

T.C.
MERSİN ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

**PRESİNAPTİK PROTEİNLERİ KODLAYAN GENLERİN
POLİMORFİZMLERİ İLE ALZHEİMER HASTALIĞI
ARASINDAKİ İLİŞKİNİN ARAŞTIRILMASI**

Tuba GÖKDOĞAN EDGÜNLÜ

DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN

Prof. Dr. M. Emin ERDAL

MERSİN – 2009

T.C.
MERSİN ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

**PRESİNAPTİK PROTEİNLERİ KODLAYAN GENLERİN
POLİMORFİZMLERİ İLE ALZHEİMER HASTALIĞI ARASINDAKİ
İLİŞKİNİN ARAŞTIRILMASI**

Tuba GÖKDOĞAN EDGÜNLÜ

DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN

Prof. Dr. M. Emin ERDAL

Bu tez, Mersin Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından
BAP SBE TBG (TG) 2005 DR kodlu proje olarak desteklenmiştir.

Tez No: .6..

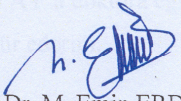
MERSİN – 2009

TESİKKÜR

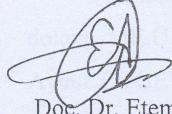
Mersin Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı Doktora Programı çerçevesinde yürütülmüş olan “Presinaptik proteinleri kodlayan genlerin polimorfizmleri ile Alzheimer hastalığı arasındaki ilişkinin araştırılması” adlı çalışma, aşağıdaki jürimiz tarafından Doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

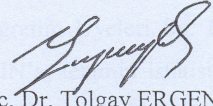
Tez Savunma Tarihi 21.05/2009


Prof. Dr. M. Emin ERDAL

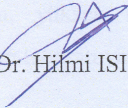
Jüri Üyesi


Doç. Dr. Etem AKBAŞ


Jüri Üyesi


Yrd. Doç. Dr. Tolgay ERGENOĞLU

Jüri Üyesi

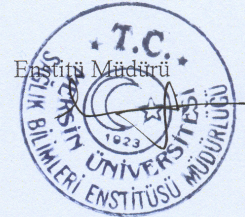

Yrd. Doç. Dr. Hilmi ISI

Jüri Üyesi


Yrd. Doç. Dr. Ömer BARLAS

Jüri Üyesi

Bu tez, Enstitü Yönetim Kurulunun 03.06.2009 tarih ve 2009/103 sayılı kararı ile onaylanmıştır.



TEŞEKKÜR

Yüksek lisans ve Doktora eğitimim boyunca, akademik açıdan yetişmemde büyük katkısı olan, Anabilim Dalı Başkanımız, danışman hocam Sn. Prof. Dr. M. Emin ERDAL'a, tezimin hazırlanması boyunca gösterdiği titizlik, özveri ve bilimsel katkıdan dolayı teşekkür ederim.

Anabilim dalımızın değerli hocaları; Sn. Doç. Dr. Nurcan ARAS ATEŞ'e, Sn. Doç. Dr. Etem AKBAŞ'a, Sn.Yrd. Doç. Dr. İ.Ömer Barlas'a, Sn. Yrd. Doç. Dr. Özlem İZCİ AY ve Sn. Yrd. Doç. Dr. Ertan AY'a doktora eğitimim boyunca yaptıkları bilimsel ve akademik katkıdan dolayı teşekkür ederim.

Tezimde yer alan hasta gruplarının toplanması sırasındaki yardımlarından dolayı, ME.Ü. Tıp Fakültesi Nöroloji Anabilim Dalı Öğretim Üyeleri Sn. Doç. Dr. Aynur ÖZGE, Sn. Arş. Gör. Dr. Özgür Osman YALIN'a, tezimin istatistikleri ve bulguların değerlendirilmesi konusundaki yardımlarından dolayı Biyoistatistik Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Sn.Yrd. Doç. Dr. Bahar TAŞDELEN ve Sn. Arş. Gör. Seval KUL'a, sekans analizi okumalarında bana yardımcı olan Sn. Arş. Gör. Seda TEZCAN'a, yüksek lisans ve doktora eğitimim boyunca, her türlü desteğini esirgemeyen laboratuarda birlikte çalıştığım arkadaşlarımdan hepsine teşekkür ederim.

Hayatımın her aşamasında yanımda olan, maddi ve manevi destekleriyle, eğitimimin akademik yönde devam etmesini sağlayan aileme ve varlığıyla bana hep destek olan sevgili eşime sonsuz teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY.....	iii
TEŞEKKÜR.....	iv
İÇİNDEKİLER.....	v
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	viii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ.....	ix
ÖZET.....	xiii
ABSTRACT.....	xiv
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1 Alzheimer Hastalığı.....	3
2.1.1 Alzheimer Hastalığının Tarihçesi.....	3
2.1.2 Alzheimer Hastalığının Nöropatolojisi.....	3
2.1.3 Alzheimer Hastalığının Genetiği.....	8
2.1.3.1 Amiloid Prokürsör protein (APP).....	9
2.1.3.2 Presinilin proteini (PSEN).....	9
2.1.3.3 Apolipoprotein E (APOE)	10
2.2 Sinaptik vezikülün salınım mekanizması.....	11
2.2.1.SNARE Proteinleri.....	16
2.2.2. Synapsin III proteini ve genetik özellikleri.....	19
2.2.3. Syntaxin 1A proteini ve genetik özellikleri.....	24
2.2.4 Synaptobrevin (VAMP) proteini ve genetik özellikleri.....	27
2.2.5 SNAP-25 proteini ve genetik özellikleri.....	30
3. GEREÇ VE YÖNTEMLER.....	34
3.1 Hasta ve Kontrol Grubunun Toplanması.....	34
3.2 Kullanılan Araç ve Gereçler.....	34
3.2.1. Alet ve Cihazlar.....	34
3.2.2. Kimyasal Maddeler.....	35
3.2.3. Çözeltiler.....	36

3.3 Yöntemler.....	37
3.3.1 DNA İzolasyonunu.....	37
3.3.2 Moleküler Analiz.....	38
3.3.2.1 VAMP2 (Synaptobrevin) geni 26 bp Ins/Del polimorfizminin belirlenmesi.....	38
3.3.2.2 SNAP-25 geni <i>MnII</i> , <i>DdeI</i> polimorfizmlerinin belirlenmesi	40
3.3.2.3 Synapsin III geni -196 G>A ve -631C>G polimorfizminin belirlenmesi.....	41
3.3.2.4 Syntaxin 1A geni ekson 3 ve intron 7 polimorfizminin belirlenmesi.....	43
3.3.3 DNA Dizi Analizi.....	44
3.4 İstatistiksel Analiz.....	45
4. BULGULAR.....	47
4.1 Synapsin III geni -196 G>A ve -631 C>G polimorfizmleri bulguları.....	50
4.1.1 Synapsin III geni -196 G>A polimorfizmi bulguları.....	50
4.1.2 Synapsin III geni -631 C>G polimorfizmi bulguları.....	51
4.2 VAMP2(Synaptobrevin) geni 26 bp Ins/Del polimorfizmi bulguları.....	53
4.3 SNAP-25 geni <i>MnII</i> ve <i>DdeI</i> polimorfizmleri bulguları.....	54
4.3.1 SNAP-25 geni <i>MnII</i> polimorfizmi bulguları.....	54
4.3.2 SNAP-25 geni <i>DdeI</i> polimorfizmi bulguları.....	56
4.4 Syntaxin 1A geni Ekson 3 ve İntron 7 polimorfizmleri bulguları.....	57
4.4.1 Syntaxin 1A geni İntron 7 polimorfizmi bulguları.....	57
4.4.2 Syntaxin 1A geni ekson 3 polimorfizmi bulguları.....	59
4.4.2.1 Syntaxin 1A geni ekson 3 polimorfizmi sekans analizi bulguları...60	
4.5 VAMP2 (Synaptobrevin) geni 26 bp Ins/Del polimorfizmi, SNAP-25 geni <i>MnII</i> , <i>DdeI</i> polimorfizmleri, syntaxin 1A geni ekson 3 ve intron 7 polimorfizmlerinin Linresyon Linkage Disequilibrium (LD) ve Lojistik regresyon ile değerlendirilmesi...61	
5. TARTIŞMA.....	63
6. SONUÇ ve ÖNERİLER.....	70
7. KAYNAKLAR.....	72
ÖZGEÇMİŞ.....	78

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1 (Nörofibriler yıkımın aşamaları).....	6
Şekil 2.2 (APP'nin üç proteolitik yıkım yolu).....	7
Şekil 2.3 (Nörotransmitterlerin salınım aşamaları).....	12
Şekil 2.4 (Nörotransmitterlerin salınımının moleküler yapısı).....	13
Şekil 2.5 (SNARE mekanizması).....	17
Şekil 2.6 (Sinaptik vezikülün golgiden başlayan oluşumu)	18
Şekil 2.7 (Synapsin III proteinini kodlandığı gen bölgesinin kromozomal lokalizasyonu).....	22
Şekil 2.8 (Alternatif splicing sonucu oluşan synapsin III proteinlerine ait transkript ürünleri).....	22
Şekil 2.9 (Synapsin III geni çizimi).....	23
Şekil 2.10 (Syntaxin 1A proteininin kodlandığı gen bölgesinin kromozomal lokalizasyonu).....	25
Şekil 2.11 (Syntaxin 1A geni çizimi).....	25
Şekil 2.12 (VAMP2 proteinini kodlandığı gen bölgesinin kromozomal Lokalizasyon).....	28
Şekil 2.13 (VAMP2 geni çizimi).....	29
Şekil 2.14 (SNAP-25 proteininin kodlandığı gen bölgesinin kromozomal lokalizasyonu).....	32
Şekil 2.15 (SNAP-25 geni çizimi).....	33
Şekil 4.1 (Synapsin III geni -196 G>A polimorfizmi elektroforez sonrası fotoğrafı).....	52
Şekil 4.2 (Synapsin III geni -631 C>G polimorfizmi elektroforez sonrası fotoğrafı).....	53
Şekil 4.3 (VAMP2 geni 26 bp Ins/Del polimorfizmi elektroforez sonrası fotoğrafı).....	54
Şekil 4.4 (SNAP-25 geni <i>MnI</i> polimorfizmi elektroforez sonrası fotoğrafı).....	56
Şekil 4.5 (SNAP-25 geni <i>DdeI</i> polimorfizmi elektroforez sonrası fotoğrafı).....	57
Şekil 4.6 (Syntaxin 1A geni intron 7 polimorfizmi elektroforez sonrası fotoğrafı).....	59
Şekil 4.7 (Syntaxin 1A geni ekson 3 polimorfizmi elektroforez sonrası fotoğrafı).....	60
Şekil 4.8 Syntaxin 1A geni ekson 3 polimorfizmi elektroforez sonrası fotoğrafı ile sekans analizinin karşılaştırılması.....	62

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1 (Alzheimer hastalığının etkenleri).....	5
Çizelge 2.2 (Alzheimer hastalığında rol oynayan faktörler).....	6
Çizelge 2.3 (AH ile ilişkili genler ve etkinlikleri).....	8
Çizelge 2.4 (Sinaptik vezikül ve ilişkili olduğu bilinen proteinler).....	14
Çizelge 2.5 (Synapsin III geni polimorfizmleri ve ilişkisi araştırılan hastalıklar).....	21
Çizelge 2.6 (Syntaxin 1A geni polimorfizmleri ile ilişkili hastalıklar).....	25
Çizelge 2.7 (VAMP2 geni polimorfizmleri ile ilişkisi araştırılan hastalıklar).....	28
Çizelge 2.8 (SNAP-25 geni polimorfizmleri ile ilişkisi araştırılan hastalıklar).....	32
Çizelge 4.1 (Kontrol ve Hasta Gruplarında Yaş Ortalamaları).....	48
Çizelge 4.2 (Çalışılan tüm genlerin genetik özellikleri).....	49
Çizelge 4.3 (Çalışılan tüm genlerin PCR-RFLP şartları ve sonuçları).....	50
Çizelge 4.4 (Synapsin III geni -196 G>A polimorfizmi genotip dağılımı).....	51
Çizelge 4.5 (Synapsin III geni -196 G>A polimorfizmi allel dağılımı).....	52
Çizelge 4.6 (Synapsin III geni -631 C>G polimorfizmi genotip dağılımı).....	53
Çizelge 4.7 (Synapsin III geni -631 C>G polimorfizmi allel dağılımı).....	54
Çizelge 4.8 (VAMP2 geni 26 bp Ins/Del polimorfizminin genotip dağılımı).....	55
Çizelge 4.9 (VAMP2 geni Ins/Del polimorfizminin gruplara göre allel dağılımı).....	55
Çizelge 4.10 (SNAP-25 geni <i>MnI</i> polimorfizminin genotip dağılımı).....	56
Çizelge 4.11 (SNAP-25 geni <i>MnI</i> polimorfizminin allel dağılımı).....	56
Çizelge 4.12 (SNAP-25 geni <i>DdeI</i> polimorfizminin genotip dağılımı).....	57
Çizelge 4.13 (SNAP-25 geni <i>DdeI</i> polimorfizminin allel dağılımı).....	58
Çizelge 4.14 (Syntaxin 1A geni intron 7 polimorfizminin genotip dağılımı).....	59
Çizelge 4.15 (Syntaxin 1A geni intron 7 polimorfizminin allel dağılımı).....	59
Çizelge 4.16 (Syntaxin 1A geni ekson 3 polimorfizminin genotip dağılımı).....	61
Çizelge 4.17 (Syntaxin 1A geni ekson 3 polimorfizminin allel dağılımı).....	61
Çizelge 4.18 (Bütün gen polimorfizmleri allel dağılımları)	63

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

ACT	α_1 -antichymotrypsin
ACE	Angiotensin converting enzyme (Anjiotensin dönüştürücü enzim)
AH	Alzheimer Hastalığı
ANG-2	Angiopietin 2
APOE	Apolipoprotein E
APP	β Amiloid prokürsör proteini
A β	β amiloid peptid
ATPase	ATP yıkıcı enzim
A2M	α_2 -makroglobulin
BDNF	Brain derivated neutrophic factor
Bp	Baz çifti
cAMP	Siklik AMP
Ca ²⁺	Kalsiyum
CALHM1	Kalsiyum homeostasis modölator 1
CaMK	Kalmodulin bağımlı protein kinaz
CaMKI	Ca ²⁺ calmodulin bağımlı protein kinaz I
CaMKII	Ca ²⁺ calmodulin bağımlı protein kinaz II
CAPS	Calcyphosine gene
CCL5	hemokine ligand-5
CCL7	Chemokine ligand-7
CCL15	Chemokine ligand-15
CCL18	Chemokine ligand-18
cdk5	Siklin bağımlı kinaz 5
CFP	FRET donorün,Cyon flouresant protein
ChAT	Asetilkolinesteraz
CHRNA2	Kolinerjik reseptör nikotinik beta 2 nöronal Protein
Cl ⁻	Klor
CSP	Cystein String Protein
CST3	Cystatin C 3
CXCL8	Interleukin-8 (İnterlökin 8)

DNase	DNA yıkıcı enzim
EDTA	Etilendimetil tetra asetik asitli
EGF	Epidermal büyüme faktörü
ESR1	Östrojen reseptörü
GAPDHS	Gliseraldehit-3-fosfat dehidrojenaz
G-CSF	Granülosit Koloni Sitümüle edici Faktor
GDNF	Glial cell line derived neurotrophic factor
GDI	GDP-dissociation inhibitors
GeneID	Gen kod numarası
GTP	Guanosine triphosphate
HPC-1	Syntaxin 1A
HW	Hardy Weinberg
ICAM	İnterselüler adezyon molekülü-1
IDE	İnsulin-degrading enzim
IGFBP	İnsulin-like growth faktör-binding protein
IL-1a	İnterlökin 1A
IL	İnterlökin
kDa	Kilodalton
LD	Linkage Disequilibrium
MAP	Mikrotübül asosiye proteinler
MAP kinaz	Mitojen aktivite edici protein kinaz
M-CSF	Makrofaj CSF
mRNA	Haberci RNA
MgCl ₂	Magnezyum klorür
µl	Mikrolitre
MSS4	Mammalian suppressor of SEC4 proteini
MTHFR	Methylene-Tetra-Hydro-Folate-Reductase
Na ⁺	Sodyum
Na ₂ EDTA	Sodyum-2-etilendiamintetraasetik asit
NCSTN	Nicastrin
NET	Norepinefrin transport
NFY	Nörofibriler yumak

NGFB	Nerve growth faktör
NGFR	Nerve growth faktör reseptör
NSF	Etylmaleimide sensitive fusyon protein
NTRK1	Nörotrophin tirozin kinaz reseptörleri 1
NTRK2	Nörotrophin tirozin kinaz reseptörleri 2
PCR	Polimeraz zincir reaksiyonu
PDGF-BB	Platelet-Derived Growth Factor-BB
PGRN	Progranulin
PHF	Çift sarmallı filaman
PKA	Protein kinaz A
PRNP	Prion protein
PSEN1	Presenilin 1
PSEN2	Presenilin 2
pp60 ^{src}	60kDa monoklonal antikor tanıma proteini
RFLP	Restriksiyon Parça Uzunluk Polimorfizmi
RE	Restriksiyon Endonükleaz
RIM	Retinal-specific ATP-binding cassette transporter
RNAase	RNA yıkıcı enzim
Rpm	Dakikadaki Devir Sayısı
SDS	Sodyum dodesil sülfat
SCAMPs	Sekretör taşıyıcı membran proteinleri
Ser	Serin aminoasiti
SERT	Serotonin transporter
SNAPs	Soluble NSF-attachment protein
SV2s	Sinaptik vezikül 2
SCORE	SNARE kompleks reporter
SN1	SNARE motif 1
SN2	SNARE motif 2
SNAP-25	Synaptosomal-associated protein of 25 kDa
SNAREs	N-etylmaleimide-sensitive factor attachment protein reseptörleri
SNP	Tekli nükleotid değişimi polimorfizmi
SPSS	Statistical Package for Social Sciences version

SYT1	Synaptobrevin
TBE	Tris-Borat- Etilendiamintetraasetik Asit
TE	Tris-etilendiamintetraasetik asit
TF	Transferrin
TFAM	Transcription factor A
TNF- α	Tümör Nekrozis Faktör α
TRAIL-R4	TNF-like membrane toksik protein
t-SNARE	Plazma membran proteini
UTR	Untranslate Region
v-SNARE	Sinaptik vezikül membran proteini
VAMP2	Vezikül associated membran protein 2

ÖZET

Presinaptik Proteinleri Kodlayan Genlerin Polimorfizmleri İle Alzheimer Hastalığı Arasındaki İlişkinin Araştırılması

Alzheimer hastalığı (AH); yakın hafıza, neden sonuç ilişkisi, konsantrasyon, dil, görsel algılama ve görsel uzamsal fonksiyonları içeren kognitif fonksiyonların ilerleyici kaybıdır. AH başladığı yaşa göre iki tip olarak bilinmektedir; 65 yaş öncesi başlayan AH'a erken başlangıçlı AH, 65 yaş sonrası gelişen AH'a geç başlangıçlı AH denilmektedir. Yapılan araştırmalar sonucunda, Alzheimer hastalarında sinaptik vezikül proteinleri ve presinaptik plazma membran proteinlerinin sinaptik taşınmada oldukça önemli oldukları belirlenmiştir. Bunlardan bazıları olan synapsin III, syntaxin 1A, SNAP-25 ve VAMP2 proteinleri ile Alzheimer hastalığı arasındaki ilişki araştırıldı.

Çalışmamızda 68 Alzheimer hastası ve kontrol grubu olarak 72 sağlıklı bireyin periferik kanlarından DNA izole edilerek, VAMP2 (Synaptobrevin) geni 26 bp Ins/Del polimorfizmi, SNAP-25 geni *MnII*, *DdeI* polimorfizmleri, synapsin III geni -196 G>A ve -631C>G polimorfizmleri, syntaxin 1A geni ekson 3 ve intron 7 polimorfizmleri allel ve genotipleri tespit edildi.

Synapsin III geni -631 C>G polimorfizmi için; Allel sayıları ile gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki vardır. G alleleline sahip olan bireyler C alleleline sahip olan bireylere oranla 1,5 kat daha risk altında olmaktadır (p=0.047). Syntaxin 1A geni ekson 3 polimorfizmi allel sayıları ile gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki vardır. T alleleline sahip olan bireylerin, C alleleline sahip olan bireylere oranla 1,7 kat daha fazla hastalık riskine sahip oldukları tespit edildi (p=0.018). Ayrıca, logistik regresyon analizi sonucunda da VAMP2 ve SNAP-25 genlerine ait polimorfizmlerde de anlamlılık tespit edilmiştir (p= 0.009, p=0.010).

Sonuç olarak, presinaptik bölgede yer alan ve sinaptik geçişi etkileyen başka proteinlerinde genetik açıdan incelenmesi AH'nın erken tanısı ve tedavisinde yardımcı olacaktır.

Anahtar Kelimeler: Alzheimer, SNARE, VAMP2, Synapsin III, Syntaxin 1A, SNAP-25

ABSTRACT

Investigations on Genetic Polymorphisms of Presynaptic Proteins Genes in Alzheimer Disease

Alzheimer Disease (AD), is a progressive brain disease that slowly destroys memory thinking skills, and eventually even the ability to carry out the simplest tasks, the loss of cognitive functioning-thinking, remembering and reasoning to such an extent that it interferes with a person's daily life and activities. AD separates two groups. In most people with AD, symptoms first appear after age 65, these group are called late-onset AD. However, the other group appears before age 65, this group is called early-onset AD. It has been reported that about AD; synaptic vesicle proteins and plasma membrane proteins are crucial role for synaptic transmission. We investigated that association with AD and genetic polymorphism of synapsin III, SNAP-25, VAMP2 and syntaxin 1A proteins.

In our study, we obtained DNA from persons who have AD (n=68) and unrelated healthy person (n=72). We determined alleles and genotypes of 26 bp Ins/Del polymorphism of VAMP2 gene, *MnlI* and *DdeI* polymorphisms of SNAP-25 gene, -196 G>A, -631 C>G polymorphism of synapsin III gene.

Our result suggested that, case-control comparisons of these polymorphisms revealed significant differences in the allelic and genotypic distributions; -631 C>G polymorphism of synapsin III gene alleles relation with AD ($p=0.047$). Persons who have G alleles 1.5 times more at risk than C alleles increased susceptibility of AD. Exon 3 polymorphism of syntaxin 1A gene is associated with AD ($p=0.018$). Persons who have T alleles 1.7 times more at risk than C alleles increased susceptibility of AD. Also, result of logistic regression analysis SNAP-25 and VAMP2 are significant relevance with AD ($p= 0.009$, $p=0.010$).

Result of our study; we determined that relation between AD and SNAP-25, VAMP2, synapsin III, syntaxin 1A genes. Also, gene of other proteins which have been in presynaptic region should be investigated. Consequently, these studies can assist with AD early diagnosis and treatment.

Keywords: Alzheimer, SNAP-25, Synapsin III, Syntaxin 1A, VAMP2

1.GİRİŞ

Alzheimer hastalığı (AH) ilk kez 1900'lü yılların başlarında Alman bilim adamı olan Alois Alzheimer tarafından 51 yaşındaki bir kadın hastada tanımlanmıştır. Uzun yıllar geç yaşta başlayan bir hastalık olarak kabul edilmiştir. AH; biyokimya, hücre biyolojisi, moleküler genetik, sinir bilimi ve yapısal biyoloji gibi biyolojik disiplinlerin ilgilendiği bir hastalık olarak da tanımlanmıştır. AH yakın hafıza, neden sonuç ilişkisi, konsantrasyon, dil, görsel algılama ve görsel uzamsal fonksiyonları içeren bilişsel fonksiyonların ilerleyici kaybıdır (1, 2). AH başladığı yaşa göre iki tip olarak tanımlanmıştır; 65 yaş öncesi başlayan AH'a erken başlangıçlı AH, 65 yaş sonrası gelişen AH'a geç başlangıçlı AH denilmektedir. AH parenkima ve damar duvarlarında ayrıca, nörofibriller iplikciklerde β amiloid peptid ($A\beta$) depozisyonu ve nöronal kayıpla karakterize anormal tau proteinlerinin nöronal hücrelerde görüldüğü bir nörodejeratif hastalıktır. Bu alanlar, genellikle serebral korteks ve hipokampusta görülmektedir (3).

Alzheimer hastalarının beyinlerinde yapılan histopatolojik çalışmalar sonucunda, beynin hipokampus ve neokorteks gibi farklı kısımlarında nörofibriller iplikler, senil plaklar ve geniş nöronal kaybın olduğu bölgeler belirlenmiştir. Tespit edilen dört proteinin hastalığın erken başlangıçlı formuyla ilişkili olduğu belirlenmiştir. Bunlar; beta amiloid prokürsörü, presenilin 1 (PSEN1), presenilin 2 (PSEN2) ve tau proteinleri olarak bilinmektedir (4). Ancak, bunların dışında AH ile ilişkili birçok gen bölgesi de belirlenmiştir (5). Sinaptik değişimin amiloid birikimi patogenezinde ve hücre iskeleti anomalilerinde etkili olabileceği düşünülmektedir (4).

N-etylmaleimide-sensitive factor attachment protein reseptör (SNAREs) proteinleri plazma membran proteiniyle kompleks oluşturur ve nöroekzitozu düzenler. Popüler bir teoriye göre, üç presinaptik SNARE proteini vardır; syntaxin, synaptobrevin 2 (VAMP2) ve SNAP-25 proteinleridir. Bu proteinler, sinaptik vezikülün füzyon oluşturmada erken ve geç evrede oldukça önemlidir. Synaptobrevin, SNARE kompleksinin vezikülde bulunan kısmını oluştururken, syntaxin ve SNAP-25 plazma membran proteinlerindedir (6,7). Synapsin ise, fosforile olmuş sinaptik vezikül ilişkili proteindir (8). Sze ve ark' nın (2000) yaptığı bir çalışmaya göre; Alzheimer hastalarının beyinlerinin dört farklı bölgesinde (hipokampus, entorhinal korteks, caudate nucleus ve occipital korteks) immünohistokimyasal olarak yedi farklı presinaptik bölge proteini (synaptobrevin, synaptotagmin, SNAP-25, syntaxin, SV2, Rab3A ve synapsin I) incelenmiştir. Kontrol bireylerle olası/erken başlangıçlı Alzheimer

hastaları karşılaştırıldığı zaman, hipokampüste synaptobrevin ve synaptotagminin belirgin oranlarda azaldığı tespit edilmiştir. AH ile kontrol bireyleri karşılaştırıldığında; hipokampusta synaptobrevin, synaptotagmin ve Rab3A proteinlerinde, entorhinal kortekste synaptobrevin (VAMP), synaptotagmin ve Rab3A da belirgin miktarda düşüşler tespit edilmiştir. Sonuç olarak, presinaptik vezikül proteinleri ile bilişsel bozukluk arasında bir ilişki olabileceği öne sürülmüştür (9). Shimohama S. ve ark (1997) yaptıkları çalışma sonucunda ise, Alzheimer hastalarında sinaptik vezikül proteinlerinin presinaptik plazma membran proteinlerinden daha hassas oldukları belirlemiştir (10).

AH ile synapsin III, syntaxin 1A, VAMP2 ve SNAP-25 genleri polimorfizmleri arasındaki ilişki daha önce uluslararası hiçbir çalışmaya konu olmamıştır. Bu çalışmada, VAMP2 geni 26 bp Ins/Del polimorfizmi, SNAP-25 geni *MnII*, *DdeI* polimorfizmleri, synapsin III geni -196 G>A ve -631C>G polimorfizmleri, syntaxin 1A geni ekson 3 ve intron 7 polimorfizmleri ile Alzheimer hastalığı arasındaki ilişki araştırıldı.

2.GENEL BİLGİLER

2.1 Alzheimer Hastalığı

2.1.1. Alzheimer Hastalığının Tarihçesi

Alzheimer hastalığı (AH) ilk kez 1900'lü yılların başlarında Alois Alzheimer tarafından 51 yaşındaki bir kadında tanımlanmıştır. Uzun yıllar geç yaşta başlayan bir hastalık olarak kabul edilmiştir. Bu görüş son yıllarda değişmiştir. 30 yaşlarından sonra başlayan herhangi bir yaşta ortaya çıkan, etyolojisi bilinmeyen, ilerleyici demansa neden olan bir hastalık olarak ta tanımlanmaktadır (11). AH; biyokimya, hücre biyolojisi, moleküler genetik, sinir bilimi ve yapısal biyoloji gibi biyolojik disiplinlerin ilgilendiği bir hastalık olarak ta tanımlanmıştır. AH yakın hafıza, neden sonuç ilişkisi, konsantrasyon, dil, görsel algılama ve görsel uzamsal fonksiyonları içeren bilişsel fonksiyonların ilerleyici kaybıdır (1, 2). Yetmiş yaşın üzerindeki kişilerin % 10'unda demans, bunların yarısında AH görülmektedir. Genetik heterojenite gösteren bir hastalık olup, % 5'ten azı erken başlangıçlı ailesel ve % 75'i sporadik vakalardır. Ailesel AH vakalarının yaklaşık % 10'unda otozomal dominant kalıtım, geri kalanında ise multifaktöriyel kalıtım görülmektedir. Hastaların % 1'inden azı ise Down Sendromlu olarak belirlenmiştir. AH, sayısı bilinmeyen genetik faktör ve çevresel etkenlerle oluşan multifaktöriyel bir hastalıktır. AH başladığı yaşa göre iki tip olarak tanımlanmıştır; 65 yaş öncesi başlayan Alzheimer hastalığına erken başlangıçlı AH, 65 yaş sonrası gelişen Alzheimer hastalığına geç başlangıçlı AH denilmektedir (2). AH parenkima ve damar duvarlarında ayrıca, nörofibriller iplikciklerde β amiloid peptid ($A\beta$) depozisyonu ve nöronal kayıpla karakterize anormal tau proteinlerinin nöronal hücrelerde görüldüğü bir nörodejeratif hastalıktır (2, 3).

2.1.2 Alzheimer Hastalığının Nöropatolojisi

Alzheimer, demans hastalığının büyük bir kısmını oluşturan progresif nörodejeratif bir hastalıktır. 85 yaş üzeri bireylerin % 50'sinden fazlasında AH görülmektedir. Alzheimer hastalarının beyinlerinde yapılan histopatolojik çalışmalar beynin hipokampus ve neokorteks gibi farklı bölgelerinde nörofibriller iplikler, senil plaklar ve geniş nöronal kaybın olduğu

bölgeler belirlenmiştir (çizelge 2.1) (4). AH patogenezi, çevresel ve genetik faktörlerin birlikte oluşturduğu kompleks bir yapıya sahiptir. Bazı hastalarda sporadik olarak gelişirken özellikle ailesel kalıtsal tiplerinde tespit edilen bazı proteinler vardır (12). Beta amiloid peptid, tau proteinleri ve izoform 4 tipindeki kolesterol transporting apolipoprotein E (APOE) proteinlerinin AH patogenezinde etkili olduğu tespit edilmiştir (13). A β 'nin prokürsor proteini olan β Amiloid prekürsor proteini (APP) çeşitli dokularda eksprese edilmektedir. APP ekspresyonu; stres, büyüme hormonları, sitokinler gibi çeşitli ajanlarla indüklenebilmektedir (çizelge 2.2) (2).

Alzheimer hastalarının beyinlerinde yapılan histopatolojik çalışmalar sonucunda beyinde hipokampus ve neokorteks bölgelerinde nörofibrilar iplikcikler, senil plaklar ve geniş bir nöronal kayıp olduğu tespit edilmiştir. Hastalığın patogenezi, kompleks olup çevresel ve genetik faktörlerin ortak etkisiyle gelişmektedir. AH vakalarının büyük bir kısmı sporadik olup etyolojisi net olarak bilinmemektedir. Bazı formları ise özellikle Familial Alzheimer hastalığı (FAD) kalıtsal olup, genlerin etkisiyle olduğu belirlenmiştir. Tespit edilen dört protein, hastalığın erken başlangıçlı formuyla ilişkilidir. Bunlar; Beta amiloid prekürsörü, presenilin 1 (PSEN1), presenilin 2 (PSEN2) ve tau proteinleri olarak bilinmektedir. Diğer taraftan, apolipoprotein E nin ϵ 4 alleli geç başlangıçlı demans için genetik bir risk oluşturmaktadır (12). Bu bilgiler ışığında, AH ile ilgili amiloid hipotezi öne sürülmüştür. Amiloid hipotezi, amiloidlerin birleşmesi dışında diğer parametreleri de içermektedir. Bu şekilde; senil plakların oluşması, nöronal ve sinaptik kaybı da beraberinde getirmektedir. Amiloidlerin birikimini oluşturan intraselüler amiloid beta 42 (A β 42) olup, normal formlu A β birikim göstermemektedir. Biriken amiloidler nörotoksik özellik göstermektedir. İn vivo ortamda toksik etkili amiloid plakların sinaptik plastisiteyi ve hafıza oluşumunu etkilediği belirlenmiştir (12).

Son yıllarda, özellikle kalıtsal formulu AH için yeni bir hipotez öne sürülmüştür. Bu hipoteze göre; γ sekretaz enziminde oluşan mutasyon hastalıktan sorumlu tutulmaktadır. Gama sekretaz, hücre yüzey reseptörlerinin proteolizisinde görev alır ve bu proteolizi yaparken hücre yüzeyinden nükleusa sinyal transdüksiyonunda etkilidir (12). Normal gelişimden nörodejenerasyona kadar birçok proteinin üzerinde etki göstermektedir. Buna ek olarak, γ sekretaz'ın inhibisyonuyla; APP, Notch-1 ve N-cadherin gibi bazı proteinlerinin üretiminin de etkilendiği belirlenmiştir. γ sekretaz'ın sadece interselüler iletişimi ve sinyal transdüksiyonu değil, nörodejenerasyon mekanizmasındaki sinyal yolağının disregülasyonunda da önemli olduğu tespit edilmiştir (12).

APP' nin endoproteolitik parçalanması sonucu, nörotropik ve nöroproktetif aktivite gösteren peptidler oluşturur. APP'nin endozomal-lizozomal yapı içinde parçalanması sonucu 40 aminoasitlik karboksil-terminal peptid $A\beta_{40}$ oluşturur (1). Normalde olması gerekli bu reaksiyon dışında, APP'nin golgide ve endoplazmik retikulumda parçalanması sonucu 42 ya da 43 aminoasitlik bir karboksil peptid olduğu bilinmektedir. Bu peptidlerin nörotoksik özellikleri olduğu düşünülmektedir. AH'larının beyinlerinde belirgin miktarda $A\beta_{42/43}$ birikimi gözlenmiştir (1, 14).

Çizelge 2.1. Alzheimer hastalığının etkenleri

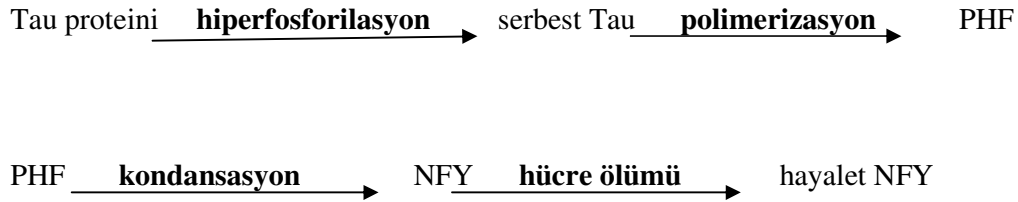
ALZHEİMER HASTALIĞININ NÖROPATOLOJİSİNDEKİ ETKENLER
Nörofibriler yumaklar
Amiloid plaklar
Nöron kaybı
Sinaps kaybı
Gliozis-inflamasyonun kaybı
Kolinergik innervasyonun kaybı
Diğer nörotransmitterlerin kaybı

APOE, sinirlerde hasar tamirinde etkilidir. APOE beyinde sentezlenip astrositlere geçer ve sinir hasarı sonucunda aniden artar. Alzheimer hastası olan bireylerde astrositlerin biyokimyasının değiştiği belirlenmiştir. APOE'nin nöronal ekspresyonunun varyasyonlarının AH için risk olabileceği öne sürülmüştür. APOE ekspresyonu, çeşitli hücre ve dokularda olmaktadır. Besin, hormon, doku, hücreye spesifik faktörler ve intraselüler kolesterol seviyeleri gibi etkenlerle düzenlenir (2,14). Sinaptik değişimin amiloid birikimi patogeneğinde hücre iskeleti anomalilerinde etkili olabileceği düşünülmektedir. AH beyinlerindeki caudate difüz plaklarının oluşması gözlenmiştir. Son yıllarda yapılan çalışmalarda, mikrotübüllerle ilişkili fosforile proteini olan tau proteini araştırılmıştır. Bu çalışmalara göre, tau proteini mikrotübüllerdeki tubulin polimerizasyonu ile bağlantılı olduğu tespit edilmiştir (14).

Çizelge 2.2. Alzheimer hastalığında rol oynayan faktörler

ALZHEİMER HASTALIĞINDA ROL OYNAYAN FAKTÖRLER	
Risk Faktörleri	Koruyucu Faktörler
Yaş	Yüksek eğitim
Cinsiyet	APOE-ε2
Ailede demans öyküsü	Antioksidan kullanımı
Genetik etkenler	Anti-inflamatuvar kullanımı
Kafa travması	Östrojen kullanımı
Down sendromu	Statin kullanımı
Major depresyon öyküsü	
Vasküler olaylar	
Plazma homosistein düzeyi	
Küçük kafa çevresi	
Tiroid hastalığı	
Bazı toksik ve zararlı durumlara maruz kalma	

Nörofibriler Yumaklar: Nörofibriler yumakların (NFY) temel bileşeni hiperfosforile tau proteindir. Tau proteini, kromozom 17q21.1 deki bir gen bölgesi tarafından kodlanan mikrotübül asosiye proteinler (MAP) ailesinin bir üyesidir. Mikrotübüllerin stabilizasyonu, sitoskeletal bütünlük ve aksonal transportta önemli roller oynar. AH patogenezinde hiperaktif kinazlar ve/veya hipoaktif fosfotazlar tau proteinin hiperfosforilasyonuna yol açarak mikrotübüllere bağlanma yeteneğini bozarlar. Bağlanmamış fosforilize tau çözünmeyen çift sarmallı filamanlara (PHF) polimerize olur (şekil 2.1). PHF'ler giderek intranöronal NFY'ler şeklinde kondanse olur. PHF'den NFY'ye geçişin yıllar kapsayan uzun bir süreç olduğu düşünülmektedir. Bu süreçte tau hedefli tedavi stratejilerinin, PHF'lerin NFY şeklinde çökmesini hedeflemeleri gerektiği belirtilmiştir. NFY sonunda stroskeletonun bütünlüğünü ve aksonal transportu bozarak hücre ölümüne neden olur. Hücre ölümüyle ortaya çıkan ekstraselular NFY'ye (hayalet yumak) adı verilir (15, 16).



Şekil 2.1. Nörofibriler yıkımın aşamaları

Amiloid Plaklar: Amiloid plakların kaynağı kan damarları ve beyindeki nöronların dış yüzeyinde biriken amiloid beta ($A\beta$) peptid kompleksidir. APP olarak bilinen normal nöron transmembran proteinidir. APP'nin, nöronal stres veya hasar ile doğal nöroprotektif ajan olduğu düşünülmektedir. Ayrıca, APP'nin glutamat eksitoksisitesinden nöronları koruyup, Ca^{+2} konsatrasyonunu indirgeyerek, nöronal stres veya hasardan doğal nöron koruyucu olduğu düşünülmektedir. APP'nin farklı enzimlerle kesilerek $A\beta_{40}$ $A\beta_{42}$ peptidlerini oluşturdukları bilinmektedir (şekil 2.2). $A\beta_{42}$, $A\beta_{40}$ ' a oranla daha hidrofobik ve bağlantıya daha uygundur. $A\beta_{42}$ fibrilleri birleşerek amiloid plakları oluştururlar. $A\beta_{40}$ ve $A\beta_{42}$ intraselüler formlardır fakat hücre dışına taşındıkları zaman birleşirler. İnsülin, ekstraselüler ortama taşınmasını kolaylaştırır. Bu nedenle tip 2 diabet hastalarının AH olma insidansı oldukça yüksektir (16).

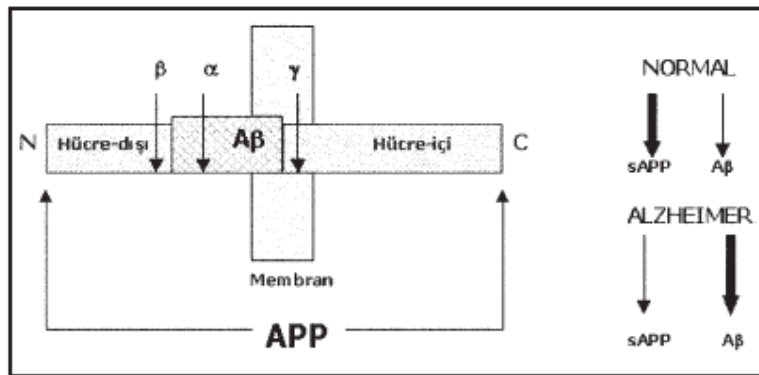
Amiloid plak formasyonu iki yolakla nöron ölümünde etkin rol oynar.

1-İnflamasyon

2-Nörofibriler iplikcikler

Beyin hücrelerinin iki tipi astrositler ve mikroglialar, immün/inflamatuvar yanıtta etkilidir. Aktive olmuş mikroglia hücreleri serbest radikallerle birleşir. Aktive olmuş astrosit ve mikroglialar nöronların hücre ölümüne neden olur (16).

APP → $A\beta_{42}$ → Fibriller $A\beta$ → amiloid plaklar → inflamasyon/NFY → Nöron ölümü



Şekil 2.2. APP'nin üç proteolitik yıkım yolu (16)

2.1.3 Alzheimer Hastalığının Genetiği

Alzheimer hastalığı patogeneğinde rol oynayan proteinlerin kodlandığı genler hastalığın gelişimi açısından oldukça önemlidir. AH'de genetik faktörler büyük oranda hastalığın gelişimi için çevresel faktörlere bir yatkınlık zemini yaratacak şekilde birer risk faktörü niteliğindedir. Genetik açıdan genel olarak kompleks bir hastalık olarak nitelendirilmesinin yanı sıra, AH Mendelian geçiş açısından da heterojenite gösteren polijenik multiallelik bir hastalıktır. Birden fazla kromozomdaki gen lokuslarının çok sayıda farklı mutasyonları aynı hastalığa yol açar. Otozomal dominant geçişten sorumlu olan 4 ayrı gen belirlenmiştir (16).

- 1- Amiloid prekürsor protein (APP, kromozom 21q21.2)
- 2- Presenilin 1 (PSEN1, kromozom 14q24.3)
- 3- Presenilin 2 (PSEN2, kromozom 1q31-q42)
- 4- Tau proteini (kromozom17q21.1)

Bu proteinlerin ilk üçü normal işlevi çok iyi bilinmeyen, nöronal plastisitede rol oynadıkları ileri sürülen transmembran proteinleridir (çizelge 2.3). Bu üç gende meydana gelen mutasyonlar, APP'den metabolize edilen A β proteini atılmayıp amiloid plakların içinde biriken daha uzun bir şeklinin üretiminin artmasına neden olur. APP geni mutasyonu taşıyan aileler çok az sayıda olsa da, APP geni mutasyonları bir yandan amiloid metabolizması üzerinden hastalığın patogenezine ışık tutarken, bir yandan da Down Sendromu ile AH arasındaki ilişkiyi de aydınlatmıştır. Down'lu bireyler 30'lu yaşlardan itibaren çoğunlukla AH'ın nöropatolojik değişikliklerini göstermeye başlarlar (11, 16).

Çizelge 2.3. AH ile ilişkili genler ve etkinlikleri

GEN	KROMOZOM	PROTEİN	MEKANİZMA	ETKİ
APP	21q21.2	APP	Mutasyon/trizomi	A β üretiminde artış
PSEN1	14q24.3	S182	Mutasyon	A β üretiminde artış
PSEN2	1q31-q42	STM2	Mutasyon	A β üretiminde artış
APOE	19q13	APOE	Polimorfizm	A β yapısında bozulma, tau hiperfosforilasyonu, nöral plastisitede bozulma
α 2-mikroglobulin	12	α 2-mikroglobulin	Polimorfizm	A β yapısında bozulma

2.1.3.1. Amiloid prekürsor protein (APP)

Beta amiloid peptidin, amiloid prekürsor proteinden oluştuğu bilinmektedir. Amiloid prekürsor proteinin aminoasit diziliminde valin yerine izolösin, fenilalanin ya da glisin değişimi olmasının mutasyona neden olduğu bunun da amiloid depolanmasında rol oynadığı bilinmektedir. APP mutasyonu ile oluşan Alzheimer'da erken yaşta başlangıç görülmektedir (15). APP geni kalıtsal erken başlangıçlı AH ile ilişkili olup gen bölgesinde günümüz itibariyle 18 mutasyon tespit edilmiştir (12).

Erken gelişen Alzheimer hastalığı için etkili sayılan ilk gen APP'dir. Kromozom 21q21.2'deki bir gen bölgesi tarafından sentezlenmektedir. APP tüm hücrelerde 2 major yolla aşamalı olarak metabolize edilir. Bazı hücrelerde en çok görülen yolak α sekretazın kestiği ve N-truncated $A\beta$ peptidin oluştuğu yolaktır. Bazen farklı enzimler bu kesme işlemini yaparlar. Sıklıkla β -sekretaz ve γ -sekretaz 40 ve 42 aminoasitlik $A\beta$ izoformlarının oluşumuna neden olurlar. APP geni üzerinde bulunan 8 mutasyon sekretazların kesim bölgelerine yakındır (2, 12).

Ekstraselular ortamda, $A\beta_{42}$ birikiminin artması ve amiloid plakların oluşumu kalıtsal Alzheimer hastalığının patogeneğinde görülür. Çok sayıda izoform tek bir genin alternatif splicingi sonucu oluşur. En kısa major izoformlar (695 aminoasitlik) çoğunlukla nöronlarda eksprese edilir. Diğer iki form da (751 ve 770 aminoasit) nöronal ve non-nöronal hücrelerde eksprese edilir. Kısaca, APP polipeptidleri heterojendir. APP sinyal peptidi aracılığı ile endoplazmik retikuluma alınır, oradan fosfat ve şeker grupları ile golgiye taşınır. Golgiden sekretör vezikülle plazma membranına taşınır. Hücre yüzeyinde proteolizis altındaki bazı APP molekülleri α sekretaz ile 16 ve 17. rezidülerindeki 687 lizin ve lösin arasındaki bölgeden kesilir. Alternatif olarak kesilmemiş olan yüzey APP molekülleri katerin kaplı veziküllerle endosite edilir. Diğer bir yolakta ise APP kesimi için β -sekretaz kullanılır ve 99. rezidüde 671. metiyoninden sonra kesim yapılır. Sonra oluşan 12 kDa'luk fragment γ -sekretaz ile 711 valin rezidüsünden kesilirse 40 rezidülük $A\beta$ peptid, 713 izolösin rezidüsünden kesilirse 42 rezidülük $A\beta$ peptid oluşur (15).

2.1.3.2. Presinilin proteini (PSEN)

Yaş ilerledikçe, PSEN'lerin ekspresyonu azalır. Nöronlardaki bu azalma, AH'nın gelişiminde etkilidir. Bunun tersine, astrositler PSEN seviyesine göre nörodejenerasyonda

etkilidir. PSEN1 APP'nin γ -sekretaz ile kesilmesiyle ilişkili olup ekspresyonun % 50'nin altına düşmesine neden olur (2). 1995'te PSEN1 ve PSEN2'nin Alzheimer üzerinde etkili olduğu belirlenmiştir. Bu genler, 467 ve 448 rezidüden oluşan 7-9 transmembran domainden oluşan polipeptid oluşturmaktadır. Bu polipeptidlerin tam fonksiyonları henüz net olarak bilinmemektedir (14). PSEN1 rezidüleri endoplazmik retikulum/golgi kompleksinde bulunmaktadır (17). PSEN ekspresyonundaki küçük bir değişim AH patolojisi ve APP'nin üretimi için major etkili olabilmektedir. Apoptozis boyunca PSEN1 ekspresyonun azaldığı, PSEN2 ekspresyonunun da arttığı belirlenmiştir (2).

PSEN 1 kromozom 14q24.3'deki gen bölgesi tarafından sentezlenirken, PSEN2 kromozom 1q42.1'deki gen bölgesi tarafından sentezlenmektedir. Beyinde PSEN1'in transkripti 2.7 ila 7.5 kb arasında olup, PSEN2 transkripti ise 2.3 kb olup daha düşük seviyededir. Her iki PSEN'de primer olarak nöronlarda ve daha az oranda glia hücrelerinde bulunur. PSEN1 untranslated bölgesi 4 ekson içerip ilk iki eksonla alternatif transkript oluşturur. PSEN1'in promoter bölgesinde delesyon tespit edilmiştir. Önemli PSEN1 promoter bölgesi promoter aktivitesinin % 90'ını kontrol edip -6, -22 bölgeleri arasında belirlenmiştir. Erken gelişen Alzheimer hastalığı ile ilgili yapılan çalışmalarda PSEN1 -48 C→T değişiminin ilişkili olabileceği öne sürülmüştür. Ayrıca 3 kb upstreamdeki -1789 G/A, -2154 G/A, -2319 T_n ve -2823 I/D olmak üzere 4 tip mutasyonu belirlenmiştir. Bunlarda özellikler -2154 G/A ve 2823 I/D mutasyonları erken gelişimli Alzheimer hastalığı ile ilişkili bulunmuştur. Buna ek olarak -280 C/G ve 2818 A/G ise potansiyel etken mutasyonlar olarak öne sürülmüştür. Özellikle, PSEN1 ekspresyon seviyesinin azalmasının Alzheimer hastalığında etkin olduğu öne sürülmektedir (2, 16).

2.1.3.3. Apolipoprotein E (APOE)

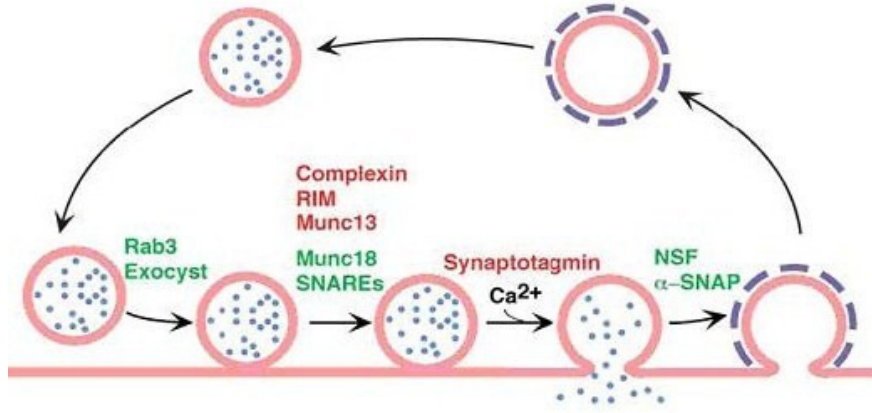
APOE diğer apolipoproteinler gibi karaciğerde sentezlenen bir apolipoproteindir. Fakat bunun yanı sıra bağımsız olarak beyindeki astrositlerde de sentezlenir. APOE lipid transportundan sorumlu bir lipoproteindir. APOE okside olmuş lipidlerin beyinden taşınmasında etkin rol oynar (16). Kolesterol transport proteini olan apolipoprotein E'nin (APOE) familial AH ile ilişkili olduğu düşünülmektedir. Özellikle serebrospinal sıvıdaki durumu incelenmiştir. APOE geni kromozom 19q13'deki bir gen bölgesi tarafından kodlanmaktadır. Kalıtsal olarak ϵ 4 allelinin erken ve geç başlangıçlı AH ile ilişkili olduğu düşünülmektedir. APOE ϵ 2 allelinin ise Alzheimer hastalığına karşı koruyucu bir etkisi olduğu düşünülmektedir. ϵ 4 alleli taşıyan bireylerde, taşımayanlara oranla daha fazla A β

birikimi olduğu belirlenmiştir (14). APOE, sinirlerde hasar tamirinde etkilidir. APOE beyinde sentezlenip astrositlere geçer ve hasar sonrasında aniden artar. Ayrıca, APOE çeşitli dokularda ekspresyon edilir. Ekspresyonu, besin, hormon, doku, hücreye spesifik faktörler ve intraselüler kolesterol seviyeleri gibi etkenler ile düzenlenir. APOE genine ait üç tane enhancer bölge vardır ve nöronal ve non-nöronal hücrelerde aktif haldedir. Astrositlerdeki APOE'nin proksimal promotör elementi cAMP ile sinerjik olarak up-regüle olur. APOE $\epsilon 4$ mRNA seviyesi AH bireylerde normal bireylere oranla daha yüksek oranda tespit edilmiştir (2). APOE'nin allellerinden $\epsilon 4$ AH için en az koruyucu iken $\epsilon 3$ az koruyucu, $\epsilon 2$ ise en fazla koruyucu etkiye sahiptir. Kafkas populasyonunda yapılan bir çalışmaya göre sırasıyla $\epsilon 2$, $\epsilon 3$ ve $\epsilon 4$ allel frekansı % 15, % 94 ve % 25 olarak belirlenmiştir. Özellikle allel 4 taşıyan bayan bireylerin erkek bireylere oranla daha fazla AH'a yakalanma riski taşıdıkları belirlenmiştir (17). APOE'nin nöronal hücrelerdeki ekspresyon varyasyonlarının AH için risk faktörü olabileceği öne sürülmüştür (2).

Tespit edilen ilk varyasyon intron 1 enhancer elementte +113'deki C→G değişimidir. Bunun yanı sıra -491 A/T, -457 T/C -219 T/G olmak üzere üç SNP polimorfizmi belirlenmiş ve bu polimorfizmlerin AH ile ilişkisi olabileceği öne sürülmüştür. Bunların dışında -557 C/T ve -456 C/T polimorfizmleri de belirlenmiştir. AH ile ilgili bahsi geçen genlerin ortak bir mekanizma ile çalışarak etkili oldukları düşünülmektedir (2).

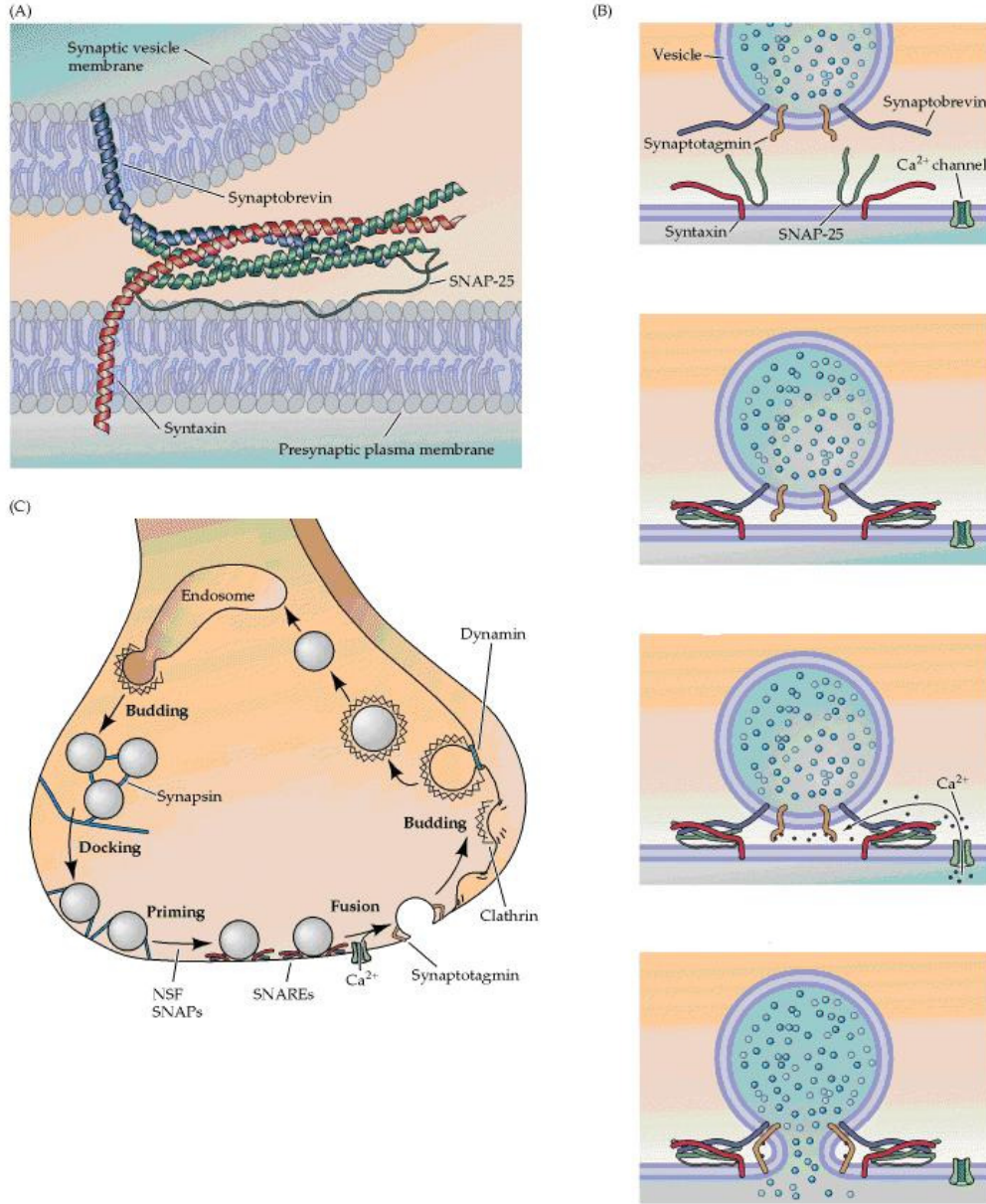
2.2 Sinaptik vezikülün salınım mekanizması

Nörotransmitterlerin düzenli salınımı, nöronal etkileşimi düzenler, öğrenme ve hafıza sensörlerinden sinir sisteminin tüm fonksiyonları bu yolla sağlanır. Sinapslarda nörotransmitterlerin salınım mekanizması presinaptik plazma membranı ile sinaptik veziküllerin Ca^{+} tarafından tetiklenmiş ekzositotik füzyonu ile gerçekleşmektedir. Sinaptik vezikülün ekzositozu temel prensiplere bağlı olmakla beraber, homolog proteinlerle diğer membran proteinlerinin etkileşimine de bağlıdır. Nörotransmitterler sinaptik vezikülü doldurur ve presinaptik plazma membranı olarak bilinen aktif bölgeye doğru ilerler. Aktif bölgeye doğru yaklaşmış olan vezikül "priming" adını alır, füzyon komponentini oluşturur (şekil 2.3). Ca^{+2} girişi ile tetiklenmiş aksiyon potansiyeline yanıt olarak, 'priming' olarak adlandırılan vezikül nörotransmitterleri salmaktadır (17).



Şekil 2.3. Nörotransmitterlerin salınım aşamaları (17).

Ekzositozu takiben, sinaptik vezikül membranları ve seçilmiş proteinler endositozla plazma membranından elde edilir (17). Endositoz ile gelecek döngü için lokalize olur. Füzyon mekanizmasının temelini SNAREs olarak adlandırılan bir protein grubu oluşturur. Yaklaşık 60 aminoasitten oluşan α -helikal bir yapıya sahip protein kompleksidir (6, 17). SNARE hipotezi ile sinapslardaki füzyon mekanizmasını açıklamışlardır (7). Veziküler membranda (sinaptik vezikül membran) bulunan SNARE sistemi v-SNARE olarak adlandırılır. Hedef membrandaki (plazma membran) proteinler ise t-SNARE olarak adlandırılır. v-SNARE yapısı synaptobrevin (VAMP) adı verilen bir proteinden oluşmaktadır (şekil 2.4). t-SNARE ise SNAP-25 (Synaptosomal-associated protein of 25 kDa) ve syntaxin proteinlerinden oluşmaktadır. Bu üç protein füzyon mekanizmasının temelini oluşturmaktadır. (6, 7).



Şekil 2.4. Nörotransmitterlerin salınımının moleküler yapısı: A; SNARE kompleksi yapısını göstermektedir. v-SNARE olarak synaptobrevin (mavi), t-SNARE olarak syntaxin (kırmızı) ve SNAP-25 (yeşil) gösterilmiştir. B; Ca²⁺ tarafından tetiklenmiş vezikül füzyonunu göstermektedir. Plazma membranında ve vezikül membranında bulunan SNARE molekülleri bir kompleks oluşturmaktadır. Sonrasında vezikül membranındaki synaptotagmine bağlanan Ca²⁺ molekülleri plazma membranı üzerindeki moleküllerin sitoplazmaya doğru girişini sağlar ve membran füzyonunu katalizler. C; proteinlerin sinaptik veziküldeki yerleşimini göstermektedir (6).

Presinaptik bölgedeki Ca²⁺ artışının nörotransmitterlerdeki vezikül salınımını nasıl tetiklediği henüz net olarak bilinmemektedir. Bu konuda yapılan moleküler çalışmalarda sinaptik veziküldeki ve plazma membranındaki proteinler önem kazanmıştır. Nörotransmitter salınımında önemli olan proteinlerin bazıları başka hücrelerde de bulunmaktadır. Örneğin; Golgi aparatının membranı ile veziküllerin füzyonu için önemli iki protein bilinmektedir.

Bunlar NSF (NEM-sensitive füzyon protein) ve SNAPs (Soluble NSF–attachment protein). Bu iki proteinin ortak çalışarak diğer proteinlerle oluşturduğu protein kompleksine ise SNAREs (SNAPs receptor) adı verilmektedir. SNARE proteinlerinden sinaptik vezikülde primer olarak bulunan synaptobrevin, plazma membranında ise primer olarak bulunan SNAP-25 ve syntaxin proteinleridir. SNARE proteinleri iki membran boyunca uzanan makromoleküler bir kompleksdir. Önemli bir ayrıntı olarak SNARE proteinlerini ve dolayısıyla nörotransmitterlerin salınımını toksinlerin bloke ettiği tespit edilmiştir. SNARE kompleksine bağlanan başka proteinler tespit edilmiştir (çizelge 2.4). Bunlar; nSec-1, snapsin, syntaphilin, ve tomosyn gibi proteinlerdir. SNARE proteinleri Ca^{+2} a bağlanmadığına göre nörotransmitterler salınırken Ca^{+2} a bağlanan başka moleküller vardır. Kalmodulin içeren çeşitli presinaptik proteinler (CAPS ve munc-13 gibi) Ca^{+2} a bağlanmaktadır. Sinaptik membranda bulunan synaptotagmin de Ca^{+2} a bağlanmaktadır. Synaptotagmin bir Ca^{+2} sensörü gibi davranıp vezikül salınımının tetiklenmesinde rol oynamaktadır. Ratlarda yapılan bir çalışmaya göre; 12 synaptotagmin geninde meydana gelen bir delesyon letal mutasyon olarak tespit edilmiştir. Ancak, synaptotagminin Ca^{+2} a nasıl bağlandığı ve eksositozu nasıl tetiklediği net olarak bilinmemektedir. Tek bilinen Ca^{+2} un bağlanarak synaptotagminin kimyasal yapısını değiştirdiğidir. Bu olay, sinaptik vezikülün füzyonunun son adımını düzenlemektedir (6).

Çizelge 2.4. Sinaptik vezikül ve ilişkili olduğu bilinen proteinler (6).

1- Sinaptik vezikül proteinleri	
Sistein string protein (Cystein String Protein, CSP)	Periferal membran proteini olup, fonksiyonu tam olarak bilinmemektedir.
Sitokrom b561	Dopamine- β -hydroxylase ve peptid amidaz aktivitesi için gereklidir. Sekterör vezikülde bulunan intraveziküler moooksijenaz için gerekli elektron transport proteinidir.
Nörotransmitter transporterları	Bilinen en az 5 tip farklı transpoter vardır. Bunlar; glutamat, asetilkolin, katekolamin, glisin/GABA ve ATP için olanlar sayılabilir.
Rab ve ral protein	Rab3A, rab3C, rab5, rab7 ve ral. Sitosolik ve membran bağlı formlar arasındaki rab proteinleri döngüleri oluştururlar.
Rabphilin-3A	GTP nin bir fonksiyonu olarak rab3A ve rab3C ye bağlanır. Multiple protein kinazlar için substrat olurlar. Ca^{+2} a bağlanabilen C terminal C_2 domainine sahiptir.
Sekretör taşıyıcı membran proteinleri (SCAMPs)	Fonksiyonu tam olarak bilinmeyen transport ve sekretör integral membran proteindir.
SV2s	Fonksiyonu tam olarak bilinmemektedir. Yüksek oranda glikolize

	olmuş proteinlerdir. 12 transmembran bölgesi içerip bakteriyal ve ökaryotik transporterlarla homoloji gösterir.
Sinapsin Ia, Ib, IIa, IIb ve III	N terminal domainleri içeren monotopik membran proteinidir. CaMKI ve protein kinase A için fosforile bölgeler içerir. Fakat C terminalinden ayrılır.
Synaptobrevin (VAMP)	Tetanus toxin ve botulinum toxin B, D, F ve G ile parçalanabilen küçük membran proteinidir.
Synaptogyrin	Tirozini fosforile olmuş bir membran proteinidir. Fonksiyonu bilinmemektedir.
Synaptotagmin	C ₂ domaini olan en az 12 izoformu olan membran proteinidir. Ca ⁺² ve fosfolipitlere bağlanır. Neurexins, AP2 and syntaxinlerle etkileşime girer. Synaptotagmin I ve II hızlı Ca ⁺ -bağımlı neurotransmitter salınımında Ca ⁺² sensörü olarak fonksiyon gösterdiği düşünülmektedir. Diğer syaptotagminlerin fonksiyonları bilinmemektedir.
Klor ve çinko için transport proteinler (kanallar).	Birçok sinaptik vezikülde çinko geri alımı ve glutamat gerialımı için klor akışını düzenler. Çinko transporter endozomal ve plazma membran çinko transport ile homoloji gösterir.
Vakuolar proton pompası	12 den fazla alt ünitesi olan protein kompleksidir.
2. Sinaptik vezikülle ilişkili proteinler	
Amphiphysin	Synaptotagmine AP2 yoluyla bağlanabilen, sinaptik vezikülle ilişkili sinir ucu proteinidir.
AP2 ve clathrin	Sinaptik vezikül üzerinde spesifik reseptöre bağlanan protein kompleksidir.
Ca ²⁺ , calmodulin bağımlı protein kinaz I ve II (CaMKI ve CaMKII)	Fosforile sinapsin ve rabphilin-3A ile ilişkili olduğu düşünülüp, fonksiyonu net olarak bilinmemektedir.
Dynamin-1	Protein kinaz C tarafında fosforile edilmiş olup, endositoz için GTPaz gerektirmektedir. Fakat fonksiyonu net olarak bilinmemektedir.
Dynein	Mikrotübül bazlı sinaptik vezikül transport motor proteinidir. Hücre boyunca aksonal transportun geri dönüşünü düzenler.
GDP-dissociation inhibitors (<u>GDI</u> s)	Sitoplazmik bir kompleks sonucunda, GDP bağlı formda isoprenylenmiş rab proteinlerine bağlanır.
Kinesin	Mikrotübül bazlı sinaptik vezikül transport motor proteinidir.
MSS4	Rab proteinlerinin alt grupları olan rab1, rab3 ve rab8 e bağlanır. Fonksiyonu net olarak bilinmemektedir.
pp60 ^{src}	Synaptophysin ve synaptogyrini fosforile eden tyrosine kinazdır.
3.Sinaptik plazma membran proteinleri	
Munc13s	Phorbol esterlerine bağlanır fakat fonksiyonu bilinmemektedir.
Neurexin	Üç genin alternatif splicingi sonucu oluşan 1000 den fazla hücre

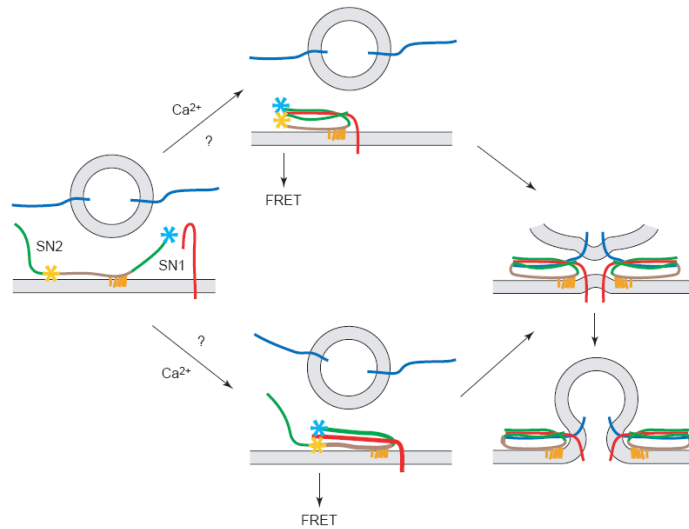
	yüzey proteindir. Nöronlar arasında hücreler arası tanımada etkili olabilir.
SNAP-25	Periferal membran proteindir. Syntaxine bağlanır ve botulinum toxin A ve E tarafından parçalanırlar.
Syntaxin (HPC-1)	Her yerde bulunan membran proteinleridir. botulinum toxin C1 tarafından kesilir ve synaptotagmin, SNAP-25, synaptobrevin, complexins, munc13, SNAP, Ca ²⁺ kanalları ve munc18 lere bağlanır.
Voltage-gated Ca ²⁺ kanalları	Aktif bölgede nörotransmitterlerin salınımı için Ca ²⁺ geçişini düzenler.
RIM	Rab3 e bağlanır. Regüle edilen füzyondaki rab3 aktivitesini düzenler.
4. Plazma membran proteini ile ilişkili proteinleri	
Munc18s	Syntaxine sıkıca bağlanır.
N-ethylmaleimide-sensitive factor (NSF)	Sinaptik vezikül döngüsü boyunca chaperonlara benzer bir fonksiyon gösterebilir.

Sze ve ark' nın (2000) yaptığı bir çalışmaya göre; Alzheimer hastalarının beyinlerinin dört farklı bölgesinde (hipokampus, entorhinal korteks, caudate nucleus ve occipital korteks) immünohistokimyasal olarak yedi farklı presinaptik bölge proteini (synaptobrevin, synaptotagmin, SNAP-25, syntaxin, SV2, Rab3A ve synapsin I) incelenmiştir. Kontrol bireylerle olası/erken başlangıçlı Alzheimer hastaları karşılaştırıldığı zaman, hipokampüste synaptobrevin ve synaptotagminin belirgin oranlarda azaldığı tespit edilmiştir. Belirgin AH ile kontrol bireyleri karşılaştırıldığında; hipokampüste synaptobrevin, synaptotagmin ve Rab3A proteinlerinde, entorhinal kortekste synaptobrevin (VAMP), synaptotagmin ve Rab3A da belirgin miktarda düşüşler tespit edilmiştir. Sonuç olarak, presinaptik vezikül proteinleri ile bilişsel bozukluk arasında bir ilişki olabileceği öne sürülmüştür (9). Shimohama S. ve ark (1997) yaptıkları çalışma sonucunda ise, Alzheimer hastalarında sinaptik vezikül proteinlerinin presinaptik plazma membran proteinlerinden daha hassas olduklarını belirlemişlerdir (10).

2.2.1. SNARE Proteinleri

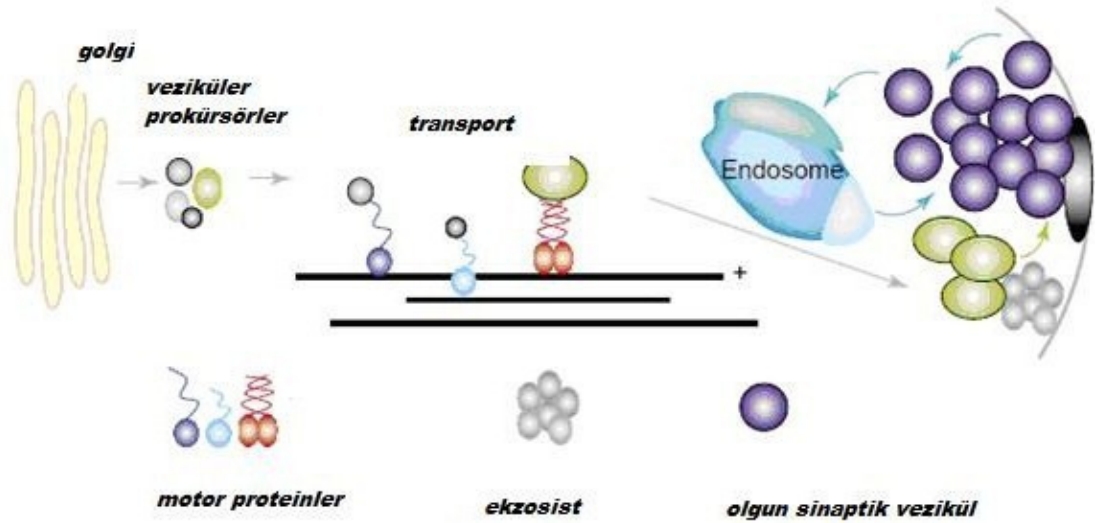
SNARE proteinleri plazma membran proteiniyle kompleks oluşturur ve nöroekzositozu düzenler. Popüler bir teoriye göre, üç presinaptik SNARE proteini vardır; syntaxin, synaptobrevin 2 (VAMP2) ve SNAP-25 proteinleridir. SNARE proteinleri, sinaptik vezikülün füzyon oluşturmada erken ve geç evrede oldukça önemlidir. SNARE proteinlerinin kendiliğinden bir araya gelmesi ve ATPase NSF tarafından katalize edilmiş olması henüz

netleştirilmemiştir. Synaptobrevin, SNARE kompleksinin vezikülde bulunan kısmını oluştururken, syntaxin ve SNAP-25 plazma membran proteinlerindedir. Syntaxin ve SNAP-25 in oluşturduğu kompleks synaptobrevin için bir reseptör gibidir. SNARE kompleksi dörtlü bir kompleksin ürünüdür. Bu dörtlü kompleks bağdan biri syntaxin, ikincisi synaptobrevin ve diğer ikisi SNAP-25 den oluşmaktadır. Bunlar leucine-zipper benzeri etkileşimle bağlanırlar. Bu birleşme kompleksin aynı bölgesinde synaptobrevin ve syntaxinin transmembran bağından oluşur. Bu mekanizmaya göre; SNARE kompleksleri 'zip-up' merkezi porunun açılması ve lipid karışımının katalizasyonunu sağlar. SNAP-25 deki α -helikal yapının syntaxin ile kompleks formasyonunu indüklediği belirlenmiştir. SNAP-25 in N terminaline FRET donörün (Cyon flouresant protein, CFP) yerleşmesi ve FRET acceptörü iki SNARE molekülü arasında bağlantı bölgesi oluşturur. Böylece tüm SNARE molekülü üzerinde değişim oluşmaktadır. Bu oluşuma SNARE kompleks reporter veya SCORE adı verilmektedir. Syntaxinin işaretlenmesiyle bu yapı tanımlanmıştır. İlginç olan Ca^{+2} konsantrasyonu arttığı zaman, FRET sinyalinde artma gözlenmiştir. SNARE katalize vezikül füzyonun aşamaları; syntaxin ve synaptobrevin, plazma membranına ve vezikül membranına sırayla bağlanırlar. Bunu transmembran domain yoluyla yaparlar. SNAP-25 iki SNARE (SN1 ve SN2) domaini içerir. Bunlar birbirine esnek bir bağla bağlanırlar. Belirli bölgeler, SCORE daki acceptor ve FRET moleküllerinin pozisyonunun belirlenmesini sağlar (19). SN1 ve syntaxin arasındaki ikili heliks bağın Ca^{+2} un etkisiyle oluştuğu öne sürülmüştür (şekil 2.5)(19).



Şekil 2.5. SNARE mekanizması (19)

SNARE sistem proteinlerinin nörit gelişiminde etkili olduğu düşünülmektedir. VAMP-2 nin nörotransmitter salınımında etkisi olduğunu belirlemişlerdir. Ancak, VAMP-2 botulinum nörotoksin C ve tetanus nörotoksin ile inhibe edildiği zaman nörit gelişiminin etkilenmediği belirlenmiştir. Yapılan bir başka çalışmada, SNAP-25 in antisense oligonükleotidlerle inhibe edilmesi sonucu nörit gelişiminin etkilendiği, akson gelişimini inhibe ettiği tespit edilmiştir. Bunun tam tersi, syntaxin 1A nın inhibisyonu ise retinal gangliyon nöronlarda ve dorsal gangliyon ayak nöronlarında nörit gelişimini arttırdığı belirlenmiştir. Diğer yandan, botulinum neurotoxin C1 tarafından inhibe edildiği zaman gelişiminde inhibe olduğu tespit edilmiştir (7). Clostridial bakterisi botulinum toxin ve tetanus toksinleri adı verilen maddeleri sentezler. Sinir uçları bu maddeleri alır ve sinaptik vezikül ekzositozunu inhibe eder. Bu maddeler proteazlar gibi intraselüler etki gösterirler. İnsanlarda nöropatiye neden olurlar. Botulinum ve tetanus toksinleri çok spesifik proteazlardır. Bunların büyük bir kısmı tek substrat olarak bilinir. Botulinum toksinleri B, D, F, G, H ve tetanus toksinleri sadece synaptobrevin üzerinde etkili olurlar. Buna karşılık, toksin A ve B sinaptik vezikülde ve plazma membranında bulunan SNAP-25 üzerinde etkili olur. Sadece, toksin C1 SNAP-25 ve SNAP-25 ile iletişimde olan syntaxin üzerinde etkili olur. Bu toksinlerin sinaptik bölgedeki bu proteinler için substrat olması vezikül salınımının priming aşamasında etkili olacaktır (20).



Şekil 2.6. Sinaptik vezikülün golgiden başlayan oluşumu (21).

Sinapslardaki vezikül membran proteinlerinin oluşumu golgi de başlar, golgide oluşan veziküler prekürsor proteinler, motor proteinler ile taşınırlar ve presinaptik membrana yerleşirler (şekil 2.6). Bu gelen proteinler endozomla presinaptik plazma membranına alınırlar. Böylece olgun sinaptik vezikül oluşur. Bu veziküller, genellikle prokürsor sinaptik veziküller olarak adlandırılırlar. Çünkü bunlarda olgun sinaptik veziküllerde olmayan proteinler mevcuttur (21).

2.2.3. Synapsin III proteini ve genetik özellikleri (22q12-13: OMİM *602705)

Synapsinler, nörotransmitterlerin salınımını düzenlemede ve synaptogenesis de etkili olan nöron spesifik sinaptik vezikül associated fosfoproteinler familyasındandır. Synapsinler, fosforile olmuş sinaptik vezikül associated proteindir (8). Synapsinlerin I, II ve III olarak isimlendirilen üç ayrı tipi belirlenmiştir. Bunlar birbirine yakın üç gen bölgesi tarafından kodlanmaktadır. Synapsin I ve II alternatif splicing ürünü olarak belirlenmiştir (22). Synapsinlerin mozaik domainleri vardır. Bütün synapsinler kısa bir amino terminal domaini (A domain) içerir. A domaini protein kinaz A ve CaM kinaz I tarafından fosforile edilir. Bağlayıcı kısım B domain olarak tanımlanmıştır. B domaini, kısa amino asit zincirleri bakımından zengin olup geniş merkez domaini oluşturur. Toplam synapsin sequenslerinin yaklaşık yarısı B domainden meydana gelmektedir. C domaini ise D, E, F ve G domainlerini içeren farklı bir kombinasyondur. Son yıllarda, özellikle kompleks olan C domaini anlaşılmaya çalışılmaktadır. C domaininin yapısal olarak ATP kullanan enzimlerle ilişkili olarak belirlenmiştir. Synapsinler, sinaptik vezikül proteinleri, fosfolipidler, aktinler ve protein kinazlarla etkileşim gösterirler. Bu etkileşimler aracılığı ile sinaptik taşımada rol oynarlar. Synapsinlerin, sinir ucu terminali formasyonu, nörotransmitter salınımı modülasyonu ve sinaps gelişimi ile ilişkili oldukları düşünülmektedir (23). Synapsinler sinaptik vezikülün sitoplazmik yüzeyinde bulunan nöronal fosfoproteinlerdir. Bu grubun tüm üyeleri aynı tip proteinlerden oluşurlar. Nörotransmitter salınımında ve synaptogenesisde etkilidirler. A, C ve E domainleri içerirler, synapsin III bunların dışında birde J domainine sahiptir (24).

Fosfoproteinler familyasından olan synapsinler, presinaptik terminalde hedef sinaptik vezikülde bulunmaktadır. Defosforile olmuş synapsinler, sinaptik veziküllere ve aktin filamentlerine bağlanır. Synapsinler, sinir uçlarındaki nörotransmitterlerin salınımında etkilidir. Primer olarak nöronlarda sentezlenirler. Synapsin Ia ve Ib synapsin I olarak bilinir. Tek bir genin alternatif splicing ürünleri olarak oluşmaktadır. Synapsinler, IIa ve IIb de

synapsin II olarak bilinip yine tek bir genin alternatif splicingi sonucu oluşmaktadır. Sırasıyla 55 ve 74 kDa olarak belirlenmişlerdir. Synapsin I in fosforilasyonu nörotransmitterlerin salınımını düzenler. Synapsin I bir baş veya globuler kısımdan oluşmaktadır. Protein kinaz A (PKA) ve kalmodulin bağımlı protein kinaz (CaMK) tarafından serin rezidüsü fosforlanmaktadır. Synapsin I in kuyruk domainindeki fosforilasyon kalmodulin bağımlı protein kinaz II (CaMKII) tarafından düşürülerek sinaptik veziküle afinite duyar (24). Synapsin gen ailesine ait üç protein de protein kinaz A içeren çeşitli protein kinazlar tarafından fosforile için substratı oluştururlar. Bu protein kinazlar; CaMKII, mitojen aktive edici protein kinaz, siklin bağımlı kinaz 5 (cdk5) dir. Synapsinlerin fonksiyonu kendi fosforilasyon bölgelerini sıkı bir şekilde regüle etmektir. Örneğin, CaMKII tarafından fosforile olan synapsin I, nörotransmitter salınımını düzenler ve aktive bağlanır. Sıklıkla mitojen aktivite edici protein kinaz (MAP kinaz) tarafından synapsin I in fosforilasyonu BDNF (Brain derived neurotrophic factor) yi uyarır ve sinaptik vezikülün eksositozunu indükler. Ayrıca, PKA tarafından synapsinin fosforilasyonu embriyogenezis boyunca nöritlerin gelişimini düzenler (25). Frederikse ve ark' nın (2004) ratlarda yaptığı bir çalışmaya göre; nöronlarda, Alzheimer prokürsor protein ile bağlantılı olduğu bilinen synapsin I, II ve III proteinlerinin embriyonik ve postnatal dönemde lens gelişiminde etkili olduğu belirlenmiştir. Özellikle synapsin III ün fosforlanan Ser₉ bölgelerinin yetişkin lenslerinde, embriyonik döneme oranla büyük oranda azalma olduğunu tespit etmişlerdir (26).

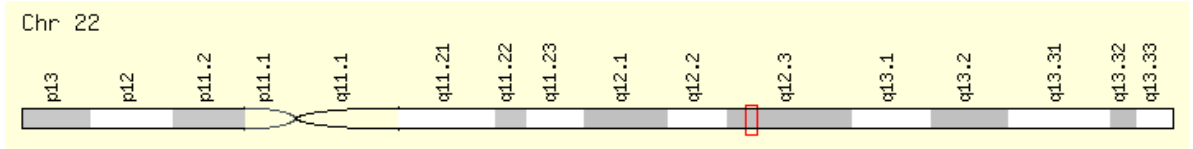
Memelilerde birbirine yakın iki gen bölgesince kodlanan synapsin I ve II den sonra son yıllarda synapsin III belirlenmiştir. İnsanlarda bulunan synapsin III 1998 de tanımlanmıştır. Üç synapsin de birbirine benzer özellikler göstermektedir. Nörotransmitter salınımında olası etkileri olduğu düşünülüp, nöron spesifik organizasyonu ve domain yapısında benzerlikler bulunmaktadır (8). Literatürlerin büyük bir kısmında synapsinin akson ve sinaps formasyonunda etkili olduğu belirtilmiştir. Synapsin I ve II nin olmadığı koşullarda fertilitate ve canlılık veya fertilitate bir bozukluk olduğu ancak, anatomik yapıda bir değişiklik olmadığı tespit edilmiştir (27). Synapsin III geni en az 6 farklı transkript oluşturmaktadır (synapsin IIIa-III f). Synapsin III Synapsin familyasındaki en büyük protein olup, fetal yapıda yetişkin beynine oranla daha fazla bulunduğu belirlenmiştir. Synapsin IIIa da sıklıkla A, C ve F domainleri bulunmaktadır. B ve J domainleri de C ve F domainleri arasında lokalize olmaktadır. Bu domainler, prolin ve glutamine zengin bir bölgedir (28, 29). Synapsin III ün de diğer synapsinler gibi ATP afinitesi vardır. SYN 3 ün C domaini ATP ile bağ kurmaktadır. SYN1 ve SYN2 nin aksine, ATP ile bağ kurmuş SYN 3 kalsiyum tarafından inhibe edilir. Ancak, kalsiyumun SYN1, 2 ve 3 üzerinde regülatör etki gösterdiği tartışılmaktadır (30).

Synapsin III proteini (geneID: 8224, GeneBank accession number: Z83846) kromozom 22q12-q13 gen bölgesi tarafından kodlanmakta olup, 14 ekson bölgesi içermektedir (şekil 2.7). Yaklaşık 380- 400 kb boyutundadır. Ayrıca, 582 aminoasitten oluşmaktadır (23, 27, 28). Genin alternatif splicing sonucu 6 farklı izoformu (synapsin IIIa-f) oluşmaktadır (şekil 2.8) (29). Gen bölgesine ait bilinen fonksiyonel üç polimorfik bölgesi vardır. Bular; 5' upstream promoter bölgede bulunan bölgede bulunan -196 G>A (rs133945), -631 C>G (rs133946) ve 69C>A (ekson 1) polimorfizmleri bilinmektedir (8, 23). Bunların dışında; 408 (ekson 3) Thr136Thr, 1402 (ekson 12) Pro468Ser, 1573 (ekson12) Glu525Gln, 1601 (ekson 12) Pro534Leu, 1601 (ekson 12) Pro534Leu, 1769 G>C polimorfizmleri bilinmektedir. Bu polimorfizmlerle ilişkili yapılmış çeşitli çalışmalar mevcuttur (çizelge 2.5) (28).

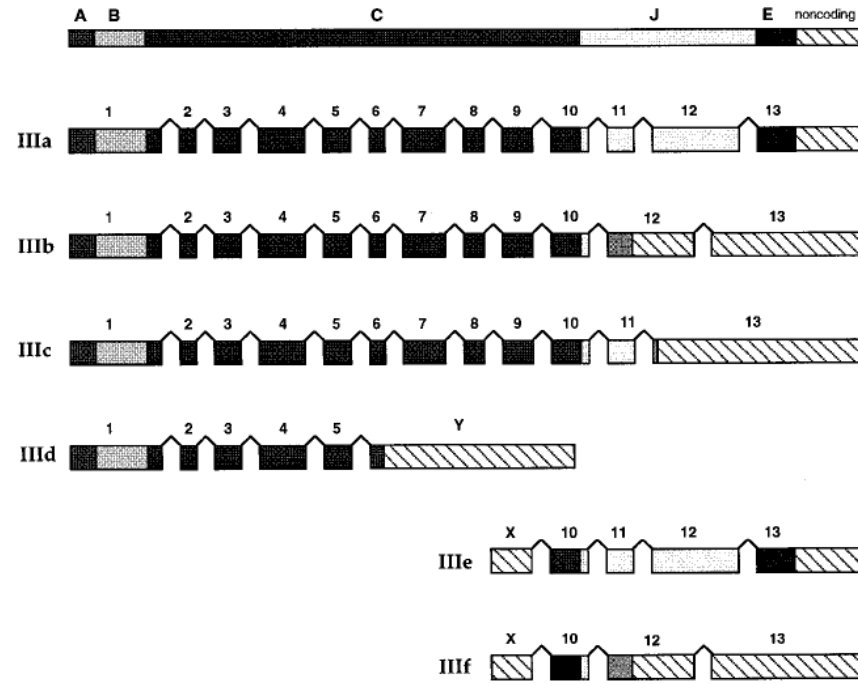
Western blot çalışmalarında şizofren hastalarının bazılarında synapsin I eksikliği olduğu tespit edilmiştir. Sinaptik anormalitenin şizofreni ile ilişkili olduğu düşünülmüştür. Sonuç olarak, Japon populasyonunda yapılan bu çalışmaya göre SYN3 gen polimorfizmi ile şizofren hastalığı arasında bir ilişki tespit edilmemiştir. Ancak özellikle synapsin III 22 numaralı kromozom üzerinde kodlandığı için şizofreni hastalığı ile olan ilişkisi incelenmeye devam edilmektedir (27).

Çizelge 2.5. Synapsin III geni polimorfizmleri ve ilişkisi araştırılan hastalıklar

Polimorfizm	İlişkili olabilecek hastalıklar	İlişkisi	Araştırma
-631C>G polimorfizmi (rs133946)	Şizofreni	Yok	Ohmori O. 2000 (8)
	Şizofreni	Yok	Ohtsuki T. 2000 (27)
	Multiple skleroz	Yok	Liguori M. 2004 (32)
	Multiple skleroz	Yok	Akkad D. 2006 (33)
	Multiple skleroz	Var	Otaegui D. 2009 (34)
-196 G>A polimorfizmi (rs133945)	Şizofreni	Yok	Ohmori O. 2000 (8)
	Şizofreni	Yok	Imai K. 2001 (28)
	Multiple skleroz	Yok	Liguori M. 2004 (32)
	Multiple skleroz	Yok	Akkad D. 2006 (33)
	Bipolar bozukluk	Yok	Lachman H.M. 2006 (35)
Multiple skleroz	Var	Otaegui D. 2009 (34)	
408 (ekson 3) Thr136Thr	Şizofreni	Yok	Imai K. 2001 (28)
1402 (ekson 12) Pro468Ser	Şizofreni	Yok	Imai K. 2001 (28)
1573 (ekson12) Glu525Gln	Şizofreni	Yok	Imai K. 2001 (28)
1601 (ekson 12) Pro534Leu	Şizofreni	Yok	Imai K. 2001 (28)
1769 G>C polimorfizmi	Şizofreni	Yok	Imai K. 2001 (28)



Şekil 2.7. Synapsin III proteinini kodlandığı gen bölgesinin kromozomal lokalizasyonu (31).



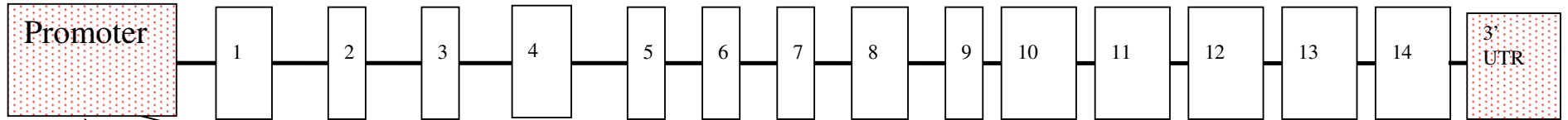
Şekil 2.8. Alternatif splicing sonucu oluşan synapsin III proteinlerine ait transkript ürünleri (29).

SYNAPSİN III GENİ (SYNIII, Genebank Accession Number: Z83846)

22q12-q13

Telomerik Bölge

Sentromerik Bölge



rs133945

rs133946

```
AAGCCAACAAATACATAAGTGGAAACGACCTCCACCCCCTT
AAGAGCAAACAGATACAGCGCTTTCCTGCCCACTGCAGGTG
GTAATGTAATAGGACATCCTTCTGGAAAGG
```

```
ACCAAATGACTACAAAGATGTACAAGTTGAAAGAACAAAACCTTG
GAAATAAAAGAAATCAAAGTGTTAACAGTGATTATATTTTGGTAAC
GCAAGTACATGCCT
```

Şekil 2.9. SYN III geni eksonları ve promotor bölgesi polimorfizmleri. Sarı renkle işaretlenmiş bölgeler primerleri, pembe renkli olarak belirlenmiş bölgeler ise nükleotid değişimi bölgesidir.

2.2.3 Syntaxin 1A proteini ve genetik özellikleri (7p11.23: OMIM *186590)

Syntaxin 1A/HPC-1 proteini ilk kez 1985'de Barnstable ve ark tarafından tanımlanmıştır. 35 kD ağırlığında olup, syntaxin familyasının bir üyesidir (30). Syntaxin proteini SNARE kompleksinin bir parçasıdır. VAMP ve SNAP-25 proteinleriyle kompleks oluşturmaktadır. Kimyasal nörotransmisyonunda etkili rol oynamaktadır. Ayrıca presinaptik terminalde gama aminobütirik asit ve norepinefrin transpoterlarını içeren nörotransmitterlere bağlı başka proteinlerle de bağlantı kurmaktadır. Syntaxin ve norepinefrin transport (NET) bağlantı kompleksi, plazma membran yüzeyindeki taşıma trafiğini düzenler. Syntaxin 1A, Na⁺ ve Cl⁻ bağımlı nörotransmitter transpoterlarla da etkileşim gösterir. SNARE hipotezinin anahtar komponenti olup, Ca⁺ kanallarının düzenlenmesi ile de direk olarak ilişkilidir (36). Gama aminobütirik asit ve NET içeren nörotransmitter associated proteinlerle de bağ kurar. Syntaxin-NET kompleksi plazma membran yüzeyine transporter trafiğini ve transporterın aktivitesini düzenler. Syntaxinler vezikül füzyon olayında etkilidir (35). Sinaptik veziküller Ca⁺ regülasyonu ekzositoz boyunca salınan nörotransmitterleri içerirler. Nörotransmitterlerin spesifitesi sinaptik veziküller ve kalsiyum kanallarının her ikisinin birlikte presinaptik aktif bölgeye lokalizasyonunu gerektirir. Ayrıca, botulinum nörotoksin tip C ile bloke edilirler. Bennett ve ark (1992) 35 kDa ağırlığındaki syntaxin proteini ve 65 kDa ağırlığındaki synaptotagmin arasındaki etkileşimi belirlemişlerdir. P35 ve P65 % 84 oranında benzerlik gösterir (37).

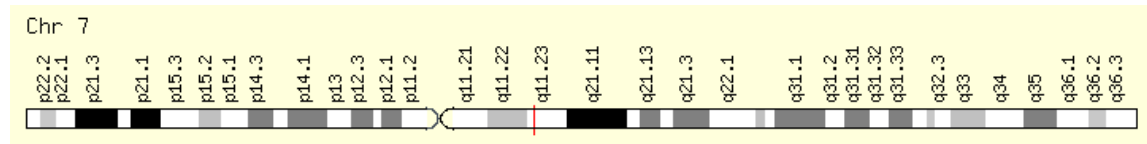
Syntaxin proteinleri sinir sisteminde eksprese edilmektedir. Yapılan çalışmalar sonucunda syntaxin 1A'nın Alzheimer hastalığı ile ilişkili olan PSEN1 ile bağlantılı olduğu tespit edilmiştir (38). Naren ve ark (2000) syntaxin 1A'nın solunum epitelyum hücrelerinde eksprese edildiğini ve sadece nöronlara spesifik bir protein olmadığını tespit etmişlerdir. Sinaptik vezikülün eksositozunun ilk aşaması için syntaxin, SNAP-25 ve synaptobrevinin oluşturduğu SNARE kompleksinin oluşturulması gerekmektedir. Spesifik olarak SNARE motifine bağlanan syntaxinin amino terminali diğer SNARE proteinleriyle etkileşime geçer. Syntaxinin N terminaline ayrıca, UNC13 proteini de bağlanmaktadır. Syntaxin 1A'nın homologu Sso1 dur (39). Syntaxin 1A ve serotonin transporter (SERT) in etkileşiminin serotoninin geri alımında etkili olduğu düşünülmüştür. Ayrıca, syntaxin 1A'nın sinaptik sinyalde pozitif regülatör olduğu da belirtilmiştir. Nöronal ekzositoz, kalsiyum ve 3 SNARE proteinin varlığıyla gerçekleşir. Bunlar sinaptik veziküldeki VAMP, plazma membranındaki SNAP-25 ve syntaxindir. Nöronal SNARE proteinleri membrana parallel 4-heliks

yapısındadır. Plazma membranındaki 5-8 syntaxin transmembran segmentleri füzyon porlarını oluşturmaktadır (36).

Syntaxin 1A proteini 7q11.2 deki gen bölgesi tarafından sentezlenmektedir (şekil 2.10) (nakayama 1997). Syntaxin 1A geni (GenBank Acc. No: U12918, Gen ID: U12918) ekson 3 T>C (rs3793243), intron 7 T>C (rs1569061) ve ekson 8 G>A polimorfizmleri tespit edilmiştir (40). Syntaxin 1A geni 10 kb uzunluğunda olup, 10 eksondan meydana gelmiştir. Syntaxinin 1A'nın transmembran bazı rezidülerinde ve gen bölgelerinde mutasyonlar belirlenmişlerdir (41, 42). Ayrıca, syntaxin 1A geni polimorfizmi ile bazı hastalıklar arasındaki ilişkiler de araştırılmıştır (çizelge 2.6).

Çizelge 2.6. Syntaxin 1A geni polimorfizmleri ile ilişkisi araştırılan hastalıklar.

Polimorfizm	İlişkili olabilecek hastalıklar	İlişkisi	Araştırma
Ekson 3 (D68D) T>C polimorfizmi(rs3793243)	Tip II diyabet	Var	Tsunoda K 2001 (41)
	Şizofreni	Var	Wong A.H.C 2004 (36)
İntron 7 T>C polimorfizmi (rs1569061)	Şizofreni	Var	Wong A.H.C 2004 (36)
	Şizofreni	Yok	Kawashima K. 2008 (43)
rs867500 polimorfizmi	Şizofreni	Yok	Kawashima K. 2008 (43)
rs4363087 polimorfizmi	Şizofreni	Yok	Kawashima K. 2008 (43)
rs3793243 polimorfizmi	Şizofreni	Yok	Kawashima K. 2008 (43)
rs875342 polimorfizmi	Şizofreni	Yok	Kawashima K. 2008 (43)
rs6951030 polimorfizmi	Şizofreni	Yok	Kawashima K. 2008 (43)
rs9654749 polimorfizmi	Şizofreni	Yok	Kawashima K. 2008 (43)
rs2030921 polimorfizmi	Şizofreni	Yok	Kawashima K. 2008 (43)



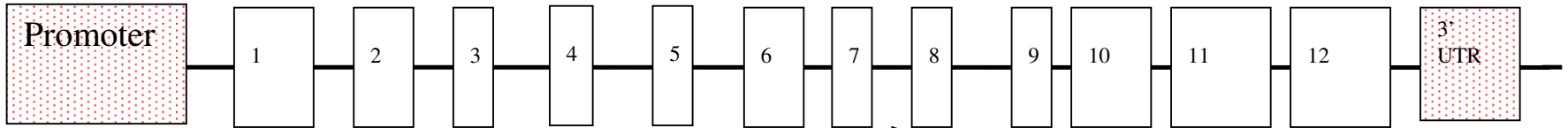
Şekil 2.10. Syntaxin 1A proteininin kodlandığı gen bölgesinin kromozomal lokalizasyonu (31).

SYNTAXİN 1A GENİ (STX1A, Genbank Accession Number: U12918)

7p11.23

Telomerik Bölge

Sentromerik Bölge



rs3793243

```
CAGAGGTCCCGTGAGGCCTCCTGGCAGCAGCCCCTTC
CCGAGGCTTGTGGGGCCTGAAACCCGTCCCCGCCCCA
CACACTCACTCTCGTCG↓GGGTTGGGGGATGCCAGGA
TGGCACTGTGCTTCCGCTTACCTCCTCCACGTTCTCTGC
GATCTTGCAATGAAGCCTCGAATCTCCTCCACCTGCGG
ACCAAGGCCAGGTGGTCAGGAGAAGGAAATCAGGGGA
GAAGCCTTCTGGGGCCAGAGATGGCCCAGAGTAG
```

rs1569061

```
CGCTGACATTTATGTGACC TCAGCCTGGTGT TTTCCCCTCTC
TGGGACTCTTCCTTCCCTAAAACCTGCCTTACAAGGGTCT
GTGTCCAAATACTGTCCAGACCCAGCACTAGGGGT CATGG
ACGT↓AGGGAACATGGTGAGGGGGTCATGGCAGGAGGG
ATGGGGCCTACACTCACCCAGAGGCCAAAGATGGCGGGGT
TCCC ACTCTCCAGCATGTCCTCCAGCTCCTCACTGGTCGTG
GTCCTGCCGGCTGCAAGCGAGTGGGGTCACACTGAGCCCA
GCCCTCTTCGGG GAGTTCAGCAGCAGCATTG
```

Şekil 2.11..Syntaxin 1A geni eksonları, ekson 3 ve intron 7 polimorfizmleri. Pembe renkli belirtilen bölge RE enzimleri ile tanınan nükleotid değişim bölgeleridir.

2.2.4. Synaptobrevin (VAMP) proteini ve genetik özellikleri (17p13.1: OMIM *185881)

Sinaptik vezikül proteinleri hücre içinde belli bir seviyede üretilir ve sinaptik veziküllerin membran prokürsorlerinden aksonlara doğru taşınırlar. Bu proteinlerden biri olan VAMP2 proteini kültür ortamında hippocampal nöronlarda sentezlenmiş olup, VAMP1 ve synaptotagmin 1(syt1) ile yüksek oranda homoloji gösterir (44). Her iki proteinin de proline zengin amino terminalinde etkinliği maksimum düzeyde olup, VAMP2 nin amino terminal ucu synaptophysin (sypI) ile etkileşime girer. VAMP2 sinaptik veziküllerin plazma membranına bağlanan bölgelerinde bulunur. VAMP2 ve sypI in birlikte ekspresyonu VAMP2 nin sinaptik veziküle doğru yerleşmesine yardımcı olur. VAMP proteini 1 den 8 e kadar farklı gruplarda adlandırılmıştır. VAMP2, 7 ve 8 eksositik yolda görev almaktadırlar. Pankreatik acinar hücreleri ve parotidin sekretör granül membranında VAMP2 ve VAMP8 proteinlerinin varlığı belirlenmiştir. Ayrıca clostridial nörotoksinler tarafından parçalandıkları bilinmektedir. VAMP2 nin sitosolik ucu sypI ile etkileşim kurar ve sinaptik veziküldeki görevi için bu oldukça önemlidir. Kültüre edilen nöronların aksonlarında, VAMP2 ekspresyonu daha fazla tespit edilmiştir. SypI, VAMP2 nin sinapslara yerleşmesinde direk olarak etkilidir. SytI ve VAMP2 sypI e ihtiyaç duymazlar (44). SNARE kompleksinde SNAP-25 ve Syntaxin ile kurduğu bağ VAMP2 nin oldukça önemlidir. Özellikle sinir hücrelerindeki sekretör yolağın düzenlenmesinde etkilidir (45). Ekzositoz oluşurken v-SNARE in en önemli bileşenlerinden biri, VAMP2 olarak belirlenmiştir. VAMP7 ekzositozda minör bir etmen iken, lizozomal transportta görev almaz, VAMP-8 ise yine v-SNARE yapısında bulunmaktadır (46). Ayrıca botulinum ve tetanus toksinleri VAMP1 ve VAMP2 yi inhibe edip nörotransmitter salınımını engeller. Ratlarda yapılan bir deneyde; VAMP2-VAMP3 ve VAMP8-VAMP2 mutant formları oluşturulmuş ve bu ratların doğumun hemen sonrasında öldüğü tespit edilmiştir (47).

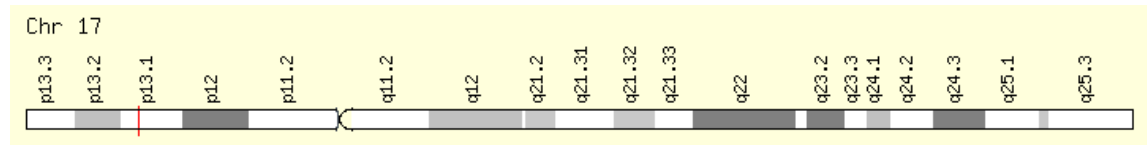
VAMP2, nörotransmitterlerin salınımında oldukça önemlidir. Syntaxin 1A ve SNAP-25 ile stabil bir bağ kurar. Ayrıca synaptophysin ile de belirgin bir kompleks oluşturur. Presinaptik terminalde, sinaptik vezikülün atılımında ve füzyonundaki core kompleksinin bir komponenti olarak bulunur (9). VAMP2 presinaptik bölgede bulunan SNARE kompleksi yapısında bulunur. SNARE kompleksde membran füzyon mekanizmasının merkezini oluşturur. Membran füzyonu Ca^{+} sensörleri ile regüle edilir. Synaptotagminin Ca^{+} sensörü olarak etki gösterdiği düşünülmektedir (45). Presinaptik plazma membran associated proteinleri (t-SNAREs); SNAP-25 ve syntaxinin oluşturduğu kompleks sonradan VAMP ile

bağ kurar (48). Synaptobrevin nöronlarda vezikül için spesifik küçük bir integral membran proteindir. Synaptobrevin 1 ve 2 yi kodlayan genleri cozmid klonlarla izole edip, farklı intron boylarına rağmen homoloji gösterdiğini tespit etmişlerdir. Nörotransmitterlerin salınımında oldukça önemlidir. Syntaxin 1A ve SNAP-25 ile stabil bir bağ kurar. Ayrıca synaptophysin ile de belirgin bir kompleks oluşturur. Syntaxin 1A nın homologu Sso1, SNAP-25 in homologu ise Sec 9 dur (30). Yapılan bir çalışmada VAMP2 nin nörit gelişimini tetiklediği tespit edilmiştir (49).

VAMP2 proteini 116 aminoasitten oluşur. VAMP2 geni yaklaşık 3 kb uzunluğunda olup, 5 ekson içerir (30). VAMP2 proteini kromozom 17p13.1 deki gen bölgesi tarafından kodlanmaktadır (şekil 2.12-13). Gen bölgesine ait 1970- 1995 bölgeleri (GenBank Acc. No: AF152105, Gen ID: AF152105) arasında polimorfik CpG adacığında 26 bp lik insersiyon/delesyon polimorfizmi tanımlanmıştır. Bu polimorfizm, VAMP2 geninin 3' ucunun 2 kb uzağında bulunmaktadır (50). VAMP2 genine ait üç SNP (Single Nucleotide Polymorphism) rs8067606, rs1061032, rs2278637 bölgesi bulunmaktadır. Bu üç polimorfizmin fluvoxamine yanıtına etkisi olup olmadığı araştırılmış, belirgin bir etkisi olmadığı tespit edilmiştir (45). Ayrıca bu polimorfik bölgeler ile şizofreni hastalığı arasındaki ilişki de araştırılmıştır (çizelge 2.7).

Çizelge 2.7. VAMP2 geni polimorfizmleri ile ilişkisi araştırılan hastalıklar.

Polimorfizm	İlişkili olabilecek hastalıklar	İlişkisi	Araştırma
rs8067606, rs1061032, rs2278637 polimorfizmleri	Majör depresyon	Yok	Saito S. 2006 (45)
	Şizofreni	Yok	Kawashima K. 2008 (43)



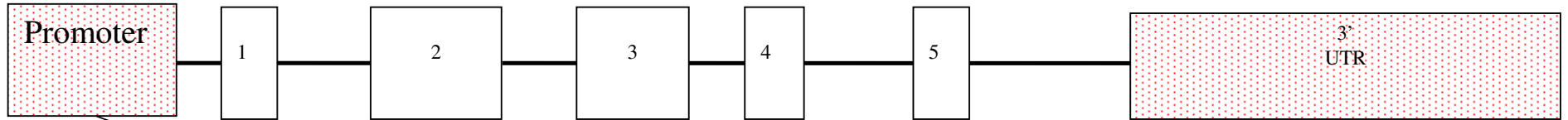
Şekil 2.12. VAMP2 proteinini kodlandığı gen bölgesinin kromozomal lokalizasyonu (31).

SYNAPTOBREVİN GENİ (VAMP2, Genebank Accession Number: AF152105)

17p13.1

Telomerik Bölge

Sentromerik Bölge



```
ACAAAGTGCGCCTTATACGCTGCCACCGCTCACGTCTGCGCCTGCGT  
GCAGGTCACGCTCGCTGCGCCTGCGCAGATTAGCAGCCGTGGTTA  
AGAGTGTCGTCAAGGAAAATCCC
```

Şekil 2.13. VAMP2 geni eksonları ve promoter bölgesi 26 bp Ins/Del polimorfizmi. Sarı ile işaretlenmiş olan kısımlar primerleri göstermektedir.

2.2.5. SNAP-25 (Synaptosomal-associated protein of 25 kDa) proteini ve genetik özellikleri (20p11.2: OMİM 6000322)

SNAP proteini 25 kDa ağırlığında 206 aminoasitten oluşmaktadır. İlk defa 1994 de fare hipokampusunda nöron spesifik gen olarak tanımlanmıştır. Sinaptik vezikül membranındaki taşıma ve boşaltım yolağında presinaptik plazma membranında görev aldığı belirlenmiştir (9, 51). Graps ve ark (1996) ribbon sinapsları olmayan retinadaki konvensiyonel sinaptik terminalde belirlemişlerdir. Bu bölge santral sinir sistemine bilgi taşımada anahtar rol oynadığı saptanmıştır (52). Mc New ve ark hücrelerden SNARE proteinlerini izole edip tanımlamışlardır (53). Nöronal eksositoz kalsiyumla birlikte 3 SNARE proteini gerektirir. Bunlar; synaptobrevin (sinaptik vezikülde), syntaxin ve SNAP-25 (plazma membranındaki). SNARE kompleks formasyonu için uygun serbestlikte SNAP-25 (Genbank Acc. No: D21267) ve syntaxinin varlığını belirlemişlerdir. SNARE proteinleri normal sitoplazma yüzeyine dönük olup, füzyon için helikal domainler membranla bağ kurar (30). SNAP-25 in SNAP-25a ve SNAP-25b olmak üzere iki izoformu vardır. SNARE kompleksinde yer alan formları; SNAP-25a, SNAP-25b ve SNAP-23 dür (51).

Hücre yüzeyindeki t-SNARE (syntaxin 1A ve SNAP-25) ve VAMP2 domainlerinin spontan olarak birleştiği belirlenmiştir. Biyolojik membranlarda etkili olan SNARE yapıları bu şekilde oluşmaktadır (42). Vezikül üzerinde yeniden yapılanmış olan SNAP-25, syntaxin ve synaptobrevin gibi normal SNARE proteinleriyle, membran füzyonunu düzenlerler. Kalsiyum girdiğinde, SYT1 in sitoplazmik bölümü membran füzyonunu güçlü bir şekilde stimüle eder. Bu arada, synaptobrevin dansitesi normal vezikülde olduğu gibidir. SYT1 stimüle olmuş füzyonun kalsiyum bağımlılığı veziküldeki lipid kompozisyonundaki değişimle düzenlenir ve botulinum nörotoxin A ile SNAP-25 in kesilerek katlanması gerçekleşir. Füzyonun stimülasyonu Ca^{+} bağlanma aktivitesinin bozulmasıyla iptal olur veya SYT1 in C2 domainlerinin çeşitliliğiyle gerçekleşir (19).

SNAP-25 presinaptik vezikül trafiğini düzenleyen merkez kompleksin bir parçasıdır. SNAP-25 yetişkin beyninde özellikle sinir hücrelerinde sentezlenip, yüksek sinaptik plastisite bölgeleri ile ilişkilidir. SNAP-25 in iki izoformu vardır; SNAP-25a ve SNAP-25b. Bu iki izoform aynı başlangıç, bitiş ve translasyon bölgesine sahiptir. SNAP-25 sinaptik taşınmada integral rol oynayan presinaptik plazma membran proteindir. SNAP-25 nörotransmitter salınımında görev alıp, syntaxin ve sinaptik vezikül proteinleri (synaptobrevin, synaptotagmin) ile kompleks oluşturmaktadır. Beyinde farklı bölgelerde sentezlenmektedir; primer olarak neocorteks, hipokampus, anterior thalamic nuclei, substantia nigra ve cerebellar

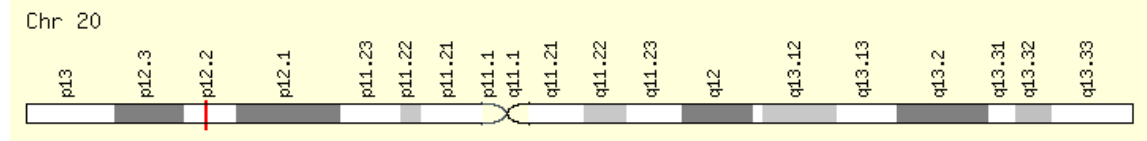
granül hücrelerinde bulunmaktadır (54). Özellikle sinir hücrelerinde sentezlenen presinaptik plazma membran proteinidir. Sinaptik vezikül füzyonunda ve nörotransmitter salınımında görev alır. Syntaxin 1A ve VAMP-2 ile kompleks oluşturur. Bu kompleks Ca⁺ yardımıyla nörotransmitterlerin salınımında presinaptik membranda sinaptik vezikülün füzyonunda etkin rol oynarlar. SNAP-25 ayrıca, etylmaleimide sensitive fasyon protein (NSF), synaptotagmin, α , β , γ SNAP larla kompleks kurabilir. Nörotransmisyonunda etkili rol oynamaktadır (55). Yetişkin fare beyinde SNAP-25b oranı SNAP-25a ya oranla daha fazla bulunur. Gelişme döneminde SNAP-25a mRNA oranı fazla iken post-natal dönemde SNAP-25b daha fazla bulunmaktadır (51).

SNAP-25 vezikül taşınım trafiğinde merkez kompleksi oluşturduğu için nörotransmitter salınımında etkilidir. SNAP-25 yetişkin beyin hücrelerinde oldukça fazla oranda sentezlenmekte olup yüksek sinaptik plastisite bölgeleri ile ilişkilidir. Bundan dolayı nörotik gelişim ve sinaptogenesiz için oldukça önemlidir (56). Ekspresyon çalışmaları SNAP-25 in beyinde farklı miktarlarda eksprese edildiğini göstermiştir. Primer olarak; neokorteks, hipokampus, anterior thalamic nuclei, substantia nigra ve cerebeller granül hücrelerinde bulunduğu tespit edilmiştir. Gelişme boyunca, sinaptik plastisite ve aksonal gelişim için oldukça önemlidir. Fakat yetişkin beyni sinir sisteminde genellikle sadece presinaptik terminalde bulunur (57). SNAP-25 in insülin mekanizmasında da görev aldığı belirtilmiştir. Buna bağlı olarak, SNAP-25 anomalilerinin kilo alımı ve glukoz regülasyonunu etkilediği düşünülmektedir. SNAP-25 geninin antipsikotik hastalıklarının çoğunda etkili aday bir gen olabileceği belirtilmiştir. Şizofreni hastalarının beyinlerinde yapılan post-mortem araştırmalarda neokorteks, hipokampus ve cerebellumda SNAP-25 oranında azalma olduğu tespit edilmiştir. Buna karşılık frontal cortexte ise ya hiç değişim olmadığı ya da artış olduğu belirlenmiştir (55). SNAP-25 disfonksiyonu nöropsikiyatrik hastalıkların patogeneğinde etkili olduğu belirlenmiştir. Şizofreni, Alzheimer ve hiperaktivite hastalığında etkili olabileceği düşünülmüştür (55).

SNAP-25 (Genebank acc. no: D21267, Gen ID: D21267) proteini kromozom 20p11.2 de bulunan bir gen bölgesi tarafından kodlanıp, 12 eksondan oluşmaktadır (şekil 2.14-15) (31, 57). Toplam uzunluğu 1584 bp dir. SNAP-25 genine ait tespit edilen üç polimorfizm bilinmektedir. Bunlar; 3' UTR bölgede *MnII* T/G (rs3746544); *DdelI* T/C (rs1051312) ve *TaiI* T/C (rs8636) polimorfizmleri olarak tespit edilmiştir (56, 58). Bu polimorfizmler ile şizofreni, hiperaktivite gibi hastalıklar arasındaki ilişki araştırılmış ve çoğunlukla ilişkili olduğu belirlenmiştir (çizelge 2.8).

Çizelge 2.8. SNAP-25 geni polimorfizmleri ile ilişkisi araştırılan hastalıklar.

Polimorfizm	İlişkili olabilecek hastalıklar	İlişkisi	Araştırma
MnII T/G (rs3746544)	Şizofreni	Var	Müler D.J. 2005 (56)
	Şizofreni	Var	Musil R. 2008 (58)
	Hiperaktivite	Var	Brophy K. 2002 (55)
	Hiperaktivite	Var	Barr CL. 2000 (59)
Ddel T/C (rs1051312)	Şizofreni	Yok	Müller D.J. 2005 (56)
	Hiperaktivite	Var	Brophy K. 2002 (55)
	Hiperaktivite	Var	Barr CL. 2000 (59)
	Şizofreni	Var	Musil R. 2008 (58)
TatI T/C (rs8636)	Şizofreni	Var	Müller D.J. 2005 (56)
	Şizofreni	Var	Musil R. 2008 (58)
İntron1 mikrosatellit (TAAA) _n polimorfizmi	Hiperaktivite	Var	Mill J. 2005 (51)



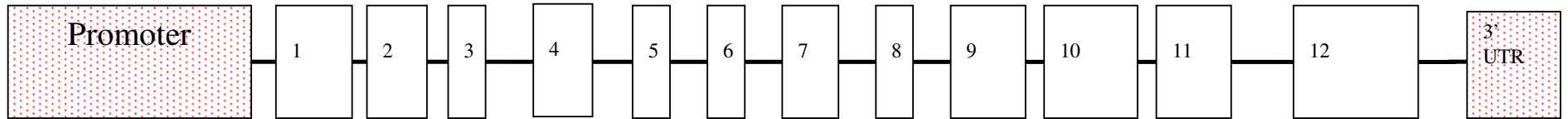
Şekil 2.14. SNAP-25 proteininin kodlandığı gen bölgesinin kromozomal lokalizasyonu (31).

SNAP-25 GENİ (Genebank Accession Number: D21267)

20p11.2

Telomerik Bölge

Sentromerik Bölge



TTCTC↓CTC CAAATGCTGTCGGCAAGATAGCTCCTTCATGCTTT
TTCATGGTATTATCTAGTAGGTCTGCACACATAACACACATCAGTC
CACCCCATTTGTAATGTTGTCCTGTGTCATCTGTCAGCTTCCAAC
AATACTTGTGTCCTTTGTTCTCTCTTGGTCTCTTCTTTCCAAAGGT
TGTACATAGTGGTCATTTGGTGGCTCTAA↓CTCC TTGATGT C↓
TTGA GTTTCATTTTTTCA TTTTCTCTCCTCGGTGG

Şekil 2.15 SNAP-25 geni eksonları ve 3' UTR bölgedeki *MnII* ve *DdeI* polimorfizmleri. Pembe ile belirtilen kesim bölgesi *DdeI* polimorfizmi için, mavi ile belirtilen kesim bölgeleri *MnII* polimorfizmi için belirlenen kesim bölgesidir.

3- GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Hasta ve Kontrol Gruplarının Toplanması

Bu çalışmada, Mersin Üniversitesi Araştırma ve Uygulama Hastanesi Nöroloji Polikliniğine başvuran, Alzheimer tanısı konmuş 29'u kadın, 38'i erkek olmak üzere 67 bireyden gerekli bilgilendirme yapıp onay alındıktan sonra, hasta grubu oluşturuldu. Ayrıca, kendisinde ve ailesinde herhangi bir nöropsikiyatrik hastalığı olmayan, 38'i kadın, 40'ı erkek olmak üzere toplam 78 sağlıklı birey alınarak kontrol grubu oluşturuldu. Kontrol grubundaki bireylerin yaş ortalaması 71.05 ± 4.95 , hasta grubunda ise 73.5 ± 10.07 olarak belirlendi. Çalışmamızın çalışma grupları oluşturulmadan önce Mersin Üniversitesi Etik Kurulu onayı alındı.

Hastalardan ve kontrol grubundaki bireylerden DNA izolasyonu için 7-8 ml venöz kan 1 ml % 2'lik Etilendimetiltetraasetik asitli (EDTA) içeren, 15 ml'lik santrifüj tüplerine konuldu. DNA izolasyonuna kadar -20°C de saklandı. Bu kanlardan tuz çöktürme yöntemiyle DNA izolasyonu yapıldı (60).

3.2. Kullanılan Araç ve Gereçler

3.2.1. Aletler ve Cihazlar

- Termal Cyclers (Techne Flexigene, Cambridge, UK)
- Elektroforez Tankı (EC Midicell EC 350, 20x20cm)
- Elektroforez Güç Kaynağı (EC 135-90)
- Jel Görüntüleme Sistemi (Vilber Lourmat Marne La Vallée, France)
- Manyetik Karıştırıcı (Nüve MK 418)
- Mikrodalga Fırın (Alaska)
- Hassas Terazî (AND GR-200)
- Mikrosantrifüj (Hermle, Z160M)
- Vorteks (VELP)
- Santrifüj (Nüve NF 800)
- Mikropipet Seti (Eppendorf)
- Derin Dondurucu (Arçelik-2031 D)

- Etüv (Nüve EN-500)
- Otoklav (Nüve OT 4060 V)
- Buzdolabı (Arçelik 8188 NF)
- ABI 3100 Genetic Analyzer

3.2.2. Kimyasal Maddeler

- 100 bp DNA ladder GeneRuler marker (Fermentas, SM 0241)
- 10X PCR Buffer with $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$
- dNTP Mix (Fermentas R0242)
- 25 mM MgCl_2
- Agarose Plus (Prona agarose plus, E.U)
- Amonyum asetat (Merck A735215 615)
- Bidistile Su (Sigma W-3500)
- Borik Asit (Carlo Erba 302177)
- Etilendimetiltetraasetik asit (EDTA) (Sigma 3341160)
- Etanol (Riedel-de Haen 32221)
- Ethidium Bromide (Sigma E-1510)
- Orange G (Sigma O-3756)
- Primerler (0.2 μmol sıkalasında HPSF purification)
- Proteinaz-K (Sigma P-2308)
- Sodyum Dodasil Sülfat (SDS) (Sigma L-5750)
- Taq DNA Polimeraz (Fermentas EP 0402)
- Tris-Hidroklorid (Sigma T-7149)
- Trizma Base (Sigma T-6066)
- *Alw26I* (*BsmAI*, Fermentas, ER0031, GCCTC(1/5)↓)
- *BseMI* (*BsrI*, Fermentas ER0881, ACTGG (1/-1)↓)
- *DdeI* (Promega R-6295, C↓TNAG)
- *Hpy99 I* (New England Biolab R0615L, CGWCG↓)
- *MnII* (Fermentas ER1072, CCTC(7/6) ↓)
- *TaiI* (*HpyF3I*, Fermentas ER1142, ACGT↓)

3.2.3.Çözeltiler

1. Nuklei Lizis Tamponu

Tris-HCl.....1.576 gr

NaCl.....23.4 gr

Na₂EDTA.....0.7 gr

1 lt distile suya tamamlanıp çözdükten sonra, otoklavda sterillendi ve + 4 °C'de saklandı.

2. 10 mg/ml Proteinaz K Çözeltisi

100 mg Proteinaz K, 10 ml steril distile su ile çözümlenerek hazırlandı ve – 20 °C'de saklandı.

3. 10 M Amonyum asetat Solüsyonu

148 gr Amonyum asetat

200 ml distile suda çözünür.+4 °C de saklanır.

4. % 10 SDS Solüsyonu

10 gr SDS 100 ml distile suda çözüldü.

5. TE (Tris-HCl) Tamponu

Tris-HCl.....0.394 gr

Na₂EDTA.....0.093 gr

250 ml distile suya tamamlanıp çözdükten sonra, otoklavda steril edildi ve +4°C'de saklandı.

6. 10XTBE (Tris-Borat-EDTA) Tamponu

Trizma Base.....108 gr

Borik asit54.8 gr

EDTA.....5.44 gr

Distile su ile 1lt'ye tamamlanarak çözüldü.

7. Orange G çözeltisi

Na₂ EDTA.....2,232 gr

Orange G.....200 mg

60 ml Gliserol ve 40 ml distile sudan oluşan solüsyon içerisinde çözüldü.

8. Elektroforez Yürütme Tamponu

10X TBE tamponundan distile su ile seyreltilerek hazırlanmış olan 1X TBE içerisine 0.5 µg/ml konsantrasyonunda olacak şekilde ethidium bromide (EtBr) konularak hazırlandı.

9. % 3'lük Agaroz Jel Solüsyonu

140 ml 1X TBE tamponu içerisinde 4.2 gr agaroz (Agarose plus) mikrodalga fırında eritildikten sonra 0.5 µg/ml konsantrasyonunda olacak şekilde EtBr eklenerek, hazırlandı.

3.3.Yöntemler

3.3.1. DNA izolasyonu

DNA izolasyonu tuz çöktürme yöntemine göre yapıldı (60). Yöntem, lökositlerde bulunan DNA dışındaki tüm yapıların bozularak parçalanması, yoğun bir tuz çözeltisi ile çöktürülmesi ve üstte kalan sıvı kısımda bulunan DNA'nın etil alkol yardımı ile yoğunlaştırılarak DNA'nın elde edilmesi esasına dayanır.

1.Gün İşlemleri

1. İçinde yaklaşık 7-8 ml kan bulunan 15 ml'lik santrifüj tüpü üzerine soğuk steril distile su ilave edilerek yaklaşık 13 ml'ye tamamlandı.
2. Karışım 2-3 dk. hızlı olarak aşağı yukarı karıştırıldı.
3. 10 dk. 2000 rpm'de oda ısısında santrifüj edildi.
4. Supernatant atıldıktan sonra peletin üzerine soğuk steril distile su ilave edilerek yaklaşık 13 ml'ye tamamlandı.
5. 10 dk. 2000 rpm'de santrifüj edildi ve supernatant atıldı.
6. Bu işlem yaklaşık 4-5 kez tekrarlandı.
7. Pelet üzerine 3 ml nüklei lizis buffer eklendi.

8. 50µl proteinaz K (10mg/ml), 500µl 5M sodyum perklorat ve 200µl %10 SDS eklendi.
9. Tüp aşağı yukarı alt üst edilerek bir gece 37 °C’de etüvde inkübe edildi.

2. Gün İşlemleri

10. 2 ml amonyum asetat ilave edilip hızlıca yaklaşık 20 defa aşağı yukarı karıştırıldı.
11. Oda ısısında 10 dk bırakıldı ve 15 dk 3500 rpm’de santrifüj edildi.
12. Supernatant başka bir tüpe alınır ve 2 katı oranında soğuk absolü etanol eklendi. Dikkatli olarak karıştırıldı ve DNA otomatik pipet ucuyla çekmeden uca sarılarak alındı.
13. 500 µl TE içeren tüpe alındı ve oda ısısında çözüldü (24 saat oda ısısında tutuldu).
14. DNAse inaktivasyonu için 80 °C’de 10 dk tutuldu.

3.3.2. Moleküler Analiz

3.3.2.1. VAMP2 (Synaptobrevin) geni 26 bp Ins/Del polimorfizminin belirlenmesi

PCR, tek bir molekül DNA’yı dahi çoğaltabileceğinden, reaksiyon karışımlarının DNA molekülleri ile kontamine olmasının engellenmesi gerekmektedir. Bu kontaminasyon, daha önceki PCR reaksiyonu, eksojen DNA veya diğer hücrel materyallerden kaynaklanıyor olabilir. Bu nedenle, kullanılan sarf malzemeleri ve solüsyonların steril olmasına dikkat edildi. Ayrıca PCR reaksiyonunda, ısı iletiminden kaynaklanabilecek sorunların en az düzeye indirilmesi için, ince duvarlı DNAase ve RNAase enzimlerinden arındırılmış steril 0,5 ml’lik PCR tüpleri (Axygen Thin-Walled PCR Tubes), reaksiyonun gerçekleştirilmesi için Thermal Cycler cihazı ve 0,5-10 µl’lik, 2-20 µl’lik ve 10-100 µl’lik otomatik pipetler kullanıldı.

Çalışmamızda öncelikle, VAMP2 gen bölgesinin amplifikasyonu için PCR yapıldı. Sonuçta, 116 ve 90 bp lik PCR ürünleri elde edildi. Daha sonra yapılan elektroforez işlemi ile elde edilen DNA parçacıklarının uzunluklarına göre allel değerlendirilmesi yapıldı. VAMP2 geni 26 bp lik insersiyon/ delesyon için PCR işleminde kullanılan primerler aşağıda verilmiştir (50).

VAMP2F 5' - ACAAAGTGC GCCTTATACGC-3'

VAMP2R 5' - GGGATTTTCCTTGACGACACTC-3'

Uygulanan PCR protokolü:

10 örnek için

Distile su.....	170 µl
10X PCR buffer (NH ₄)SO ₄ lü	25 µl
2 mM dNTP mix.....	25 µl
VAMP2F.....	5 µl
VAMP2R.....	5 µl
Taq DNA Polimeraz (5U/µl).....	2 µl
25 mM MgCl ₂	15 µl
Hedef DNA.....	1 µl

PCR şartları;

95 °C	2 dak.	} 35 döngü
95 °C	45 sn.	
57°C	1 dak.	
72 °C	1.5 dak.	
72 °C	7 dak.	

VAMP2 geni Ins/Del polimorfizmi için sadece PCR protokolü uygulandı ve elde edilen PCR ürünü % 3' lük agaroz jel üzerinde yürütülerek alleller elde edildi. Ins/Ins genotipi: 116 bp; Ins/Del genotipi: 116, 90 bp; Del/Del genotipi: 90 bp olarak tanımlandı.

3.3.2.2. SNAP-25 geni *MnII*, *DdeI* polimorfizmlerinin belirlenmesi

SNAP-25 gen bölgesinin amplifikasyonu için PCR yapıldı. Sonrasında 261 bp lik PCR ürünü elde edildi. Daha sonra, PCR örneklerinin üzerine Restriction Endonuclease (RE) enzimleri yardımıyla Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) işlemi gerçekleştirildi. Her iki polimorfik bölge aynı PCR ürünü üzerinde bulunmaktadır. Bundan dolayı bir çift primer kullanılmakta ve farklı RE enzimleri ile RFLP gerçekleştirilmektedir. *MnII* T/G (rs3746544) polimorfizmi için *MnII* (Fermentas ER1072) enzimi kullanıldı. *DdeI* T/C (rs1051312) polimorfizmi için ise *DdeI* (Promega R-6295) enzimi kullanıldı. Elektroforez işlemi ile elde edilen DNA parçacıklarının uzunluklarına göre allel değerlendirilmesi yapıldı. SNAP-25 geni *MnII*, *DdeI* polimorfizmleri için PCR işleminde kullanılan primerler aşağıda verilmiştir (59).

SNAP-25 F 5'- TTCTCCTCCAAATGCTGTCG- 3'

SNAP-25 R 5'- CCACCGAGGAGAGAAAAT G- 3'

PCR ortamı VAMP2 için uygulanan PCR prosedürünün iki katı kadar miktarda hazırlandı.

Uygulanan PCR protokolü:

10 örnek için

Distile Su.....	340 µl
10X PCR buffer (NH ₄)SO ₄ lü	50 µl
2 mM dNTP mix.....	50 µl
SNAP-25 F.....	10 µl
SNP-25 R.....	10 µl
Taq DNA Polimeraz(5U/µl).....	4 µl
25 mM MgCl.....	30 µl
Hedef DNA.....	1 µl

PCR şartları;

95 °C2 dak.

95 °C45 sn.

58 °C1 dak.

72 °C1.5 dak.

72 °C7 dak.

35 döngü

PCR sonrası ürün ikiye bölündü ve *DdeI* ve *MnII* enzimleri yardımıyla 37 °C de bir gece RFLP uygulandı. RFLP sonrası % 3 lük agaroz jel yardımıyla alleller belirlendi. SNAP-25 geni *MnII* ve *DdeI* polimorfizmleri için sadece PCR ve RFLP yöntemleri uygulandı ve elde edilen PCR ürünleri % 3'lük agaroz jel üzerinde yürütülerek alleller elde edildi.

SNAP-25 geni *MnII* polimorfizmi için; T/T genotipi: 256, 5 bp, T/G genotipi: 256, 210, 46, 5 bp, G/G genotipi: 210, 46, 5 bp olarak tanımlanmıştır. SNAP-25 geni *DdeI* polimorfizmi için; T/T genotipi: 261 bp, T/C genotipi: 261, 228, 33 bp, C/C genotipi: 228, 33 bp olarak tanımlanmıştır.

3.3.2.3. Synapsin III geni -196 G>A ve -631C>G polimorfizminin belirlenmesi

Synapsin III geni promoter bölgesinin amplifikasyonu için PCR yapıldı. Daha sonra yapılan PCR örneklerinin üzerine Restriction Endonuclease (RE) enzimleri yardımıyla Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) işlemi gerçekleştirildi. Promoter bölgedeki -196 G>A (rs133945) polimorfizmi için *Alw26I* (*BsmAI*, Fermentas, ER0031) enzimi ile 37 °C de bir gece inkübasyonla RFLP işlemi gerçekleştirildi. Synapsin III -196 G>A polimorfizmi için; A/A genotipi: 116 bp, G/A genotipi: 116, 100 ve 16 bp, G/G genotipi: 100, 16 bp olarak tanımlanmıştır.

Synapsin III geni -196 G>A polimorfizmi için uygulanan PCR işleminde kullanılan primerler aşağıda verilmiştir (32).

SYN2F 5'- TCCTTTCCAGAAGGATGTCC 3'

SYN2R 5'- AAGCCAACAAATACATAAGTGGAGA 3'

Synapsin III geni promoter bölgedeki -631 C>G (rs133946) polimorfizmi için PCR yapıldıktan sonra, *BseNI* (*BsrI*, Fermentas, ER0881) enzimi ile 65 °C de 3 saat inkübasyonla

RFLP işlemi gerçekleştirildi. Synapsin III geni polimorfizmlerinin her ikisi için de aynı PCR protokolleri kullanıldı. Synapsin III geni -196 G>A ve -631C>G polimorfizminin belirlenmesi için PCR ve RFLP yöntemleri uygulandı ve elde edilen PCR ürünü % 3'lük agaroz jel üzerinde yürütülerek alleller tespit edildi. Synapsin III -631C>G polimorfizmi için; C/C genotipi: 105 bp, G/C genotipi: 105, 84, 21 bp, G/G genotipi: 84, 21 bp olarak tanımlanmıştır. Synapsin III geni -631 C>G polimorfizmi için PCR işleminde kullanılan primerler aşağıda verilmiştir (32).

SYN1F 5'- AGGCATGTACTTGCGTTACC-3'

SYN1R 5'- ACCAAATGACTACAAAGATGTACCA-3'

Uygulanan PCR protokolü:

10 örnek için

Distile Su	170 µl
10X PCR buffer (NH ₄)SO ₄ lü	25 µl
2 mM dNTP mix.....	25 µl
SYN1F.....	5 µl
SYN1R.....	5 µl
Taq DNA Polimeraz (5U/µl).....	2 µl
25 mM MgCl ₂	15 µl
Hedef DNA.....	1 µl

PCR şartları;

95 °C	2 dak.	} 35 döngü
95 °C	45 sn.	
58 °C	1 dak.	
72 °C	1.5 dak.	
72 °C	7 dak.	

3.3.2.4. Syntaxin 1A geni ekson 3 ve intron 7 polimorfizminin belirlenmesi

Syntaxin1A geni intron 7 polimorfizmi (rs1569061) için PCR yapıldı. Sonuçta 312 bp lik bir PCR ürünü elde edildi. Daha sonra yapılan PCR örneklerine *TaiI* (Fermentas ER1142) enzimi ile 65 °C de 3 saat inkübasyonla RFLP işlemi gerçekleştirildi. Sonra, elektroforez işlemi ile elde edilen DNA parçacıklarının uzunluklarına göre allel değerlendirilmesi yapıldı. Syntaxin 1A intron 7 gen polimorfizmi için; T/T genotipi: 312 bp, T/C genotipi: 312, 186, 126 bp, C/C genotipi: 186, 126 bp olarak belirlendi. Syntaxin1A geni intron 7 polimorfizmi için PCR işleminde kullanılan primerler aşağıda verilmiştir (36).

STAX2F 5'- CAATGCTGCTGCTGAACTC- 3'

STAX2R 5'- CGCTGACATTTATGTGACC- 3'

Uygulanan PCR protokolü:

10 örnek için

Distile su.....	170 µl
10X PCR buffer (NH ₄)SO ₄ lü	25 µl
2 mM dNTP mix.....	25 µl
STAX2F	5 µl
STAX2R	5 µl
Taq DNA Polimeraz (5 U/ µl).....	2 µl
25 mM MgCl ₂	15 µl
Hedef DNA.....	1 µl

PCR şartları;

95 °C	2 dak.	
95 °C	45 sn.	} 35 döngü
53 °C	1 dak.	
72 °C	1.5 dak.	
72 °C	7 dak.	

Syntaxin1A geni ekson 3 (D68D) polimorfizmi (rs3793243) için PCR yapıldı. Daha sonra yapılan PCR örneklerine *Hpy99I* (New England Biolab R0615L) enzimi uygulandı.

Elektroforez işlemi ile elde edilen DNA parçacıklarının uzunluklarına göre allel değerlendirilmesi yapıldı. Syntaxin1A geni ekson 3 polimorfizmi için PCR işleminde kullanılan primerler aşağıda verilmiştir. T/T genotipi: 263 bp, T/C genotipi: 263, 174, 89 bp, C/C genotipi: 174, 89 bp olarak belirlenmiştir (36).

STAX1F 5'- CTACTCTGGGCCATCTCTG- 3'

STAX1R 5'- CAGAGGTCCCGTGAGGCCTC- 3'

Uygulanan PCR protokolü:

10 örnek için

Distile su.....	170 µl
10X PCR buffer (with KCl)	25 µl
2 mM dNTP mix.....	25 µl
STAX1F	5 µl
STAX1R	5 µl
Taq DNA Polimeraz (5 U/ µl).....	2 µl
25 mM MgCl ₂	15 µl
Hedef DNA.....	1 µl

PCR şartları;

96 °C	2 dak.	} 35 döngü
96 °C	45 sn.	
63 °C	1 dak.	
72 °C	1.5 dak.	
72 °C	7 dak.	

3.3.3. DNA Dizi Analizi

İnsan Genom Projesi gibi büyük projeler çok sayıda DNA dizi analizi yapılmasını gerektirmektedir. Artan analiz sayısı, uzun zaman ve yüksek iş gücü gerektirir. Bu gelişmeler sonucunda otomasyon kaçınılmaz olmuştur. Otomatik DNA dizi analizleri zaman kazancı yanında, standart çalışma koşulları ve elde edilen sonuçların değerlendirilmesinde de yarar sağlamıştır. Otomatik DNA dizi analiz cihazları basit olarak, sabit bilgisayarda yüklü

programlar ile bu programların yönettiği elektroforez sistemini içerir. Elektroforetik birimlerde bulunan lazer ışık kaynağı ile monokromatik bir ışık oluşturulur. Söz konusu DNA' nın bulunduğu jel matriks bu monokromatik ışık ile taranır. Elektroforez süresince DNA' ya bağlanan floresan boya ışık ile taranan bölgeye geldiğinde uyarılır. Uyarılan boya kendisi için karakteristik olan dalga boyunda ışığı geri yansıtır. Yansıyan bu ışık demeti bir detektör tarafından kaydedilir. Kaydedilen veriler bilgisayar programları ile değerlendirilerek sonuçlar grafiksel ya da matematiksel olarak bilgisayar ekranına aktarılır. DNA dizi analizi cihazlarında 6 bazdan 1000 baza kadar güvenli okuma yapılabilmektedir. Bu çalışmada gerçekleştirilen DNA dizi analizlerinde ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, USA) kullanılmıştır.

Bu çalışmada, syntaxin 1A geni ekson 3 polimorfizmi PCR ürünleri DNA dizi analizine tabi tutulmuştur. Bu yöntemle polimorfik bölge net olarak tanımlanmıştır. Sekans analizi için yaklaşık 40 µl PCR örneği hazırlandı ve 15 örnek primerlerle birlikte sekans analizi için Ortadoğu Teknik Üniversitesinde (ODTÜ) bulunan Teknokent deki Ref-Gen firmasına gönderilerek sekans analizi sonuçları elde edildi. Değerlendirme yapılırken, genedoc, clustalx, mega4 ve finchTV programları kullanıldı.

1. Sekans için kullanılan reaktifler: BigDye Cycle Sequencing kit v.3.1
2. Reaksiyon içinde kullanılan DNA miktarı 10 ng/uL
3. Reaksiyon içinde kullanılan primer miktarı 3.2 pmol/uL dir.
4. Cycle Sequencing sonrası purifikasyon yöntemi: Sodyum Asetat-EDTA-Ethanol purifikasyon yöntemi kullanıldı.
5. Dizi analiz için kullanılan cihaz: ABI 3100 Genetic Analyzer

Elde edilen sekans analizi sonuçları PCR-RFLP sonuçlarıyla karşılaştırılarak veriler oluşturuldu.

3.4. İstatistiksel Analiz

İstatistiksel analizler, SPSS (Statistical Package for Social Sciences, version 10.0) Paket Programı ve Helix Tree Genetics Data Analysis Software Paket Programları kullanılarak yapıldı. Hardy Weinberg dengesinde olup olmadığına belirlemek için analiz yapılmıştır.

VAMP2 geni 26 bp Ins/Del polimorfizmi, SNAP-25 geni *MnII*, *DdeI* polimorfizmleri, synapsin III geni -196 G>A ve -631C>G polimorfizmleri, syntaxin 1A geni ekson 3 ve intron 7 polimorfizmleri ile Alzheimer hastalığı arasındaki ilişki, genotip açısından, çoklu lojistik regresyon modeli ile, allel açısından ise ki-kare analizi ile SPSS (Statistical Package for Social Sciences, version 10.0) paket programı kullanılarak değerlendirildi. Örneklerin Hardy Weinberg (HW) dengesinde olup olmadığı değerlendirildi. Ayrıca, Helix Tree Genetics Data Analysis Software programı kullanılarak Linkage Disequilibrium (LD) tespiti yapıldı.

4. BULGULAR

Bu çalışmada, VAMP2 (Synaptobrevin) geni 26 bp Ins/Del polimorfizmi, SNAP-25 geni *MnII*, *DdeI* polimorfizmleri, synapsin III geni -196 G>A ve -631C>G polimorfizmleri, syntaxin 1A geni ekson 3 ve intron 7 polimorfizmleri ile Alzheimer hastalığı arasındaki ilişki araştırıldı. Çalışmamızın grupları oluşturulmadan önce Mersin Üniversitesi Etik Kurulu onayı alındı. Mersin Üniversitesi Araştırma ve Uygulama Hastanesi Nöroloji Polikliniğine başvuran, Alzheimer hastalığı tanısı konmuş 29'u kadın, 38'i erkek olmak üzere 67 hasta ile gerekli bilgilendirme yapıp onay alındıktan sonra, hasta grubu oluşturuldu. Ayrıca, kontrol grubu oluşturmak amacıyla, kendisinde ve ailesinde herhangi bir nöropsikiyatrik hastalığı olmayan, 38'i kadın, 40'ı erkek olmak üzere toplam 78 sağlıklı birey gerekli bilgilendirme ve onay alındıktan sonra kontrol grubu oluşturuldu. Bu iki grupta bulunan bireylerin yaşları arasında belirgin bir fark olmadığı belirlendi ($p=0.064$). Kontrol grubundaki bireylerin yaş ortalaması 71.05 ± 4.95 , hasta grubunda ise 73.5 ± 10.07 olarak belirlendi (çizelge 4.1). VAMP2 (Synaptobrevin) geni 26 bp Ins/Del polimorfizmi, SNAP-25 geni *MnII*, *DdeI* polimorfizmleri, synapsin III geni -196 G>A ve -631C>G polimorfizmleri, syntaxin 1A geni ekson 3 ve intron 7 polimorfizmleri allel ve genotipleri tespit edildi (çizelge 4.2, 4.3).

Çizelge 4.1.. Kontrol ve Hasta Gruplarında Yaş Ortalamaları

		GRUP		TOPLAM
		Kontrol n (%)	Alzheimer n (%)	
Cinsiyet	Erkek	40 (% 51.3)	38 (% 56.7)	78
	Kadın	38 (% 48.7)	30 (% 43.3)	67
Toplam		78 (%53.8)	68 (% 42.6)	145

n= Birey sayısı

Çizelge 4.2. Çalışılan tüm genlerin genetik özellikleri

Gen	Kromozomal Lokalizasyon	Polimorfizm	rs numaraları	Genbank Acc. No	Gen ID
VAMP2	17p13.1	Ins/Del polimorfizmi	-	AF152105	6844
SNAP-25 geni	20p11.2	<i>MnII</i> polimorfizmi	rs3746544	D21267	6616
		<i>DdeI</i> polimorfizmi	rs1051312		
Synapsin III geni	22q12-13	-196 G>A Polimorfizmi	rs133945	Z83846	8224
		-631 C>G polimorfizmi	rs133946		
Syntaxin 1A geni	7p11.23	Ekson 3 polimorfizmi	rs3793243	U12918	6804
		İntron 7 polimorfizmi	rs1569061		

Çizelge 4.3. Çalışılan tüm genlerin PCR-RFLP şartları ve sonuçları

Gen	Polimorfizm	Primerler	Annealing Isısı	RE enzimi	PCR ürünü
VAMP2	ins/del polimorfizmi	F5' ACAAAGTGCCTTATACGC 3' R5' GGGATTTTCCTTGACGACACTC 3'	57 °C	-	Ins alleli:116 bp Del alleli:90 bp
SNAP-25 geni	MnII polimorfizmi	F5' TTCTCCTCCAAATGCTGTCG 3' R5' CCACCGAGGAGAGAAAATG 3'	58 °C	MnII	T alleli:256, 5 bp G alleli:210, 46, 5 bp
	DdeI polimorfizmi	R5' CCACCGAGGAGAGAAAATG 3' F5' TTCTCCTCCAAATGCTGTCG 3'		DdeI	T alleli:261 bp C alleli:228, 33 bp
Synapsin III geni	-196 G>A polimorfizmi	F5' TCCTTTCCAGAAGGATGTCC 3 R5' AAGCCAACAAATACATAAGTGGAGA 3	58 °C	Alw26I	A alleli:116 bp G alleli: 100, 16 bp
	-631 C>G polimorfizmi	F5' AGGCATGTACTTGGCATTACC 3' R5' ACCAAATGACTACAAAGATGTACCA 3'		BseNI	C alleli:105 bp G alleli:84, 21 bp
Syntaxin 1A geni	Ekson 3 polimorfizmi	F5' CTA CTCTGGGCCATCTCTG 3' R5' CAGAGGTCCC GTGAGGCCTC 3'	63 °C	Hpy99I	T alleli:263 bp C alleli:174, 89 bp
	İntron 7 polimorfizmi	F5' CAATGCTGCTGCTGAACT C 3 R5' CGCTGACATTTATGTGACC 3'	57 °C	TaiI	T alleli:312 bp C alleli:186, 126 bp

4.1. Synapsin III geni -196 G>A ve -631 C>G polimorfizmleri bulguları

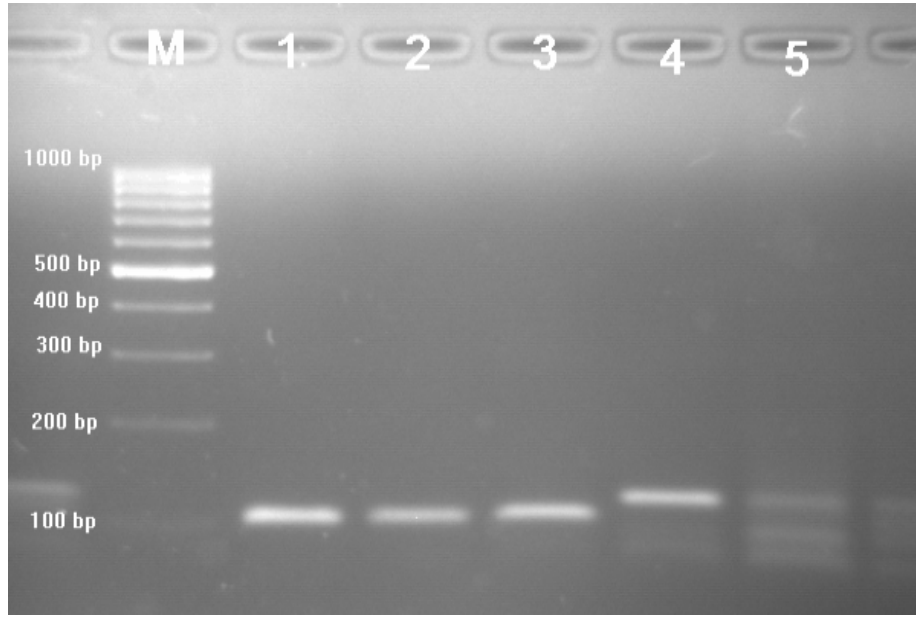
4.1.1. Synapsin III geni -196 G>A polimorfizmi bulguları

Synapsin III geni -196 G>A ve -631 C>G polimorfizmleri PCR-RFLP yöntemleri ile yapıldı. Elde edilen PCR-RFLP sonuçları agaroz jel elektroforezinde yürütüldükten sonra, elde edilen bantlar “Vilber Lourmat Marne La Vallée, France” marka jel görüntüleme sistemi ile görüntülenerek bilgisayar ortamına aktarıldı. Synapsin III geni -196 G>A polimorfizmi için; A/A genotipi:116 bp, G/A genotipi: 116, 100 ve 16 bp, G/G genotipi: 100, 16 bp olarak tespit edildi (şekil 4.1).

Deneyler sonunda, 67 Alzheimer hastası ve 78 kontrol grubu bireyden oluşturulan gruplar araştırıldı. Gruplar, Synapsin III geni -196 G>A polimorfizmi açısından değerlendirildi. Hasta grubunda Hardy Weinberg (HW) dengesinde olmadığı belirlendi ($p=0.015$). Kontrol grubunda ise; HW dengesinin olduğu belirlenmiştir ($p=0.492$).

Alzheimer hastalarında tespit edilen genotip dağılımı; A/A genotipi 21 (% 30.9), G/A genotipi 24 (% 35.3), G/G genotipi 23 (% 33.8) olarak belirlenmiştir. Kontrol bireylerinde tespit edilen genotip dağılımı; A/A genotipi 17 (% 21.8), G/A genotipi 27 (% 53.8), G/G genotipi 19 (% 24.4) olarak belirlenmiştir (çizelge 4.4). Synapsin III geni -196 G>A polimorfizmi ile Alzheimer hastalığı arasında anlamlı bir ilişki tespit edilmiştir ($p=0.03$). G/A genotipinin Alzheimer hastalığı açısından koruyucu etkisi olduğu belirlenmiştir ($p=0.008$).

Alzheimer gruplarına ait allel dağılımı: A alleli; 66 (% 48.5), G alleli; 70 (% 51.5) olarak belirlenmiştir. Kontrol grubuna ait allel dağılımı: A alleli; 76 (% 48.7), G alleli; 80 (% 51.3) olarak belirlenmiştir (çizelge 4.5). Allel sayıları ile gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki yoktur ($p=0.974$).



Şekil 4.1. Synapsin III geni -196 G>A polimorfizmi elektroforez sonrası fotoğrafı. 1,2 ve 3 numaralı örnekler G/G genotipinde, 4 numaralı örnek A/A genotipinde, 5 numaralı örnek ise G/A genotipindedir.

Çizelge 4.4. Synapsin III geni -196 G>A polimorfizmi gruplara göre genotip dağılımı.

		GRUP		Toplam
		Kontrol n (%)	Alzheimer n (%)	
Synapsin III -196 G>A	A/A	17 (% 21.8)	21 (% 30.9)	38
	G/A	42 (% 53.8)	24 (% 35.3)	66
	G/G	19 (% 24.4)	23 (% 33.8)	42
Toplam		78 (% 53.4)	68 (% 46.6)	146

n: birey sayısı

Çizelge 4.5. Synapsin III geni -196 G>A polimorfizmi gruplara göre allel dağılımı.

Synapsin III -196 G>A	Allel	GRUP		Toplam
		Kontrol n (%)	Alzheimer n (%)	
	G	80 (% 51.3)	70 (% 51.5)	150
	A	76 (% 48.7)	66 (% 48.5)	142

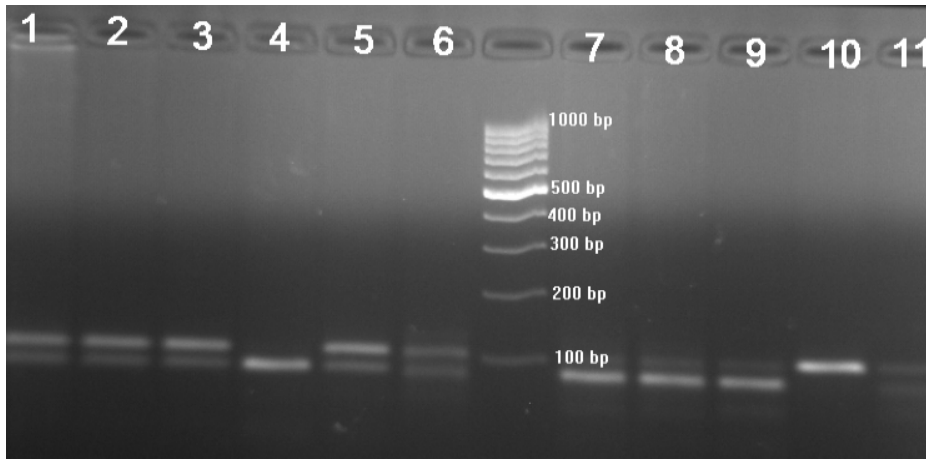
N:Allel sayısı

4.1.2. Synapsin III geni -631 C>G polimorfizmi bulguları

Synapsin III geni -631C>G polimorfizmi için; C/C genotipi: 105 bp, C/G genotipi: 105, 84, 21 bp, G/G genotipi: 84, 21 bp olarak belirlenmiştir (şekil 4.2). Synapsin III geni -631 C>G polimorfizmi açısından örnekler değerlendirildiğinde, Hasta grubu ve kontrol grubunun HW dengesinde olduğu belirlenmiştir (p=0.907, p=0.905). Alzheimer hasta

grubundaki genotip dağılımı; G/G genotipi 21 (% 30.9), G/C genotipi 24 (% 50.0), C/C genotipi 13 (% 19.1) olarak belirlenmiştir. Kontrol bireylerinde tespit edilen genotip dağılımı; G/G genotipi 15 (% 19.2), G/C genotipi 39 (% 50.0), C/C genotipi 24 (% 30.8) olarak belirlenmiştir (çizelge 4.6). Synapsin III geni -631 C>G polimorfizmi ile gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki yoktur (p=0.139).

Synapsin III geni -631 C>G polimorfizmi açısından Alzheimer hastası ve kontrol bireylerinde allel dağılımı; Alzheimer hastalarına ait allel dağılımı; G alleli 76 (% 55.9), C alleli 60 (% 44.1) olarak belirlenmiştir. Kontrol grubuna ait allel dağılımı; G alleli 69 (% 44.1), 87 (% 55.9) olarak belirlenmiştir (çizelge 4.7). Synapsin III geni -631 C>G polimorfizmi için; Allel sayıları ile gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki vardır (p=0.047). G alleleline sahip olan bireyler C alleleline sahip olan bireylere oranla 1,5 kat daha risk altında olmaktadır.



Şekil 4.2. Synapsin III geni -631 C>G polimorfizmi elektroforez sonrası fotoğrafı. 1, 2, 3, 5, 6, 11 numaralı örnekler C/G genotipine, 4, 7, 8, 9 numaralı örnek G/G genotipine, 10 numaralı örnek C/C genotipine sahiptir.

Çizelge 4.6. Synapsin III geni -631 C>G polimorfizmi gruplara göre genotip dağılımı.

Synapsin III -631 C>G	Genotip	GRUP		Toplam
		Kontrol n (%)	Alzheimer n (%)	
	G/G	15 (% 19.2)	21 (% 30.9)	36
	C/G	39 (% 50.0)	34 (% 50.0)	73
	C/C	24 (% 30.8)	13 (% 19.1)	37
Toplam		78 (% 53.4)	68 (% 46.6)	146

n: birey sayısı

Çizelge 4.7. Synapsin III geni -631 C>G polimorfizmi gruplara göre allel dağılımı.

Synapsin III -631 C>G	Allel	GRUP		Toplam
		Kontrol n (%)	Alzheimer n (%)	
	G	69 (% 44.1)	76 (% 55.9)	145
	C	87 (% 55.9)	60 (% 44.1)	147

N:Allel sayısı

4.2. VAMP2 (Synaptobrevin) geni 26 bp Ins/Del polimorfizmi bulguları

VAMP2 geni 26 bp/del polimorfizmi PCR yöntemi elde edildi. PCR sonuçları, agaroz jel elektroforezinde yürütüldükten sonra, elde edilen bantlar “Vilber Lourmat Marne La Vallée, France” marka jel görüntüleme sistemi ile görüntülenerek bilgisayar ortamına aktarıldı. VAMP2 geni 26 bp/del polimorfizmi için; Ins/Ins genotipi: 116 bp Ins/Del genotipi: 116, 90 bp Del/Del genotipi: 90 bp olarak belirlenmiştir (şekil 4.3). Hasta ve kontrol gruplarının Hardy Weinberg (HW) dengesinin olduğu belirlenmiştir (Hasta grubu p=0.298, Kontrol grubu p=0.373).



Şekil 4.3. VAMP2 geni 26 bp Ins/Del polimorfizmi elektroforez sonrası fotoğrafı. 1, 2, 3, 4, 6, 7 numaralı örnekler Ins/Ins genotipinde, 5 numaralı örnek Del/Del genotipinde, 8 numaralı örnek ise Ins/Del genotipindedir.

Deneyler sonunda, 67 Alzheimer hastası ve 78 kontrol grubu bireyden oluşturulan gruplar araştırıldı. Gruplar, VAMP2 geni 26 bp Ins/Del polimorfizmi açısından değerlendirildi. Alzheimer hastalarında tespit edilen genotip dağılımı; Ins/Ins genotipi 53 (% 77.9), Ins/Del genotipi 13 (% 19.2), Del/Del genotipi 2 (% 2.9) olarak belirlenmiştir. Kontrol bireylerinde tespit edilen genotip dağılımı; Ins/Ins genotipi 48 (% 61.5), Ins/Del genotipi 28 (% 35.9), Del/Del genotipi 2 (% 2.6) olarak belirlenmiştir (çizelge 4.8). VAMP2 geni 26 bp

Ins/del polimorfizmi ile Alzheimer hastalığı arasında anlamlı bir ilişki tespit edilmemiştir (p=0.075).

VAMP2 geni Ins/Del polimorfizmi açısından, Alzheimer hastalarına ait allel dağılımı; Ins alleli 119 (% 87.5), Del alleli 17 (% 46.6) olarak tespit edilmiştir. Kontrol bireylerine ait allel dağılımı; Ins alleli 124 (% 79.5), Del alleli 32 (% 53.4) olarak tespit edilmiştir (çizelge 4.9). Allel sayıları ile gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki bulunamamıştır (p=0.068).

Çizelge 4.8. VAMP2 geni 26 bp Ins/Del polimorfizminin gruplara göre genotip dağılımı.

		GRUP		Toplam
		Kontrol n (%)	Alzheimer n (%)	
VAMP2 Ins/Del	Ins/Ins	48 (% 61.5)	53 (% 77.9)	101
	Ins/Del	28 (% 35.9)	13 (% 19.2)	41
	Del/Del	2 (% 2.6)	2 (% 2.9)	4
Toplam		78 (% 53.4)	68 (% 46.6)	146

n: birey sayısı

Çizelge 4.9. VAMP2 geni Ins/Del polimorfizminin gruplara göre allel dağılımı.

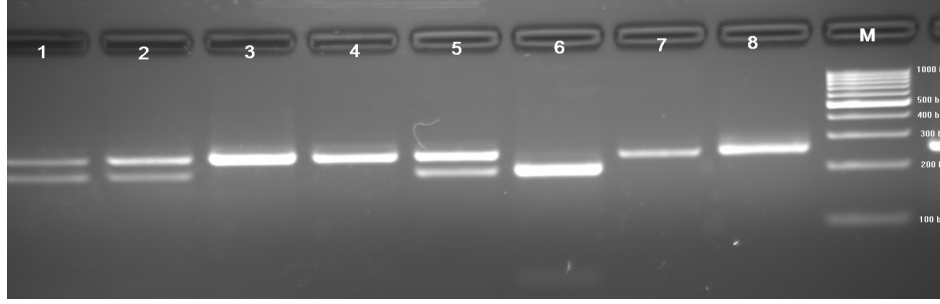
VAMP2 Ins/Del	Allel	GRUP		Toplam
		Alzheimer n (%)	Kontrol n (%)	
	Ins	119 (% 87.5)	124 (% 79.5)	243
	Del	17 (% 46.6)	32 (% 53.4)	49

N:Allel sayısı

4.3. SNAP-25 geni *MnII* ve *DdeI* polimorfizmleri bulguları

4.3.1. SNAP-25 geni *MnII* polimorfizmi bulguları

SNAP-25 geni *MnII* polimorfizmi PCR ve RFLP yöntemleri ile elde edildi. PCR-RFLP sonuçları, agaroz jel elektroforezinde yürütüldükten sonra, elde edilen bantlar “Vilber Lourmat Marne La Vallée, France” marka jel görüntüleme sistemi ile görüntülenerek bilgisayar ortamına aktarıldı. SNAP-25 geni *MnII* polimorfizmi için genotipleri; T/T genotipi: 256, 5 bp, T/G genotipi: 256, 210, 46, 5 bp, G/G: 210, 46, 5 bp olarak belirlenmiştir (şekil 4.4). Kontrol grubunun Hardy Weinberg dengesinin olduğu belirlenmiştir (p=0.714). Alzheimer grubunun Hardy Weinberg dengesinde olmadığı belirlenmiştir (p=0.0216).



Şekil 4.4. SNAP-25 geni *MnlI* polimorfizmi elektroforez sonrası fotoğrafı. 1, 2, 5 numaralı örnekler T/G genotipi, 3, 4, 7, 8 numaralı örnekler G/G genotipi, 6 numaralı örnek T/T genotipindedir.

SNAP-25 geni *MnlI* polimorfizmi için; Alzheimer hasta grubunda genotip dağılımı: T/T genotipi 31 (% 45.6), T/G genotipi 23 (% 33.8), G/G genotipi 14 (% 20.6) olarak belirlenmiştir. Kontrol grubunda genotip dağılımı: T/T genotipi 36 (% 46.2), T/G genotipi 35 (% 44.9), G/G genotipi 7 (% 9) olarak belirlenmiştir (çizelge 4.10). SNAP-25 *MnlI* polimorfizmi ile gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki tespit edilmemiştir ($p=0.104$).

SNAP-25 geni *MnlI* polimorfizmi için; Alzheimer hasta grubunda allel dağılımı: T alleli 85 (% 62.5), G alleli 51 (% 37.5) olarak belirlenmiştir. Kontrol grubunda allel dağılımı: T alleli 107 (% 68.6), G alleli 49 (% 31.4) olarak belirlenmiştir (çizelge 4.11). Allel sayıları ile gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki yoktur ($p=0.274$).

Çizelge 4.10. SNAP-25 geni *MnlI* polimorfizminin gruplara göre genotip dağılımı.

		GRUP		Toplam
		Kontrol n (%)	Alzheimer n (%)	
SNAP-25 <i>MnlI</i>	T/T	36 (% 46.2)	31 (% 45.6)	67
	T/G	35 (% 44.9)	23 (% 33.8)	58
	G/G	7 (% 9)	14 (% 20.6)	21
Toplam		78 (% 53.4)	68 (% 46.6)	146

n: birey sayısı

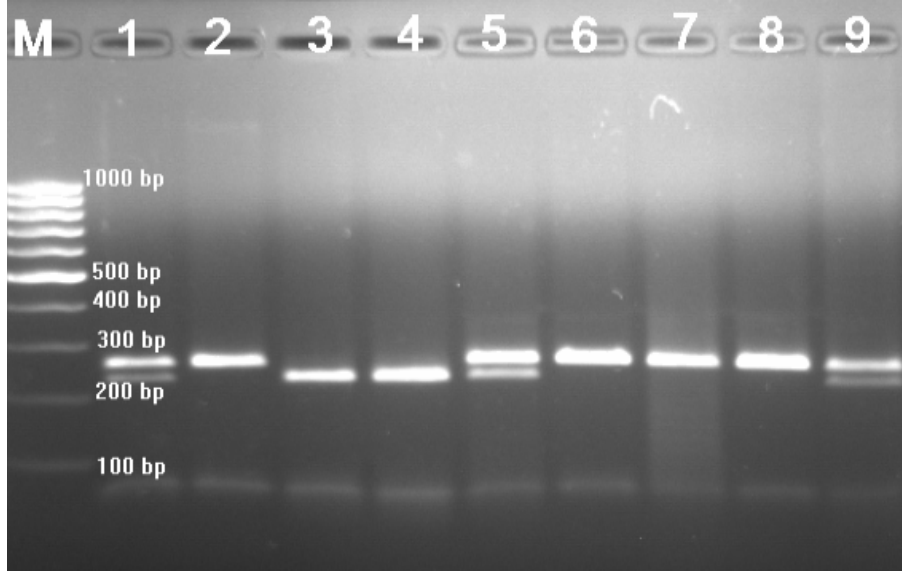
Çizelge 4.11. SNAP-25 geni *MnlI* polimorfizminin gruplara göre allel dağılımı.

SNAP-25 <i>MnlI</i>		Allel	GRUP		Toplam
			Kontrol n (%)	Alzheimer n (%)	
		T	107 (% 68.6)	85 (% 62.5)	192
		G	49 (% 31.4)	51 (% 37.5)	100

N:Allel sayısı

4.3.2. SNAP-25 geni *DdeI* polimorfizmi bulguları

SNAP-25 geni *DdeI* polimorfizmi için genotipler; T/T genotipi: 261 bp, T/G genotipi: 261, 228, 33 bp ve G/G genotipi: 228, 33 bp olarak belirlenmiştir (şekil 4.5). Hasta ve kontrol gruplarının Hardy Weinberg (HW) dengesinin olduğu belirlenmiştir (Hasta grubu $p=0.827$, Kontrol grubu $p=0.373$).



Şekil 4.5. SNAP-25 geni *DdeI* polimorfizmi elektroforez sonrası fotoğrafı. 2, 6, 7, 8 numaralı örnekler T/T genotipinde, 1, 5, 9 numaralı örnekler T/G genotipinde, 3, 4 numaralı örnekler G/G genotipindedir.

SNAP-25 geni *DdeI* polimorfizmi için Alzheimer hasta grubunda genotip dağılımı: T/T genotipi 41 (% 60.3), T/C genotipi 24 (% 35.3), C/C genotipi 3 (% 4.4) olarak belirlenmiştir. Kontrol grubunda genotip dağılımı: T/T genotipi 45 (% 57.7), T/C genotipi 28 (% 35.9), C/C genotipi 5 (% 6.4) olarak belirlenmiştir (çizelge 4.12). SNAP-25 *DdeI* polimorfizmi ile gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki tespit edilmemiştir ($p=0.855$).

SNAP-25 geni *DdeI* polimorfizmi için; Alzheimer hasta grubunda allel dağılımı: T alleli 106 (% 77.9), C alleli 30 (% 22.1) olarak belirlenmiştir. Kontrol grubunda allel dağılımı: T alleli 118 (% 75.6), C alleli 38 (% 24.4) olarak belirlenmiştir (çizelge 4.13). Allel sayıları ile gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki bulunamamıştır ($p=0.643$).

Çizelge 4.12. SNAP-25 geni *DdeI* polimorfizminin gruplara göre genotip dağılımı.

		GRUP		Toplam
		Kontrol n (%)	Alzheimer n (%)	
SNAP-25 <i>DdeI</i>	T/T	45 (% 57.7)	41 (% 60.3)	86
	T/C	28 (% 35.9)	24 (% 35.3)	52
	C/C	5 (% 6.4)	3 (% 4.4)	8
Toplam		78 (% 53.4)	68 (% 46.6)	146

n: birey sayısı

Çizelge 4.13. SNAP-25 geni *DdeI* polimorfizminin gruplara göre allel dağılımı.

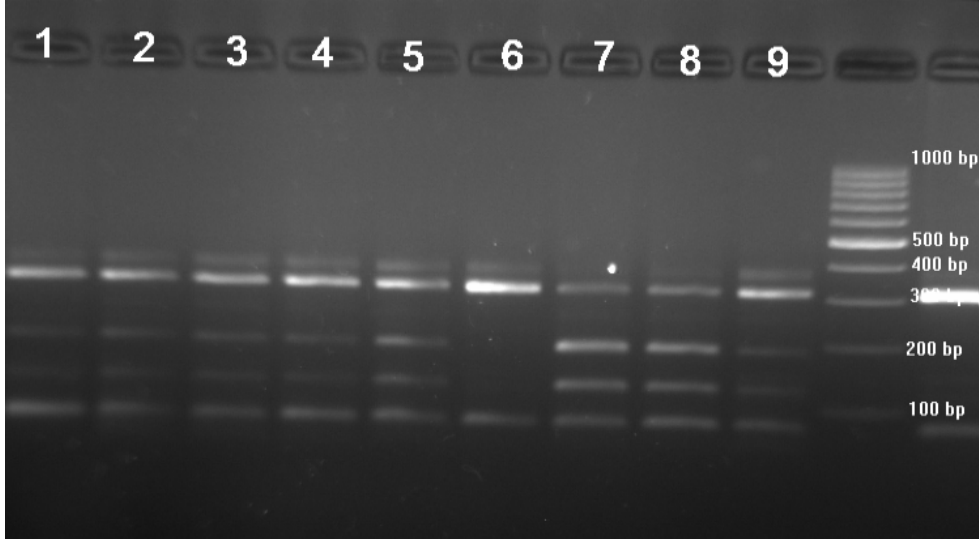
SNAP-25 <i>DdeI</i>	Allel	GRUP		Toplam
		Kontrol n (%)	Alzheimer n (%)	
	T	118 (% 75.6)	106 (% 77.9)	192
	C	38 (% 24.4)	30 (% 22.1)	100

N: Allel sayısı

4.4. Syntaxin 1A geni Ekson 3 ve İntron 7 polimorfizmleri bulguları

4.4.1. Syntaxin 1A geni İntron 7 polimorfizmi bulguları

Syntaxin 1A geni intron 7 polimorfizmi PCR ve RFLP yöntemleri ile elde edildi. PCR-RFLP sonuçları, agaroz jel elektroforezinde yürütüldükten sonra, elde edilen bantlar “Vilber Lourmat Marne La Vallée, France” marka jel görüntüleme sistemi ile görüntülenerek bilgisayar ortamına aktarıldı. Syntaxin 1A geni intron 7 polimorfizmi için genotipleri; T/T genotipi: 312 bp T/C genotipi: 312, 186 ve 126 bp, C/C genotipi: 186, 126 bp olarak belirlenmiştir (şekil 4.6). Kontrol grubunun HW dengesinin olduğu belirlenmiştir ($p=0.149$). Alzheimer grubunun HW dengesinde olmadığı belirlenmiştir ($p=0.002$).



Şekil 4.6. Syntaxin 1A geni intron 7 polimorfizmi elektroforez sonrası fotoğrafı. 6 numaralı örnek T/T genotipi, 1, 2, 3, 4, 5, 7, 8, 9 numaralı örnekler T/C genotipindedir.

Syntaxin 1A geni intron 7 polimorfizmi için Alzheimer hasta grubunda genotip dağılımı; T/T genotipi 14 (% 21.2), T/C genotipi 45 (% 68.2), C/C genotipi 7 (% 10.6) olarak belirlenmiştir. Kontrol grubunda genotip dağılımı: T/T genotipi 13 (% 16.7), T/C genotipi 35 (% 57.7), C/C genotipi 9 (% 25.6) olarak belirlenmiştir (çizelge 4.14). Syntaxin 1A geni intron 7 polimorfizmi ile gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki tespit edilmemiştir ($p=0.264$).

Syntaxin 1A geni intron 7 polimorfizmi için Alzheimer hasta grubunda allel dağılımı; T alleli 73 (% 55.3), C alleli 59 (% 44.7) olarak belirlenmiştir. Kontrol grubunda allel dağılımı: T alleli 59 (% 49.3), C alleli 71 (% 45.5) olarak belirlenmiştir (çizelge 4.15). Allel sayıları ile gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki tespit edilmemiştir ($p=0.098$).

Çizelge 4.14. Syntaxin 1A geni intron 7 polimorfizminin gruplara göre genotip dağılımı.

		GRUP		Toplam
		Kontrol n (%)	Alzheimer n (%)	
Syntaxin 1A İntron 7	T/T	13 (% 16.7)	14 (% 21.2)	27
	T/C	35 (% 57.7)	45 (% 68.2)	90
	C/C	9 (% 25.6)	7 (% 10.6)	27
Toplam		78 (% 54.2)	66 (% 45.8)	146

n: birey sayısı

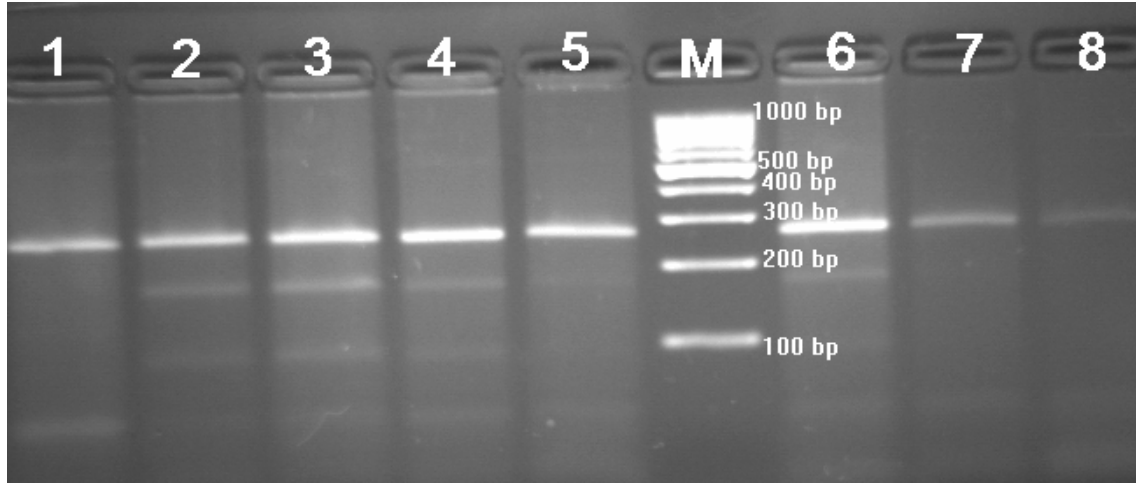
Çizelge 4.15. Syntaxin 1A geni intron 7 polimorfizminin gruplara göre allel dağılımı.

Syntaxin 1A İntron 7	Allel	GRUP		Toplam
		Kontrol n (%)	Alzheimer n (%)	
	T	71 (% 45.5)	73 (% 55.3)	144
	C	85 (% 54.5)	59 (% 44.7)	144

N:Allel sayısı

4.4.2. Syntaxin 1A geni ekson 3 polimorfizmi bulguları

Syntaxin 1A geni ekson 3 polimorfizmi PCR ve RFLP yöntemleri ile elde edildi. PCR-RFLP sonuçları, agaroz jel elektroforezinde yürütüldükten sonra, elde edilen bantlar “Vilber Lourmat Marne La Vallée, France” marka jel görüntüleme sistemi ile görüntülenerek bilgisayar ortamına aktarıldı. Ayrıca Syntaxin 1A geni ekson 3 polimorfizmini belirlemek için sekans analizi de yapılmıştır. Syntaxin 1A geni ekson 3 polimorfizmi için genotipleri; T/T genotipi: 263 bp, T/C genotipi: 263, 174, 89 bp, C/C genotipi: 174, 89 bp olarak belirlenmiştir. Kontrol grubunun HW dengesinin olduğu belirlenmiştir (p=0.149). Alzheimer grubunun HW dengesinde olmadığı belirlenmiştir (p=0.018).



Şekil 4.7. Syntaxin 1A geni ekson 3 polimorfizmi elektroforez sonrası fotoğrafı. 1, 7, 8 numaralı örnekler T/T genotipinde, 2, 3, 4, 5, 6 numaralı örnekler T/C genotipindedir.

Syntaxin 1A geni ekson 3 polimorfizmi için Alzheimer hasta grubunda genotip dağılımı; T/T genotipi 36 (% 52.9), T/C genotipi 21 (% 30.9), C/C genotipi 11 (% 16.2) olarak belirlenmiştir. Kontrol grubunda genotip dağılımı: T/T genotipi 34 (% 43.6), T/C genotipi 35 (% 44.9), C/C genotipi 9 (% 11.5) olarak belirlenmiştir (çizelge 4.16). Syntaxin 1A geni

ekson 3 polimorfizmi ile gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki tespit edilmemiştir (p= 0.098).

Syntaxin 1A geni ekson 3 polimorfizmi için Alzheimer hasta grubunda allel dağılımı; T alleli 93 (% 68.4), C allel 43 (% 31.6) olarak belirlenmiştir. Kontrol grubunda allel dağılımı; T alleli 103 (% 55.4), C alleli 53 (% 44.6) olarak belirlenmiştir (çizelge 4.17). Allel sayıları ile gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki vardır (p=0.018). T alleleline sahip olan bireylerin, C alleleline sahip olan bireylere oranla 1,7 kat daha fazla hastalık riskine sahip oldukları tespit edilmiştir.

Çizelge 4.16. Syntaxin 1A geni ekson 3 polimorfizminin gruplara göre genotip dağılımı.

		GRUP		Toplam
		Kontrol n (%)	Alzheimer n (%)	
Syntaxin 1A Ekson 3	T/T	34 (% 43.6)	36 (% 52.9)	70
	T/C	35 (% 44.9)	21 (% 30.9)	56
	C/C	9 (% 11.5)	11 (% 16.2)	20
Toplam		78 (% 53.4)	68 (% 46.6)	146

n: Birey sayısı

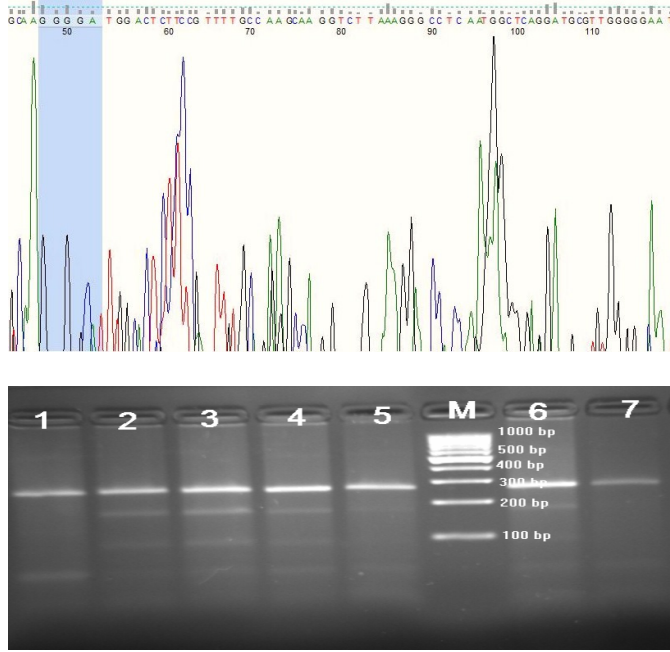
Çizelge 4.17. Syntaxin 1A geni ekson 3 polimorfizminin gruplara göre allel dağılımı.

Syntaxin 1A Ekson 3	Allel	GRUP		Toplam
		Kontrol n (%)	Alzheimer n (%)	
	T	103 (% 55.4)	93 (% 68.4)	196
	C	83 (% 44.6)	43 (% 31.6)	126

N:Allel sayısı

4.4.2.1. Syntaxin 1A geni ekson 3 polimorfizmi sekans analizi bulguları

Syntaxin 1A geni ekson 3 polimorfizmini belirlemek için sekans analizi verileri FinchTV programı ile gösterilmiştir. Polimorfik bölge yapılan analizler sonucunda belirlenmiştir. Yapılan analiz sonucunda elde ettiğimiz genotipleri sekans analizinden gelen genotipler ile karşılaştırdık. Forward ve reverse primerleri ile elde edilen iki ayrı sekans bölgesi tüm nükleotidleri ile tanımlanmıştır. Kullanılan programlarla (GenDoc, Mega4, ClustalX) bu diziler karşılaştırıldı ve polimorfik bölge tanımlandı. Şekil 4.8 de belirtilen sekans analiz dizisinde işaretli bölgenin sonundaki T nükleotidi o örneğe ait polimorfik bölgenin bir allelinin T olduğunu göstermektedir.



Şekil 4.8. Syntaxin 1A geni ekson 3 polimorfizmi elektroforez sonrası fotoğrafı ile sekans analizinin karşılaştırılması. Sekans analizinde işaretli olan T alleli 1 ve 7 numaralı örneklerdeki gibi T/T genotipinde 2, 3, 4, 5, 6 örnekleri gibi T/C genotipinde olan bireylerde bulunmaktadır.

4.5. VAMP2 (Synaptobrevin) geni 26 bp Ins/Del polimorfizmi, SNAP-25 geni *MnII*, *DdeI* polimorfizmleri, syntaxin 1A geni ekson 3 ve intron 7 polimorfizmlerinin Linkage disequilibrium (LD) ve Lojistik regresyon ile değerlendirilmesi

Aralarında bağlantı dengesizliği olan iki gen aynı anda modele alındığında istatistiksel anlamlılık yokken var gibi gösterebilir. O nedenle bağlantı dengesizliği olan genlerin interaksiyon etkisi ile modele alınması gerekir.

Lojistik regresyon analizi yapılırken, aralarında bağlantı dengesizliği olan iki gen aynı anda modele alındığında istatistiksel anlamlılık yokken var gibi gösterebilir. O nedenle bağlantı dengesizliği olan genlerin interaksiyon etkisi ile modele alınması gerekir. synapsin III geni -196 G>A ve -631C>G polimorfizmleri arasında hasta ve kontrol gruplarında güçlü bir dengesizlik olduğu için interaksiyon etkisi modele alındı (kontrol p=0.000, hasta p=0.000). SNAP-25 geni *MnII*, *DdeI* polimorfizmleri arasında ise sadece kontrol grubunda istatistiksel olarak anlamlı bağlantı dengesizliği görülmüştür (kontrol p=0.000, hasta p=0.725). İnteraksiyon etkisinin modele alınması durumunda gözelerdeki synapsin III geni -196 G>A ve -631C>G polimorfizmleri eksik gözlemler dolayısı ile aşırı büyük güven aralıkları ve odds oranları tahmin edilmiştir. Bütün gen polimorfizmlerinin birlikte değerlendirilerek yapılan

lojistik regresyon modelinin sonuçları çizelge 4.20 de belirtilmiştir. Bu analizde VAMP 2 geni için; Ins/Ins genotipi referans alındığında, Ins/Del genotipinin 0.3 kat koruyucu etki gösterdiği tespit edilmiştir (p=0.009). SNAP-25 geni *MnlI*, *DdeI* polimorfizmleri için TC+CC/TG+GG genotipi referans olarak alındığında, TT/TT genotipinin diğerlerine oranla 3.5 kat koruyucu etki gösterdiği tespit edilmiştir (p=0.010). Ayrıca, Syntaxin 1A geni intron 7 polimorfizmi için C/C genotipi referans alındığında T/C genotipinin 3.2 kat daha koruyucu etki gösterdiği tespit edilmiştir (p=0.029) (şekil 4.20).

Çizelge 4.18. Bütün gen polimorfimleri allel dağılımları ve istatistiksel değerleri.

GEN	GENOTİP	ALZHEİMER n (%)	KONTROL n (%)	ODSS	P değeri	GÜVEN ARALIĞI	
						Üst sınır	Alt sınır
VAMP2 Ins/Del polimorfizmi	İns/İns	53 (% 77.9)	48 (% 61.5)	Referans	0,027		
	İns/Del	13 (% 19.2)	28 (% 35.9)	0,301	0,009	0.123	0.738
	Del/Del	2 (% 2.9)	2 (% 2.6)	0,309	0,301	0,033	2,859
SNAP-25 geni <i>MnlI</i> * <i>DdeI</i> polimorfizmleri	TC+CC/TG+GG	15 (% 22.1)	9 (% 11.5)	Referans			
	TT/TT	19 (% 27.9)	12 (% 15.4)	3.593	0.010	1.357	9.512
Synapsin III geni -196 G>A * -631 C>G polimorfizmleri	CC/GG	9 (% 13.2)	17 (% 21.8)	Referans	0,467		
	GG/AA	15 (% 22.1)	13 (% 16.7)	1.026	0.962	0.367	2.869
	GG/GA	5 (% 7.4)	3 (% 3.8)	2.687	0.428	0.233	30.950
	CG/GA	20 (% 29.4)	35 (% 44.9)	0.53	0.149	0.224	1.259
Syntaxin 1A geni Ekson 3 polimorfizm	T/T	36 (% 52.9)	34 (% 43.6)	0.816	0.726	0.262	2.543
	T/C	21 (% 30.9)	35 (% 44.9)	3,255	0.072	0,901	11.764
	C/C	11 (% 16.2)	9 (% 11.5)	Referans	0.083		
Syntaxin 1A geni İtron 7 polimorfizm	T/T	14 (% 21.2)	13 (% 16.7)	3.255	0.072	0.901	11.764
	T/C	45 (% 68.2)	35 (% 57.7)	3.204	0.029	1.125	9.124
	C/C	7 (% 10.6)	9 (% 25.6)	Referans	0.83		

5. TARTIŞMA

Alzheimer hastalığı, özellikle batı toplumunda yoğunluklu olarak görülen multifaktöriyel, nörodejeneratif bir hastalıktır. Alzheimer hastalığında hafızaya nöropatolojik mekanizmanın etkisi net olarak tanımlanmamıştır. AH' da nöronlar beynin belli bölgelerinde degrade olurlar. Alzheimer hastalarının beyinlerinde yapılan histopatolojik çalışmalar beynin hipokampus ve neokorteks gibi farklı bölgelerinde nörofibriler iplikler, senil plaklar ve geniş nöronal kaybın olduğu bölgeler belirlenmiştir (4, 9). AH için, beta amiloid prokürsörü (APP), presenilin 1 (PSEN1) ve presenilin 2 (PSEN2) proteinlerini kodlayan genler özellikle önemlidir. Ancak bunların dışında AH ile ilişkisi araştırılan birçok gen bölgesi vardır (5).

Sinaptik terminaller, AH' daki patolojik değişiklik için önemli bir bölgedir. Elektron mikroskobu ile AH' larının sinapsları araştırılmış ve sinaptik kayıp belirlenmiştir. Bundan dolayı, presinaptik bölgedeki proteinler araştırılmıştır. Özellikle, SNARE proteinleri bu bölge için oldukça önemlidir. Son yıllarda yapılan çeşitli çalışmaların bir kısmında, AH' larının presinaptik bölgelerinde etkili olan proteinlerden synaptophysinin, SNAP-25 ve syntaxinin azaldığı tespit edilmiştir (61). Yapılan bir başka çalışmada, synaptophysinin % 30, SNAP-25 in de % 10 oranında azaldığı, syntaxinin ise değişmediği belirlenmiştir. AH larındaki sinaptik patoloji değişikliğinin belirlenmesinin hastalıkta etkili olan tau proteini mekanizması veya asetilkolinesteraz (ChAT) mekanizmasına ışık tutacağı düşünülmektedir. Yapılan çalışmalara göre, AH' larında presinaptik membran ve vezikül proteinlerinin azaldığı belirlenmiştir (61). AH' da yapılan bir başka çalışma sonucu da, sinapslarla ilişkili olan β -amiloid birikimine post sinaptik yapıdaki değişimler ve gliosizin eşlik ettiği öne sürülmüştür (62).

Dessi F ve ark' nın yaptığı bir çalışmada, Alzheimer hastalarında özellikle nöronlardaki nörofibriler iplikciklerin oluşmasına neden olan tau proteinlerinin yanı sıra SNAP-25 gibi sinaptik markerlarında etkili olabileceği belirtilmiştir (63). İtalyan popülasyonunda yapılan bir başka çalışmada, neurotrophin sistem genleri olan nerve growth factor (NGFB), brain-derived nörotrofik factor (BDNF), bunların reseptörleri olan; nerve growth factor reseptör (NGFR), nörotrophin tirozin kinaz reseptörleri 1 ve 2 (NTRK1 ve NTRK2) polimorfizmleri ile AH arasındaki ilişki araştırılmıştır. Sonuç olarak; NGFR geni rs2072446 polimorfizmi, NTRK2 geni rs2289656 polimorfizmi, NTRK1 geni rs6336 polimorfizmi ve BDNF geni rs1048218 polimorfizmi ile arasında ilişki tespit edilmiştir. Bu durumda, neurotrophin sistem genleri ile AH arasında bir ilişki olabileceği öne sürülmüştür (64). Yapılan bir başka çalışmada, progranulin (PGRN) gen polimorfizmi ile AH arasındaki ilişki araştırılmış ve ilişkili olduğu öne sürülmüştür (65). AH ile PSEN1 geni mutasyonlarının ilişkili olduğu bilinmekle birlikte,

syntaxin 1A proteininin bağ kurduğu in vitro ortamda yapılan deneylerle tespit edilmiştir (66). Alzheimer hastalarında yapılan bir başka çalışmada sinaptik değişim incelenmiş ve postsinaptik yapının ve sinaptik kaybın Alzheimer hastalığı üzerinde etkili olabileceği öne sürülmüştür. Belçika ve Amerika popülasyonlarında yapılan çalışmalarda kalsiyum homeostasis modülatör 1 (*CALHM1*) geni rs2986017 polimorfizmi ile AH arasındaki ilişki de araştırılmış ve belirgin bir ilişkiye rastlanmamıştır (67, 68). Güney Çin popülasyonunda yapılan bir başka çalışmada, AH ile tümör nekrozis faktör- α (TNF- α) geni G308A polimorfizmi ile ilişkisi araştırılmış ve belirgin bir ilişki saptanmıştır (69). Mc Geer ve ark' nın yaptığı bir başka çalışmada AH ile inflamasyonda etkili olan; interlökin IL-1 α , IL-1 β , IL-6, TNF- α , α_2 -makroglobulin (A2M), ve α_1 -antichymotrypsin (ACT) genlerine ait 10 polimorfizm arasında ilişki tespit edilmiştir (70). Candore ve ark tarafından IL-1 β geni -511, IL-1 β geni +3953, IL-6 geni -174, IL-10 geni -1082 polimorfizmleri ile AH arasındaki ilişki araştırılmıştır. IL-1 β geni -511 polimorfizmi ve IL-1 β geni +3953 polimorfizmleri ile ilişkili olduğu tespit edilmiştir (71). Tanzi ve ark 2008 de yaptıkları çalışmada kalsiyum homeostasis modülatör 1 (*CALHM1*) ile AH arasındaki ilişkiyi araştırmış, kalsiyum homeostasisinin AH için oldukça önemli olduğu tespit edilmiştir (72). Ray ve ark yaptıkları çalışma sonucunda kan plazmasında bulunan 18 sinyal proteininin Alzheimer hastalığı ile ilişkisini araştırmış, ANG-2, CCL5, CCL7, CCL15, CCL18, CXCL8, EGF, G-CSF, GDNF, ICAM, IGFBP, IL-1 α , IL-3, IL-11, M-CSF, PDGF-BB, TNF- α ve TRAIL-R4 proteinlerinin AH ile ilişkili olduğu tespit edilmiştir (73). Alzheimer hastalığının onlarca gen ile ilişkisi araştırılmış ve araştırılmaya da devam edilmektedir (5).

Presinaptik terminalde sinaptik vezikül füzyonu SNARE molekülü ile modüle edilir. SNARE molekülü yapısında ise VAMP2, SNAP-25 ve syntaxin 1A proteinleri vardır (74). SNARE proteinleri plazma membran proteiniyle kompleks oluşturur ve nöroekzitozu düzenler. Popüler bir teoriye göre, üç presinaptik SNARE proteini vardır; syntaxin, synaptobrevin 2 (VAMP2) ve SNAP-25 proteinleridir. Alzheimer hastalarının beyinlerinin dört farklı bölgesinde (hipokampus, entorhinal korteks, caudate nucleus ve occipital korteks) immünohistokimyasal olarak yedi farklı presinaptik bölge proteini (synaptobrevin, synaptotagmin, SNAP-25, syntaxin, SV2, Rab3A ve synapsin I) incelenmiştir. Kontrol bireylerle olası/erken başlangıçlı Alzheimer hastaları karşılaştırıldığı zaman, hipokampüste synaptobrevin ve synaptotagminin belirgin oranlarda azaldığı tespit edilmiştir (9). AH ile kontrol bireyleri karşılaştırıldığında; hipokampüste synaptobrevin, synaptotagmin ve Rab3A proteinlerinde, entorhinal kortekste synaptobrevin (VAMP), synaptotagmin ve Rab3A da belirgin miktarda düşüşler tespit edilmiştir. Sonuç olarak, presinaptik vezikül proteinleri ile

kognitif bozukluk arasında bir ilişki olabileceği öne sürülmüştür (9). Shimohama ve ark (1997) yaptıkları çalışma sonucunda ise, Alzheimer hastalarında sinaptik vezikül proteinlerinin presinaptik plazma membran proteinlerinden daha hassas olduğu belirlenmiştir (10).

SNARE proteinleri olan syntaxin 1A, SNAP-25 ve VAMP2 genleri polimorfizmleri ile şizofreni arasındaki ilişki Japon popülasyonunda araştırılmış ve belirgin bir ilişkiye rastlanmamıştır (43). Çalışmamızda, AH ile synapsin III, syntaxin 1A, VAMP2 ve SNAP-25 genleri polimorfizmleri arasındaki ilişki araştırılmıştır. Bu amaçla, AH ve kontrol gruplarının bireylerinden elde edilen DNA'larda, VAMP2 (Synaptobrevin) geni 26 bp Ins/ Del polimorfizmi, SNAP-25 geni *MnII*, *DdeI* polimorfizmleri, synapsin III geni -196 G>A ve -631 C>G polimorfizmleri, syntaxin 1A geni ekson 3 ve intron 7 polimorfizmlerine bakılarak her iki grup arasında allel ve genotip dağılımı açısından farklılık olup olmadığı istatistiksel olarak incelendi.

Synapsin III proteini geni kromozom 22q12-13 bölgesi tarafından kodlanmaktadır. Bu bölge, şizofreni hastalığından sorumlu tutulan gen bölgesi içinde olduğundan, synapsin III ile şizofreni hastalığı arasındaki ilişki birçok araştırmaya konu olmuştur. Yapılan çalışmaların bir kısmında, synapsin III geni -631 C>G, -196 G>A polimorfizmleri ile şizofreni hastalığı arasındaki ilişki araştırılmış, belirgin bir ilişkiye rastlanmamıştır (8, 27, 28). Yapılan çalışmada, synapsin III geni -631 C>G, -196 G>A ve 69 C>A polimorfizmleri ile şizofreni arasındaki ilişki olmadığı tespit edilmiştir (23). Yapılan çalışmalarda -196 G>A polimorfizminin olduğu transkripsiyon bağlanma bölgesi ile transkripsiyon regülasyonunun ilişkili olmadığı tespit edilmiştir. Bu durumda bu polimorfizmin fonksiyonel bir etkisi olmadığı da düşünülmektedir (28). Synapsin III geni -631 C>G, -196 G>A polimorfizmleri ile multiple skleroz (MS) hastalığı arasındaki ilişki de incelenmiş ve C631/A196 haplotipinin MS hastalığı için koruyucu olduğu belirlenmiştir (32). MS ile synapsin III -631C>G, -196G>A polimorfizmleri arasındaki ilişki bir başka çalışmada da araştırılmış ve ilişki tespit edilmiştir (34). Hiperaktivite hastalığı ile synapsin III geni -631C>G, -196G>A polimorfizmleri arasındaki ilişki araştırılmış ancak, belirgin bir ilişkiye rastlanmamıştır (75). Yapılan çalışmada -196G>A polimorfizmi için; G aleli % 52, A aleli ise T % 48 olarak belirlenmiştir. -631C>G polimorfizmi için; G aleli % 48, C aleli ise % 52 oranlarında belirlenmiştir. Çalışma sonucunda haplotip değerlendirilmesi de yapılmıştır (75). Çalışmamızda da haplotip değerlendirme yapılmış -631C>G, -196G>A polimorfizmleri arasında bağlantı tespit edilmiştir.

Çalışmamızda, synapsin III geni -196 G>A polimorfizmi açısından Alzheimer gruplarına

ait allel dağılımı: % 48.5 A alleli, % 51.5 G alleli olarak belirlenmiştir. Kontrol grubuna ait allel dağılımı: % 48.7 A alleli, % 51.3 G alleli olarak belirlenmiştir. Allel sayıları ile gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki tespit edilmemiştir. (p=0.974).

Çalışmamızda, synapsin III geni -631 C>G polimorfizmi açısından Alzheimer hastası ve kontrol bireylerinde allel dağılımı; Alzheimer hastalarına ait allel dağılımı; % 55.9 G alleli, % 44.1 C alleli olarak belirlenmiştir. Kontrol grubuna ait allel dağılımı; % 44.1 G alleli, % 55.9 C alleli olarak belirlenmiştir. Synapsin III geni -631 C>G polimorfizmi için; Allel sayıları ile gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki tespit edilmiştir (p=0.047). G allele sahip olan bireyler C allele sahip olan bireylere oranla 1,5 kat daha risk altında olduğu belirlenmiştir.

VAMP2 nin antidepresan yanıtında etkili rol oynadığı düşünülmektedir. Ancak, yapılan bu çalışmada belirgin bir ilişkiye rastlanmamıştır (45) Şizofren hastalarının beyinlerinde yapılan postmortem çalışmalar sonucu, beyinlerinin cingulate korteks bölümünde syntaxin 1A artışı tespit edilmiştir (76). Buna karşılık; frontal temporal, parietal cortices ve cerebellum da syntaxin 1A miktarında bir değişiklik tespit edilmemiştir (76, 77, 78). Japon populasyonunda yapılan bir başka çalışmaya göre VAMP2 geni rs8067606, rs1061032, rs2278637 polimorfizmleri ile major depresyon hastalarının antidepresan yanıtı ile ilişkisi araştırılmış ve belirgin bir ilişki saptanmamıştır (45).

Yapılan bir çalışmada, VAMP2 geni Ins alleli % 80, Del alleli ise % 20 oranında tespit edilmiştir (50). Çalışmamızda elde ettiğimiz sonuçlarda ise; VAMP2 geni Ins/Del polimorfizmi açısından, Alzheimer hastalarına ait allel dağılımı; % 87.5 Ins alleli, % 46.6 Del alleli olarak belirlenmiştir. Kontrol bireylerine ait allel dağılımı; % 79.5 Ins alleli, % 53.4 Del alleli olarak tespit edilmiştir. Allel sayıları ile gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki tespit edilmemiştir (p=0.068).

Müller ve ark SNAP-25 geni *DdeI*, *MnII* ve *TaiI* polimorfizmlerinin, antipsikotik tedavi alan şizofren hastalarındaki kilo kaybı ile arasında ilişki olduğunu tespit etmişlerdir. Yaptıkları analiz sonucunda *DdeI* polimorfizmi için; T/T genotipi % 82, T/C genotipi % 18 olarak, *MnII* polimorfizmi için; T/T genotipi % 54, T/G genotipi % 34, G/G genotipi % 12 olarak belirlenmiştir (56). Ayrıca, yapılan bir başka çalışmada SNAP-25 ile hiperaktivite hastalığı arasındaki ilişki araştırılmış ve SNAP-25 geni mikrosatellit bölgedeki (ATTT)_n polimorfizmi ile ilişkili bulunmuştur (57). SNAP-25 genine ait *MnII* ve *DdeI* polimorfizmleri ile hiperaktivite hastalığı arasındaki ilişki araştırılmış *MnII* polimorfizmi için belirgin bir ilişkiye rastlanmamıştır. Ancak, *DdeI* polimorfizmi arasında bir ilişki belirlenmiştir (55). Hiperaktivite hastalığı ile SNAP-25 genine ait *MnII* ve *DdeI* polimorfizmleri arasında yapılan

bir başka çalışmada yine haplotip analizi ile ilişkili tespit etmiştir (59). Çalışmamızda ise, SNAP-25 geni *MnII* polimorfizmi için; Alzheimer hasta grubunda allel dağılımı: % 62.5 T alleli, % 37.5 G alleli olarak belirlenmiştir. Kontrol grubunda allel dağılımı % 68.6 T alleli, % 31.4 G alleli olarak belirlenmiştir. Allel sayıları ile gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki yoktur ($p=0.274$).

SNAP-25 geni *DdeI* polimorfizmi için; Alzheimer hasta grubunda allel dağılımı: % 77.9 T alleli, % 22.1 C alleli olarak belirlenmiştir. Kontrol grubunda allel dağılımı % 75.6 T alleli, % 24.4 C alleli olarak belirlenmiştir. Allel sayıları ile gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bulunamamıştır ($p=0.643$).

Syntaxin, presinaptik terminalde bulunan, SNAP-25 ve VAMP ile birleşip SNARE kompleksini oluşturan bir proteindir. Kimyasal nörotransmisyon için oldukça önemlidir (30). Syntaxin 1A ve SERT in oluşturduğu kompleksin etkisi araştırılmış ve bu kompleksin aminerjik sinyal trafiği ve amin transportu ile ilişkili hastalıklarda etkili olabileceği öne sürülmüştür (79). Yapılan bir çalışmada da syntaxin 1A proteininin özellikle normal utero gelişimi için oldukça önemli olduğu belirlenmiştir (80)

Syntaxin 1A geni ekson 3 ve intron 7 polimorfizmleri ile şizofren hastalığı arasındaki ilişki araştırılmış, haplotip analizi ile değerlendirilmiş ve özellikle intron 7 polimorfizminin etkili olabileceği tespit edilmiştir (36). Syntaxin 1A nın insülin salınımında etkili rol oynadığı tespit edilmiş ve bu çalışmada insüline bağlı tip II diabet hastalarında syntaxin 1A gen polimorfizmleri incelenmiştir. Multiple regresyon analizine göre bir ilişki tespit edilmiştir (41). Williams sendromu ile syntaxin 1A genindeki hemizigot mutasyon arasında ilişki olup olmadığı araştırılmıştır. Kromozom bazında gözlenebilen bu mutasyonlar ile nörolojik bazı semptomların ilişkili olduğu öne sürülmüştür (40).

Çalışmamızda, syntaxin 1A geni intron 7 polimorfizmi için Alzheimer hasta grubunda allel dağılımı; % 55.3 T alleli, % 44.7 C alleli olarak belirlenmiştir. Kontrol grubunda genotip dağılımı: % 49.3 T alleli, % 45.5 C alleli olarak belirlenmiştir. Syntaxin 1A geni intron 7 polimorfizmi ile gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki tespit edilmemiştir ($p=0.098$).

Syntaxin 1A geni ekson 3 polimorfizmi için Alzheimer hasta grubunda allel dağılımı; % 68.4 T alleli 93, % 31.6 C allel olarak belirlenmiştir. Kontrol grubunda genotip dağılımı: T alleli 103 (% 55.4), C alleli 53 (% 44.6) olarak belirlenmiştir. Allel sayıları ile gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki belirlenmiştir ($p=0.018$). T alleleline sahip olan bireylerin, C alleleline sahip olan bireylere oranla 1,7 kat daha fazla hastalık riskine sahip oldukları tespit edilmiştir.

Çalışmamıza konu olan presinaptik bölge proteinleri, Alzheimer hastalarının beyinlerinde yapılan postmortem çalışmalar sonucu tanımlanmıştır. Bu proteinlerden synaptobrevinin caudate de seviyesinin azalması ile birlikte AH' nın erken evrelerinde bu bölgede difüz plakların bulunduğu belirlenmiştir (81, 82). Ancak, bunun tersini ifade eden çalışmalarda yapılmıştır (83). ChAT ve synaptophysindeki değişimler, AH larında SNAP-25 ve syntaxin ile kıyaslandığında sinaptik vezikülü içeren kompensatör mekanizmayı oluşturmaktadır (61). Sinaptik kaybın AH' da etkili olduğu, beyinlerinde yapılan premortem ve postmortem çalışmalar sonucunda tespit edilmiştir (84). Öğrenme ve hafızanın moleküler ve hüresel mekanizması hipokampusdaki sinaptik fonksiyona bağlıdır. Sinaptik fonksiyon ise, nörotransmitterlerin salınımı ile düzenlenir. Bu olay, sinaptik vezikül ile presinaptik membran proteinlerinin etkileşimi ile sağlanır (9). Yapılan bir başka postmortem çalışmada, AH larının beyinlerinde SNAP-25 ve syntaxin oranının kontrol bireylere oranla % 30 oranında daha az olduğu tespit edilmiştir (10). Çalışmamızda, sinaptik nörotransmisyonunda etkili olan proteinleri kodlayan genlerin polimorfizmleri ile Alzheimer hastalığı arasındaki ilişki araştırıldı.

AH ile synapsin III, syntaxin 1A, VAMP-2 ve SNAP-25 genleri polimorfizmleri arasındaki ilişki daha önce uluslararası hiçbir çalışmaya konu olmamıştır. Çalışmamızda, VAMP2 (Synaptobrevin) geni 26 bp Ins/ Del polimorfizmi, SNAP-25 geni *MnII*, *DdeI* polimorfizmleri, synapsin III geni -196 G>A ve -631C>G polimorfizmleri, syntaxin 1A geni ekson 3 ve intron 7 polimorfizmleri ile AH arasındaki ilişki araştırıldı. Çalışma sonucunda yapılan istatistiksel analiz sonucunda, ayrı ayrı her bir gen bölgesi değerlendirildiğinde syntaxin 1A geni ekson 3 polimorfizmi için, allel sayıları ile gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki tespit edilmiştir (p=0.018). T alleleline sahip olan bireylerin, C alleleline sahip olan bireylere oranla 1,7 kat daha fazla hastalık riskine sahip oldukları tespit edilmiştir. Synapsin III geni -196 G>A polimorfizmi ile Alzheimer hastalığı arasında anlamlı bir ilişki tespit edilmiştir (p=0.03). G/A genotipinin Alzheimer hastalığı açısından koruyucu etkisi olduğu belirlenmiştir (p=0.008).

SNAP-25 geni *MnII*, *DdeI* polimorfizmleri ve synapsin III geni -196 G>A ve -631C>G polimorfizmleri arasında hasta ve kontrol gruplarında güçlü bir dengesizlik olduğu için interaksiyon etkisi modele alındı. Yapılan lojistik regresyon analizi sonucunda, VAMP 2 geni için; Ins/Ins genotipi referans alındığında, Ins/Del genotipinin 0.3 kat koruyucu etki gösterdiği tespit edilmiştir (p=0.009). SNAP-25 geni *MnII*, *DdeI* polimorfizmleri için TC+CC/TG+GG genotipi referans olarak alındığında, TT/TT genotipinin diğerlerine oranla 3.5 kat koruyucu etki gösterdiği tespit edilmiştir (p=0.010). Ayrıca, Syntaxin 1A geni İtron 7 polimorfizmi için C/C genotipi referans alındığında T/C genotipinin 3.2 kat koruyucu etki gösterdiği tespit

edilmiştir (p=0.029).

AH ile ilgili yapılan son çalışmalarda hastalığın temelini oluşturduğu düşünölen gen polimorfizmleri araştırılmıştır (73). Çalışmamızda presinaptik bölgede kodlanan SNARE proteinleri (syntaxin 1A, SNAP-25, VAMP2) ve synapsin III proteinlerine ait gen bölgelerindeki polimorfizmler araştırıldı ve istatistiksel sonuçların bir kısmında anlamlı sonuçlar elde edildi. Ancak, hasta sayısının artırılması, presinaptik bölgede görev alan başka proteinlerin de polimorfizmlerinin araştırılması AH' nın daha iyi tanımlanmasına ve genetik kökeninin belirlenmesine yardımcı olacaktır. Bu çalışmalar, özellikle hastalığı önceki yıllarında erken teşhisi ve tedavisine yardımcı olacaktır. Yüzyılımızın hastalıklarından biri olan AH' nın genetik geçişi ve önceki nesillerden aktarılıp aktarılmadığı özellikle önem kazanmıştır. Bizim çalışmamıza benzer birçok gen polimorfizmi çalışmaları yapılmaktadır (5). Bu çalışmaların bir araya getirilip değerlendirilmesi hastalığın genetik geçişine ışık tutacaktır. Çalışmamıza konu olan syntaxin 1A geni ekson 3 polimorfizmi, VAMP2 geni Ins/Del polimorfizmi, synapsin III geni -631 C>G polimorfizminin hastalıkla ilişkili olabileceği tespit edildi.

6. SONUÇLAR ve ÖNERİLER

Çalışmamızda, VAMP2 (Synaptobrevin) geni 26 bp Ins/ Del polimorfizmi, SNAP-25 geni *MnII*, *DdeI* polimorfizmleri, synapsin III geni -196 G>A ve -631C>G polimorfizmleri, syntaxin 1A geni ekson 3 ve intron 7 polimorfizmleri ile AH arasındaki ilişki araştırıldı. Çalışma sonucunda yapılan istatistiksel analiz sonucunda, ayrı ayrı her bir gen bölgesi değerlendirildi.

Synapsin III geni -196 G>A polimorfizmi ile Alzheimer hastalığı arasında anlamlı bir ilişki tespit edildi ($p=0.03$). G/A genotipinin Alzheimer hastalığı açısından koruyucu etkisi olduğu tespit edildi ($p=0.008$). Synapsin III geni -196 G>A polimorfizmi için allel sayıları ile gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki bulunmadı ($p=0.974$).

Synapsin III geni -631 C>G polimorfizmi ile gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki bulunmamıştır ($p=0.139$). Synapsin III geni -631 C>G polimorfizmi için; Allel sayıları ile gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki vardır ($p=0.047$). G alleleline sahip olan bireyler C alleleline sahip olan bireylere oranla 1,5 kat daha risk altında olmaktadır.

VAMP2 geni 26 bp Ins/del polimorfizmi ile Alzheimer hastalığı arasında anlamlı bir ilişki tespit edilmedi ($p=0.075$). Allel sayıları ile gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki yoktur ($p=0.068$).

SNAP-25 *MnII* polimorfizmi ile gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki tespit edilmedi ($p=0.104$). Allel sayıları ile gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki yoktur ($p=0.274$). SNAP-25 *DdeI* polimorfizmi ile gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki tespit edilmedi ($p=0.855$). Allel sayıları ile gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki yoktur ($p=0.643$).

Syntaxin 1A geni intron 7 polimorfizmi ile gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki tespit edilmemiştir ($p=0.264$). Allel sayıları ile gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki tespit edilmemiştir ($p=0.098$). Syntaxin 1A geni ekson 3 polimorfizmi ile gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki tespit edilmedi ($p=0.098$). Allel sayıları ile gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki vardır ($p=0.018$). T alleleline sahip olan bireylerin, C alleleline sahip olan bireylere oranla 1,7 kat daha fazla hastalık riskine sahip oldukları tespit edildi.

SNAP-25 geni *MnII*, *DdeI* polimorfizmleri arasında ise sadece kontrol grubunda istatistiksel olarak anlamlı bağlantı dengesizliği belirlendi (kontrol $p=0.044$, hasta $p=4.65$). Çalışmamızda incelediğimiz bütün polimorfizmleri Logistik regresyon analizi ile birlikte

değerlendirildiğinde; VAMP 2 geni için; Ins/Ins genotipi referans alındığında, Ins/Del genotipinin 0.3 kat koruyucu etki gösterdiği tespit edildi (p=0.009). SNAP-25 geni *MnII*, *DdeI* polimorfizmleri için TC+CC/TG+GG genotipi referans olarak alındığında, TT/TT genotipinin diğerlerine oranla 3.5 kat koruyucu etki gösterdiği tespit edildi (p=0.010). Ayrıca, Syntaxin 1A geni intron 7 polimorfizmi için C/C genotipi referans alındığında T/C genotipinin 3.2 kat daha koruyucu etki gösterdiği tespit edildi (p=0.029)

Sonuç olarak çalışmamız Alzheimer hastalığı olan bireylerde özellikle presinaptik bölgede yer alan proteinlerin etkili olabileceğini göstermiştir. Özellikle polimorfizmi incelenmiş olan genlerin polimorfik bölgelerin hastalık için önemli olabileceği öne sürülmüştür. Çalışmamız bundan sonraki çalışmalara zemin hazırlamaktadır. Yaptığımız çalışmaya ek olarak, presinaptik bölgede bulunan ve sinaptik geçişi etkileyen başka proteinlerinde genetik açıdan incelenebilir ve çalışmamızı destekleyen sonuçlar elde edilebilir.

7. KAYNAKLAR

- 1- **Tunçbilek E.** Tıbbi Genetik, 6. baskı, Ankara: Güneş yayınevi, **2005.** **Çeviri:** Robert L. Nussbaum. Thompson & Thompson Genetics in Medicine, 6. edition, W.B. Saunders Company, **2004.**
- 2- **Theuns J, Broeckhoven C.V.** Transcriptional regulation of Alzheimer's disease genes: implication for susceptibility. *Hum. Mol.Genet*, **2000**; 9 (16): 2383-2394.
- 3- **Finckh U.** The future of genetic association studies in Alzheimer disease. *J Neural Trans*, **2003**; 110(3): 253-66.
- 4- **Selkoe DJ.** Alzheimer's disease: genes, proteins, and therapy. *Physiol Rev.* **2001**;81(2):741-66.
- 5- <http://www.Alzgene.org> (erişim tarihi: 20. 01. 2009)
- 6- **Purves D, Augustine GJ, Fitzpatrick D, Lawrence C, LaMantia A, McNamara JO, Williams S, Mark S.** Neuroscience. Sinauer Associates Inc, **2001.**
- 7- **Kimura K, Mizoguchi A, Ide C.** Regulation of growth cone extension by SNARE proteins. *J Histochem Cytoche*, **2003**; 51(4): 429-33.
- 8- **Ohmori O, Shinkai T, Hori H, Kojima H, Nakamura J.** Synapsin III gene polymorphisms and schizophrenia. *Neurosci Let*, **2000**; 279(2):125-7.
- 9- **Sze CI, Bi H, Kleinschmidt-DeMasters BK, Filley CM, Martin LJ.** Selective regional loss of exocytotic presynaptic vesicle proteins in Alzheimer's disease brains. *J Neurol Sci*, **2000**;175(2): 81-90.
- 10- **Shimohama S, Kamiya S, Taniguchi T, Akagawa K, Kimura J.** Differential involvement of synavesicle and presynaptic plasma membrane proteins in Alzheimer's disease. *Biochem Biophys Res Commun*, **1997**; 236(2): 239-42.
- 11- **Yüksel N.** Ruhsal hastalıklar, Ankara: Çizgi yayıncılık, **2001.**

- 12- **Marambaud P, Robakis NK.** Genetic and molecular aspects of Alzheimer's disease shed light on new mechanisms of transcriptional regulation. *Genes Brain Behav*, **2005**;134-46.
- 13- **Adalbert R, Gilley J, Coleman MP.** A beta, tau and ApoE4 in Alzheimer's disease: the axonal connection. *Trends Mol Med*. **2007**;13(4):135-42.
- 14- **Selkoe D.J.** Amyloid β protein and the genetics of Alzheimer's disease. *J. Biol. Chem.* **1996**; 271(31):18295-18300.
- 15- **Işık E.** Organik Psikiyatri, Tayf Matbaacılık, Ankara: **1999**
- 16- **Oge AE.** Sinir sisteminin dejeneratif hastalıkları: Demans sendromu, Alzheimer Hastalığı ve Alzheimer dışı demanslar, Ankara: Nobel tıp Kitabevi, **2004**
- 17- **Li L, Chin LS.** The molecular machinery of synaptic vesicle exocytosis. *Cell Mol Life Sci*, **2003**; 60(5): 942-60.
- 18- **Sørensen JB.** SNARE complexes prepare for membrane fusion. *Trends Neurosci*, **2005**; 28(9): 453-5.
- 19- **An S.J, Almers W.** Tracking SNARE complex formation in live endocrine cells. *Science*, **2004**; 306: 1042-1046
- 20- **Siegel GJ, Agranoff BW, Albers R, Wayne F, Stephen K, Uhler MD.** Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular, and Medical Aspects, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia: **1999**
- 21- **Zhen M, Jin Y.** Presynaptic terminal differentiation: transport and assembly. *Curr Opin Neurobiol*, **2004**;14(3): 280-7.
- 22- **Kao HT, Porton B, Czernik AJ, Feng J, Yiu G, Häring M, Benfenati F, Greengard P.** A third member of the synapsin gene family. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **1998**; 95(8): 4667-72.
- 23- **Tsai MT, Hung CC, Tsai CY, Liu MY, Su YC, Chen YH, Hsiao KJ, Chen CH.** Mutation analysis of synapsin III gene in schizophrenia. *Am J Med Genet*, **2002**;114(1):79-83.

- 24- **Madame Curie Bioscience Database.** Landes Bioscience and Springer Science Business Media, **2009**
- 25- **Porton B, Ferreira A, DeLisi LE, Kao HT.** A rare polymorphism affects a mitogen-activated protein kinase site in synapsin III: possible relationship to schizophrenia. *Biol Psychiatry*, **2004**; 55(2):118-25.
- 26- **Frederikse PH, Yun E, Kao HT, Zigler JS Jr, Sun Q, Qazi AS.** Synapsin and synaptic vesicle protein expression during embryonic and post-natal lens fiber cell differentiation. *Mol Vis*, **2004**;10:794-804.
- 27- **Ohtsuki T, Ichiki R, Toru M, Arinami T.** Mutational analysis of the synapsin III gene on chromosome 22q12-q13 in schizophrenia. *Psychiatry Res*, **2000**; 94(1):1-7.
- 28- **Imai K, Harada S, Kawanishi Y, Tachikawa H, Okubo T, Suzuki T.** Polymorphisms in the promoter and coding regions of the synapsin III gene. A lack of association with schizophrenia. *Neuropsychobiology*, **2001**;43(4): 237-41.
- 29- **Porton B, Kao HT, Greengard P.** Characterization of transcripts from the synapsin III gene locus. *J Neurochem*, **1999**; 73(6): 2266-71.
- 30- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=omim&TabCmd=Limits> (Erişim tarihi: 15.10.2008)
- 31- <http://www.genecards.org/>(Erişim tarihi: 10. 01. 2009)
- 32- **Liguori M, Cittadella R, Manna I, Valentino P, La Russa A, Serra P, Trojano M, Messina D, Ruscica F, Andreoli V, Romeo N, Livrea P, Quattrone A.** Association between Synapsin III gene promoter polymorphisms and multiple sclerosis. *J Neurol*, **2004**;251(2):165-70.
- 33- **Akkad DA, Gödde R, Epplen JT.** No association between synapsin III gene promoter polymorphisms and multiple sclerosis in German patients. *J Neurol*, **2006**;253(10):1365-6.
- 34- **Otaegui D, Zuriarrain O, Castillo-Triviño T, Aransay A, Ruíz-Martinez J, Olaskoaga J, Marti-Masso J, Lopez de Munain A.** Association between synapsin III gene promoter SNPs and multiple sclerosis in Basque patients. *Mult Scler*, **2009**; 15(1):124-8.
- 35- **Lachman HM, Stopkova P, Papolos DF, Pedrosa E, Margolis B, Aghalar MR, Saito T.** Analysis of synapsin III-196 promoter mutation in schizophrenia and bipolar disorder. *Neuropsychobiology*, **2006**; 53(2):57-62.
- 36- **Wong AH, Trakalo J, Likhodi O, Yusuf M, Macedo A, Azevedo MH, Klempan T, Pato MT, Honer WG, Pato CN, Van Tol HH, Kennedy JL.** Association between schizophrenia and the syntaxin 1A gene. *Biol Psychiatry*, **2004**; 56(1): 24-9.

- 37- **Bennett MK, Calakos N, Scheller RH.** Syntaxin: a synaptic protein implicated in docking of synaptic vesicles at presynaptic active zones. *Science*, **1992**; 257 (5067): 255-9.
- 38- **Smith SK, Anderson HA, Yu G, Robertson AG, Allen SJ, Tyler SJ, Naylor RL, Mason G, Wilcock GW, Roche PA, Fraser PE, Dawbarn D.** Identification of syntaxin 1A as a novel binding protein for presenilin-1. *Brain Res Mol Brain Res*, **2000**; 78 (1-2): 100-7.
- 39- **Naren AP, Di A, Cormet-Boyaka E, Boyaka PN, McGhee JR, Zhou W, Akagawa K, Fujiwara T, Thome U, Engelhardt JF, Nelson DJ, Kirk KL** Syntaxin 1A is expressed in airway epithelial cells, where it modulates CFTR Cl(-) currents. *J Clin Invest*, **2000**; 105(3): 377-86.
- 40- **Nakayama T, Fujiwara T, Miyazawa A, Asakawa S, Shimizu N, Shimizu Y, Mikoshiba K, Akagawa K.** Mapping of the human HPC-1/syntaxin 1A gene (STX1A) to chromosome 7 band q11.2. *Genomics*, **1997**;42(1):173-6.
- 41- **Tsunoda K, Sanke T, Nakagawa T, Furuta H, Nanjo K.** Single nucleotide polymorphism (D68D, T to C) in the syntaxin 1A gene correlates to age at onset and insulin requirement in Type II diabetic patients. *Diabetologia*, **2001**;44(11):2092-7.
- 42- **Han X, Wang CT, Bai J, Chapman ER, Jackson MB.** Transmembrane segments of syntaxin line the fusion pore of Ca²⁺-triggered exocytosis. *Science*, **2004**;304(5668):289-92.
- 43- **Kawashima K, Kishi T, Ikeda M, Kitajima T, Yamanouchi Y, Kinoshita Y, Takahashi N, Saito S, Ohi K, Yasuda Y, Hashimoto R, Takeda M, Inada T, Ozaki N, Iwata N.** No association between tagging SNPs of SNARE complex genes (STX1A, VAMP2 and SNAP25) and schizophrenia in a Japanese population. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*, **2008**;147B(7):1327-31.
- 44- **Pennuto M, Bonanomi D, Benfenati F, Valtorta F.** Synaptophysin I controls the targeting of VAMP2/synaptobrevin II to synaptic vesicles. *Mol Biol Cell*, **2003**;14(12):4909-19.
- 45- **Shinichi S, Nagahide T, Ryoko I, Masashi I, Tatsuyo S, Tsuyoshi K, Yoshio Y, Nakao I, Mitsuhiro Y, Keizo Y, Toshiya I, Norio O.** Association study between vesicle-associated membrane protein 2 gene polymorphisms and fluvoxamine response in Japanese major depressive patients. *Neuropsychobiology*, **2006**; 54: 226-230.
- 46- **Oishi Y, Arakawa T, Tanimura A, Itakura M, Takahashi M, Tajima Y, Mizoguchi I, Takuma T.** Role of VAMP-2, VAMP-7, and VAMP-8 in constitutive exocytosis from HSY cells. *Histochem Cell Biol*, **2006**;125(3):273-81.

47- **Nystuen AM, Schwendinger JK, Sachs AJ, Yang AW, Haider NB.** A null mutation in VAMP1/synaptobrevin is associated with neurological defects and prewean mortality in the lethal-wasting mouse mutant. *Neurogenetics*, **2007**;8(1):1-10.

48- <http://www.ihop-net.org> (Erişim tarihi: 21. 09. 2008)

49- **Shirasu M, Kimura K, Kataoka M, Takahashi M, Okajima S, Kawaguchi S, Hirasawa Y, Ide C, Mizoguchi A.** VAMP-2 promotes neurite elongation and SNAP-25A increases neurite sprouting in PC12 cells. *Neurosci Res*, **2000**; 37(4):265-75.

50- **V. Falbo, G. Florida, S. Gaudi, G. Zoraqi and D. Taruscio.** A new polymorphism in the flanking region of human VAMP2 and hPer1 genes. *Molecular and Cellular Probes*, **2002**; 16: 391-392.

51- **Mill J, Xu X, Ronald A, Curran S, Price T, Knight J, Craig I, Sham P, Plomin R, Asherson P.** Quantitative trait locus analysis of candidate gene alleles associated with attention deficit hyperactivity disorder (ADHD) in five genes: DRD4, DAT1, DRD5, SNAP-25, and 5HT1B. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*, **2005**;133B(1):68-73.

52- **Grabs D, Bergmann M, Urban M, Post A, Gratzl M.** Rab3 proteins and SNAP-25, essential components of the exocytosis machinery in conventional synapses, are absent from ribbon synapses of the mouse retina. *Europ. J. Neurosci*, **1996**; 8: 162-168

53- **McNew J. A, Parlati F, Fukuda R, Johnston R. J, Paz K, Paumet F, Sollner T. H, Rothman J. E.** Compartmental specificity of cellular membrane fusion encoded in SNARE proteins. *Nature*, **2000**; 407: 153-159

54- **Kustanovich V, Merriman B, McGough J, McCracken JT, Smalley SL, Nelson SF.** Biased paternal transmission of SNAP-25 risk alleles in attention-deficit hyperactivity disorder. *Mol Psychiatry*, **2003**; 8(3):309-15.

55- **Brophy K, Hawi Z, Kirley A, Fitzgerald M, Gill M.** Synaptosomal-associated protein 25 (SNAP-25) and attention deficit hyperactivity disorder (ADHD): evidence of linkage and association in the Irish population. *Mol Psychiatry*, **2002**;7(8):913-7.

56- **Müller DJ, Klempan TA, De Luca V, Sicard T, Volavka J, Czobor P, Sheitman BB, Lindenmayer JP, Citrome L, McEvoy JP, Lieberman JA, Honer WG, Kennedy JL.** The SNAP-25 gene may be associated with clinical response and weight gain in antipsychotic treatment of schizophrenia. *Neurosci Lett*, **2005**;379(2):81-9.

57- **Mill J, Curran S, Kent L, Gould A, Hockett L, Richards S, Taylor E, Asherson P.** Association study of a SNAP-25 microsatellite and attention deficit hyperactivity disorder. *Am J Med Genet*, **2002**;114(3):269-71.

- 58- **Musil R, Spellmann I, Riedel M, Dehning S, Douhet A, Maino K, Zill P, Müller N, Möller HJ, Bondy B.** SNAP-25 gene polymorphisms and weight gain in schizophrenic patients. *J Psychiatr Res*, **2008**; 42(12):963-70.
- 59- **Barr CL, Feng Y, Wigg K, Bloom S, Roberts W, Malone M, Schachar R, Tannock R, Kennedy JL.** Identification of DNA variants in the SNAP-25 gene and linkage study of these polymorphisms and attention-deficit hyperactivity disorder. *Mol Psychiatry*, **2000**;5(4):405-9.
- 60- **Miller SA, Dykes DD, Polesky HF.** A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Research* **1988**; 16:1215.
- 61- **Minger SL, Honer WG, Esiri MM, McDonald B, Keene J, Nicoll JA, Carter J, Hope T, Francis PT.** Synaptic pathology in prefrontal cortex is present only with severe dementia in Alzheimer disease. *J Neuropathol Exp Neurol*, **2001**;60(10):929-36.
- 62- **Gyls KH, Fein JA, Yang F, Wiley DJ, Miller CA, Cole GM.** Synaptic changes in Alzheimer's disease: increased amyloid-beta and gliosis in surviving terminals is accompanied by decreased PSD-95 fluorescence. *Am J Pathol*, **2004**;165(5):1809-17.
- 63- **Dessi F, Colle MA, Hauw JJ, Duyckaerts C.** Accumulation of SNAP-25 immunoreactive material in axons of Alzheimer's disease. *Neuroreport*, **1997**; 8(17): 3685-9.
- 64- **Cozza A, Melissari E, Iacopetti P, Mariotti V, Tedde A, Nacmias B, Conte A, Sorbi S, Pellegrini S.** SNPs in neurotrophin system genes and Alzheimer's disease in an Italian population. *J Alzheimers Dis*, **2008**;15(1):61-70.
- 65- **Cortini F, Fenoglio C, Guidi I, Venturelli E, Pomati S, Marcone A, Scalabrini D, Villa C, Clerici F, Dalla Valle E, Mariani C, Cappa S, Bresolin N, Scarpini E, Galimberti D.** Novel exon 1 progranulin gene variant in Alzheimer's disease. *Eur J Neurol*, **2008**;15(10):1111-7.
- 66- **Smith SK, Anderson HA, Yu G, Robertson AG, Allen SJ, Tyler SJ, Naylor RL, Mason G, Wilcock GW, Roche PA, Fraser PE, Dawbarn D.** Identification of syntaxin 1A as a novel binding protein for presenilin-1. *Brain Res Mol Brain Res*, **2000**;78(1-2):100-7.
- 67- **Slegers K, Brouwers N, Bettens K, Engelborghs S, van Miegroet H, De Deyn PP, Van Broeckhoven C.** No association between CALHM1 and risk for Alzheimer dementia in a Belgian population. *Hum Mutat*, **2009**;30(4):E570-E574.
- 68- **Minster RL, Demirci FY, Dekosky ST, Kamboh MI.** No Association Between *CALHM1* Variation and Risk of Alzheimer Disease. *Human Mutat*, **2009**; 30(4):E566-E569

- 69- **Yang L, Lu R, Jiang L, Liu Z, Peng Y.** Expression and genetic analysis of tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) G-308A polymorphism in sporadic Alzheimer's disease in a Southern China population. *Brain Res*, **2009**;1247:178-81.
- 70- **McGeer PL, McGeer EG.** Polymorphisms in inflammatory genes and the risk of Alzheimer disease. *Arch Neurol*, **2001**;58(11):1790-2.
- 71- **Candore G, Balistreri CR, Grimaldi MP, Vasto S, Listi F, Chiappelli M, Licastro F, Lio D, Caruso C.** Age-related inflammatory diseases: role of genetics and gender in the pathophysiology of Alzheimer's disease. *Ann N Y Acad Sci*, **2006**;1089:472-86.
- 72- **Tanzi RE, Bertram L.** Alzheimer's disease: The latest suspect. *Nature*, **2008**; 454(7205): 706-8.
- 73- **Ray S, Britschgi M, Herbert C, Takeda-Uchimura Y, Boxer A, et al.** Classification and prediction of clinical Alzheimer's diagnosis based on plasma signaling proteins. *Nat Med*, **2007**;13(11):1359-62.
- 74- **Harel A, Wu F, Mattson MP, Morris CM, Yao PJ.** Evidence for CALM in directing VAMP2 trafficking. *Traffic*, **2008**; 9(3): 417-29.
- 75- **Makkar R, Gomez L, Wigg KG, Ickowicz A, Pathare T, Tannock R, Malone M, Kennedy JL, Schachar R, Barr CL.** The gene for synapsin III and attention-deficit hyperactivity disorder. *Psychiatr Genet*, **2007**; 17(2): 109-12.
- 76- **Gabriel SM, Haroutunian V, Powchik P, Honer WG, Davidson M, Davies P, Davis KL.** Increased concentrations of presynaptic proteins in the cingulate cortex of subjects with schizophrenia. *Arch Gen Psychiatry*, **1997**; 54(6): 559-66.
- 77- **Honer WG, Falkai P, Young C, Wang T, Xie J, Bonner J, Hu L, Boulianne GL, Luo Z, Trimble WS.** Cingulate cortex synaptic terminal proteins and neural cell adhesion molecule in schizophrenia. *Neuroscience*, **1997**;78(1):99-110.
- 78- **Mukaetova-Ladinska EB, Hurt J, Honer WG, Harrington CR, Wischik CM.** Loss of synaptic but not cytoskeletal proteins in the cerebellum of chronic schizophrenics. *Neurosci Lett*, **2002**; 317(3): 161-5.
- 79- **Quick MW.** Role of syntaxin 1A on serotonin transporter expression in developing thalamocortical neurons. *Int J Dev Neurosci*, **2002**;20(3-5): 219-24.

80- **McRory JE, Rehak R, Simms B, Doering CJ, Chen L, Hermosilla T, Duke C, Dyck R, Zamponi GW.** Syntaxin 1A is required for normal in utero development. *Biochem Biophys Res Commun*, **2008**;375(3):372-7.

81- **Braak H, Braak E.** Alzheimer's disease: striatal amyloid deposits and neurofibrillary changes. *J Neuropathol Exp Neurol*, **1990**;49(3): 215-24.

82- **Gearing M, Schneider JA, Rebeck GW, Hyman BT, Mirra SS.** Alzheimer's disease with and without coexisting Parkinson's disease changes: apolipoprotein E genotype and neuropathologic correlates. *Neurology*, **1995**;45(11):1985-90.

83- **Masliah E, Honer WG, Mallory M, Voigt M, Kushner P, Hansen L, Terry R.** Topographical distribution of synaptic-associated proteins in the neuritic plaques of Alzheimer's disease hippocampus. *Acta Neuropathol*, **1994**; 87(2): 135-42.

84- **Dekosky ST, Scheff SW, Styren SD.** Structural correlates of cognition in dementia: quantification and assessment of synapse change. *Neurodegeneration*, **1996**;5(4):417-21.

Tuba GÖKDOĞAN EDGÜNLÜ'nün özgeçmiři

1979 yılında Elazığ'da doğdu. İlk orta ve lise öğrenimini Elazığ'da tamamladı. 1997-2001 yılları arasında Fırat Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümünde lisans eğitimini tamamladı. 2001-2003 yılları arasında Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik A.D da yüksek lisans eğitimini yaptı. 2003 yılında Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik A.D da başlamış olduğu doktora eğitimi devam etmektedir. Evli ve bir çocuk annesidir.