

← Adınızı soyadınızı giriniz

Tez kabul edildikten sonra yapılan **sabit ciltte sırt yazısı** bu şablona göre yazılacak. Yazılar tek satır olacak  
Cilt sırtı yazıların yönü yukarıdan aşağıya  
(sol yandaki gibi) olacak .



← Tez, Yüksek Lisans'sa, YÜKSEK LİSANS TEZİ;  
Doktora ise DOKTORA TEZİ ifadesi kalacak

← Tez Sınavının yapılacağı yılı yazınız

**T.C.  
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**( YÜKSEK LİSANS TEZİ )**

**ALZHEİMER HASTALARINDA VİTAMİN D EKSİKLİĞİ  
İLE İLİŞKİLİ OLAN POLİMORFİZMLERİN  
ARAŞTIRILMASI**

**ÖMÜR SELİN ARAZ**

**DANIŞMAN  
PROF. DR. SELMA YILMAZER**

**TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI  
TIBBİ BİYOLOJİ PROGRAMI**

**İSTANBUL-2013**

**TEZ ONAYI**

İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Programında Ömür Selin Araz tarafından hazırlanan Alzheimer Hastalarında Vitamin D Eksikliği İle İlgili Olan Polimorfizmlerin Araştırılması başlıklı Yüksek Lisans tezi, yapılan tez sınavında Jürimiz tarafından başarılı bulunarak kabul edilmiştir.

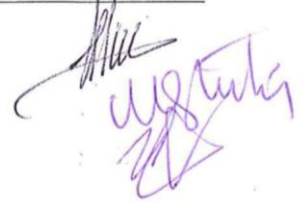
23 / 07 / 2013

**Tez Sınav Jürisi**

Ünvanı Adı Soyadı (Üniversitesi, Fakültesi, Anabilim Dalı)

İmzası

- 1.Prof.Dr.Selma YILMAZER(DANIŞMAN)
- 2.Prof.Dr.Melek ÖZTÜRK
- 3.Prof.Dr.İ.Hakan GÜRVİT
- 4.
- 5.



**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 haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim.

Ömür Selin ARAZ



## İTHAF

Dedem Hüseyin Karakullukçu ve Rahmetli Anneannem Türkan Karakullukçu'ya  
ithafen...

## TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim ve bu çalışmanın her aşamasında, bilgi ve tecrübesiyle beni yönlendiren, hiçbir zaman desteğini benden esirgemeyen, akademik kişiliği ve çalışma prensipleri ile bana örnek olan, birlikte çalışmaktan her zaman mutluluk duyacağım değerli danışmanım Sn. Prof. Dr. Selma Yılmaz'er'e, Anabilim Dalı olanaklarını kullanmamı sağlayan Anabilim Dalı Başkanımız Sn. Prof. Dr. Turgut Ulutin' e, eğitimimde bana her konuda yardım eden Sn. Prof. Dr. Melek Öztürk'e, veri toplanması ve bilimsel katkıları için Prof. Dr. Hakan Gürvit, Prof. Dr. Murat Emre ve Prof. Dr. Engin Eker'e teşekkürlerimi sunarım.

Gerek hayatımda, gerek tezimde benden yardımlarını, her zaman doğru olan nasihatlerini esirgemeyen, dik durabilmeyi ve azmetmeyi öğreten, alternatif çözümlere ulaşmamı sağlayan, disipliniyle kendime örnek aldığım Dr. Duygu Gezen Ak'a, birlikte çalışmaktan büyük keyif aldığım, bilgisiyle beni aydınlatan, çalışmamda sonsuz desteğini benden esirgemeyen, kişiliği, ahlakı ve iş sorumluluklarıyla bana her zaman örnek olacak Dr. Erdinç Dursun'a, her zaman yanımda olan, beni her durumda motive eden, çalışmam boyunca desteğini benden esirgemeyen, dostluğu ve yardımseverliği ile bulunmaz bir çalışma arkadaşı olan Bio. Merve Alaylıoğlu'na, laboratuvar çalışmalarımdaki yardımlarından ötürü Bio. İrem L. Atasoy'a, İstatistiksel analizlerdeki yardımlarından ötürü Yrd. Doç. Dr. Ömer Uysal' a ve anabilim dalımızdaki tüm öğretim üyeleri ve asistanlara teşekkür ederim.

Maddi manevi desteklerini üzerimden asla esirgemeyen, her türlü zorluğa karşı beni koruyan, aldığım her kararda sonuna kadar arkamda olan, sevgilerini tüm kalbimle hissettiğim sevgili annem B. Candan K. Araz'a ve sevgili babam Metin Araz'a, bütün zor zamanlarımda desteğini üzerimden esirgemeyen sevgili ablam Arş. Gör. Aylin Aras'a, hayatımın her döneminde yanımda olan, varlığıyla güç veren sevgili teyzem Arzum Gençoğlu'na, bütün bu süreç boyunca benden yardımını, manevi desteğini esirgemeyen, iyi, kötü her anımı paylaştığım Kerem Günaydın'a, benimle her zaman gurur duyduklarına inandığım sevgili dedem Hüseyin Karakullukçu ve kaybettiğim anneannem Türkan Karakullukçu'ya en içten teşekkürlerimi sunarım.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 11685

## İÇİNDEKİLER

|                                                                            |      |
|----------------------------------------------------------------------------|------|
| TEZ ONAYI .....                                                            | İİ   |
| BEYAN.....                                                                 | İİİ  |
| İTHAF.....                                                                 | İV   |
| TEŞEKKÜR.....                                                              | V    |
| İÇİNDEKİLER .....                                                          | VI   |
| TABLolar LİSTESİ.....                                                      | Vİİİ |
| ŞEKİLLER LİSTESİ .....                                                     | X    |
| SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ .....                                      | Xİİİ |
| ÖZET .....                                                                 | XİV  |
| ABSTRACT.....                                                              | XV   |
| 1. GİRİŞ VE AMAÇ.....                                                      | 1    |
| 2. GENEL BİLGİLER .....                                                    | 4    |
| 2.1. Alzheimer Hastalığı: .....                                            | 4    |
| 2.1.1. Alzheimer Hastalığı'nın Patolojik Bileşenleri .....                 | 6    |
| 2.1.1.1. Amiloid $\beta$ : .....                                           | 6    |
| 2.1.1.2. Nörofibril Yumakları: .....                                       | 10   |
| 2.1.2. Alzheimer Hastalığının Genetiği: .....                              | 15   |
| 2.1.2.1. Amiloid Öncül Protein (APP) .....                                 | 15   |
| 2.1.2.2. Presenilin-1 ve Presenilin-2 .....                                | 16   |
| 2.1.2.3. Apolipoprotein-E (ApoE).....                                      | 16   |
| 2.2. Vitamin D.....                                                        | 17   |
| 2.2.1. Vitamin D ve Beyin .....                                            | 20   |
| 2.2.2. Vitamin D ve Alzheimer Hastalığı.....                               | 22   |
| 2.3. Vitamin D Bağlayan Protein (DBP, GC-Globulin) .....                   | 22   |
| 2.3.1. DBP'nin Vitamin D'ye Bağlanması .....                               | 27   |
| 2.3.2. DBP'nin Biyolojik Fonksiyonları .....                               | 28   |
| 2.4. Kantitatif Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (qRT-PZR) ..... | 29   |
| 3. GEREÇ VE YÖNTEM.....                                                    | 30   |
| 3.1. DNA İzolasyonu .....                                                  | 30   |
| 3.1.1. DNA İzolasyon Protokolü.....                                        | 30   |

|                                                                                |    |
|--------------------------------------------------------------------------------|----|
| 3.2. DNA Saflığı ve Miktarının Tayin Edilmesi.....                             | 31 |
| 3.3. Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT PZR) ile Genotipleme ..... | 32 |
| 3.3.1. Reaksiyon Karışımlarının Hazırlanışı: .....                             | 47 |
| 3.3.2. Gerçek Zamanlı PZR Programı: .....                                      | 47 |
| 3.4. Haplotip Analizi:.....                                                    | 50 |
| 3.5. İstatistiksel Değerlendirme: .....                                        | 50 |
| 4. BULGULAR.....                                                               | 51 |
| 4.1. DNA İzolasyonu .....                                                      | 51 |
| 4.2. DBP Genotipleme Sonuçları .....                                           | 51 |
| 4.3. ApoE Genotipleme Sonuçları .....                                          | 64 |
| 5. TARTIŞMA .....                                                              | 70 |
| KAYNAKLAR .....                                                                | 75 |
| FORMLAR .....                                                                  | 81 |
| ETİK KURUL KARAR.....                                                          | 82 |
| ÖZGEÇMİŞ .....                                                                 | 83 |

## TABLOLAR LİSTESİ

|                                                                                                                                                 |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tablo 2-1: Alzheimer Hastalığı'nın amiloid $\beta$ hipotezi.....                                                                                | 9  |
| Tablo 2-2: Alzheimer Hastalığı'nda Tau Proteininin aşırı fosforilasyonu ve mekik biçimli nörofibriller lezyonların oluşması.....                | 14 |
| Tablo 2-3: Alzheimer Hastalığı ile ilişkili genler.....                                                                                         | 15 |
| Tablo 3-1: DBP geninde polimorfizm bakılan bölgelerin bulunduğu konum ve allelleri.....                                                         | 32 |
| Tablo 3-2: DBP geninin 6 bölgesine ait allel değişimleri.....                                                                                   | 33 |
| Tablo 3-3: ApoE geni üzerinde genotipleme için kullanılan bölgeler, ilgili genotipler, erime (melting) noktaları ve fenotipe yansıma riski..... | 40 |
| Tablo 3-4: DBP geni için kullanılan reaksiyon karışımı.....                                                                                     | 47 |
| Tablo 3-5: ApoE geni için kullanılan reaksiyon karışımı.....                                                                                    | 47 |
| Tablo 3-6: DBP geni için kullanılan Gerçek Zamanlı PZR programı.....                                                                            | 48 |
| Tablo 3-7: ApoE için kullanılan Gerçek Zamanlı PZR program.....                                                                                 | 49 |
| Tablo 3-8: DBP genine ait SNP'lerin kromozom üzerindeki konumları.....                                                                          | 50 |
| Tablo 4-1: Hasta ve kontrol gruplarında DBP geninin rs17467825 bölgesi genotip dağılımı.....                                                    | 52 |
| Tablo 4-2: Hasta ve kontrol gruplarında DBP geninin rs17467825 bölgesi allel dağılımı.....                                                      | 52 |
| Tablo 4-3: Hasta ve kontrol gruplarında DBP geninin rs2282679 bölgesi genotip dağılımı.....                                                     | 54 |
| Tablo 4-4: Hasta ve kontrol gruplarında DBP geninin rs2282679 bölgesi allel dağılımı.....                                                       | 54 |
| Tablo 4-5: Hasta ve kontrol gruplarında DBP geninin rs3755967 bölgesi genotip dağılımı.....                                                     | 56 |
| Tablo 4-6: Hasta ve kontrol gruplarında DBP geninin rs3755967 bölgesi allel                                                                     |    |

|                                                                                                                       |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| dağılımı.....                                                                                                         | 56 |
| Tablo 4-7: Hasta ve kontrol gruplarında DBP geninin rs2298850 bölgesi genotip dağılımı.....                           | 58 |
| Tablo 4-8: Hasta ve kontrol gruplarında DBP geninin rs2298850 bölgesi allel dağılımı.....                             | 58 |
| Tablo 4-9: Hasta ve kontrol gruplarında DBP geninin rs7041 bölgesi genotip dağılımı.....                              | 60 |
| Tablo 4-10: Hasta ve kontrol gruplarında DBP geninin rs7041 bölgesi allel dağılımı.....                               | 60 |
| Tablo 4-11: Hasta ve kontrol gruplarında DBP geninin rs1155563 bölgesi genotip dağılımı.....                          | 62 |
| Tablo 4-12: Hasta ve kontrol gruplarında DBP geninin rs1155563 bölgesi allel dağılımı.....                            | 62 |
| Tablo 4-13: Hasta ve kontrol gruplarında ApoE genotiplerinin dağılımı.....                                            | 64 |
| Tablo 4-14: Hasta ve kontrol gruplarında ApoE allellerinin dağılımı.....                                              | 64 |
| Tablo 4-15: Hasta ve kontrollerde DBP genine ait 6 SNP'nin haplotip analizi.....                                      | 67 |
| Tablo 4-16: Hasta ve kontrollerde DBP genine ait 4 SNP'nin haplotip analizi.....                                      | 68 |
| Tablo 4-17: DBP geninin 6 SNP'sine ait haplotipler ile ApoE allellerinin hasta ve kontrollerde karşılaştırılması..... | 69 |
| Tablo 4-18: DBP geninin 4 SNP'sine ait haplotipler ile ApoE allellerinin hasta ve kontrollerde karşılaştırılması..... | 69 |

## ŞEKİLLER LİSTESİ

|                                                                                                                                                                       |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Şekil 2-1: AH'da Beynin belirli bölgelerinde görülen değişiklikler.....                                                                                               | 5  |
| Şekil 2-2: A $\beta$ peptidinin enzimler tarafından parçalanması.....                                                                                                 | 6  |
| Şekil 2-3: Amiloid kaskad hipotezi.....                                                                                                                               | 7  |
| Şekil 2-4: Alzheimer Hastalığı'nda A $\beta$ patolojisi.....                                                                                                          | 8  |
| Şekil 2-5: Tau geninin alternatif kırılmaları sonucu oluşan tau proteini.....                                                                                         | 11 |
| Şekil 2-6: Nöronlarda tau proteini birikimi ve nöron ölümü.....                                                                                                       | 12 |
| Şekil 2-7: Tau proteini patolojisi.....                                                                                                                               | 13 |
| Şekil 2-8: Vitamin D, vitamin D <sub>2</sub> (ergokalsiferol) veya vitamin D <sub>3</sub> (kolekalsiferol) şeklinde bulunur.....                                      | 18 |
| Şekil 2-9: Vitamin D metabolizması.....                                                                                                                               | 19 |
| Şekil 2-10: Vitamin D'nin sinir sistemindeki metabolizması.....                                                                                                       | 21 |
| Şekil 2-11: DBP, insan 4'üncü kromozomu üzerindeki yeri ve ALB, AFM, AFP genlerine yakınlığı.....                                                                     | 23 |
| Şekil 2-12: İnsan DBP amino asit dizisi (GC2 izoformu).....                                                                                                           | 24 |
| Şekil 2-13: Hepatosit nuklear faktör 1 (HNF-1) aracılığıyla vitamin D bağlayan protein geninin düzenlenmesi.....                                                      | 25 |
| Şekil 2-14: Reseptör aracılı endositoz ve megalin tarafından böbrek proksimal tubullerinde 25(OH)D'nin aktivasyonu.....                                               | 26 |
| Şekil 2-15: DBP'nin vitamin D'ye bağlanarak onun dokulara iletilmesi ve hücre içine taşınarak vitamin D ile düzenlenen gen anlatımını gerçekleştirmesindeki rolü..... | 28 |
| Şekil 3-1: DBP geninin rs17467825 bölgesine ait genotipler sırasıyla AA, AG, GG görülmektedir.....                                                                    | 34 |
| Şekil 3-2: DBP geninin rs2282679 bölgesine ait genotipler sırasıyla CC, , CA, AA görülmektedir.....                                                                   | 35 |

|                                                                                                                                   |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Şekil 3-3: DBP geninin rs3755967 bölgesine ait genotipler sırasıyla GG, GA, AA görülmektedir.....                                 | 36 |
| Şekil 3-4: DBP geninin rs2298850 bölgesine ait genotipler sırasıyla CC, CG, GG görülmektedir.....                                 | 37 |
| Şekil 3-5: DBP geninin rs7041 bölgesine ait genotipler sırasıyla GG, GT, TT görülmektedir.....                                    | 38 |
| Şekil 3-6: DBP geninin rs1155563 bölgesine ait genotipler sırasıyla TT, TC, CC görülmektedir.....                                 | 39 |
| Şekil 3-7: ApoE genine ait $\epsilon 2/\epsilon 2$ genotipi belirlenmesinde kullanılan erime noktalarını gösteren grafik.....     | 41 |
| Şekil 3-8: ApoE genine ait $\epsilon 2/\epsilon 3$ genotipi belirlenmesinde kullanılan erime noktalarını gösteren grafik.....     | 42 |
| Şekil 3-9: ApoE genine ait $\epsilon 2/\epsilon 4$ genotipi belirlenmesinde kullanılan erime noktalarını gösteren grafik.....     | 43 |
| Şekil 3-10: ApoE genine ait $\epsilon 3/\epsilon 3$ genotipi belirlenmesinde kullanılan erime noktalarını gösteren grafik.....    | 44 |
| Şekil 3-11: ApoE genine ait $\epsilon 3/\epsilon 4$ genotipi belirlenmesinde kullanılan erime noktalarını gösteren grafik.....    | 45 |
| Şekil 3-12: ApoE genine ait $\epsilon 4/\epsilon 4$ genotipinin belirlenmesinde kullanılan erime noktalarını gösteren grafik..... | 46 |
| Şekil 4-1: Hasta ve kontrol gruplarında DBP geninin rs17467825 bölgesi genotip dağılımı.....                                      | 52 |
| Şekil 4-2: Hasta ve kontrol gruplarında DBP geninin rs17467825 bölgesi A ve G allelleri dağılımı.....                             | 53 |
| Şekil 4-3: Hasta ve kontrol gruplarında DBP geninin rs2282679 bölgesi genotip dağılımı.....                                       | 55 |
| Şekil 4-4: Hasta ve kontrol gruplarında DBP geninin rs2282679 bölgesi C ve A allelleri dağılımı.....                              | 55 |

|                                                                                                                             |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Şekil 4-5: Hasta ve kontrol gruplarında DBP geninin rs3755967 bölgesi genotip dağılımı.....                                 | 57 |
| Şekil 4-6: Hasta ve kontrol gruplarında DBP geninin rs3755967 bölgesi G ve A allelleri dağılımı.....                        | 57 |
| Şekil 4-7: Hasta ve kontrol gruplarında DBP geninin rs2298850 bölgesi genotip dağılımı.....                                 | 59 |
| Şekil 4-8: Hasta ve kontrol gruplarında DBP geninin rs2298850 bölgesi C ve G allelleri dağılımı.....                        | 59 |
| Şekil 4-9: Hasta ve kontrol gruplarında DBP geninin rs7041 bölgesi genotip dağılımı.....                                    | 61 |
| Şekil 4-10: Hasta ve kontrol gruplarında DBP geninin rs7041 bölgesi G ve T allelleri dağılımı.....                          | 61 |
| Şekil 4-11: Hasta ve kontrol gruplarında DBP geninin rs1155563 bölgesi genotip dağılımı.....                                | 63 |
| Şekil 4-12: Hasta ve kontrol gruplarında DBP geninin rs1155563 bölgesi T ve C allelleri dağılımı.....                       | 63 |
| Şekil 4-13: Hasta ve kontrol gruplarında ApoE genotip dağılımı.....                                                         | 65 |
| Şekil 4-14: Hasta ve kontrol gruplarında ApoE geninin $\epsilon 2$ , $\epsilon 3$ , $\epsilon 4$ allellerinin dağılımı..... | 65 |
| Şekil 4-15: DBP geninde incelenen 6 SNP için İkili Bağlantı Eşitsizliği Analizi Sonuçları.....                              | 66 |
| Şekil 4-16: DBP geninde incelenen 4 SNP için İkili Bağlantı Eşitsizliği Analizi Sonuçları.....                              | 67 |

**SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ**

|                                      |                                                              |
|--------------------------------------|--------------------------------------------------------------|
| 25-OH <sub>2</sub>                   | 25-hidroksilaz                                               |
| 25-(OH)D <sub>3</sub>                | 25-hidroksivitamin D <sub>3</sub>                            |
| 1,25(OH) <sub>2</sub> D <sub>3</sub> | 1,25-dihidroksivitamin D <sub>3</sub>                        |
| AFM                                  | Afamin                                                       |
| ALB                                  | Albumin                                                      |
| AFP                                  | Alfa-fetoprotein                                             |
| AH                                   | Alzheimer Hastalığı                                          |
| A $\beta$                            | Amiloid $\beta$                                              |
| APP                                  | Amiloid Öncül Proteini                                       |
| BOS                                  | Beyin-Omurilik Sıvısı                                        |
| EBAH                                 | Erken-Başlangıçlı Alzheimer Hastalığı                        |
| EHF                                  | Eşleşmiş Helikal Filamentler                                 |
| GBAH                                 | Geç-Başlangıçlı Alzheimer Hastalığı                          |
| GTP                                  | Guanozintrifosfat                                            |
| HWE                                  | Hardy – Weinberg Eşitliği                                    |
| HNF1                                 | Hepatosit nuklear faktör 1                                   |
| MAF                                  | Makrofaj Aktive Edici Faktör                                 |
| MARRS                                | Membran-İlişkili Hızlı Yanıt Steroid Hormon Bağlayan Protein |
| NFY                                  | Nörofibril Yumakları                                         |
| PS-1                                 | Presenilin-1                                                 |
| PS-2                                 | Presenilin-2                                                 |
| NGF                                  | Sinir Büyüme Faktörünün                                      |
| SNP                                  | Tek Nükleotid Polimorfizmi                                   |
| iNOS                                 | Uyarılabilir nitrik oksit sentaz                             |
| DBP                                  | Vitamin D Bağlayan Proteine                                  |
| VDR                                  | Vitamin D Reseptör                                           |

## ÖZET

Araz, Ö.S. (2013). Alzheimer Hastalarında Vitamin D Eksikliği ile İlişkili Olan Polimorfizmlerin Araştırılması. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Biyoloji ABD. Yüksek Lisans Tezi. İstanbul.

Alzheimer hastalığı (AH) ilerleyici nörodejeneratif bir hastalıktır. Yapılan çalışmalarda Vitamin D'nin sinir sistemi üzerinde koruyucu etkilerinin bulunduğu bildirilmiştir. Vitamin D'nin nöroprotektif etkisini, nöron kalsiyum dengesinin düzenlenmesi ve nörotrofinlerin üretimi aracılığıyla gerçekleştirdiği gösterilmiştir. Biz de bu çalışmada Vitamin D eksikliği ile ilgili olduğu bildirilen DBP geninin rs17467825, rs2282679, rs3755967, rs2298850, rs7041, rs1155563 bölgelerindeki polimorfizmler ile Alzheimer hastalığı arasında ilişki bulunup bulunmadığını araştırmayı amaçladık. Ayrıca söz konusu DBP polimorfizmleri ile ApoE allelerini birlikte değerlendirdik. Çalışmada 61 Alzheimer hastası, 60 sağlıklı bireyden elde edilen DNA örnekleri Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu yöntemi ile incelendi. Ayrıca hastaların ve kontrol örneklerinin haplotip analizi yapıldı. DBP genindeki 6 farklı tek nükleotid polimorfizmi ile AH arasında bir ilişki saptanamadı. DBP genine ait 6 SNP'nin haplotip analizi sonucunda ise "ACGCGT" haplotipi kontrol gruplarında hastalara göre daha fazla ve istatistiksel olarak yakın anlamlı bulundu. rs7041 ve rs1155563 bölgelerinin analizden çıkarılması sonucu hasta ve kontrol grupları karşılaştırıldığında, "ACGC" haplotipinin kontrol gruplarında anlamlı derecede yüksek olduğu saptandı. ApoE geni allel dağılımına bakıldığında  $\epsilon 2$  alleli kontrol bireylerinde hastalara göre anlamlı düzeyde yüksek bulundu. DBP genine ait haplotipler ve ApoE geni allelerinin birlikte analizi sonucunda,  $\epsilon 3$  alleli taşıyan ve aynı zamanda "ACGCGT" haplotipini taşıyan kontrol örnekleri hastalara göre istatistiksel olarak yakın anlamlı düzeyde daha fazla olarak bulundu. rs7041 ve rs1155563 bölgeleri analizden çıkarılarak 4 bölge ve ApoE geni allel sıklıkları analiz edildiğinde,  $\epsilon 3$  alleli ile "ACGC" haplotipini birlikte taşıyan kontrol gruplarının hastalara göre anlamlı derecede yüksek olduğu saptandı. Çalışmamız, DBP geninin bazı haplotiplerinin ve bu haplotiplerle ApoE  $\epsilon 3$  allelinin birlikte kalıtılmasının Alzheimer Hastalığı'na karşı koruyucu olabileceğini göstermiştir.

Anahtar Kelimeler: Alzheimer Hastalığı, Vitamin D, Vitamin D Eksikliği, Vitamin D Bağlayan Protein, Polimorfizm

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 11685

## ABSTRACT

Araz, Ö.S. (2013). Investigation of Polymorphisms Associated with Vitamin D Deficiency in Alzheimer's Disease Patients. İstanbul University, Institute of Health Science, Department of Medical Biology. MSc Thesis. İstanbul.

Alzheimer's disease (AD) is a progressive neurodegenerative disease. Recent studies have reported that vitamin D has protective effects on the nervous system. Neuroprotective effects of vitamin D in AD was suggested to be via maintenance of calcium homeostasis and the regulation of neurotrophic factor synthesis. The aim of this study is to investigate whether there is an association between rs17467825, rs2282679, rs3755967, rs2298850, rs7041, rs1155563 polymorphisms of DBP gene that was suggested to be associated with vitamin D deficiency and Alzheimer's Disease. DNA samples which has been obtained from 61 AD patients and 60 healthy individuals has been investigated by Real Time PCR method and also the patients haplotypes has been analyzed. A relationship between polymorphisms belong to 6 regions in DBP gene and AD has not been determined. Haplotype analysis of 6 SNPs in DBP gene showed higher frequency of "ACGCGT" haplotype in controls and state it as statistically nearly significant. In haplotype analysis, "ACGC" haplotype has been found significantly increased in control groups compared to patient groups, in result of removing rs7041 and rs1155563 regions from analysis. Allelic distribution of the ApoE gene indicated that the frequency of  $\epsilon$ 2 allele was significantly higher in healthy individuals. The individuals who have both  $\epsilon$ 3 allele and "ACGCGT" haplotype together were higher in control group when compared with AD patients and the result was statistically nearly significant in the analysis of ApoE gene allelic distribution with DBP haplotypes. Control groups that carry  $\epsilon$ 3 allele and "ACGC" haplotype together has been found significantly increased compared to patients when 4 regions and ApoE's haplotype frequencies analyzed after rs7042 and rs1155563 regions removed from analysis. Our study has indicated that some haplotypes of DBP gene and inheritance of these haplotypes and ApoE  $\epsilon$ 3 allele together might be protective against AD.

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

The present work was supported by the Research Fund of İstanbul University. Project No. 11685

## 1. GİRİŞ VE AMAÇ

Alzheimer hastalığı (AH) demansın en sık görülen tipidir ve ilerleyici nörodejeneratif bir hastalıktır [1]. Ön beyin bazalinde ve hipokampusta görülen nöron dejenerasyonunun yanı sıra sinaps kaybı ve nöron iletişim bozuklukları da hastalığın patogenezine katılır. AH iki farklı protein birikimi ile birlikte görülür: Nöritik (senil) plaklar ve nörofibril yumakları [2]. Nöritik plaklar daha çok serebral korteks ile meningial ve serebral kan damarlarının duvarlarında görülen ekstraselüler yapılardır. Bu plaklar yoğun bir amiloid materyal içerirler [3-5]. Ana bileşeni Tau proteini olan nörofibril yumakları ise hücre içerisinde bulunurlar. Ancak hücre içi birikimlerde bulunan Tau, mikrotubule bağlı bulunandan farklı olarak hiperfosforile şekildedir [4]. Alzheimer hastalığı tedavisindeki önemli hedefler nöron hasarlarını azaltmak, nöronların onarımı veya rejenerasyonunu sağlamaktır [2].

Vitamin D, insanlarda besinlerle alınma ve deride endojen üretimi olmak üzere iki kaynaktan sağlanır. Deride epidermis hücrelerinin plazma membranlarındaki çift tabakalı lipid molekülleri arasında çok miktarda 7-dehidrokolesterol molekülü bulunur [6]. Bu moleküller güneş ışığındaki morötesi ışınlar ile D<sub>3</sub> öncüllerine dönüşür. Bitkisel kaynaklarda vitamin D, öncül molekül şeklinde (ergosterol) bulunur ve vücutta vitamin D<sub>2</sub>'ye dönüştürülür. Vitamin D<sub>3</sub> ile aynı fonksiyona sahip olan besin kaynaklı vitamin D bağırsaklarda emildikten sonra lenf damarları ile karaciğere aktarılırken, deride üretilen vitamin D albumin benzeri bir plazma taşıyıcı proteini olan Vitamin D Bağlayan Protein (DBP) ile taşınır [7, 8].

Yapılan çoklu epidemiyolojik çalışmalarla serum vitamin D seviyeleriyle kognitif performans arasında olası bağlantı gösterilmiştir. Bununla birlikte vitamin D yetersizliği ve AH riski arasındaki ilişkinin biyolojik temeli halen bilinmemektedir [9].

Vitamin D'nin beyin gelişiminin önemli bir düzenleyicisi olduğu düşünülmektedir [10]. Son zamanlarda yapılan çalışmalarda Vitamin D (1,25 (OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>)'nin sinir sistemi üzerinde koruyucu etkilerinin bulunduğu bildirilmiştir. Özellikle sinir büyüme faktörü (NGF) sentezinin Vitamin D ile düzenlendiği, diğer bazı nörotrofinlerin sentezinin düzenlenmesinde de rol oynadığı gösterilmiştir [11]. Vitamin D'nin nöroprotektif etkisini, nöron kalsiyum dengesinin düzenlenmesi ve nörotrofinlerin üretimi aracılığıyla gerçekleştirdiği AH benzeri in vitro modellerde gösterilmiştir [2].

Yaşlı sıçanlarda 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> tedavisi hipokampus atrofisini azaltmakta ve nöron

yoğunluğunu korumaktadır [12]. İnsanlarda yapılan çalışmalarda ise; Alzheimer hastalarında kontrollere kıyasla hipokampusun özgün bölgelerinde (CA1 ve CA2 piramit hücrelerinde) Vitamin D Reseptör (VDR) mRNA'sında azalma olduğu tesbit edilmiştir [13]. Ayrıca VDR geni ApaI polimorfizminin AH riskini 2.3 kat arttırdığı anabilim dalımızda yapılan çalışmalar sonucu bulunmuştur [2]. Alzheimer hastalarının ve demans görülen hastaların 25(OH)D<sub>3</sub> serum konsantrasyonunun normal bireylere göre daha düşük olduğu gösterilmiştir [14-16].

Vitamin D'nin fiziksel fonksiyonlar üzerindeki faydalı etkileri yaşlılarda belirlenmiştir. Bunun yanı sıra, nöronlar üzerindeki faydalı etkileri giderek açıklığa kavuşmaktadır. Vitamin D eksikliği, vasküler demans ve Alzheimer hastalığı gibi nörodejeneratif hastalıklar için risk faktörlerinden biri olabilir ve bu hastalıkların patolojik sürecinde etkili bir rol oynayabilir [17].

Anabilim Dalımızda yapılan bir çalışmada primer kortikal nöronlara amiloid beta (A $\beta$ ) uygulamasının VDR mRNA seviyesini düşürdüğü, VDR proteinini ise ortadan kaldırdığı gösterilmiştir [18]. Vitamin D Bağlayan Protein (DBP), gerek beslenme yolu ile alınan gerekse UV etkisi ile deride sentezlenen Vitamin D'nin plazmada taşınım ilgili hücrelere ulaştırılmasından sorumlu globüler bir proteindir [19]. İnsan serumunda bulunan DBP, yaklaşık 58 kDa ağırlığında bir glikoproteindir. DBP, 16 amino asitlik sinyal peptid dizisi kesildikten sonra, albumin (ALB) ve alfa-fetoprotein (AFP) ile belirgin bir dizi homolojisi gösteren 458 aminoasitlik bir protein olarak salgılanır [20].

Vitamin D'nin dolaşımdaki formu 25(OH)D<sub>3</sub>, DBP tarafından böbreklere taşınır. Böbrekte, düşük yoğunluklu lipoprotein reseptör alt ailesinden olan megalin, 25(OH)D<sub>3</sub>'ün hücre içine alınmasında önemli bir rol oynar [21]. Çok fonksiyonlu bir çöpçü reseptörü olan megalin, böbreğin proksimal tubul epitelinin fırçamsı kenarlı yüzünde bulunur. Vitamin D Bağlayan Protein ve ona bağlı 25(OH)D glomerülden süzülerek böbrek tubul epitel hücresi tarafından endositozla alınır. Bu alınmada bazen megalin de görev yapar. DBP-Vitamin D kompleksi lizozomal kompartmanda parçalanarak vitamin D ve taşıyıcı proteini olan DBP sitozole salınır. Sonrasında, 25(OH)D direk olarak hücre dışına salınır veya mitokondriye bağlı olarak bulunan 1alfa-hidroksilaz aracılığıyla 1,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>'ye dönüştürülür. İnterstitiel sıvıya salgılanmasıyla birlikte Vitamin D sterollerini serbest halde bulunan DBP'ye bağlanır ve hedef dokulara iletilir. Bu model her ne kadar böbrek için araştırılmış olsa da, Kan-Beyin bariyerinde bulunan endotel hücrelerinin de megalin ekspres etmeleri Vitamin

D'nin ve DBP'nin beyne ulaşmak için benzer bir yol izlediğini düşündürmektedir [22].

Son zamanlarda Vitamin D eksikliğini etkileyen genetik faktörleri belirlemek üzere yapılan genom çapında bir ilişki taramasında 3 ayrı gene ait 18 adet polimorfizm ile Vitamin D'nin plazma yoğunluğu arasında anlamlı bir ilişki olduğu saptanmıştır. Bunlardan biri de kromozom 4p12'deki GC (Vitamin D Bağlayan Protein - DBP) genidir [23].

Biz de bu çalışmada Vitamin D eksikliği ile ilişkili olduğu bildirilen DBP (Vitamin D Bağlayan Protein - GC) geninin rs17467825, rs2282679, rs3755967, rs2298850, rs7041, rs1155563 bölgelerindeki polimorfizmler, Apolipoprotein E (ApoE) geni ve Alzheimer hastalığı arasında ilişki bulunup bulunmadığını araştırarak Anabilim Dalı'mızda daha önce yapılmış olan genetik ve hücre kültürü çalışmaları ile ortaya konulan Vitamin D ve AH arasındaki ilişkinin aydınlatılmasına katkıda bulunmayı amaçlamaktayız. Bu amaçla, 61 Alzheimer hastası, 60 sağlıklı bireyden elde edilen DNA örnekleri Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu yöntemi ile incelenecektir.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Alzheimer Hastalığı:

Alzheimer Hastalığı (AH) ilk kez 1906 yılında Alman psikiyatrist ve nöropatolog Dr. Alois Alzheimer tarafından tanımlanmış olup demansın en sık görülen tipidir [24].

Alzheimer Hastalığı ilerleyici bellek kaybı ve diğer bilişsel işlevlerde bozukluk ile tanımlanır ve genellikle 65 yaş üstü bireyleri etkiler. Ancak, hastaların yaklaşık %5'i daha genç yaşta (~40-50 yaş) söz konusu hastalık fenotipi gösterir ve çoğu ailesel olan bu vakalar erken başlangıçlı olarak sınıflandırılır [24]. AH ilerleyici ve geri dönüşü olmayan nörodejeneratif bir hastalıktır. Sinir hücreleri içinde ve dışında biriken fibrilsis proteinler ve bu proteinlerin oluşturduğu plaklar nedeniyle hücreler ya tamamen yok olur veya büyük oranda fonksiyon kaybına uğrarlar. Risk faktörleri arasında, artan yaş, aile hikayesi, kafa travmaları, önceden geçirilmiş depresyonlar ön plana çıkmaktadır [5].

Hastalık başlangıç yaşına göre 2 alt tipe ayrılır: Erken-Başlangıçlı Alzheimer Hastalığı (EBAH) ve Geç-Başlangıçlı Alzheimer Hastalığı (GBAH). Erken başlangıçlı Alzheimer Hastalığı bütün hastaların yaklaşık %1-6'sını oluşturur ve başlangıç yaşı kabaca 30 ile 60-65 yaş arasında değişmektedir. Ancak, geç-başlangıçlı Alzheimer hastalığının en sık görülen şeklidir ve başlangıç yaşı 65 yaşından sonradır [25].

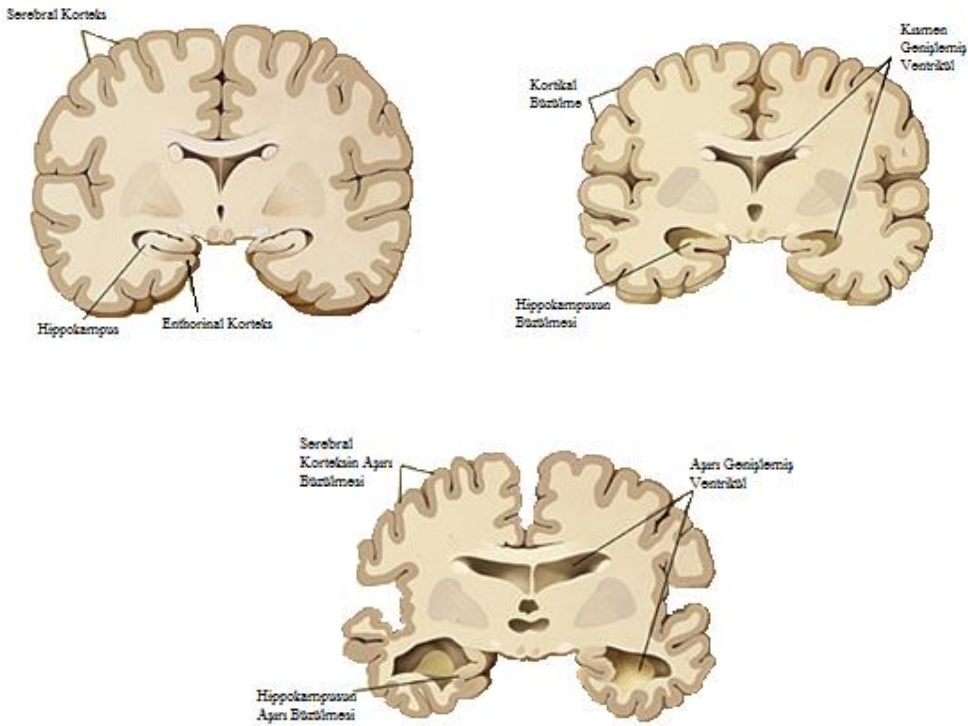
AH genetik açıdan kompleks bir nörolojik hastalık olarak nitelenir. Mendel tipi geçiş açısından da heterojenite gösteren, poligenik/multiallelik bir hastalıktır; birden fazla kromozomdaki gen lokuslarının çok sayıda farklı mutasyonları aynı hastalığa yol açar [26].

AH ile ilgili modern çalışmalar, 1960-1970'lerde hastalık ile ilgili serebral kortikal lezyonların yapısının ve nörotransmitterlerdeki eksikliklerin anlaşılması ve AH'nın daha detaylı tanımlanmasından sonra başlamıştır. 1980-1990'lardaki moleküler biyoloji ve genetik çalışmalar ise, AH'daki moleküler değişikliklere yeni bir bakış açısı sağlamıştır. Bu gelişmeler, hastalığın patogeneziye yönelik mekanizmaların anlaşılması için basamak oluşturmuştur [27].

Alzheimer Hastalığı'nın nöropatolojik belirteçleri, senil plaklar ve nörofibril yumaklarıdır ve bunlar Alzheimer Hastalığı'nın patolojik tanısı için bir kriter olarak kullanılırlar. Senil plaklar beyin korteksinde hücre dışı amiloid birikimleri, nörofibril

yumakları ise tau proteininin hücre içi birikimleri şeklinde görülür. Anormal tau birikimleri, amiloid plaklar tarafından daha da hızlandırılır [28]. Tüm patolojik değişiklikler genelde hipokampus, entorhinal korteks, asosiyasyon korteksi ve ön beyin bazalinde görülür [5].

Anatomik olarak, beyin temporal lobu, parietal lobu, frontal korteks ile singulate gyrus bölgelerinde atrofi ve serebral korteks ile belirli subkortikal bölgelerde nöron ve sinaps kaybı görülür (şekil 2-1) [29].



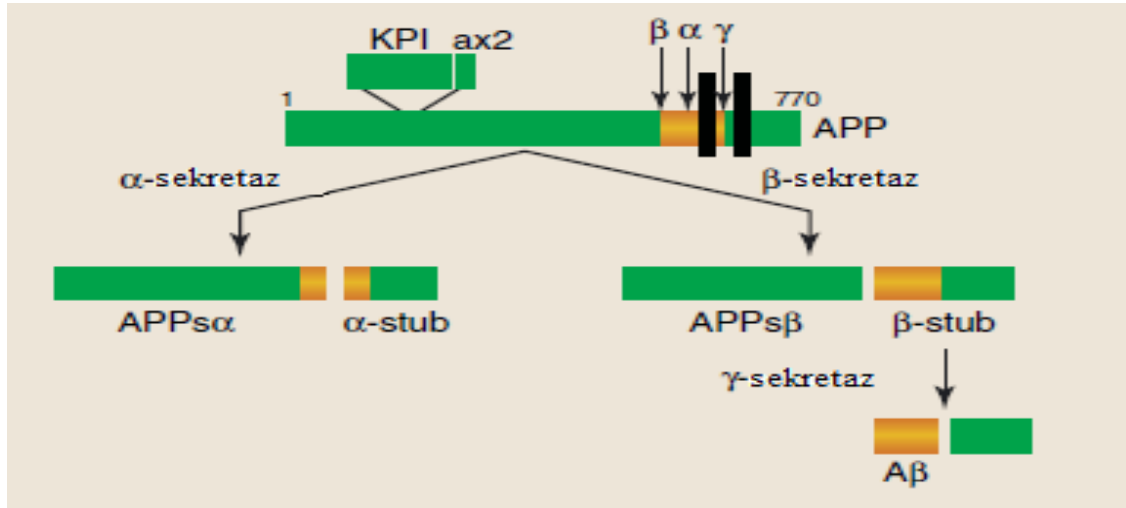
**Şekil 2-1: AH'da Beynin belirli bölgelerinde görülen değişiklikler.**

([http://www.bioedonline.org/hot-topics/alzheimers-disease.cfm#\\_edn3](http://www.bioedonline.org/hot-topics/alzheimers-disease.cfm#_edn3))

### 2.1.1. Alzheimer Hastalığı'nın Patolojik Bileşenleri

**2.1.1.1. Amiloid  $\beta$ :** Amiloid  $\beta$  ( $A\beta$ ) 40-42 aminoasitten oluşup, çok daha büyük bir transmembran proteini olan Amiloid Öncül Proteini'nin (APP)'in proteolitik kesilmesi sonucu meydana gelir [30].

$A\beta$  üzerindeki araştırmaların yoğunlaşması,  $A\beta$  üretiminin ayrıntılı bir şekilde anlaşılmasını sağlamıştır.  $A\beta$ , Amiloid Öncül Proteini (APP) olarak adlandırılan büyük bir transmembran proteininin  $\alpha$  sekretaz,  $\beta$  sekretaz ve  $\gamma$  sekretaz enzimleri tarafından ve iki ayrı şekilde kesilmesi ile gerçekleşir. Birinci yolakta,  $\alpha$ -sekretaz enzimi tarafından gerçekleştirilen kesim  $A\beta$  oluşumunu engeller ve çözünebilir  $sAPP\alpha$  üretilir. Bunun yanı sıra, daha az kullanılan ikinci yolakta APP'nin sırasıyla  $\beta$ - ve  $\gamma$ -sekretazlar tarafından kesimi gerçekleştirilir ve bu kesim sonucu  $A\beta$  peptidi oluşur. Bu peptid zaman içinde birikerek senil plakları oluşturur.  $A\beta$  nörotoksik etkiye sahiptir.  $A\beta$  peptidi neprilysin, insulin parçalayıcı enzim veya endotelin dönüştürücü enzim tarafından parçalanır (şekil 2-2) [31].

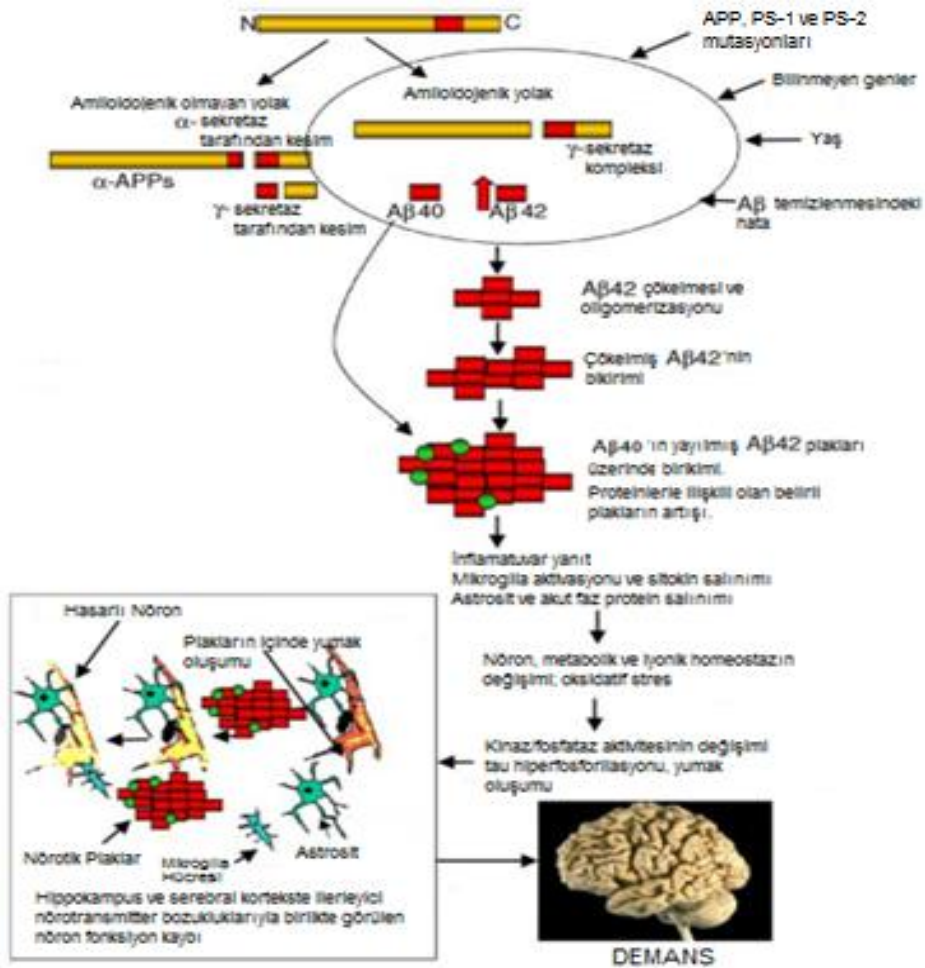


Şekil 2-2:  $A\beta$  peptidinin enzimler tarafından parçalanması [30]

Elde edilen bulgular,  $A\beta$ 'nin normal koşullarda sinaptik aktivitenin düzenlenmesinde ve nöron sağkalımında rol oynayabileceğini göstermektedir [31]. Bununla birlikte beyinde biriken  $A\beta$ 'nin mikroglia aktivasyonu ile inflamatuvar yanıtı neden olduğu gösterilmiştir [32].

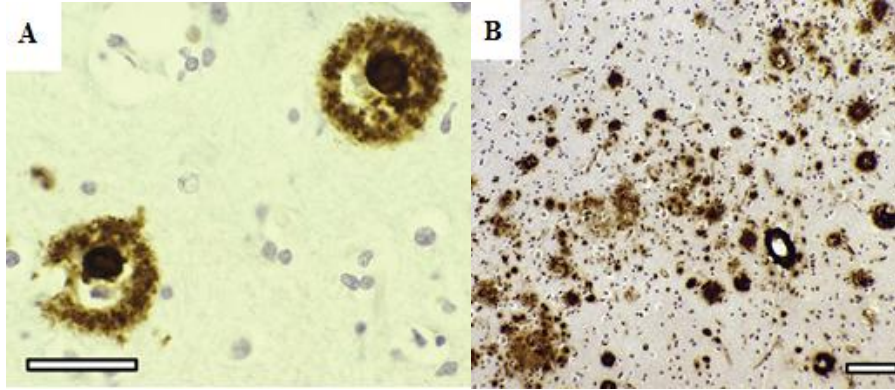
Yüksek miktardaki A $\beta$ 'nin nörotoksik özellikleri ön plana çıkmaktadır. A $\beta$ 'nin iki ana formu elektroforez ile ayrılabilir. Bunlar, küçük ve 40 aminoasitten oluşan A $\beta$  1-40; daha büyük ve 42 aminoasitten oluşan A $\beta$  1-42'dir. A $\beta$  1-40 normal hücrelerde açığa çıkan A $\beta$ 'nin yaklaşık %90'ını, 42 aminoasitlik A $\beta$  1-42 ise %10'u oluşturmaktadır, A $\beta$  1-40 hastalığın geç aşamalarında patolojik olarak ortaya çıkmaktadır. Ancak A $\beta$  1-42, A $\beta$  1-40'a oranla fibril oluşturmaya daha yatkındır [33].

Amiloid kaskad hipotezine göre, nöronların ölümü ve fonksiyon kaybına neden olan senil plaklardaki A $\beta$  kümelenmesi ve birikimi demansın başlıca sebebidir Şekil 2-3) [33].



Şekil 2-3: Amiloid kaskad hipotezi [33].

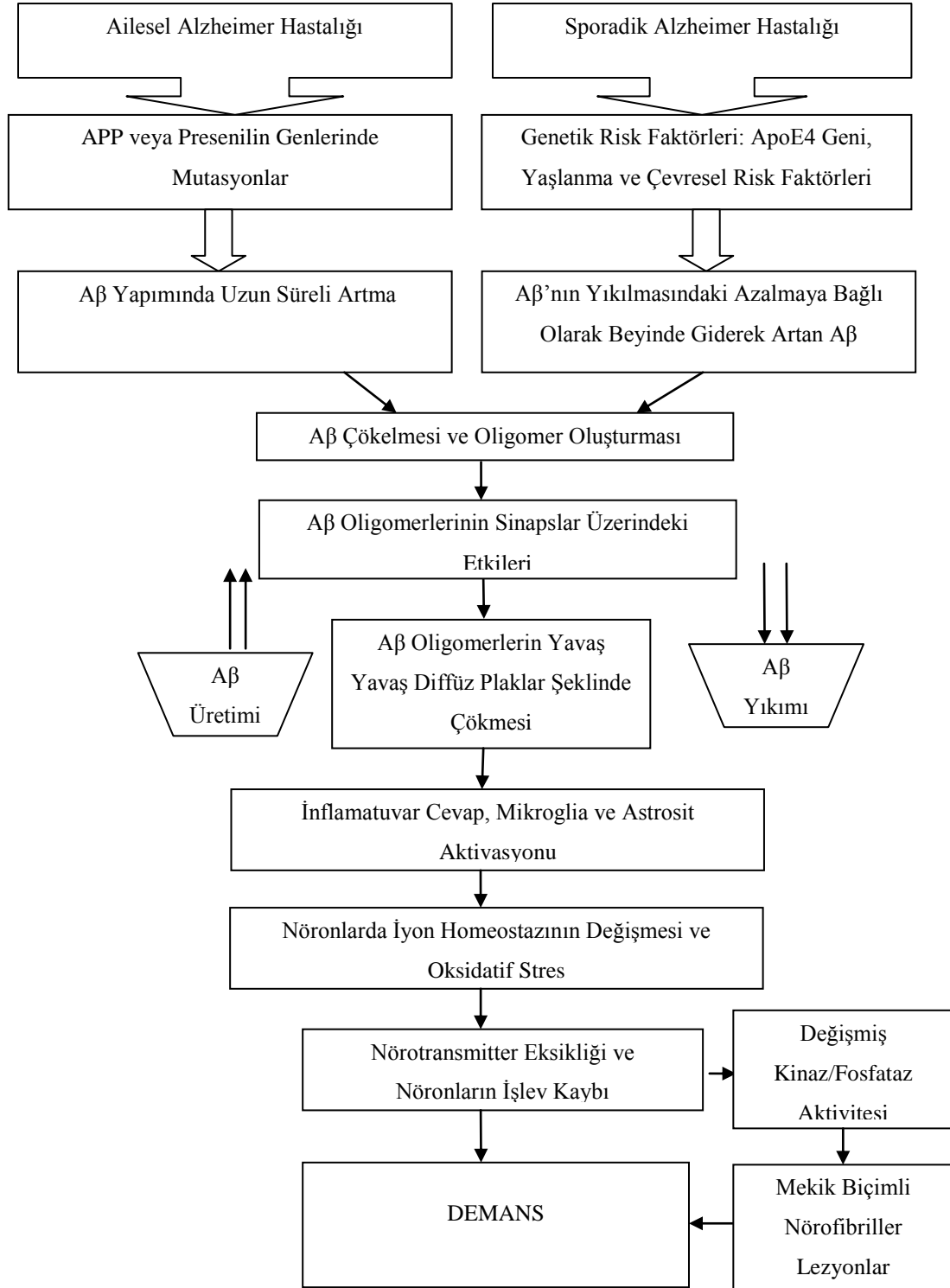
AH'nın tanımlanmasından yaklaşık 100 yıl sonra, Glenner ve Wong nöritik plaklardan zengin Alzheimer Hastası beyinlerinden Amiloid  $\beta$  peptidini izole etmiş [34] ve bundan birkaç yıl sonra Amiloid Öncül Proteini geni bulunmuştur (Şekil 2-4) (Tablo 2-1) [35-38].



**Şekil 2-4: Alzheimer Hastalığı'nda A $\beta$  patolojisi [39]**

A) Alzheimer Hastalığı'nda senil plaklar, B) Kortikal kan damarlarını çevreleyen amiloid anjiyopati görülmektedir

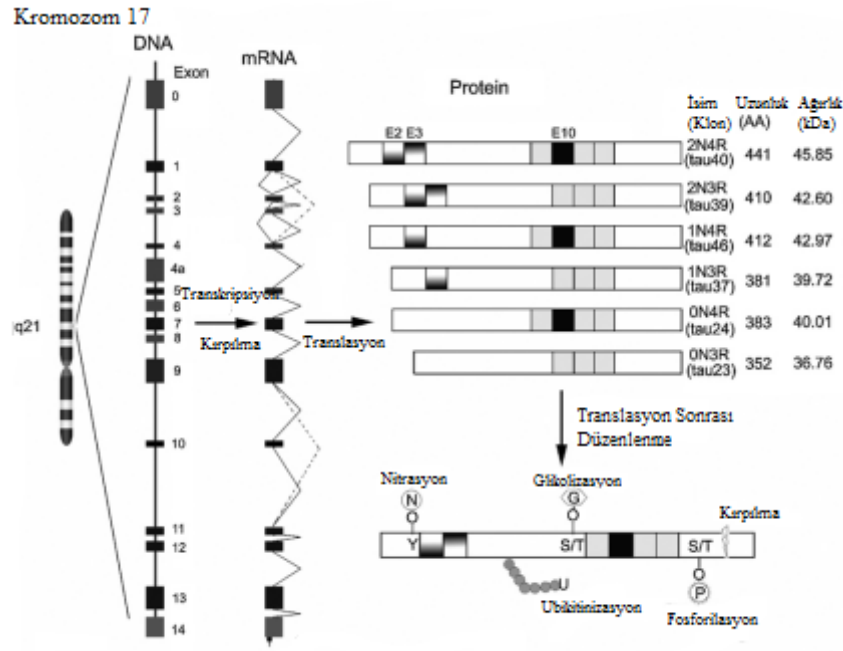
**Tablo 2-1: Alzheimer Hastalığı'nın amiloid  $\beta$  hipotezi [26].**



**2.1.1.2. Nörofibril Yumakları:** Nöronlarda sitoskeletin iki önemli bileşeni mikrotubuller ve nörofilamentlerdir. Alzheimer hastalarının beyinlerinde çok sayıda nöronun sitoskeleti değişikliğe uğrar ve morfolojik olarak normal nörofibrillere benzemeyen “eşleşmiş helikal filamentler” (EHF) olarak adlandırılan filament gruplarını oluşturur [40].

Sitoskelet proteinlerinin patolojik değişimleri sonucu oluşan nörofibril yumakları (NFY) Alzheimer hastalığının en belirgin beyin lezyonlarından biridir [5]. NFY, sonunda sitoskelet bütünlüğünü ve aksonal transportu bozarak hücre ölümüne neden olur. Hücre ölümüyle ortaya çıkan ekstraselüler NFY'lara “hayalet yumaklar” denir [26]. Normal yaşlılık sürecinde limbik (entorhinal ve hippocampal) NFY sayısı yaş arasında ilişki olduğu gösterilmiştir. AH'de de demansın ağırlığı ve süreciyle paralel biçimde NFY'nin sayısı artar ve önceden görülmeyen bölgelerde NFY görülür [26]. NFY, aşırı fosforillenmiş durumdaki tau proteinlerden oluşur. Tau, mikrotubullere bağlanan bir proteindir. Normal aksonlarda mikrotubullerin oluşması ve kararlılığında rol oynar [41, 42].

**2.1.1.2.1. Tau Proteinleri:** Tau proteinleri, en önemli mikrotubul-ilişkili protein olup insanda tau geni kromozom 17q21 bölgesinde yer alır. Mikrotubul-ilişkili tau proteininin önemli biyolojik işlevleri vardır. Bunlar mikrotubul bağlama, aksonal transport, nörit gelişimi ve mikrotubul kararlılığını sağlamaktır. Tau proteinleri mikrotubullerin kararlılığını farklı izoformları ve fosforilasyon yoluyla gerçekleştirir. Tau proteininin 6 izoformu tau geninin ekzon 2, 3 ve 10 bölgelerindeki alternatif kırılmalar sonucu oluşur ve sırasıyla 0, 1 veya 2 amino-terminal bölge ve 3 veya 4 mikrotubul-bağlayıcı bölge tekrarları içerirler (Şekil 2-5). İzoformlar, 352-441 amino asitten oluşup 37-46 kDa ağırlığındadır. Mikrotubul bağlanma bölgeleri proteinin karboksi ucunda bulunur ve pozitif yüklüdür. Pozitif yüklü olmaları, negatif yüklü mikrotubule bağlanmalarına olanak sağlar [30, 43, 44].



**Şekil 2-5: Tau geninin alternatif kırplmaları sonucu oluşan tau proteini [43]**

Tau'nun çeşitli yapısal ve fonksiyonel proteinlerle etkileşmesi, tau'nun sadece normal mikrotubul yapısında rol oynamayıp aynı zamanda nöronların sinyal iletiminde de rol oynadığını göstermektedir [43].

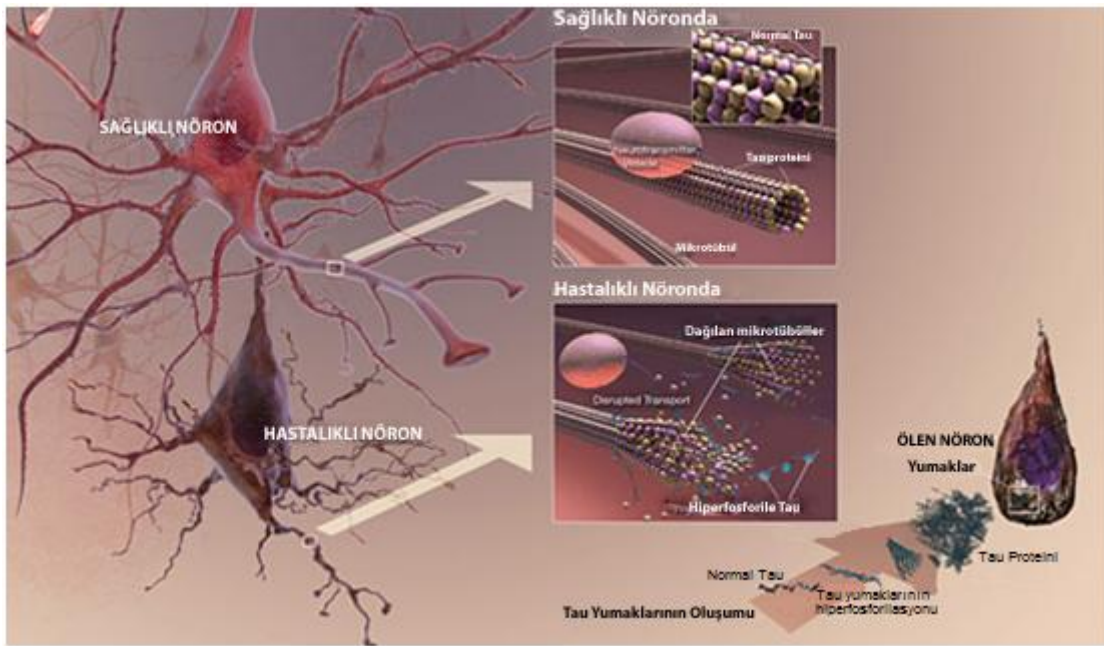
AH'larında normal kinaz-fosfataz etkinliğindeki dengenin bozulması sonucu tau hiperfosforile olur; bu dengesizliklerin A $\beta$  veya A $\beta$  ile ilişkili hücresel değişiklikler tarafından başlatıldığı düşünülmektedir [42].

Alzheimer Hastalarında kognitif gerileme ile tau-ilişkili nörofibril patolojisinin miktarı arasında ilişki vardır [43]. AH'larının beyinlerinde tau'nun anormal fosforilasyonu sonucu mikrotubul oluşumunu uyarıcı özelliği baskılanır. Tau'daki bu değişimin mikrotubul oluşumunun bozulmasına neden olduğu düşünülmektedir. Mikrotubul oluşumunu başlatacak olan guanozintrifosfatın (GTP) tubulin  $\beta$  alt birimine bağlanması tau tarafından uyarılır. AH'larının beyinde fonksiyonel tau'nun eksikliği GTP bağlanmasını azaltacağından, mikrotubul oluşumu da azalacaktır [40, 45].

Alzheimer Hastalarının beyinlerinde tau'nun anormal fosforilasyonu sonucu mikrotubul oluşumunun azalması, aksoplazmik akışın bozulmasına ve bazen nöron ölümüne yol açar. Aksoplazmik akıştaki bozukluk sonucu, akson boyunca taşınması

gereken hücresel elemanlar perikaryon ve sinir terminallerinde birikir (Tablo 2-2) [5, 40].

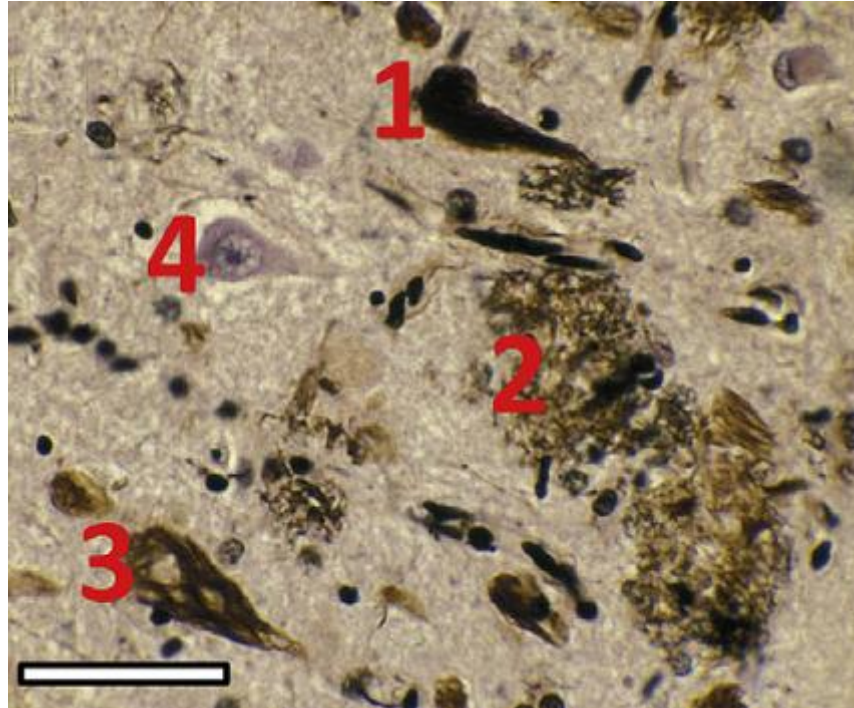
Bu birikimlerin miktarı hücrede söz konusu bileşenlerin sentezi, taşınması ve biriken maddelerin yıkılması arasındaki dengeye bağlıdır. Normalde hücre soması ile sinir terminalleri arasında taşınan elemanlar çok hızlı indirgenirler oysa hastalıktan etkilenmiş hücrelerde bir birikim söz konusu olur (Şekil 2-6) [5].



**Şekil 2-6: Nöronlarda tau proteini birikimi ve nöron ölümü**

([http://www.bioedonline.org/hot-topics/alzheimers-disease.cfm#\\_edn3](http://www.bioedonline.org/hot-topics/alzheimers-disease.cfm#_edn3))

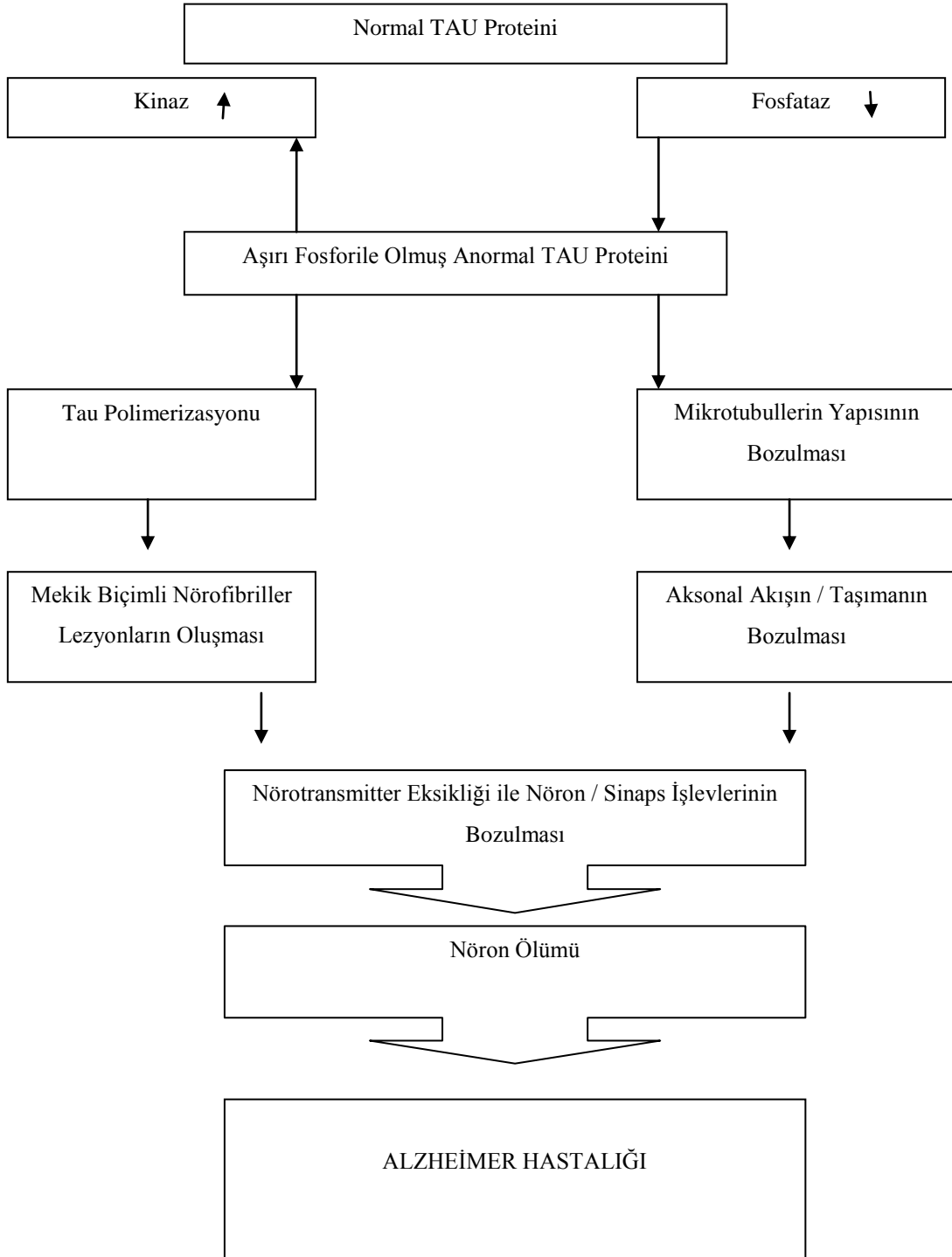
Tau patolojisi ilk olarak transentorhinal bölgede meydana gelir ve oradan hippokampus ve amygdalaya daha sonra da neokortikal bölgelere yayılır. A $\beta$  plakları ise ilk olarak neokortekste gözlenir. Her iki tip inklüzyon da (A $\beta$  plakları ve nörofibril yumakları) birbirinden bağımsız olarak oluşur. İlk oluşanlar Tau yumaklarıdır. Sonraki aşamalarda A $\beta$  plaklarının neokortekste birikmesinin daha çok miktarda nörofibril yumak oluşumuna öncülük ettiği bildirilmiştir [5]. 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 (Şekil 2-7)



**Şekil 2-7: Tau proteini patolojisi [39]**

(1) Piramidal nöronların içindeki nörofibril yumaklarında fibröz tau birikimleri, (2) Nöritik plaklar, 3) Nörofil; Nörofibril yumaklarının hücre dışı hayalet yumaklar haline gelmesi, (4) Etkilenmemiş nöron

**Tablo 2-2: Alzheimer Hastalığı'nda Tau Proteininin aşırı fosforilasyonu ve mekik biçimli nörofibriller lezyonların oluşması [26].**



### 2.1.2. Alzheimer Hastalığının Genetiği:

Hastalığın erken başlangıçlı ailesel tipi Amiloid Öncül Proteini (APP), Presenilin-1 (PS-1) ve Presenilin-2 (PS-2) genlerindeki yüksek etkili mutasyonlarla ilişkilidir. Genel olarak, Alzheimer hastalarının %90'ından fazlası sporadik olup başlangıcı 65 yaş ve üzerinde görülmektedir. Yapılan genetik çalışmalarla sadece Apolipoprotein E geninin sporadik geç-başlangıçlı Alzheimer Hastalığı için risk faktörü olduğu tespit edilmiştir (Tablo 2-3). Sporadik Alzheimer Hastalığı için hastalık riskinin %80'inden fazlasının genetik faktörlere bağlı olabileceği bildirilmiştir [25, 46].

**Tablo 2-3: Alzheimer Hastalığı ile ilişkili genler**

| Alzheimer Hastalığı ile İlişkili Genler |                       |                     |                   |
|-----------------------------------------|-----------------------|---------------------|-------------------|
| Genin Kısa Adı                          | Genin Adı             | Yerleştiği Kromozom | Kalıtım Şekli     |
| APP                                     | Amiloid Öncül Protein | 21q21               | Otozomal Dominant |
| PS-1                                    | Presenilin 1          | 14q2.2              | Otozomal Dominant |
| PS-2                                    | Presenilin 2          | 1q42.13             | Otozomal Dominant |
| ApoE                                    | Apolipoprotein E      | 19q13.32            | Sporadik          |

#### 2.1.2.1. Amiloid Öncül Protein (APP)

APP geni 21. kromozomda yer alır ve 18 ekson içerir [24]. APP geninde AH ile ilişkili 20 yanlış anlamlı mutasyon tespit edilmiştir. APP geninin duplikasyonu, beyinde nöronların dışında serebral kan damarlarında A $\beta$  birikimine neden olur [30, 47].

Bir membran proteini olan APP'nin olgunlaşması, APP'nin hücre yüzeyine taşınmasından önce Endoplazmik retikulum ve Golgi'de gerçekleşen O ve N-glikozilasyonu gibi çeşitli post-translasyonel modifikasyonları içerir [48]. APP lokusu karmaşıktır ve genetik çeşitlilik açısından incelenmesi gereken birçok düzenleyici bölgesi vardır. Promotor üzerinde de genetik çeşitliliği ortaya çıkarabilecek birçok düzenleyici element vardır [49].

APP genindeki ailesel AH ile bağlantılı mutasyonların belirlenmesi sadece AH etiyolojisinde APP işlenmesinin rolünü değil, ayrıca APP işlenmesinin kontrolünde rol oynayan moleküler yolların aydınlatılmasını da kapsamaktadır [48].

### 2.1.2.2. Presenilin-1 ve Presenilin-2

Presenilin-1 geni mutasyonlarının Ailesel Alzheimer Hastalığı ile ilişkisi 1995 yılında yapılan bir dizi çalışmayla tespit edilmiştir. Presenilinlerin  $\gamma$ -sekretaz aktivitesiyle bağlantılı olduğuna dair ilk kanıt PS-1 eksikliğinin A $\beta$  peptidlerinin üretiminde azalmayla sonuçlandığının anlaşılmasıdır. Daha sonra yapılan çalışmalarda PS-1'in iki transmembran bölgesindeki aspartat kalıntısının  $\gamma$ -sekretaz aktivitesi için kritik olduğu gösterilmiştir. Bu da PS-1'in yeni bir aspartil proteaz olduğunu veya  $\gamma$ -sekretazın katalitik bileşeni olduğunu ortaya çıkarmıştır [50].

Presenilin 1 14. kromozomda yer alır (14q24.2) ve 467 amino asitlik bir proteini kodlayan 12 eksondan oluşur. PS-1  $\gamma$ -sekretaz adı verilen enzim kompleksinin katalitik bölgesini oluşturan politopik bir membran proteinidir. PS-1'deki mutasyonlar erken başlangıçlı ailesel Alzheimer Hastalığı'nın en sık rastlanan nedenidir. PS-1 mutasyonları A $\beta$ 40 göre A $\beta$ 42'nin üretilme oranını arttırır, bu da  $\gamma$ -sekretaz aktivitesinin azalmasına yol açan fonksiyon değişikliğiyle sonuçlanır [25].

Presenilin 2 geni 1. kromozomda yer alır (1q42.13) ve 12 eksonu vardır ve 10 ekson, 448 amino asitlik bir peptidi kodlar. PS-1 gibi PS-2 de A $\beta$ 'nin kesilmesinden sorumlu olan  $\gamma$ -sekretaz olarak adlandırılan aspartil proteazın bir bileşenidir. PS-2 öncelikle beyindeki nöronlar olmak üzere bir dizi dokuda ifade edilir [25].

İnsan ve sıçan merkezi sinir sisteminde bulunan PS-1 ve PS-2 mRNA'ları üzerinde yapılan in situ hibridizasyon çalışmalarında iki genin de ağırlıklı olarak nöronal hücre popülasyonunda ifade edildiği gösterilmiştir [51].

### 2.1.2.3. Apolipoprotein-E (ApoE)

Geç başlangıçlı Alzheimer Hastalığı için tekrar tekrar araştırılan genetik risk faktörlerinden biri de kromozom 19q13.2'de yer alan ApoE genidir. ApoE bir lipid bağlayıcı protein olup insanlarda 3 farklı allel tarafından kodlanan 3 izoformu vardır. Bunlar ApoE  $\epsilon$ 2,  $\epsilon$ 3, ve  $\epsilon$ 4'tür. Bu 3 allel farklılığı 4. ekzonun 112 ve 158.

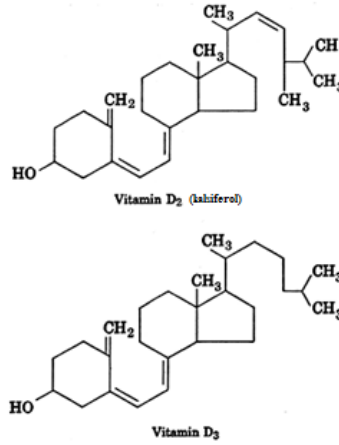
kodonlarındaki 2 adet tek-baz değişiminden ortaya çıkar. ApoE 112>C ve ApoE 158>T (rs7412)'nin sırasıyla T ve C alleleri Sistein (Cys) ve Arjinin (Arg) kodlar. ε2 112 ve 158 pozisyonlarının her ikisinde de T alleli, ε3 112 ve 158 pozisyonlarında sırasıyla T ve C alleli, ε4 112 ve 158 pozisyonlarının her ikisinde de C alleli bulundurur. ApoE ε4 allelinin sporadik, geç başlangıçlı AH için bir risk faktörü olduğu gösterilmiştir [52, 53].

ApoE- ε2 ve ApoE- ε3 kan-beyin bariyerini geçemez. Astroitler tarafından sentez edilir. ApoE- ε4 ise daha kolay geçer, ApoE, Alzheimer Hastaları'nın beyinde senil plaklarda, nörofibril yumaklarında ve Beyin-Omurilik Sıvısı'nda (BOS) bulunmuştur. ApoE- ε2 izoformu ApoE'nin mikrotubullere bağlı tau proteiniyle bağlantısını arttırır ve nörofibriler yumak yapan eşleşmiş filamentlerin yapımını engeller, dolayısıyla AH riskini azaltır. Erken ve geç başlangıçlı ailesel Alzheimer olgularında ApoE- ε2 allelinin görölme sıklığının kontrol bireylere kıyasla önemli oranda azaldığı gözlenmiştir [54].

İn vivo çalışmalarla ApoE ε4 allelinin beyinde amiloid birikimindeki artışla ilişkili olduğu gösterilmiş, nörodejenerasyonla ve kognitif bozukluk ile ilişkili olduğu ileri sürölmüştür [55].

## 2.2. Vitamin D

Vitamin D veya kalsiferol, dört halkalı kolesterol omurgası içeren lipid bileşikleri grubunu ifade eder. Vitamin D; vitamin D<sub>2</sub> (ergokalsiferol) veya vitamin D<sub>3</sub> (kolekalsiferol) şeklinde bulunur (Şekil 2-8) [56].

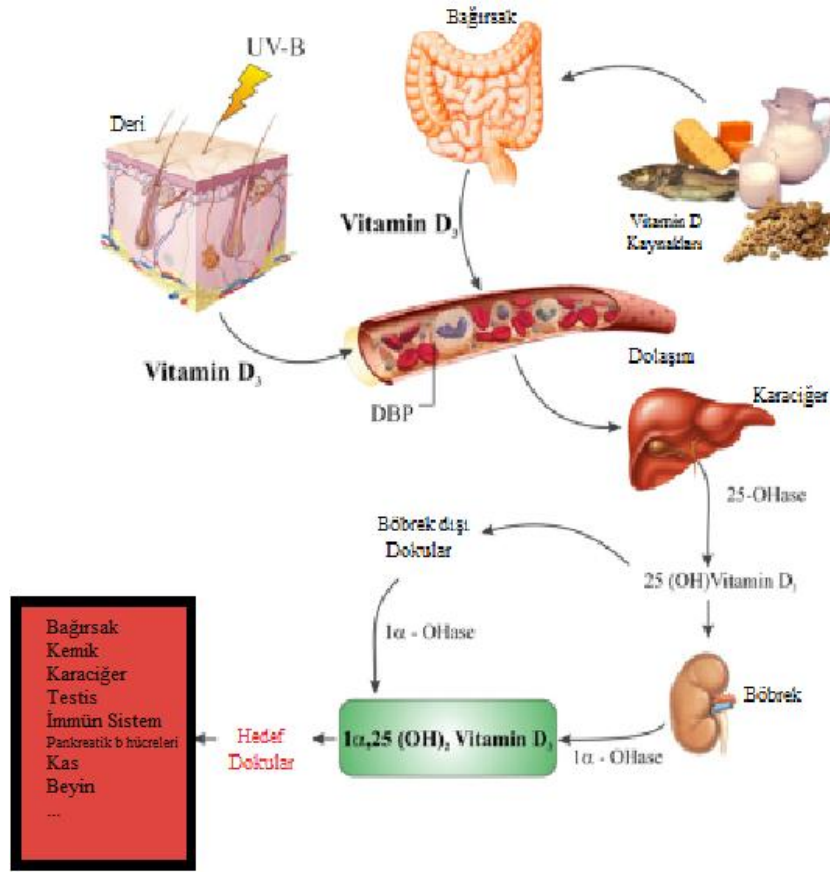


**Şekil 2-8: Vitamin D, vitamin D<sub>2</sub> (ergokalsiferol) veya vitamin D<sub>3</sub> (kolekalsiferol) şeklinde bulunur** (<http://www.cyberlipid.org/vitd/vitd0001.htm>).

Vitamin D<sub>3</sub> deride ultraviyole-B ışınları tarafından oluşturulur, epidermal keratinosit ve dermal fibroblastlarda 7-dehidrokolesterol pre-vitamin D'ye dönüştürülür. Bu vitamin D'nin kararsız formudur. Daha sonra enzimatik olmayan bir yolla vitamin D<sub>3</sub>'e izomerize olur. Vitamin D'nin bu formu hayvansal ürünlerde veya bazı tamamlayıcı vitamin D ürünlerinde bulunmaktadır. Bitkilerdeki ergosterol güneş ışığına maruz kaldığında ergokalsiferol veya vitamin D<sub>2</sub> oluşur. Vitamin D'nin bu şekli bitkisel kaynaklarda, balıkta, sütte ve en çok tamamlayıcı vitamin D takviyelerinde bulunur. Bazı tahıl ve ekmek ürünleri vitamin D bakımından güçlendirilmiştir [56].

Gerekli olan vitamin D'nin %10'undan azı doğal besin kaynaklarından sağlanmaktadır. Besinlerle alınan vitamin D yağda çözünür, ince bağırsakta emilir ve şilomikronlar içerisinde birikir. Vitamin D, şilomikronlar ve lipoproteinler ile ilişkili vitamin D bağlayan proteine (DBP) bağlanarak kan yoluyla hedef organlara taşınır. Daha sonra vitamin D 25-hidroksilaz (25-OHaz veya CYP27A1) enzimiyle 25-hidroksivitamin D (25-(OH)D<sub>3</sub>; kalsidiol)'e metabolize edilir. Öncül vitamin D formu dolaşım sisteminde kan plazmasında bulunur ve hormonal olarak aktif metaboliti olan 1,25-dihidroksivitamin D (1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>)'nin üretimi için substrat oluşturur. 25(OH)D<sub>3</sub>, plazmada taşıyıcı moleküllere (DBP) bağlanarak bir kompleks oluşturur, DBP, böbrek glomerüllerinde süzülür ve proksimal tubüllerde endositik reseptör megalin aracılığı ile geri alınır. 25-(OH)D<sub>3</sub> öncelikle böbrekte 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> (kalsitriol)'ye hidroksillenir ve en aktif formu oluşur. Vitamin D hormonunun aktif formu plazma zarında çok hızlı

değişimlere uğrayabilir, bu da  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  membran-ilişkili hızlı yanıt steroid hormon bağlayan protein (MARRS) tarafından sağlanır (Şekil 2-9) [56, 57].



**Şekil 2-9: Vitamin D metabolizması**

Vitamin D başlıca, kalsiyum ve fosfat metabolizmasında, kemik oluşumu ve devamlılığında görev almaktadır [58, 59]. Ayrıca enterositlerin farklılaşmasını sağlar ve bağırsaktan kalsiyum ve fosforun emilimini artırır. Bu kemik mineralizasyonuna yardımcı olur. Hipokalsemi veya hipofosfatemi koşullarında, vitamin D kemik yıkımını uyarır, böylece kalsiyum ve fosforun serum seviyeleri korunur. Vitamin D eksikliği veya direnci hipokalsemi ve hipofosfatemiye neden olur. Vitamin D iskelet dışında da önemli roller oynar. Vitamin D eksikliğinin multiple skleroz, tip 1 diyabet, romatoid artrit, inflamatuvar bağırsak hastalıkları, durum duyu bozuklukları ve kanser gibi bazı hastalıklarla ilişkili olabileceği düşünülmektedir. Gençlerde, vitamin D'nin düşük serum

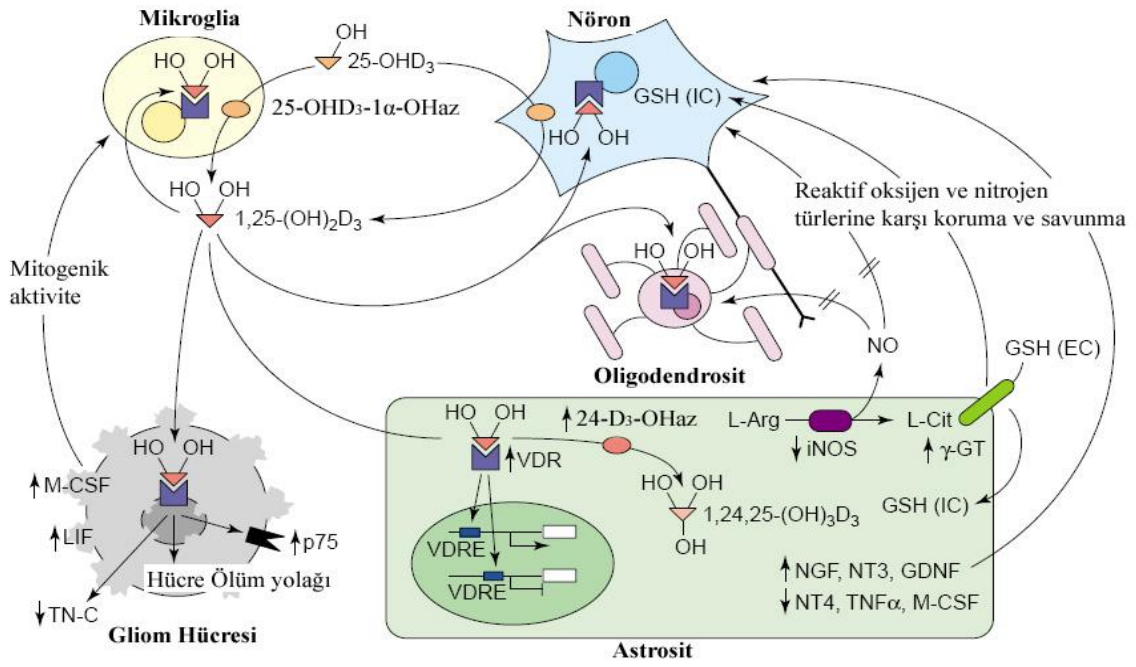
seviyeleri hipertansiyon, hiperglisemi, metabolik sendrom ve üst solunum yolu enfeksiyonu riskinin artmasıyla ilişkilidir [56].

Ayrıca glukoz homeostazında görev aldığı bilinmektedir. İnsanlarda ve hayvan modellerinde vitamin D eksikliğinin, yetersiz insülin salgılanmasına neden olduğu ve vitamin D takviyesi ile bu durumun normale döndüğü gösterilmiştir [58, 59].

Vitamin D'nin kas fonksiyonları üzerinde de etkileri görülmektedir. Vitamin D eksikliğinde, iskelet kası zayıflıkları ve atrofi oluşmaktadır. Her ne kadar bu etki düşük  $Ca^{+2}$  miktarının bir sonucu gibi gözükse de Vitamin D Reseptör (VDR) geni çıkarılmış farelerde normal olmayan kas gelişimi bu durumun vitamin D ile ilişkili olduğunu göstermektedir [60, 61].

### **2.2.1. Vitamin D ve Beyin**

Vitamin D'nin son yıllarda ortaya çıkan önemli bir fonksiyonu da sinir sistemindeki görevleridir (Şekil 2-10). Önceleri, beyindeki vitamin D kaynağının vitamin D'nin plazma konsantrasyonuna bağımlı olduğu kabul edilse de yapılan son çalışmalarla, vitamin D öncülünün biyoaktivasyonu için gerekli olan vitamin D<sub>3</sub>-hidroksilaz ve 25-hidroksivitamin D<sub>3</sub>-1- $\alpha$ -hidroksilaz enzimlerinin merkezi sinir sistemindeki varlığının gösterilmesiyle bu varsayımın geçerliliği sorgulanmaktadır [62, 63].



**Şekil 2-10: Vitamin D'nin sinir sistemindeki metabolizması [64].**

Vitamin D'nin sinir sistemi üzerinde koruyucu etkisi dikkat çekmektedir. Özellikle sinir büyüme faktörünün (NGF) sentezi Vitamin D ile düzenlenir [11, 65]. Bütün bunlarında yanında Vitamin D diğer bazı nörotrofinlerin sentezinin düzenlenmesinde de rol oynar [66]. Nörotrofin sentezinin Vitamin D tarafından artırılmasının nöroprotektif etkiyle bağlantılı olduğu çeşitli çalışmalarla ortaya konmuştur [67]. Vitamin D sinir sistemi üzerinde koruyucu etkisini 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 [65] [68].

Vitamin D'nin nöroprotektif etkisini gösterdiği bir diğer yol da, parvalbumin gibi kalsiyum bağlayan proteinlerin sentezini arttırmasıdır [69]. Vitamin D ayrıca uyarılabilir nitrik oksit sentezinin (iNOS) sentezini engeller. iNOS, yüksek seviyelerde ifade edildiğinde nöronlara ve oligodendrositlere hasar veren nitrik oksit üretilir. iNOS seviyesinin Alzheimer, Parkinson, Multiple Skleroz gibi nörodejeneratif hastalıklarda yükselmesi bu bağlamda dikkat çekicidir [70].

### 2.2.2. Vitamin D ve Alzheimer Hastalığı

Vitamin D, kan-beyin bariyerini aşan ve vitamin D reseptörlerine bağlanan nörosteroid bir hormondur. Hippokampus, hipotalamus, korteks ve subkorteks de dahil olmak üzere merkezi sinir sistemi nöronlarında ve glia hücrelerinde bulunur. 1,25-dihidroksivitamin D voltaja duyarlı kalsiyum kanallarının düzenlenmesi yoluyla intranöronal kalsiyum dengesini düzenler, böylece nekroz engellenmiş olur. Aynı zamanda antioksidan etkileri yoluyla glutamat toksisitesine karşı nöroprotektif özellikler gösterir ve böylece apoptozu engeller. Bu antioksidan etki sıçan mezensefalik hücre kültürlerinde 2001 yılında tanımlanmıştır. Vitamin D eksikliği olan ve vitamin D takviyesi alması gereken 75 yaş üstü bireylerin %70'inden fazlasında bilişsel azalma bulunduğu saptanmıştır. Böylece, vitamin D'nin söz konusu özelliklerine dayanarak, vitamin D eksikliğinin tedavisinin bilişsel gerilemeye karşı koruyucu olabileceği söylenebilir. Vitamin D'yi ekzojen kaynaklardan daha fazla alanların daha az alanlara kıyasla daha iyi bir bilişsel performansa sahip olduğu gösterilmiştir. Kronik yürüyüş bozuklukları görünen Alzheimer Hastalığı'nın ana komplikasyonlarından biri motor disfonksiyonlardır. Alzheimer hastalığı ve ilişkili hastalıkların tedavisinde kullanılan bir ilaç olan memantin ve vitamin D'nin birlikte kullanımının bilişsel performansın artmasını dolayısıyla da daha iyi bir duruş ve yürüyüş performansının gelişmesini sağladığı gösterilmiştir. Demans gelişimine neden olan mekanizmaların düşük vitamin D düzeylerine bağlı olabileceği düşünülmektedir [71, 72].

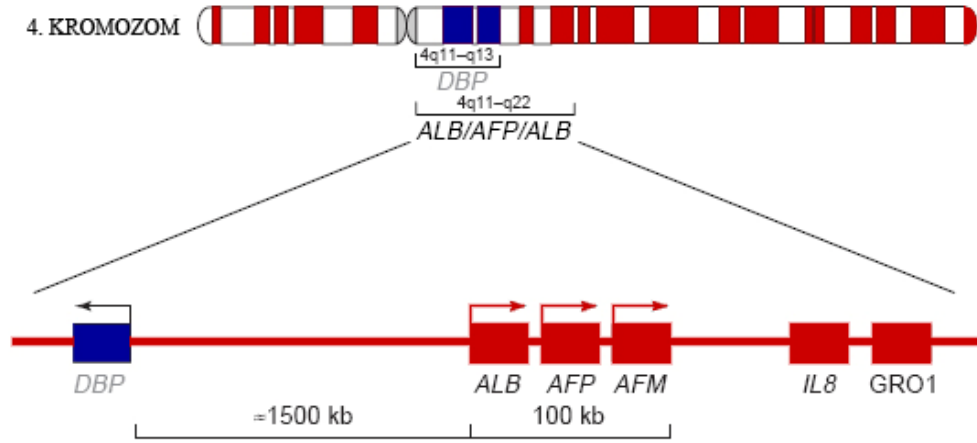
Vitamin D birçok fizyolojik fonksiyonun korunması için önemli olup, vitamin D eksikliği Multiple Skleroz, Parkinson Hastalığı ve diğer nörodejeneratif hastalık risklerinin artmasıyla ilişkilidir. Bunların yanında vitamin D'nin yetişkin beyin fonksiyonlarının gelişmesinde de olumlu rol oynadığı ileri sürülmektedir [73].

### 2.3. Vitamin D Bağlayan Protein (DBP, GC-Globulin)

Vitamin D bağlayan protein, serumda bulunan çok fonksiyonlu bir protein olup, yaklaşık yarım yüzyıl önce bulunmuştur ve vitamin D'nin çeşitli formlarına bağlanmasıyla tanımlanır [74]. Vitamin D Bağlayan Protein'in ismi, son kırk yıl içinde DBP tarafından kontrol edilen çeşitli biyolojik fonksiyonlar ortaya çıktıkça birçok kez değiştirilmiştir. İlk olarak, 1959 yılında Hirschfield tarafından plazmanın  $\alpha$ 2-globulin kısmından izolasyonundan sonra "Gruba Özgü Bileşen (Group specific component/

GC)” olarak adlandırılmıştır. Bu proteinin, Vitamin D analoglarına bağlanarak plazmada taşıdığı gösterildikten sonra, “D Bağlayan Protein” (DBP) ismi verilmiştir. En son olarak, molekülün makrofaj uyarıcı aktivitesinin gösterilmesiyle üçüncü bir isim olarak “Makrofaj aktive edici faktör” ifadesi de eski adlandırmanın yanına eklenmiştir (GcMAF/DBP-MAF) [19].

İnsan DBP geni 13 ekson ve 12 introndan oluşur, 4. kromozom üzerinde 4q11-4q13 bölgelerinde ilgili albumin proteinleri kodlayan genlerin (albumin (ALB), alfa-fetoprotein (AFP), ve afamin (AFM) yakınında bulunur. DBP, 458 amino asitten oluşan polimorfik bir insan serum proteini olup, vitamin D<sub>3</sub> ve metabolitlerini (25-hidroksivitamin D<sub>3</sub>, 1,25-dihidroksivitamin D<sub>3</sub>) taşıyan önemli bir taşıyıcı proteindir (Şekil 2-11) [74].



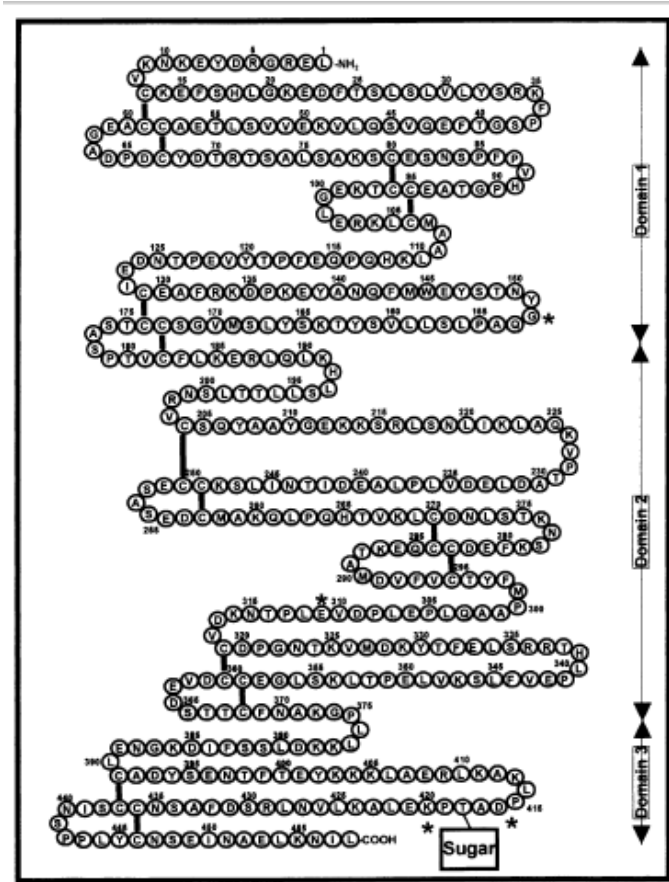
**Şekil 2-11: DBP, insan 4’üncü kromozomu üzerindeki yeri ve ALB, AFM, AFP genlerine yakınlığı [75].**

(Oklar transkripsiyon yönünü göstermektedir)

DBP, N-terminalindeki 16 aminoasitlik bir parçanın kesilmesi ve glikolizasyon ile post-translasyonel değişime uğrar ve 52-59 kDa molekül ağırlığına sahip bir protein oluşur (Şekil 2-12). Üç önemli polimorfik formu bulunur (GC1F, GC1S, GC2). Bunlar 416 ve 420 pozisyonları dışında aynı amino asit dizisinden oluşmaktadır. GC1F’nin 416 pozisyonundaki aspartik asit yerine GC1S’te glutamik asit vardır. GC2’de ise 420 pozisyonundaki tirozin yerine lizin vardır. DBP’nin bu üç önemli genetik varyasyonunun etnik gruplar arasında değişik dağılımı gösterilmiştir. GC1 genotipi varyantlarından GC1F’nin Afrika kökenliler arasında en çok bulunduğu, buna karşılık

GC1S'e Avrupa popülasyonunda en sık rastlandığı gösterilmiştir. Asyalılarda ise GC1 formları orta sıklıkta görülmektedir. GC2 formu siyahi etnik gruplarda çok nadirdir. Asya ve Avrupa kökenlilerde benzer sıklıkta bulunur [74].

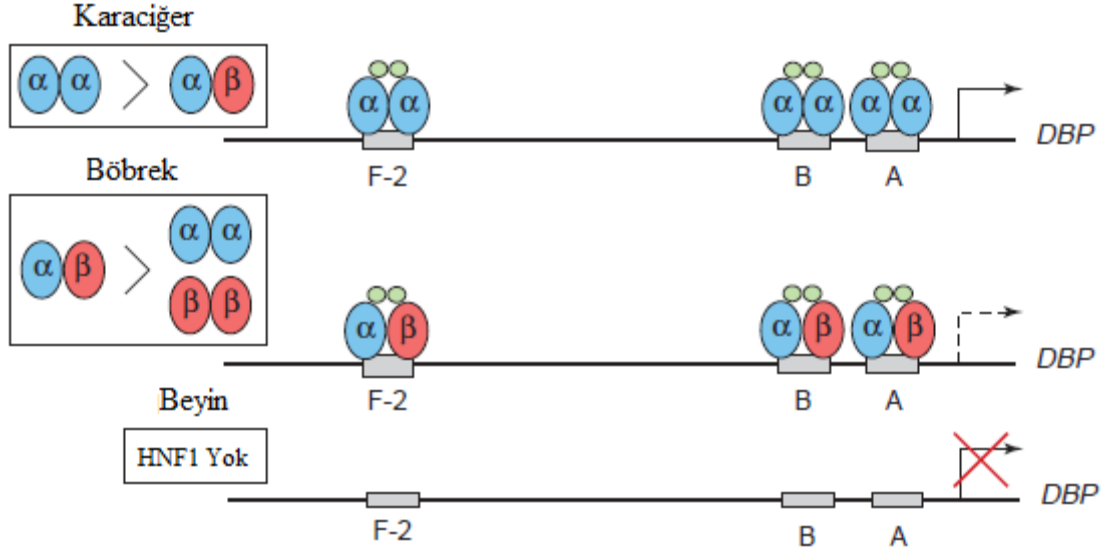
Vitamin D, DBP'ye bağlanarak dolaşım sistemine taşınır. DBP vitamin D'nin çeşitli doku ve hücre tiplerine erişimini kolaylaştırmasının yanı sıra organizma için kullanılabilir vitamin D miktarını da düzenler. Vitamin D'nin çoğunluğu DBP'e bağlı olmakla beraber daha az miktarda albumin ve şilomikronlara (lipoprotein partikülleri) da bağlı bulunabilir [74].



**Şekil 2-12: İnsan DBP amino asit dizisi (GC2 izoformu) [76]**

DBP geninin promotor bölgesi üzerinde yapılan çalışmalarda 2 kb boyundaki transkripsiyon başlangıç bölgesinde üç adet hepatosit nuklear faktör 1 (HNF1) bağlayan fonksiyonel bölge tanımlanmıştır. Daha distaldeki iki adet HNF-1 bağlayan bölgenin etkinliğinin transkripsiyon faktörünün iki izoformu olan HNF-1 $\alpha$  ve HNF-1 $\beta$ 'nin bağlı seviyelerine bağlı olduğu bulunmuştur. Bunun nedeni, HNF-1 $\beta$ 'nin, HNF-1 $\alpha$  aracılı

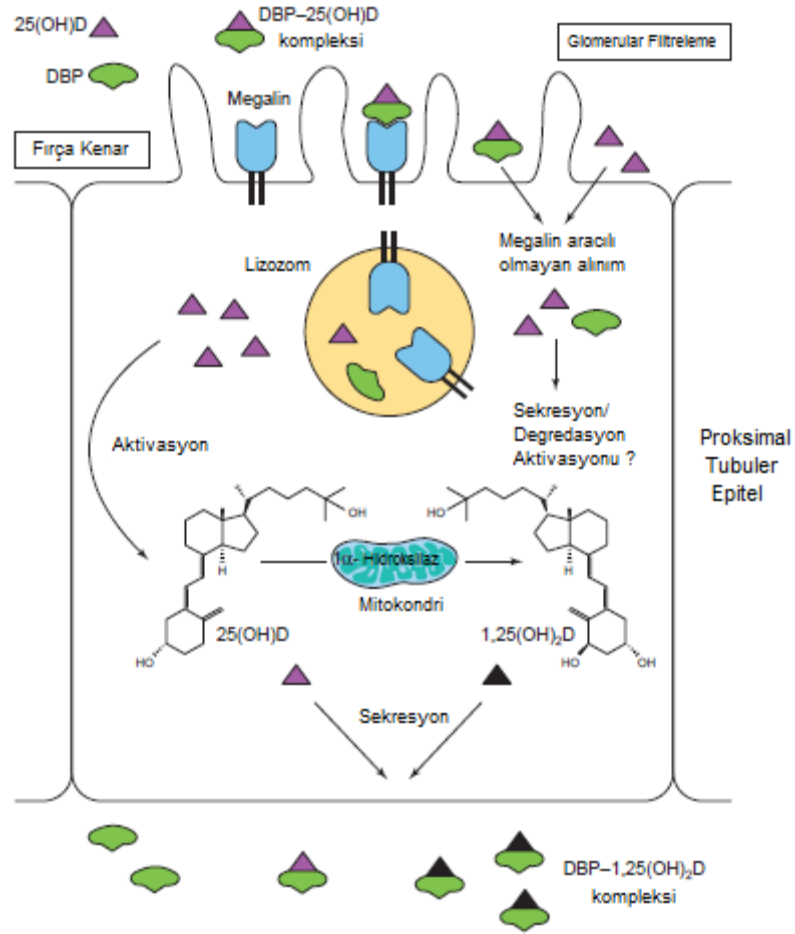
arttırıcı etkiye karşı trans-dominant bir inhibitör olarak rol oynamasıdır. Böbrek ve karaciğerdeki HNF-1 izoformlarının bağlı seviyeleri bu iki dokuda gözlenen DBP mRNA seviyelerindeki farkı açıklayabilir (Şekil 2-13) [75].



**Şekil 2-13: Hepatosit nuklear faktör 1 (HNF-1) aracılığıyla vitamin D bağlayan protein geninin düzenlenmesi [75].**

DBP geninin proksimal promotör bölgesindeki 2 kb'lık transkripsiyon başlangıç bölgesi içinde üç tane HNF1-bağlayan bölge (A, B ve F-2) bulunmaktadır.

Çok fonksiyonlu bir çöpçü reseptör olan megalin böbrek proksimal tubul epitelinin fırçamsı kenarlı yüzeyinde bulunur. DBP ve DBP bağlı 25(OH)D<sub>3</sub>, glomerul içinden süzülür ve böbrek tubul epitel hücresi içine endositozla alınır. Bu bazı durumlarda megalin aracılığıyla gerçekleştirilir. Bu kompleks, lizozomal kompartmanda parçalanarak vitamin D ve taşıyıcı protein sitozole salınır. 25(OH)D<sub>3</sub> ya direk olarak hücre dışına salınır ya da mitokondriye bağlı olarak bulunan 1α-hidroksilaz enzimi aracılığı ile 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>'ye dönüştürülür. İnterstisyel sıvıya salgılanmasıyla birlikte vitamin D sterollerini serbest halde bulunan DBP'ye bağlanır ve hedef dokulara iletilir (Şekil 2-14) [75].

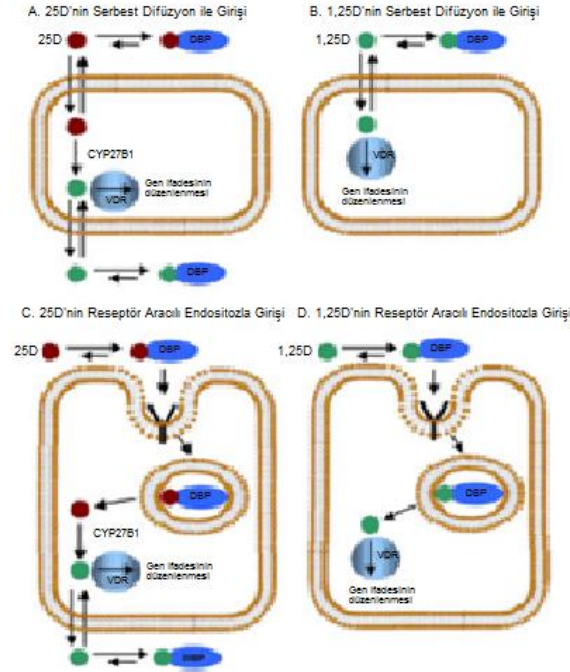


**Şekil 2-14: Reseptör aracılı endositoz ve megalin tarafından böbrek proksimal tubullerinde 25(OH)D'nin aktivasyonu [75]**

Vitamin D Bağlayan Protein'in fonksiyonları "serbest-hormon" hipotezine uygundur. Bu hipoteze göre, plazma sterollerinin serumdaki bağlayıcı proteinler aracılığıyla vasküler kompartımanlarda tutulur. Steroller bağlayıcı proteinlerden ayrılarak hücrelerde kullanılabilir hale gelirler. Serum steroid bağlayan proteinler için özgün bir hücre yüzey reseptörünün tanımlanmasıyla, bağlayıcı proteinlerin hücre içine sterol/steroid girişini kolaylaştırarak onların hücre içi biyoetkinliğini ve gen aktivasyonunu kolaylaştırmak veya aşırı serbest hormondaki korunmasını sağlamak gibi işlevlerinin de olduğu söylenebilir [77].

### 2.3.1. DBP'nin Vitamin D'ye Bağlanması

DBP'nin ana fonksiyonu vitamin D'ye bağlanarak vitamin D'yi dokulara taşımak ve kullanılabilir hale getirmektir. Bu noktadan başlayarak, organizmadaki dokuların vitamin D kaynağına erişebilmesini sağlayan çeşitli mekanizmalar vardır. DBP tarafından gerçekleştirilen vitamin D taşınımı yoğun bir şekilde çalışılmıştır. DBP serumdaki vitamin D3'e bağlanır ve bu seko-steroidi 25(OH)D<sub>3</sub> formuna dönüştürmek üzere karaciğere taşır; daha sonra vitamin D hormonunun aktif formu olan 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>'i oluşturmak için yine DBP tarafından böbreğe taşınır. Son olarak da 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>, DBP tarafından hedef dokulara iletilir. Dokular, serbest ligandların hücre membranından difüzyonuyla vitamin D'yi alabilir. 25(OH)D<sub>3</sub> membranı geçer ve hücre içerisinde CYP27B1'in etkisiyle vitamin D tarafından düzenlenen gen anlatımını başlatmak üzere 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>'e dönüşür. 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>, vitamin D tarafından düzenlenen gen anlatımını steroid hormonların klasik etkisiyle gerçekleştirir. Buna ek olarak vitamin D dokulara DBP bağlı durumda iken de reseptör aracılı endositoz yoluyla alınabilir ve vitamin D ile düzenlenen gen anlatımını gerçekleştirebilir. Bu bakımdan 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>'in, kalsiyum ve fosfor homeostazı, immün modülasyon, büyümenin düzenlenmesi, normal ve habis hücrelerin olgunlaşması gibi biyolojik fonksiyonları DBP ile yakından ilişkilidir (Şekil 2-15) [74, 76].



**Şekil 2-15: DBP'nin vitamin D'ye bağlanarak onun dokulara iletilmesi ve hücre içine taşınarak vitamin D ile düzenlenen gen anlatımını gerçekleştirmesindeki rolü [74]**

### 2.3.2. DBP'nin Biyolojik Fonksiyonları

DBP, yalnız vitamin D metabolitlerinin taşınmasında rol alan önemli bir protein olmayıp, kemotaktik yanıtın artırılması ve osteoklast aktivasyonunda da görev yapar.

En erken etki gösteren ve en güçlü kemotaktik faktörlerden biri olan C5a, tamamlayıcı bir aktivasyon peptididir. Plazma kaynaklı DBP, insanda nötrofiller, monositler ve fibroblastlarda C5-kaynaklı peptidlerin (C5a/C5ades Arg) kemotaktik aktivitesini artırır.

DBP kemiğin mikrovasküler kararlılığı üzerindeki etkileri yoluyla kemik büyümesini ve onarımını teşvik eder, bu kemiğin hem kalitesine hem de miktarına etki eder. DBP ayrıca makrofaj aktive edici faktör (MAF) olarak da rol oynar. DBP-MAF'ın inflamatuvar yanıt sırasında makrofajların aktivasyonunda rol aldığı bulunmuştur. Yakın zamanlarda, DBP-MAF'ın osteoporotik sıçanlarda osteoklast sayısı ve etkinliğini de arttırdığı gösterilmiştir [19, 78, 79].

Aktin DBY'ye yüksek bir affinite ile bağlanır. Bu nedenle, DBP'nin organizmanın aktini atmasıyla ilgili sistemin bir parçası olduğu düşünülmektedir ve bu fonksiyon hücre ve doku hasarında hayati önem taşır [74].

Sıçanlarda yapılan çalışmada, aktinin intravenöz yolla verilmesiyle, aktin filamentlerinin polimerizasyonunun endotel yaralanmalarına yol açtığı gösterilmiştir. Ancak, aktin verilmeden önce DBP enjeksiyonu uygulandığında bu zararlı değişimlerin olmadığı gösterilmiştir. Bu bakımdan DBP kullanılmasının doku hasarı olan hastalarda tedavi edici olabileceği düşünülmektedir [74].

#### **2.4. Kantitatif Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (qRT-PZR)**

Kantitatif Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu biyolojik çalışmaların çeşitli alanlarında çok önemli bir yer tutar ve en çok tercih edilen yöntemlerden biri haline gelmiştir. Gen anlatımının mRNA düzeyinde ölçümü biyolojik yanıtları ortaya çıkarmak için yaygın olarak kullanılır. Kantitatif gen analizi ise belli bir genin genom içindeki miktarını belirlemek için kullanılır [80, 81].

Gerçek zamanlı PZR, bazen kinetik PZR olarak da adlandırılır, çoğaltılan hedef dizinin floresan sinyal oluşturmasıyla gerçekleşen bir yöntemdir ve bu floresan sinyal PZR işlemi sırasında reaksiyon tüpü içinde ölçülür. Bu floresan sinyali oluşturmak için iki temel teknik vardır. Birincisi, çift zincirli DNA'ya bağlanan SYBR®Green gibi bir boyanın kullanılmasını içerir. Bu teknikte, sentezlenen herhangi bir ampikon boyaya bağlanır ve floresan sinyal oluşturur, bu da cihaz tarafından tespit edilir. İkinci teknik, daha yaygın olarak kullanılan bir teknik olup, diziye özgü floresan prob kullanır. PZR reaksiyonunun denatürasyon adımından sonra hibritleşme aşaması sırasında bu prob hedef diziye hibritleşir. Floresan sinyal reaksiyonun uzama aşaması sırasında gerçekleşir [81].

Gerçek zamanlı PZR cihazı DNA amplifikasyonunun gerçek zamanlı görüntülenmesini sağlar. Üretici firmaya göre, sistem hızlı bir şekilde ısınan hava ile çalışır (20 dakikada 30 döngü) ve 6 ayrı kanalla floresan tespiti yapar. Buna ek olarak, genotipleme için, erime (melting) eğrisi analizi ile tek baz değişiklikleri tespit edilebilir, böylece polimorfizmlerin analizini sağlar. Erime eğrisi analizi genin herhangi bir varyasyonunu problemler aracılığı ile tespit eder. Genellikle farklı erime noktalarıyla birden fazla varyasyon da saptanabilir, böylece 2 veya daha fazla varyantın belirlenmesi mümkün hale gelir [82].

### 3. GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmaya, İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Dahili Tıp Bilimleri Bölümü Nöroloji Anabilim Dalı tarafından 2011 – 2013 yılları arasında psikometrik değerlendirme olarak; Minimal test, Saat çizim testi, Set test uygulanan, laboratuvar tetkikleri olarak kan sayımı, kan elektrolitleri, T3, T4, TSH, B12, folik asit tayini ve radyolojik tetkiklerden BBT veya MR yapılarak klinik teşhis konulan 61 Alzheimer hastası ile bu hasta grubuyla yaş paralelliği gösteren (>65) ve herhangi bir nörodejeneratif hastalığı bulunmayan 60 sağlıklı birey dahil edildi.

Periferik kan örneklerinden elde edilen DNA'larda DBP geninin, rs17467825, rs2282679, rs3755967, rs2298850, rs7041, rs1155563 bölgelerindeki tek nükleotid polimorfizmleri (SNP) belirlendi. Ayrıca ApoE genotipleri saptandı. Söz konusu genotipleme çalışmaları, İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Nörogenetik laboratuvarında yapıldı. Tüm katılımcı ya da yakınlarından bilgilendirilmiş onam formu alındı. Araştırma İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu tarafından 16366 sayı ve 9 Mayıs 2011 tarihli yazısıyla onaylandı.

#### 3.1. DNA İzolasyonu

Hastalardan ve sağlıklı kontrol bireylerden, vakumlu steril K3-EDTA'lı tüplere alınan 5 ml periferik kan örnekleri -20°C'de saklandı ve Qiagen DNA izolasyon kiti kullanılarak ilk 3-5 gün içerisinde DNA izolasyonu yapıldı.

##### 3.1.1. DNA İzolasyon Protokolü

1. 1.5ml'lik temiz bir tüpün dibine 20µl QIAGEN Protease (Proteinase K) pipetlendi.
2. 200µl örnek bu tüpün içine konuldu.
3. Örneklerin üstüne 200µl Buffer AL eklenir. 15sn vorteks ile karıştırıldı.
4. Örnekler 56 °C'de 10dk inkübe edildi.
5. 1.5ml'lik tüp cidarına yapışmış sıvıları aşağıda toplamak üzere kısa süre santrifüj edildi.

6. Örnekler üzerine 200µl etanol (%96-100) eklendi ve 15sn vorteks ile karıştırıldı. Vorteksten sonra tüp cidarına yapışmış sıvıları aşağıda toplamak üzere kısa süre santrifüj edildi.

7. 6.adımda elde edilen karışım dikkatlice 2ml'lik toplama tüpünün içine yerleştirilen QIAamp Mini spin kolonun içine dikkatlice kenarlarını ıslatmadan konuldu. Kapak kapatılıp ve 6000g'de (8000rpm) 1dk santrifüj edildi. Santrifüjlemeden sonra QIAamp Mini spin kolon, temiz bir 2ml'lik toplama tüpüne yerleştirildi.

8. QIAamp Mini spin kolonun kapağı dikkatlice açılıp ve kenarları ıslatmadan 500µl Buffer AW1 eklendi. Kapak kapatıldı ve 6000g'de (8000rpm) 1dk santrifüj edildi. Santrifüjlemeden sonra QIAamp Mini spin kolon temiz bir 2ml'lik toplama tüpüne yerleştirildi.

9. QIAamp Mini spin kolonun kapağı dikkatlice açılıp ve kenarları ıslatmadan 500µl Buffer AW2 eklendi. Kapak kapatılıp en yüksek hızda (20.000 x g/14.000rpm) 3dk santrifüj edildi.

10. QIAamp Mini spin kolon temiz bir 2ml'lik toplama tüpüne yerleştirildi. En yüksek hızda 1dk santrifüj edildi.

11. QIAamp Mini spin kolon temiz bir 1.5ml'lik toplama tüpüne yerleştirildi. QIAamp Mini spin kolonun kapağı dikkatlice açılıp 50-200 µl Buffer AE veya distile su eklendi. Oda sıcaklığında (15-25°C) 1-5 dk inkübe edildi ve 6000g'de (8000rpm) 1dk santrifüj edildi.

### 3.2. DNA Saflığı ve Miktarının Tayin Edilmesi

DNA izolasyonunun sonuçları, spektral ölçüm ile değerlendirildi. Total DNA konsantrasyonu, 260 nm deki OD değerinden, DNA saflığı ise, 260nm/280nm deki OD oranından bulundu. DNA konsantrasyonu ve saflığı tayininde kullanılan formüller aşağıda verilmiştir.

$$\text{DNA konsantrasyonu (mg/ml)} = \text{OD 260 nm} \times \text{Seyreltme Faktörü} \times 50$$

$$\text{DNA saflığı} = \frac{\text{OD 260}}{\text{OD 280}} = 1,8 \pm 0,2$$

### 3.3. Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT PZR) ile Genotipleme

Tüm hastalarda ve kontrollerde DBP geninin rs17467825, rs2282679, rs3755967, rs2298850, rs7041, rs1155563 bölgelerine ait polimorfizmleri ve ApoE genine ait genotipleri belirlemek için RT PZR yöntemi kullanıldı. Simple Probe, Fast Start DNA Master HybProbe (Roche, Mannheim, Germany) ve PZR döngü koşulları kullanılarak LightCycler® 480 (Roche, Mannheim, Germany) cihazında RT PZR ile genetik analiz yapıldı. DBP geni için LightSNiP (TibMolBiol, Berlin, Germany), ApoE geni için ise LightMix Kit ApoE C112R R158C (TibMolBiol, Berlin, Germany) kullanıldı.

DBP geninde tek nükleotid polimorfizmi bakılan bölgelerin bulunduğu konumlar ve allelleri Tablo 3-1’te gösterilmiştir.

**Tablo 3-1: DBP geninde polimorfizm bakılan bölgelerin bulunduğu konum ve allelleri**

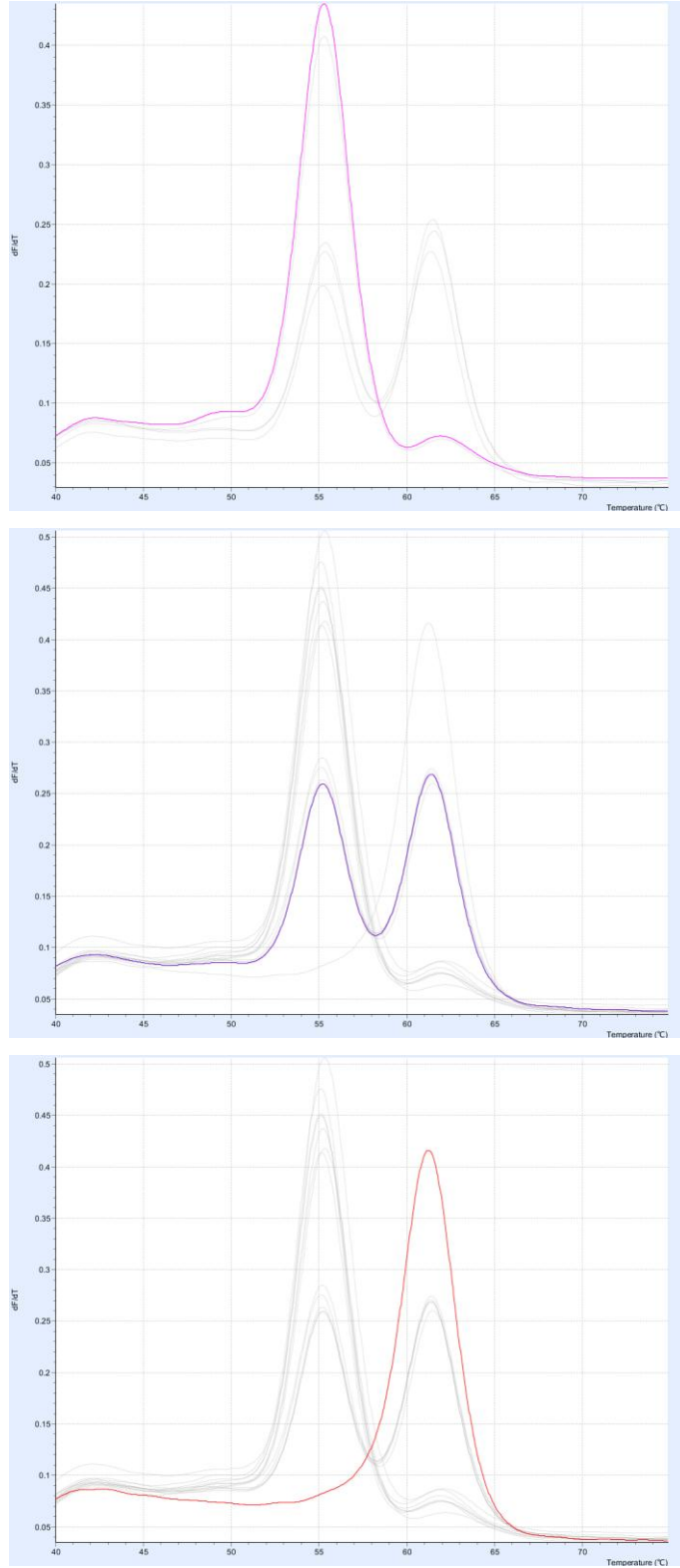
| Gen | SNP Nosu   | Bulunduğu Konum | Alleller |
|-----|------------|-----------------|----------|
|     |            | Genin 3’ ucuna  |          |
| DBP | rs17467825 | yakın bölge     | A/G      |
| DBP | rs2282679  | Intron          | A/C      |
| DBP | rs3755967  | Intron          | A/G      |
| DBP | rs2298850  | Intron          | C/G      |
| DBP | rs7041     | Ekzon           | G/T      |
| DBP | rs1155563  | Intron          | T/C      |

DBP geninde polimorfizm bakılan bölgelerin bulunduğu konumlar ve allel değişimleri Tablo 3-2’de gösterilmiştir.

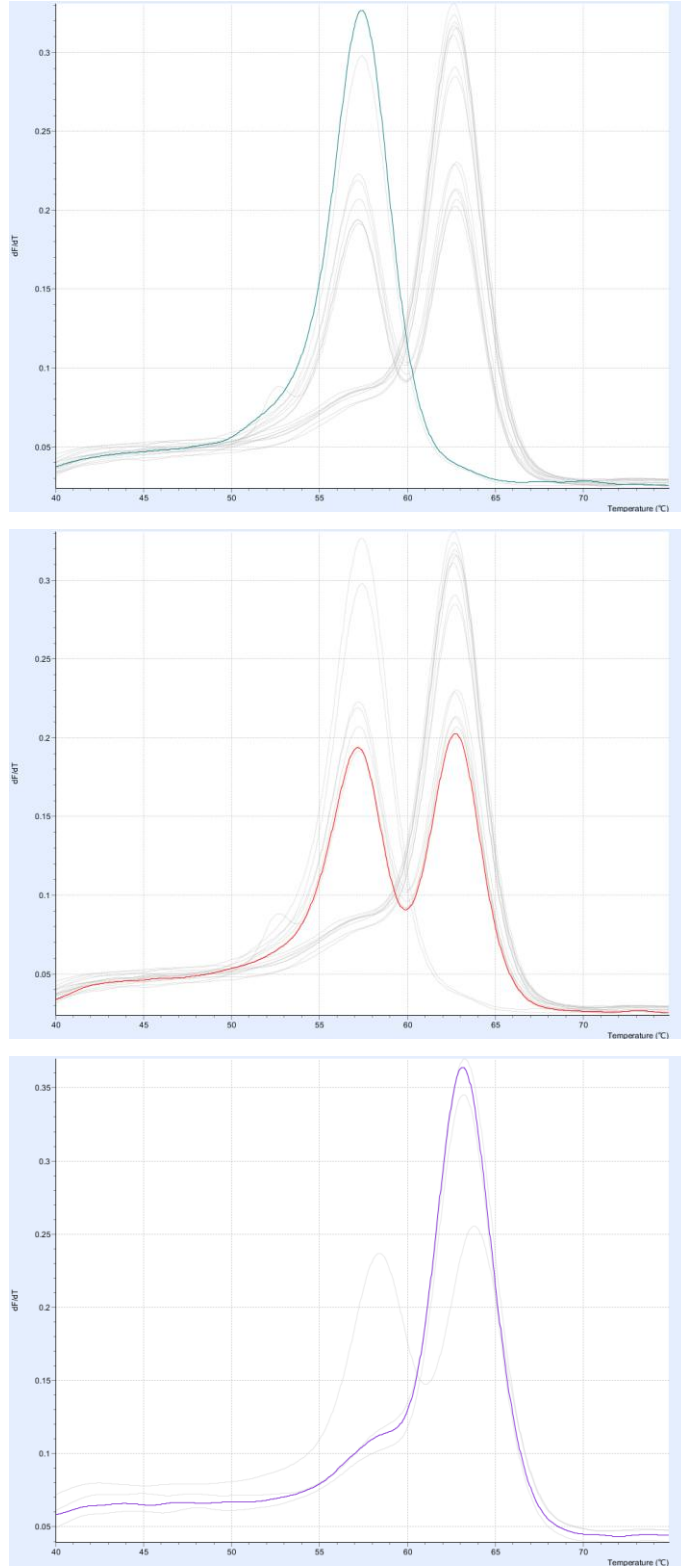
**Tablo 3-2: DBP geninin 6 bölgesine ait allel değişimleri**

| Gen | SNP Nosu   | Allel Değişim Bölgeleri                                  |
|-----|------------|----------------------------------------------------------|
| DBP | rs17467825 | GTCAGCGATTCTTAATATAAGAAAA[A/G]TGGTGAAATGTGTTTAGAGTGTGCT  |
| DBP | rs2282679  | AATCTCTGTCTCTTAATTATCTCAC[A/C]AGCCAGGTATTTTTATTGTTAGCT   |
| DBP | rs3755967  | CACAAAGTTATAGGTCTGAGGACTT[A/G]ATATCCAGAAATAATGAGACCACAA  |
| DBP | rs2298850  | TCATTCAGGCAGGGCATCCCTTTGGG[C/G]TCTTCTGAGAACTCATTACTATGCT |
| DBP | rs7041     | GAGCGACTAAAAGCAAAATTGCCTGA[G/T]GCCACACCCACGGAAGTGGCAAAGC |
| DBP | rs1155563  | TGTGCTCTTGCTATTGTATTTTTTAA[C/T]AGATAAAAAAATCACAGTTATTCC  |

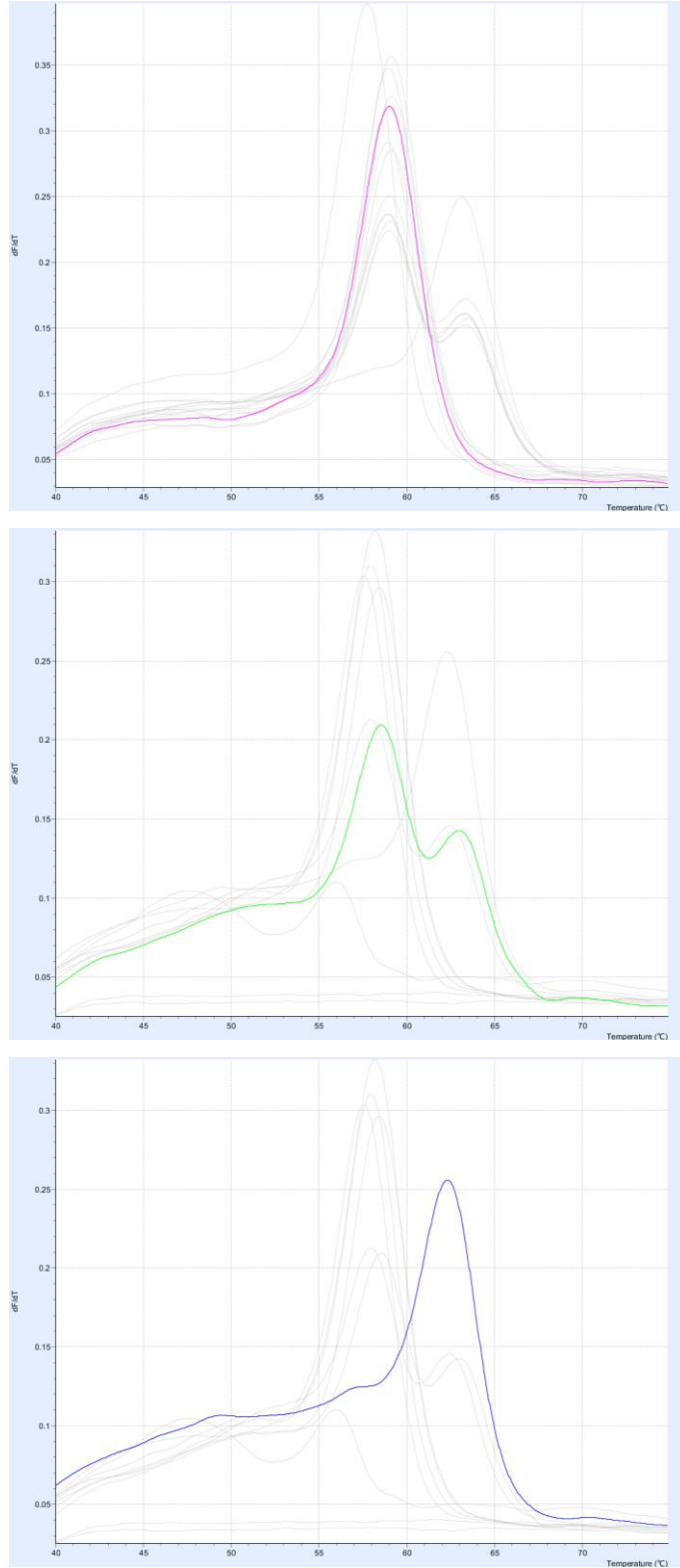
DBP geninin rs17467825, rs2282679, rs3755967, rs2298850, rs7041, rs1155563 bölgelerine özgü prob’larla işaretlenmesi sonucu oluşan erime noktaları rs17467825 bölgesine ait AA genotipi için 55,64 °C, AG genotipi için 55,64 °C – 61,80 °C ve GG genotipi için 61,80 °C’dir (Şekil 3-1). rs2282679 bölgesine ait CC genotipi için 57,65 °C, CA genotipi için 57,65 °C - 63,15 °C ve AA genotipi için 63,15 °C’dir (Şekil 3-2). rs3755967 bölgesine ait GG genotipi için 59,27 °C, GA genotipi için 59,27 °C – 63,72 °C, AA genotipi için 63,72 °C’dir (Şekil 3-3). rs2298850 bölgesine ait CC genotipi için 53,33 °C, GC genotipi için 53,33 °C – 62,26 °C ve GG genotipi için 62,26 °C’dir (Şekil 3-4). rs7041 bölgesine ait GG genotipi için 58,99 °C, GT genotipi için 58,99 °C – 65,74 °C ve TT genotipi için 65,74 °C’dir (Şekil 3-5). rs1155563 bölgesine ait TT genotipi için 51,59 °C, TC genotipi için 51,59 °C – 58,36 °C ve CC genotipi için 58,36 °C’dir (Şekil 3-6).



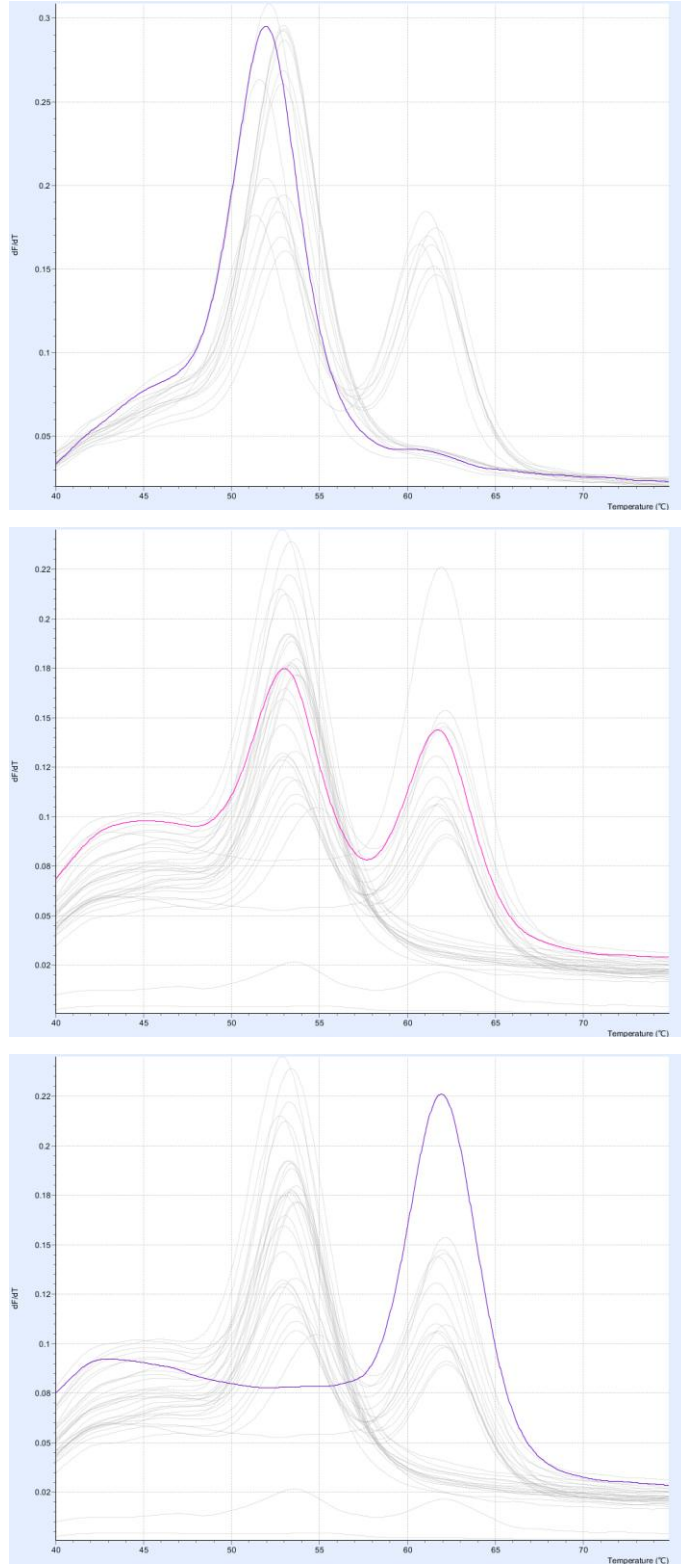
**Şekil 3-1: DBP geninin rs17467825 bölgesine ait genotipler sırasıyla AA, AG, GG görülmektedir.**



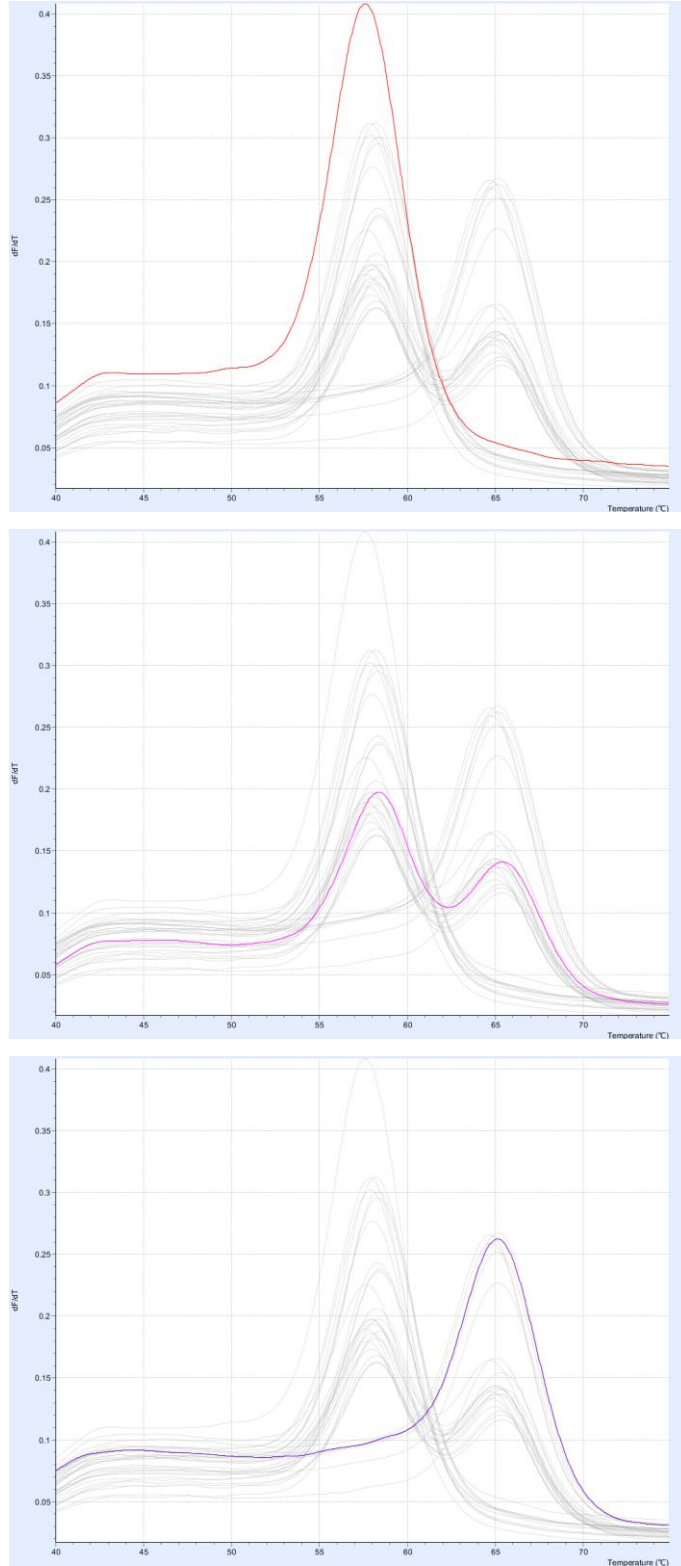
**Şekil 3-2: DBP geninin rs2282679 bölgesine ait genotipler sırasıyla CC, , CA, AA görülmektedir.**



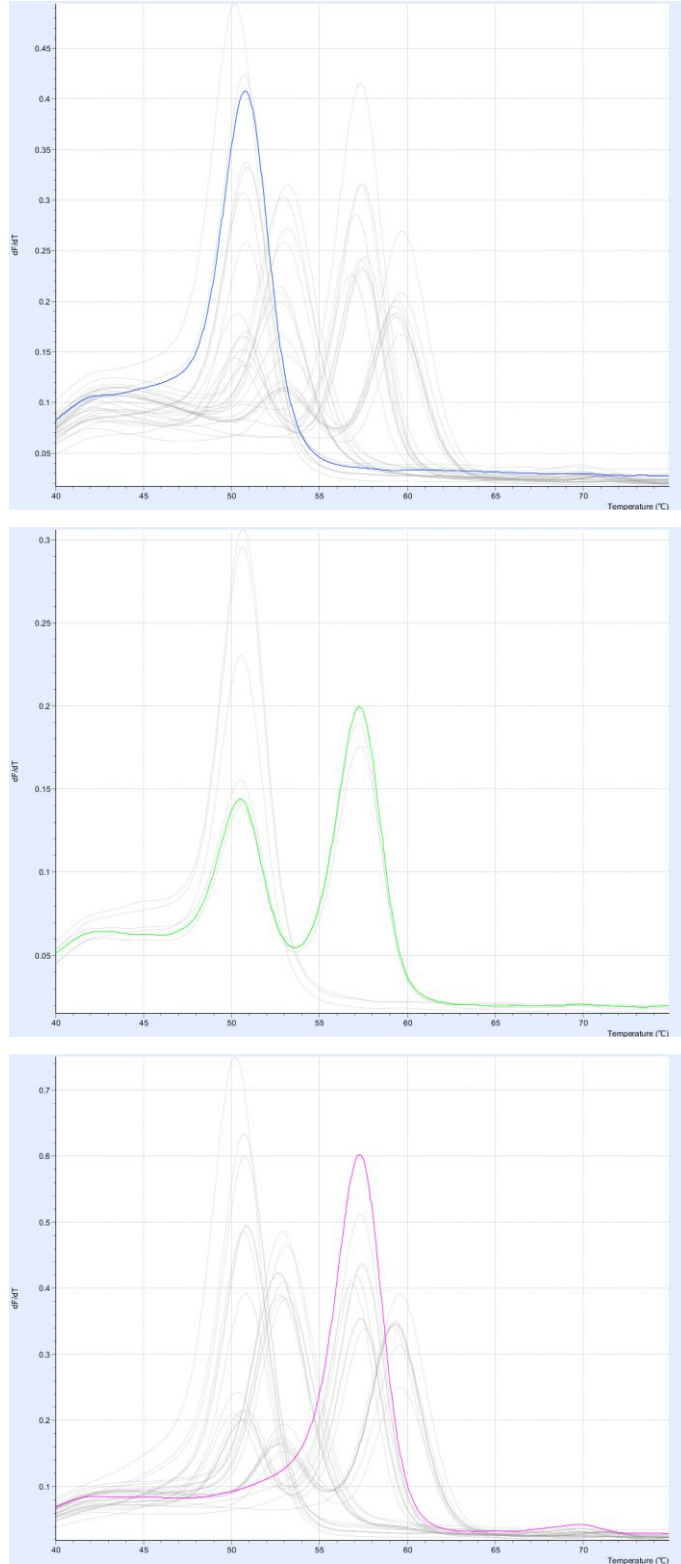
**Şekil 3-3: DBP geninin rs3755967 bölgesine ait genotipler sırasıyla GG, GA, AA görülmektedir.**



**Şekil 3-4: DBP geninin rs2298850 bölgesine ait genotipler sırasıyla CC, CG, GG görülmektedir.**



**Şekil 3-5: DBP geninin rs7041 bölgesine ait genotipler sırasıyla GG, GT, TT görülmektedir.**



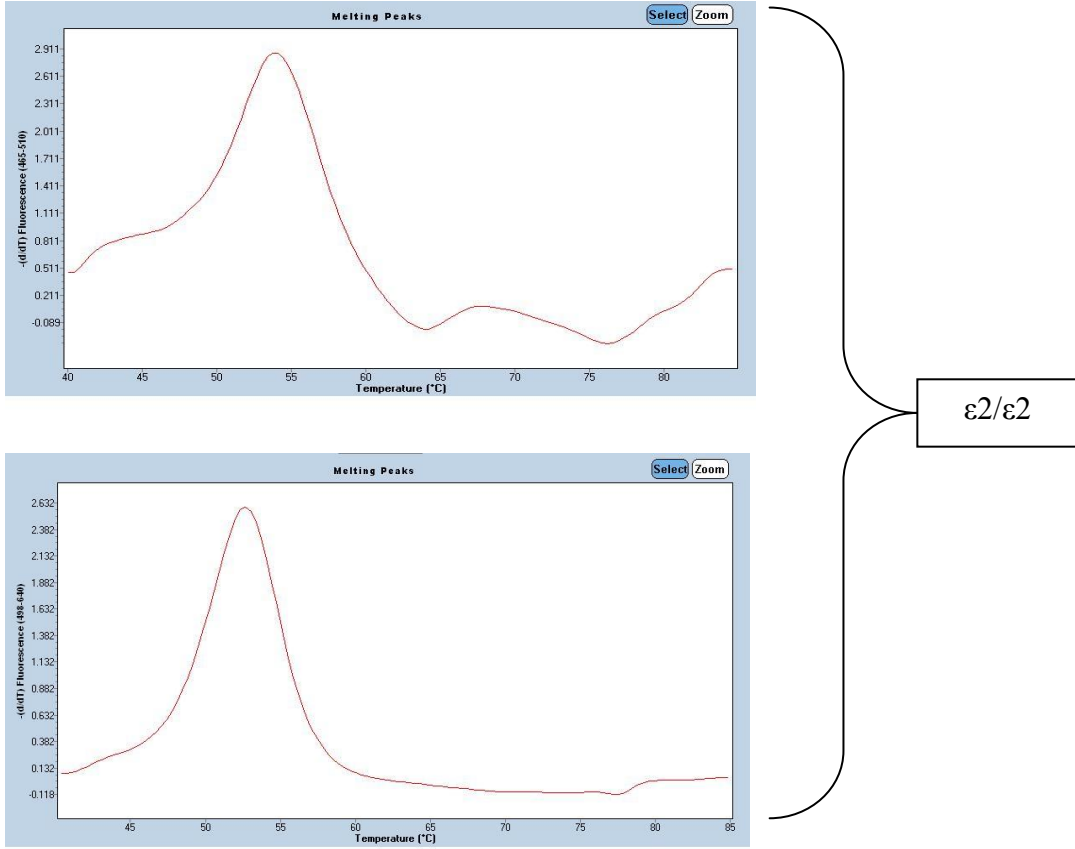
**Şekil 3-6: DBP geninin rs1155563 bölgesine ait genotipler sırasıyla TT, TC, CC görülmektedir.**

ApoE geni üzerinde genotipleme için kullanılan bölgeler, ilgili genotipler, erime (melting) noktaları ve fenotipe yansıma riski Tablo 3-3'te gösterilmiştir.

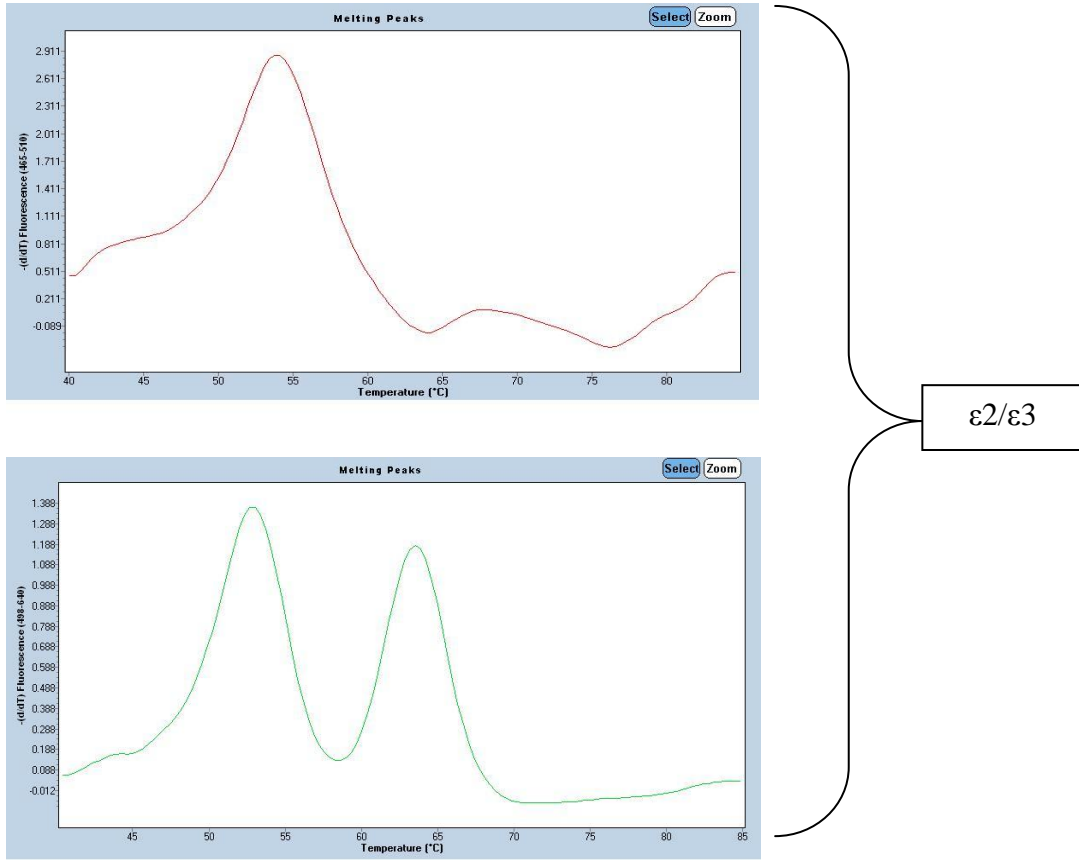
**Tablo 3-3: ApoE geni üzerinde genotipleme için kullanılan bölgeler, ilgili genotipler, erime (melting) noktaları ve fenotipe yansıma riski**

|                                                              |                          |                         |                         |                         |                         |                                               |
|--------------------------------------------------------------|--------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-----------------------------------------------|
| Allel                                                        | 112C/C<br>158C/C         | 112C/C<br>158C/R        | 112C/R<br>158C/R        | 112C/C<br>158R/R        | 112C/R<br>158R/R        | 112R/R<br>158R/R                              |
| ApoE Genotipi                                                | $\epsilon 2/\epsilon 2$  | $\epsilon 2/\epsilon 3$ | $\epsilon 2/\epsilon 4$ | $\epsilon 3/\epsilon 3$ | $\epsilon 3/\epsilon 4$ | $\epsilon 4/\epsilon 4$                       |
| 530 Kanaldaki<br><i>T<sub>m</sub></i> Değeri                 | 55°C                     | 55°C                    | 55/64°C                 | 55°C                    | 55/64°C                 | 64°C                                          |
| 640 Kanaldaki<br><i>T<sub>m</sub></i> Değeri                 | 53°C                     | 53/63°C                 | 53/63°C                 | 63°C                    | 63°C                    | 63°C                                          |
| Fenotipe<br>Yansıma                                          | Tip III<br>Hiperlipidemi |                         |                         | Normal                  |                         | Alzheimer<br>Hastalığı<br>için yüksek<br>risk |
| <p><math>\epsilon 4</math>: Kolesterol seviyesinde artış</p> |                          |                         |                         |                         |                         |                                               |

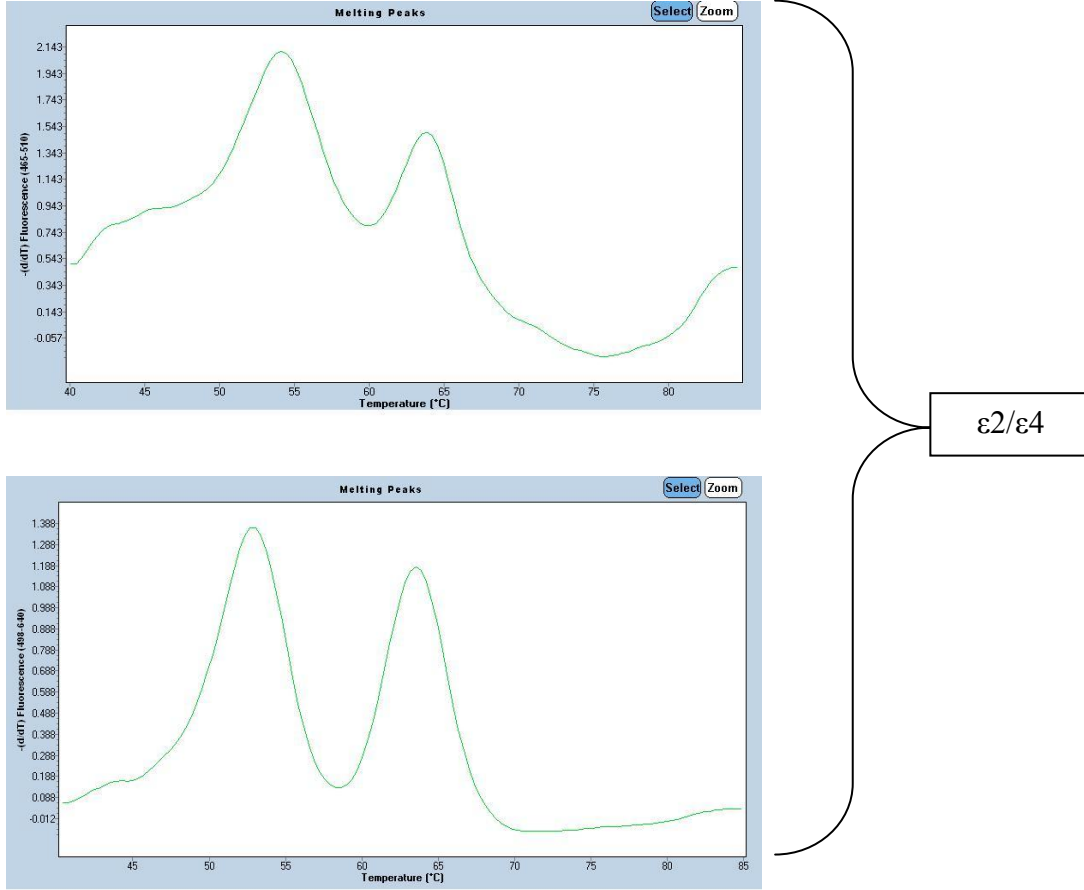
ApoE geninin 112C ve 158R bölgelerine özgü prob'larla işaretlenmesi sonucu oluşan erime (melting) noktaları  $\epsilon 2/\epsilon 2$  genotipi için 55°C -53°C (Şekil 3-7),  $\epsilon 2/\epsilon 3$  genotipi için 55°C – 53/63°C (Şekil 3-8),  $\epsilon 2/\epsilon 4$  genotipi için 55/64°C – 53/63°C (Şekil 3-9),  $\epsilon 3/\epsilon 3$  genotipi için 55°C - 63°C (Şekil 3-10),  $\epsilon 3/\epsilon 4$  genotipi için 55/64°C - 63°C (Şekil 3-11),  $\epsilon 4/\epsilon 4$  genotipi için 64°C - 63°C'dir (Şekil 3-12).



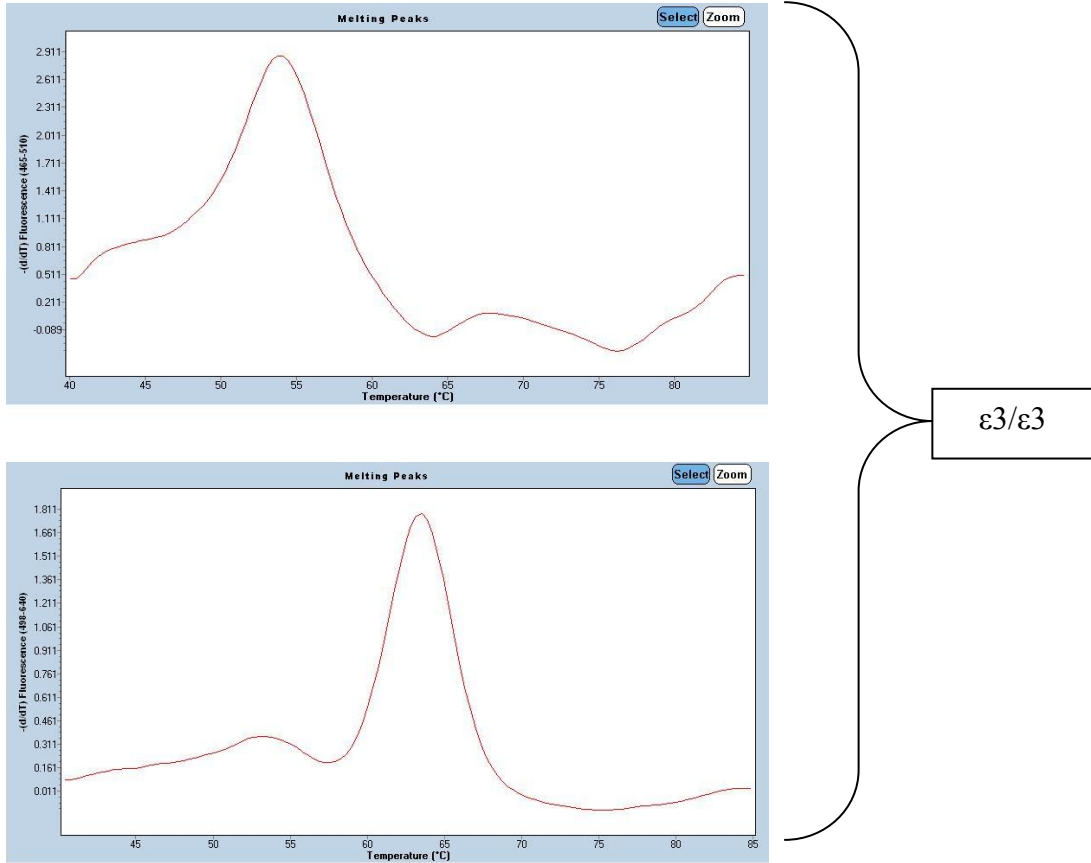
**Şekil 3-7: ApoE genine ait  $\epsilon 2/\epsilon 2$  genotipi belirlenmesinde kullanılan erime noktalarını gösteren grafik.**



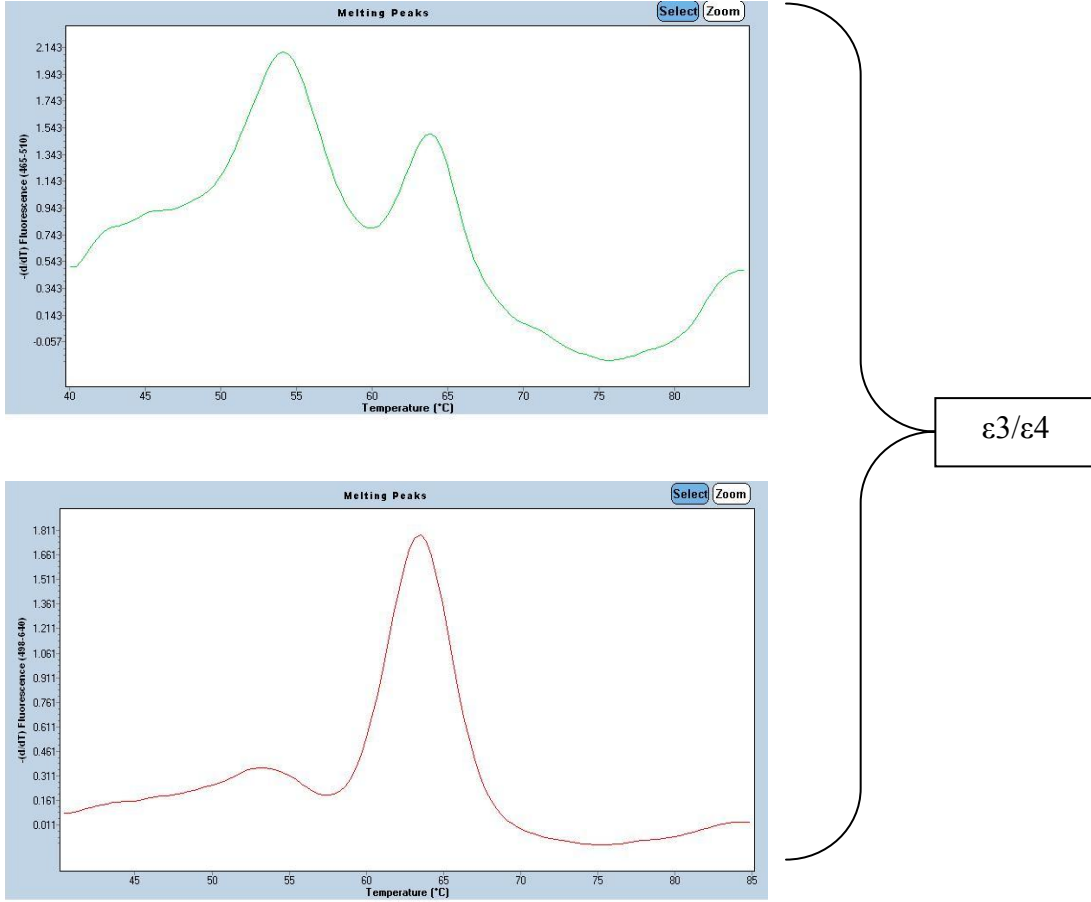
**Şekil 3-8: ApoE genine ait ε2/ε3 genotipi belirlenmesinde kullanılan erime noktalarını gösteren grafik.**



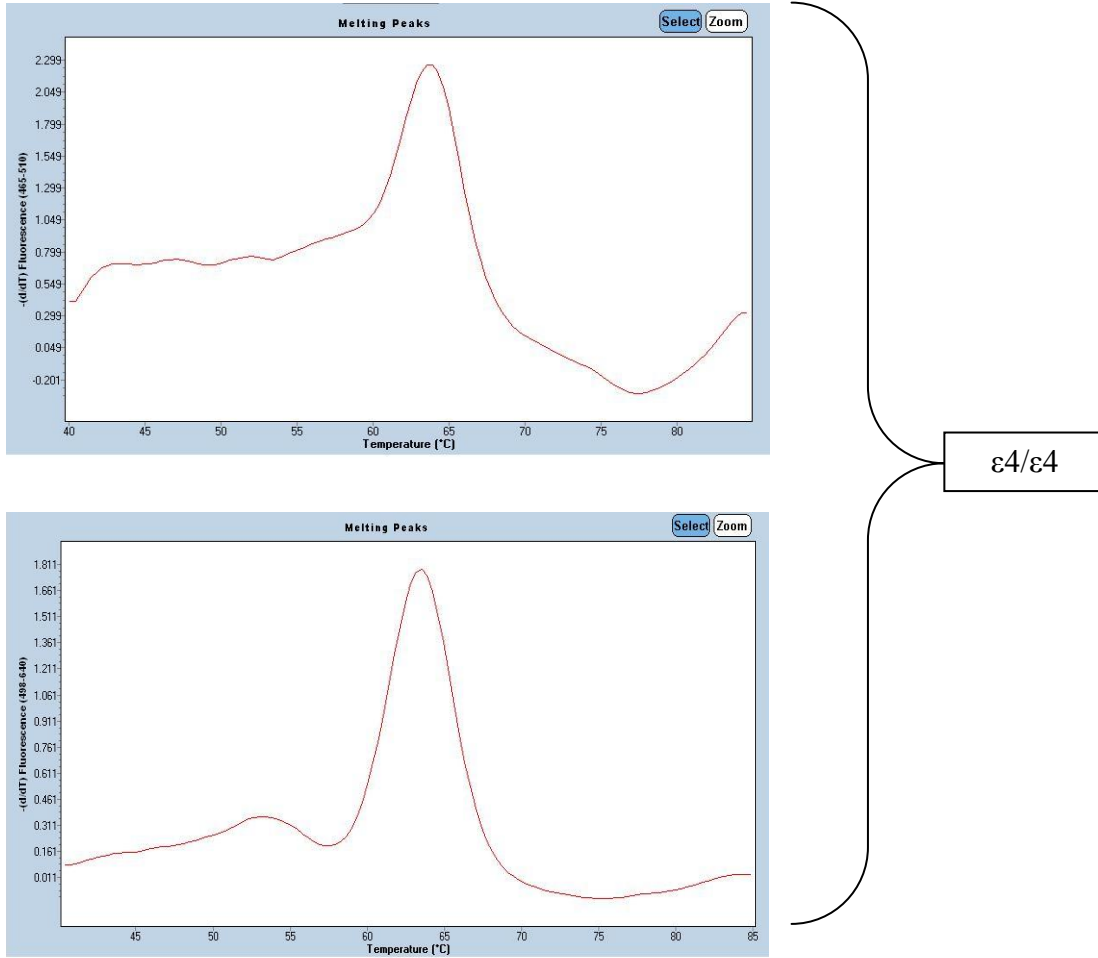
**Şekil 3-9: ApoE genine ait  $\epsilon 2/\epsilon 4$  genotipi belirlenmesinde kullanılan erime noktalarını gösteren grafik.**



**Şekil 3-10: ApoE genine ait  $\epsilon 3/\epsilon 3$  genotipi belirlenmesinde kullanılan erime noktalarını gösteren grafik.**



**Şekil 3-11: ApoE genine ait  $\epsilon 3/\epsilon 4$  genotipi belirlenmesinde kullanılan erime noktalarını gösteren grafik.**



**Şekil 3-12: ApoE genine ait  $\epsilon 4/\epsilon 4$  genotipinin belirlenmesinde kullanılan erime noktalarını gösteren grafik.**

### 3.3.1. Reaksiyon Karışımlarının Hazırlanışı:

DBP geni için 20µl lik reaksiyon karışımı, Tablo 3-4’de belirtildiği gibi hazırlandı.

**Tablo 3-4: DBP geni için kullanılan reaksiyon karışımı**

|                           |         |
|---------------------------|---------|
| H <sub>2</sub> O          | 10.4 µl |
| Primer Prob Karışımı      | 1.0 µl  |
| FastStart DNA Master*     | 2.0 µl  |
| MgCl <sub>2</sub> (25 mM) | 1.6 µl  |
| DNA                       | 5.0 µl  |

MgCl<sub>2</sub> son konsantrasyonu: 3.0 mM

\*LightCycler® FastStart DNA Master HybProbe (Roche Diagnostics)

ApoE geni için 20µl lik reaksiyon karışımı, Tablo 3-5’te belirtildiği gibi hazırlandı.

**Tablo 3-5: ApoE geni için kullanılan reaksiyon karışımı**

|                          |        |
|--------------------------|--------|
| H <sub>2</sub> O         | 6.2 µl |
| Mg <sup>+2</sup> (25 mM) | 1.6 µl |
| Primer Prob Karışımı     | 4.0 µl |
| DMSO                     | 1.2 µl |
| FastStart DNA Master**   | 1.2 µl |
| DNA                      | 5 µl   |

\*\*LightCycler® FastStart DNA Master HybProbe (Roche Diagnostics)

### 3.3.2. Gerçek Zamanlı PZR Programı:

DBP geni için kullanılan Gerçek Zamanlı PZR programı\*\*\* Tablo 3-6’da gösterilmiştir.

**Tablo 3-6: DBP geni için kullanılan Gerçek Zamanlı PZR programı**

| Program                   | Denatürasyon |          | Döngü         |          |          |          | Erime (Melting) |          | Soğuma |
|---------------------------|--------------|----------|---------------|----------|----------|----------|-----------------|----------|--------|
| Parametre                 |              |          |               |          |          |          |                 |          |        |
| Analiz Modu               | Yok          |          | Kantifikasyon |          |          |          | Erime Eğrisi    |          |        |
| Döngü                     | 1            |          | 45            |          |          |          | 1               | 1        |        |
| Segment                   | 1            | 1        | 2             | 3        | 1        | 2        | 3               | 1        |        |
| Hedef (°C)                | 95           | 95       | 60            | 72       | 95       | 40       | 75              | 40       |        |
| Bekleme Süresi (ss:dd:ss) | 00:10:00     | 00:00:10 | 00:00:10      | 00:00:15 | 00:00:30 | 00:02:00 | 00:00:00        | 00:00:30 |        |
| Yükselme Oranı (°C/s) 384 | 4.6          | 4.6      | 2.4           | 4.6      | 4.6      | 2.0      |                 | 2.0      |        |
| Yükselme Oranı (°C/s) 96  | 4.4          | 4.4      | 2.2           | 4.4      | 4.4      | 1.5      |                 | 1.5      |        |
| Kazanım Modu              | Yok          | Yok      | Tek           | Yok      |          | Yok      | Devamlı         |          |        |
| Kazanım (per °C)          |              |          |               |          |          |          | 3               |          |        |

\*\*\* Her altı reaksiyon için de aynı program kullanılmıştır.

ApoE geni için kullanılan Gerçek Zamanlı PZR programı Tablo 3-7’de gösterilmiştir.

**Tablo 3-7: ApoE için kullanılan Gerçek Zamanlı PZR programı**

|                              |              |          |               |          |          |              |          |          |
|------------------------------|--------------|----------|---------------|----------|----------|--------------|----------|----------|
| Program                      | Denatürasyon |          | Döngü         |          |          | Erime        |          | Soğuma   |
| Parametre                    |              |          |               |          |          |              |          |          |
| Analiz Modu                  | Yok          |          | Kantifikasyon |          |          | Erime Eğrisi |          |          |
| Döngü                        | 1            |          | 45            |          |          | 1            |          | 1        |
| Hedef (°C)                   | 95           | 95       | 60            | 72       | 95       | 40           | 85       | 40       |
| Bekleme Süresi<br>(ss:dd:ss) | 00:10:00     | 00:00:05 | 00:00:10      | 00:00:15 | 00:00:20 | 00:00:20     | 00:00:00 | 00:00:30 |
| Yükselme Oranı<br>(°C/s)     | 20           | 20       | 20            | 20       | 20       | 20           | 0.2      | 20       |
| Kazanım Modu                 | Yok          | Yok      | Tek           | Yok      | Yok      | Yok          | Devamlı  | Yok      |

### 3.4. Haplotip Analizi:

Haplotip analizi, bir genin çeşitli varyanlarının ilgili kromozom üzerinde birlikte kalıtılma olasılığını gösterir. Haplotip analizi ile homolog kromozomların mayoz sırasındaki olası parça değişimi noktaları (crossing-over bölgeleri) saptanır. Analiz, polimorfizm olduğu bilinen bölgelerin kromozom üzerinde buldukları yere göre yapılır. Çalışmamızda kullanılan her bir bölgenin kromozom üzerindeki konumu Tablo 3-8'de gösterilmiştir.

**Tablo 3-8: DBP genine ait SNP'lerin kromozom üzerindeki konumları**

| Gen | SNP Nosu   | Kromozom | Kromozom Konumu |
|-----|------------|----------|-----------------|
| DBP | rs17467825 | 4        | 72605517        |
| DBP | rs2282679  | 4        | 72608383        |
| DBP | rs3755967  | 4        | 72609398        |
| DBP | rs2298850  | 4        | 72614267        |
| DBP | rs7041     | 4        | 72618334        |
| DBP | rs1155563  | 4        | 72643488        |

### 3.5. İstatistiksel Değerlendirme:

İstatistiksel analizler, SPSS 17.0<sup>®</sup> istatistik yazılım programı kullanılarak yapıldı. DBP genine ait polimorfizmlerin analizi, ApoE genotipleme analizleri ve allelerin gruplara göre dağılımının analizi için kıkare ( $\chi^2$ ) yöntemi kullanıldı. Değerler ortalama  $\pm$  standart sapma (SS) olarak verilmiştir.  $p < 0,05$  olan değerler anlamlı olarak değerlendirilmiştir. DBP genine ait polimorfik bölgelerin genotipleri üç grup halinde sınıflandırılırken, ApoE genine ait genotipler altı grup halinde sınıflandırıldı. Genotiplere, Hardy – Weinberg Eşitliği (HWE) kullanılarak test yapıldı. Haplotip analizi, Haploview 4.2 yazılım programı kullanılarak ve her bir SNP'nin kromozomdaki konumuna bağlı olarak yapıldı. DBP genine ait SNP bölgeleri kendi arasında analiz edildikten sonra bu bölgelerle ApoE genotipleri karşılaştırıldı.

## 4. BULGULAR

Çalışmada 61 Geç başlangıçlı Alzheimer hastasının ve herhangi bir nörodejeneratif hastalığı bulunmayan cinsiyet ve yaş bakımından hasta grubuyla uygunluk gösteren (>65) 60 sağlıklı bireyin Vitamin D Bağlayan Protein (DBP) geni genotipleri belirlenerek, Alzheimer Hastalığı ile ilişkisi araştırıldı.

### 4.1. DNA İzolasyonu

Qiagen DNA izolasyon kitiyle yapılan izolasyon sonucunda, örneklerin 260nm/280nm dalga boylarındaki OD değerlerinin  $1.8 \pm 0.1$  arasında olduğu, DNA konsantrasyonlarının ise 25-50 ng/µl olduğu belirlendi.

### 4.2. DBP Genotipleme Sonuçları

Hasta ve kontrol grubuna ait kan örneklerinden elde edilen genomik DNA'dan, DBP geninin rs17467825, rs3755967, rs2282679, rs2298850, rs7041, rs1155563 bölgelerine özgü probler kullanılarak RT-PZR metodu ile erime noktaları hesaplanarak genotipleri tespit edildi.

DBP geninin rs17467825 bölgesine ait genotipler; Alzheimer hastalarının 27'sinde (%44,3) AA, 29'unda (%47,5) AG ve 5'inde (%8,2) GG olarak belirlendi. Kontrol grubunun ise 36'sının (%60,0) AA, 19'unun (%31,7) AG ve 5'inin (%8,3) GG genotipine sahip olduğu belirlendi (Tablo 4-1). Alzheimer hastalarının 83'ünün (%68,0) A alleli, 39'unun (%32,0) G alleli taşıdığı belirlendi. Kontrol grubunun ise 91'inin (%75,8) A alleli, 29'unun (%24,2) G alleli taşıdığı belirlendi (Tablo 4-2). Ancak hasta ve kontrol grupları arasında genotip dağılımları (Şekil 4-1,  $p=0,186$ ) veya allel dağılımları (Şekil 4-2,  $p=0,177$ ) açısından anlamlı bir fark bulunmadı.

**Tablo 4-1: Hasta ve kontrol gruplarında DBP geninin rs17467825 bölgesi genotip dağılımı**

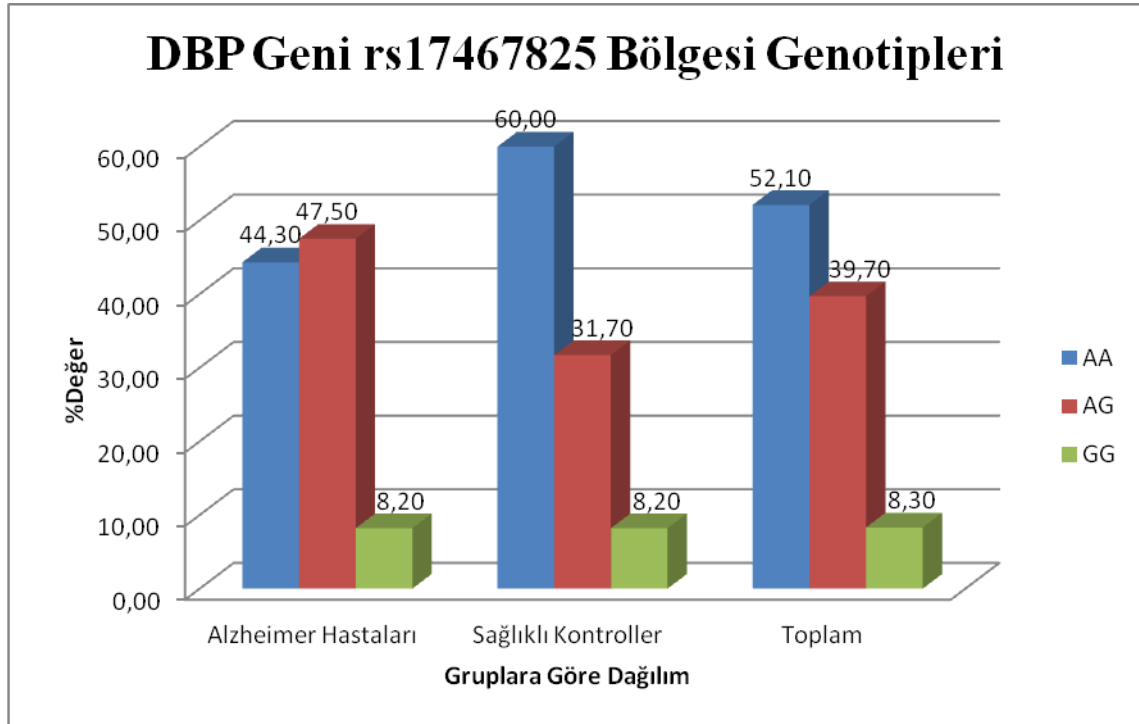
| rs17467825          | Genotip    |            |          |
|---------------------|------------|------------|----------|
|                     | AA         | AG         | GG       |
| Alzheimer Hastaları | 27 (%44,3) | 29 (%47,5) | 5 (%8,2) |
| Sağlıklı Kontroller | 36 (%60,0) | 19 (%31,7) | 5 (%8,2) |

$$\chi^2=3,361, p=0,186.$$

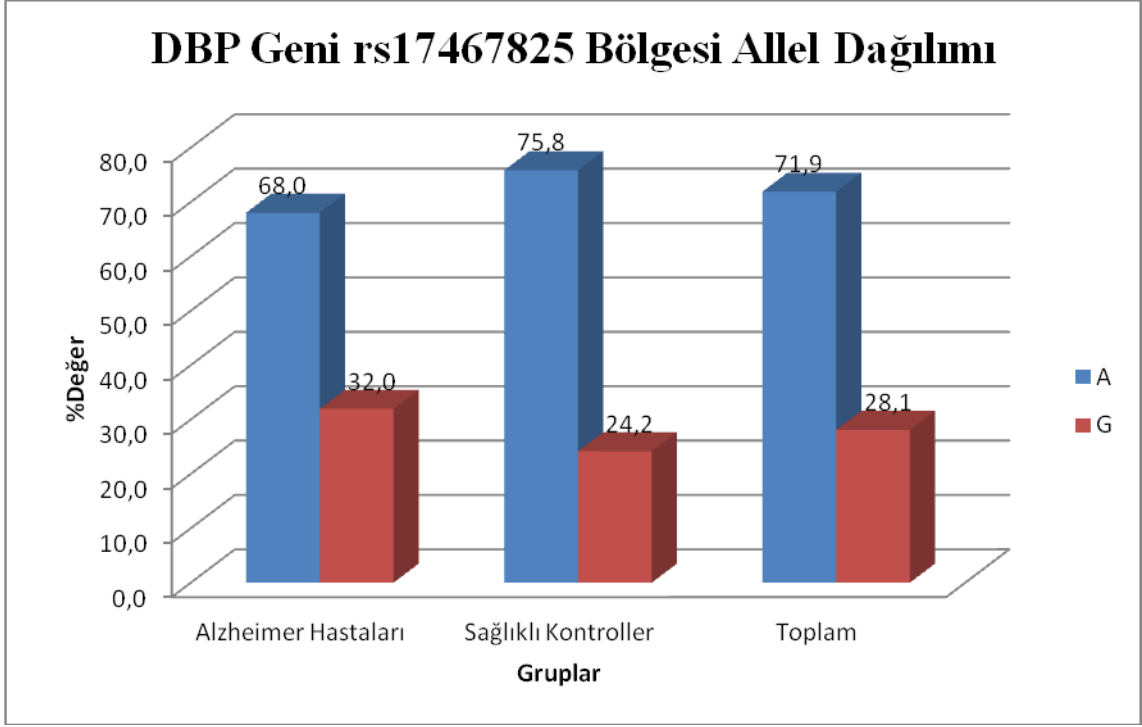
**Tablo 4-2: Hasta ve kontrol gruplarında DBP geninin rs17467825 bölgesi allel dağılımı**

| rs17467825          | Allel      |            |
|---------------------|------------|------------|
|                     | A          | G          |
| Alzheimer Hastaları | 83 (%68,0) | 39 (%32,0) |
| Sağlıklı Kontroller | 91 (%75,8) | 29 (%24,2) |

$$\chi^2= 1,82; p= 0,177$$



**Şekil 4-1: Hasta ve kontrol gruplarında DBP geninin rs17467825 bölgesi genotip dağılımı**



**Şekil 4-2: Hasta ve kontrol gruplarında DBP geninin rs17467825 bölgesi A ve G allelleri dağılımı**

DBP geninin rs2282679 bölgesi genotipleme sonucu; Alzheimer hastalarının 5'inin (%8,2) CC, 29'unun (%47,5) CA ve 27'sinin (%44,3) AA genotipine sahip olduğu belirlendi. Kontrol grubunun ise 7'sinin (%11,7) CC, 18'inin (%30,0) CA ve 35'inin (%58,3) AA genotipine sahip olduğu belirlendi (Tablo 4-3). Alzheimer hastalarının 39'unun (%32,0) C alleli, 83'ünün (%68,0) A alleli taşıdığı belirlendi. Kontrol grubunun ise 32'sinin (%26,7) C alleli, 88'inin (%73,3) A alleli taşıdığı belirlendi (Tablo 4-4). Ancak hasta ve kontrol grupları arasında genotip dağılımları (Şekil 4-3,  $p=0,140$ ) veya allel dağılımları (Şekil 4-4,  $p=0,365$ ) açısından anlamlı bir fark bulunmadı.

**Tablo 4-3: Hasta ve kontrol gruplarında DBP geninin rs2282679 bölgesi genotip dağılımı**

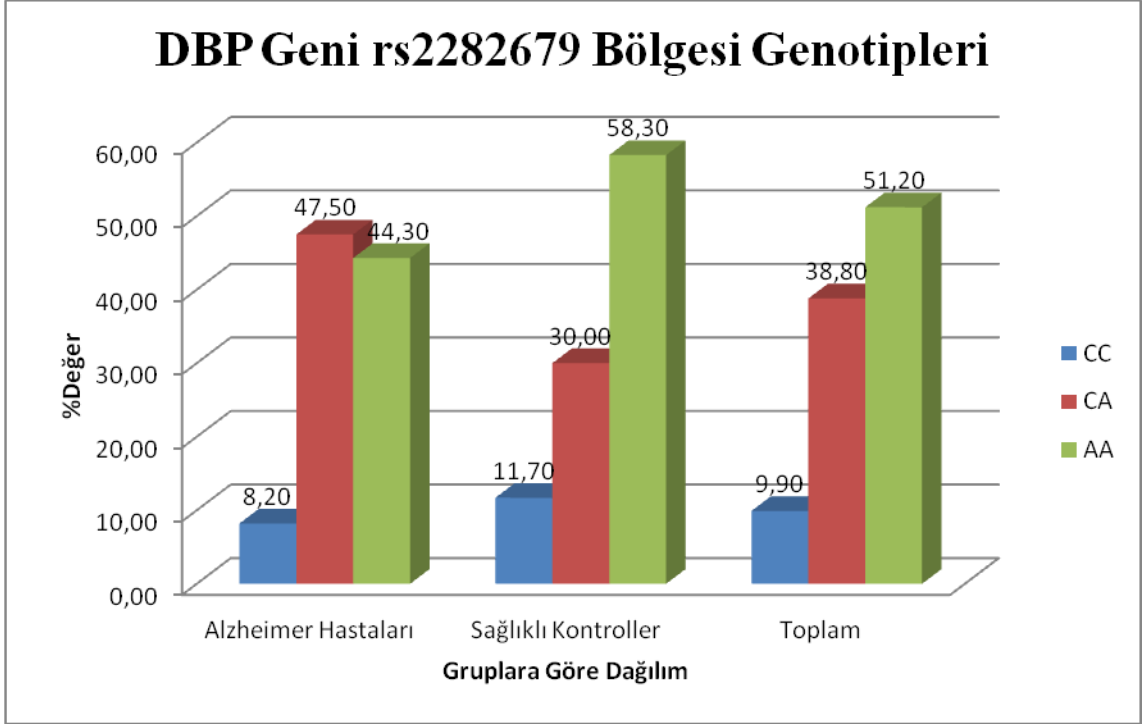
| rs2282679           | Genotip   |            |            |
|---------------------|-----------|------------|------------|
|                     | CC        | CA         | AA         |
| Alzheimer Hastaları | 5 (%8,2)  | 29 (%47,5) | 27 (%44,3) |
| Sağlıklı Kontroller | 7 (%11,7) | 18 (%30,0) | 35 (%58,3) |

$$\chi^2=3,932; p=0,140$$

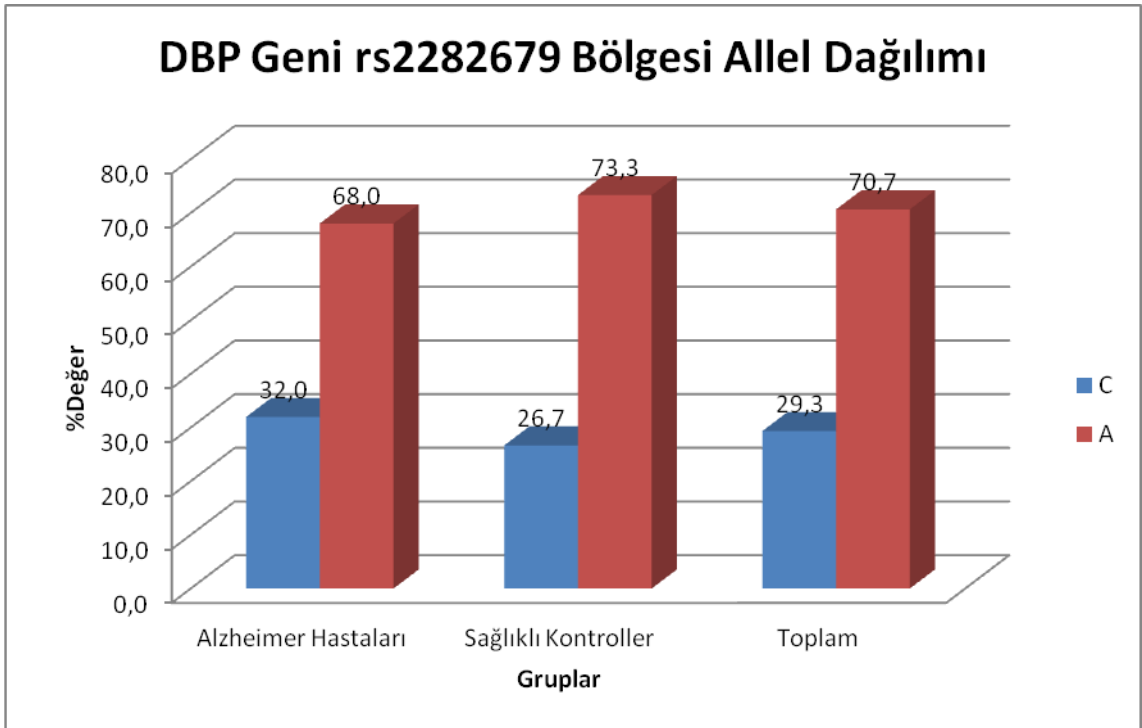
**Tablo 4-4: Hasta ve kontrol gruplarında DBP geninin rs2282679 bölgesi allel dağılımı**

| rs2282679           | Allel      |            |
|---------------------|------------|------------|
|                     | C          | A          |
| Alzheimer Hastaları | 39 (%32,0) | 83 (%68,0) |
| Sağlıklı Kontroller | 32 (%26,7) | 88 (%73,3) |

$$\chi^2=0,82; p=0,365$$



**Şekil 4-3: Hasta ve kontrol gruplarında DBP geninin rs2282679 bölgesi genotip dağılımı**



**Şekil 4-4: Hasta ve kontrol gruplarında DBP geninin rs2282679 bölgesi C ve A allelleri dağılımı.**

DBP geninin rs3755967 bölgesi genotipleme sonucu; Alzheimer hastalarının 27'sinin (%44,3) GG, 29'unun (%47,5) GA ve 5'inin (%8,2) AA genotipine sahip olduğu belirlendi. Kontrol grubunun ise 36'sının (%60,0) GG, 19'unun (%31,7) GA ve 5'inin (%8,3) AA genotipine sahip olduğu belirlendi (Tablo 4-5). Alzheimer hastalarının 83'ünün (%68,0) G alleli, 39'unun (%32,0) A alleli taşıdığı belirlendi. Kontrol grubunun ise 91'inin (%75,8) G alleli, 29'unun (%24,2) A alleli taşıdığı belirlendi (Tablo 4-6). Ancak hasta ve kontrol grupları arasında genotip dağılımları (Şekil 4-5,  $p=0,186$ ) veya allel dağılımları (Şekil 4-6,  $p=0,177$ ) açısından anlamlı bir fark bulunmadı.

**Tablo 4-5: Hasta ve kontrol gruplarında DBP geninin rs3755967 bölgesi genotip dağılımı**

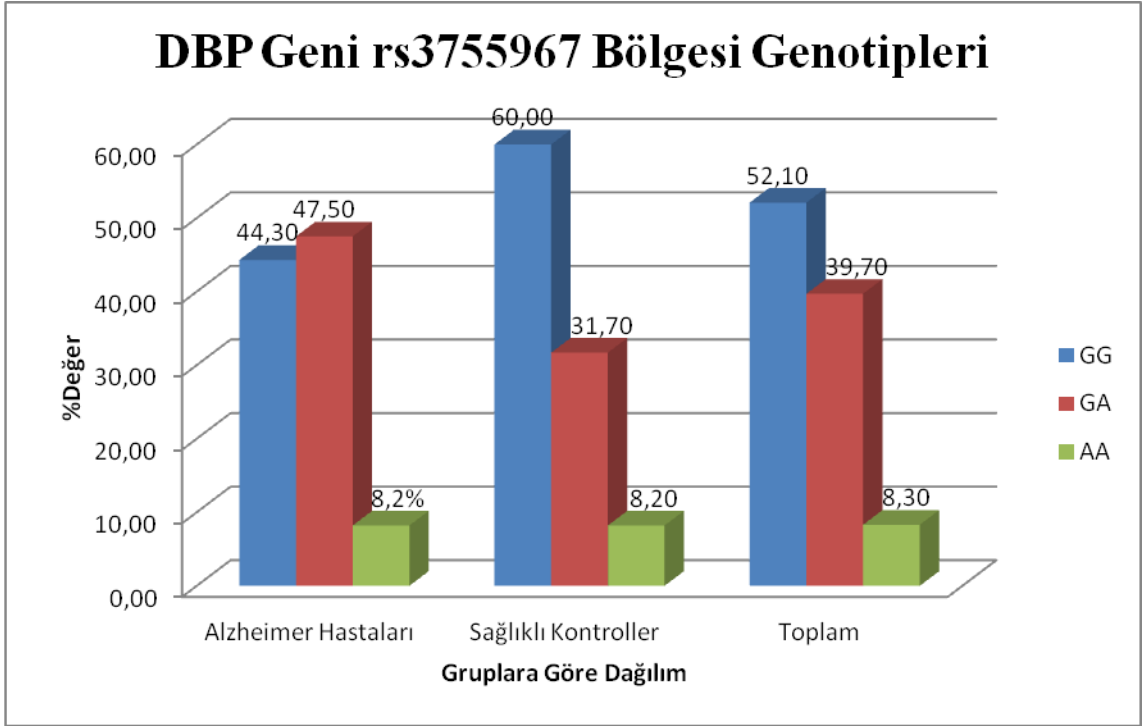
| rs3755967           | Genotip    |            |          |
|---------------------|------------|------------|----------|
|                     | GG         | GA         | AA       |
| Alzheimer Hastaları | 27 (%44,3) | 29 (%47,5) | 5 (%8,2) |
| Sağlıklı Kontroller | 36 (%60,0) | 19 (%31,7) | 5 (%8,2) |

$$\chi^2=3,361, p=0,186$$

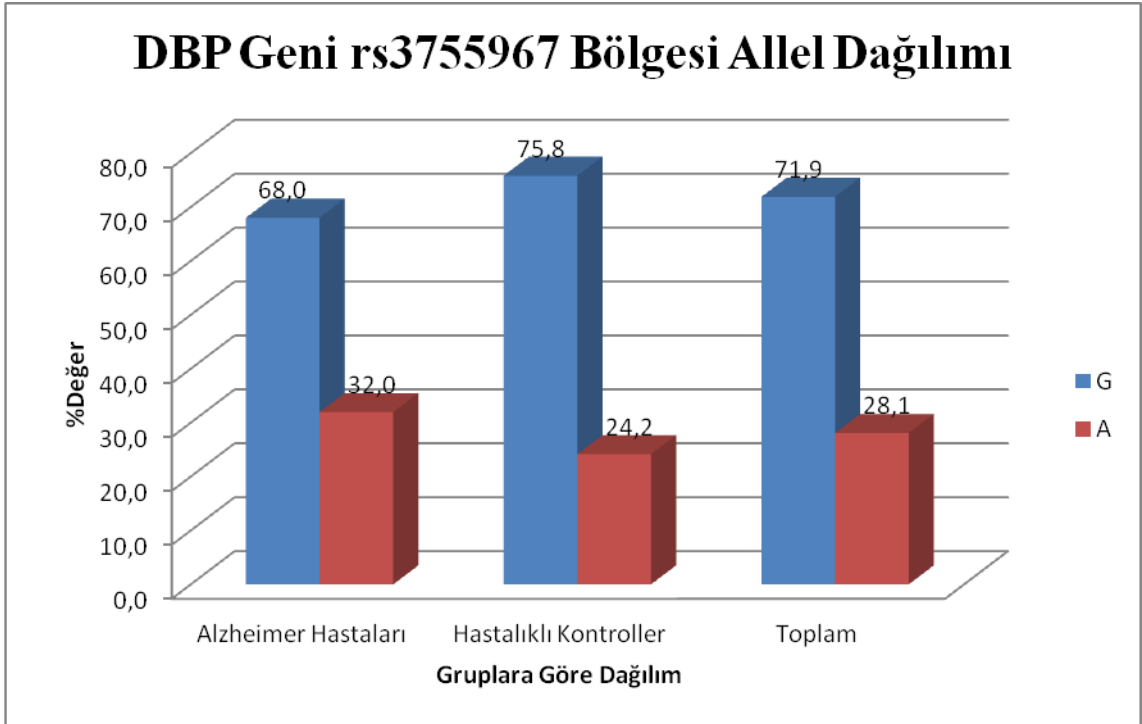
**Tablo 4-6: Hasta ve kontrol gruplarında DBP geninin rs3755967 bölgesi allel dağılımı**

| rs3755967           | Allel      |            |
|---------------------|------------|------------|
|                     | G          | A          |
| Alzheimer Hastaları | 83 (%68,0) | 39 (%32,0) |
| Sağlıklı Kontroller | 91 (%75,8) | 29 (%24,2) |

$$\chi^2= 1,82; p= 0,177$$



**Şekil 4-5: Hasta ve kontrol gruplarında DBP geninin rs3755967 bölgesi genotip dağılımı**



**Şekil 4-6: Hasta ve kontrol gruplarında DBP geninin rs3755967 bölgesi G ve A allelleri dağılımı.**

DBP geninin rs2298850 bölgesi genotipleme sonucu; Alzheimer hastalarının 27'sinin (%44,3) CC, 30'unun (%49,2) CG ve 4'ünün (%6,6) GG genotipine sahip olduğu belirlendi. Kontrol grubunun ise 36'sının (%60,0) CC, 21'inin (%35,0) CG ve 3'ünün (%5,0) GG genotipine sahip olduğu belirlendi (Tablo 4-7). Alzheimer hastalarının 84'ünün (%68,9) C alleli, 38'inin (%31,1) G alleli taşıdığı belirlendi. Kontrol grubunun ise 93'ünün (%77,5) C alleli, 27'sinin (%22,5) G alleli taşıdığı belirlendi (Tablo 4-8). Ancak hasta ve kontrol grupları arasında genotip dağılımları (Şekil 4-7,  $p=0,222$ ) veya allel dağılımları (Şekil 4-8,  $p=0,129$ ) açısından anlamlı bir fark bulunmadı.

**Tablo 4-7: Hasta ve kontrol gruplarında DBP geninin rs2298850 bölgesi genotip dağılımı**

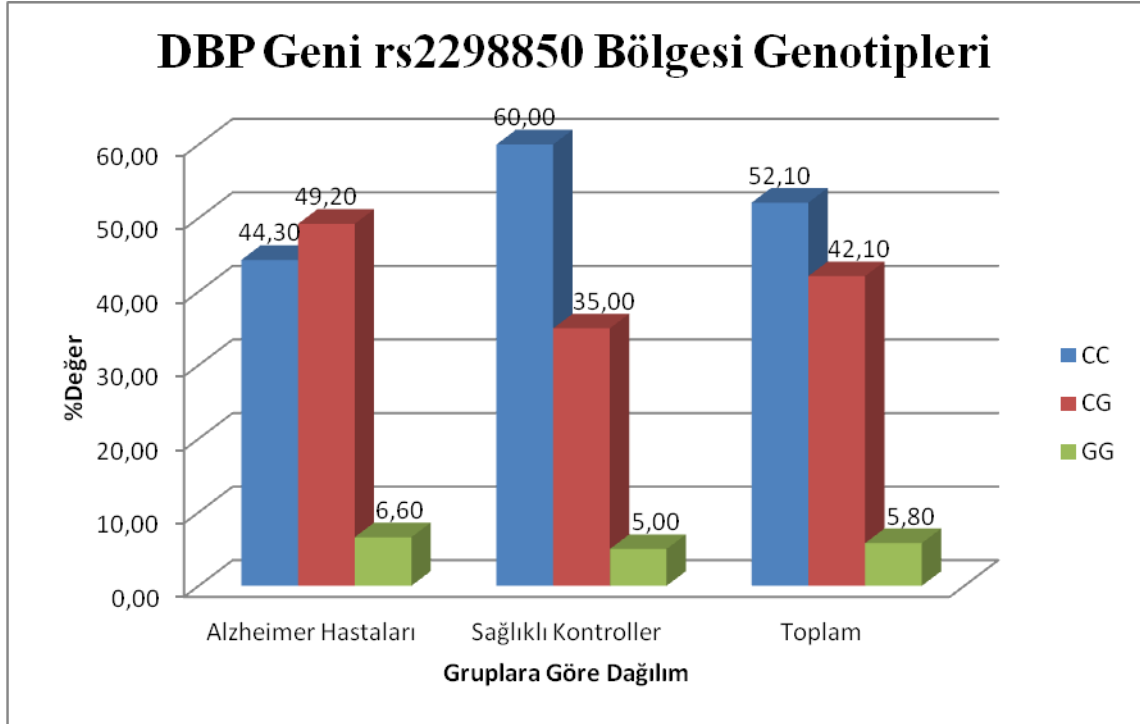
| rs2298850           | Genotip    |            |          |
|---------------------|------------|------------|----------|
|                     | CC         | CG         | GG       |
| Alzheimer Hastaları | 27 (%44,3) | 30 (%49,2) | 4 (%6,6) |
| Sağlıklı Kontroller | 36 (%60,0) | 21 (%35,0) | 3 (%5,0) |

$$\chi^2=3,009, p=0,222$$

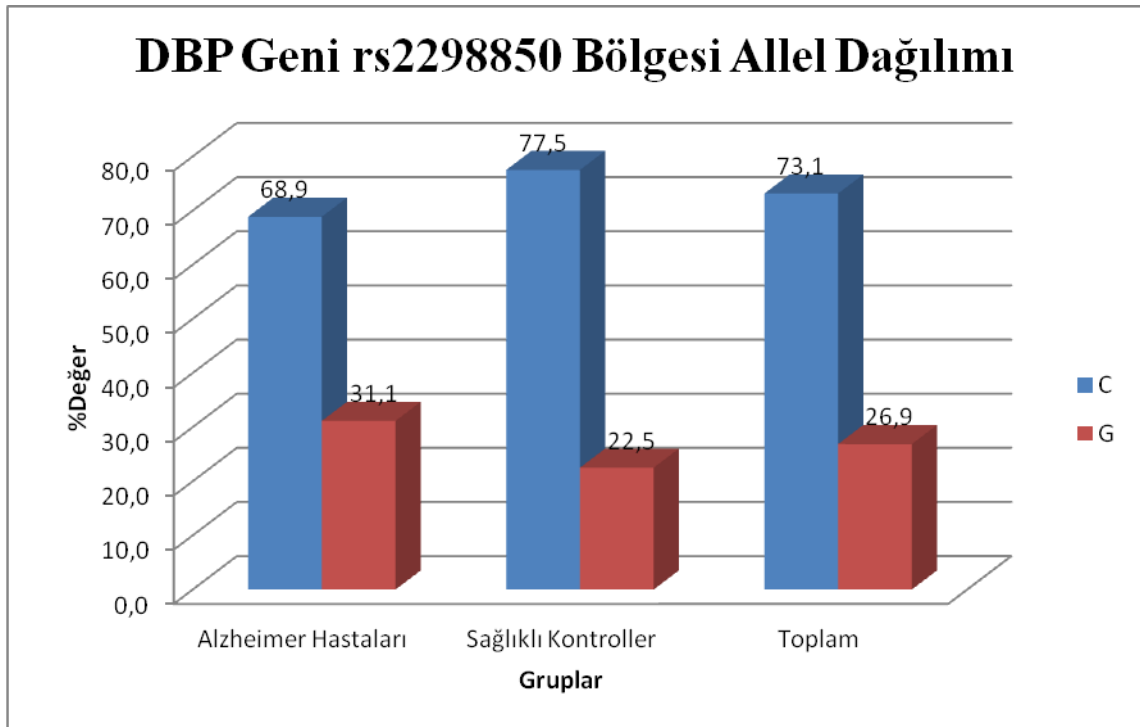
**Tablo 4-8: Hasta ve kontrol gruplarında DBP geninin rs2298850 bölgesi allel dağılımı**

| rs2298850           | Allel      |            |
|---------------------|------------|------------|
|                     | C          | G          |
| Alzheimer Hastaları | 84 (%68,9) | 38 (%31,1) |
| Sağlıklı Kontroller | 93 (%77,5) | 27 (%22,5) |

$$\chi^2=2,303; p=0,129$$



**Şekil 4-7: Hasta ve kontrol gruplarında DBP geninin rs2298850 bölgesi genotip dağılımı**



**Şekil 4-8: Hasta ve kontrol gruplarında DBP geninin rs2298850 bölgesi C ve G allelleri dağılımı.**

DBP geninin rs7041 bölgesi genotipleme sonucu; Alzheimer hastalarının 15'inin (%24,6) GG, 38'inin (%62,3) GT ve 8'inin (%13,1) TT genotipine sahip olduğu belirlendi. Kontrol grubunun ise 21'inin (%35,6) GG, 29'unun (%49,2) GT ve 9'unun (%15,3) TT genotipine sahip olduğu belirlendi (Tablo 4-9). Alzheimer hastalarının 68'inin (%55,7) G alleli, 54'ünün (%44,3) T alleli taşıdığı belirlendi. Kontrol grubunun ise 71'inin (%60,3) G alleli, 47'sinin (%39,8) T alleli taşıdığı belirlendi (Tablo 4-10). Ancak hasta ve kontrol grupları arasında genotip dağılımları (Şekil 4-9,  $p=0,327$ ) veya allel dağılımları (Şekil 4-10,  $p=0,487$ ) açısından anlamlı bir fark bulunmadı.

**Tablo 4-9: Hasta ve kontrol gruplarında DBP geninin rs7041 bölgesi genotip dağılımı**

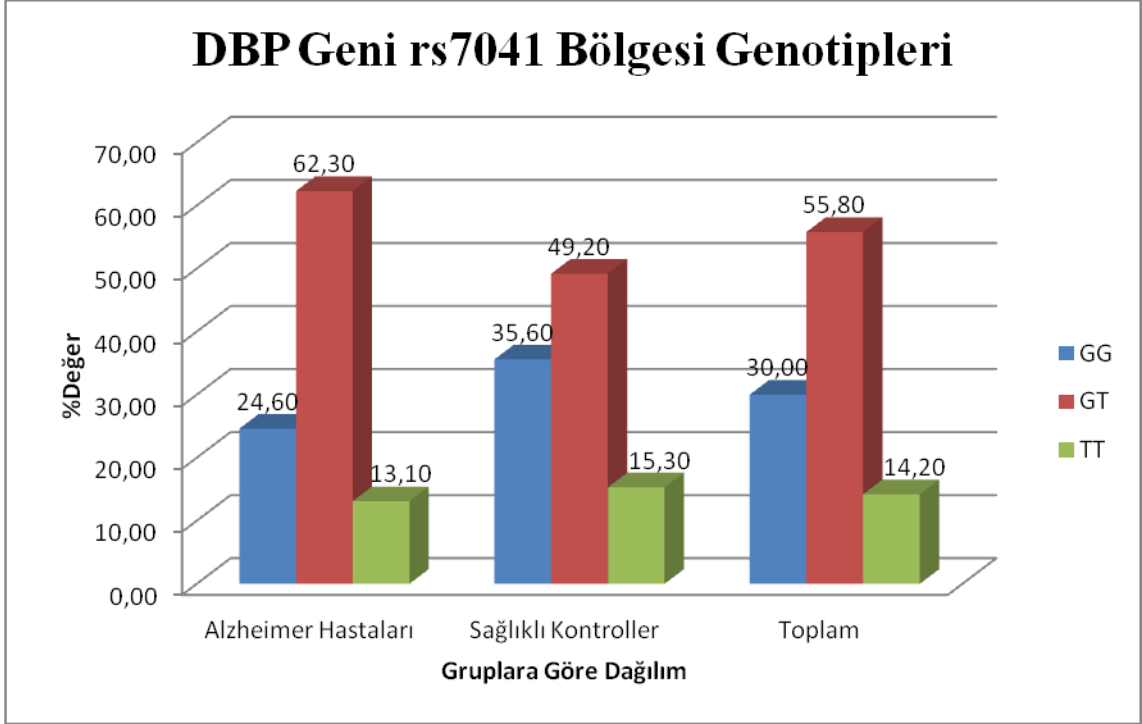
| rs7041              | Genotip    |            |           |
|---------------------|------------|------------|-----------|
|                     | GG         | GT         | TT        |
| Alzheimer Hastaları | 15 (%24,6) | 38 (%62,3) | 8 (%13,1) |
| Sağlıklı Kontroller | 21 (%35,6) | 29 (%49,2) | 9 (%15,3) |

$$\chi^2=2,235, p=0,327$$

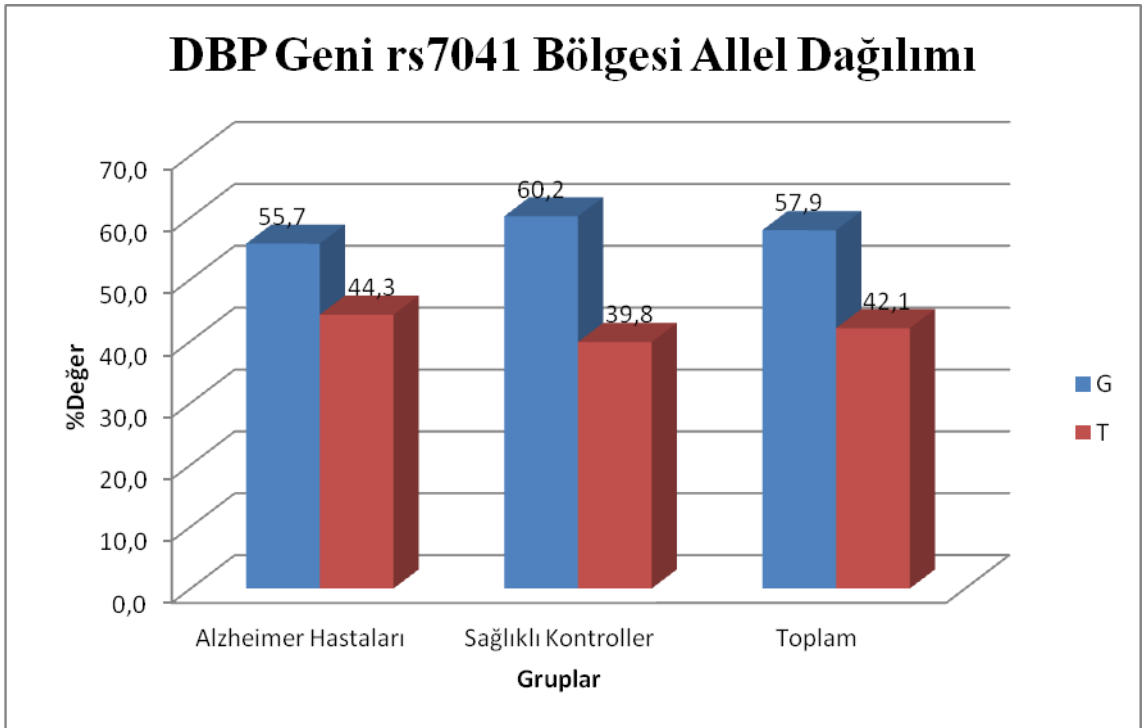
**Tablo 4-10: Hasta ve kontrol gruplarında DBP geninin rs7041 bölgesi allel dağılımı**

| rs7041              | Allel      |            |
|---------------------|------------|------------|
|                     | G          | T          |
| Alzheimer Hastaları | 68 (%55,7) | 54 (%44,3) |
| Sağlıklı Kontroller | 71 (%60,2) | 47 (%39,8) |

$$\chi^2=0,483; p=0,487$$



**Şekil 4-9: Hasta ve kontrol gruplarında DBP geninin rs7041 bölgesi genotip dağılımı**



**Şekil 4-10: Hasta ve kontrol gruplarında DBP geninin rs7041 bölgesi G ve T allelleri dağılımı.**

DBP geninin rs1155563 bölgesi genotipleme sonucu; Alzheimer hastalarının 25'inin (%41,0) TT, 29'unun (%47,5) TC ve 7'sinin (%11,5) CC genotipine sahip olduğu belirlendi. Kontrol grubunun ise 32'sinin (%53,3) TT, 23'ünün (%38,3) TC ve 5'inin (%8,3) TT genotipine sahip olduğu belirlendi (Tablo 4-11). Alzheimer hastalarının 79'unun (%64,8) T alleli, 43'ünün (%35,2) C alleli taşıdığı belirlendi. Kontrol grubunun ise 87'sinin (%72,5) T alleli, 33'ünün (%27,5) C alleli taşıdığı belirlendi (Tablo 4-12). Ancak hasta ve kontrol grupları arasında genotip dağılımları (Şekil 4-11,  $p=0,391$ ) veya allel dağılımları (Şekil 4-12,  $p=0,194$ ) açısından anlamlı bir fark bulunmadı.

**Tablo 4-11: Hasta ve kontrol gruplarında DBP geninin rs1155563 bölgesi genotip dağılımı**

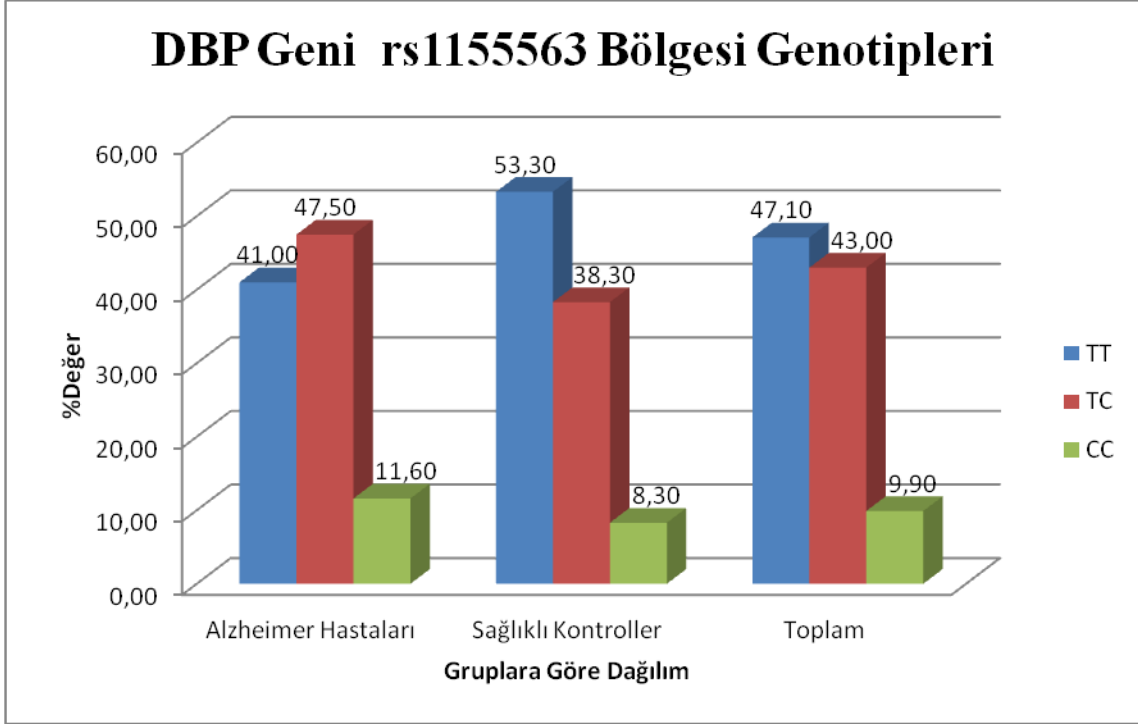
| rs1155563           | Genotip    |            |           |
|---------------------|------------|------------|-----------|
|                     | TT         | TC         | CC        |
| Alzheimer Hastaları | 25 (%41,0) | 29 (%47,5) | 7 (%11,6) |
| Sağlıklı Kontroller | 32 (%53,3) | 23 (%38,3) | 5 (%8,3)  |

$$\chi^2=1,877, p=0,391$$

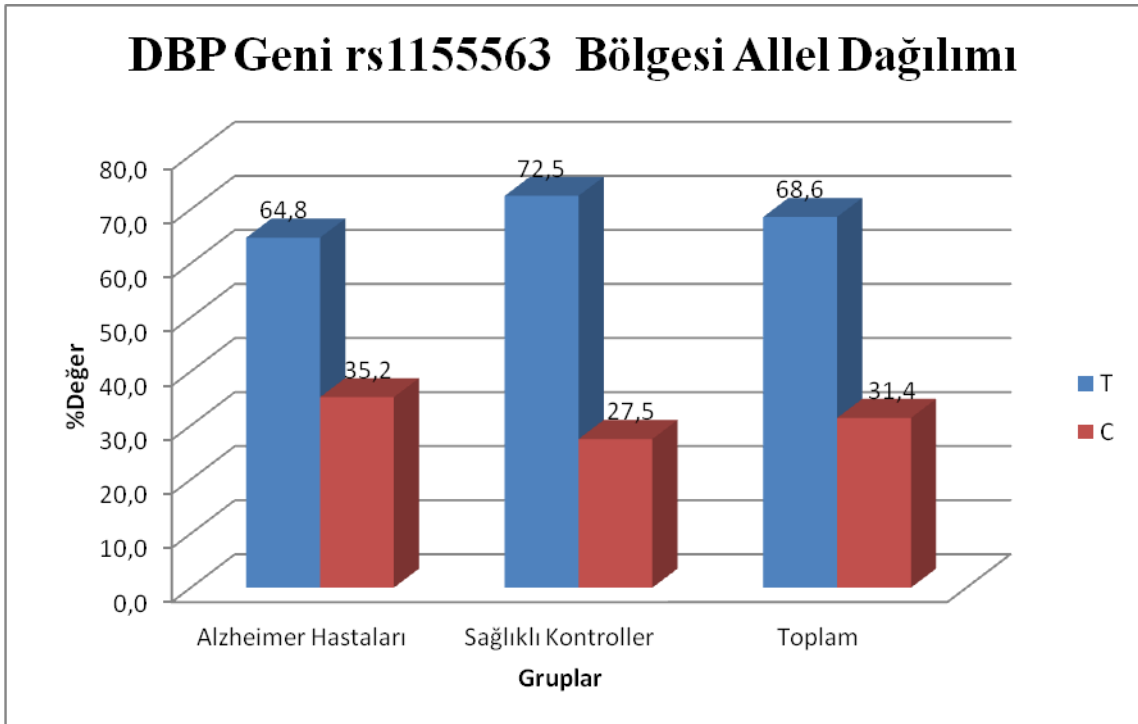
**Tablo 4-12: Hasta ve kontrol gruplarında DBP geninin rs1155563 bölgesi allel dağılımı**

| rs1155563           | Allel      |            |
|---------------------|------------|------------|
|                     | T          | C          |
| Alzheimer Hastaları | 79 (%64,8) | 43 (%35,2) |
| Sağlıklı Kontroller | 87 (%72,5) | 33 (%27,5) |

$$\chi^2=1,685; p=0,194$$



**Şekil 4-11: Hasta ve kontrol gruplarında DBP geninin rs1155563 bölgesi genotip dağılımı**



**Şekil 4-12: Hasta ve kontrol gruplarında DBP geninin rs1155563 bölgesi T ve C allelleri dağılımı.**

### 4.3. ApoE Genotipleme Sonuçları

Hastaların ve kontrollerin ApoE genotipi analizleri  $\epsilon 4$  alleli taşıyıp taşımadıklarına göre yapıldı. Alzheimer hastalarının 44'ünde (%69,8)  $\epsilon 2/\epsilon 2$ ,  $\epsilon 2/\epsilon 3$  -  $\epsilon 3/\epsilon 3$  genotipi, 19'unda (%30,2)  $\epsilon 2/\epsilon 4$  -  $\epsilon 3/\epsilon 4$  -  $\epsilon 4/\epsilon 4$  genotipi saptandı. Kontrol grubunun ise 47'sinde (%81,0)  $\epsilon 2/\epsilon 2$ ,  $\epsilon 2/\epsilon 3$  -  $\epsilon 3/\epsilon 3$  genotipi, 11'inde (%19,0)  $\epsilon 2/\epsilon 4$  -  $\epsilon 3/\epsilon 4$  -  $\epsilon 4/\epsilon 4$  genotipi saptandı. Ancak hasta ve kontrol grupları arasında genotip dağılımları açısından anlamlı bir fark bulunmadı (Tablo 4-13) (Şekil 4-13,  $p=0,126$ ). Alzheimer hastalarının 2'sinin (%1,64)  $\epsilon 2$  alleli, 100'ünün (%81,97)  $\epsilon 3$  alleli, 20'sinin (%16,39)  $\epsilon 4$  alleli taşıdığı belirlendi. Kontrol grubunun ise 11'inin (%9,17)  $\epsilon 2$  alleli, 97'sinin (%80,83)  $\epsilon 3$  alleli, 12'sinin (%10,0)  $\epsilon 4$  alleli taşıdığı belirlendi (Tablo 4-14) (Şekil 4-14). Hasta ve kontrol grupları arasında allel dağılımları açısından anlamlı bir fark olduğu bulundu ( $p=0,013$ ). Farkın  $\epsilon 2$  allelinden kaynaklandığı tespit edildi.

**Tablo 4-13: Hasta ve kontrol gruplarında ApoE genotiplerinin dağılımı**

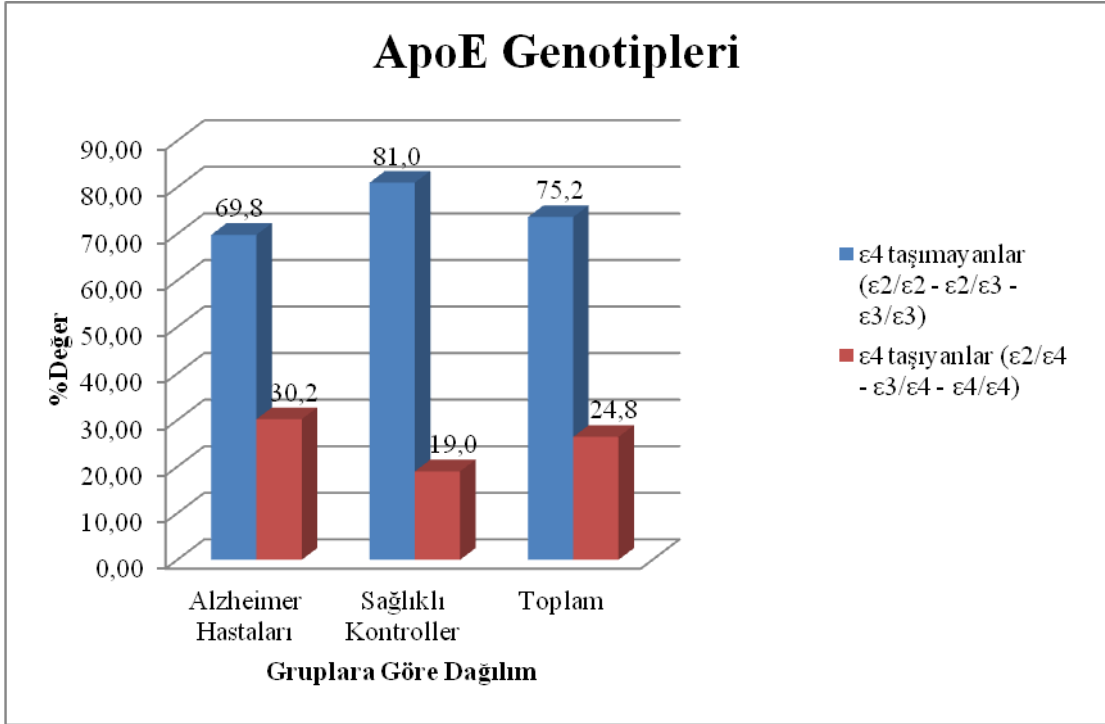
| ApoE                | Genotip                                                                     |                                                                             |
|---------------------|-----------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------|
|                     | $\epsilon 2/\epsilon 2$ - $\epsilon 2/\epsilon 3$ - $\epsilon 3/\epsilon 3$ | $\epsilon 2/\epsilon 4$ - $\epsilon 3/\epsilon 4$ - $\epsilon 4/\epsilon 4$ |
| Alzheimer Hastaları | 44 (%69,8)                                                                  | 19 (%30,2)                                                                  |
| Sağlıklı Kontroller | 47 (%81)                                                                    | 11 (%19)                                                                    |

$$\chi^2=2,340; p=0,126$$

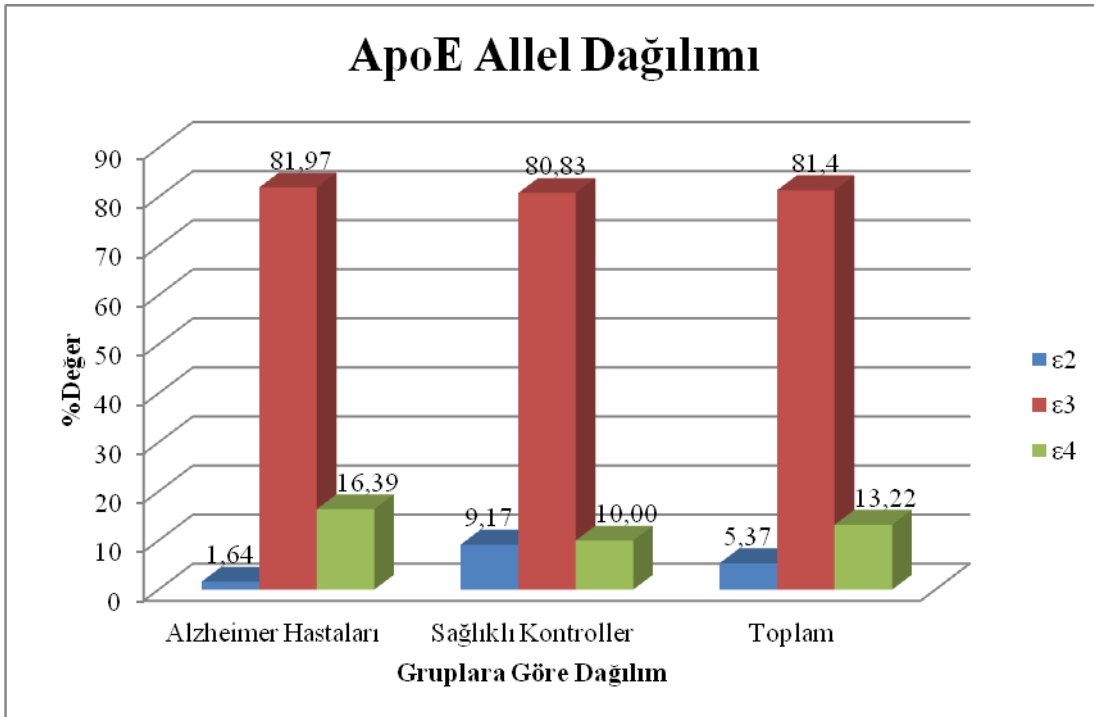
**Tablo 4-14: Hasta ve kontrol gruplarında ApoE allellerinin dağılımı**

| ApoE                | Allel        |              |              |
|---------------------|--------------|--------------|--------------|
|                     | $\epsilon 2$ | $\epsilon 3$ | $\epsilon 4$ |
| Alzheimer Hastaları | 2 (%1,64)    | 100 (%81,97) | 20 (%16,39)  |
| Sağlıklı Kontroller | 11 (%9,17)   | 97 (%80,83)  | 12 (%10,0)   |

$$\chi^2=6,110; p=0,013 \text{ (Fark } \epsilon 2 \text{ allelinden kaynaklanmaktadır.)}$$



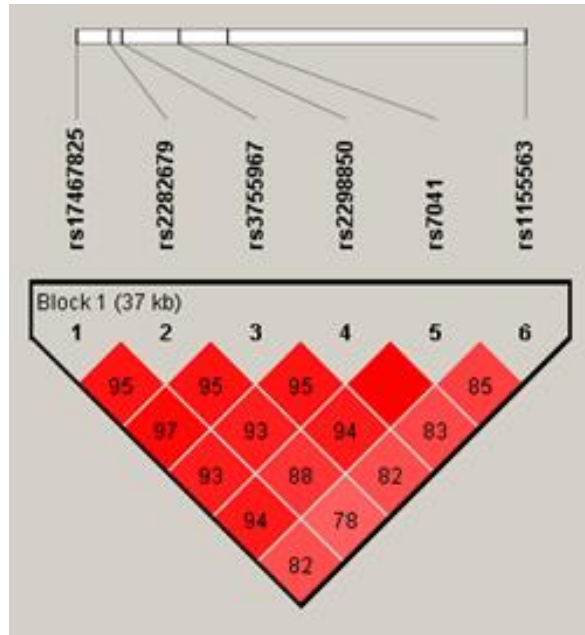
**Şekil 4-13: Hasta ve kontrol gruplarında ApoE genotip dağılımı**



**Şekil 4-14: Hasta ve kontrol gruplarında ApoE geninin ε2, ε3, ε4 allellerinin dağılımı.**

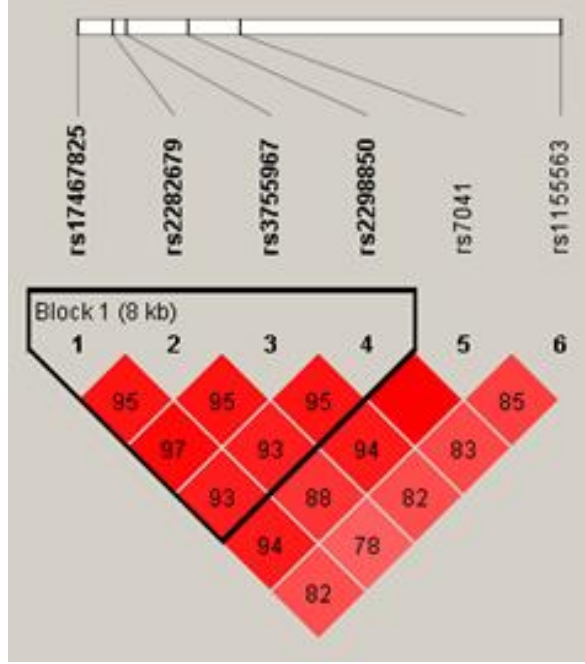
#### 4.4. Haplotip Analizi Sonuçları

Hasta ve kontrol gruplarında DBP genine ait tek nükleotid polimorfizmi gösteren bölgeler iki ayrı şekilde değerlendirildi. Önce 6 SNP'nin hepsi haplotip sıklığı için analiz edildi (Tablo 4-15). 6 SNP'nin birlikte analiz edilmesi sonucu "ACGCGT" haplotipini taşıyan kontrol bireylerinin hastalara göre daha fazla olduğu ve bunun da istatistiksel olarak yakın anlamlı olduğu bulunmuştur ( $p=0,0783$ ). 6 SNP'ye ait Bağlantı Eşitsizliği Analizi sonuçları Şekil 4-15'te gösterilmiştir. Kromozomdaki konumları nedeniyle birlikte kalıtılma olasılığı diğerlerine göre düşük olan 2 SNP'nin (rs7041 ve rs1155563) analizden çıkarılması ve tekrar analiz yapılması sonucu hasta ve kontrol grupları karşılaştırıldığında, "ACGC" haplotipinin kontrol grubunda anlamlı derecede yüksek bulunduğu saptandı (Tablo 4-16) ( $p=0,0409$ ). 4 SNP'ye ait Bağlantı Eşitsizliği Analizi Şekil 4-16'te gösterilmiştir.



**Şekil 4-15: DBP geninde incelenen 6 SNP için İkili Bağlantı Eşitsizliği Analizi Sonuçları**

(Koyu olan bölgeler iki bölge arasında birlikte kalıtılma olasılığının yüksek olduğunu ( $r^2$  değerinin yüksek olduğunu) göstermektedir. ( $r^2$ değeri, iki bölge arasındaki korelasyon katsayısıdır).



**Şekil 4-16: DBP geninde incelenen 4 SNP için İkili Bağlantı Eşitsizliği Analizi Sonuçları.**

(Koyu olan bölgeler  $r^2$  değerinin yüksek olduğunu göstermektedir).

**Tablo 4-15: Hasta ve kontrollerde DBP genine ait 6 SNP'nin haplotip analizi**

| Haplotip | Hasta | Kontrol | $\chi^2$ | $p$ Değeri |
|----------|-------|---------|----------|------------|
| AAGCGT   | 0.499 | 0.556   | 0.803    | 0.3701     |
| GCAGTC   | 0.269 | 0.202   | 1.494    | 0.2216     |
| AAGCTT   | 0.090 | 0.136   | 1.254    | 0.2629     |
| AAGCGC   | 0.042 | 0.011   | 2.171    | 0.1406     |
| GCAGTT   | 0.034 | 0.009   | 1.655    | 0.1983     |
| AAGCTC   | 0.024 | 0.008   | 1.002    | 0.3169     |
| ACGCGT   | 0.000 | 0.025   | 3.099    | 0.0783     |
| GCACTC   | 0.008 | 0.017   | 0.373    | 0.5416     |

**Tablo 4-16: Hasta ve kontrollerde DBP genine ait 4 SNP'nin haplotip analizi**

| Haplotip | Hasta | Kontrol | $\chi^2$ | <i>p</i> Değeri |
|----------|-------|---------|----------|-----------------|
| AAGC     | 0,655 | 0,712   | 0,876    | 0,3493          |
| GCAG     | 0,303 | 0,212   | 2,612    | 0,1061          |
| GCAC     | 0,008 | 0,026   | 1,069    | 0,3013          |
| ACGC *   | 0,000 | 0,034   | 4,179    | 0,0409          |

Hasta ve kontrol gruplarında DBP genine ait SNP bölgeleri ve ApoE geninin allel sıklıkları iki ayrı şekilde değerlendirildi. 6SNP'ye ait haplotipler ile ApoE'nin allel sıklıkları karşılaştırıldı. Hasta ve kontrol grupları arasında anlamlı bir fark bulunamadı. Ancak  $\epsilon 3$  alleli taşıyan ve aynı zamanda "ACGCGT" haplotipini taşıyanların kontrol grubunda hastalara göre daha fazla olduğu saptandı. Bu fazlalığın istatistiksel olarak yakın anlamlı olduğu saptandı (Tablo 4-17,  $p=0,0595$ ). Kromozomdaki konumları nedeniyle birlikte kalıtımla olasılığı diğerlerine göre düşük olan 2 SNP'nin (rs7041 ve rs1155563) analizden çıkarılarak geri kalan 4 bölge ve ApoE'nin allel sıklıkları analiz edildiğinde,  $\epsilon 3$  alleli taşıyan ve aynı zamanda "ACGC" haplotipini taşıyan kontrol örneklerinin hastalara göre anlamlı derecede yüksek olduğu saptandı (Tablo 4-18,  $p=0,0288$ ).

**Tablo 4-17: DBP geninin 6 SNP'sine ait haplotipler ile ApoE allellerinin hasta ve kontrollerde karşılaştırılması**

| Haplotip | ApoE alleleri | Hasta | Kontrol | $\chi^2$ | <i>p</i> Değeri |
|----------|---------------|-------|---------|----------|-----------------|
| AAGCGT   | $\epsilon 3$  | 0,427 | 0,474   | 0,484    | 0,4866          |
| GCAGTC   | $\epsilon 3$  | 0,206 | 0,183   | 0,176    | 0,6748          |
| AAGCTT   | $\epsilon 3$  | 0,091 | 0,131   | 0,92     | 0,3374          |
| AAGCGT   | $\epsilon 4$  | 0,066 | 0,055   | 0,114    | 0,7358          |
| GCAGTC   | $\epsilon 4$  | 0,064 | 0,026   | 1,759    | 0,1847          |
| AAGCGC   | $\epsilon 3$  | 0,049 | 0,011   | 2,616    | 0,1058          |
| ACGCGT   | $\epsilon 3$  | 0,000 | 0,030   | 3,55     | 0,0595          |
| GCACTC   | $\epsilon 3$  | 0,008 | 0,020   | 0,53     | 0,4667          |
| AAGCTT   | $\epsilon 4$  | 0,008 | 0,018   | 0,488    | 0,4847          |
| GCAGTT   | $\epsilon 4$  | 0,023 | 0,000   | 2,254    | 0,1333          |
| GCAGTT   | $\epsilon 3$  | 0,012 | 0,011   | 0,014    | 0,9055          |

**Tablo 4-18: DBP geninin 4 SNP'sinin ait haplotipler ile ApoE allellerinin hasta ve kontrollerde karşılaştırılması**

| Haplotip | ApoE alleleri | Hasta | Kontrol | $\chi^2$ | <i>p</i> Değeri |
|----------|---------------|-------|---------|----------|-----------------|
| AAGC     | $\epsilon 3$  | 0,577 | 0,617   | 0,352    | 0,5533          |
| GCAG     | $\epsilon 3$  | 0,218 | 0,193   | 0,204    | 0,6515          |
| AAGC     | $\epsilon 4$  | 0,075 | 0,073   | 0,003    | 0,9554          |
| GCAG     | $\epsilon 4$  | 0,080 | 0,027   | 3,497    | 0,0615          |
| GCAC     | $\epsilon 3$  | 0,009 | 0,030   | 1,366    | 0,2425          |
| ACGC *   | $\epsilon 3$  | 0,000 | 0,040   | 4,782    | 0,0288          |

## 5. TARTIŞMA

Alzheimer Hastalığı'nın en yaygın görülen şekli olan geç başlangıçlı Alzheimer Hastalığı (GBAH), genetik olarak tek genli Mendel tipi kalıtım gösteren erken başlangıçlı Alzheimer Hastalığı'na göre daha karmaşıktır [2]. Çok sayıda gendeki risk allelerin etkisiyle oluşur. Bu nedenle, geç başlangıçlı Alzheimer Hastalığı ile ilgili risk genlerinin belirlenmesi, hastalığın teşhisi, hastalıktan korunmak ve hastalığa ait yeni tedavi yaklaşımlarının bulunması açısından önemlidir.

ApoE geni  $\epsilon 4$  allelinin geç başlangıçlı Alzheimer hastalığı için önemli bir risk faktörü olduğu yapılan çalışmalarla tekrarlayan şekilde gösterilmiştir [25, 46, 52]. Bununla birlikte  $\epsilon 4$  alleli tek başına hastalık oluşması için yeterli değildir ve GBAH ile ilgili diğer risk genlerinin bulunması için yoğun araştırmalar yapılmaktadır. Biz de bu çalışmada Vitamin D Bağlayan Protein (DBP) geni polimorfizmlerinin GBAH ile ilişkisini inceledik.

Vitamin D yetersizliği gelişmiş ülkelerdeki yetişkinlerin yarısını etkiler. Yetersiz vitamin D'nin iskelet sistemi üzerindeki etkileri iyi bilinmektedir. Öte yandan vitamin D yetmezliği giderek artan sayıda farklı hastalık ile ilişkilendirilmektedir [23].

Dolaşımdaki 25(OH)D<sub>3</sub> seviyesini belirleyen faktörler güneş ışınlarına maruz kalma düzeyi ve beslenme şeklidir. Ancak vitamin D seviyesinin ileri derecede kalıtsal bir özellik oluşu genetik faktörlerin de rol oynadığını göstermektedir [23].

Son senelerde vitamin D konsantrasyonunu belirleyen genetik varyantları ortaya çıkararak vitamin D yetersizliği riskini saptayabilmek amacıyla çeşitli çalışmalar yapılmıştır [23].

Vitamin D başlıca, kalsiyum ve fosfat metabolizmasında, kemik oluşumunda ve devamlılığında görev almakla birlikte, son yıllarda sinir sistemi üzerinde de önemli etkileri olduğu gösterilmiştir [58, 59, 62, 63]. Hormonal olarak aktif metaboliti olan 1,25-dihidroksivitamin D'nin üretimi için substrat olan öncül vitamin D formu kan plazmasında bulunur [56, 57]. Beyindeki 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> miktarının 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>'ün plazma konsantrasyonuna bağlı olduğu ileri sürülmüştür. Ancak vitamin D metabolizmasına katılan 25-OH<sub>2</sub> ve 25-(OH)D<sub>3</sub>-1 $\alpha$ -OH<sub>2</sub> enzimlerinin beyinde bulunduğunu gösteren son çalışmalar merkezi sinir sisteminin bölgesel olarak vitamin D<sub>3</sub> hormonunun biyoaktivasyonunu gerçekleştirebildiğini göstermiştir [64].

Yapılan çalışmalarda, vitamin D'nin nörotrofik faktör üretimini,  $Ca^{+2}$  homeostazını ve bağışıklık sistemi fonksiyonlarını düzenlediği ve oksidatif stresi engellediği gösterilmiştir [13, 18, 64, 68, 83].

Vitamin D etkisini nükleer steroid hormon reseptör ailesinden olan Vitamin D Reseptörü'ne (VDR) bağlanarak gösterir ve 1000'den fazla genin anlatımının düzenlenmesini sağlar. VDR mRNA ve proteininin merkezi sinir sisteminde bulunduğu bildirilmiştir. Bu çalışmalarda VDR'nin hem nöronlarda hem de glia hücrelerinde ifade edildiği gösterilmiştir [13, 66, 84]. Alzheimer Hastalarının hippocampusunda VDR mRNA seviyesinin düştüğü gösterilmiştir [13, 18, 64, 68, 83]. Ayrıca VDR geni polimorfizmlerinin geç başlangıçlı Alzheimer hastalığı ile ilişkili olduğunu gösteren araştırmalar vardır [2]. Epidemiyolojik çalışmalarla ise vitamin D serum seviyesiyle kognitif performans arasında bir bağlantı olduğu bildirilmiştir [83].

Anabilim Dalımızda yapılmış olan çalışmalarla vitamin D-VDR yoluyla ile nörodejenerasyon ve Alzheimer Hastalığı arasındaki ilişki gösterilmiştir [18, 65].

Vitamin D ve onun metabolitleri, dolaşımda, vitamin D bağlayan proteine (DBP) bağlanarak taşınırlar [85]. DBP, vitamin D'nin çeşitli doku ve hücre tiplerine ulaşımını kolaylaştırır ve organizma için kullanılabilir vitamin D miktarını da düzenler [74].

Dolaşımdaki  $25(OH)D_3$  ve  $1,25(OH)_2D_3$ 'nin sağlıklı bireylerin merkezi sinir sistemine erişebilmesini sağlayan çeşitli mekanizmalar vardır. "Serbest hormon hipotezi", bağlayıcı proteinlerin, dolaşımdaki steroidleri biyolojik olarak inaktif durumda tuttuğunu ve hücrelere difüzyonla girebilen serbest steroid hormonların dolaşımdaki konsantrasyonunu düzenlediğini ileri sürmektedir. Vitamin D-DBP kompleksinin birçok dokuda özgün transport mekanizmalarıyla hedef hücrelere taşındığı gösterilmiştir [86].

İnsanlarda DBP (GC) geninde en sık rastlanan polimorfizmler, bu proteini kodlayan genin 11. ekzon bölgesindeki 416'nci ve 420'inci kodonlardaki amino asit değişimlerinden kaynaklanan polimorfizmlerdir. Bu polimorfizmler sonucunda proteinin Gc1F, Gc1S, Gc2 ve GcU olmak üzere dört farklı izoformu oluşmaktadır. Bu allele ek olarak GC geninde 124'ten fazla allel varyantı tarif edilmiştir. Bu durum DBP lokusunun en polimorfik bölgelerden biri olarak bilinmesine neden olur. Yapılan çeşitli çalışmalarda,  $25(OH)D_3$  ve  $1,25(OH)_2D_3$ 'ün plazma konsantrasyonlarındaki değişiklikler ile GC fenotipleri arasındaki ilişki araştırılmıştır. Bu genin bazı tek

nükleotid polimorfizmlerinin 25(OH)D<sub>3</sub> konsantrasyonlarıyla ilişkili olduğu bulunmuştur [74, 75, 87]. Wang ve ark. tarafından yapılan Genom Çapında İlişki çalışmasında 3 farklı gene ait 18 SNP ile vitamin D düzeyleri karşılaştırılmıştır. DBP genindeki rs7041 polimorfizmleri ile dolaşımdaki 25(OH)D<sub>3</sub>'ün seviyesi arasındaki ilişki bulunduğu gösterilmiştir. Yine bu çalışmada DBP'nin de içinde bulunduğu 3 genin genetik varyasyonlarının vitamin D eksikliği riskini arttırdığı gösterilmiştir [23].

25(OH)D<sub>3</sub>'nin düşük konsantrasyonları ile ilişkili olan DBP varyantlarının Vitamin D Bağlayan Protein konsantrasyonunun düşmesiyle de ilişkili olduğu gösterilmiştir. Yapılan çalışmalarla DBP nakavt farelerde 25(OH)D<sub>3</sub> ve 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>'ün serum konsantrasyonlarının yabani tip farelere göre anlamlı derecede düşük olduğu gözlenmiştir. Vitamin D Bağlayan Protein konsantrasyonunun 25(OH)D<sub>3</sub> ve 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>'ün hedef organlara taşınmasını etkilediği, ancak, dolaşıma katılan DBP miktarındaki farklılığın vitamin D metabolizmasını ve vitamin D kullanılabilirliğini etkileyip etkilemediği çok iyi bilinmemektedir [77, 87-90].

Güney Brezilya'daki sağlıklı kız çocuklarında yapılan çalışmada, DBP geni rs7041 ve rs4588 polimorfizmleri ve "AT" haplotipinin 25(OH)D<sub>3</sub>'nin düşük seviyesiyle ilişkili olduğu gösterilmiştir [91]. 750 sağlıklı bebek ve çocukta yapılmış olan diğer bir çalışmada rs7041 polimorfizmiyle dolaşımdaki düşük 25(OH)D<sub>3</sub> seviyeleri arasında ilişki bulunamamıştır [92]. Çin toplumundaki yetişkin ve yaşlılar üzerinde yapılan bir çalışmada DBP geni rs7041 polimorfizmiyle düşük 25(OH)D<sub>3</sub> seviyeleri arasında anlamlı bir ilişki bulunmuştur [93]. Benzer sonuçlar Kanadalı genç yetişkinler [85] ve yaşlı beyaz ırkta da bulunmuştur [94].

Çevresel ve genetic faktörlerle değişen DBP aktivitesinin kan ve kemikteki kalsiyum metabolizmasının düzenlenmesi ile birlikte osteoporoz patolojisinin gelişimine sebep olabileceği düşünülmüştür [94].

Yapılan çalışmalar, kan beyin bariyerinin bozulmasının DBP-bağlı vitamin D metabolitlerinin merkezi sinir sistemine taşınmasını kolaylaştırdığını göstermiştir. Çeşitli proteomik çalışmalar bununla uyumlu olarak multiple skleroz hastalarının beyin omurilik sıvılarında DBP seviyesinin arttığını göstermiştir. DBP'nin beyin omurilik sıvısındaki seviyesinin multiple skleroz hastalarında kan beyin bariyerinin bütünlüğünü gösteren bir biyoışaretleyici olarak kullanılabileceğini bildirmiştir [86].

Alzheimer hastalarında yapılan bir proteomik çalışmasında DBP'nin de aralarında bulunduğu 30 kadar proteinin plazmadaki düzeyinin azaldığı gösterilmiştir. Ayrıca Alzheimer hastalarının Beyin-Omurilik Sıvısı'nda (BOS) da DBP seviyelerinin azaldığı gösterilmiştir. Düşük DBP seviyelerinin kadınlarda kognitif gerileme riskini arttırdığı bildirilmiştir [95].

Bunların yanında Vitamin D Bağlayan Protein polimorfizmi ile Grave's Hastalığı, AIDS, diyabet, Kronik Obstruktif Akciğer Hastalığı (KOAH), obezite, Multiple Skleroz gibi birçok hastalık arasında ilişki olduğunu bildiren çeşitli araştırmalar bulunmaktadır. DBP allellerinin dağılımlarında ırksal farklılıklar gözlemlendiği için, hastalıklara yatkınlıkta da ırklar arasında farklı sonuçlar alınabilmektedir [96-99].

Bizim çalışmamızda, DBP geninin 6 SNP bölgesine ait genotip ve allel dağılımları açısından hasta ve kontrol grupları arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır. DBP genine ait 6 SNP'nin haplotip analizi sonucunda ise "ACGCGT" haplotipinin kontrol gruplarında hastalara göre daha fazla ve istatistiksel olarak yakın anlamlı bulunması bu haplotipin Alzheimer Hastalığı riskini azaltabileceğini düşündürmektedir. rs7041 ve rs1155563 bölgelerinin analizden çıkarılması sonucu, geri kalan 4 SNP'nin haplotip analizi sonucu "ACGC" haplotipi kontrol gruplarında hastalara göre anlamlı derecede yüksek bulunmuştur. Bu bulgu söz konusu haplotipin Alzheimer hastalığına karşı koruyucu olabileceğini göstermektedir.

ApoE genotipleri GBAH için risk faktörü olduğu bilinen  $\epsilon 4$  allelini taşıyan ve taşımayanlar olmak üzere iki grup halinde değerlendirildiğinde  $\epsilon 4$  alleli içeren genotiplerin Alzheimer hastaları arasında daha fazla olduğu, fakat bu farkın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı görülmüştür. ApoE geni allel dağılımları açısından sonuçlarımız  $\epsilon 2$  allelinin kontrol bireylerinde Alzheimer hastalarına kıyasla anlamlı derecede fazla olduğunu göstermiştir ve  $\epsilon 2$  allelinin Alzheimer Hastalığı riskini azalttığını teyit etmektedir.

DBP genine ait haplotipler ve ApoE geni allellerinin birlikte analizi sonucunda,  $\epsilon 3$  alleli taşıyan ve aynı zamanda "ACGCGT" haplotipini taşıyan kontrol örneklerinin hastalara göre istatistiksel olarak yakın anlamlı düzeyde fazla olması bu haplotipin Alzheimer Hastalığı riskini azaltabileceğini düşündürmektedir. rs7041 ve rs1155563 bölgeleri analizden çıkarılarak 4 bölge ve ApoE'nin allel sıklıkları birlikte analiz

edildiğinde,  $\epsilon 3$  alleli taşıyan ve aynı zamanda “ACGC” haplotipini taşıyan kontrol bireylerin sayısının hastalara göre anlamlı derecede yüksek olması  $\epsilon 3$  alleli ve “ACGC” haplotipinin birlikte bulunmasının Alzheimer Hastalığı riskini azalttığına işaret etmektedir. Bununla birlikte  $\epsilon 3$  allelinin toplumumuzda yüksek bir sıklıkta bulunduğu da dikkate alınmalıdır.

Türk toplumundan alınan örnekler üzerinde yapılmış olan çalışmamızın sonuçlarına göre DBP geninin bazı SNP haplotiplerinin ve bu haplotiplerle ApoE  $\epsilon 3$  allelinin birlikte kalıtılmasının Alzheimer Hastalığı'na karşı koruyucu olabileceği gösterilmiştir. Ancak çalışmamızda değerlendirilen hasta ve kontrol örneklerinin sayısının kısıtlı oluşu nedeniyle örnek sayısının artırılmasıyla yapılacak çalışmalar bu ilişkileri ortaya koymada yararlı olacaktır.

Yapılan kaynak taramasında, DBP geni polimorfizmleri ve haplotipleri ile Alzheimer hastalığı arasındaki ilişkiyi ApoE alleleriyle birlikte araştıran başka bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu konuda ilk olan bu çalışmanın daha sonra yapılacak olan çalışmalarla desteklenmesinin gerektiğini düşünmekteyiz.

## KAYNAKLAR

1. Alzheimer's Association, *Alzheimer's disease facts and figures*. Alzheimer's & Dementia, 2010. **6**(2): p. 158-194.
2. Gezen-Ak, D., et al., *Association between vitamin D receptor gene polymorphism and Alzheimer's disease*. Tohoku J Exp Med, 2007. **212**(3): p. 275-82.
3. Cras, P., et al., *Senile plaque neurites in Alzheimer disease accumulate amyloid precursor protein*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1991. **88**(17): p. 7552-6.
4. Helisalmi S, *Molecular genetics of Alzheimer's Disease. With special emphasis on presenilin, amyloid beta precursor protein and apolipoprotein E genes*, in *Department of Neurology*. 1998, University of Kuopio: Kuopio. p.1-44.
5. Price DL, Aging of the brain and dementia of the Alzheimer. İçinde. ed. S.J. Kandel ER, Jessell TM. *Principles of Neural Science 4th Edition*, New York: McGrawHill, 2000, p: 1149-61.
6. Holick, M.F., *Noncalcemic actions of 1,25-dihydroxyvitamin D3 and clinical applications*. Bone, 1995. **17**(2 Suppl): p. 107S-111S.
7. Bouillon, R., et al., *Vitamin D metabolism and action*. Osteoporos Int, 1998. **8** Suppl 2: p. S13-9.
8. Houston, L.A., et al., *Vitamin D receptor polymorphism, bone mineral density, and osteoporotic vertebral fracture: studies in a UK population*. Bone, 1996. **18**(3): p. 249-52.
9. Wang, L., et al., *Vitamin D receptor and Alzheimer's disease: a genetic and functional study*. Neurobiol Aging, 2012. **33**(8): p. 1844 e1-9.
10. Harms, L.R., et al., *Vitamin D and the brain*. Best Pract Res Clin Endocrinol Metab, 2011. **25**(4): p. 657-69.
11. 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.
12. Landfield, P.W. and L. Cadwallader-Neal, *Long-term treatment with calcitriol (1,25(OH)<sub>2</sub> vit D<sub>3</sub>) retards a biomarker of hippocampal aging in rats*. Neurobiol Aging, 1998. **19**(5): p. 469-77.
13. 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.
14. Buchner, D.M. and E.B. Larson, *Falls and fractures in patients with Alzheimer-type dementia*. JAMA, 1987. **257**(11): p. 1492-5.
15. Kipen, E., et al., *Bone density, vitamin D nutrition, and parathyroid hormone levels in women with dementia*. J Am Geriatr Soc, 1995. **43**(10): p. 1088-91.
16. 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.
17. Buell, J.S. and B. Dawson-Hughes, *Vitamin D and neurocognitive dysfunction: preventing "D"ecline?* Mol Aspects Med, 2008. **29**(6): p. 415-22.

18. Dursun, E., D. Gezen-Ak, and S. Yilmazer, *A novel perspective for Alzheimer's disease: vitamin D receptor suppression by amyloid-beta and preventing the amyloid-beta induced alterations by vitamin D in cortical neurons*. J Alzheimers Dis, 2011. **23**(2): p. 207-19.
19. Gomme, P.T. and J. Bertolini, *Therapeutic potential of vitamin D-binding protein*. Trends Biotechnol, 2004. **22**(7): p. 340-5.
20. 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.
21. Christakos, S., et al., *Vitamin D: metabolism*. Endocrinol Metab Clin North Am, 2010. **39**(2): p. 243-53, table of contents.
22. Dietrich, M.O., et al., *Megalyn mediates the transport of leptin across the blood-CSF barrier*. Neurobiol Aging, 2008. **29**(6): p. 902-12.
23. Wang, T.J., et al., *Common genetic determinants of vitamin D insufficiency: a genome-wide association study*. Lancet, 2010. **376**(9736): p. 180-8.
24. Zhang, H., et al., *Proteolytic processing of Alzheimer's beta-amyloid precursor protein*. J Neurochem, 2012. **120** Suppl 1: p. 9-21.
25. Bekris, L.M., et al., *Genetics of Alzheimer disease*. J Geriatr Psychiatry Neurol, 2010. **23**(4): p. 213-27.
26. Gürvit İH, Sinir sisteminin dejeneratif hastalıkları. İçinde ed. Ö. AE. *Nöroloji*, İstanbul: Nobel Tıp Kitapevleri, 2004, s: 367-415.
27. Markesbery, W.R., *Oxidative stress hypothesis in Alzheimer's disease*. Free Radic Biol Med, 1997. **23**(1): p. 134-47.
28. Shim, Y.S. and J.C. Morris, *Biomarkers predicting Alzheimer's disease in cognitively normal aging*. J Clin Neurol, 2011. **7**(2): p. 60-8.
29. Wenk, G.L., *Neuropathologic changes in Alzheimer's disease*. J Clin Psychiatry, 2003. **64** Suppl 9: p. 7-10.
30. Goedert, M. and M.G. Spillantini, *A century of Alzheimer's disease*. Science, 2006. **314**(5800): p. 777-81.
31. Pearson, H.A. and C. Peers, *Physiological roles for amyloid beta peptides*. J Physiol, 2006. **575**(Pt 1): p. 5-10.
32. Wilkinson, K., et al., *A high content drug screen identifies ursolic acid as an inhibitor of amyloid beta protein interactions with its receptor CD36*. J Biol Chem, 2011. **286**(40): p. 34914-22.
33. Verdile, G., et al., *The role of beta amyloid in Alzheimer's disease: still a cause of everything or the only one who got caught?* Pharmacol Res, 2004. **50**(4): p. 397-409.
34. 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.
35. Goldgaber, D., et al., *Characterization and chromosomal localization of a cDNA encoding brain amyloid of Alzheimer's disease*. Science, 1987. **235**(4791): p. 877-80.
36. Kang, J., et al., *The precursor of Alzheimer's disease amyloid A4 protein resembles a cell-surface receptor*. Nature, 1987. **325**(6106): p. 733-6.

37. Tanzi, R.E., et al., *Amyloid beta protein gene: cDNA, mRNA distribution, and genetic linkage near the Alzheimer locus*. Science, 1987. **235**(4791): p. 880-4.
38. Robakis, N.K., et al., *Molecular cloning and characterization of a cDNA encoding the cerebrovascular and the neuritic plaque amyloid peptides*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1987. **84**(12): p. 4190-4.
39. Harrington, C.R., *The molecular pathology of Alzheimer's disease*. Neuroimaging Clin N Am, 2012. **22**(1): p. 11-22, vii.
40. Iqbal K, I.I., Alzheimer's disease: From cytoskeletal protein pathology to neuronal degeneration. İçinde. ed. M.D. Iqbal K, Winbald B, Wisniewski HM. *Alzheimer's Disease: Basic Mechanisms, Diagnosis and Therapeutic Strategies*, Chichester: John Wiley & Sons, 1991, p: 173-180.
41. Brion, J.P., *Neurofibrillary tangles and Alzheimer's disease*. Eur Neurol, 1998. **40**(3): p. 130-40.
42. Sorrentino, G. and V. Bonavita, *Neurodegeneration and Alzheimer's disease: the lesson from tauopathies*. Neurol Sci, 2007. **28**(2): p. 63-71.
43. Wang, J.Z. and F. Liu, *Microtubule-associated protein tau in development, degeneration and protection of neurons*. Prog Neurobiol, 2008. **85**(2): p. 148-75.
44. Lasagna-Reeves, C.A., et al., *Tau oligomers impair memory and induce synaptic and mitochondrial dysfunction in wild-type mice*. Mol Neurodegener, 2011. 6: p. 39.
45. Mandelkow, E.M. and E. Mandelkow, *Tau in Alzheimer's disease*. Trends Cell Biol, 1998. **8**(11): p. 425-7.
46. Marchani, E.E., et al., *Evidence for three loci modifying age-at-onset of Alzheimer's disease in early-onset PSEN2 families*. Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet, 2010. **153B**(5): p. 1031-41.
47. Borquez, D.A. and C. Gonzalez-Billault, *The amyloid precursor protein intracellular domain-fe65 multiprotein complexes: a challenge to the amyloid hypothesis for Alzheimer's disease?* Int J Alzheimers Dis, 2012. **2012**: p. 353145.
48. Chapuis, J., et al., *Growth arrest-specific 1 binds to and controls the maturation and processing of the amyloid-beta precursor protein*. Hum Mol Genet, 2011. **20**(10): p. 2026-36.
49. Lahiri, D.K., et al., *Characterization of two APP gene promoter polymorphisms that appear to influence risk of late-onset Alzheimer's disease*. Neurobiol Aging, 2005. **26**(10): p. 1329-41.
50. Lessard, C.B., S.L. Wagner, and E.H. Koo, *And four equals one: presenilin takes the gamma-secretase role by itself*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. **107**(50): p. 21236-7.
51. Blanchard, V., et al., *Immunohistochemical analysis of presenilin 2 expression in the mouse brain: distribution pattern and co-localization with presenilin 1 protein*. Brain Res, 1997. **758**(1-2): p. 209-17.
52. Reitz, C. and R. Mayeux, *Endophenotypes in normal brain morphology and Alzheimer's disease: a review*. Neuroscience, 2009. **164**(1): p. 174-90.
53. Eichner, J.E., et al., *Apolipoprotein E polymorphism and cardiovascular disease: a HuGE review*. Am J Epidemiol, 2002. **155**(6): p. 487-95.

54. Gafvels, M.E., et al., *Cloning of a cDNA encoding a putative human very low density lipoprotein/apolipoprotein E receptor and assignment of the gene to chromosome 9pter-p23*. *Somat Cell Mol Genet*, 1993. **19**(6): p. 557-69.
55. Jones, P.B., et al., *Apolipoprotein E: isoform specific differences in tertiary structure and interaction with amyloid-beta in human Alzheimer brain*. *PLoS One*, 2011. **6**(1): p. e14586.
56. Sahay, M. and R. Sahay, *Rickets-vitamin D deficiency and dependency*. *Indian J Endocrinol Metab*, 2012. **16**(2): p. 164-76.
57. Chagas, C.E., et al., *Focus on vitamin D, inflammation and type 2 diabetes*. *Nutrients*, 2012. **4**(1): p. 52-67.
58. Norman, A.W., et al., *Vitamin D deficiency inhibits pancreatic secretion of insulin*. *Science*, 1980. **209**(4458): p. 823-5.
59. 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.
60. Boland, R., *Role of vitamin D in skeletal muscle function*. *Endocr Rev*, 1986. **7**(4): p. 434-48.
61. 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.
62. 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.
63. 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.
64. Garcion, E., et al., *New clues about vitamin D functions in the nervous system*. *Trends Endocrinol Metab*, 2002. **13**(3): p. 100-5.
65. Gezen-Ak, D., E. Dursun, and S. Yilmazer, *The effects of vitamin D receptor silencing on the expression of LVSCC-A1C and LVSCC-A1D and the release of NGF in cortical neurons*. *PLoS One*, 2011. **6**(3): p. e17553.
66. 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.
67. 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.
68. 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.
69. 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.
70. Dawson, V.L. and T.M. Dawson, *Nitric oxide in neurodegeneration*. *Prog Brain Res*, 1998. **118**: p. 215-29.
71. Annweiler, C., et al., *Alzheimer's disease--input of vitamin D with mEmantine assay (AD-IDEA trial): study protocol for a randomized controlled trial*. *Trials*, 2011. **12**: p. 230.

72. Pogge, E., *Vitamin D and Alzheimer's disease: is there a link?* Consult Pharm, 2010. **25**(7): p. 440-50.
73. Taghizadeh, M., et al., *Vitamin-D-free regimen intensifies the spatial learning deficit in Alzheimer's disease.* Int J Neurosci, 2011. **121**(1): p. 16-24.
74. Chun, R.F., *New perspectives on the vitamin D binding protein.* Cell Biochem Funct, 2012. **30**(6): p. 445-56.
75. White, P. and N. Cooke, *The multifunctional properties and characteristics of vitamin D-binding protein.* Trends Endocrinol Metab, 2000. **11**(8): p. 320-7.
76. Swamy, N., et al., *Biochemical and preliminary crystallographic characterization of the vitamin D sterol- and actin-binding by human vitamin D-binding protein.* Arch Biochem Biophys, 2002. **402**(1): p. 14-23.
77. 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.
78. Papiha, S.S., et al., *Vitamin D binding protein gene in male osteoporosis: association of plasma DBP and bone mineral density with (TAAA)(n)-Alu polymorphism in DBP.* Calcif Tissue Int, 1999. **65**(4): p. 262-6.
79. Benis, K.A. and G.B. Schneider, *The effects of vitamin D binding protein-macrophage activating factor and colony-stimulating factor-1 on hematopoietic cells in normal and osteopetrotic rats.* Blood, 1996. **88**(8): p. 2898-905.
80. Heid, C.A., et al., *Real time quantitative PCR.* Genome Res, 1996. **6**(10): p. 986-94.
81. Snider, J.V., M.A. Wechser, and I.S. Lossos, *Human disease characterization: real-time quantitative PCR analysis of gene expression.* Drug Discov Today, 2001. **6**(20): p. 1062-1067.
82. Roman, M., et al., *Validation of a genotyping method for analysis of TPMT polymorphisms.* Clin Ther, 2012. **34**(4): p. 878-84.
83. Wang, J.Y., et al., *Vitamin D(3) attenuates 6-hydroxydopamine-induced neurotoxicity in rats.* Brain Res, 2001. **904**(1): p. 67-75.
84. Stumpf, W.E., et al., *1,25(OH)<sub>2</sub> vitamin D<sub>3</sub> sites of action in spinal cord and sensory ganglion.* Anat Embryol (Berl), 1988. **177**(4): p. 307-10.
85. Gozdzik, A., et al., *Association of vitamin D binding protein (VDBP) polymorphisms and serum 25(OH)D concentrations in a sample of young Canadian adults of different ancestry.* J Steroid Biochem Mol Biol, 2011. **127**(3-5): p. 405-12.
86. Smolders, J., et al., *Vitamin D in the healthy and inflamed central nervous system: access and function.* J Neurol Sci, 2011. **311**(1-2): p. 37-43.
87. 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.
88. Engelman, C.D., et al., *Genetic and environmental determinants of 25-hydroxyvitamin D and 1,25-dihydroxyvitamin D levels in Hispanic and African Americans.* J Clin Endocrinol Metab, 2008. **93**(9): p. 3381-8.
89. Ahn, J., et al., *Vitamin D-related genes, serum vitamin D concentrations and prostate cancer risk.* Carcinogenesis, 2009. **30**(5): p. 769-76.

90. Janssens, W., et al., *Vitamin D deficiency is highly prevalent in COPD and correlates with variants in the vitamin D-binding gene*. Thorax, 2010. **65**(3): p. 215-20.
91. Santos, B.R., et al., *Variations in the vitamin D-binding protein (DBP) gene are related to lower 25-hydroxyvitamin D levels in healthy girls: a cross-sectional study*. Horm Res Paediatr, 2013. **79**: p. 162-8.
92. Carpenter, T.O., et al., *Vitamin D binding protein is a key determinant of 25-hydroxyvitamin D levels in infants and toddlers*. J Bone Miner Res, 2013. **28**(1): p. 213-21.
93. Robien, K., et al., *Genetic and environmental predictors of serum 25-hydroxyvitamin D concentrations among middle-aged and elderly Chinese in Singapore*. Br J Nutr, 2012: p. 1-10.
94. Fang, Y., et al., *Vitamin D binding protein genotype and osteoporosis*. Calcif Tissue Int, 2009. **85**(2): p. 85-93.
95. Song F, *Plasma biomarkers of Mild Cognitive Impairment and Alzheimer's Disease*. 2011, University of New South Wales. p. 217.
96. Speeckaert, M., et al., *Biological and clinical aspects of the vitamin D binding protein (Gc-globulin) and its polymorphism*. Clin Chim Acta, 2006. **372**(1-2): p. 33-42.
97. 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.
98. 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.
99. 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. **31**(8): p. 1319-24.

## FORMLAR

### Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formu

Bu çalışma bir moleküler genetik çalışmasıdır. Çalışmada Alzheimer Hastalığı ile ilişkili olduğu bildirilen GC (Vitamin D Bağlayan Protein - DBP) geninin polimorfizmleri araştırılacaktır. Bu nedenle hastaya ve hasta yakınına genetik yapısının incelendiği anlatılacaktır. Çalışma için hastadan bir defaya mahsus olarak kan alınacaktır. Kan alma işlemi hasta açısından bir risk taşımamaktadır. Çalışmada hastanın ismi gizli tutulacaktır. Çalışma aşamasında ve çalışma sonlandırıldıktan sonra hasta bireyin tedavisi kesintisiz olarak devam edecektir. Kabul edilmesi halinde hasta ve hasta yakınları bilgilendirilmiş ve onayları alınmış olacaktır. Hastaya herhangi bir madde verilmeyecek ve ayrıca hastadan herhangi bir maddi katkı talebi olmayacaktır.

Adı, Soyadı:

Doğum yeri, tarihi:

Yaşı:

Cinsiyeti:

Adresi:

Kaç yıldır Alzheimer hastası:

Hastanın yakınının imzası:

Aile öyküsü:

Okudum

Prof. Dr. İbrahim Hakan GÜRVİT  
İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi  
Dahili Tıp Bilimleri Bölümü  
Nöroloji Anabilim Dalı  
Tel: (0212) 621 56 23

## ETİK KURUL KARAR



T.C.  
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ  
CERRAHPAŞA TIP FAKÜLTESİ  
DEKANLIĞI



Sayı : 16366  
Konu :

İstanbul ...../...../.....

Temel Tıp Bilimleri Bölümü  
Başkanlığına

09 Mayıs 2011

İLGİ: 14.04.2011 tarihli, 576 sayılı yazımıza:

Bölümünüze bağlı Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi **Prof.Dr.Selma YILMAZER**'in danışmanlığında **Yüksek Lisans Öğrencisi Ömür Selin ARAZ**'ın yürütücülüğünde "**Alzheimer Hastalarında Vit.D Eksikliği ile İlişkisi Olan Polimorfizmlerin Araştırılması**" başlıklı **Yüksek Lisans Tezi** hakkında ilgi yazınız ve ekleri **03 Mayıs 2011** tarihinde toplanan Fakültemiz Klinik Araştırmalar Etik Değerlendirme Kurulunca müzakere edilmiş olup, etik açıdan uygun olduğuna karar verilmiştir. Bilgilerinizi, durumun adı geçen anabilim dalı başkanlığına bildirilmesini saygılarımla rica ederim.

Eki:  
1 dosya

Prof.Dr.Fatih ALTINDAŞ  
Dekan Yardımcısı ve Klinik Araştırmalar  
Etik Değerlendirme Kurulu Başkanı

Not: Yanıtlarda yazımızın gün sayısının belirtilmesi rica olunur.Tel(0212)4143000

## ÖZGEÇMİŞ

### Kişisel Bilgiler

|                 |            |                  |             |
|-----------------|------------|------------------|-------------|
| <b>Adı</b>      | Ömür Selin | <b>Soyadı</b>    | Araz        |
| <b>Doğ.Yeri</b> | Ankara     | <b>Doğ.Tar.</b>  | 17.09.1986  |
| <b>Uyruğu</b>   | T.C        | <b>TC Kim No</b> | 39700364068 |
| <b>Email</b>    |            | <b>Tel</b>       |             |
|                 |            |                  |             |

### Eğitim Düzeyi

|                 | Mezun Olduğu Kurumun Adı      | Mez. Yılı |
|-----------------|-------------------------------|-----------|
| <b>Doktora</b>  |                               |           |
| <b>Yük.Lis.</b> |                               |           |
| <b>Lisans</b>   | Süleyman Demirel Üniversitesi | 2009      |
| <b>Lise</b>     | Trabzon Lisesi                | 2004      |

### İş Deneyimi (Sondan geçmişe doğru sıralayın)

|           | Görevi | Kurum | Süre (Yıl - Yıl) |
|-----------|--------|-------|------------------|
| <b>1.</b> |        |       | -                |
| <b>2.</b> |        |       | -                |
| <b>3.</b> |        |       | -                |

| Yabancı Dilleri | Okuduğunu Anlama* | Konuşma* | Yazma* | KPDS/ÜDS Puanı | (Diğer) Puanı |
|-----------------|-------------------|----------|--------|----------------|---------------|
| İngilizce       | İyi               | Orta     | İyi    | 50.00          |               |
|                 |                   |          |        |                |               |

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

|                      | Sayısal  | Eşit Ağırlık | Sözel    |
|----------------------|----------|--------------|----------|
| <b>ALES Puanı</b>    | 66,12346 | 64,31813     | 57,78805 |
| <b>(Diğer) Puanı</b> |          |              |          |

### Bilgisayar Bilgisi

| Program                      | Kullanma becerisi |
|------------------------------|-------------------|
| Microsoft Office Programları | Çok iyi           |
|                              |                   |
|                              |                   |

### Yayınları/Tebliğleri Sertifikaları/Ödülleri

**Özel İlgi Alanları (Hobileri): Spor, Kitap okumak, Evrim, Hayvanlar**