

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

(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

**CLUSTERİN POLİMORFİZMLERİ İLE ALZHEİMER
HASTALIĞI ARASINDAKİ İLİŞKİNİN ARAŞTIRILMASI**

MERVE ALAYLIOĞLU

**DANIŞMAN
PROF. DR. SELMA YILMAZER**

**TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
TIBBİ BİYOLOJİ PROGRAMI**

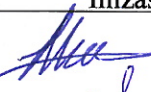
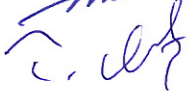

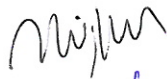

STANBUL-2014

TEZ ONAYI

İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Programında Merve Alaylıoğlu tarafından hazırlanan "Clusterin polimorfizmleri ile Alzheimer hastalığı arasındaki ilişkinin araştırılması" başlıklı Yüksek Lisans tezi, yapılan tez sınavında Jürimiz tarafından başarılı bulunarak kabul edilmiştir.

10 / 07 / 2014

Tez Sınav Jürisi

<u>Ünvanı Adı Soyadı (Üniversitesi, Fakültesi, Anabilim Dalı)</u>	<u>İmzası</u>
1.Prof.Dr.Selma YILMAZER (DANIŞMAN) Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı	
2.Prof.Dr.Turgut ULUTİN Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı	
3.Prof.Dr.Hakan GÜRVİT İ.Ü İstanbul Tıp Fak. Nöroloji Anabilim Dalı	
4. Prof.Dr.Müjgan CENGİZ Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı	
5. Prof.Dr.Melek ÖZTÜRK Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı	

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.

Merve ALAYLIOĞLU



THAF

Annem Leman Yıldız Erciya ve Rahmetli Anneannem Gülistan Erciya 'a ithafen...

TE EKKÜR

Yüksek lisans eğitimim ve tez çalışmam sırasında bilgi ve tecrübeleriyle beni aydınlatan ve yönlendiren, hiçbir zaman yardımını ve desteğini esirgemeyen, akademik kişiliği, çalışmaya prensipleri ve başarılarıyla bana örnek olan, birlikte çalışmaktan her zaman mutluluk ve memnuniyet duyacağımı saygıdeğer danışmanım Prof. Dr. Selma YILMAZER'e, lisans dönemimde bilgi ve tecrübeleriyle beni yönlendiren, akademik kariyer yapmak için karar vermemde etkili olan ve anabilim dalı olanaklarını kullanmama olanak sağlayan anabilim dalı başkanımız Prof. Dr. Turgut ULUT N'e, bilgi ve desteklerinden esirgemeyen Prof. Dr. Melek ÖZTÜRK ve Prof. Dr. Sema BOLKENT'e, çalışmalarım sırasında bana yardımcı ve destek olan Doç. Dr. Matem TUNÇDEMİR ve Doç. Dr. Fatma KAYADA İSTANLI'ya, veri toplanması ve bilimsel katkıları için Prof. Dr. Hakan GÜRVET, Prof. Dr. HANEM HANA ASI, Prof. Dr. Murat EMRE, Prof. Dr. Engin EKER ve Doç. Dr. Barış BİLGİÇ'e, istatistiksel analizlerdeki yardımlarından ötürü Yrd. Doç. Dr. Ömer UYSAL'a teşekkür ederim.

Yüksek lisans eğitimim, tezim ve hayatım ile ilgili her türlü konuda sonsuz yardımlarını ve desteklerini esirgemeyen, bilgileriyle beni her zaman aydınlatan ve yol gösteren, dik durmayı ve azmetmeyi öğreten, laboratuvar konusunda bildiğim her şeyi bana öğreten, kişilikleri, sorumlulukları, disiplinleri ve başarılarıyla kendime örnek aldığım, birlikte çalışmaktan her zaman mutluluk ve gurur duyacağımı Doç. Dr. Duygu GEZEN-AK ve Doç. Dr. Erdi DURSUN'a, her zaman yanımda olan ve beni motive eden, çalışmalarım boyunca benden yardımlarını ve desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen çok değerli çalışmaya arkadaşlarım MSc. Ömür Selin ARAZ, MSc. Cem Lutfiye ATASOY ve Bio. Esin CANDA'ya, kardeşimin sadece kan bağıyla olmadığını öğreten, dostluklarını, sevgilerini ve desteklerini hiçbir zaman eksik etmeyen ve yüzümü hep güldüren sevgili arkadaşlarım MSc. Ali Bahar BEYDOĞAN, Bio. Gamze ARGÜN-KÜRÜM ve Bio. Pınar AYDOĞDU'ya teşekkür ederim.

Hayatımın her anında yanımda olan, beni bugünlere getiren, maddi manevi her konuda desteğini asla esirgemeyen, aldığım her kararda arkamda olan, sevgisini ve inancını tüm kalbimle hissettiğim, hayatımın anlamı sevgili annem Yıldız ERCİYA'ya, destekleri ve yardımlarıyla yanımda olan sevgili abilerim Ceyhan ALAYLIOĞLU ve Tayfun ALAYLIOĞLU ile babam Fikret ALAYLIOĞLU'na, destekleri ve bana olan inançları için dedem Mehmet Zeki ERCİYA, teyzelerim Nur ALHAS, Kamer MUMCUOĞULLARI ve dayım Celal ERCİYA'ya, her daim yanımda olan, yardımlarını ve manevi desteğini esirgemeyen, her anımı paylaştığım, bütün zor zamanlarımda varlığıyla bana güç veren Burak YURTBAK'a ve benimle her zaman gurur duyduğuna inandığım, hayat boyu inancımı, sevgisini ve varlığını yanımda hissedeceğim Alzheimer hastalığından kaybettiğim rahmetli anneannem Gülistan ERCİYA'ya en içten teşekkürlerimi sunarım.

Bu çalışmam, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir.
Proje No: 32402

Ç NDEK LER

TEZ ONAYI	
BEYAN.....	
THAF.....	V
TE EKKÜR.....	V
Ç NDEK LER	V
TABLolar L STES	V
EK LLER L STES	X
SEMBOLLER / KISALTMALAR L STES	X
ÖZET	X
ABSTRACT.....	X V
1. G R VE AMAÇ.....	1
2. GENEL B LG LER	4
2.1. Alzheimer Hastalı 1:	4
2.1.1. Alzheimer Hastalı 1'nın Patolojik Bile enleri	5
2.1.1.1. Amiloid β	6
2.1.1.2. Tau.....	10
2.1.2. Alzheimer Hastalı 1'nın Geneti i	12
2.1.2.1. Amiloid Öncül Proteini (APP).....	13
2.1.2.2. Presenilin 1 (PSEN1) ve Presenilin 2 (PSEN2).....	13
2.1.2.3. Apolipoprotein E (ApoE).....	14
2.2. Clusterin.....	15
2.2.1. Clusterin'in Biyolojik Fonksiyonları	19
2.2.2. Clusterin ve Alzheimer Hastalı 1.....	20
2.3. Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PZR)	21
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	22
3.1. Kullanılan Malzemeler.....	22
3.2. DNA zolasyonu	23
3.2.1. DNA zolasyon Protokolü.....	23
3.3. DNA Saflı ı ve Miktarının Tespiti	24

3.4. Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PZR) ile CLU ve ApoE Genotiplerinin Belirlenmesi.....	24
3.4.1. CLU Genotiplerinin Belirlenmesi.....	24
3.4.2. ApoE Genotiplerinin Belirlenmesi.....	29
3.4.3. Deneylerde Kullanılan Simple Prob'ların Hazırlanması.....	36
3.4.4. RT-PZR Reaksiyon Karışımlarının Hazırlanması.....	36
3.4.5. RT-PZR Döngü Programı.....	38
3.5. Haplotip Analizi.....	38
3.6. Statistiki Değerlendirme:.....	39
4. BULGULAR.....	40
4.1. DNA İzolasyonu Sonuçları.....	40
4.2. CLU Genotipleme Sonuçları.....	40
4.3. ApoE Genotipleme Sonuçları.....	48
4.4. Haplotip Analizi Sonuçları.....	52
5. TARTI MA.....	54
KAYNAKLAR.....	59
FORMLAR.....	69
ETİK KURUL KARARI.....	70
ÖZGEÇM.....	71

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 2-1: Amiloid kaskad hipotezi	9
Tablo 2-2: Tau proteinlerinin hiperfosforilasyonu ve nörofibril yumaklarının oluşumu	12
Tablo 2-3: Erken başlangıçlı ailesel Alzheimer Hastalığı'nda görülen genler ve patolojik etkileri	13
Tablo 2-4: Clusterinin izole edildiği dokular ve kullanılan diğer isimler.....	16
Tablo 3-1: CLU geninde araştırmaya konu olan polimorfizm bölgelerinin bulunduğu konum ve deiyotipik sonucu ortaya çıkan alleller.....	25
Tablo 3-2: CLU geninin 3 SNP bölgesine ait allel deiyotipleri.....	25
Tablo 3-3: ApoE genine ait genotiplerin belirlenmesi için kullanılan bölgeler, ilgili genotipler, erime noktaları ve fenotipe yansıma riski.....	29
Tablo 3-4: CLU geni için kullanılan reaksiyon karışımları	37
Tablo 3-5: ApoE geni için kullanılan reaksiyon karışımları.....	37
Tablo 3-6: CLU geni için kullanılan RT-PZR programı	38
Tablo 3-7: ApoE geni için kullanılan RT-PZR programı	38
Tablo 3-8: CLU genine ait SNP'lerin kromozom üzerindeki konumları	39
Tablo 4-1: Hasta ve kontrol gruplarında CLU geninin rs11136000 bölgesi genotip dağılımı	41
Tablo 4-2: Hasta ve kontrol gruplarında CLU geninin rs11136000 bölgesi allel dağılımı	41
Tablo 4-3: Hasta ve kontrol gruplarında CLU geninin rs9331888 bölgesi genotip dağılımı	43
Tablo 4-4: Hasta ve kontrol gruplarında CLU geninin rs9331888 bölgesi allel dağılımı	44
Tablo 4-5: Hasta ve kontrol gruplarında CLU geninin rs2279590 bölgesi genotip dağılımı	46
Tablo 4-6: Hasta ve kontrol gruplarında CLU geninin rs2279590 bölgesi allel dağılımı	46
Tablo 4-7: Hasta ve kontrol gruplarında ApoE genotip dağılımı	49

Tablo 4-8: Hasta ve kontrol gruplarında ApoE ϵ 4 alleli taşımayanlar ve taşıyanlara göre genotip dağılımı	50
Tablo 4-9: Hasta ve kontrol gruplarında ApoE ϵ 2, ϵ 3 ve ϵ 4 allelleri dağılımı	50
Tablo 4-10: ApoE ϵ 4 alleli taşımayanlar ve taşıyanlar ile rs9331888 bölgesi genotiplerinin hasta ve kontrollerde karşılaştırılması	52
Tablo 4-11: Hasta ve kontrollerde CLU geninde araştırılan üç SNP'nin (sırasıyla rs2279590, rs11136000 ve rs9331888 bölgelerinin) haplotip analizi	53

EK LLER L STES

ekil 2-1: AH'da beyinde görülen anomaliler.....	5
ekil 2-2: Alzheimer Hastalığı'nın patolojik bileşenleri	6
ekil 2-3: A β antikorları ile immün izoformları kullanılarak senil plakların gösterilmesi.....	6
ekil 2-4: APP'nin kesim yolları ve A β peptidinin oluşumu	8
ekil 2-5: A β proteininin yanlış katlanması ve amiloid fibrilleri halinde birikimi	9
ekil 2-6: Tau proteininin izoformları	10
ekil 2-7: Nörofibril yumaklarının mikroskopik görünümü.....	11
ekil 2-8: Apolipoprotein E izoformları	15
ekil 2-9: CLU geni, transkriptleri ve proteinleri.....	17
ekil 2-10: sCLU proteininin oluşumu	18
ekil 2-11: sCLU proteininin yapısı	18
ekil 3-1: CLU geni rs11136000 bölgesine ait TT genotipinin belirlenmesinde kullanılan erime noktasını gösteren grafik.....	26
ekil 3-2: CLU geni rs11136000 bölgesine ait CT genotipinin belirlenmesinde kullanılan erime noktasını gösteren grafik.....	26
ekil 3-3: CLU geni rs11136000 bölgesine ait CC genotipinin belirlenmesinde kullanılan erime noktasını gösteren grafik.....	26
ekil 3-4: CLU geni rs9331888 bölgesine ait CC genotipinin belirlenmesinde kullanılan erime noktasını gösteren grafik.....	27
ekil 3-5: CLU geni rs9331888 bölgesine ait GC genotipinin belirlenmesinde kullanılan erime noktasını gösteren grafik.....	27
ekil 3-6: CLU geni rs9331888 bölgesine ait GG genotipinin belirlenmesinde kullanılan erime noktasını gösteren grafik.....	27
ekil 3-7: CLU geni rs2279590 bölgesine ait AA genotipinin belirlenmesinde kullanılan erime noktasını gösteren grafik.....	28
ekil 3-8: CLU geni rs2279590 bölgesine ait GA genotipinin belirlenmesinde kullanılan erime noktasını gösteren grafik.....	28
ekil 3-9: CLU geni rs2279590 bölgesine ait GG genotipinin belirlenmesinde kullanılan erime noktasını gösteren grafik.....	28

ekil 3-10: ApoE genine ait $\epsilon 2/\epsilon 2$ genotipinin belirlenmesinde kullanılan erime noktalarını (45 - 51°C) gösteren grafik.....	30
ekil 3-11: ApoE genine ait $\epsilon 2/\epsilon 3$ genotipinin belirlenmesinde kullanılan erime noktalarını (45 - 51/61°C) gösteren grafik.....	31
ekil 3-12: ApoE genine ait $\epsilon 2/\epsilon 4$ genotipinin belirlenmesinde kullanılan erime noktalarını (45/56 - 53/63°C) gösteren grafik.....	32
ekil 3-13: ApoE genine ait $\epsilon 3/\epsilon 3$ genotipinin belirlenmesinde kullanılan erime noktalarını (45 - 61°C) gösteren grafik.....	33
ekil 3-14: ApoE genine ait $\epsilon 3/\epsilon 4$ genotipinin belirlenmesinde kullanılan erime noktalarını (45/56 - 61°C) gösteren grafik.....	34
ekil 3-15: ApoE genine ait $\epsilon 4/\epsilon 4$ genotipinin belirlenmesinde kullanılan erime noktalarını (56 - 61°C) gösteren grafik.....	35
ekil 4-1: Hasta ve kontrol gruplarında CLU geninin rs11136000 bölgesi genotip da ılımı.....	42
ekil 4-2: Hasta ve kontrol gruplarında CLU geninin rs11136000 bölgesi C ve T allelleri da ılımı.....	42
ekil 4-3: Hasta ve kontrol gruplarında CLU geninin rs9331888 bölgesi genotip da ılımı.....	44
ekil 4-4: Hasta ve kontrol gruplarında CLU geninin rs9331888 bölgesi G ve C allelleri da ılımı.....	45
ekil 4-5: Hasta ve kontrol gruplarında CLU geninin rs2279590 bölgesi genotip da ılımı.....	47
ekil 4-6: Hasta ve kontrol gruplarında CLU geninin rs2279590 bölgesi G ve A allelleri da ılımı.....	47
ekil 4-7: Hasta ve kontrol gruplarında ApoE genotip da ılımı.....	49
ekil 4-8: Hasta ve kontrol gruplarında $\epsilon 4$ alleli ta ımayan ve ta ıyanlara göre ApoE genotip da ılımı.....	51
ekil 4-9: Hasta ve kontrol gruplarında ApoE $\epsilon 2$, $\epsilon 3$ ve $\epsilon 4$ allelleri da ılımı.....	51
ekil 4-10: CLU geninde ara tırımı oldu umuz SNP'ler (sırasıyla rs2279590, rs11136000 ve rs9331888 bölgeleri) için Ba lantı E itsizli i Analizi.....	53

SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

- A β : Amiloid Beta
AH: Alzheimer Hastalığı 1
ApoE: Apolipoprotein E
ApoJ: Apolipoprotein J
APP: Amiloid Öncül Proteini
BOS: Beyin-Omurilik Sıvısı
CLU: Clusterin
EBAH: Erken Başlangıçlı Alzheimer Hastalığı 1
EFH: Etkin Helikal Filament
ER: Endoplazmik Retikulum
GBAH: Geç Başlangıçlı Alzheimer Hastalığı 1
GSK3 β : Glikojen Sentaz Kinaz 3 β
GWAS: Genom Çapında İlişki Taraması
HDL: Yüksek yoğunluklu lipoprotein
IL-1 β : İnterlökin-1 β
IL-2: İnterlökin-2
MAPT: Mikrotübül İlişkili Protein Tau
ml: Mili Litre
 μ l: Mikro Litre
nCLU: Nükleer Clusterin
NFY: Nörofibril Yumak
nm: Nano Metre
PP2A: Protein Fosfataz 2A
PSEN1: Presenilin-1
PSEN2: Presenilin-2
RT-PZR: Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu
sCLU: Salgı Clusterin
SNP: Tek Nükleotid Polimorfizmi

ÖZET

Alaylıo lu Merve (2014). Clusterin Polimorfizmleri ile Alzheimer Hastalı 1 Arasındaki İlişkinin Araştırılması. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Biyoloji AD. Yüksek Lisans Tezi. İstanbul.

Alzheimer hastalı 1 (AH) ilerleyici bir nörodejeneratif hastalıktır. Geç başlangıçlı Alzheimer hastalı ıyla (GBAH) ilgili risk genlerini belirlemek amacıyla yapılan genetik çalışmalarıyla 660'dan fazla genin hastalıkla ilişkisi bildirilmiştir. Çalışmamızda, bu genler arasında ön sıralarda yer alan CLU geninin rs11136000, rs9331888 ve rs2279590 bölgelerindeki polimorfizmlerle GBAH arasındaki ilişkiyi araştırmayı amaçladık. Ayrıca, ApoE genotipleri belirlenerek söz konusu polimorfizmlerle ilişkiyi inceledik. Çalışmada, McKhann 1984 kriterine göre tanı konulan 183 Alzheimer hastasıyla nörodejeneratif hastalı 1 bulunmayan sağlıklı kontrollerden elde edilen DNA örnekleri kullanıldı. CLU geni polimorfizmleri ve ApoE genotipleri Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu yöntemiyle belirlendikten sonra istatistiksel analizleri yapıldı. Ayrıca, CLU genine ait 3 SNP'nin haplotip analizi yapıldı. rs11136000 ve rs2279590 bölgeleriyle GBAH arasında ilişki saptanmadı. Ancak, rs9331888 bölgesi GG genotipinin hastalarda, CC genotipinin kontrollerde istatistiksel olarak anlamlı derecede daha fazla görüldü ü, G allelinin hastalarda, C allelinin ise kontrollerde istatistiksel olarak yakın anlamlı derecede daha sık görüldü ü bulundu. Haplotip analizi sonuçlarına göre, "GCG" haplotipinin hastalarda istatistiksel olarak anlamlı derecede daha fazla görüldü ü belirlendi. ApoE geni allel dağılımına bakıldığında ϵ 2 allelinin kontrollerde, ϵ 4 allelinin ise hastalarda istatistiksel olarak anlamlı derecede artışı ve ϵ 4 allelinin hastalık riskini 2,1 kat arttırdığı belirlendi. ApoE ϵ 4 alleliyle CLU geni rs9331888 genotipleri istatistiksel olarak karşılaştırıldığında ϵ 4 alleli taşımayan hastalarda G allelinin, kontrollerde ise C allelinin daha sık görüldü ü bulundu. Buna göre; ϵ 4 alleli taşımayan bireylerde rs9331888 bölgesi G allelinin hastalığa yatkınlığı arttırdığı, C allelinin ise koruyucu özelliği olduğu saptandı. ϵ 4 alleli ile CLU geni rs9331888 bölgesi genotipleri arasında saptanan ilişki CLU geninin ApoE'den bağımsız olarak hastalık gelişiminde rolü olabileceğini göstermektedir.

Anahtar Kelimeler : Alzheimer Hastalı 1, Clusterin, Apolipoprotein E, Tek Nükleotid Polimorfizmi, Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 32402

ABSTRACT

Alaylıo lu Merve (2014). Investigation of Relationship Between Clusterin Polymorphisms and Alzheimer's Disease. stanbul University, Institute of Health Science, Department of Medical Biology. MSc Thesis. stanbul.

Alzheimer's disease (AD) is a progressive neurodegenerative disorder. More than 660 genes are reported to be associated with late-onset Alzheimer's disease (LOAD) by the studies has done in order to identify risk genes of the disease. In this study, we aimed to investigate the relationship between LOAD and rs11136000, rs2279590 and rs9331888 polymorphisms in CLU gene. Moreover, we investigated the relationship between these polymorphisms and ApoE genotypes. In the study, DNA samples obtained from 183 patients that were diagnosed according to the criteria of McKhann 1984 and 154 healthy controls without neurodegenerative disorders were used. Statistical analysis were performed after detection of genotypes of CLU and ApoE by Real-Time PCR technique. Haplotype analysis was performed for these 3 SNPs in CLU. A relationship between rs11136000 and rs2279590 regions and LOAD was not determined. But for rs9331888, it was found that "GG" genotype in patients and "CC" genotype in controls were significantly higher and "G" allele in patients and "C" allele in controls were nearly significant. According to haplotype analysis, it was found that "GCG" haplotype were significantly higher in patients. According to allele distribution of ApoE, it was determined that ϵ 2 allele in controls and ϵ 4 allele in patients were significantly higher and ϵ 4 allele increased the risk for 2,1 times. When ApoE ϵ 4 allele and rs9331888 genotypes were compared statistically, it was found that "G" allele in patients and "C" allele in controls were higher in non-carriers of ApoE ϵ 4 allele. It is shown that "G" allele of rs9331888 polymorphism increases risk for AD and "C" allele has a protective role in non-carriers of ϵ 4. These results indicates that CLU gene might have a role in development of AD independently from ApoE.

Key Words: Alzheimer's Disease, Clusterin, Apolipoprotein E, Single Nucleotide Polymorphism, Real-Time PCR

The present work was supported by the Research Fund of Istanbul University. Project No.3240

1. G R VE AMAÇ

Alzheimer Hastalığı (AH); ilerleyici hafıza kaybı ile zihinsel ve sosyal yeteneklerin giderek günlük yaşamı etkileyecek derecede bozulmasıyla tanımlanan nörodejeneratif bir hastalıktır. Nöropatolojik olarak AH; beynin belirli bölgelerinde iki farklı proteinin birikimi sonucu oluşan nöritik (senil) plaklar ve nörofibril yumakları ile tanımlanır. Nöritik plakların ana bileşeni olan amiloid beta ($A\beta$) peptidi, amiloid öncül proteininin (APP) proteolitik olarak kesilmesi sonucu oluşur ve hücre dışında birikerek amiloid plakları meydana getirir. Nörofibril yumakları ise mikrotübül ili kili bir protein olan tau'nun hücre içinde birikimi sonucu oluşur (Price 2000 p 1155; Gürvit, .H. 2004 p 392; Ross ve Poirier 2004; Mott ve Hulette 2005).

AH; bağımlı yaşına göre 65 yaş altında görülen erken bağımlı Alzheimer Hastalığı (EBAH) ve 65 yaş ve üstünde görülen geç bağımlı Alzheimer Hastalığı (GBAH) olmak üzere ikiye ayrılır. Hastalığın erken bağımlı tipinin Amiloid Öncül Proteini (APP), Presenilin-1 (PSEN1) ve Presenilin-2 (PSEN2) genlerindeki mutasyonlar ile ili kili olduğu gösterilmiştir. Yapılan çalışmalar, apolipoprotein E (ApoE) geni $\epsilon 4$ allelinin GBAH için bir risk faktörü olduğunu göstermiştir (Gürvit, .H. 2004 p 391; Bekris ve ark. 2010; Blennow ve ark. 2006; Zetzsche ve ark. 2010).

Hastalığın en sık rastlanan ekli olan GBAH ile ili kili di er genlerin belirlenmesi amacıyla yapılan çok sayıda ara tırma sonucunda hastalığın bu tipten ili kili olduğu ileri sürülen 660'tan fazla gen bulunmuştur. Daha sonra yapılan genom çapında ili ki taramaları (GWAS) ve meta analizler, GBAH ile ili kili olduğu ileri sürülen genler arasındaki en güçlü aday genleri belirlemiştir. Bu aday genler arasında; clusterin (CLU), kompleman reseptör 1 (CR1), fosfatidilinositol bağımlı klatrin toplayıcı protein (PICALM) gibi genler yer almaktadır (Lambert ve Amouyel 2011). Bu aday genler arasında ön sıralarda yer alan CLU genindeki bazı polimorfizmlerin AH riski ile ili kisi halen araştırılmaktadır. CLU ve AH ile ili kisi olduğu ileri sürülen di er genetik risk faktörleri üzerinde yapılacak olan çalışmalar, halen tam olarak bilinmeyen AH patogeneziyle ili kili mekanizmaların aydınlatılması için önemli ipuçları ortaya koyabilecektir.

Apolipoprotein J (ApoJ) olarak da bilinen clusterin çok fonksiyonlu bir glikoproteindir. Clusterin; ApoE gibi beyinde çok fazla ifade edilen bir

apolipoproteindir. (Holtzman 2004). Yapılan son çalı malar, clusterin'in hücrel stres sırasında küçük ısı- ok proteinlerine benzer bir ekilde yanlı katlanmı proteinlerin hidrofobik bölgelerine ba lanarak birikimlerini engelledi ini göstermi tir. (Calero ve ark. 2000; Tunçdemir 2006; Nuutinen ve ark. 2009).

Clusterin ile AH arasındaki ili ki ilk kez Alzheimer hastalarının hippocampus doku örneklerinde kontrol gruplarına kıyasla artmı clusterin ifadesinin gösterilmesiyle kurulmu tur. Bu sonuçlar, Alzheimer hastalarında artmı clusterin ifadesinin nöroprotektif bir yanıt ile ili kili olabilece i ihtimallerini ortaya koymu tur. Daha sonra yapılan çalı malar ile clusterin'in nörofibril yumakları ve ekstraselüler amiloid birikimleri ile birlikte yer aldı ı tekrarlayan ekilde gösterilmi tir (Nuutinen ve ark. 2009; Charnay ve ark. 2012).

Yapılan ara tırmalar sonucu, clusterin'in AH ile ili kili pek çok rolünün oldu u bildirilmi tir. Clusterin, esnek yapısı sayesinde AH patolojisine katılan A β peptidine ba lanabilir. *in vitro* ve *in vivo* çalı malar, clusterin/A β etkile iminin amiloid plak olu umu ve A β 'nın toksik etkileri üzerinde önleyici bir rol oynadı ını göstermi tir. Clusterin/A β kompleksinin, A β polimerizasyonunu ve böylece amiloid birikimini engelledi i ortaya konmu tur. (Yu ve Tan 2012).

CLU polimorfizmleri ile GBAH arasındaki ili ki ilk kez 2009 yılında gerçekte tirilmi olan bir GWA çalı ması ile gösterilmi tir. Bu çalı ma, imdiye kadar GBAH üzerine gerçekte tirilmi olan en geni çaplı genetik çalı ma olmu tur. Çalı ma sonucunda, APOE geni ϵ 4 alleli ve CLU geni rs11136000 bölgesinin GBAH ile ili kili oldu u gösterilmi tir (Harold ve ark. 2009).

Aynı yıl, GBAH üzerine ikinci bir geni çaplı GWA çalı ması gerçekte tirilmi tir. Çalı ma sonucunda, APOE ϵ 4 alleli ve CLU geni rs11136000, rs9331888 ve rs2279590 bölgelerinin GBAH ile ili kili oldu u bildirilmi tir (Lambert ve ark. 2009).

2010 yılında, Çin'de Kuzey Hun populasyonunda CLU polimorfizmleri ile GBAH arasındaki ili kiyi ara tıran bir çalı mada, CLU genine ait rs11136000, rs9331888 ve rs2279590 bölgelerindeki polimorfizmler incelenmi ve rs9331888 bölgesinin G allelinin GBAH riskini arttırdı ı gösterilmi tir (Yu ve ark. 2010). Bununla birlikte, CLU polimorfizmleri ve GBAH arasındaki ili ki ile ilgili çeli kili sonuçlar da

mevcuttur. (Golenkina ve ark. 2010; Guerreiro ve ark. 2010; Ma ve ark. 2011; Klimkowicz-Mrowiec ve ark. 2013).

Biz de bu çalı mamızda, CLU geninde AH ile ili kili oldu u ileri sürülen rs11136000, rs9331888 ve rs2279590 bölgelerindeki tek nükleotid polimorfizmleri ile geç ba langıçlı Alzheimer hastalı ı arasında bir ili ki bulunup bulunmadı ını ara tırdık. Ayrıca, ApoE genotip tayini yaparak söz konusu polimorfizmlerin ApoE risk alleli ta ıyan ve ta ımayan hasta ve kontrollerdeki da ılımını kar ıla tırdık. Böylece, Türk toplumunda ilk kez CLU geni polimorfizmleri ile geç ba langıçlı Alzheimer hastalı ı arasındaki ili kiyi ara tırarak, clusterin ve AH patogenezi arasındaki ili kinin aydınlatılmasına katkıda bulunmayı amaçladık.

2. GENEL B LG LER

2.1. Alzheimer Hastalı ı

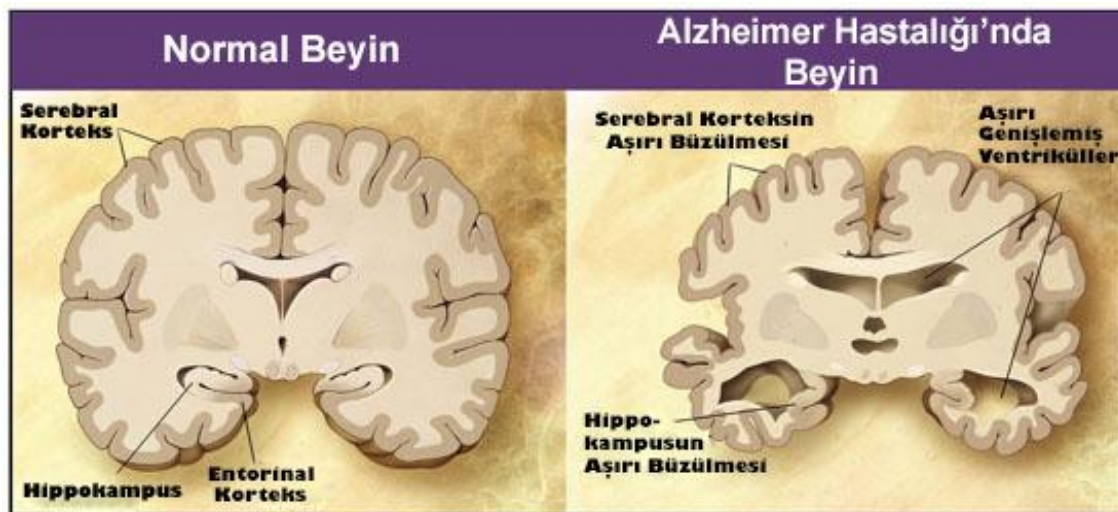
Alzheimer Hastalı ı (AH), demansın en sık görülen tipidir. Demans, beyindeki nöronların fonksiyonlarını kaybetmesi veya ölümüyle birlikte geli en ve çok sayıda hastalı ı kapsayan bir terimdir. Bu durum, bireyin hafıza, davranı ve sa lıklı dü ünme yetisinde bozulmalara neden olur. AH, bili sel fonksiyonların ve davranı sal becerilerin kaybı ile birlikte bireyin günlük ya amsal faaliyetlerini yerine getirebilme kabiliyetini ciddi bir e kilde etkileyen ilerleyici, geri dönü ümsüz bir nörodejeneratif hastalıktır (Price 2000 p 1152; Di Carlo ve ark. 2012; Alzheimer's Association 2013).

AH, ilk kez 1907 yılında Alman nöropatolog ve psikiyatrist Dr. Alois Alzheimer tarafından tanımlanmı tır. Dr. Alois Alzheimer, 4 yıllık ilerleyici bir demans geçmi i olan ve 55 ya ında ölen Auguste Deter isimli hastanın serebral korteksinde hastalı ın patolojik özellikleri olan plakları ve nörofibril yumaklarını gözlemlemi tir. Dr. Alzheimer, hastalı ın klinik özelliklerini ve plakları ilk kez tanımlayan ki i de ildir ancak Bielschowsky gümü boyaması tekni i ile hastanın serebral korteksinde ilk kez nörofibril yumaklarının varlı nı göstermi tir. Hastalı ın ismi, 1910 yılında Dr. Alois Alzheimer'ın çalı ma arkada ı olan Emil Kraepelin tarafından verilmi tir (Mott ve Hulette 2005; Hardy 2006; Jellinger 2006).

AH klinik olarak; depresyon, davranı de i ikli i, yeni bilgileri hatırlamada güçlük, günlük ya amı etkileyen hafıza kaybı, problem çözmede zorluk, zaman ve mekanı karı tırma, konu ma ve yazmada problemler ve ilerleyici bili sel fonksiyon kaybı ile, anatomik olarak; neokorteks, entorinal alan, hippocampus, amigdala, nükleus bazalis ve anterior talamustaki anomaliler ile (ekil 2-1), nöropatolojik olarak ise; nöron kaybıyla beraber, amiloid beta proteininin (A β) birikiminden olu an ekstraselüler senil plaklar ve hiperfosforile tau proteininin birikiminden olu an, intraselüler nörofibril yumakları ile tanımlanır (Gezen-Ak 2009; Price ve ark. 2009; Kauwe ve ark. 2011; Alzheimer's Association 2013).

AH ba langıç ya ına göre, erken ba langıçlı Alzheimer hastalı ı (EBAH) ve geç ba langıçlı Alzheimer hastalı ı (GBAH) olmak üzere iki alt tipe ayrılır. EBAH, tüm vakaların yakla ık %1-6'sını olu turur ve 30-65 ya aralı ında görülür. AH'nın en yaygın formu olan GBAH ise tüm vakaların yakla ık %94-99'unu olu turur ve 65 ya

üzeri bireylerde görülür. Erken başlangıçlı Alzheimer hastalarının büyük çoğunluğunda ailesel geçmişi görülmektedir. GBAH vakalarının çoğu belirgin bir ailesel geçmişi göstermediği için sporadik olarak adlandırılır ve birden fazla genin ve çevresel faktörlerin etkileşimini içeren kompleks bir hastalık olarak görülmektedir (Dursun 2009; Lambert ve Amouyel 2011; Alonso ve ark. 2012).

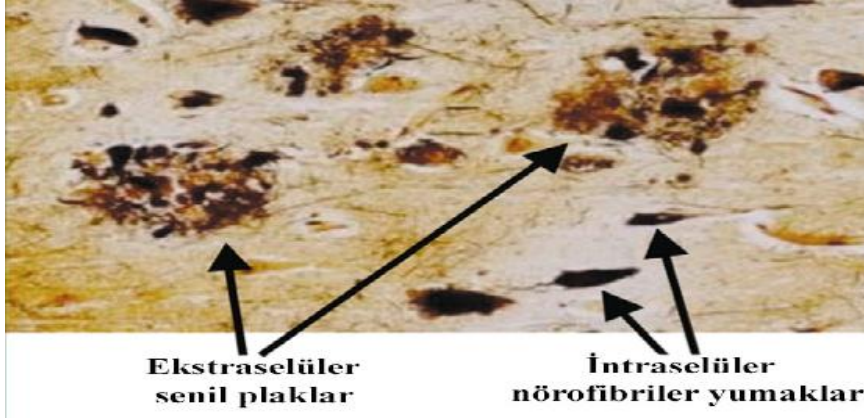


ekil 2-1: AH'da beyinde görülen anomaliler.

(<http://www.wholehealthinsider.com/newsletter/alzheimers-type-3-diabetes/>)

2.1.1. Alzheimer Hastalığı'nın Patolojik Özellikleri

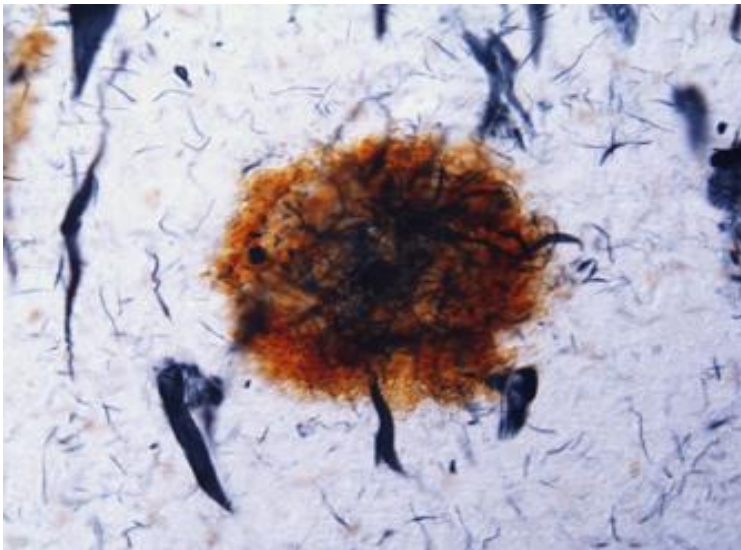
AH'nın en önemli patolojik özelliklerinden biri serebral korteks ve subkortikal alanlarda nöron ve sinaps kaybı sonucu ortaya çıkan beyin atrofisidir. Özellikle hippokampus, amigdala ve temporal neokortekste belirgin nöron dejenerasyonu ve sinaptik kayıp gözlenir. Beyindeki bu değişikliklere ekstraselüler senil plakların ve intraselüler nörofibril yumaklarının oluşumu eklenir (Gilbert 2013; Xu ve ark. 2013). Ekstraselüler senil plaklar, amiloid öncül proteininin (APP) işlenmesi sonucu ortaya çıkan A β proteininin birikiminden; intraselüler nörofibril yumakları ise mikrotübül ili kili bir protein olan tau filamentlerinin birikiminden oluşur (ekil 2-2) (Hardy 1997). Bu ekstraselüler ve intraselüler birikimler, aksonal taşıma, nöron içi sinyal iletimi ve nörotrofik faktör sentezinde bozulmalara, nöronal kalsiyum homeostazında değişikliklere ve oksidatif strese neden olur (Dursun ve ark. 2011).



ekil 2-2: Alzheimer Hastalığı'nın patolojik bileşenleri (Blennow ve ark. 2006)

2.1.1.1. Amiloid S

Yapı kan bir peptid olan A β peptidi, ilk olarak yaklaşık 30 yıl önce Alzheimer hastalarının ve Down sendromlu bireylerin meningeal kan damarlarından elde edilmiştir. Bundan bir yıl sonra ise aynı peptid, Alzheimer hastalarının beyin dokusundaki senil (nöritik) plakların esas bileşeni olarak tanımlanmıştır (ekil 2-3) (Hardy ve Selkoe 2002).

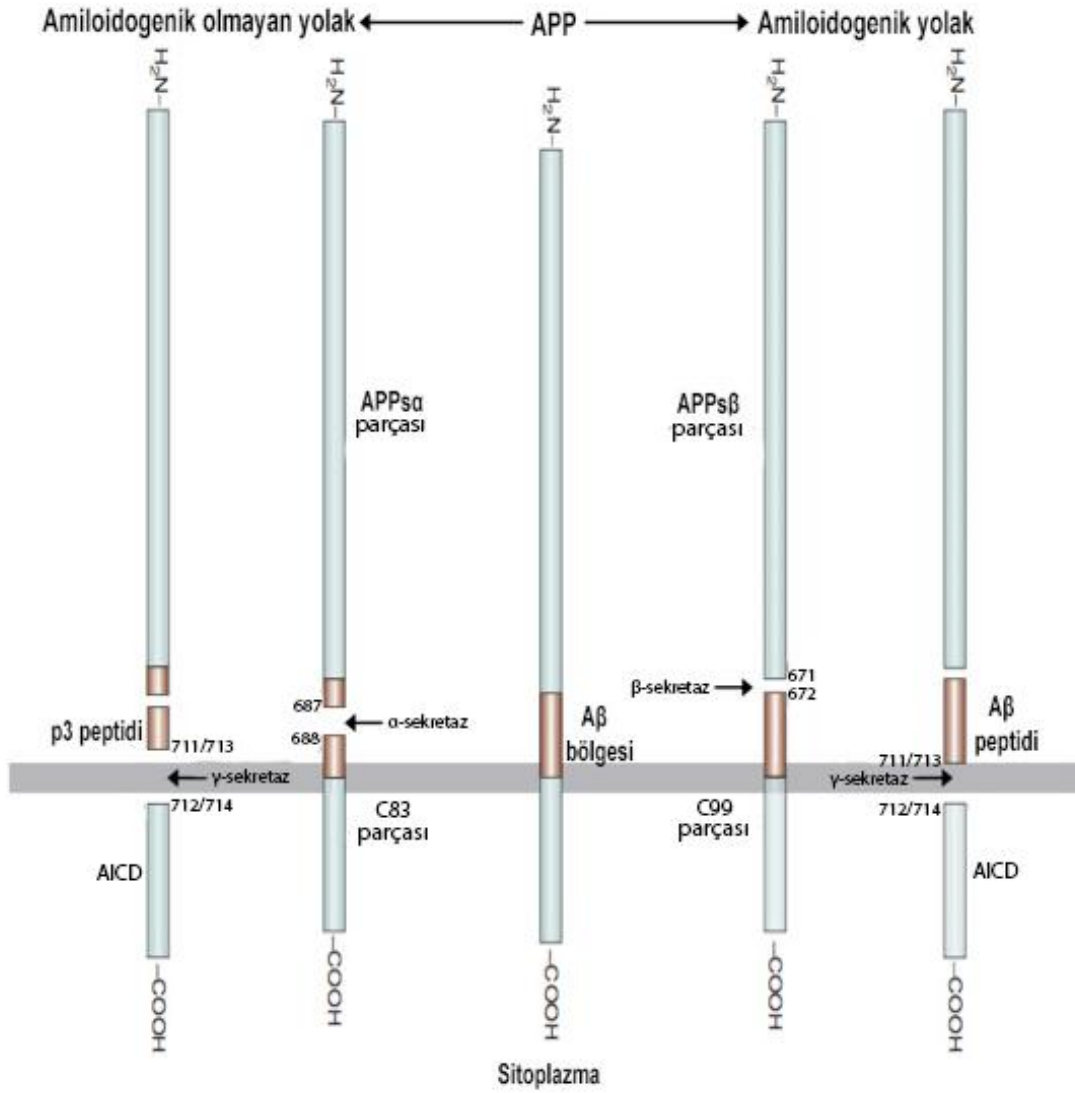


ekil 2-3: AS antikorları ile immünohistokimya yöntemi kullanılarak senil plakların gösterilmesi.

(http://www.usc.edu/programs/neuroscience/faculty/img/52_PikeADhimag.jpg)

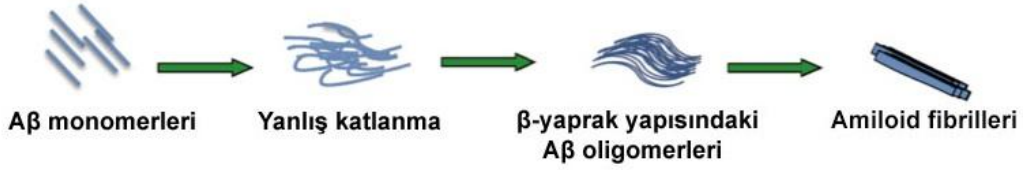
A β peptidi, amiloid öncül proteini (APP) adı verilen 770 amino asitlik büyük bir transmembran proteinin proteolitik kesimi sonucu ortaya çıkan küçük bir peptiddir. APP kısa ömürlüdür, hücrelerde iki yolak aracılığıyla hızlı bir şekilde metabolize edilir.

Amiloidogenik olmayan birinci yolakta APP'nin 687. ve 688. kalıntıları arasından α -sekretaz enzimi ile kesilmesi sonucu çözünebilir APPs α parçası ile 83 amino asitlik C-terminal parçası (C83) oluşur. Daha sonra γ -sekretaz enzimi C83 parçasını 711 ya da 713. kalıntılarında keserek P3 parçası ile amiloid öncül proteini intraselüler bölgesinin (AICD) ortaya çıkmasını sağlar. Bu yolakta, A β bölgesi içerisinde kesim gerçekleştiği için A β oluşumu gerçekleşmez. Amiloidogenik olan ikinci yolakta ise APP, 671. ve 672. kalıntıları arasından β -sekretaz enzimi ile kesilir ve çözünebilir APPs β parçası ile 99 amino asitlik C-terminal parçası (C99) oluşur. Daha sonra γ -sekretaz enzimi C99 parçasını 711 ya da 713. kalıntılardan keserek A β peptidi ile AICD'nin ortaya çıkmasını sağlar (Şekil 2-4). Eğer bu yolakta γ -sekretaz enziminin gerçekleştiği kesim 711-712 kalıntıları arasında olursa kısa A β peptidi (A β 40), 713-714 kalıntıları arasında olursa uzun A β peptidi (A β 42) meydana gelir. A β 42, A β 'nin senil plaklarda bulunan baskın formudur ve fizyolojik koşullarda A β 42 ve A β 40 arasındaki oran yaklaşık 1:10'dur. A β 42, A β 40'a göre daha fazla nörotoksik etkiye sahiptir ve birikimi daha hızlı gerçekleşir (Hardy 1997; Selkoe 1998; Di Carlo ve ark. 2012).



ekil 2-4: APP'nin kesim yolakları ve AS peptidinin oluşumu (Avramopoulos 2009'dan uyarlanmıştır)

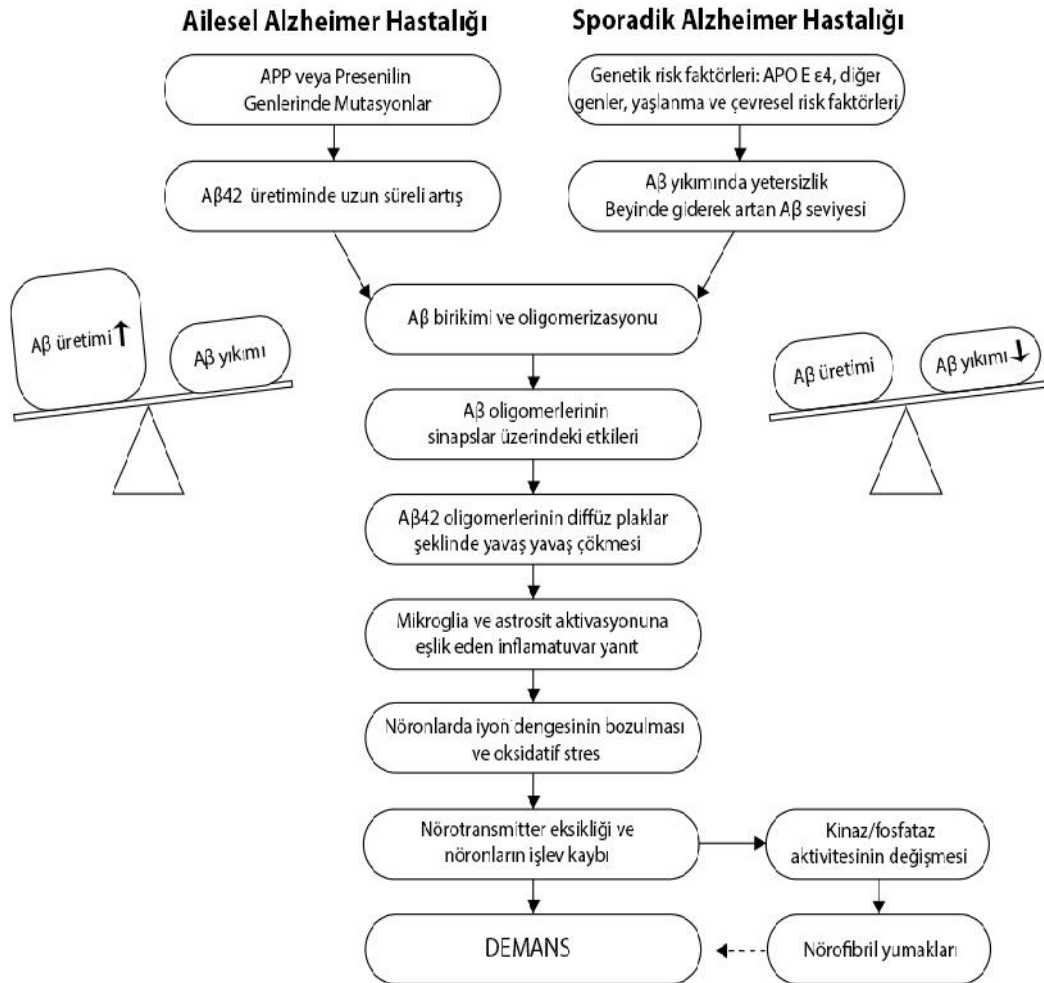
Nöron membranında bulunan 4 kDa ağırlığındaki A β monomerleri yanlış katlanarak α -heliks yapısından β -yaprak yapısına dönüşür. Bu durum, A β monomerlerinin polimerizasyonunu tetikleyerek kısa, çözünür ve yarı stabil ara ürünler olan A β oligomerlerinin oluşmasına neden olur. Oligomerler, yeni monomerlerin hızlı bir şekilde eklenmesiyle genişleyerek protofibrilleri oluşturur. Son olarak, protofibriller bir araya toplanarak plaklarda biriken geniş, β -yaprak yapısına sahip çözünmeyen formdaki amiloid fibrillerini oluşturur (ekil 2-5) (Gilbert 2013).



ekil 2-5: A β proteininin yanlış katlanması ve amiloid fibrilleri halinde birikimi (Di Carlo ve ark. 2012)

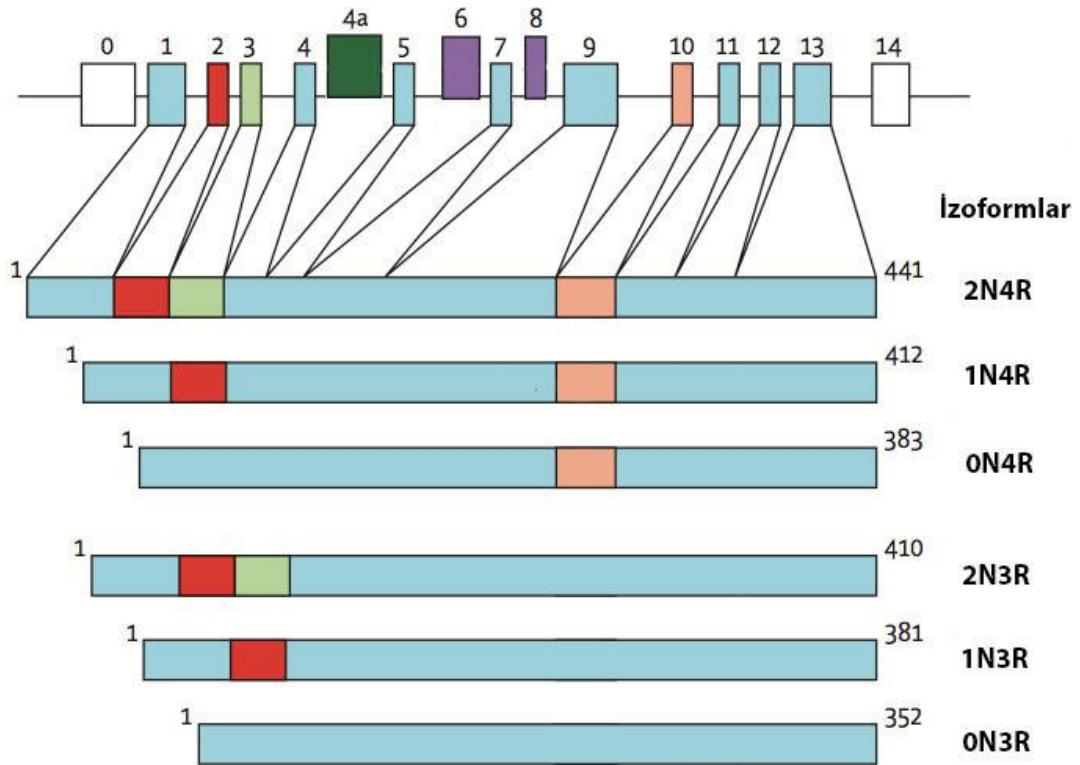
Hardy ve Higgins yaklaşık 20 yıl önce “amiloid kaskad hipotezi”ni ileri sürmüşlerdir. Bu hipoteze göre, A β üretimi ile yıkımı arasındaki dengesizlikten kaynaklanan A β birikiminin, nörofibril yumak oluşumu, sinaps kaybı ve nöron ölümünü içeren AH patogenezinin esas nedeni olduğu düşünülmektedir. (Tablo 2-1) (Tanzi ve Bertram 2005; Gilbert 2013).

Tablo 2-1: Amiloid kaskad hipotezi (Blennow ve ark. 2006)



2.1.1.2. Tau

Tau proteinleri, fizyolojik ko ulla rda tubulin proteinlerinin polimerize olarak mikrotübül olu turmasını sa lar ve tubulin ile etkile im halinde bulunarak mikrotübülleri kararlı hale getirirler (Lee ve Leugers 2012; Atasoy 2013; Spillantini ve Goedert 2013). Tau proteinleri, merkezi sinir sisteminde en çok nöronlarda ve astrositlerde bulunmaktadır. Mikrotübül ili kili tau proteinleri, 17. kromozomun uzun kolu üzerindeki 17q21 bandında yer alan MAPT geni tarafından kodlanır. MAPT geni 16 ekzondan olu maktadır. Genin 2., 3. ve 10. ekzonlarının alternatif olarak kırılması sonucunda tau proteininin 6 farklı izoformu meydana gelir. Kırılan ekzonlara ba lı olarak izoformlar 0N3R, 0N4R, 1N3R, 1N4R, 2N3R ve 2N4R olarak isimlendirilir. 0N; 2. ve 3. ekzonların birlikte kırıldığı nı, 1N; 3. ekzonun kırıldığı nı, 2N; hem 2. hem de 3. ekzonun kodlandı nı, 3R; 10. ekzonun kırıldığı nı, 4R ise 10. ekzonun kodlandı nı ifade etmektedir (ekil 2-6) (Cárdenas 2012; Ho 2012; Spillantini ve Goedert 2013).



ekil 2-6: Tau proteininin izoformları (Spillantini ve Goedert 2013'ten uyarlanmı)

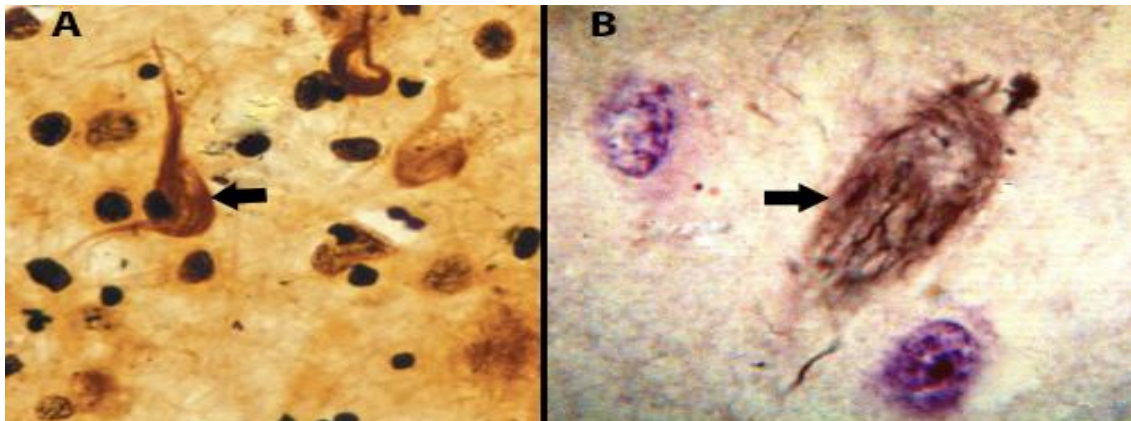
Tau proteinlerinin, mikrotübüllerin olu maya ba laması, büyümesi ve demet olu turmasını te vik etmede, mikrotübül dengesini korumada, nörit büyümesinde ve

kararlılıkta, akson oluşumunda, nöronal polaritede, hücre çeklinin, hareketliliğinin ve mikrotübül-plazma membranı etkileşimlerinin düzenlenmesinde ve sinyal iletiminde rolü olduğu bildirilmiştir (Shahani ve Brandt 2002).

Tau proteinleri kontrollü bir şekilde fosforile olarak mikrotübüllere bağlanır. Tau proteinlerinin fosforilasyonu, iki önemli enzim olan glikojen sentaz kinaz 3β (GSK3 β) ve protein fosfataz 2A'nın (PP2A) dengeli bir şekilde aktivesi aracılığıyla kontrol edilir. GSK3 β 'nin aşırı ifadesi ve PP2A'nın yeterli derecede ifade edilememesi sonucu kinaz-fosfataz dengesi bozularak tau proteinleri hiperfosforile olur ve mikrotübüllere olan afinitesi azalarak mikrotübüllerin dağılmasına ve elementer helikal filamentler (EHF) şeklinde tau agregatlarının oluşmasına yol açar (Spires-Jones 2009; Cárdenas 2012; Atasoy 2013).

Hiperfosforile tau proteinleri bir araya gelerek her biri yaklaşık 10 nm çapında olan EHF'leri oluşturur. Çok sayıda EHF de bir araya gelerek nörofibril yumaklarını (NFY) oluşturur. Perikaryonda birikmeye başlayan NFY'ler, nükleusun yerinde itirerek perikaryonun periferine doğru kaymasına sebep olur. Neredeyse tüm perikaryonu dolduran NFY'lar nöronların ölümüne yol açar ve geriye "hayalet" NFY'ler kalır (ekil 2-7) (Serrano-Pozo ve ark. 2011).

Taupatilerde de görüldüğü gibi tau'nun hiperfosforilasyonu nöronal işlev bozukluğuna, hücresel trafiğin bozulmasına, sinaps kaybına ve nöron ölümüne neden olur (Tablo 2-2) (Spires-Jones 2009).

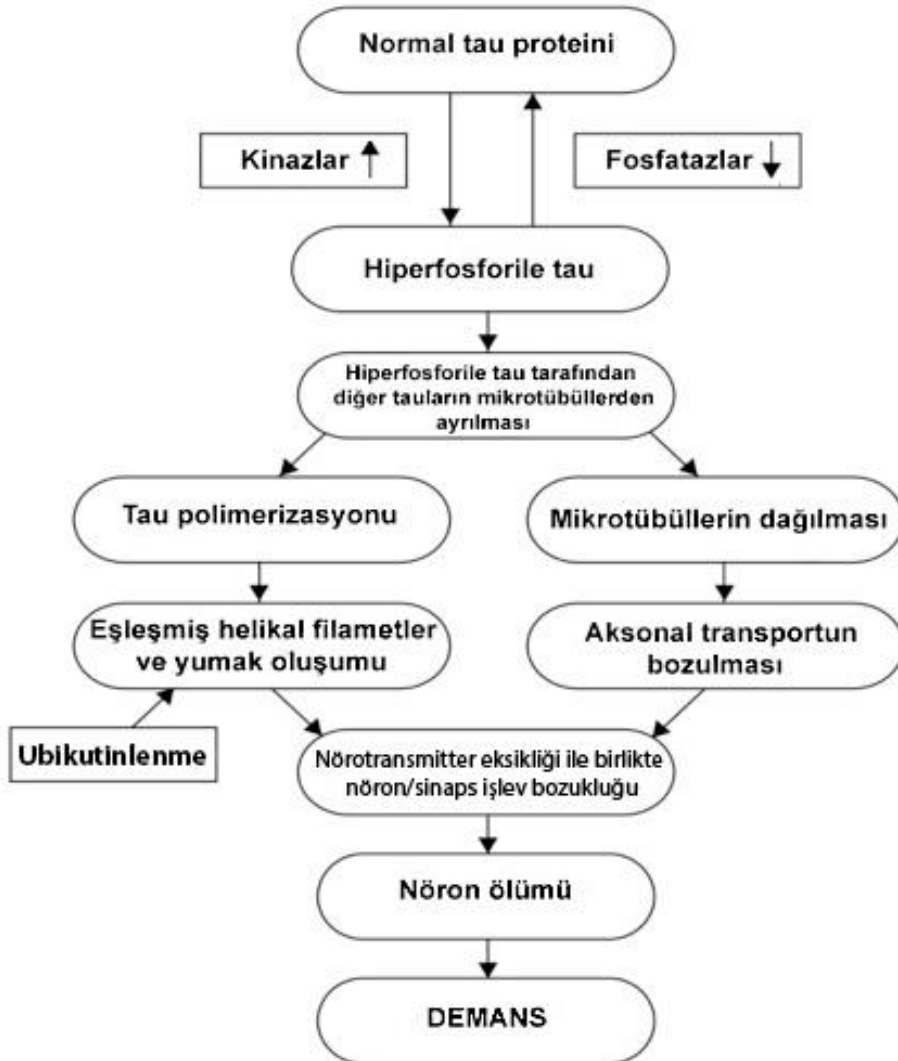


ekil 2-7: Nörofibril yumaklarının mikroskopik görünümü

A. Tüm perikaryonu dolduran nörofibril yumaklar, B. Hayalet nörofibril yumaklar.

(http://www.muirspathology.com/gallery/chapter11/images/fig%2011_33.jpg ve <http://jswood.files.wordpress.com/2008/01/for-blog-11.jpg>)

Tablo 2-2: Tau proteinlerinin hiperfosforilasyonu ve nörofibril yumaklarının oluşumu
(Blennow ve ark. 2006)



2.1.2. Alzheimer Hastalığı'nın Genetiği

AH'nın genetik olarak ailesel ve sporadik olmak üzere iki çeşidi vardır. Ailesel form, erken başlangıçlı Alzheimer hastalarında görülür ve Mendel tipi kalıtım ile kalıtılır. Erken başlangıçlı Alzheimer hastalarının yaklaşık %60'ının ailelerinde birden fazla Alzheimer hastası bulunmakta ve bunların %13'ü en az üç kuşaka etkileyerek otozomal dominant bir şekilde kalıtılmaktadır. Ailesel form; Amiloid Öncül Proteini (APP), Presenilin-1 (PSEN1) ve Presenilin-2 (PSEN2) genlerindeki nadir görülen otozomal dominant mutasyonlar sonucunda ortaya çıkar (Tablo 2-3). Sporadik form ise geç başlangıçlı Alzheimer hastalarında görülür ve Mendel tipi kalıtım göstermez. Sporadik form, çok sayıda genetik ve çevresel faktörün bir arada etkilemesi sonucu

ortaya çıkmaktadır. İndiye kadar yalnızca Apolipoprotein E geni (ApoE) sporadik form için bir risk faktörü olarak bildirilmiştir (Lambert ve Amouyel 2011; Alonso ve ark. 2012; Tanzi 2012; Araz 2013).

Tablo 2-3: Erken başlangıçlı ailesel Alzheimer Hastalığı'nda görülen genler ve patolojik etkileri (Tanzi 2012)

Gen	Protein	Kromozom	Mutasyon Sayısı	Etkileri
<i>APP</i>	Amiloid öncül proteini	21q21	24	$A\beta_{42}/A\beta_{40}$ oranında artış A β üretiminde artış A β birikiminde artış
<i>PSEN1</i>	Presenilin 1	14q24	185	$A\beta_{42}/A\beta_{40}$ oranında artış
<i>PSEN2</i>	Presenilin 2	1q42	14	$A\beta_{42}/A\beta_{40}$ oranında artış

2.1.2.1. Amiloid Öncül Proteini (APP)

İlk olarak 1987 yılında 21. kromozom (21q21) üzerinde yer aldığı tespit edilen APP geni 18 ekzon içerir ve 770 amino asit uzunluğunda tek geçişli bir transmembran proteini ifade eder. A β peptidi, APP geninin 16. ve 17. ekzonları tarafından kodlanır (Alonso ve ark. 2012; Bagyinszky 2014). Fizyolojik koşullarda sentezlenen APP, endoplazmik retikulum (ER) ve Golgi'de N- ve O- glikolizasyonu ve fosforilasyon ile olgunlaşır. APP'nin, nöronal hücre gövdesinde ve aksonlarda bulunur. APP'nin nörit büyümesi ve uzaması, sinaptik taşıma ve akson korunmasında rol oynadığı düşünülmektedir (Sun ve Zhang 2011).

A β peptidinin proteolizini etkileyerek AH patolojisine yol açtığı düşünülen patolojik APP mutasyonlarının çoğu yanlış anlamı mutasyonlardır ve γ -sekretaz enziminin kesim bölgelerinde bulunmaktadır. β ve γ proteolitik bölgelerde görülen mutasyonlar, hem total A β üretiminin artmasına hem de daha toksik olan A β_{42} oranının artarak A $\beta_{40}/A\beta_{42}$ oranının düşmesine yol açmaktadır (Alonso ve ark. 2012).

2.1.2.2. Presenilin 1 (PSEN1) ve Presenilin 2 (PSEN2)

Presenilinler, genellikle ER, Golgi, ER-Golgi geçişleri ve sinaptik terminallerde bulunan çok geçişli transmembran proteinlerdir. Presenilinler, insan beyninde özellikle nöronlarda ve periferel dokularda yüksek miktarda ifade edilir. PSEN1 ve PSEN2 arasında güçlü bir dizi homolojisi bulunmaktadır (Sun ve Zhang 2011).

PSEN1 geni 14. kromozom üzerinde (14q24) yer alır ve membranı yaklaşık 6 ila 10 kez geçen 467 amino asit uzunluğunda bir transmembran proteini kodlayan 12 ekzondan oluşur. PSEN-1 γ -sekretaz kompleksinin katalitik bölgesini oluşturan bir çok geçişli transmembran proteindir (Bekris ve ark. 2010).

AH ile ilişkili bildirilen mutasyonların büyük çoğunluğu PSEN1 geninde görülen mutasyonlardır. Bugüne kadar 180'den fazla PSEN1 mutasyonu belirlenmiştir. Bu mutasyonların büyük çoğunluğu yanlış anlamalı mutasyondur. Bu yanlış anlamalı mutasyonlar, PSEN1 proteininde amino asit değişikliği meydana getirerek A β 42/ A β 40 oranında artışa neden olur (Bekris ve ark. 2010; Sun ve Zhang 2011).

PSEN2 geni ise 1. kromozom üzerinde (1q42) yer alır. PSEN2 geni 12 ekzondan oluşur ve 10 ekzonu 448 amino asit uzunluğunda bir peptid kodlar. PSEN1 gibi PSEN2 de A β peptidinin kesiminden sorumlu γ -sekretaz olarak adlandırılan atipik bir aspartil proteazın bileşenlerinden biridir (Bekris ve ark. 2010).

Bugüne kadar AH ile ilişkili olduğu tespit edilen 14 tane PSEN2 mutasyonu bildirilmiştir. PSEN1 geninde olduğu gibi PSEN2 geninde görülen yanlış anlamalı mutasyonlar PSEN2 proteininde amino asit değişikliğine neden olarak A β 42/ A β 40 oranında artışa yol açar (Bekris ve ark. 2010; Sun ve Zhang 2011).

2.1.2.3. Apolipoprotein E (ApoE)

19. kromozom üzerinde (19q13) yer alan ApoE geni 299 amino asit uzunluğunda bir protein kodlayan 4 ekzon içerir. ApoE, en fazla karaciğer ve beyinde sentezlenen bir glikoproteindir. Beyinde ApoE, çoğunlukla astrositler, mikroglia ve bazı patofizyolojik durumlarda çok az miktarda nöronlar tarafından üretilir (Alonso ve ark. 2012). ApoE, beyinde kolesterol taşıyan lipoproteinlerin en önemli bileşenlerinden biridir ve nöron korunması ile onarımında rol oynar. ApoE, hücre yüzeyinde bulunan çeşitli reseptörlere bağlanarak lipid taşıması, glukoz metabolizması, nöronal sinyalleme ve mitokondriyal fonksiyonlarda yer alır. Ayrıca A β peptidine bağlanarak onun temizlenmesinde rol alır (Bagyinszky ve ark. 2014).

ApoE'nin ϵ 2, ϵ 3 ve ϵ 4 olmak üzere üç izoformu bulunmaktadır. Bu üç izoform 112 ve 158. amino asit kalıntılarında bir ya da iki amino asit farklılıkla birbirinden ayrılmaktadır. ϵ 2 izoformunun 112 ve 158. amino asit kalıntılarının her ikisinde birden Sistein (Cys), ϵ 3 izoformunun 112. amino asit kalıntısında Sistein 158. amino asit

kalıntısında Arjinin (Arg), $\epsilon 4$ izoformunun 112 ve 158. amino asit kalıntılarının her ikisinde de Arjinin amino asidi bulunmaktadır. Bu farklılıklar ApoE yapısında ve fonksiyonunda farklılıklara yol açar (ekil 2-8) (Kim ve ark. 2009). $\epsilon 3$ izoformu, $\epsilon 2$ ve $\epsilon 4$ izoformlarına kıyasla ApoE geninin en yaygın görülen formudur (Alonso ve ark. 2012).



ekil 2-8: Apolipoprotein E izoformları

(http://www.openi.nlm.nih.gov/detailedresult.php?img=3084234_pone.0018569.g001®=4)

ApoE ve AH arasındaki ilişki ilk kez 1990'ların başlarında ApoE'nin amiloid plaklar ile birlikte yer aldığı bulunması ile kurulmuştur. Daha sonra yapılan çalışmalar ile ApoE geni $\epsilon 4$ allelinin AH için güçlü bir genetik risk faktörü olduğu bulunmuştur (Namba ve ark. 1991; Corder ve ark. 1993; Holtzman ve ark. 2012). Geç başlangıçlı Alzheimer hastalarının yaklaşık %50'sinde $\epsilon 4$ alleli bulunmaktadır (Alonso ve ark. 2012). Yapılan çalışmalar, $\epsilon 3/\epsilon 3$ allellerini taşıyan bireylere kıyasla $\epsilon 3/\epsilon 4$ allellerini taşıyan bireylerin yaklaşık 3 kat, $\epsilon 4/\epsilon 4$ allellerini taşıyan bireylerin ise yaklaşık 15 kat daha fazla AH gelişme riski olduğunu göstermiştir. $\epsilon 2$ allelinin ise AH riskine karşı koruyucu olduğu gösterilmiştir (Guerreiro ve ark. 2012).

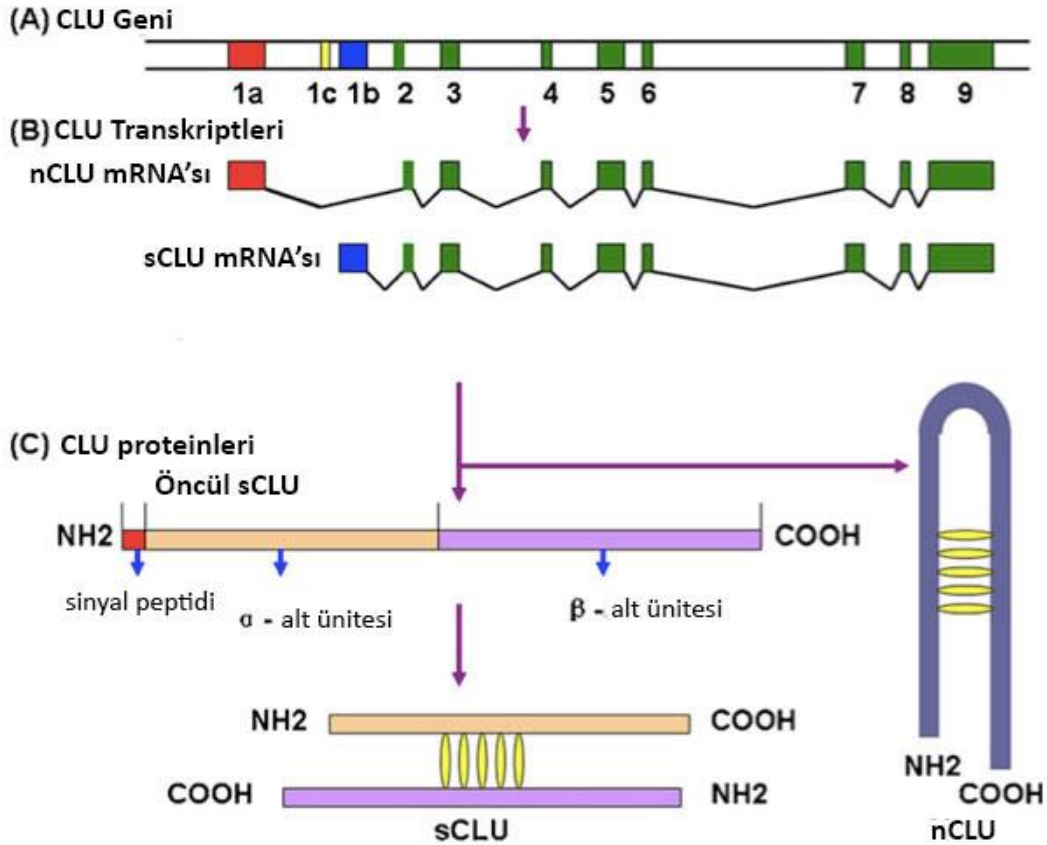
2.2. Clusterin

Clusterin, ilk kez 1983 yılında koç rete testis sıvısından izole edilmiş bir glikoproteindir ve ismini Sertoli hücrelerinin kümeleme yeteneğinden almıştır (Blaschuk ve ark. 1983). Daha sonraki yıllarda clusterin, farklı gruplar tarafından farklı canlı türlerinden izole edilmiş ve dolayısıyla çok sayıda farklı isimle anılmaya başlanmıştır. Daha sonra 1992 yılında İngiltere'de düzenlenen Uluslararası Clusterin seminerinde tüm bilimsel çalışmalarda "clusterin" teriminin kullanılması önerilmiştir. (Tablo 2-4) (Rosenberg ve Silkensen 1995; Tunçdemir 2006).

Tablo 2-4: Clusterinin izole edildiği dokular ve kullanılan diğer isimler (Rosenberg ve Silkenssen 1995)

Doku	Tür	İsim	Kaynak
Rete testis sıvısı	Koç	Clusterin	Blaschuk ve ark. (1983)
Adrenal medulla	Siğir	GPIII	Fischer-Colbrie ve ark. (1984)
Sertoli hücreleri	Siçan	SGP-2 (DAG)	Collard ve Griswold (1987)
Prostat	Siçan	TRPM-2	Leger ve ark. (1987)
Testis	Siçan	Clusterin	Cheng ve ark. (1988)
Prostat	Siçan	SGP-2	Bettuzzi ve ark. (1989)
Nöroretinal hücreler	Bıldırcın	T64	Michel ve ark. (1989)
Serum (karaciğer)	İnsan	SP-40,40	Kirszbaum ve ark. (1989)
Serum (karaciğer)	İnsan	CLI	Jenne ve Tschopp (1989)
Beyin	Hamster	SGP-2	Duguid ve ark. (1989)
Adrenal medulla	Siğir	Glikoprotein III	Palmer ve Christie (1990)
Kan	İnsan	apoJ	deSilva ve ark. (1990)
Beyin	İnsan	pADHC-9	May ve ark. (1990)
Renal hücreler	Köpek	gp 80	Hartmann ve ark. (1991)
Kan	İnsan	NA1/NA2	James ve ark. (1991)
Beyin	İnsan	pTB16	Danik ve ark. (1991)
Retina	İnsan	K611	Jones ve ark. (1992)
Vasküler düz kas	Domuz	pc38K	Diemer ve ark. (1992)

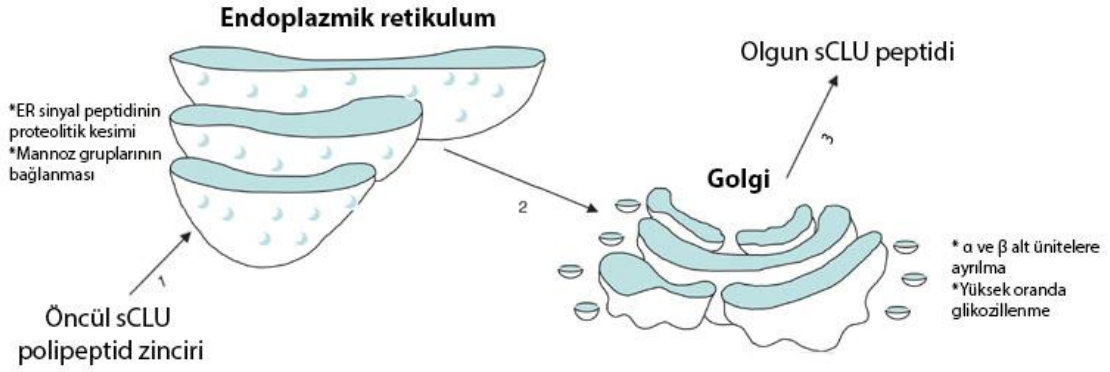
CLU geni, 8. kromozom üzerinde (8p21-p12) yer alan, 9 ekzon içeren ve yaklaşık 16 kb uzunluğunda olan tek kopyalı bir gen dir. CLU geninin alternatif kırılması sonucu ortaya çıkan iki transkripti bulunmaktadır. 1. ekzonun farklı parçalarının transkribe olmasıyla birbirinden ayrılan bu transkriptler, farklı hücreler ve dokulara ve farklı biyolojik fonksiyonlara sahip proteinleri sentezler. 1. ekzonun 1a parçasını içeren transkript, nükleustaki yerleşimi nedeniyle nükleer clusterin (nCLU) olarak adlandırılan proteini sentezler. Clusterin'in salgılanan formu olan sCLU'yu sentezleyen transkript ise 1. ekzonun 1b parçasını içerir (ekil 2-9) (Koltai 2014).



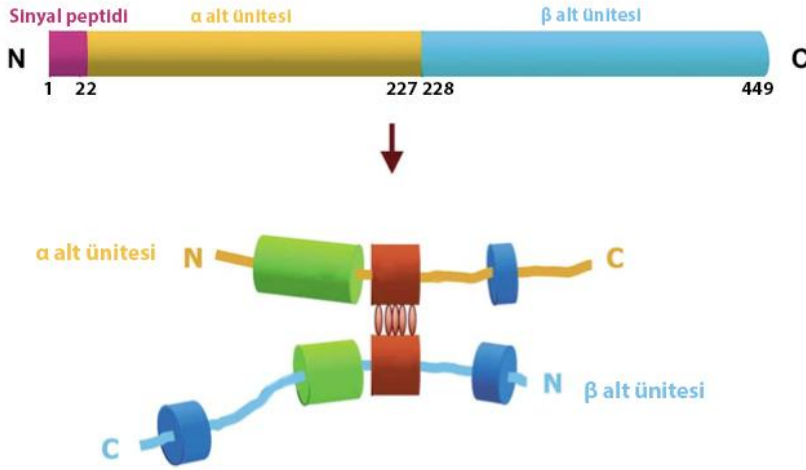
ekil 2-9: CLU geni, transkriptleri ve proteinleri (Yu ve Tan 2012'den uyarlanmı)

CLU transkriptlerinin alternatif kırılması sonucu ortaya çıkan iki protein vardır. Clusterin'in en sık görülen formu olan sCLU; tüm sCLU mRNA'sının kodlanması sonucu oluşurken, nCLU; nCLU mRNA'sından 2. ekzonun alternatif kırılması sonucu meydana gelmektedir (Nuutinen ve ark. 2009, Shannan ve ark. 2006).

sCLU, 449 amino asitlik bir öncül polipeptid zinciri olarak sentezlenir. Zincirin N-ucundaki 22 amino asitlik sinyal peptidi, öncül sCLU peptidinin ER'ye yönelmesini sağlar. Bu sinyal peptidi, ER'de proteolitik kesim ile çıkartılır ve geri kalan zincire çok sayıda mannoz grubu bağlanır. Daha sonra bu öncül polipeptid zinciri Golgi'ye taşınarak burada 227. arjinin ile 228. serin amino asitleri arasında kırılır ve her biri yaklaşık 40 kDa ağırlığında olan α ve β alt ünitelerine ayrılır. Merkez noktalarına yakın yerlerden birbirlerine anti-paralel 5 disülfid bağıyla bağlanan α ve β alt üniteleri, yüksek oranda glikozillenerek yaklaşık 75 kDa ağırlığındaki olgun sCLU molekülünü oluşturur (ekil 2-9 ve ekil 2-10) (Trogakos ve Gonos 2006).



ekil 2-10: sCLU proteininin oluşumu (Shannan ve ark. 2006'dan uyarlanmıştır)



ekil 2-11: sCLU proteininin yapısı (Jones ve Jomary 2002'den uyarlanmıştır)

sCLU molekülü; içerdiği üç adet amfipatik, iki adet çift kıvrımlı α -heliks yapılarıyla küçük ısı- ok proteinleri gibi moleküler aponlara benzemektedir. sCLU, ATP'den bağımsız bir mekanizma aracılığıyla yanlı katlanma proteinlerin hidrofobik bölgelerine bağlanarak birikmelerini engellemektedir (Trogakos ve Gonos 2006; Nuutinen ve ark. 2009).

nCLU ise, ER sinyal peptidinin yer aldığı 2. ekzonun alternatif kırılması sonucu oluşan nCLU mRNA'sından öncül polipeptid zinciri olarak sentezlenir. Yaklaşık 49 kDa ağırlığında olan disülfid bağımlı öncül nCLU, sinyal peptidi içermediği için ER'a hedeflenemez, dolayısıyla α ve β alt ünitelerine ayrılmaz ve glikozillenmez. Sitoplazmada yerleşik olan öncül nCLU, hücre hasar meydana geldiğinde translasyon

sonrası de i ikli e u rayarak yakla ık 55 kDa a ırlı ndaki olgun nCLU molekülüne dönüür ve içerd i iki nüklear yerle im sinyali sayesinde nükleusa geçer. Çift zincir DNA kırıklarının onarımı için önemli bir protein olan Ku70 proteinine ba lanarak DNA tamirinin gerçekleştirilmesini engeller ve apoptozu tetikler (Shannan ve ark. 2006; Nuutinen ve ark. 2009).

2.2.1. Clusterin'in Biyolojik Fonksiyonları

Neredeyse tüm memeli dokularında bulunan clusterin'in bu geni da ılımı nedeniyle pek çok fizyolojik süreçte yer aldığı ileri sürülmü tür. Clusterin'in fonksiyonları arasında en ba ta lipid transportu (de Silva ve ark. 1990), sperm olgunlaşması (Hermo ve ark. 1994) ve kompleman inhibisyonu gelmektedir (Trogakos ve Gonos 2002).

Apolipoprotein J (ApoJ) olarak da bilinen clusterin, kolesterol ve fosfolipidler gibi lipidlerin transportunu sağlayan lipoprotein partiküllerinin yapısında yer almaktadır. Plazmada clusterin'in, yüksek yoğunluklu lipoprotein (HDL) partiküllerinin yapısında bulunduğu gösterilmiştir.

Anti-apoptotik bir protein olarak da bilinen cCLU, apoptozda önemli rol oynayan Bax proteinine ba lanarak oligomerizasyonunu engeller ve böylece mitokondriden sitokrom c salınımına engel olarak apoptozu önler.

Pro-apoptotik bir protein olarak bilinen nCLU da DNA kırıklarının tamirinde önemli bir role sahip Ku70/Ku80 kompleksinde yer alan Ku70 proteinine ba lanarak DNA tamirine engel olur ve böylece apoptozu tetikler (Nuutinen ve ark. 2009)

Clusterin, küçük ısı- ok proteinlerine benzer bir yapıya sahip olan bir moleküler aperiendir. Yanlı katlanmış proteinleri ATP'den ba ımsız bir şekilde ba layarak HSP90 gibi ısı- ok proteinleri tarafından tekrar katlanmalarına aracılık eder. Isı- ok proteinlerinin bulunmadığı ekstraselüler alanda ise megalin reseptörüyle etkileerek yanlı katlanmış proteinlerin endositoz yoluyla temizlenmesine yardımcı olur (Wilson ve ark. 2008).

Ayrıca clusterin'in, hücre adhezyonu ve hücre-hücre etkileşimlerinin kontrolü (Silkensen ve ark. 1995; Silkensen ve ark. 1999), kompleman aracılı hücre hasarının inhibisyonu, membran korunması, hücre siklusunun düzenlenmesi (Bettuzzi ve ark. 1999), hücresel birikintilerin temizlenmesi (Bartl ve ark. 2001) gibi rolleri olduğu,

gelişim (French ve ark. 1993; O'Bryan ve ark. 1993) ve farklı maddeler (Ahuja ve ark. 1994) yer aldığı bildirilmiştir (Jones ve Jomary 2002; Shannan ve ark. 2006; Trougakos ve Gonos 2006; Yu ve Tan 2012)

2.2.2. Clusterin ve Alzheimer Hastalığı

Clusterin, hemen hemen tüm memeli dokularında ifade edilir ancak diğer dokulara kıyasla beyinde daha fazla ifade edilir. Beyinde clusterin, hipokampustaki piramidal nöronlarda ve serebellumdaki Purkinje hücrelerinde, astrositlerde ve az miktarda da mikroglia'da ifade edilir (Nuutinen ve ark. 2009).

AH ile clusterin arasındaki ilişki, ilk kez May ve ark. tarafından Alzheimer hastalarının hipokampus doku örneklerinde clusterin ifadesinin sağlıklı kontrollere kıyasla artmış olduğu gösterilmiştir (May ve ark. 1990).

Daha sonra yapılan çalışmalar ile beyin-omurilik sıvısında (BOS) clusterin'in çözünür A β peptidlerine bağlanabildiği ve A β çözünürlüğünü artırarak birikimini engellediği gösterilmiştir. Ayrıca clusterin'in AH'de görülen oksidatif stresin neden olduğu nörotoksik etkiyi azalttığı gösterilmiştir (Nuutinen ve ark. 2009).

Beyinde A β , hem beyin parenkimasında bulunan mikroglia, astrosit ve nöronlar tarafından reseptör aracılı yolla hem de kan-beyin bariyeri aracılığıyla temizlenir. Clusterin, A β peptidine bağlanarak kan-beyin bariyeri aracılığıyla taşınmasını sağlar, böylece A β temizlenmesini artırarak A β fibril oluşumunu azaltabilir (Yu ve Tan 2012).

Hem *in vivo* hem de *in vitro* çalışmalar, clusterin/A β etkileşiminin amiloid fibril oluşumu ve A β 'nin nörotoksik etkisi üzerinde önemli bir rol oynadığını göstermektedir. Clusterin/A β kompleksinin oluşması, çözünebilir A β birikimini ve polimerizasyonunu önemli derecede azaltmaktadır (Yerbury ve ark. 2007; Yu ve Tan 2012).

AH aynı zamanda nöroinflamatuvar bir hastalıktır. Nöroinflamasyon süreci, mikroglia, astrosit ve kompleman sistem aktivasyonu ile başlar ve sitokin, kemokin ve sitotoksik bileşenlerin salınımı ile devam eder. Yapılan çalışmalar, clusterin'in beyinde görülen bu inflamatuvar süreçte rol aldığını göstermektedir. Clusterin beyinde, kompleman aktivasyonunu düzenler, immün yanıtın düzenlenmesinde önemli bir rol oynayan nükleer faktör κ B'nin (NF- κ B) aktivasyonunu inhibe eder ve Smad2/3

proteinine ba lanarak nöroprotektif etkisi olan Dönü türücü Büyüme Faktörü β (TGF- β) sinyalini artırır (Nuutinen ve ark. 2009).

Clusterin'in astrositlerde mitotik yanıtı düzenleyen ekstraselüler sinyal ili kili kinaz 1/2 (ERK1/2) yola nı uyardı ı bildirilmi tir. Bu durum, AH'da clusterin ifadesinin artarak astrositlerin proliferasyonunu indükledi ini dü ündürmektedir (Shim ve ark. 2009)

2.3. Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PZR)

Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PZR), nükleik asit miktar tayini, genotipleme ve kimerizm analizleri gibi pek çok farklı amaç için kullanılan bir tekniktir.

RT-PZR yönteminin temeli, floresan sinyal tekni i kullanılarak amplifikasyon sürecinin e zamanlı olarak görüntülenebilmesine dayanmaktadır. Floresan sinyaller, çift zincirli DNA'ya özgü floresan boyaların kullanılmasıyla olu turulur. SYBR Green, RT-PZR yönteminde en çok kullanılan floresan boyalardan biridir. Sentezlenen PZR ürünü boyaya ba lanır ve floresan bir sinyal olu turur, daha sonra bu sinyal cihaz tarafından tespit edilir.

Diziye özgü i aretleme için ise florofofor i aretli oligonükleotid probları kullanılmaktadır. Primer ba lanma a masında diziye özgü florofofor i aretli prob hedef dizi ile hibritle erek floresan bir sinyal olu turur ve bu sinyal cihaz tarafından tespit edilir.

RT-PZR yöntemi konvensiyonel PZR yöntemine göre çok daha hızlı sonuç verir. Ayrıca tüm amplifikasyon profili bilindi i için konvensiyonel PZR yöntemine göre daha güvenilir sonuçlar elde edilir (Wilhelm ve Pingoud 2003).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Çalı mada, stanbul Üniversitesi stanbul Tıp Fakültesi Nöroloji Anabilim Dalı ve stanbul Üniversitesi Cerrahpa a Tıp Fakültesi tarafından 2012- 2014 yılları arasında psikometrik de erlendirme (minimental test, saat çizim testi ve set test), laboratuvar tetkikleri (kan sayımı, kan elektrolitleri, T3, T4, TSH, B12 ve folik asit tayini) ve radyolojik tetkikler (BBT veya MR) ile McKhann 1984 kriterlerine göre te hisleri konulan 183 geç ba langıçlı Alzheimer hastası ile bu hasta grubuyla ya paralelli i gösteren ve herhangi bir nörodejeneratif hastalı ı bulunmayan 154 sa lıklı bireyden toplanan periferik kan örnekleri kullanıldı.

Periferik kan örneklerinden elde edilen DNA'larda, CLU genine ait rs11136000, rs9331888 ve rs2279590 bölgelerindeki tek nükleotid polimorfizmleri (SNP) ile ApoE genotipleri saptandı.

Çalı maya dahil olan tüm bireyler ya da yakınlarından bilgilendirilmi gönüllü olur formu alındı. Çalı ma, stanbul Üniversitesi Cerrahpa a Tıp Fakültesi Klinik Ara tırmalar Etik Kurulu tarafından 83045809/5559 sayı ve 07.03.2013 tarihli yazısıyla onaylandı. Çalı ma, stanbul Üniversitesi Cerrahpa a Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Nörogenetik laboratuvarında yapıldı.

3.1. Kullanılan Malzemeler

QIAamp DNA Mini Kit (51304, QIAGEN, Hilden, Germany)

Fast Start DNA Master HybProbe (Roche, Mannheim, Germany)

LightSNiP (TibMolBiol, Berlin, Germany)

LightMix Kit ApoE C112R R158C (TibMolBiol, Berlin, Germany)

LightCycler® 480 II cihazı (Roche, Mannheim, Germany)

Santrifüj

Mikropipet

3.2. DNA izolasyonu

Vakumlu steril K3-EDTA'lı tüplere alınan 5 ml periferik kan örnekleri -20°C'de saklandı ve QIAamp DNA Mini Kit (51304, QIAGEN, Hilden, Germany) izolasyon kiti ile DNA izolasyonu gerçekleştirildi.

3.2.1. DNA izolasyon Protokolü

1. 1.5 ml'lik temiz bir tüpün dibine 20 µl QIAGEN Protease (Proteinase K) pipetlendi.
2. 200 µl örnek bu tüpün içine konuldu.
3. Örneklerin üstüne 200 µl Buffer AL eklendi. 15 saniye vorteks ile karıştırıldı.
4. Örnekler 56°C'de 10 dakika inkübe edildi.
5. 1.5 ml'lik tüp cidarına yapışmış sıvıları ağızda toplamak üzere santrifüj edildi.
6. Örnekler üzerine 200 µl etanol (%96-100) eklendi ve 15 saniye vorteks ile karıştırıldı. Vorteksten sonra tüp cidarına yapışmış sıvıları ağızda toplamak üzere santrifüj edildi.
7. 6. adımda elde edilen karışım dikkatlice 2 ml'lik toplama tüpüne yerleştirilen QIAamp Mini spin kolonun içine dikkatlice kenarlarını ıslatmadan konuldu. Kapak kapatılıp 6000 g'de (8000 rpm) 1 dakika santrifüj edildi. Santrifüjden sonra QIAamp Mini spin kolon temiz bir 2 ml'lik toplama tüpüne yerleştirildi.
8. QIAamp Mini spin kolonun kapakları dikkatlice açılıp kenarları ıslatılmadan 500 µl Buffer AW1 eklendi. Kapak kapatıldı ve 6000 g'de (8000 rpm) 1 dakika santrifüj edildi. Santrifüjlemeden sonra QIAamp Mini spin kolon temiz bir 2 ml'lik toplama tüpüne yerleştirildi.
9. QIAamp Mini spin kolonun kapakları dikkatlice açılıp kenarları ıslatılmadan 500 µl Buffer AW2 eklendi. Kapak kapatılıp en yüksek hızda (20.000 x g/14.000 rpm) 3 dakika santrifüj edildi.

10. QIAamp Mini spin kolon temiz bir 2 ml'lik toplama tüpüne yerle tirildi. En yüksek hızda 1 dakika santrifüj edildi.
11. QIAamp Mini spin kolon temiz bir 1.5 ml'lik toplama tüpüne yerle tirildi. QIAamp Mini spin kolonun kapağı dikkatlice açılıp 50-200 µl Buffer AE veya distile su eklendi. Oda sıcaklığında (15-25°C) 1-5 dakika inkübe edildi ve 6000 g'de (8000 rpm) 1 dakika santrifüj edildi.

3.3. DNA Saflığı ve Miktarının Tespiti

zolasyon sonucu elde edilen DNA'ların saflık ve miktar tayini spektrofotometrik ölçüm ile yapıldı. DNA'ların 260 ve 280 nm'deki absorbanları okunduktan sonra konsantrasyon ve saflıkları aşağıda belirtilen formüllere göre hesaplandı.

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

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

3.4. Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PZR) ile CLU ve ApoE Genotiplerinin Belirlenmesi

CLU genine ait rs11136000, rs9331888 ve rs2279590 bölgelerinde görülen SNP'ler ve ApoE genotipleri, tüm hasta ve kontrollerde Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PZR) yöntemiyle belirlendi. RT-PZR yönteminde; Simple Probe, Fast Start DNA Master HybProbe (Roche, Mannheim, Germany) ve PZR döngü kollarını gerçekleştiren LightCycler® 480 II (Roche, Mannheim, Germany) cihazı kullanıldı. Simple Probe olarak, CLU geni için LightSNiP (TibMolBiol, Berlin, Germany), ApoE geni için ise LightMix Kit ApoE C112R R158C (TibMolBiol, Berlin, Germany) kullanıldı.

3.4.1. CLU Genotiplerinin Belirlenmesi

CLU geninde çalışılan SNP bölgelerinin kromozom üzerinde bulunduğu konumlar ve alleller Tablo 3-1'de, allel de i im bölgeleri ise Tablo 3-2'de gösterilmiştir.

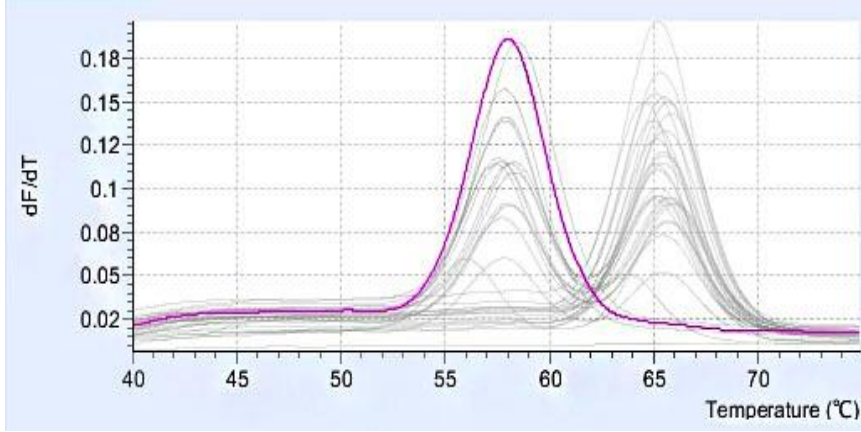
Tablo 3-1: CLU geninde ara tırılmı olan polimorfizm bölgelerinin bulundu u konum ve de i iklik sonucu ortaya çıkan alleller.

SNP No'su	Bulundu u Konum	De i iklik Gösteren Alleller
rs11136000	ntron	C / T
rs9331888	5' UTR bölgesi	C / G
rs2279590	ntron	A / G

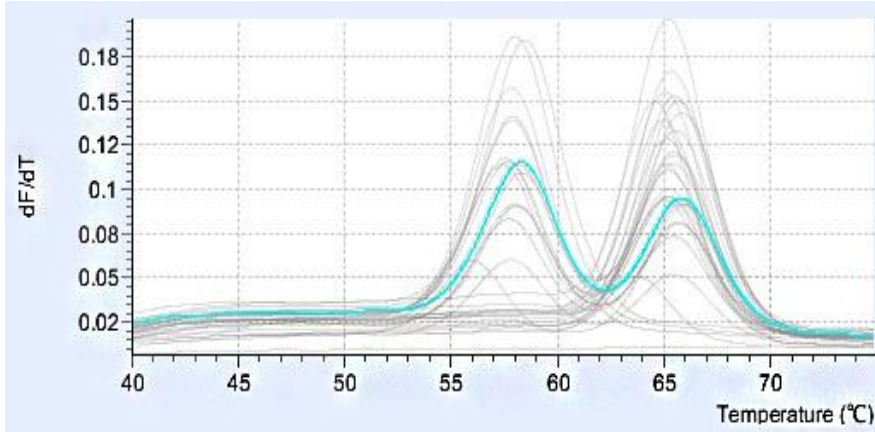
Tablo 3-2: CLU geninin 3 SNP bölgesine ait allel de i imleri.

SNP No'su	Allel De i im Bölgeleri
rs11136000	CACCAAAGCCACACCAGCTATCAAAA C/T TCTCTAACGGGCCCTTGCCACTGA
rs9331888	AGAGGCAAGAGGACTCATCCTTCCAAA C/G GGACTTTCTCTGGGAAGCCTGCTCC
rs2279590	GCTCAGCTCTCTAGGTTTCCTTGGAG A/G AGCAGGAGGACTTCCTTATCAGAAG

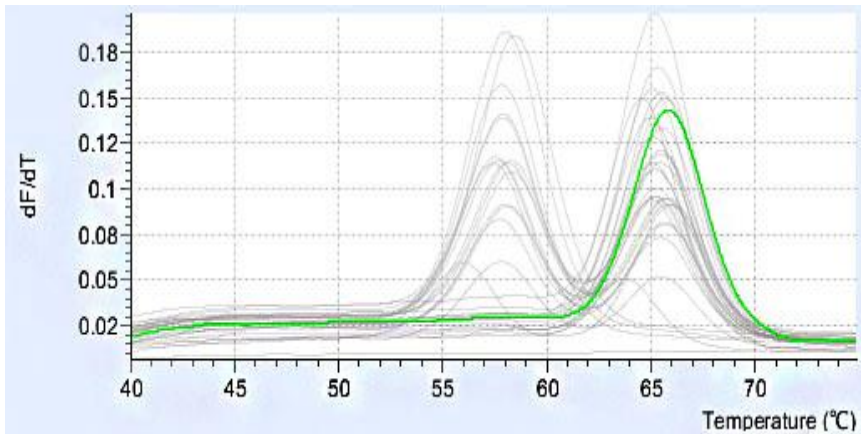
CLU geninin rs11136000, rs9331888 ve rs2279590 bölgelerine özgü prob'larla i aretlenmesi sonucu erime noktaları; rs11136000 bölgesine ait TT genotipi için 59,34°C (ekil 3-1), CT genotipi için 59,34°C – 66,86°C (ekil 3-2) ve CC genotipi için 66,86°C (ekil 3-3), rs9331888 bölgesine ait CC genotipi için 56,66°C (ekil 3-4), GC genotipi için 56,66°C – 64,60°C (ekil 3-5) ve GG genotipi için 64,60°C (ekil 3-6), rs2279590 bölgesine ait AA genotipi için 52,75°C (ekil 3-7), GA genotipi için 52,75°C – 62,43°C (ekil 3-8) ve GG genotipi için 62,43°C'dir (ekil 3-9).



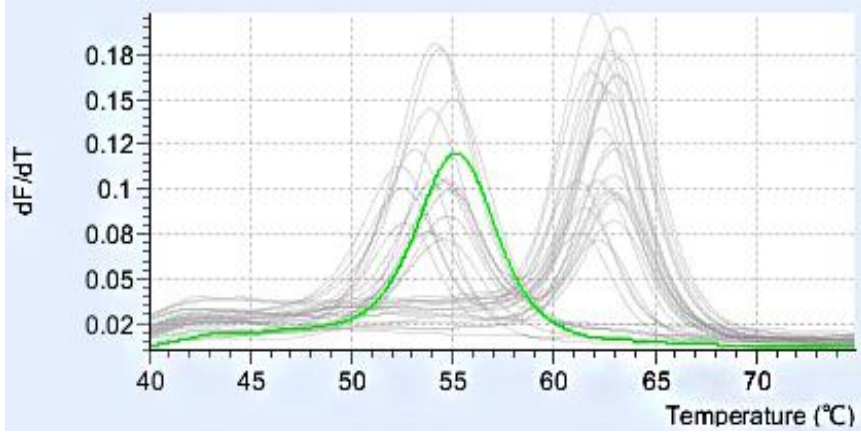
ekil 3-1: CLU geni rs11136000 bölgesine ait TT genotipinin belirlenmesinde kullanılan erime noktasını gösteren grafik.



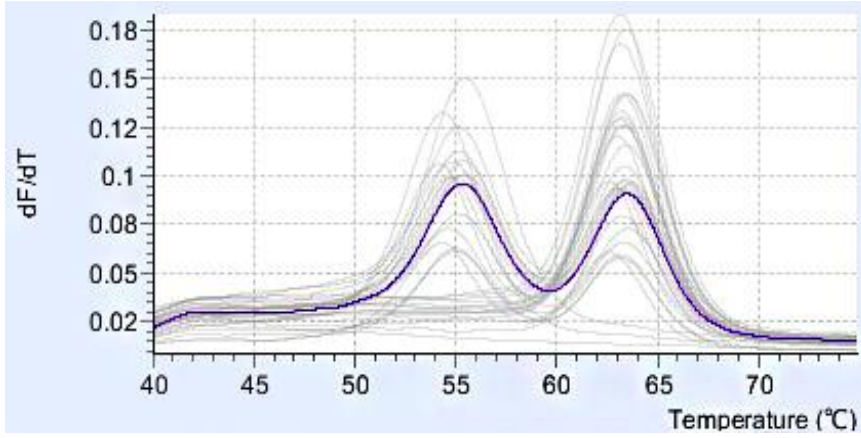
ekil 3-2: CLU geni rs11136000 bölgesine ait CT genotipinin belirlenmesinde kullanılan erime noktasını gösteren grafik.



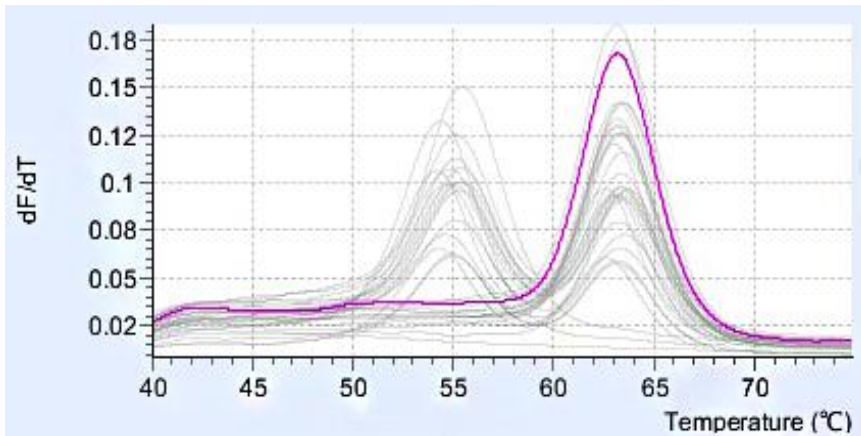
ekil 3-3: CLU geni rs11136000 bölgesine ait CC genotipinin belirlenmesinde kullanılan erime noktasını gösteren grafik.



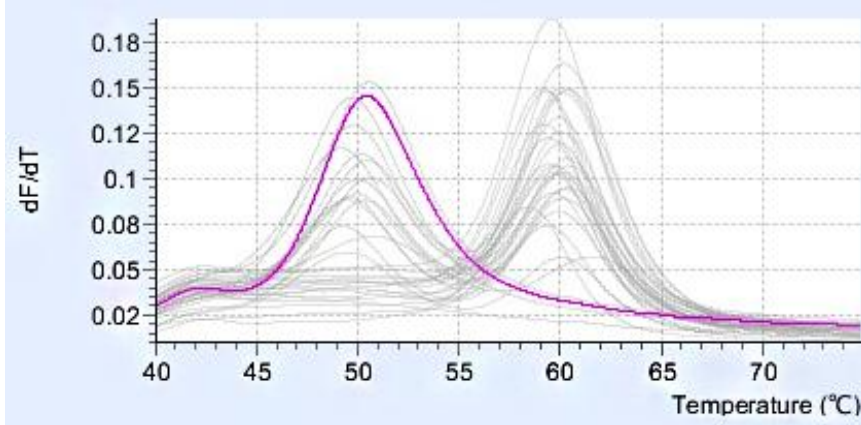
ekil 3-4: CLU geni rs9331888 bölgesine ait CC genotipinin belirlenmesinde kullanılan erime noktasını gösteren grafik.



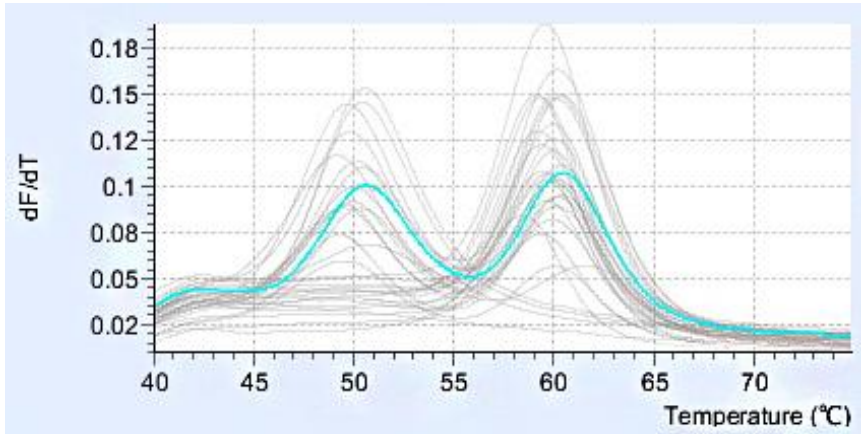
ekil 3-5: CLU geni rs9331888 bölgesine ait GC genotipinin belirlenmesinde kullanılan erime noktasını gösteren grafik.



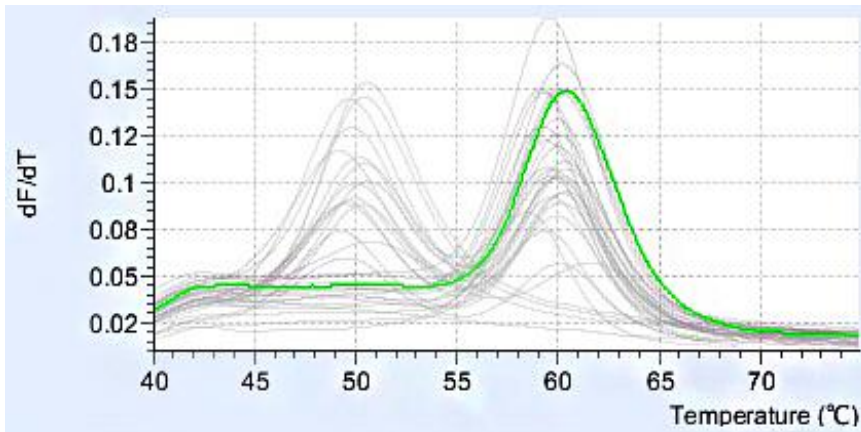
ekil 3-6: CLU geni rs9331888 bölgesine ait GG genotipinin belirlenmesinde kullanılan erime noktasını gösteren grafik.



ekil 3-7: CLU geni rs2279590 bölgesine ait AA genotipinin belirlenmesinde kullanılan erime noktasını gösteren grafik.



ekil 3-8: CLU geni rs2279590 bölgesine ait GA genotipinin belirlenmesinde kullanılan erime noktasını gösteren grafik.



ekil 3-9: CLU geni rs2279590 bölgesine ait GG genotipinin belirlenmesinde kullanılan erime noktasını gösteren grafik

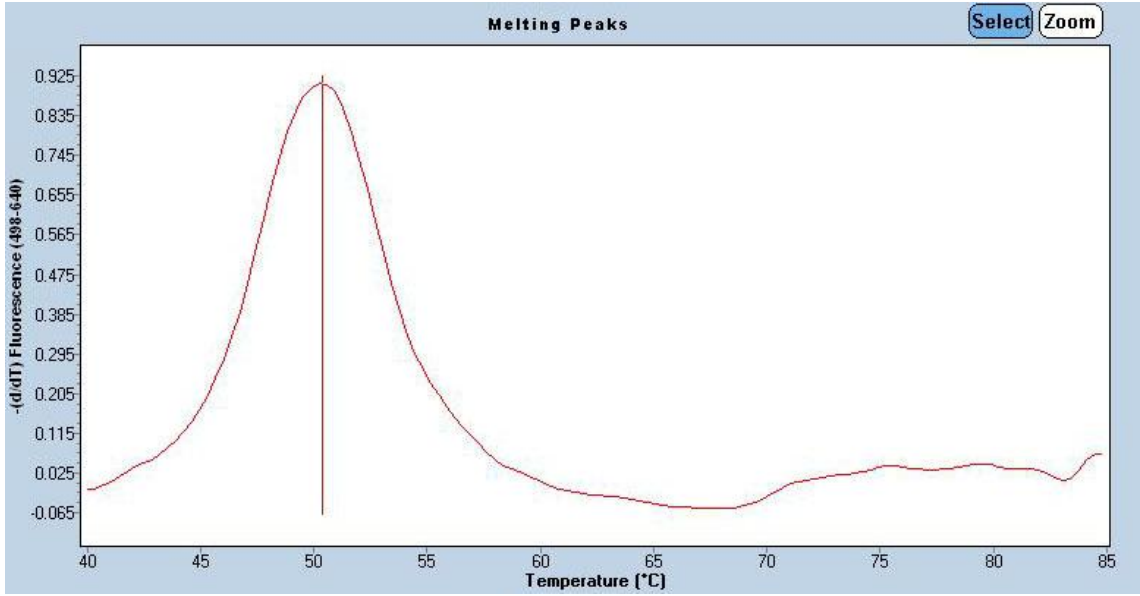
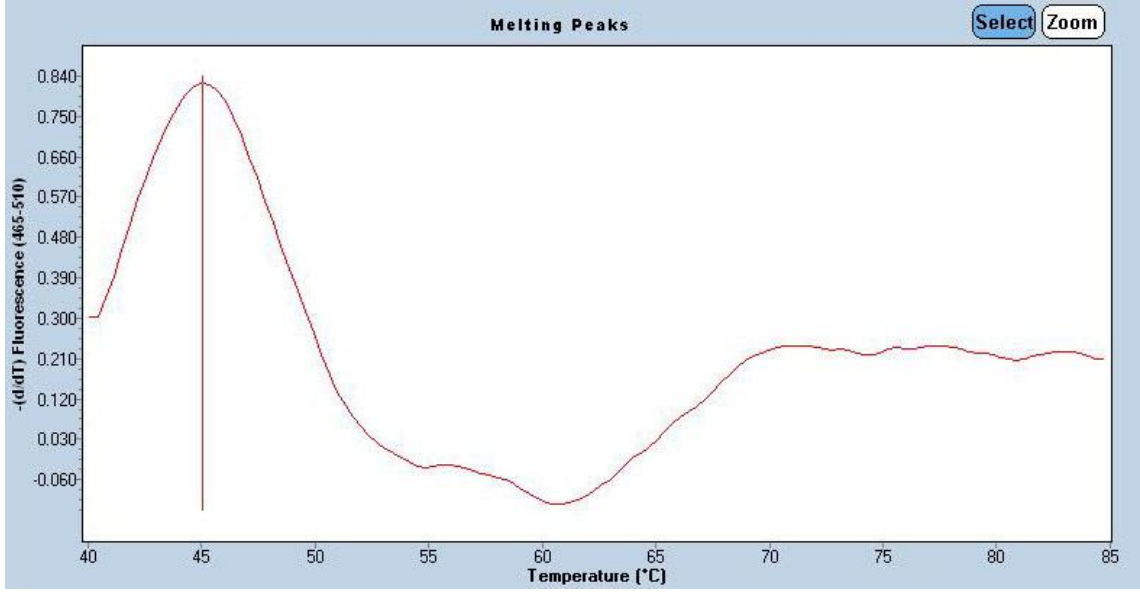
3.4.2. ApoE Genotiplerinin Belirlenmesi

ApoE genine ait genotiplerin belirlenmesi için kullanılan bölgeler, ilgili genotipler, erime noktaları ve fenotipe yansıma riskleri Tablo 3-3'te gösterilmiştir.

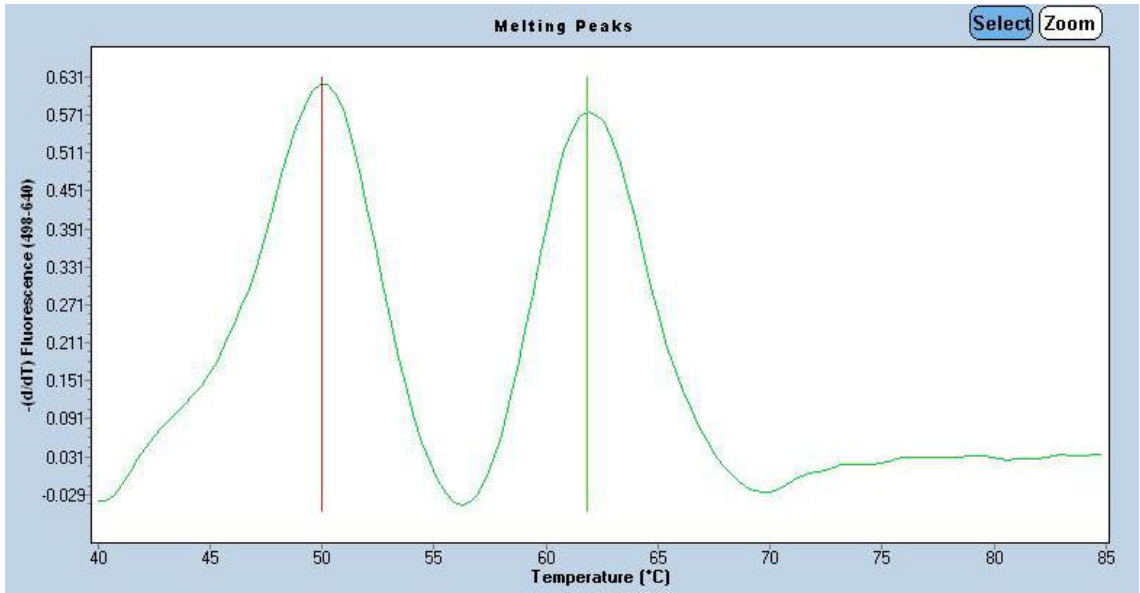
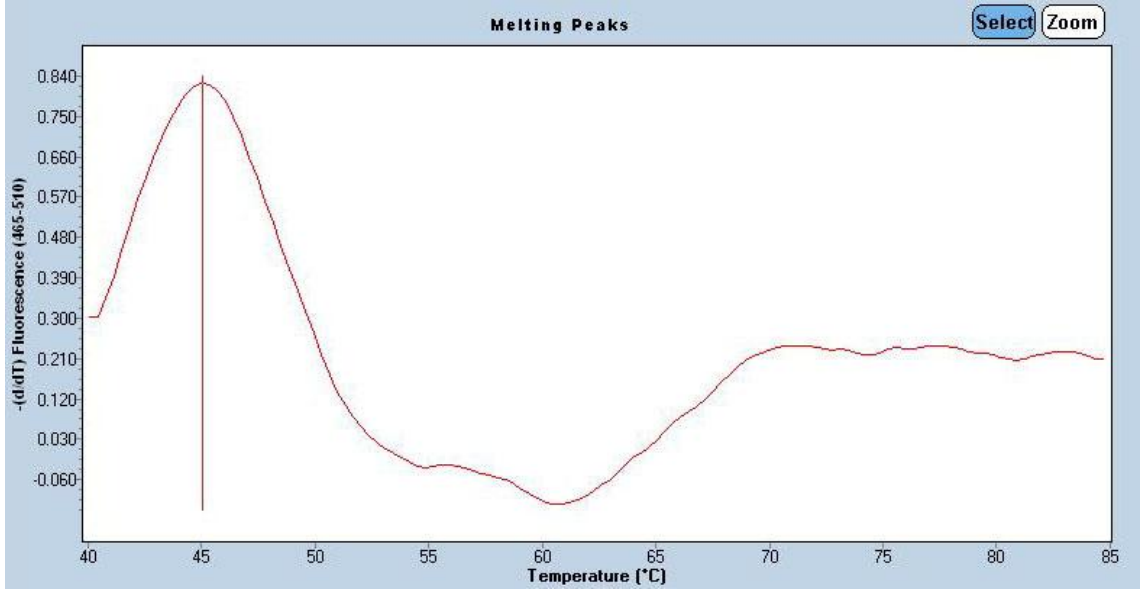
Tablo 3-3: ApoE genine ait genotiplerin belirlenmesi için kullanılan bölgeler, ilgili genotipler, erime noktaları ve fenotipe yansıma riski.

Allel	APOE Genotipi	465-510 Filtre Kombinasyonundaki Tm Değeri	498-640 Filtre Kombinasyonundaki Tm Değeri	Fenotipe Yansıma
112C/C 158C/C	$\epsilon 2/\epsilon 2$	45°C	51°C	Tip III Hiperlipidemi
112C/C 158C/R	$\epsilon 2/\epsilon 3$	45°C	51-61°C	
112C/R 158C/R	$\epsilon 2/\epsilon 4$	45-56°C	51-61°C	
112C/C 158R/R	$\epsilon 3/\epsilon 3$	45°C	51°C	Normal
112C/R 158R/R	$\epsilon 3/\epsilon 4$	45-56°C	61°C	
112R/R 158R/R	$\epsilon 4/\epsilon 4$	56°C	61°C	Alzheimer Hastalığı için yüksek risk

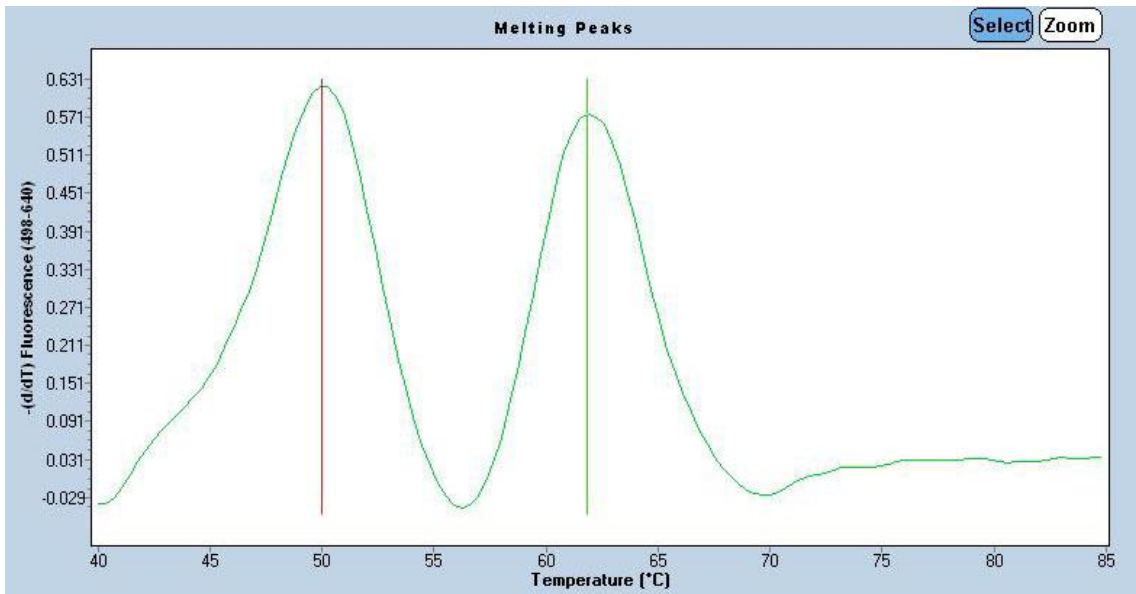
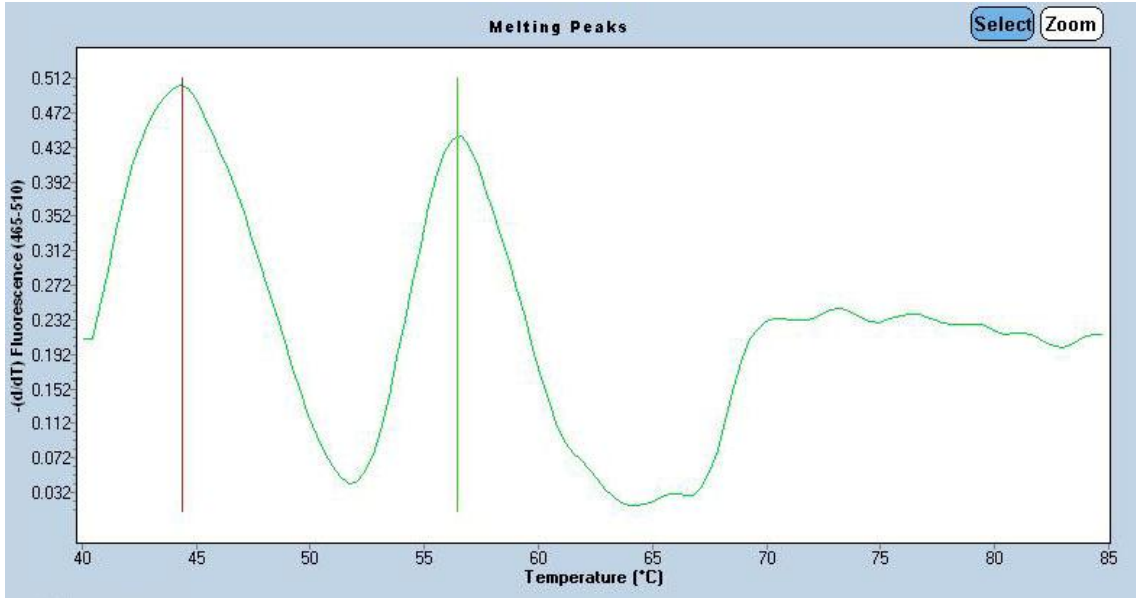
ApoE geninin 112C ve 158R bölgelerine özgü prob'larla i aretlenmesi sonucu olu an erime noktaları $\epsilon 2/\epsilon 2$ genotipi için 45°C – 51°C (ekil 3-10), $\epsilon 2/\epsilon 3$ genotipi için 45°C – 51/61°C (ekil 3-11), $\epsilon 2/\epsilon 4$ genotipi için 45/56°C – 53/63°C (ekil 3-12), $\epsilon 3/\epsilon 3$ genotipi için 45°C – 61°C (ekil 3-13), $\epsilon 3/\epsilon 4$ genotipi için 45/56°C – 61°C (ekil 3-14) ve $\epsilon 4/\epsilon 4$ genotipi için 56°C – 61°C'dir (ekil 3-15).



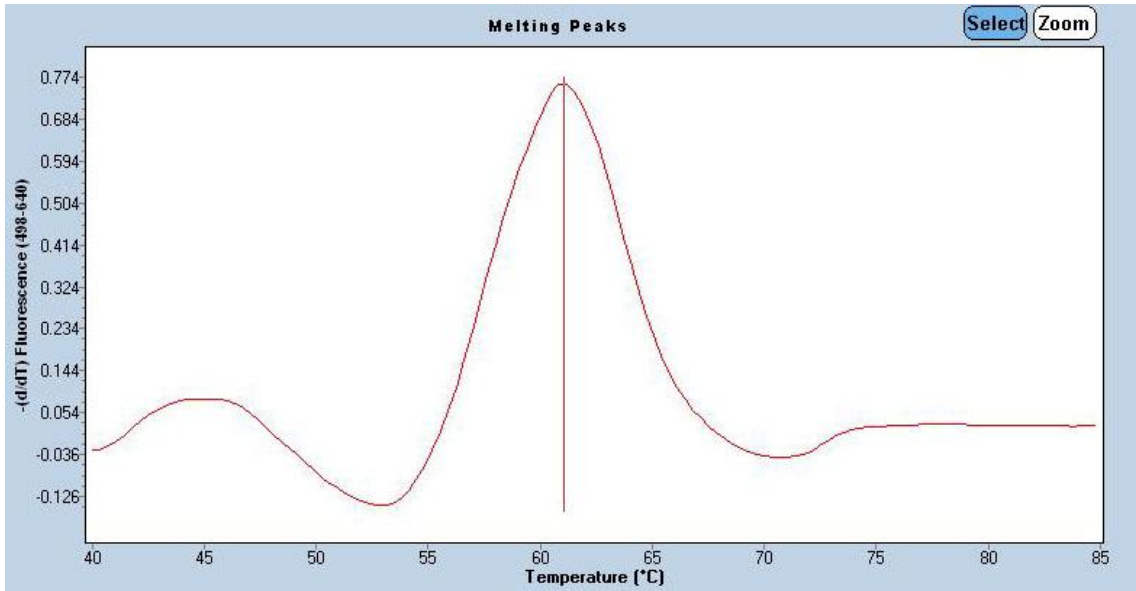
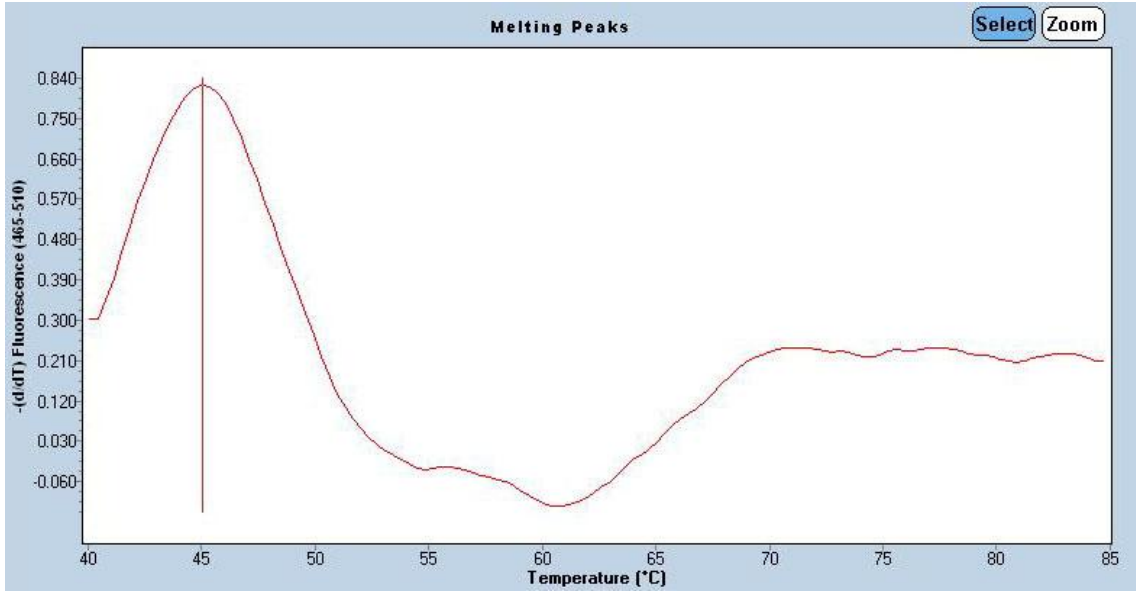
ekil 3-10: ApoE genine ait v2/v2 genotipinin belirlenmesinde kullanılan erime noktalarını (45 - 51°C) gösteren grafik.



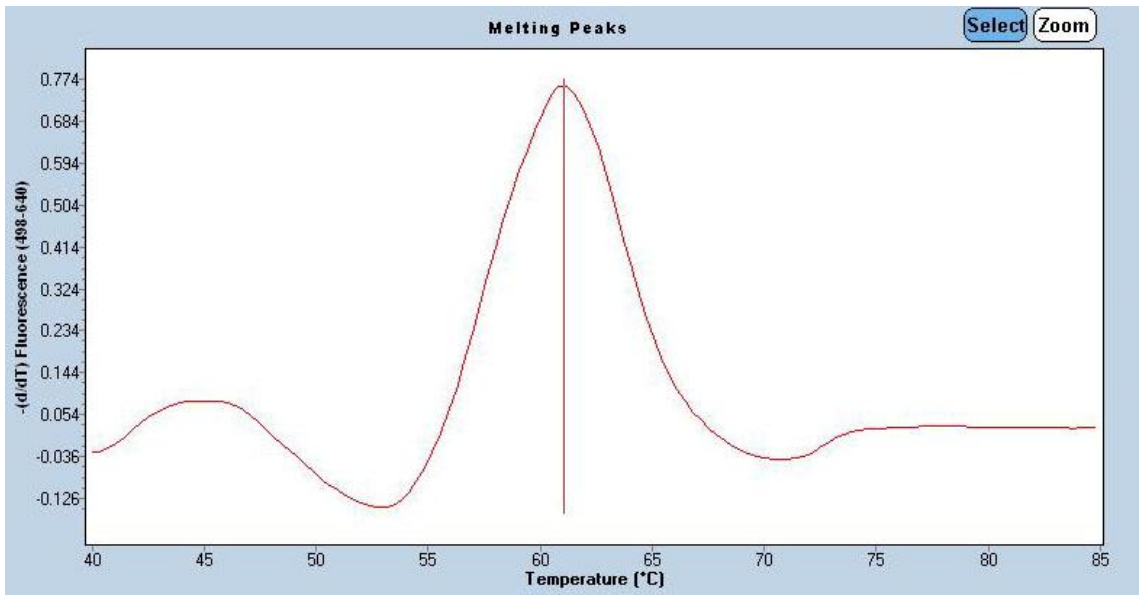
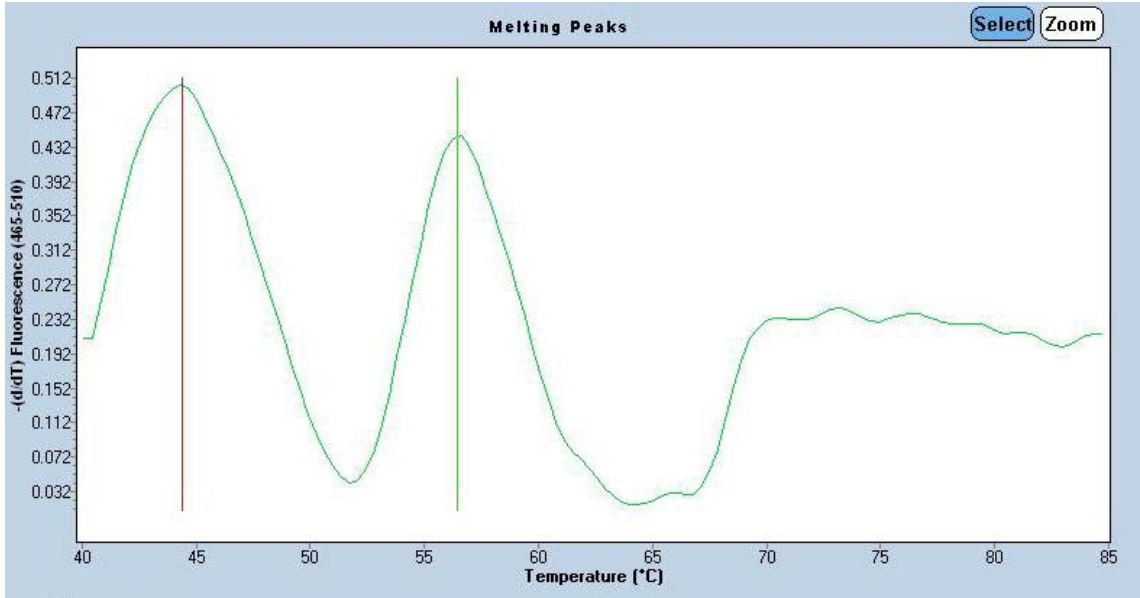
ekil 3-11: ApoE genine ait $\nu 2/\nu 3$ genotipinin belirlenmesinde kullanılan erime noktalarını (45 - 51/61°C) gösteren grafik.



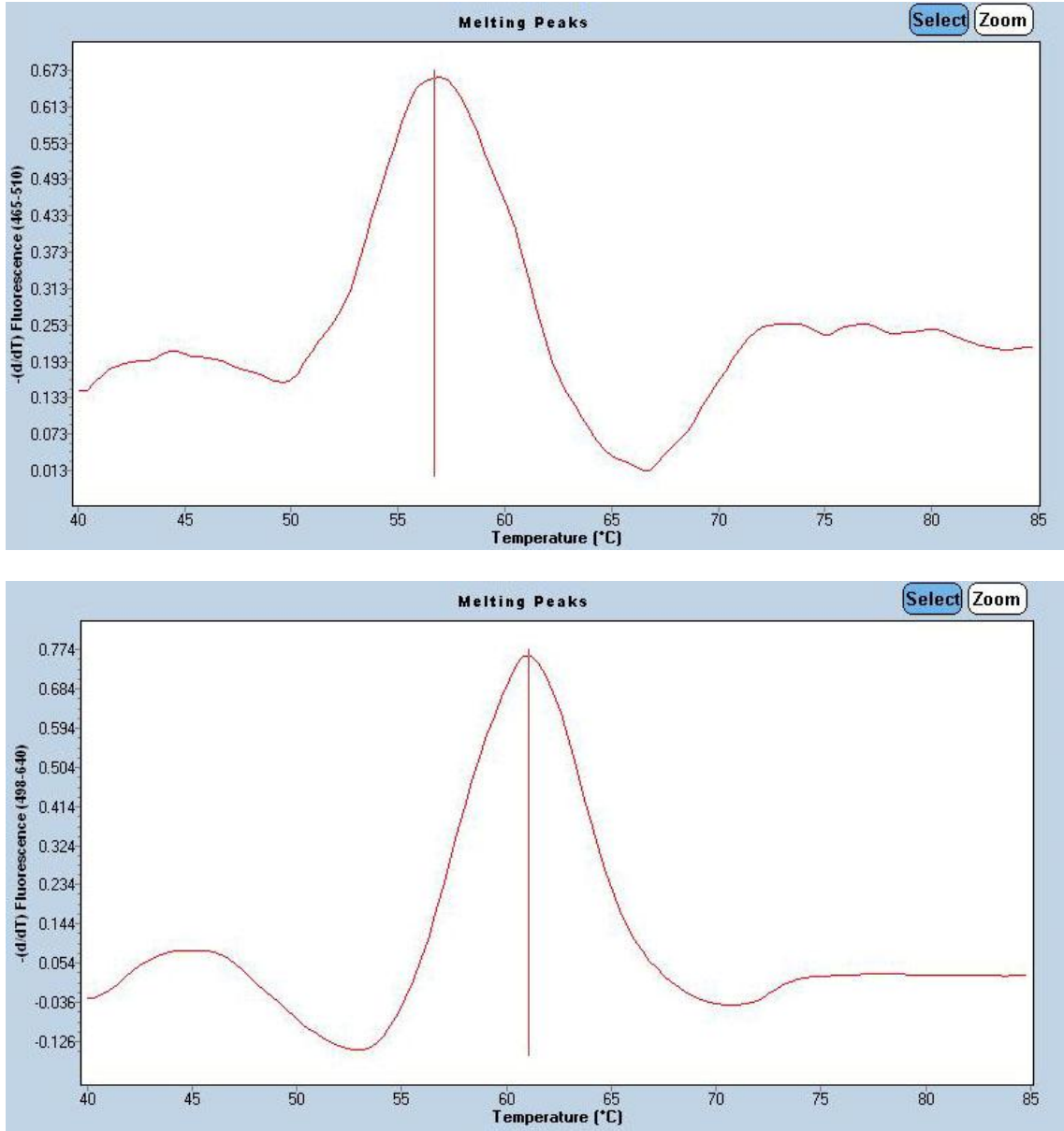
ekil 3-12: ApoE genine ait v2/v4 genotipinin belirlenmesinde kullanılan erime noktalarını (45/56 - 53/63°C) gösteren grafik.



ekil 3-13: ApoE genine ait $\nu 3/\nu 3$ genotipinin belirlenmesinde kullanılan erime noktalarını (45 - 61°C) gösteren grafik.



ekil 3-14: ApoE genine ait $\nu 3/\nu 4$ genotipinin belirlenmesinde kullanılan erime noktalarını (45/56 - 61°C) gösteren grafik.



ekil 3-15: ApoE genine ait v4/v4 genotipinin belirlenmesinde kullanılan erime noktalarını (56 - 61°C) gösteren grafik.

3.4.3. Deneylerde Kullanılan Simple Prob'ların Hazırlanması

CLU genine ait genotiplerin tespiti için Simple Prob olarak LightSNiP (TibMolBiol, Berlin, Germany) kullanıldı. CLU geni için kullanılan her bir Simple Prob'u hazırlamak üzere aşağıdaki adımler takip edildi.

1. Liyofilize primer ve prob karışımını içeren tüpler açılmadan önce kısa bir süre santifüjlenerek sarı bir çökelti elde edildi.
2. Tüplerin içerisine 100 µl dH₂O eklendi.
3. Kısa bir süre vorteks ile karıştırıldıktan sonra santrifüjlenerek tüm sıvı tüpün dibinde toplandı.

ApoE genine ait genotiplerin tespiti için Simple Prob olarak LightMix Kit ApoE C112R R158C (TibMolBiol, Berlin, Germany) kullanıldı. ApoE geni için kullanılan her bir Simple Prob'u hazırlamak üzere aşağıdaki adımler takip edildi.

1. Liyofilize primer ve prob karışımını içeren tüpler açılmadan önce kısa bir süre santrifüjlendi.
2. Tüplerin içerisine 66 µl dH₂O eklendi.
3. Kısa bir süre vorteks ile karıştırıldıktan sonra santrifüjlenerek tüm sıvı tüpün dibine çöktürüldü.

3.4.4. RT-PZR Reaksiyon Karışımlarının Hazırlanması

RT-PZR reaksiyon karışımları hazırlanmak üzere aşağıdaki adımler takip edildi.

1. Tüm solüsyonlar, içeriklerinin tamamı karışımaya kadar çözündürüldü ve kısa bir süre santifüjlendikten sonra mikropipet yardımıyla karıştırılıp buz üzerine alındı.
2. Primer ve prob karışımları bölüm 3.3.3'de açıklandığı gibi hazırlandı.
3. Buz üzerindeki 1.5 ml tüpe reaksiyon karışımları Tablo 3-4 ve Tablo 3-5'te gösterildiği gibi konuldu.
4. Karışım mikropipet yardımıyla karıştırıldıktan sonra kısa bir süre santrifüjlenerek tüm sıvı tüpün dibinde toplandı.
5. 96 kuyulu plakanın her bir kuyusuna 15 µl reaksiyon karışımı konuldu. Üzerine 5 µl kalıp DNA eklendi.

6. 96 kuyulu plakanın yüzeyi kaplama folyosuyla kaplandı.
7. 96 kuyulu plaka uygun rotora sahip santrifüjde kısa bir süre santrifüj edildi ve LightCycler 480 II cihazına yüklendi.

Tablo 3-4: CLU geni için kullanılan reaksiyon karı ımı

Reaksiyon Bile ni	Hacim
dH ₂ O	6.2 µl
Primer Prob Karı ımı	1.6 µl
FastStart DNA Master*	4.0 µl
MgCl ₂ (25 nM)	1.2 µl

MgCl₂ son konsantrasyonu 3 nM

*LightCycler® FastStart DNA Master HybProbe (Roche Diagnostics)

15.0 ~1

Tablo 3-5: ApoE geni için kullanılan reaksiyon karı ımı

Reaksiyon Bile ni	Hacim
dH ₂ O	6.2 µl
Mg ⁺² (25 mM)	1.6 µl
Primer Prob Karı ımı	4.0 µl
DMSO	1.2 µl
FastStart DNA Master**	2.0 µl

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

15.0 ~1

3.4.5. RT-PZR Döngü Programı

LightCycler 480 II cihazında yapılan RT-PZR'nun döngü programı CLU geni için *** Tablo 3-6'da, ApoE geni için Tablo 3-7'de gösterildiği gibi uygulandı.

Tablo 3-6: CLU geni için kullanılan RT-PZR programı

Program Adı:	Denatürasyon	Amplifikasyon			Erime			Soğuma
Parametre								
Analiz Modu	Yok	Kantifikasyon			Erime Eğrisi			Yok
Döngü Sayısı	1	45			1			1
Segment	1	1	2	3	1	2	3	1
Hedef Sıcaklık (°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/sn) 384	4.6	4.6	2.4	4.6	4.6	2.0	-	2.0
Yükselme Oranı(°C/sn) 96	4.4	4.4	2.2	4.4	4.4	1.5	-	1.5
Kazanım Modu	Yok	Yok	Tek	Yok	Yok	Yok	Devamlı	Yok
Kazanımlar (°C başına)							3	

*** Her üç reaksiyon için de aynı program kullanılmıştır.

Tablo 3-7: ApoE geni için kullanılan RT-PZR programı

Program Adı:	Denatürasyon	Amplifikasyon			Erime			Soğuma
Parametre								
Analiz Modu	Yok	Kantifikasyon			Erime Eğrisi			Yok
Döngü Sayısı	1	45			1			1
Hedef Sıcaklık [°C]	95	95	60	72	95	40	85	40
Bekleme Süresi (ss:dd:ss)	00:10:00	00:00:05	00:00:10	00:00:15	00:00:30	00:02:00	00:00:00	00:00:30
Yükselme oranı [°C/s] 96	4.4	4.4	2.2	4.4	4.4	1.5	-	1.5
Yükselme oranı [°C/s] 384	4.6	4.6	2.4	4.6	4.6	2.0	-	2.0
Kazanım Modu	Yok	Yok	Tek	Yok	Yok	Yok	Devamlı	Yok
Kazanımlar [°C başına]	-	-	-	-	-	-	3	-

3.5. Haplotip Analizi

Haplotip Analizi, bir genin çeşitli varyantlarının ilgili kromozom üzerinde birlikte kalıtılma olasılığını gösteren bir yöntemdir. Haplotip analizi ile homolog kromozomların mayoz sırasındaki olası parça değişim noktaları (crossing-over bölgeleri) saptanmaktadır. Analiz, polimorfizm olduğu bilinen bölgelerin kromozom üzerinde buldukları yere göre yapılmaktadır. Çalışmamızda kullanılan her bir bölgenin kromozom üzerindeki konumu Tablo 3-8'de gösterilmiştir.

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

SNP Nosu	Kromozom	Kromozom Konumu
rs2279590	8	27456253
rs11136000	8	27464519
rs9331888	8	27468862

3.6. istatistiksel De erlendirme:

statistiksel de erlendirmeler, SPSS 17.0[®] istatistik yazılım programı kullanılarak yapıldı. CLU genine ait rs11136000, rs2279590 ve rs9331888 bölgelerinde görülen tek nükleotid polimorfizmleri ile ApoE genotipleri ve allellerinin gruplara göre da ılımlarının analizleri için kıkare (χ^2) yöntemi kullanıldı. De erler ortalama \pm standart sapma (SS) olarak verildi. $p < 0,05$ olan de erler anlamlı olarak de erlendirildi. Çalışma mada incelenen CLU genine ait polimorfik bölgelerin genotipleri üç grup halinde sınıflandırılırken, ApoE genine ait genotipler altı grup halinde sınıflandırıldı. Genotiplere, Hardy – Weinberg E itli i (HWE) kullanılarak test yapıldı. CLU genine ait SNP bölgeleri kendi arasında analiz edildikten sonra bu bölgeler ile ApoE genotipleri karşılaştırıldı. Haplotip analizi, Haplowiew 4.2 yazılım programı kullanılarak ve her bir SNP'nin kromozomdaki konumuna ba lı olarak gerçekleştirildi. Çalışmamızda, CLU genine ait kromozom üzerindeki yerlerine göre sırasıyla rs2279590, rs11136000 ve rs9331888 polimorfizmlerinin birlikte analizi yapıldıktan sonra istatistiksel olarak de erlendirildi.

4. BULGULAR

Çalı mada 183 geç ba langıçlı Alzheimer hastasının ve herhangi bir nörodejeneratif hastalı ı bulunmayan ve ya bakımından hasta grubuyla uygunluk gösteren 154 sa lıklı bireyin CLU geni rs11136000, rs9331888 ve rs2279590 tek nükleotid polimorfizmleri ile AH arasındaki ili kiyi ara tırdık. Ayrıca ApoE genotipleri belirlenerek söz konusu CLU polimorfizmleri ile ili kisini de inceledik.

4.1. DNA zolasyonu Sonuçları

DNA izolasyonu QIAamp DNA Mini Kit ile yapılan örneklerin 260nm/280nm dalga boylarındaki OD de erlerinin 1.8 ± 0.1 arasında oldu u, DNA konsantrasyonlarının ise 50-100 ng/μl oldu u saptandı.

4.2. CLU Genotipleme Sonuçları

Hasta ve kontrol grubuna ait genomik DNA örneklerinden CLU geninin rs11136000, rs9331888 ve rs2279590 bölgelerine özgü probalar kullanılarak RT-PZR metodu ile erime noktaları hesaplanarak genotipleri tespit edildi.

Hasta ve Kontrol Gruplarında CLU geninin rs11136000 Bölgesi Genotip ve Allel Da ılımı

Alzheimer hastalarında CLU geninin rs11136000 bölgesine ait genotip da ılımı; 183 hastanın 80'inde CC (%43,7), 79'unda CT (%43,2) ve 24'ünde TT (%13,1) olarak belirlendi. 154 bireyden olu an kontrol grubunun ise 66'sının CC (%42,9), 63'ünün CT (%40,9) ve 25'inin CC (%16,2) genotipine sahip oldu u belirlendi (Tablo 4-1).

rs11136000 için allel sıklı ı kar ıla tırıldı nda, Alzheimer hasta grubunda C alleli frekansının %65,3; T alleli frekansının ise %34,7 oldu u; kontrol grubunda ise sırasıyla C allelinin %63,3; T allelinin %36,7 olarak görüldü ü belirlendi (Tablo 4-2).

Ancak hasta ve kontrol grupları arasında genotip da ılımları (ekil 4-1) (Tablo 4-1, p= 0,714) veya allel da ılımları (ekil 4-2) (Tablo 4-2, p= 0,591) açısından anlamlı bir fark bulunmadı.

Tablo 4-1: Hasta ve kontrol gruplarında CLU geninin rs11136000 bölgesi genotip dağılımı

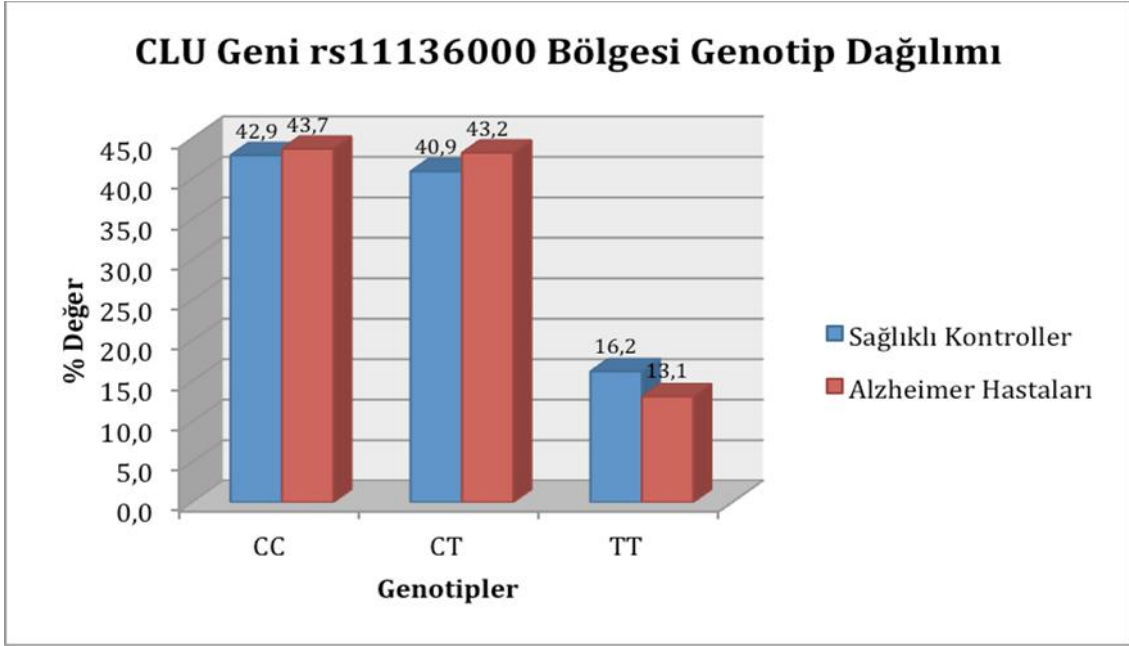
Gruplar	rs11136000 Genotipleri, n (%)		
	CC	CT	TT
Sa ğlıklı Kontroller (n=154)	66 (%42,9)	63 (%40,9)	25 (%16,2)
Alzheimer Hastaları (n=183)	80 (%43,7)	79 (%43,2)	24 (%13,1)
Toplam (n=337)	146 (%43,3)	142 (%42,1)	49 (%14,5)

$$t^2 = 0,675, p = 0,714$$

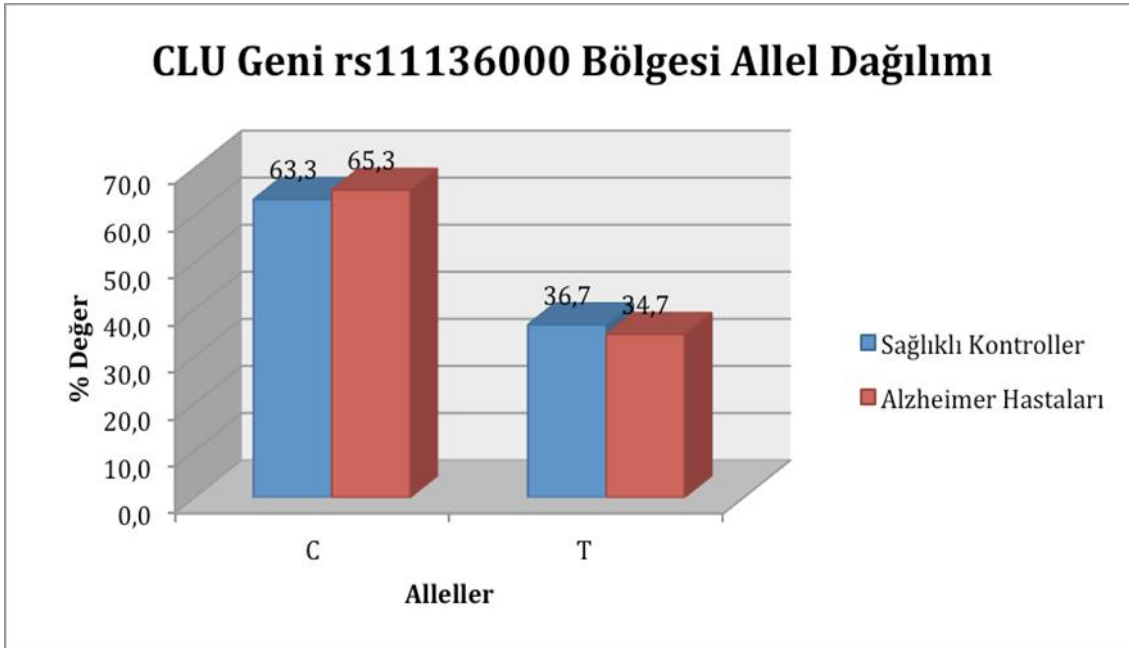
Tablo 4-2: Hasta ve kontrol gruplarında CLU geninin rs11136000 bölgesi allel dağılımı

Gruplar	rs11136000 Allelleri, n (%)	
	C	T
Sa ğlıklı Kontroller (n=154)	195 (%63,3)	113 (%36,7)
Alzheimer Hastaları (n=183)	239 (%65,3)	127 (%34,7)

$$t^2 = 0,289; p = 0,591$$



ekil 4-1: Hasta ve kontrol gruplarında CLU geninin rs11136000 bölgesi genotip dağılımı



ekil 4-2: Hasta ve kontrol gruplarında CLU geninin rs11136000 bölgesi C ve T allelleri dağılımı

Hasta ve Kontrol Gruplarında CLU geninin rs9331888 Bölgesi Genotip ve Allel Dağılımı

Alzheimer hastalarında CLU geninin rs9331888 bölgesine ait genotipler; 183 hastanın 90'ında GG (%49,2), 84'ünde GC (%45,9) ve 9'unda CC (%4,9) olarak belirlendi. 154 bireyden oluşan kontrol grubunun ise 69'unun GG (%44,8), 64'ünün GC (%41,6) ve 21'inin CC (%13,6) genotipine sahip olduğu saptandı (Tablo 4-3).

rs9331888 bölgesi için allel sıklığı karşılaştırıldığında, Alzheimer hasta grubunda G alleli frekansının %72,1; C alleli frekansının ise %27,9 olduğu; kontrol grubunda ise sırasıyla G allelinin %65,6; C allelinin %34,4 olarak görüldüğü belirlendi (Tablo 4-4).

GG genotipinin hasta grubunda kontrollere kıyasla, CC genotipinin de kontrol grubunda hastalara kıyasla daha sık görüldüğü (Şekil 4-3) (Tablo 4-3, $p=0,020$), G allelinin hastalarda, C allelinin de kontrollerde daha sık görüldüğü saptandı (Şekil 4-4) (Tablo 4-4, $p=0,067$).

Tablo 4-3: Hasta ve kontrol gruplarında CLU geninin rs9331888 bölgesi genotip dağılımı

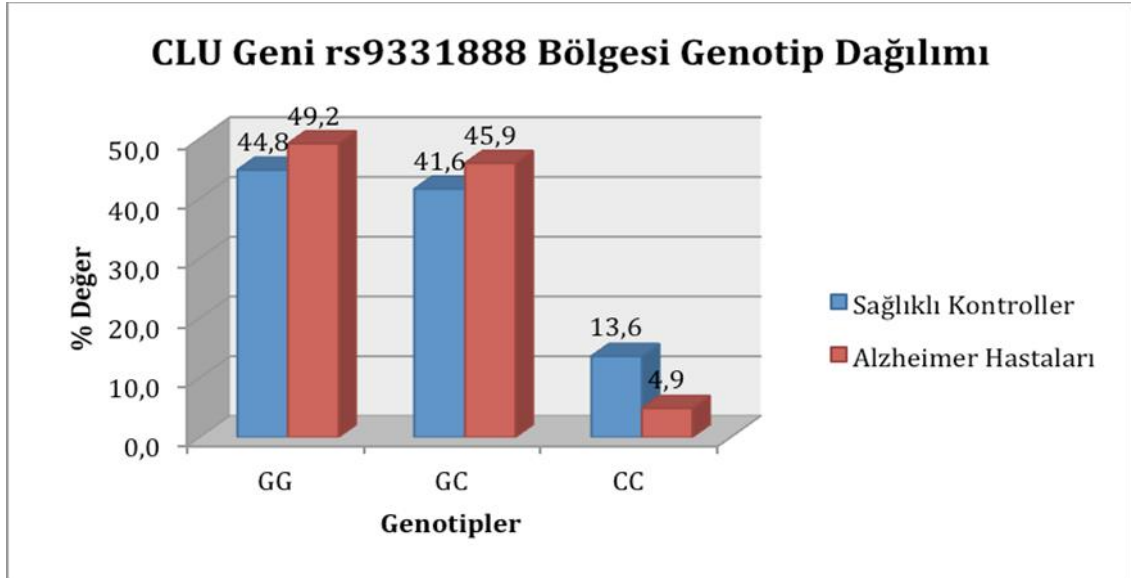
Gruplar	rs9331888 Genotipleri, n (%)		
	GG	GC	CC
Sağlıklı Kontroller (n=154)	66 (%44,8)	64 (%41,6)	21 (%13,6)
Alzheimer Hastaları (n=183)	90 (%49,2)	84 (%45,9)	9 (%4,9)
Toplam (n=337)	148 (%43,9)	148 (%43,9)	30 (%8,9)

$$t^2 = 7,839; p = 0,020$$

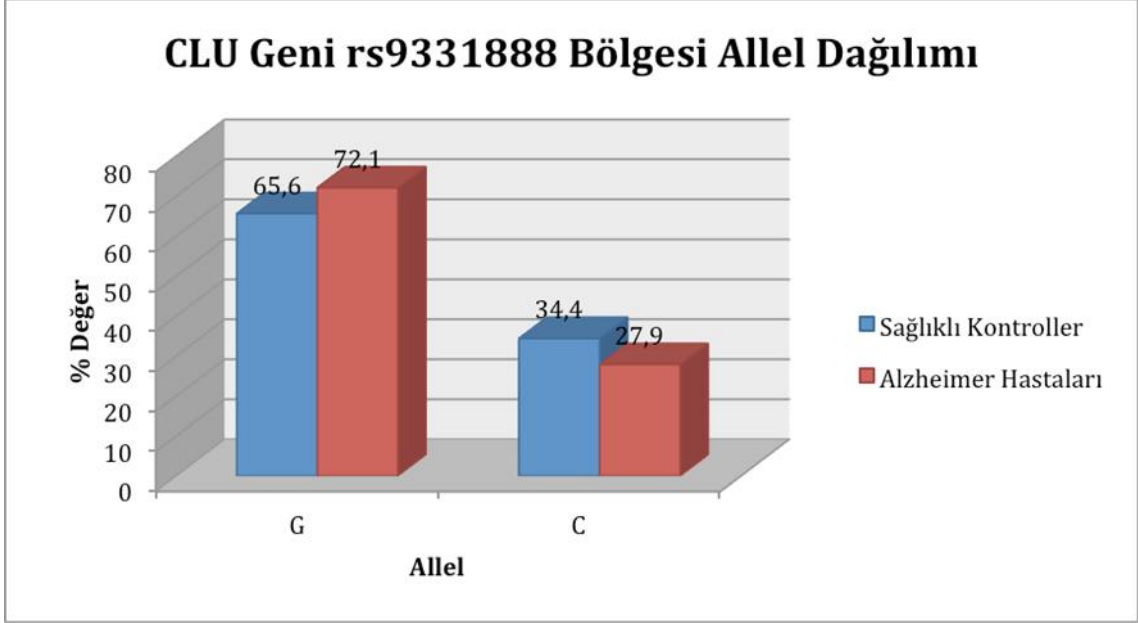
Tablo 4-4: Hasta ve kontrol gruplarında CLU geninin rs9331888 bölgesi allel dağılımı

Gruplar	rs9331888 Allelleri, n (%)	
	G	C
Sağlıklı Kontroller (n=154)	202 (%65,6)	106 (%34,4)
Alzheimer Hastaları (n=183)	264 (%72,1)	102 (%27,9)

$$t^2 = 3,360; p = 0,067$$



ekil 4-3: Hasta ve kontrol gruplarında CLU geninin rs9331888 bölgesi genotip dağılımı



ekil 4-4: Hasta ve kontrol gruplarında CLU geninin rs9331888 bölgesi G ve C allelleri dağılımı

Hasta ve Kontrol Gruplarında CLU Geninin rs2279590 Bölgesi Genotip ve Allel Dağılımı

Alzheimer hastalarında CLU geninin rs2279590 bölgesine ait genotipler; 183 hastanın 81'inde GG (%44,3), 79'unda GA (%43,2) ve 23'ünde AA (%12,6) olarak belirlendi. 154 bireyden oluşan kontrol grubunun 64'ünün GG (%43,5), 67'sinin GA (%43,5) ve 23'ünün AA (%14,9) genotipine sahip olduğu belirlendi (Tablo 4-5).

rs2279590 bölgesi için allel sıklığı karşılaştırıldığında, Alzheimer hasta grubunda G alleli frekansının %65,9; A alleli frekansının ise %34,1 olduğu; kontrol grubunda ise sırasıyla G allelinin %63,3; A allelinin %36,7 olarak görüldüğü belirlendi (Tablo 4-6).

Ancak hasta ve kontrol grupları arasında genotip dağılımları (ekil 4-5) (Tablo 4-5, $p=0,784$) veya allel dağılımları (ekil 4-6) (Tablo 4-6, $p=0,493$) açısından anlamlı bir fark bulunmadı.

Tablo 4-5: Hasta ve kontrol gruplarında CLU geninin rs2279590 bölgesi genotip dağılımı

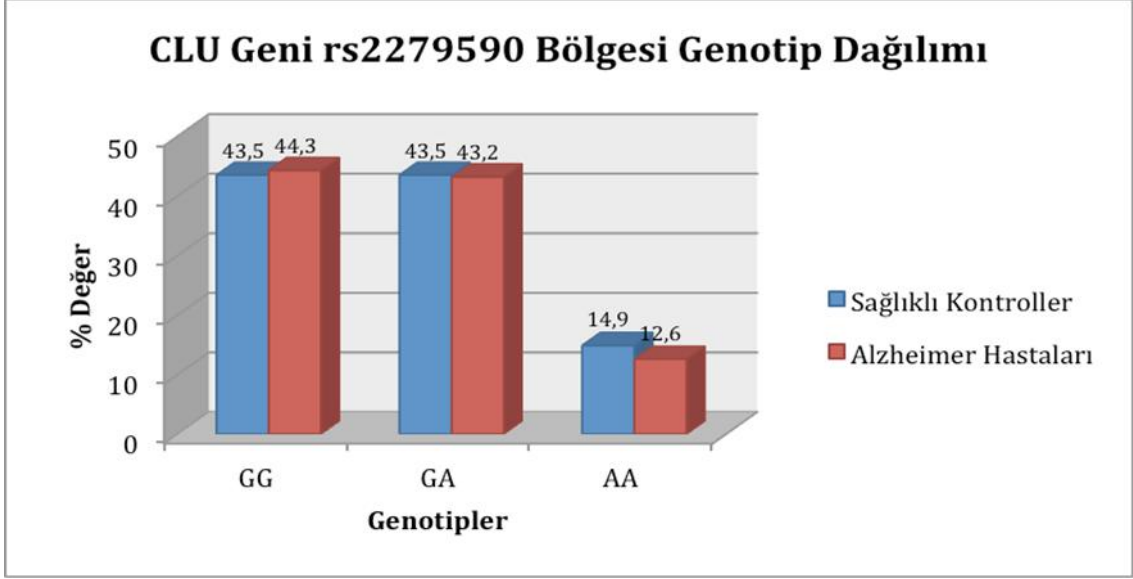
Gruplar	rs2279590 Genotipleri, n (%)		
	GG	GA	AA
Sa ğlıklı Kontroller (n=154)	64 (%43,5)	67 (%43,5)	23 (%14,9)
Alzheimer Hastaları (n=183)	81 (%44,3)	79 (%43,2)	23 (%12,6)
Toplam (n=337)	145 (%43,0)	146 (%43,3)	46 (%13,6)

$$t^2 = 0,487; p = 0,784$$

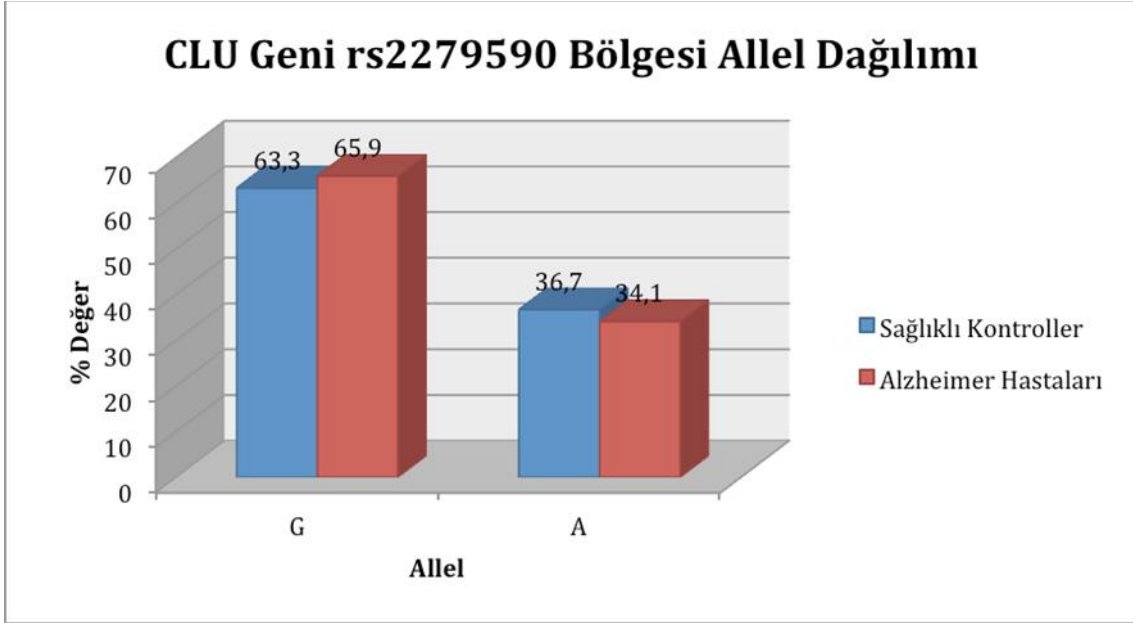
Tablo 4-6: Hasta ve kontrol gruplarında CLU geninin rs2279590 bölgesi allel dağılımı

Gruplar	rs2279590 Allelleri, n (%)	
	G	A
Sa ğlıklı Kontroller (n=154)	195 (%63,3)	113 (%36,7)
Alzheimer Hastaları (n=183)	241 (%65,9)	125 (%34,1)

$$t^2 = 0,471; p = 0,493$$



ekil 4-5: Hasta ve kontrol gruplarında CLU geninin rs2279590 bölgesi genotip dağılımı



ekil 4-6: Hasta ve kontrol gruplarında CLU geninin rs2279590 bölgesi G ve A allelleri dağılımı

4.3. ApoE Genotipleme Sonuçları

Hasta ve kontrol gruplarında ApoE genotipi analizleri ϵ_2 , ϵ_3 , ϵ_4 allellerinin saptanmasına olanak sağlayan probler kullanılarak ve RT-PZR metodu ile erime noktaları hesaplanarak yapıldı.

Alzheimer hastalarında ApoE genotip dağılımları; 183 hastada ϵ_2/ϵ_2 görülmedi (%0,0), ϵ_2/ϵ_3 9 bireyde (%4,9), ϵ_2/ϵ_4 görülmedi (%0,0), ϵ_3/ϵ_3 119 bireyde (%65,0), ϵ_3/ϵ_4 47 bireyde (%25,7), ϵ_4/ϵ_4 8 bireyde (%4,4) olarak belirlendi. 154 bireyden oluşan kontrol grubunun ise; 3'ünde ϵ_2/ϵ_2 (%1,9), 12'sinde ϵ_2/ϵ_3 (%7,8), 3'ünde ϵ_2/ϵ_4 (%1,9), 113'ünde ϵ_3/ϵ_3 (%73,4), 19'unda ϵ_3/ϵ_4 (%12,3), 4'ünde ϵ_4/ϵ_4 (%2,6) olarak tespit edildi (Tablo 4-7) (ekil 4-7).

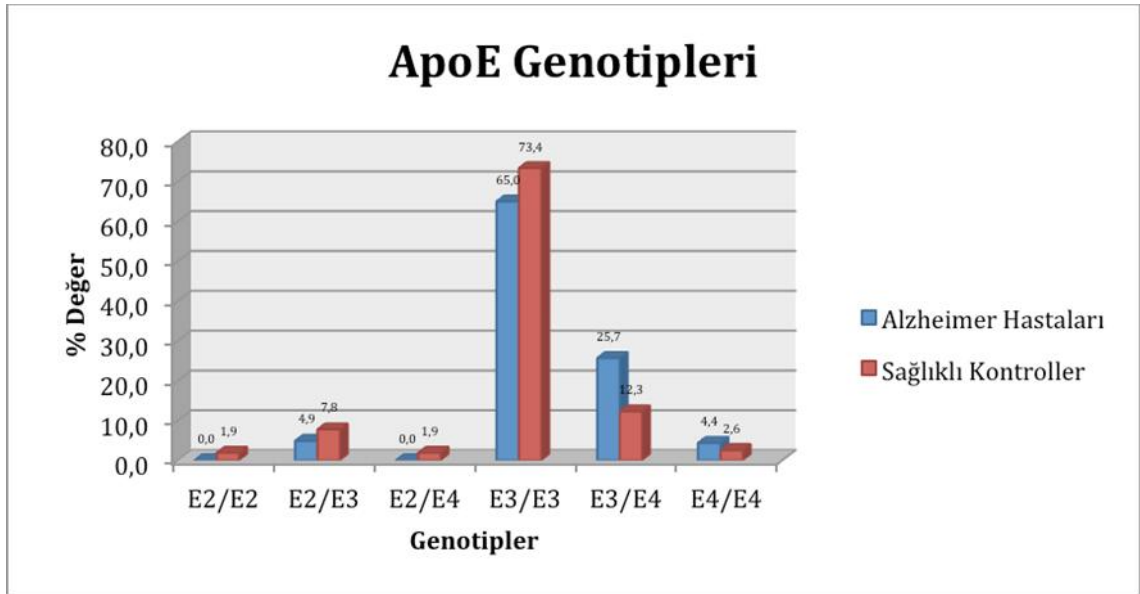
4 genotip grubunda beklenen değerlerin 5 bireyden az olması sebebiyle istatistiksel değerlendirme ϵ_4 alleli taşımayanlar (ϵ_2/ϵ_2 , ϵ_2/ϵ_3 , ϵ_3/ϵ_3) ile en az 1 ϵ_4 alleli taşıyanları (ϵ_2/ϵ_4 , ϵ_3/ϵ_4 , ϵ_4/ϵ_4) karşılaştırılarak tekrarlandı. Buna göre 183 Alzheimer hastasında ϵ_4 alleli taşımayanların ve taşıyanların dağılımı sırasıyla 128 (%69,9) ve 55 (%30,1) iken bu oranların kontrol grubunda sırasıyla 128 (%83,1) ve 26 (%16,9) olduğu belirlendi (Tablo 4-8, p= 0,005) (ekil 4-8).

ApoE için allel sıklığı karşılaştırıldığında, Alzheimer hasta grubunda ϵ_2 alleli frekansının %2,5, ϵ_3 alleli frekansının %80,3, ϵ_4 alleli frekansının ise %17,2 olduğu; kontrol grubunda ise sırasıyla ϵ_2 allelinin %6,8, ϵ_3 allelinin %83,3, ϵ_4 allelinin ise %9,7 olarak görüldüğü belirlendi. Buna göre ϵ_4 alleli Alzheimer hasta grubunda kontrol grubuna kıyasla anlamlı derecede artmış sıklıkta görülmekte ($t^2= 7,946$; p<0,005) ve hastalık riskini 2,1 kat kadar arttırmaktadır (OR= 2,115; %95CI 1,249-3,583) (Tablo 4-9) (ekil 4-9).

Tablo 4-7: Hasta ve kontrol gruplarında ApoE genotip dağılımı

Gruplar	ApoE Genotipleri, n (%)					
	$\epsilon 2/\epsilon 2$	$\epsilon 2/\epsilon 3$	$\epsilon 2/\epsilon 4$	$\epsilon 3/\epsilon 3$	$\epsilon 3/\epsilon 4$	$\epsilon 4/\epsilon 4$
Sağlıklı Kontroller (n=154)	3 (%1,9)	12 (%7,8)	3 (%1,9)	113 (%73,4)	19 (%12,3)	4 (%2,6)
Alzheimer Hastaları (n=183)	0 (%0,0)	9 (%4,9)	0 (%0,0)	119 (%65,0)	47 (%25,7)	8 (%4,4)
Toplam (n=337)	3 (%0,9)	21 (%6,2)	3 (%0,9)	232 (%68,8)	66 (%19,6)	12 (%3,6)

$$t^2 = 17,429; p = 0,004$$



ekil 4-7: Hasta ve kontrol gruplarında ApoE genotip dağılımı

Tablo 4-8: Hasta ve kontrol gruplarında ApoE v4 alleli taşımayanlar ve taşıyanlara göre genotip dağılımı

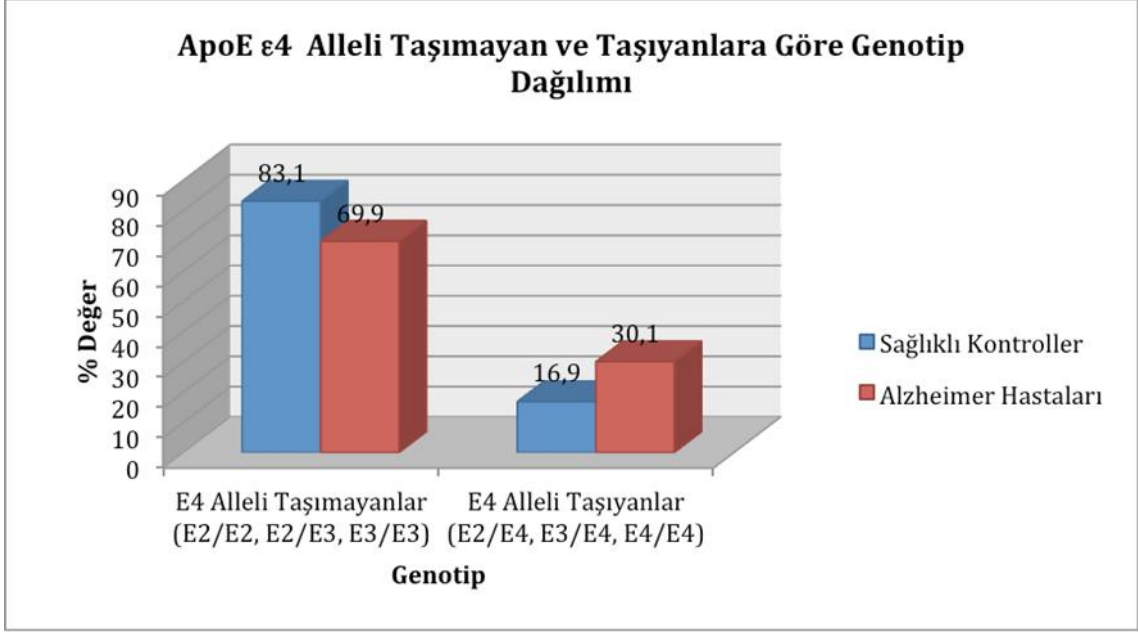
Gruplar	ApoE Genotipleri	
	v4 Alleli Taşımayanlar (v2/v2, v2/v3, v3/v3)	v4 Alleli Taşıyanlar (v2/v4, v3/v4, v4/v4)
Sağlıklı Kontroller (n=154)	128 (%83,1)	26 (%16,9)
Alzheimer Hastaları (n=183)	128 (%69,9)	55 (%30,1)
Toplam (n=337)	256 (%76,0)	81 (%24,0)

$$t^2 = 7,946; p = 0,005$$

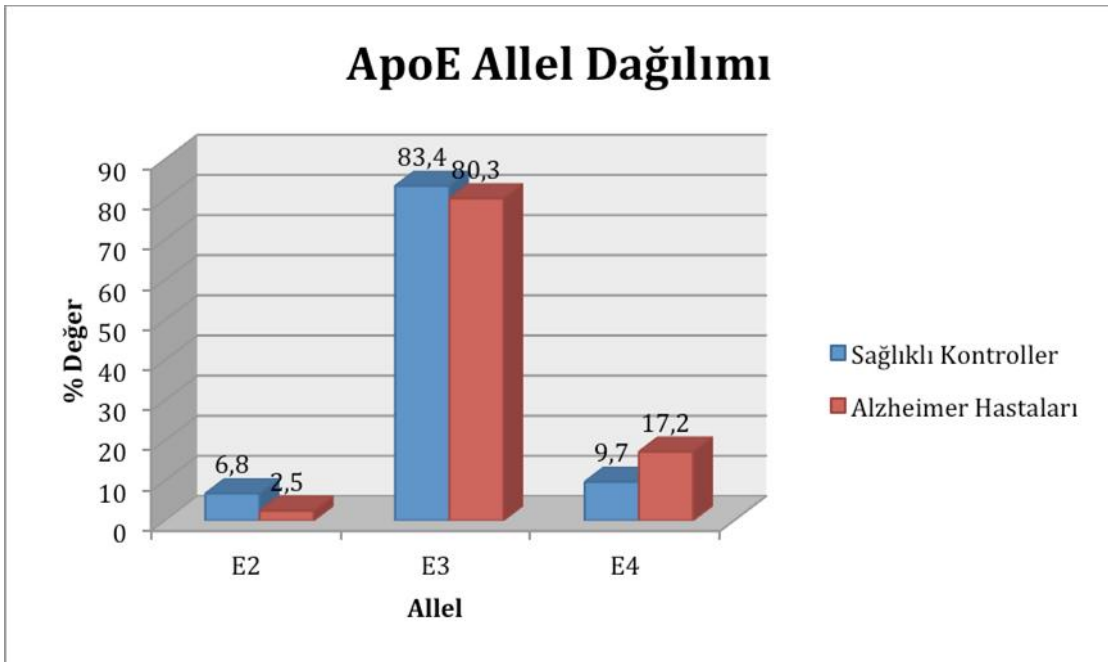
Tablo 4-9: Hasta ve kontrol gruplarında ApoE v2, v3 ve v4 allelleri dağılımı

Gruplar	ApoE Allelleri		
	v2	v3	v4
Sağlıklı Kontroller (n=154)	21 (%6,8)	257 (%83,4)	30 (%9,7)
Alzheimer Hastaları (n=183)	9 (%2,5)	294 (%80,3)	63 (%17,2)

$$t^2 = 14,108; p = 0,001; \%95CI 1,249-3,583; OR = 2,115$$



ekil 4-8: Hasta ve kontrol gruplarında ϵ 4 alleli taşımayan ve taşıyanlara göre ApoE genotip dağılımı



ekil 4-9: Hasta ve kontrol gruplarında ApoE ϵ 2, ϵ 3 ve ϵ 4 allelleri dağılımı

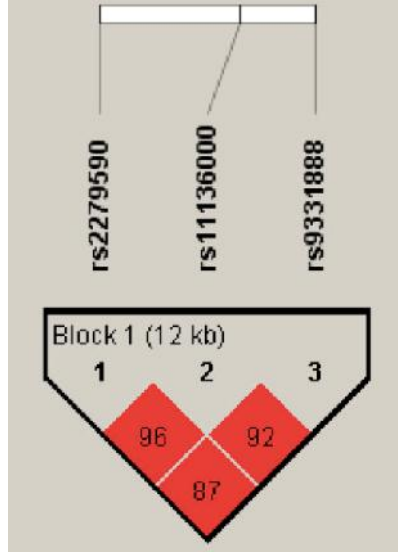
ApoE $\epsilon 4$ alleli ta ımayan ve $\epsilon 4$ alleli ta ıyan hasta ve kontroller ile CLU geni rs9331888 bölgesi genotipleri açısından kar ıla tırıldı ında, $\epsilon 4$ alleli ta ımayan hastalarda G allelinin daha sık görüldü ü (p=0,023), $\epsilon 4$ alleli ta ıyan hasta ve kontroller arasında ise söz konusu CLU genotipleri açısından anlamlı bir farklılık olmadı ı saptandı (p=0,723) (Tablo 4-10).

Tablo 4-10: ApoE v4 alleli ta ımayanlar ve ta ıyanlar ile rs9331888 bölgesi genotiplerinin hasta ve kontrollerde kar ıla tırılması

Gruplar	rs9331888 Genotipi	Kontrol	Hasta	P De eri
v4 Alleli Ta ımayanlar, n (%)	GG	54 (%42,2)	62 (%48,4)	0,023
	GC	55 (%43,0)	60 (%46,9)	
	CC	19 (%14,8)	6 (%4,7)	
v4 Alleli Ta ıyanlar, n (%)	GG	15 (%57,7)	28 (%50,9)	0,723
	GC	9 (%34,6)	24 (43,6)	
	CC	2 (%7,7)	3 (%5,5)	

4.4. Haplotip Analizi Sonuçları

Hasta ve kontrol gruplarında CLU genine ait çalı tı ımız SNP'ler, haplotip sıklı ını belirlemek üzere analizi edildi. 3 SNP'ye ait Ba lantı E itsizli i Analizi sonuçları ekil 4-10'da gösterilmi tir. Kromozom üzerinde sırasıyla rs2279590, rs11136000 ve rs9331888 polimorfizmlerinin birlikte analizi sonucu "GCG" haplotipini ta ıyan hastaların aynı haplotipi ta ıyan sa lıklı bireylere göre istatistiksel olarak anlamlı derecede daha fazla oldu u bulundu (Tablo 4-11) (p=0,0328).



ekil 4-10: CLU geninde ara tırnı oldu umuz SNP'ler (sırasıyla rs2279590, rs11136000 ve rs9331888 bölgeleri) için Ba lantı E itsizli i Analizi

Tablo 4-11: Hasta ve kontrollerde CLU geninde ara tırnı oldu umuz SNP'lerin (sırasıyla rs2279590, rs11136000 ve rs9331888 bölgelerinin) haplotip analizi

Haplotip	Hasta	Kontrol	t^2	p De eri
GCG	0,380	0,301	4,554	0,0328
ATG	0,330	0,345	0,149	0,6994
GCC	0,268	0,322	2,377	0,1231
GTG	0,011	0,010	0,023	0,8798

5. TARTI MA

lerleyici ve geridönü ümsüz bir nörodejeneratif hastalık olan Alzheimer hastalığının (AH) genetik kökenini ara tırmak üzere çok sayıda ara tırma yapılmı tır. AH'nin en yaygın görülen tipi olan geç ba langıçlı Alzheimer Hastalığı (GBAH) için bugüne kadar yalnızca Apolipoprotein E (ApoE) geni $\epsilon 4$ allelinin bir risk faktörü oldu u saptanmı tır (Hardy 2006; Bertram ve ark. 2010; Zetsche ve ark. 2010; Lambert ve Amouyel 2011; Tanzi 2012; Bettens ve ark. 2013; Reitz ve Mayeux 2014)

ApoE geni haricinde GBAH ile ili kili olabilecek di er risk genlerinin belirlenebilmesi için yo un ara tırmalar yapılmaktadır. Bu yo un ara tırmalar sonucunda bugüne kadar çok sayıda aday gen belirlenmi tir (Grupe ve ark. 2007; Li ve ark. 2008; Feulner ve ark. 2010; Lambert ve Amouyel 2011). Bu aday genler arasında ön sıralarda yer alan clusterin (CLU) geni ve GBAH arasındaki ili kiyi aydınlatmak üzere çe itli çalı malar yapılmı tır. Bu çalı malar sonucunda, CLU geninde görülen bazı SNP'lerin GBAH ile ili kisi oldu u belirtilmi tir (Zetsche ve ark. 2010; Tanzi 2012; Bettens ve ark. 2013). Ancak CLU polimorfizmleri ve GBAH arasındaki ili ki ile ilgili çeli kili sonuçlar da mevcuttur. Biz de bu çalı mada, CLU genine ait rs11136000, rs2279590 ve rs9331888 bölgelerinde görülen tek nükleotid polimorfizmlerinin (SNP) GBAH ile ili kisini ara tırdık.

Harold ve ark. 2009 yılında Amerika ve Avrupa'dan katılan çok sayıdaki hasta ve sa lıklı kontrolden elde edilen örnekler ile gerçekle tirdikleri genom çapında ili ki taraması ile (GWAS) ilk kez CLU polimorfizmleri ile GBAH arasında bir ili ki oldu unu göstermi tir. Bu çalı ma, Amerika ve Avrupa'dan 5,964 hasta ile 10,188 sa lıklı bireyin katılımı ile imdiye kadar GBAH üzerine gerçekle tirilmi olan en geni çaplı genetik çalı ma olmu tur. Çalı ma sonucunda, CLU geni rs11136000 polimorfizminin GBAH ile ili kili oldu u gösterilmi tir (Harold ve ark. 2009). Aynı yıl Fransa, Belçika, Finlandiya, talya ve spanya'dan katılan 5,828 hasta ve 8,425 sa lıklı kontrolden elde edilen örnekler ile GBAH üzerine gerçekle tirilen ikinci büyük GWA çalı ması ile CLU geni rs11136000, rs9331888 ve rs2279590 polimorfizmleri ile GBAH arasında anlamlı bir ili ki oldu u bildirilmi tir (Lambert ve ark. 2009). rs11136000 polimorfizmi ile GBAH ili kisi, daha sonra yapılan ba ka bir GWA çalı ması ile de onaylanmı tır (Seshadri ve ark. 2010). Ayrıca, 2014 yılında Asya ve

Avrupa kökenli bireyler üzerinde yapılan geni çaplı bir meta-analiz çalışmasında CLU geni rs2279590 polimorfizmi ve GBAH ile kisi desteklenmiştir (Zhang ve ark. 2014).

Söz konusu çalışmalar ve CLU ile ilgili diğer bazı bulgular, CLU'nun hastalığa katılan güçlü bir aday gen olduğunu ifade etmektedir. Ancak, diğer bir takım çalışmalarda CLU polimorfizmleri ile AH riski arasında ilişki bulunamamıştır (Golenkina ve ark. 2010; Guerreiro ve ark. 2010; Gu ve ark. 2011; Klimkowicz-Mrowiec ve ark. 2013).

Özellikle Asya toplumlarında (Çin, Japon, Kore) yapılan çalışmalarda CLU geni rs11136000, rs2279590 ve rs9331888 polimorfizmleri ile AH arasında ilişki açısından farklı çalışmalarda çelişkili sonuçlar bildirilmiştir (Yu ve ark. 2010; Komatsu ve ark. 2011; Chen ve ark. 2012; Ma ve ark. 2011; Lu ve ark. 2014).

CLU geni varyantlarının görülme sıklıkları genetik olarak farklı ırk/etnik gruplarda farklı olduğu için CLU geninin AH üzerindeki potansiyel etkisini göstermek üzere farklı toplumlarda yapılacak çalışmalar önem taşımaktadır. Biz de bu çalışmamızda, CLU geni rs 11136000, rs2279590 ve rs9331888 bölgelerinde görülen SNP'ler ile GBAH arasındaki ilişkiyi araştırdık.

Çalışmamızda, rs11136000 ve rs2279590 bölgelerine ait genotip ve allel dağılımları açısından hasta ve kontrol grupları arasında anlamlı bir fark bulunmadı. rs9331888 genotip dağılımı açısından ise GG genotipinin hasta grubunda kontrollere kıyasla, CC genotipinin de kontrol grubunda hastalara kıyasla istatistiksel olarak anlamlı düzeyde daha sık bulunduğu, allel dağılımı açısından ise G allelinin hastalarda, C allelinin de kontrollerde istatistiksel olarak yakın anlamlı şekilde daha sık görüldüğü saptandı. rs11136000 polimorfizmi ile ilgili söz konusu bulgularımız; Rusya, Polonya ve Çin-Hun popülasyonlarında gerçekleştirilmiş olan çalışmaları ile benzerlik göstermiştir (Golenkina ve ark. 2010; Yu ve ark. 2010; Ma ve ark. 2011; Klimkowicz-Mrowiec ve ark. 2013; Lu ve ark. 2014). Ancak, GWA çalışmaları ve Güney Çin toplumunda yapılmış olan bir çalışmaları ile uyumlu değildir (Harold ve ark. 2009; Lambert ve ark. 2009; Chen ve ark. 2012). rs2279590 polimorfizmi ile GBAH arasında bir ilişki bulunmadığı eklindeki sonuçlarımız; Çin'in Kuzey Hun ve Güney Hun toplumlarında yapılan bazı çalışmalar ile uyumludur (Yu ve ark. 2010; Lu ve ark. 2014). Ancak, Lambert ve ark.'nın GWA çalışması ve Zhang ve ark.'nın meta-analiz çalışması ile farklılık göstermektedir (Lambert ve ark. 2009; Zhang ve ark. 2014).

rs9331888 polimorfizmi ile GBAH arasındaki ili kiyi gösteren bu bulgularımız; Yu ve ark.'nın Kuzey Hun toplumunda rs9331888 bölgesi G allelinin hastalı a yatkınlı ı arttırdı ını bildiren sonuçları ile uyumludur (Yu ve ark. 2010).

CLU geni polimorfizmleri üzerinde yapılmı olan bazı çalı malarda genotip ve allel da ılımları bakımından hasta ve kontrol grupları arasında anlamlı bir farklılık bulunamazken, bazı h aplo tiplerin hastalı a yatkınlı ı arttırdı ı gösterilmi tir. Biz de çalı mamızda, CLU genine ait rs2279590, rs11136000 ve rs9331888 bölgelerinde görülen SNP'lerin haplotip analizini gerçekle tirdik. "GCG" haplotipinin Alzheimer hastalarında sa lıklı kontrollere göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde daha fazla bulundu unu gösterdik. Yu ve ark. ise aynı SNP'ler ile yaptıkları haplotip analizi sonucunda "CGC" haplotipinin hastalık riskini arttırdı ını göstermi tir (Yu ve ark. 2010).

ApoE ϵ 4 alleli, GBAH için imdiye kadar bildirilmi olan tek risk faktörüdür. Çalı mamızda, ϵ 4 allelinin Alzheimer hastalarında, ϵ 2 allelinin ise sa lıklı kontrollerde anlamlı derecede fazla oldu unu ve ϵ 4 allelinin hastalık için risk faktörünü 2,1 kat arttırdı ını gösterdik. Çalı mamızda ayrıca, ApoE genotipleri ϵ 4 allelini ta ıyan ve ta ımayanlar olmak üzere gruplandırıldı ında ϵ 4 alleli içermeyen genotiplerin sa lıklı kontrollerde, ϵ 4 alleli içeren genotiplerin ise Alzheimer hastalarında istatistiksel olarak anlamlı derecede daha fazla görüldü ünü bulduk. ϵ 4 allelini içeren genotiplerin; kontrollerde %16,9, Alzheimer hastalarında ise %30,1 oranında bulundu unu gösterdik. Bu bulgularımız, çe itli toplumlarda Alzheimer hastaları ve sa lıklı bireylerde ϵ 4 allelinin görülme sıklı ı üzerine gerçekle tirilmi olan meta-analiz sonuçları ile kar ıla tırıldı ında; bu da ılımın Asya toplumlarına daha yakın oldu unu gözlendi (Wand ve ark.2012).

Ayrıca çalı mamızda, GBAH ile ili kili oldu unu göstermi oldu umuz CLU geni rs9331888 genotipleri ile ApoE ϵ 4 alleli ta ıyan ve ta ımayan hasta ve kontrol örnekleri kar ıla tırıldı. Bunun sonucunda, G allelinin ϵ 4 alleli ta ımayan hastalarda istatistiksel olarak anlamlı düzeyde daha sık görüldü ü saptandı. ϵ 4 alleli ta ıyan hasta ve kontroller arasında ise istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık olmadı ı görüldü. Bu sonuçlarımız, Yu ve ark.'nın Çin Kuzey Hun toplumunda gerçekle tirmi oldu u

çalı mada aynı SNP allelinin ApoE ε4 ta ımayan hastalarda daha sık bulundu unu gösteren sonuçları ile benzerlik göstermektedir (Yu ve ark. 2010).

Her ne kadar yapılan genetik çalı malar CLU geni varyantları ile GBAH arasında bir ili ki oldu una i aret etse de, CLU geni varyantlarının hastalık olu umunu nasıl etkiledi i halen kesin olarak bilinmemektedir. Ancak clusterin'in çe itli çalı malarla ortaya konan biyolojik özellikleri, onun AH patolojisi üzerinde koruyucu etkileri olabilece ini göstermektedir.

ApoJ olarak da adlandırılan clusterin, beyinde daha fazla olmak üzere neredeyse tüm memeli dokularında üretilen bir apolipoproteindir. Clusterin'in AH patolojisi ile ili kili olabilecek çe itli özelliklere sahip oldu u gösterilmi tir. AH'da ekstraselüler amiloid plakları ve nörofibril yumakları ile birlikte yer aldı ı gösterilen clusterin'in, esnek yapısı sayesinde AH patolojisine katılan Aβ peptidine ba lanabildi i, böylece amiloid plak olu umu ve Aβ'nın nöronlar üzerindeki toksik etkileri üzerinde önleyici bir rol oynadı ı *in vitro* ve *in vivo* çalı malar ile gösterilmi tir (Nuutinen ve ark. 2009; Yerbury ve ark. 2010; Charnay ve ark. 2012; Yu ve Tan 2012). Transgenik AH modelleri, ApoE ve clusterin'in Aβ temizlenmesine aracılık etti ini göstermi tir. Bu apolipoproteinlerin seviyesinde meydana gelen bir azalmanın, hem amiloid plaklarda hem de BOS'ta Aβ birikiminin artmasına yol açtı ı bildirilmi tir (Cole ve Ard 2000; DeMattos ve ark. 2004; Nilselid ve ark. 2006). Clusterin ayrıca, ApoE ile birlikte lipid transportuna katılır (de Silva ve ark. 1990), nöron apoptozunu önler (Zhang ve ark. 2005) ve nöron koruyucu TGF-β sinyalini güçlendirir (Nuutinen ve ark. 2009). Yapılan çalı malarda clusterin proteininin, Alzheimer hastalarının beyin-omurilik sıvısında (BOS) önemli derecede arttı nı gösterilmi tir (Nilselid ve ark. 2006; Sihlbom ve ark. 2008).

Türk toplumunda yapılmı olan çalı mamızda, CLU geni rs9331888 bölgesi G allelinin hastalık riskini arttı rdı ı, C allelinin ise koruyucu özelli i oldu u saptanmı tir. Ayrıca sonuçlarımız; sırasıyla rs2279590, rs11136000 ve rs9331888 bölgeleri için "GCG" haplotipininin Alzheimer hastalı ı riskini arttırabilece ini göstermi tir. CLU geni rs9331888 G allelinin ApoE ε4 alleli ta ımayan hasta grubunda kontrollere kıyasla anlamlı düzeyde daha fazla görülmesi, CLU geninin ApoE geninden ba ımsız olarak hastalık geli iminde rolü olabilece ini veya hastalı a yatkınlık sa layabilece ine i aret etmektedir.

Çalı mamız, Türk toplumunda CLU geni polimorfizmleri ile GBAH arasındaki ili kiyi ara tıran ilk çalı ma olmakla birlikte, çalı mamızda de erlendirilen hasta ve kontrollere ait örnek sayısının kısıtlı olu u nedeniyle örnek sayısının arttırılmasıyla yapılacak olan çalı malar CLU geni polimorfizmleri ile GBAH arasındaki ili kiyi aydınlatmada yararlı olacaktır. CLU polimorfizmleri ve GBAH arasındaki biyolojik ili kiyi belirlemek üzere bundan sonra yapılacak deneysel çalı malara gerek vardır.

KAYNAKLAR

Ahuja, H.S., Tenniswood, M., Lockshin, R. ve Zakeri, Z.F. (1994). Expression of clusterin in cell differentiation and cell death. *Biochemistry and Cell Biology*, **72**(11-12), 523-530.

Alonso Vilatela, M.E., López-López, M. ve Yescas-Gómez, P. (2012). Genetics of Alzheimer's Disease. *Archives of Medical Research*, **43**(8), 622-631.

Alzheimer's Association. (2013). Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimer's & Dementia*, **9**(2), 208-245.

Golenkina, S.A., Gol'tsov, Alu, Kuznetsova, I.L., Grigorenko, A.P., Andreeva, T.V., Reshetnov, D.A. ve ark. (2010). Analysis of clusterin gene (CLU/APOJ) polymorphisms in Alzheimer's disease patients and in normal cohorts from Russian populations. *Molecular Biology (Mosk)*, **44**(4), 620-626.

Araz, Ö.S. (2013). Alzheimer Hastalarında Vitamin D Eksikliği ile İlişkili Olan Polimorfizmlerin Araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Üniversitesi, 4-15.

Atasoy, .L. (2013). Tau Hiperfosforilasyonunun Beyin Kökenli Nörotrofik Faktör (BDNF) Üzerine Etkilerinin Araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Üniversitesi, 1-18.

Avramopoulos, D. (2009). Genetics of Alzheimer's disease: recent advances. *Genome Medicine*, **1**(3):34.

Bagyinszky, E., Youn, Y.C., An, S.S. ve Kim, S. (2014). The genetics of Alzheimer's disease. *Journal of Clinical Interventions in Aging*, **9**, 535-551.

Bartl, M.M., Luckenbach, T., Bergner, O., Ulrich, O. ve Koch-Brandt, C. (2001). Multiple receptors mediate apoJ-dependent clearance of cellular debris into nonprofessional phagocytes. *Experimental Cell Research*, **271**(1), 130-141.

Blaschuk, O., Burdzy, K. ve Fritz, I.B. (1983). Purification and characterization of a cell-aggregating factor (clusterin), the major glycoprotein in ram rete testis fluid. *The Journal of Biological Chemistry*, **258**, 7714-7720.

Bekris, L.M., Yu, C.E., Bird, T.D. ve Tsuang, D.W. (2010). Genetics of Alzheimer's disease. *Journal of Geriatric Psychiatry and Neurology*, **23**(4), 213-227.

Bertram, L., Lill, C.M. ve Tanzi, R.E. (2010). The genetics of Alzheimer disease: back to the future. *Neuron*, **68**(2), 270-281.

Bettens, K., Sleegers, K. ve Van Broeckhoven (2013). Genetic insights in Alzheimer's disease. *The Lancet Neurology*, **12**, 92-104.

Bettuzzi, S., Astancolle, S., Guidetti, G., Moretti, M., Tiozzo, R. ve Corti, A. (1999). Clusterin (SGP-2) gene expression is cell cycle dependent in normal human dermal fibroblasts. *FEBS Letters*, **448**(2-3), 297-300.

Blaschuk, O., Burdzy, K. ve Fritz, I.B. (1983). Ram rete testis fluid contains a protein (clusterin) which influence cell-cell interactions in vitro. *The Journal of Biological Chemistry*, **258**(12), 7714-7720.

Blennow, K. de Leon, M.J. ve Zetterberg, H. (2006). Alzheimer's Disease. *The Lancet*, **368**(9533), 387-403.

Calero, M., Rostagno, A., Matsubara, E., Zlokovic, B., Frangione, B. ve Ghiso, J. (2000). Apolipoprotein J (Clusterin) and Alzheimer's Disease. *Microscopy Research and Technique*, **50**, 305-315.

Cárdenas, A.M., Ardiles, A.O., Barraza, N., Baéz-Matus, X. ve Caviedes, P. (2012). Role of tau protein in neuronal damage in Alzheimer's disease and Down syndrome. *Archives of Medical Research*, **43**(8), 645-654.

Charnay, Y., Imhof, A., Vallet, P.G., Kovari, E., Bouras, C. ve Giannakopoulos, P. (2012). Clusterin in neurological disorders: molecular perspectives and clinical relevance. *Brain Research Bulletin*, **88**(5), 434-443.

Chen, L.H., Kao, P.Y., Fan, Y.H., Ho, D.T., Chan, C.S., Yik, P.Y. ve ark. (2012). Polymorphisms of CR1, CLU and PICALM confer susceptibility of Alzheimer's disease in a southern Chinese population. *Neurobiology of Aging*, **33**(1), 210.e1-210.e7.

Cole, G.M., ve Ard., M.D. (2000). Influence of lipoproteins on microglial degradation of Alzheimer's amyloid beta-protein. *Microscopy Research and Technique*, **50**(4), 316-324.

Corder, E.H., Saunders, A.M., Strittmatter, W.J. Schmechel, D.E. Gaskell, P.C., Small, G.W. ve ark. (1993). Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families. *Science*, **261**, 921-923.

DeMattos, R.B., Cirrito, J.R., Parsadanian M., May, P.C., O'Dell, M.A, Taylor, J.W. ve ark. (2004). ApoE and clusterin cooperatively suppress Abeta levels and deposition: evidence that ApoE regulates extracellular Abeta metabolism in vivo. *Neuron*, **41** (2), 193-202.

De Silva, H.V., Stuart, W.D., Duvic, C.R., Wetterau, J.R., Ray, M.J., Ferguson, D.G. ve ark. (1990). A 70-kDa apolipoprotein designated ApoJ is a marker for subclasses of human plasma high density lipoproteins. *The Journal of Biological Chemistry*, **265**(22), 13240-13247.

Di Carlo, M., Giacomazza, D. ve San Biagio, P.L. (2012). Alzheimer's disease: biological aspects, therapeutic perspectives and diagnostic tools. *Journal of Physics: Condensed Matter*, **24**(24):244102.

Dursun, E. (2009). Vitamin D'nin Alzheimer Hastalığı ile İlişkinin Araştırılması. Doktora Tezi, İstanbul Üniversitesi, 4-17.

Dursun, E., Gezen-Ak, D. ve Yilmazer, S. (2011). A novel perspective for Alzheimer's disease: Vitamin D receptor suppression by amyloid- β and preventing the amyloid- β induced alterations by Vitamin D in cortical neurons. *Journal of Alzheimer's Disease*, **23**, 207-219.

Feulner, T.M., Laws, S.M. Friedrich, P., Wagenpfeil, S., Wurst, S.H.R., Riehle, C. ve ark. (2010). Examination of the current top candidate genes for AD in a genome-wide association study. *Molecular Psychiatry*, **15** (7), 756-766.

French, L.E., Chonn, A., Ducrest, D., Baumann, B., Belin, D., Wohlwend, A. ve ark. (1993). Murine clusterin: Molecular cloning and mRNA localization of a gene associated with epithelial differentiation processes during embryogenesis. *The Journal of Cell Biology*, **122**(5), 1119-1130.

Gezen-Ak, D. (2009). Vitamin D'nin Nöron Yaşamı ve Nörodejenerasyon Üzerine Etkilerinin Araştırılması. Doktora Tezi, İstanbul Üniversitesi, 13-17.

Gilbert, B.J. (2013). The role of amyloid β in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Journal of Clinical Pathology*, **66**(5), 362-366.

Golenkina, S.A., Gol'tsov, A., Kuznetsova, I.L., Grigorenko, A.P., Andreeva, T.V., Reshetov, D.A. ve ark. (2010). Analysis of clusterin gene (CLU/APOJ) polymorphism in Alzheimer's disease patients and in normal cohorts from Russian populations. *Molecular Biology (Mosk)*, **44**(4), 620-626.

Grupe, A., Abraham, R., Li, Y., Rowland, C., Hollingworth, P., Morgan, A. ve ark. (2007). Evidence for novel susceptibility genes for late-onset Alzheimer's disease from a genome-wide association study of putative functional variants. *Human Molecular Genetics*, **16** (8), 865-873.

Gu, H., Wei, X., Chen, S., Kurz, A., Müller, U., Gasser, T. ve ark. (2011). Association of clusterin gene polymorphisms with late-onset Alzheimer's disease. *Dementia and Geriatric Cognitive Disorders*, **32**(3), 198-201.

Guerreiro, R., Gustafson, D.R. ve Hardy J. (2012). The genetic architecture of Alzheimer's disease: beyond APP, PSENs and APOE. *Neurobiology of Aging*, **33**(3), 437-456.

Guerreiro, R.J., Beck, J., Gibbs, J.R., Santana, I., Rossor, M.N., Schott, J.M. ve ark. (2010). Genetic variability in CLU and its association with Alzheimer's disease. *PLoS One*, **5**(3), e9510.

Gürvit, .H. (2004). Demans Sendromu, Alzheimer Hastalığı ve Alzheimer Dışı Demanslar. içinde ed. Öge, A.E. Nöroloji, İstanbul: Nobel Tıp Kitapevleri, 381-398.

Hardy, J. (1997). Amyloid, the presenilins and Alzheimer's disease. *Trends in Neurosciences*, **20**(4), 154-159.

Hardy, J. (2006). A hundred years of Alzheimer's disease research. *Neuron*, **52**(1), 3-13.

Hardy, J., Selkoe, D.J. (2002). The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science*, **297**(5580), 353-356.

Harold, D., Abraham, R., Hollingworth, P., Sims, R., Gerrish, A., Hamshere, M. ve ark. (2009). Genome-wide association study identifies variants at CLU and

PICALM associated with Alzheimer's disease, and shows evidence for additional susceptibility genes. *Nature Genetics*, **41**(10), 1088-1093.

Hermo, L., Barin, K. ve Oko, R. (1994). Developmental expression of sulfated glycoprotein-2 in the epididymis of the rat. *The Anatomical Record*, **240**(3), 327-344.

Ho, W.L., Leung, Y., Tsang, A.W., So, K.F., Chiu, K. ve Chang, R.C. (2012). Review: tauopathy in the retina and optic nerve: does it shadow pathological changes in the brain?. *Molecular Vision*, **18**, 2700-2710

Holtzman, D.M. (2004). In vivo effects of ApoE and clusterin on amyloid-beta metabolism and neuropathology. *Journal of Molecular Neuroscience*, **23** (3), 247-254.

Holtzman, D.M., Herz, J. ve Bu, G. (2012). Apolipoprotein E and apolipoprotein E receptors: normal biology and roles in Alzheimer disease. *Cold Spring Harb Perspect Med*, **2**(3): a006312.

Jellinger, K.A. (2006). Alzheimer 100-highlights in the history of Alzheimer research. *Journal of Neural Transmission*, **113**(11), 1603-1623.

Jones, S.E. ve Jomary, C. (2002). Clusterin. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, **34**, 427-431.

Kauwe, J.S.K., Cruchaga, C., Karch, C.M., Sadler, B., Lee, M., Mayo, K. ve ark. (2011). Fine mapping of genetic variants in BIN1, CLU, CR1 and PICALM for association with cerebrospinal fluid biomarkers for Alzheimer's disease. *PLoS One*, **6**(2): e15918.

Koltai, T. (2014). Clusterin: a key player in cancer chemoresistance and its inhibition. *Journal of OncoTargets and Therapy*, (7), 447-456.

Kim, J., Basak, J.M. ve Holtzman, D.M. The role of Apolipoprotein E in Alzheimer's Disease. (2009). *Neuron*, **63**(3), 287-303.

Klimkowicz-Mrowiec, A., Sado, M., Dziubek, A., Dziedzic, T., Pera, J., Szczudlik, A. ve ark. (2013). Lack of association of CR1, PICALM and CLU gene polymorphisms with Alzheimer disease in a Polish population. *Neurologia i Neurochirurgia Polska*, **47**(2), 157-160.

Komatsu, M., Shibata, N., Kuerban, B, Ohnuma, T., Baba, H. ve Arai, H. (2011). Genetic association between clusterin polymorphisms and Alzheimer's disease in a Japanese population. *Psychogeriatrics*, **11**(1), 14-18.

Lambert, J.C. ve Amouyel, P. (2011). Genetics of Alzheimer's disease: new evidences for an old hypothesis?. *Current Opinion in Genetics & Development*, **21**(3), 295-301.

Lambert, J.C., Heath, S., Even, G., Campion, D., Sleegers, K., Hiltunen, M. ve ark. (2009). Genome-wide association study identifies variants at CLU and CR1 associated with Alzheimer's disease. *Nature Genetics*, **41**(10), 1094-1099.

Lee, G. ve Leurgers, C.J. (2012). Tau and Tauopathies. *Progress in Molecular Biology and Translational Science*, **107**, 263-293.

Li, H., Wetten, S., Li, L., St. Jean, P.L., Upmanyu, R., Surh, L. ve ark. (2008). Candidate single-nucleotide polymorphisms from a genomwide association study of Alzheimer's disease. *Archives of Neurology*, **65**(1), 45-53.

Lu, S.J., Li, H.L., Sun, Y.M., Liu, Z.J., Yang, P. ve Wu, Z.Y. (2014). Clusterin variants are not associated with southern Chinese patients with Alzheimer's disease. *Neurobiology of Aging*, DOI: 10.1016/j.neurobiolaging.2014.05.015.

Ma, J.F., Liu, L.H., Zhang, Y., Wang, Y., Deng, Y.L., Huang, Y. ve ark. (2011). Association study of clusterin polymorphism rs11136000 with late onset Alzheimer's disease in Chinese Han population. *American Journal of Alzheimer's Disease 7 Other Dementias*, **26**(8), 627-630.

May, P.C., Lampert-Etchells, M., Johnson, S.A., Poirier, J., Masters, J.N. ve Finch, C.E. (1990). Dynamics of gene expression for a hippocampal glycoprotein elevated in Alzheimer's disease and in response to experimental lesions in rat. *Neuron*, **5**, 831-839.

Mott, R.T. ve Hulette, C.M. (2005). Neuropathology of Alzheimer's disease. *Neuroimaging Clinics of North America*, **15**(4), 755-765.

Namba, Y., Tomonaga, M., Kawasaki, H., Otomo, E., Ikeda, K. (1991). Apolipoprotein E immunoreactivity in cerebral amyloid deposits and neurofibrillary

tangles in Alzheimer's disease kuru plaque amyloid in Creutzfeldt-Jacob disease. *Brain Research*, **541**, 163-166.

Nilselid, A.M., Davidsson, P., Nagga, K., Andresen, N, Fredman, P., Blennow, K. (2006). Clusterin in cerebrospinal fluid: analyses of carbohydrates and quantification of native and glycosylated forms. *Neurochemistry International*, **48**(8), 718-728.

Nuutinen, T., Suuronen, T., Kauppinen, A. ve Salminen, A. (2009). Clusterin: A forgotten player in Alzheimer's disease. *Brain Research Reviews*, **61**(2), 89-104.

O'Bryan, M.K., Cheema, S.S., Bartlett, P.F., Murphy, B.F. ve Pearse, M.J. (1993). Clusterin levels increase during neuronal development. *Journal of Neurobiology*, **24**(4), 421-432.

Price, D.L. Aging of the brain and dementia of the Alzheimer type. içinde: ed. Kandel, E.R., Schwartz, J.H., Jessell, T.M. Principals of Neural Science 4ed. New York: McGraw-Hill; 2000. p 1149-1161.

Price, D.L., Albert, M., Troncoso, J., Borchelt, D.R. ve Wong, P.C. (2009). Aging of the brain and Alzheimer's disease. *Encyclopedia of Neuroscience*, 197-201.

Reitz, C. ve Mayeux, R. (2014). Alzheimer's disease: Epidemiology, Diagnostic Criteria, Risk Factors and Biomarkers. *Biochemical Pharmacology*, **88**(4), 640-651.

Rosenberg, M. E. ve Silkens, J. (1995). Clusterin: Physiologic and Pathophysiologic considerations. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, **27**, 633-645.

Ross, C.A. ve Poirier, M.A. (2004). Protein aggregation and neurodegenerative disease. *Nature Medicine*, **10**, 10-17.

Seshadri, S., Fitzpatrick, A.L., Ikram, M.A, DeStefano, A.L., Gudnason, V., Boada, M. ve ark. (2010). Genome-wide analysis of genetic loci associated with Alzheimer disease. *JAMA*, **303**(18), 1832-1840.

Serrano-Pozo, A., Frosch, M.P., Masliah, E. ve Hyman, B.T. (2011). Neuropathological alterations in Alzheimer disease. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, **1**(1)

Shahani, N. ve Brandt, R. (2002). Functions and malfunctions of the tau proteins. *Cellular and Molecular Life Sciences*, **59**(10), 1668-1680.

Shannan, B., Seifert, M., Leskov, K., Willis, J., Boothman, D., Tilgen, W. ve ark. (2006). Challenge and promise: roles for clusterin in pathogenesis, progression and therapy of cancer. *Cell Death and Differentiation*, **13**(1), 12-19.

Shim, Y.J., Shin, Y.J., Jeong, S.Y., Kang, S.W., Kim, B.M., Park, I.S. ve ark. (2009). Epidermal growth factor receptor is involved in clusterin-induced astrocyte proliferation. *NeuroReport*, **20**(4), 435-439.

Silkensen, J.R., Skubitz, K.M., Skubitz, A.P.N., Chmielewaki, D.H., Manivel, J.C., Dvergsten, J.A. ve ark. (1995). Clusterin promotes the aggregation and adhesion of renal porcine epithelial cells. *Journal of Clinical Investigation*, **96**(6), 2646-2653.

Silkensen, J.R., Skubitz, K.M., Skubitz, A.P.N. ve Rosenberg, M.E. (1999). Identification of clusterin sequences mediating renal tubular cell interactions. *Journal of Peptide Research*, **54**(5), 449-457.

Selkoe, D.J. (1998). The cell biology of β -amyloid precursor protein and presenilin in Alzheimer's disease. *Trends in Cell Biology*, **8**(11), 447-453.

Spillantini, M.G. ve Goedert, M. (2013). Tau pathology and neurodegeneration. *The Lancet*, **12**, 609-622.

Spires-Jones, T.L., Stoothoff, W.H., de Calignon, A., Jones, P.B. ve Hyman, B.T. (2009). Tau pathophysiology in neurodegeneration: a tangled issue. *Trends in Neurosciences*, **32**(3), 150-159.

Sun, X. ve Zhang, Y. Amyloid Hypothesis and Alzheimer's Disease. içinde: ed. Chang, R.C.C. Advanced Understanding of Neurodegenerative Diseases (2011), ISBN: 978-953-307-529, InTech, DOI: 10.5772/28947.

Tanzi, R.E. (2012). The Genetics of Alzheimer's Disease. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, **2**(10): a006296.

Tanzi, R.E. ve Bertram L. (2005) Twenty years of the Alzheimer's disease amyloid hypothesis: a genetic perspective. *Cell*, **120**(4), 545-555.

Trougakos, I.P. ve Gonos, E.S. (2002). Clusterin/Apolipoprotein J in human aging and cancer. *The International Journal of Biochemistry 7 Cell Biology*, **34**(11), 1430-1448.

Trougakos, I.P. ve Gonos, E.S. (2006). Regulation of clusterin/apolipoprotein J, a functional homologue to the small heat shock proteins, by oxidative stress in ageing and age-related diseases. *Free Radical Research*, **40**(12), 1324-1334.

Tunçdemir, M. (2006). STZ-Diabetik Sıçanlarda ACE inhibitörü ve Angiotensin Reseptör Blokerinin Böbrek Dokusunda Clusterin ve Apoptoz Üzerine Etkileri. Doktora Tezi, İstanbul Üniversitesi, 29-37.

Ward, A., Crean, S., Mercaldi, C.J., Collins, J.M., Boyd, D., Cook, M.N. (2012). Prevalence of apolipoprotein E4 genotype and homozygotes (APOE e4/4) among patients diagnosed with Alzheimer's disease: a systematic review and meta-analysis. *Neuroepidemiology*, **38**(1), 1-17.

Wilhelm, J. ve Pingoud, A. (2003). Real-Time Polymerase Chain Reaction. *ChemBioChem*, **4**(11), 1120-1128.

Wilson, M.R, Yerbury, J.J. ve Poon, S. (2008). Potential roles of abundant extracellular chaperones in the control of amyloid formation and toxicity. *Molecular BioSystems*, **4**, 42-52.

Xu, W., Marseglia, A., Ferrari, C. ve Wang, H.X. Alzheimer's disease: A clinical perspective. içinde : ed. Kishore, U. Neurodegenerative Diseases (2013), ISBN: 978-93-51-1088-0, InTech, DOI: 10.5772/54539.

Yerbury, J.J., Poon, S., Meehan, S., Thompson B., Kumita, J.R., Dobson, C.M. ve ark. (2007). The extracellular chaperone clusterin influences amyloid formation and toxicity by interacting with prefibrillar structures. *The FASEB Journal*, **21**(10), 2312-2322.

Yu, J.T., Li, L., Zhu, Q.X., Zhang, Q., Zhang, W., Wu, Z.C. ve ark. (2010). Implication of CLU gene polymorphisms in Chinese patients with Alzheimer's disease. *Clinica Chimica Acta*, **411**(19-20), 1516-1519.

Yu, J.T. ve Tan, L. (2012). The role of clusterin in Alzheimer's disease: Pathways, pathogenesis, and therapy. *Molecular Neurobiology*, **45**(2), 314-326.

Zhang, H., Kim, J.K., Edwards, C.A., Xu, Z., Taichman, R., Wang, C.Y. (2005). Clusterin inhibits apoptosis by interacting with activated Bax. *Nature Cell Biology*, **7**(9), 909-915.

Zhang, S., Zhang, D., Yongshuai, J., Lina, W., Shang, H., Liu, J. ve ark. (2014). CLU rs2279590 polymorphpism contributes to Alzheimer's disease susceptibility in Caucasian and Asian populations. *Journal of Neural Transmission*, 1260-1269.

Zetzsche, T., Rujescu, D., Hardy, J. ve Hampel, H. (2010). Advances and perspectives from genetic research: development of biological markers in Alzheimer's disease. *Expert Review of Molecular Diagnostics*, **10**(5), 667-690.

FORMLAR

Bilgilendirilmi Gönüllü Olur Formu

Bu çalı ma bir moleküler genetik çalı masıdır. Çalı mada Alzheimer Hastalı ı ile ili kili oldu u bildirilen CLU (Clusterin) geninin polimorfizmleri ara tırılacaktır. Bu nedenle hastaya ve hasta yakınına genetik yapısının incelenece i anlatılacaktır. Çalı ma için hastadan bir defaya mahsus olarak kan alınacaktır. Kan alma i lemi hasta açısından bir risk ta ımamaktadır. Çalı mada hastanın ismi gizli tutulacaktır. Çalı ma a amasında ve çalı ma sonlandırıldıktan sonra hasta bireyin tedavisi kesintisiz olarak devam edecektir. Kabul edilmesi halinde hasta ve hasta yakınları bilgilendirilmi ve onayları alınmı olacaktır. Hastaya herhangi bir madde verilmeyecek ve ayrıca hastadan herhangi bir maddi katkı talebi olmayacaktır.

Adı, Soyadı:

Do um yeri, tarihi:

Ya ı:

Cinsiyeti:

Adresi:

Kaç yıldır Alzheimer hastası:

Hasta yakınının imzası:

Aile öyküsü:

Okudum

Prof.Dr. brahim Hakan GÜRV T
stanbul Üniversitesi stanbul Tıp Fakültesi
Dahili Tıp Bilimleri Bölümü
Nöroloji Anabilim Dalı
Tel: (0212) 621 56 23

ET K KURUL KARARI



T.C
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
CERRAHPAŞA TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞI
KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU



Sayı : 83045809/ 5559

Konu:

İstanbul//

Temel Tıp Bilimleri Bölümü
Başkanlığına

07 Mart 2013

İLGİ: 19.02.2013 tarihli, 242 sayılı yazınıza:

Bölümünüze bağlı Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Prof.Dr.Selma YILMAZER'in danışmanlığında Yüksek Lisans Öğrencisi Biyolog Merve ALAYLIOĞLU'nun yürütücülüğünde Prof.Dr.İbrahim Hakan GÜR VİT'in yardımcılığında "Clustterin Polimorfizmleri ve Alzheimer Hastalığı Arasındaki İlişkinin Araştırılması" başlıklı Yüksek Lisans Tezi hakkında ilgi yazınız ve ekleri 05 Mart 2013 tarihinde toplanan Fakültemiz Klinik Araştırmalar Etik Kurulunca müzakere edilmiş olup; Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) desteği alınması koşuluyla ,etik açıdan uygun olduğuna karar verilmiştir.

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

Eki:
1 dosya

Prof.Dr.Fatih ALTINDAŞ
Klinik Araştırmalar Etik Kurulu Başkanı

Not: Yanıtlarımızda yazınızın gün ve sayısının belirtilmesi rica olunur.
İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi 34303 Cerrahpaşa/İSTANBUL
Telefon 0 (212) 414 32 52 Dahili: 22300 Faks: 0(212) 632 00 40 e-posta:ctfetik@istanbul.edu.tr.

ÖZGEÇM

Kişisel Bilgiler

Adı	Merve	Soyadı	Alaylıo lu
Do .Yeri	Adana	Do .Tar.	10.04.1989
Uyru u	T.C.	TC Kim No	
Email	merve.alaylioglu@hotmail.com	Tel	

Eğitim Düzeyi

	Mezun Oldu u Kurumun Adı	Mez. Yılı
Doktora		
Yük.Lis.		
Lisans	İstanbul Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü	2011
Lise	Ni anta 1 Nuri Akın Lisesi	2007

Deneyimi (Sondan geçmi e do ru sıralayın)

	Görevi	Kurum	Süre (Yıl - Yıl)
1.			-
2.			-
3.			-

Yabancı Dilleri	Okudu unu Anlama*	Konu ma*	Yazma*	KPDS/ÜDS Puanı	(Di er) Puanı
İngilizce	Çok iyi	Çok iyi	Çok iyi	75.000	

*Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak de erlendirin

	Sayısal	Eğitim A ırlık	Sözel
ALES Puanı	77,86229	80,55542	71,51956
(Di er) Puanı			

Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma becerisi
Microsoft Office Programları	Çok iyi

Yayımları/Tebliğleri Sertifikaları/Ödülleri

Yayımlar

1. Gezen-Ak D, Dursun E, Hana ası H, Bilgiç B, Lohman E, Araz OS, Atasoy I, Alaylıo lu M, Onal B, Gürvit H, Yılmaz S. BDNF, TNF α , HSP90, CFH and

IL-10 Serum Levels in Patients with Early or Late Onset Alzheimer's Disease or Mild Cognitive Impairment. J Alzheimers Dis.; 2013 Jul 3.

Posterler

1. **Merve Alaylıo lu**, Duygu Gezen-Ak, Erdiñ Dursun, Ha met Hana ası, Ba ar Bilgiç, Ebba Lohmann, Ömür Selin Araz, rem L. Atasoy, Burak Önal, Hakan Gürvit, Selma Yılmaz. Serum TNF alpha levels elevated in early and late onset Alzheimer's disease but not in mild cognitive impairment, Alzheimer's Association International Conference (AAIC), Boston, United States, July 13-18, 2013.
2. **Merve Alaylıo lu**, Duygu Gezen-Ak, Erdiñ Dursun, Ha met Hana ası, Ba ar Bilgiç, Ebba Lohmann, Ömür Selin Araz, rem L. Atasoy, Burak Önal, Hakan Gürvit, Selma Yılmaz. Erken ve geç ba langıçlı Alzheimer Hastalı ı ile Hafif Kognitif Bozukluk'ta serum TNF α ve IL-10 seviyelerinin ara tırılması, 13. Ulusal Tıbbi Biyoloji ve Genetik Kongresi, Ku adası, Aydın, 27-30 Ekim, 2013.