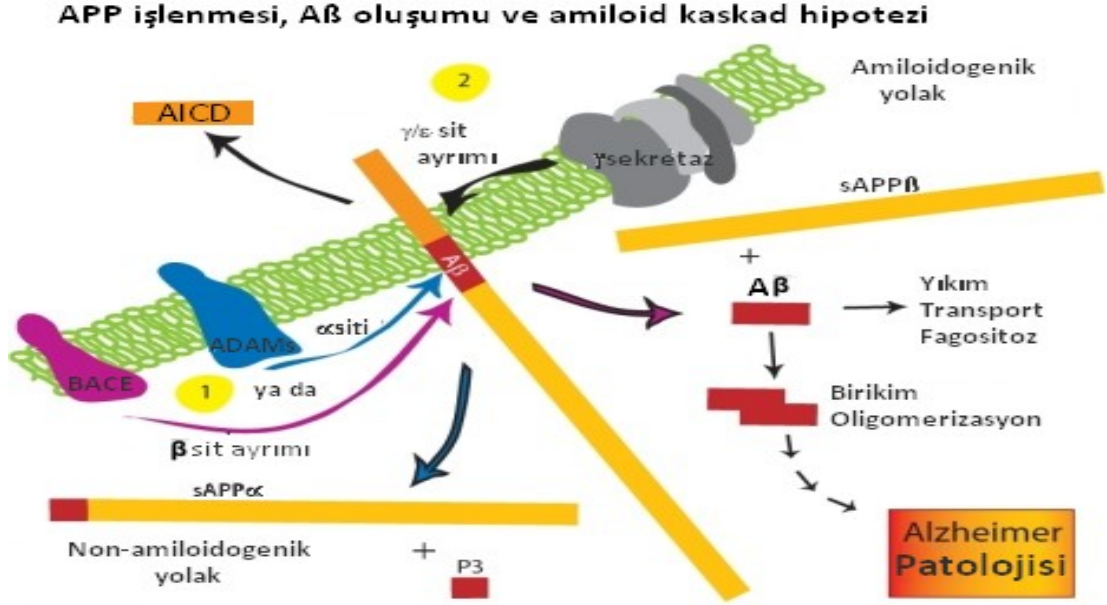
NFY'lerin temel bileşeni 'hiperfosforile tau' proteindir. tau proteini 17. kromozomda yerleşik mikrotübül-ilişkili proteinler (MAP) ailesinden bir proteindir. Mikrotübül stabilizasyonu, hücre iskeletinin bütünlüğü ve aksonal transportta önemli rol alır. AH patogenezinde, hiperaktif kinazlar ve /veya hipoaktif fosfatazlar tau proteininin hiperfosforilasyonuna yol açarak mikrotübüllere bağlanma yeteneğini bozarlar. Bağlanmamış fosforile tau, çözünmeyen çift sarmal filamentlere polimerize olur ve bu süreçte yeni oluşan modifiye form toksik olabilir. Etkilenmiş nöronlar normal tau proteini sentezleyerek ve anormal hiperfosforile edilmiş tau proteinini nörofibriler ağlara sararak ve kıvrarak filament uzamasına neden olurlar ve toksik tau proteinine tepki gösterirler. Bu oluşumlar zaman içerisinde nöron içi NFY'ler haline gelir. NFY oluşumu sonunda hücre iskeletinin bütünlüğünü ve aksonal transportu bozarak hücre ölümüne neden olur [14].

Aileesel AH'daki mutasyonların tau proteini düzeyinde değil, amiloid beta ( $A\beta$ ) düzeyinde artışa neden olmaları, AH-dışı nörodejeneratif hastalıklarda da tau proteininin bulunması, AH fizyopatolojisinde tau'nun önemini tartışmaya açmaktadır. Bununla birlikte beyinde anormal tau birikiminin nörodejeneratif etkisi kanıtlanmıştır [15]. Bu protein ve bununla ilişkili sinyal yolları AH için önemli terapötik hedeflerdir [16].

### **2.3.2. Amiloid Plaklar (AP)**

AH'deki ikinci temel nöropatolojik değişiklik olan amiloid plaklar (AP) farklı morfolojik yapıda olabilir; ancak ana bileşeni amiloid beta peptididir ( $A\beta$ ).  $A\beta$ , 40-42 amino asitten oluşan bir peptid olup, 21. kromozomda kodlanan bir transmembran protein olan amiloid prekürsör protein (APP)'den proteolitik kesimi ile oluşur [17]. Başka bir deyişle  $A\beta$ , APP'nin metabolizma ürünlerindedir. APP knock-out farelerde önemli bir morbidite ya da mortalite gözlenmemekle birlikte, APP'nin nörotrofik ve nöroprotektif aktivitesi olabileceğini belirten çalışmalar mevcuttur [18].

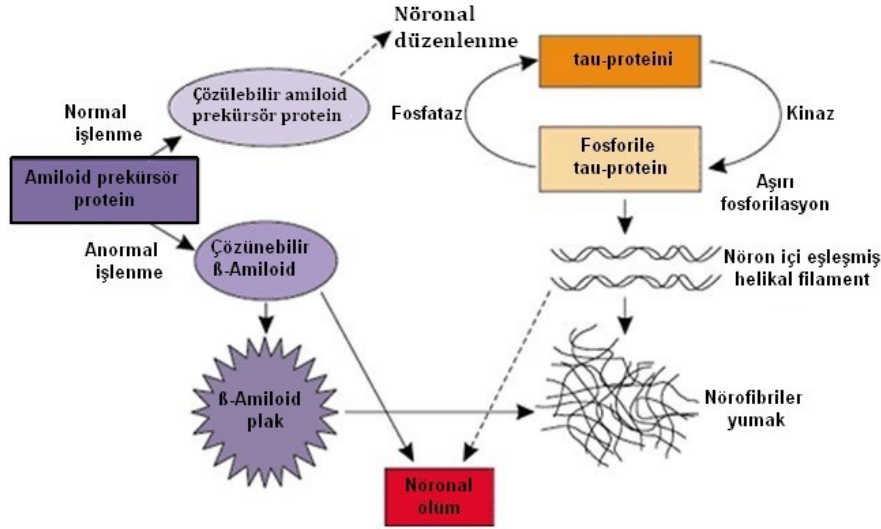
Bütün transmembran proteinlerde olduğu gibi APP'nin de hücre içi karboksi ucu, membran içerisinde seyreden 28 amino asitlik bölümü ve hücre dışı amino ucu vardır.  $A\beta$ , APP'nin membran içi 28 amino asitlik bölgesini de içeren bir parçasıdır. APP bir dizi proteolitik enzimle kesilerek metabolize edilir.  $\alpha$ -sekretaz, APP'yi amiloid  $\beta$ 'nin yaklaşık ortasından keser ve bu kesim sonucunda amiloid  $\beta$  yerine sAPP adı verilen hücre-dışı yeni bir protein meydana gelir. Bu molekülün hücre kültürlerinde nöronlar üzerine nörotrofik olumlu etkileri olduğu gösterilmiştir. Diğer iki sekretaz ( $\beta$ -sekretaz ve  $\gamma$ -sekretaz), APP'yi amino ucundan ( $\beta$ -sekretaz) ve karboksi ucundan ( $\gamma$ -sekretaz) böler ve ürün olarak  $A\beta$  oluşur. Oluşan  $A\beta$ 'ler 40-42 amino asit uzunluğundadır ve bunlardan daha fazla amiloidojenik olanı 42 amino asitlik form olup ilk çöken de odur [19]. Çökme sürecini takiben  $A\beta$ , diffuz ve nörotik plaklar şeklinde parankimde ve kan damarlarında birikir. Bu durum amiloid kaskad hipotezi olarak tanımlanır [20] [Şekil 2.2.]. Erken demansı olan olguların, beyin dokuları ve beyin omurilik sıvısı (BOS)'nda artmış  $A\beta$ -42 ve amiloid oligomerleri bulunur. Bu yapıların miktarları bilişsel düzeyde azalma ile ilişkilidir [21].



**Şekil 2.2.** Amiloid kaskad hipotezi. 20 numaralı kaynaktan değiştirilerek alınmıştır. [20]

A $\beta$  oligomerleri ve plaklar etkili sinaptotoksinler olup, proteazom fonksiyonunun ve mitokondrial aktivitenin engellenmesine neden olurlar; ayrıca hücre içi kalsiyum düzeyini değiştirdikleri ve çeşitli inflamatuvar süreçlerin düzenlenmesinde etkili oldukları da bilinmektedir. A $\beta$ 'nin normal fizyolojik fonksiyonlarının kaybının nöronal disfonksiyona da neden olduğu düşünülmektedir. A $\beta$ , mikrotübül ilişkili tau proteininin fosforilasyonunu düzenleyen sinyal yolları ile etkileşir. Ayrıca, hiperfosforile tau proteinlerinin proteozomlar tarafından yıkımının inhibisyonu A $\beta$  tarafından gerçekleştirilir [16].

A $\beta$ , normal nöronlar tarafından üretilmekle birlikte, AH patogenezinde nöronal lizozomlarda çok miktarda biriktiği gösterilmiştir. Normal koşullarda A $\beta$ 'nin büyük çoğunluğu, ekstralizozomal olarak lokalize olurken, oksidatif stresin makrotofaji aktivasyonu yoluyla intralizozomal A $\beta$  içeriğini artırdığı ileri sürülmektedir. Bu nedenle hasarlı A $\beta$  salınımının ve A $\beta$ 'nin intralizozomal artışının AH patolojisine katkıda bulunduğu düşünülmektedir. Bununla birlikte A $\beta$ 'nin nöronlarda nasıl dağılım gösterdiği ve A $\beta$  salınımının inhibisyonunda etkilenecek yolların neler olabileceği açık değildir [24].



**Şekil 2.3.** AH patogenezinde amiloid plak ve nörofibriler yumak oluşum mekanizması. 22 numaralı kaynaktan değiştirilerek alınmıştır. [22]

AP'ler ve NFY'ler arasındaki bağlantıyı anlamak, AH patogenezinin anlamak için kesinlikle gereklidir ve muhtemelen AH fizyopatolojisindeki en büyük bilinmezi oluşturmaktadır [Şekil 2.3.]. Varsayılan bağlantılardan biri, apoptoz başlatıcıları olan sistein aspartil proteazlarını (kaspazları) içermektedir. Giderek artan kanıtlar, A $\beta$  protein birikiminin kaspazların aktivasyonunu tetiklediği, böylelikle tau proteininin kaspaz tarafından indüklenen bölünmesine sebep olduğunu ve bu işlemin erken AH'da olduğunu düşündürmektedir. "tau" proteininin bölünmesi NFY oluşumunda kritik bir olay gibi görünmektedir [25].

Bir başka hipoteze göre NFY ve AP'ler birbirinden bağımsız olup, AH patogenezinin araçları değil, sonuç ürünleri olarak işlev görmektedir. Bu hipoteze göre AH, genetik ve çevresel etkilerle yaşam boyunca artarak biriken, plastisite yükünün artık kaldırılmaz olması nedeniyle, normal yaşlanma sürecinden sapmanın sonuçlarıdır. Özellikle plastisite yükünün yüksek olduğu bölgelerde kinaz-fosfataz dengesinin bozulması, fosforillenmiş tau proteininin defosforilasyonunun sağlanamarak patolojik katlanmasına ve oligomere dönüşmesine neden olmaktadır. APP ise nöronal plastisitedeki rolü deneysel olarak gösterilmiş bir transmembran proteindir. APP proteolizi sonucunda kesilen ürün olan sAPP'nin de nörit büyümesi ve uzun süreli potensiyasyon (LTP) 'deki rolü bilinmektedir. Buna karşılık  $\beta$  ve  $\gamma$ -sekretazlarla alternatif kesim

sonucu oluşan A $\beta$  fragmanı oldukça nörotoksiktir, aksonal tomurcuklanma ve LTP'yi inhibe eder.

PSEN1'in, Notch ile etkileşiminin erişkin beyinde plastisite yükseltici etkileri gösterilmiştir. *PSEN1* mutasyonları, APP proteolizini A $\beta$  yoluna kaydırmanın yanı sıra Notch ile etkileşim göstermeyen bozuk ürünlere yol açarak da plastisite potansiyelini baskılıyor olabilir [13].

İmmünohistokimyasal çalışmalarda apolipoprotein-E (Apo-E)'nin hem nörofibriler yumaklar hem de amiloid plaklar ile ilişkili olduğu saptanmıştır [26]. Kolesterol ve fosfolipidlerin hücrelerarası naklinde rol oynayan ve dolayısıyla aksonal büyüme ve sinaptogeneze katkıda bulunduğu düşünülebilecek Apo-E plastisite ile de ilişkilidir. Buna göre Apo-E4 plastisiteyi baskımlarken E2 ve E3 yükseltici etki göstermektedir [13].

NFY'ler ve AP'lerin yanı sıra; gliozis, inflamasyon, nöron ve sinaps kayıpları, kortikal kolinerjik innervasyon ve diğer nörotransmitter sistemlerinde kayıplar AH nöropatolojisinin bileşenlerini oluştururlar [14].

#### **2.4. Alzheimer Hastalığı'nın Klinik Özellikleri**

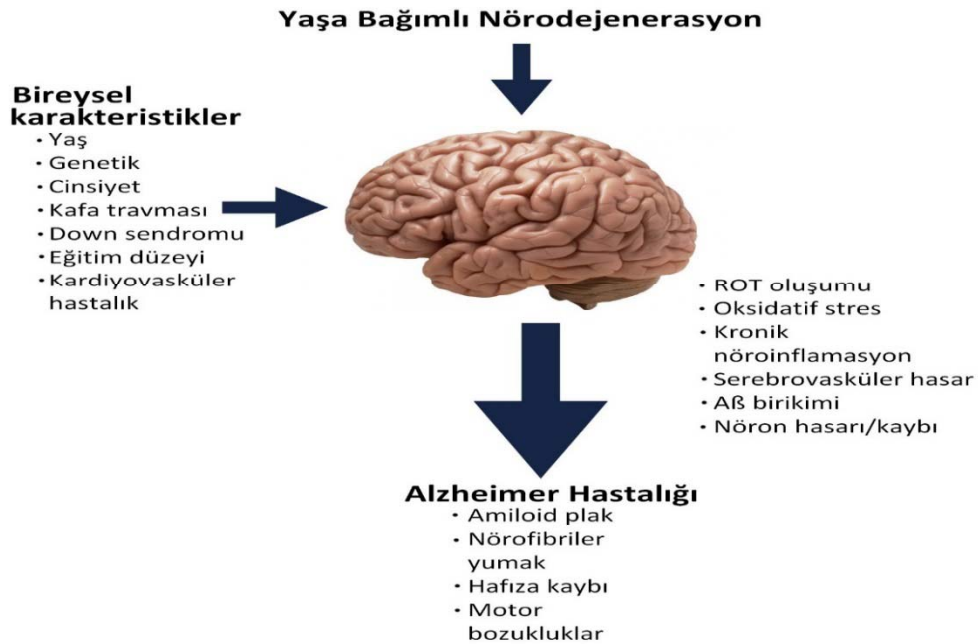
AH, yaşa bağımlı ve geri dönüşümsüz bir beyin hastalığıdır. Hastalığın başlangıcında kısa dönemli hafızada aşamalı ve ilerleyici bir yıkım görülür ve bu yıkım davranış ve karakter değişiklikleri ile ilerleyerek, düşünme, karar verme ve konuşma gibi diğer bilişsel alanları da etkileyerek en sonunda zihinsel fonksiyonun yitirilmesine, bireyin günlük aktivitelerini yapamaz hale gelmesine neden olur [27]. Kesin Alzheimer tanısı, biyopsi veya otopside alınan doku incelemesi ile patolojik olarak konabilir. Klinikte konulan tanı ise olası Alzheimer hastalığı tanısıdır. Bununla birlikte, hasta öyküsü, fizik ve nörolojik muayene, nöropsikolojik testler, görüntüleme yöntemleri ve laboratuvar incelemeleri ile yüksek oranda (% 85-90) doğrulukla klinik tanı koymak mümkündür [9]. 2001 yılında Amerikan Nöroloji Akademisi tarafından yayınlanan bir rehberle Alzheimer hastalığı için standart tanı kriterleri ve değerlendirme metotları belirlenmiştir. Bu rehberde, tanı kriterleri olarak geliştirilen Uluslararası Nörolojik ve Bilişsel Hastalıklar Ulusal Enstitüsü, İnme, Alzheimer Hastalığı ve İlişkili Hastalıklar Birliği (NINCDS-ADRA) ve Tanısal ve İstatiksel El Kitabı-IV (DSM-IV) kriterlerinin kullanımı güvenilir bulunarak önerilmektedir [Şekil 2.4.] [9].

- A. Aşağıdakilerden her ikisinin bulunması ile belirli çoğul kognitif defisit gelişmesi
1. Bellek bozukluğu (yeni bilgiler öğrenme ya da daha önceden öğrenilmiş bilgileri anımsama yetisinde bozulma)
  2. Aşağıdaki kognitif bozukluklardan birinin ya da daha fazlasının bulunması
    - a. Afazi (dil bozukluğu)
    - b. Apraksi (motor işlevlerde bozukluk olmamasına rağmen motor aktiviteleri yerine getirmede bozukluk)
    - c. Agnozi (duyu işlevlerinde bozukluk olmamasına karşın nesneleri tanıyamama ya da tanımlayamama)
    - d. Yönelimsel işlevlerde bozukluk (organize etme, sıraya koyma, tasarlama, soyutlama)
- B. A<sub>1</sub> ve A<sub>2</sub> tanı ölçütlerindeki kognitif bozuklukların kişinin toplumsal, sosyal ve günlük işlevselliğinde bozulmaya ya da önceki işlevsellik düzeyinde azalmaya sebep olması
- C. Hastalığın yavaş, sinsi, aşama aşama oluşu ve sürekli bir kognitif azalma
- D. Hastanın kognitif kapasitesindeki azalmanın santral sinir sistemini ilgilendiren hastalıklara (serebrovasküler olay, Parkinson hastalığı, subdural hematoma, beyin tümörü, hidrosefali,...), demansa yol açabilecek sistemik durumlara (hipotiroidizm, vitamin B<sub>12</sub> eksikliği, hipoglisemi,...) ya da madde bağımlılığına bağlı olmaması
- E. Hasta deliryum tablosunda olmamalı
- F. Hastanın klinik durumu başka bir psikiyatrik bozuklukla (şizofreni, majör depresyon,...) açıklanamamalıdır

**Şekil 2.4.** AH tanısında DSM-IV kriterleri [9].

## 2.5. Alzheimer Hastalığı'nın Etiyolojisi

Özellikle GBAH olgularının etiyolojisi multifaktöriyeldir. Çevresel faktörler ve bu faktörler ile genler arasındaki etkileşimler; AH gelişimi için risk faktörlerini belirlemekte, hastalığın başlangıç yaşını ve ilerleme sürecini düzenlemektedir. Bu faktörlerin çoğunun sürece gerçek katkısı, önemi ve etkileşimlerinin aydınlatılması gerekmektedir [28] [Şekil 2.5].



**Şekil 2.5.** AH etiyojisi. 29 numaralı kaynaktan değiştirilerek alınmıştır. [29]

Alzheimer Hastalığı'nda yaş en önemli risk faktörüdür. Hastalığın prevalansı 65 yaşın altında nadirken, 85 yaşın üzerinde yaklaşık % 50'ye ulaşmaktadır [2].

Kadınlarda AH'ın daha sık görüldüğü birçok çalışmada bildirilmiştir. Kadınlarda gözlenen ömür süresinin uzunluğu veya genellikle daha düşük eğitim seviyelerine sahip olunmasının bu oranı artırdığı öne sürülmüşse de, yaş ve eğitim faktörlerinin göz ardı edildiği lojistik regresyon analizi modellerinde de kadınlarda demans riskinin arttığı gösterilmiştir. Östrojen eksikliği ve menapoz yaşı gibi faktörler ile AH ilişkisi araştırılmış; ancak net bir ilişki ortaya konulamamıştır. Östrojen eksikliğinin serebral kan akımı, nöronların düzenlenmesi, glial hücrelerin gelişimi ve *APOE* ekspresyonu gibi süreçleri etkileyebileceği bildirilmiştir. Östrojenin *APOE* ε4 heterozigotlarda ε4'ün ekspresyonunu inhibe ederek demans başlama yaşını geciktirebildiği ileri sürülmüştür [30]. Ancak 2003'te yayınlanan 'Women's Health Initiative' çalışmasının verilerine göre östrojen kullanan bireylerde demans riskinin arttığı tespit edilmiş olup, AH tedavisi veya önlenmesinde kullanılması önerilmemiştir [31].

Aile öyküsü, AH riskinin değerlendirilmesinde oldukça anlamlıdır. Birinci derece akrabalarda AH varlığı demans gelişme riskini 3 kat artırmaktadır [32].

AH'da muhtemel risk faktörlerinden düşük eğitim düzeyinin, hastalık insidansını 1,5 kat artırdığı bildirilmiştir [33].

35 yaşın üzerindeki Down sendromlu olgularda, AH gelişim riski yüksektir. Bu olgularda, Alzheimer hastalarının beyinlerindeki patolojik lezyonlara benzer lezyonların geliştiği rapor edilmiştir [34].

Yaş, cinsiyet, aile öyküsü ve Down sendromu gibi klasik risk faktörlerinin yanı sıra, hipertansiyon, diabetes mellitus, dislipidemi, düşük sosyoekonomik düzey, inflamasyon, oksidatif hasar, beslenme yetersizlikleri, homosistein yüksekliği, vitamin B12 eksikliği, hipotroidi, inme, infeksiyonlar gibi çok sayıda minör risk faktörü son yıllarda tanımlanmaya başlanmıştır. Türkiye'de yapılan bir çalışmada ülkemizde AH gelişim risk faktörleri incelenmiş ve lojistik regresyon analizlerinde cinsiyet, yaş, vitamin kullanımı ve depresyon varlığının bağımsız risk faktörleri olduğu saptanmıştır [35].



Nörotoksinler, glutamat, organik çözücüler, endüstriyel boyalar, alüminyum, demir, bakır, çinko, kurşun gibi bazı metallerin AH riski ile ilişkili olduğu öne sürülmüştür; ancak kesin bir bağlantı ortaya konulamamıştır. Bununla birlikte epidemiyolojik kanıtlar beyinde metal düzeylerinin yükselmesinin, AH'ın nörodejeneratif sürecin gelişimi ve ilerlemesiyle ilişkili olduğunu göstermektedir.

Glutamat, etkisini N-metil-D-aspartat (NMDA) üzerinden gerçekleştiren ve hücre içi serbest radikalleri artıran bir eksitotoksindir. AH için risk faktörleri arasında gösterilir ve patogeneizde suçlanmaktadır [1].

Alüminyumun AH'daki rolü yıllardır araştırılmaktadır. Gerçekleştirilen yeni bir çalışmada, yaşlı hastaların beyinlerinde hipokampal CA1 nöronlarının erken nörofibriler yumaklarında alüminyum belirlenmiştir; ancak etki mekanizması tartışmalıdır [1].

Beyinde demir birikimi, AH patofizyolojisinde öne sürülen başka bir önemli mekanizmadır. Aşırı demir, serbest radikallerin oluşumunu destekler, bu da lipid peroksidasyonu ve nörotoksititeye yol açar. Tüm bu değişiklikler hücre membran hasarı ve hücre ölümüyle sonuçlanır. AH'a sahip bireylerin beyinlerinde demir konsantrasyonu demansa sahip olmayan kontroller ile karşılaştırıldıklarında önemli derecede yüksek çıkmıştır. Özellikle parietal korteks ve hipokampusda demir birikimi, AH'ın erken basamaklarında hastalardaki bilişsel bozukluğun şiddeti ile pozitif bağlantı içindedir [1].

Çinkonun çökelen A $\beta$  proteini ile biriktiği ve inflamatuvar cevabın kontrolünde rol oynadığı rapor edilmiştir. Özellikle sitokin ekspresyonunun çinko varlığı tarafından düzenlenebildiği bulunmuştur [1].

Yeni bir çalışmada kemirgenlerde yaşamın erken evrelerinde kurşun maruziyetinin, sonraki süreçte amiloidogenez sürecini tetiklediğine işaret edilmektedir. Bu maruziyet AH patolojisi ile ilişkili A $\beta$  proteinlerinin artışı ile sonuçlanır [1].

Yapılan bir çalışmada clioquinol (CQ) gibi in vitro metal ligandların bakır düzeyini artırdığını göstermiştir. Hücre içi bakır düzeyindeki artış, hücre dışı A $\beta$ -40 ve A $\beta$ -42 düzeyinde dramatik ve hızlı şekilde düşüşe neden olur [1].

Kolesterol AH'deki amiloid plakların oluşması ile yakından ilişkilidir. Kolesterol düzeyi ile fazla APP oluşumu arasında ilişki gösterilmiş, statinlerle kolesterol

seviyesinin düşürülmesinin AH oluşma riskini % 70 azalttığını öne sürülmüştür [36].

Vasküler faktörler ve AH ilişkisi son yıllarda giderek önem kazanmaktadır. İnme varlığı vasküler demansın yanı sıra AH için de önemli bir risk faktörüdür [37]. Diyabetin AH için bir risk olmadığını veya düşük bir risk olduğunu belirten çalışmalar mevcuttur. Hipergliseminin amiloid depolanmasını ve agregasyonunu artırabileceği, NFY'lerde glikozillenmiş son ürünlerin varlığı gibi bulgularla diyabet ve AH ilişkisi açıklanmaya çalışılmıştır. Diğer taraftan, diyabetiklerde sık gelişebilen hipoglisemilere bağlı nöronal hasarın demans gelişimini tetikleyebileceği düşünülür. Diyabetin gerçek bir risk faktörü mü olduğu yoksa yol açtığı vasküler sorunlar ve eşlik eden hipertansiyon, dislipidemi ile dolaylı olarak mı AH riskini artırdığı henüz bilinmemektedir [38].

Hipotiroidinin de AH riskini artırdığı bildirilmiştir. AH bireylerin hipokampüsünde TSH serbestleştirilen hormon (TRH) konsantrasyonunda azalma saptanmış, TRH'nin hipokampüste proteinlerin fosforilasyonunu düzenlediği ve böylelikle AH patogenezinde yer alabileceği öne sürülmüştür [39].

### **2.5.1. Alzheimer Hastalığı'nda Genetik Risk Faktörleri**

AH'de genetik faktörler, büyük oranda hastalığın gelişimi için çevresel faktörlere bir yatkınlık zemini oluşturan risk faktörü niteliğindedir. Genetik ve çevresel faktörlerin karmaşık bir etkileşimi ile AH oluşur. AH'li olguların çoğu sporadiktir ve tüm Alzheimer olgularının % 5'e ulaşan bir oranı kalıtsal olma (basit Mendel kalıtımı ile otozomal dominant geçiş) özelliği taşır [40].

### **2.6. Alzheimer Hastalığı'nın Genetiği**

Tek yumurta ikizlerinde gerçekleştirilen çalışmalar % 18 - 41 arasında değişen konkordansın olduğunu ve bu uygunluk oranları ile Alzheimer hastalığının tek bir otozomal dominant gen ile tam açıklanamayacağını göstermiştir [41].

AH, Mendel kalıtımı ile geçiş açısından da heterojenite gösteren; polijenik/multialelik bir hastalıktır. Yani, birden fazla kromozomdaki gen lokuslarının çok sayıda farklı mutasyonları aynı hastalığa yol açar [4].

1990 yılından bu yana AH'ın altta yatan genetik ögesi hakkında önemli oranda kanıt birikmiştir. Ailesel EBAH'a yol açan otozomal dominant mutasyonlar

taşıyan üç gen (*APP*, *PSEN1* ve *PSEN2*), AH'ın %1'inden daha azını açıklamaktadır. Ayrıca geç başlangıçlı AH için kabul gören tek risk faktörü olan *APOE* ε4 aleli de, bu hastalığın genetik riskinin yalnızca bir kısmını açıklar [4].

Genetik bağlantı ve ilişki çalışmalarında birçok aday gen bölgesi bulunmasına rağmen, bu sonuçlar bağımsız çalışmalarda çoğunlukla tekrarlanamamıştır. Genetik heterojenlik, düşük etkili genetik faktörler ve çalışmaların yeterli güçte olmaması bu duruma yol açan nedenler arasındadır. Yüz binlerce tekli nükleotid polimorfizmi ile binlerce kişinin incelendiği genom çapında ilişki çalışmaları, AH gibi karmaşık genetik karakteristiğe sahip hastalıkların altında yatan yaygın risk varyasyonlarının bulunması için olası güçlü bir yaklaşım olarak görülmektedir [4].

Günümüzde geç başlangıçlı AH'da 11 tane genom çapında ilişki çalışması tamamlanmış ve izlenmesi gereken yeni aday genetik bölge ve genlerin bulunmasını sağlamıştır. Bu çalışmalar AH'da orta çapta etkili, olası genetik faktörlerle ilgili yeni kanıtlar sağlamasına rağmen, bu hastalığın hesaplanan riskinin tümünü açıklamaya yetmemektedir. Bu durumun olası nedeni, şu ana kadar bulunmuş genetik faktörlere ek olarak, AH'ın altında yatan ve daha geleneksel genetik bağlantı ve ilişki analizi yöntemleriyle belirlenemeyen, düşük etkili, nadir ve/veya yapısal DNA polimorfizmlerinin varlığı olabilir. Yeni kuşak sekanslama, sayısal endofenotip, kopya sayısı varyasyonları ve meta-analiz gibi alternatif yaklaşımların bu ek genetik risk faktörlerinin bulunması için gerekli olabileceği düşünülmektedir [4].

AH için yüzden fazla aday risk geni analiz edilmiş ve birçok çalışmada bu aday genlerden dördünün (*APP*, *PSEN1*, *PSEN2* ve *APOE*) hastalıkla ilgili olduğu bildirilmiştir. Bu genlerden yalnızca *APOE*'nin GBAH ile kuvvetli bağlantı gösterdiği kabul görmektedir [42].

### **2.6.1. Erken Başlangıçlı Alzheimer Hastalığı İle İlişkili Genler**

Hastalığın erken başlangıç gösteren formunun ortaya çıkması ile ilişkili otozomal dominant geçişten sorumlu olan şimdiye kadar üç ayrı gen bulunmuştur: *APP* geni (21. kromozom), *PSEN1* geni (14. kromozom) ve *PSEN2* geni (1. kromozom). Bu genler tarafından kodlanan üç protein de işlev

mekanizmaları aydınlatılmaya çalışılan, nöronal plastisitede rol oynadıkları öne sürülen transmembran proteinlerdir [15] [Tablo 2.1.].

*APP* genindeki mutasyonlar ailesel AH'lerin az bir kısmının sebebidir (ailesel EBAH olgularının %10-15'inde etkili), amiloid metabolizması üzerinden hastalığın patogenezinin ışık tutabilmiş ve Down sendromu ile AH arasındaki ilişkiyi de aydınlatmıştır. Bilindiği gibi Down sendromlu bireyler 21. kromozomun üç kopyasını taşırlar (Trizomi 21). Bu hastalar 30'lu yaşlardan itibaren çok sık olarak AH'nin nöropatolojik değişikliklerini göstermeye başlarlar [15]. *PSEN1*'deki mutasyonlar ailesel AH'lerin en sık sebebidir (ailesel EBAH olgularının % 30-70'inde etkili). *PSEN2* geninde meydana gelen mutasyonlar ise bu olguların % 5'inden azını etkilemektedir [40].

**Tablo 2.1.** EBAH ile ilişkili genler. 43 numaralı kaynaktan değiştirilerek alınmıştır.[43]

<b>Gen Adı (Sembol)</b>	<b>Kromozomal lokasyon</b>	<b>Kodlanan proteinin fonksiyonu</b>
<b>Amiloid prekürsör protein (<i>APP</i>)</b>	21q21.3	Nöronal gelişim, sinaptik oluşum ve tamir
<b>Presenilin-1 (<i>PSEN1</i>)</b>	14q24.3	APP ve NOTCH reseptör proteinlerinin birbiriyle örtüşen; ancak farklı
<b>Presenilin-2 (<i>PSEN2</i>)</b>	1q42.13	mekanizmalarla ayrımı

### **2.6.2. Geç Başlangıçlı Alzheimer Hastalığı İle İlişkili Genler**

Otozomal dominant Mendel kalıtımı gösteren ailesel AH'nin tersine; sporadik ya da geç başlangıç gösteren AH, etiyolojik açıdan heterojendir ve çok sayıda genetik ve çevresel faktörün kombinasyonu sonucu oluşur. Hastalığın bileşiminde güçlü genetik katkılar olduğuna dair kanıtlar var olmasına rağmen, genetik risk kalıntıları büyük oranda belirlenememiştir. Multifaktöriyel hastalıklarda kompleks kalıtım ve heterojenite; genotip ve fenotip analizleri için elde edilebilir farklı jenerasyonlarda etkilenen birey sayısının sınırlı olması, fenokopilerin varlığı ve geç başlangıç gösteren hastalığın semptomlarının ortaya çıkmasından önce mutasyonları veya polimorfizmleri taşıyan bireylerin

ölüm olasılığı gibi zorluklar nedeniyle ilişkilendirme çalışmaları sınırlanmaktadır. İsveçli ikizlerle geniş populasyon bazında gerçekleştirilen çalışmada GBAH kalıtım oranı % 79 olarak hesaplanmıştır. Ancak yakın zamana kadar, yalnızca tek bir gen AH için kabul gören tek risk faktörüdür. *APOE* ε4 aleli günümüzde GBAH için risk artışında etkili olduğu kadar hastalığın başlangıç yaşını da erkene çekmektedir [43]. GBAH riski ile ilişkili çok sayıda ek polimorfizmler bulunmuştur; ancak bu ilişkilerin doğrulanması için çalışmaların çoğaltılması gerekmektedir. Çoklu çalışmalar tarafından doğrulananlara örnek olarak; *ABCA7*, *APOE*, *BIN1*, *CD2AP*, *CD33*, *CLU*, *CR1*, *EPHA1*, *MS4A4A/MS4A4E/MS4A6E*, *PICALM* ve *SORL1* genleri örnek gösterilebilir [43] [Tablo 2.2.].

**Tablo 2.2.** GBAH ile ilişkili bazı genler. 43 numaralı kaynaktan değiştirilerek alınmıştır. [43]

<b>Gen Adı (Sembol)</b>	<b>Kromozomal lokasyon</b>	<b>Kodlanan proteinin fonksiyonu</b>
<b><i>APOE</i></b>	19q13.2	Lipoprotein, yağda çözünen vitaminler ve kolesterol transportu
<b><i>CLU</i></b>	8p21	Şaperon protein
<b><i>CR1</i></b>	1q32	C3b ve C4b komplement ayırım fragmentleri için reseptör, komplement opsonize immün komplekslerin ortadan kaldırılması için temel sistem
<b><i>PICALM</i></b>	11q14.2	Sinaptik veziküllerin membran içerisine alınması, lipid ve proteinlerin hücre içi hareketi, tam uzunlukta APP'nin hücre yüzeyinden içeri alımı
<b><i>BIN1</i></b>	2q14.3	Tümör baskılayıcı
<b><i>ABCA7</i></b>	19p13.3	Lipid homeostazisi ve immün hücrelerin farklılaşması
<b><i>MS4A</i></b>	11q12.2	Sinyal iletimi ve immünolojik fonksiyonlar
<b><i>EPHA1</i></b>	7q34	EPH reseptör tirozin kinaz ailesinin üyesi, sinir sistemi gelişimi
<b><i>CD33</i></b>	19q13.3	Myelomonositik kökenli hücrelerde adhezyon molekülü
<b><i>CD2AP</i></b>	6p12.3	Aktin hücre iskeleti ve vezikül oluşumunu düzenleyen iskelet molekülü
<b><i>SORL1</i></b>	11q24.1	Apo-E reseptörü, APP hücre içi trafiğinde ve işlenmesinde yardımcı

## 2.7. *PSEN1* Geni ve Proteini

14. kromozomun uzun kolunda EBAH'ta etkili olan bir genetik lokusun varlığı Schellenberg tarafından 1992'de belirlenmiştir [44]. Bu kromozomal bölgenin çeşitli transkriptleri araştırılmış ve pozisyonel klonlaması yapılmıştır. Otozomal dominant geçiş gösteren çok sayıda EBAH olgusuna ilişkin pedigri ile gerçekleştirilen genetik bağlantı çalışmaları *PSEN1* geninin keşfine ışık tutmuştur [45]. *PSEN1* geni 10'u kodlayıcı bölgeyi oluşturan toplam 12 ekzona sahiptir. *PSEN1* promotor bölgeleri, korunmuş TATA ve CAAT kutusu dizilerine ek olarak sinyal iletimine yanıtta transkripsiyonel aktivasyon için gerekli olan çoklu 'sinyal transdüksiyon ve transkripsiyon' (STAT) elementlerine sahiptir [45].

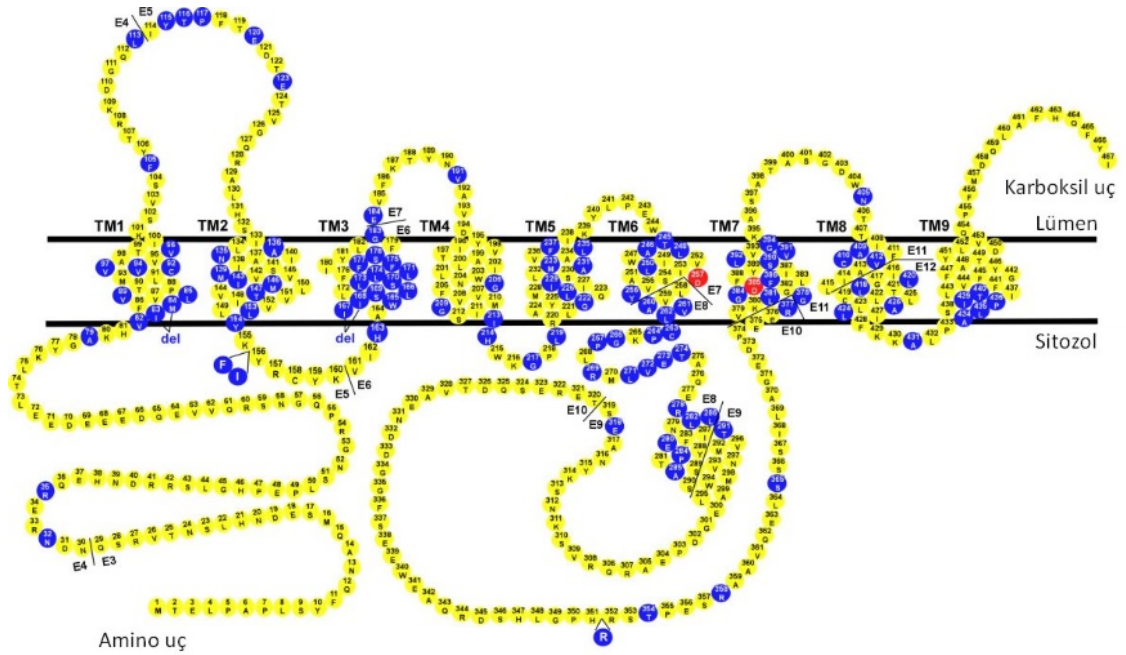
*PSEN1* ve *PSEN2* iki homolog gendir ve dizileri % 67 benzerlik gösterirler. Her iki presenilin mRNA'sı yaygın bir şekilde beyin, kalp, böbrek ve kası kapsayan pek çok insan ve fare dokusunda tespit edilmiştir [46].

Evrimsel açıdan bakıldığında; bitkiler, omurgalı ve omurgasızlarda yüksek dizi benzerliği gösteren presenilin homologu varlığı bilinmektedir. Presenilinlerin protein homolog ailelerinin belirlenmesi için çeşitli veri tabanları araştırılmıştır. Bu ailenin üyeleri, presenilin homologları olarak adlandırılırlar, presenilinlere önemli derecede sekans benzerliği gösterirler ve tahmini transmembran segmentlere bitişik şekilde korunmuş iki aspartik asit rezidusu taşırlar. Presenilin homolog ailesi; mantarlar, bitkiler ve hayvanlar gibi çoğu ökaryotta bulunur; hatta Arkelerde de varlıkları bilinmektedir. İnsan genomunda beş presenilin homologu belirlenmiştir. Bunlardan üçü presenilinlerin öngörülen proteaz fonksiyonları ile uyumlu olarak "proteaz-ilişkili" domeyn taşırlar. Bu bilgiler temelinde presenilin ve presenilin homologlarının politopik membran ilişkili aspartil proteazların geniş ailesinin farklı alt dallara ayrılması ile oluştukları ileri sürülmüştür [47].

Presenilin-1, ekzon 3'te 12 bp'lik kısımda kırılma bölgesi içerir. 1995'te Alzheimer Hastalığı Kolaboratif Grubu *PSEN1* N-terminal domeyninde yer alan 26-29 arası kodonların 'Val-Arg-Ser-Gln' (VRSQ) işleme haricinde ya da dâhilinde bırakılarak kırılma varyantı oluşabildiğini belirtmişlerdir [48]. VRSQ motifinin dâhil olması protein kinaz C ve kazein kinaz II için potansiyel fosforilasyon bölgesi oluşturur. Bununla birlikte bu iki transkriptin tüm dokularda

göreceli düzeyleri önemli derecede çeşitlilik göstermemektedir. Her iki izoform da beyin dokularında, fibroblast ve lenfoblastlarda bulunur, bu da *PSEN1* geni için alternatif kırılma olaylarının doku özgül düzenlenmesinin az olduğunu ileri sürmüştür; fakat bu kısa izoform uzun transkriptten 1.5 kat daha yaygın olarak bulunmaktadır. *PSEN1* 'in ikinci kırılma varyantı yalnızca lökositlerde ekzon 8'in çıkarılması şeklinde gözlenmiştir. Bu varyantın önemi tam olarak belirlenememiştir; fakat *PSEN1* ekzon 8 bölgesi yüksek yoğunlukta AH mutasyonu içerdiğinden, önemli olabileceği açıktır. *PSEN1* geni intron 9'da yer alan çerçeve dışı kırılma bölgesi ya da farklı ekzon-intron bağlantı bölgelerinde yer alan kırılma bölgelerinin de kullanılması ile çeşitli varyantlara sahiptir [45].

*PSEN1* geninin şimdiye kadar tanımlanmış 27 transkript varyantı olduğu ve bu transkriptlerden birinin 467 amino asite karşılık geldiği bilinmektedir [49]. *PSEN1* proteini hücre dışı karboksil uca ve sitosolik amino uca sahip, dokuz transmembran birimi ile multi-transmembran proteindir [Şekil 2.6.], ER ve transgolgi ağında bol miktarda bulunur, bir kısmı nüklear membran, kinetokor ve sentrozomlarda yerleşmiştir [48].



**Şekil 2.6.** Presenilin-1 proteini yapısı. 46 numaralı kaynaktan değiştirilerek alınmıştır. Mavi daireler AAH ilişkili mutasyon ya da delesyonları göstermektedir, kırmızı daireler iki katalitik aspartat rezidusunu işaret etmektedir [46].

Fizyolojik koşullarda, PSEN1 proteinlerinin büyük çoğunluğu stoplazmik kısımda yer alan büyük hidrofilik loop içerisinde ~27-28 kDa N-terminal fragment (NTF) ve 16-17 kDa C-terminal fragment (CTF) oluşturmak üzere endoproteolizis geçirir. Bu endoproteolitik ayırım 292. ve 299. amino asitler arasında heterojen bir bölgede, transmembran domeyn 6 (TM6) ve transmembran domeyn 7 (TM7) arasında gerçekleşir. Bazı çalışmalar bu işlemi gerçekleştiren proteinleri “presenilinaz” olarak rapor ederken, presenilinlerin otoendoproteolizis geçirdiğini destekleyen kanıtlar artış göstermektedir. Bu endoproteolizis işlemi büyük hidrofobik kısmın otoinhibitör etkisinin uzaklaştırılması ile  $\gamma$ -sekretaz aktivitesinin aktif duruma getirilmesi için önemlidir. Bununla birlikte PSEN1deIE9 gibi bazı presenilin mutantlarında, endoproteolizis yokluğunda enzimin aktive olduğu tespit edildiğinden bu yana presenilin olgunlaşması için endoproteolizisin kesin olarak gerekli olup olmadığı açık değildir [46].

## 2.8. PSEN1 Fonksiyonu

*In situ* hibridizasyon analizleri, *PSEN1* ve *PSEN2*'nin beyindeki ifadelerinin birbirleriyle benzerlik gösterdiği ve nöronal bileşenlerde her ikisinin de öncelikli olarak tespit edilebildiği sonucunu vermiştir. İmmünohistokimyasal analizler *PSEN1* ve *PSEN2*'nin benzer büyüklüklerde, endoplazmik retikulum ve Golgi kompleksi gibi benzer hücre içi bölgelerde lokalize olduklarına işaret etmektedir [50].

*PSEN1* aşırı ekspresyonu gösteren COS-7 (maymun böbrek hücresi kökenli fibroblast benzeri hücre hattı) hücrelerinde bu protein plazma, endoplazmik retikulum, perinükleer aralık gibi hücresel membranlara lokalize olmuştur. *PSEN1*'in özellikle plazma membranında immünreaksiyon vermesi ve hücre-hücre temasının olduğu bölgelerde yoğunlaşması bu proteinin hücre adhezyon molekülü olduğunu düşündürmektedir [51].

Yabanıl tip *PSEN1* ve *PSEN2*'nin çekirdek zarında yer alması, interfaz kinetokor ve sentrozomları ile ilişkisi bu iki proteinin kromozom organizasyonu ve ayırımındaki görevine işaret etmiştir. AAH'ın patojenik mekanizması tartışıldığında, mutant presenilinlerin mitoz sürecinde kromozomların yanlış ayırımına neden olduğu ve bunun apoptozis ya da trizomi mozaizmi ile sonuçlandığını göstermiştir. Alternatif bir hipoteze göre mutant presenilinlerin



endoplazmik retikulumdan çıkış trafiği normal şekilde işlemez, bu durum da APP'nin normal işleme sürecine engel olur [52].

*PSEN1*'in Alzheimer hastalarında anatomik dağılımı ve ekspresyonu tanımlanmıştır. Sıçan önbeyinlerinde *in situ* hibridizasyon kullanılarak, *PSEN1* mRNA ekspresyonunun öncelikle kortikal ve hipokampal nöronlarda olduğu, subkortikal yapılarda daha az ifade edildiği görülmüştür. Ekspresyonun bölgesel dağılımı ise APP dağılımına benzerlik göstermektedir. *PSEN-1* ekspresyonunun AH ile ilişkili bazı hassas beyin bölgelerinde fazla olduğu gözlenmiştir. Bununla birlikte, *PSEN-1* ekspresyonu ilişkili bölgelerin işaretlenmesi için yeterli bir belirteç değildir. Genel olarak söylenebilir ki, nöronal hücre popülasyonlarında *PSEN1* mutasyonları nöropatojenik süreci başlatır [53].

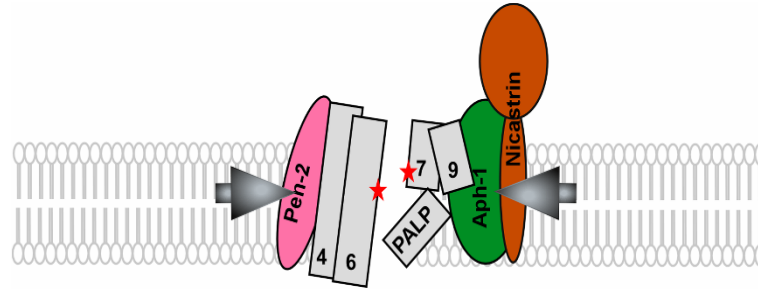
PSEN1 ve PSEN2, APP ve Notch reseptör proteinlerinin proteolitik ayrımı için gerekli  $\gamma$ -sekretaz aktivitesinin önemli belirleyicilerindendir. Presenilinler *in vitro* ve *in vivo* olarak  $\gamma$ -sekretaz ile ilişkisi olduğu belirlenen ilk moleküllerdir [46]. *PSEN1* knockout farelerde APP'nin  $\gamma$ -sekretaz ayrımının indirgenmiş olduğu gösterilmiştir. PSEN1 bir transmembran aspartil proteazdır ve  $\gamma$ -sekretaz kofaktörü olarak davrandığı ya da  $\gamma$ -sekretazın APP ile eşleşmiş yerleşimine yardımcı olduğu düşünülmektedir. PSEN1, bilinen aspartil proteazlarla ya hiç homoloji göstermemekte ya da çok az homoloji göstermektedir. Çalışmalar PSEN1 (ve PSEN2)'in  $\gamma$ -sekretazın aktif bölgesinde yer aldığını göstermektedir [54]. Presenilinler aspartil intramembran ayırıcı proteazlar (I-CLiPs) sınıfına ait olan sinyal peptit peptidazlar (SPP) ile birliktedirler. Presenilinlerin NTF ve CTF'lerinde sırasıyla iki katalitik aspartat rezidusu [Asp257; (TM6) ve Asp385 (TM7)] yer alır. Her iki aspartat rezidusundaki mutasyon da  $\gamma$ -sekretaz aktivitesini ortadan kaldırır. Bu sonuçlar iki transmembran aspartat rezidusunun presenilin endoproteolizisi ve  $\gamma$ -sekretaz aktivitesi için kritik olduğuna işaret eder. Presenilin-1, ya özgün  $\gamma$ -sekretaz için bir diaspartil kofaktördür ya da kendisi  $\gamma$ -sekretaz aktivitesine sahip zar içi proteazdır [55].

Membran içerisine yerleşmiş durumda peptit bağlarını hidrolize eden aspartil proteazların özgün bir sınıfının üyeleri olarak bulunan PSEN1 ve PSEN2 proteinleri,  $\gamma$ -sekretaz aktivitesinde birlikte yer alsalar da bu iki enzimin benzer ya da farklı substratlara sahip olup olmadığı, farklı komplekslerde yer aldıkları bilindiğinden bu yana açık değildir. Bu durum  $\gamma$ -sekretaz aktivitesinin yüksek

moleküler ağırlıklı bir kompleks tarafından gerçekleştirildiğini ve ayırım işleminin regülasyonunun başka proteinlerin karakterizasyonuna bağlı olduğunu göstermektedir [56].

## 2.9.Gama Sekretaz ( $\gamma$ -sekretaz) Kompleksi

$\gamma$ -sekretaz adlandırması ilk olarak 1993 yılında transmembran domeynde APP kesimindeki proteolitik aktiviteyi tanımlamak için kullanılmıştır, yaklaşık on yıl içerisinde bu ayırmadan sorumlu moleküler aygıtın tüm bileşenleri belirlenmiştir [46].  $\gamma$ -sekretaz; PSEN1 ya da PSEN2, nikastrin, APH1 ve PEN-2'den oluşan multiprotein kompleksidir [57]. Nikastrin/ APH1 birimleri ve SPP, PSEN1 TM-6/ TM-7 ve TM-9'un oluşturduğu membran aralığına göreceli gevşek şekilde bağlanır, TM-9'da yer alan prolin-arjinin-lösin-prolin (PALP) motifi yeniden düzenlenme geçirerek katalitik merkezin aralığını oluşturur, böylece  $\gamma$ -sekretaz kompleksi aktive olur [46] [Şekil 2.7.].  $\gamma$ -sekretaz, oldukça hidrofobik komplekstir ve membranda fıçı benzeri bir yapı oluşturur. Katalik aktivite için gerekli su, bu yapı içinde bulunur [5].



**Şekil 2.7.**  $\gamma$  –sekretaz kompleksi ve PSEN1 katalitik yapısının oluşumu. [46]

PSEN1 transmembran domeynleri numaralandırılarak gösterilmiştir, diğer birimler olmaksızın PSEN1 göreceli por yapısını membranda oluşturur. Diğer birimlerin bağlanması ile PALP motifi katalitik merkezin yakınına hareket eder ve PSEN1 transmembran domeynlerindeki yapısal değişiklikler tarafından katalitik yapı aktive edilir [46].

*Drosophila* hücre kültürlerinde APH1, PEN2 ya da nikastrini RNA-aracılı inaktivasyon çalışmaları sonucu, APP ve Notch substratlarının  $\gamma$ -sekretaz ile ayırımlarında indirgenme, presenilin işleme düzeylerinde düşüş görülmüştür. Bu durum APH1, PEN2 ve nikastrinin  $\gamma$ -sekretaz kompleksinin biraraya gelmesinde ve aktivitesinde önemli rol oynadığını gösterir [58].

Koimmünpresipitasyon deneyleri ile PEN2'nin PSEN1/  $\gamma$ -sekretaz ve PSEN2/  $\gamma$ -sekretaz komplekslerinin kritik bileşenleri olduklarını göstermiştir. PSEN1 ya da

PSEN1 ve PSEN2'nin birlikte yokluğu PEN2 düzeyinin indirgenmesi ile sonuçlanmıştır. Ek olarak PEN2'nin RNA interferans tekniği ile downregülasyonu, presenilin düzeyinin indirgenmesi, nikastrin oluşumunun bozulması ve  $\gamma$ -sekretaz kompleksinin oluşumunda kusur ile ilişkilidir [59].

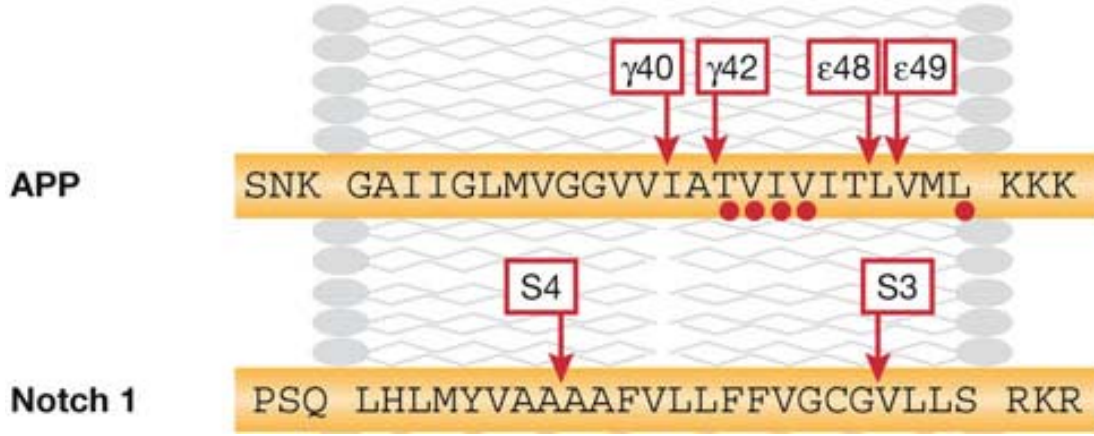
PSEN1 karboksi ucunun, nikastrinin transmembran domeyni ile etkileşimde bulunduğu ve membrana tutunduğu belirlenmiştir. PSEN1 proteininin terminalinde yer alan amino asitlerin delesyonu PSEN1'in endoplazmik retikulum (ER)'den salınımını tamamen bloke eder, PSEN1 'in bağımsız ve aktif şekilde ER içerisinde kalmasına neden olur ve  $\gamma$ -sekretaz yapılımasını engeller. Nikastrin-bağlanma sitinden farklı olarak PSEN1 karboksi-ucu içerisinde amino asitlerin hidrofobik kısmı tespit edilmiştir, bu kısım PSEN1'in ER içerisinde komplekse katılmaksızın kalması için gereklidir ve bu kalım sinyalinin delesyonu PSEN1'in ER'den salınımına aynı zamanda fonksiyonel olmayan  $\gamma$ -sekretaz kompleksinin oluşumuna neden olur, bu motifin PSEN1 fonksiyonu için önemli olduğu ileri sürülmektedir [60].

$\gamma$ -sekretaz; ektodomeyn ayrılması gerçekleştikten sonra tip-1 integral membran proteinlerinin işlenmesinde görev alır. Klasik substratlarının fonksiyonlarının çoğunun, hücre adhezyon ve göçü, nörit gelişimi ve sinaps oluşumu gibi AH patogeneğinde sıklıkla zarar gören çeşitli sinyal yollarında yer alması ilgi çekicidir.  $\gamma$ -sekretaz substratlarının sayısı 80 'in üzerindedir ve APP, Notch, neurogulin, ErbB4 , E-kaderin ve N-kaderin, CD44 ve büyüme hormon reseptörünü kapsar. Bununla birlikte APP ve Notch en iyi bilinen  $\gamma$ -sekretaz substratlarıdır [1].

### **2.9.1. $\gamma$ -Sekretazların $\epsilon$ - ve $\gamma$ - Bölgelerinde Ayrımı**

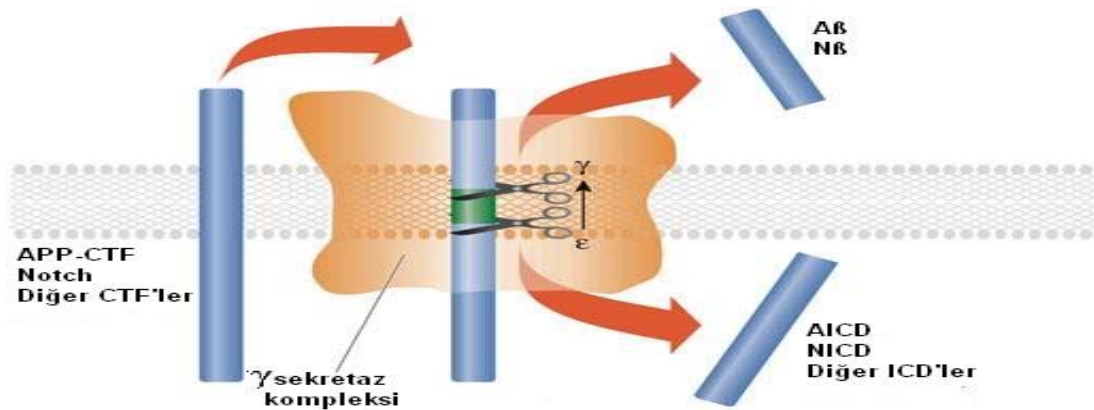
$\gamma$ -sekretaz substratlarını çoklu ayırım sitlerinde işler.  $\gamma$ -sekretaz APP transmembran domeyninde iki noktada ayırım yapar:  $\gamma$ -siti ayırımı A $\beta$ 'yi oluştururken, daha aşağıda yer alan  $\epsilon$ -sitinde gerçekleşecek ayırım APP hücreiçi domeyni (AICD)'i oluşturur.  $\gamma$ -sitinde ayırım heterojen olup A $\beta$ 'nin 39-43 kalıntılı birimlerini oluştururken ,  $\epsilon$ -siti ürünü AICD yaygın biçimde 50 kalıntıdır. Daha belirleyici şekilde iki temel  $\gamma$  ayırımının iki ürününden biri; Val40 (A $\beta$ -40) kalıntısında, diğeri ise Ala42 (A $\beta$ -42) kalıntısında sonlanır. AICD peptidi Val51 ya da Met52'den başlar [5].

Aynı fenomen Notch işlenmesinde de söz konusudur: S4 ( $\gamma$ -siti) heterojen ayırım ile N $\beta$ , S3 'te ( $\epsilon$ -siti) ise homojen ayırım ile Notch hücreiçi domeyni (NICD) oluşturulur [46] [ Şekil 2.8.].



**Şekil 2.8.** APP ve Notch 1 subsratlarının  $\gamma$ -sekretaz kompleksi tarafından ayırım bölgeleri. [5]

Görüldüğü gibi  $\gamma$ -sekretaz subsratlarını  $\gamma$  ve  $\epsilon$ -sitlerinde işler, A $\beta$  ve NICD gibi farklı ürünler üretir. A $\beta$ , AH patojenezinde merkezi rol oynarken; NICD gelişim sürecinde olduğu kadar erişkin dönemde de aracılı kısa süreli hücre içi iletişim ve hücre kaderinin belirlenmesi gibi evrimsel olarak korunmuş süreçlerde nüklear transkripsiyonel aktivatör olarak gereklidir. Presenilin mutasyonları, A $\beta$  üretimi kadar NICD oluşumunu da etkiler, bu durum presenilin mutasyonlarının  $\gamma$  ve  $\epsilon$ -sitlerinin her ikisindeki ayırmada da değişikliğe neden olduğunu göstermektedir [Şekil 2.9.] [46].



**Şekil 2.9.**  $\gamma$ -sekretaz subsratlarının ayırım ürünleri. 5 numaralı kaynaktan değiştirilmiştir. [5]

Bununla birlikte son çalışmalar  $\gamma$  ve  $\epsilon$  sitlerinde gerçekleşecek ayrımlarının kendilerine özgü enzimatik kinetikleri ve farmosotik karakterizasyonları ile ayrı enzimatik olaylar olduğuna işaret etmişlerdir, AAH-ilişkili *PSEN1* mutasyonları tarafından farklı şekilde etkilenebilirler. Özellikle *PSEN1* yer alan ailesel mutasyonların  $\gamma$ -sekretaz kompleksinde fonksiyon kaybı ya da kazanımı mekanizmalarından hangisine neden olduğu halen tartışma konusudur [46].

## 2.10. *PSEN1* Geni Değişimleri ve Etkileri

Günümüze değin 180'den fazla *PSEN1* mutasyonu tanımlanmıştır [6]. Tüm durumların % 70'inden fazlasında etkili olmakla *PSEN1* genindeki mutasyonlar ailesel EBAH olgularında belirlenen mutasyonların önemli kısmını oluşturmaktadır. *PSEN1*'de yer alan mutasyonların çoğu, genin kodladığı presenilin proteininde tek amino asit değişimiyle sonuçlanan, yanlış anlamalı mutasyonlardır, bu mutasyonlar gen yapısı boyunca dağınık halde bulunurlar. Bununla birlikte, *PSEN1* proteininin aktivitesi için önemli olan transmembran domeynlerin içinde ve çevresinde kümelenme eğilimindedirler, dahası bazı *PSEN1* mutasyonları tamamlanmamış penetrans gösterirler, bu yüzden tüm mutasyon taşıyıcıları hastalık gelişimi göstermez.

*PSEN1* geninde küçük delesyonlar, insersiyonlar ve kırılma (splice) mutasyonları gibi bazı daha kompleks mutasyonlar da tespit edilmiştir. *PSEN1*'de belirlenen en şiddetli mutasyon iki amino asit değişiminin neden olduğu ekzon 9 çerçeve delesyonu ile sonuçlanan donör-akseptör splice mutasyonudur. Görülmüştür ki, bu mutasyonların biyokimyasal sonuçları  $\gamma$ -sekretaz oluşumu için sınırlayıcıdır. Hastalığa yol açan mutasyonlar tarafından *PSEN1*'in 467 amino asitlik açık okunma çerçevesinde yaklaşık üçte birinin etkilenmesiyle proteinin kırılması ya da yokluğu gözlenmemiştir, bu durum haploetersizliğin AH'a neden olmadığına işaret eder [5].

Yabanıl tip olmayan, *PSEN1* overekspresyon transgenik fare mutantlarında beyin A $\beta$ -42 (43) düzeylerinin seçici olarak arttığı gösterilmiştir. Bu sonuçlar *PSEN1* mutasyonlarının AH'a toksik fonksiyon kazanımı ile beyinde depolanan A $\beta$ -42 (43) birikiminin artışı yoluyla neden olduğunu işaret etmektedir [61].

Ancak yapılan bir çalışmada yabanıl tip ve bir fonksiyonel *PSEN1* alelinin kaybedildiği fareler arasında, amiloid birikimlerinde bir farklılık olmadığı

gösterilmiştir [62]. *PSEN1*, A246E mutasyonu taşıyan farelerde A $\beta$ -42 (43) düzeyinin artmış olduğunun gösterilmesi ise toksik fonksiyon kazanımı hipotezlerini desteklemektedir [63].

Transfekte hücre hatlarında mutant *PSEN1* ve *PSEN2* varlığı A $\beta$ -42'nin önemli derecede artışı ile sonuçlanır. *PSEN2* Volga mutasyonu total A $\beta$ -42 üretiminin 6-8 kat artışına neden olurken, *PSEN1* mutasyonlarının hiçbirisi böyle dramatik etkilere sahip değildir, *PSEN1* ve *PSEN2* mutasyonlarının kendine özgü farklılıklarının bu etkiyi oluşturduğu ileri sürülmüştür. Mutant *PSEN1* geni taşıyıcısı transgenik farelerin beyinlerinde A $\beta$ -42 üretimi artmıştır ve bu durum 2-4. ay evrelerinde tespit edilebilmektedir. *In vitro* ve *in vivo* deney kombinasyonları ailesel AH bağlantılı *PSEN1* mutasyonlarının  $\alpha$  ve  $\beta$ -sekretaz aktivitelerine etki etmeksizin  $\gamma$ -sekretaz düzeyini direkt ya da indirekt olarak değiştirerek A $\beta$ -42 üretiminde artış ile AH'a yol açtığını göstermiştir [64].

Sonuç olarak *PSEN1* mutasyonlarının klinik açıdan toksik fonksiyon kazanımına neden olduğu ve *PSEN1* aktivitesinin inhibisyonunun AH'da anti-amiloidogenik terapi için potansiyel bir hedef olduğu düşünülmüştür [65].

*PSEN1* ya da *PSEN2* veya her iki proteinin de yok olduğu fare hücrelerinde hücre içi A $\beta$  oluşumu, üretimi ve salgılanma biçimleri incelenmiştir. Çoğu A $\beta$  türleri *PSEN1/PSEN2* (-/-) hücrelerinde ortadan kalkmış olmasına rağmen, hücre içi A $\beta$ -42'nin endoplazmik retikulum aracılı kompartmanda üretimi bu proteinlerin tekli ya da ikili kombinasyonlarının yokluğundan etkilenmez. Buradan şu sonuca varılmaktadır ki, A $\beta$  havuzunun üretimi *PSEN1* ve *PSEN2* 'den bağımsız olarak gerçekleşir, bu nedenle erken salgılanma bölgelerinin içinde APP ayrımı için başka bir  $\gamma$ -sekretaz aktivitesinin sorumlu olduğu düşünülmektedir [66].

A $\beta$ -40 ve A $\beta$ -42 peptitlerinin presenilin bağımlı  $\gamma$ -sekretaz ayrımı ile APP'den aşırı düzeyde üretilmesi için glikojen sentaz kinaz-3- $\alpha$  (GSK3A)'ya gereksinim olduğu gösterilmiştir. *In vitro*'da GSK3A inhibitörü olan lityum,  $\gamma$ -sekretaz basamağını inhibe ederek A $\beta$  üretimini bloke eder. *APP* ve *PSEN1* genlerinde ailesel AH ilişkili mutasyon ekspresyonu gösteren farelerde, lityum, A $\beta$  peptit düzeyini indirir. GSK3A'nın AH'da nörofibriler yumakların temel bileşeni olan

tau proteinini de fosforillediği bilinmektedir. GSK3A inhibisyonunun AH için yeni terapötik yaklaşımlardan biri olduğu düşünülebilir [67].

*PSEN1* ekspresyonu gösteren transfekte böcek hücrelerinde insan APP (C99) C-terminal fragmenti A $\beta$  üretimi ile birlikte artar ve C99'un hücre içi düzeyi orantılı artış gösterir. Tekrarlanan deneyler C99 birikiminin C99 yarı ömrünün artışından kaynaklandığını ileri sürer.  $\gamma$ -sekretaz aktivitesinin inhibisyonu *PSEN1*'in C99'un hücre içi düzeyini artırma yeteneğinde değişime neden olmaz. *PSEN1*'in C99'a bağlanması onun ara işleme süreçleri için gerekli değildir. *PSEN1*'in substrat yerleşim siti içerdii ve C99 işlenmesini spatiotemporal olarak düzenlediği ileri sürülmektedir [68].

Kumar ve Singh, A $\beta$  oluşum ve APP işleme sürecini 9 kliniksel *PSEN1* mutasyonu için ELISA-temelli in vitro metot kullanılarak çalışmışlardır. Tüm mutasyonların A $\beta$ -40 ile APP C-terminal fragmentlerinin birikimini önemli derecede azaltarak A $\beta$ -42/A $\beta$ -40 oranını artırdıkları gösterilmiştir, bu azalmış *PSEN1* aktivitesine işarettir. Mutlak A $\beta$ -42 düzeylerindeki artış test edilen mutasyonların yalnızca yarısında gözlenmiştir. *PSEN1* bağlantılı ailesel AH'ın başlangıç yaşının A $\beta$ -42/A $\beta$ -40 oranı ve mutlak A $\beta$ -42 düzeyiyle ters; ancak A $\beta$ -40 düzeyiyle doğru orantılı olduğu gösterilmiştir. Sonuç olarak veriler göstermektedir ki, A $\beta$ -40 daha fazla toksik olan A $\beta$ -42'den ayrılabilir ve ortadan kaldırılma kolaylığı nedeniyle koruyucu etkiye sahip olduğu düşünülebilir [69].

*PSEN1* mutasyonlarının A $\beta$ -40 formu yerine, daha toksik olan A $\beta$ -42 formunun üretimini artırarak AAH'a neden olduğu farzedilmektedir, bu toksik fonksiyon kazanımına işarettir. Bununla birlikte çok sayıda çalışma *PSEN1* mutasyonlarının A $\beta$ -42 üretimini etkilemesinin dışında, klinik olarak A $\beta$ -40 üretiminde bozulmayla ilişkili olduğunu göstermiş, mutant proteinin ayırım spesifitesinin A $\beta$ -40 yerine A $\beta$ -42 üretimine kaymış olması fikrinin revizyonuna neden olmuştur. Başka bir deyişle, son zamanlarda ileri sürülen, en azından, bazı AAH-ilişkili mutasyonların A $\beta$ -42'nin göreceli ya da tam aşırı üretiminden çok mutant proteinin  $\gamma$ -sekretaz aktivitesini destekleme yeteneğinin tamamını kaybettiğini ileri sürülmektedir. Bundan dolayı fonksiyon kaybı; ayırım özgüllüğünde kayma (A $\beta$ -40 yerine A $\beta$ -42) ile ya da  $\gamma$ -sekretaz aktivitesinin bilinmeyen başka bir hedef substratı ile ilişkili olabilir. Bu durumda yetişkin

memeli beyinde *PSEN1* fonksiyon kaybı birincil olay olabilir ve AH'da nörodejenerasyona yol açan, varsayılan patojenik kaskadı tetikleyebilir [1].

Bu durumu destekler nitelikte, gerçekleştirilen analizler *PSEN1* protein yapısının üçte birinden fazla bir kısmının korunmuş domeynlerden oluştuğunu, *PSEN1* ilişkili ailesel AH mutasyonlarının % 75 'inin bu yüksek derecede korunmuşluk gösteren bölgelerde yerleştiğini göstermiştir, bu nedenle çoğu *PSEN1* mutasyonunun *PSEN1*/γ-sekretaz fonksiyon kaybına neden olduğu düşünülür [70].

AAH-ilişkili presenilin mutasyonları yalnızca başlangıç yaşı, nörolojik ve psikolojik belirtiler gibi klinik özelliklerde heterojenite göstermezler, nörofibriler yumak oluşumu, nörotik plak kompozisyonunda değişim, Pick cisimciği varlığı, beyin kökü ve bazal gangliada nöropatolojik lezyonlar gibi nöropatolojik bulgularda da farklılıklar vardır [46].

*PSEN1* geninde yer alan mutasyonların erken başlangıçlı AAH 'a neden olduğu belirlenmişken, sporadik AH olgularındaki etkisi henüz aydınlatılamamıştır. Yapılan bir çalışmada sporadik AH bireylerde ve normal yaşlanma sürecinde yabani tip *PSEN1* proteinin, mutant *PSEN1* proteinine benzer şekilde patojenik konformasyonel değişime uğradığı gösterilmiştir [71]. Sporadik GBAH olgularında *PSEN1* ekspresyonunun arttığına gösterilmesi *PSEN1* düzeyinde meydana gelen değişikliklerin hastalığın geç başlangıç gösteren formu ile de ilişkili olduğuna işaret etmektedir [72].

*PSEN1* klinik mutasyonlarının APP işleme sürecindeki etkileri çoğunlukla Aβ 42/40 oranının analizi ile araştırılır; AAH gelişimi için baskın faktör olarak tanımlanır. On yılı aşkın süre önce Aβ-42 "nükleasyon" faktörü olarak tanımlanmış Aβ birikimi in vitroda kesin olarak gösterilmiştir. Aβ-42'nin AH'daki önemine direkt kanıt APPVal717 ile klinik mutasyonunun biyokimyasal analizinden gelmiştir, bu mutasyon diğer bazı mutasyonlarda olduğu gibi Aβ-40 yerine Aβ-42 üretiminde göreceli artışa neden olmaktadır. Sonuçta Aβ-42 nöronlar tarafından Aβ-40'dan 10 kat daha düşük oranda oluşturulsa da AH'a sahip bireylerde amiloid plakların temel bileşenidir [5].

Aβ-40 ve Aβ-42 peptitlerinin biyolojik özelliklerinde ciddi farklılıklar vardır, örneğin mutant *PSEN1* aleli ve *PSEN1* null alel kombinasyonu amiloidoz



birikimine neden olurken, aynı mutant ve yabancı tip kombinasyonu  $\gamma$ -sekretaz aktivitesi artmış olsa bile koruyucu özelliğe sahiptir. Dahası, transgenik farelerde A $\beta$ -42 ekspresyonu -A $\beta$ -40 üretimi olmaksızın- amiloidozis için tek başına yeterlidir [5].

*PSEN1* klinik mutasyonlarının APP işleme sürecine etkileri hücre kültür sistemlerinde yeniden aydınlatılmaya çalışılmaktadır. Bu çalışmalar özellikle  $\gamma$ -sekretaz için direkt substrat olan APP C-99 bağlamında, A $\beta$ -40 ve A $\beta$ -42'nin toplam (mutlak) düzeyini analiz ederler. A $\beta$ -42/A $\beta$ -40 oranının artış gösterdiği doğrudur; fakat bu çeşitli mutantlarda A $\beta$ -40 seviyelerinin düşüşü nedeniyledir. Önemli bir şekilde, tüm hücre hatları APP C-99 biriktirir ve stoplazmik AICD oluşumunda düşüş gösterir, *PSEN1* genindeki mutasyonlar uzun (A $\beta$ -42) ve kısa (A $\beta$ -40) amiloid peptitleri arasındaki oranın artışı ile uyumludur. *PSEN1* ve *PSEN2* genlerinin inaktivasyonu A $\beta$  oluşumunu tamamen engeller, bu artış gerçekten toksik fonksiyon kazanımı olarak açıklanabilir, fakat oranlardaki bu değişim A $\beta$ -40 oluşumunun sonucu da olabilir [5].

Çeşitli araştırmalar yıllardır baskın olan toksik fonksiyon kazanımı hipotezini değiştirecek veriler ortaya koymuşlardır. İlk olarak mutant *PSEN1*'in, Notch-alesi üyesi lin-12 (sel-12) *C.elegans*'taki homologunu kendi baskılayıcı kaybindan kurtarmakta etkisiz ya da daha az etkili iken yabancı tip *PSEN1*'in bu işlemi etkili şekilde gerçekleştirdiği, ikinci olarak *PSEN1* fonksiyonunun tamamen ortadan kaldırılmasının fare ön beyinlerinde APP işleme sürecini etkileyerek nörodejeneratif sürece neden olduğu, üçüncü olarak çeşitli gruplar tarafından *PSEN1* geninin özgül kaybının fare ön beyinlerinde hafıza yaklaşımlarını etkilediği gösterilmiştir. Nörodejenerasyon ve hafıza kusurlarının her ikisi de AH'nin önemli özellikleridir, fakat bunların insan patolojisinde gözlenmesi tehlikeli sonuçlara neden olabilir. Benzer şekilde, fare modelinde dört *PSEN1* alelinin tamamının kaybının gösterilmesi, AAH bireylerde tek bir *PSEN1* alelinde nokta mutasyonunun etkinin gösterilmesine kıyasla çok daha zordur. Gerçekten nörodejeneratif fenotipler fare modellerin yalnızca tek bir alelin inaktivasyonu ile gözlenmemiştir (*PSEN1* +/- ya da *PSEN2* +/-). Buna ek olarak önbeyin özgül *PSEN1*-knockout farelerde gözlenen hafıza kusurlarının AH patogenezindeki ile uyumlu olup olmadığı açık değildir. Bu konuda AH fare modelinde APP overekspresyonundan kaynaklanan hafıza

kusurlarından bazıları *PSEN1* inaktivasyonu ile geri döndürülebilmektedir. Ayrıca *PSEN1* geninde yer alan bir promotor polimorfizminin gen ekspresyonunda düşüşe neden olarak EBAH patogenezinin katkı sağladığı düşünülmektedir; bununla birlikte amiloid oluşumuna etkisi henüz tam olarak bilinmemektedir [46].

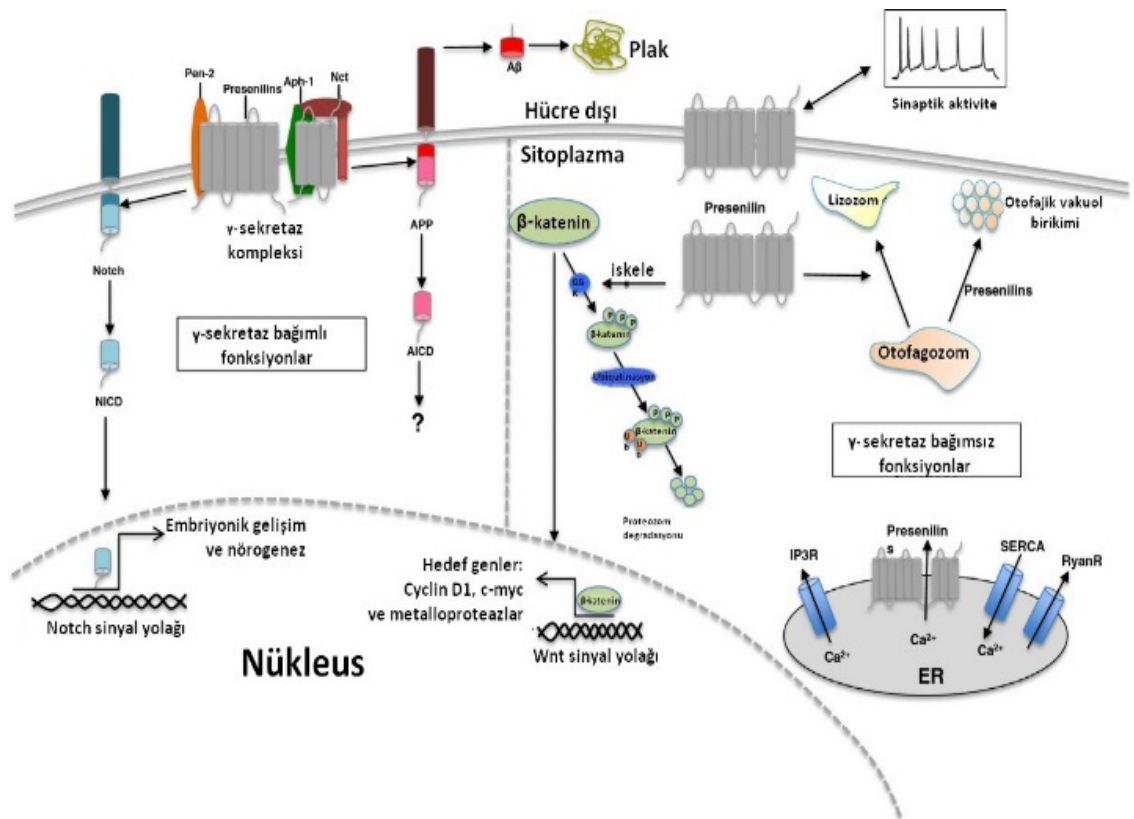
Alternatif model daha karmaşıktır, *PSEN1* mutasyonları  $\gamma$ -sekretaz için  $\epsilon$ -ayrımını başlatan ek katalitik sitler oluşturur. Bu durum APP'nin ardışık işleme sürecinde *PSEN1* mutasyonlarının normal A $\beta$ -40 oluşumunda düşüşe neden olarak kendiliğinden uzun A $\beta$  (A $\beta$ -42) oluşumunu artırmasıyla fonksiyon kaybı mutasyonu özelliği gösterebileceğini destekler. *PSEN1* mutasyonları diğer mekanizmalarda da fonksiyon kaybı mutasyonu özelliği göstermektedir [46].

*PSEN1* mutasyonlarının Notch sinyallenmesinde kayba neden olduğuna dair ilk *in vivo* kanıt *C.elegans*'tan sağlanmıştır. Fakat bu çalışmayı takiben farelerde gerçekleştirilen çalışmalar bu gözlemleri desteklememiştir. Bu çalışmalarda çelişkinin, çalışmaların farelerde gerçekleştirilmiş olmasından kaynaklandığı öne sürülmüştür; çünkü hücre-temelli analizlerde bu mutasyonun (*PSEN1* Ala246Glu) Notch ayrımında % 20 indirgenme ile sonuçlandığı bildirilmiştir. Ancak bu deneyler *PSEN1* geninde fonksiyon kaybı mutasyonlarına ışık tutamamıştır. Knock-in mutasyonların bu mekanizmayı aydınlatmada daha iyi bir yol olabileceği düşünülmüştür. Göreceli yumuşak fenotiplerde çeşitli mutant fareler tanımlanmıştır. İki hastalıklı alel içeren fare modelinde hafıza kusurları gözlenirken, heterozigot farelerin fonksiyon kaybı fenotipinden kurtulduğuna işaret edilmiştir. Hücre hatlarında gerçekleştirilen deneylerde *PSEN1* mutantlarının Notch, syndekan, N-kaderin ve muhtemelen diğer başka substratların ayrımında da düşüşe yol açtığı kesin olarak doğrulanmıştır. Bu nedenle *PSEN1* mutasyonlarının  $\gamma$ -sekretaz fonksiyon kaybı ile sonuçlandığı düşünülmektedir. Doğrusu, *PSEN1* fonksiyonunun protein trafiği, apoptozis, otofaji, kalsiyum homeostazisi,  $\beta$ -katenin turnoveri, kinaz yollarının regülasyonu ve tau fosforilasyonu gibi süreçlerde aydınlatılması fonksiyon kaybı yorumlamalarını desteklemektedir [5].

## 2.11. PSEN1 ve Diğer Metabolik Yolaklar

Son zamanlarda presenilinlerin  $\gamma$ -sekretaz katalitik merkezindeki görevi dışında çok sayıda fonksiyonu gerçekleştirdiklerini destekleyen kanıtlar artmaktadır. Salgılayıcı nöronlarda presenilinlerin koşullu knock out'u ile yaşa-bağımlı nörodejenerasyon gösterilmiş, presenilinlerin nörodejeneratif süreçte amiloid kaskad hipotezinden bağımsız rolüne işaret edilmiştir.

Presenilinlerin Wnt sinyallenmesi, hücre adhezyonu, kalsiyum homeostazisi, protein degradasyonu ve apoptoz gibi  $\gamma$ -sekretaz bağımsız fonksiyonlarının keşfindeki artış bu heterojenliğe kanıt sağlamaktadır [46] [Şekil 2.10.].



**Şekil 2.10.** Presenilin fonksiyonları. 46 numaralı kaynaktan değiştirilerek alınmıştır. [46]

### 2.11.1. PSEN1 ve Notch Sinyal Yolağı

Notch reseptör proteinleriyle gerçekleştirilen sinyalizasyon gelişim sürecinde hücre akıbetinin belirlenmesi için gereklidir ve Notch'un ligand tarafından tetiklenen ayrımını gerektirir. Bu ayrım tahmini olarak transmembran domeynde gerçekleşir, Notch intrasellüler domeyn (NICD) ortaya çıkar ve APP'nin  $\gamma$ -sekretaz aracılı ayrımını hatırlatır. Memeli hücrelerinde APP'nin  $\gamma$ -sekretaz

tarafından işleme sürecini PSEN1 kusurları inhibe eder, *C.elegans* PSEN1 ve Notch homologları arasındaki genetik etkileşimler presenilinlerin Notch sinyal yolağını düzenlediğini göstermiştir. PSEN1 kusurlu memeli hücrelerinde hasarlı Notch yapısından NICD'in proteolitik salınımının azaldığı rapor edilmiştir, böylece Notch sinyal yolağında PSEN1 tarafından etkilenen özel bir basamak belirlenmiştir. Ayrıca çeşitli  $\gamma$ -sekretaz inhibitörleri Notch işlenmesini aynı basamakta bloke eder, bu da gösterir ki bağlantılı proteaz aktiviteleri Notch ve APP'nin tahmini transmembran domeynlerindeki ayırmadan sorumludur. Bu durumda AH tedavisi için  $\gamma$ -sekretaz hedeflemesi, azalmış Notch sinyalizasyonu nedeniyle toksite riski taşımaktadır [73].

*Drosophila* PSEN1 genindeki null mutasyonlar Notch sinyal iletimini ortadan kaldırır ve hücre içi domeynin nükleus içerisine girişine engel olur. Notch'un ligand tarafından aktivasyonunu takiben intrasellüler domeynin proteolitik salınımı için presenilinlerin gerekliliği ortaya konmuştur [74]. *Drosophila*'da presenilin-bağımlı Notch işleme süreci ve tip-1 transmembran proteinlerinin substrat gereksinimleri için in vivo ölçümler yapılmıştır ve bulunmuştur ki presenilin bağımlı ayrımlar bu proteinlerde yer alan özel dizilerin tanınmasına değil, hücre dışı domeynin büyüklüğüne bağlıdır: daha küçük boyut, ayırmanın etkinliğini fazlalaştırır. Bu yüzden, Notch, APP ya da başka proteinler kalan proteinden hücre dışı domeynin ayrılmasında presenilin aracılı mekanizma kullanılır [75].

*Drosophila* presenilin geninde; pronöral hücre kümelerinin içerisinde lateral inhibisyon kaybı, kanat mesafe oluşumunda kayıp gibi, Notch-ilişkili lethal fenotipe neden olan fonksiyon kaybı mutasyonları tanımlanmıştır [76].

### **2.11.2. PSEN1 ve $\beta$ -katenin, Kaderin İlişkisi**

$\beta$ -katenin, hücre adhezyon molekülü olduğu kadar Wnt sinyal yolağında sinyal iletim proteindir.  $\beta$ -katenin hücre sel lokalizasyonuna göre iki ayrı fonksiyona sahiptir: Membran  $\beta$ -katenin hücre adhezyon molekülü olan E-kaderin ile kompleks oluştururken, stoplazmik  $\beta$ -katenin Wnt-sinyalizasyonunda gen ekspresyonunun düzenlenmesinde görevlidir [46].

PSEN1'in,  $\beta$ -katenin ile kompleks oluşturduğu ve  $\beta$ -katenin stabilitesini artırdığı in vivo gösterilmiştir. PSEN1 genindeki patojenik mutasyonlar, presenilin  $\beta$ -

kateninini stabilizasyon yeteneğini azaltır ve transgenik farelerin beyinlerinde  $\beta$ -kateninin artmış degradasyonuna yol açar. Dahası,  $\beta$ -katenin düzeylerinin *PSEN1* mutasyonu taşıyan Alzheimer hastalarında önemli derecede azaldığı gösterilmiştir.  $\beta$ -katenin sinyallenmesinin kaybı nöronal duyarlılığı artırarak APP tarafından indüklenen apoptozisi destekler. Böylece, *PSEN1* genindeki mutasyonların  $\beta$ -katenin stabilitesindeki değişim ile nöronal apoptozisi artırdığı ve AH'ın erken başlangıç formuna zemin hazırladığı kanısı desteklenmektedir [77].

MDCK (Madin-Darby canine kidney) hücrelerinde *PSEN1*'in kaderin–temelli tutunma bağlantılarının bileşenleri gibi hücre içi iletişim bölgelerinde kolokalize olarak biriktiği gösterilmiştir. *PSEN1* fragmentleri E-kaderin,  $\beta$ -katenin ve  $\alpha$ -katenin gibi tutunma bağlantılarının tüm bileşenleri ile kompleks oluşturur. Yeterince çoğalmış MDCK hücrelerinde, *PSEN1* hücre yüzeyi E-kaderini ile birleşir,  $Ca^{+2}$  bağımlı hücre-hücre etkileşiminde bozulma hücre yüzeyi *PSEN1*'i ve *PSEN1*-E-kaderin kompleksi düzeylerini azaltır. İnsan böbrek hücrelerinde *PSEN1* overekspresyonu hücre-hücre adhezyonunu artırır. Bu veriler *PSEN1* 'in kaderin/katenin adhezyon sistemine katıldığını ve hücre-hücre adhezyonunu düzenlediğini gösterir. *PSEN1* epitel dokuda hücreler arası temas bölgelerinde konsantre olur, E-kaderin ve N-kaderin ile kompleks oluşturur ve beyinde sinaptik bölgelerde yoğunlaşır. *PSEN1* kaderin/katenin kompleksinin kurucusudur ve bu kompleks *PSEN1* mutasyonları ile ilişkili ailesel Alzheimer hastaları için potansiyel bir hedeftir [78].

*PSEN1*,  $\beta$ -katenin ile etkileşir ve bu proteinin turnoverini bağımsız mekanizmalarla başlatır. Bu aktivitesiyle uyumlu olarak *PSEN1*'in *in vivo* epidermal hücre çoğalmasının kontrolünde önemli olduğu rapor edilmiştir. *PSEN1*-kusurlu farelerde deri kanserinin gelişimi,  $\beta$ -katenin stabilizasyonunda *PSEN1*'in görev aldığını göstermektedir. Bununla birlikte  $\beta$ -kateninin AH patogenezindeki özgün rolü açık değildir. Sporadik AH vakalarında pek çok çalışma indirgenmiş Wnt/ $\beta$ -katenin sinyallenmesinin AH patogenezinine katkı sağlayabileceğini işaret etmektedir [46].

*PSEN1* mutant L286V proteini sıçan nöronal öncül hücrelerinde nörit büyümesini ve nöronal farklılaşmayı  $\beta$ -katenin aracılı sinyallenme ve transkripsiyonda azalma nedeniyle inhibe etmektedir [79].

PSEN1,  $\beta$ -katenin düzeyini, yapısında da yer alan sitosolik ilmek yoluyla fiziksel olarak etkileşerek negatif olarak düzenler. PSEN1 'in bu fonksiyonu  $\beta$ -katenin yapım-yıkımının yabani tip PSEN1'de gerçekleşirken D257A mutantında ortadan kalktığına gösterilmesi ile belirlenmiştir [46]. PSEN1'in  $\beta$ -katenin fosforilasyonunu kolaylaştıran bir iskelet olarak işlev gördüğüne ilişkin kanıtlar vardır ve  $\beta$ -katenin yıkımını siklin bağımlı kinaz 5 (CDK5)/GSK-3 $\beta$  fosforilasyonu aracılığıyla düzenlediği belirlenmiş olmasına rağmen mekanizma henüz aydınlatılamamıştır. Gosall ve Coll, AICD-overekspresyonu gösteren transgenik farelerin GSK-3 $\beta$ 'nin anormal aktivasyonuna sahip olabileceğini göstermiştir. Bu fareler tau hiperfosforilasyonunu/agrasyonu ve nörodejenerasyon hafıza kusurlarını kapsayan AH-benzeri karakteristiklere sahiptir [1].

Presenilinler için iyi çalışılmış diğer substratlar N- ve E-kaderinlerdir. PSEN1, bu proteinler ve  $\alpha/\beta$  kateninler ile hücre yüzeyinde kompleks oluşturur.  $\gamma$ -sekretaz E-kaderin'i proteolize uğratar ve bu kompleksle ilişkili  $\beta$  ve ( $-\alpha$ ) kateninlerin salınımı ve tutunma bağlantısının bozulması ile sonuçlanır. N-kaderin ayrımı  $\gamma$ -sekretazlar tarafından sağlanır ve NMDA agonistleri tarafından düzenlenir. Bu ayrımla artış gösteren N-kaderin fragmentleri siklik AMP yanıt elementi bağlanma proteini (CREB)'e bağlanır [80].

PSEN1, ER'den plazma membranına etkili N-kaderin trafiği için gereklidir. E-kaderin ve nöronal kaderin (N-kaderin)  $Ca^{+2}$  bağımlı hücre-hücre adhezyonu ve tanınmasında aracılık eden tip-I transmembran protein ailesinin üyesidirler. N-kaderinin plazma membranına PSEN1 aracılı iletimi, hücre-hücre temas durumunun kontrolünü kapsayan fizyolojik fonksiyonların gerçekleştirilmesi için önemlidir [1].

PSEN1 yalnızca AH-ilişkili protein gibi görünen; ancak bağımsız multifonksiyonel özellikleri ile çok sayıda hücre sel sinyal mekanizmasını merkezinde bulunan protein olarak tanımlanmıştır [81].

### **2.11.3. PSEN1 ve Kalsiyum Homeostazisi İlişkisi**

Presenilinlerin kalsiyum homeostazisindeki rolleri daha da tartışmalıdır. *PSEN1* genindeki klinik mutasyonların endoplazmik retikulum (ER)'deki kalsiyum havuzuna zarar verdiği ise ortak bir kanıdır. Mekanizmalar tam olarak

açıklamamış olmakla birlikte ve presenilinlerin Ryanodin reseptörünün (RyR) yüksek ekspresyonuna, inositol-3-fosfat (IP3) – indükleyici ER  $Ca^{+2}$  salınımına ya da sarko (endo) plazmik retikulum  $Ca^{+2}$  –ATPaz (SERCA) düzenlenmesine etki ettiği düşünülmektedir. Presenilinler kalsiyum geçirgenliği olan kanallar gibi davranabilirler ve bu geçiş fonksiyonu sadece PSEN1'in tamamında gözlenebilir (örneğin  $\gamma$ -sekretaz kompleksi ile birleşmeden önce) ve presenilinlerin içerdiği aspartat mutasyonları bu işlevi etkileyebilir [80].

*PSEN1* genindeki mutasyonların anormal hücre içi kalsiyum sinyallenmesi ile bağlantılı olduğu ve IP3 reseptörü aracılığıyla ER depolarından  $Ca^{+2}$  salınımını başlattığı bildirilmiştir. Presenilinler IP3 reseptörleri ile etkileşimde bulunurlar, IP3 kanal aktivitesini düzenlerler. Patch-clamp tekniği kullanılarak *PSEN1* M146L mutasyonunun IP3 kanallarının açıklığını uzattığı ve  $Ca^{+2}$  geçirgenliğini artırdığı gözlenmiştir. PSEN1M146L eksprese eden fare primer nöronlarında, mutant *PSEN1*'in RyR miktar ve ekspresyonunu artırdığı aynı zamanda, IP3R ve  $Ca^{+2}$  sinyallenmesini düzenlediği gösterilmiştir. IP3 reseptörü ve RyR dışında, presenilinlerin sar-/ endoplazmik retikulum  $Ca^{+2}$ ATPaz (SERCA) ile etkileşime geçerek hücre içi kalsiyum sinyallenmesini düzenlediği rapor edilmiştir. Bu çalışmalar presenilin ve mutantlarının hücre içi kalsiyum sinyallenmesini çeşitli kalsiyum kanal-aracılı proteinlerle etkileşim yoluyla düzenlediğini ileri sürer. Presenilinlerin düşük geçirgenlikte, pasif ER  $Ca^{+2}$  geçiş kanalları olarak davranabiliyor olması ile presenilinlerin  $Ca^{+2}$  sinyalizasyonundaki fonksiyonu, Alzheimer hastalığı ve bozulmuş nöronal  $Ca^{+2}$  sinyallenmesi arasındaki bağlantıyı destekler niteliktedir [82].

#### **2.11.4. PSEN1 ve Otofaji**

Amiloid plakların çevresinde distrofik nöritlerde, otofajik vakuollerin birikimi gözlenmektedir. Otofajide bozulmuş hücre organelleri ve toksik protein degradasyonu için hücresel işleme gerçekleştirilir, bu mekanizma hücrelerin besin tükenmesi gibi stres koşullarında canlılıklarının sürdürülmesine yardımcı olur. Otofaji temel olarak iki basamak gerektirir: Bozulmuş hücresel organelleri içeren otofagozomun oluşumu ve içeriğin lizozom ya da geç endozom füzyonu ile degradasyonu. PSEN1 kusurlarının telensephalin (TLN) ve alfa-sinüklein benzeri uzun ömürlü proteinlerin yapım-yıkım sürecinde bozulmaya neden olduğu, bunun da lizozomal füzyon başarısızlığı ve otofajik kusurla sonuçlandığı

bildirilmiştir. Diğer bir hipoteze göre PSEN1-bağlantılı otofajik vakuol birikimi lizozom asidifikasyon mekanizmasında kusurlara neden olur [46].

PSEN1 kusurlarının otofajik vakuol anormallikleriyle bağlantılı olduğu iyi bilinmektedir. Ancak otofaji ve AAH-ilişkili PSEN1 mutasyonları arasındaki ilişki net olarak açıklanamamıştır. Örneğin yapılan bir çalışmada, AAH-ilişkili *PSEN1* mutasyonlarının TLN-pozitif otofajik kusurla ilişkili olmadığı gösterirken, bir diğer çalışmada *PSEN1* AAH-ilişkili mutasyon taşıyan insan fibroblastlarında otofajik kusur tespit edilmiştir. Bu durum gösterir ki, AAH-ilişkili PSEN1 mutasyonlarının AH'da otofajik kusurlara katkısının aydınlatılması için sonraki çalışmalara ihtiyaç vardır [46].

#### **2.11.5. PSEN1 ve Sinaptik Geçiş**

AH için başka patolojik yaklaşım sinaptik iletimde başarısızlık ve sonraki nöral devrelerde hasar varlığıdır. Plak oluşumundan bağımsız şekilde sinaptik fonksiyon bozukluğunun AH patogeneziye katkı sağladığına dair çok sayıda bulgu mevcuttur. Aβ'nin sinaptik iletim etkinliğinin sürdürülmesi ve nöral devrelerin stabilizasyonunda önemli rol oynadığı rapor edilmiştir. Son zamanlara presenilin proteinlerinin nörotransmitter salınımına katıldığı ve sinaptik sinyal seviyelerinin düzenlenmesinde rol oynadığı dikkati çekmiştir [46].

#### **2.11.6. PSEN1 ve Apoptoz**

Apoptozis, normal gelişimde ve farklı hücre tiplerinin homeostazisinin sağlanması için gerekli biyolojik bir süreçtir. Bu süreçte meydana gelen bozulmalar nörodejeneratif hastalıkların pek çoğu ile bağlantılıdır. Apoptoz sürecinde PSEN1'in normal endoproteolitik ayırım sürecinden bağımsız olarak kaspaz-3 ailesi proteazları tarafından ayırma uğradığı bildirilmiştir.

PSEN1, ERK 1/2 aktivitesinin bazal düzeyini Grb'nin SH2 domeni ile direkt bağlanması ile Ras-Raf-MEK-bağımlı yolağın aktivasyonunu gerçekleştirerek düzenler. ERK ailesi, en yaygın olan hücre dışı sinyal mekanizmalarından biridir ve mekanizmanın aktivasyonu hücre dışı düzenleyiciler ile ilişkilidir; ayrıca bu yolak hücre çoğalması, canlılığın sürdürülmesi ve hücre farklılaşması gibi süreçlerin yanı sıra hücre ölümü ve apoptoz mekanizmaları ile de bağlantılıdır.

AAH-mutantlarının hücre ölümüne neden olduğu ya da apoptozise yol açan sekonder olayları indüklediği bildirilmiştir. *PSEN1* ve *PSEN2* genleri delesyona



uğrayan farelerde öğrenme, hafıza ve sinaptik fonksiyon kusurları ve nöronal hücre ölümü görülmüştür. Bulgular PSEN1'in Bcl2 ailesinin antiapoptotik bir üyesi ile etkileşimde olduğunu göstermektedir [46].

### **2.11.7. PSEN1 ve Etkileşimde Olduğu Diğer Mekanizmalar**

Nöronlarda APP'nin aksonal transportunun, APP'nin kinezin-1'in, kinezin hafif zincir birimine direkt bağlanması aracılığıyla gerçekleştiği gösterilmiştir. Aksonal membran kompartmanının APP,  $\beta$ -sekretaz ve PSEN1 içerdiği belirlenmiştir. APP'nin proteolitik yıkımının aksonlarda olduğu *in vivo* ve *in vitro* olarak gösterilmiştir. Bu proteolizis APP'nin karboksi terminal fragmentini ve A $\beta$ 'yı oluşturur ve kinezin-1'in membrandan salınımına neden olur. Buradan şu sonuca varılabilir ki APP, kinezin-1 membran reseptörü olarak davranır,  $\beta$ -sekretaz ve PSEN1, APP'nin aksonal transportunda aracıdır. APP'nin amiloid  $\beta$ 'ya işleme süreci sekretazlar tarafından gerçekleştirilir, bu aksonal membran kompartmanında kinezin-1 tarafından transportla desteklenir [83].

*PSEN1*'deki AAH-ilişkili mutasyonların ER lümeninde yanlış katlanan proteinlerin birikimi ile ER'de strese yanıt olarak aktive edilen katlanmamış protein yanıtında hasara neden olduğunu gösterir. Hücre kültürü çalışmaları *PSEN1* mutantlarının Ire-1 alfa, ATF6 ve PERK gibi ER stres ileticilerinin aktivasyonunu inhibe ettiği gösterilmiştir [84,85].

TRPM7-ilişkili Mg<sup>+2</sup>-inhibe katyon kanalları disregülasyonunun temelinde *PSEN1*-AAH-mutant hücrelerinde iyon kanal fonksiyonu bozulması yatmaktadır. Fosfatidil inositol 4,5 -bifosfat (PIP<sub>2</sub>) eklenmesi kanal kusurlarını yeniden restore eder ve PIP<sub>2</sub> metabolizmasındaki dengesizliğin hastalık patogenezinde bir faktör olabileceği ileri sürülmüştür [86].

PSEN1 ekstrasellüler matriks bileşenleri için hücre yüzey adhezyon molekülü olan, tümör hücre büyümesi ve metastazın düzenlenmesini kapsayan geniş kapsamlı biyolojik ve patolojik süreçlerde rol oynayan CD44'ün membran içi ayrımı için gereklidir [1].

Son zamanlarda düşük yoğunluklu aracılı protein (LRP)'nin de  $\gamma$ -sekretaz benzeri bir aktiviteyle ayrıldığını göstermektedir. LRP reseptörleri  $\epsilon$ 4 alel taşıyıcılarında geç başlangıçlı AH gelişiminde iyi bilinen bir risk olan Apo-E tarafından aktive edilir [1].

Presenilinler, proteinlerin hücresel trafiğinde de etkilidir. Çok sayıda presenilin substratı, beklenmedik şekilde proteolitik süreçle ilişkilidir ve protein fragmentlerinin anormal birikimine yol açarlar. Bununla birlikte  $\gamma$ -sekretaz substratı olduğu açık olmayan intrasellüler adezyon molekülü 5 (ICAM 5), telensephalin, epidermal büyüme faktör reseptörü (EGFR) ve B1-integrin gibi çeşitli hücre-yüzey proteinleri presenilin kusurlu hücrelerde yanlış lokalize olmuşlardır. Presenilin knock-out hücrelerde bu proteinlerin anormal birikimi endozom ya da lizozomlar arasında kusurlu transport ya da geç endozomal ve başka yıkım organlarındaki eksiklikler ile açıklanmaktadır [80].

## **2.12. PSEN1 ve İlişkili Hastalıklar**

### **2.12.1. Dilate Kardiyomiyopati**

Presenilinlerin kalp dokusunda eksprese oldukları ve kardiyak gelişimde rol oynadıkları hipotezinden bu yana presenilinlerin dilate kardiyomiyopati (CMD1U; 613694) ile ilişkili olduğu düşünülmüştür. 315 dilate kardiyomiyopati hastasının *PSEN1* ve *PSEN2* (600759) sekans varyasyonları araştırılmıştır. Yeni *PSEN1* heterozigot yanlış anlamlı mutasyon (104311.0034) penetrans bir ailede belirlenirken bir başka iki ailede tek heterozigot *PSEN2* (600759.0008) yanlış anlamlı mutasyonu belirlenmiştir. *PSEN1* mutasyonu tamamlanmış ve kardiyak transplantasyon gerekliliği ya da ölümle sonuçlanan progresif süreçle ilişkilidir. *PSEN1* ve *PSEN2* mutasyonu taşıyıcılarının költüre deri fibroblastlarında kalsiyum sinyallenmesinde değişim olduğu gözlenmiştir [87].

### **2.12.2. Ailesel Akne İnversa**

Ailesel otozomal dominant kalıtım gösteren akne inversa -3 (ACNINV3; 613737) 'de *PSEN1* 'de tek bazlık çerçeve kayması (frameshift) mutasyonu tanımlanmıştır (104311.0038). *PSEN1*, *PSENEN* (607632) ve *NCSTN* (605254)  $\gamma$ -sekretaz kompleksinde heterozigot fonksiyon kaybı mutasyonunun ailesel akne inversa nedeni olabileceği gösterilmiştir. Çalışma grubu olarak Alzheimer ya da demans belirtisi taşımayan 50 yaş ve üstü bireyler seçilmiştir [88].

## 2.13. Apolipoproteinler ve Apolipoprotein-E (Apo-E)

### 2.13.1. Fonksiyon ve Metabolizma

Lipidler plazmada çözünemediklerinden dolayı çözünüp taşınabilir hale gelmeleri ve çeşitli dokularda enerji kaynağı, lipid depolanması, steroid hormon sentezi ve safra asidi oluşumu gibi biyolojik fonksiyonları sağlamak için lipoproteinlere ihtiyaç duyarlar. Lipoproteinler, lipid ve proteinlerin birleşiminden oluşur. Lipoproteinlerin protein kısmına apolipoprotein ya da apoprotein denir [89]. En önemli apolipoproteinler Apo-E, Apo-C ve Apo-B'dir. Lipid kısmı kolesterol, esterleşmiş kolesterol, trigliserid ve fosfolipidleri içerirken, apolipoprotein kısmı da enzimler için taşıyıcı ve/veya kofaktör olarak ve reseptörler için ligand olarak görev yapar. Her biri farklı göreve sahip olan beş temel lipoprotein vardır. Bunlar yüksek dansiteli lipoprotein (HDL), düşük dansiteli lipoprotein (LDL), orta dansiteli lipoprotein (IDL), çok düşük dansiteli lipoprotein (VLDL) ve şilomikronlardır. Bu apolipoproteinlerden LDL hariç, tümünün yapısında Apo-E bulunmaktadır. Diğer bir deyişle Apo-E; VLDL, IDL, HDL ve şilomikron kalıntılarının bileşenidir, bunların oluşumunda ve stabilitesinde önemlidir [90].

Apo-E, ilk defa 1973'te VLDL'nin bir bileşeni olarak tespit edilmiştir [91]. Diğer apolipoproteinlerle karşılaştırıldığında daha yüksek oranda arjinin amino asiti içermektedir. Karaciğerde sentezlenen ve trigliseridleri karaciğerden periferik dokulara taşıyan VLDL %10-20 oranında Apo-E içerir. Hücreler arası kolesterol dağılımında önemli rol oynayan HDL ise % 1-2 oranında Apo-E içerir. Buna ilave olarak Apo-E diyet lipidlerini bağırsaklardan karaciğere ve diğer dokulara taşıyan, barsaklarda oluşan şilomikronların ana bileşenidir. Bazı lipoproteinlerin bağlanma, internalizasyon ve katabolizma gibi metabolik reaksiyonları, Apo-E tarafından yüksek afiniteli reseptörlerin tanınması aracılığı ile olur. Bu reseptörler, örneğin Apo-B'yi tanıyan ve karaciğer ve ekstrahepatik dokularda bulunan LDL reseptörleri ve saf Apo-E reseptörleridir ki bunlara şilomikron kalıntı reseptörleri de denir. Bu reseptörler büyük oranda karaciğer hücrelerinde bulunurlar [89].

Apo-E; LDL reseptörleri için ligand görevi yapan bir plazma proteindir. Bu reseptörlerle etkileşimi sonucu vücudun çeşitli hücrelerinde kolesterol ve diğer

lipidlerin transportunda rol alır. Apo-E beyinde astrosit hücreleri tarafından sentez edilir, dalak hücreleri, akciğerler, adrenaller, overler, böbrekler ve karaciğer de sentez edildiği yerler arasındadır. Ayrıca yüksek konsantrasyonlarda intestinal sıvılarda bulunur ve burada fazla kolesterol içeren hücrelerdeki kolesterolü, ihtiyaç duyulan hücrelere dağıtmakta görev alır. Apo-E ayrıca hücre hasarını tamirde rol almaktadır. Örneğin periferik sinir hasarlarında ve rejenerasyonunda *APOE* ekspresyon seviyeleri önemli ölçüde artmış olarak bulunmuştur. Buradan yola çıkarak Apo-E'nin lipid transport görevinden bağımsız fonksiyonları olduğu söylenebilmiştir. Bu fonksiyonlar hücre büyüme ve farklılaşmasının immunoregülasyonu ve modülasyonudur [92].

Bazı reseptörlerin Apo-E'ye olan yüksek afiniteleri, bu proteinin lipoprotein metabolizmasındaki ana fizyolojik rolünü açıklamaktadır. Apo-E büyük oranda karaciğerde sentezlenen lipoproteinlerden farklıdır, çünkü sinir sistemi dâhil olmak üzere ekstrahepatik dokularda da anlatımı gerçekleşir [93]. Apo-E beyin omurilik sıvısında (BOS) bulunan, hem periferik hem de santral sinir sisteminin Schwann hücreleri ve astrositler tarafından üretilen temel apolipoproteindir [94]. Apo-E'nin farklı hücre tiplerindeki varlığı, onun lipid transportu dışında, rejenerasyon ve immünolojik süreçlerde de rol aldığına işaret etmektedir. Apo-E'nin büyüklük ve elektriksel yük bakımından farklı izoformlarının oluşu, genetik varyasyon ve post-translasyonel glikozilasyon olaylarının bir sonucudur [95].

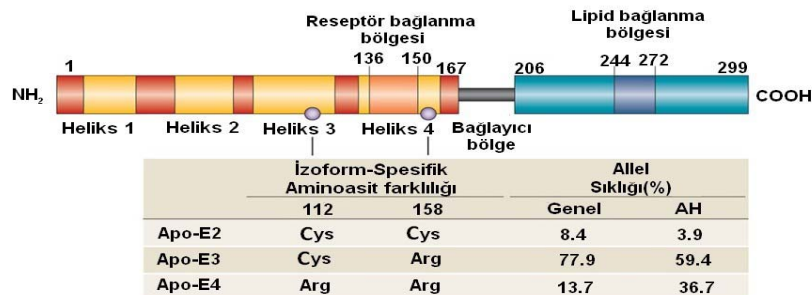
### **2.13.2. *APOE* Geni ve Apo-E Proteini**

İnsan *APOE* geni (*APOE*, MIM 107741) 19. kromozomun uzun koluna (19q13.2) lokalize 3597 bç uzunluğunda, 4 ekzon ve 3 intron içeren bir gendir [96]. Birinci intron yaklaşık 760 bç uzunluğundadır ve 5' translasyona uğramayan (untranslated) dizide sekansı translasyonu başlatan metionin kodonunun yukarısında (upstreaminde) yerleşmiştir. İkinci ve üçüncü intronlar sırasıyla 1092 ve 582 bç uzunluğundadır ve Apo-E proteininin -4. aminoasidi ile olgun proteinin +61.aminoasidi arasında bulunurlar [97]. *APOE*'nin transkripsiyon başlama (inisiasyon) bölgesi birinci intronu başlatan guanozin-timin (GT) nükleotidlerinin 44 bç yukarısında, adenin (A) nükleotidinde bulunur [96]. Varsayılan promotor sekansı (TATAAATT kutusu), bu transkripsiyon başlama bölgesinin 33 bç yukarısında bulunur [97] . Bunlara ek olarak başka iki temel ters dönmüş tekrar (inverted repeated) dizisi mRNA başlama bölgesine

yakın 5' flanking bölgede, 150 nükleotit içinde bulunur. Proksimal element -76. ve -46.nükleotidler arasında, distal element ise -144. ve -108. nükleotidler arasında yerleşmiştir. Bu iki sekansta çok sayıda bulunan GC-baz çifti stabil palindrom benzeri yapı oluşumundan kaynaklanır [96]. Dördüncü ekzon olgun proteinin 112. ve 158. pozisyonunda bulunan ve Apo-E'nin genotipini belirleyen kodonları içerir [97].

*APOE* transkripsiyonu ve kırılması sonucunda 1163 bp uzunluğunda bir *APOE* mRNA meydana gelir. Bu mRNA daha sonra sinyal peptid görevi gören, 18-N terminal amino asit içeren, 317 amino asitlik bir proteinin oluşması amacıyla translasyona uğrar. Metionin ile başlayan 18 amino asitlik bu segment, lizin amino asiti ile başlayan 299 amino asitlik olgun Apo-E'yi oluşturmak üzere, mikrozomal membranda polipeptidden ayrılarak ihtiyaç duyulan dokuya yönlendir [97]. Apo-E yaklaşık 34 kilodalton (kDA) ağırlığında bir lipid transport proteindir [89].

İnsanlarda *APOE* geni polimorfiktir. Apo-E'nin üç ana izoformu bulunur ve bunlar tek bir genin üç alelik formunun ( $\epsilon 2$ ,  $\epsilon 3$ ,  $\epsilon 4$ ) ürünleridir [98]. Bu alellerin farklı kombinasyonları altı farklı genotipin ( $\epsilon 2/\epsilon 2$ ,  $\epsilon 2/\epsilon 3$ ,  $\epsilon 2/\epsilon 4$ ,  $\epsilon 3/\epsilon 3$ ,  $\epsilon 3/\epsilon 4$  ve  $\epsilon 4/\epsilon 4$ ) meydana gelmesine imkân verir. Bunlardan en sık görüleni  $\epsilon 3/\epsilon 3$  genotipidir. Bu üç izoform olgun Apo-E'nin 112. ve 158. pozisyonlarındaki sistein (Cys) ve arjinin (Arg) rezidülerindeki değişimler sonucu meydana gelmektedir [99]. Apo-E protein varyantları Apo-E2 (Cys112, Cys 158), Apo-E3 (Cys 112, Arg 158), Apo-E4 (Arg 112, Arg 158) şeklinde ifade edilir [89] [Şekil 2.11.].

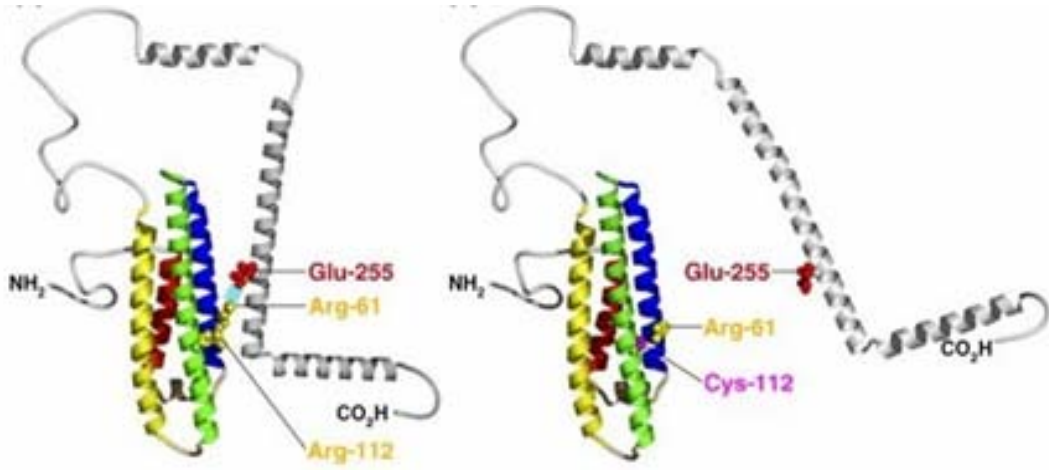


**Şekil 2.11.** Apo-E variantları ve alel bazında farklılıklar.104 numaralı kaynaktan değiştirilerek alınmıştır. [104]

Apo-E iki adet bağımsız yapısal domeynden oluşur. Bunlardan amino-terminal domeyn (1-167. kalıntılar) stabil globüler bir yapıya sahip olup reseptör bağlama fonksiyonuna sahiptir. Karboksi-terminal domeyn (206-299. kalıntılar) ise daha az stabil olup lipoprotein bağlama fonksiyonunu yerine getirmektedir [100]. Populasyon çalışmalarının büyük kısmı en sık görülen üç farklı polimorfik alel ( $\epsilon 2$ ,  $\epsilon 3$ ,  $\epsilon 4$ ) üzerinde durur. Genel olarak yaygın alel  $\epsilon 3$  iken,  $\epsilon 2$  ve  $\epsilon 4$  alelleri populasyonlara göre sıklık sırasında yer değiştirir. İnsan *APOE* geni üç polimorfik aleli -  $\epsilon 2$ ,  $\epsilon 3$  ve  $\epsilon 4$ - dünya genel populasyonunda sırasıyla % 8,4, %77,9 ve % 13,7 frekansa sahiptir [101] [Şekil 2.11.]. Genotip sıklıkları ise en sık görüldenden başlanarak  $\epsilon 3/\epsilon 3$ ,  $\epsilon 3/\epsilon 4$ ,  $\epsilon 2/\epsilon 3$ ,  $\epsilon 4/\epsilon 4$ ,  $\epsilon 2/\epsilon 4$  ve  $\epsilon 2/\epsilon 2$  şeklinde sıralanmakla birlikte farklılıklar göstermektedir [98]. Apo-E3 en sık görülen “wild type” (yabanıl tip, atasal ) olan formdur ve 112. pozisyonda sistein amino asiti, bağlama bölgesinde olan 158. pozisyonda ise arjinin amino asiti bulundurmaktadır [97]. Bu iki pozisyondaki amino asit farklılığı Apo-E izoformlarının yapısını ve lipid, reseptör ve amiloid beta ( $A\beta$ )’ya bağlanma yeteneğini etkiler [102,103]. Apo-E4’de amino asit değişikliği, pozisyon 61’deki arjinin ve pozisyon 255’deki glutamik asit arasındaki bir tuz köprüsünün oluşumuyla meydana gelen yapısal bir değişiklikle sonuçlanmaktadır [103] [Şekil 2.12.]

#### Apo-E4

#### Apo-E3



**Şekil 2.12.** Apo-E4 ve Apo-E3 proteinleri [103].

İnsan ve hayvanlar üzerinde gerçekleştirilen çalışmalar açıkça göstermiştir ki Apo-E izoformları,  $A\beta$  birikim ve ortadan kaldırılmasını farklı şekilde etkilerler. Çeşitli  $A\beta$  –bağımsız fonksiyonlar da Apo-E izoformları ile ilişkilidir [104].

Günümüze kadar, en sık görülen *APOE* varyantları olan  $\epsilon 2$ ,  $\epsilon 3$  ve  $\epsilon 4$  dâhil olmak üzere 60'tan fazla *APOE* varyantı tanımlanmıştır [105]. *APOE*'nin sekans analizleri  $\epsilon 2$  ve  $\epsilon 3$  alellerinin atasal  $\epsilon 4$  alelinden kökenlendiklerini ve  $\epsilon 3$  alel frekansının  $\epsilon 4$ 'e oranla son 200.000 yıl içerisinde arttığını göstermektedir [97]. Son araştırmalar bu değişimin sebebini Apo-E'nin, henüz çok az tanımlanmış olan, immünolojik cevap veya enfeksiyonlardaki modülatör görevlerine bağlamaktadır [106]. Diğer bir sebep ise geninin iki polimorfik bölgesi olan 112. ve 158. kodonların "hot spot" mutasyon bölgeleri olan CpG adacıklarında bulunmasıdır [107].

Çalışmalar sonucunda *APOE* alel frekanslarının populasyonlar arasında oldukça farklı oranlara sahip olduğu ortaya çıkmaktadır. Çin, Japon ve Maya Kızılderilileri diğer ırklara göre daha yüksek  $\epsilon 3$  ve daha düşük  $\epsilon 4$  alel frekansına sahiptirler. Yine  $\epsilon 4$  aleli Güney Avrupa'ya göre Kuzey Avrupa'da daha yüksek bulunmuştur.  $\epsilon 4$  aleli Finlandiya'da % 20 sıklıkta iken Yunanistan'da % 8.5 oranında görülmektedir [99]. Türkiye'de yapılan çalışmalar sonucunda sağlıklı populasyonda *APOE* alel sıklığı  $\epsilon 3 > \epsilon 2 > \epsilon 4$  olarak özetlenebilirse de oranlar yaklaşık olarak sırasıyla % 80.3, % 11.6 ve % 8.1 şeklinde detaylandırılabilir [108].

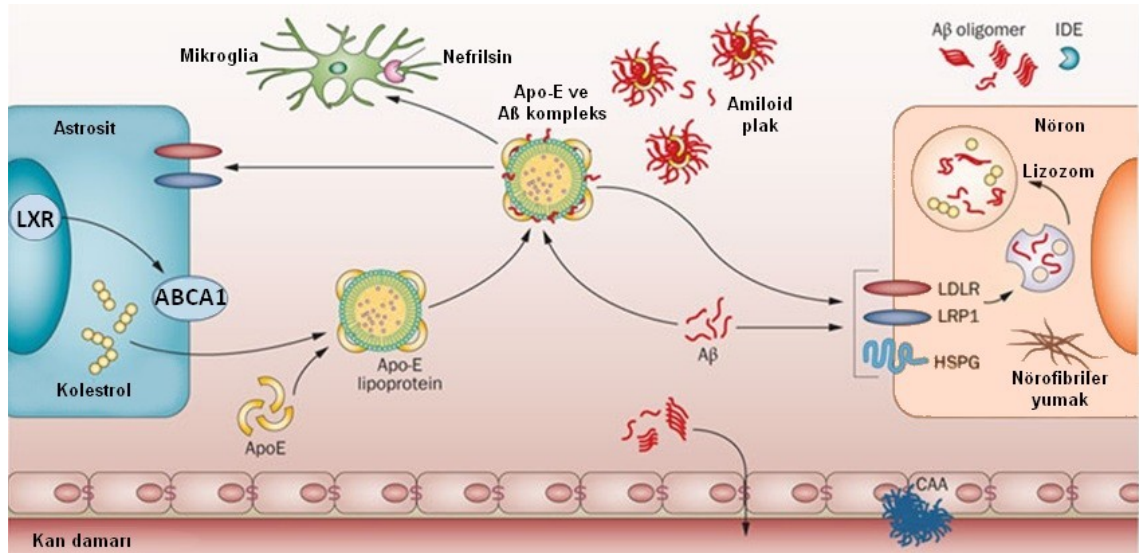
Genom çapında ilişkilendirme çalışmaları *APOE*  $\epsilon 4$  alelinin AH için güçlü bir genetik risk faktörü olduğunu doğrulamıştır [109,110]. Bu alelin varlığı EBAH ve GBAH görülme riski artışı ile ilişkilidir [111,112]. Kliniksel meta-analizler ve otopsi temelli çalışmalar göstermiştir ki AH riski  $\epsilon 4$  alelinin tek kopyasını ( $\epsilon 2/\epsilon 4$ , göreceli olasılıklar oranı (GOO) 2,6);  $\epsilon 3/\epsilon 4$ , GOO 3.2) ya da iki kopyasını ( $\epsilon 4/\epsilon 4$ , GOO 14.9) taşıyan bireyler  $\epsilon 3/\epsilon 3$  genotipini taşıyan bireylere göre kıyaslandığında artmış AH riskine sahiptir. Buna karşılık *APOE*  $\epsilon 2$  aleli AH'a karşı koruyucu etkiye sahiptir: *APOE*  $\epsilon 2/\epsilon 2$  genotipine (GOO 0.6) ya da  $\epsilon 2/\epsilon 3$  (GOO 0.6) genotipine sahip bireylerde AH riski  $\epsilon 3/\epsilon 3$  taşıyanlara göre daha düşüktür [101].

Populasyon temelli çalışmalarda *APOE*  $\epsilon 4$ -AH ilişkisi Afrika kökenli Amerikalılar ( $\epsilon 4/\epsilon 4$ , GOO 5.7) ya da latin kökenli populasyonlarda ( $\epsilon 4/\epsilon 4$ , GOO 2.2) daha zayıf iken beyaz bireylerle karşılaştırıldığında Japon bireylerde ( $\epsilon 4/\epsilon 4$ , GOO 12.5) daha güçlüdür. *APOE*  $\epsilon 4$  aleli artmış AH prevalansı ve başlangıç yaşındaki düşmeyle ilişkilidir [101].  $\epsilon 4$  homozigotlarında AH frekansı % 91 iken

ve ortalama başlangıç yaşı 68'dir,  $\epsilon 4$  heterozigotlarında frekans % 47 iken ortalama başlangıç yaşı 76'dır,  $\epsilon 4$  taşıyıcısı olmayanlarda ise frekans %20 'lere düşerken başlangıç yaşı 84'e çıkmaktadır. Görülmektedir ki *APOE*  $\epsilon 4$  aleli AH gelişim riskini şiddetli şekilde artırırken, başlangıç yaşını ise gende doz bağımlı şekilde erkene çekmektedir [113].

#### 2.14. Alzheimer Hastalığı'nda Apo-E İzofomlarının Mekanizması

Apo-E, beyin tarafından sentezlenen ana lipoproteindir ve beyin omurilik sıvısı (BOS)'da bulunan lipoproteinlerin bir bileşenidir. Beyinde Apo-E sentezini ve salgılanmasını yöneten mekanizmalar henüz tam olarak anlaşılammıştır. Beyinde Apo-E fonksiyonuna ilişkin bazı yollar Şekil 2.13'de verilmiştir. AH için bilinen en önemli risk faktörlerinden biri *APOE*'nin  $\epsilon 4$  izoformunun varlığıdır [104].

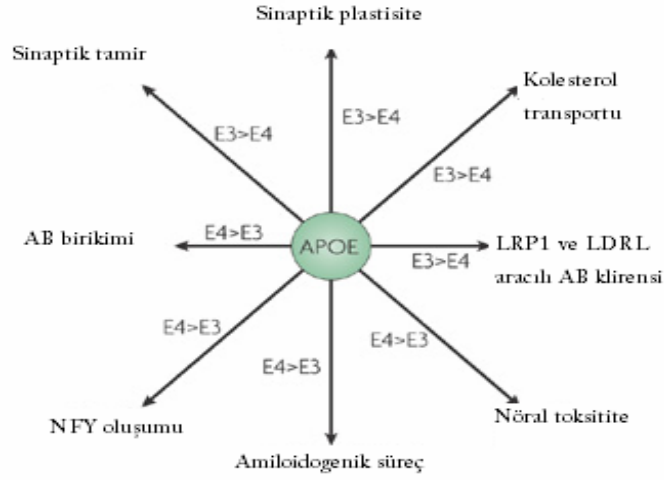


**Şekil 2.13.** Beyinde apolipoprotein-E ve amiloid  $\beta$  metabolizması. [104 numaralı kaynaktan değiştirilerek alınmıştır]

Epidemiyolojik çalışmalar *APOE*  $\epsilon 4$  taşıyıcılarının AH için daha yüksek bir riske sahip olduğunu ve Apo-E4 'ün hastalığın oluşumundan ve gelişiminden sorumlu olduğunu göstermektedir. Ayrıca Apo-E4, hastalığa neden olan bütün biyokimyasal bozukluklar (A $\beta$  depozisyonu, nörofibriller yumakların oluşumu, oksidatif stres, lipid dengesinin bozulması, sinaptik elastikiyet kaybı ve kolinerjik fonksiyon kaybı) ile ilişkili tek moleküldür [114]. Bu veriler Apo-E4'ün toksik fonksiyonların kazanımı ve nörokoruyucu fonksiyonların azalması ya da her iki



mekanizmayı birlikte tetikleyerek AH patogenezinde rol oynadığına dikkat çeker [114] [Şekil 2.14].



**Şekil 2.14.** Apo-E4 ve Apo-E3 proteinlerinin metabolizma düzeyinde etkinlik farklılıkları [114].

### 2.14.1. Amiloid $\beta$ ( $A\beta$ ) Metabolizması, Birikimi ve Apo-E

$A\beta$ 'nin üretimi, oligomerizasyonu ve depolanmasının AH'da önemli rol oynadığı bildirilmiştir.  $A\beta_{1-42}$  üretiminde artış ile sonuçlanan, amiloid prekürsör proteini (*APP*) ve presenilin (*PSEN1*, *PSEN2*) genlerindeki otozomal dominant mutasyonların saptanması,  $A\beta$  metabolizması ve AH arasındaki ilişkiye işaret etmektedir [114].

İnsan ve transgenik hayvanlardaki çalışmalar göstermiştir ki beyindeki  $A\beta$  düzeyleri ve amiloid plak yükleri *APOE*'nin alelik izoformları ile bağlantılıdır ( $\epsilon 4 > \epsilon 3 > \epsilon 2$ ). Apo-E;  $A\beta$  metabolizması, birikim ve depolanma mekanizmalarının değişiminde önemli role sahiptir. İnsan Apo-E izoformlarını eksprese eden genç ve yaşlı amiloid fare modellerinde Apo-E4'ün;  $A\beta$ 'nin ortadan kaldırılmasında Apo-E3'ten daha az etkili olduğu gösterilmiştir [115].

Apo-E;  $A\beta$ 'nin beyinden uzaklaştırılmasını,  $A\beta$ 'yi kan beyin bariyerinden karşıya geçirerek sistemik sirkülasyonla sağlar [116]. Lipoprotein reseptörü (LRP1) ile Apo-E4 lipoproteinlerine bağlı  $A\beta$  arasındaki etkileşim, Apo-E3 lipoproteinlerine bağlı  $A\beta$ 'ye göre daha düşüktür. Başka bir deyişle LRP1 reseptörünün Apo-E4 ile bağlanmış  $A\beta$ 'ye afinitesi düşüktür. Bu bakımdan Apo-E, kan beyin

bariyerinde A $\beta$ 'nin ortadan kaldırılmasına, izoform özgül şekilde engel olur (Apo-E4 < Apo-E3 ve Apo-E2) [117]. Ayrıca, mikroglia hücreleri üzerindeki çalışmalar göstermiştir ki Apo-E3, A $\beta$ 'nin enzim aracılı degradasyonunu Apo-E4'den daha etkili şekilde gerçekleştirir [118]. Tüm çalışmalar Apo-E4'ün A $\beta$  klirensini inhibe ettiğini ve/veya A $\beta$  klirens aracılığını Apo-E3 ve Apo-E2'ye göre daha az etkili şekilde gerçekleştirdiğini göstermiştir [104].

Apo-E'nin A $\beta$  yığılma ve birikimini düzenlediği açıkça görülmektedir. Önemli bir çalışma göstermiştir ki *APOE* gen delesyonuna sahip amiloid fare modelinde fibriler A $\beta$  birikimi önemli derecede ortadan kaldırılmıştır [119]. Apo-E AH'a sahip bireylerde nörotik plaklarda bulunmaktadır ve *APOE*  $\epsilon$ 4 alelini taşıyan Alzheimer hastalarında A $\beta$  seviyeleri yükselmektedir. Apo-E4, A $\beta$  yığılma ve birikimini izoform-bağımlı şekilde başlatır, bununla birlikte mekanizmanın aydınlatılması için sonraki araştırmalara ihtiyaç vardır [104]. Ek olarak  $\gamma$ -sekretaz aktivitesi ve A $\beta$  üretimini değiştirdiği gösterilen Apo-E izoformları, kolesterol seviyelerini de farklı şekilde düzenlerler [120].

#### **2.14.2. Beyin Atrofisi ve Apo-E**

AH, hipokampusun fonksiyonel anormalliği ve hafıza ağında kortikal atrofi ile ilişkilidir. *APOE*  $\epsilon$ 4 taşıyıcısı AH'na sahip bireyler özellikle hipokampal alanda daha büyük medial temporal lob atrofisi gösterir [121].

#### **2.14.3. tau Hiperfosforilasyonu, Nörotoksitite ve Apo-E**

tau proteininin anormal gerçekleşen fosforilasyonu, Alzheimer ve diğer bazı nörodejeneratif hastalıkların genel karakteristiği olan nörofibriler yumakların (NFY) oluşumuna neden olmaktadır [122]. *In vitro* çalışmalar Apo-E izoformlarının tau proteini ile etkileşimlerinin farklı olduğunu göstermiştir. tau proteini Apo-E4 yerine, Apo-E3 ile sabit bir kompleks oluşturmaktadır, tau proteininin anormal fosforilasyonu tau-Apo-E3 etkileşimini inhibe etmektedir. Apo-E3 yalnızca fosforile olmamış tau proteinine bağlanabilir. Bu veriler Apo-E3'ün tau ile ilgili süreçte önemli rol oynadığını ve nöronal iskeletin kararlılığın bozulmasını engelleyebileceğini düşündürmektedir [123].

Apo-E izoformları arasında  $\epsilon$ 4, A $\beta$  için en yüksek, tau proteini için ise en düşük etkileşim aktivitesine sahiptir. Apo-E varlığında nöronlarda, Apo-E'nin nöroprotektif bağlayıcılığından kurtulan tau proteini nörofibriler yumaklar

dönüşecek olan eşleşmiş helikal fragmentleri oluşturmaktadır. Mikrotübül organizasyonunda rol oynayan tau proteininin yokluğu, hücre şekli ve sinaptik bütünlüğün sağlanmasını olumsuz etkileyecektir [124].

Apo-E önemli derecede astrosit ve mikroglialar tarafından üretilir. Nöronal *APOE* ekspresyonu, stres ya da hasara yanıt olarak tetiklenebilir, büyük olasılıkla nöronal tamir ve yeniden modellenmeyi destekler. Stres ve hasarı takiben Apo-E'nin proteolitik yıkımı sonucu oluşan hasarlı Apo-E fragmenti tau hiperfosforilasyonu, hücre iskeletinin bozulması ve mitokondriyal fonksiyon kayıplarını artırır. Apo-E4; A $\beta$  ve diğer olayların tetiklediği nörotoksititeyi şiddetlendirir [125]. Yapılan bir çalışma, *APOE*  $\epsilon$ 4 alleli taşıyıcısı temporal lob epilepsisi hastalarının *APOE*  $\epsilon$ 3 taşıyıcılarına göre, hipereksitabiliteye bağlı hasarlara daha az dirençli ve A $\beta$  toksitesine daha fazla duyarlı olduğunu göstermiştir [126] , bu nedenle Apo-E3'ün nöronal strese karşı Apo-E4'e göre nöroprotektif etkiye sahip olduğu düşünülür. İlginç şekilde *APOE*  $\epsilon$ 4'ün nöronal ekspresyonu eksitotoksik hücre ölümüne neden olurken, astrosit-kökenli Apo-E4'ün eksitotoksik hasarlara karşı nöroprotektif etkiye sahip olduğu gösterilmiştir. Bu sonuç, çeşitli hücrel kaynaklardan kökenlenen Apo-E'nin farklı fizyolojik ve patolojik aktiviteler gösterebileceğini ileri sürer [127].

#### **2.14.4. Lipid Metabolizması ve Apo-E**

Anormal lipid metabolizması, AH patogenezi ile güçlü şekilde bağlantılıdır. Merkezi sinir sisteminde Apo-E, nöronal kökenli yeniden modellenme, sinaptik oluşum ve aksonal büyüme için gerekli bileşen olan; öğrenme, hafıza oluşumu ve nöronal tamir olaylarında rol oynayan kolesterol taşınımında görevlidir [128]. Beyin kolesterol düzeyi AH'larda aynı yaştaki kontrol grupları ile karşılaştırıldığında hipokampal ve kortikal alanlarda büyük oranda azalmıştır [129].  $\epsilon$ 4 aleli taşıyıcılarında yetersiz Apo-E düzeyi ve / veya bozulmuş Apo-E fonksiyonu, anormal merkezi sinir sistemi kolesterol homeostazisine ve nöronal gelişimde anormalliğe neden olur ve AH için risk oluşturur [104].

A $\beta$ , kolesterolün nöronlarda sentezini ve dağılımını düzenlemektedir [130]. Bununla birlikte kolesterolün, A $\beta$  bağımlı nörotoksititeyi azalttığı gösterilmiştir. Bu veriler, kolesterol ve A $\beta$  arasındaki ilişkinin oldukça kompleks olduğunu göstermektedir. Apo-E izoformlarının lipid taşınımı ile ilgili olarak farklı özellikler

gösterdiği göz önüne alındığında, kolesterol ile A $\beta$  ilişkisinin Apo-E genotipi tarafından düzenlenebileceği düşünülmektedir [131].

#### **2.14.5. Sinaptik Plastisite, Omurga Bütünlüğü ve Apo-E**

Sinaptik bozulmalar AH'ın erken patolojik özelliğidir [132]. Artan kanıtlar Apo-E izoformlarının sinaptik plastisite ve tamiri farklı şekilde düzenlediğini göstermektedir. AH ve aynı yaştaki sağlıklı kontrollerde *APOE*  $\epsilon$ 4 gen dozajı ile hipokampustaki dendritik omurga yoğunluğu ile ters ilişkilidir. Apo-E4-transgenik fareler, Apo-E3-transgenik fareler ile karşılaştırıldığında daha düşük dendritik omurga yoğunluk ve uzunluğuna sahiptir. Apo-E3, A $\beta$  oligomerleri tarafından indüklenen sinaptik ağların kaybını engeller. Ayrıca Apo-E izoformları yaşlanma boyunca dendritik omurgayı farklı şekilde düzenler [133]. Yaş bağımlı bu farklılıklar Apo-E izoformlarının nöronal bütünlüğün sağlanmasındaki etkilerine işaret eder ve bu durum ileri yaş *APOE*  $\epsilon$ 4 alel taşıyıcılarında artmış demans riski ile ilişkilidir [104].

1 yaşında olan Apo-E4-transgenik fareler ve Apo-E3-transgenik fareler arasında yapılan karşılaştırmada Apo-E4-transgenik farelerde, sinaptik geçişin azaldığı gözlenmiştir, bu durum Apo-E4'ün gelişimin erken evrelerinde de fonksiyonel kusurlara yol açabildiğini gösterirken, nöronal devrelerin değişimi sonucu yaşamın ileri evrelerinde meydana gelen bilişsel hastalıkları açıklayabilir [133]. Ek olarak Apo-E4, glutamat reseptör fonksiyonu ve sinaptik plastisiteyi bozmasının yanı sıra Apo-E reseptörleri ile trafik ve sinyallenmeyi de etkiler [134].

Sinir sisteminde nöronlar ve glia hücreleri arasındaki etkileşim büyümenin ilerleyişi, rejenerasyon ve sinaptik plastisite için oldukça önemlidir [135]. Bu evrede lipidlerin ApoE-ilişkili yeniden dağılımı temel bir rol oynamaktadır. AH'da neokortekste geniş nöronal kayıp vardır [136]. *APOE*  $\epsilon$ 4 taşıyıcılarında farklı beyin bölgelerindeki nöronal hasarın onarılması yetersiz kalırken,  $\epsilon$ 4 alelini taşımayanlar aynı bölgelerde belirgin rejeneratif değişiklikler göstermiştir [95]. Bununla birlikte tüm bulgular *APOE*  $\epsilon$ 4 alelinin AH riskini etkilemekte aracılık yaptığını göstermektedir; ancak bu kısımda sinaptik fonksiyon üzerine direkt etkilidir [104].

## 2.14.6. Nöroinflamasyon, Nörogenez ve Apo-E

Nöroinflamasyon, AH patogenezinde işaret edilen nöronal hasara neden olur. Apo-E, amiloid plak ve mikroglialar ile birlikte bulunur. Bu durum Apo-E'nin AH'daki doğuştan immün cevaptaki rolüne işaretir. Farelerde Apo-E kusurları A $\beta$ 'ye yanıt olarak artmış inflamasyon ile ilişkilidir, fakat Apo-E izoformları doğuştan immün yanıtı farklı şekilde düzenlerler. Apo-E4 proinflamatuvar ya da indirgenmiş anti-inflamatuvar fonksiyon göstererek AH patolojisini şiddetlendirir. Örneğin Apo-E4-transgenik fareler; Apo-E3-transgenik fareler ile karşılaştırıldığında lipopolisakkaritlere karşı daha fazla inflamasyon yanıtına sahiptir. Ek olarak genç *APOE*  $\epsilon$ 4 taşıyıcıları, ileri yaşamdaki AH riskine bağlı olarak artmış inflamasyon yanıtı gösterirler. Bu durumla uyumlu olarak steroid olmayan anti-inflamatuvar ilaçların yalnızca *APOE*  $\epsilon$ 4 taşıyıcılarında riski azalttığı gösterilmiştir, *APOE* genotipi AH için anti-inflamatuvar uygulamaların etkisini belirleyebilir [104].

Hipokampal nöron yenilenmesi, beyin ağlarının sürdürülmesinde ve yapısal plastisitede önemli role sahiptir. İşlevsiz nöron oluşumu, hastalığın erken belirtilerine neden olabilir, dahası AH için nöronal hassasiyeti artırır ve hafızada bozulmalara neden olur. Apo-E, yetişkin hipokampusunda nöral kök ve progenitör hücre havuzunun sürdürülmesi için gereklidir [104].

*APOE* 'nin eksprese olduğu organ sistemleri özellikle sindirim, endokrin, sinir, üreme sistemleri ve kısmen immün, üriner ve görme ilişkili sistemlerdir. Geçen zaman içerisinde Apo-E reseptörlerinin (LDL-reseptör bağımlı protein) fonksiyonel olarak farklı sinyal reseptörü görevleri olduğu, bu etkilerini sadece vasküler sistemde değil, beraberinde sinir sisteminde ve gelişim sırasında da gösterdikleri ortaya konmuştur. Apo-E'nin izoform bağlantılı post-sinaptik sinyal etkisi bulunmaktadır [137].

## 2.15. Apo-E: İlişkili Olduğu Diğer Hastalıklar

### 2.15.1. Tip III Hiperlipoproteinemi (Ailesel Disbeta Lipoproteinemi)

Çeşitli *APOE* varyantları hiperlipoproteinemi tip III (ailesel disbetallipoproteinemi) olarak bilinen hastalıkla ilişkilidir. Hiperlipoproteinemi tip III erkeklerde genellikle üçüncü dekadadan sonra, kadınlarda ise menopozdan sonra olmaktadır. Hastaların büyük çoğunluğunda, *APOE*  $\epsilon$ 2 aleli homozigot olarak

bulunmaktadır, daha ağır vakalarda ise *APOE*'nin heterozigot nadir varyantları tespit edilmiştir. Hastalığın oluşumunda başka genlerin ve çevresel faktörlerin de etkili olduğu bilinmektedir [138].

### **2.15.2. İnme ve Beyin Hasarı Sonrası İyileşme, İnflamasyon**

Beyin hasarlarının ve hasar sonrası iyileşmenin karmaşık multifaktöriyel ve poligenik etkilerle oluştuğu düşünülmektedir. Bu durumu destekleyici şekilde nörotravma ve nörodejeneratif hastalıklarda bazı yatkınlık genleri tespit edilmiş olup, bunlar arasında *APOE* geni de bulunmaktadır. Apo-E proteini yaralanmadan sonra nöronal büyümede, kolesterolün yeniden dağılımı ve mobilizasyonunda görevlidir [139]. *APOE*  $\epsilon$ 4 alelinin; *APOE*  $\epsilon$ 2 ve *APOE*  $\epsilon$ 3 ile karşılaştırıldığında, travmatik beyin hasarını takiben karşılaşılan kötü sonuçlarla ilişkili olduğunu gösteren kanıtlar artmaktadır [140].

Meta analizler, travmatik beyin hasarı (TBH) sonrası sonuçların *APOE*  $\epsilon$ 4 taşıyıcılarında, taşıyıcı olmayanlara göre kötü gidişata yatkın olduğunu göstermiştir [141]. TBH, Alzheimer riskinin artışı ile bağlantılıdır [142] ve bu risk *APOE*  $\epsilon$ 4 taşıyıcılığı ile ilişki içerisindedir [143]. TBH gösteren bireylerinde *APOE*  $\epsilon$ 4 taşıyıcısı olmayan bireylerin yalnızca % 10'unda A $\beta$  patolojisine rastlanırken, bir ya da iki  $\epsilon$ 4 aleline sahip TBH bireylerinde oranlar sırasıyla % 35 ve %100'dür [144]. Bu olumsuz sonuçlar Apo-E4'ün Apo-E3 ile karşılaştırıldığında sinapsların tamiri ve yeniden modellenmesinde nöronların hasara karşı korunmasında indirgenmiş yeteneğe sahip olması ile ilişkili olabilir [145].

Apo-E proteininin glial aktivasyonu ve santral sinir sisteminin inflamatuvar cevabını azalttığı tespit edilmiştir. Bu etki izoforma özgüdür ve Apo-E4 izoformu, inflamatuvar sitokinleri azaltmada daha az etkili olarak bulunmuştur [146].

### **2.15.3. Kardiyovasküler Hastalıklar**

Kardiyovasküler hastalık (KVH) ve özellikle aterosklerotik bozukluklar dünya çapında hastalık, sakatlık ve ölüme yol açan ana sebeplerdir. Global olarak ölümlerin % 29'unun KVH'lara bağlanabileceği ve bu sayıların gelişmiş ülkelerdeki yaşlı popülasyonun artışı ile birlikte daha da artacağı belirtilmektedir. Her ne kadar yüksek kolesterol, hipertansiyon ve başka vasküler hastalıklar da

yaşlanmada etkili olsa da, ABD'de 65 yaş üzeri ölümlerin % 40'ının sebebinin KVH olduğunu bilinmektedir [147].

Sirkülasyondaki kolesterol seviyesinin düzenlenmesi büyük ölçüde Apo-E ile LDL reseptörleri arasındaki özel ilişkiye bağlıdır [148]. Normal olmayan bağlama afinitesi sebebi ile  $\epsilon 4$  taşıyıcıları kanda oluşturulan VLDL ve şilomikronu karaciğere uzaklaştırmada daha verimsizdir. Böyle kişilerde düşük plazma kolesterol seviyesi, karaciğer LDL-reseptörlerinde upregülasyon ve sirkülasyondaki trigliserid seviyelerinde artış görülür bu duruma ek olarak  $\epsilon 2$  alel taşıyıcıları diyet lipidlerinin kandan eliminasyonunda  $\epsilon 3$  ve  $\epsilon 4$  taşıyıcılarına kıyasla daha etkindirler [149].

Apo-E'nin lipid seviyeleri üzerine etkisi çoğunlukla koroner arter hastalığı (KAH) riski üzerine etkili olmaktadır. *APOE*  $\epsilon 4$  varyantına sahip olan bireyler daha yüksek KAH riski taşımaktadır [149]. Kolesterol seviyelerinin değişikliğinde *APOE* genotipleri önemli rol oynamaktadır ve günümüzde ateroskleroz gelişiminde etkili olduğu ortaya konmuş en önemli faktördür [150].

Farklı populasyonlarla yapılan alel frekansı çalışmalarının çoğu ile Tip III Hiperlipoproteinemide altta yatan sebebin *APOE* polimorfizmi olduğu bulunana kadar, hastalığın temeli lipid ve kolesterol seviyeleri ölçümleriyle ilişkilendirilmiştir. Hipertrigliseridemi hastalarında  $\epsilon 2$  alelinin daha anlamlı olduğu ve  $\epsilon 4$  alelinin de hiperkolesterolemili hastalarda daha sık görüldüğünü ifade edilmiştir [150]. Hem hiperkolesterolemi hem de hipertrigliseridemi KVH patogenezinin önemli etkileri olan yaygın risk faktörleridir. *APOE* genotipinin hem lipid seviyesi hem de KVH riski ile ilişkisi yapılan kapsamlı çalışmalarla önemli ölçüde ortaya konmuştur [147].

*APOE* polimorfizmleri KVH'larda lipoprotein klirensi ve lipid metabolizması ile ilişkilendirilmişken,  $\epsilon 4$  alel taşıyıcılarının daha yüksek açlık kan glikozu düzeyine olduğu ve zaman içinde daha hızlı glukoz seviye değişikliklerine yatkın oldukları gözlenmiştir. Yapılan bir çalışmada daha yüksek glukoz seviyelerinin daha fazla Apo-E glikozilasyonuna sebep olacağı öngörülmüştür [151]. Bunun önemi ileri glikozilasyon son ürünlerinin diyabet, diyabet kaynaklı ateroskleroz, nefropati, retinopati, Alzheimer Hastalığı ve başka nörodejeneratif bozukluklar gibi yaşa bağlı hastalıklarda rol oynamasıdır [152].

Vasküler bilişsel bozukluk, vasküler demans kapsayan, serebrovasküler kökenli bilişsel hasarlarla oluşan klinik koşulları tanımlar, batıda klinik temelli yaşlı bireylerin yaklaşık % 8-15'inde bilişsel bozulma görülmektedir. Son meta-analizler *APOE* ε4 taşıyıcısı bireylerin, *APOE* ε3 (GOO 1.72) taşıyıcısı bireylerle karşılaştırıldığında artmış vasküler demans riski ile karşı karşıya olduklarını göstermiştir.

Çeşitli çalışmalar hipertansiyon, dislipidemi ve aterogenez gibi başka vasküler risk faktörlerinden bağımsız olarak *APOE* ε4 alelinin vasküler bilişsel bozukluk riskine katkı sağladığını gösterirken, başka bir çalışma bilişsel zayıflamanın *APOE* ε4 taşıyıcılarında artmış kan basıncından dolayı oluşan beyin hasarı tarafından indüklendiğini göstermiştir. Bu sonuçlar gösterir ki *APOE* ε4 nörovasküler bozulma ile yakın ilişkilidir [104].

#### **2.15.4. Diğer Nörodejeneratif Hastalıklar ve Apo-E**

Lewy Cisimciği Hastalığı, ikinci en sık görülen demans olarak kabul edilir ve Parkinson Hastalığı (PH), Parkinson İlişkili Demans ve Lewy Cisimcikli Demans (LCD) gibi geniş bir spektrumdan oluşur. PH ve AH'ın klinik özellikleri genellikle çakışır. Bununla birlikte çoğu çalışma *APOE* ε4 ve PH ya da PH ilişkili demans arasında ilişki bulamamıştır. LCD'da, AH ve PH ile benzer klinik ve patolojik karakterlere sahiptir, çeşitli çalışmalar *APOE* ε4'ün LCD riskini artırdığını göstermiştir. İmmünohistokimyasal analizler LCD hastalarında Lewy cisimciği birikiminin *APOE* ε4 taşıyıcısı bireylerde diğerlerine göre daha fazla miktarda olduğunu göstermiştir. Lewy cisimciği birikimi LCD hastalarının serebral korteksinde Aβ birikimi ile uyumlu olarak artış gösterir; amiloid patolojisi ve LCD patolojisi arasındaki bu güçlü ilişki *APOE* ε4 alelinin LCD için neden risk artışına neden olduğunu açıklayabilir. *APOE* ε4 alelinin frontotemporal demans için risk faktörü olabileceği düşünülmektedir; ancak Apo-E'nin bu hastalıkta patofizyolojik rolü için ileri araştırmalara ihtiyaç vardır [104]. *APOE* genotiplerinin Hungtinton Hastalığı [153] ve Amfiyotrik Lateral Skleroz riskleri ile ilişkisi bulunamamıştır [154].

#### **2.16. *APOE* Genotipi ve Aβ İmmunterapisi**

Aβ N-terminalini hedefleyen "Bapineuzumab" adlı ilaç için gerçekleştirilen immünoterapi faz III denemelerinden elde edilen sonuçlara göre, hafif ve orta



şiddetli AH'a sahip *APOE*  $\epsilon$ 4 taşıyıcısı bireylerin beyinlerinde bu ilaç depolanmayı engellemektedir; fakat taşıyıcı olmayanlarda bu durum gözlenmemektedir [155].

Bu sonuçlar Alzheimer hastalığına sahip bireylerin beyinlerinden, A $\beta$  eliminasyonu için, A $\beta$  immünoterapisinin gerekli olduğunun düşünülmesine neden olur; ancak bu etki muhtemelen Apo-E izoformlarına bağımlıdır. Bapineuzumab ciddi yan etkilere sahiptir ve bu etkiler, *APOE*  $\epsilon$ 4 taşıyıcılarında taşıyıcı olmayanlara göre daha sık görülür. Bapineuzumab'ın bilişsel ve fonksiyonel azalmayı engellemede klinik denemelerde görülen başarısızlığına rağmen, immünoterapi ve *APOE* hedefli yaklaşımların kombinasyonlarının daha efektif tedavi edici stratejilere yol açacağı bilinmektedir [155].

### **2.16.1. $\epsilon$ 4 Taşıyıcılarında Bilişsel Zayıflamanın Engellenmesi**

Prospektif çalışmalar, çok sayıda düşünsel açıdan normal olan *APOE*  $\epsilon$ 4 taşıyıcısı bireyde demans riskinin yüksek eğitim, boş zaman aktivitelerinin çokluğu ve vasküler hastalıkların olmaması gibi parametrelerle ters ilişki içerisinde olduğuna işaret etmiştir. Çalışmalar göstermiştir ki fiziksel aktivite, düşünsel açıdan normal *APOE*  $\epsilon$ 4 taşıyıcılarında Pittsburgsh Bileşiği-B (PİB)-pozitifliğini azaltmıştır, sedanter yaşam tarzı *APOE*  $\epsilon$ 4 taşıyıcılarında amiloid depolanma riskini artırır. Yüksek eğitim, aktif boş zaman faaliyetleri, egzersiz ve vasküler sağlığın sürdürülmesi özellikle *APOE*  $\epsilon$ 4 taşıyıcılarında AH riski ve bilişsel zayıflamanın azaltılmasında yarar sağlar [156].

### **2.16.2. Apo-E-A $\beta$ İlişkisinin Blokasyonu**

Apo-E, amiloid fare modellerinde A $\beta$  fibrillerin birikimi için gereklidir. Son çalışmalar insan *APOE* geninde haployetersizliğin *APOE* izoform durumlarına bağlı olmaksızın amiloid fare modelinde amiloid plak birikiminin önemli derecede azalttığını göstermektedir. Böylece Apo-E ve A $\beta$  arasındaki ilişkinin bozulması ile A $\beta$  yığılma ve birikiminin azaltılması bir tedavi yaklaşımı olarak düşünülebilir. A $\beta$ , Apo-E ile 12-28. amino asit kalıntıları aracılığıyla etkileşime geçer. Bu diziyi taklit eden sentetik peptid A $\beta$ 12-28P, fare amiloid modellerinde A $\beta$  birikimini azaltır ve bellek kusurlarını düzeltir. Apo-E-A $\beta$ - etkileşiminin A $\beta$  - taklit edici peptitler kullanılarak engellenmesi AH tedavisi için efektif bir yaklaşımdır [157].

Apo-E–A $\beta$  etkileşimini bozacak Apo-E özgül antikorlar ya da bileşikler belirlemek için tarama çalışmalarına ihtiyaç duyulmaktadır. Bu yaklaşımlar dikkatle değerlendirilmelidir; çünkü bu tür yaklaşımlar Apo-E'nin lipid etkileşimini ve ilişkili yararlı fonksiyonlarını bozabilir [104].

### **2.16.3. Diğer Apo-E Temelli Terapötik Yaklaşımlar**

Apo-E4, yapısal olarak Apo-E2 ve Apo-E3'ten farklıdır ve farklı domeyn etkileşimlerine sahiptir, bu farklılık muhtemelen Apo-E4'nin izoform özgül zarar verici etkisine neden olur. Apo-E4 yapısının modifikasyonu ile Apo-E3 benzeri bir molekül oluşturulması zararlı etkilerin iyileştirilmesi için ilginç bir yaklaşımdır. Gerçekte Apo-E4'e bağlanan N-ucu ve C-ucu arasındaki domeyn etkileşimini bozan çeşitli moleküller bulunmuştur. GIND-25 (disulfonat) ve GIND-105 (monosülfoalkil) bu bağlanma için uygun adaylardır, çünkü onlar A $\beta$  üretimini Apo-E3 tarafından indüklenene benzer şekilde Apo-E4 tarafından indükleyerek düşürürler [158]. CB9032258 (fitalazine analogu) Apo-E4 domeyn ilişkisini bozar. Apo-E4'ün fonksiyonel aktivitelerini yeniden düzenler. Apo-E taklit edici peptidinin içerdiği reseptör bağlanma bölgesi nöronal hücre ölümünü ve in vitro NMDA maruziyeti ile ilişkili içeri kalsiyum akışını baskılar. Reseptör bağlanma bölgesi içeren COG112 kimerik peptidinin, multiple skleroz ve siyatik sinir paralizisi fare modellerinde inflamatuvar cevapların düzenlenmesi yoluyla semptomları iyileştirdiği rapor edilmiştir. A $\beta$ –etki ya da lipid bağlanma bölgesi içermediğinden, bu peptidlerin AH patogenezindeki etkileri bilinmemektedir [159].

Apo-E reseptörleri de AH terapisi için potansiyel hedeflerdir. AH'da bu Apo-E reseptörlerinin ekspresyonlarının düzenlenmesi lipid homeostazisini ve sinaptik plastisiteyi yeniden düzenler, A $\beta$  klirensini artırır [160].

Apo-E temelli tedavilerin geliştirilmesinde henüz erken aşamalarda olunmasına rağmen, AH'a karşı savaşta önemli gelişmeler vardır. Sonuç olarak, AH için koruyucu ya da tedavi edici uygulamalar için Apo-E temelli stratejilerin tedavi edici potansiyellerinin sonraki klinik denemelerle aydınlatılması gerekmektedir [104].

### 3. MATERYAL VE METOT

#### 3.1. Kan Örneklerinin Toplanması

Araştırmaya dâhil edilen hasta grubu kanları, Gülhane Askeri Tıp Akademisi Nöroloji Ana Bilim Dalı Kliniği'ne başvuran ve yapılan muayene sonucunda DSM-IV kriterlerine göre olası Alzheimer tanısı konulan 30 bireyden, kontrol grubu kanları ise aynı polikliniğe başvuran; ancak Alzheimer hastalığı ve başka bir nedene bağlı demans öyküsü bulunmayan 40 bireyden gönüllülük esasına bağlı kalınarak etik kurallar çerçevesinde toplanmıştır. Kontrol grubunda yer alan bireyler hasta grubu ile aynı yaş aralığında seçilmiştir. Hasta ve kontrol gruplarını oluşturan bireylerin demografik özellikleri Tablo 3.1.'de verilmiştir.

**Tablo 3.1.** Kontrol ve hasta gruplarının demografik özellikleri

	<b>Kontrol Grubu (n=40)</b>	<b>Hasta Grubu (n= 30)</b>
<b>Yaş (Ortalama)</b>	60.68	69.3
<b>Cinsiyet</b>	32E/8K	13E/17K
<b>Ailede Demans Öyküsü</b>	0	6

Hasta ve kontrol gruplarına ait kan örnekleri DNA izolasyonu gerçekleştirilmek üzere etilendiamintetraasetik asit (EDTA) içeren tüplerde +4 °C'de saklanmıştır.

#### 3.2. Kandan Genomik DNA İzolasyonu

##### 3.2.1. Fenol-Kloroform Ekstraksiyonu

Fenol-kloroform ekstraksiyonu sıvı-sıvı ekstraksiyonudur. Sıvı-sıvı ekstraksiyonu molekül karışımlarının iki farklı karışmaz sıvı içerisinde moleküllerin çözünürlük farklılıkları temelinde ayrılmasıdır [161]. Bu yöntem RNA, DNA ve proteinlerin ayırımında yaygın olarak kullanılmaktadır [162].

Saf fenol  $1.07 \text{ g/cm}^3$  yoğunluğa sahiptir; bu nedenle su ( $1.00 \text{ g/cm}^3$ ) ile karıştırıldığında alt fazda yer alır [163]. Fenolün pH'sı DNA ve RNA'nın sulu ve organik faz arasında dağılıma özelliğini belirler. Nötral ve hafif alkali pH'da (pH 7-8), nükleik asitlerdeki fosfat diesterleri negatif yüklüdür, böylece DNA ve RNA sulu faza dağılır [164].

Kloroform, sıvılar arasında faz ayırımını sağlar; çünkü kloroform fenolle kolayca karışabilir ve fenolden yüksek yoğunluğa ( $1.47 \text{ g/cm}^3$ ) sahiptir [163]. Böylece

organik ve sulu fazın ayrımı için itici bir güç oluşturur ve sulu fazın organik fazdan minimal karşı kontaminasyon ile uzaklaştırılmasını sağlar [162].

Kandan genomik DNA izolasyonu için, Sambrook ve arkadaşları [165] tarafından geliştirilen fenol-kloroform yönteminin modifiye edilmiş şekli kullanılmıştır. Yöntem aşağıdaki basamakları içermektedir.

1. 1.5 ml'lik steril ependorf tübüne EDTA'lı tüplerde bulunan yaklaşık 5 ml kan örneğinden 250 µl alınmıştır.
2. Tüpler içerisindeki 250 µl kan örnekleri 1XTE (10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH=7.4) tamponu ilave edilerek 1.5 ml'ye tamamlanmıştır.
3. Örnekler iyice karıştırılarak 13.000 rpm'de 2 dakika santrifüje edilmiştir. Süpernatant uzaklaştırarak 2. basamak iki kez tekrarlanmıştır.
4. Son yıkama basamağından sonra peletin üzerine 90 µl 1M sodyum klorür (NaCl), 80 µl % 10'luk sodyum dodesilsülfat (SDS) ve 10 µl 10 mg/ml proteinaz K ilave edilmiş son hacim 1XTE ile 500 µl'ye tamamlanmıştır.
5. Örnekler 37 °C'de gece boyu inkübasyona bırakılmıştır.
6. İnkübasyon sonrası tüplere 250 µl fenol ve 250 µl kloroform eklenmiştir.
7. Tüpler iyice karıştırılarak 2500 rpm'de 4 dakika santrifüje edilmiştir.
8. Santrifüj sonrası süpernatantlar temiz tüplere aktarılmış ve saf alkol ile 1,5 ml'ye tamamlanmıştır. Tüpler hafifçe alt-üst edilerek DNA'nın görünür hale gelmesi sağlanmıştır. Presipitasyonun fazlalaşması için tüpler -20°C'de 10 dakika bekletilmiştir.
9. Örnekler 13.000 rpm'de 2 dakika santrifüje edilerek, saf alkol uzaklaştırılmış; pelet üzerine % 70'lik etanol ilave edilerek 1,5 ml'ye tamamlanmıştır.
10. Örnekler 13.000 rpm'de 2 dakika santrifüje edilmiştir. % 70'lik alkol ile yıkama tamamlandıktan sonra alkolün tamamen uçması için tüpler oda sıcaklığında bir süre bekletilmiştir.
11. Elde edilen pelet, çözünme oranına bağlı olarak 50-150 µl steril distile su içerisinde çözülmüştür.
12. İzole edilen genomik DNA'lar -20 °C 'de saklanmıştır.

### 3.2.2. İzole Edilen Genomik DNA'ların Agaroz Jel Elektroforezi İle Kontrolü

Hasta ve kontrol gruplarının kanlarından izole edilen genomik DNA örnekleri % 1'lik agaroz jelde kontrol edilmiştir.

Agaroz jel elektroforezi, büyüklükleri 100 bp ve 25 kb arasında değişen DNA fragmentlerinin ayrılmasında en etkili yoldur. Agaroz, *Gelidium* ve *Gracilaria* cinsi deniz yosunlarından izole edilmiştir ve 'L ve D-galaktoz' subunitleri tekrarlarından oluşur. Jelleşme sırasında, agaroz non-kovalent şekilde polimerleşir ve jelin moleküler eleme özelliğini belirleyen dallanma ağlarını oluşturur. Agaroz jelin kullanımı DNA ayırımı için devrim niteliğinde olmuştur. Agaroz jel kullanımına geçişten önce, DNA esas olarak yalnızca molekül büyüklüğüne göre ayırım yapabilen sükröz–yoğunluk gradient santrifigasyonu ile ayrıştırılıyordu. DNA'nın agaroz jel elektroforezi ile ayırımı için DNA, önceden jel içerisindeki kuyucuklara yüklenir ve akım uygulanır. DNA (ve RNA)'nın fosfat omurgası negatif yüklüdür; bu nedenle elektriksel alan oluşturulduğunda pozitif yüklü anoda hareket ederler. DNA, homojen kütle/yük oranına sahip olması nedeniyle agaroz jelde büyüklüklerine göre ayrılır ve moleküler ağırlığının logaritması ile ters orantılı olarak göç eder. DNA molekülünün jel boyunca göç oranı; 1) DNA molekülünün büyüklüğüne, 2) Agaroz konsantrasyonuna, 3) DNA konformasyonuna 4) Uygulanan voltaja 5) Etidyum bromür (EtBr) varlığına 6) Agaroz ve elektforez tamponunun özelliğine bağlıdır. Ayırım sonrası DNA molekülleri UV ışığı altında görüntülenebilir [166].

Agaroz 0.5X TBE tamponu (Tris-Borat-EDTA) içerisinde kaynatılarak çözülmüştür, soğutma işlemini takiben 18 µl EtBr (interkalasyon ajanı) eklenerek, elde edilen karışım, tarakları yerleştirilerek hazırlanan yatay elektforez sistemine dökülmüştür. Jelin polimerizasyonu tamamlandıktan sonra içinde 0.5X TBE yürütme tamponu bulunan elektforez tankına yerleştirilmiştir. 2 µl DNA örneği, 2 µl 6X yükleme çözeltisi ile karıştırılarak, hazırlanan jele yüklenmiş ve 80 volt (V) sabit voltaj verilerek 30 dakika süreyle yürütülmüştür. Jel, 300 nm dalga boyuna ayarlı UV transillüminatörde incelenmiştir.

### **5X TBE tamponu (pH= 8.3,1L) Hazırlanması**

54 g Tris-Baz (M<sub>a</sub>: 121.14,Sigma®)

27.5 g Borik asit (M<sub>a</sub>: 61.83,Sigma® )

20 ml 0.5 M EDTA ( M<sub>a</sub>: 372.24,Sigma®)

### **6X Yükleme Tamponu İçeriği**

% 40 (w/v) sükröz çözeltisi

% 0.25 brom fenol mavisi

% 60 10X TBE tamponu

### **3.3. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)**

1985 yılında K.Mullis ve arkadaşları tarafından 'Polimeraz Zincir Reaksiyonu' (PZR)'nun keşfedilmesiyle moleküler biyoloji ve moleküler tıp alanlarında büyük bir ilerleme olmuştur. Polimeraz zincir reaksiyonu, özgül bir DNA parçasının kopyalarının primerler tarafından yönlendirilerek, enzimatik olarak sentezlenmesi şeklinde tanımlanan in vitro bir yöntemdir. PZR ile insan genomik DNA'sı gibi kompleks DNA kalıplarından özgül DNA parçalarının sentezinin birkaç saat içinde gerçekleştirilebilir hale gelmesi, bu teknolojinin yaygınlaşmasında başlıca neden olmuştur. Günümüzde bu teknolojiyi, alelik dizi varyasyonlarının tespit edilebilmesi ile doku transplantasyonu için doku tipinin belirlenmesi, adli tıp örneklerinin genetik tiplendirmesi (analık-babalık tayini) gibi tıbbın diğer kollarında, tarımda (tohum saflığının belirlenmesi), sistematik ve evölüsyon çalışmaları gibi birçok alanda (doğadaki çeşitli canlı türlerinin tanısı, türler arası polimorfizmin belirlenmesi) kullanmak olası hale gelmiştir.

Polimeraz zincir reaksiyonu, çift zincirli bir DNA molekülündeki hedef dizilere iki oligonükleotid primerin bağlanması ve uzaması esasına dayanır. Primerler, kalıp DNA molekülü denatüre edildikten sonra, tek iplikli DNA molekülleri üzerinde kendilerine tamamlayıcı olan bölgelere hibridize olurlar. Primerlerin özgül olarak dizilere bağlanması düşük sıcaklık derecelerinde gerçekleşir. DNA polimeraz enzimi, uygun tampon ve dört çeşit deoksiribonükleotit trifosfat (dNTP) varlığında primerin 3' hidroksil ucundan uzamasını sağlar. Böylece kalıp DNA ipliğine tamamlayıcı olan yeni DNA molekülü sentezlenmiş olur. Bir PCR döngüsü; denatürasyon, primerin bağlanması (annealing) ve uzama (extension) olarak adlandırılan üç aşamadan oluşur. Artarda tekrarlanan bu evrelerle DNA parçaları üssel olarak artış gösterir. Bu üssel artışın nedeni, bir döngü sonucu

sentezlenen ürünün ardışık döngüde diğer primerler için kalıp görevi yapmasıdır. PZR boyunca biriken ürünlerin boyu iki primerin boyu ve hedef DNA bölgeleri arasındaki mesafelerin toplamı kadardır.

Matematiksel olarak amplifikasyon  $2^n$  formülü ile ifade edilir. “n” döngü sayısı olarak belirtilir ve potansiyel olarak her döngünün % 100 verimle gerçekleştiği varsayılırsa; örneğin 20 döngü sonucunda  $2^{20}$  kat ürün meydana gelir.

PZR'ın temel bileşenleri olan kalıp DNA molekülü, DNA polimeraz enzimi, primerler, dNTP karışımı, tampon ve  $MgCl_2$  aynı zamanda PZR verimini de etkileyen önemli parametrelerdir [167].

### 3.3.1. *PSEN1* Geni 3-12. Ekzonlarının PZR ile Çoğaltılması

Çalışma kapsamında *PSEN1* geni 3-12. ekzon bölgelerinin çoğaltımı için uygun primer çiftleri sentez ettirilmiştir [Tablo 3.2.].

**Tablo 3.2.** *PSEN1* geni 3-12. ekzon bölgelerinin çoğaltımı için kullanılan primer çiftleri

Primerler	5'-3' dizisi	Ürün boyutu
PSENI-3F PSENI-3R	5'-TCTGCTTAATGTAATCTATGAAAGTG-3' 5'-AGATGATAAGTGAATCCAGTCTGG-3'	277 bp
PSENI-4F PSENI-4R	5'-CCAGGTCTAACCGTTACCTTGAT-3' 5'-GCCTTCAAGGTGATGATGACATG-3'	399 bp
PSENI-5F PSENI-5R	5'-TCTGTGTTGGAGGTGGTAATGTG-3' 5'-CTAGATCAGTTAAGTTACTGTGAC-3'	303 bp
PSENI-6F PSENI-6R	5'-AAGTGAGACCCTGTCTCAAAAAAG-3' 5'-CTTCAGAGTAATTCATCAACAAAGTA-3'	262 bp
PSENI-7F PSENI-7R	5'-GAGCCATCACATTATTCTAAATAATG-3' 5'-AAAGAAAACACTCCAGTGGGGCA-3'	359 bp
PSENI-8F PSENI-8R	5'-TACCACCCATTTACAAGTTTAGCC-3' 5'-TTACATGTGCTTCAGTTCCGATAAA-3'	233 bp
PSENI-9F PSENI-9R	5'-AAGACTGGCGATTTGTGTGGAGA-3' 5'-AGTCTATGACCAAAGAAAGACGATA-3'	282 bp
PSENI-10F PSENI-10R	5'-CTGTTTCCATGTAATTTCTTAAAGG-3' 5'-AATTAGACTGTAACACTCTCAATTCA-3'	352 bp
PSENI-11F PSENI-11R	5'-ATTCATTGTGGGGTTGAGTAGGG-3' 5'-ACAGAACTGCCTTAAAGGGACTG-3'	297 bp
PSENI-12F PSENI-12R	5'-ATGTTAAAAACCAAGACTTGTGATTG-3' 5'-CCGGGAATCTTGACTTTGTTAGAT-3'	356 bp

*PSEN1* geni belirtilen ekzon bölgelerinin çoğaltımı için gerekli koşulları sağlayan PZR karışımı aşağıda belirtildiği şekilde hazırlanmıştır [Tablo 3.3.].

**Tablo 3.3.** *PSEN1* geni 3-12. ekzon bölgelerinin çoğaltımını gerçekleştirmek üzere belirlenen reaksiyon bileşen miktarları

Reaksiyon Bileşenleri	1X25µL
Kalıp DNA	2 µl
10X Standart PZR Tamponu (Dr.Zeydanlı) (15 mM MgCl <sub>2</sub> içerir)	2.5 µl
2,5 mM dNTP karışımı	1.0 µl
İleri primer (F) (10 pmol/ µl)	1.0 µl
Geri primer (R) (10 pmol/ µl)	1.0 µl
Taq DNA polimeraz (Dr.Zeydanlı) (10 Ünite (U) / µl)	0.2 µl
Steril distile H <sub>2</sub> O	17.3 µl
<b>Toplam Hacim</b>	<b>25 µl</b>

PZR aşağıda belirtilen koşulda yapılmıştır.

94 °C 2'      1 döngü  
94°C 30 "      }  
\*64 °C 30"      } 30 döngü  
72 °C 30"      }  
72 °C 5'      1 döngü

\* 7. ve 10. ekzon bölgelerinin çoğaltımı için primer bağlanma sıcaklığı 58 °C olarak optimize edilmiş ve reaksiyona 0.1 µl dimetilsülfoksit (DMSO) eklenmiştir.

### 3.3.2. *PSEN1* Geni 3-12. Ekzon Bölgeleri PZR Ürünlerinin Agaroz Jel Elektroforezi ile Kontrolü

Reaksiyonlar sonucunda elde edilen *PSEN1* geni 3-12 ekzonlarına ait PZR ürünleri % 1.5 'luk agaroz jelde kontrol edilmiştir. 8 µl PZR ürünü, 2 µl yükleme boyası ile karıştırılarak hazırlanan örnekler, etidyum bromür içeren jelle



yüklenmiş, 85 V sabit voltaj verilerek 30 dakika yürütülmüştür. Jel 300 nm dalga boyuna ayarlı UV transillüminatörde incelenmiştir.

### 3.3.3. PZR Ürününün Temizlenmesi

DNA dizi analizi gerçekleştirilecek amplifikasyon ürünlerinin temizlenmesi Ekzonükleaz I USB®/Shrimp Alkalen Fosfataz USB® kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Bu iki hidrolitik enzimden “Ekzonükleaz I” kalıntı tek-zincirli primerleri ve PZR’da yer alan dış kaynaklı tek zincirli DNA parçalarını uzaklaştırırken, “Shrimp Alkalen Fosfataz” ise PZR karışımında kalan ve sonraki reaksiyonları etkileyebilecek olan dNTP’leri uzaklaştırır. Her bir PZR ürünün temizlenmesi için Tablo 3.4.’de verilen protokol kullanılarak reaksiyon karışımı hazırlanmıştır.

**Tablo 3.4.** PZR ürününün temizlenme basamağını gerçekleştirmek üzere belirlenen reaksiyon bileşen miktarları

<b>Reaksiyon Bileşenleri</b>	
PZR ürünü	4 µl
Ekzonükleaz I USB® (10 U/µl)	0,4 µl
Shrimp Alkalen Fosfataz USB® ( 2 U/µl)	0,4 µl
<b>Toplam hacim</b>	<b>4,8 µl</b>

Tüp içerikleri belirtilen şekilde hazırlandıktan sonra PZR aletinde aşağıdaki program 1 döngü uygulanmıştır.

37 °C 20 dakika

80 °C 20 dakika

95 °C 2 dakika

Örnekler işlemin ardından -20 °C ’de saklanmıştır.

### 3.3.4. Otomatik DNA Dizi Analizi

Zincir sonlandırma metodu temelinde gerçekleştirilen DNA dizi analizi reaksiyonu, dizisi çıkarılacak DNA parçasının 5' → 3' yönündeki ipliğinin sentezini floresanla işaretlenmiş dideoksinükleotidtrifosfat (ddNTP)'lar kullanarak belirli bazlarda sentezin durdurulması ve farklı uzunluklarda DNA parçaları elde etme esasına dayanır. Bu yöntemde farklı renklerde işaretlenmiş dört ddNTP aynı tübe konulur. Reaksiyon tamamlandıktan sonra meydana gelen farklı uzunluktaki renkli DNA fragmentleri, kapiller elektroforez sisteminde ayrıştırılır. Cihaz tarafından algılanan floresan rengin oluşturulması için örneklerin işaretleme reaksiyonu Tablo 3.5.'de belirtildiği şekilde hazırlanmıştır. Tez çalışması kapsamında çoğaltımı gerçekleştirilen bölgelerin DNA dizi analizi "ABI 310 Genetic Analyzer" cihazı ile gerçekleştirilmiştir. Veriler DNA dizi analizi programları kullanılarak incelenmiştir.

**Tablo 3.5.** Temizlenmiş PZR ürünlerinin işaretleme reaksiyonlarını gerçekleştirmek üzere kullanılan reaksiyon bileşen miktarları

<b>Reaksiyon Bileşenleri</b>	
PZR ürünü (Temizlenmiş)	1.5 µl
Big Dye reaksiyon karışımı	0.6 µl
Primer (10 pmol /µl)	0.5 µl
Reaksiyon tamponu	0.95 µl
Steril distile H <sub>2</sub> O	6.45 µl
<b>Toplam hacim</b>	<b>10 µl</b>

Hazırlanan örneklerin işaretleme reaksiyonu aşağıdaki programın 25 döngü halinde uygulanması ile gerçekleştirilmiştir.

96 °C 10 saniye

50 °C 5 saniye

60 °C 4 dakika

Döngüler tamamlandıktan sonra reaksiyondan arta kalan malzemeler, aşağıda belirtilen prosedür takip edilerek sekans sonrası pürifikasyon gerçekleştirilmiştir.

1. Her bir örnek tübüne 2 µl 3M sodyum asetat eklenmiştir.
2. Tüplere 50 µl soğuk % 100 'lük etil alkol ilave edilerek iyice karıştırılmış ve 1,5 ml'lik ependorf tüplere aktarılmıştır.
3. Tüpler 20 dakika -20 °C 'de bekletilmiştir.
4. Bekleme süresinin ardından örnekler 20 dakika 13.000 rpm'de santrifüj edilmiş ve süpernatant uzaklaştırılmıştır.
5. Pelet üzerine 250 µl soğuk % 70'lik etil alkol ilave edilmiş ardından 13.000 rpm'de 20 dakika santrifüje edilmiştir. Süpernatant uzaklaştırılmış ve pelet oda ısısında kurumaya bırakılmıştır.
6. Pelet 20 µl deiyonize formamid ilavesi ile çözülmüş ve vortekslenmiştir.
7. Spin edilerek örnekler ABI 310 sekans tüplerine aktarılmıştır.
8. Örnekler 95 °C 'de 5 dakika inkübe edilerek denatüre edilmiş, 3-4 dakika -20 °C'de bekletilmiştir.
9. Hazırlanan örnekler kapiller elektroforez sisteminde yürütülmüştür.

### 3.3.5. APOE Geninin Alellerinin PZR İle Çoğaltılması

APOE geni alelleri hedef bölgeye özgül primerler kullanılarak çoğaltılmıştır [Tablo 3.6.].

**Tablo 3.6.** APOE geni alellerinin PZR ile çoğaltılması aşamasında kullanılan primer çifti ve ürün boyutunun gösterimi

Primer çifti	5'-3' dizisi	Ürün boyutu
APOE-F (ileri)	5'-GAACAACCTGACCCCGGTGGCG-3'	295 bç
APOE-R (geri)	5'-GGATGGCGCTGAGGCCGCGCTC-3'	

APOE geni alellerinin çoğaltılması için gerekli koşulları sağlayan PZR karışımı, son hacim 25 µl olacak şekilde Tablo 3.7.'de belirtildiği şekilde hazırlanmıştır.

**Tablo 3.7.** *APOE* geninin alellerinin çoğaltılması için kullanılan reaksiyon bileşen miktarları

<b>Reaksiyon Bileşenleri</b>	
Kalıp DNA	2 µl
10X PZR Tamponu Sigma®	2.5 µl
25 mM MgCl <sub>2</sub> Sigma®	1.5 µl
2,5 mM dNTP karışımı	1.0 µl
İleri primer (F) (10 pmol / µl)	1.0 µl
Geri primer (R) (10 pmol / µl)	1.0 µl
DMSO	2.5 µl
Taq DNA polimeraz (Sigma®) (5U/ µl)	0.2 µl
Steril distile H <sub>2</sub> O	13.5 µl
<b>Toplam Hacim</b>	<b>25 µl</b>

PZR aşağıda belirtilen koşullarda yapılmıştır.

94 °C 4'	1 döngü
94°C 45 "	} 32 döngü
62 °C 45"	
72 °C 45"	
72 °C 5'	1 döngü

### **3.3.6. *APOE* Geni Alelleri PZR Ürünlerinin Agaroz Jel Elektroforezi İle Kontrolü**

Reaksiyonlar sonucunda elde edilen PZR ürünleri % 1,5'luk agaroz jelde kontrol edilmiştir. 8 µl PZR ürünü 2 µl yükleme boyası ile karıştırılarak hazırlanan örnekler, EtBr içeren jele yüklenmiş, 85 volt sabit voltaj verilerek 30 dakika yürütülmüştür. Jel, UV transillüminatörde incelenmiştir.

### 3.3.7. Restriksiyon Fragment Uzunluk Polimorfizmi (RFLP)

PZR-Restriksiyon Fragment Uzunluk Polimorfizmi (RFLP) temelli analizler, genotipleme için yaygın olarak kullanılır. PZR-RFLP analizinde ilk basamak, varyasyon içeren fragmentin çoğaltılmasıdır. Bunu takiben çoğaltılmış fragment uygun restriksiyon enzimi ile muamele edilir. Restriksiyon enziminin tanıma bölgesinin varlığı ya da yokluğu farklı boyutlarda restriksiyon fragment ürünlerinin oluşumu ile sonuçlanır. Alelik belirleme, fragmentlerin elektroforetik ayrımı ile gerçekleştirilir [168].

*APOE* geninin alelleri belirlemek üzere PZR ile çoğaltılan bölgenin RFLP analizi için izlenen protokol Tablo 3.8.'de belirtilmiştir.

**Tablo 3.8.** RFLP analizi için hazırlanan reaksiyon bileşen miktarları

<b>Reaksiyon Bileşenleri</b>	
PZR ürünü	15 µl
10X Tango Reaksiyon Tamponu (Thermo Scientific®) <u>1X Tango Reaksiyon Tampon İçeriği</u> 33 mM Tris-asetat ( pH 7.9) 10 mM Magnezyum asetat 66 mM Potasyum asetat 0.1 mg/ml BSA	2 µl
<i>HhaI</i> (10 U / µl) (Thermo Scientific®)	0.5 µl
Steril distile H <sub>2</sub> O	2.5 µl
<b>Toplam hacim</b>	<b>20 µl</b>

Reaksiyon karışımı belirtilen miktarlar kullanılarak hazırlanmış 37 °C'de gece boyu inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi sonunda reaksiyon 6x durdurma tamponu (% 40 (w/v) sükröz çözeltisi, % 0.25 brom fenol mavisi, % 60 10X TBE tampon) ile durdurulmuş, kesim örnekleri Poliakrilamid Jel Elektroforezi (PAGE) ile analize hazır hale getirilmiştir.

### 3.3.8. Poliakrilamid Jel Elektroforezi (PAGE)

Poliakrilamid jel elektroforezi (PAGE)'de matris materyali olan poliakrilamid, akrilamid monomerlerinin çapraz bağlayıcı ajan olan N-N' metilenbisakrilamid yardımıyla kovalent olarak bağlanmasıyla oluşan polimerik bir yapıdır. Amonyumpersülfat (APS) serbest radikal oluşturarak polimerizasyonu başlatır. N, N, N', N'-tetrametiletilediamin (TEMED) ise katalizör olarak işlev görür.

Poliakrilamid jellerde por büyüklüğü, akrilamid ve bis içeriğini ifade eden % T ve % C<sub>bis</sub> değerleri ile belirlenir. % T total akrilamid % 'si (w/v); % C<sub>bis</sub> ise bis'in monomere oranı (w/w)'dır [169].

Restriksiyon enzim kesim sonuçlarını belirlemek için % 10'luk PAGE kullanılmıştır. 10X TBE ve % 10 'luk jelin hazırlanması için kullanılan karışım aşağıda belirtildiği şekilde hazırlanmıştır.

#### **10X TBE Tamponu (pH 8.3,1L) Hazırlanması**

60.55 g Tris-Baz (M<sub>a</sub>: 121,14; Sigma®)

31 g Borik asit (M<sub>a</sub>: 61,83; Sigma®)

3.725 g EDTA (M<sub>a</sub>: 372,24; Sigma®)

#### **% 10'luk Poliakrilamid Jelin Hazırlanması İçin Kullanılan Karışım (50 mL)**

Akrilamid (M<sub>a</sub>: 71.08; Sigma®) 4.8 gr

Bisakrilamid (M<sub>a</sub>: 154.17; Sigma® ) 0.25 gr

10X TBE 5 ml

APS 0.03 gr

TEMED 22.5 µl

} Stok solüsyon olarak  
hazırlanmıştır.

Elektroforez sisteminin camları jel yüzeyinin pürüzsüz olabilmesi için yıkandıktan sonra % 70 'lik etanol ile silinerek iyice temizlenmiştir. Akrilamid (4.8 gr) ve bisakrilamid (0.25 gr) tartıldıktan sonra 5 ml 10X TBE içerisinde çözülmüş ardından son hacim su ile 50 ml'ye tamamlanmıştır. Karışım süzölmüş ve oksijen polimerizasyonu engelleyici olarak davrandığı için havası alınmıştır. APS, sdH<sub>2</sub>O ile 300 µl ye tamamlanmış, TEMED ile birlikte 50 ml'lik akrilamid: bisakrilamid stoğuna eklendikten sonra karışım hızlı bir şekilde jelin çeşitli kalınlık ve boyutta hazırlanabilmesine olanak veren elektroforez aygıtının

dökme aparatı kullanılarak iki cam (jel kaseti) arasına dökülmüştür. Jelin polimerleşmesi tamamlandıktan sonra örnekler jele yüklenmiş ve 230 V'ta 4 saat 1X TBE (10X TBE stoğundan 1:10 seyreltilerek hazırlanmıştır) tamponu kullanılarak yürütülmüştür. Yürüme tamamlandıktan sonra jel iki cam arasından çıkarılarak EtBr çözeltisi ile boyanmış, boyası alındıktan sonra jel görüntüleme sisteminde, oluşan bant profilleri görüntülenmiştir.

### **3.4. Verilerin İstatiksel Analizi**

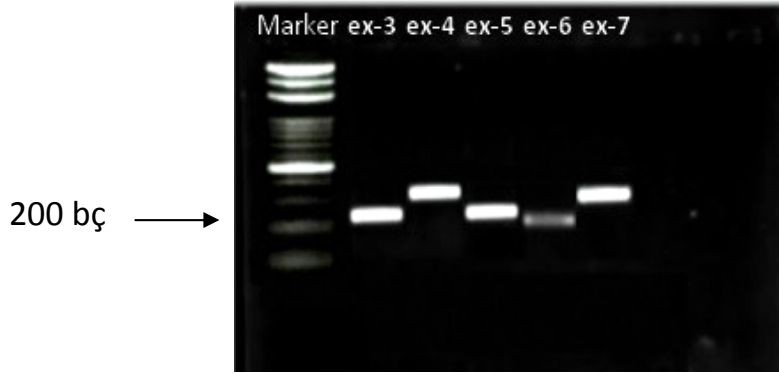
Verilerin istatistiksel açıdan değerlendirilmesi, SPSS V21.0 programı kullanılarak yapılmıştır. Kontrol ve hasta gruplarında *PSEN1* rs165932 (G/T) ve *APOE*  $\epsilon$ 2,  $\epsilon$ 3 ve  $\epsilon$ 4 polimorfizmlerinin genotip ve alel frekansları, ailesinde demans öyküsü bulunan hastalar ve bulunmayan hastalarda  $\epsilon$ 4 alel varlığı, ki-kare ( $\chi^2$ ) testi kullanılarak karşılaştırılmıştır. Alzheimer hasta grubunda *APOE* geni  $\epsilon$ 4 aleli ve *PSEN1* rs165932 (G/T) polimorfizmi genotiplerinin birlikteliğinin istatistiksel açıdan değerlendirilmesinde de  $\chi^2$  testi kullanılmıştır. Verilerin karşılaştırılmasında  $p < 0.05$  değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

## 4. BULGULAR

Çalışma kapsamında, hasta grubunda *PSEN1* geni kodlayıcı bölgeleri (3-12.ekzonlar) DNA dizi analizi ile mutasyon açısından taranmıştır. Sekans analizleri sonucunda hasta grubunda sadece *PSEN1* geni intron 8 bölgesinde rs165932 (G/T) polimorfizmi saptanmış olup, anlamlılığı değerlendirilmek üzere bu bölge kontrol grubunda da DNA dizi analizi ile taranmıştır. Ayrıca, olası Alzheimer tanısı almış hasta bireyler ile demans öyküsü bulunmayan sağlıklı bireylerde *APOE*  $\epsilon$ 2,  $\epsilon$ 3 ve  $\epsilon$ 4 polimorfizmleri genotipleme yapılmıştır.

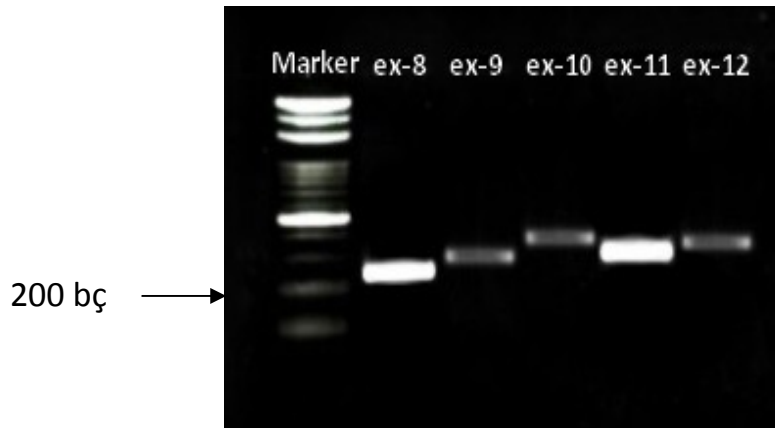
### 4.1. *PSEN1* Geni (3-12.ekzonlar) PZR Ürünlerinin Jelde Görüntülenmesi

*PSEN1* geni kodlanan bölgelerinin (3-12.ekzonlar) PZR ürünleri % 1.5'lük agaroz jelde yürütülerek görüntülenmiştir. Kontrol amaçlı olarak 100 bç'lik marker kullanılmıştır [Şekil 4.1.].



1-Marker

2-6. PZR ürünleri (ekzon 3-4-5-6-7 sırası ile)



1-Marker

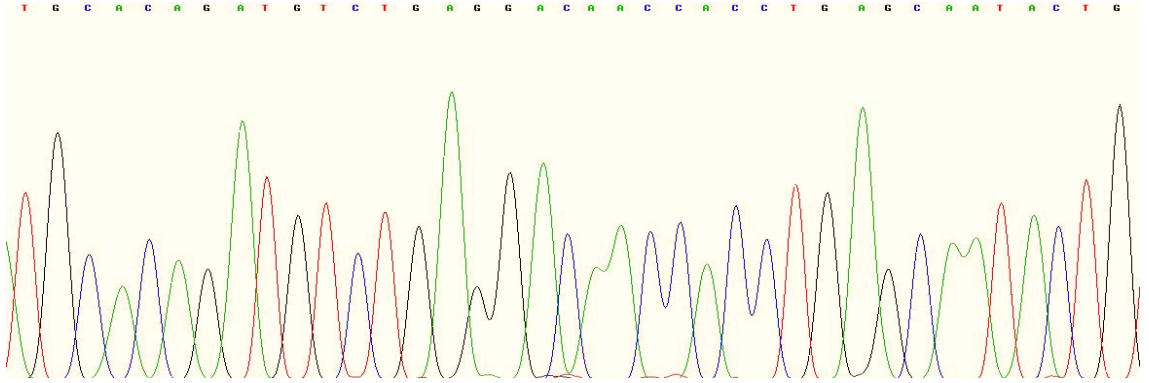
2-6. PZR ürünleri (ekzon 8-9-10-11-12 sırası ile)

**Şekil 4.1.** *PSEN1* Geni (3-12.ekzonlar) PZR ürünlerinin jelde görüntülenmesi

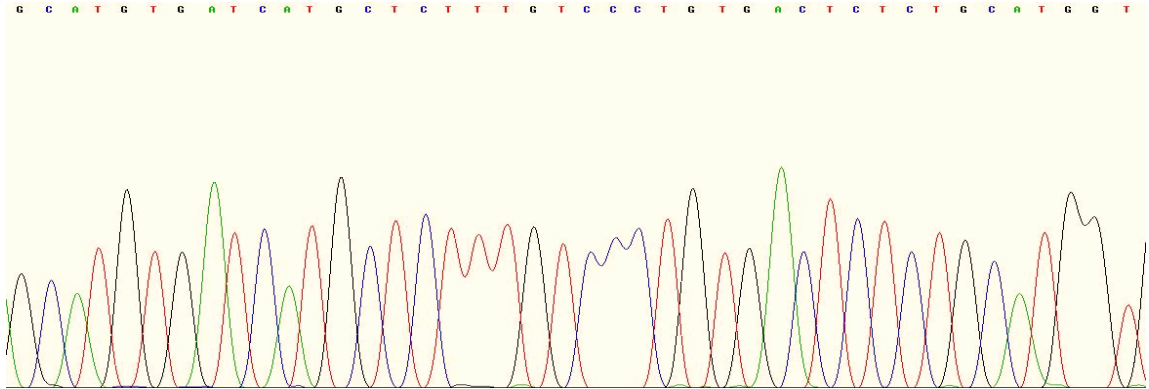


## 4.2. *PSEN1* Geni Amplifikasyon Bölgelerinin DNA Dizi Analizi Kromatogramları

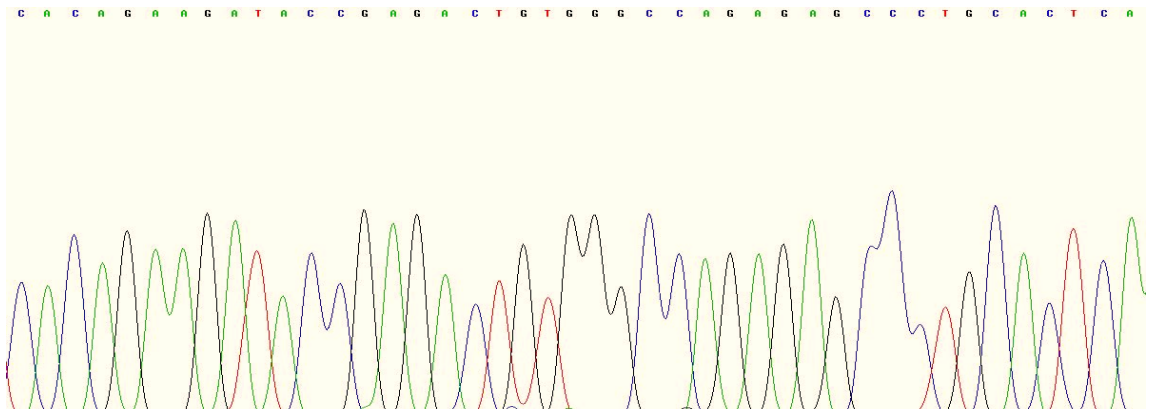
*PSEN1* geninin kodlayıcı bölgelerini oluşturan ve 30 hasta bireyin tamamında okunan amplifikasyon bölgelerinin ileri primerler (F) ile gerçekleştirilen okumaları ekzon sırası ile Şekil 4.2., Şekil 4.3., Şekil 4.4., Şekil 4.5., Şekil 4.6., Şekil 4.7., Şekil 4.8, Şekil 4.9., Şekil 4.10. 'de verilmiştir. *PSEN1* geni ekzon 6 bölgesinin sekansı okunamamıştır.



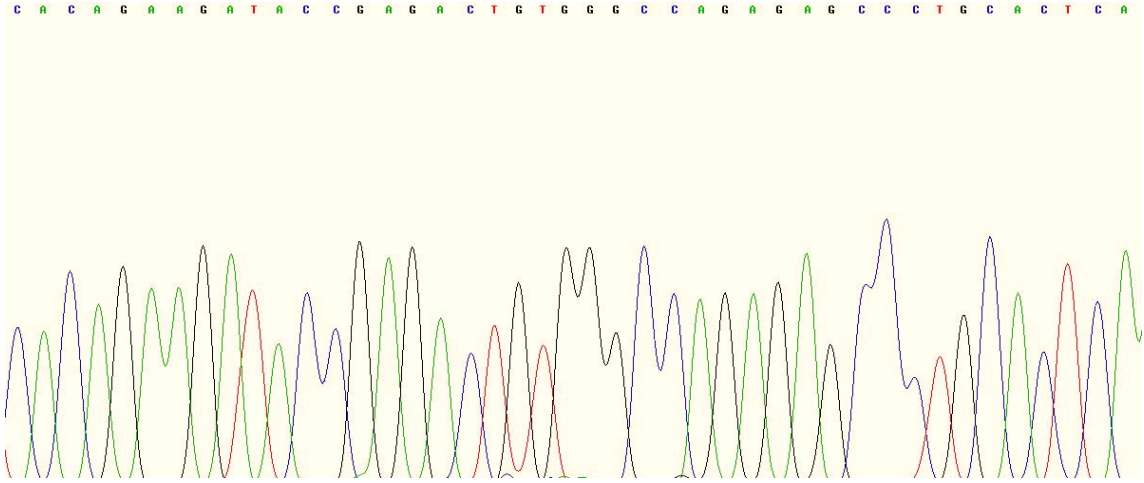
Şekil 4.2. *PSEN1* geni ekzon 3 bölgesi DNA dizi analizi kromatogramı



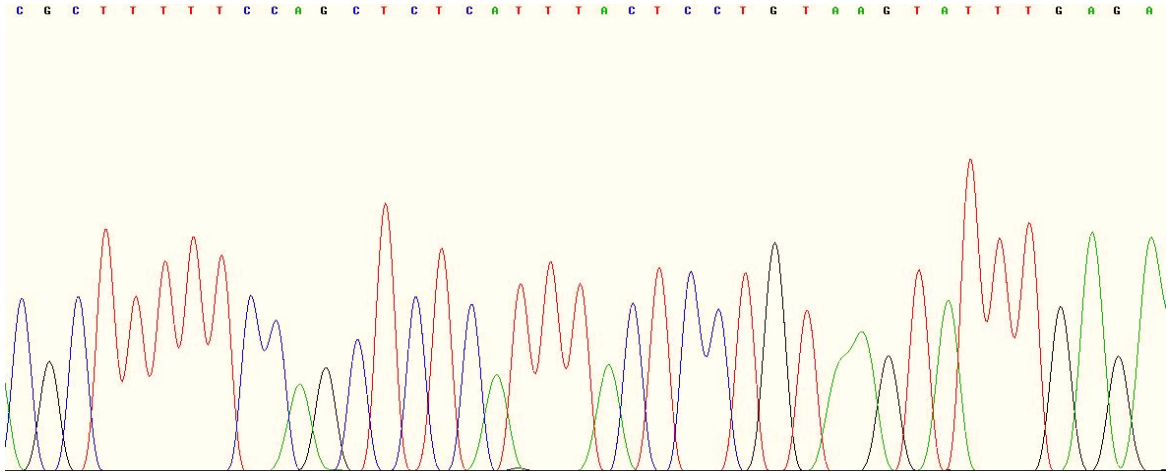
Şekil 4.3. *PSEN1* geni ekzon 4 bölgesi DNA dizi analizi kromatogramı



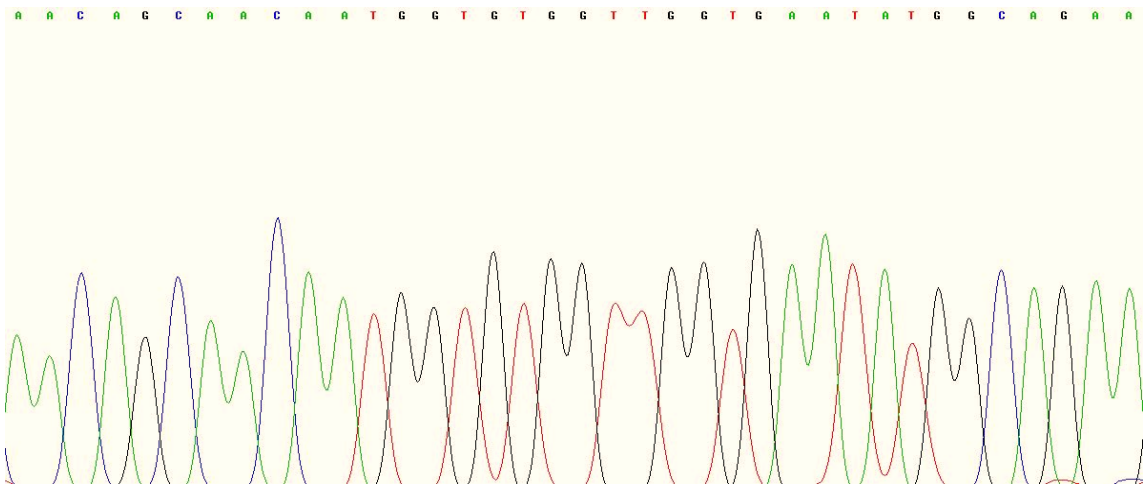
Şekil 4.4. *PSEN1* geni ekzon 5 bölgesi DNA dizi analizi kromatogramı



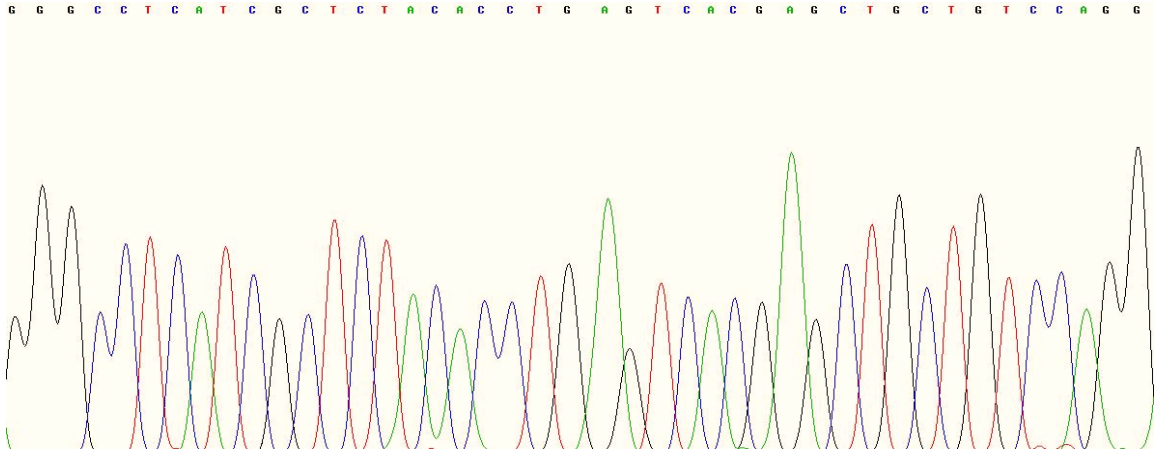
**Şekil 4.5.** *PSEN1* geni ekzon 7 bölgesi DNA dizi analizi kromatogramı



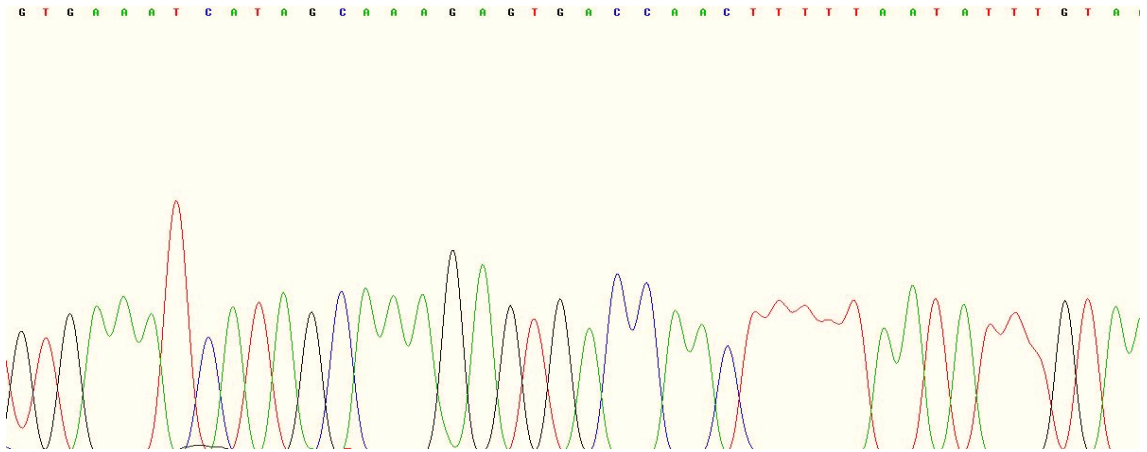
**Şekil 4.6.** *PSEN1* geni ekzon 8 bölgesi DNA dizi analizi kromatogramı



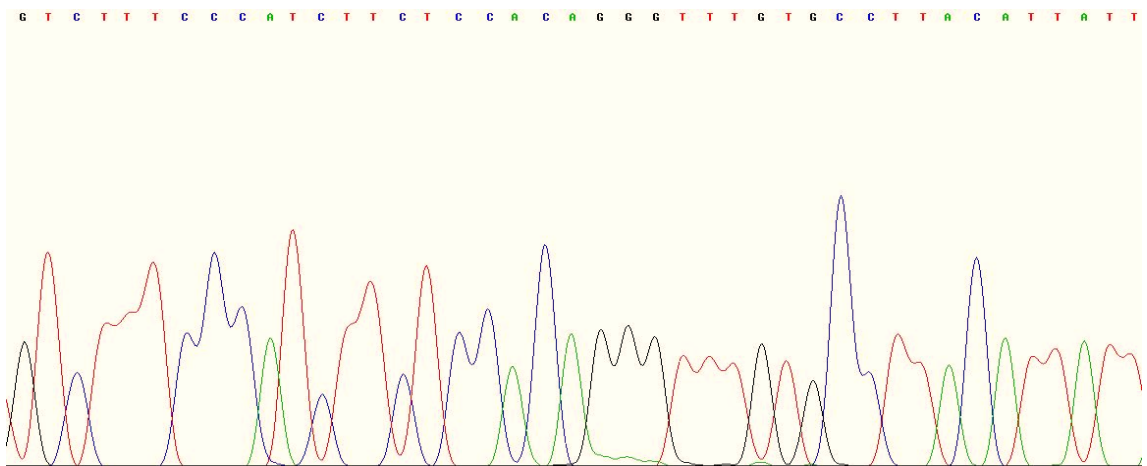
**Şekil 4.7.** *PSEN1* geni ekzon 9 bölgesi DNA dizi analizi kromatogramı



**Şekil 4.8.** *PSEN1* geni ekzon 10 bölgesi DNA dizi analizi kromatogramı

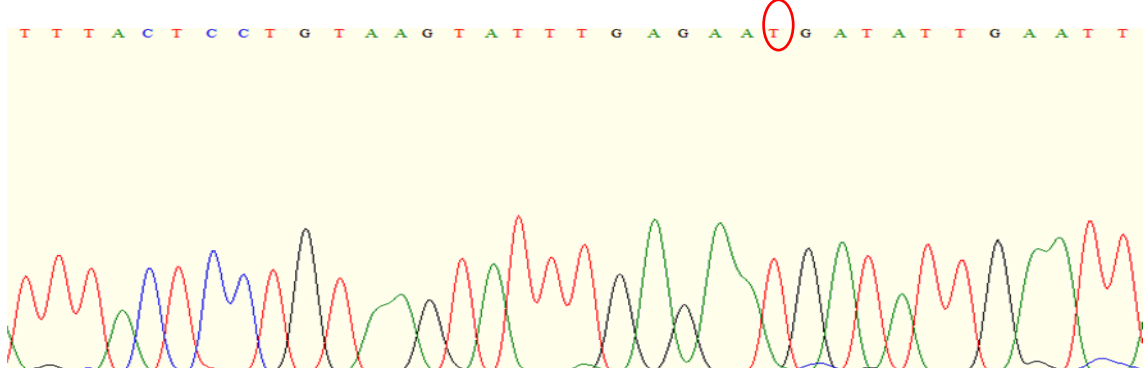


**Şekil 4.9.** *PSEN1* geni ekzon 11 bölgesi DNA dizi analizi kromatogramı

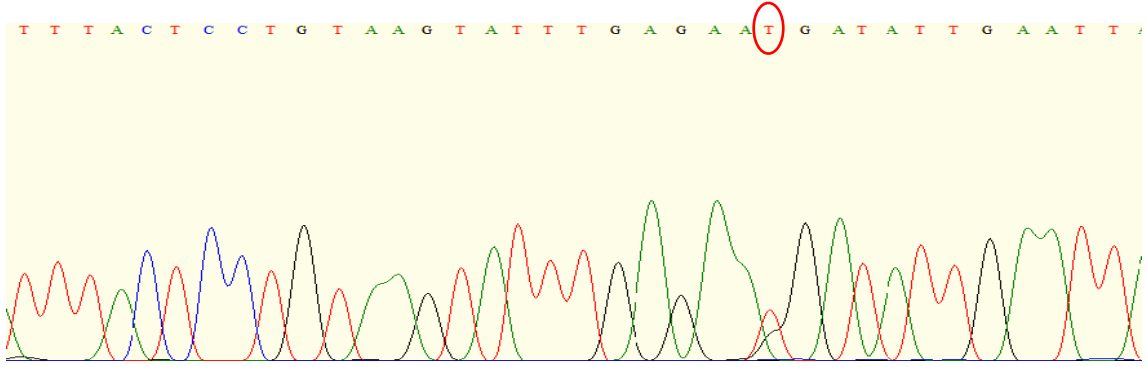


**Şekil 4.10.** *PSEN1* geni ekzon 12 bölgesi DNA dizi analizi kromatogramı

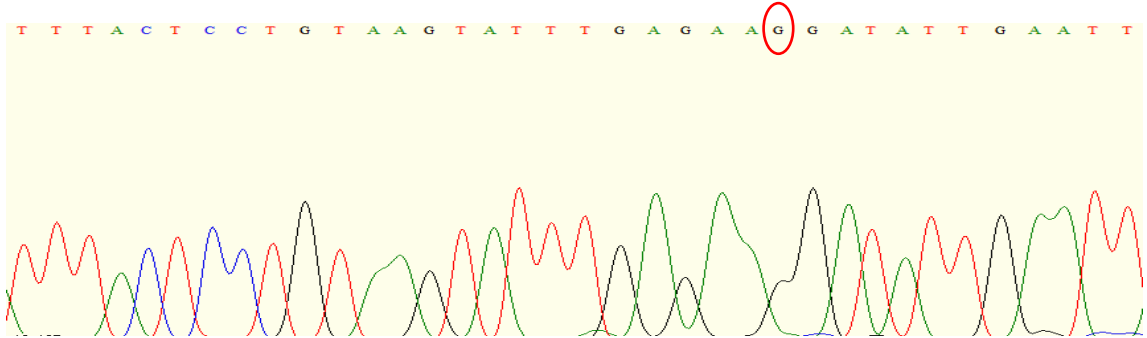
#### 4.3. *PSEN1* Geni İtron 8 Bölgesinde Tespit Edilen rs165932 (G/T) Polimorfizminin DNA Dizi Analizi Kromatogramında Gösterimi



Şekil 4.11. 1/1 Genotipine sahip bireyin DNA dizi analizi kromatogramı (TT)



Şekil 4.12. 1/2 Genotipine sahip bireyin DNA dizi analizi kromatogramı (TG)



Şekil 4.13. 2/2 Genotipine sahip bireyin DNA dizi analizi kromatogramı (GG)

#### 4.4. *PSEN1* Geni İtron 8 Polimorfizminin (rs165932 G/T) Oluşturduğu Genotip ve Alel Frekansı

*PSEN1* geni intron 8 bölgesinde yer alan rs165932 G/T polimorfizmi açısından bireyler TT (1/1), TG (1/2) ve GG (2/2) olmak üzere üç genotipe sahiptir. Çalışma kapsamında *PSEN1* geni intron 8 bölgesinde yer alan rs165932 G/T polimorfizmi açısından hasta ve kontrol grupları değerlendirilmiştir.

Kontrol ve hasta grupları için *PSEN1* geni intron 8 bölgesinde yer alan rs165912 G/T polimorfizmine ilişkin genotipleme çalışmasına ait genotip ve alel frekanslarının dağılımı Tablo 4.1.'de verilmiştir.

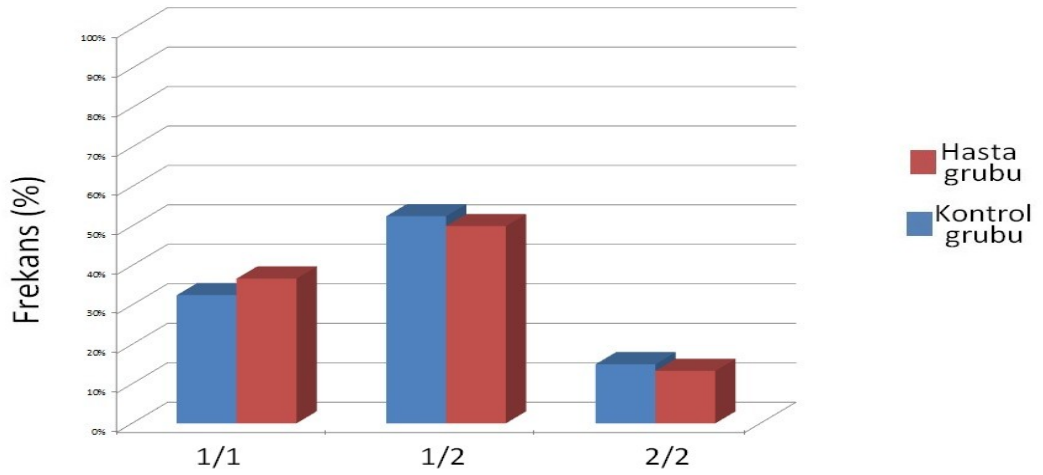
Genotip frekansları TT (1/1), TG (1/2) ve GG (2/2)  $\chi^2$  testi kullanılarak istatistiksel olarak karşılaştırıldığında 1/1, 1/2 ve 2/2 genotipleri açısından kontrol ve hasta grupları arasında anlamlı bir fark bulunamamıştır ( $p>0.05$ ) [Tablo 4.1.]. Kontrol ve hasta gruplarında genotip frekansları dağılımının grafiksel gösterimi Şekil 4.14.'de verilmiştir.

1 (T) ve 2 (G) alel frekansları  $\chi^2$  testi kullanılarak istatistiksel olarak karşılaştırıldıklarında kontrol ve hasta grupları arasında anlamlı bir fark bulunamamıştır ( $p> 0.05$ ) [Tablo 4.1].

**Tablo 4.1.** *PSEN1* intron 8 polimorfizmi (rs165932 G/T) genotip ve alel frekanslarının kontrol ve hasta gruplarında dağılımı

	<b>Kontrol grubu</b>	<b>Hasta grubu</b>	<b>p</b>
	<b>(n=40) (%)</b>	<b>(n=30) (%)</b>	
<b>Genotip</b>			
<b>1/1 (TT)</b>	13 (32.5)	11 (36.7)	0.455
<b>1/2 (TG)</b>	21 (52.5)	15 (50.0)	0.514
<b>2/2 (GG)</b>	6 (15.0)	4 (13.3)	0.563
<b>Alel</b>			
<b>1 (T)</b>	47 (58.75)(n=80)	37 (61.7)(n=60)	0.432
<b>2 (G)</b>	33 (41.25)(n=80)	23 (38.3)(n=60)	0.432

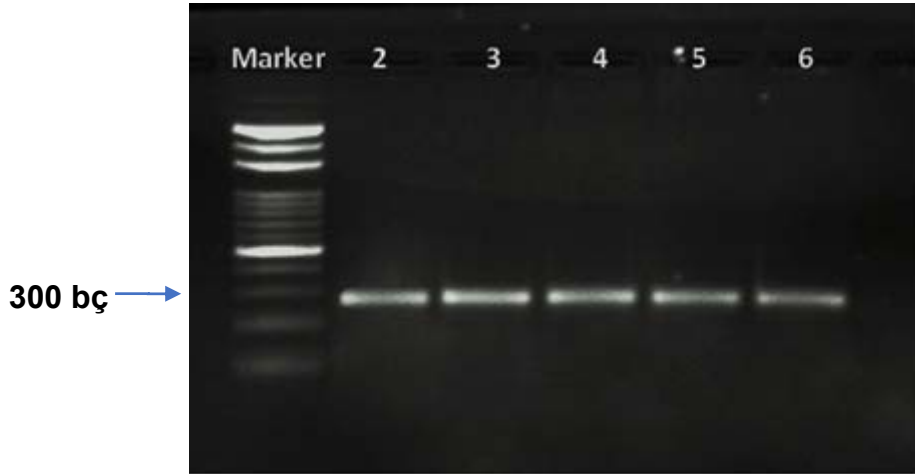
p değeri ki-kare ( $\chi^2$ ) testi sonucunda elde edilmiştir.



**Şekil 4.14.** Kontrol ve hasta gruplarında *PSEN1* genotip frekanslarının dağılımı

#### 4.5. *APOE* Geni Alellerinin PZR Ürünlerinin Jelde Görüntülenmesi

*APOE* geni 4.ekzonunda yer alan 295 bç'lik bölgenin çoğaltımı sonucunda elde edilen PZR ürünü %1.5'luk jelde yürütülerek görüntülenmiştir. Kontrol amaçlı olarak 100 bç'lik marker kullanılmıştır [Şekil 4.15.].



**Şekil 4.15.** *APOE* geni alellerinin PZR ürünlerinin jelde görüntülenmesi

1- Marker

2-6.PZR ürünü (295 bç)

#### 4.6. APOE PZR Ürünlerinin HhaI Restriksiyon Enzimi İle Kesim Sonuçları

APOE geni 4.ekzonunda yer alan polimorfik bölgeleri içeren 295 bç'lik bölge PZR ile çoğaltıldıktan sonra ürünler HhaI (Thermo Scientific®) restriksiyon endonükleazı ile kesilmiştir [Şekil 4.16.].

Enzimin tanıma dizisi Şekil 4.17.'de ve kesim sonucu elde edilen APOE genotiplerinin şematik görünümü Şekil 4.18'de verilmiştir.

GAACAACTGACCCCGGTGGCGGAGGAGACGCGGGCACGGCTGTCCAAGGAGCTGCAGG  
CGGCGCAGGCCCGGCTGGGCGCGGACATGGAGGACGTGTGCGGCCGCCTGGTGCAGTA  
CCGCGGCGAGGTGCAGGCCATGCTCGGCCAGAGCACCGAGGAGCTGCGGGTGCGCCTC  
GCCTCCACCTGCGCAAGCTGCGTAAGCGGCTCCTCCGCGATGCCGATGACCTGCAGAA  
GGCGCCTGGCAGTGTACCAGGCCGGGGCCCGCGAGGGCGCCGAGCGCGGCCTCAGCGCC  
ATCC

Şekil 4.16. APOE geni PZR ürünü dizisi



Şekil 4.17. HhaI enzimi tanıma dizisi

Şekil 4.16.'de belirtilen diziyeye göre enzim kesimi sonucu aşağıda belirtilen uzunlukta kesim ürünleri oluşmaktadır.

ε2/ε2 : 63-16-91-18-83-7-11-6

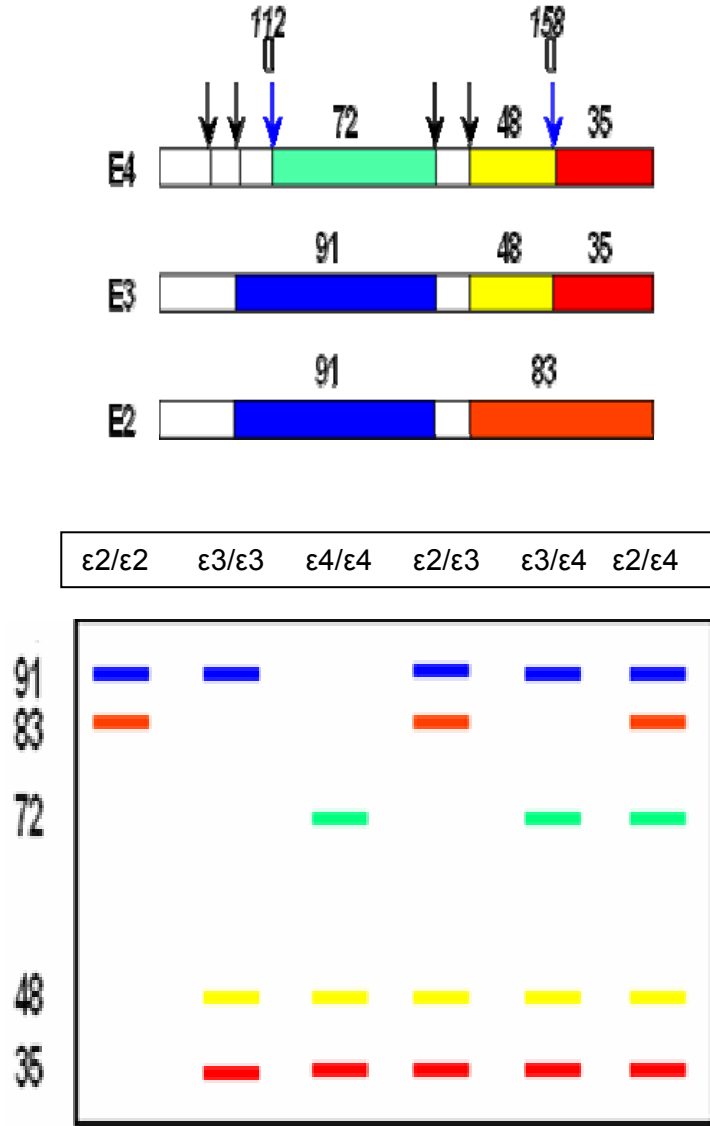
ε2/ε3 : 63-19-91-18-48-35-83-7-11-6

ε3/ε3 : 63-16-91-18-48-35-7-11-6

ε3/ε4 : 63-16-91-19-72-18-48-35-7-11-6

ε4/ε4 : 63-16-19-72-19-18-48-35-7-11-6

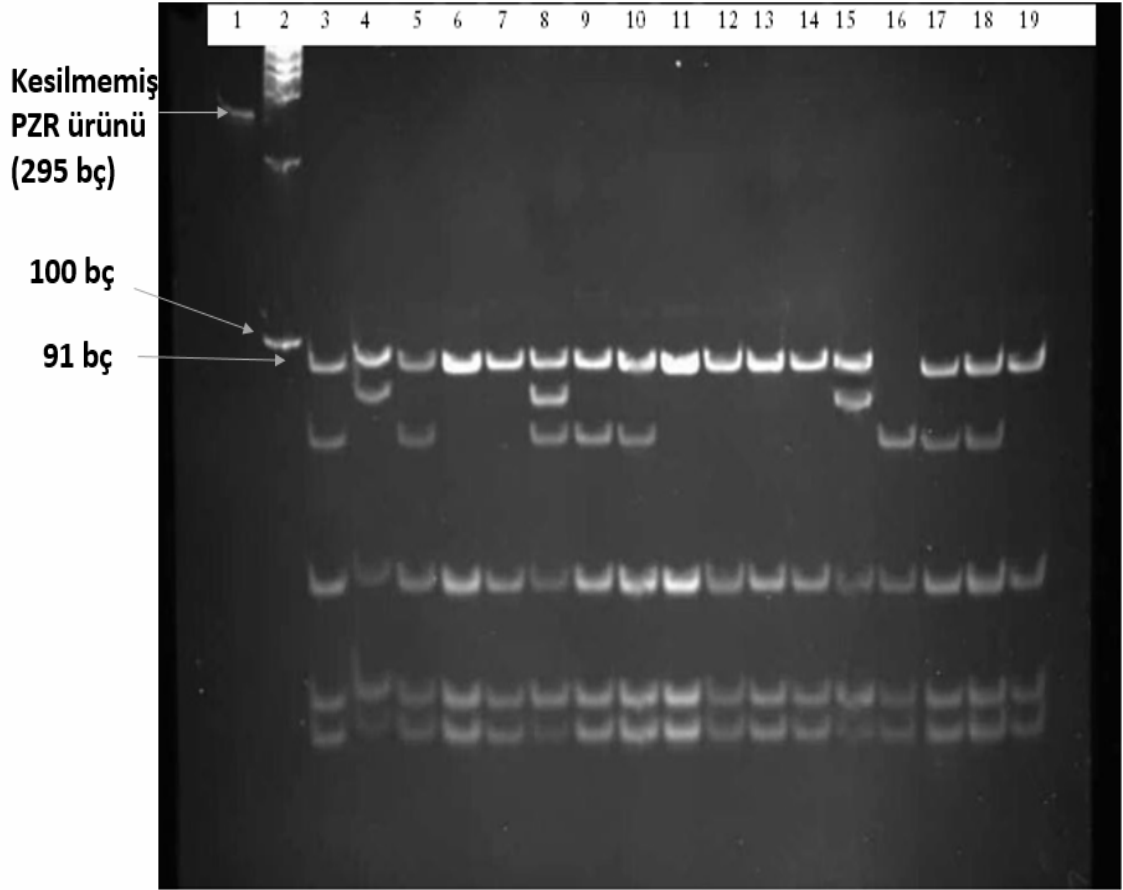
ε2/ε4 : 63-16-91-19-72-18-48-35-83-7-11-6



**Şekil 4.18.** *HhaI* restriksiyon enzim kesim noktaları ve kesim sonucunda elde edilen *APOE* genotiplerinin şematik görünümü [170].

Elde edilen PZR ürünlerinin *HhaI* enzimi ile kesimi sonucu elde edilen ve PAGE'de ayrılan bant profilleri Şekil 4.19.'da verilmiştir.





**Şekil 4.19.** *HhaI* enzim kesimi sonucu elde edilen *APOE* genotiplerinin %10 'luk PAGE'de görüntülenmesi

- |   |   |
|---|---|
| 1-Kontrol (Kesilmemiş örnek; 295 bç)    | 13- <i>APOE</i> $\epsilon 3/\epsilon 3$ |
| 2-"Marker"                              | 14- <i>APOE</i> $\epsilon 3/\epsilon 3$ |
| 3- <i>APOE</i> $\epsilon 3/\epsilon 4$  | 15- <i>APOE</i> $\epsilon 2/\epsilon 3$ |
| 4- <i>APOE</i> $\epsilon 2/\epsilon 3$  | 16- <i>APOE</i> $\epsilon 4/\epsilon 4$ |
| 5- <i>APOE</i> $\epsilon 3/\epsilon 4$  | 17- <i>APOE</i> $\epsilon 3/\epsilon 4$ |
| 6- <i>APOE</i> $\epsilon 3/\epsilon 3$  | 18- <i>APOE</i> $\epsilon 3/\epsilon 4$ |
| 7- <i>APOE</i> $\epsilon 3/\epsilon 3$  | 19- <i>APOE</i> $\epsilon 3/\epsilon 3$ |
| 8- <i>APOE</i> $\epsilon 2/\epsilon 4$  |   |
| 9- <i>APOE</i> $\epsilon 3/\epsilon 4$  |   |
| 10- <i>APOE</i> $\epsilon 3/\epsilon 4$ |   |
| 11- <i>APOE</i> $\epsilon 3/\epsilon 3$ |   |
| 12- <i>APOE</i> $\epsilon 3/\epsilon 3$ |   |

#### 4.7. APOE Geni $\epsilon 2$ , $\epsilon 3$ ve $\epsilon 4$ Polimorfizmlerinin Genotip ve Alel Frekansı

APOE geni  $\epsilon 2$ ,  $\epsilon 3$  ve  $\epsilon 4$  polimorfizmleri bireylerde  $\epsilon 2/\epsilon 2$ ,  $\epsilon 2/\epsilon 3$ ,  $\epsilon 2/\epsilon 4$ ,  $\epsilon 3/\epsilon 3$ ,  $\epsilon 3/\epsilon 4$  ve  $\epsilon 4/\epsilon 4$  olmak üzere altı farklı genotip oluşturmaktadır. Çalışma kapsamında APOE geninde yer alan belirtilen polimorfizmler, Alzheimer tanısı almış hastalar ve demans öyküsü bulunmayan sağlıklı kontrollerde değerlendirilmiştir.

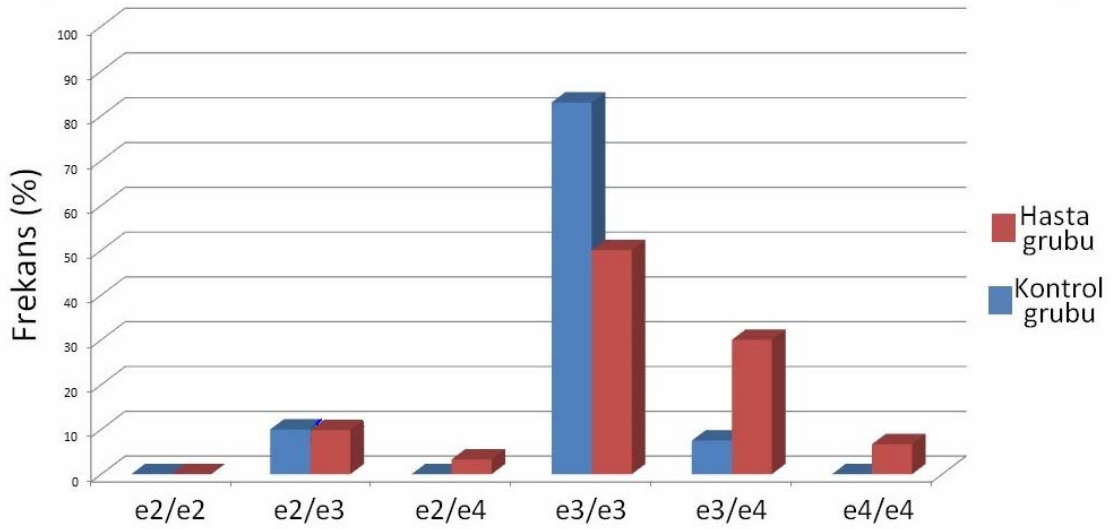
APOE geni  $\epsilon 2$ ,  $\epsilon 3$  ve  $\epsilon 4$  polimorfizmlerine ilişkin genotipleme çalışmasına ait genotip ve alel frekanslarının dağılımı kontrol ve hasta grubu için Tablo 4.2.'de, grafiksel gösterimi ise Şekil 4.20. ve Şekil 4.21.'de verilmiştir.

Kontrol grubunda  $\epsilon 2/\epsilon 2$ ,  $\epsilon 2/\epsilon 4$  ve  $\epsilon 4/\epsilon 4$  genotiplerine sahip bireye, hasta grubunda  $\epsilon 2/\epsilon 2$  genotipine sahip bireye rastlanmamıştır [Tablo 4.2.][Şekil 4.20.].

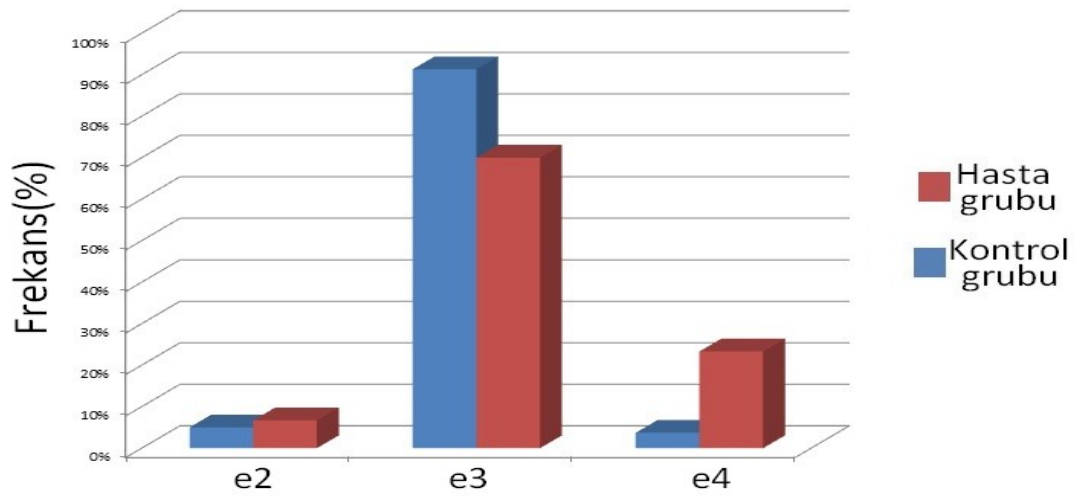
**Tablo 4.2.** APOE genotip ve alel frekanslarının kontrol ve hasta gruplarında dağılımı

	Kontrol grubu (n=40) (%)	Hasta grubu (n=30) (%)	p
<b>Genotip</b>			
$\epsilon 2/\epsilon 2$	0 (0.0)	0 (0.0)	-
$\epsilon 2/\epsilon 3$	4 (10.0)	3 (7.5)	0.660
$\epsilon 2/\epsilon 4$	0 (0.0)	1 (3.3)	0.429
$\epsilon 3/\epsilon 3$	33 (82.5)	15 (50.0)	<b>0.004</b>
$\epsilon 3/\epsilon 4$	3 (7.5)	9 (30.0)	<b>0.016</b>
$\epsilon 4/\epsilon 4$	0 (0.0)	2 (6.7)	0.180
<b>Alel</b>			
$\epsilon 2$	4 (5.0) (n=80)	4 (6.7) (n=60)	0.473
$\epsilon 3$	73 (91.3) (n=80)	42 (70.0) (n=60)	<b>0.001</b>
$\epsilon 4$	3 (3.7) (n=80)	14 (23.3) (n=60)	<b>0.001</b>

p değeri ki-kare ( $\chi^2$ ) testi sonucunda elde edilmiştir.



**Şekil 4.20.** Kontrol ve hasta gruplarında *APOE* genotip frekanslarının dağılımı



**Şekil 4.21.** Kontrol ve hasta gruplarında *APOE* alel frekanslarının dağılımı

Genotip frekansları ( $\epsilon 2/\epsilon 2$ ,  $\epsilon 2/\epsilon 3$ ,  $\epsilon 2/\epsilon 4$ ,  $\epsilon 3/\epsilon 3$ ,  $\epsilon 3/\epsilon 4$  ve  $\epsilon 4/\epsilon 4$ )  $\chi^2$  testi kullanılarak istatistiksel açıdan değerlendirilmiş,  $\epsilon 3/\epsilon 3$  ve  $\epsilon 3/\epsilon 4$  genotiplerinin kontrol ve hasta grupları arasındaki dağılım farkının anlamlı olduğu görülmüştür ( $p < 0.05$ ).  $\epsilon 3/\epsilon 3$  genotip frekansı; kontrol grubunda, hasta grubuna göre anlamlı düzeyde yüksektir.  $\epsilon 3/\epsilon 4$  genotip frekansı ise hasta grubunda kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde yüksek bulunmuştur [Tablo 4.2.].

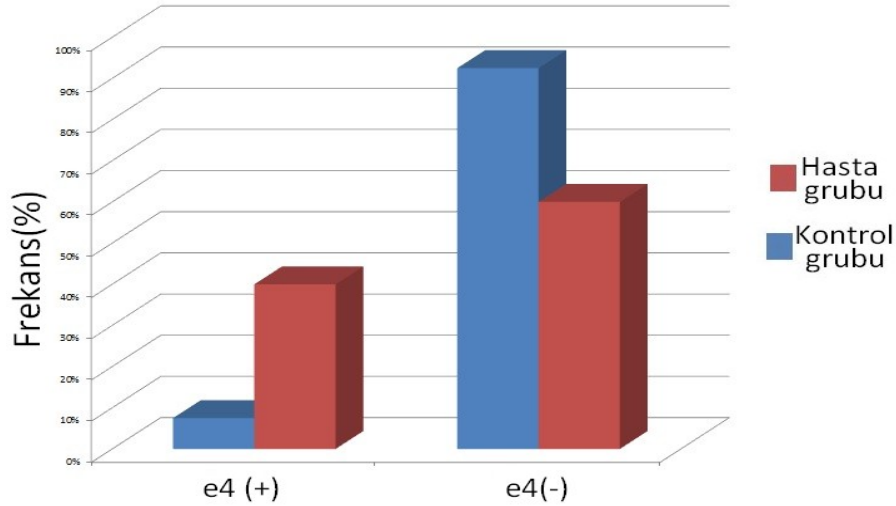
*APOE* genine ait;  $\epsilon 2$ ,  $\epsilon 3$  ve  $\epsilon 4$  alel frekansları  $\chi^2$  testi kullanılarak istatistiksel açıdan karşılaştırıldığında,  $\epsilon 3$  ve  $\epsilon 4$  alelleri açısından kontrol ve hasta grubunda anlamlı bir fark bulunmuştur ( $p < 0.05$ ).  $\epsilon 3$  alel frekansının kontrol grubunda hasta grubuna göre anlamlı düzeyde yüksek olduğu görülmüştür.  $\epsilon 4$  alel frekansı ise hasta grubunda kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde yüksektir [Tablo 4.2.].

Kontrol ve hasta grubunda  $\epsilon 4$  alelinin varlığı bakımından farkın anlamlı düzeyde olduğu belirlenmiştir ( $p < 0.05$ ) [Tablo 4.3.]. Sonuçların grafiksel gösterimi, Şekil 4.22.'de verilmiştir.

**Tablo 4.3.** Kontrol ve hasta gruplarında *APOE*  $\epsilon 4$  alelinin varlığı ya da yokluğu

Alel varlığı/yokluğu	Kontrol grubu n=40 (%)	Hasta grubu n= 30 (%)	p
$\epsilon 4 (+)$	3 (7.5)	12 (40.0)	<b>0.001</b>
$\epsilon 4 (-)$	37 (92.5)	18 (60.0)	

p değeri ki-kare ( $\chi^2$ ) testi sonucunda elde edilmiştir.



**Şekil 4.22.** Kontrol ve hasta gruplarında *APOE*  $\epsilon 4$  varlığı ya da yokluğu

Ailesinde demans öyküsü bulunan ve bulunmayan hastalarda  $\epsilon_2$ ,  $\epsilon_3$  ve  $\epsilon_4$  alel frekansı  $\chi^2$  testi kullanılarak istatistiksel açıdan karşılaştırıldığında, ailesinde demans öyküsü bulunan hastalar ve bulunmayan hastalar arasında  $\epsilon_3$  ve  $\epsilon_4$  alellerinin dağılımındaki farklılığın anlamlı olduğu bulunmuştur ( $p < 0.05$ ).  $\epsilon_4$  alel frekansının, ailesinde demans öyküsü bulunan hastalarda anlamlı düzeyde yüksek olduğu,  $\epsilon_3$  alel frekansının ise ailesinde demans öyküsü bulunmayan hasta grubunda anlamlı düzeyde yüksek olduğu görülmüştür [Tablo 4.4.].

**Tablo 4.4.** Hasta grubunda ailesinde demans öyküsü bulunan ve bulunmayan bireylerde *APOE*

<b>Alel</b>	<b>Ailesinde demans öyküsü bulunmayan AH n= 48(%)</b>	<b>Ailesinde demans öyküsü bulunan AH n= 12(%)</b>	<b>p</b>
<b><math>\epsilon_2</math></b>	3 (6.2)	1 (8.3)	0.601
<b><math>\epsilon_3</math></b>	37 (77.1)	5 (41.7)	<b>0.023</b>
<b><math>\epsilon_4</math></b>	8 (16.7)	6 (50.0)	<b>0.024</b>

p değeri ki-kare ( $\chi^2$ ) testi sonucunda elde edilmiştir.

#### 4.8. *PSEN1* Geni İtron 8 (rs165932 G/T) ve *APOE* $\epsilon_2$ , $\epsilon_3$ ve $\epsilon_4$ Polimorfizmlerinin Birlikte Değerlendirilmesi

Çalışmamızda Alzheimer hasta grubunda *APOE* geni  $\epsilon_4$  alel polimorfizmi ile *PSEN1* geni intron 8 bölgesinde yer alan rs165932 G/T polimorfizminin oluşturduğu 1/1, 1/2 ve 2/2 genotiplerinin birlikteliği  $\chi^2$  testi kullanılarak değerlendirilmiştir [Tablo 4.5.]. Hasta grubumuzda *PSEN1* genotipleri dağılımı ve  $\epsilon_4$  aleli taşıyıcılığı birlikte değerlendirildiğinde anlamlı bir farklılık bulunamamıştır ( $p > 0.05$ ).

**Tablo 4.5.**  $\epsilon 4$  aleli taşıyan ve taşımayan AH bireylerde *PSEN1* 1/1, 1/2 ve 2/2 genotiplerinin dağılımı

<i>PSEN1</i> Genotip	$\epsilon 4$ aleli taşıyan AH n=12 (%)	$\epsilon 4$ aleli taşımayan AH n=18 (%)	p
1/1	6 (50.0)	5 (27.8)	0.163
1/2	3 (25.0)	12 (66.7)	
2/2	3 (25.0)	1 (5.5)	

p değeri ki-kare ( $\chi^2$ ) testi sonucunda elde edilmiştir.

## 5.TARTIŞMA ve SONUÇ

Alzheimer Hastalığı (AH), klinik ve nörolojik açıdan heterojenite gösteren; bilişsel işlevlerde bozulma ve günlük yaşam aktivitelerinde azalma ile sonuçlanan ilerleyici nörodejeneratif bir hastalıktır [171]. Çok sayıda genetik ve çevresel faktör AH gelişimi için risk faktörlerini belirlemekte, hastalığın başlangıç yaşını ve ilerleme sürecini etkilemektedir. Bu faktörlerin çoğunun AH patogeneziğine katkısı, önemi ve etkileşimleri halen tam olarak anlaşılamamıştır. AH'a neden olan mekanizmaların aydınlatılması için araştırmalar devam etmektedir. AH için birçok aday risk geni belirlenmiş, ancak bu genlerin hastalık ile ilişkileri gerçekleştirilen çalışmalarla tam olarak doğrulanamamış, aday genlerin hastalık ile ilişkileri hakkında birbirinden farklı sonuçlar elde edilmiştir [4].

Tez çalışması kapsamında hasta grubunda *PSEN1* geni kodlama yapan bölgelerinde mutasyon taraması yapılmıştır. Kontrol ve hasta gruplarında *APOE* genine ait  $\epsilon 2$ ,  $\epsilon 3$  ve  $\epsilon 4$  alelleri incelenmiştir. Yapılan sekans analizleri sonucunda yalnızca *PSEN1* geni intron 8 bölgesinde polimorfizm (rs165932 G/T) tespit edilmiş olup, bu bölge polimorfizmin hastalıkla ilişkisinin değerlendirilmesi için kontrol grubunda da taranmıştır.

### 5.1. *PSEN1* Varyasyonları ve Alzheimer Hastalığı'nın İlişkisi

AH'da kromozom 14q24.3 bölgesinde lokalize olan *PSEN1* geni mutasyonlarının ailesel EBAH 'ın büyük çoğunluğundan sorumlu faktör olduğu bilinmektedir. Ancak bu gen, hastalığın ailesel formu ile ilişkili olduğu kadar sporadik olgularda gerçekleştirilecek araştırmalar için önemli bir aday olarak görülmüştür. Yapılan bir çalışmada, histolojik olarak doğrulanmış "sporadik" vak'alar ve bunlarla aynı yaş grubuna sahip normal bireylerin beyin dokularından ekstrakte edilen *PSEN1* transkriptlerinin RT-PZR ile analizinden sonra *PSEN1* kodlayıcı bölgelerinde hasta ve kontrol gruplarında hiçbir dizi değişikliğine rastlanmamıştır. Bu nedenle sporadik vak'alarda *PSEN1* geni kodlayıcı bölgelerinde mutasyon frekansının düşük olacağı ileri sürülmüştür [172]. Bu çalışmanın verilerine benzer şekilde çalışmamızda *PSEN1* geni kodlayıcı bölgelerinde yapılan sekans analizleri sonucunda mutasyona rastlanamamıştır.

*PSEN1* geninde yer alan mutasyonların otozomal dominant EBAH olgularının %18-50'sinden sorumlu olduğuna işaret edilmektedir. Bu nedenle *PSEN1*'in GBAH için potansiyel risk geni olduğu ileri sürülmüştür [173]. Gerçekleştirilen çalışmalar sonucu GBAH olgularında *PSEN1* geni 9.ekzonunda A/G transisyonu ile ortaya çıkan Glu318Gly (E318G) mutasyonu tanımlanmıştır. Bununla birlikte E318G mutasyonunun patojenik olmadığı bilinmekte; nadir bir polimorfizm, nötral ya da tamamlanmamış penetrans gösteren mutasyon olduğu düşünülmektedir [174]. Gerçekleştirilen başka bir çalışmada ise E318G varyantının *APOE*  $\epsilon$ 4 taşıyıcılarında AH riskini artırdığı belirtilmiştir [175].

*PSEN1* geninde GBAH ile ilişkisi kesin olarak ortaya konan bir başka varyant ise R269H'dır. GBAH tanı kriterlerine kesin olarak uyan ve ailede etkilenen toplam dokuz birey varlığı ile üç nesil (jenerasyon) boyunca otozomal dominant geçiş gösterdiği belirlenen bu mutasyon, ikiz kardeşlerde tespit edilmiştir [176].

*PSEN1* varyasyonlarının GBAH patogenezinde etkisiz olduğuna dair kanıtların yanı sıra [177] *PSEN1* nadir varyantlarının hastalığın geç başlangıçlı formunun patogenezine katkıda bulunduğu dair kanıtlar da mevcuttur [178]. Ancak *PSEN1* GBAH ilişkisini moleküler düzeyde araştıran çalışmaların pek çoğunun çalışmamıza benzer şekilde kuvvetli bağlantılar bulamadığı görülmektedir.

*PSEN1* genindeki mutasyonların, EBAH olgularının pek çoğunda etkili olduğunun bilinmesinin ve *APOE*  $\epsilon$ 4 alelinin de GBAH ile ilişkilendirilmesinin yanı sıra; çalışmamızda tespit ettiğimiz *PSEN1* intron 8 polimorfizminin de hastalığın geç başlangıç gösteren formu ile ilişkili olduğu ileri sürülmüştür. Wragg ve arkadaşları tarafından gerçekleştirilen çalışmada alel 1 homozigotluğunun, alel 2 homozigotluğu ve alel 1/2 heterozigotluğu ile karşılaştırıldığında GBAH riskini iki kat artırdığı bulunmuştur [179]. *PSEN1* 1/1 genotipinin geç başlangıç gösteren AH vak'alarının sporadik ve ailesel formlarında risk artışı ile ilişkili olduğu gösterilmiştir [180] ancak daha sonra gerçekleştirilen sayıları 40'ı aşkın patolojik ve klinik çalışmada bu ilişki doğrulanmamıştır. Bazı çalışmalar AH'da görülen histolojik değişikliklerle intronik polimorfizm arasında bağlantı olduğunu vurgulamış, bazıları ise bu bağlantıyı ortaya koyamamıştır. Çeşitli meta-analizler ile *PSEN1* 1/1 genotipi ve EBAH/GBAH olguları arasında ilişkilendirme çalışmaları yapılmış, bu genotipin yalnızca GBAH'a yatkınlık ile ilişkili olduğu bulunmuştur. Ancak ailesel



Alzheimer vakalarında alel 1 frekans artışının, *PSEN1* ya da *PSEN2* mutasyonları ile ilişkili olduğu fakat APP mutasyonları veya GBAH ile ilişkili olmadığı da rapor edilmiştir. Bununla birlikte *PSEN1* 2/2 genotipinin hastalığın patogenezi ile ilişkili olduğunu ileri süren bazı klinik çalışmalar da mevcuttur [181].

Çalışmamızda kontrol grubunda 1/1 genotipine sahip birey sayısı 13 (% 32.5), 1/2 genotipine sahip birey sayısı 21 (% 52.5), 2/2 genotipine sahip birey sayısı ise 6 (%15.0) olarak bulunmuştur [Tablo 4.1.]

Hasta grubunda 1/1 genotipine sahip birey sayısı 11 (% 36.7), 1/2 genotipine sahip birey sayısı 15 (% 50.0), 2/2 genotipine sahip birey sayısı ise 4 (% 13.3) olarak bulunmuştur. Çalışmamız kapsamında literatürdeki birçok çalışmayı destekler şekilde rs165912 G/T polimorfizm varlığının AH bireyler ve sağlıklı bireylerde genotip ve alel frekanslarının dağılımları arasında anlamlı bir farkın olmadığı belirlenmiştir [Tablo 4.1].

Tysoe ve arkadaşlarının; otopsi ile doğrulanmış EBAH / GBAH vakaları ve geniş kontrol grubu ile gerçekleştirdiği çalışmada *PSEN1* 1/1 risk genotipi dağılımının EBAH ve GBAH vakalarında önemli derecede artış göstermediği belirtilmiştir [182].

Çin populasyonunda gerçekleştirilen çalışmada *APOE* ε4 aleli dağılımı ve *PSEN1* intron 8 polimorfizminin AH ile ilişkisi birlikte ve ayrı parametreler şeklinde değerlendirilmiş, *PSEN1* genotiplerinin hasta ve kontrol gruplarında benzer dağılım gösterdiği görülmüş, polimorfizmin *APOE* ε4 aleli ile ilişkisi ε4 aleli taşıyan AH birey sayısının azlığı nedeniyle net olarak ortaya konulamamıştır [183]. Bu çalışma, sonuçları bakımından bizim çalışmamız ile paralellik göstermektedir.

Liao ve arkadaşları tarafından gerçekleştirilen çalışmada otopsi ile tanılanan AH örneklerinde; *PSEN1* genotiplerinin; hastalığın başlangıç yaşı, ilerleme durumu; Aβ(total), Aβ(1-40), Aβ(1-42), nörofibriler yumak ve nöron miktarı parametrelerin kantitatif nöropatolojik ölçüm sonuçları karşılaştırılması amaçlanmıştır. 1/1 genotipinin kliniksel veya nöropatolojik fenotipteki herhangi bir değişiklik ile ilişkili olmadığı görülmüş, *PSEN1* intron 8 polimorfizminin AH'ın klinik ve nöropatolojik

karakteristiği üzerine önemli bir etkisi olmadığını ileri sürülmüştür [184]. Bu durum çalışmamızla uyum göstermektedir.

rs165912 G/T polimorfizmi EBAH olgularında da tespit edilmiştir [185]. Van Dujin C.M. ve arkadaşlarının Nature dergisinde yayınlanan çalışmasında *PSEN1* mutasyonu taşıyan ve taşımayan EBAH vakaları, aynı zamanda bunlarla uygunluk gösteren kontrol grupları kullanılmış, *PSEN1* intron 8 polimorfizmi, promotor polimorfizmi ve *PSEN1* geni yukarı bölgesinde yerleşen basit ardışık tekrar (STR) polimorfizmi D14S1028 birlikte değerlendirilmiştir. Bu çalışma sonucu EBAH vakalarında *PSEN1* geninin promotor ya da düzenleyici bölgesinde yer alan polimorfizm ya da mutasyonların *PSEN1* intron 8 polimorfizminden daha etkili olduğu ileri sürülmüş, Wragg ve arkadaşlarının GBAH olgularındaki bulgularının aksine, EBAH olgularında *PSEN1* geni alel 2 homozigotluğunun artmış olduğunu göstermişlerdir [186].

Gerçekleştirilen bir diğer çalışmada Bağlı ve arkadaşları Alman popülasyonu bazında *PSEN1* intron 8 polimorfizminin oluşturduğu genotip ve alel frekansları arasındaki dağılımın AH ve kontrol bireylerde önemli derecede farklılık göstermediğini rapor etmişlerdir. Bu çalışma bazında *PSEN1* genotipi ve *APOE* ε4 aleli dağılımı ile ilgili bir ilişkide bulunamamıştır. Bu çalışma değerlendirilen parametreler ve sonuçları açısından çalışmamız ile paralellik göstermektedir [187].

51 aile bazında gerçekleştirilen çalışmada, *PSEN1* ve *APOE* polimorfizmi için içerisinde GBAH'a sahip bireyler bulunan ailelere ilişki analizleri, koşullu lojistik regresyon ve geleneksel bağlantı çalışma metodları uygulanmış, bu analizler sonucu *PSEN1* intron 8 polimorfizmi ile GBAH arasında ilişki bulunamamıştır [188]. Çalışmamız bu çalışmanın sonuçları ile benzerlik göstermektedir.

Çin popülasyonunda 2002 yılında gerçekleştirilen bir çalışmada ise *PSEN1* alel 1 frekansının AH grubunda, diğer çalışmalara göre yüksek olduğu bildirilmiştir [189].

2007 yılında gerçekleştirilen AH riski ve *PSEN1* intron 8 polimorfizmi meta-analiz ve ilişkilendirme çalışmasında *PSEN1* geni alel 2 homozigotluğunun çalışma yaptıkları 85 GBAH bireyde artış gösterdiğini belirlemişlerdir (göreceli risk 2.38 ; % 95 güven aralığı 1.07-5.29, p<0.05). Bununla birlikte 85 GBAH

bireyden oluşan grup bazında *PSEN1* 2/2 genotipi ve *APOE* ε4 aleli AH gelişiminde bağımsız faktörler olarak görülmüştür. Ancak *PSEN1* 2/2 genotipi tek başına Avrupa alt grubu için AH gelişimi ile bağlantılı bulunmuştur (göreceli risk 1.19, 95% güven aralığı 1.02-1.37,  $p < 0.05$ ). Bu durumda *PSEN1* 2/2 genotipinin GBAH için İspanya popülasyonu ve muhtemel olarak Avrupa popülasyonu için risk faktörü olduğu belirtilmiştir [181].

Dursun ve arkadaşları tarafından Türk popülasyonunda gerçekleştirilen çalışmada, intronik polimorfizmle ilişkili genotip ve alel frekanslarının kontrol ve hasta grubundaki dağılımında anlamlı bir farkın olmadığı belirtilmiş, literatürde genel risk faktörü olarak belirtilen 1/1 genotipinin Türk popülasyonunda GBAH gelişim riskini artırdığı yönünde bulguya rastlanmamıştır [191]. Çalışmamız sonucu elde ettiğimiz veriler de bu sonucu desteklemektedir.

Rassas ve arkadaşları tarafından Tunus popülasyonunda gerçekleştirilmiş çalışma kapsamında *PSEN1* intron 8 polimorfizmi ve *APOE* ε4 alel varlığı birlikte ve bağımsız parametreler olarak değerlendirilmiş *PSEN1* genotip ve alel frekanslarının dağılımında kontrol ve hasta grupları arasında önemli bir fark bulunamamıştır. *PSEN1* genotipleri dağılımı *APOE* ε4 aleli varlığına göre birlikte değerlendirildiğinde de ilişki ortaya konulamamıştır [192].

*PSEN1* geninde 8. ve 9. ekzonlar arasında yer alan intron 8'de görülen bu polimorfizmin, konumu nedeniyle *PSEN1* proteininde, dolayısıyla AH patogenezinde biyolojik herhangi bir etkisinin olma olasılığı düşüktür. Bu durum üç şekilde açıklanabilmektedir:

- 1) *PSEN1* geni intron 8 polimorfizmi hastalıkla biyolojik olarak ilişkilidir,
- 2) Polimorfizm *PSEN1* geni üzerinde farklı bir yerde bulunan ve hastalıkla biyolojik olarak ilişkili başka bir değişkenle bağlantılıdır,
- 3) Polimorfizmin bağlantı gösterdiği bölge hastalıkla biyolojik olarak ilişkili ve polimorfizme çok yakın olan bir gen ile çakışır [179].

Bununla birlikte ekzon 8 ve ekzon 9 arasındaki bu intronik polimorfizmin bulunduğu yer nedeniyle farklı bir kırılma varyantı oluşturabileceği ve bu açıdan hastalıkla doğrudan etkileşim içerisinde olabileceği düşünülmektedir. Ekzon 8 'in bazı dokularda alternatif olarak kırılmaya uğradığı gösterilmiştir. Yapılan bir çalışmada intron 8'in akseptör bölgesindeki bir mutasyonun ekzon

9'un ortadan kaldırılmasına neden olarak EBAH nedeni olduğu belirlenmiştir [179]. Bunlara ek olarak ekzon 8'in EBAH-ilişkili mutasyon frekansının yüksek olduğu bir bölge olduğu belirtilmiştir; ancak polimorfizmin populasyonlar arası heterojenite göstermesi, hastalığın patogeneziyle ilişkili olduğuna dair görüşleri desteklememektedir. Aynı zamanda, bu polimorfizmin AH'da A $\beta$  birikiminin moleküler formunu ve miktarını etkilemediği gösterilmiştir [184]. Bu sonuçlar, bu polimorfizmin *PSEN1* geni üzerinde bulunup hastalıkla biyolojik olarak ilişkili bir değişken ile bağlantı gösterdiği görüşünü belirgin kılmaktadır. 1/1 genotipine sahip hastaların açık okunma çerçevelerinin dizi analizleri sonucu kodlayan bölgelerde herhangi bir değişiklik açığa çıkarılamamıştır. Bu durum *PSEN1*'de intronik polimorfizmle bağlantılı bir değişkenin promotor bölgede veya kodlama yapmayan bir bölgede bulunduğunu düşündürmektedir [179].

Sonuç olarak çalışmamızda *PSEN1* rs165932 (G/T) intronik polimorfizmi ile AH patogenezi arasında herhangi bir ilişki belirlenmemiştir. Bulgularımız farklı populasyonlarda 1/1 ya da 2/2 genotiplerinin hastalık riskini artırdığı yönündeki öngörüyü desteklememektedir. Ancak ilişkinin tam olarak ortaya konulması için hasta ve kontrol sayılarının artırılması, homojen ve kapalı populasyonlarda çalışılması gerekmektedir. Polimorfizmin *PSEN1* geninde alternatif kırılma sürecine etkisinin belirlenmesi önemlidir. *PSEN1* geninin promotor bölgesi veya düzenleyici bölgeler üzerindeki başka değişkenlerle etkileşiminin araştırılması ve daha sonra da bu değişkenlerin hastalıkla olan ilişkilerinin belirlenmesi, polimorfizmin fonksiyonunun aydınlatılması için bir yol olabilir.

## **5.2. APOE Geni $\epsilon$ 2, $\epsilon$ 3 ve $\epsilon$ 4 Polimorfizmleri ile Alzheimer Hastalığı'nın İlişkisi**

*APOE* geni 19. kromozomun uzun kolunda yer alan; 4 ekzon ve 3 introna sahip 3597 bp uzunluğunda bir gendir ve 299 amino asitten oluşan 34 kDA moleküler ağırlığa sahip bir proteini kodlar [114]. *APOE* geninde yer alan iki polimorfik bölge  $\epsilon$ 2,  $\epsilon$ 3 ve  $\epsilon$ 4 olmak üzere üç alelin oluşumundan sorumludur. AH için bilinen en önemli risk faktörlerinden biri *APOE*  $\epsilon$ 4 izoformunun varlığıdır. Pek çok çalışmada  $\epsilon$ 4 aleli taşıyıcılığının AH başlangıç yaşını ve hastalığın gelişim sürecini etkilediğini gösterilmiştir [7].

Çalışma grubumuzda *APOE* genindeki  $\epsilon 2$ ,  $\epsilon 3$  ve  $\epsilon 4$  polimorfizmlerinin genotip frekansları kontrol grubunda  $\epsilon 2/\epsilon 3$  (% 4),  $\epsilon 3/\epsilon 3$  (% 82.5) ve  $\epsilon 3/\epsilon 4$  (%7.5), hasta grubunda  $\epsilon 2/\epsilon 3$  (% 7.5),  $\epsilon 2/\epsilon 4$  (% 3.3),  $\epsilon 3/\epsilon 3$  (% 50.0),  $\epsilon 3/\epsilon 4$  (% 30.0) ve  $\epsilon 4/\epsilon 4$  (% 6.7) olarak bulunmuştur. *APOE* genindeki  $\epsilon 2$ ,  $\epsilon 3$  ve  $\epsilon 4$  polimorfizmleri genotip frekansları açısından değerlendirildiğinde hasta ve kontrol grupları arasında  $\epsilon 3/\epsilon 3$  ve  $\epsilon 3/\epsilon 4$  genotipleri açısından anlamlı bir farkın olduğu tespit edilmiştir.  $\epsilon 3/\epsilon 3$  genotip frekansı kontrol grubunda, hasta grubuna göre anlamlı derecede yüksek iken,  $\epsilon 3/\epsilon 4$  genotip frekansı ise hasta grubunda kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksek bulunmuştur [ Tablo 4.2.]

De-Andrade ve arkadaşları tarafından gerçekleştirilen çalışmada [192] bizim çalışmamıza benzer şekilde hasta grubunda  $\epsilon 2/\epsilon 2$  genotipine sahip birey bulunmamıştır. Ancak söz konusu çalışmadan farklı olarak çalışmamızda kontrol grubunda  $\epsilon 4/\epsilon 4$  genotipinde bireye rastlanmamıştır [ Tablo 5.1].

Brezilya popülasyonunda gerçekleştirilmiş olan bir çalışmada [193]  $\epsilon 3/\epsilon 4$  genotip frekansının hasta grubunda,  $\epsilon 3/\epsilon 3$  genotip frekansının ise kontrol grubunda anlamlı düzeyde yüksek olduğu rapor edilmiştir. Çalışmamıza benzer şekilde, söz konusu çalışmada kontrol ve hasta grubunda  $\epsilon 2/\epsilon 2$  genotipine sahip bireye rastlanmamıştır. Bu çalışma, hasta grubunda  $\epsilon 2/\epsilon 4$  genotipli bireyin olmaması ve kontrol grubunda  $\epsilon 4/\epsilon 4$  genotipli bireylerin varlığı ile çalışmamızdan farklılık göstermektedir [Tablo 5.1].

İşbir ve arkadaşlarının gerçekleştirdiği çalışma [194] hasta ve kontrol grubunda  $\epsilon 2/\epsilon 2$  genotipinde bireye, kontrol grubunda ise  $\epsilon 4/\epsilon 4$  genotipine sahip bireye rastlanmaması ile çalışmamızla benzerlik göstermektedir [Tablo 5.1].

Yokeş ve arkadaşları tarafından gerçekleştirilen çalışmada genotip frekansları hasta grubunda  $\epsilon 2/\epsilon 3$  (% 11.8),  $\epsilon 2/\epsilon 4$  (% 0.8),  $\epsilon 3/\epsilon 3$  (% 71.7),  $\epsilon 3/\epsilon 4$  (% 15.7) ; kontrol grubunda  $\epsilon 2/\epsilon 3$  (% 7.4),  $\epsilon 3/\epsilon 3$  (% 63.2),  $\epsilon 3/\epsilon 4$  (% 29.4) olarak belirtilmiştir [195]. Türkiye’de gerçekleştirilen çalışmada hasta grubunda  $\epsilon 2/\epsilon 2$ ,  $\epsilon 2/\epsilon 4$  ve  $\epsilon 4/\epsilon 4$ , kontrol grubunda ise  $\epsilon 2/\epsilon 2$  ve  $\epsilon 4/\epsilon 4$  genotiplerine rastlanılmamıştır, bu durum çalışmamızda ortaya çıkan sonuçlarla uyum göstermektedir [Tablo 5.1].

**Tablo 5.1. Farklı çalışmalar temelinde APOE genotip ve alel frekans bulguları**

	Genotip Frekansları (%)														Alel Frekansları (%)							
	Hasta Grubu							Kontrol Grubu							Hasta Grubu				Kontrol Grubu			
	ε2/ε2	ε2/ε3	ε2/ε4	ε3/ε3	ε3/ε4	ε4/ε4	ε2/ε2	ε2/ε3	ε2/ε4	ε3/ε3	ε3/ε4	ε4/ε4	ε2	ε3	ε4	ε2	ε3	ε4				
Araştırmacı/Yayın Tarihi	Populasyon	0.0	7.5	3.3	50.0	30.0	6.7	0.0	4.0	0.0	82.5	7.5	0.0	6.7	70.0	23.3	5.0	91.3	3.7			
Çalışmamız	Türkiye	0.0	12.92	0.48	57.89	28.23	0.48	0.0	16.82	0.91	68.18	13.18	0.91	6.7	78.47	14.83	8.86	83.18	7.95			
Zhou ve ark.(2012)	Çin	0.0	5.0	1.0	37.0	43.0	13.0	2.0	7.0	4.0	62.0	24.0	1.0	4.0	60.0	36.0	8.0	77.0	15.0			
B.V.P. de-Almada ve ark.(2012)	Brezilya	1.0	7.4	2.1	63.2	21.1	4.3	0.0	1.7	0.0	93.3	5.0	0.0	4.7	77.4	17.8	0.8	96.7	2.5			
Yıldız ve ark.(2012)	Türkiye	0.0	8.3	1.7	41.7	35.0	13.3	1.4	7.0	1.4	69.0	18.3	2.8	5.0	63.5	31.65	5.6	81.65	12.65			
Rassas ve ark.(2011)	Tunus	-	7.4	6.6	28.2	42.3	15.2	0.7	17.1	4.1	55.8	20.0	2.3	7.3	53.1	39.6	11.3	74.3	14.3			
Sando ve ark.(2008)	Norveç	0.3	7.4	6.6	28.2	42.3	15.2	0.7	17.1	4.1	55.8	20.0	2.3	7.3	53.1	39.6	11.3	74.3	14.3			
Aybek ve ark. (2007)	Türkiye	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	21.0	-	-	9.0			
Lavados ve ark.(2005)	Şili	0.0	11.8	17.6	47.1	23.5	0.0	0.0	22.2	0.0	55.6	22.2	0.0	15.0	65.0	20.0	11.0	78.0	11.0			
Yokeş ve ark. (2005)	Türkiye	0.0	7.4	0.0	63.2	29.4	0.0	0.0	11.8	0.8	71.7	15.7	0.0	3.7	81.6	14.7	6.3	85.4	8.3			
Tang ve ark. (2004)	Çin	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	28.6	-	-	14.2			
Clarimon ve ark.(2003)	İspanya	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	30.0	-	-	8.0			
Souza ve ark.(2003)	Brezilya	0.0	1.0	0.0	53.0	41.0	5.0	0.0	7.0	2.0	72.0	16.0	3.0	1.0	74.0	25.0	4.0	84.0	12.0			
İşbir ve ark. (2001)	Türkiye	0.0	5.7	2.9	74.3	14.3	2.9	0.0	3.4	0.0	93.1	3.4	0.0	4.2	84.2	11.4	1.7	96.5	1.7			
De-Andrede ve ark.(2000)	Avrupa	0.0	4.0	9.0	35.0	35.0	17.0	1.0	10.0	3.0	68.0	16.0	3.0	1.0	74.0	25.0	4.0	84.0	12.0			

B.V.P. de-Almada ve arkadaşlarının gerçekleştirmiş olduğu çalışmada [196] kontrol grubunda  $\epsilon_2/\epsilon_2$ ,  $\epsilon_2/\epsilon_4$  ve  $\epsilon_4/\epsilon_4$  genotipine sahip bireylerin olduğu görülmüştür. Hasta grubunda ise  $\epsilon_2/\epsilon_2$  genotipine sahip birey tespit edilmiştir. Bu bulgular çalışmamızdan farklılık göstermektedir [Tablo 5.1].

Çin popülasyonu temelinde Zhou ve arkadaşları tarafından gerçekleştirilen çalışmada [197] çalışmamıza benzer şekilde  $\epsilon_2/\epsilon_2$  genotipine sahip bireye hasta ve kontrol gruplarında rastlanılmamıştır. Kontrol grubunda  $\epsilon_4/\epsilon_4$  genotipine sahip birey varlığı ise çalışmamızdan farklılık göstermektedir [Tablo 5.1].

Rassas ve arkadaşları gerçekleştirdikleri çalışmada [198] çalışmamıza benzer şekilde  $\epsilon_2/\epsilon_2$  genotipine sahip bireye hasta grubunda rastlanılmamıştır, çalışmamızdan farklı olarak kontrol grubunda  $\epsilon_2/\epsilon_4$  ve  $\epsilon_2/\epsilon_2$  genotipine sahip bireyler tespit edilmiştir [Tablo 5.1].

Türkiye’de gerçekleştirilen bir başka çalışmada genotip frekansları hasta grubunda;  $\epsilon_2/\epsilon_3$  (% 7.4 ),  $\epsilon_2/\epsilon_4$  (% 2.1),  $\epsilon_3/\epsilon_3$  (% 63.2),  $\epsilon_3/\epsilon_4$  (% 21.1) ve  $\epsilon_4/\epsilon_4$  (% 6.3), kontrol grubunda;  $\epsilon_2/\epsilon_3$  (% 1.7),  $\epsilon_3/\epsilon_3$  (% 93.3),  $\epsilon_3/\epsilon_4$  (% 5.0) olarak belirtilmiştir [199]. Bu çalışmada çalışmamıza benzer şekilde hasta ve kontrol grubunda  $\epsilon_2/\epsilon_2$  genotipine, bunun yanı sıra kontrol grubunda  $\epsilon_3/\epsilon_4$  ve  $\epsilon_4/\epsilon_4$  genotiplerine rastlanılmamıştır. Bu açıdan söz konusu bulgular, çalışmamızda elde edilen veriler ile paralellik göstermektedir [Tablo 5.1].

Verilerimiz alel frekansı açısından değerlendirildiğinde kontrol grubunda  $\epsilon_2$  % 5.0,  $\epsilon_3$  % 91.3 ve  $\epsilon_4$  % 3.7 olarak, hasta grubunda ise  $\epsilon_2$ ,  $\epsilon_3$  ve  $\epsilon_4$  alellerinin frekansı sırasıyla % 6.7, % 70.0 ve % 23.3 olarak bulunmuştur [Tablo 4.4].

De-Andrade ve arkadaşlarının çalışmasında [192] çalışmamıza benzer şekilde  $\epsilon_3$  aleli kontrol grubunda ,  $\epsilon_4$  aleli ise hasta grubunda anlamlı düzeyde yüksek çıkmıştır [ Tablo 5.1].

Brezilya popülasyonunda gerçekleştirilmiş çalışmada [193] çalışmamız ile uyumlu şekilde  $\epsilon_3$  alel frekansının kontrol grubunda,  $\epsilon_4$  alel frekansının ise hasta grubunda anlamlı düzeyde yüksek olduğu belirlenmiştir [ Tablo 5.1].

Clarimon ve arkadaşları tarafından gerçekleştirilen çalışmada  $\epsilon 4$  alel frekansı Alzheimer hasta grubunda (% 30) kontrol grubuna göre (% 8) anlamlı düzeyde yüksek bulunmuştur [200] [ Tablo 5.1.].

Thang ve arkadaşları tarafından 2004 yılında gerçekleştirilen çalışmada  $\epsilon 4$  aleli hasta grubunda (% 28.6) kontrol grubuna göre (% 14.2) anlamlı düzeyde yüksek bulunmuştur [201] [ Tablo 5.1.].

2005 yılında gerçekleştirilen bir diğer çalışmada kontrol ve hasta gruplarında  $\epsilon 2/ \epsilon 2$  ve  $\epsilon 4/ \epsilon 4$  genotiplerine rastlanılmamış genotip ve alel frekansları açısından kontrol ve hasta grupları arasında fark bildirilememiştir [202] [ Tablo 5.1.].

İşbir ve arkadaşlarının çalışmasında alel frekansları kontrol grubunda  $\epsilon 2$  (% 1.7),  $\epsilon 3$  (% 96.5) ve  $\epsilon 4$  (% 1.7) , hasta grubunda ise  $\epsilon 2$  (% 4.2),  $\epsilon 3$  (% 83.2) ve  $\epsilon 4$  (% 11.4) olarak bildirilmiştir [194]. Çalışmamız bu çalışma sonucu elde edilen alel frekansları ile tam paralellik göstermektedir [Tablo 5.1.].

Yokeş ve arkadaşları tarafından gerçekleştirilen çalışmada  $\epsilon 2$ ,  $\epsilon 3$  ve  $\epsilon 4$  alel frekansları kontrol grubunda sırasıyla % 6.3 , % 85.4 ve % 8.3, hasta grubunda ise % 3.7, % 81.6 ve % 14.7 olarak bildirilmiştir [195]. Söz konusu çalışmada  $\epsilon 2$  alel frekansı çalışmamızdan farklı olarak kontrol grubunda yüksek bulunmuştur,  $\epsilon 4$  alel frekansı ise çalışmamıza paralel şekilde hasta grubunda anlamlı düzeyde yüksek olarak bildirilmiştir [Tablo 5.1.].

Türkiye’de 56 kontrol ve 62 hasta ile gerçekleştirilen çalışmada  $\epsilon 4$  aleli hasta grubunda (% 21.0), kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde yüksek bulunmuştur [203]. Bu çalışmanın sonuçları bizim sonuçlarımız ile uyum göstermektedir [ Tablo 5.1.].

Rassas ve arkadaşları gerçekleştirdikleri çalışmada alel frekansları hasta grubunda  $\epsilon 2$  (% 5.0),  $\epsilon 3$  (% 63.5) ve  $\epsilon 4$  (% 31.65) , kontrol grubunda ise  $\epsilon 2$  (% 5.6),  $\epsilon 3$  (% 81.65) ve  $\epsilon 4$  (% 12.65) olarak bildirilmiştir [198] [Tablo 5.1.].

B.V.P.De-Almada ve arkadaşlarının çalışması kapsamında [196]  $\epsilon 3$  alel frekansı kontrol grubunda,  $\epsilon 4$  alel frekansı ise hasta grubunda anlamlı düzeyde yüksek bulunurken,  $\epsilon 2$  aleli için gruplar arasında anlamlı düzeyde farklılık görülemedi. Çalışmamız sonucunda elde ettiğimiz sonuçlar, bu çalışmanın sonuçları ile paralellik göstermektedir [Tablo 5.1.].



Çin popülasyonu temelinde Zhou ve arkadaşları tarafından gerçekleştirilen çalışmada [194]  $\epsilon 4$  alel frekansının hasta grubunda anlamlı düzeyde yüksek olduğu belirtilmiştir. Bu çalışma  $\epsilon 4$  alel frekans verileri açısından çalışmamızla uyum göstermektedir [Tablo 5.1.].

Türkiye’de gerçekleştirilen bir başka çalışmada  $\epsilon 2$ ,  $\epsilon 3$  ve  $\epsilon 4$  alel frekansları sırasıyla kontrol grubunda; % 0.8, % 96.7 ve % 2.5, hasta grubunda; % 4.7 ,% 77.4 ve %17.8 olarak bulunmuştur [199]. Bu çalışma  $\epsilon 3$  alelinin kontrol,  $\epsilon 4$  alelinin ise hasta grubunda anlamlı düzeyde yüksek bulunması ile çalışmamızla paralellik göstermektedir; ancak çalışmamızdan farklı olarak  $\epsilon 2$  aleli hasta grubunda kontrol grubundan anlamlı düzeyde yüksek bulunmuştur [Tablo 5.1.].

Geç başlangıçlı AH, multifaktöriyeldir, bu nedenle ortaya çıkışı genetik ve genetik olmayan faktörler tarafından desteklenir. GBAH için kabul edilen risk faktörlerinin başında *APOE*  $\epsilon 4$  taşıyıcılığı ve ailede demans öyküsünün varlığı gelmektedir [199]. Çalışmamızda yapılan pek çok çalışmada olduğu gibi [192,193,194,195,196,197,198,199,200,201,202,203]  $\epsilon 4$  aleli ile AH arasında güçlü bir ilişki olduğu ortaya konmuştur [ Tablo 4.5.]. Bunun yanı sıra ailesinde demans hikâyesi olan AH bireylerin oluşturduğu grupta belirlenen *APOE*  $\epsilon 4$  alel frekansı, ailesinde demans hikayesi bulunmayan hastalarımıza göre anlamlı düzeyde yüksek bulunmuştur [Tablo 4.6.]. Bu sonuç *APOE*  $\epsilon 4$  aleli taşıyıcılığı ile ailesinde demans hikâyesinin bulunması etkenlerinin birlikte bulunmasının AH gelişim riskini artırabildiği görüşünü desteklemektedir.

Bununla birlikte AH ve *APOE* polimorfizmleri arasındaki ilişki çalışmalar ve popülasyonlar bazında farklılık göstermektedir. Tablo 5.1.’de *APOE*  $\epsilon 2$ ,  $\epsilon 3$  ve  $\epsilon 4$  polimorfizmlerine ilişkin farklı çalışmalarda elde edilen genotip ve alel frekansları verilmiştir.

*APOE* polimorfizmleri AH patogenezinin oluşum ve ilerleme sürecinde önemli rol oynamaktadır.  $\epsilon 4$  alelinin kalıtımının AH riskini artırdığına,  $\epsilon 3$ ’ün ise nötral etki gösterdiğine dair kanıtlar mevcuttur [196] ,  $\epsilon 2$  alelinin kalıtımının ise AH riskini azaltarak koruyucu etki gösterdiği düşünülmektedir [199] bununla birlikte bu koruyuculuk her popülasyonda gösterilememiştir [196,204,205]. Çeşitli hipotezler Apo-E’nin amiloid plak birikimi ve nörofibriler yumak oluşumunu etkileyen yollarda işlev gördüğünü ileri sürmektedir [199,206]; ancak

mekanizmalar henüz tam olarak aydınlatılmış değildir. Çalışmamız da literatür ile uyumlu olarak AH gelişiminde  $\epsilon 4$  alelinin önemini gösterir niteliktedir. Ayrıca çalışmamız kapsamında ailesinde demans öyküsü olan hastalarda  $\epsilon 4$  alel frekansının anlamlı düzeyde yüksek bulunması, hastalığın kalıtsal temelinin göz ardı edilemeyeceğini ve hastalığa yatkınlıkta kuvvetli bir belirleyici olarak kullanılabileceğini desteklemektedir [197].

Çalışmamızda  $\epsilon 2$  alelinin dağılımı açısından kontrol ve hasta grubu arasında anlamlı bir fark bulunamamıştır. Bu sonuç literatürdeki bazı verileri desteklemektedir [196,204,205]. Ancak  $\epsilon 2$  alelinin koruyucu bir faktör olarak bildirildiği çalışmalar da literatürde mevcuttur [199]. Çalışmamızda görülen farkın muhtemel sebeplerinden biri  $\epsilon 2$  alel frekansının hasta grubumuzda literatüre göre yüksek, kontrol grubunda ise literatürle kıyaslandığında düşük olmasıdır. Bu durum iki grup arasındaki farkın anlamlı görülmemesinin nedeni olabilir, bir diğer yaklaşım ise çalışma grubumuzda  $\epsilon 2$  alelinin AH için koruyucu bir niteliğinin olmadığı yönündedir.

Çalışma sonuçlarımıza göre *APOE*  $\epsilon 4$  aleli taşıyıcılığı ile AH arasında kuvvetli ilişki olduğu gösterilmiştir [Tablo 4.3.]. *PSEN1* geni kodlanan bölgelerin DNA dizi analizi sonucunda, yalnızca intron 8 bölgesinde rs165932 (G/T) polimorfizmine rastlanmıştır; ancak rs165932 (G/T) polimorfizmi ile AH arasında herhangi bir ilişki bulunamamıştır. Çalışma grubumuzda *PSEN1* genotipleri dağılımı ve  $\epsilon 4$  aleli taşıyıcılığı birlikte değerlendirildiğinde anlamlı bir farklılık bulunamamıştır [Tablo 4.5.].

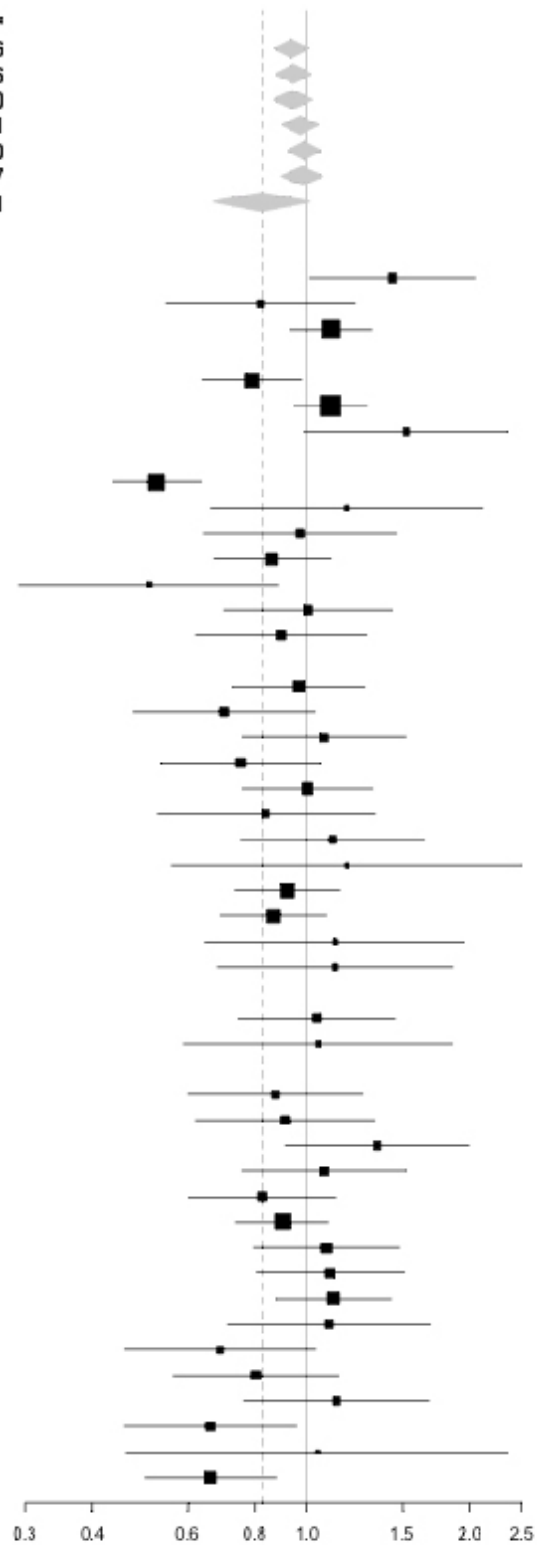
**Tablo 5.2.** Tüm yayınlanan ilişki çalışmalarında *PSEN1* alel ve genotip dağılımının özeti (etnik grup temelinde). 207 numaralı kaynaktan değiştirilerek alınmıştır. [207]

TÜM YAYINLANAN İLİŞKİ ÇALIŞMALARININ ALEL VE GENOTİP DAĞILIMININ ÖZETİ (ETNİK GRUP TEMELİNDE)							
	# Durum Kontrol Örnekleri		Aleller		Genotipler		
			G-Aleli (2) (frekans)	T-Aleli (1) (frekans)	G/G (frekans)	G/T (frekans)	T/T (frekans)
Kafkas	26	AH	0.44	0.56	1081	2760	1775
		Kontrol	0.45	0.56	(0.192) 986 (0.190)	(0.491) 2647 (0.510)	(0.316) 1555 (0.300)
Afrika Kökenli	1	AH	0.21	0.79	2 (0.069)	8 (0.276)	19
		Kontrol	0.20	0.80	3 (0.060)	14 (0.280)	(0.655) 33 (0.660)
Asya	11	AH	0.33	0.67	145	688	633
		Kontrol	0.39	0.61	(0.099) 286 (0.147)	(0.469) 957 (0.491)	(0.432) 706 (0.362)
Diğer / Karışık	6	AH	0.39	0.61	147	532	386
		Kontrol	0.39	0.62	(0.138) 111 (0.132)	(0.500) 427 (0.507)	(0.362) 304 (0.361)
TOTAL	44	AH	0.41	0.59	1375	3988	2813
		Kontrol	0.43	0.58	(0.168) 1386 (0.173)	(0.488) 4045 (0.504)	(0.344) 2598 (0.324)

**Tablo 5.3.** *PSEN1* AlzGene meta-analiz verileri. [207]

**AlzGene meta-analysis for *PSEN1* (rs165932): G vs. T**

	OR	95% CI	I <sup>2</sup>
<b>All studies</b>	<b>0.93</b>	<b>[0.87,1.01]</b>	<b>56</b>
<b>All excl initial</b>	<b>0.94</b>	<b>[0.87,1.02]</b>	<b>56</b>
<b>All excl HWE violations</b>	<b>0.94</b>	<b>[0.86,1.02]</b>	<b>60</b>
<b>Caucasian studies</b>	<b>0.97</b>	<b>[0.90,1.05]</b>	<b>41</b>
<b>Caucasian excl initial</b>	<b>0.99</b>	<b>[0.92,1.06]</b>	<b>30</b>
<b>Caucasian excl HWE violations</b>	<b>0.98</b>	<b>[0.90,1.07]</b>	<b>47</b>
<b>Asian studies</b>	<b>0.82</b>	<b>[0.67,1.01]</b>	<b>71</b>
<b>Study specific ORs</b>			
Giedraitis, 2009 [C]	1.44	[1.01,2.05]	
Dursun, 2008 [O] #	0.82	[0.55,1.23]	
Martinez-Garcia, 2008 [C]	1.11	[0.93,1.32]	
Corder, 2008 [C] ‡	-	-	
Belbin, 2008 [C]	0.79	[0.64,0.98]	
Li, 2008 [C]	1.11	[0.95,1.30]	
Rodriguez, 2007 [C]	1.53	[0.99,2.36]	
Pandey, 2007 [O] †	-	-	
Jia, 2006 [A]	0.53	[0.44,0.64]	
Chandak, 2002 [O]	1.18	[0.66,2.12]	
Yamada, 2002 [A]	0.97	[0.64,1.47]	
Dermaut, 2001 [C]	0.86	[0.67,1.11]	
Cui, 2000 [A]	0.51	[0.29,0.89]	
Kim, 2000 [A]	1.00	[0.70,1.44]	
Rodriguez, 2000 [C]	0.90	[0.62,1.29]	
Papassotiropoulos, 2000 (II) [C] ‡	-	-	
Combarros, 1999 [C] #	0.97	[0.73,1.28]	
van Duijn, 1999 [C]	0.70	[0.48,1.03]	
Bagli, 1999 [C]	1.07	[0.76,1.52]	
Tilley, 1999 [C]	0.75	[0.53,1.06]	
Yasuda, 1999 [A]	1.00	[0.76,1.32]	
Wu, 1999 [A]	0.84	[0.53,1.34]	
Scacchi, 1999 [C]	1.12	[0.75,1.65]	
Liao, 1999 [O]	1.18	[0.56,2.51]	
Taddel, 1998 [C] #	0.92	[0.73,1.15]	
Wang, 1998 [C]	0.87	[0.69,1.09]	
Kowalska, 1998 [C]	1.13	[0.65,1.96]	
Hu, 1998 [A]	1.13	[0.68,1.87]	
Aldudo, 1997 [C] ‡	-	-	
Helisalmi, 1997 [C]	1.04	[0.74,1.46]	
Sodeyama, 1997 [A]	1.05	[0.59,1.86]	
Yamada, 1997 [A] ‡	-	-	
Singleton, 1997 [C] #	0.87	[0.60,1.27]	
Korovaitseva, 1997 [C]	0.91	[0.62,1.33]	
Brookes, 1997 [C]	1.35	[0.91,2.00]	
Lendon, 1997 [C]	1.07	[0.75,1.53]	
Ezquerro, 1997 [C]	0.83	[0.60,1.13]	
Scott, 1997 [O]	0.90	[0.74,1.09]	
Nishiwaki, 1997 [A]	1.09	[0.79,1.48]	
Cai, 1997 [O]	1.10	[0.80,1.51]	
Tysoe, 1997 [C]	1.12	[0.87,1.43]	
Sorbi, 1997 [C]	1.10	[0.71,1.69]	
Isoc, 1996 [A]	0.69	[0.46,1.04]	
Kehoe, 1996 (II) [C]	0.80	[0.56,1.15]	
Perez-Tur, 1996 [C]	1.13	[0.76,1.68]	
Higuchi, 1996 [A]	0.86	[0.46,0.96]	
Wragg, 1996, USA [D] •	1.04	[0.46,2.37]	
Wragg, 1996, USA & Europe [C] •	0.66	[0.50,0.88]	



• Initial study † No data provided, or data not eligible for inclusion ‡ Overlap # HWE violation in controls ( $P \leq 0.05$ )  
A Asian C Caucasian D African-descent O Other/Mixed

Literatür bilgileri ve çalışma sonuçlarımız birlikte değerlendirildiğinde *APOE* ve rs165932 (G/T) polimorfizmleri açısından pek çok farklı sonuç olduğu görülmektedir [Tablo 5.1., Tablo 5.2. ve Tablo 5.3]. Sonuçların çeşitlilik göstermesinin çalışma gruplarının farklı etnik kökenden oluşması, farklı sayı ve nitelikte (klinik ya da otopsi ile tanılama) hasta gruplarının kullanılmasından kaynaklandığı düşünülebilir. Hasta grubunda *PSEN1* geni kodlayıcı bölgelerinde mutasyona rastlanılamamıştır. Alzheimer Hastalığı gibi kompleks multifaktöriyel hastalıklarda hastalığın oluşumunda ve gelişiminde etkisi olan pek çok farklı gen ve polimorfizmin bir arada etkileşim göstererek çevre ile birlikte sürece katıldığı düşünüldüğünde bu sonuç olası görülmektedir.

Çalışma sonuçlarının, Alzheimer tanısı alan bireylerde hastalığın seyri ve ailelerinde yatkınlık açısından bilgilendirici olacağı düşünülmektedir. Ayrıca yapılan literatür taramasında ülkemizde bu hasta grubunda *PSEN1* geni mutasyon taramasına yönelik çalışmaların çok sınırlı olduğu, *APOE* alel ve genotip frekanslarının ise çalışmalar bazında farklılık gösterdiği görülmüştür. Çalışmamız, ülkemizde GBAH olgularında *PSEN1* geni mutasyon taramasının gerçekleştirilmiş olması ve bu sonuçların *APOE* alel ve genotipleri dağılımları ile birlikte değerlendirilmesi açısından önem taşımaktadır.

Bu bağlamda, bu tez çalışmasında elde ettiğimiz verilerin daha geniş hasta ve kontrol grupları kullanılarak, daha çok sayıda aday gen ve polimorfizmin birlikte değerlendirilerek araştırılması gerektiği kanısındayız.

## KAYNAKLAR

- [1] Nizzari, M., Thellung, S., Corsaro, A., Villa, V., Pagano, A., Porcile, C., Russo, C., Fluiro, T., Neurodegeneration in Alzheimer Disease: Role of Amyloid Precursor Protein and Presenilin 1 Intracellular Signaling, *Journal of Toxicology*, 1-13, **2012**.
- [2] Alzheimer's Association, Alzheimer's disease Facts and Figures, *Alzheimer's & Dementia*, 9 (2), **2013**.
- [3] Tysoe, C., Whittaker, J., Cairns N.J., Atkinson, P.F., Harrington, C.R., Xuereb, J., Wilcock, G., Rubinsztein, D.C., Presenilin-1 intron 8 polymorphism is not associated with autopsy-confirmed late-onset Alzheimer's Disease, *Neuroscience Letter*, 222(1): 68-9, **1997**.
- [4] Ertekin Taner, N., and Genetics of Alzheimer's disease: Lessons Learned in Two Decades, *Turkish Journal of Neurology*, 16:1-11, **2010**.
- [5] Strooper, D.B., Loss-of-function presenilin mutations in Alzheimer disease, *EMBO reports*, 8(2): 141-146, **2007**.
- [6] <http://www.molgen.ua.ac.be/ADMutations/default.cfm?MT=1&ML=6&Page=StatPerGene> ( Aralık, **2013**).
- [7] Bales, R. K., Brain lipid metabolism, apolipoprotein E and the pathophysiology of Alzheimer's disease, *Neuropharmacology*, 59: 295-30, **2010**.
- [8] Hanağası, A.H., Demans Kavramı ve Hastaya Yaklaşım, *Klinik Gelişim*,10(1):44-47, **2010**.
- [9] Selekler, K., Alois Alzheimer and Alzheimer Disease, *Turkish Journal of Geriatrics*,13(3): 9-14, **2010**.
- [10] Raskind, M.A., Carta, A.,Bravi, D., Is early-onset Alzheimer disease a distinct subgroup within the Alzheimer disease population?, *Alzheimer Disease Association Disorder*, 1: 2-6, **1995**.
- [11] Mayeux, R.,Stem., Y., Epidemiology of Alzheimer Disease, *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*,1-18, **2012**.
- [12] Tufan, İ.,Alzheimer Hastaları Durum-Öngörü-Öneri, **2012**.
- [13] Gürvit, H., Sinir Sisteminin Dejeneratif Hastalıkları. Demans Sendromu, Alzheimer Hastalığı ve Alzheimer Dışı Demanslar., In: Öge AE; eds. Nöroloji. İstanbul: Nobel Matbaacılık:367-415, **2004**.

- [14] Bennett, D.A., Schneider, J.A., Wilson, R.S. et al., Neurofibrillary tangles mediate the association of amyloid load with clinical Alzheimer disease and level of cognitive function, *Archives Neurology*, 61:378, **2004**.
- [15] Goedert, M., Spillantini, M.G., A century of Alzheimer's Disease, *Science*, 314: 777-781, **2006**.
- [16] LaFerra, M.F., Amyloid- $\beta$  and tau in Alzheimer Disease, *Nature Reviews, Neuroscience*, May **2008**.
- [17] Glenner, G.G, Wong, C.W., Alzheimer's disease: initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 120: 885-90, **1984**.
- [18] Bird, T.D., Miller, B.L., Alzheimer's disease and other dementias. In: Kaspar DL et al.; eds. *Harrison's Principles of Internal Medicine*. 16th ed. McGraw-Hill; 2393-2406, **2005**.
- [19] Iwatsubo, T., Odaka, A., Suzuki, N. et al., Visualization of A beta 42(43) and A beta 40 in senile plaques with end-specific A beta monoclonals: evidence that an initially deposited species is A beta 42(43), *Neuron*, 13: 45-53, **1994**.
- [20] Cummings, J.L., Alzheimer's disease, *The New England Journal of Medicine*, 351: 56, **2004**.
- [21] Georganopoulou, D.G, Chang, L., Nam, J.M. et al., Nanoparticle-based detection in cerebral spinal fluid of a soluble pathogenic biomarker for Alzheimer's disease, *Proceedings of National Academy of Sciences of the United States of America*, 102: 2273, **2005**.
- [22] Solomon, B., Protective Molecules in Alzheimer's disease: Therapeutic Antibodies, *Drug News Perspectives*, 15(7): 410, **2002**.
- [23] Understanding Alzheimer's disease, <http://www.webmd.com/alzheimers/guide/understanding-alzheimers-disease-basics>, (Aralık **2013**).
- [24] Zheng, L., Minguez, C.A., Hallbeck, M., Jerhammar, F., Marcusson, J., and Terman, A., Intracellular distribution of amyloid beta peptide and its relationship to the lysosomal system, *Translational Neurodegeneration*, 1:19, **2012**.
- [25] Rissman, R.A., Poon, W.W., Blurton-Jones, M. et al., Caspase-cleavage of tau is an early event in Alzheimer disease tangle pathology, *Journal of Clinical Investigation*, 114: 121, **2004**.

- [26] Namba, Y., Tomonaga, M., Kawasaki, H., Apolipoprotein-E immunoreactivity in cerebral amyloid deposits and neurofibrilar tangles in Alzheimer's Disease and kuru plaque amyloid in Creuzfeldt-Jakob Disease, *Brain Research*, 541, 163-166, **1991**.
- [27] Öge, A.E., Nöroloji İ.Ü., *İstanbul Tıp Fakültesi ve Klinik Bilimler Ders Kitapları* , Nobel Tıp Kitabevleri , **2004**.
- [28] Lurong, Q.V.K., Nguyen H.T.L., Environmental Factors in Alzheimer's and Parkinson's Diseases, *Journal Alzheimer's Disease and Parkinsonism*, 3:2, **2013**.
- [29] <http://www.hindawi.com/journals/jep/2012/472751/fig1/> (Aralık, **2013**).
- [30] Zandi, P.P, Carlson, M.C., Plassman, B.L. et al, Cache County Memory Study Investigators, Hormone replacement therapy and incidence of Alzheimer disease in older women: the Cache County Study, *Journal of The American Medical Association*, 288:2123-9, **2002**.
- [31] <http://www.nih.gov/news/pr/may2003/nia-27.htm>, (Aralık, **2013**).
- [32] Gao, S., Hugh, C., Hendrie, M.B., Hall, K.S., Hui, S., The Relationships Between Age, Sex and The Incidence of Dementia and Alzheimer Disease, *Archives of General Psychiatry*, 55, 809-815, **1998**.
- [33] Ganguli, M., Dodge, H.H., Chen, P., Belle, S., DeKosky, S.T., Ten year incidence of dementia in a rural elderly US community population: The Movies Project, *Neurology*, 54(5), 1109-1116, **2000**.
- [34] George-HyslopSt, P.H.,Tanzi , R.E., Polinsky, R.J., Haines, J.L., Nee, L., The genetic defect causing familial Alzheimer Disease maps on chromosome 21, *Science*, 235, 885-890, **1987**.
- [35] Cankurtaran, M., Arıoğul, S., Alzheimer Hastalığı Risk Faktörleri, In: Arıoğul S, ed. Geriatri ve Gerontoloji. 1. Basım Ankara: MN Medial ve Nobel, 953-968, **2006**.
- [36] Reitz, C., Tang, M.X., Luchsinger, J. et al., Relation of plasma lipids to Alzheimer disease and vascular dementia, *Archives of Neurology*, 61: 705-14, **2004**.
- [37] Richard, F., Fromentin-David, I., Ricolfi, F. et al., The angiotensin I converting enzyme gene as a susceptibility factor for dementia, *Neurology*, 56:1593-5, **2001**.
- [38] Arvanitakis, Z., Wilson, R.S., Bienias, J.L. et al., Diabetes mellitus and risk of Alzheimer disease and decline in cognitive function, *Archives of Neurology*, 61: 661-6, **2004**.



- [39] Ewins, D.L., Rossor, M.N., Butler, J. et al., Association between auto-immune thyroid disease and familial Alzheimer's disease, *Clinical Endocrinology*, 35: 93-6, **1991**.
- [40] <http://www.amaassn.org/resources/doc/genetics/geneticsofalzheimers.pdf> (**Aralık**, 2013).
- [41] Raiha, I., Kaprio, J., Koskenvuo, M., et al., Alzheimer's disease in Finnish twins, *Lancet*, 347 :573-578, **1996**.
- [42] Iivonen, S., Genetic and Expressional Studies of Alzheimer's Disease Candidate Genes Emphasis on CYP19, Seladin-1 and HSPG2 Genes, Department Of Neurology Series of Reports, 77, **2005**.
- [43] Barber, C.R., The Genetics of Alzheimer Disease , *Hindawi Publishing Corporation, Scientifica*, 1-14, **2012**.
- [44] Schellenberg, G.D., Bird, T.D., Wijsman, E.M., One, H.T., Anderson, L., Nemens, E., White, J.A., Bonnycastle, L., Weber, J.L., Alonso, M.E. et al., Genetic linkage evidence for a familial Alzheimer's disease locus on chromosome 14, *Science* , 258; 668-671, **1992**.
- [45] Rogaeve, E.I., Sherrington, R., Wu, C., Levesque, G., Liang, Y., Rogaeve, E.A., Ikeda, M., Holman, K., Lin, C., Lukiw, W.J., De Jong, P.J., Fraser, P.E., Rommens , J.M., St George-Hyslop, P., Analysis of the 5' sequence , genomic structure and alternative splicing of the presenilin-1 gene (PSEN1) associated with early onset Alzheimer disease, *Genomics*, 40(3):415-24, **1997**.
- [46] Zhang, S., Zhang, M., Cai, F., Song, W., Biological function of Presenilin and its role in AD pathogenesis, *Translational Neurodegeneration*, 2: 15, **2013**.
- [47] Ponting, C. P., Hutton, M., Nyborg, A., Baker, M., Jansen, K., Golde, T. E., Identification of a novel family of presenilin homologues, *Human Molecular Genetics* ,11: 1037-1044, **2002**.
- [48] Alzheimer's Disease Collaborative Group, The structure of the presenilin 1 (S182) gene and identification of six novel mutations in early onset AD families, *Nature Genetics*, 11: 219-222, **1995**.
- [49] Spasic, D., Annaert, W., Building gamma-secretase: the bits and pieces, *Journal of Cell Science*, 121: 413-420, **2008**.
- [50] Kovacs, D. M., Fausett, H. J., Page, K. J., Kim, T.-W., Moir, R. D., Merriam, D. E., Hollister, R. D., Hallmark, O. G., Mancini, R., Felsenstein, K. M., Hyman, B. T., Tanzi, R. E., Wasco, W. ,Alzheimer-associated presenilins 1 and 2: neuronal expression in brain and localization to intracellular membranes in mammalian cells, *Nature Medicine*, 2: 224-229, **1996**.

- [51] Takashima, A., Sato, M., Mercken, M., Tanaka, S., Kondo, S., Honda, T., Sato, K., Murayama, M., Noguchi, K., Nakazato, Y., Takahashi, H., Localization of Alzheimer-associated presenilin 1 in transfected COS-7 cells, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 227: 423-426, **1996**.
- [52] Li, J., Xu, M., Zhou, H., Ma, J., Potter, H., Alzheimer presenilins in the nuclear membrane, interphase kinetochores, and centrosomes suggest a role in chromosome segregation, *Cell*, 90: 917-927, **1997**.
- [53] Page, K., Hollister, R., Tanzi, R. E., Hyman, B. T., In situ hybridization analysis of presenilin 1 mRNA in Alzheimer disease and in lesioned rat brain, *Proceedings of National Academy of Sciences*, 93: 14020-14024, **1996**.
- [54] Li, Y.-M., Xu, M., Lai, M.-T., Huang, Q., Castro, J. L., DiMuzio-Mower, J., Harrison, T., Lellis, C., Nadin, A., Neduelil, J. G., Register, R. B., Sardana, M. K., Shearman, M. S., Smith, A. L., Shi, X.-P., Yin, K.-C., Shafer, J. A., Gardell, S. J., Photoactivated gamma-secretase inhibitors directed to the active site covalently label presenilin 1, *Nature*, 405: 689-694, **2000**.
- [55] Wolfe, M. S., Xia, W., Ostaszewski, B. L., Diehl, T. S., Kimberly, W. T., Selkoe, D. J., Two transmembrane aspartates in presenilin-1 required for presenilin endoproteolysis and gamma-secretase activity, *Nature*, 398: 513-517, **1999**.
- [56] Kopan, R., Goate, A., A common enzyme connects Notch signaling and Alzheimer's disease, *Genes Development*, 14: 2799-2806, **2000**.
- [57] De Strooper, B. Aph-1, Pen-2, and nicastrin with presenilin generate an active gamma-secretase complex, *Neuron*, 38: 9-12, **2003**.
- [58] Francis, R., McGrath, G., Zhang, J., Ruddy, D. A., Sym, M., Apfeld, J., Nicoll, M., Maxwell, M., Hai, B., Ellis, M. C., Parks, A. L., Xu, W., Li, J., Gurney, M., Myers, R. L., Himes, C. S., Hiebsch, R., Ruble, C., Nye, J. S., Curtis, D. aph-1 and pen-2 are required for Notch pathway signaling, gamma-secretase cleavage of beta-APP, and presenilin protein accumulation, *Developmental Cell*, 3: 85-97, **2002**.
- [59] Steiner, H., Winkler, E., Edbauer, D., Prokop, S., Basset, G., Yamasaki, A., Kostka, M., Haass, C. PEN-2 is an integral component of the gamma-secretase complex required for coordinated expression of presenilin and nicastrin, *The Journal of Biological Chemistry*, 277: 39062-39065, **2002**.

- [60] Kaether, C., Capell, A., Edbauer, D., Winkler, E., Novak, B., Steiner, H., Haass, C., The presenilin C-terminus is required for ER-retention, nicastrin-binding and gamma-secretase activity, *European Molecular Biology Organisation Journal*, 23: 4738-4748, **2004**.
- [61] Duff, K., Eckman, C., Zehr, C., Yu, X, Prada, C.-M., Perez-tur, J., Hutton, M., Buee, L., Harigaya, Y., Yager, D., Morgan, D., Gordon, M. N., Holcomb, L., Refolo, L., Zenk, B., Hardy, J., Youndkin, S., Increased amyloid-beta-42(43) in brains of mice expressing mutant presenilin 1, *Nature* ,383: 710-713, **1996**.
- [62] Davis, J. A., Naruse, S., Chen, H., Eckman, C., Younkin, S., Price, D. L., Borchelt, D. R., Sisodia, S. S., Wong, P. C., An Alzheimer's disease-linked PS1 variant rescues the developmental abnormalities of PS1-deficient embryos, *Neuron*, 20: 603-609, **1998**.
- [63] Qian, S., Jiang, P., Guan, X.-M., Singh, G., Trumbauer, M. E., Yu, H., Chen, H. Y., Van der Ploeg, L. H. T., Zheng, H., Mutant human presenilin 1 protects presenilin 1 null mouse against embryonic lethality and elevates A-beta-1-42/43 expression, *Neuron* , 20: 611-617, **1998**.
- [64] Citron, M., Westaway, D., Xia, W., Carlson, G., Diehl, T., Levesque, G., Johnson-Wood, K., Lee, M., Seubert, P., Davis, A., Kholodenko, D., Motter, R., Sherrington, R., Perry, B., Yao, H., Strome, R., Lieberburg, I., Rommens, J., Kim. S., Schenk, D., Fraser, P., St George Hyslop, P., Selkoe, D. J. Mutant presenilins of Alzheimer's disease increase production of 42-residue amyloid beta-protein in both transfected cells and transgenic mice., *Nature Medicine*, 3: 67-72, **1997**.
- [65] De Strooper, B., Saftig, P., Craessaerts, K., Vanderstichele, H., Guhde, G., Annaert, W., Von Figura, K., Van Leuven, F., Deficiency of presenilin-1 inhibits the normal cleavage of amyloid precursor protein, *Nature*, 391: 387-390, **1998**.
- [66] Wilson, C. A., Doms, R. W., Zheng, H., Lee, V. M.-Y., Presenilins are not required for A-beta-42 production in the early secretory pathway, *Nature Neuroscience*, 5: 849-855, **2002**.
- [67] Phiel, C. J., Wilson, C. A., Lee, V. M.-Y., Klein, P. S., GSK-3-alpha regulates production of Alzheimer's disease amyloid-beta peptides, *Nature* , 423: 435-439, **2003**.
- [68] Pitsi, D., Octave, J.-N., Presenilin-1 stabilizes the C-terminal fragment of the amyloid precursor protein independently of gamma-secretase activity, *The Journal of Biological Chemistry*, 279: 25333-25338, **2004**.

- [69] Kumar-Singh, S., Theuns, J., Van Broeck, B., Pirici, D., Vennekens, K., Corsmit, E., Cruts, M., Dermaut, B., Wang, R., Van Broeckhoven, C., Mean age-of-onset of familial Alzheimer disease caused by presenilin mutations correlates with both increased A-beta-42 and decreased A-beta-40, *Human Mutation*, 27: 686-695, **2006**.
- [70] Kim, S.D., Kim J., Sequence analyses of presenilin mutations linked to familial Alzheimer's disease, *Cell Stress Chaperones*; 13(4): 401-412, **2008**.
- [71] Wahlster, L., Arimon, M., Nasser-Ghods, N., Post, K.L., Serrano-Pozo, A., Uemura, K., Berezovska, O., Presenilin-1 adopts pathogenic conformation in normal aging and in sporadic Alzheimer's disease, *Acta Neuropathologica*, 125(2):187-99, **2013**.
- [72] Borghi, R., Piccini, A., Barini, E., Cirmena, G., Guglielmotto, M., Tamagno, E., Fornaro, M., Perry, G., Smith, M.A., Garuti, A., Tabaton, M., Upregulation of presenilin 1 in brains of sporadic, late-onset Alzheimer's disease, *Journal of Alzheimers Disease*, 22(3):771-5, **2010**.
- [73] De Strooper, B., Annaert, W., Cupers, P., Saftig, P., Craessaerts, K., Mumm, J. S., Schroeter, E. H., Schrijvers, V., Wolfe, M. S., Ray, W. J., Goate, A., Kopan, R., A presenilin-1-dependent gamma-secretase-like protease mediates release of Notch intracellular domain, *Nature*, 398: 518-522, **1999**.
- [74] Struhl, G., Greenwald, I., Presenilin is required for activity and nuclear access of Notch in *Drosophila*, *Nature*, 398: 522-525, **1999**.
- [75] Struhl, G., Adachi, A., Requirements for Presenilin-dependent cleavage of Notch and other transmembrane proteins, *Molecular Cell*, 6: 625-636, **2000**.
- [76] Ye, Y., Lukinova, N., Fortini, M. E., Neurogenic phenotypes and altered Notch processing in *Drosophila* presenilin mutants, *Nature*, 398: 525-529, **1999**.
- [77] Zhang, Z., Hartmann, H., Minh Do, V., Abramowski, D., Sturchler-Pierrat, C., Staufenbiel, M., Sommer, B., van de Weterling, M., Clevers, H., Saftig, P., De Strooper, B., He, X., Yanker, B. A., Destabilization of beta-catenin by mutations in presenilin-1 potentiates neuronal apoptosis., *Nature*, 395: 698-702, **1998**.
- [78] Georgakopoulos, A., Marambaud, P., Efthimiopoulos, S., Shioi, J., Cui, W., Li, H.-C., Schutte, M., Gordon, R., Holstein, G. R., Martinelli, G., Mehta, P., Friedrich, V. L., Jr., Robakis, N. K., Presenilin-1 forms complexes with the cadherin/catenin cell-cell adhesion system and is recruited to intercellular and synaptic contacts, *Molecular Cell*, 4: 893-902, **1999**.

- [79] Teo, J.-L., Ma, H., Nguyen, C., Lam, C., Kahn, M. Specific inhibition of CBP/beta-catenin interaction rescues defects in neuronal differentiation caused by a presenilin-1 mutation, *Proceedings of National Academy of Sciences*, 102: 12171-12176, **2005**.
- [80] Strooper, D.B., Iwatsubo T., Wolfe, Michael S.W, Presenilins and gamma-Sekretaz: Structure, Function and Role in Alzheimer Disease,., *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, **2012**.
- [81] Hartmann, D., From Alzheimer's disease to skin tumors: the catenin connection, *Proceedings of National Academy of Sciences*, 98: 10522-10523, **2001**.
- [82] Tu, H., Nelson, O., Bezprozvanny, A., Wang, Z., Lee, S.-F., Hao, Y.-H., Serneels, L., De Strooper, B., Yu, G., Bezprozvanny, I., Presenilins form ER Ca(2+) leak channels, a function disrupted by familial Alzheimer's disease-linked mutations, *Cell*, 126: 981-993, **2006**.
- [83] Kamal, A., Almenar-Queralt, A., LeBlanc, J. F., Roberts, E. A., Goldstein, L. S. B., Kinesin-mediated axonal transport of a membrane compartment containing beta-secretase and presenilin-1 requires APP, *Nature*, 414: 643-648, **2001**.
- [84] Katayama, T., Imaizumi, K., Honda, A., Yoneda, T., Kudo, T., Takeda, M., Mori, K., Rozmahel, R., Fraser, P., St. George-Hyslop, P., Tohyama, M. Disturbed activation of endoplasmic reticulum stress transducers by familial Alzheimer's disease-linked presenilin-1 mutations, *The Journal of Biological Chemistry*, 46: 43446-43454, **2001**.
- [85] Yasuda, Y., Kudo, T., Katayama, T., Imaizumi, K., Yatera, M., Okochi, M., Yamamori, H., Matsumoto, N., Kida, T., Fukumori, A., Okumura, M., Tohyama, M., Takeda, M., FAD-linked presenilin-1 mutants impede translation regulation under ER stress, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 296: 313-318, **2002**.
- [86] Landman, N., Jeong, S. Y., Shin, S. Y., Voronov, S. V., Serban, G., Kang, M. S., Park, M. K., Di Paolo, G., Chung, S., Kim, T.-W., Presenilin mutations linked to familial Alzheimer's disease cause an imbalance in phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate metabolism, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 103: 19524-19529, **2006**.
- [87] Li, D., Parks, S. B., Kushner, J. D., Nauman, D., Burgess, D., Ludwigsen, S., Partain, J., Nixon, R. R., Allen, C. N., Irwin, R. P., Jakobs, P. M., Litt, M., Hershberger, R. E. Mutations of presenilin genes in dilated cardiomyopathy and heart failure, *American Journal of Human Genetics*, 79: 1030-1039, **2006**.

- [88] Wang, B., Yang, W., Wen, W., Sun, J., Su, B., Liu, B., Ma, D., Lv, D., Wen, Y., Qu, T., Chen, M., Sun, M., Shen, Y., Zhang, X. Gamma-secretase gene mutations in familial acne inversa, *Science*, 330: 1065, **2010**.
- [89] Mahley, R.W., Rall, S.C., Apolipoprotein E : far more than a lipid transport protein, *Annual Review Genomics Human Genetics* , 1 , 507-537, **2000**.
- [90] Mahley, R.W., Apolipoprotein E: cholesterol transport protein with expanding role in cell biology , *Science* , 29 ,622-630 , **1988**.
- [91] Shore, V.G., Shore, B., Heterogeneity of human plasma very low density lipoproteins and separation of species differing in protein components, *Biochemistry*, 12 (3), 502-507, **1973**.
- [92] Mahley, R.W., Huang, Y. Apolipoprotein E: From Atherosclerosis to Alzheimer Disease and Beyond, *Current Opinion in Lipidology*, 10(3), 207-217, **1999**.
- [93] Elshourbagy, N.A., Liao, W.S., Mahley, R.W., Taylor, J.M., Apolipoprotein E m RNA is abundant in the brain and adrenals , as well as in the liver and is present in other peripheral tissues of rats and marmosets, *Proceedings of National Academy of Sciences*, 82 (1) : 203-207, **1985**.
- [94] Pitas, R.E., Boyles, J.K., Lee, S.H., Foss, D., Mahley, R.W., Astrocytes synthesize apolipoprotein E and metabolize apolipoprotein-E and metabolize apolipoprotein-E containing lipoproteins., *Biochimika et Biophysica Acta*, 917(1), 148-161, **1987**.
- [95] Mahley, R.W., Apolipoprotein E: cholesterol transport protein with expanding role in cell biology, *Science*, 240 (4852), 622-630, **1988**.
- [96] Das, H.K., McPherson, J., Bruns, G.A. et al., Isolation, charecterization and charecterization , and mapping to chromosome 19 of the human apolipoprotein E gene, *Journal of Biochemistry*, 25,260(10) : 6240-6247, **1985**.
- [97] Breslow, J.L., Human apolipoprotein molecular biology and genetic variation, *Annual Review of Biochemistry*, 54, 699-727, **1985**.
- [98] Uterman, G., Apolipoprotein E polymorphism in health and disease., *American Heart Journal*, 113, 433, 440, **1987**.
- [99] Hallman, D.M., Boerwinkle, E., Saha, N., et al., The apolipoprotein E polymorphism : a comporison of the allele frequencies and effects nine populations, *American Journal of Human Genetics*, 49 (2):338-349, **1991**.

- [100] Weisgraber, K.H., Roses, A.D., Strittmatter, W.J., The role of apolipoprotein E in the nervous system, *Current Opinion Lipidology*, 5(2):110-116, **1994**.
- [101] Farrer, L. A., et al., Effects of age, sex, and ethnicity on the association between apolipoprotein E genotype and Alzheimer disease: a meta-analysis. *Journal American Medical Association*, 278, 1349–1356, **1997**.
- [102] Freiden, C., Garai, K., Structural differences between apoE3 ve apoE4 may be useful in developing therapeutic agents for Alzheimer’s disease, *Proceedings National Academy Scientific*, 109, 8913-8918, **2012**.
- [103] Zhong, N., Weisgraber, K.H., Understanding the association of apolipoprotein E4 with Alzheimer disease :clues from its structure, *Journal Biology Chemistry*, 284, 6027-6031, **2009**.
- [104] Liu, C.C., Kanekiyo, T., Xu H., Bu, G., Apolipoprotein E and Alzheimer disease risk, mechanisms and therapy, *Nature Reviews Neurology*, **2013**.
- [105] Nieminen, T., Kahönen, M., Viiri, L.E., et al., Pharmacogenetics of Apolipoprotein E gene during lipid-lowering therapy :lipid levels and prevention of coroner heart disease, *Pharmacogenomics*, 9 (10), 1475-1486, **2008**.
- [106] Finch, C.E., Sapolsky, R.M., The evolution of Alzheimer disease , the reproductive schedule and apoE isoforms , *Neurobiology of Aging*, 20(4), 407-428, **1999**.
- [107] Paik, Y.K., Chank, D.J., Reardon, C.A. et. al., nucleotide sequence ans structure of human apolipoprotein E gene, *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 82(10) :3445-3449, **1985**.
- [108] Duzenli, S., Pirim, I., Gepdiremen, A., Deniz, O., Apolipoprotein E polymorphism and stroke in a population from eastern Turkey., *Journal of Neurogenetics*, 18 (1), 365-375, **2004**.
- [109] Harold, D. et al., Genome-wide association study identifies variants at CLU and PICALM associated with Alzheimer’s disease, *Nature Genetics*, 41, 1088–1093, **2009**.
- [110] Lambert, J. C. ve ark. Genome-wide association study identifies variants at CLU and CR1 associated with Alzheimer’s disease, *Nature Genetics*, 41, 1094–1099, **2009**.
- [111] Chartier-Harlin, M. C. et al., Apolipoprotein E,  $\epsilon$ 4 allele as a major risk factor for sporadic early and late-onset forms of Alzheimer’s disease: analysis of the 19q13.2 chromosomal region, *Human Molecular Genetics*, 3, 569–574, **1994**.

- [112] Houlden, H. et al., ApoE genotype is a risk factor in nonpresenilin early-onset Alzheimer's disease families, *American Journal of Medical Genetics*, 81, 117–121, **1998**.
- [113] Robert, C. Green, M.D., M.P.H., J. Scott Roberts, Ph.D., L. Adrienne Cupples, Ph.D., Norman R. Relkin, M.D., Ph.D., Peter J. Whitehouse, M.D., Ph.D., Tamsen Brown, M.S., Susan LaRusse Eckert, M.S., Melissa Butson, Sc.M., A. Dessa Sadovnick, Ph.D., Kimberly A. Quaid, Ph.D., Clara Chen, M.H.S., Robert Cook-Deegan, M.D., and Lindsay A. Farrer, Ph.D., Disclosure of APOE Genotype for Risk of Alzheimer's Disease, *The New England Journal of Medicine*, 361 :245-254, **2009**.
- [114] Cedazo- Minguéz, A., Apolipoprotein E and Alzheimer's disease: Molecular mechanisms and therapeutic oppornities, *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 11, 1227-1238., **2007**.
- [115] Castellano, J. M. et al. Human apoE isoforms differentially regulate brain amyloid- $\beta$  peptide clearance, *Science Translational Medicine*, 3, **2011**.
- [116] LaDu, M. J. et al., Isoform-specific binding of apolipoprotein E to  $\beta$ -amyloid, *The Journal of Biological Chemistry*, 269, 23403–23406, **1994**.
- [117] Deane, R. et al., ApoE isoform-specific disruption of amyloid  $\beta$  peptide clearance from mouse brain, *Journal of Clinical Investigation*, 118, 4002–4013 , **2008**.
- [118] Jiang, Q. et al. ApoE promotes the proteolytic degradation of A $\beta$ , *Neuron*, 58, 681–693, **2008**.
- [119] Bales, K. R. et al. Lack of apolipoprotein E dramatically reduces amyloid  $\beta$ -peptide deposition, *Nature Genetics*, 17, 263–264, **1997**.
- [120] Osenkowski, P., Ye, W., Wang, R., Wolfe, M. S., Selkoe, D. J. Direct and potent regulation of  $\gamma$ -secretase by its lipid microenvironment, *The Journal of Biological Chemistry*, 283, 22529–22540, **2008**.
- [121] Hashimoto, M. et al., Apolipoprotein E  $\epsilon$ 4 and the pattern of regional brain atrophy in Alzheimer's disease, *Neurology* ,57, 1461–1466, **2001**.
- [122] Sergeant, N., Delacourte ,A., Buee, L., Tau protein as a differantial biomarker of taupathies , *Biochimica et Biophysica Acta*, 179-197, **2005**.
- [123] Strittmater, W.J., Weisgraber, K.H., Goedert, M.,Saunders, A.M., Huang, D., Corder, E.H., Dong, L.M., Jakes, R., Alberts ,M.J., Gilbert, J.R., et al., Hypothesis : microtubule instability and paired helical filament formation in the Alzheimer disease brain are related to apolipoprotein E genotype, *Experimental Neurology* ,125, 163-171, **1994**.



- [124] Manelli, A.M., Bulfinch, L.C., Sullivan, P.M., LaDu, M.J., Abeta 42 neurotoxicity in primary co-cultures: effect of apoE isoform and Abeta conformation, *Neurobiology Aging*, 28, 1139-1147, **2007**.
- [125] Huang, Y., A $\beta$ -independent roles of apolipoprotein E4 in the pathogenesis of Alzheimer's disease, *Trends Molecular Medicine*, 16, 287–294, **2010**.
- [126] Aboud, O., Mrak, R. E., Boop, F. & Griffin, S. T. Apolipoprotein epsilon 3 alleles are associated with indicators of neuronal resilience, *BioMed Central Medicine*, 10, 35, **2012**.
- [127] Buttini, M. et al. , Cellular source of apolipoprotein E4 determines neuronal susceptibility to excitotoxic injury in transgenic mice, *American Journal of Pathology*, 177, 563–569, **2010**.
- [128] Pfrieger, F. W. Cholesterol homeostasis and function in neurons of the central nervous system, *Cell Molecular Life Science*, 60, 1158–1171, **2003**.
- [129] Svennerholm, L. & Gottfries, C.-G. Membrane lipids, selectively diminished in Alzheimer brains, suggest synapse loss as a primary event in early-onset form (Type I) and demyelination in late-onset form (Type II), *The Journal of Neuroscience*, 62, 1039–1047, **1994**.
- [130] Cutler, R.G., Kelly, J., Storie, K., Pedersen, W.A., Tammara, A., Hatanpaa, K., Troncoso, J.C., Mattson, P., Involvement of oxidative stress –induced abnormalities in ceramide and cholesterol metabolism in brain aging and Alzheimer's disease, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(7), 2070-2075, **2004**.
- [131] Lee, C.Y., Tse, W., Smith, J.D., Landreth, G.E., Apolipoprotein E promotes  $\beta$ -amyloid trafficking and degradation by modulating microglial cholesterol levels, *The Journal of Biological Chemistry*, 13; 287(3): 2032-44, **2012**.
- [132] Koffie, R., Hyman, B. & Spires-Jones, T., Alzheimer's disease: synapses gone cold, *Molecular Neurodegeneration*, 6, 63, **2011**.
- [133] Klein, R. C., Mace, B. E., Moore, S. D. & Sullivan, P. M. Progressive loss of synaptic integrity in human apolipoprotein E4 targeted replacement mice and attenuation by apolipoprotein E2, *Neuroscience*, 171, 1265–1272, **2010**.
- [134] Chen, Y., Durakoglugil, M. S., Xian, X. & Herz, J. ApoE4 reduces glutamate receptor function and synaptic plasticity by selectively impairing ApoE receptor recycling, *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 107(26), 12011-12016, **2010**.

- [135] Verkhatsky, A., Toescu, E.C., Neuronal-glia networks as substrate for CNS integration, *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 10, 826-836, **2006**.
- [136] Forero, D.A., Casadesus, G., Perry, G., Arboleda, H., Synaptic dysfunction and oxidative stress in Alzheimer's disease: emerging mechanisms, *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 10 (3), 796-805, **2006**.
- [137] Bu G., Apolipoprotein E and its receptors in Alzheimer's disease: pathway, pathogenesis and therapy, *Nature Reviews, Neuroscience* Volume, 333, **2009**.
- [138] Smelth, A.H., De Beer F., Apolipoprotein E and familial dysbetalipoproteinemia: clinical, biochemical and genetic aspects., *Neurology*, 2198-2202, **2004**.
- [139] Saunders, A.M., Roses, A.D., Apolipoprotein E allele frequency, ischemic cerebrovascular disease and Alzheimer's disease, *Stroke*, 1416, **1993**.
- [140] Verghese, P.B., Castellano, J.M., Holtzman, D.M., Apolipoprotein E in Alzheimer's disease and other neurological disorders, *Lancet Neurology*, 241-252, **2011**.
- [141] Zhou, W., et al, Meta-analysis of APOE4 allele and outcome after traumatic brain injury, *Journal Neurotrauma*, 279-290, **2008**.
- [142] Fleminger, S., Oliver, D.L., Lovestone, S., Rabe-Hesketh, S., Giora, A., Head injury as a risk factor for Alzheimer's disease: the evidence 10 years on; a partial replication, *Journal Neurology, Neurosurgery and Psychiatry*, 857-862, **2003**.
- [143] Magnoni, S., Brody, D.L., New perspectives on amyloid- $\beta$  dynamics after acute brain injury: moving between experimental approaches and studies in the human brain, *Archives Neurology*, 1068-1073, **2010**.
- [144] Nicoll, J. A., Roberts, G. W. & Graham, D. I. Apolipoprotein E  $\epsilon$ 4 allele is associated with deposition of amyloid  $\beta$ -protein following head injury, *Nature Medicine*, 1, 135-137, **1995**.
- [145] Potter, H., Wisniewski, T., Apolipoprotein E: Essential Catalyst of the Alzheimer's Amyloid cascade, *International Journal of Alzheimer's Disease*, 9, **2012**.
- [146] Lync, J.R., Whang, H., Mace, B., et al., A novel therapeutic derived from apolipoprotein E reduces brain inflammation and improves outcome after closed head injury, *Experimental Neurology*, 192: 109-16, **2005**.

- [147] Cambien, F., Tiret L., Genetics of Cardiovascular Diseases: From Single Mutations to the Whole Genome, *Circulation* , 1714-1724, **2007**.
- [148] Hoe, H.S., Rebeck, G. W., Functional interactions of APP with the apoE receptorfamily, *Journal Neurochemistry*, (106); 2263-2271, **2008**.
- [149] Bennet, A.M., Di Angelantonio, E., Ye, Z., Association of Apolipoprotein E Genotypes with Lipid Levels and Coronary Risk, *The Journal of the American Medical Association*, 1300-1311, **2007**.
- [150] Uterman, G, Hees, M, Steinmetz, A., Polymorphism of Apolipoprotein E and occurrence of dysbetalipoproteinaemia in Man, *Nature*, 269:604–607, **1977**.
- [151] Scuteri, A., Najjar, S.S., Muller, D., et al., aApoE4 allele and the natural history of cardiovascular risk factors, *American Journal of Physiology and Endocrinology Metabolism* ; 289 (2) :E322-327, **2005**.
- [152] Sun, X.C., Jiang, Y., Genetic susceptibility to traumatic brain injury and apolipoprotein E gene., *China Journal Traumatology*, 11 (4):247-52, **2008**.
- [153] Saft, C. et al. Apolipoprotein E genotypes do not influence the age of onset in Huntington's disease, *Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry*, 75, 1692–1696, **2004**.
- [154] Jawaid, A. et al., Does apolipoprotein E genotype modify the clinical expression of ALS? *European Journal of Neurology*, 18, 618–624, **2011**.
- [155] Sperling, R. et al. A randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial of intravenous bapineuzumab in patients with Alzheimer's disease who are apolipoprotein E  $\epsilon$ 4 carriers, *Presented at the 16th meeting of the European Federation of Neurological Societies* (Stockholm, Sweden, **2012**).
- [156] Ferrari, C. et al. How can elderly apolipoprotein E  $\epsilon$ 4 carriers remain free from dementia? *Neurobiology of Aging*, 34(1) :13-21, **2013**.
- [157] Sadowski, M. J. et al. Blocking the apolipoprotein E/amyloid- $\beta$  interaction as a potential therapeutic approach for Alzheimer's disease, *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 103, 18787–18792, **2006**.
- [158] Mahley, R.W., Weisgraber, K.H., Huang, Y., Apolipoprotein E4 : A causative factor and therapeutic target in neuropathology, including Alzheimer's disease, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 5645, **2006**.

- [159] Aono, M. et al., Protective effect of apolipoprotein E-mimetic peptides on N-methyl-d- aspartate excitotoxicity in primary rat neuronal- glial cell cultures. *Neuroscience*, 116, 437–445, **2003**.
- [160] Kanekiyo, T. et al. Heparan sulphate proteoglycan and the low-density lipoprotein receptor-related protein 1 constitute major pathways for neuronal amyloid- $\beta$  uptake, *Journal of Neuroscience*, 31, 1644–1651, **2011**.
- [161] Stenesh, J., Dictionary of Biochemistry and Molecular Biology. 2nd edition. New York: John Wiley & Sons, **1989**.
- [162] Agency for Toxic Substances and Disease Registry, Toxicological Profile for Chloroform. Atlanta, GA: U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service; **1997**.
- [163] O'Neil M. The Merck Index. 14th edition. New Jersey: Merck & Co.; **2006**.
- [164] Puissant, C. and L.M. Houdebine. "An Improvement of the Single-Step Method of RNA Isolation by Acid Guanidinium Thiocyanate-Phenol-Chloroform Extraction", *BioTechniques* 8: 148 – 149, **1990**.
- [165] This protocol was adapted from "Commonly Used Techniques in Molecular Cloning," Appendix 8, in *Molecular Cloning*, Volume 3, 3rd edition, by Joseph Sambrook and David W. Russell. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*, Cold Spring Harbor, NY, USA, **2001**.
- [166] Lee, P.Y., Costumbrado, J., Hsu, C., Kim, Y.H. Agarose Gel Electrophoresis for the Separation of DNA Fragments, *Journal of Visualized Experiments*, (62), **2012**.
- [167] Temizkan, G., Arda, N., Moleküler Biyolojide Kullanılan Yöntemler, Nobel Tıp Kitabevleri, 3.Baskı, 102-103, **2007**.
- [168] Rasmussen., H. B., Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis of PCR-Amplified Fragments (PCR-RFLP) and Gel Electrophoresis - Valuable Tool for Genotyping and Genetic Fingerprinting, *Gel Electrophoresis - Principles and Basics*, Dr. Sameh Magdeldin (Ed.), ISBN: 978-953-51-0458-2, InTech, **2012**.
- [169] Electrophoresis of DNA in agarose gels, polyacrylamide gels and in free solution, *Electrophoresis*, 30 (1), 188-195, **2009**.
- [170] <https://somapps.med.upenn.edu/pbr/portal/microarr/technology.php> (Aralık, **2013**).
- [171] Kemper, P., and Murtaugh, C.M., Lifetime use of nursing home care, *New England Journal Medicine*, 324, 595-600, **1991**.

- [172] Anwar, R., Moynihan, T.P., Ardley, H., Brindle, N., Coletta, P.L., Cairns, N., Markham, A.F., Robinson, P.A., Molecular analysis of the presenilin1 (S182) gene in "sporadic" cases of Alzheimer's disease : identification and characterisation of unusual splice variants, *Journal of Neurochemistry*, 66(4):1774-7, **1996**.
- [173] Thenus, J., DeFavero, J., Dermaut, B., Van Duijn, M.C., Backhovens, H., Van den Broeck, M., Serneels, S., Corsmit, E., Van Broeckhoven, C., Cruts, M., Genetic variability in the regulatory region of presenilin 1 associated with risk for Alzheimer's disease and variable expression, *Human Molecular Genetics*, 9(3), **2000**.
- [174] Taddei, K., Fisher, C., Laws, S.M., Martins, G., Paton, A., Clarnette, R.M., Chung, C., Brooks, W.S., Hallmayer, J., Miklossy, J., Relkin, N., St George-Hyslop, P.H., Gandy, S.E., Martins, R.N., Association between presenilin-1 Glu318Gly mutation and familial Alzheimer's disease in the Australian population., *Molecular Psychiatry*, 7(7):776-81, **2002**.
- [175] Benitez, B.A., Karch, C.M., Cai, Y., Jin, S.C., Cooper, B., Carrell, D., Bertelsen, S., Chibnik, L., Schneider, J.A., Bennett, D.A., Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative; Genetic and Environmental Risk for Alzheimer's Disease Consortium GERAD, Fagan, A.M., Holtzman, D., Morris, J.C., Goate, A.M., Cruchaga, C., The PSEN1, p.E318G variant increases the risk of Alzheimer's disease in APOE- $\epsilon$ 4 carriers, *PLoS Genetics*, 9(8), **2013**.
- [176] Larner, A.J., Ray, P.S., Doran, M., The R269H mutation in presenilin-1 presenting as late-onset autosomal dominant Alzheimer's disease. *Journal of Neurological Science*, 252(2):173-6, **2007**.
- [177] Gerrish, A., et.al., The role of variation at A $\beta$ PP, PSEN1, PSEN2, and MAPT in late onset Alzheimer's disease., *Journal of Alzheimer's Disease*, 28(2):377-87, **2012**.
- [178] Cruchaga, C., Haller, G., Chakraverty, S., Mayo, K., Vallania, F.L., Mitra, R.D., Faber, K., Williamson, J., Bird, T., Diaz-Arrastia, R., Foroud, T.M., Boeve, B.F., Graff-Radford N.R., St Jean P, Lawson, M., Ehm, M.G., Mayeux, R., Goate, A.M.; NIA-LOAD/NCRAD Family Study Consortium, Rare variants in *APP*, *PSEN1* and *PSEN2* increase risk for AD in late-onset Alzheimer's disease families., *PLoS One*, 7(2), **2012**.
- [179] Wragg, M., Hutton, M., Talbot, C., and the Alzheimer's Disease Collaborative Group, Genetic association between intronic polymorphism in presenilin-1 gene and late-onset Alzheimer's disease, *Lancet*, 347: 509-512, **1996**.
- [180] Higuchi, S., Muramatsu, T., Matsushita, S., Arai, H., Sasaki H., Presenilin-1 polymorphism and Alzheimer's disease., *Lancet*, 347:1185-1186, **1996**.

- [181] Rodríguez-Manotas, M., Amorín-Díaz, M., Cañizares-Hernández, F., Ruíz-Espejo, F., Martínez-Vidal, S., González-Sarmiento, R., Martínez-Hernández P, Cabezas-Herrera, J., Association study and meta-analysis of Alzheimer's disease risk and presenilin-1 intronic polymorphism, *Brain Research*, 19;1170:119-28, **2007**.
- [182] Tysoe, C., Whittaker, J., Cairns, N.J., Atkinson, P.F., Harrington, C.R., Xuereb, J., Wilcock, G., Rubinsztein, D.C., Presenilin 1 intron 8 polymorphism is not associated with autopsy-confirmed late-onset Alzheimer's disease., *Neuroscience Letters*, 222 (68-69), **1997**.
- [183] Hu, C.J., Sung, S.M., Liu, H.C., Chang, J.G., Association of apolipoprotein E genotype and intronic polymorphism of the presenilin-1 gene with Alzheimer's disease in elderly Taiwan Chinese, *Journal of Neurological Science*., 157(2):158-61, **1998**.
- [184] Liao, A., Gómez-Isla, T., Clatworthy, A., Hyman, B.T., Lack of association of presenilin-1 intron-8 polymorphism with neuropathological features of Alzheimer's disease., *Brain Research*, 816(2):295-8, **1999**.
- [185] Wasco, W., Pettingel, W.P., et.al., Familial Alzheimer's chromosome 14 mutations, *Nature Medicine* ,1:848, **1995**.
- [186] Van Duijn, C.M., Cruts, M., Theuns, J., Van Gassen, G., Backhovens, H., van den Broeck, M., Wehnert, A., Serneels, S., Hofman, A., Van Broeckhoven, C., Genetic association of the presenilin-1 regulatory region with early-onset Alzheimer's disease in a population-based sample, *European Journal of Human Genetics*, 7(7):801-6, **1999**.
- [187] Bagli, M., Papassotiropoulos, A., Schwab, S.G., Jessen, F., Rao, M.L., Maier, W., Heun, R., No association between an intronic polymorphism in the presenilin-1 gene and Alzheimer disease in a German population., *Journal of Neurological Science*., 167(1):34-6, **1999**.
- [188] Romas, S.N., Mayeux, R., Tang, M.X., Lantigua, R., Medrano, M., Tycko, B., Knowles, J. No association between a presenilin 1 polymorphism and Alzheimer disease, *Archives of Neurology*, 57,699-702, **2000**.
- [189] Chandak, G.R., Sridevi, M.U., Vas, C.J., Panikker, D.M., Singh, L., Apolipoprotein E and presenilin-1 allelic variation and Alzheimer's disease in India., *Human Biology* ,74(5):683-93, **2002**.
- [190] Dursun, E., Gezen-Ak, D., Eker, E., Ertan, T., Engin, F., Hanagasi, H., Gürvit, H., Emre, M., Yilmazer, S., Presenilin-1 gene intronic polymorphism and late-onset Alzheimer's disease., *Journal of Geriatric Psychiatry and Neurology*., 21(4):268-73, **2008**.

- [191] Rassas, A.A., Fredj, S.H., Khiari, H.M., Sahnoun, S., Bibi, A., Siala, H., Mrabet, A., Messaoud, T., No association between an intronic polymorphism in the presenilin-1 gene and Alzheimer disease in a Tunisian population, *Journal of Neural Transmission*, 120(9):1355-8, **2013**.
- [192] De-Andrade, F.M., Larrandabaru, M., Callegari, S.M., Gastaldo, G., Hutz, M.H., Association of Apolipoprotein E polymorphism with plasma lipids and Alzheimer's disease in a Southern Brazilian population, *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 33(5), 529-537, **2000**.
- [193] Souza, D.R., De Godoy, M.R., Hotta, J., Tajara, E.H., Brandoa, A.C., Pinheiro Junior S., Tognola W.A., dos Santos, J.E., Association of Apolipoprotein E polymorphism in late-onset Alzheimer's disease and vascular dementia in Brazilians, *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 36(7), 919-923, **2003**.
- [194] Isbir, T., Agachan, B., Yilmaz, H., Aydın, M., Kara, I., Eker, D., Eker E., Interaction between apolipoprotein-E and angiotension-converting enzyme genotype in Alzheimer's disease, *American Journal Alzheimer's Disease Other Dementias*, 16(4), 205-210, **2001**.
- [195] Yokeş M.B., Apolipoprotein E Genotyping in Turkish Alzheimer Patients, *Balkan Journal of Medical Genetics*, 8(1):57-63, **2007**.
- [196] B.V.P. de-Almada, L.D., de-Almeida, D. Camporez, M.V.D., de-Moraes, R.L., Morelato, A.M.S., Perrone, L., Belcavello, I.D., Loura and F. de-Paulo, Protective effect of the *APOE*-e3 allele in Alzheimer's disease, *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 45 (1) 8-12, **2012**.
- [197] Zhou, X., Miao, H., Rausch, W.D., Long, Ma., Luo, X., Yu, H., Zhang X., Bayahemaiti K., Abulizi P., Keyimu, K., Association between apolipoprotein E gene polymorphism and Alzheimer's disease in Uighur and Han populations, *Psychogeriatrics*, 12:83-87, **2012**.
- [198] Rassas, A.A., Mrabet Khiari, H., Hadj Fredj, S., Sahnoun, S., Batti, H., Zakraoui, N.O., Cherif, A., Anane, N., Ben Ali, N., Messaoud, T., Mrabet, A., High *APOE* epsilon 4 allele frequencies associated with Alzheimer disease in a Tunisian population, *Neurological Science*, 33(1):33-7, **2012**.
- [199] Yildiz et.al., Association of Alzheimer's Disease with *APOE* and *IL-1 $\alpha$*  Gene Polymorphism, *American Journal of Alzheimer's Disease and Other Dementias*, 1-6, **2012**.
- [200] Clarimon, J., Bertranpetit, J., Calafell, F., Boada, M., Tarraga, L., Comas D., Joint analysis of candidate genes related to Alzheimer's disease in a Spanish population, *Psychiatrics Genetics*, 13(2), 85-90, **2003**.

- [201] Tang, M.N., Zhang, Z.X., Han, H.Y., Liu, X.H., Shen, Y., Analysis on association between the polymorphism in apolipoprotein-E, interleukin-1 alpha genes and Alzheimer's disease in Chengdu area, *Zhounghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi*, 21(2), 176-178, **2004**.
- [202] Lavados, M., Farías, G., Rothhammer, F., Guillon, M., Mujica, M.C., Maccioni, C., Maccioni, R.B., APOE alleles and tau markers in patients with different levels of cognitive impairment, *Archives of Medical Research*, 36(5):474-9, **2005**.
- [203] Aybek, H., Ercan, F., Aslan, D., Sahiner, T., Determination of malondialdehyde, reduced glutathione levels and APOE4 allele frequency in late-onset Alzheimer's disease in Denizli, Turkey, *Clinical Biochemistry*, 40 (3-4), 172-176, **2007**.
- [204] Corder, E.H., Saunders, A.M., Risch, N.J., Strittmater, W.J., Schmechel, D.E., Gaskell, P.C., et.al., Protective effect of Apolipoprotein-E type-2 allele for late onset Alzheimer disease, *Nature Genetics*, 7, 180:184, **1994**.
- [205] Panza, F., Solfrizzi, V., Torres, F., Mastroianni, F., Colacicco A.M., Basile A.M., et.al., Apolipoprotein-E in Southern Italy: protective effect of epsilon2 allele for late onset sporadic Alzheimer's disease, *Neuroscience Letters*, 292:79-82, **2000**.
- [206] Nathan, B.P., Jiang, Y., Wong, G.K., Shen, F., Brewer, G.J., Struble, R.G., Apolipoprotein-E4 inhibits and apolipoprotein E3 promotes neurite outgrowth in cultured adult Mouse cortical neurons through the low-density lipoprotein receptor-related protein, *Brain Research*, 928(1-2):96-105, **2002**.
- [207] <http://www.alzgene.org/meta.asp?genelD=84> (Ocak, **2013**)



**EKLER**  
**EK-1**  
**ETİK KURUL BELGESİ**

06100 Sıhhiye-Ankara  
Telefon: 0(312) 3051082-Faks:0(312) 3100580  
E-posta:selmak@hacettepe.edu.tr

**HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ**  
**Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu**

Sayı : B.30.2.HAC.0.20.05.04/428

30 Mayıs 2012

**ARAŞTIRMA PROJESİ DEĞERLENDİRME RAPORU**

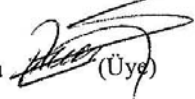
**Toplantı Tarihi** : 13 NİSAN.2012 CUMA  
**Toplantı No** : 2012/03  
**Proje No** : TBK 12/10 (Değerlendirme Tarihi 16.03.2012)  
**Karar No** : TBK 12/10-15

Üniversitemiz Fen Fakültesi Moleküler Biyoloji Anabilim Dalı Anabilim Dalı öğretim üyelerinden Doç. Dr. Hatice Mergen'in sorumlu araştırmacısı olduğu, Doç. Dr. Erdal Eroğlu, Araş. Gör. Tuğçe Karaduman, Gamze Kamışlı ve Elif Düzcü ile birlikte çalışacakları TBK 12/10 kayıt numaralı ve "*Alzheimer Hastalığına Neden Olan Moleküler Patolojilerin Araştırılması*" başlıklı proje önerisi Kurulumuzda değerlendirilmiş olup, etik açıdan uygun bulunmuştur.

1.Prof. Dr. Nurten Akarsu

  
(Başkan)

9 Prof. Dr. Songül Vaizoğlu

  
(Üye)

2. Prof. Dr. Nüket Örnek Büken

(Üye)

10. Doç. Dr. Ayşe Lale Doğan

(Üye)

3. Prof. Dr. Hakan S. Örer

(Üye)

11. Doç. Dr. R. Köksal Özgül

(Üye)

4. Prof. Dr. Sevdâ F. Müftüoğlu

(Üye)

12. Doç. Dr. Cansın Saçkesen

(Üye)

KATILMADI

5. Prof. Dr. Cenk Sökmensüer

(Üye)

KATILMADI

13 Doç. Dr. Melahat Görduysus

(Üye)

6. Prof. Dr. Meral Aksoy

(Üye)

KATILMADI

14. Doç. Dr. S. Kutay Demirkan

(Üye)

7. Prof. Dr. Volga Bayrakçı Tunay

(Üye)

15. Yrd. Doç. Dr. H. Hüsrev Turnagöl (Üye)

8. Prof. Dr. Yılmaz Selim Erdal

(Üye)

16. Av. Meltem Önürü

(Üye)

# ÖZGEÇMİŞ

## Kimlik Bilgileri

Adı Soyadı: TUĞÇE KARADUMAN

Doğum Yeri: ANKARA

Medeni Hali: BEKAR

E-posta: tugcekaraduman@hacettepe.edu.tr

Adresi: Pınarbaşı Mah. Anız Sok. No: 9/9 Keçiören /ANKARA

## Eğitim

Lise: Özel Cemal Şaşmaz Fen Lisesi

Lisans: İstanbul Üniversitesi Fen Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü

Yüksek Lisans: Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Bölümü Moleküler Biyoloji Anabilim Dalı

## Yabancı Dil ve Düzeyi

İngilizce- Upper-intermediate (orta üstü)

## İş Deneyimi

Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Araş. Gör (2011-...)

## Deneyim Alanları

Moleküler Genetik

## Tezden Üretilmiş Proje ve Bütçesi

Bu çalışma Hacettepe Üniversitesi Öğretim Üyesi Yetiştirme Programı ( ÖYP) Koordinatörlüğü tarafından desteklenmiştir. Destek miktarı: 9.998 TL'dir.

## Tezden Üretilmiş Yayınlar (-)

## Tezden Üretilmiş Poster Sunumu ile Katıldığı Toplantılar (-)