

**İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**DANIŞMAN
Prof. Dr. SELMA YILMAZER**

132346

**ALZHEİMER HASTALARINDA PRESENİLİN-1
POLİMORFİZMİ**

**T.C. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU
AKADEMİK YERLEŞİMİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Biyolog ERDİNÇ DURSUN

132346

İSTANBUL - 2003

Bu çalışma İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yürütücü Sekreterliği tarafından desteklenmiştir. Proje no: T-1225/01112001



2. 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 YILMAZER'e, gerek eğitimim gerekse tezimde bana her türlü konuda yardım eden Sn. Prof. Dr. Melek ÖZTÜRK'e, eğitimime katkısından ötürü Sn. Doç Dr. Sema Bolkent'e, anabilim dalı başkanımız Sn. Prof Dr. Mustafa ŞENOCAK'a, veri toplanmasındaki katkıları ve bilimsel destekleri ile Sn. Prof. Dr. Engin EKER'e, Alzheimer hastalığı ile beni tanıştıran, bilimsel anlamda ufku açıp özgüvenimin artmasını sağlayan Sn. Prof. Dr. Nazlı BAŞAK'a, akademik kariyer yapmak için karar vermemde etkili olan, kişilikleri, sorumlulukları, iş ahlakları ve başarıları ile her zaman bana örnek olacak sevgili dayılarım Dr. Rüştü ARAZ ve Prof. Dr. Kenan ARAZ'a, Sn. Prof Dr. Gürsel DURSUN ve Sn. Prof. Dr Ayşe DURSUN'a teşekkürlerimi sunarım.

Beni her zaman motive eden, yarışmanın ve çekişmenin tadını çalışma ortamında çok az kişinin becerebildiği uyumumuzla birleştirebilen, çoğunlukla muhalefet yapıp fikir darlığına düşmemi engelleyen, dostluğu ve yardım severliği ile bulunmaz bir çalışma arkadaşı olan, her zaman yanımda olan ve her zaman yanımda olacağım sevgili arkadaşım Duygu GEZEN-AK'a, bana olan desteğini bir an bile esirgemeyen, alternatif çözüm yolları üretmede bir deha ve dehasıyla bana örnek olan Sn. MSc. Matem TUNÇDEMİR'e, desteğini hep yanımda hissettiğim Sn. MSc. Fatma DAĞISTANLI'ya, istatistiksel analizlerdeki yardımlarından ötürü Sn. Ömer UYSAL'a, çalışmalarına maddi kaynak sağlayan İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yürütücü Sekreterliği'ne teşekkür ederim.

Beni bu dünyaya getiren, maddi-manevi desteğini benden hiçbir zaman esirgemeyen sevgili annem Nilüfer DURSUN ve sevgili babam Ertan DURSUN'a, gerek muhalefetleri gerekse destekleri ve esprileri ile hayatımın anlamı olan sevgili kardeşlerim Ertaç DURSUN ve Nil Yeşim DURSUN'a, benimle her zaman gurur duyan sevgili dedem Kemal ARAZ'a ve yattığı yerde yine gurur duyduğuna inandığım dedem Alaaddin DURSUN'a dualarını benden esirgemeyen sevgili anneannem Rafet ARAZ ve sevgili babaannem Emine DURSUN'a en içten teşekkürlerimi sunmayı bir borç bilirim.

1. İÇİNDEKİLER

1. İÇİNDEKİLER	
2. TEŞEKKÜR	
3. GİRİŞ ve AMAÇ.....	1
4. GENEL BİLGİLER.....	3
4.1. Alzheimer Hastalığı.....	3
4.2. Alzheimer Hastalığında Görülen Patolojik Değişiklikler.....	4
4.2.1. Nörofibriler Yumaklar.....	6
4.2.2. Amiloid Birikimleri.....	9
4.2.3. Nöropil İplikler.....	11
4.3. Alzheimer Hastalığında Etkili Olabilecek Genetik Risk Faktörleri.....	12
4.4. Presenilin-1.....	13
4.5. Presenilin 1'in Hücre Biyolojisi.....	18
4.6. Presenilin 1'in Fonksiyonları.....	19
4.7. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR).....	21
4.8. DNA'nın Enzimatik Kesimi.....	23
4.8.1. Restriksiyon Parça Uzunluk Polimorfizmi (RFLP).....	24
5. GEREÇ ve YÖNTEM.....	25
5.1. Kandan DNA İzolasyonu.....	25
5.1.1. Yüksek tuz konsantrasyonu kullanılarak kandan DNA izolasyonu..	25
5.1.2. DNA miktarı ve saflığının ölçülmesi.....	26
5.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu Yöntemi	26
5.2.1. Primerlerin Hazırlanması.....	26
5.2.2. PZR karışımı.....	27
5.2.3. PZR programı.....	28
5.2.4. PZR koşullarının optimizasyonu.....	28
5.3. PZR Ürünlerinin Agaroz Jel Elektroforezinde İncelenmesi.....	29
5.4. PS-1 Geni PZR Ürününün BamH I Enzimi ile Kesilmesi.....	30
5.4.1. PS-1 geninin BamH I enzimiyle oluşan kesim ürünleri.....	30
5.5. RFLP Ürünlerinin Agaroz Jel Elektroforezinde İncelenmesi.....	30
5.6. İstatistiksel Değerlendirmeler.....	31
5.7. Kullanılan Kimyasal Maddeler.....	31
5.8. Kullanılan Çözeltiler.....	32
6. BULGULAR.....	34
6.1. DNA İzolasyonu	34
6.2. Genotipleme Sonuçları.....	34
7. TARTIŞMA.....	39
8. ÖZET.....	44
9. SUMMARY.....	45
10. KAYNAKLAR.....	46
11. ÖZGEÇMİŞ.....	52
12. KISALTMALAR	

3. GİRİŞ VE AMAÇ

Alzheimer genellikle yaşlılarda görülen ve beynin birçok bölümüne yayılan nörodejeneratif bir hastalıktır. Nöronların içinde ve dışında biriken proteinler ve bu proteinlerin oluşturduğu plaklar sebebiyle, hücreler ya tamamen yok olur veya büyük oranda fonksiyon kaybına uğrar (13, 15, 29). Geniş çaptaki hücre ölümleri beyin fonksiyonlarında kayıplara yol açar. Olası riskler arasında artan yaş, ailede demans vakalarının bulunup bulunmaması, kafa travmaları, önceden geçirilmiş depresyonlar sayılabilir (13). Alzheimer hastalığı klinik olarak, başlangıçta hafıza kaybı, ilerleyen zamanlarda kognitif (bilişsel) fonksiyonlardaki bozukluklar ile tanınır. Hastalığa çeşitli psikiyatrik bozukluklar da eşlik eder. Hastalık yaşla ilintili olup, 30-64 yaş arasında %0.3, 65 yaşın üstünde %3.6 ve 85 yaşın üstünde ise %14.8 oranında görülür (13, 29).

Alzheimer hastalığında (AH) beyinde görülen çeşitli patolojik değişikliklerden biri daha çok serebral korteks ile meningeal ve serebral kan damarlarının duvarlarında görülen ekstraselüler yapılar olan nöritik plakların ortaya çıkmasıdır. Bu plaklar nöritler (aksonlar, dendritler), reaktif astrositler ve mikroglialarla çevrili yoğun bir amiloid materyal içerirler (5, 13, 29). Bir diğer yapısal değişiklik ise hücre içerisinde görülen nörofibriler yumaklardır. Bu değişikliklerden başka beyinde nöronal ve sinaptik kayıplar, reaktif astrositoz ve mikroglia proliferasyonu da görülür (13). Genelde tüm bu patolojik değişiklikler hipokampus, entorinal korteks, asosiyasyon korteksi ve ön beyin bazalinde görülür (13, 29).

AH, daha çok kalıtsal olan ve ailede birinci derece akrabalar arasında demans görülmesiyle tarif edilen "ailesel Alzheimer" ve aile hikayesi olmaksızın kendiliğinden oluşan, "sporadik Alzheimer" olarak ikiye ayrılır. Ayrıca başlangıç yaşı 65 yaş altı olan hastalar "erken başlayan", başlangıç yaşı 65 yaş üstü olan hastalar ise "geç başlayan" AH olarak sınıflandırılabilir (46).

Son yıllarda Alzheimer hastalığının genetik kökenini araştırmak üzere çeşitli çalışmalar yapılmıştır. AH'nın tüm tipleri için en çok çalışılan 5 gen; Apolipoprotein E (Apo E), Amiloid Öncül Protein (APP), Presenilin-1 (PS-1), Presenilin-2 (PS-2) ve Antikimotripsin (ACT) genleridir. Bu genlerin Alzheimer hastalığı ile ilişkileri üzerinde elde edilen sonuçlara göre:

En az 3 gen üzerindeki mutasyonlar erken başlayan Alzheimer hastalığının (EBAH)'dan sorumlu görülmektedir:

APP geni: Kromozom 21 üzerinde bulunur. Bu gende 6 çeşit yanlış anlamlı (missens) mutasyon saptanmıştır. APP gen mutasyonları bütün Ailesel Alzheimer Hastalarının (AAH) %2'sinde, erken-başlayan AAH'larının ise %5-7'sinde görülür (13, 45).

PS-1 geni: Kromozom 14 üzerinde bulunur. 41 farklı mutasyonu bilinmektedir. Biri hariç hepsi yanlış anlamlı (missens) mutasyonlardır. PS-1 mutasyonları erken başlayan AH'nın %30-50'sinde bulunmaktadır (13, 16, 40, 42, 46).

PS-2 geni: Kromozom 1 üzerinde bulunur. 2 çeşit yanlış anlamlı (missens) mutasyon görülür. Tüm erken başlayan AAH'larının %2'sinde bulunur (13, 16, 42).

Bunlardan başka özellikle Apo E polimorfizmlerinin geç başlayan Alzheimer hastalığı (GBAH) üzerinde etkili olduğu da gösterilmiştir (13, 16, 29, 31).

PS-1 sekiz geçişli bir plazma membran proteindir (11). Bu protein ile Alzheimer hastalığı arasındaki ilişki fonksiyonel açıdan tam olarak açıklanamamıştır (29). Ancak PS-1 geninin erken başlayan Alzheimer hastalığının %30-50'sinden sorumlu olduğu bildirilmektedir (13, 16, 40, 42, 46). Buna karşılık PS-1 geninin intron 8 bölgesinin ise geç başlayan AH ile ilişkili olduğu ileri sürülmüştür. Intron 8 polimorfizmi için, allel 1'in homozigot halde bulunmasının, allel 2'nin homozigot halde bulunması veya iki allelin heterozigot halde bulunmasına oranla geç başlayan AH için risk faktörünü iki katına çıkardığı rapor edilmiştir (50). Ancak bu iddiayı destekleyen (15, 18) veya buna karşı çıkan (22, 38, 46) sonuçlar da yayınlanmıştır. İlişkinin henüz tartışma konusu olması, PS-1 geninin Alzheimer hastalığı üzerindeki etkisini belirleyecek olan yeni araştırmaların önemini arttırmaktadır.

Biz bu çalışmada PS-1 geni intron 8 polimorfizminin Alzheimer Hastalığı ile ilişkisini belirlemek amacıyla 35 geç başlayan Alzheimer hastası ve 22 sağlıklı bireyin PS-1 intron 8 allellerini inceledik.

4. GENEL BİLGİLER

4.1. Alzheimer Hastalığı

Alzheimer hastalığı (AH) 1906'da Dr. Aloiz Alzheimer tarafından tanımlanmıştır. Alzheimer demansın en çok rastlanan sebeplerinden biridir. Demans, açık bir bilinç düzeyinde başta bellek olmak üzere zihinsel ve sosyal yeteneklerin kişinin günlük yaşam aktivitelerini etkileyecek derecede yıkılması şeklinde tanımlanır. Alzheimer Organizasyonuna göre Amerika Birleşik Devletlerinde, 65 yaş üzerindeki her 10 kişiden biri ve 85 yaş üzerdekilerin de yaklaşık yarısı Alzheimer hastasıdır. Bu gün sadece Amerika'da 4 milyon kişi bu hastalığa yakalanmış durumda olup bu sayının 2050'de 14 milyona ulaşması beklenmektedir.

Alzheimer hastalığı klinik olarak, başlangıçta hafıza kaybı, ilerleyen zamanlarda kognitif (bilişsel) fonksiyonlardaki bozukluklar ile tanınır. Hastalığa çeşitli psikiyatrik bozukluklar da eşlik eder. Nörodejeneratif bir hastalıktır. Sinir hücreleri içinde ve dışında biriken fibrils proteinler ve biriken proteinlerin oluşturduğu plaklar sebebiyle, hücreler ya tamamen yok olur veya büyük oranda fonksiyon kaybına uğrarlar. Risk faktörleri olarak, artan yaş, aile hikayesi (ailede demans bulunup bulunmaması), kafa travmaları, önceden geçirilmiş depresyonlar ön plana çıkmaktadır (29) (Tablo 1).

AH aileye ve yaşa göre sınıflandırılabilir. Ailede demans gösteren birinci dereceden akraba olup olmamasına göre, ailesel veya sporadik olarak ikiye ayrılır. Aynı zamanda yaşa göre de erken evre dediğimiz 65 yaş altı ve geç evre dediğimiz 65 yaş ve üstü olarak ikiye ayrılabilir (4, 13, 16, 41).

AH ile ilişkili olduğu düşünülen genlerin başında; Apolipoprotein E (Apo E), Amiloid Prekürsör Protein (APP), Presenilin-1 (PS-1), Presenilin-2 (PS-2) ve Antikimotripsin (ACT) genleri gelmektedir (13, 16, 29).

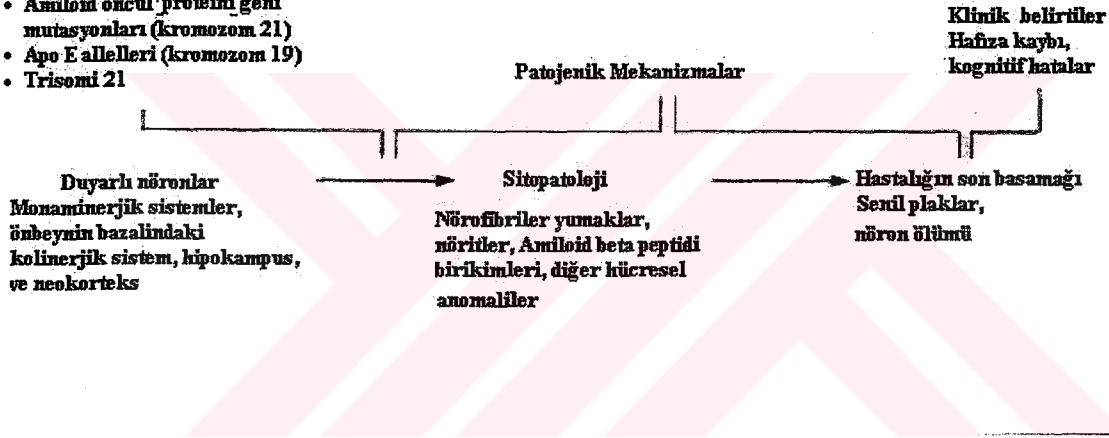
AH'da görülen önemli bir patolojik değişiklik; serebral korteks, meningial ve serebral kan damarlarının duvarlarında görülen ve ekstraselüler yapılar olan nöritik

plaklardır (9, 29, 41). Bu plaklar nöritler (aksonlar, dendritler), reaktif astrositler ve mikroglia ile çevrili yoğun bir amiloid materyal içerirler. Diğer yapısal değişiklikler ise hücre içinde görülen nörofibriler yumaklar; nöronal ve sinaptik kayıplar, reaktif astrositoz ve mikroglia proliferasyonudur. Genelde tüm patolojik değişiklikler hipokampus, entorinal korteks, asosiyasyon korteksi ve ön beynin bazalinde görülür (29).

Tablo 1: Alzheimer Hastalığında risk faktörleri, patojenik mekanizma ve hücrel anomaliler ile klinik belirtiler arasındaki ilişki (29).

Risk Faktörleri

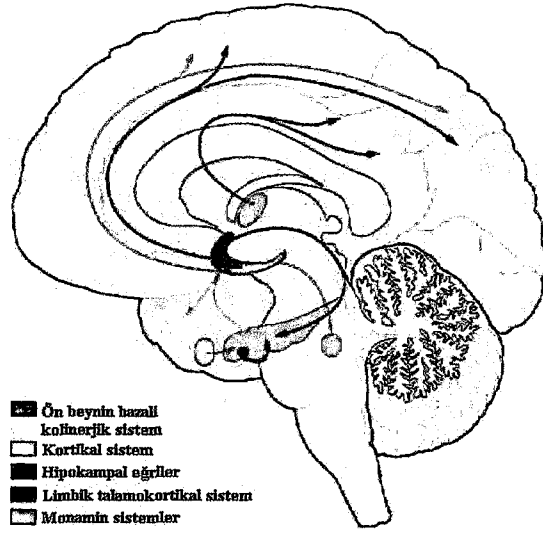
- Yaş
- Presenilin 1 mutasyonları (kromozom 14)
- Presenilin 2 mutasyonları (kromozom 1)
- Amiloid öncül proteini geni mutasyonları (kromozom 21)
- Apo E allelleri (kromozom 19)
- Trisomi 21



4.2. Alzheimer Hastalığında Görülen Patolojik Değişiklikler

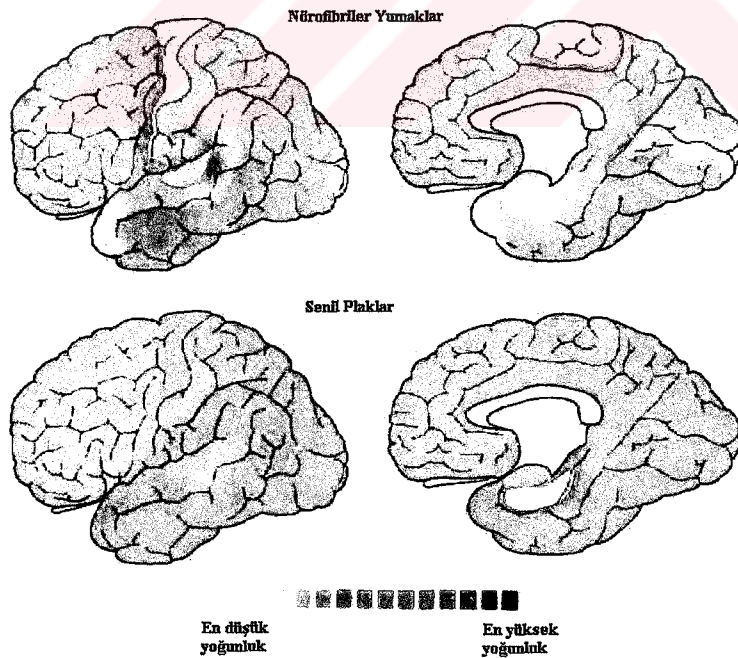
Alzheimer hastalığı, özellikle beynin neokorteks, entorinal alan, hipokampus, amigdala, bazal nükleuslar, anterior talamus ve beyin sapının monoaminergic nükleusunda (cerebellum bölgesi ve raphe kompleksi) görülen bir seri anomali ile tanımlanır (29) (Şekil 1).

ALZHEIMER HASTALIĞI MERKEZİ



Şekil 1: Alzheimer hastalığına duyarlı olan nöron sistemleri (29).

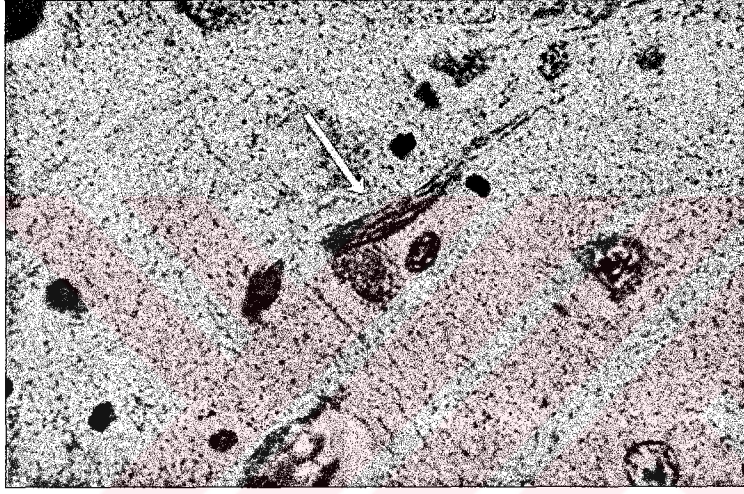
Beynin hasarlı bölgelerindeki nöronların fonksiyon bozuklukları ve ölümü sitoiskelet anomalileri ile ilişkilidir (29) (Şekil 2).



Şekil 2: Alzheimer'lı bir beyinde nörofibriller yumaklar ve senil plakların topografik dağılımı. Serebral hemisferlerin lateral ve medial görüntüleri. (29).

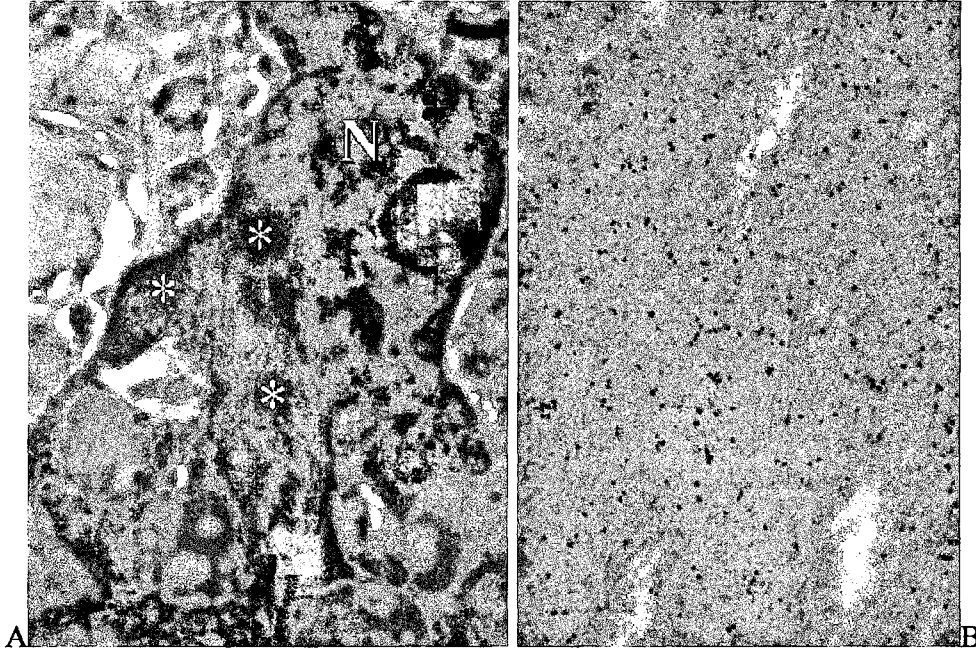
4.2.1. Nörofibriler Yumaklar

Sitoiskelet proteinlerinin patolojik değişimleri sonucu oluşan Nörofibriler Yumaklar (NFY) Alzheimer'ın en belirgin beyin lezyonlarından biridir. Etkilenen nöronların çoğu fonksiyonlarını kısmen de olsa yerine getirebilir. Neokorteks gibi beyin bazı bölgelerinde ise çoğunlukla ölecek geride "mezar taşı" (tombstone) veya "hayalet yumaklar" (ghost tangles) denilen yapıları bırakırlar (17, 29) (Şekil 3,4).



Şekil 3: Nörofibriler yumaklar,.hücre içerisinde yoğun fibriler yapılar (ok) olarak görülmektedir. Boya: hematoksilen eozin.

(<http://www-medlib.med.utah.edu/WebPath/CNSHTML/CNS094.html>)



Şekil 4: A) Alzheimer'lı beyne ait bir nöronda nörofibriler yumakları (*) gösteren TEM fotoğrafı. B) Tau proteini için immün-altın işaretlenmiş yumakların daha büyük büyütmedeki görüntüsü.

(http://www.biols.susx.ac.uk/home/Julian_Thorpe/ad_nftem.htm)

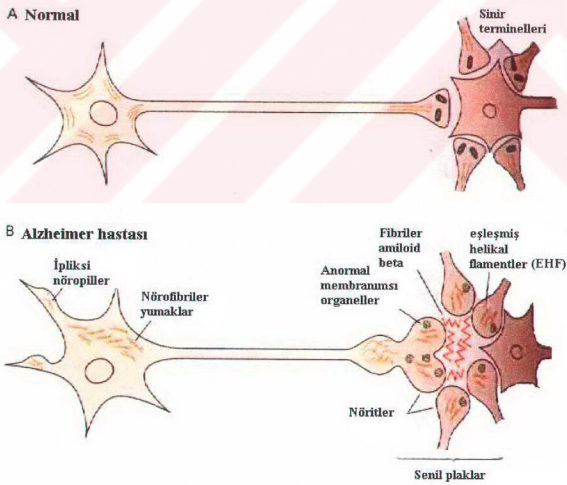
Mikrotubuller ve nörofilamentler normal bir nöronun sitoiskeletinin iki ana bileşenidir. Alzheimer hastalarının beyinlerinde çok sayıda nöronun sitoiskeleti giderek değişikliğe uğrar ve morfolojik olarak normal nörofibrillere benzemeyen “eşleşmiş helikal filamentler” (EHF) denilen filament grupları oluşturur (17). EHF'den oluşan Nörofibriler Yumaklar (NFY), sözkonusu nöronun perikaryonunun hemen hemen tamamını doldurur (25).

NFY'lar morfolojileri ve kimyasal özellikleri açısından heterojendirler. NFY'lar EHF'den oluşur. EHF'in de iki farklı yapıya sahip olduğu gösterilmiştir. Bunlar daha büyük çaplı “sağa dönümlü EHF” ve daha küçük çaplı “sola dönümlü EHF” dir (17).

Alzheimer'lı hastaların beyinlerinden izole edilen EHF'lerin kompleks bir protein yapı olduğu görülmüştür. Bu kompleksin esas polipeptidi 45-62 kDa ağırlığındadır. Bundan başka anormal fosforilasyona uğramış olan tau'nun da EHF'nin başlıca bileşenlerinden biri olduğu gösterilmiştir (25). Ayrıca ubiquitin varlığı da belirlenmiştir (17).

Nöronların hayati fonksiyonlarından biri perikaryon ile sinir uçları arasındaki madde taşınmasıdır. AH'da bu intraselüler transport için gerekli olan mikrotübül oluşumu hatalıdır (17, 25, 29). Tau, tubulinlerin polimerizasyonunu uyararak mikrotübül oluşumunu teşvik eder, ayrıca mikrotübül yapısının devamlılığını da sağlar. Alzheimer'lı beyinde tau'nun anormal fosforilasyonu sonucu mikrotübül oluşumunu uyarma özelliği baskılanır. Tau'daki bu değişimin mikrotübül oluşumunun bozulmasına neden olduğu düşünülmektedir. Mikrotübül oluşumunu başlatacak olan guanozintrifosfatın (GTP) tubulin β alt birimine bağlanması tau tarafından uyarılır. AH'larının beyinde fonksiyonel tau'nun eksikliği GTP bağlanmasını azaltacağından, mikrotübül oluşumu da azalacaktır (17, 25).

Alzheimer'lı hastaların beyinde tau'nun anormal fosforilasyonu sonucu mikrotübül oluşumunun azalması, aksoplazmik akışın bozulmasına ve bazen nöron ölümüne yol açar. Aksoplazmik akıştaki bozukluk sonucu taşınması gereken hücresel elemanlar da perikaryon ve sinir terminallerinde birikir (17, 29) (Şekil 5).

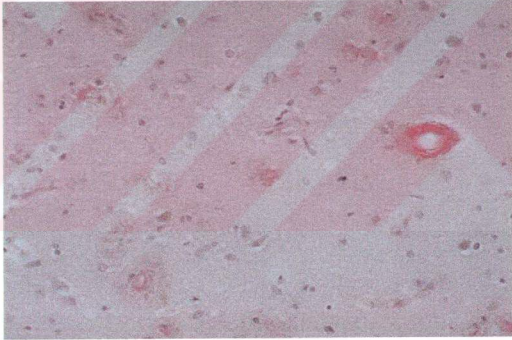


Şekil 5: Normal bir beynin nöronlarıyla Alzheimer'lı bir beynin nöronlarının karşılaştırılması (29)

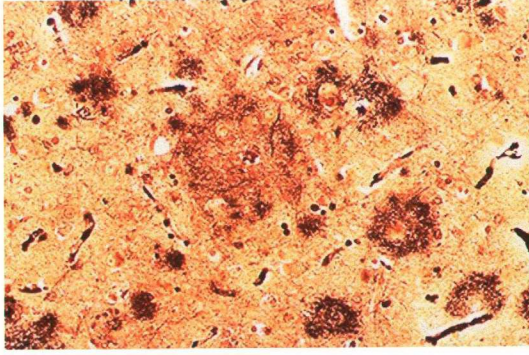
Bu birikimlerin miktarı sözkonusu hücrede sentezin miktarına, transport oranına ve biriken maddelerin indirgenmesine bağlıdır. Normalde hücre gövdesiyle sinir terminalleri arasında taşınan elemanlar çok hızlı indirgenirler oysa hastalıktan etkilenmiş hücrelerde birikim söz konusudur (29).

4.2.2. Amiloid Birikimleri

Alzheimer hastalığında beynin hasar gören bölgeleri, amiloidin hücre dışı alanlarda birikmesi ve bu birikimlerin etrafının distrofik aksonlar, astrositler ve mikroglia ile çevrilmesi ile oluşan nöritik (Şekil 6) veya senil plakları (Şekil 7) içerir (29). Nöritik plaklar kompleks yapılardır. 8-10 nm'lik fibriller yapılar olup esas bileşenleri 4 kDa'luk peptidlerdir. Bu 4 kDa'luk peptidler, amiloid öncül proteini APP'nin farklı sekretazlarla (α , β , γ) kesilmesi sonucu oluşan $A\beta$, β amiloid, A4 ya da β /A4 gibi farklı isimler ile anılan β amiloid proteinidir (5, 8, 9, 29) (Şekil 8).

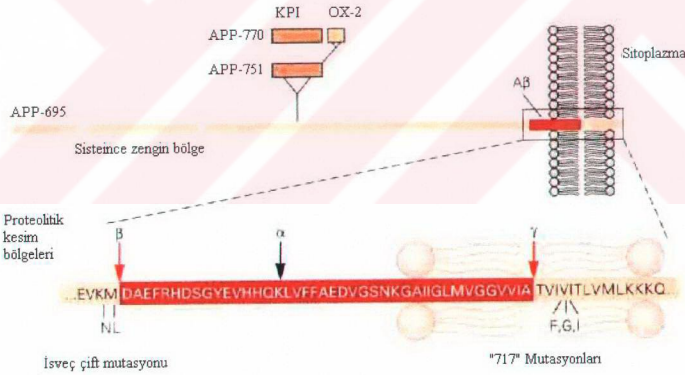


Şekil 6: Nöritik plaklar: Amiloid birikimleri kırmızı olarak boyanmıştır (Boyama; Congo red). (<http://www-medlib.med.utah.edu/WebPath/CNSHTML/CNS092.html>)



Şekil 7: Senil plaklar: Diffüz veya yoğun amiloid birikimleri koyu kahverengi olarak boyanmış (Boyama: Gümüşleme).

(<http://www-medlib.med.utah.edu/WebPath/CNSHTML/CNS090.html>)



Şekil 8: β amiloid peptid öncüllerinin sentezi ve işlenmesi. Amiloid öncül proteini APP-770 ve APP-751 Kunitz sınıfı serin proteaz inhibitörleri (KPI) ile homolog bir bölge içerirler. Ancak APP-695 böyle bir bölgeye sahip değildir. Üstte amiloid öncül proteininin ekstraselüler, transmembran ve sitoplazmik bölgeleri, aşağıda ise Alzheimer hastalığı ile ilişkili bazı APP mutasyonları ve α , β ve γ sekretaz kesim noktaları

görülmektedir. APP'nin bir endopeptidaz olan α sekretaz tarafından kesilmesi ekstraselüler parçanın salınmasına yol açmakta ancak β amiloid oluşturmamaktadır. β ve γ sekretaz tarafından kesilmesi ise fibril oluşturma özelliği yüksek olan β amiloidi oluşturmaktadır. (29)

Ancak APP'nin amiloid oluşturmak üzere kesilmesi amiloid plak oluşumunun sadece ilk basamağıdır. Amiloid öncül proteinin yapısındaki mutasyonlar ve amiloid proteinin çökmesine eşlik eden apolipoprotein E (apoE) gibi bir takım proteinler de bu plakların oluşumunda etkindir (13, 29). Nöritik plakların merkezini oluşturan amiloid plaklar, distrofik sinir hücreleri ve reaktif astrosit ve mikroglia hücreleri tarafından çevrelenmişlerdir. Senil plaklar nöropillerle birlikte serebral kan damarlarının duvarlarında görülür (5).

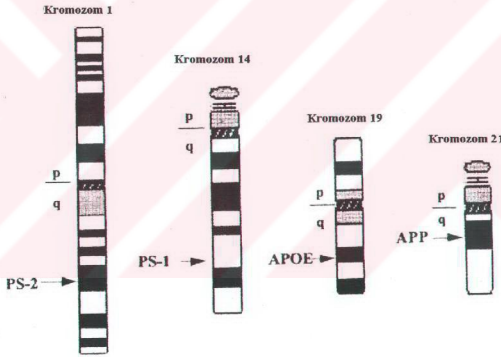
Çalışmalar amiloid plakların nörotoksik olduğunu ve nörodejenerasyonun sebeplerinden birini oluşturduğunu göstermiştir. Amiloid fibrillerin neden nörotoksik olduğunu açıklayan birçok teori bulunmakla beraber bunlardan en çok rağbet edilenler amiloid fibrillerin hücrede kalsiyum dengesini bozduğunu vurgulayan çalışmalardır. Kalsiyumun sinir iletisi (asetilkolin ve diğer nörotransmitterlerin salınması) ve hücre yaşamı için önemli olduğu dikkate alındığında, buradaki bir bozukluk hastalığın patogenezini anlamada önemli olabilir (12, 34).

4.2.3. Nöropil İplikler

EHF-tau (A68) için immünpozitif olan, parçalanmış ve dönümler yapmış liflerden oluşan argirofilik ağ nöropil iplikler (Nİ) olarak adlandırılır. Bunlar daha çok aksonların presinaptik terminallerinde ve dendritlerde oluşur. Plaklardan bağımsızdırlar ancak her zaman nörofibriler yumaklarla ilişkilidirler (29).

4.3. Alzheimer Hastalığında Etkili Olabilecek Genetik Risk Faktörleri

Alzheimer hastalığı için beş esas genetik risk faktörü bilinmektedir: 1) kromozom 21 üzerinde bulunan APP genindeki mutasyonlar; 2) kromozom 14 üzerinde bulunan presenilin 1 genindeki mutasyonlar; 3) kromozom 1'deki presenilin 2 geninde bulunan mutasyonlar; 4) kromozom 19 üzerinde bulunan ApoE geninin bazı allelleri ve 5) kromozom 12 üzerinde bulunan alfa-2-makroglobulin genindeki muhtemel mutasyon veya polimorfizmler (13, 29) (Şekil 9). İlk üç başlıkta sayılan mutasyonlar erken başlayan Alzheimer vakalarının yaklaşık yarısıyla ilişkilidir. Buna karşılık özel apoE alleleri veya alfa-2-makroglobulindeki değişiklikler erken evre sporadik Alzheimer'da etkili olabildiği gibi daha çok geç evre ailesel Alzheimer'dan sorumludurlar (29).



Şekil 9: Alzheimer ile ilişkisi gösterilen genler ve buldukları kromozomlar (13)

4.4. Presenilin-1

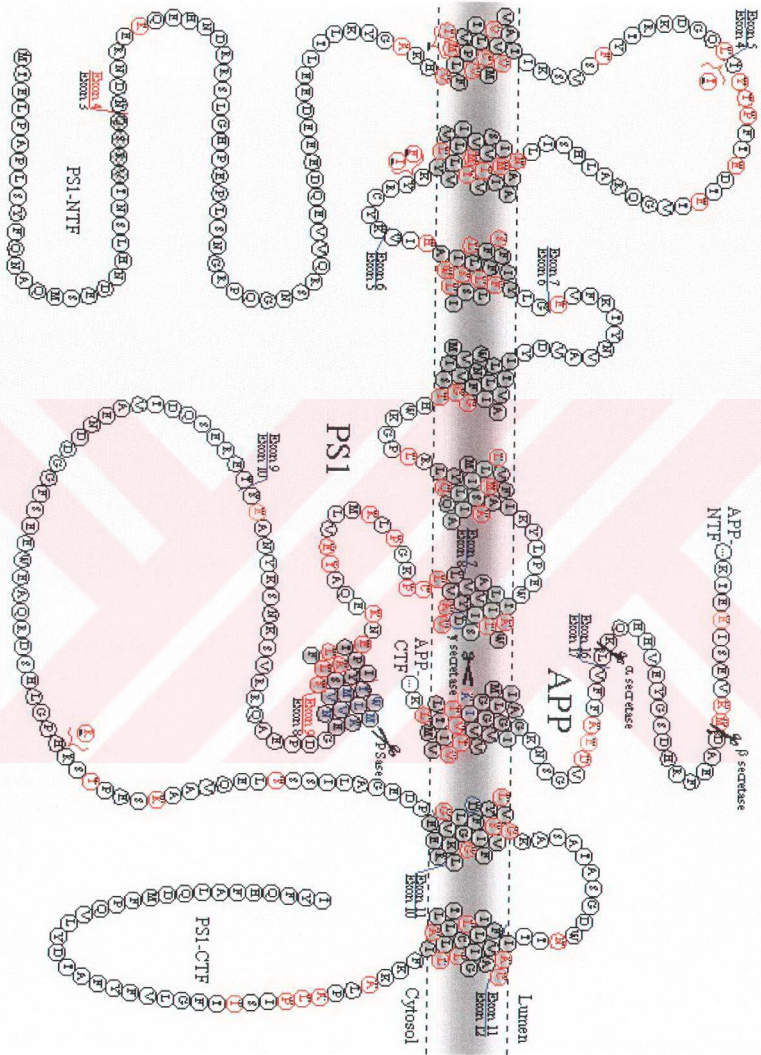
Alzheimer hastalarının yaklaşık %10'unda, klinik belirtiler 50 yaşından önce ortaya çıkmakta ve hastalık otozomal dominant kalıtım göstermektedir. Yapılan çalışmalarda erken başlayan Alzheimer hastalarının %30-%50'sinin kromozom 14q üzerindeki presenilin1 geni ile ilişkili olduğu saptanmıştır (13, 16, 29). Gen, translasyonu yapılan 10 adet eksonu, translasyonu yapılmayan ve 5' uçta bulunan 2 ila 3 eksonu içermektedir (6) (Şekil 10). PS1'in RNA transkriptleri 2.7 ve 7.5 kb olup insan beyninin değişik bölgelerinde, iskelet kasında, böbrekte, pankreasta, plasentada ve kalpte ekspresyonu yapılmaktadır (39). Bu gen, sekiz transmembran bölgeye sahip olan ve 467 aminoasitten oluşan bir serpentin proteini kodlamaktadır, ancak fonksiyonu henüz tam olarak bilinmemektedir (Şekil 11). Memeli hücrelerinde presenilin 1 nukleus zarında, endoplazmik retikulumda ve Golgi'de bulunur (19). İnsan, maymun ve fareden elde edilen çeşitli dokulara ait hücrelerin kültürleri ve beyin hücre kültürlerinde presenilin 1'in, N-terminal (~ 28 kDa) ve C-terminal (~ 18 kDa) olmak üzere parçalar halinde birikimler oluşturduğu gözlenmiştir. Bu presenilin 1'in in vivo'da endoproteolitik bir kesim işlemi geçirdiğine işaret etmektedir (29).

Erken başlayan ailesel Alzheimer'da presenilin 1 için yaklaşık 40 farklı yanlış anlamlı (missens) mutasyon ve bir ekson delesyonu gözlenmektedir (11) (Tablo 2). Bu mutasyonların çoğunluğu transmembran bölgelerin hemen yakınında bulunmaktadır (13) (Şekil 12). Presenilin mutasyonlarının Alzheimer hastalığına nasıl yol açtığı henüz tam olarak anlaşılammıştır. Ancak presenilin 1 ve presenilin 2 mutasyonuna sahip olan hastaların serumlarının incelenmesiyle A β 1-42 ve A β 1-43 seviyelerinin mutasyon taşımayanlara oranla daha yüksek olduğu saptanmıştır (29).

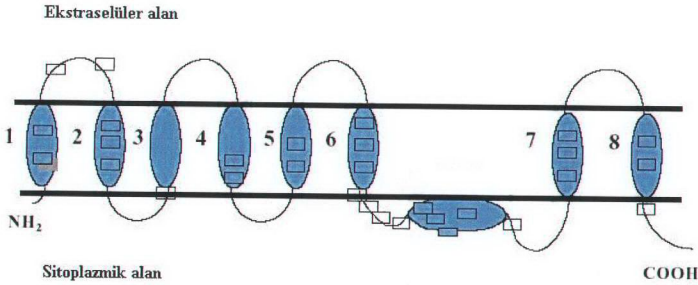
Tablo 2: Presenilin 1 ve 2 üzerinde gözlenen mutasyonlar (11)

Presenilin Mutasyonları

Mutasyon	Baz çifti değişimi	Ekson	Yer	PS1/PS2'deki homolog bölgeler
PS1 A79V	gCc-gTc	4	N/TM1	A85
V82L	Gtg-Ttg	4	TM1	V88
V96F	Gtc-Ttc	4	TM1	V102
Y115H	Tat-Cat	5	TM1/2	Y121
Y115C	tAc-tGc	5	TM1/2	Y121
E120K	Gaa-Aaa	5	TM1/2	E126
E120D	gAa-gaT	5	TM1/2	E126
N135D	Aat-Gat	5	TM2	N141
M139V	Atg-Gtg	5	TM2	M145
M139T	aTg-aCg	5	TM2	M145
M139I	atG-atI	5	TM2	M145
I143F	Att-Ttt	5	TM2	I149
I143T	aTt-aCt	5	TM2	I149
M146L	Atg-Ctg	5	TM2	M152
M146V	Atg-Gtg	5	TM2	M152
H163Y	Cat-Tat	6	TM2/3	H169
H163R	cAt-cGt	6	TM2/3	H169
G209V	gGa-gTa	7	TM4	G215
I213T	aTt-aCt	7	TM4	I219
A231T	Gtc-Atc	7	TM5	A237
A231V	gCc-gTc	7	TM5	A237
L235P	cTg-cCg	7	TM5	L241
A246E	gCg-gAg	7	TM6	A252
L250S	tTg-tCg	7	TM6	L256
A260V	gCt-gTt	8	TM6	A266
C263R	Tgt-Cgt	8	TM6/HP7	C269
P264L	cCg-cTg	8	TM6/HP7	P270
P267S	Cca-Tca	8	TM6/HP7	P273
R269G	Cgt-Ggt	8	TM6/HP7	R275
R269H	cGt-cAt	8	TM6/HP7	R275
E280A	gAa-gCa	8	HP7	E286
E280G	gAa-gGa	8	HP7	E286
A285V	gCt-gTt	8	HP7	A291
L286V	Ctt-Gtt	8	HP7	L292
S290C	-	8/9 splice	HP7	S296
E318G	gAa-gCa	9	HP7/TM8	E322
G384A	gGa-gCa	11	TM8	G385
L392V	Ctg-Gtg	11	TM8	L373
C410Y	tCa-tAc	11	TM9	C391
A426P	Gcc-Ccc	12	TM9	A407
P436S	Cca-Tca	12	TM9/C	P417
PS2 N141I	aAc-aTc	5	TM2	N135
M239V	Atg-Gtg	7	TM5	M233



Şekil 11: 467 aminoasitten ve 8 transmembran bölgeden oluşan Presenilin 1 proteini (<http://www.alzforum.org/res/com/mut/pre/diagram1.asp>)



Şekil 12: PS-1'in 8 transmembran bölgesi üzerindeki mutasyonların yaklaşık yerleri dikdörtgen kutucuklar ile gösterilmiştir (13).

Her ne kadar presenilinlerin biyolojik fonksiyonu yeterince anlaşılamamış olsa da, presenilin ile nematod *Caenorhabditis elegans*'in sel-12 geni arasında çok önemli bir homoloji gözlenmektedir. Sel-12 *C. elegans*'da gelişim sırasında hücre kaderinin belirlenmesinde önemli rol oynayan bir protein olarak iş görmektedir. Söz konusu geni hedef alan çalışmalar presenilin 1'in de memelilerin gelişimi sırasında hücrenin kaderinin belirlenmesinde önemli rol oynadığını ve PS1'in yokluğunda A β seviyelerinin dramatik bir şekilde azaldığını göstermiştir (29).

APP veya presenilin genlerinde gözlenen yanlış anlamlı (missens) mutasyonlar A β peptidinin toksik şekillerinin oluşumunu arttırmaktadır. Bu mutasyonlar, APP'nin işlenmesindeki çeşitli değişikliklere dolayısıyla A β peptid oluşumunun artmasına ve A β 'nin daha uzun şekillerinin miktarının artarak, fibril oluşumunun artmasına yol açmaktadır. Bu nedenle Alzheimer hastalığı ile ilişkisi olduğu düşünülmektedir (29).

Bazı ApoE allellerinin özellikle geç başlayan Alzheimer'da etkili olduğunun belirlenmesinden sonra alfa-2-makroglobulin, alfa-1-antikimotripsin (ACT) gibi genlerin polimorfizmleri de araştırılmaya başlanmıştır (13). 1996'da Wragg ve arkadaşları presenilin 1'in intron 8'deki bir polimorfizmin geç başlayan Alzheimer oluşumu riskini artırdığını göstermişlerdir (50).

PS1'deki mutasyonlar erken başlayan ailesel Alzheimer'ın büyük çoğunluğundan sorumludur. PS1'in intron 8 polimorfizminin ise geç başlayan Alzheimer ile ilişkili olabileceği düşünülmektedir. İntron 8'de görülen bu polimorfizme göre allel 1 homozigotluğunun, allel 2 homozigotluğu ve allel 1-2 heterozigotluğu ile karşılaştırıldığında geç başlayan Alzheimer için risk faktörünü iki kat arttırdığı ileri sürülmüştür (50). Bu ilişki geç başlayan Alzheimer hastalığının hem sporadik hem de ailesel vakalarında gözlenmiştir (15, 18). Fakat farklı çalışmalarda ise presenilin 1 intron 8 polimorfizmi ile geç başlayan Alzheimer arasında her hangi bir ilişki kurulamamıştır (22, 38, 46). İspanyol Alzheimer hastaları üzerinde yapılan çalışmalar tam ters sonuçlar ortaya koymuştur. Buna göre allel 2 homozigotluğu geç başlayan Alzheimer riskini üç kat arttırmakta ve Apo E ε4 allelini taşıyan hastalarda bu oran 4.5 katına çıkmaktadır (13).

Daha sonra yapılan çalışmalarda da Alzheimer hastalığı taşıyan ailelerde presenilin 1 intron 8 polimorfizmindeki allel 1 frekans artışının, PS1 veya PS2 mutasyonlarıyla ilişkili olduğu fakat APP mutasyonları veya geç evre Alzheimer hastalığı ile ilişkili olmadığı bildirilmiştir (42).

Presenilin 1'de ekson 8 ile 9 arasındaki intron 8'de görülen bu polimorfizmin, bulunduğu yer dolayısıyla biyolojik herhangi bir etkisinin olması ihtimali oldukça düşüktür. Bu sebeple bu ilişki için üç farklı açıklama düşünülmektedir: 1) söz konusu polimorfizim hastalıkla biyolojik olarak ilişkilidir, 2) polimorfizm, PS-1 geni üzerinde farklı bir yerde bulunan ve hastalıkla biyolojik olarak ilişkili bir başka değişken ile bağlantı göstermektedir, 3) polimorfizmin bağlantı gösterdiği bölge hastalıkla biyolojik olarak ilişkili ve polimorfizme çok yakın olan komşu bir gen üzerindedir (50).

4.5. Presenilin 1'in Hücre Biyolojisi

Presenilin 1'in, insan ve fare, embriyonik ve erişkin beyin dokularını da içeren pek çok dokuda ekspresyonu yapılır (16, 19, 21). İn situ hibridizasyon çalışmalarına göre beyinde hipokampal bölge ve entorhinal kortekste en yüksek konsantrasyonda gözlenir. Ayrıca beyaz maddenin glial hücrelerinde de az miktarda transkript

bulunmaktadır. Presenilin 1 ekson 3'te alternatif bir kesime uğrar (16). 1995'te Alzheimer Hastalığı Kolaboratif Grubu, kesim bölgesinin alternatif kullanımlarıyla 26-29 arası kodonların (VRSQ) işlenme dahilinde veya işlenme haricinde kalabildiğini göstermiştir (16). Buna ek olarak lökositlerdeki PS1 transkriptlerinden bilinmeyen bir sebeple ekson 8 de kesilip çıkarılmaktadır (30).

Hidrofobik PS1 proteini 467 amino asitten oluşur ve ER membranını sekiz kez geçer (11). Proteinin N ve C terminali gibi 6. ve 7. transmembran bölgeleri (TM6 ve TM7) arasında bulunan büyük hidrofilik bir ilmek de β -katenin gibi birçok sitoplazmik protein ile ilişki kurabilmek üzere sitoplazmaya bakacak şekilde düzenlenmiştir (51). PS1 esas olarak ER üzerinde konumlanırsa da Golgi, plazma membranı ve nuklear kinetokorlarda da PS-1 immünreaktifliği gözlenmektedir (16).

PS1 holoproteini sentezlendikten sonra kesilir ve oluşan C terminal parça ve N terminal parça diğer proteinlerle ilişki kurmak üzere aktif hale geçen bir heterodimerik kompleks oluşturur (43). PS-1 proteinin kesim bölgesi 6. ve 7. transmembran bölgeleri arasında bulunmaktadır. Kesim, bu hidrofilik bölgedeki 291 ve 292'nci amino asitler arasından gerçekleşir (16). Aktif PS-1 oluşmasında rol alan bu bölgeyi etkileyen mutasyonlardan biri olan ekson 9'un delesyonu, kesim bölgesinin kaybolmasına dolayısıyla kesilmemiş PS1 proteinin birikimine yol açmaktadır (43)

4.6. Presenilin 1'in Fonksiyonları

Presenilin 1 proteininin kesin işlevi bilinmemekle beraber bazı kanıtlar PS1'in membran proteinlerinin işlenmesi, trafiği ve apoptoz ile ilişkili olabileceğini göstermektedir. Presenilin 1 mutasyonlarının Alzheimer hastalığına nasıl yol açtığı henüz tam olarak anlaşılamamakla birlikte presenilin 1 mutasyonu bulunan hastaların serumlarının incelenmesiyle 42 amino asitlik ve 43 amino asitlik amiloid beta peptid ($A\beta$ 1-42, $A\beta$ 1-43) seviyelerinin, mutasyon taşımayanlara oranla daha yüksek olduğu saptanmıştır (3, 29). Aynı zamanda PS1'i hatalı nöronlardan elde edilen veriler de PS1'in APP'nin γ -sekretaz ile işlenmesini ve $A\beta$ 40/42 salınımını güçlü bir şekilde

inhibe ettiğini göstermiştir (7). Bu bulgularla paralel olarak PS1'in 6. ve 7. transmembran bölgelerindeki aspartat bölgelerinde görülen mutasyonların PS1'in normal endoproteolizini etkilediği gibi APP'nin γ -sekretaz ile gerçekleşen kesimini de önemli derecede azalttığı belirlenmiştir (48). Bütün bu veriler bir araya toplandığında presenilin 1'in γ -sekretazın kendisi veya γ -sekretaz için hayati önem taşıyan bir kofaktör protein olması ihtimali ortaya çıkmıştır. Ancak son veriler PS1'in, γ -sekretazın kendisi olmasından çok, onu katalizleyen önemli bir makromolekül kompleksi olduğunu desteklemektedir (24).

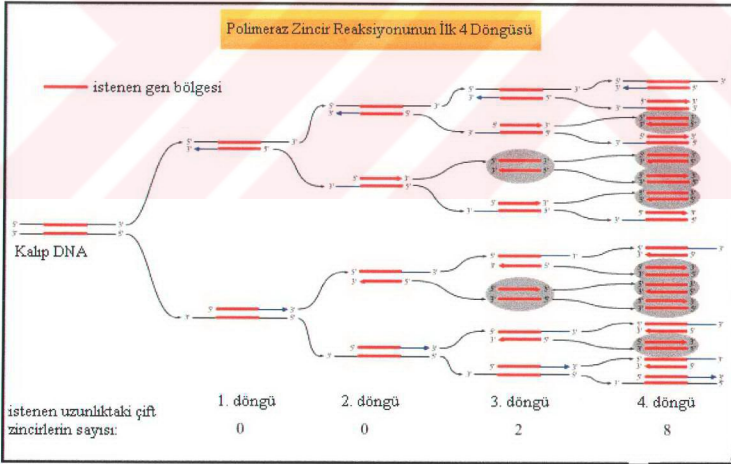
Presenilin 1'in, APP'nin yanı sıra gelişim sırasında hücre kaderinin belirlenmesinde rol oynayan Notch reseptörünün de işlenmesi ve trafiğinin düzenlenmesinde rol alabileceği, PS1'in *C. elegans*'daki homologu olan SEL-12 üzerinde ve PS-1 geni bloke edilmiş farelerle yapılan çalışmalarla gösterilmiştir (23, 49). PS-1 eksikliği ve PS-1'in 6. ve 7. transmembran bölgelerinde (TM6 ve TM7) gözlenen aspartat mutasyonları, APP'nin γ -sekretazla kesilmesini engellemesinin yanı sıra Notch'un da endoproteolitik kesimini engellemektedir. Notch'un intraselüler bölgesi endoproteoliz yoluyla kesildikten sonra sitoplazmaya salınır ve daha sonra gelişim sırasında hücre kaderinin belirlenmesini düzenleyen özel transkripsiyon faktörlerini aktive etmek üzere nükleusa girer (37). PS-1 ve notch genleri bloke edilmiş farelerden elde edilen sonuçlar, bu hayvanların bazı gelişimsel özellikler açısından fenotipik olarak birbirine benzediğini göstermiştir. Bu bulgular PS1'in Notch sinyalizasyonunda fonksiyonel bir rolü olduğuna işaret etmektedir (14, 20). Her ne kadar bahsi geçen veriler PS-1'in APP ve Notch işlenmesinde ortak bir fonksiyonu olduğunu gösterse de PS-1'in 286. pozisyonunda görülen mutasyon, APP ve Notch'un endoproteolizisinde PS-1'in ayrı biyolojik fonksiyonlarının olduğuna işaret etmektedir (20).

PS-1 mutasyonlarının sinir hücrelerinde apoptoza karşı duyarlılığı arttırması, PS-1'in apoptozun düzenlenmesindeki rolüne işaret etmektedir (10, 44). Öte yandan PS-1 mutasyonları sonucu apoptoza karşı duyarlılığın artmasının PS-1 tarafından β -kateninin stabilize edilmesindeki azalmaya bağlı olduğu düşünülmektedir (51). Bu fikirle uyumlu olarak PS-1 mutasyonu taşıyan Alzheimer hastalarının beyinlerinde β -katenin seviyeleri

gerçekten de azalmıştır. PS-1'in apoptoz ile ilgili fonksiyonları hakkında çelişkili sonuçlar bulunmaktadır. Mutant PS-1 geni içeren bazı nöronlarda apoptoz görülmemektedir. Bu durum proapoptotik olaylarda hücreSEL farklılıklar olduğu ihtimalini arttırmaktadır (2).

4.7. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)

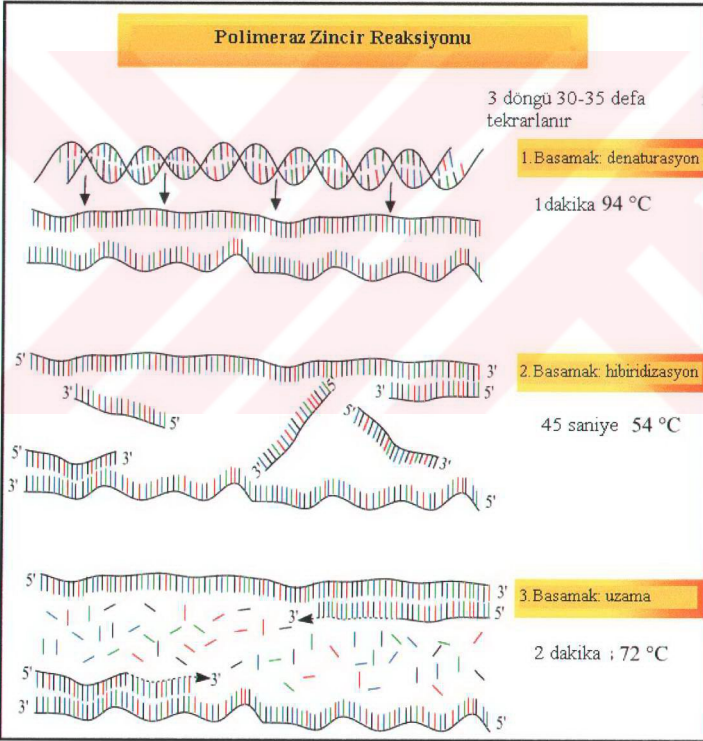
Polimeraz zincir reaksiyonu, incelenmek istenen DNA parçasının çoğaltıldığı in vitro klonlama yöntemidir (Şekil 13). PZR ile seçici olarak tek bir DNA molekülü bir kaç saat içerisinde bir kaç milyon kat çoğaltılır. Reaksiyon, DNA'nın ısı ile tek iplikli hale getirilmesinden sonra incelenecek bölgeye özel olarak sentezlenmiş iki adet kısa oligonükleotidin (primer) DNA zincirlerine bağlanmaları ve DNA polimeraz tarafından uygun sıcaklıkta zincirlerin tamamlayıcılarının sentezlenerek, istenen bölgenin çoğaltılması esasına dayanır (1, 35).



Şekil 13 : Polimeraz Zincir Reaksiyonunun şematik görüntüsü

(<http://allserv.rug.ac.be/~avierstr/principles/pcr.html>)

Döngüsel bir reaksiyon olan PZR üç basamaktan oluşur. Birinci basamak, primerlerin bağlanabilmesi için çift iplikli DNA'nın tek iplikli hale getirildiği **denaturasyon** aşamasıdır. İkinci basamak, primerlerin, incelenecek bölgenin sınırlarını belirlemek ve DNA polimeraz için serbest 3'OH ucu oluşturmak üzere kalıp DNA'ya bağlanmasıdır. Bu aşama **hibridizasyon** olarak adlandırılır ve genellikle 37-55 °C arasında gerçekleşir. Son basamak, DNA polimerazın ortamdaki deoksiribonükleotid trifosfatları (dNTP) MgCl₂ eşliğinde primerin serbest 3'OH ucuna ekleyerek yeni zincirin sentezini tamamladığı **uzama** aşamasıdır (şekil 14). Bu üç basamak bir PZR reaksiyonunda 30-35 defa tekrarlanır.



Şekil 14: Bir PZR döngüsünün basamakları

(<http://allserv.rug.ac.be/~avierstr/principles/pcr.html>)

Polimeraz zincir reaksiyonunun kısa sürelerde ve daha verimli şekilde kullanılmasına olanak veren en önemli iki olay, yüksek ısılara dayanıklı DNA polimerazların kullanılmaya başlanması ve termal döngü cihazlarının keşfidir (1, 26, 35).

4.8. DNA'nın Enzimatik Kesimi

DNA'nın enzimatik kesimi restriksiyon endonükleazları kullanılarak yapılır. Bu endonükleazlar çift iplikli sarmal DNA'da özel nükleotid dizilerini tanıyan ve DNA'nın her iki ipliğini kesen enzimlerdir. Kesim işleminin gerçekleştiği alan ve kesme şekli kullanılan enzime göre değişir.

Şimdiye kadar tanımlanan restriksiyon enzimleri üç grup içinde sınıflandırılmıştır. I., II. ve III. tip restriksiyon enzimleri.

I. tip restriksiyon endonükleazları; hem endonükleaz hem de metilaz işlevlerine sahip multimerik enzimlerdir. Bu enzimlerde genellikle üç tip alt birim bulunur: R alt birimi restriksiyon endonükleazı, M alt birimi modifikasyon metilazı olarak iş görür, S alt birimi ise DNA'daki hedef yeri tanımdan sorumludur. Enzim hedef noktayı tanıyıp DNA'ya bağlandığında ya restriksiyon ya da modifikasyon yapar. Bu enzimlerde, kesme yeri tanıma yerinden 1000 den fazla baz çifti uzaktadır.

II. tip restriksiyon endonükleazları; sadece restriksiyon etkisinden sorumludur. Bu enzimler için tanıma yerleri 4-6 baz çiftlik palindromik dizilerdir. Bu enzimlerin çoğu için kesme çok özgüldür ve kesilme genellikle tanıma dizisinde meydana gelir. Bu enzimler kesmeyi iki zincirde karşılıklı noktalarda yapar ve küt uçlu parçalar oluşturur, diğerleri ise karşı karşıya gelmeyen noktalarda kesme yaparak yapışkan uçlu parçaların oluşumuna yol açar.

III. tip restriksiyon endonükleazları; I tip enzimlere benzerler. Bu tipin DNA ya bağlanması için ATP'ye gereksinimi vardır. Metillenme bağlanma yerinde

olur; restriksiyon aktivitesi ise tanıma yerinden yaklaşık 24-26 baz çifti ötede meydana gelir (26, 28).

4.8.1. Restriksiyon Parça Uzunluk Polimorfizmi (RFLP)

Bu yöntem, DNA'nın restriksiyon endonükleazları kullanılarak enzimatik olarak kesilmesi ve oluşan parçaların analizi esasına dayanır. Organizmanın DNA'sının incelenmek istenen kısmındaki farklılıklar endonükleazların kesim bölgeleriyle ortaya çıkar. Endonükleazların bu bölgeleri keserek oluşturduğu parçaların uzunlukları belirlenerek, organizmanın genotipi olarak yorumlanır. Kesim parçalarının analizi jel elektroforezi ile yapılır (26, 28, 35).

5. GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışma, İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Dahili Tıp Bilimleri Bölümü Psikiyatri Anabilim Dalı Geropsikiyatri Bilim Dalı tarafından, "Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, Fourth Edition" (DSM-IV)'a göre teşhisi konulan 35 geç başlangıçlı Alzheimer hastası (yaş ortalamaları 74.2 ± 7.1 , %77 kadın) ve hastalarla yaş paralelliği gösteren ve herhangi bir nörodejeneratif hastalığı bulunmayan 22 sağlıklı birey (yaş ortalamaları 72.8 ± 5.8 , %55 kadın) üzerinde gerçekleştirildi.

5.1 Kandan DNA İzolasyonu

Hasta ve kontrol bireylerinden vakumlu steril K3-EDTA'lı tüplere alınan periferik kan örnekleri -20°C 'de saklandı ve ilk 3-5 gün içerisinde DNA'ları izole edildi.

Çalışmada "Yüksek tuz konsantrasyonu kullanılarak DNA izolasyonu" yöntemi kullanıldı (35).

5.1.1. Yüksek tuz konsantrasyonu kullanılarak kandan DNA izolasyonu

1. 0,5 ml K3-EDTA'lı kan üzerine 1,5 ml lizis tampon eklendi ve $+4^{\circ}\text{C}$ 'de 15 dakika inkübe edildi.
2. Soğutmalı santrifüj kullanılarak $+4^{\circ}\text{C}$ 6000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi.
3. Üst sıvı atılıp, pellet üzerine 0,5 ml lizis tampon eklendi ve 6000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi.
4. 3. işlem ortamdan hemoglobin uzaklaşmaya kadar tekrarlandı.
5. Pellet üzerine 0,5 ml nükleaz tampon eklendi ve üzerine 2,5 μl %10 SDS, 1,5 μl proteinaz K eklenerek 37°C 'de bir gece inkübasyona bırakıldı.
6. İnkübasyon sonunda tüplere eşit hacimde 5M NaCl ve bidistile su eklenerek karıştırıldı.
7. Oda sıcaklığında 20 dakika, 10.000 rpm'de santrifüj edildi.

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

5.1.2. DNA miktarı ve saflığının ölçülmesi

DNA izolasyonunun sonuçları spektrofotometrik ölçüm yöntemi ile değerlendirildi. DNA konsantrasyonu 260 nm'deki optik densitesinden, saflığı da 260 nm/280 nm'deki OD oranından tespit edildi (28). DNA konsantrasyonu ve saflığı aşağıdaki formüller kullanılarak hesaplandı.

DNA konsantrasyonu (mg / ml)= OD 260nm x seyreltme faktörü x 50

$$\text{DNA saflığı} = \frac{\text{OD 260}}{\text{OD 280}} = 1.8 \pm 0.1$$

5.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu Yöntemi

Lökositlerden izole edilen genomik DNA üzerindeki PS-1 geninin intron 8 bölgesini kapsayan 199 baz çiftlik alan PZR yöntemi kullanılarak çoğaltıldı. Wragg'ın yöntemi (50) esas alınarak polimeraz zincir reaksiyonu karışım içeriği ve PZR programı üzerinde modifikasyonlar yapılarak kullanıldı.

5.2.1. Primerlerin hazırlanması

Test edilen polimorfizmlerin belirlenebilmesi için kullanılan ileri (F1) ve geri (R1) primerler, (Invitrogen™, Life Technologies, Scotland, UK) liyofilize halde satın

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

Bu çalışmada PS-1 geni polimorfizmlerini tespit etmek amacıyla Polimeraz Zincir Reaksiyonunda (PZR) kullanılan ve presenilin 1 geninin intron 8 bölgesinde 199 baz çiftlik bir alanı çoğaltan ileri (F1) ve geri (R1) primerler kullanıldı. Primerlerin dizileri aşağıda verilmiştir (50).

F1-5' CACCCATTTACAAGTTTAGC 3'

R1-5' CACTGATTACTAATTCAGGATC 3'

Geri primerde altı çizili olarak gösterilen nükleotidler yanlış eşleşme yapmak üzere dizayn edilmişlerdir (50). İncelenecek olan polimorfizm, bölge üzerinde ne bir restriksiyon noktasının oluşmasına ne de bir restriksiyon noktasını yok olmasına neden olmaktadır. Ancak primerin 3' ucuna 4 veya 5 nükleotid, polimorfizme ise 5 veya 6 nükleotid uzaklıkta oluşturulan bu yanlış eşleşme sayesinde, ortaya çıkan PZR ürünlerinin 16. nükleotidinde C (sitozin) bulunması durumunda bir BamH1 kesim noktasının oluşması, A (adenin) bulunması durumunda ise BamH1 kesim noktasının oluşmaması yapay olarak sağlanmaktadır. Böylece polimorfizm bir restriksiyon enzimi ile takip edilebilmektedir.

5.2.2. PZR karışımı

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

Tablo 3: PZR karışımı

STOK	FİNAL KONSANTRASYON
10 x TNK50 tamponu	1x
MgCl ₂ (25 mM)	1,5mM
İleri primer (100 pmol/μl)	10 pmol/μl
Geri primer (100 pmol/μl)	10 pmol/μl
dNTP'ler (2mM)	200 μM
Taq DNA polimeraz 5U/μl	0,5U/reaksiyon
Kalıp DNA	100ng
Total hacim Sigma su ile 25μl'ye tamamlanır	

PZR karışımı 25 μl olacak şekilde hazırlandıktan sonra, üzerine 50 μl mineral yağ eklenip termal döngü cihazına konuldu.

5.2.3. PZR programı

1. 94°C'de 5 dakika
 2. 94°C'de 30 saniye
 3. 45 °C'de 30 saniye
 4. 72 °C'de 30 saniye
 5. 72°C'de 3 dakika
- } 35 döngü

olarak düzenlendi .

5.2.4. PZR koşullarının optimizasyonu

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

Magnezyum, DNA polimerazın işlevinde kofaktör görevi yaptığından çalışmada magnezyum klorür konsantrasyonu, 1,5mM'den başlayıp 2mM'e kadar değiştirilerek denendi. En uygun konsantrasyon olarak saptanan 1,8mM MgCl₂ konsantrasyonu kullanıldı.

Çift iplikli nükleik asit moleküllerindeki baz çiftlerinin yarısının ortadan kalkmasına neden olan sıcaklık olan ve primerlerin kalıp DNA'ya bağlanma ısısını belirleyen Tm değeri aşağıdaki formüle göre hesaplandı (35)

$$Tm = [(A+T\text{'lerin sayısı}) \times 2^\circ C + (G+C\text{'lerin sayısı}) \times 4^\circ C] \quad (32)$$

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

Bağlanma ısısı Tm değeri hesaplandıktan sonra birkaç derecelik ısı değişiklikleri denenerek belirlendi.

5.3. PZR Ürünlerinin Agaroz Jel Elektroforezinde İncelenmesi

Bu çalışmada PZR ürünlerinin büyüklüğü göz önüne alınarak agaroz jel elektroforezi kullanıldı. PZR ürünlerinin analizleri %1,5'luk agaroz jelde yürütülerek yapıldı. 40ml'lik kaset kullanıldığından %1,5'luk jel için 0.6gr Agaroz 40ml 1xTBE içerisinde çözüldü. Isıtıcı ve manyetik karıştırıcı üzerinde şeffaf hale gelinceye kadar kaynatılan ve karıştırılan jeller daha sonra soğumaları için bekletildiler. Tam olarak soğumalarına izin verilmeden üzerlerine çeker ocak altında 0.8µl etidyum bromid (EB) eklendi. EB'in iyice dağılması sağlandıktan sonra jeller, polimerize olması için tarağı yerleştirilmiş olan kaset içerisine, hava kabarcığı kalmamasına dikkat edilerek dökülüp çeker ocak altında 2 saat bekletildi. Jel polimerize olduktan sonra tarak çıkartılıp kaset ile birlikte orta boydaki elektroforez tankı (Biometra horizontal jel electrophoresis apparatus) içerisine yerleştirildi. Jelin üzerini kaplayacak şekilde tankı dolduran 1xTBE tamponu eklendi. 8 µl'lik PZR ürünleri 1-2 µl yükleme tamponu (bromo fenol mavisi) ile karıştırılarak jele yüklendi. 80 volt 24 miliamper'de 40 dakika yürütüldü. Daha sonra PZR ürünlerinin büyüklükleri ultraviyole ışık altında birinci kuyuya yüklenmiş olan FermantasTM pBR322 DNA/BsuRI (HaeIII) moleküler ağırlık belirleme standardı ile birlikte incelenerek yorumlandı ve polaroid film ile fotoğrafları çekildi. PZR ürünleri restriksiyon parça uzunluk polimorfizmi (RFLP) yöntemi uygulanana kadar +4°C'de saklandı.

5.4. PS-1 Geni PZR Ürününün BamH I Enzimi ile Kesilmesi

Daha önce belirtildiği üzere PZR ürünlerinde 16. nükleotidde C (sitozin) bulunması durumunda bir BamH1 kesim noktası oluşması, 16. nükleotidde A (adenin) bulunması durumunda da BamH1 kesim noktasının oluşmaması sağlanmıştı. Bu sebeple PS-1 geni intron 8 bölgesinde 16. nükleotidde bulunan bu polimorfizm, II.tip restriksiyon endonükleazlarından BamH1 enziminin kullanılmasıyla tespit edildi.

BamH I ile kesim için 8 µl PZR ürünü 2x tampon ve 2 ünite enzim ile 37 °C'de 4 saat inkübe edildi (13, 42, 50). Elde edilen kesim ürünleri %3'lük agaroz jelde yürütülerek analizleri yapıldı.

5.4.1. PS-1 geninin BamH I enzimiyle oluşan kesim ürünleri

PS-1 geninin 199 bp uzunluğundaki PZR ürününün BamH I enzimiyle kesimi; her iki allelde de kesim bölgesi bulunmuyorsa 199 bp'lik tek bir parçanın, tek bir kesim bölgesi bulunuyorsa 182bp'lik ve 7bp'lik parçaların oluşmasını sağlar. Allellerin heterozigot olması durumunda ise 199, 182 ve 7bp'lik parçalar meydana gelir. Ancak %3'lük agaroz jel elektroforezinde 7bp'lik parçalar izlenmez (50)

5.5. RFLP Ürünlerinin Agaroz Jel Elektroforezinde İncelenmesi

RFLP ürünlerinin boyları arasındaki farklar göz önüne alındığında, kullanımı daha pratik olan yüksek konsantrasyonda bir agaroz jelin elektroforez için yeterli olduğu görüldü. Çalışmada, RFLP ürünlerinin analizi için %3'lük agaroz jel kullanıldı. %3'lük jel için 1,2 gr Agaroz 40ml 1xTBE içerisinde çözüldükten sonra, jel PZR ürünlerinin incelenmesinde anlatıldığı şekilde hazırlandı ve 8 µl'lik kesim ürünleri 1-2 µl yükleme tamponu ile karıştırılarak jele yüklendi. Kesim sonuçları UV ışık altında Fermantas™ pBR322 DNA/BsuRI (HaeIII) moleküler ağırlık belirleme standardı ile karşılaştırılarak incelendi ve fotoğrafları çekildi.

Elektroforez işleminin tamamlanmasından sonra EB içeren jeller, üzerlerinden su geçirilerek yıkandı. Daha sonra eşit hacimde 0.5M $KMnO_4$ ve 2.5N HCl eklenip 1-2 saat bekletildi. Son olarak eşit hacimde 2.5N NaOH ile karıştırılıp dekontamine edildi (35).

5.6. İstatistiksel Değerlendirmeler

İstatistiksel analizler UNISTAT 5.0 istatistik yazılım programı kullanılarak hesaplandı. Yaşın gruplara göre dağılımı Student's t-tests, genotiplerin, allellerin ve cinsiyetlerin gruplara göre dağılımı ki-kare yöntemleri kullanılarak analiz edildi. PS-1 genotipleri BamHI enzimi için üç grup halinde sınıflandırıldı. BamHI alleli taşıyıcıları için 1/1, 1/2 ve 2/2 genotipine sahip kişiler ele alındı. $p < 0.05$ olan veriler anlamlı kabul edildi (36).

5.7. Kullanılan Kimyasal Maddeler

1. Agarose, Sigma A9414
2. Amonyum persülfat, Sigma A9164
3. BamHI restriksiyon enzimi, 4000U, Fermentas ER0051
4. Borik asit, Merck K21183760
5. Bromofenol mavisi, Merck 8122
6. dNTP set 100mM, Fermentas (dATP R0141, dCTP R0151, dGTP R0161, dTTP R0171)
7. EDTA0.5M, Sigma E 7889
8. Ethanol, Reidel Haden 32221
9. KCl, Sigma P4504
10. Lauryl sülfat (SDS), Sigma L4509
11. MgCl, Sigma M0250
12. Mineral yağ, Sigma M5904
13. pBR322 DNA/BsuRI (HaeIII), DNA moleküler ağırlık merdiveni, Fermentas SM271
14. Polaroid film (667), Sigma F4638

15. Potasyum bikarbonat, Sigma P9144
16. Potasyum klorür, Aldrich 40931-6
17. Potasyum permanganat, Merck 50801000
18. Primerler, Invitrogen™, Life Technologies, Scotland, UK
19. Proteinaz K, Sigma P4914
20. Sodyum klorür, Sigma S3014
21. Sukroz, Sigma S2395
22. Taq DNA polymerase, Fermentas EPO401 ve Promega M186E
23. Titriplex (EDTA), Merck K90602421
24. Tris baz, Sigma T8524
25. Tris EDTA , Sigma T9285
26. Triton X-100, Sigma X100

5.8. Kullanılan Çözeltiler

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

Tris baz	54gr
Borik asit	27.5gr
0.5M EDTA pH 8.0	20ml
7. Lizis Tamponu

NH ₄ Cl	155 mM
KHCO ₃	10 mM
EDTA	0,1 mM
8. Nükleaz Tampon

EDTA	25 mM
NaCl	400 mM
Tris Baz	10 mM
9. 10xTNK50 Tamponu	
Tris HCl (pH 8.6 25°C)	100mM
MgCl ₂	15mM
NH ₄ Cl	50mM
KCl	0.5M
10. EB Dekontaminasyon tamponları	
KMnO ₄	0.5 M
HCl	2.5N
NaOH	2.5N
11. BamHI Tamponu (firma tarafından sağlandı)	
Tris-HCl (pH 8.0)	10mM
MgCl ₂	5mM
KCl	100mM
Triton X-100	%0.02
BSA	0.1mg/ml
12. TE (pH 7.4)	
Tris HCl (pH 7.4)	10mM
EDTA (pH 8)	1mM

6. BULGULAR

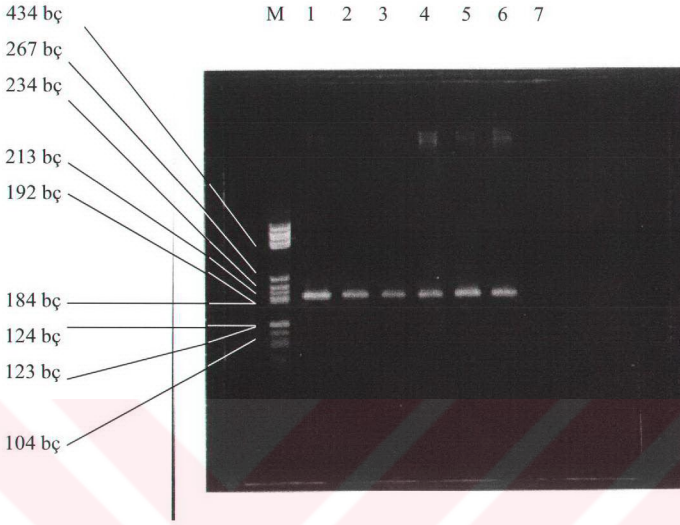
Çalışmada 35 Alzheimer hastasının ve herhangi bir nörodejeneratif hastalığı bulunmayan cinsiyet ve yaş bakımından hasta grubuyla uygunluk gösteren 22 sağlıklı bireyin PS-1 genotipleri saptandı.

6.1. DNA İzolasyonu

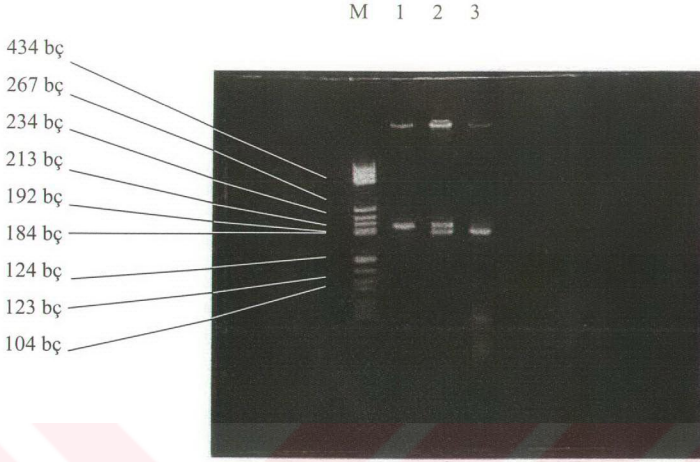
Uygulanan yüksek tuz konsantrasyonu yöntemi sonucunda, örneklerin 280nm / 260nm dalga boylarındaki OD değerleri okundu ve bu değerlerin 1.8 ± 0.1 arasında, DNA konsantrasyonlarının ise 50-150 ng/ μ l olduğu belirlendi.

6.2. Genotipleme Sonuçları

Hasta ve kontrol grubuna ait kan örneklerinden elde edilen genomik DNA'dan, PS-1 geninin intron 8 bölgesine özgü primerler kullanılarak PZR yöntemi ile 199 bp'lik DNA parçası çoğaltıldı (Şekil 15). Elde edilen DNA parçaları, BamH I restriksiyon enzimi kullanılarak kesime tabi tutulduktan sonra kesim ürünleri değerlendirilerek (RFLP) PS-1 geni allelik polimorfizmleri belirlendi. Hasta ve kontrol grubuna ait bazı örneklerin BamH I kesim ürünleri Şekil 16'da görülmektedir.



Şekil 15: %1.5'luk agaroz jel elektroforezinde PS-1 geni PZR ürünleri görülmektedir. 1. kuyu DNA moleküler ağırlık belirteci, 2-6. kuyular 199 bç'lik PZR ürünü, 7. kuyu negatif kontrol.

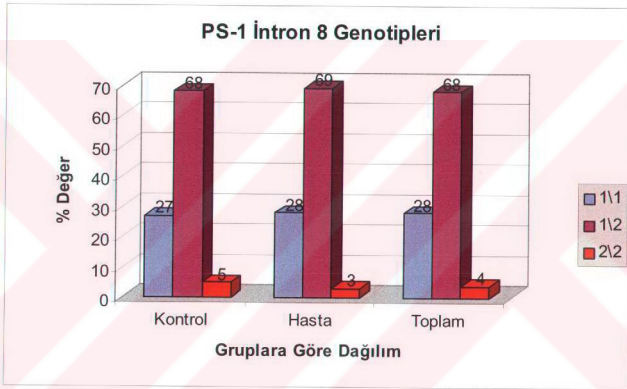


Şekil 16: Agaroz jel elektroforezinde BamH I kesim ürünleri görülmektedir. 1. kuyu DNA moleküler ağırlık belirteci, 2. kuyu “1/1”, 199 bç’lik tek bant, 3. kuyu “1/2”, 199 ve 182’bç’lik 2 bant, 4. kuyu “2/2”, 182 bç’lik tek bant.

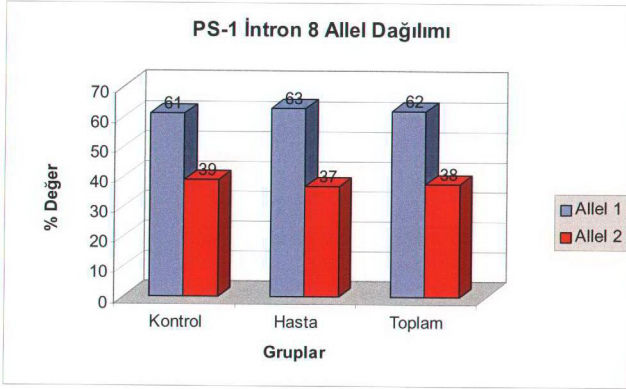
Hastaların ve sağlıklı kontrollerin genetik analizleri sonucunda kontrollerin 6’sının (%27) 1/1, 15’inin (%68) 1/2, 1’inin (%5) 2/2 genotipine sahip olduğu, hastaların ise 10’unun (%28) 1/1, 24’ünün (%69) 1/2, 1’inin (%3) 2/2 genotipine sahip olduğu belirlendi (Tablo 4). Ancak kontrol ve hasta grupları arasında genotip dağılımları ($P=0,95$, Şekil 17) veya allel dağılımları ($P=0,87$, Şekil 18) açısından anlamlı bir fark bulunamadı.

Tablo 4: Hasta ve kontrol gruplarında BamHI restriksiyon enzimiyle kesim sonucunda oluşan genotiplerin ve allellerin dağılımı

	Genotip			Allel	
	1/1	1/2	2/2	1	2
Sağlıklı Kontroller	6(0.27)	15(0.68)	1(0.05)	27(0.61)	17(0.39)
Alzheimer Hastaları	10(0.28)	24(0.69)	1(0.03)	44(0.63)	26(0.37)



Şekil 17: Hasta ve kontrol gruplarında BamHI genotip sıklıkları $\chi^2=0,004$; $P=0,95$ (2/2 genotipleri istatistiksel değerlendirmeden çıkartıldı)



Şekil 18: Hasta ve kontrol gruplarında Allel 1 ve Allel 2'nin dağılımı
 $\chi^2=0,025$; $P=0,87$

7. TARTIŞMA

Alzheimer hastalığının (AH) genetik kökenini araştırmak üzere çeşitli çalışmalar yapılmıştır. Yapılan çalışmalarda Presenilin-1 (PS-1) geninin erken başlayan Alzheimer hastalığı ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (13, 16, 29). Biz bu çalışmada geç Alzheimer ile PS-1 geni intron 8 polimorfizmi arasındaki ilişkiyi inceledik.

Alzheimer hastalığı ile ilgili genetik çalışmalar daha çok Apolipoprotein E (Apo E), Amiloid Öncül Protein (APP), Presenilin-1 (PS-1), Presenilin-2 (PS-2) ve Antikimotripsin (ACT) genleri üzerinde yoğunlaşmıştır. Bunlardan Apo E polimorfizmlerinin geç başlangıçlı Alzheimer hastalığı (GBAH) üzerinde etkili olduğu gösterilmiştir (13, 16, 29, 31). APP mutasyonlarının ise Alzheimer hastalığı ile ilişkisi amiloid plak oluşumu üzerinde etkili olması ile açıklanmıştır. Buna göre, APP mutasyonları APP'nin yapısını değiştirmekte ve dolayısıyla APP proteinin farklı sekretazlar (α , β , γ) ile kesilmesini etkilemektedir. Böylece bu sekretazların APP'yi kesmesiyle oluşan amiloid beta peptidinin ($A\beta$) miktarı ve tipi değişmekte, buna bağlı olarak da esas bileşeni $A\beta$ olan amiloid plakların oluşumu etkilenmektedir. PS-1 ve PS-2 genleri ise yüksek oranda homoloji gösteren ve özellikle erken Alzheimer ile ilişkisi olduğu düşünülen genlerdir.

Alzheimer hastalarının yaklaşık %10'unda, klinik belirtiler 50 yaşından önce ortaya çıkmakta ve otozomal dominant kalıtım göstermektedir. Yapılan çalışmalarda erken başlayan Alzheimer hastalarının (EBAH) %30-%50'sinin kromozom 14q üzerindeki presenilin1 geni ile ilişkili olduğu saptanmıştır (13, 16, 29). Erken başlayan ailesel Alzheimer hastalığında presenilin 1 geninde yaklaşık 40 çeşit yanlış anlamlı (missens) mutasyon ve bir ekson delesyonu saptanmıştır (11). Bu mutasyonların çoğu, sekiz geçişli bir transmembran protein olan presenilin 1'in membrana gömülü bölgelerinin hemen yakınında bulunmaktadır (13). Presenilin 1 proteinin kesin işlevi bilinmemekle beraber bazı kanıtlar PS1'in membran proteinlerinin işlenmesi, trafiği ve apoptoz ile ilişkili olabileceğini göstermektedir. Presenilin 1 mutasyonlarının Alzheimer hastalığına nasıl yol açtığı henüz tam olarak anlaşılammakla birlikte presenilin 1 mutasyonu bulunan hastaların serumlarının incelenmesiyle 42 amino asitlik ve 43

amino asitlik amiloid beta peptid (A β 1-42, A β 1-43) seviyelerinin, mutasyon taşımayanlara oranla daha yüksek olduğu saptanmıştır (29).

PS1 holoproteini sentezlendikten sonra kesilir ve oluşan C terminal parça ve N terminal parça diğer proteinlerle ilişki kurmak üzere aktif hale geçen bir heterodimerik kompleks oluşturur (43). PS-1 proteinin kesim bölgesi 6. ve 7. transmembran bölgeleri arasında bulunmaktadır. Kesim, bu hidrofilik bölgedeki 291 ve 292'nci amino asitler arasından gerçekleşir (16). Bu bölge insan, maymun ve fareden elde edilen çeşitli dokulara ait hücreler ve beyin hücre kültürlerinde PS-1'in, N-terminal (~ 28 kDa) ve C-terminal (~ 18 kDa) olmak üzere parçalar halinde birikimler oluşturmasıyla saptanmıştır (29). Aktif PS-1 oluşmasında rol alan bu bölgeyi etkileyen mutasyonlardan biri olan ekson 9'un delesyonu, kesim bölgesinin kaybolmasına dolayısıyla kesilmemiş PS1 proteinin birikimine yol açmaktadır (43). Bundan başka, PS1'de görülen mutasyonlar sonucu fibril oluşturmaya ve birikmeye daha yatkın olan A β 42'nin üretiminin arttığı in vitro ve in vivo çalışmalarda gösterilmiştir. Böylece PS1'in APP'nin işlenmesinde rol oynadığı açığa çıkmıştır (3). PS-1 proteini hatalı olan nöronlardan elde edilen veriler bu görüşü destekler niteliktedir. Buna göre PS-1'in iş görmemesi durumunda, APP'nin γ -sekretaz ile işlenmesi ve A β 40/42 salınması güçlü bir şekilde baskılanmaktadır (7). Bu bulgularla paralel olarak PS1'in 6. ve 7. transmembran (TM6 ve TM7) bölgelerindeki aspartat mutasyonlarının PS1'in normal endoproteolizini etkilediği ve dolayısıyla APP'nin γ -sekretaz ile kesilmesini de önemli derecede azalttığı belirlenmiştir (48). Bütün bu veriler bir araya toplandığında presenilin 1'in γ -sekretazın kendisi veya γ -sekretaz için hayati önem taşıyan bir kofaktör protein olması ihtimali ortaya çıkmıştır. Ancak son veriler PS1'in, γ -sekretazın kendisi olmasından çok, onu katalizleyen önemli bir makromolekül kompleksi olduğunu desteklemektedir (24).

Presenilin 1'in, APP'nin yanı sıra gelişim sırasında hücre kaderinin belirlenmesinde rol oynayan Notch reseptörünün de işlenmesi ve trafiğinin düzenlenmesinde rol alabileceği, PS1'in *C. elegans*'daki homologu olan SEL-12 üzerinde ve PS-1 geni bloke edilmiş farelerle yapılan çalışmalarla gösterilmiştir (23, 49). PS-1 eksikliği ve PS-1'in 6. ve 7. transmembran bölgelerinde (TM6 ve TM7) gözlenen aspartat mutasyonları, APP'nin γ -sekretazla kesilmesini engellemesinin yanı

sıra Notch'un da endoproteolitik kesimini engellemektedir. Notch'un intraselüler bölgesi endoproteoliz yoluyla kesildikten sonra sitoplazmaya salınır ve daha sonra gelişim sırasında hücre kaderinin belirlenmesini düzenleyen özel transkripsiyon faktörlerini aktive etmek üzere nukleusa girer (37). PS-1 ve notch genleri bloke edilmiş farelerden elde edilen sonuçlar, bu hayvanların bazı gelişimsel özellikler açısından fenotipik olarak birbirine benzediğini göstermiştir. Bu bulgular PS1'in Notch sinyalizasyonunda fonksiyonel bir rolü olduğuna işaret etmektedir (14, 20).

PS1'deki mutasyonların erken başlayan ailesel Alzheimer hastalığının büyük bir çoğunluğundan sorumlu olmasının yanı sıra PS1'in intron 8 polimorfizminin de geç başlayan Alzheimer hastalığı ile ilişkili olabileceği düşünülmektedir. İntron 8'de görülen bu polimorfizme göre allel 1 homozigotluğunun, allel 2 homozigotluğu ve allel 1-2 heterozigotluğu ile karşılaştırıldığında geç başlayan Alzheimer için risk faktörünü iki kat arttırdığı ileri sürülmüştür (50). Bu ilişki geç başlayan Alzheimer hastalığının hem sporadik hem de ailesel vakalarında gözlenmiştir (15, 18). Biz, geç başlayan Alzheimer hastalığı ile PS-1 geni intron 8 polimorfizmi arasındaki ilişkiyi araştırdığımız bu çalışmamızda, Alzheimer hastalarının ve sağlıklı kontrol bireylerinin, genotip ve allel dağılımları açısından anlamlı bir fark göstermediğini belirledik. Alzheimer hastalarının 10/35'inin (%28) 1/1, 24/35'inin (%69) 1/2, 1/35'inin (%3) 2/2, sağlıklı kontrollerin ise 6/35'inin (%27) 1/1, 15/35'inin (%68) 1/2, 1/35'inin (%5) 2/2 genotipine sahip olduğu saptandı. Keza bizim sonuçlarımızla paralellik gösteren ve bu intron 8 polimorfizmi ile geç başlayan Alzheimer hastalığı arasında herhangi bir ilişkinin bulunmadığı çalışmalar da yayınlanmıştır (22, 38, 46). Öte yandan İspanyol Alzheimer hastaları üzerinde yapılan çalışmalar ise tam ters sonuçlar ortaya koymuştur. Buna göre allel 2 homozigotluğu Alzheimer riskini üç kat arttırmakta ve Apo E ε4 allelini taşıyan hastalarda bu oran 4.5 katına çıkmaktadır (13). Ayrıca Alzheimer hastalığı taşıyan ailelerde presenilin 1 intron 8 polimorfizmindeki allel 1 frekans artışının, PS1 veya PS2 mutasyonlarıyla ilişkili olduğu fakat APP mutasyonları veya geç başlayan Alzheimer hastalığı ile ilişkili olmadığı da rapor edilmiştir (42).

Presenilin 1'de ekson 8 ile 9 arasındaki intron 8'de görülen bu polimorfizmin, bulunduğu yer dolayısıyla biyolojik herhangi bir etkisinin olması ihtimali oldukça

düşüktür. Bu sebeple bu ilişki için üç farklı açıklama düşünülmektedir: 1) söz konusu polimorfizm hastalıkla biyolojik olarak ilişkilidir, 2) polimorfizm, PS-1 geni üzerinde farklı bir yerde bulunan ve hastalıkla biyolojik olarak ilişkili bir başka değişken ile bağlantı göstermektedir, 3) polimorfizmin bağlantı gösterdiği bölge hastalıkla biyolojik olarak ilişkili ve polimorfizme çok yakın olan komşu bir gen üzerindedir (50).

Ekson 8 ile 9 arasındaki bu intronik polimorfizmin, bulunduğu yer nedeniyle, ekson 8 ile 9'un farklı bir şekilde kırılmasında rol oynayabileceği ve bu açıdan hastalıkla doğrudan ilişkisi olabileceği düşünülmektedir. Ekson 8'in bazı dokularda alternatif olarak kırılmaya uğradığı gösterilmiştir. Bir İngiliz ailesi üzerinde yapılan çalışmalar intron 8'in akseptör bölgesindeki bir mutasyonun ekson 9'un kaybolmasına yol açarak erken başlayan Alzheimer hastalığına yol açtığını göstermiştir (50). Bunlara ek olarak ekson 8'in erken başlayan Alzheimer'a yol açan en önemli mutasyonların bulunduğu bölge olduğu da belirtilmiştir (39). Ancak polimorfizm hastalığın sebebiyle direkt olarak ilişkili olsaydı, bu ilişkinin bütün popülasyonlarda görülmesi gerekirdi. Oysa farklı popülasyonlarda farklı sonuçlar elde edilmiştir (15, 18, 22, 38, 42, 46, 50). Bu sonuçlar polimorfizmin PS-1 geni üzerinde farklı bir yerde bulunup hastalıkla biyolojik olarak ilişkili bir başka değişken ile bağlantı gösterdiği görüşünü ön plana çıkarmaktadır. 1/1 genotipine sahip hastaların açık okuma çerçevelerinin dizi analizleri sonucu kodlayan bölgelerde herhangi bir değişiklik açığa çıkarılmamıştır (50). Bu durum PS-1 'de intronik polimorfizmle bağlantılı bir değişkenin promotör bölgede veya kodlama yapmayan bir bölgede bulunduğunu düşündürmektedir.

Bulgularımız Türk toplumunda PS-1 intron 8 polimorfizmi için 1/2 genotipinin en sık rastlanan genotip olduğunu (%68,5), bunu %27,5 ile 1/1 ve %4 ile 2/2 genotipinin izlediğini göstermektedir. Türk toplumunda PS-1 genotipleri üzerinde yapılan başka bir çalışmaya rastlanmamıştır. İtalyan ve İngiliz toplumlarında yapılan ve PS-1 intron 8 polimorfizmini araştıran çalışmalarda, 1/2 ve 1/1 genotip dağılımları sırasıyla, %60, %25,5 ve %55,5, %28,5 olarak bildirilmiştir (40, 42). Bu sonuçların bizim bulgularımızla uyumlu olduğu görülmüştür.

Sonuç olarak çalışmamızda PS-1 intronik polimorfizmi ile geç Alzheimer hastalığı arasında herhangi bir ilişki belirlenmemiştir. Bulgularımız, geç başlayan Alzheimer hastalarında 1/1 genotipinin hastalık riskini arttırdığı tezini desteklememektedir. Ancak ilişkinin tam olarak açığa çıkarılabilmesi için hasta ve kontrol sayılarının artırılması ve kapalı populasyonlarda ilişkinin incelenmesi gerekmektedir. Polimorfizmin PS-1 geninin alternatif kırılması üzerindeki etkisi araştırılmalıdır. Polimorfizmin PS-1 geninin promotör bölgesi veya kontrol elemanları üzerindeki bir başka değişken ile bağlantısı araştırılmalı daha sonra bu değişkenin de hastalıkla ilişkisi belirlenmelidir.

8. ÖZET

Presenilin 1 (PS-1) geninde görülen mutasyonların erken Alzheimer ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. Bu çalışmada PS-1 geni intron 8 polimorfizmi ile geç başlayan Alzheimer hastalığı arasında bir ilişki olup olmadığını belirlemeyi amaçladık. Çalışma Alzheimer tanısı konan 35 hasta ve herhangi bir nörodejeneratif hastalığı bulunmayan yaşça paralellik gösteren 22 sağlıklı kontrol üzerinde yapıldı (ortalama yaşları sırasıyla $74,2 \pm 7,1$ ve $72,8 \pm 5,8$). Hastaların klinik teşhisleri İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Geropsikiyatri Bilim Dalı tarafından DSM-IV (Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, Fourth Edition) kriterlerine göre konuldu. PS-1 geni intron 8 polimorfizmi polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ve restriksiyon parça uzunluk polimorfizmi (RFLP) teknikleri kullanılarak araştırıldı. PS-1'in genetik analizinden sonra, Alzheimer hastalarında 1/1 genotipi %28, 1/2 genotipi %69, 2/2 genotipi %3 olarak, ve sağlıklı kontrollerde 1/1 genotipi %27, 1/2 genotipi %68, 2/2 genotipi %5 olarak belirlendi. Hastalar ve kontroller 1/1, 1/2, ve 2/2 genotipleri için ki-kare testine göre karşılaştırıldıklarında allel ve genotip dağılımlarının anlamlı bir fark göstermediği görüldü (sırasıyla; $p=0,87$, $p=0,94$). Sonuçlarımıza göre geç Alzheimer hastalarında 1/1 genotipinin hastalık riskini artırıcı etkisi saptanamamıştır. Çalışmamızda PS-1 intronik polimorfizmi ile geç Alzheimer hastalığı arasında herhangi bir ilişki belirlenememiştir.

9. SUMMARY

Mutations in the presenilin-1 (PS-1) gene has been reported to be associated with early-onset Alzheimer's disease. In this study, our aim was to determine if there is an association between PS-1 gene and late-onset Alzheimer's disease. We collected blood samples from 35 cases of dementia of the Alzheimer type and from 22 age-matched controls (mean ages $74,2 \pm 7,1$, and $72,8 \pm 5,8$ years, respectively); %77 and %55 were female in each series. Patients are clinically diagnosed by the Department of Geriatricpsychiatry Cerrahpasa Faculty of Medicine University of Istanbul according to DSM-IV (Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, Fouth Edition) criterias. We used PCR and RFLP to test for an association between Alzheimer's disease and a polymorphism within intron 8 of the PS-1 gene. After genetic analysis of the PS-1 gene, we found 10/35 genotype 1/1 (%28), 24/35 genotype 1/2 (%69), 1/35 genotype 2/2 (%3) for patients, and 6/22 genotype 1/1 (%27), 15/22 genotype 1/2 (%68), 1/22 genotype 2/2 (%5) for healthy controls. When the control and patients were compared for 1/1 and 1/2 genotype we saw that the allele and genotype distribution did not differ according to Chi-square ($p=0,87$, $p=0,94$ respectively). Our results showed 1/1 genotype does not increase the risk for AD in late-onset cases significantly. Thus, we were unable to find an association between the PS-1 intronic polymorphism and late-onset Alzheimer's disease.

10. KAYNAKLAR

1. Arı S. DNA'nın Polimeraz Zincir Reaksiyonu ile Çoğaltılması: Temizkan G, Arda N. Moleküler Biyolojide Kullanılan Yöntemler. Nobel-İstanbul, 1999: 57-64.
2. Bursztajn S, DeSouza R, McPhie DL, Berman SA, Shioi J, Robakis NK, Neve RL. Overexpression in neurons of human presenilin-1 or a presenilin-1 familial Alzheimer disease mutant does not enhance apoptosis. *J Neurosci* 1998; 18: 9790-9799.
3. Citron M, Westaway D, Xia W, Carlson G, Diehl T, Levesque G, Johnson-Wood K, Lee M, Seubert P, Davis A, Kholodenko D, Motter R, Sherrington R, Perry B, Yao H, Strome R, Lieberburg I, Rommens J, Kim S, Schenk D, Fraser P, St George Hyslop P, Selkoe DJ. Mutant presenilins of Alzheimer's disease increase production of 42-residue amyloid beta-protein in both transfected cells and transgenic mice. *Nat Med* 1997; 3: 67-72.
4. Cotman CW, Bridges R, Pike C, Kesslak P, Loo D, Copani A. Mechanisms of neuronal cell death in Alzheimer's disease. In: Corain B, Iqbal K, Nicolini M, Winbald B, Wisniewski HM, Zata P. *Alzheimer's Disease: Advances in Clinical and Basic Research*. John Wiley & Sons, Chichester, 1993; 281-290
5. Cras P, Kawai M, Lowery D, Gonzalez -DeWhitt P, Greenberg B, Perry G. Senile plaque neurites in Alzheimer's disease accumulate amyloid precursor protein. *Proc.Natl. Acad. Sci. USA* 1991; 88: 7552-7556
6. Cruts M, Hendriks L, Van Broeckhoven C. The presenilin genes: A new gene family involved in Alzheimer's disease pathology. *Hum Mol Genet* 1996; 5: 1449-1455.
7. De Strooper B, Saftig P, Craessaerts K, Vanderstichele H, Guhde G, Annaert W, Von Figura K, Van Leuven F. Deficiency of presenilin-1 inhibits the normal cleavage of amyloid precursor protein. *Nature* 1998; 391: 387-390.
8. Frautschy SA, Baird A, Cole GM. Effects of injected Alzheimer b-amyloid cores in rat brain. *Proc.Natl. Acad. Sci. USA* 1991; 88: 8362-8366.
9. Guenette SY, Tanzi RE. Progress toward valid transgenic mouse models for Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 1999; 20: 201-211.

10. Guo Q, Sopher BL, Furukawa K, Pham DG, Robinson N, Martin GM, Mattson MP. Alzheimer's presenilin mutation sensitizes neural cells to apoptosis induced by trophic factor withdrawal and amyloid beta-peptide: involvement of calcium and oxyradicals. *J Neurosci* 1997; 17: 4212-4222.
11. Hardy J. Amyloid, the presenilins and Alzheimer's disease. *Trends Neurosci.* 1997; 20: 154-159.
12. Hardy J, Selkoe DJ. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: Progress and problems on the road to therapeutics. *Science* 2002; 297: 353-356.
13. Helisalmi S. Molecular genetics of Alzheimer's Disease. With special emphasis on presenilin, amyloid beta precursor protein and apolipoprotein E genes, University of Kuopio Department of Neurology, Doctoral Dissertation, Kuopio, 1998.
14. Herreman A, Hartmann D, Annaert W, Saftig P, Craessaerts K, Serneels L, Umans L, Schrijvers V, Checler F, Vanderstichele H, Baekelandt V, Dressel R, Cupers P, Huylebroeck D, Zwijsen A, Van Leuven F, De Strooper B. Presenilin 2 deficiency causes a mild pulmonary phenotype and no changes in amyloid precursor protein processing but enhances the embryonic lethal phenotype of presenilin 1 deficiency. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; 96: 11872-11877.
15. Higuchi S, Muramatsu S, Arai H, Sasaki H. Presenilin-1 polymorphism and Alzheimer's disease. *Lancet* 1996; 347: 1185-1186.
16. Hiltunen M. A molecular genetic study of factors involved in Alzheimer's Disease, University of Kuopio Department of Neurology, Doctoral Dissertation, Kuopio, 2000.
17. Iqbal K, Iqbal IG. Alzheimer's disease: From cytoskeletal protein pathology to neuronal degeneration. In: Iqbal K, McLachlan DRC, Winbald B, Wisniewski HM. *Alzheimer's Disease: Basic Mechanisms, Diagnosis and Therapeutic Strategies.* John Wiley & Sons, Chichester, 1991; 173-180
18. Kehoe P, Williams J, Lovestone S, Wilcock G, Owen MJ, the UK Alzheimer's disease collaborative group. Presenilin-1 polymorphism and Alzheimer's disease. *Lancet* 1996; 347: 1185.

19. Kovacs DM, Fausett HJ, Page KJ, Kim TW, Moir RD, Merriam DE, Hollister RD, Hallmark OG, Mancini R, Felsenstein KM, Hyman BT, Tanzi RE, Wasco W. Alzheimer-associated presenilins 1 and 2: Neuronal expression in brain and localization to intracellular membranes in mammalian cells. *Nat Med* 1996; 2: 224-229.
20. Kulic L, Walter J, Multhaup G, Teplow DB, Baumeister R, Romig H, Capell A, Steiner H, Haass C. Separation of presenilin function in amyloid beta-peptide generation and endoproteolysis of Notch. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; 97: 5913-5918.
21. Lee MK, Slunt HH, Martin LJ, Thinakaran G, Kim G, Gandy SE, Seeger M, Koo E, Price DL, Sisodia SS. Expression of presenilin 1 and 2 (PS1 and PS2) in human and murine tissues. *J Neurosci* 1996; 16: 7513-7525.
22. Lendon CL, Myers A, Cumming A, Goate AM, St Clair D. A polymorphism in the presenilin 1 gene does not modify risk for Alzheimer's disease in a cohort with sporadic early onset. *Neurosci Lett* 1997; 228: 212-214.
23. Levitan D, Greenwald I. Facilitation of lin-12-mediated signalling by sel-12, a *Caenorhabditis elegans* S182 Alzheimer's disease gene. *Nature* 1995; 377: 351-354.
24. Li YM, Lai MT, Xu M, Huang Q, DiMuzio-Mower J, Sardana MK, Shi XP, Yin KC, Shafer JA, Gardell SJ. Presenilin 1 is linked with gamma-secretase activity in the detergent solubilized state. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; 97: 6138-6143.
25. Maria Mandelkow E, Mandelkow E. Tau in Alzheimer's disease. *Trend Cell Biol* 1998; 8: 425-427
26. Nussbaum RL, McIness RR, Willard HF. *Thompson and Thompson Genetics in Medicine*. 6. ed. WB Saunders, Philadelphia, 2001; 44-46.
27. Olgun A.. DNA'nın İzolasyonu ve Saflaştırılması: Temizkan G, Arda N. *Moleküler Biyolojide Kullanılan Yöntemler*. Nobel, İstanbul, 1999; 19-28.
28. Olgun A, Topal A. DNA'nın Analizi: Temizkan G, Arda N. *Moleküler Biyolojide Kullanılan Yöntemler*. Nobel, İstanbul, 1999; 33-45.

29. Price DL. Aging of the brain and dementia of the Alzheimer type. In : Kandel ER, Schwartz JH, Jessel TM, Principals of Neural Science 4th ed. McGraw-Hill, New York, 2000; 1149-1161
30. Rogaev EI, Sherrington R, Wu C, Levesque G, Liang Y, Rogaeva EA, Ikeda M, Holman K, Lin C, Lukiw WJ, de Jong PJ, Fraser PE, Rommens JM, St George-Hyslop P. Analysis of the 5' sequence, genomic structure, and alternative splicing of the presenilin-1 gene (PSEN1) associated with early onset Alzheimer disease. *Genomics* 1997; 40: 415-424.
31. Roses AD. The predictive value of Apo E genotyping in early diagnosis of dementia of the Alzheimer type: Data from three independent series. In: Iqbal K, Winbald B, Nishimura T, Takeda M, Wisniewski HM, Alzheimer's Disease: Biology, Diagnosis and Therapeutics. John Wiley & Sons, Chichester, 1997; 85-91.
32. Roux KH. Optimization and Troubleshooting in PCR. In: Dieffenbach CW, Dveksler GS. PCR Primer a Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1995; 53-62.
33. Rubinsztein DC. The genetics of Alzheimer's disease. *Prog Neurobiol* 1997; 52: 447-454.
34. Saitoh T, Mook Jung I. Commentary: Is understanding the biological function of APP important in understanding Alzheimer's disease. *Alzheimer's Disease Rev* 1996; 1: 30-36.
35. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular Cloning a Laboratory Manual* 2.ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1989.
36. Saunders BD, Trappe RG. *Basic & Clinical Biostatistics*. 2. ed. Appleton & Lange, London 1994.
37. Schroeter EH, Kisslinger JA, Kopan R. Notch-1 signalling requires ligand-induced proteolytic release of intracellular domain. *Nature* 1998; 393: 382-386.
38. Scott WK, Roses AD, Haines JL, Pericak-Vance MA: Presenilin-1 polymorphism and Alzheimer's disease. *Lancet* 1996; 347: 1560-1561.

39. Sherrington R, Rogaev EI, Liang Y, Rogaeva EA, Levesque G, Ikeda M, Chi H, Lin C, Li G, Holman K, Tsuda T, Mar L, Foncin J-F, Bruni AC, Montesi MP, Sorbi S, Rainero I, Pinessi L, Nee L, Chumakov I, Pollen D, Brookes A, Sanseau P, Polinsky RJ, Wasco W, Da Silva HA, Haines JL, Pericak-Vance MA, Tanzi RE, Roses AD, Fraser PE, Rommens JM, St George-Hyslop PH. Cloning of a gene bearing missense mutations in early-onset familial Alzheimer's disease. *Nature* 1995; 375: 754-760.
40. Singleton AB, Lamb H, Leake A, McKeith IG, Perry RH, Morris CM. No association between an intronic polymorphism in the presenilin-1 gene and Alzheimer's disease. *Neurosci Lett* 1997; 234: 19-22.
41. Sirinathsinghji DJS. Transgenic models of Alzheimer's disease. *Cur Res Alzheimer's Disease* 1998; 3(2): 47-56.
42. Sorbi S, Nacmias B, Tedde A, Forleo P, Piacentini S, Latorraca S, Amaducci L. Presenilin-1 gene intronic polymorphism in sporadic and familial Alzheimer's disease. *Neurosci Lett* 1997; 222: 132-134.
43. Steiner H, Romig H, Grim MG, Philipp U, Pesold B, Citron M, Baumeister R, Haass C. The biological and pathological function of the presenilin-1 Deltaexon 9 mutation is independent of its defect to undergo proteolytic processing. *J Biol Chem* 1999; 274: 7615-7618.
44. Tani H, Ankarcrona M, Flood F, Nilsberth C, Mehta ND, Perez-Tur J, Winblad B, Benedikz E, Cowburn RF. Alzheimer's disease presenilin-1 exon 9 deletion and L250S mutations sensitize SHSY5Y neuroblastoma cells to hyperosmotic stress-induced apoptosis. *Neuroscience* 2000; 95: 593-601.
45. Tanzi RE, Kim TW, Kovacs DM, Guenette SY, Moir RD, Hyman BT, Wasco W. The genes responsible for familial Alzheimer's disease: Toward a common etiological pathway. In: Iqbal K, Winblad B, Nishimura T, Takeda M, Wisniewski HM, Alzheimer's Disease: Biology, Diagnosis and Therapeutics. John Wiley & Sons, Chichester, 1997; 63-69.
46. Tysoe C, Whittaker J, Cairns NJ, Atkinson PF, Harrington CR, Xuereb J, Wilcock G, Rubinsztein DC. Presenilin-1 intron 8 polymorphism is not associated with autopsy-confirmed late-onset Alzheimer's disease. *Neurosci Lett* 1997; 222: 68-69.

47. Vahey MT, Wong MT, Michael NL. A Standard PCR Protocol. In: Dieffenbach CW, Dveksler GS. PCR Primer a Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1995: 17-22.
48. Wolfe MS, Xia W, Ostaszewski BL, Diehl TS, Kimberly WT, Selkoe DJ. Two transmembrane aspartates in presenilin-1 required for presenilin endoproteolysis and gamma-secretase activity. *Nature* 1999; 398: 513-517.
49. Wong PC, Zheng H, Chen H, Becher MW, Sirinathsinghji DJ, Trumbauer ME, Chen HY, Price DL, Van der Ploeg LH, Sisodia SS. Presenilin 1 is required for Notch1 and DIII expression in the paraxial mesoderm. *Nature* 1997; 387: 288-292.
50. Wragg M, Hutton M, Talbot C, the Alzheimer's disease collaborative group. Genetic association between intronic polymorphism in presenilin-1 gene and late-onset Alzheimer's disease. *Lancet* 1996; 347: 509-512.
51. Zhang Z, Hartmann H, Do VM, Abramowski D, Sturchler-Pierrat C, Staufenbiel M, Sommer B, van de Wetering M, Clevers H, Saftig P, De Strooper B, He X, Yankner BA. Destabilisation of beta-catenin by mutations in presenilin-1 potentiates neuronal apoptosis. *Nature* 1998; 395: 698-702.

11. ÖZGEÇMİŞ

02.06.1977 tarihinde Bursa'da doğdum. İlk ve orta öğrenimimi Trabzon'da Dumlupınar İlköğretim Okulu ve Trabzon Anadolu Lisesi'nde tamamladım (1992). Liseyi İstanbul'da Hüseyin Avni Sözen Anadolu Lisesi'nde okudum (1995). Lisans eğitimimi İstanbul Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümünde tamamlayıp, 2000 yılında Biyolog ünvanı alarak mezun oldum. Bu tarihten itibaren dokuz ay süre ile özel bir firmaya bağlı olarak Marmara Üniversitesi Nörolojik Bilimler Enstitüsü'nün merkez laboratuvarında çalıştım. Yüksek lisans eğitimime İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Temel Tıp Bilimleri Bölümü Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalında 2000 yılında başladım ve halen aynı yerde araştırma görevlisi olarak çalışmaktayım.

Erdinç DURSUN

KISALTMALAR

AAH	Ailesel Alzheimer Hastalığı
ACT	antikimotripsin
AH	Alzheimer Hastalığı
ApoE	Apolipoprotein E
APP	Amiloid öncül protein
bA4	beta amiloid
EB	Etidyum bromür
EBAH	Erken başlayan Alzheimer hastalığı
EDTA	Etilen diamin tetra asetik asit
EHF	Eşleşmiş helikal filamentler
GBAH	Geç başlayan Alzheimer hastalığı
HMG protein	Yüksek hareketli grup proteinleri
kDa	Kilo dalton
KPI	Kunitz proteaz inhibitörü
NFY	Nörofibriler yumaklar
Nİ	Nöropil iplikler
OD	Optik yoğunluk
PS	Presenilin
PZR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RFLP	Restriksiyon Parça Uzunluk Polimorfizmi
Tm	Erime ısısı