

T.C.  
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

VİTAMİN D BAĞLAYAN PROTEİN (VDBP)  
POLİMORFİZMİNİN ALZHEIMER HASTALIĞI İLE  
İLİŞKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

MEHMET OKTAR GÜLOĞLU

DANIŞMAN  
PROF. DR. SELMA YILMAZER

TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI /  
TIBBİ BİYOLOJİ YÜKSEK LİSANS PROGRAMI

İSTANBUL-2007

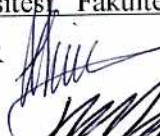
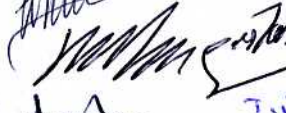



## TEZ ONAYI

Aşağıda tanıtımı yapılan tez, jüri tarafından başarılı bulunarak Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

10.07.2007  
  
Prof. Dr. Emine Kökoğlu  
Enstitü Müdürü

Kurum : İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü  
Program Adı : Tıbbi Biyoloji  
Programın seviyesi : Yüksek Lisans  Doktora   
Anabilim Dalı : Tıbbi Biyoloji  
Tez Sahibi : Mehmet Oktar GÜLOĞLU  
Tez Başlığı : Vitamin D Bağlayan Protein (VDBP) Polimorfizminin Alzheimer Hastalığı ile İlişkisinin Araştırılması  
Sınav Yeri : Tıbbi biyoloji AD.  
Sınav Tarihi : 26 / 06 / 2007

### Tez Sınav Jürisi

Ünvanı	Adı Soyadı	Üniversitesi	Fakültesi	Anabilim Dalı
1. Prof. Dr. Selma YILMAZER		(Donanım)	T.Ü. CTF.	Tıbbi Biyoloji AD.
2. Prof. Dr. Engin EKER			T.Ü. CTF.	Psikiyatri AD.
3. Prof. Dr. Filiz Aydın			T.Ü. İst. Tıp Fak.	Tıbbi Biyoloji AD.
4. Doç. Dr. Ayhan DEVİREN			T.Ü. CTF.	Tıbbi Biyoloji AD.
5. Doç. Dr. Fatma Oğuz Savran			T.Ü. İst. Tıp Fak.	Tıbbi Biyoloji AD.

**BEYAN**

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmayla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarımı ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim.

MEHMET OKTAR GÜLOĞLU



## İTHAF

Babaannem Nebahat Güloğlu'na ithaf ediyorum

## TEŞEKKÜR

Destekleriyle bu tezin ortaya çıkmasında emekleri geçen tez danışmanım Sn. Selma Yılmaz'er'e, anabilim dalımızın tüm olanaklarından faydalanmamı sağlayan anabilim dalı başkanımız Sn. Turgut Ulutin'e, veri toplanmasındaki katkıları ve bilimsel destekleri ile Sn. Prof. Dr. Engin Eker'e ve Sn. Prof. Dr. Murat EMRE'ye, anabilim dalımızdaki tüm öğretim üyeleri ve asistanlara, özellikle laboratuvar arkadaşlarım Sn. Duygu Gezen-Ak ve Sn. Erdiñ Dursun'a, Sn. Aynur Müdürođlu'na, ayrıca eğitimim boyunca maddi manevi desteklerini esirgemeyen sevgili aileme ve babaanneme teşekkürü borç bilirim.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: T-100/15122006

**İÇİNDEKİLER**

TEZ ONAYI .....	İİ
BEYAN.....	İİİ
İTHAF.....	İV
TEŞEKKÜR.....	V
İÇİNDEKİLER .....	VI
TABLolar LİSTESİ.....	Vİİ
ŞEKİLLER LİSTESİ .....	Vİİİ
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ .....	X
ÖZET .....	Xİİ
ABSTRACT.....	Xİİİ
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER .....	3
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	25
4. BULGULAR.....	34
5. TARTIŞMA .....	41
KAYNAKLAR .....	45
ETİK KURUL KARARI .....	52
ÖZGEÇMİŞ .....	53

**TABLULAR LİSTESİ**

Tablo 3.1: PZR karışımı.....	27
Tablo 4.1: HaeIII ve StyI enzim kesimi genotip dağılımı.....	36
Tablo 4.2: HaeIII ve StyI enzim kesimi allel dağılımı.....	37
Tablo 4.3: HaeIII enzim kesimi genotip dağılımı.....	37
Tablo 4.4: HaeIII enzim kesimi allel dağılımı.....	38
Tablo 4.5: StyI enzim kesimi genotip dağılımı.....	39
Tablo 4.6: StyI enzim kesimi allel dağılımı.....	40

## ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2.1: Alzheimer'lı beyin ile normal beynin anatomik karşılaştırması.....	3
Şekil 2.2: Alzheimer'lı beyin ile normal beynin mikroskopik karşılaştırılması....	4
Şekil 2.3: APP'den A $\beta$ oluşumu.....	4
Şekil 2.4: İnsan beyninde ekspresyonu yapılan altı tau izoformu.....	5
Şekil 2.5: Vitamin D sentezi, aktif hale gelmesi ve katabolizması.....	8
Şekil 2.6: Beyindeki vitamin D Sinyal Yolu.....	10
Şekil 2.7: Vitamin D Reseptörünün üç boyutlu yapısı.....	12
Şekil 2.8: VDBP ve albumin gen ailesi üyelerinin kromozomdaki yeri.....	13
Şekil 2.9: VDBP'nin amino asit dizisi ve ikincil yapısı.....	14
Şekil 2.10: Serbest haldeki VDBP'nin kristal yapısı.....	15
Şekil 2.11: VDBP geninin HNF1 ile düzenlenmesini gösteren model.....	16
Şekil 2.12: 25(OH)D'nin megalinle aracılığıyla endositozu.....	18
Şekil 2.13: Aktine bağlı VDBP'nin şematik görünüşü.....	19
Şekil 2.14: Aktin-VDBP kompleksinin atom yüzeyi doldurma modeli.....	21
Şekil 2.15: Gelsolin ve VDBP'nin aktin ile benzer şekilde etkileşimleri.....	22
Şekil 3.1: VDBP'de gözlenen 7 farklı genotipin şematik olarak gösterimi.....	30
Şekil 3.2: VDBP'de gözlenen 4 allelin kesim yerine göre şematik gösterimi...31	
Şekil 4.1: VDBP PZR ürünleri.....	34
Şekil 4.2: VDBP kesim ürünleri.....	35
Şekil 4.3: HaeIII ve StyI enzim kesimi genotip dağılımı.....	36
Şekil 4.4: HaeIII ve StyI enzim kesimi allel dağılımı.....	37
Şekil 4.5: HaeIII enzim kesimi genotip dağılımı.....	38
Şekil 4.6: HaeIII enzim kesimi allel dağılımı.....	39
Şekil 4.7: StyI enzim kesimi genotip dağılımı.....	39

Şekil 4.8: StyI enzim kesimi allel dağılımı.....	40
--	----

## SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

25(OH)D	Kalsidiol (25-hidroksivitamin D <sub>3</sub> )
1,25(OH) <sub>2</sub> D	Kalsitriol (1,25-dihidroksivitamin D <sub>3</sub> )
AAH	Ailesel Alzheimer Hastalığı
A $\beta$	Amiloid Beta
ACT	Antikimotripsin
AGD	Arjirofilik Granül Hastalığı
AFP	$\alpha$ -fetoprotein
AFM	$\alpha$ -albumin/atamin
AH	Alzheimer Hastalığı
ALB	Albumin
aMCI	Amnestik Hafif Bilişsel Bozukluk
ApoE	Apolipoprotein E
APP	Amiloid Öncül Protein
BOS	Beyin Omirilik Sıvısı
CBD	Kortiko Bazal Dejenerasyon
COPD	Kronik Obstruktif Akciğer Hastalığı
DBP	D Bağlayan Protein
DNA	Deoksiribonükleik asit
dNTP	Deoksiribonükleosid trifosfat
DRIP	D Reseptörü ile Etkileşen Protein
EB	Etidyum bromür
EDTA	Etilen diamin tetra asetik asit
HNF1	Hepatosit nuklear faktör 1
iNOS	Uyarılabilir nitrik oksit sentaz
GalNac	N-asetilgalaktozamin
Gc	Gruba Özgü Bileşen
GDNF	Glial hücre kökenli nörotrofik faktör
MAP	Mikrotübül Bağlantılı Protein
MAF	Maktofaj aktive edici faktör
mRNA	Haberci RNA
NGF	Sinir Büyüme Faktörü

NFY	Nörofibril Yumakları
NT3	Nörotrofin 3
NT4	Nörotrofin 4
OD	Optik yoğunluk
PAF	Platelet aktive edici faktör
PHF	Çiftli Sarmal Filamentleri
PIB	Pittsburg Bileşiği B
PKN	Protein Kinaz N
PTH	Paratiroid hormon
PZR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PS-1	Presenilin-1
PS-2	Presenilin-2
PSP	Supranuklear Palsi
RFLP	Restriksiyon Parça Uzunluk Polimorfizmi
RNA	Ribonüklesik asit
TBE	Tris Borat EDTA
TE	Tris EDTA
Tm	Erime ısısı
UVB	Ultraviyole (Morötesi) B
VDBP	Vitamin D Bağlayan Protein
VDR	Vitamin D Reseptörü

## ÖZET

Güloğlu, M.O. (2007). Vitamin D Bağlayan Protein (VDBP) Poliformizminin Alzheimer Hastalığı ile İlişkisinin Araştırılması. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, CTF Tıbbi Biyoloji ABD. Yüksek Lisans Tezi. İstanbul.

Vitamin D Bağlayan Protein (VDBP) geninin, 11. ekzon bölgesindeki 416. ve 420. kodonlarındaki polimorfizmlerin çeşitli hastalıklara yatkınlıkla ilişkili olduğu gösterilmiştir. Bu alışmada, Alzheimer Hastalığı ile VDBP polimorfizmi arasında bir ilişkinin olup olmadığını araştırmayı amaçladık. Bu amaçla, çalışmamızda 106 geç başlangıçlı Alzheimer hastasının ve hastalarla yaş paralelliği gösteren ve herhangi bir nörodejeneratif hastalığı bulunmayan 98 kontrol bireyin DNA'ları izole edilip; VDBP geninin 11. ekzon bölgesindeki 416. ve 420. kodonların polimorfizmi, PZR yöntemi ve HaeIII ve StyI enzimleri kullanılarak Restriksiyon Parça Uzunluk Polimorfizmi (RFLP) yöntemi ile belirlendi. Hastaların yaklaşık % 2'si Gc1F/Gc1F, %18'i Gc1F/Gc1S, %10'u Gc1F/Gc2, %26'sı Gc1S/Gc1S, %35'i Gc1S/Gc2, %6'sı Gc2/Gc2 ve %2'si GcU/GcU genotipine sahipken, kontrol bireylerinde ise bu oranlar sırasıyla % 5, % 29, %4, %26, %30, %5 ve %2 olarak bulundu. Genotipleme sonuçları istatistiksel olarak karşılaştırıldığında hasta ve kontrol grupları arasında anlamlı bir fark bulunmadı. Sonuç olarak, VDBP 11. ekzon polimorfizmi ile Alzheimer Hastalığı arasında bir ilişki saptanmadı.

Anahtar Kelimeler : Alzheimer hastalığı, Polimorfizm, Vitamin D Bağlayan Protein

Bu alışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: T-100/15122006

## ABSTRACT

Guloglu, M.O. (2007). Studying the association between Vitamin D Binding Protein (VDBP) Polimorphism and Alzheimer's Disease. İstanbul University, Institute of Health Science, Cerrahpasa Medical Faculty, Department of Medical Biology. Master Thesis. İstanbul.

It has been shown that polymorphisms at codons 416 and 420 of exon 11 of the Vitamin D Binding Protein (VDBP) is associated with tendency to some diseases. In this study, we aimed to study whether there is an association between VDBP polymorphism and Alzheimer's disease. On this purpose, DNA's of 106 patients with sporadic Alzheimer's Disease and 98 control group who are age-related and free from any neurodegenerative diseases purified; the polymorphisms at codons 416 and 420 of exon 11 of the VDBP were determined by using PCR method and Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) methods by using HaeIII and StyI digestion enzymes. Patients were found to be 2% for Gc1F/Gc1F, 18% for Gc1F/Gc1S, 10% for Gc1F/Gc2, 26% for Gc1S/Gc1S, 35% for Gc1S/Gc2, 6% for Gc2/Gc2 and 2% for GcU/GcU genotypes, whereas in control group these ratios were found to be 5%, 29%, 4%, 26%, 30%, 5% and 2% respectively. When the genotyping results compared statistically, there found to be no statistical significance between the patient and control groups. As a result, there is no association between VDBP exon 11 polymorphism and Alzheimer's Disease

Key Words: Alzheimer's Disease, Polymorphism, Vitamin D Binding Protein

The present work was supported by the Research Fund of İstanbul University.  
Project No. T-100/15122006

## 1. GİRİŞ VE AMAÇ

Alzheimer Hastalığı (AH), demansın en sık rastlanan nedenidir [1]. Kronik olarak ilerleyen multifaktoriyel, nörodejeneratif bir hastalıktır. Demans, beyin korteksine ilişkin işlevlerin genel olarak bozulmasıdır. Bunlar, kişinin çevreyi farkındalığı (bilinci) bozulmaksızın, bellek, günlük yaşamın gereksinimleriyle başa çıkabilme yeteneğinde, algı ve devinime ilişkin işlevlerde, koşullara uygun düşen toplumsal davranışın korunabilmesinde ve duygusal tepkilerin kontrolünde bozulma şeklinde sıralanabilir [1]. Büyük çoğunlukla geri dönüşsüz ve ilerleyici bir hastalıktır. Genel olarak 60 yaşın üzerindeki kişilerde %10 olan Alzheimer Hastalığı görülme sıklığı, 85 yaşın üzerindeki kişilerde %50'lere kadar çıkmaktadır. Bu yüzden toplumun ortalama yaşam süresinin artması ile birlikte Alzheimer Hastalarının sayısı da giderek artmaktadır ve hastalık her geçen gün daha fazla kişiyi etkilemektedir. Alzheimer Hastalığı, ailesel ve sporadik olmak üzere iki gruba ayrılır. Ailesel Alzheimer Hastalığına az rastlanır. Tüm Alzheimer tipi demansların % 1-5'ini oluşturur. Ailesel Alzheimer Hastalığı'nda kalıtımın rolü kanıtlanmıştır ve Amiloid Öncül Protein (APP), Presenilin-1 ve Presenilin-2 genlerindeki mutasyonların erken başlangıçlı AH'nin büyük bir kısmından sorumlu olduğu gösterilmiştir. Kırklı yaşlardaki genç hastalar genellikle bu gruptandır. Sporadik türü ise tüm olguların % 95-99'unu oluşturur. Yaşlılarda görülen Alzheimer hastalığının tipik şeklidir. Geç başlangıçlı AH için belirlenen tek yatkınlık geni Apolipoprotein E'dir (ApoE). ApoE ε4 alleli hastalık riskini arttırmaktadır. Alzheimer hastalığının gerek görülme sıklığının giderek yükselmesi gerekse yaşam kalitesini düşürüp hastayı oldukça masraflı bir bakım sürecine mahkum etmesi nedeniyle, hastalığın tedavisi için yapılan araştırmalar her geçen gün artmakta ve önem kazanmaktadır.

Kalsiferol olarak da bilinen Vitamin D, kanda fosfor ve kalsiyumun normal seviyede tutulmasına yardım eden bir hormon öncüsüdür. Vitamin D her ne kadar deride sentezlenebiliyorsa da bu işlem güneş ışığından gelen ultraviyole radyasyona bağımlıdır [2, 3].

Yapılan son çalışmalardan elde edilen sonuçlar Vitamin D'nin, kalsiyum metabolizması üzerindeki etkilerinin yanı sıra, beyinde de önemli bir rolünün olduğunu göstermektedir [2, 3]. Vitamin D'nin etkisini gerçekleştirmesi için gerekli olan Vitamin

D Reseptörü'nün (VDR) ekspresyonu beyin çeşitli bölgelerinde gösterilmiştir [4]. Kalsitriol Reseptörü olarak da bilinen Vitamin D Reseptörü, genellikle sitoplazmada bulunur ve seçici olarak Vitamin D ile bağlanıp nukleusa hareket eder. Burada, Vitamin D reseptörü ile etkileşen proteinlerin (D Receptor Interacting Proteins = DRIP) katılımı ile belirli genlerin transkripsiyonunu regüle ederler [5]. Anabilim Dalımızda yapılmış olan bir çalışmada VDR geninin ligand bağlayıcı bölge polimorfizmleri ile Alzheimer Hastalığı arasında daha önce bildirilmemiş olan anlamlı bir ilişki saptanmıştır [6]. Söz konusu çalışmalar, Vitamin D miktarı ve Vitamin D alımı ile ilgili problemlerin nörodejeneratif hastalıklar ve nöron hasarı ile ilişkili olabileceğini düşündürmektedir.

Diğer taraftan, Vitamin D Bağlayan Protein (VDBP) gerek beslenme yolu ile alınan gerekse UV etkisi ile deride sentezlenen Vitamin D'nin plazmada taşınım ilgili hücrelere ulaştırılmasından sorumlu globüler bir proteindir. VDBP'nin sıklıkla rastlanan üç alleli bulunmaktadır: Gc1F, Gc1S ve Gc2 [7]. Ayrıca, çok nadir rastlanan ve bizim GcU olarak adlandırdığımız dördüncü bir alleli daha bulunmaktadır. Bu allellerle ilgili polimorfizmlerin Grave's Hastalığı ve diyabet gibi bir takım hastalıklara yatkınlığı bildiren çeşitli araştırmalar vardır [8-11]. Fakat, VDBP'nin nörodejeneratif hastalıklarla ilişkisine dair herhangi bir çalışmaya yapmış olduğumuz literatür taramasında rastlanmamıştır. Gerek Anabilim dalımızda daha önce yapılan genetik çalışmaların sonuçları, gerek Vitamin D'nin beyin üzerindeki etkileri ile ilgili çalışmalar, gerekse VDBP'nin plazma haricinde serebral sıvıda da bulunması [7] değerlendirildiğinde Vitamin D taşınmasında meydana gelen hataların Alzheimer hastalığı ile ilişkili olabileceği düşünülebilir. Bu bağlamda, bu çalışmanın amacı VDBP polimorfizmi ile geç başlangıçlı Alzheimer hastalığı arasında bir ilişki olup olmadığını araştırmaktır.

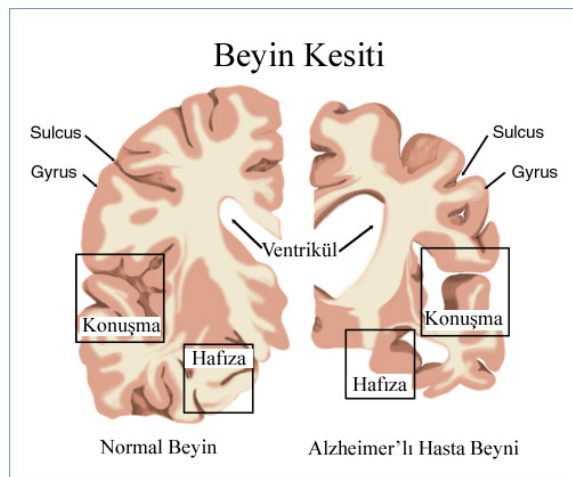
## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Alzheimer Hastalığı

Alzheimer Hastalığı'nın (AH) klinik ve nöropatolojik özellikleri, ilk olarak 1906 yılında Tübingen kentinde yapılan Alman Psikiyatri Derneği 37. Toplantısı'nda Dr. Alois Alzheimer tarafından tanımlanmıştır [1, 12] sonra Emil Kraepelin bu hastalığa "Alzheimer Hastalığı" adını vermiştir [1].

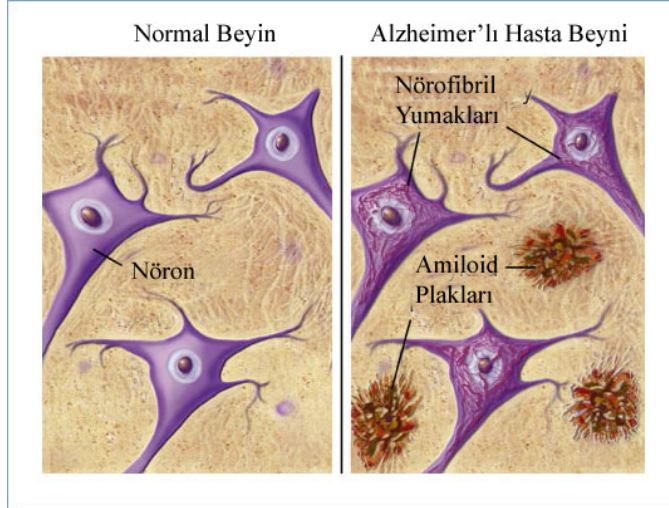
Alzheimer Hastalığı, geri dönüşü olmayan ve ilerleyici bir hastalıktır. Alzheimer Hastalığı, demansın en sık rastlanan nedenidir. 2006 yılı itibariyle dünyada yaklaşık 20 milyon Alzheimer hastası olduğu tahmin edilmektedir [1] ve her sene yaklaşık 4,6 milyon kişi bu hastalığa yakalanmaktadır [13].

Alzheimer Hastalığı patolojisinin esas bileşenleri hücre dışında bulunan amiloid beta plakları ile hücre içinde toplanan nörofibril yumaklarıdır (NFY). Anatomik seviyede ise beyinin temporal lobu, parietal lobu, frontal korteks ile singulate gyrus bölgelerinde atrofi ve serebral korteks ile belirli subkortikal bölgelerde nöronların ve sinapsların kaybı görülür (Şekil 2.1-2.2) [14].



**Şekil 2.1: Alzheimer'lı hasta beyni ile normal beynin anatomik olarak karşılaştırılması**

Alzheimer hastasının beyininde nörodejenerasyona bağlı olarak hipokampus ve serebral kortekste küçülme, ventriküllerde ise belirgin genişleme göze çarpmaktadır [15].

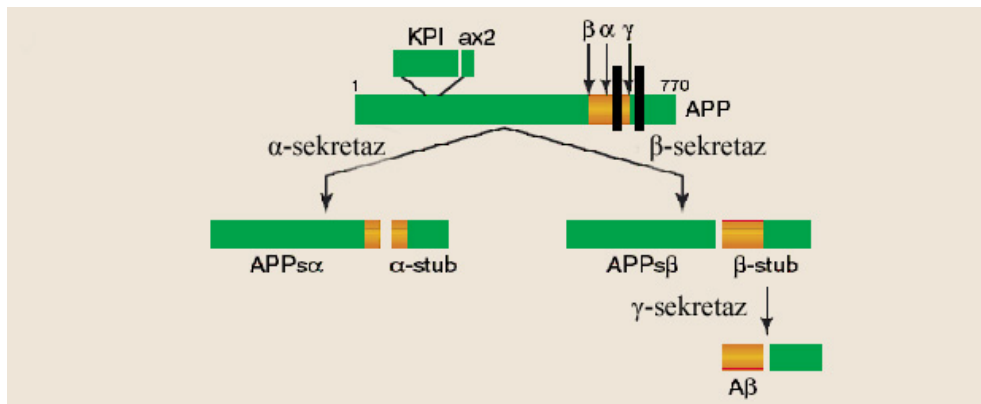


**Şekil 2.2: Alzheimer'lı hasta beyni ile normal beynin mikroskopik yapısının sematik olarak karşılaştırılması**

Alzheimer hastalığı patolojisinin en önemli bileşenleri olan nörofibril yumakları nöronların sitozolünde bulunurken, amiloid  $\beta$  plakları hücrelerarası alanda gözlenmektedir [16].

### 2.1.1. Amiloid Beta ( $A\beta$ )

Amiloid  $\beta$ , 40-42 aminoasit uzunluğunda bir proteindir. Tek geçişli bir membran proteini olan Amiloid öncül proteininin (APP) kesilmesi ile oluşur [17].  $A\beta$  proteininin amino ucu, APP'nin hücre dışı kısmında bulunur ve proteininin transmembran kısmına 28 aminoasit uzaklıktadır. Karboksil ucu ise APP proteininin transmembran kısmında bulunur. N ve C uçlarının kesilmelerini sağlayan enzimler sırasıyla  $\beta$ -sekretaz ve  $\gamma$ -sekretazdır (Şekil 2.3). Üçüncü bir enzim olan  $\alpha$ -sekretaz ise 16 ile 17. bakiyeler



**Şekil 2.3: APP'den  $A\beta$  oluşumu.**

APP'nin,  $\beta$ -sekretaz ile kesimi  $A\beta$ 'nin N ucunu oluştururken  $\gamma$ -sekretaz ile kesimi ise C ucunu oluşturur.  $\alpha$ -sekretaz ile kesim ise  $A\beta$  oluşumunu engeller [1].

arasından kesim yaparak Amiloid- $\beta$  oluşumunu engeller. Amiloid- $\beta$ 'nin 40 ve 42 aminoasitlik olmak üzere başlıca iki şekli bulunmaktadır. 42 aminositlik olan daha fazla birikme özelliğine sahiptir [18].

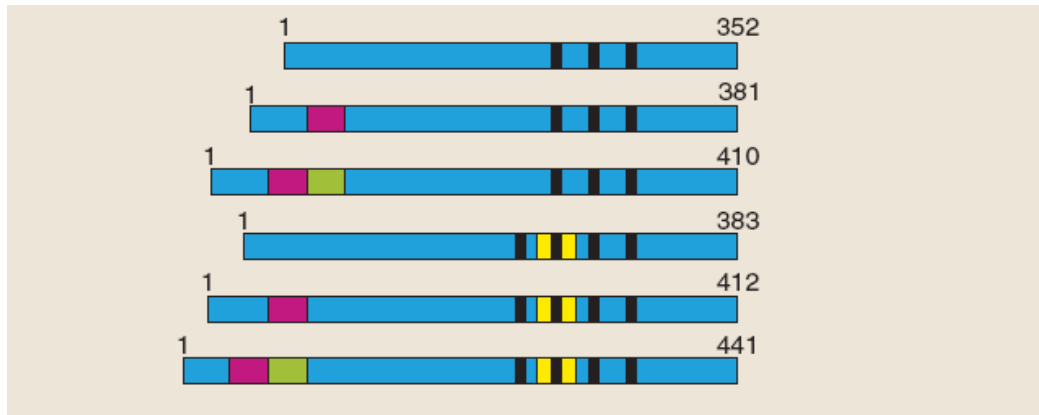
### 2.1.2.Nörofibril Yumakları

Nörofibril yumakları (NFY) sinir hücrelerinin sitoplazmasında bulunan hücre içi birikimlerdir. Amiloid Beta plakları ile birlikte Alzheimer Hastalığından etkilenmiş beynin tipik patolojisini oluştururlar. Nörofibril yumaklarının yoğunluğu, demansın şiddeti ile doğru orantılıdır [19]. Ayrıca, NFY ile sinaps kaybı arasında bir ilişkinin bulunduğu da gösterilmiştir [20]. NFY'ler başlıca çiftli sarmal filamentlerden (PHF) oluşur. Bu filamentlerin yapısında ise bir mikrotübül bağlantılı protein (MAP) olan tau proteini vardır [21].

#### 2.1.2.1.Tau Proteini

Tau proteinleri, özellikle nöronlarda ve merkezi sinir sisteminde bolca bulunan mikrotübül bağlantılı proteinlerdir. 1975 yılında, Princeton Üniversitesinden Marc Kirschner tarafından bulunmuştur [22].

Tau proteinleri, tübülün altbirimlerinin polimerize olarak mikrotübül oluşturmasını sağlamak ve mikrotübülleri kararlı hale getirmek üzere tübülün proteinleriyle etkileşim halindedir. Tau proteini, mikrotübüllerin kararlılığını izoformları ve fosforilasyon yoluyla gerçekleştirir.



**Şekil 2.4: İnsan beyninde ekspresyonu yapılan altı tau izoformu.**

Alternatif

kırılmaya uğrayan ekzonlar sırasıyla kırmızı, yeşil ve sarı ile gösterilmiştir. Mikrotübül bağlayan bölgeler ise siyahla gösterilmiştir [1].

Beyin dokusunda altı tau izoformu bulunmaktadır ve bunlar mikrotübül bağlanma bölgelerinin sayısı ile birbirinden ayrılırlar (Şekil 2.4). Üç izoformu, üç mikrotübül bağlanma bölgesine sahipken, diğer üç izoformunun dört bağlanma bölgesi bulunmaktadır. İzofomlar, tau geninin ekzon 2,3 ve 10 bölgelerindeki alternatif kırılmalar sonucu oluşurlar. Bağlanma bölgeleri proteinin karboksi ucunda bulunur ve pozitif yüklüdür. Pozitif yüklü olmaları, negatif yüklü mikrotübüle bağlanmalarına olanak sağlar.

Dört bağlanma bölgesine sahip izofomlar, mikrotübülü kararlı kılmada üç bağlanma bölgesine sahip olan izofomlara oranla daha başarılıdır. Sağlıklı bir bireyin beyininde nörodejenerasyonun ve demansın önlenmesi için 3 bağlanma bölgesine sahip tau'ların dört bağlanma bölgesine sahip tau'lara göre sabit bir oranda bulunması zorunludur [1].

Tau proteininin fosforilasyonu bir serin/threonin kinaz olan Protein kinaz N (PKN) gibi birçok kinaz ile düzenlenir. PKN aktive edildiğinde, tau proteinini fosforile ederek mikrotübül organizasyonunu bozar [23].

Tau proteinlerinin hiperfosforilasyonu, Tau yumaklarını oluşturan tau filamentlerinin oluşumuna yol açar. Filament halindeki tau proteinleri Alzheimer hastalığının yanı sıra İlerleyici Supranuklear Palsi (PSP), Kortiko Bazal Dejenerasyon (CBD), Pick's Hastalığı, Arjirofilik Granül Hastalığı (AGD) ve Guam'ın Parkinson-Demans Kompleksi gibi nörodejeneratif hastalıklarda sıklıkla gözlenir [24].

İleri yaş, AH için önemli bir risk faktörüdür. Çoğu bireyin beyininde yaşlandıkça az sayıda A $\beta$  plakları ve nörofibril yumakları oluşur [25]. Tau patolojisi ilk olarak transentorhinal bölgede meydana gelir ve oradan hipokampusa ve amygdalaya daha sonra da neokortikal bölgelere yayılır. A $\beta$  plakları ise ilk olarak neokortekste gözlenir. Bu iki tip inklüzyon da (A $\beta$  plakları ve nörofibril yumakları) birbirinden bağımsız oluşur. İlk oluşanlar Tau yumaklarıdır. Sonraki aşamalarda A $\beta$  plaklarının neokortekste birikmesinin ciddi yumak oluşumuna öncülük ettiği bildirilmiştir [26]. Bu yüzden A $\beta$  birikmesinin, yaşla bağlantılı tau patolojisini arttırdığı düşünülmektedir. Aynı zamanda, APP geninde meydana gelen mutasyonlar ve duplikasyonlar sonucunda A $\beta$  42'nin artması tau'da fonksiyon bozukluğuna yol açar. Diğer taraftan, tau'daki mutasyonlar

filament oluşumuna, nörodejenerasyona ve demansa neden olurken A $\beta$  birikimine yol açmaz.

### 2.1.3. Ailesel Alzheimer Hastalığı

Presenilin-1 (PS-1) genindeki mutasyonlar, ailesel AH'nin başlıca sebebidir. PS-1 mutasyonları erken evre AH'nin % 30-50'sinde bulunmaktadır [27]. Ayrıca, bağlantılı bir protein olan Presenilin-2 genindeki mutasyonların da bu hastalığa yol açtığı bilinmektedir [28]. Bu güne kadar, presenilin genlerinde 160'dan fazla mutasyon tanımlanmıştır. Presenilinler, APP'nin  $\gamma$ -sekretazla kırılmasından sorumlu atipik aspartil proteaz komplekslerinin bileşenlerinden biridir [29]. Presenilin-1 mutasyonları, hastaların serumlarında Amiloid  $\beta$ -42'nin artmasına neden olur. Bu artışın sebebi,  $\gamma$ -sekretaz aktivitesinin azalmasıdır [30].

Bunlar iki gen haricinde Amiloid Beta Öncül Proteinindeki (APP) mutasyonlar da ailesel alzheimer hastalığına yol açmaktadır. APP geni, 21. kromozom üzerinde bulunur. APP geninde, AH hastalığına yol açan 6 çeşit yanlış anlamlı (missens) mutasyon saptanmıştır. APP gen mutasyonları bütün Ailesel Alzheimer Hastalarının %2'sininde, erken-evre AAH'larının ise %5-7'sinde görülür [31].

### 2.1.4. Sporadik Alzheimer Hastalığı

Sporadik Alzheimer, olguların yaklaşık %95-99'unu teşkil eder. Sporadik Alzheimer için en iyi bilinen genetik risk faktörü Apolipoprotein E'nin (ApoE)  $\epsilon$ 4 allelinin kalıtımıdır [32, 33]. Amiloid- $\beta$  plakları,  $\epsilon$ 4 pozitif bireylerde,  $\epsilon$ 4 negatif bireylere oranla daha fazla bulunmaktadır [34]. Ayrıca ApoE  $\epsilon$ 4 alleli; AH patolojisine mitokondriyal anormaliler, sitoskelet fonksiyon bozukluğu ve şeker kullanımında azalma gibi diğer faktörler aracılığı ile de katılmaktadır [35].

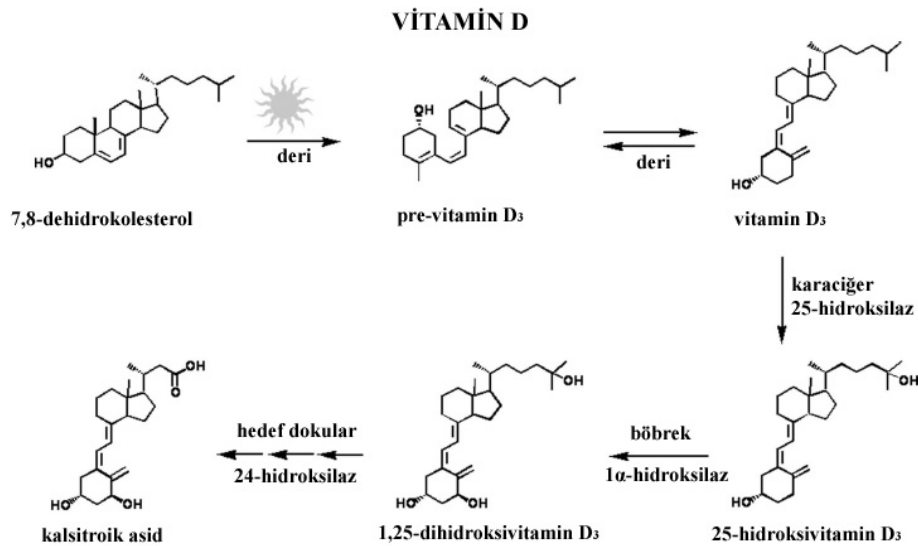
Alzheimer Hastalığı'nda nörodejenerasyonun, ilk klinik semptomlar görülmeden yaklaşık 20-30 yıl önce başladığı tahmin edilmektedir. Erken klinik safha genellikle amnestik hafif bilişsel bozukluk (aMCI) olarak adlandırılır [36]. aMCI'nin nöropatolojik özellikleri yaşlılıkla AH arasındadır: Tau birikimi entorhinal korteks ve hipokampusda bolca bulunurken A $\beta$  birikimi neokortekste gözlenir.

AH'nin uzun presemptomik evresi hastalığı önleyici stratejilerin geliştirilmesi için önemlidir. Bu stratejilerin etkinliğini test etmek için bilişsel değişiklikler

gelişmeden önce nöropatolojik anomalilerin tespit edilmesi gereklidir. Bir thioflavin T türevi olan Pittsburg Bileşiği B'nin (PIB) AH'li hastalarda ve demans göstermeyen yaşlılarda A $\beta$  birikiminin gözlenmesinde kullanılabilir [37]. PIB klinik ve prelinik safhadaki hastalığı belirleyebilmektedir. Gelecekte tau birikimlerini de canlı insan beyinde görüntülemek mümkün olacaktır.

## 2.2.Vitamin D

Kalsiferol olarak da bilinen Vitamin D, kanda fosfor ve kalsiyumun normal seviyede tutulmasına yardım eden bir hormon öncüsüdür. Vitamin D besinlerle alınmakla birlikte çoğunlukla deride sentezlenir. Güneş ışığında bulunan 290-315 nm dalga boyu uzunluğundaki Ultraviyole B (UVB) ışınları insan derisindeki vitamin D<sub>3</sub> öncüsünün yapımından sorumludur (Şekil 2.5) [2, 3].



**Şekil 2. 5: Vitamin D sentezi, aktif hale gelmesi ve katabolizması.**

Vitamin D, deride 7-dehidrokolesterolün fotolitik kırılması ve takiben termal izomerizasyonu ile üretilir. Daha sonra, serumda bulunan Vitamin D bağlayan protein ile karaciğere taşınır. Burada Vitamin D'nin dolaşımdaki başlıca metaboliti olan 25-hidroksivitamin D<sub>3</sub>'e dönüştürülür. Aktif hale gelmesi için son adım ise, çoğunlukla böbrekte gerçekleşen 1- $\alpha$ -hidroksilasyondur. Böylelikle vitamin D'nin hormonal şekli olan 1,25-dihidroksivitamin D<sub>3</sub> oluşur. Vitamin D'nin katabolizması ise 24-hidroksilaz ile gerçekleşir. Bu enzim, bir seri oksidasyonu katalizler [38].

Bu yüzden, epidermise ulaşan UVB fotonları sayısındaki düşüş vitamin D<sub>3</sub> üretimini önemli ölçüde etkiler. Artan deri pigmentasyonu ise vitamin D<sub>3</sub> üretimini normalin 1/60'ına kadar düşürür [39]. Ayrıca, koruma faktörlü güneş kremi kullanmak da epidermise ulaşan UVB fotonu sayısında %99,9'a kadar ulaşabilen önemli bir azalmaya sebep olduğundan Vitamin D üretiminde aynı oranda düşüşe neden olur. Ayrıca, güneş ışınlarının dünya üzerine ulaştığı açı da sentezlenen Vitamin D miktarını etkilemektedir. Kış aylarında daha yatay açılarla ulaşan güneş ışınlarındaki UVB fotonlarını çoğu ozon tabakası tarafından absorbe edilir. Bu da, vitamin D'nin çok az sentezlenmesi veya hiç sentezlenmemesi ile sonuçlanan bir durumdur. Özellikle 35° Kuzey ve 35° Güney enlemleri arasında yaşayan insanlar haricinde kalanlar, bu sorunla karşı karşıyadırlar [40]. Deride Vitamin D sentezlenmesini azaltan bir diğer faktör de yaşlanmadır. 70 yaşındaki bir birey, 20 yaşındaki bir bireyin 1/4'ü kadar vitamin D sentezler.

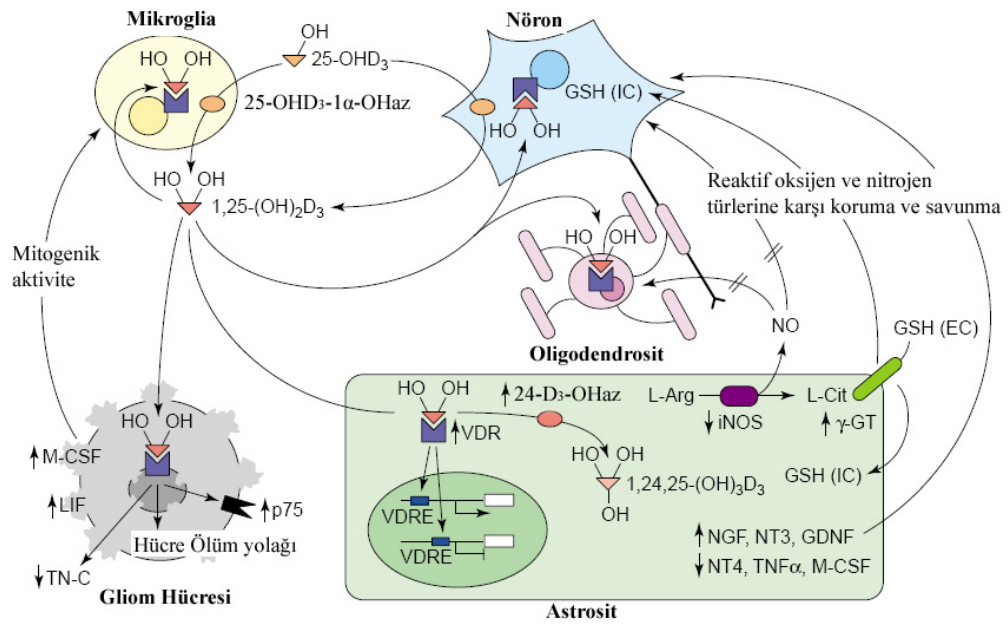
İnsanda Vitamin D'nin başlıca kaynağı UVB ışığı altında deride sentezlenen vitamin D öncüsü olsa da, Vitamin D besinlerle de alınabilmektedir. Özellikle balık yağı, karaciğer, ve Vitamin D ile güçlendirilmiş süt ürünleri, Vitamin D açısından zengin besinlerdir. Bu yüzden, vitamin D eksikliği olanlar tarafından günlük diyetten çıkarılmamalıdır.

Vitamin D başlıca, kalsiyum ve fosfat metabolizmasında, kemik oluşumu ve devamlılığında görev almaktadır. Fakat 1970'lerden itibaren vitamin D'nin diğer önemli işlevleri de keşfedilmeye başlamıştır. Bunlardan bir tanesi Vitamin D'nin glukoz homeostazında aldığı görevdir. İnsanlarda ve hayvan modellerinde Vitamin D eksikliğinin, yetersiz insülin salgılanmasına neden olduğu ve Vitamin D takviyesi ile bu durumun normale döndüğü gösterilmiştir [41, 42]. Ayrıca, insanlarda Vitamin D metabolitleri ile plazma glukoz ve insülin seviyeleri arasında bir bağlantı olduğu gözlenmiştir [42]. Vitamin D'nin insülin sentezini nasıl düzenlediği şimdilik tam olarak bilinmese de pankreas-β hücrelerinde protein sentezini aktive ettiği [43], glikolitik yolağı düzenlediği[44], β hücrelerine kalsiyum akışını arttırdığı [45] ve proinsülinin insüline dönüşümünü uyardığı gösterilmiştir.

Bunların yanı sıra, Vitamin D hücre çoğalmasının düzenlenmesinde görev almaktadır. Vitamin D'nin hücre çoğalmasının düzenlenmesinde görev aldığına dair ilk bilgiler Abe ve arkadaşlarının 1981 yılında lösemi hücre soylarında yaptığı

araştırmayla başlamıştır. Bu çalışmada, Vitamin D'nin çeşitli insan lösemi hücre soylarında klonal proliferasyonu inhibe ettiği, normal ve lösemik myeloid öncülerin daha olgun, ve daha az agresif fenotiplere farklılaşmasını sağladığı gösterilmiştir [46]. Vitamin D ayrıca apoptozu da düzenleyerek hücre çoğalmasında etkin bir rol oynar. Örneğin, meme kanserinde Bcl-2 ve Bax'ın karşılıklı düzenlenmesi ile apoptozu tetikler [47].

Vitamin D'nin kas fonksiyonları üzerinde de etkileri görülmektedir. Vitamin D eksikliğinde, iskelet kası zayıflıkları ve atrofi oluşmaktadır [48]. Her ne kadar bu etki düşük  $Ca^{+2}$  miktarının bir sonucu gibi gözükse de Vitamin D Reseptörü (VDR) geni çıkarılmış farelerde normal olmayan kas gelişimi bu durumun Vitamin D ile ilişkili olduğunu göstermektedir [49].



**Şekil 2.6: Beyindeki Vitamin D sinyal yolu.**

1,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>'ün bölgesel sentezi, aktive olmuş gliaların yanı sıra nöronlar gibi 25-OHD<sub>3</sub>-1α-OHaz ekspresyonu yapan hücreler tarafından gerçekleştirilir. 1,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>'ün mikrogliyalardan merkezi sinir sistemindeki bu bölgesel sentezi anti-tümör cevabı oluşturabilir. Çünkü 1,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> glioma hücrelerinde hücre ölümünü ve/veya farklılaşmasını uyarır. Beyindeki 1,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> astrositler gibi 24-D<sub>3</sub>-OHaz ekspresyonu yapan hücreler tarafından metabolize edilir. VDR ekspresyonu yapan glial ve nöronal hücreler 1,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> için hedef hücrelerdir. Astrositlerde 1,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>, NGF, NT3 ve GDNF gibi nörotrofinlerin ve γ-glutamil transpeptidazın sentezini artırarak koruyucu etki oluşturur. iNOS sentezinin 1,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> tarafından baskılanması 1,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>'ün bir diğer nöroprotektif etkisidir [50].

Vitamin D'nin özellikle son yıllarda ortaya çıkan bir diğer önemli fonksiyonu da sinir sistemindeki görevleridir (Şekil 2.6). Önceleri, beyindeki Vitamin D kaynağının vitamin D'nin plazma konsantrasyonuna bağımlı olduğu kabul edilse de yapılan son çalışmalarla, Vitamin D öncüsünün biyoaktivasyonu için gerekli olan Vitamin D<sub>3</sub>-hidroksilaz ve 25-hidroksivitamin D<sub>3</sub>-1- $\alpha$ -hidroksilaz enzimlerinin merkezi sinir sisteminde varlığının gösterilmesiyle bu varsayımın geçerliliği sorgulanmaktadır [51]. Bu bağlamda, kültürdeki mikroglial hücrelerin Vitamin D'yi öncüsünden sentezleyebildikleri gösterilmiştir [52].

Vitamin D'nin sinir sistemi üzerinde koruyucu etkisi göze çarpmaktadır. Özellikle sinir büyüme faktörünün (NGF) sentezi Vitamin D ile düzenlenir [53]. Bunun haricinde Vitamin D diğer bazı nörotrofinlerin sentezinin düzenlenmesinde de rol oynar. Örneğin Vitamin D; sinir büyüme faktörü (NGF), Nörotrofin 3 (NT3) ve glial hücre kökenli nörotrofik faktör (GDNF) sentezini arttırırken; nörotrofin 4 (NT4) sentezini azaltır [54]. Nörotrofin sentezinin Vitamin D tarafından arttırılmasının nöroprotektif etkiyle bağlantılı olduğu çeşitli çalışmalarla ortaya konmuştur [55]. Özellikle, 6-hidroksidopaminle tetiklenen nörotoksisite ve hipokinezin Vitamin D ile azaltılması önemlidir [56].

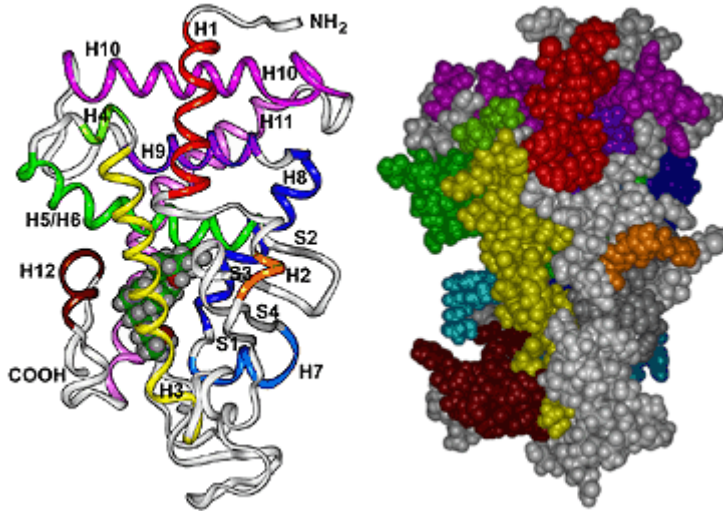
Vitamin D, sinir sistemi üzerindeki koruyucu etkilerini sadece nörotrofin sentezini düzenleyerek sağlamaz. Aynı zamanda, nöronal Ca<sup>+2</sup> homeostazını düzenleyerek de gösterir. Bu etkisini özellikle hipokampusdaki nöronlarda voltaja duyarlı L-tipi kalsiyum kanallarının sentezini azaltarak gösterir. Böylelikle eksitotoksik etkilere karşı nöroprotektif bir etki göstermiş olur [57]. Vitamin D'nin nöroprotektif etkisini gösterdiği bir diğer yol da, parvalbumin gibi kalsiyum bağlayan proteinlerin sentezini arttırmasıdır [58]. Vitamin D ayrıca uyarılabilir nitrik oksit sentazın (iNOS) sentezini engeller. iNOS, yüksek seviyelerde eksprese edildiğinde nöronlara ve oligodendritlere hasar veren nitrik oksit üretir. iNOS seviyesinin Alzheimer, Parkinson, Multiple Skleroz gibi nörodejeneratif hastalıklarda yükselmesi bu bağlamda dikkat çekicidir [59].

### **Alzheimer ve Vitamin D**

Alzheimer hastalarında vitamin D seviyesinin düşük olduğu ve bu yüzden kalça kırıklarına daha sık rastlandığı yapılan bir takım çalışmalar ile ortaya konmuştur [60-62]. Ayrıca Vitamin D seviyesi düşük olan hastalarda mod bozuklukları ve algılamada

sorunlar gözlemlendiği belirtilmiştir [63]. Bu konudaki bir diğer dikkat çekici bulgu da siyah ırkta vitamin D eksikliğinin beyaz ırka göre daha fazla görülmesinin yanı sıra, Alzheimer hastalığına yakalanma oranının da beyaz ırka göre daha fazla olduğudur. Benzer bir ilişki kadın ve erkek bireyler arasında da geçerlidir. Kadınlarda Vitamin D eksikliği daha sık görülmektedir ve Alzheimer Hastalığı'na yakalanma oranı da erkek bireylere göre daha fazladır.

Vitamin D'nin, nuklear fonksiyonları Vitamin D reseptörü (VDR) tarafından gerçekleştirilir (Şekil 2.7) [64]. Gerek VDR geni mRNA'sı gerekse VDR proteini sinir sistemi hücrelerinde bulunmaktadır. VDR geni ekspresyonu, hem nöronlarda hem de glial hücrelerde gösterilmiştir [4]. VDR mRNA seviyesinin, Alzheimer Hastalığında, hipokampusun CA1 ve CA2 piramit hücrelerinde azaldığı gözlemlenmiştir [65]. Ayrıca, Alzheimer Hastalığı ile VDR geni polimorfizmi arasında bir ilişki bulunduğu gösterilmiştir [6].



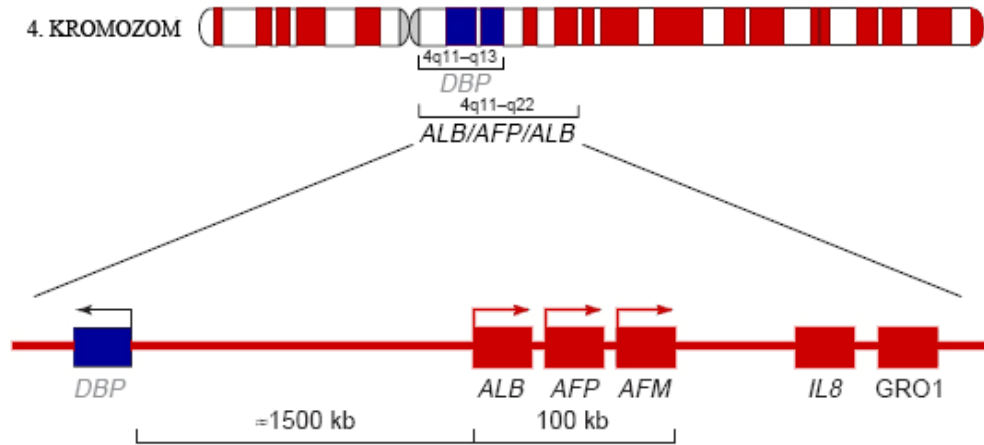
**Şekil 2.7: Vitamin D Reseptörü'nün üç boyutlu yapısı [66]**

Bu sonuçlar, Alzheimer Hastalığı ile Vitamin D yolağı arasında muhtemel bir ilişkiyi göstermektedir. Vitamin D yolağında yer alan diğer bir önemli protein ise Vitamin D'nin plazmada taşınmasını sağlayan Vitamin D Bağlayan Proteindir (VDBP).

### 2.3.Vitamin D Bağlayan Protein

İnsan serumunda bulunan VDBP, yaklaşık 58 kDa ağırlığında bir glikoproteindir [67]. VDBP; albumin (ALB),  $\alpha$ -fetoprotein (AFP), ve  $\alpha$ -albumin/atamin (AFM) gen ailesinin bir üyesidir. İnsanda, 4. kromozomda, 4q11-q13 bantları arasında bulunmaktadır (Şekil 2.8) [68]. Son zamanlarda yapılan çalışmalar sayesinde bu bölgenin haritası çıkarılmış ve bu aileye ait genlerin sentromere göre yerleşimi belirlenmiştir: 3'-DBP-5'-5'-ALB-AFP-AFM-3'-telomer [69].

VDBP'nin cDNA yapısı, ilk olarak insanlarda belirlenmiştir. Bunu sırasıyla sıçan, fare, tavşan, kaplumbağa ve en son olarak da tavuk izlemiştir [67]. VDBP, 16 aminositlik sinyal peptid dizisi kesildikten sonra, ALB ve AFP ile belirgin bir dizi homolojisi gösteren 458 amino asitlik bir protein olarak salgılanır. VDBP, diğer ALB ailesi üyeleri gibi yüksek sistein miktarına (hepsi disülfid halinde, toplam 28 adet) ve özgün üç bölgesi olan modüler bir yapıya sahiptir. Yapısında iki farklı bağlama bölgesi tanımlanmıştır. Bunlardan biri 35 ile 49'uncu bakiyeler arasında bulunan Vitamin D bağlayan bölge; diğeri ise 373 ile 403'üncü bakiyeler arasında bulunan aktin bağlayan

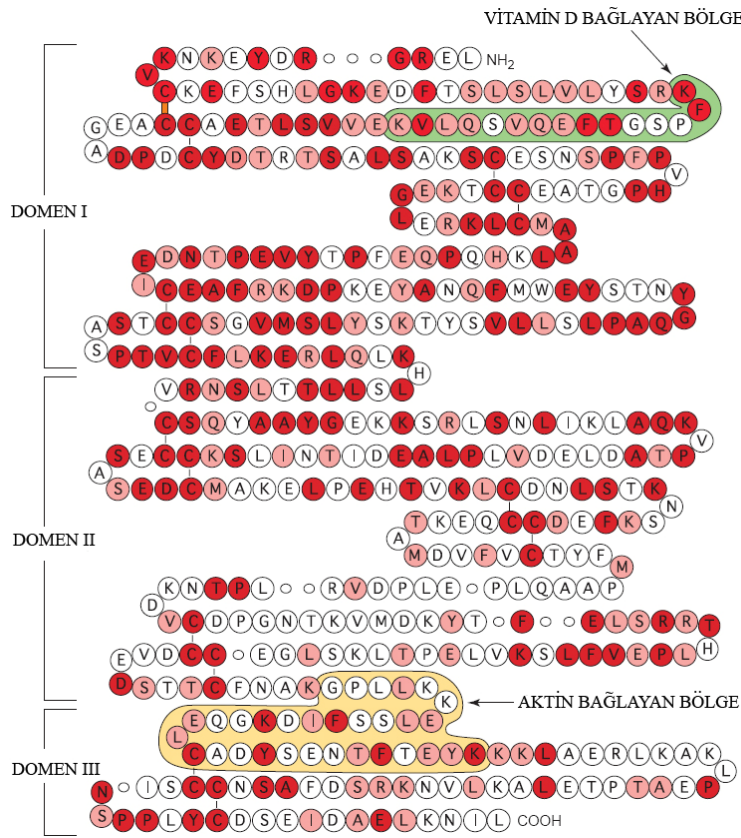


**Şekil 2.8: Vitamin D bağlayan Protein (VDBP), ve albumin gen ailesi üyeleri insan 4. kromozomu üzerinde ve birbirleri ile bağlantılıdır.**

VDBP, insan 4'üncü kromozomu üzerinde 4q11-q13 bantları arasında yerleşmiş tek bir gen tarafından kodlanır ve 4q11-4q22 arasında yerleşen diğer üç aile üyesiyle bağlantılıdır. Yapılan son çalışmalar sayesinde bu bölgenin haritası çıkarılmış ve şekilde gösterildiği üzere VDBP ile ALB geninin birbirlerinden yaklaşık 1.5 megabaz uzaklıkta oldukları gösterilmiştir. Oklar transkripsiyon yönünü göstermektedir. AFM,  $\alpha$ -albumin/atamin kodlayan gen; AFP,  $\alpha$ -fetoprotein kodlayan gen; ALB, albumin kodlayan gen [67].

bölgedir [70]. Son yapılan çalışmalarla; Vitamin D'nin sterol bağlayan cep bölgesinin çok seçici olduğu, böylelikle bağlanma cebinin içerisinde ligandın üç boyutlu bütünlüğünün korunduğu ortaya konmuştur (Şekil 2.9-2.10) [71].

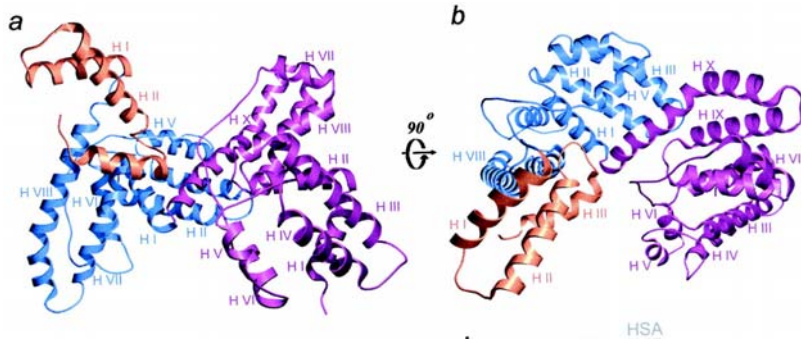
VDBP molekülü bilinen 124'den fazla çeşidiyle çok yüksek seviyede bir polimorfizm göstermektedir [72]. Hatta, VDBP'nin bilinen proteinler arasında en



**Şekil 2.9: Vitamin D Bağlayan proteinin Gc1S allelinin amino asit dizisi ve tahmini ikincil yapısı.**

458 amino asitlik VDBP'nin disülfid bağları ile katlanmış hali ve üç bölgeyi gösterilmektedir. Üçüncü bölge, VDBP'de kesilmiş haldedir, fakat albuminde (ALB) ve a-fetoproteinde (AFM) tam boydadır. Küçük, içi boş daireler ALB ve AFM'de bulunan fakat VDBP'de bulunmayan amino asit bakıyelerini göstermektedir. Sterol bağlayan bölgeyi (35 ile 49'uncu bakıyeler arasındaki yeşille gösterilmiş bölge) oluşturan turuncuyla gösterilmiş disülfid bağıyla oluşmuş küçük kıvrım ALB ve AFB'de bulunmamaktadır. Bilinen bütün VDBP formlarında 28. sistein bakıyesi korunmuş durumdadır. Deneysel olarak belirlenmiş aktin bağlayan bölge (373 ile 403'üncü aminosit bakıyeleri arasındaki) sarı renk ile gösterilmiştir. Şekil insan, tavşan, sıçan, fare, kaplumbağa ve tavuktaki VDBP amino asit dizilerini göstermektedir. Türe özgü olan amino asitler kırmızı, türler arasında korunanlar pembe renk ile gösterilmiştir. [67]

polimorfik olanların arasında bulunduğu söylenebilir. VDBP her ne kadar yüksek oranda polimorfizm gösterse de, molekülün başlıca üç izotipi bulunmaktadır: Gc1f (f, “fast (hızlı) elektroforez” göçünü ifade etmektedir), Gc1s (s, “slow (yavaş) elektroforez” göçünü ifade etmektedir) ve Gc2. Her bir izotipin beyaz ırkta görülme sıklığı ise; Gc1s için “% 56”, Gc1f için “% 16”, Gc2 için “% 28”dir [8]. İzotipler, molekülün 416’ncı (Asp/Glu) ve 420’inci (Lys/Thr) pozisyonlarındaki değişimlerin farklı kombinasyonları ile birbirinden ayrılır. Hem Gc1f hem de Gc1s izotipleri, içerdikleri karbohidrat parçalarıyla birbirinden ayrılan iki ana alttıpe sahiptir (Gc1a ve Gc1c). VDBP O-bağlantılı glikozillenme gösterir. Glikozillenme molekülün III. bölgesinde threonin veya serin bakiyesinde (Ser/Thr 418, Thr420) bulunur. Eklenen



**Şekil 2.10: Serbest haldeki VDBP'nin kristal yapısı.**

VDBP yapısının temsili kurdela (ribbon) çizimi a ve b de 90 derece çevrilerek resmedilmiştir. VDBP'nin üç bölgesi sırasıyla mor (bölge I), mavi (bölge II) ve turuncu (bölge III) ile belirtilmiştir [73].

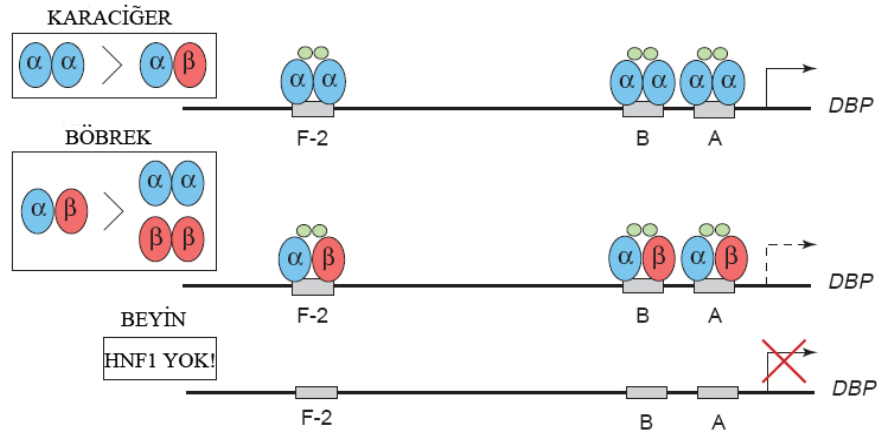
karbohidrat parçası, N-asetilgalaktozamin (GalNac), galaktoz veya siyalik asit içeren küçük bir disakkarit veya trisakkaritden oluşur [7].

VDBP'nin nötrofiller, fibroblastlar, monositler, T ve B hücreleri, plasentadaki sitotrofoblastlar, domuz böbreği tübül hücreleri, sıçan pankreatik asinar hücreleri, insan kas hücreleri gibi çok sayıda hücrenin yüzeyiyle ilişkili olduğu gösterilmiştir. VDBP'nin hücre yüzeyiyle etkileşimi kondroitin sülfat proteoglikanları aracılığıyla gerçekleşir [74].

### 2.3.1.VDBP Ekspresyonu

VDBP geninin birçok dokuda ekspresyonu yapılır. Fakat, serumda bulunan VDBP'nin büyük bir kısmı karaciğerde yapılan ve salgılanan bir üründür. İnsanlarda VDBP, ALB ile paralel olarak fetal karaciğerde de eksprese edilir ve ilk trimesterin sonunda normal erişkin değerine (4-8 mM) ulaşır [67]. Ekspresyonu östrojene bağımlı olduğu için, yüksek östrojen seviyesinde VDBP miktarı %50 kadar artabilir. Ciddi karaciğer hastalıklarında ise önemli ölçüde düşer [75]. *In vivo* yarı ömrü yaklaşık 2,5-3 gündür. Kan plazmasının dışında Beyin Omirilik Sıvısı (BOS), seminal sıvı, tükürük ve anne sütü gibi çeşitli sıvılarda da VDBP'inin varlığı gösterilmiştir [7].

VDBP geninin proksimal promotör bölgesiyle yapılan çalışmalar, 2 kb boyundaki başlangıç transkripsiyon bölgesinde üç adet hepatosit nuklear faktör 1 (HNF1) bağlayan fonksiyonel bölge belirlemiştir. VDBP gen transkripsiyonunun, bu



**Şekil 2.11: Vitamin D Bağlayan Protein geninin hepatosit nuklear faktör 1 ile düzenlenmesini gösteren model.**

VDBP geninin proksimal promotör bölgesindeki 2 kb'lık transkripsiyonel başlangıç bölgesi içinde üç tane HNF1- bağlayan bölge ( A, B ve F-2) bulunmaktadır. HNF1α (mavi) trans aktivatör olarak, HNF1β ise HNF1α aktivasyonunun trans dominant inhibitörü olarak görev yapmaktadır. HNF1 altüniteleri, 11 kDa ağırlığında bir kofaktör olan DCOH (yeşil) adlı üçüncü bir proteinle birleşerek homo- veya heterodimer bir yapı oluşturur ve HNF1- bağlanma bölgelerine bağlanır. Ekspresyon, HNF1α ve HNF1β izoformlarının göreceli ekspresyonuna bağlıdır. Bu yüzden HNF1α'nın yüksek miktarda bulunduğu karaciğerde VDBP yüksek miktarda eksprese edilir. Böbrekte, HNF1β ve dolayısıyla heterodimerler fazladır. bu yüzden böbrekte VDBP ekspresyonu belirgin bir şekilde azalır. Beyinde ise HNF1 sentezlenmediğinden VDBP ekspresyonu yoktur. DCOH, HNF1'in dimerizasyon kofaktörü; HNF1, hepatosit nuklear faktör [67].

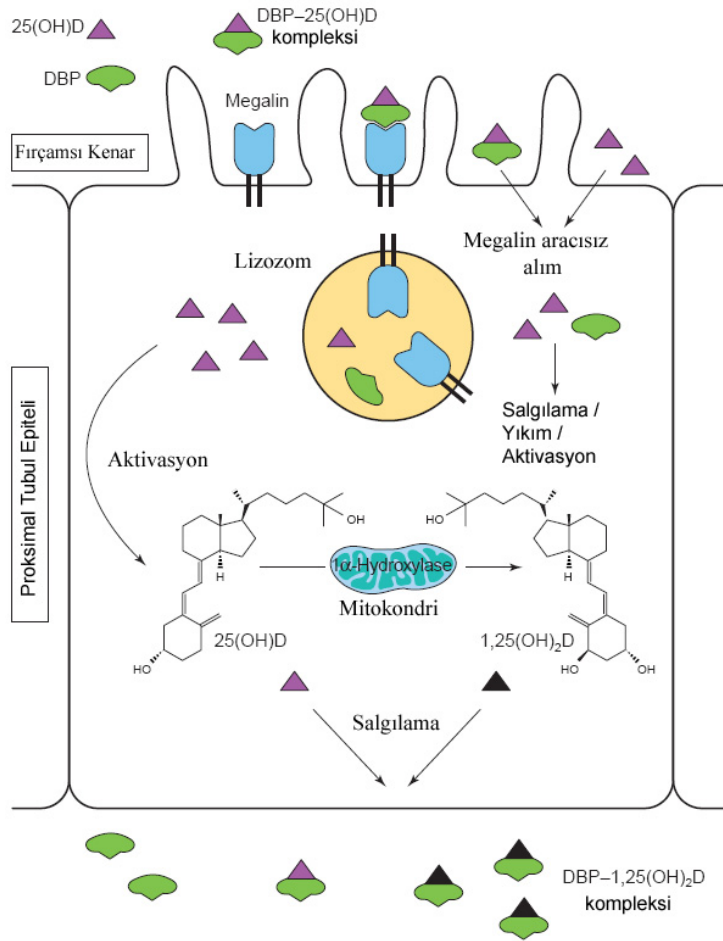
transkripsiyon faktörünün iki izoformunun (HNF1 $\alpha$  ve HNF1 $\beta$ ) bağıl seviyesine bağlı olduğu bulunmuştur. Bunun sebebi, HNF1 $\beta$ 'nin, HNF1 $\alpha$  kaynaklı arttırıcı etkiye karşı trans-dominant bir inhibitör olarak görev almasıdır [76]. Bu HNF1 izoformlarının karaciğer ve böbrekteki bağıl seviyeleri, bu iki dokuda gözlenen VDBP mRNA seviyelerindeki farkı açıklamaktadır (Şekil 2.11). VDBP'nin promotör bölgesindeki karşıt etkilerine rağmen HNF1 $\alpha$  ve HNF1 $\beta$ , AFP ve ALB promotör bölgelerinde güçlü bir arttırıcı etkiye sahiptir [67].

Vitamin D Bağlayan Proteinin Vitamin D'yi hücre içine taşıması megalin aracılığıyla olur (Şekil 2.12). Çok fonksiyonlu bir temizleme reseptörü olan megalin, böbreğin proksimal tubul epitelinin fırçamsı kenarlı yüzünde bulunur. Vitamin D Bağlayan Protein ve VDBP bağılı 25(OH)D glomerülden süzülerek böbrek tubulü epitel hücrelerinden endositozla alınır. Bu alınımda bazen megalin de görev yapar. VDBP-Vitamin D kompleksi lizozomal kompartmanda parçalanarak vitamin D ve taşıyıcı proteini sitozole salınır. Sonrasında, 25(OH)D ya direk olarak hücre dışına salınır, veya mitokondriye bağılı olarak bulunan 1 $\alpha$ -hidroksilaz aracılığıyla 1,25(OH) $_2$ D'ye dönüştürülür. İnterstitial sıvıya salgılanmasıyla birlikte Vitamin D sterollerini serbest halde buluna VDBP'ye bağlanır ve hedef dokulara iletilir [67]. Bu model her ne kadar böbrek için araştırılmış olsa da, Kan-Beyin Bariyerinde bulunan endotel hücrelerinin de megalin eksprese etmeleri [77] Vitamin D'nin ve VDBP'nin beyne ulaşmasında benzer bir yol izlediğini düşündürmektedir.

### 2.3.2.VDBP'nin Fonksiyonları

Vitamin D Bağlayan Protein'in ismi, son kırk yıl içinde VDBP tarafından kontrol edilen çeşitli biyolojik fonksiyonlar ortaya çıktıkça birçok defa değiştirilmiştir. İlk olarak, Hirschfield tarafından 1959 yılında plazmanın  $\alpha_2$ -globulin kısmından izolasyonununundan sonra "Gruba Özgü Bileşen (Group specific component/ Gc)" olarak adlandırılmıştır. Bu proteinin, Vitamin D analoglarına bağlanarak onları plazmada taşıdığı gösterildikten sonra, "D Bağlayan Protein" (DBP) ismi verilmiştir. En son olarak, molekülün makrofaj uyarıcı aktivitesinin gösterilmesiyle üçüncü bir isim olarak "Maktofaj aktive edici faktör" ifadesi de eski adlandırmanın yanına eklenmiştir. GcMAF/DBP-MAF) [7]. Bu isimlerin yanı sıra Gc-globulin ve Vitamin D Bağlayan Protein de sıklıkla kullanılan adlandırmalardır.

VDBP'nin dünya çapında araştırılan 100.000 bireyden hiçbirinde homozigot olarak eksikliği gözlenmediği için, proteinin canlı organizmada önemli bir rolünün olduğu düşünülmektedir. Fakat, VDBP geni eksik olan (VDBP-null / VDBP<sup>-/-</sup>) farelerin sağlıklı oldukları ve üreyebildikleri gözlenmiştir [78]. Aynı zamanda, VDBP geni eksik olan bu farelerin, normal farelerle kıyaslandıklarında; serum 25(OH)D ve



**Şekil 2.12: 25(OH)D'nin böbrek proksimal tübülünde megalinle reseptör aracılı endositozu ve aktivasyon modeli [67].**

1,25(OH)<sub>2</sub>D seviyelerinin belirgin olarak düşük olduğu da ortaya konmuştur. Buna rağmen, bu fareler Vitamin D eksikliğinden doğan herhangi bir bozukluk göstermemişlerdir. Bunun sebebinin VDBP geni eksik olan farelerde, serbest hormon miktarının fizyolojik işlevleri yerine getirmede yeterli olması düşünülmektedir [67].

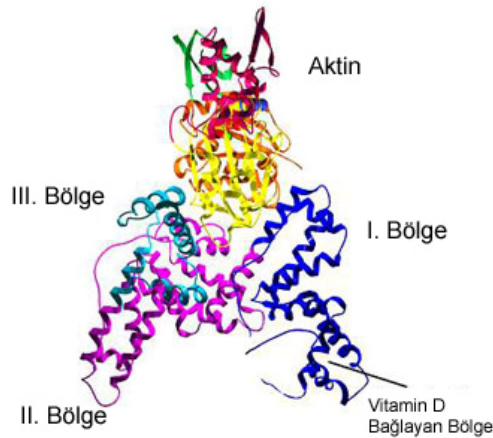
Normal fareler, dört ile altı hafta arasında vitamin D içermeyen bir diyetle tabi tutulduklarında Vitamin D eksikliğine bağlı olarak herhangi bir organ hasarı

göstermemişlerdir. Ancak, VDBP geni eksik fareler, dört ile altı hafta arasında Vitamin D içermeyen bir diyetle tabi tutulduklarında, vitamin D eksikliği sonucu belirgin organ hasarlarının meydana geldiği gösterilmiştir. Paratiroid hormon (PTH) ve alkalik fosfataz seviyelerinde yükselme ile hipovitaminoz D osteopatisi bu etkilerden en belirgin olanıdır. Bütün bu bulgular, vitamin D içermeyen bir diyetle tabi tutulan VDBP geni bulunmayan farelerde hücre içi  $1,25(OH)_2D$  eksikliğinin bir göstergesidir [67]. Bu verilerin ışığında, VDBP'nin kısa dönemli, diyet kaynaklı vitamin D eksikliğine karşı bir koruma sağladığı söylenebilir.

VDBP; serumda Vitamin D bağlanması yanı sıra, hücre dışı aktin temizlenmesi, C5a'ya dayalı lökosit kemotaksisi, makrofaj aktivasyonu ve osteoklastların uyarılmasında da görev alır [79].

### 2.3.2.1. Vitamin D'nin Bağlanması

İsminden de anlaşılacağı üzere, VDBP'nin en önemli fonksiyonu Vitamin D metabolitlerini bağlayıp, vücutta taşımaktır. Bu metabolitlerden 25-hidroksivitamin D<sub>3</sub> (25(OH)D; kalsidiol) dolaşımda bulunan başlıca Vitamin D metabolitidir, 1,25-dihidroksivitamin D<sub>3</sub> ( $1,25(OH)_2D$ ); kalsitriol) ise vitamin D'nin en aktif metabolitidir. Vitamin D sterolleri normal kemik gelişimi ve kalsiyum homeostazı için gereklidir. Ayrıca, bağışıklık düzenlenmesine de katkıda bulunur ve anti-proliferatif ve yaşlanma karşıtı özelliklere sahiptir.



Şekil 2.13: Aktine bağlı VDBP'nin, Vitamin D bağlayan bölgesi ile birlikte şematik görünüşü [80].

Başlıca görevi bu iki sterolu plazmada taşımak olan VDBP, plazmada vitamin D metabolitlerine göre 20 kat daha fazla bulunur. Bu, diğer hormon veya vitamin taşıyan proteinlerle kıyaslandığında, alışılmadık bir durumdur ve VDBP'nin diğer fonksiyonları nedeniyle plazmada bu kadar fazla seviyede bulunduğu düşünülmektedir [67].

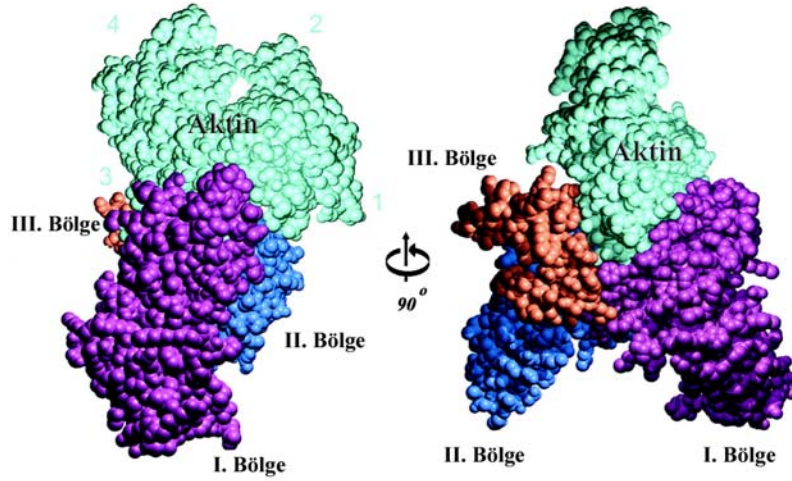
Normal fizyolojik koşullarda, dolaşımda bulunan vitamin D metabolitlerinin çoğu, VDBP'ye bağlıdır. VDBP, serumda bulunan 25-hidroksivitamin D<sub>3</sub> 'ün %88'ini, 1,25-dihidroksivitamin -D<sub>3</sub>'ün ise % 85'ini taşır. Dolaşımda bulunan başlıca Vitamin D (25-hidroksivitamin D<sub>3</sub>) ile etkileşimi  $5 \times 10^{-8}$  M ve  $1 \times 10^{-11}$  M arasında değişen bir afiniteyle gerçekleşir. VDBP aynı zamanda Vitamin D'nin aktif formuna (1,25-dihidroksivitamin D<sub>3</sub>) yaklaşık  $4 \times 10^{-7}$  M'lık bir afinite ile bağlanır. VDBP, Vitamin D analoglarına da, I. bölgesinin amino ucunda bulunan bağlanma bölgesiyle farklı afinitelerle bağlanır. Vitamin D'nin hücre farklılaşması için yüksek potansiyel gösteren fakat düşük kalsemik aktiviteye sahip sentetik analogları genellikle düşük bağlanma afinitelerine sahiptir. Herhangi bir anda, VDBP'nin sterol bağlayan bölgelerinin sadece % 1-2'si bu moleküllere bağlıdır [81].

### 2.3.2.2. Hücre dışı Aktinin Bağlanması ve Temizlenmesi

VDBP, gelsolinle birlikte hücre dışı aktin temizleme sistemi olarak hareket eder. Hücre parçalanmasını takiben aktin hücrelerarası bölgeye bırakılır. Hücrelerarası bölgedeki iyonik durum G-aktin'nin (monomerik form) F-aktin'e (filament formu) polimerizasyonunu teşvik eder. 1-5 mm uzunluğundaki aktin filamentleri kılcal damarları bloke etme ve bu damarlara zarar verme kapasitesindedir. VDBP'nin aktin temizleme sistemindeki görevi G-aktine bağlanarak daha fazla nukleasyonu ve polimerizasyonunu engellemektir (Şekil 2.14) [7]. Eğer, VDBP mikroenjeksiyon yöntemiyle hücrelere enjekte edilirse, mikrofilament organizasyonunda hızlı ve tersine dönebilir bir bozulma meydana gelir [82].

III. Bölge parçasıyla yapılan çalışmalar, filament nukleasyonu ve polimerasyonunu inhibe etmek için tüm molekülün bağlanması gerektiğini göstermektedir. VDBP, aktine karboksil ucundaki aktin bağlayan bölge ile bağlanır (Şekil 2.14). VDBP, hem G-aktine hem de F-aktine bağlanan gelsolinin aksine; F-aktine bağlanma yeteneğinde değildir. Bu yüzden gelsolin filamentleri bölerken, VDBP'nin aktini monomerik G-aktin şeklinde stabil hale getirmede görev aldığı düşünülmektedir [7].

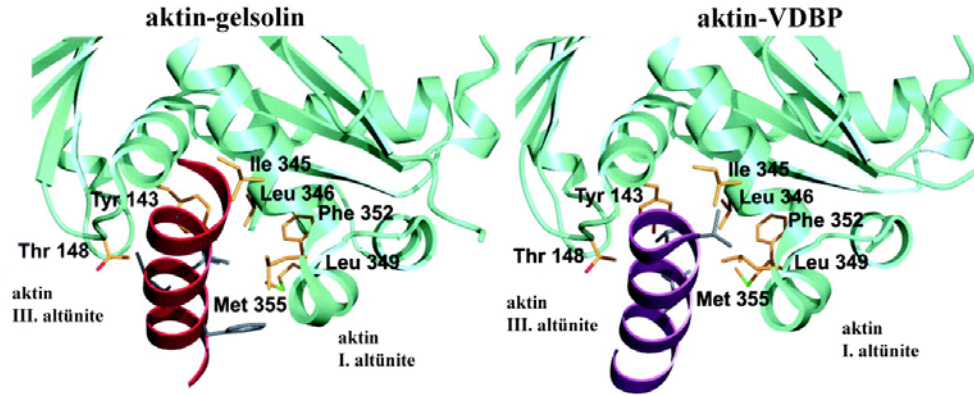
Aktin filamentlerinin bölünmesi için enerjiye gerek duyulmaz. Çoğu aktin-bölen protein, gelsolin süperalesinin üyesidir. Gelsolin süperalesinin bölme etkinliği yüksek sitozolik  $Ca^{+2}$  ile aktive olur. Gelsolin, aktin altbirimlerinin iki farklı bölgesine bağlanan altbirimlere sahiptir (Şekil 2.15). Bunlardan biri filamentin yüzeyinde



**Şekil 2.14: Aktin-VDBP kompleksinin atom yüzeyi doldurma yöntemiyle resmedilmesi.**

VDBP'nin üç bölgesi sırasıyla mor (I. bölge), mavi (II. bölge) ve turuncu (III. bölge) ile belirtilmiştir. Çizim 90 derece döndürülerek iki farklı bakış açısından gösterilmiştir. Aktinin 4 farklı altbölgesi 1'den 4'e kadar numaralanmıştır. VDBP'nin her üç bölgesi de aktinin 1 ve 3'üncü altbölgeleri ile arasındaki etkileşime katılırlar [73].

bulunurken, diğeri protofilamentteki altbirimin yanındaki uzunlamasına bağda gizlidir. Gelsolinin aktin bölücü aktivitesini açıklayan bir modele göre, gelsolin aktin filamentinin yan tarafına bağlanarak termal dalgalanmanın oluşup protofilamentteki komşu altbirimler arasında bir boşluk yaratıncaya kadar bekler. Daha sonra gelsolin, altbirimini yavaşça bu boşluğa sokarak filamentini böler. Gelsolin aktin filamentini böldüğü zaman, artı ucuna bağlı olarak kalır ve efektif bir şapka proteini olarak görev alır. Ancak, diğere bazı aktin filamentini şapka proteinleri gibi, lokal  $PIP_2$  konsantrasyonundaki artış ile filamentin ucundan uzaklaştırılabilir [83].



**Şekil 2.15: Gelsolin ve VDBP'nin aktin ile benzer şekilde etkileşimleri.**

VDBP'nin Ser-194-Lys-207 ve gelsolinin I. bölgesinin (Kırmızı renkli) Gln-71-Leu-84 alfa-helikal parçaları aktin yüzeyine benzer bir bölgeye sahiptirler. aktin'in 1 ve 3'üncü altödomenleri arasındaki hidrofobik amino asitlerden oluşan (Tyr-143, Thr-148, Ile-345, Leu-346, Leu-349, Phe-352, and Met-355, sarı) yarıkla etkileşirler. Gelsolinin (Ala-76, Ala-78, Ile-79, Phe-80, ve Val-82) ile VDBP'nin (Val-197, Leu-200, and Leu-204) aktindeki hidrofobik parçayla etkileşen amino asit bakiyeleri gri renk ile gösterilmiştir [73].

Benzer bir etkileşim, aktinin VDBP ile bağlanmasında gözlenmiştir. Gelsoline benzer şekilde, VDBP'nin  $\alpha$ -heliks parçası aktindeki boşluğa bağlanır (Şekil 2.15). VDBP'nin aktine bağlanması, gelsolinin aktini monomerik formda stabil hale getirmedeki işlevini üstlenerek, ortamdaki gelsolinin asıl görevi olan filament formundaki aktini bölme fonksiyonu için serbest kalmasını sağlamaktadır [84].

Hepatit, akut akciğer hasarı, septik şok, bakteriyel pnömoni, asetaminofen intoksikasyonu, çoklu travma ve gebelikte hastaların dolaşımında aktin kompleksleri bol olarak bulunmaktadır. Söz konusu bilgiler bu klinik tablolarla birleştiriririrse, serumdaki VDBP miktarının az oluşunun bu gibi durumlarda aktin kaynaklı damar hasarlarının meydana gelmesine neden olacağı düşünülebilir.

### 2.3.2.3. Kemotaksik aktivitenin arttırılması

Plazmada bulunan VDBP; C5 kaynaklı peptitlerin (C5a ve C5a<sup>desArg</sup>) insan nötrofilleri, monositleri ve fibroblastları üzerindeki kemotaktik aktivitesini arttırır [74, 79]. Nötrofillerin kemotaktik ve efektör fonksiyonları birçok aracı ile sağlanır [örneğin platelet aktive edici faktör (PAF), sitokinler, eikosanoidler, formüle olmuş peptidler vb.]. Bunlardan iltihabi yanıtta başlıca görevi alanı, C5'in 10 kDa ağırlığındaki bir parçası olan C5a'dır. C5a, hedef hücrelerde birçok etkiye sahiptir. Bu etkiler, kemotaksi,

degranülasyon, oksidatif patlama, hücre adhezyon değişiklikleri, vasokonstriksiyon, artan damar geçirgenliği ve düz kas kasılmasıdır [74, 85]. Lokal mediyatör popülasyonu her bir nötrofil hücrelerinin tepkisini belirlemede görev alır. Bazı durumlarda bir aracının düşük konsantrasyonu, ikinci bir aracının etkisinde artmaya yol açabilir [86]. Bu çevrenin içinde, VDBP C5a ve C5a<sup>desArg</sup>'ın kemotaktik özelliklerini seçici olarak artırabilir. VDBP'nin bağlanması sitokin öncülüğündeki lökosit kemotaksisinde gerçekleştiği için, C5a reseptörlerinin düzenlenmesini azaltmaz veya C5a ve C5a<sup>desArg</sup> reseptör afinitesinde değişikliğe yol açmaz. Onun yerine, henüz tanımlanmamış bir ko-stimulatörün indüklenmesinde görev aldığı düşünülmektedir [85].

#### 2.3.2.4.Makrofaj Modülasyonu

VDBP'nin O-bağlı karbonhidratın GalNac'a işlenmesi, VDBP molekülünün potansiyel bir Makrofaj Aktive Edici Faktöre (MAF) değişimiyle sonuçlanır. VDBP üzerinde bulunan karbohidrat, B hücrelerinin yüzeyinde eksprese edilen lizo-Pc-indüklemiş-β-galaktozidaz ile modifiye edilir ve daha sonra T hücresi siyalidazının etkisiyle DBP-MAF'a dönüştürülebilen Makrofaj Aktive Edici Faktör Öncüsü oluşur [87]. İnflamasyon sırasında uyarılan lenfositler ile VDBP'nin modifikasyonu sonucu hızlı DBP-MAF oluşumu, enfeksiyon veya yangı hastalıklarına karşı organizmanın tepkisi olarak makrofajların hızlıca aktive olması demektir.

Son çalışmalar, DBP-MAF'ın yangı olan bölgede makrofaj aktivitesinin kontrolünde farklı bir rolü daha olduğunu göstermektedir. Bu yeni rolü, p38 ve JNK1/2 yollarını kullanarak kaspaz aktivitesini artırması ve böylelikle makrofaj ölümünü tetiklemesidir [88]. Böylelikle VDBP, enfeksiyon ve inflamasyon bölgelerinde makrofaj aktivitesini tetikleyen, ihtiyaç kalmadığı zaman ise bu hücrelerin ölümünü teşvik eden bir anahtar rolü görmektedir [7].

#### 2.3.2.5.Osteoklast Aktivasyonu

DBP-MAF, osteoklast aktivitesini ve kemik yıkımını uyarabilir. Kemik yıkımında meydana gelen hatalar, yoğun ve kırılğan kemiklerle tanımlanan osteoporozu sebep olur [89]. DBP-MAF karbonhidrat yan zincirinin bu etkinin düzenlenmesinde önemli bir görevinin olduğu düşünülmektedir. Baculovirüs'de eksprese edilen DBP-MAF uyarıcı etkisini korurken, *E.coli*'de eksprese edilen glikozillenmemiş DBP bu etkiye sahip değildir [90]. DBP-MAF'ın osteoklastlar üzerindeki etkisini hücre dışı

kalsiyum seviyesi artınca, osteoklast aktivesini düşüren hücrel bir geribildirim döngüsü üzerinden gerçekleştirdiği düşünülmektedir. Adebano ve arkadaşları, DBP-MAF'ın (nanomolar konsantrasyon seviyesinde) bu geribildirim döngüsünü inhibe ettiğini ve böylelikle hücre dışı kalsiyum varlığında da osteoklast aktivitesini sağladığını ortaya koymuşlardır. Araştırmacılar aynı zamanda, iltihabi koşullarda aktive olmuş T hücrelerinin DBP-MAF oluşumunu tetiklediğini, böylelikle osteoklast kalsiyum duyarlılığını etkileyerek kemik yıkımında rol aldığını varsaymaktadırlar. Her ne kadar, VDBP ve DBP-MAF şimdiye kadar kemik yıkımıyla ilgili olaylarla ilişkilendirilirse de, son zamanlarda yapılan bir çalışma tüm proteinin ve proteinin III. bölgesinden köken alan 14 amino asitlik bir sentetik peptidin hayvan modellerinde yeni kemik oluşumunu teşvik ettiğini göstermiştir [91]. Bu çalışma, VDBP'nin kemik oluşumu ve yeniden yapılanmasında bilinenden daha bir düzenleyici rolü olduğunu ortaya koymaktadır.

### 2.3.3.VDBP Ve Hastalıklar

Gerek Vitamin D gibi önemli bir sterolü plazmada taşınması, gerek aktin temizleme sisteminde görev alması, gerekse makrofaj aktivasyonundaki rolü VDBP'yi çeşitli hastalıklarla ilişkilendirilmesi için uygun bir aday yapmaktadır.

1980'lerin sonlarında VDBP'nin çeşitli allelik varyantlarının HIV enfeksiyonu ile ilişkilendirilmesi hakkında çeşitli karşıt raporlar yayınlansa da, *Alonso ve ark.* ve diğer bazı araştırmacıların yaptığı son çalışmalar bu yönde bir bağlantının olmadığını ortaya koymuştur [92]. HIV enfeksiyonuyla ilişkilendirmeye benzer bir durum da, VDBP ile diyabetin ilişkilendirilmesi konusunda görülmüştür. 1980'lerin sonunda ve 1990'ların başında VDBP allelik ekspresyonu ile diyabet hastalığı arasında bir bağlantının olduğuna dair raporlar yayınlanmıştır. Fakat, bunu takip eden çalışmalar (en azında beyaz ırk için) böyle bir bağlantının var olmadığını göstermektedir [93-95]. Vitamin D yolağında görev alan proteinlerdeki polimorfizmler ile meme kanseri arasında bağlantının olduğunu gösteren çalışmalar olmasına rağmen, VDBP polimorfizmi ile meme kanseri riski arasında herhangi bir bağlantı olmadığı güncel çalışmalarla ortaya konmuştur [96].

VDBP polimorfizmlerinin; Grave's Hastalığı [9], diyabet [10] COPD [11] gibi bir çok hastalığa yatkınlığı belirlediğini bildiren çeşitli araştırmalar bulunmaktadır.

### 3. GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışma; İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Dahili Tıp Bilimleri Bölümü Psikiyatri Anabilim Dalı Geropsikiyatri Bilim Dalı ve İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi, Nöroloji Bölümü, Davranış ve Hareket Bozuklukları Birimi tarafından, “Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, Fourth Edition” (DSM-IV)’a göre teşhisi konulan 106 geç başlangıçlı Alzheimer hastası (yaş ortalamaları  $74.2 \pm 7.1$ , %77 kadın) ve hastalarla yaş paralelliği gösteren ve herhangi bir nörodejeneratif hastalığı bulunmayan 98 sağlıklı birey (yaş ortalamaları  $72.8 \pm 5.8$ , %55 kadın) üzerinde, İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Temel Bilimler Bölümü Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı laboratuvarlarında, 2007 yılında gerçekleştirildi.

#### 3.1.Kandan DNA İzolasyonu

Vakumlu steril K3-EDTA’lı tüplere alınan kan örnekleri  $-20^{\circ}\text{C}$ ’de saklandı ve ilk 3-5 gün içerisinde DNA’ları izole edildi.

Çalışmada “Yüksek tuz konsantrasyonu kullanılarak DNA izolasyonu ” yöntemi kullanıldı [97].

##### 3.1.1.Yüksek tuz konsantrasyonu kullanılarak kandan DNA izolasyonu yöntemi

1. 0,5 ml K3-EDTA’lı kan üzerine 1,5 ml lizis tampon eklendi ve  $+4^{\circ}\text{C}$ ’de 15 dakika inkübe edildi.
2. Soğutmalı santrifüj kullanılarak  $+4^{\circ}\text{C}$  6000 rpm’de 10 dakika santrifüj edildi.
3. Üst sıvı atılıp, pellet üzerine 0,5 ml lizis tampon eklendi ve 6000 rpm’de 10 dakika santrifüj edildi.
4. 3. işlem ortamdan hemoglobin uzaklaşmaya kadar en az 3-4 defa tekrarlandı.
5. Pellet üzerine 0,5 ml nükleaz tampon eklendi ve üzerine 2,5  $\mu\text{l}$  %10 SDS, 1,5 $\mu\text{l}$  proteinaz K eklenerek  $37^{\circ}\text{C}$ ’de bir gece inkübasyona bırakıldı.
6. İnkübasyon sonunda tüplere eşit hacimde 5M NaCl ve bidistile su eklenerek karıştırıldı.

7. Oda sıcaklığında 20 dakika, 10.000 rpm'de santrifüj edildi.
8. Üst sıvı 15 ml'lik polipropilen tüpe alınarak üzerine 2 hacim saf etanol eklenip DNA çökene kadar beklendi.
9. DNA iplikleri mikropipet yardımıyla toplanarak temiz bir tüpe aktarıldıktan sonra 100-200 µl TE (Tris EDTA ) içinde çözündürüldü.
10. Çalışma süresince +4°C'de saklandı.

### 3.1.2.DNA miktarı ve saflığının ölçülmesi

DNA izolasyonunun sonuçları spektrofotometrik ölçüm yöntemi ile değerlendirildi. DNA konsantrasyonu 260 nm'deki optik densitesinden, saflığı da 260 nm/280 nm'deki OD oranından tespit edildi [98]. DNA konsantrasyonu ve saflığı aşağıdaki formüller kullanılarak hesaplandı (3-1; 3-2).

$$\text{DNA konsantrasyonu ( mg / ml )} = \text{OD 260nm} \times \text{seyreltme faktörü} \times 50 \quad (3-1)$$

$$\text{DNA saflığı} = \frac{\text{OD 260}}{\text{OD 280}} = 1.8 \pm 0.1 \quad (3-2)$$

### 3.2.Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) Yöntemi

Lökositlerden izole edilen genomik DNA üzerindeki VDBP geninin ekzon 11 bölgesini kapsayan 233 baz çiftlik alan PZR yöntemi kullanılarak çoğaltıldı. Polimeraz zincir reaksiyonu karışım içeriği ve PZR programı farklı değerler denenerek optimize edildi.

#### 3.2.1.Primerlerin hazırlanması

Test edilen polimorfizmlerin belirlenebilmesi için kullanılan ileri (F) ve geri (R) primerler, (Invitrogen™, Life Technologies, Scotland, UK) liyofilize halde satın alındı.

Primerler, steril, DNaz, RNaz içermeyen ultra saf su ile çözündürüldükten sonra (100pmol/μl), 10 pmol/μl'lik stoklar şeklinde hazırlanıp -20°C'de muhafaza edildi.

Bu çalışmada VDBP geni polimorfizmlerini tespit etmek amacıyla Polimeraz Zincir Reaksiyonunda (PZR) kullanılan ve Vitamin D Bağlayan Protein geninin ekzon 11 bölgesinde 233 baz çiftlik bir alanı çoğaltan İleri (F) ve Geri (R) primerler kullanıldı. Primerlerin dizileri aşağıda verilmiştir [10].

F: 5'-ACATGTAGTAAGACCTTA-3'

R: 5'-GATTGGAGTGCATACGTT-3'

### 3.2.2.PZR karışımı

25 μl'lik PZR karışımı 0,5 ml'lik PZR tüplerinde Tablo 3'de belirtildiği gibi hazırlandı.

**Tablo 3.1: PZR karışımı**

STOK	SON KONSANTRASYON
10 x TNK50 tamponu	1x
MgCl <sub>2</sub> ( 25 mM )	2,5mM
İleri primer ( 100 pmol/μl )	10 pmol/μl
Geri primer ( 100 pmol/μl )	10 pmol/μl
dNTP'ler ( 2mM )	200 μM
Taq DNA polimeraz 5U/μl	1 U/reaksiyon
Kalıp DNA	100ng
Total hacim Sigma su ile 25μl'ye tamamlanır	

PZR karışımı 25 μl olacak şekilde hazırlandıktan sonra, Techne marka termal döngü cihazına konuldu.

### 3.2.3.PZR programı

1. 94°C'de 8 dakika

2. 94°C’de 1 dakika
  3. 55 °C’de 40 saniye
  4. 72 °C’de 1 dakika
  5. 72°C’de 7 dakika
- } 35 döngü

olarak düzenlendi.

### 3.2.4.PZR koşullarının optimizasyonu

Daha iyi PZR ürünleri elde etmek amacıyla PZR koşulları, magnezyum miktarı ve bağlanma ısısı değiştirilerek optimize edildi [99].

Magnezyum, DNA polimerazın işlevinde kofaktör görevi yaptığından çalışmada magnezyum klorür konsantrasyonu, 1,8 mM’den başlayıp 2,5 mM’e kadar değiştirilerek denendi. En uygun konsantrasyon olarak saptanan 2,5 mM MgCl<sub>2</sub> konsantrasyonu kullanıldı.

Çift iplikli nükleik asit moleküllerindeki baz çiftlerinin yarısının ortadan kalkmasına neden olan sıcaklık olup primerlerin kalıp DNA’ya bağlanma ısısını belirleyen T<sub>m</sub> değeri aşağıdaki formüle göre hesaplandı (3-3) [97, 99]:

$$T_m = [(A+T\text{'lerin sayı}) \times 2 \text{ } ^\circ\text{C} + (G+C\text{'lerin sayı}) \times 4 \text{ } ^\circ\text{C}] \quad (3-3)$$

A, T, G, C : Primer dizisinde bulunan adenin, timin, guanin ve sitozin bazları.

Bağlanma ısısı T<sub>m</sub> değeri hesaplandıktan sonra birkaç derecelik ısı değişiklikleri denenerek belirlendi.

### 3.3.PZR Ürünlerinin Agaroz Jel Elektrofrezinde İncelenmesi

Bu çalışmada PZR ürünlerinin büyüklüğü göz önüne alınarak agaroz jel elektrofrezini kullanıldı. PZR ürünlerinin analizleri %1,5’luk agaroz jelde yürütülerek yapıldı . 100ml’lik kaset kullanıldığından %1,5’luk jel için 1,5 gr Agaroz 100ml 1xTBE içerisinde çözüldü. Isıtıcı ve manyetik karıştırıcı üzerinde şeffaf hale gelinceye kadar kaynatılan ve karıştırılan jeller daha sonra soğumaları için bekletildiler. Tam olarak soğumalarına izin verilmeden üzerlerine çeker ocak altında 2 µl etidyum bromid (EB) eklendi. EB’in iyice dağılması sağlandıktan sonra jeller, polimerize olması için tarağı

yerleştirilmiş olan kaset içerisine, hava kabarcığı kalmamasına dikkat edilerek dökülüp çeker ocak altında 2 saat bekletildi. Jel polimerize olduktan sonra tarak çıkartılıp kaset ile birlikte orta boydaki elektroforez tankı (Biometra yatay jel elektroforez aparatı) içerisine yerleştirildi. Jelin üzerini kaplayacak şekilde tankı dolduran 1xTBE tamponu eklendi. 4 µl'lik PZR ürünleri 2 µl yükleme tamponu ( bromo fenol mavisi ) ile karıştırılarak jele yüklendi. 80 volt 24 miliamper'de 40 dakika yürütüldü. Daha sonra PZR ürünlerinin büyüklükleri ultraviyole ışık altında birinci kuyuya yüklenmiş olan Fermantas<sup>TM</sup> pUC19 DNA/MspI (HpaII) moleküler ağırlık belirleme standardı ile birlikte incelenerek yorumlandı ve polaroid film ile fotoğrafları çekildi. Tüpte kalan PZR ürünlerinin restriksiyon parça uzunluk polimorfizmi (RFLP) yöntemi uygulananmak üzere HaeIII ve StyI (EcoT14 I) enzimleri ile kesimi yapıldı.

### **3.4.VDBP Geni PZR Ürününün HaeIII ve StyI (EcoT14 I) Enzimleri ile Kesilmesi**

VDBP geninin Ekzon 11'inde bulunan 416. kodonda meydana gelen Asp(GAT)/Glu(GAG) değişimi HaeIII restriksiyon enzimi için kesim bölgesi oluşturmaktadır; 420. kodonda meydana gelen Thr(ACG)/Lys(AAG) değişimi ise Sty I (EcoT14 I) enziminin tanıyacağı kesim bölgesi oluşturmaktadır. Bu yüzden, VDBP geni Ekzon 11'inde bulunan bu polimorfizm II. tip restriksiyon endonükleazlarından olan HaeIII ve Sty I (EcoT14 I) kullanılarak belirlendi.

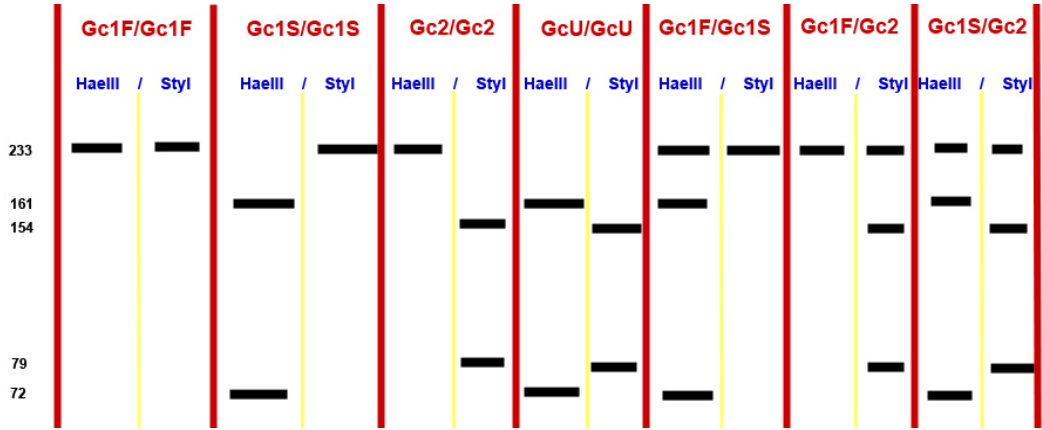
PZR ürününün HaeIII ile kesimi için 6 µl PZR ürünü 1X tampon ve 5 ünite enzim kullanılarak 7 °C'de 16 saat inkübe edildi; StyI (EcoT14 I) ile kesim için de aynı değerler kullanıldı. Elde edilen kesim ürünleri %2'lik agaroz jel üzerinde yan yana yüklenerek analizler yapıldı.

#### **3.4.1.VDBP geninin HaeIII enzimi ile oluşan kesim ürünleri**

VDBP geninin 233 bç uzunluğundaki PZR ürününün HaeIII enzimiyle kesiminde; her iki allelde de kesim bölgesi bulunmuyorsa 233 bç uzunluğunda tek bir parçanın, her iki allelde de kesim bölgesi bulunuyorsa 161 ve 72 bç uzunluğunda iki parçanın, heterozigot durumda ise 233, 161 ve 72 bç uzunluğunda üç parçanın gözlenmesine neden olmaktadır (Şekil 3.1-3.2).

#### **3.4.2.VDBP geninin StyI (Eco T14 I) enzimi ile oluşan kesim ürünleri**

VDBP geninin 233 bç uzunluğundaki PCR ürününün StyI (Eco T14 I) enzimiyle kesiminde; her iki allelde de kesim bölgesi bulunmuyorsa 233 bç uzunluğunda tek bir parçanın, her iki allelde de kesim bölgesi bulunuyorsa 154 ve 79 bç uzunluğunda iki parçanın, heterozigot durumda ise 233, 154 ve 79 bç uzunluğunda üç parçanın gözlenmesine neden olmaktadır (Şekil 3.1-3.2).



**Şekil 3.1: PZR ürünlerinin HaeIII ve StyI enzimleriyle kesilmesi sonucu gözlenen 7 (yedi) farklı genotipin şematik olarak gösterimi.** En sol sütundaki rakamlar baz çiftini ifade etmektedir.

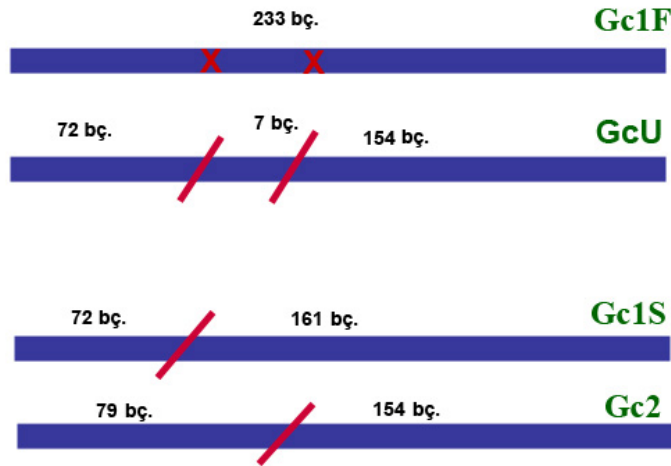
### 3.5.RFLP Ürünlerinin Agaroz Jel Elektroforezinde İncelenmesi

Çalışmada, Restriksiyon Parça Uzunluk Polimorfizmi (RFLP) ürünlerinin analizi için RFLP ürünlerinin boyları arasındaki farklar göz önüne alınarak %2'lük agaroz jel kullanıldı. %2'lük jel için 2 gr Agaroz 100 ml 1xTBE içerisinde çözüldükten sonra, jel PZR ürünlerinin incelenmesinde anlatıldığı şekilde hazırlandı ve 10 µl'lik kesim ürünleri 3 µl yükleme tamponu ile karıştırılarak jele yüklendi. Kesim sonuçları UV ışık altında Fermantas<sup>TM</sup> pUC19 DNA/MspI (HpaII) moleküler ağırlık belirleme standardı ile karşılaştırılarak incelendi ve fotoğrafları çekildi.

Elektroforez işleminin tamamlanmasından sonra EB içeren jeller, üzerlerinden su geçirilerek yıkandı. Daha sonra eşit hacimde 0.5M KMnO<sub>4</sub> ve 2.5N HCl eklenip 1-2 saat bekletildi. Son olarak eşit hacimde 2.5N NaOH ile karıştırılıp dekontamine edildi [97].

### 3.6. Verilerin Kaydı ve İstatistiksel Değerlendirmeler

İstatistiksel analizler “SPSS 14” ve “EDO - PCR & RFLP Sonuçları Kayıt ve Analiz Programı” yazılım programları kullanılarak hesaplandı. Genotiplerin ve allellerin gruplara göre dağılımı ki-kare yöntemi kullanılarak analiz edildi. VDBP genotipleri HaeIII ve StyI enzimleri için Gc1F, Gc1S, Gc2 ve GcU olmak üzere dört grup halinde sınıflandırıldı (Şekil 3.2).  $p < 0.05$  olan veriler anlamlı kabul edildi.



Şekil 3.2: VDBP geninin HaeIII ve StyI restriksiyon enzimleri ile kesim bölgelerine göre sınıflandırılmış 4 (dört) alleli.

### 3.7. Kullanılan Tampon ve Çözeltiler

1. Jele yükleme Tamponu
  - %0.25 bromofenol mavisi
  - %40 ( w/v ) sukroz
2. Etidyum bromür: 10mg/dl
3. Proteinaz K: Steril çift distile suda 20mg/ml
4. PZR primerleri: 10 $\mu$ M ( 10pmol/ $\mu$ l )
5. dNTP'ler: 10mM
6. 5XTBE
 

Tris baz	54gr
Borik asit	27.5gr
0.5M EDTA pH 8.0	20ml

## 7. Lizis Tamponu

NH <sub>4</sub> Cl	155 mM
KHCO <sub>3</sub>	10 mM
EDTA	0,1 mM

## 8. Nükleaz Tampon

EDTA	25 mM
NaCl	400 mM
Tris Baz	10 mM

## 9. EB Dekontaminasyon tamponları

KMnO <sub>4</sub>	0.5 M
HCl	2.5N
NaOH	2.5N

## 10. TE ( pH 7.4 )

Tris HCl ( pH 7.4 )	10mM
EDTA ( pH 8 )	1mM

**3.8.Kullanılan Kimyasal Maddeler**

1. Agarose, Sigma A9414
2. Amonyum persülfat, Sigma A9164
3. Borik asit, Merck K21183760
4. Bromofenol mavisi, Merck 8122
5. dNTP set 100mM, Fermentas (dATP R0141,dCTP R0151,dGTP R0161,dTTP R0171)
6. EcoT14I restriksiyon enzimi, 3000U, TaKaRa Bio Inc.
7. EDTA0.5M, Sigma E 7889
8. Ethanol, Reidel Haden 32221
9. pUC19 DNA/MspI (HpaII) DNA Ladder belirteç, Fermentas,
10. HaeIII restriksiyon enzimi, 4000U, TaKaRa Bio Inc.
11. KCl, Sigma P4504
12. Lauryl sülfat ( SDS ), Sigma L4509
13. MgCl, Sigma M0250
14. Mineral yağ, Sigma M5904
15. Polaroid film ( 667 ), Sigma F4638

16. Potasyum bikarbonat, Sigma P9144
17. Potasyum klorür, Aldrich 40931-6
18. Potasyum permanganat, Merck 50801000
19. Primerler, Invitrogen™, Life Technologies, Scotland, UK
20. Proteinaz K, Sigma P4914
21. Sodyum klorür, Sigma S3014
22. Sukroz, Sigma S2395
23. Taq DNA polymerase, 500U, Promega M1865
24. Titriplex ( EDTA ), Merck K90602421
25. Tris baz, Sigma T8524
26. Tris EDTA , Sigma T9285
27. Triton X-100, Sigma X100

### **3.9.Kullanılan Cihazlar**

1. Termal Döngü Cihazı (Techne Inc. Thermal Cyclers)
2. Yatay Elektroforez Tankı (Biometra)
3. Güç kaynağı (Biometra)
4. Ultra viyole transilüminatör (Viber Laubmat)
5. Etüv (Elektromag)
6. Spektrofotometre (Nanodrop)
7. pH metre (Ohaus, Galaxy 400)
8. Santrifüj (Hettich mikro 22, Techne)
9. Soğutmalı santrifüj (Hettich mikro 22R)
10. Elix III distile su cihazı (Milipore)
11. Manyetik karıştırıcı (Elektromag)

## 4. BULGULAR

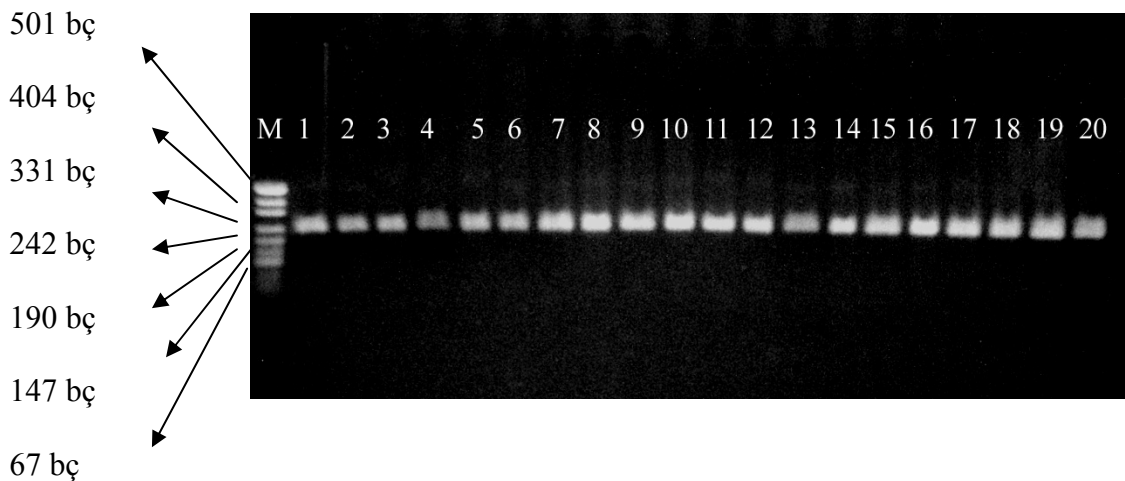
Çalışmada 106 Alzheimer hastasının ve herhangi bir nörodejeneratif hastalığı bulunmayan cinsiyet ve yaş bakımından hasta grubuyla uygunluk gösteren 98 sağlıklı bireyin Vitamin D Bağlayan Protein (VDBP) genotipleri saptandı.

### 4.1.DNA İzolasyonu

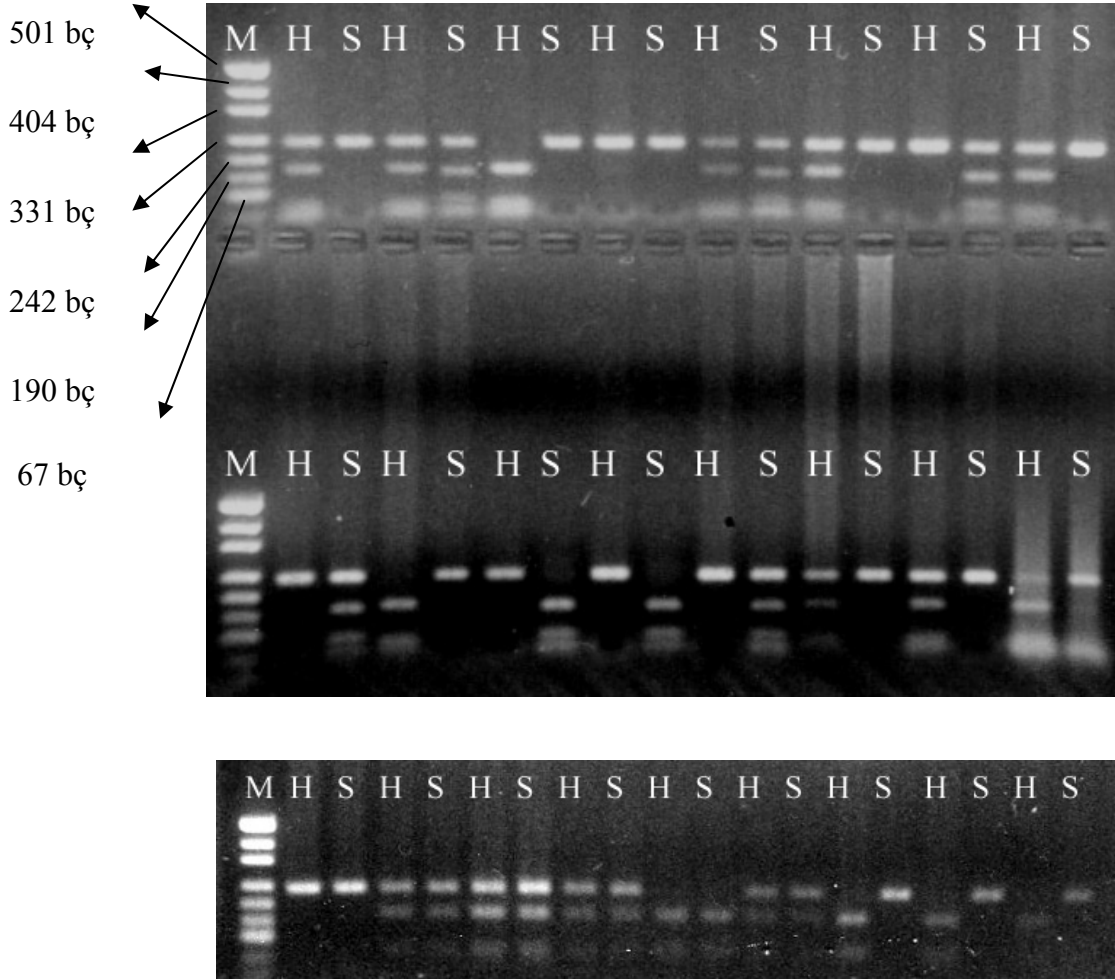
Uygulanan yüksek tuz konsantrasyonu yöntemi sonucunda, örneklerin 280nm / 260nm dalga boylarındaki OD değerleri okundu ve bu değerlerin  $1.8 \pm 0.1$  arasında, DNA konsantrasyonlarının ise 50-150 ng/ $\mu$ l olduğu belirlendi.

### 4.2. Genotipleme Sonuçları

Hasta ve kontrol grubuna ait kan örneklerinden elde edilen genomik DNA'dan, VDBP geninin ekzon 11 bölgesine özgü primerler kullanılarak PZR yöntemi ile 233 bç'lik DNA parçası çoğaltıldı (Şekil 4.1). Elde edilen DNA parçaları, HaeIII ve StyI (EcoT14I) restriksiyon enzimleri kullanılarak kesime tabi tutulduktan sonra kesim ürünleri değerlendirilerek, VDBP geni allelik polimorfizmleri belirlendi. Hasta ve kontrol grubuna ait bazı örneklerin HaeIII ve StyI enzimleri ile kesim ürünleri Şekil 4.2'de görülmektedir.



**Şekil 4.1: VDBP PZR ürünleri.** %1.5'lük agaroz jel elektroforezinde VDBP geni PZR ürünleri görülmektedir. 1. kuyu DNA moleküler ağırlık belirteci, 2-21. kuyular 233 bç'lik PZR ürünü.



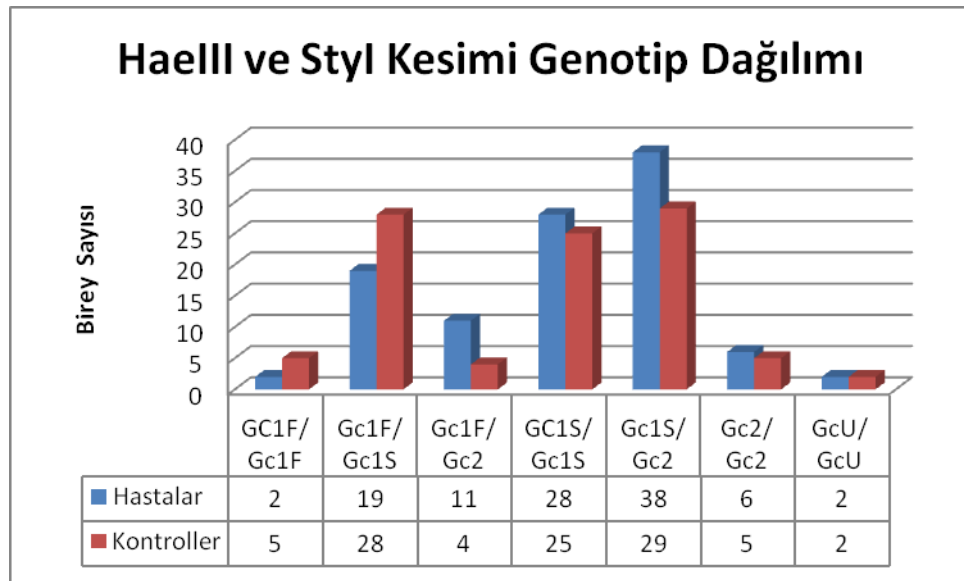
**Şekil 4.2: VDBP kesim ürünleri.** % 2'lik agaroz jel elektroforezinde HaeIII ve Sty I enzimleriyle kesim ürünleri görülmektedir. ( M = Marker, H = HaeIII Kesimi, S = Sty I Kesimi)

Hastaların ve sağlıklı kontrollerin genetik analizleri sonucunda 2 hastada Gc1F/Gc1F genotipi gözlenirken 5 kontrolde bu genotip gözlemlendi. Gc1F/Gc1S genotipi 20 hastada gözlenirken, 28 kontrolün bu genotipe sahip olduğu belirlendi. 10 hastada Gc1F/Gc2 genotipi gözlenirken, sadece 4 kontrolde bu genotip gözlemlendi. Gc1S/Gc1S genotipine sahip 28 hasta belirlenirken, 25 kontrolün bu genotipe sahip olduğu gözlemlendi. Gc1S/Gc2 genotipine sahip hasta sayısı 38 iken, kontrol grubunda 29 bireyin bu genotipe sahip olduğu belirlendi. Gc2/Gc2 genotipini taşıyan 6 hasta varken, kontrol grubundan 5 bireyin bu genotipe sahip olduğu saptandı. GcU/GcU genotipine sahip 2 hasta birey bulunurken, kontrollerde de 2 bireyin bu genotipe sahip olduğu saptandı (Tablo 4). Ancak kontrol ve hasta grupları arasında genotip dağılımları ( $P = 0,2818$ ,

Şekil 4.3) veya allel dağılımları ( $P = 0,3209$ , Şekil 4.4) açısından anlamlı bir fark bulunamadı. Hasta ve kontrol grupları HaeIII ve Sty I kesimleri ayrı ayrı değerlendirilip genotiplendiğinde de hem HaeIII hem de StyI kesimleri bakımından gerek genotip dağılımları ( $P = 0,9589$ , Şekil 4.5;  $P = 0,1622$ , Şekil 4.7) gerekse allel dağılımları ( $P = 0,9764$ , Şekil 4.6;  $P = 0,1308$ , Şekil 4.8) açısından anlamlı bir fark bulunamadı.

**Tablo 4.1: Hasta ve Kontrol gruplarında HaeIII ve Sty I enzimleriyle kesim sonucunda oluşan genotiplerin dağılımı**

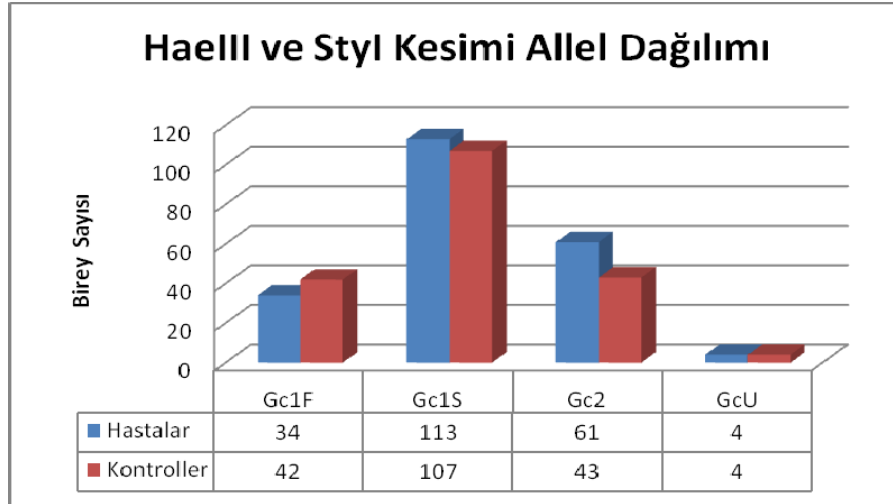
	HASTALAR		KONTROLLER		TOPLAM
	n	%	n	%	
Gc1F/Gc1F	2	1,9	5	5,1	7
Gc1F/Gc1S	19	17,9	28	28,6	48
Gc1F/Gc2	11	10,4	4	4,1	14
Gc1S/Gc1S	28	26,4	25	25,5	53
Gc1S/Gc2	38	35,8	29	29,6	67
Gc2/Gc2	6	5,7	5	5,1	11
GcU/GcU	2	1,9	2	2	4
<b>TOPLAM</b>	<b>106</b>		<b>98</b>		<b>204</b>



**Şekil 4.3:** Hasta ve kontrol gruplarında HaeIII ve Sty I enzimleriyle kesim sonucunda oluşan genotiplerin dağılımı.  $\chi^2 = 7,443182$ ;  $P = 0,2818$

**Tablo 4.2: Hasta ve Kontrol gruplarının HaeIII ve Sty I enzimleriyle kesim sonucunda oluşan allelerin dağılımı**

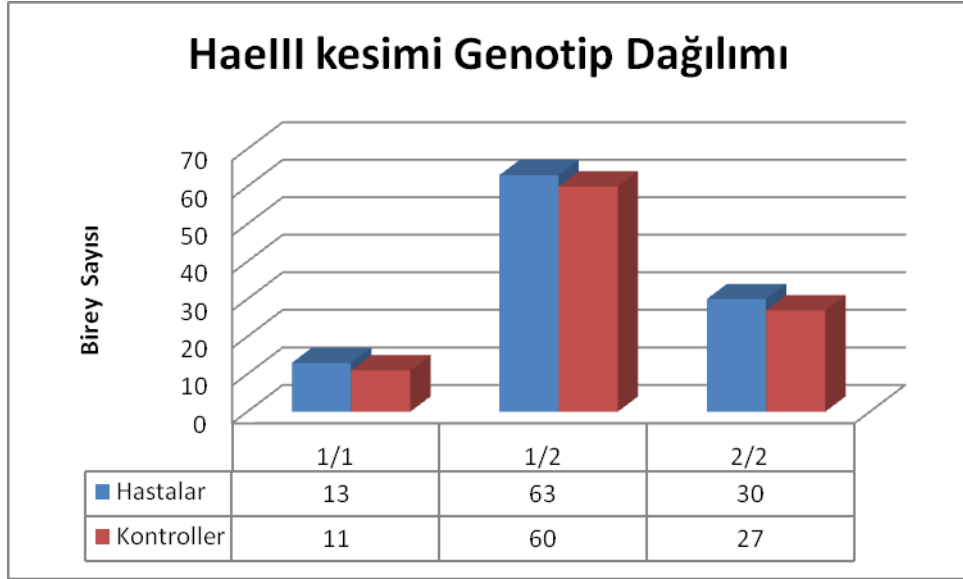
	HASTALAR		KONTROLLER		TOPLAM
	n	%	n	%	
<b>Gc1F</b>	34	16	42	21,4	<b>76</b>
<b>Gc1S</b>	113	53,3	107	54,6	<b>221</b>
<b>Gc2</b>	61	28,8	43	21,9	<b>103</b>
<b>GcU</b>	4	1,9	4	2	<b>4</b>
<b>TOPLAM</b>	<b>212</b>		<b>196</b>		<b>408</b>



**Şekil 4.4:** Hasta ve Kontrol gruplarının HaeIII ve Sty I enzimleriyle kesim sonucunda oluşan allelerin dağılımı.  $\chi^2 = 3,4990$  ;  $P = 0,3209$

**Tablo 4.3: Hasta ve kontrol gruplarında HaeIII enzimiyle kesim sonucunda oluşan genotiplerin dağılımı.**

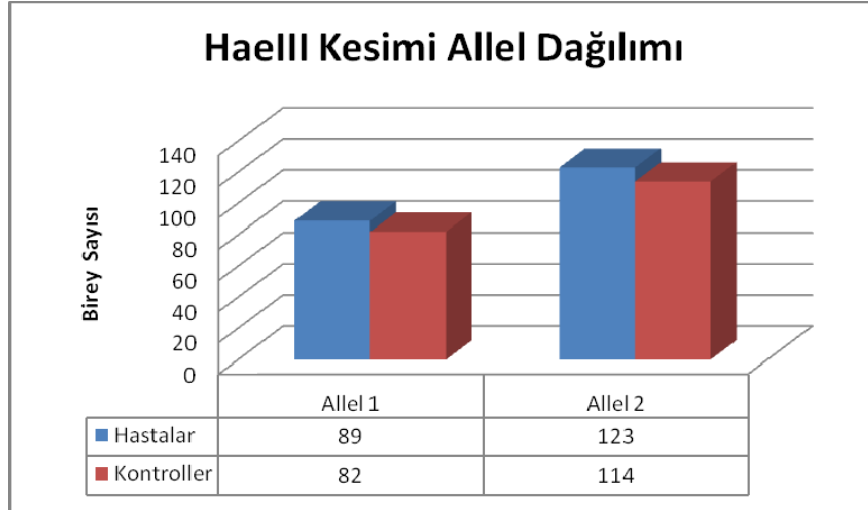
	HASTALAR		KONTROLLER		TOPLAM
	n	%	n	%	
<b>1/1</b>	13	12,5	11	11,2	<b>24</b>
<b>1/2</b>	63	63,9	60	61,2	<b>123</b>
<b>2/2</b>	30	29,6	27	27,4	<b>57</b>
<b>TOPLAM</b>	<b>106</b>		<b>98</b>		<b>204</b>



**Şekil 4.5:** Hasta ve kontrol gruplarında HaeIII enzimiyle kesim sonucunda oluşan genotiplerin dağılımı.  
 $\chi^2 = 0,0841$ ;  $P = 0,9589$

**Tablo 4.4:** Hasta ve kontrol gruplarında HaeIII enzimiyle kesim sonucunda oluşan allellerin dağılımı.

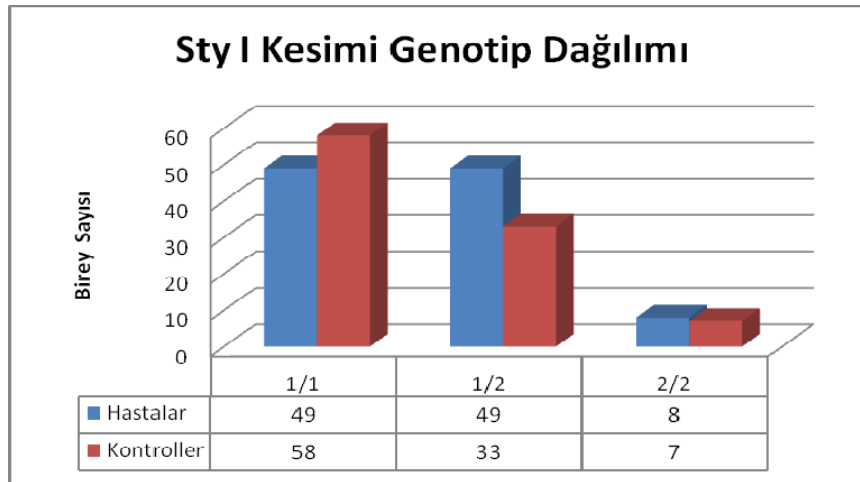
	HASTALAR		KONTROLLER		TOPLAM
	n	%	n	%	
Allel 1	89	42	82	41,9	171
Allel 2	123	58	114	58,1	237
TOPLAM	212		196		408



**Şekil 4.6:** Hasta ve kontrol gruplarında HaeIII enzimiyle kesim sonucunda oluşan allellerin dağılımı.  
 $\chi^2 = 0,0009$ ;  $P = 0,9764$

**Tablo 4.5:** Hasta ve kontrol gruplarında StyI enzimiyle kesim sonucunda oluşan genotiplerin dağılımı.

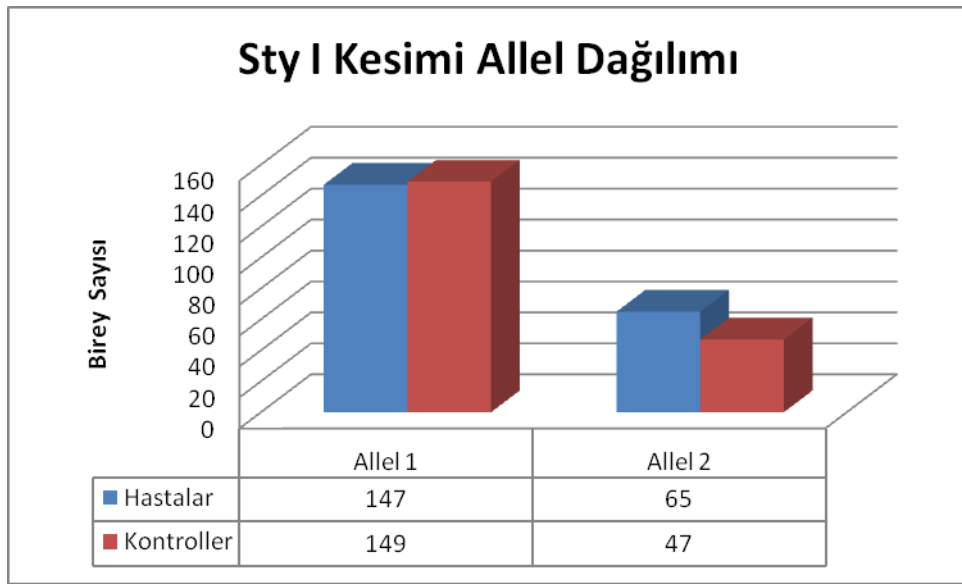
	HASTALAR		KONTROLLER		TOPLAM
	n	%	n	%	
1/1	49	46,2	58	59,2	107
1/2	49	46,2	33	33,7	82
2/2	8	7,6	7	7,1	15
<b>TOPLAM</b>	<b>106</b>		<b>98</b>		<b>204</b>



**Şekil 4.7:** Hasta ve kontrol gruplarında StyI enzimiyle kesim sonucunda oluşan genotiplerin dağılımı.  
 $\chi^2 = 3,6375$ ;  $P = 0,1622$

**Tablo 4.6:** Hasta ve kontrol gruplarında StyI enzimiyle kesim sonucunda oluşan allelerin dağılımı.

	HASTALAR		KONTROLLER		TOPLAM
	n	%	n	%	
Allel 1	147	69,3	149	76	<b>296</b>
Allel 2	65	30,7	47	24	<b>112</b>
<b>TOPLAM</b>	<b>212</b>		<b>98</b>		<b>408</b>



**Şekil 4.8:** Hasta ve kontrol gruplarında StyI enzimiyle kesim sonucunda oluşan genotiplerin dağılımı.

$$\chi^2 = 2,2824; P = 0,1308$$

## 5. TARTIŞMA

Tüm Alzheimer olgularının, % 95-99'unu teşkil eden sporadik Alzheimer Hastalığı için en iyi bilinen genetik risk faktörü -fonksiyonu şimdilik tam olarak bilinmese de- hastaların yaklaşık % 50'sinden sorumlu olan Apolipoprotein E'nin (ApoE) ε4 allelinin kalıtımıdır [100]. Bu yüzden sporadik Alzheimer Hastalığı ile ilişkili diğer genlerin bulunması hastalığın erken teşhisi, koruyucu önlemlerin alınabilmesi ve tedavisi açısından önem taşımaktadır.

Vitamin D'nin başlıca kalsiyum ve fosfat metabolizmasındaki işlevleri bilinse de son yıllarda yapılan çalışmalar sinir sisteminde de önemli görevler üstlendiğini göstermektedir. Vitamin D'nin sinir sisteminde koruyucu etkisi vardır. Özellikle sinir büyüme faktörü (NGF) sentezi Vitamin D ile düzenlenir [53]. NGF azalmasının sporadik Alzheimer ile ilişkili olduğu ve NGF uygulanmasının Alzheimer hastalığı tedavisinde kullanılabileceği yapılan son çalışmalarla ortaya konmuştur [101, 102]. Alzheimer hastalarında vitamin D seviyesinin düşük olduğu ve bu yüzden kalça kırıklarına daha sık rastlandığı yapılan bir takım çalışmalar ile gösterilmiştir [60-62]. Ayrıca Vitamin D seviyesi düşük olan hastalarda mod bozuklukları ve algılamada sorunlar gözlemlendiği belirtilmiştir [63].

Vitamin D'nin, nuklear fonksiyonları Vitamin D reseptörü (VDR) aracılığı ile gerçekleştirilir [64]. Gerek VDR mRNA'sı gerekse VDR proteini sinir sistemi hücrelerinde bulunmaktadır. VDR geni ekspresyonu, hem nöronlarda hem de glial hücrelerde gösterilmiştir [4]. VDR mRNA seviyesinin, Alzheimer Hastalığında, hipokampusun CA1 ve CA2 piramit hücrelerinde azaldığı gözlenmiştir [65]. Ayrıca, Alzheimer Hastalığı ile VDR geni polimorfizmi arasında bir ilişki bulunduğu gösterilmiştir [6].

Vitamin D yolağında yer alan diğer bir önemli protein ise Vitamin D'nin plazmada taşınmasını sağlayan Vitamin D Bağlayan Proteindir (VDBP). Vitamin D Bağlayan Protein çok polimorfik bir proteindir. 124 farklı polimorfizme sahip olduğu gösterilmiştir [72]. En sık rastlanan ve çalışılan polimorfizm, bu proteini kodlayan genin 11. ekzon bölgesindeki 416'ncı ve 420'inci kodonlardaki amino asit değişimlerinden kaynaklanan polimorfizmdir. Bu polimorfizm sonucunda proteinin Gc1F, Gc1S, Gc2 ve GcU olmak üzere dört farklı izoformu bulunmaktadır. Her ne kadar bu izoformlar

arasında ligandına ilgi açısından farklılıklar olsa da, bütün polimorfik bölgeler değerlendirildiğinde Vitamin D metabolitlerini bağlamada Gc1A9 ve A11 izoformları en yüksek, Gc1C1 ve Gc1C21 izoformları ise en düşük afiniteye sahiptir [103]. Ancak, çalışılan bu üç izoformun vitamin D'ye ilgileri arasındaki fark, vitamin D eksikliğine yol açacak kadar önemli olmayabilir.

Lauridsen ve ark. VDBP polimorfizminin plazma 25(OH)D ve 1,25(OH)<sub>2</sub>D konsantrasyonunu belirleyici bir etken olduğunu bildirmişlerdir. Her iki vitamin D metabolitinin konsantrasyonunun Gc1-1 genotipinde en çok, Gc1-2 genotipinde orta, Gc2-2 genotipinde ise en az seviyede olduğu gösterilmiştir. VDBP genotiplerinin Vitamin D metabolitlerinin plazma konsantrasyonunu belirleyici bir etken olmasının yanı sıra, VDBP'nin de plazma konsantrasyonunu belirleyici rol oynar. Dolayısıyla, VDBP genotipine bağlı olarak, VDBP'nin plazma konsantrasyonu da Vitamin D metabolitleriyle benzer şekilde değişiklik gösterir [104, 105].

Bu çalışmada VDBP genotipi belirlenen 106 Alzheimer hastasının % 46'sı Gc1-1 genotipine sahipken, Gc2-2 genotipindeki bireylerin oranı yaklaşık % 6 olarak bulundu. Araştırılmış olan 98 kontrol bireyde ise bu oranlar sırasıyla % 59 ve % 5 olarak bulundu. Alzheimer hastalarında Gc1-1 oranı azalır, Gc2-2 oranı artmakla birlikte bu farklılık istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı, Alzheimer Hastalığı ile VDBP geninin ekzon 11 bölgesinde bulunan 416. ve 420. kodonlardaki polimorfizmler arasında anlamlı bir ilişki saptanmadı.

Serbest hormon teorisine göre, herhangi bir hormonun biyolojik aktivitesinin taşıyıcı proteine bağlı miktarından ziyade, plazmada serbest halde bulunan miktarına bağlı olduğu belirtilmektedir. Fakat, bu teori her hormon için geçerli değildir ve geçerliliği sadece hormona özgü olmayıp hormonun alındığı dokuya, alınma şekline, plazmada taşındığı proteinden ayrılmasına ve hücre içi kullanımına bağlı olarak değişiklik gösterir. Teori, tiroid hormonları, kortizol ve Vitamin D'nin hidroksile metabolitlerinin bütün dokulara alımında geçerlidir. Diğer steroid hormonların ise bazı dokulara alımında geçerli iken diğer dokulara (örneğin karaciğer) alımında rol oynamaz. Bazı steroid hormonlar için de (örneğin progesteron) geçerli değildir [106-109].

Sağlıklı kadınlarda, serum 1,25(OH)<sub>2</sub>D konsantrasyonu serum VDBP konsantrasyonuyla doğru orantılıdır [110]. Bu yüzden hamilelik ve östrojen tedavisi

sirasında artan serum VDBP konsantrasyonu ile total serum 1,25(OH)<sub>2</sub>D miktarı artsa da biyolojik olarak aktif olan serbest 1,25(OH)<sub>2</sub>D miktarı aynı kalmaktadır [111].

Yakın zamanda yapılan bir çalışmada VDBP geni eksik olan farelerin sağlıklı oldukları ve üreyebildikleri gözlenmiştir [78]. Aynı zamanda, VDBP geni eksik olan bu farelerin, VDBP geni açısından normal farelerle kıyaslandıklarında; serum 25(OH)D ve 1,25(OH)<sub>2</sub>D seviyelerinin belirgin olarak düşük olduğu da ortaya konmuştur. Buna rağmen, bu fareler Vitamin D eksikliğinden doğan herhangi bir bozukluk göstermemişlerdir. Bunun sebebi olarak, VDBP geni eksik olan farelerde serbest hormon miktarının fizyolojik işlevleri yerine getirmede yeterli olması düşünülmektedir [67].

Vitamin D'nin plazmada taşınmasından büyük bir oranda karaciğerde sentezlenen VDBP sorumlu olsa da gözden kaçırılmaması gereken bir diğer nokta da beyinde bulunan hücrelerin de Vitamin D'yi öncülünden sentezleme yeteneğinde olduğudur. Vitamin D sentezinin bir diğer önemli unsurunun UVB ışığı olduğu göz önüne alındığında, Vitamin D öncülünün gözde sentezlenip, aksonal taşınım ile aktif metabolitlere dönüşümün nöronlarda olabileceği ileri sürülmektedir [50].

Vitamin D'nin taşınmasına ek olarak VDBP'nin hücre dışı aktin temizlenmesi işlevine de katıldığı gösterilmiştir. VDBP, aktin temizleme sisteminde gelsolinle beraber hareket etmektedir. Gelsolin'in aktin temizleme sistemindeki görevinin yanı sıra, gelsolinde meydana gelen bozuklukların deride, gözlerde, merkezi ve periferik sinir sisteminde amiloid plak birikimiyle tanımlanan Fin tipi ailesel amiloidoza yol açtığı bilinmektedir [112, 113]. Ayrıca, mutant APP ve mutant PS geni ile Alzheimer modeli oluşturulmuş transgenik farelere periferik dolaşıma gelsolin verilmesinin plazmadaki A $\beta$  birikimini azaltmanın yanı sıra, beyinde oluşan A $\beta$  plaklarını azalttığı ve yeni plakların oluşmasını önlediği fareler üzerinde yapılan deneylerde gösterilmiştir [114]. Bunun yanı sıra, sıçan pheochromocytoma (PC-12) hücrelerine insan sitoplazmik gelsolini verilmesinin, bu hücrelerde A $\beta$  birikiminin azalttığı ve A $\beta$  ile tetiklenen mitokondriyal apoptoz yolunu engellediği bildirilmiştir [115]. Gelsolinin kararlılığı Ca<sup>+2</sup> a bağlıdır. Ca<sup>+2</sup>, bu proteinin normal formunun yıkımını önlerken mutant formunda ise böyle bir koruma yeteneğine sahip değildir [116]. Her ne kadar, amiloidozda VDBP'nin rolü daha önce çalışılmamış olsa da, VDBP ile gelsolinin aktin temizleme sisteminde birlikte hareket etmesi, gelsolin'in aktivitesinin Ca<sup>+2</sup> a bağlı

olması ve  $Ca^{+2}$  metabolizmasının başlıca düzenleyicisinin Vitamin D olduğu göz önüne alındığında VDBP polimorfizmlerinin de amiloid plak birikimi ile ilişkili olabileceği düşünülebilir.

Vitamin D Bağlayan Protein polimorfizmi ile Grave's Hastalığı, diyabet, Kronik Obstruktif Akciğer Hastalığı (COPD) ve obezite gibi bir çok hastalık arasında ilişki olduğunu bildiren çeşitli araştırmalar bulunmaktadır. VDBP allellerinin dağılımlarında ırksal farklılıklar gözlemlendiği için, hastalıklara yatkınlıkta da ırklar arasında farklı sonuçlar alınabilmektedir [8-11, 92, 94, 117-121]. Bu çalışmanın sonuçları (Gc1S “%54”, Gc1F “%19”, Gc2 “%25”, GcU “%2” ), VDBP alleleri dağılımı bakımından beyaz ırk üzerinde yapılan diğer çalışmaların sonuçlarıyla (Gc1S “%56”, Gc1F “%16”, Gc2 “%28” [8]) paralellik göstermektedir. Heterojen bir yapıya sahip olan Türk toplumundan alınan örnekler üzerinde yapılmış olan çalışmamızın sonuçları VDBP polimorfizmi ile Alzheimer Hastalığı arasında anlamlı bir ilişki saptayamamış olmakla beraber daha homojen yapıdaki kapalı populasyonlarda ve hasta ile kontrol sayılarının artırılmasıyla yapılacak çalışmalar VDBP polimorfizmi ve Alzheimer hastalığı arasındaki ilişkiyi ortaya koymada daha yararlı olacaktır.

VDBP polimorfizmi ve Alzheimer hastalığı arasındaki ilişkiyi araştıran başka bir çalışmaya yapılan kaynak taranmasında rastlanmadığından, bu konuda ilk olan bu çalışmanın diğer çalışmalarla desteklenmesi gerekmektedir.

## KAYNAKLAR

1. Goedert, M. and M.G. Spillantini, *A century of Alzheimer's disease*. Science, 2006. **314**(5800): p. 777-81.
2. Holick, M.F., J.A. MacLaughlin, and S.H. Doppelt, *Regulation of cutaneous previtamin D3 photosynthesis in man: skin pigment is not an essential regulator*. Science, 1981. **211**(4482): p. 590-3.
3. MacLaughlin, J.A., R.R. Anderson, and M.F. Holick, *Spectral character of sunlight modulates photosynthesis of previtamin D3 and its photoisomers in human skin*. Science, 1982. **216**(4549): p. 1001-3.
4. Veenstra, T.D., et al., *1,25-Dihydroxyvitamin D3 receptors in the central nervous system of the rat embryo*. Brain Res, 1998. **804**(2): p. 193-205.
5. MacDonald, P.N., et al., *Vitamin D receptor and nuclear receptor coactivators: crucial interactions in vitamin D-mediated transcription*. Steroids, 2001. **66**(3-5): p. 171-6.
6. Gezen-Ak, D., et al., *Association between Vitamin D Receptor Gene Polymorphism and Alzheimer's Disease*. Tohoku J. Exp. Med., 2007. **212**(3): p. 00-00.
7. Gomme, P.T. and J. Bertolini, *Therapeutic potential of vitamin D-binding protein*. Trends Biotechnol, 2004. **22**(7): p. 340-5.
8. Schellenberg, D., et al., *Vitamin D binding protein variants and the risk of COPD*. Am J Respir Crit Care Med, 1998. **157**(3 Pt 1): p. 957-61.
9. Pani, M.A., et al., *A polymorphism within the vitamin D-binding protein gene is associated with Graves' disease but not with Hashimoto's thyroiditis*. J Clin Endocrinol Metab, 2002. **87**(6): p. 2564-7.
10. Hirai, M., et al., *Variations in vitamin D-binding protein (group-specific component protein) are associated with fasting plasma insulin levels in Japanese with normal glucose tolerance*. J Clin Endocrinol Metab, 2000. **85**(5): p. 1951-3.
11. Ito, I., et al., *Risk and severity of COPD is associated with the group-specific component of serum globulin 1F allele*. Chest, 2004. **125**(1): p. 63-70.
12. Alzheimer, A., et al., *An English translation of Alzheimer's 1907 paper, "Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde"*. Clin Anat, 1995. **8**(6): p. 429-31.
13. Roberson, E.D. and L. Mucke, *100 years and counting: prospects for defeating Alzheimer's disease*. Science, 2006. **314**(5800): p. 781-4.
14. Wenk, G.L., *Neuropathologic changes in Alzheimer's disease*. J Clin Psychiatry, 2003. **64 Suppl 9**: p. 7-10.
15. AHAF, *Cross Section of Normal and Alzheimer's Brain*. Erişim: 05/04/2007 About Alzheimer's, American Health Assistance Foundation: <http://www.ahaf.org/alzdis/about/BrainAlzheimer.htm>.
16. AHAF, *Amyloid Plaques and Neurofibrillary Tangles*. About Alzheimer's, American Health Assistance Foundation: <http://www.ahaf.org/alzdis/about/AmyloidPlaques.htm>.
17. Glenner, G.G. and C.W. Wong, *Alzheimer's disease: initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein*. Biochem Biophys Res Commun, 1984. **120**(3): p. 885-90.

18. Iwatsubo, T., 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*, 1994. **13**(1): p. 45-53.
19. Brion, J.P., *Neurofibrillary tangles and Alzheimer's disease*. *Eur Neurol*, 1998. **40**(3): p. 130-40.
20. Terry, R.D., et al., *Physical basis of cognitive alterations in Alzheimer's disease: synapse loss is the major correlate of cognitive impairment*. *Ann Neurol*, 1991. **30**(4): p. 572-80.
21. Iqbal, K., et al., *Identification and localization of a tau peptide to paired helical filaments of Alzheimer disease*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1989. **86**(14): p. 5646-50.
22. Weingarten, M.D., et al., *A protein factor essential for microtubule assembly*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1975. **72**(5): p. 1858-62.
23. Taniguchi, T., et al., *Phosphorylation of tau is regulated by PKN*. *J Biol Chem*, 2001. **276**(13): p. 10025-31.
24. Lee, V.M., M. Goedert, and J.Q. Trojanowski, *Neurodegenerative tauopathies*. *Annu Rev Neurosci*, 2001. **24**: p. 1121-59.
25. Braak, H. and E. Braak, *Neuropathological staging of Alzheimer-related changes*. *Acta Neuropathol (Berl)*, 1991. **82**(4): p. 239-59.
26. Price, J.L. and J.C. Morris, *Tangles and plaques in nondemented aging and "preclinical" Alzheimer's disease*. *Ann Neurol*, 1999. **45**(3): p. 358-68.
27. Higuchi, S., et al., *Presenilin-1 polymorphism and Alzheimer's disease*. *Lancet*, 1996. **347**(9009): p. 1186.
28. Rogaeve, E.I., et al., *Familial Alzheimer's disease in kindreds with missense mutations in a gene on chromosome 1 related to the Alzheimer's disease type 3 gene*. *Nature*, 1995. **376**(6543): p. 775-8.
29. De Strooper, B., et al., *Deficiency of presenilin-1 inhibits the normal cleavage of amyloid precursor protein*. *Nature*, 1998. **391**(6665): p. 387-90.
30. Citron, M., et al., *Mutant presenilins of Alzheimer's disease increase production of 42-residue amyloid beta-protein in both transfected cells and transgenic mice*. *Nat Med*, 1997. **3**(1): p. 67-72.
31. Armstrong, J., et al., *Familial Alzheimer disease associated with A713T mutation in APP*. *Neurosci Lett*, 2004. **370**(2-3): p. 241-3.
32. Strittmatter, W.J., et al., *Apolipoprotein E: high-avidity binding to beta-amyloid and increased frequency of type 4 allele in late-onset familial Alzheimer disease*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1993. **90**(5): p. 1977-81.
33. Isbir, T., et al., *Apolipoprotein-E gene polymorphism and lipid profiles in Alzheimer's disease*. *Am J Alzheimers Dis Other Dement*, 2001. **16**(2): p. 77-81.
34. Schmechel, D.E., et al., *Increased amyloid beta-peptide deposition in cerebral cortex as a consequence of apolipoprotein E genotype in late-onset Alzheimer disease*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1993. **90**(20): p. 9649-53.
35. Mahley, R.W., K.H. Weisgraber, and Y. Huang, *Apolipoprotein E4: a causative factor and therapeutic target in neuropathology, including Alzheimer's disease*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006. **103**(15): p. 5644-51.
36. Petersen, R.C., et al., *Mild cognitive impairment: clinical characterization and outcome*. *Arch Neurol*, 1999. **56**(3): p. 303-8.
37. Mintun, M.A., et al., *[11C]PIB in a nondemented population: potential antecedent marker of Alzheimer disease*. *Neurology*, 2006. **67**(3): p. 446-52.

38. Dusso, A.S., A.J. Brown, and E. Slatopolsky, *Vitamin D*. Am J Physiol Renal Physiol, 2005. **289**(1): p. F8-28.
39. Clemens, T.L., et al., *Increased skin pigment reduces the capacity of skin to synthesise vitamin D3*. Lancet, 1982. **1**(8263): p. 74-6.
40. Webb, A.R., L. Kline, and M.F. Holick, *Influence of season and latitude on the cutaneous synthesis of vitamin D3: exposure to winter sunlight in Boston and Edmonton will not promote vitamin D3 synthesis in human skin*. J Clin Endocrinol Metab, 1988. **67**(2): p. 373-8.
41. Norman, A.W., et al., *Vitamin D deficiency inhibits pancreatic secretion of insulin*. Science, 1980. **209**(4458): p. 823-5.
42. Boucher, B.J., et al., *Glucose intolerance and impairment of insulin secretion in relation to vitamin D deficiency in east London Asians*. Diabetologia, 1995. **38**(10): p. 1239-45.
43. Bourlon, P.M., A. Faure-Dussert, and B. Billaudel, *The de novo synthesis of numerous proteins is decreased during vitamin D3 deficiency and is gradually restored by 1, 25-dihydroxyvitamin D3 repletion in the islets of langerhans of rats*. J Endocrinol, 1999. **162**(1): p. 101-9.
44. Billaudel, B., L. Barakat, and A. Faure-Dussert, *Vitamin D3 deficiency and alterations of glucose metabolism in rat endocrine pancreas*. Diabetes Metab, 1998. **24**(4): p. 344-50.
45. Kajikawa, M., et al., *An insulinotropic effect of vitamin D analog with increasing intracellular Ca<sup>2+</sup> concentration in pancreatic beta-cells through nongenomic signal transduction*. Endocrinology, 1999. **140**(10): p. 4706-12.
46. Abe, E., et al., *Differentiation of mouse myeloid leukemia cells induced by 1 alpha,25-dihydroxyvitamin D3*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1981. **78**(8): p. 4990-4.
47. Wagner, N., et al., *1,25-dihydroxyvitamin D3-induced apoptosis of retinoblastoma cells is associated with reciprocal changes of Bcl-2 and bax*. Exp Eye Res, 2003. **77**(1): p. 1-9.
48. Boland, R., *Role of vitamin D in skeletal muscle function*. Endocr Rev, 1986. **7**(4): p. 434-48.
49. Endo, I., et al., *Deletion of vitamin D receptor gene in mice results in abnormal skeletal muscle development with deregulated expression of myoregulatory transcription factors*. Endocrinology, 2003. **144**(12): p. 5138-44.
50. Garcion, E., et al., *New clues about vitamin D functions in the nervous system*. Trends Endocrinol Metab, 2002. **13**(3): p. 100-5.
51. Hosseinpour, F. and K. Wikvall, *Porcine microsomal vitamin D(3) 25-hydroxylase (CYP2D25). Catalytic properties, tissue distribution, and comparison with human CYP2D6*. J Biol Chem, 2000. **275**(44): p. 34650-5.
52. Neveu, I., et al., *Synthesis of 1,25-dihydroxyvitamin D3 by rat brain macrophages in vitro*. J Neurosci Res, 1994. **38**(2): p. 214-20.
53. Wion, D., et al., *1,25-Dihydroxyvitamin D3 is a potent inducer of nerve growth factor synthesis*. J Neurosci Res, 1991. **28**(1): p. 110-4.
54. Neveu, I., et al., *1,25-dihydroxyvitamin D3 regulates NT-3, NT-4 but not BDNF mRNA in astrocytes*. Neuroreport, 1994. **6**(1): p. 124-6.
55. Riaz, S., et al., *A vitamin D(3) derivative (CB1093) induces nerve growth factor and prevents neurotrophic deficits in streptozotocin-diabetic rats*. Diabetologia, 1999. **42**(11): p. 1308-13.

56. Wang, J.Y., et al., *Vitamin D(3) attenuates 6-hydroxydopamine-induced neurotoxicity in rats*. Brain Res, 2001. **904**(1): p. 67-75.
57. Brewer, L.D., et al., *Vitamin D hormone confers neuroprotection in parallel with downregulation of L-type calcium channel expression in hippocampal neurons*. J Neurosci, 2001. **21**(1): p. 98-108.
58. de Viragh, P.A., K.G. Haglid, and M.R. Celio, *Parvalbumin increases in the caudate putamen of rats with vitamin D hypervitaminosis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1989. **86**(10): p. 3887-90.
59. Dawson, V.L. and T.M. Dawson, *Nitric oxide in neurodegeneration*. Prog Brain Res, 1998. **118**: p. 215-29.
60. Martyn, C.N., S. Singh, and P.J. Wood, *Calcium metabolism in Alzheimer's disease. A case-control study*. Gerontology, 1989. **35**(2-3): p. 153-7.
61. Sato, Y., T. Asoh, and K. Oizumi, *High prevalence of vitamin D deficiency and reduced bone mass in elderly women with Alzheimer's disease*. Bone, 1998. **23**(6): p. 555-7.
62. Sato, Y., et al., *Risk factors for hip fracture among elderly patients with Alzheimer's disease*. J Neurol Sci, 2004. **223**(2): p. 107-12.
63. Wilkins, C.H., et al., *Vitamin D deficiency is associated with low mood and worse cognitive performance in older adults*. Am J Geriatr Psychiatry, 2006. **14**(12): p. 1032-40.
64. Segaert, S. and R. Bouillon, *Vitamin D and regulation of gene expression*. Curr Opin Clin Nutr Metab Care, 1998. **1**(4): p. 347-54.
65. Sutherland, M.K., et al., *Reduction of vitamin D hormone receptor mRNA levels in Alzheimer as compared to Huntington hippocampus: correlation with calbindin-28k mRNA levels*. Brain Res Mol Brain Res, 1992. **13**(3): p. 239-50.
66. Norman, A., *Vitamin D Nuclear Receptor*. Erişim: 11/04/2007. Department of Biochemistry, University of California, Riverside: <http://www.biochemistry.ucr.edu/faculty/norman.html>.
67. White, P. and N. Cooke, *The multifunctional properties and characteristics of vitamin D-binding protein*. Trends Endocrinol Metab, 2000. **11**(8): p. 320-7.
68. Cooke, N.E., et al., *Direct regional assignment of the gene for vitamin D binding protein (Gc-globulin) to human chromosome 4q11-q13 and identification of an associated DNA polymorphism*. Hum Genet, 1986. **73**(3): p. 225-9.
69. Song, Y.H., et al., *Physical and meiotic mapping of the region of human chromosome 4q11-q13 encompassing the vitamin D binding protein DBP/Gc-globulin and albumin multigene cluster*. Genome Res, 1999. **9**(6): p. 581-7.
70. Haddad, J.G., et al., *Identification of the sterol- and actin-binding domains of plasma vitamin D binding protein (Gc-globulin)*. Biochemistry, 1992. **31**(31): p. 7174-81.
71. Swamy, N., et al., *Probing the vitamin D sterol-binding pocket of human vitamin D-binding protein with bromoacetate affinity labeling reagents containing the affinity probe at C-3, C-6, C-11, and C-19 positions of parent vitamin D sterols*. Arch Biochem Biophys, 2000. **373**(2): p. 471-8.
72. Cleve, H. and J. Constans, *The mutants of the vitamin-D-binding protein: more than 120 variants of the GC/DBP system*. Vox Sang, 1988. **54**(4): p. 215-25.
73. Otterbein, L.R., et al., *Crystal structures of the vitamin D-binding protein and its complex with actin: structural basis of the actin-scavenger system*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(12): p. 8003-8.

74. DiMartino, S.J. and R.R. Kew, *Initial characterization of the vitamin D binding protein (Gc-globulin) binding site on the neutrophil plasma membrane: evidence for a chondroitin sulfate proteoglycan*. J Immunol, 1999. **163**(4): p. 2135-42.
75. Haddad, J.G., *Plasma vitamin D-binding protein (Gc-globulin): multiple tasks*. J Steroid Biochem Mol Biol, 1995. **53**(1-6): p. 579-82.
76. Song, Y.H., et al., *Vitamin D-binding protein gene transcription is regulated by the relative abundance of hepatocyte nuclear factors 1alpha and 1beta*. J Biol Chem, 1998. **273**(43): p. 28408-18.
77. Dietrich, M., et al., *Megalyn mediates the transport of leptin across the blood-CSF barrier*. Neurobiol Aging, 2007.
78. Safadi, F.F., et al., *Osteopathy and resistance to vitamin D toxicity in mice null for vitamin D binding protein*. J Clin Invest, 1999. **103**(2): p. 239-51.
79. Kew, R.R., J.A. Fisher, and R.O. Webster, *Co-chemotactic effect of Gc-globulin (vitamin D binding protein) for C5a. Transient conversion into an active co-chemotaxin by neutrophils*. J Immunol, 1995. **155**(11): p. 5369-74.
80. JF., H., *Structure of the actin-vitamin D-binding protein*. Erişim: 25/04/2007. Department of Physiology and Biophysics: <http://biophysics.bumc.bu.edu/faculty/head/index.html>.
81. Ray, R., *Molecular recognition in vitamin D-binding protein*. Proc Soc Exp Biol Med, 1996. **212**(4): p. 305-12.
82. Sanger, J.M., et al., *Disruption of microfilament organization in living nonmuscle cells by microinjection of plasma vitamin D-binding protein or DNase I*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1990. **87**(14): p. 5474-8.
83. Alberts, B., A. Johnson, and J. Lewis, *Severing Proteins Regulate the Length and Kinetic Behavior of Actin Filaments and Microtubules*. Erişim:05/05/2007. Molecular Biology of the Cell: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/bv.fcgi?highlight=gelsolin&rid=mboc4.section.2995#3028>
84. *A Prevalent Target-Binding Cleft in Actin*. Erişim:05/05/2007. Landes Bioscience: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/bv.fcgi?highlight=Vitamin%20D%20binding%20Protein&rid=eurekah.section.68983#68987>.
85. Binder, R., et al., *Neutrophil priming by cytokines and vitamin D binding protein (Gc-globulin): impact on C5a-mediated chemotaxis, degranulation and respiratory burst*. Mol Immunol, 1999. **36**(13-14): p. 885-92.
86. Hallett, M.B. and D. Lloyds, *Neutrophil priming: the cellular signals that say 'amber' but not 'green'*. Immunol Today, 1995. **16**(6): p. 264-8.
87. Mohamad, S.B., et al., *Preparation of Gc protein-derived macrophage activating factor (GcMAF) and its structural characterization and biological activities*. Anticancer Res, 2002. **22**(6C): p. 4297-300.
88. Gumireddy, K., C.D. Reddy, and N. Swamy, *Mitogen-activated protein kinase pathway mediates DBP-maf-induced apoptosis in RAW 264.7 macrophages*. J Cell Biochem, 2003. **90**(1): p. 87-96.
89. Adebajo, O.A., et al., *A possible new role for vitamin D-binding protein in osteoclast control: inhibition of extracellular Ca<sup>2+</sup> sensing at low physiological concentrations*. Biochem Biophys Res Commun, 1998. **249**(3): p. 668-71.
90. Swamy, N., et al., *Baculovirus-expressed vitamin D-binding protein-macrophage activating factor (DBP-maf) activates osteoclasts and binding of*

- 25-hydroxyvitamin D(3) does not influence this activity.* J Cell Biochem, 2001. **81**(3): p. 535-46.
91. Schneider, G.B., et al., *The anabolic effects of vitamin D-binding protein-macrophage activating factor (DBP-MAF) and a novel small peptide on bone.* Crit Rev Eukaryot Gene Expr, 2003. **13**(2-4): p. 277-84.
  92. Alonso, A., et al., *GC subtyping and HIV infection in a Spanish population: no evidence of an association between GC subtypes and AIDS.* Hum Hered, 1990. **40**(1): p. 34-7.
  93. Klupa, T., et al., *Amino acid variants of the vitamin D-binding protein and risk of diabetes in white Americans of European origin.* Eur J Endocrinol, 1999. **141**(5): p. 490-3.
  94. Pani, M.A., et al., *Vitamin D binding protein alleles and susceptibility for type 1 diabetes in Germans.* Autoimmunity, 1999. **31**(1): p. 67-72.
  95. Malecki, M.T., et al., *Vitamin D binding protein gene and genetic susceptibility to type 2 diabetes mellitus in a Polish population.* Diabetes Res Clin Pract, 2002. **57**(2): p. 99-104.
  96. McCullough, M.L., et al., *Vitamin D pathway gene polymorphisms, diet, and risk of postmenopausal breast cancer: a nested case-control study.* Breast Cancer Res, 2007. **9**(1): p. R9.
  97. Sambrook, J., E. Fritsch, and T. Maniatis, *Cloning a Laboratory Manual.* 2 ed. 1989, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
  98. Olgun, A. and A. Topal, *DNA'nın analizi*, in *Moleküler Biyolojide Kullanılan Yöntemler*, G. Temizkan and N. Arda, Editors. 1999, Nobel: İstanbul. p. 33-45.
  99. Roux, K., *Optimization and Troubleshooting in PCR*, in *PCR Primer a Laboratory Manual*, C. Dieffenbach and G. Dveksler, Editors. 1995, Cold Spring Harbor Laboratory Press: New York. p. 53-62.
  100. Refolo, L.M. and H.M. Fillit, *Apolipoprotein E4 as a target for developing new therapeutics for Alzheimer's disease.* J Mol Neurosci, 2004. **23**(3): p. 151-5.
  101. Williams, B.J., M. Eriksdotter-Jonhagen, and A.C. Granholm, *Nerve growth factor in treatment and pathogenesis of Alzheimer's disease.* Prog Neurobiol, 2006. **80**(3): p. 114-28.
  102. Capsoni, S. and A. Cattaneo, *On the molecular basis linking Nerve Growth Factor (NGF) to Alzheimer's disease.* Cell Mol Neurobiol, 2006. **26**(4-6): p. 619-33.
  103. Arnaud, J. and J. Constans, *Affinity differences for vitamin D metabolites associated with the genetic isoforms of the human serum carrier protein (DBP).* Hum Genet, 1993. **92**(2): p. 183-8.
  104. Lauridsen, A.L., et al., *Plasma concentrations of 25-hydroxy-vitamin D and 1,25-dihydroxy-vitamin D are related to the phenotype of Gc (vitamin D-binding protein): a cross-sectional study on 595 early postmenopausal women.* Calcif Tissue Int, 2005. **77**(1): p. 15-22.
  105. Lauridsen, A.L., P. Vestergaard, and E. Nexø, *Mean serum concentration of vitamin D-binding protein (Gc globulin) is related to the Gc phenotype in women.* Clin Chem, 2001. **47**(4): p. 753-6.
  106. Mendel, C.M., *The free hormone hypothesis: a physiologically based mathematical model.* Endocr Rev, 1989. **10**(3): p. 232-74.
  107. Adams, J.S., *"Bound" to work: the free hormone hypothesis revisited.* Cell, 2005. **122**(5): p. 647-9.

108. Rosner, W., *Sex steroids and the free hormone hypothesis*. Cell, 2006. **124**(3): p. 455-6; author reply 456-7.
109. Midgley, J.E., *The free thyroid hormone hypothesis and measurement of free hormones*. Clin Chem, 1993. **39**(6): p. 1342-4.
110. Bouillon, R., et al., *Influence of the vitamin D-binding protein on the serum concentration of 1,25-dihydroxyvitamin D3. Significance of the free 1,25-dihydroxyvitamin D3 concentration*. J Clin Invest, 1981. **67**(3): p. 589-96.
111. van Hoof, H.J., et al., *Relationship between free and total 1,25-dihydroxyvitamin D in conditions of modified binding*. Eur J Endocrinol, 2001. **144**(4): p. 391-6.
112. Kangas, H., et al., *In vitro expression analysis shows that the secretory form of gelsolin is the sole source of amyloid in gelsolin-related amyloidosis*. Hum Mol Genet, 1996. **5**(9): p. 1237-43.
113. Kiuru, S., *Gelsolin-related familial amyloidosis, Finnish type (FAF), and its variants found worldwide*. Amyloid, 1998. **5**(1): p. 55-66.
114. Matsuoka, Y., et al., *Novel therapeutic approach for the treatment of Alzheimer's disease by peripheral administration of agents with an affinity to beta-amyloid*. J Neurosci, 2003. **23**(1): p. 29-33.
115. Qiao, H., et al., *Inhibition of Alzheimer's amyloid-beta peptide-induced reduction of mitochondrial membrane potential and neurotoxicity by gelsolin*. Neurobiol Aging, 2005. **26**(6): p. 849-55.
116. Page, L.J., et al., *Ca<sup>2+</sup> binding protects against gelsolin amyloidosis*. Biochem Biophys Res Commun, 2004. **322**(4): p. 1105-10.
117. Hirai, M., et al., *Group specific component protein genotype is associated with NIDDM in Japan*. Diabetologia, 1998. **41**(6): p. 742-3.
118. Ishii, T., et al., *Association of Gc-globulin variation with susceptibility to COPD and diffuse panbronchiolitis*. Eur Respir J, 2001. **18**(5): p. 753-7.
119. Korytina, G.F., et al., *[Genotypes of vitamin-D-binding protein (DBP) in patients with chronic obstructive pulmonary disease and healthy population of Republic Bashkortostan]*. Mol Biol (Mosk), 2006. **40**(2): p. 231-8.
120. Lu, M., B. Yang, and Y.Y. Cai, *[The relationship between vitamin D binding protein gene polymorphism and chronic obstructive pulmonary disease]*. Zhonghua Nei Ke Za Zhi, 2004. **43**(2): p. 117-20.
121. Jiang, H., et al., *Association analysis of vitamin D-binding protein gene polymorphisms with variations of obesity-related traits in Caucasian nuclear families*. Int J Obes (Lond), 2007.

## ETİK KURUL KARARI



T.C.  
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ  
CERRAHPAŞA TIP FAKÜLTESİ  
DEKANLIĞI



Sayı :

29785

Konu :

Temel Tıp Bilimleri Bölümü  
Başkanlığı

İstanbul, ..... / ..... / .....

20 Kasım 2006

İLGİ: 17.10.2006 tarihli, 4063 sayılı yazınıza:

Bölümünüze bağlı Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalında Yüksek Lisans  
**Öğr.MEHMET OKTAR GÜLOĞLU'nun** yürüteceği "Vitamin D Bağlayan (VDBP)  
Poliformizminin Alzheimer Hastalığı İle İlişkinin Araştırılması" başlıklı projesi hakkında  
ilgi yazınız ve ekleri **07 Kasım 2006** tarihinde toplanan Fakültemiz Etik Kurulunca müzakere edilmiş  
olup, etik açıdan uygun olduğuna karar verilmiştir.

Bilgilerinizi durumun adı geçen anabilim dalı başkanlığına bildirilmesini  
saygılarımla rica ederim.

EKİ:

1 dosya

G. Soydaner  
Kasım 2006 S. SİPAHIOĞLU.

Prof.Dr. Mehmet YILDIRIM  
Dekan Yardımcısı ve Etik  
Kurul Başkanı

Remzi Semel  
21.11.06

## ÖZGEÇMİŞ

### Kişisel Bilgiler

<b>Adı</b>	Mehmet Oktar	<b>Soyadı</b>	GÜLOĞLU
<b>Doğ.Yeri</b>	Kayseri	<b>Doğ.Tar.</b>	12.03.1977
<b>Uyruğu</b>	T.C.	<b>TC Kim No</b>	55663029950
<b>Email</b>	oktar@guloglu.net	<b>Tel</b>	0(555)553 33 55

### Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mez. Yılı
<b>Doktora</b>		
<b>Yük.Lis.</b>		
<b>Lisans</b>	İstanbul Üniversitesi Fen Fak. Biyoloji Bölümü	2005
<b>Lise</b>	60. Yıl Anadolu Lisesi	1995

### İş Deneyimi (Sondan geçmişe doğru sıralayın)

	Görevi	Kurum	Süre (Yıl - Yıl)
-			-
-			-
-			-

Yabancı Dilleri	Okuduğunu Anlama*	Konuşma*	Yazma*	KPDS/ÜDS Puanı	(Diğer) Puanı
İngilizce	Çok iyi	İyi	İyi		TOEFL = 253

\*Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
<b>LES Puanı</b>	71.358	70.606	69.854
<b>(Diğer) Puanı (ALES)</b>	88.849	88.458	87.677

### Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma becerisi
Ms. Office	Çok iyi
Visual Basic	Orta
Photoshop	Orta

### Yayımları/Tebliğleri Sertifikaları/Ödülleri

Ozbek M and Guloglu MO. A new cave Amphipod from Turkey: *Gammarus ustaoglu sp nov.* Isr J Zoo. 2005; 51(2):147-155

Guloglu, MO. Nörodejeneratif Hastalıkların Kök Hücreler ile Tedavisi. II.Tıbbi Biyolojik Bilimler Kongresi ve V.Tıbbi Biyolojik Bilimler Öğrenci

Sempozyumu Kitapçığı. 2006; 42

Deney Hayvanlarının Biyolojik Araştırmalarda Kullanımı sertifikası (İ.Ü. CTF Deney Hayvanları AD)

Photoshop ve Grafik Uygulamaları kursu katılım sertifikası (Bilge Adam Bilgisayar Teknolojileri Akademisi)

8. Baltık Yaz Okulu Marie Curie kongre katılım tam bursu (2006)

AB 6. Çerçeve Programı Marie Curie erken dönem araştırmacı (ESR) doktora bursu (2007-20010)

**Özel İlgi Alanları (Hobileri):**

Fotoğraf

Bilgisayar Programcılığı

Doğa Sporları