

T.C.
ESKİŞEHİR OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ GENETİK ANABİLİM DALI

TEZ KONUSU

OLASI ALZHEİMER TANISI ALMIŞ OLGULARDA
APOLİPROTEİN E (APO E) VE
İNERLÖKİN-1 ALFA C889T (*IL-1 α* C889T)
GEN POLİMORFİZMLERİNİN HASTALIK İLE İLİŞKİSİNİN
ARAŞTIRILMASI

DOKTORA TEZİ

SALİHA HANDAN YILDIZ

DANIŞMAN

PROF. DR. SEVİLHAN ARTAN

2. DANIŞMAN

PROF. DR. MUSTAFA SOLAK

EKİM, 2008

T.C.
ESKİŞEHİR OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ GENETİK ANABİLİM DALI

TEZ KONUSU
OLASI ALZHEİMER TANISI ALMIŞ OLGULARDA
APOLİPROTEİN E (APO E) VE
İNERLÖKİN-1 ALFA C889T (*IL-1 α* C889T)
GEN POLİMORFİZMLERİNİN HASTALIK İLE İLİŞKİSİNİN
ARAŞTIRILMASI

DOKTORA TEZİ

SALİHA HANDAN YILDIZ

DANIŞMAN
PROF. DR. SEVİLHAN ARTAN

2. DANIŞMAN
PROF. DR. MUSTAFA SOLAK

Bu tez çalışması Afyon Kocatepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonunun 051.TIP.06 ve 06.TIP.25 no'lu projeleri ile desteklenmiştir.

KABUL VE ONAY SAYFASI

Saliha Handan YILDIZ'ın Doktora Tezi olarak hazırladığı “*Olası Alzheimer Tanısı Almış Olgularda Apolipoprotein E(APOE) ve Interlökin-1 Alfa C889T (IL-1A C889T) Gen Polimorfizmlerinin Hastalık ile İlişkinin Araştırılması*” başlıklı bu çalışma Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği'nin ilgili maddesi uyarınca değerlendirilerek “**KABUL**” edilmiştir.

07.10.2008

Üye: Prof.Dr. Sevilhan ARTAN



Üye: Prof.Dr. Mustafa SOLAK



Üye: Prof.Dr. B.Demet ÖZBABALIK



Üye: Doç.Dr. M.Hamza MÜSLÜMANOĞLU



Üye: Yrd.Doç.Dr. Oğuz ÇİLİNGİR



Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 15.10./2008. tarih ve 762./3531 sayılı kararı ile onaylanmıştır.


Prof.Dr.Ferruh YÜCEL
Enstitü Müdürü

ÖZET

Demans kişinin bilişsel ve entellektüel işlevlerinin normal dışı azalmasıdır. Demans sendromlarının en yaygın olanı Alzheimer hastalığıdır. Alzheimer nörofibriler yumaklar ve amiloid plaklar ile karakterize, yıkıcı bir beyin hastalığıdır. Alzheimer multifaktöryel kalıtım gösteren bir hastalık olup; genetik temeli oldukça karmaşıktır. Birçok farklı gen ve polimorfizm çevresel faktörlerle etkileşerek demans gelişimine sebep olabilmektedir. Geç başlangıçlı ve sporadik Alzheimer patogeneğinde etkili olduğu düşünülen en önemli genetik risk faktörü *ApoE* gen polimorfizmidir. Ayrıca inflamasyon, Alzheimer hastalığına neden olan patojenik kaskatların bir kısmı olabilir. Patolojik çalışmalar Alzheimer hastalarının beyinde kronik inflamasyonun olduğunu ortaya koymuştur. Bu sebeple, bir proinflammator sitokin olan interlökin-1 (IL-1) de bu hastalığın patogeneziyle ilişkilendirilmiştir. Birçok çalışma, Alzheimer hastalığı ve *IL-1 α* C889T alel polimorfizmi arasında ilişki olduğunu göstermektedir.

Bu çalışmada, *ApoE* geni $\epsilon 2$, $\epsilon 3$, $\epsilon 4$ polimorfizmleri ve *IL-1 α* geni C889T polimorfizminin genotip ve alel frekansları çalışma grubumuzdaki 95 Alzheimer hastası ve 60 demans öyküsü olmayan kontrol bireyde değerlendirilmiştir. Çalışmamızda $\epsilon 3/\epsilon 3$ genotip frekansı kontrol grubunda, $\epsilon 3/\epsilon 4$, $\epsilon 4/\epsilon 4$ genotip frekansları ise olgu grubunda anlamlı düzeyde yüksekti. $\epsilon 3$ alel frekansı kontrol grubunda, $\epsilon 2$ ve $\epsilon 4$ alel frekansları ise olgu grubunda anlamlı düzeyde yüksekti. Kontrol ve olgu grupları arasında *IL-1 α* geni C889T polimorfizmine ilişkin genotip ve alel frekanslarının dağılımı açısından farklılık gözlenmedi.

Sonuç olarak, Alzheimer hastalığı ile *Apo E* $\epsilon 4$ aleli arasında kuvvetli bir ilişki varken, Alzheimer hastalığı ile *IL-1 α* C889T polimorfizmi arasında bir ilişki olmadığı belirlendi.

Anahtar kelimeler: Alzheimer hastalığı, Apolipoprotein E, İnterlökin-1 Alfa, Polimorfizm

SUMMARY

Demantia is abnormal decrease of cognitive and intellectual processes. The most commonly demantia syndrome is Alzheimer's disease. Alzheimer's disease is a destructive brain disease which is categorized by neurofibrillar tangles and amyloid plaques. Alzheimer's disease is a multifactorial disease and its genetic basis is too complicated. Many different genes and polymorphisms interacting with environmental factors may lead to development of demantia. *ApoE* gene polymorphism is thought to be the most important genetic risk factor in the patogenesis of late onset and sporadic Alzheimer's disease. Inflammation may also be the part of patogenic cascade that leads to the Alzheimer's disease. Pathological studies have exhibited that chronic inflammation exists in the brain of patients with Alzheimer's disease. Therefore, Interleukin 1 (IL-1), a proinflammatory cytokine, is found to be associated with the patogenesis of Alzheimer's disease. Many investigations show that there is an association between *IL-1 α* C889T allele polymorphism and Alzheimer's disease.

In this study recent studies, genotype and allele frequencies of $\epsilon 2, \epsilon 3, \epsilon 4$ polymorphisms of *ApoE* gene and C889T polymorphism of *IL-1 α* gene were evaluated in 95 patients with Alzheimer's disease and 60 controls without demantia story. The results showed that $\epsilon 3/\epsilon 3$ and $\epsilon 3/\epsilon 4$ genotype frequencies significantly higher in the control and case groups, respectively. Although statistically significant $\epsilon 3$ allele frequency was detected in the control group, $\epsilon 2$ and $\epsilon 4$ allele frequencies were significantly higher among the cases with Alzheimer's. There was no difference between control and case group in point of the distribution of genotypes and allele frequencies of C889T polymorphism of *IL-1 α* gene.

In conclusion, there was a strong association between Alzheimer's disease and *ApoE* $\epsilon 4$ allele, while was no relation was seen in with *IL-1 α* C889T polymorphism.

Keywords: Alzheimer's Disease, Apolipoprotein E, Interleukin-1 Alpha, Polymorphism

İÇİNDEKİLER

ÖZET	v
SUMMARY	vi
İÇİNDEKİLER	vii
ŞEKİL DİZİNİ	x
TABLO DİZİNİ	xi
SİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİ	xii
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Demans ve Alzheimer Hastalığı	3
2.2. Alzheimer Hastalığının Epidemiyolojisi.....	4
2.3. Alzheimer Hastalığının Nöropatolojisi ve Patogenezi.....	5
2.3.1. Nöritik Plaklar	5
2.3.2. Nörofibril Düğümler	5
2.4. Alzheimer Hastalığının Klinik Özellikleri ve Teşhisi	6
2.5. Alzheimer Hastalığının Alt Tipleri	7
2.6. Alzheimer Hastalığının Etiyolojisi	9
2.6.1. Demografik Risk Faktörleri.....	9
2.6.1.1 Yaş.....	9
2.6.1.2. Cinsiyet.....	9
2.6.1.3. Ailede Demans Öyküsü	10
2.6.1.4. Eğitim Düzeyi	10
2.6.1.5. Down Sendromu	10
2.6.1.7 Genetik Risk Faktörleri	10
2.7. Alzheimer Hastalığının Genetiği	11
2.7.1. Erken Başlangıçlı Alzheimer Hastalığı ile İlişkili Genler.....	11
2.7.2. Geç Başlangıçlı Alzheimer Hastalığı ile İlişkili Genler.....	11
2.7.2.1. ApoE Geni ve ApoE Proteini	14
2.7.2.2. ApoE ve Alzheimer Hastalığı	16
2.7.2.2.1. ApoE ve Amiloid β	17
2.7.2.2.2. ApoE ve Nörofibril Düğümler	18
2.7.2.2.3. ApoE, Kolesterol ve Sinaptik Tamir	19

2.7.2.2.4. ApoE ve Nörotoksisite.....	20
2.7.2.3. İnterlökin-1 Alfa (IL-1 α) Geni ve Proteini.....	20
2.7.2.4. IL-1 α ve Alzheimer.....	21
2.7.2.4.1. Alzheimer Hastalığında IL-1'in Aşırı Ekspresyonu.....	22
2.7.2.4.2. Alzheimer Patogenezinde Potansiyel IL-1 Teşvikli Kaskadlar	22
2.7.2.4.3. IL-1 ve Nöronal Disfonksiyon	24
2.8. Polimorfizm.....	24
2.9. Eş Zamanlı PCR Yöntemi.....	25
2.9.1. LightCycler Sistemi	28
3. GEREÇLER VE YÖNTEMLER	30
3.1. Gereçler.....	30
3.1.1. Materyal Seçimi.....	30
3.1.2. Kullanılan Kimyasallar	30
3.1.2.1. DNA İzolasyonu.....	30
3.1.2.2. <i>ApoE</i> Genotipleme.....	31
3.1.2.3. <i>IL-1α</i> C889T Genotipleme.....	31
3.1.3. Kullanılan Cihazlar	32
3.2. YÖNTEMLER	33
3.2.1. DNA Ekstraksiyonu	33
3.2.2. <i>ApoE</i> Genotipleme	34
3.2.3. <i>IL-1α</i> C-889T Genotipleme.....	39
3.2.4. Verilerin İstatistiksel Olarak Değerlendirilmesi	43
4. BULGULAR.....	44
4.1. ApoE Geni ϵ 2, ϵ 3 ve ϵ 4 Polimorfizmlerinin Genotip ve Alel Frekansı	44
4.2. <i>IL-1α</i> C889T Polimorfizminin Genotip ve Alel Frekansı	48
4.3. <i>IL-1α</i> C889T ve ApoE ϵ 2, ϵ 3 ve ϵ 4 Polimorfizmlerinin Birlikte Değerlendirilmesi	49
5. TARTIŞMA	50
5.1. ApoE geni ϵ 2, ϵ 3 ve ϵ 4 Polimorfizmleri ile Alzheimer Hastalığının İlişkisi.....	50
5.2. <i>IL-1α</i> C889T polimorfizmi ile Alzheimer Hastalığının İlişkisi.....	55
5.3. ApoE ϵ 4 Aleli ve <i>IL-1α</i> C889T Genotiplerinin Birlikteliği	57

6. SONUÇ.....	61
7. KAYNAKLAR.....	63
ÖZGEÇMİŞ.....	72

SEKİL DİZİNİ

Şekil 2.5.1: AH'nin teşhisinde kullanılan NINCDS/ADRDA kriterleri.	8
Şekil 2.7.2.1.1: ApoE polimorfizmleri.	16
Şekil 2.7.2.2.1: Beyinde ApoE fonksiyonu	17
Şekil 2.7.2.2.1: Alzheimer hastalığına neden olan ApoE ilişkili bazı metabolik prosesler.....	18
Şekil 2.7.2.4.4.1: IL-1 teşvikli nöronal hasara neden olan kaskadlar. NO, nitrik oksit; INOS, teşvik edilebilir NO sintaz	23
Şekil 2.9.1. Eş zamanlı PCR yönteminde yaygın kullanılan boya ve prob türleri.....	27
Şekil 3.2.2.1: Apo E ε2, ε3 ve ε4 polimorfizmlerine ilişkin genotiplerin kodon 112'ye ait erime eğrisi analizi.....	38
Şekil 3.2.2.2: Apo E ε2, ε3 ve ε4 polimorfizmlerine ilişkin genotiplerin kodon 158'e ait erime eğrisi analizi.	39
Şekil 4.1.1: Kontrol ve olgu grubunda <i>ApoE</i> genotip frekanslarının dağılımı.	45
Şekil 4.1.2: Kontrol ve olgu grubunda <i>ApoE</i> alel frekanslarının dağılımı.	47

TABLO DİZİNİ

Tablo 2.7.1.1: Erken oluşan otozomal dominant ailevi Alzheimer hastalığına etki eden genler.....	11
Tablo 2.7.2.1: GBAH ile ilişkili bazı genler.....	12
Tablo 2.7.2.1 (Devamı): GBAH ile ilişkili bazı genler	13
Tablo 2.7.2.1 (Devamı): GBAH ile ilişkili bazı genler	14
Şekil 3.2.3.1: IL-1 α C-889T polimorfizmine ilişkin genotiplerin erime eğrisi analizi	42
Tablo 4.1: Kontrol ve olgu gruplarının demografik özellikleri	44
Tablo 4.1.1: Kontrol ve olgu grubunda <i>ApoE</i> genotip frekanslarının dağılımı	45
Tablo 4.1.2: Kontrol ve olgu grubunda <i>ApoE</i> ϵ 4 alelinin varlığı (pozitif) veya yokluğu (negatif)	46
Tablo 4.1.3: Kontrol ve olgu grubunda <i>ApoE</i> alel frekanslarının dağılımı	46
Tablo 4.1.4: Ailesinde demans öyküsü olan veya olmayan olgu grubunda <i>ApoE</i> alellerinin dağılımı	47
Tablo 4.2.1: Kontrol ve olgu grubunda IL-1 α C889T genotip frekanslarının dağılımı	48
Tablo 4.2.2: Kontrol ve olgu grubunda IL-1 α C889T alel frekanslarının dağılımı	49
Tablo 4.3.1: ϵ 4 aleli taşıyan ve taşımayan AH'larında CC, CT ve TT genotiplerinin dağılımı	49
Tablo. 5.3.1. Farklı populasyonlarda ApoE geni ϵ 2, ϵ 3 ve ϵ 4 Polimorfizmlerinin genotip ve alel frekansları	59
Tablo. 5.3.2. Farklı populasyonlarda IL-1 α C889T polimorfizminin genotip ve alel frekansları.....	60

SİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİ

Simge	Açıklama
ACT	Alfa1-antikimotripsin
A2M	Alfa2-makroglobülin
AH	Alzheimer hastalığı
A β	Amiloid β
APP	Amiloid prokürsör proteini
ApoE	Apolipoprotein E
Arg	Arjinin
AChE	Asetilkolinesteraz
Bç	Baz çifti
BChE	Bütirikolinesteraz
VLDL-R	Çok düşük yoğunluklu lipoprotein reseptörü
DNA	Deoksiribonükleik asit
LDL	Düşük yoğunluklu lipoprotein
EBAH	Erken başlangıçlı Alzheimer hastalığı
EDTA	Etilendiamin tetraasetik asit
GBAH	Geç başlangıçlı Alzheimer hastalığı
IL-1 α	İnterlökin-1 α
IL-1 β	İnterlökin-1 β
IL-1Ra	İnterlökin-1 reseptör antagonisti
ICE	İnterlökin-1 β dönüştürücü enzim
S100 β	Kalsiyum bağlanma proteini beta
Kb	Kilobaz
kDa	Kilodalton
LC	Light cycler
LRP	Lipoprotein reseptör proteini
μ l	Mikrolitre
NINCDS/ADRDA	National Institute of Neurological and Communicative Disorders and Stroke/Alzheimer's Disease and Related Disorders Association
PSEN1	Presenilin 1
PSEN2	Presenilin 2
SSS	Serebrospinal sıvı
Cys	Sistein
iNOS	Teşvik edilebilir nitritoksitsintaz
TBE	Tris-Borat-EDTA
HDL	Yüksek yoğunluklu lipoprotein

1. GİRİŞ VE AMAC

Alzheimer hastalığı bellek, konuşma, yüksek serebral işlevler ve görsel-uzaysal beceriler gibi birden çok sistemi etkileyen, bilişsel işlevlerde ilerleyici kayıp ile seyreden nörodejeneratif bir hastalıktır (49). Hastalık, klinik ve patolojik yönden etiyolojik olarak çok farklı bir beyin yetmezliğidir. Hastalığın klinik özellikleri bellek kaybı, davranış değişiklikleri, kognitif yetmezlik, nörofibriler yumaklar, nöritik plaklar ve nöronal ölüm olarak ortaya çıkmaktadır (91).

Alzheimer hastalığı, yaşlı bireylerdeki demansın (kişinin bilişsel ve entellektüel işlevlerinin normal dışı azalması) en sık nedenidir. Toplumda sıklığı 65 yaş için %5-10, 85 ve daha ileri yaşlar için %47 olarak bildirilen Alzheimer hastalığının patogenezi, klinik seyri ve prognozu ile ilişkili faktörler son yıllarda araştırmaların ilgi odağı olmuştur. Hastalığın klinik özellikleri arasında hafıza ve kavramaya ait fonksiyonların bozulması yer almaktadır (62).

Alzheimer hastalığının patogenezinin sorumlu olduğu düşünülen apolipoprotein E (ApoE)'nin, beyin omurilik sıvısında amiloid beta'ya bağlı bulunduğu ve Alzheimer'lı bireylerin beyinlerinde senil plak ve nörofibriler yumaklara kolonize olduğu gösterilmiştir. ApoE, başlıca karaciğer tarafından sentezlenen bir plazma proteini olup, ilgili *ApoE* geni kromozom 19q13.2'de lokalizedir. ApoE'nin genetik olarak belirlenmiş üç şekli olan ApoE ε2, ApoE ε3 ve ApoE ε4 yüklerine göre ayrılmalarını sağlayan izoelektrik fokuslama ile ayrıştırılabilir. ApoE ε2 ApoE ε3'ten 158. amino asidin farklı olmasıyla ayrılırken (ApoE ε2'de sistein, ApoE ε3'te arginin), ApoE ε4 ApoE ε3'ten 112. amino asidin farklı olmasıyla ayrılır (ApoE ε3'te sistein, ApoE ε4'te arginin). Geç başlangıçlı Alzheimer hastalığı ile *ApoE*'nin ε4 aleli arasında güçlü bir ilişki olduğu birçok çalışmada gösterilmiştir (94).

Alzheimerlı hastaların beyin dokusunda IL-1'in aşırı derecede eksprese edildiği, IL-1'in aşırı ekspresyonunun belirlenmiş bir beyin bölgesini kapsayan patoloji ile ilişkilendirildiği ve IL-1'in aşırı ekspresyonunun kortikal bölgeleri geçerek Alzheimer

patolojisinin yayılışı ile ilişkili olduğu bildirilmektedir (116). Potansiyel bir proinflammator sitokin olan interlökin-1 (IL-1), her biri 2. kromozomun uzun kolunda (2q14-21) lokalize olmuş ayrı bir gen kümesi tarafından kodlanan ve en az üç değişik varyantı bulunan (IL-1A, IL-1B ve IL-1 antagonist reseptörü) bir protein ailesidir (119). IL-1 yetişkin beyninde düşük seviyelerde eksprese edilmekte ve farklı bir patofizyolojik oluşum içinde önemli bir rol oynamaktadır (130). İnflammator, Alzheimer hastalığına neden olan patojenik kaskadın bir kısmı olabileceğinden dolayı, IL-1A'nın bu hastalığın patogeneziyle ilişkili olabileceği düşünülmektedir. Alzheimer hastalarının beyinlerinde, artan IL-1 immünoreaktivitesi ilk olarak Griffin ve arkadaşları tarafından tanımlanmıştır (36). Alzheimer hastalığı patolojisi bulunan beyin bölgelerinde IL-1'in aşırı üretildiği bildirilmiştir. Nöritik plak progresyonunun boyutu ile nörofibriler karışıklık derecesinin IL-1 üretimi ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. Alzheimer hastalığının patogenezinde IL-1'in rolünü aydınlatmak için yapılan çalışmalar da *IL-1A-C889* polimorfizmi farklı populasyonlarda değerlendirilmiştir (22, 39).

Bu çalışmada, Alzheimer hastalığı ile ilişkili olan *ApoE* genine ait $\epsilon 2$, $\epsilon 3$ ve $\epsilon 4$ alelleri ile bu hastalığa ilişkin aday genlerden biri olan *IL-1 α -C889T* polimorfizmi birlikte incelenerek hastalıkla ilişkileri araştırılmıştır. Çalışma sonuçlarının, Alzheimer tanısı alan olguların kendilerinde hastalığın seyri ve ailelerinde yatkınlık açısından bilgilendirici olacağı düşünülmektedir.

Ayrıca yapılan literatür taramasında ülkemizde bu hasta grubunda *IL-1 α -C889T* polimorfizmine ilişkin yapılan çalışmaların çok sınırlı olduğu görülmüştür. Çalışma verilerimiz, bu iki polimorfizmin birlikte değerlendirildiği, Türkiye'de Alzheimer hastalarındaki dağılımı ve hastalıkla ilişkisi üzerine elde edilen ilk veri olma özelliği taşımaktadır. Ayrıca çalışmamızda eş zamanlı PCR yöntemi ilk kez *IL-1 α -C889T* polimorfizmine ait genotipleme çalışması için kullanılmıştır.

Alzheimer hastalığı ile ilişkili genlerin ve etkilerinin çalışılması sadece yeni tedavi yaklaşımları için değerli ipuçları sağlamakla kalmayacak, erken teşhis ve bu yıkıcı hastalığın önlenmesi için çok önemli ön koşul haline gelecek olan yeni genetik risk profillemeye stratejilerinin gelişmesine de yol açacaktır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Demans ve Alzheimer Hastalığı

Demans “kişinin bilinç dışında olması” anlamına gelir ve kişinin daha önceki durumuna oranla bilişsel ve entellektüel işlevlerinde meydana gelen azalmayı anlatmak amacıyla kullanılır. Demans oluştuğunda, bellek başta olmak üzere konuşma, algılama, görsel boyutlandırma, hesaplama, soyut düşünme, yargı yapma ve problem çözme gibi bilişsel işlevlerden en az ikisinde bozukluk meydana gelir (17). Demans yaşlanmanın doğal sonucu olmayıp bir hastalık olarak kabul edilmekte ve normal yaşlanma ile görülen kognitif ve psikolojik değişikliklerden ayırt edilmesi gerekmektedir (57). 65 yaş üstü hastalarda demansın en önemli nedenleri; Alzheimer hastalığı (yaklaşık %60), vasküler demans (%15) ve vasküler demans-Alzheimer hastalığının bir arada bulunmasıdır (%10). Diğer hastalıklar, demans sebeplerinin sadece %10'unu oluşturur (56).

Alzheimer hastalığı bilişsel işlevlerde bozulma, günlük yaşam aktivitelerinde azalma, davranışsal ve psikolojik bozukluklarla sonuçlanan ilerleyici bir nörodejeneratif hastalıktır (58). Dr. Alois Alzheimer'ın 1907'de ilk olgusu 51 yaşındaki Auguste D.'yi yayınlamasından sonra hastalığa “Alzheimer” adını klinik şefi Dr. Emil Kraepelin vermiştir (109). Alzheimer hastalığı, yaşamın son dönemlerinde başlayan kademeli demans ile karakterize edilmekte ve teşhisten ortalama 8 ila 10 yıl sonra ölüme neden olmaktadır (128). Hastalığın klinik olarak ortaya çıkarılması değişkendir ve hafıza kaybı, şaşkınlık, kişilik değişiklikleri, bozulmuş koordinasyon ve konuşma problemleri gibi semptomları içermektedir.

Alzheimer hastalığı, başlama yaşına ve kalıtım durumuna göre gruplandırılabilir. Erken oluşan hastalık 65 yaşından önce oluşmaktadır. Bu durum genellikle aileseldir ve otozomal dominant kalıtım kalıbına uygun olarak kalıtılmaktadır. Alzheimer hastalığının %10 kadarını ailevi Alzheimer hastalığı oluşturmaktadır. Alzheimer hastalığının çoğunluğu 65 yaş üzerindeki bireylerde görülen geç oluşan tiptir ve geç oluşan Alzheimer hastalığı sporadiktir (102).

2.2. Alzheimer Hastalığının Epidemiyolojisi

Demans hastalıkları popülasyonlarda ilerleyen yaşla birlikte artmaktadır. Avrupa'da yapılan bir çalışmada, yaşlılıktaki demansın prevalansı %6,4 olarak belirlenmiş ve bu oranın 65–69 yaş grubunda %0.8'den başlayıp, 90 yaş ve üzerindeki bireylerde yaklaşık üç katına çıktığı bildirilmiştir. Demans hastalarının yarısından fazlasında AH'nın görüldüğü bildirilmiştir (73).

Alzheimer Hastalığı, yaşla ilişkili demansın en yaygın formudur ve ilerleyen yaşlarda çok daha yaygındır. Hastalığın oluşum riski yaş, cinsiyet ve yaşam tarzına göre değişir. İnsidansı ise 65–70 yaşlarındaki insanlar arasında yaklaşık %1'den, 85 yaş üzerindeki insanlarda yaklaşık %6–8'lere kadar artmaktadır (80).

AH'nın süresi, hastalığın başlangıcından sonra 2 ila 16 yıl arasında değişir. Alzheimer olguları için ortalama yaşam süresi son yıllarda yapılan çalışmalarda 3 ila 7 yıl olarak belirtilmiştir (25). AH, Amerikada 65 yaş üzerindeki bireylerin ölüm nedenleri arasında sekizinci sıradadır (45).

Avrupa popülasyonlarında, AH'nın prevalansı %4.4'dür (73). Bu prevalans, ABD'de yaşayan Afro-Amerikalılar'da beyaz ırka göre yüksek olmasına rağmen (40), Afrika yerlilerinin kendi ülkelerinde daha düşüktür. (89). Hem insidans hem de hastalığın devam süresi oranı prevalans oranını etkilemektedir. Bu yüzden, klinik olarak teşhis edilen AH'lı yaşamını sürdüren olguların prevalansı yaş ile değişmektedir. 65 yaşından önce Alzheimer hastalığı nadir olarak görülmekte (bu yaş grubunda %0.5'den küçüktür); fakat 85 yaş ve üzerinde artmaktadır. 85 yaş üzerindeki popülasyonlarda, hastalık şiddetinin hangi evrede incelediğine bağlı olarak bireylerin %13 ila %30'un üzerindeki kısmı hastalığa sahiptir (96).

2.3. Alzheimer Hastalığının Nöropatolojisi ve Patogenezi

AH'na özgü histopatolojik değişiklikler nöronal kayıp, nörofibriler düğümler ve nöritik plakları içermektedir. Beynin spesifik bölgelerinde nöronal fonksiyon kaybı ve nöronların kaybı hastalığın klinik ifadesiyle ilişkilidir (19).

Alzheimer hastalığında, beyinde nöritik plaklar ve nörofibriler yumaklar olmak üzere iki tip patolojik lezyon söz konusudur. Alzheimer hastalığında demans derecesinin nörofibriler yumakları ve nöritik plakların yoğunluğu ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. Bu şekildeki lezyon oluşumunun muhtemelen hücre yapısını, dentritleri ve sinapsları bozduğu ve böylelikle nörotransmisyona ciddi şekilde zarar verdiği bunun da kavramsal yeteneğin azalması ile sonuçlandığı düşünülmektedir (33).

2.3.1. Nöritik Plaklar

Nöritik plaklar, proteinden oluşan fibril çökeltilerinin küresel ekstraselüler çekirdeğinden veya dejenere olan sinir hücre prosesleri ile çevrelenmiş amiloidden oluşmaktadır. Nöritik plaklar özellikle hipokampus, neokorteks, amigdala ve serebral ve meningeal kan damarlarının duvarlarında bulunmaktadır. Nöritik plakların çekirdeğindeki predominant protein amiloid- β ($A\beta$), A4 veya $\beta/A4$ olarak bilinen 4 kDa'luk bir peptittir. $A\beta$, 39-43 amino asitten oluşur ve 42 amino asitten oluşan form amiloid çökeltilerinde oldukça dominant olarak bulunmaktadır (53). $A\beta$, amiloid prekürsör proteini (β -APP) olarak bilinen bir öncü proteinden proteolitik ayrılma ile türemektedir (121). İmmünohistokimyasal çalışmalarda, apolipoprotein E (ApoE)'nin hem nöritik plak hem de nörofibril düğümler ile ilişkili olduğu saptanmıştır (87).

2.3.2. Nörofibril Düğümler

Nörofibril düğümler, nöronlar arası kalıntılar olarak oluşan nöronal kaynaklı dejeneratlar gibi eksternal hale gelen anormal protein çökeltileridir. Nörofibril düğümler hücre yapılarında ve nöritik plakların çekirdeğini çevreleyen dejenere nöronların apikal

dendritlerinde oluşmaktadır. Nörofibril düğümler, distrofik nöronların ortak bir özelliğidir ve Alzheimer hastalığı için spesifik olmakla beraber Parkinson gibi diğer nörodejeneratif hastalıklarda da görülmektedir. Bu düğümlerin esas yapısal bileşeni, eşlenmiş sarmal filament olarak da bilinen bir anormal fibrildir. Bu eşlenmiş sarmal filamentler mikrotübül ilişkili protein taunun aşırı fosforile olmuş formundan oluşur (67).

Mikrotübül ilişkili bir protein olan tau, normal nöron aktivitesi için kritik görünmektedir. Alzheimer hastalığında tau'nun fonksiyonunu yitirmesinin nedeni, taunun anormal hiperfosforilasyonudur. Bu sadece tau etkisinin ve mikrotübüllerin dengesinin kaybıyla sonuçlanmaz. Yeni oluşan modifiye form, toksik olabilir ve mikrotübüllerin bozulmasını ilerletebilir. Etkilenmiş nöronlar, normal tau sentezleyerek ve anormal hiperfosforile edilmiş tau'yu nörofibriler ağlara sararak, kıvrarak ve filamentleri uzatarak toksik tauya tepki gösterir. Etkilenmiş nöronlar yavaş yavaş dejenere olurlar (51).

AH'de, hipokampusda toplam nöron kaybı %40'dan %50'ye kadar değişmekte, nükleus bazalisinde %79'a kadar çıkmakta ve kortekste %15'den %58'e değişmektedir. Bu oluşum, temporalde parietal bölgesinden daha şiddetli olmaktadır (78). Spesifik sinir hücresi içindeki nükleus kaybı nörokimyasal eksikliklerle ilişkilendirilmekte, sinirsel kayıp ve nörotransmitter eksiklikler birlikte demans sendromunun ortaya çıkmasına neden olmaktadır. Bu yıkıcı durum, hücre-hücre iletişimlerini bozan, hücre iskeleti proteinleri (örneğin; tau) ile beta-amiloidin (A β) aşırı sentezi ve birikimine, sinapsların kaybına, dendritlerin miktarında azalmaya, oksidatif metabolizma yoluyla hasara ve hücre ölümüne neden olan nörokimyasal eksiklikleri kapsamaktadır (19).

2.4. Alzheimer Hastalığının Klinik Özellikleri ve Teshisi

AH öncelikle 65 yaş üzerindeki bireyleri etkiler. Klinik olarak AH, kognitif fonksiyonlardaki bozulmanın sosyal yaşam ve iş hayatında bozukluk oluşturması, evdeki günlük fonksiyonları engellemesi ve hafızada ilerleyen kayıp ile sinsi başlangıçlı olarak karakterize edilir. Kognitif fonksiyonların bozulmasını sıklıkla davranış ve

mental rahatsızlıklar takip eder. Motor zorluklar hastalığın geç aşamalarında ortaya çıkar. Hasta ölümden önce sürekli yardım ve özene ihtiyaç duyar. AH'nin semptomları ve şiddeti, hastalığın nöropatolojik ilerlemesiyle ilişkilidir. Hastalığın belirtisinden sonra umulan yaşam süresi 2–16 yıl arasında değişmekle birlikte ortalama 3 ile 7 yıldır (25).

National Institute of Neurological Communicative Disorders and Stroke ve Alzheimer Disease and Related Disorders Association (NINCDS/ADRDA) kriterlerine göre AH'nin teşhisi üç kategoriye ayrılmıştır: muhtemel, mümkün ve kesin AH. Kesin AH tanısı için, klinik olarak olası AH tanısı almış olgunun histopatolojik doğrulanması gerekir. (Şekil 2.5.1)

2.5. Alzheimer Hastalığının Alt Tipleri

AH tipinin erken başlangıçlı demans durumu (başlangıç yaşı < 65 yıl) için Erken Başlangıçlı Alzheimer Hastalığı (EBAH), AH tipinin geç başlangıçlı demans durumu (başlangıç yaşı ≥ 65 yıl) için ise Geç Başlangıçlı Alzheimer Hastalığı (GBAH) terimi kullanılmaktadır. Hastalığın tipik beyin patolojisi EBAH ve GBAH'de benzerlik göstermektedir (102). Yapılan çalışmalarda EBAH ile GBAH arasındaki en belirgin ayırıcı özelliklerin tipe özgü genler olduğu ifade edilmiştir. EBAH'nin tanımlanmasında 21. kromozomda lokalize amiloid prekürsör proteini (APP), presenilin 2 (PSEN2) ve presenilin 1 (PSEN1) genlerinin tam penetrant mutasyonları kullanılmıştır. Ancak başta ApoE ve alfa2-makroglobülin (A2M) olmak üzere pek çok yaygın polimorfizm, düşük penetranslarıyla AH'nin en sık görülen formu GBAH üzerinde risk faktörleri ve/veya yatkınlığı artırıcı markerler olarak değerlendirilmektedir (122).

Ailesel ve sporadik AH, sadece hastalıktan etkilenmiş diğer akrabaların bulunup bulunmamasına göre ayrılır. Günümüzde genetik açıdan AH, otozomal dominant ailesel AH, Mendel kalıtıma uymayan ailesel yığılma gösteren AH (ailesel agregasyon) ve sporadik AH olmak üzere üç formda gruplandırılabilir (93). Tüm AH olgularının %5 kadarı, otozomal dominant kalıtmı, erken başlangıçlı ailesel form AH'den sorumlu olduğu bilinen genetik faktörler ile açıklanabilir (103). Bununla birlikte, tüm AH

olgularının %10'u otozomal dominant ailesel olgular olarak tahmin edilmektedir. Ailesel yığılma gösteren ve Mendelyen kalıtıma uymayan olgular, tüm AH olgularının %30'unu oluşturur ve ailelerde genetik ve çevresel risk faktörlerinin etkisi altında ortaya çıkabilir (23).

NINCDS-ADRDA Tanı Kriterleri

I. MUHTEMEL Alzheimer Hastalığı klinik tanı kriterleri şunları içerir:

- Klinik muayene ile saptanan, Mini-Mental Test, Blessed Demans Ölçeği ya da benzer bir test ile dokümanite edilen ve nöropsikolojik testlerle de doğrulanan demans tablosu;
- İki ya da daha fazla bilişsel süreçte bozulma,
- Bilinç bozukluğu yok.
- Başlangıç 40-90 yaşları arasında, büyük sıklıkla da 65 yaşından sonra;
- Bellek ya da diğer bilişsel süreçlerde ilerleyici bozukluğa yol açabilecek sistemik ya da beyne ait başka bir hastalık yok.

II. MUHTEMEL Alzheimer Hastalığı tanısı şunlarla desteklenir:

- Dil (afazi), motor yetenekler (apraksi) ve algı (agnozi) gibi özgül bilişsel işlevlerde ilerleyici bozulma;
- Günlük yaşam aktivitelerinde bozulma ve davranış biçiminde değişme;
- Ailede benzer bozukluk öyküsü (özellikle patolojik olarak kanıtlanırsa);
- Laboratuarda:
 - o Standart tekniklerle normal lomber ponksiyon,
 - o EEG'nin normal olması ya da yavaş dalga aktivitesinde artış gibi non-spesifik değişiklikler,
 - o Bilgisayarlı Tomografide (BT) serebral atrofiye ilişkin bulgular ve seri incelemelerde bu bulguların ilerleyişi.

III. Alzheimer hastalığı dışındaki nedenler dışlandıktan sonra, MUHTEMEL Alzheimer Hastalığı tanısı ile uyumlu olabilecek diğer klinik özellikler şunlardır:

- Hastalığın seyirinde platolar;
- Depresyon, uykusuzluk, inkontinans, hezeyan, illüzyon ve halusinasyonlar, verbal, emosyonel ya da fiziksel katastrofik patlamalar, cinsel bozukluklar ve kilo kaybı gibi eşlikçi bulgular;
- Bazı hastalarda, özellikle hastalığın ileri dönemlerinde, kas tonusunda artış, miyoklonus ya da yürüme güçlüğü gibi diğer nörolojik bozukluklar;
- Hastalığın ileri evresinde nöbetler;
- Yaş için normal BT.

IV. MUHTEMEL Alzheimer Hastalığı tanısını belirsizleştiren ya da ihtimal dışı çıkaran özellikler şunlardır:

- İnme tarzında ani başlangıç;
- Hemiparezi, duysal kayıp, görme alanı defektleri ve inkoordinasyon gibi fokal nörolojik bulguların hastalığın erken evrelerinde bulunması;
- Nöbetler ya da yürüyüş bozukluklarının, daha başlangıçta ya da hastalığın çok erken evrelerinde bulunması;

V. MÜMKÜN Alzheimer Hastalığı tanı kriterleri şunlardır:

- Demansa neden olabilecek diğer nörolojik, psikiyatrik ya da sistemik bozukluklar olmaksızın, başlangıç, presentasyon ya da klinik seyirde varyasyonların bulunması durumunda konulabilir;
- Demansa neden olabilecek, ancak demansın nedeni gibi görünmeyen ikinci bir sistemik ya da beyin hastalığının bulunması durumunda konulabilir;
- Diğer belirlenebilir nedenlerinin dışlandığı, tek ve yavaş ilerleyici bir bilişsel bozukluğun bulunması durumunda, araştırma çalışması amaçlı olarak kullanılabilir.

VI. KESİN Alzheimer Hastalığı tanısı kriterleri şunlardır:

- Biyopsi ya da otopsiyle elde edilen histopatolojik kanıtlar.

Şekil 2.5.1: AH'nin teşhisinde kullanılan NINCDS/ADRDA kriterleri.

Tüm AH olgularının %60 kadarının ailesel yığılım göstermeyen grupta olduğu tahmin edilmekte ve bu gruptaki olgular sporadik AH olarak adlandırılmaktadır (93). Sporadik AH, çoğunlukla yaşam döngüsünün son kısmına yakın açığa çıkar (121).

2.6. Alzheimer Hastalığının Etiyolojisi

Özellikle geç oluşan Alzheimer hastalığı durumunda AH'nin etiyojisi multifaktöryeldir. Pek çok genetik ve genetik olmayan faktör Alzheimer hastalığının gelişimi için risk faktörlerini belirlemekte ve hastalığın oluşum yaşını ve gidişatını düzenlemektedir. Bu faktörlerin çoğunun gerçek katkısı, önemi ve etkileşimleri hala tam olarak anlaşılamamıştır (5).

2.6.1. Demografik Risk Faktörleri

Alzheimer hastalığı etiyojisinde pek çok çevresel risk faktörü rol oynar. Bu etkenlerden hangisinin hastalığın ortaya çıkışı veya prognozunda etkin olduğu ve etkisinin ne ölçüde olduğuna ilişkin farklı görüşler vardır.

2.6.1.1 Yaş

Tüm demans olgularında olduğu gibi Alzheimer olgularında da yaş en önemli risk faktörüdür. Hastalığın prevalansı 60 yaşından önce nadirken, 85 ve üzeri yaşlarda yaklaşık %50'ye yükselir (73).

2.6.1.2. Cinsiyet

Kadınlarda hastalığın erkeklerden daha sık görüldüğü bilinmektedir. Bazı çalışmalarda ise bu durumun ilerleyen yaşlarda kadın nüfus oranının erkeklerden yüksek olması nedeniyle meydana geldiği bildirilmiştir (65).

2.6.1.3. Ailede Demans Öyküsü

Ailesinde, birinci derece akrabalarında (ebeveynleri, çocukları, kardeşleri) Alzheimer öyküsü bulunan bireylerin hastalıktan etkilenmiş bir yakını olmayanlara göre hastalığa yatkınlıkları 3–4 kat daha fazladır (31).

2.6.1.4. Eğitim Düzeyi

Düşük eğitim düzeyinin Alzheimer hastalığı insidansını 1.5 kat arttırdığı bildirilmiştir (30).

2.6.1.5. Down Sendromu

35 yaşın üzerindeki Down sendromlu olgularda, Alzheimer hastalığı gelişim riski yüksektir. Bu olgularda, Alzheimer olgularının beyindekine benzer lezyonların geliştiği rapor edilmiştir (32).

Uzun süreli alkol kullanımı, kardiyovasküler hastalıklar ve risk faktörleri, kafa travmaları gibi pek çok değişik faktörün de hastalık riskini arttırdığı bildirilmektedir (60, 83).

2.6.1.7 Genetik Risk Faktörleri

Birkaç ailesel Alzheimer hastalığı otozomal dominant geçiş göstermesine rağmen birçok durumda hastalığın kalıtımı multifaktöriyeldir. Monozigot ikiz çalışmaları, %18 ve %41 arasında değişen konkordansın olduğunu ve bu uygunluk oranları ile Alzheimer hastalığının tek bir otozomal dominant gen ile tam anlamıyla açıklanamayacağını göstermiştir (98).

AH için 100 dolayında aday risk geni analiz edilmiş ve birçok çalışmada bu aday genlerden dördünün (*APP*, *PSEN1*, *PSEN2* ve *ApoE*) hastalıkla ilişkili olduğu bildirilmiştir. Bu genlerden sadece *ApoE*'nin, GBAH ile kuvvetli asosiasyon gösterdiği

kabul görmektedir. Alzheimer ya da kardiyovasküler sistem hastalıkları gibi multifaktöryel hastalıklarda genetik çalışmaların tekrar edilebilirliği zordur. Bu nedenle, bağlantı analizleri gibi moleküler metodlar ile populasyon ve olgu-kontrol çalışmaları, GBAH ve diğer kompleks hastalıklar için yeni genleri tanımlamak için kullanılmıştır. Bununla birlikte, bu çalışmalarda çalışılan populasyonun standardizasyonu ve örnekleme farklılıkları gibi faktörler, GBAH ile ilişkili genlerde duyarlı, tutarlı ve tekrarlanabilen analizleri yapmak ve tanımlamak için zorluk oluşturmaktadır (5).

2.7. Alzheimer Hastalığının Genetiği

2.7.1. Erken Başlangıçlı Alzheimer Hastalığı ile İlişkili Genler

Erken Başlangıçlı Alzheimer Hastalığının (EBAH) %50 kadarı daha önceden iyi bilinen *APP*, *PSEN1* ve *PSEN2* genlerinde bulunan mutasyonlarla açıklanmıştır (Tablo 2.8.1.1) (46). *PSEN1* mutasyonları AH'a neden olmakta %100 penetrandır (122).

Tablo 2.7.1.1: Erken oluşan otozomal dominant ailevi Alzheimer hastalığına etki eden genler

Gen	Lokalizasyonu	Başlangıç yaşı	Saptanan mutasyon sayısı	Etkisi
<i>APP</i>	21q21.1	43-62	33	Farklı APP yapımı, A β ve A β ₁₋₄₂ 'nin artması
<i>PSEN1</i>	14q24	29-62	172	A β ₁₋₄₂ 'nin artması
<i>PSEN2</i>	1q31-42	40-88	13	A β ₁₋₄₂ 'nin artması

2.7.2. Geç Başlangıçlı Alzheimer Hastalığı ile İlişkili Genler

Kardiyovasküler sistem hastalıkları, diyabet ve GBAH gibi kompleks ve heterojen hastalıklar basit kalıtım kalıbına sahip değildir. Üstelik bu hastalıklarla ilişkili olan çoklu minör genlerde meydana gelen mutasyonlar ve polimorfizmler, hem birbirleriyle hemde genetik olmayan faktörlerle ilişkilidir. Yaygın ve kompleks hastalıkların genetik temellerinin analizi bu sebeplerle sınırlıdır.

Multifaktöryel hastalıklarda katkılı minör genler ile çevresel faktörlerin etkisi söz konusudur. Bu nedenle bu hastalıklarda genetik analiz ile tanı koyma olanağı sınırlıdır. Söz konusu zorluklar

- kompleks kalıtım ve heterojenite,
- genotip ve fenotip analizleri için elde edilebilir farklı jenerasyonlarda etkilenen bireylerin sayılarının sınırlı olması,
- fenokopilerin varlığı ve geç başlangıçlı hastalığın semptomlarının ortaya çıkmasından önce mutasyonları veya polimorfizmleri taşıyan bireylerin ölüm olasılığı olarak sıralanabilir. (5).

Çalışmalarda AH ile ilişkili olduğu doğrulanmış olan aday risk genlerinden bazıları Tablo 2.7.2.1’de verilmiştir.

Tablo 2.7.2.1: GBAH ile ilişkili bazı genler (Ivonen (50)’den değiştirilerek)

Gen	Kromozomal lokalizasyon	AH patojenezi ile ilişkisi
<i>HSPG2</i>	1p36	A β plaklarının bileşeni
<i>MTHFR</i>	1p36	Homosistein metabolizması
<i>NCSTN</i>	1q22-23	γ -kompleksinin bileşeni
<i>IL1A</i>	2q14	İnflamator cevap
<i>TF</i>	3q22	Demir taşıyıcısı, oksidatif stres
<i>NEP</i>	3q25	A β 'in parçalanması
<i>APOD</i>	3q25	Lipit metabolizması
<i>SNCA</i>	4q21	A β plaklarının bileşeni
<i>TNFA</i>	6p21	İnflamasyon
<i>HLA-A2</i>	6p21	İnflamasyon

Tablo 2.7.2.1 (Devamı): GBAH ile ilişkili bazı genler

Gen	Kromozomal lokalizasyon	AH patojenezi ile ilişkisi
<i>ESR1</i>	6q25	Östrojen etkilerin aracısı
<i>IL6</i>	7p21	Sinir hücresi farklılaşması
<i>NOS3</i>	7q36	Nitrik oksit sentezi, apoptozis
<i>LPL</i>	8p22	Plazma lipit transportu
<i>VLDL-R</i>	9p24	Kolesterol metabolizması
<i>UBQLN1</i>	9q22	PSEN biyosentezi ve indirgenmesi
<i>PLAU</i>	10q22	Plazminojen aktivatörü, A β 'in parçalanması
<i>CINNA3</i>	10q22	β -katenini bağlar, Wnt sinyal yolağı
<i>IDE</i>	10q23	A β 'in parçalanması
<i>CTSD</i>	11p15	Lizozomal aspartil proteaz, A β 'in ayrılması
<i>FE65</i>	11p15	APP bağlanma proteini
<i>BCHE</i>	11p15	A β plaklarının bileşeni
<i>BDNF</i>	11p13	Nöronal hücrelerin hayatta kalması
<i>A2M</i>	12p13	A β 'in parçalanması
<i>LRP</i>	12q13	APOE ve A2M için reseptör
<i>NOS1</i>	12q24	Beyinde nörotransmitter özellikler
<i>DLST</i>	14q24	Enerji metabolizması
<i>AACT</i>	14q32	A β plaklarının bileşeni
<i>SHTT</i>	17q11	Serotonin taşınımı
<i>BLMH</i>	17q11	Sistein proteaz, BACE aktivitesi
<i>MAPT</i>	17q21	NFTs'in PHF formları
<i>ACE</i>	17q23	Hipertansiyon
<i>MPO</i>	17q23	Fagositoz, inflammasyon
<i>ICAM1</i>	19p13	İnflammasyon
<i>APOE</i>	19q13.32	Aβ çökmesi

Tablo 2.7.2.1 (Devamı): GBAH ile ilişkili bazı genler

Gen	Kromozomal lokalizasyon	AH patojenezi ile ilişkisi
<i>PRNP</i>	20p13	Oksidatif stres
<i>CST3</i>	20p11	Proteaz inhibitörü, A β fibril oluşumu
<i>CYP2D6</i>	22q13	İlaç metabolizması
<i>MAOA</i>	Xq21-26	Monoamin nörotransmitter metabolizması

2.7.2.1. ApoE Geni ve ApoE Proteini

Apolipoprotein E (*ApoE*) geni 19'uncu kromozomun proksimal uzun kolunda lokalize, 4 ekzon ile 3 introna sahip 3597 bp uzunluğunda bir genidir. *ApoE* promotör bölgesi, transkripsiyon başlama bölgesinden 5' ucuna doğru lokalize olan, ilk ve ikinci intronlarda bulunan çoklu transkripsiyonel arttırıcı ve baskılayıcı elementlerinden oluşmaktadır (92).

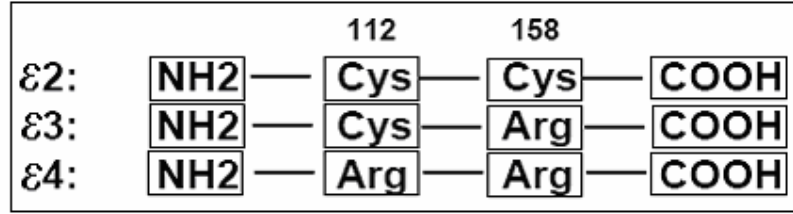
Bu gen; 5' ucunda 61 un-translated nükleotid, bir sinyal peptidini veren 54 nükleotid, olgun protein için kodlanan 897 nükleotid, UGA translasyon sonlandırma kodunu ve sonlandırma kodonunu takiben 142 untranslated nükleotidden oluşan 1157 nükleotidlik bir mRNA'yı kodlamaktadır (82). Ekzon 3 ve 4 sadece olgun protein için kodlanmaktadır. *ApoE*'deki iki polimorfik bölge, ϵ 2, ϵ 3 ve ϵ 4 olmak üzere üç allele sonuçlanmaktadır. Bu yaygın polimorfizmlere ek olarak birçok mutasyon rapor edilmiştir (135).

ApoE 34.1 kDa moleküler ağırlıkta ve 299 amino asitten oluşan bir glikoproteindir (99). ApoE hemen tüm dokularda sentez edilmekle birlikte plazma ApoE'sinin ana kaynağı karaciğerdir (134). Karaciğere ek olarak, özellikle beyin, böbreküstü bezi, böbrek ve gonadlar ApoE için aktif üreticiler olarak görülmektedir. Barsak, akciğer, kas ve lif doku ApoE üretiminde nispeten inaktiftir (134). Astrositler beyinde ana üretici olarak ortaya çıkmaktadır (131).

ApoE, lipoprotein partiküllerinin hücre içine alınımına aracılık eden ligandır ve lipid transportunda çok önemlidir. Bununla birlikte, nöronal büyüme sırasında veya nöronal zedelenmeden sonra kolesterolün akıcılığı ve yeniden dağılımı ile sinir rejenerasyonu ve birkaç lipolitik enzimin immünoregülasyon ve aktivasyonu gibi fonksiyonlarda da çok önemlidir (76).

Üç esas ApoE izoformu, polipeptid zincirinin 112 ve 158'inci pozisyonundaki sistein/arjinin değişiklikleri ile birbirlerinden ayrılmaktadır. (Şekil 2.7.2.1.1). ApoE ϵ 2 her iki pozisyonda sisteine, ApoE ϵ 4 arjinine ve ApoE ϵ 3 pozisyon 112'de sisteine sahipken pozisyon 158'de arjinine sahiptir. ApoE ϵ 3 ve ApoE ϵ 4'ün amino-terminal domainlerinin X ışını kristal yapıları, ApoE ϵ 4'deki iki yan zincirin ApoE ϵ 3'deki pozisyonlarına göre konformasyonel değişikliklere maruz kaldığını göstermektedir (21). Bu değişiklik, izoformlar arasında üç boyutlu yapıyı ve lipit bağlanma özelliklerini etkilemektedir. ApoE ϵ 4'de amino asit değişikliği, pozisyon 61'deki arjinin ve pozisyon 255'deki glutamik asit arasındaki bir tuz-köprüsünün oluşumuyla meydana gelen yapısal bir değişiklikle sonuçlanmaktadır. (75).

Çeşitli ApoE fenotiplerinin terminolojisi bunların izoelektrik fokuslama pozisyonlarına ve oldukça yaygın izoform olan ApoE ϵ 3 ile ilişkili yapılarına dayanmaktadır (100). Terminolojide ϵ 1, ϵ 2, ϵ 3, ϵ 4 vs. terimleri izoelektrik fokuslamada her bir ApoE varyantının pozisyonunu tanımlamakta ve parantez içerisindeki takip eden kod ise değişikliğe uğramış amino asidin adını ve bölgesini göstermektedir. ApoE ϵ 2 ve ApoE ϵ 4, ApoE ϵ 3'ten farklarına göre ifade edilmektedir. ApoE ϵ 2 (Arg158→Cys) ve ApoE ϵ 4 (Cys112→Arg) şeklinde gösterilir. Bununla birlikte, daha uygun olduğu için bu izoformlar basit bir şekilde ApoE ϵ 2, ApoE ϵ 3 ve ApoE ϵ 4 olarak ifade edilmekte ve diğer varyantlar daha açıklayıcı gösterimlerle belirtilmektedir (101).

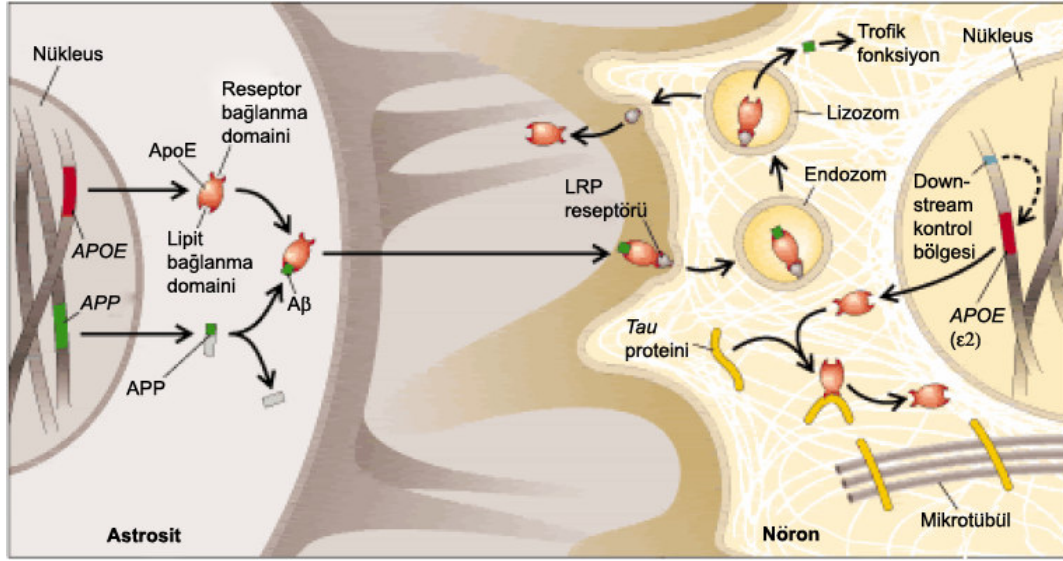


Şekil 2.7.2.1.1: ApoE polimorfizmleri (Rocchi et al., (103)'den modifiye edilerek).

2.7.2.2. ApoE ve Alzheimer Hastalığı

Beyinde ApoE sentezini ve salgılanmasını yöneten mekanizmalar henüz tam olarak anlaşılamamıştır. İnsan primer astrositlerinden ApoE salgılanması, interlökin-1 α ve β (IL-1 α ve β) ile interferon γ kombinasyonu ile azaltılabilmektedir (3). Sinir hasarına cevap olarak ApoE seviyelerinin farkedilebilir düzeyde arttığı ve orta derecedeki bir sinir hasarının merkezi sinir sisteminde ApoE seviyelerini arttırdığı rapor edilmiştir (6). Bu veriler, ApoE'nin nöronların işlevini sürdürmesinde ve tamirinde önemli rol oynadığını ortaya koymaktadır (13).

Beyinde ApoE fonksiyonuna ilişkin bazı yollar şekil 2.7.2.2.1'de verilmiştir. Alzheimer hastalığı için bilinen en önemli risk faktörlerinden biri ApoE'nin $\epsilon 4$ izoformunun varlığıdır (94). Epidemiyolojik çalışmalar, ApoE $\epsilon 4$ taşıyıcılarının AH için daha yüksek bir riske sahip olduğunu ve ApoE $\epsilon 4$ 'ün hastalığın oluşumundan ve gelişiminden sorumlu olduğunu göstermektedir. Üstelik ApoE $\epsilon 4$, hastalığa neden olan bütün biyokimyasal bozukluklar (A β depozisyonu, nörofibriler yumakların oluşumu, oksidatif stres, lipid dengesi düzeninin bozulması, sinaptik elastikiyet kaybı ve kolinerjik fonksiyon kaybı) ile ilişkili tek moleküldür. Bu veriler, ApoE $\epsilon 4$ 'ün Alzheimer hastalığının oluşumunda önemli rolü olduğunu ifade etmektedir. (13).



Şekil 2.7.2.2.1: Beyinde ApoE fonksiyonu. (Roses (107)'den değiştirilerek)

2.7.2.2.1. ApoE ve Amiloid β

Amiloid β ($A\beta$)'nin üretimi, oligomerizasyonu ve depozisyonunun Alzheimer hastalığında önemli rol oynadığı bildirilmiştir. $A\beta_{1-42}$ üretiminde artış ile sonuçlanan amiloid prekürsör proteini (*APP*) ve presenilin (*PSEN*) genlerindeki otozomal dominant mutasyonların saptanması, aşırı $A\beta$ üretiminin Alzheimer hastalığının nedenlerinden biri olduğunu düşündürmüştür. Birkaç veri, ApoE $\epsilon 4$ 'ün en azından bazı patolojik etkilerinin $A\beta$ şalalesi ile etkileşim halinde olabileceğini ileri sürmektedir (13).

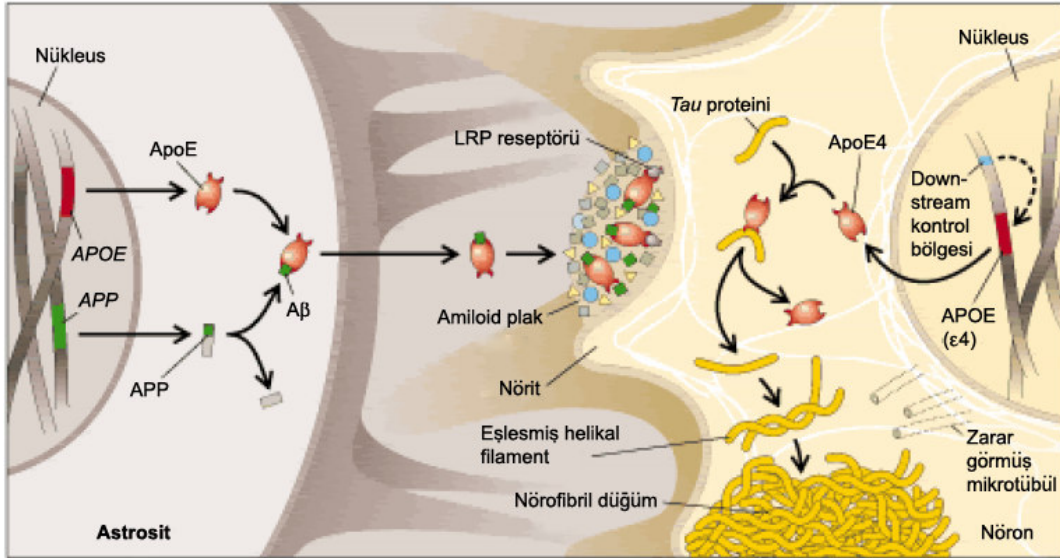
ApoE nöritik plaklarda bulunmakta ve *ApoE* $\epsilon 4$ taşıyan Alzheimer hastalarının beyinlerinde $A\beta$ seviyeleri yükselmektedir (68).

Yaşlanma sırasında beyin ApoE seviyelerindeki artışın, $A\beta$ temizlenmesindeki düzeni bozduğu ve $A\beta$ ayrılmasını arttırdığı ileri sürülmüştür (63). Takip eden çalışmalar $A\beta$ depozisyonunun, ApoE $\epsilon 4$ taşıyıcısı sporadik Alzheimer hastalarında arttığını göstermiştir (7).

ApoE'nin izoform-spesifik bir biçimde ($\epsilon 4 > \epsilon 3$) $A\beta$ 'nin nörotoksitesini arttırdığı ve $A\beta$ ve ApoE $\epsilon 4$ arasında sinerjistik patolojik etkilerin var olduğu ileri sürülmektedir (13, 77).

2.7.2.2. ApoE ve Nörofibril Düğümler

Tau proteininin anormal fosforilasyonu, Alzheimer ve diğer birkaç nörodejeneratif hastalığın ortak özelliği olan nörofibril düğümlerinin (NFD'ler) oluşumuna neden olmaktadır (111). In vitro çalışmalarda ApoE izoformlarının tau proteinlerini farklı şekilde etkilediği, ApoE $\epsilon 4$ yerine ApoE $\epsilon 3$ 'ün tau ile sabit kompleks oluşturduğu belirlenmiştir (Şekil 2.8.2.1.2). Tau proteininin anormal fosforilasyonu ApoE $\epsilon 3$ ile etkileşimini inhibe eder. ApoE $\epsilon 3$ yalnızca fosforile olmamış tau ile bağ yapabilir. Bu durum, ApoE $\epsilon 3$ 'ün anormal tau hiperfosforilasyonunu ve nöronal iskeletin kararlılığının bozulmasını engelleyebileceğini düşündürmektedir (119).



Şekil 2.7.2.2.1: Alzheimer hastalığına neden olan ApoE ilişkili bazı metabolik prosesler (Roses (107)'den değiştirilerek).

Üç farklı ApoE izoformu arasında $\epsilon 4$, $A\beta$ için en yüksek, tau proteini için ise en düşük afiniteye sahiptir. ApoE $\epsilon 4$ varlığında nöronlarda, ApoE'nin koruyucu

bağlanmasından kurtulan tau proteini, daha sonradan nörofibril düğümlere dönüşecek eşleşmiş helikal filamentleri oluşturmaktadır. Tau proteininin yokluğunda, hücre şekli ve sinaptik bütünlük için zorunlu bir proses olan mikrotübüllerin bir araya gelişi gerçekleşemeyecektir. *ApoE*'nin $\epsilon 4$ aleli tarafından kodlanan ApoE $\epsilon 4$ Alzheimer hastalığı riskini arttırmakta ve hastalığın daha erken yaşlarda oluşumuna neden olmaktadır (12, 77).

2.7.2.2.3. ApoE, Kolesterol ve Sinaptik Tamir

ApoE'nin esas fonksiyonu lipitlerin yeniden dağılımını sağlamak ve kolesterol dengesine katılmaktır (76). Kültüre alınmış nöronlarda, kolesterol alımı lipit ApoE $\epsilon 2$ ve ApoE $\epsilon 3$ 'e göre ApoE $\epsilon 4$ 'e bağlandığı zaman daha düşüktür (101). ApoE $\epsilon 4$, hem nöronlardan hem de astrositlerden kolesterolün akışının teşvikinde diğer formlara göre daha az etkindir (84). Klinik ve epidemiyolojik çalışmalardan elde edilen ilk izlenimler artan plazma kolesterol seviyesine sahip hastaların Alzheimer'e artan hassasiyet gösterdiğini belirtmiştir (106).

A β , kolesterolün nöronlarda sentezini ve dağılımlarını düzenlemektedir (18). Bununla birlikte kolesterolün nörotoksisite üzerine A β 'nin etkisini azalttığı gösterilmiştir Bu veriler kolesterol ve A β arasındaki ilişkinin oldukça kompleks olduğunu göstermektedir. ApoE izoformlarının lipit taşınımı ile ilgili olarak farklı özellikler gösterdiği göz önüne alındığında, kolesterol ile A β ilişkisinin ApoE genotipi tarafından düzenlenebileceği düşünülmektedir (13).

Sinir sisteminde nöronlar ve glia hücreleri arasındaki etkileşimi büyümenin ilerleyişi, rejenerasyon ve sinaptik plastisite için oldukça önemlidir (127). Burada lipitlerin ApoE ilişkili yeniden dağılımı temel bir rol oynamaktadır. Alzheimer hastalığında neokortekste geniş nöronal kayıp vardır (26). ApoE $\epsilon 4$ taşıyıcılarında farklı beyin bölgelerindeki nöronal hasarın onarılması yetersiz kalırken, $\epsilon 4$ alelini taşımayanlar aynı bölgelerde belirgin rejeneratif değişiklikler göstermiştir (1).

2.7.2.2.4. ApoE ve Nörotoksiste

ApoE nöronlar için direkt toksik olarak nörodejeneratif işleve katkıda bulunmaktadır. Lipit-serbest ApoE ($\epsilon 4 > \epsilon 3$) fragmentleri nöronlar için toksik olarak gösterilmiştir (13).

İnsan ApoE $\epsilon 3$, ApoE $\epsilon 4$ veya her ikisini eksprese eden transjenik farelerin kullanıldığı in vivo çalışmalarda, *ApoE* $\epsilon 3/\epsilon 4$ hayvanlara göre *ApoE* $\epsilon 3/\epsilon 3$ hayvanların yaşlanmaya bağlı nörodejenerasyona karşı daha çok korunduğu, *ApoE* $\epsilon 4/\epsilon 4$ 'lerin ise benzer koruma göstermediğini belirtmiştir (9). Bu durum, *ApoE* $\epsilon 3$ 'e göre *ApoE* $\epsilon 4$ 'ün sadece daha az nörokoruyucu etkiye sahip olduğunu değil aynı zamanda *ApoE* $\epsilon 3$ 'ün yararlı fonksiyonunu engelleyen baskın bir negatif faktör olduğunu göstermektedir (13).

2.7.2.3. İnterlökin-1 Alfa (IL-1 α) Geni ve Proteini

Proinflamator sitokinler, özellikle IL-1, hafıza işlevlerinde fizyolojik role sahiptir. Özellikle hipokampus içinde IL-1 hafıza pekiştirmek için önemlidir. IL-1 sinyalinde genetik veya farmakolojik zararların hafıza bozukluklarını oluşturduğu bildirilmiştir (34).

İnflamator sitokinlerin yaşla ilişkili nörodejeneratif hastalıklar özellikle de Alzheimer hastalığı ile çok açık ve direkt ilişkilerinin olduğu bildirilmiştir. Üstelik inflamator sitokinler özellikle de IL-1'in beyin içinde, kendi kendine hastalık proseslerini teşvik ettiğini gösteren veriler bulunmaktadır (37, 81).

Çok çalışılan IL-1 proteinleri, IL-1 α , IL-1 β ve IL-1 reseptör antagonisti (IL-1Ra); ilgili üç genin (IL-1A, IL-1B ve IL-1 Ra) ürünleridir. İnsan IL-1 genleri kromozom 2q12'nin ~500kb bölgesinde lokalizedir (88).

İnsan *IL-1 α* geni 10.5 kb ve *IL-1 β* geni 7.8 kb büyüklüğündedir (14, 29). Bu genler IL-1 mRNA'sını kodlayan yedi ekzona ve altı introna sahiptir (4).

IL-1'in iki formu da ilk olarak 31 kd'luk öncüler halinde sentez edilmektedir (pro-IL-1). Pro-IL-1, proteazlarca ayrılarak olgun IL-1 olarak adlandırılan 17 kd'lik bir peptidi oluşturur. Olgun IL-1 α ve β biyolojik olarak aktif formlardır (55).

2.7.2.4. IL-1 α ve Alzheimer

Alzheimer hastalığı, patolojik olarak senil plaklar ve nörofibril düğümlerinin varlığı ile karakterize edilmektedir. Bu yapısal değişiklikler nörofibril düğümlerle ilişkili ölü veya ölmekte olan sinir hücrelerinde oluşan inflamator cevabın beraberinde meydana gelmektedir. Bu nöroinflamator hücreler tarafından sitokinlerin veya serbest radikallerin üretimi, patolojik A β ve tau proteinlerinin üretimini ve birikimini tetikleyerek veya kolaylaştırarak nöronlara zarar verebilir ve hatta ölümlerine neden olabilir (79).

Artan IL-1 ekspresyonu ve IL-1 immünoreaktif astrositlerin artan sayısı, Alzheimer hastalarının ve yaşlı Down sendromlu bireylerin beyinlerinde gösterilmiştir (37). Bu nedenle, IL-1'deki alelik varyasyonların, beyin dokusu içerisinde bulunan glial aktivasyonun derecesini etkileyerek hastalık modifiye edici bir role sahip olabildiği düşünülmektedir. Böylelikle IL-1'deki alelik varyasyonlar zarar verdiği öne sürülen sitokinlerin sekresyonunu ve sonuç olarak Alzheimer tipi patolojik değişiklikleri arttırabilmektedir (41).

IL-1 özellikle şiddetlenen farklı beyin hasarı formlarının akut nörodejenrasyonunda rol oynar. AH'nın özelliklerinden biri olan senil plaklar, aktive edilmiş astrositler ve mikroglia tarafından kuşatılmıştır. Senil plaklarda IL-1 α ve IL-6 seviyelerinin arttığı bildirilmiştir. (37, 81). IL-1, amiloid prekürsör protein (APP)'nin ekspresyonunu uyarır (37). IL-1, AH'nın diğer karakteristik özelliği olan tau'nun hiperfosforilasyonu ile de ilişkilidir (71).

Son yıllarda, AH'nın semptomları üzerinde sistemik infeksiyonların artan etkisi üzerine yapılan çalışmalar yoğunlaşmıştır ve IL-1 gibi proinflamator sitokinlerin üretimini uyaran infeksiyonların AH ilerlemesi için zararlı olduğu rapor edilmiştir (113).

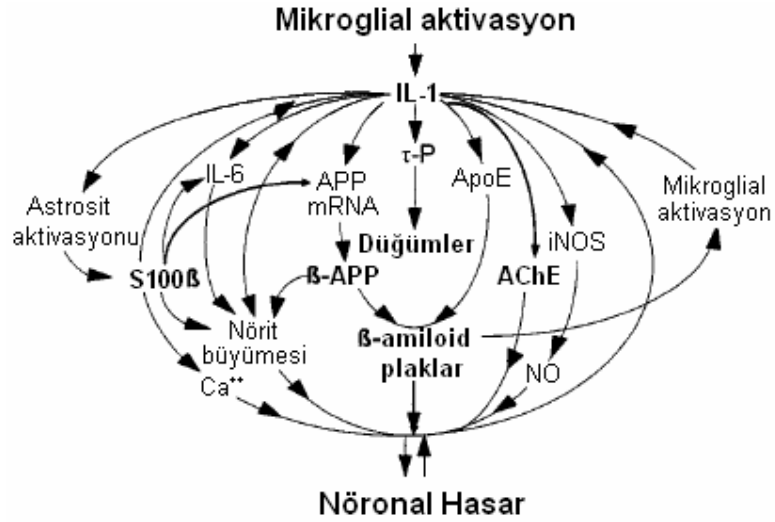
2.7.2.4.1. Alzheimer Hastalığında IL-1'in Aşırı Ekspresyonu

Alzheimer hastalığında, IL-1'in aşırı ekspresyonu, amiloid prekürsör protein (APP)'nin ekspresyonunu da aşırı uyarır. Bu durum β -amiloid (A β) plaklarının depozisyonu ve çökmesini uyarak AH'nin oluşumuna katkıda bulunur (37). Bu veriler, Alzheimer patogenezinde IL-1'in önemli bir rol üstlendiğini göstermektedir. Bunlar, Alzheimer beyin dokusunda IL-1'in aşırı derecede eksprese edildiği, IL-1'in aşırı ekspresyonunun belirlenmiş bir beyin bölgesini kapsayan patoloji ile ilişkilendirildiği ve IL-1'in aşırı ekspresyonunun Alzheimer patolojisinin yayılışı ile ilişkili olduğu gözlemlerini kapsar (116).

2.7.2.4.2. Alzheimer Patogenezinde Potansiyel IL-1 Teşvikli Kaskadlar

Hemen hemen tüm Down sendromu hastaları, orta yaşta belirgin Alzheimer-tipi nöropatolojik değişiklikler geliştirdiğinden Down sendromu, Alzheimer hastalığının doğal bir modelidir. Orta yaşta Down sendromunu karakterize eden nöropatolojik değişikliklerin (A β plakları ve nörofibriler yumaklar) ortaya çıkmasından önce IL-1 proteini aşırı eksprese edilir. Gebeliğin ikinci trimestirine kadar, Down sendromlu fetusların aktif olmuş mikrogliaları kademeli olarak IL-1'i aşırı eksprese eder. Bu aşırı ekspresyon, A β plakları ve nörofibriler yumakları içeren Alzheimer benzeri değişikliklerin ortaya çıkması ile sonuçlanır (36). IL-1'in erken ve aşırı ekspresyonu ile AH patolojisinde IL-1-kontrollü kaskadların ürünlerinin aşırı ekspresyonu sonucu, hastalığa ait patolojilerin başladığı ve sürdüğü bildirilmiştir. Bu durum, nöronal işlevlerin distrofik büyümesini teşvik ettiği bilinen bir sitokin olan astrositik S100B'nin, aşırı ekspresyonunun eşlik etmesi ile astrositlerin yoğun, erken ve kalıcı aktivasyonu ile açıklanabilir (113). Alzheimer hastalığında, S100B'nin aşırı ekspresyonu ile astrosit

aktivasyonu, nöritik plaklarda distrofik, nöronal proseslerin yoğunluğu ile olduğu kadar verilen bir bölgede nöritik plakların sayısı ile ilişkilidir (86). IL-1'in aşırı ekspresyonu ile mikroglial aktivasyonunun, nöronal disfonksiyon ve kayıp ile ilişkili olan nöritik A β plaklarının oluşumunda erken ve önemli kanıt olduğu saptanmıştır. Nöronal zararın, IL-1'in aşırı ekspresyonu ve mikroglial aktivasyonu ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (70). Şekil 2.7.2.4.4.1'de gösterilen tüm bu kaskadlar nörodejenerasyondan kaynaklanabilir (38).



Şekil 2.7.2.4.4.1: IL-1 teşvikli nöronal hasara neden olan kaskadlar. NO, nitrik oksit; INOS, teşvik edilebilir NO sintaz (Griffin (38)'den değiştirilerek).

IL-1'in astrositleri aktive ettiği ve nörit büyümesini teşvik eden sitokin S100B'nin aşırı ekspresyonunu teşvik ettiği bulgusu; IL-1'in distrofik nöritlerin proliferasyonuna ve böylece Alzheimer hastalığında nöritik A β plakları içinde A β birikimlerine katkıda bulunabildiğini düşündürmüştür (113). İlâveten, S100B aşırı ekspresyonu A β 'nin başlangıç depozisyonuna katkıda bulunabilir; çünkü S100B, A β öncülünün artan sentezini teşvik eder (69).

IL-1'in β APP'nin aşırı ekspresyonunu uyarması Alzheimer hastalığında IL-1'in aşırı ekspresyonu ile A β 'nin depozisyonu arasındaki nöropatolojik ilişkiyi doğrular. (105). Bu sonuçlar ile IL-1'in aşırı ekspresyonunun, nörofibrillar yumakların oluşumu

ve distrofik nöritlerin büyümesi için S100B'nin aşırı ekspresyonu ve astrosit aktivasyonu aracılığıyla olduğu kadar A β üretimi, depozisyonu ve böylece plak oluşumunun sürdürülmesinde önemli bir faktör olduğu ileri sürülmüştür (37).

2.7.2.4.3. IL-1 ve Nöronal Disfonksiyon

Alzheimer hastalığında gözlenen IL-1'in aşırı ekspresyonu, potansiyel olarak hastalığa karşı seminal kayıp ve nöronal disfonksiyona direkt olarak katkıda bulunur. Çünkü disfonksiyon için, in vivo beyinde IL-1'in deneysel yükselişi, Alzheimer hastalığının nörofibrillar yumaklarda mevcut olan eşleşmiş helikal filamentler ve mikrotübülle-ilişkili protein *tau*'nun nörofilament proteinlerinin fosforilasyonunu ve aşırı ekspresyonunu teşvik eder. Üstelik in vivo IL-1'in yükselişi, distrofik nöritlerin aşırı büyümesi ile ilişkilidir (115). S100B'yi aşırı eksprese eden aktive edilmiş astrositler ve IL-1'i aşırı eksprese eden aktive mikroglialar, Alzheimer hastalığında nörofibrillar yumaklarla ilgili olan nöronlarla sıkı sıkıya ilişkilidir (114).

2.8. Polimorfizm

Bir hastalığa ya da hastalığa yatkınlığa neden olan DNA dizisindeki varyasyonlar populasyonda görülme sıklığına göre mutasyon ya da polimorfizm olarak adlandırılır. DNA dizisindeki varyasyonlar populasyonun %1'inden fazlasında meydana geliyorsa polimorfizm, %1'inden daha azında görülüyorsa mutasyon olarak adlandırılır. Mutasyonlar Mendelyen kalıtıma uyan nadir tek gen hastalıklarından sorumluyken polimorfizmler daha çok yaygın kompleks genetik bozukluklarla ilişkilidir. DNA dizi varyantlarının en yaygın tipi tek nükleotid polimorfizmleridir (123). İnsan genomunda yaklaşık her bin ya da üç milyon nükleotitte bir olmak üzere 27 milyon TNP bulunduğu bildirilmektedir (90).

Polimorfizmlerin yaklaşık %90'nını oluşturan ve insan genomunun yüksek çeşitliliğinin nedeni olarak kabul edilen tek nükleotid polimorfizmleri kardiyovasküler sistem hastalıkları, osteoporoz, alzheimer ve diyabet gibi bazı hastalıklara yatkınlığı arttırmakta ya da azaltmaktadır (16).

TNP'ler kararlı ve yaygın olup, sıklıkla ilgili olduğu karakterlerle özel ilişkili olduklarından, farmakogenetik çalışmalar için kullanışlı insan markerleri arasında yer alır. Ayrıca TNP genotiplemesi genetik haritalama, etken madde araştırmaları ve populasyon genetiği gibi çalışmalar için son yıllarda tercih edilen araştırma yöntemi haline gelmiştir (90).

2.9. Eş Zamanlı PCR Yöntemi

Eş zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (PCR), 1980'li yıllarda Kary Mullis tarafından geliştirilmiş ve spesifik bir DNA parçasının bir milyar kattan daha fazla çoğaltılmasına olanak sağlayan PCR metodunun geliştirilmesine dayanmaktadır (125).

Eş zamanlı PCR ilk olarak Higuchi ve ark. tarafından geliştirilmiştir. PCR'de etidyum bromürün kullanımı ve ultraviyole ışık altında reaksiyonun yürütülmesi ile bu araştırmacılar bir video kamera ile DNA birikimini görüntüleyebilmiştir (43). Etidyum bromürün nükleik asitlere bağlanarak DNA'nın floresan özelliğini arttırdığı 1960'lardan beri bilinmekteydi. Ancak PCR ve eş zamanlı videografi ile bu floresan özelliğe sahip kimyasalın kombine edilmesi ile eş zamanlı PCR 1990'ların ilk yıllarında ortaya çıkmıştır. Sonrasında bu teknoloji rekabete dayanan bir piyasada olgunlaşmış ve ticari olarak yaygın ve bilimsel olarak etkili bir hale gelmiştir (125).

Eş zamanlı PCR'nin temel amacı, çok düşük miktarda olsa bile bir örnekteki spesifik nükleik asit sekanslarını kesin şekilde ayırmak ve ölçmektir. Eş zamanlı PCR bir örnekteki spesifik bir hedef sekansı amplifiye etmekte ve sonrasında floresan teknolojisini kullanarak amplifikasyon ilerleyişini görüntülemektedir. Amplifikasyon sırasında floresan sinyalinin hızlıca eşik seviyesine ulaşması orijinal hedef sekansın miktarı ile ilişkilidir ve böylelikle miktar tayini sağlanabilmektedir. Ek olarak son ürün, çift sarmallı ürününün eridiği zamanın belirlenmesi için son ürünün artan sıcaklıklara maruz bırakılmasıyla da karakterize edilebilmektedir. Bu erime noktası ürün uzunluğu ve nükleotit içeriğine bağlı yegane bir özelliktir. Bu görevleri yerine getirmek için

geleneksel PCR, modern flüoresan kimyasallar ile birleşmekte ve eş zamanlı PCR ortaya çıkmaktadır (125).

Bu yöntemin geleneksel yöntemlere göre avantajları, hız, kopyalama oranında artış, kontaminasyon riskinde azalma, otomasyon imkanı, mikrolevhelerde yüksek işlem hacmi ve bütün PCR reaksiyonunu eş-zamanlı olarak gözlemeye izin vermesidir. Ayrıca klasik yöntemlerdeki gibi, başlangıç materyalinin miktarını tam olarak ölçmeye de imkan verir. Direk olarak saptanan sinyal, biriken PCR miktarı ile ilişkilidir (16).

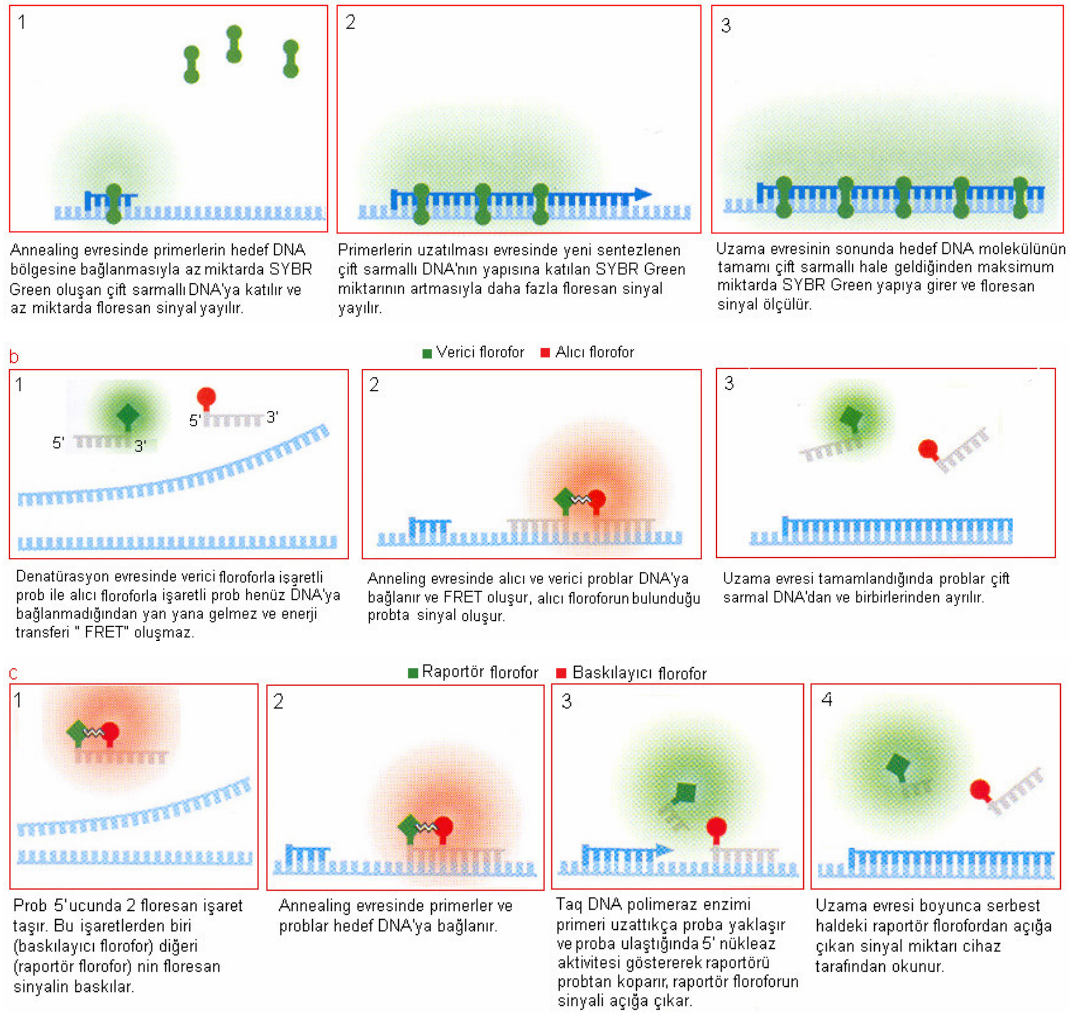
Eş zamanlı PCR’de amlifikasyonu takip etmek, ürün miktarını ya da spesifik tek nükleotid değişimlerini belirlemek için farklı floresan özellikli boya ve problemler geliştirilmiştir.

Nonspesifik çift sarmallı DNA bağlayan boyalara örnek olarak SYBR Green verilebilir. SYBR Green boyası, çift sarmallı DNA’ya bağlanarak floresan sinyallerin artmasını sağlar ve genellikle gen dozajını belirlemek için kullanılır (Şekil 2.9.1.a) (16).

Eş zamanlı PCR yönteminde kullanılan diğer bir yaklaşım hibridizasyon problemlerinin kullanımı olup, sinyal oluşumu Fluorescence Resonance Energy Transfer “FRET” prensibine dayanır. FRET, 3’ ucu floresan işaretli bir verici probdan yakındaki 5’ ucu floresan işaretli alıcı proba enerji transfer etme işlemidir. Bu transfer işlemi sonucunda oluşan floresans sinyal miktarı ortamdaki hibridizasyonun dercesine diğer bir deyişle PCR siklusuna süresince oluşan ürünlerin miktarına bağlı olarak artmaktadır. Eksitasyon ve emisyonları birbiri üzerine çakışan iki florofor, fiziksel olarak birbirine yakın ise, bir floroforun eksitasyonu, absorbe edeceği dalga boylarında ışığı yayacak ve ikinci floroforu uyatarak floresan ışımaya neden olacaktır. Hibridizasyon problemleri sıklıkla genotipleme için kullanılır (Şekil 2.9.1.b) (16).

Hidroliz problemlerinde ise Taq Polimerazın 5’→3’ nükleaz aktivitesinden faydalanılır. Yöntemin esası, 5’ ve 3’ uçlarından florofor (florokrom) maddelerle işaretli prob kullanılmasına dayanır. Probin 5’ ucunda rapörtör florokrom, 3’ ucunda ise baskılayıcı florofor bulunmaktadır. Prob tek sarmal hale getirilen hedef DNA molekülü

üzerinde primerlerin bağlanma bölgesinin arasında kalan yere bağlanır. Prob – hedef DNA molekülü arasındaki hibridizasyon devam ettiği sürece raportör florokrom maddenin sinyal oluşturması, 3' uçtaki baskılayıcı florofor tarafından engellenmektedir. (16) Primerlerin hedef DNA'ya bağlanmasıyla başlayan primer uzaması, probun bağlandığı noktaya kadar geldiğinde, sentezin devam edebilmesi için Taq DNA polimeraz enzimi 5' – 3' nükleaz aktivitesini kullanarak probu 5' uçtan yıkmaya başlar. Böylece raportör florokrom serbest hale geçer ve sinyal oluşturur. Her döngüde meydana gelen PCR ürünü miktarına paralel olarak sinyal şiddeti de artar (Şekil 2.9.1.c).



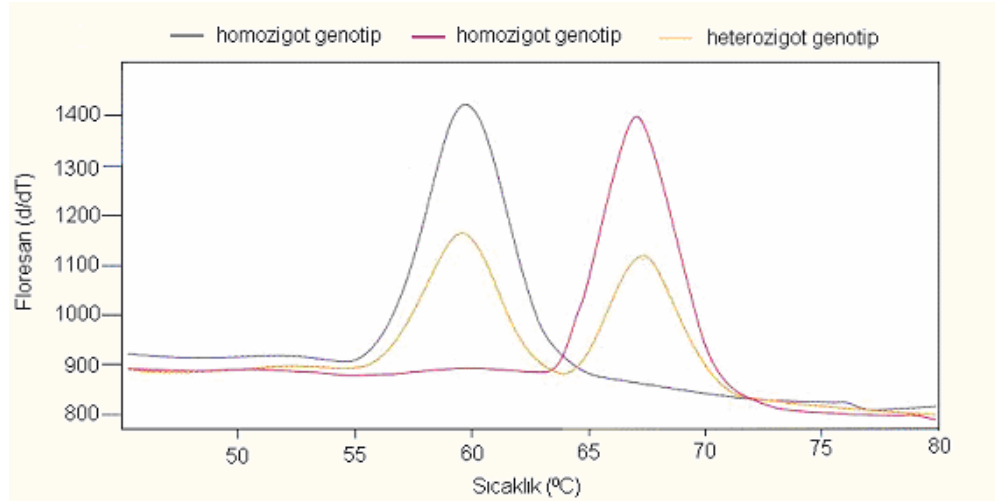
Şekil 2.9.1. Eş zamanlı PCR yönteminde yaygın kullanılan boya ve prob türleri. a) SYBR Green boyası, b) Hibridizasyon problemleri (FRET), c) Hidroliz problemleri (TaqMan).

Ticari olarak geliştirilmiş eş zamanlı PCR sistemlerine örnek olarak ABI Prism 7000 (Applied Biosystem), iCycler iQ (Bio-Rad), LightCycler (Roche), Rotor-Gene (Corbett) verilebilir (125).

2.9.1. LightCycler Sistemi

LightCycler floresan PCR yöntemi (Roche, Mannheim, Almanya) alışılmış polimeraz zincir reaksiyonunu floresan ölçüm sistemi ile birleştirerek, DNA amplifikasyonunun eş-zamanlı izlenmesini sağlamaktadır. Bu yöntemde, normal PCR'da kullanılan primerlere ek olarak, floresan işaretli iki prob kullanılmıştır. Problardan biri, polimorfizm içeren bölgeye, diğeri hemen bunun yakınına spesifiktir. Bu yöntemde genotiplerin ayırt edilmesi erime eğrisi analizi ile gerçekleştirilmektedir. Erime eğrisi analizi için, DNA amplifikasyonun tamamlanmasından sonra, sıcaklık kademeli olarak yükseltilir ve her bir örnek için erime eğrisi elde edilir (Şekil 2.9.1.1.). Polimorfik dizi ile floresan işaretli prob arasında oluşan heterodupleks, yanlış bir eşleşme içerdiğinden, normal dizi ile prob arasında oluşan duplekse oranla daha az stabildir. Bu durum, polimorfizm içeren dupleksin daha düşük bir erime noktasına sahip olmasına ve sıcaklık yükseltilmesi sırasında daha düşük bir sıcaklıkta ayrışmasına yol açmaktadır. Matematiksel bir dönüşüm kullanılarak erime eğrilerinden floresan değerinin negatif türevinin sıcaklığa göre değişimini veren profiller elde edilerek, değişik allellere ait farklı erime sıcaklıkları gösteren eğriler izlenmektedir (74, 97, 104).

Çalışmamız AH ile ilişkilendirilen *APOE* ($\epsilon 2$, $\epsilon 3$ ve $\epsilon 4$ polimorfizmleri) ve *IL-1 α* (C889T polimorfizmi) genlerinin birlikte değerlendirilmesi yönüyle ülkemizde AH genetiği üzerine yapılan diğ er çalışmalardan farklıdır. Bu polimorfizmlerin bizim popülasyonumuzda AH hastalarındaki dağılımı ve söz konusu polimorfizmlerin hastalık üzerine etkisinin araştırılması bu çalışmanın temel amacını oluşturmaktadır. Ayrıca bu çalışma ile *IL-1 α* -C889T polimorfizmi ilk kez eş zamanlı PCR yöntemi kullanılarak belirlenmiştir.



Şekil 2.9.1.1. LightCycler sisteminde hibridizasyon problemleri kullanılarak elde edilen floresan erime eğrisi pikleri

3. GEREÇLER VE YÖNTEMLER

3.1. Gereçler

3.1.1. Materyal Seçimi

Bu araştırmada, Afyon Kocatepe Üniversitesi Tıp Fakóltesi Nöroloji Polikliniğine başvuran ve Alzheimer Derneği Eskişehir Bakımevinde tedavi gören NINCDS/ADRDA kriterlerine göre olası Alzheimer Hastası tanısı almış 65 yaş üřtü 95 olgudan ve demans öyküsü bulunmayan aynı yaş grubu sağlıklı 60 kontrolden alınan kan örnekleri kullanıldı. Olgu ve kontrol grubuna dahil edilen bireylerin pedigrisi yapıldı. Kontrol grubu belirlenirken ailesinde demans öyküsü bulunmayan bireyler seçildi ve olgu grubunun antienflamatuar ilaç kullanıp kullanmadıkları sorgulandı.

Çalışmaya dahil edilen olgulara ait kan örnekleri Afyon Kocatepe Üniversitesi, Tıbbi Etik Kurulu kararlarına uygun olarak, gönüllü olur formlarının imzalanmasını takiben toplandı. Kan örnekleri pıhtılaşmayı engellemek için etilendiamintetraasetik asitli (EDTA) tüplere alındı. Kan örnekleri DNA izolasyonu yapılmaya kadar +4°C’de saklandı.

3.1.2. Kullanılan Kimyasallar

Çalışmanın DNA izolasyonu ve *ApoE* polimorfizmi genotiplemesi aşamalarında Roche Diagnostics, GmbH Mannheim, Germany ve *IL-1 α* C889T polimorfizmi genotiplemesinde ise yine Roche Diagnostics, GmbH Mannheim, Germany ile Genes-4U AG, Winterthur, Switzerland firmalarına ait kitler kullanıldı.

3.1.2.1. DNA İzolasyonu

DNA İzolasyonu High Pure Template Preparation kiti kullanılarak yapıldı.

Kit İÇeriği

Etiket	İÇerik / Özellik	Miktar	Kullanım Şekli
Tissue Lysis Buffer	4 M üre	20 ml	
Binding Buffer	6 M guanidin HCl	20 ml	
Proteinaz K	Liyofilize halde, rekombinant		Bidistile H ₂ O'da (4.5 ml) çözüldü, alikotlanarak kullanılıncaaya kadar -20°C'de tutuldu.
Inhibitor Removal Buffer		33 ml	Kullanmadan önce 20 ml absöü etanol eklendi.
Wash Buffer		20 ml	Kullanmadan önce 80 ml absöü etanol eklendi.
Elution Buffer	10 mM Tris Buffer, pH 8.5	40 ml	Kullanmadan önce 70°C'ye ısıtıldı.
High Pure filtre tüpleri		100 adet	
Toplama tüpleri		400 adet	

3.1.2.2. ApoE Genotiplemeği

ApoE Genotiplemeği Lightcycler-Apo E Mutation Detection kiti kullanılarak yapıldı.

Kit İÇeriği

Etiket	İÇerik / Özellik
LC Apo E Mutasyon Belirleme Karışımı (Vial 1, sarı kapak)	Sekansa spesifik amplifikasyon primerleri, Florofor etiketli hibridizasyon problar ve optimum konsatrasyonda MgCl ₂ 'yi içerir.
LC Apo E Reaksiyon Karışımı (Vial 2, kırmızı kapak)	10 kat konsantre, kullanıma hazır <i>Taq</i> polimeraz, buffer ve dNTP'leri içerir.
Pozitif Kontrol (Vial 3, mor kapak)	Her iki polimorfik kodon için heterozigot kontrol kalıpları içerir.
PCR grade H ₂ O (Vial 4)	

3.1.2.3. IL-1 α C889T Genotiplemeği

IL-alpha (IL- α) genindeki C889T polimorfizminin analizi LightCycler® FastStart^{PLUS} DNA Master Hybridization Probes ve IL-alpha C889T ToolSet™ for LightCycler™ kitleri kullanılarak yapıldı.

***IL-1 α* C-889T ToolSet™ for LightCycler™ kit içeriği**

Etiket	İçerik	Miktar	Kullanım Şekli
OligoTool	Liyofilize halde mutasyon belirleme probu, anchor prob ve primerler içerir.	4 vial (Bir vial 16 test için)	Kullanmadan önce 50 μ l çözücü eklendi.
Kontrol	Liyofilize CT heterozigot DNA	4 vial	Kullanmadan önce 20 μ l çözücü eklendi.
Çözücü	OligoTool/Kontrol çözücüsü	2 vial (1000 μ l çözücü)	

LightCycler® FastStart DNA Master HybProbe Kitinin İçeriği

Solüsyon	İçerik	Miktar	Kullanım Şekli
LightCycler DNA Master HybProbe, 10x Konsantre	Taq DNA polimeraz, reaksiyon buffer, dNTP miks ve 10 mM MgCl ₂ içerir.	3 x 64 μ l	PCR miksi için kullanıma hazır.
25 mM MgCl ₂ Stok Solüsyon		1 x 1 ml	Kullanıma hazır.
PCR Grade H ₂ O		2 x 1 ml	Kullanıma hazır.

3.1.3. Kullanılan Cihazlar

Cihaz Adı	Marka-Model
Thermal Cycler	LightCycler® Instrument 1.5 Roche Diagnostics, Almanya
Karusel Santrifüj	LC Carousel Centrifuge 2.0, Roche Diagnostics, Almanya
LightCycler® Kapiller (20 μ l)	Roche Diagnostics, Almanya
LightCycler® Santrifüj Adaptörleri	Roche Diagnostics, Almanya
LightCycler® Capping Tool	Roche Diagnostics, Almanya
Soğuma bloğu	Roche Diagnostics, Almanya
Buzdolabı	Profilo
Derin dondurucu	Bosch
Santrifüj	Heraeus - Biofuge pico
Hot Plate	
Mikropipetler	Eppendorf
Vorteks	
Spektrofotometre	Nanodrop ND-100

3.2. YÖNTEMLER

Bu çalışmada, incelemeye alınan olgu ve kontrole ait periferik kan örneklerinden genomik DNA izole edildi. İzole edilen her DNA molekülü *ApoE* ε2, ε3, ε4 polimorfizmleri ve *IL-1α* C889T polimorfizmi açısından değerlendirildi. Değerlendirme için Eş zamanlı PCR yöntemi kullanıldı.

3.2.1. DNA Ekstraksiyonu

Olgulara ait periferik kan örneklerinden genomik DNA, High Pure Template Preparation kiti ile aşağıda verilen işlem basamakları uygulanarak izole edildi.

1. Örneğin isim ve DNA numarası bilgileri eppendorf tüpe ve takip defterine yazılarak kayıt altına alındı.
2. 200 µl periferik kan eppendorf tüpe kondu.
3. Üzerine 200 µl Binding buffer ve 40 µl Proteinaz K eklendi ve pipetajla karıştırıldı.
4. 10 dakika 72°C'de inkübe edildi.
5. Üzerine 100 µl izopropanol ilave edildi ve pipetajla karıştırıldı.
6. Karışım High Pure filtre tüpüne aktarıldı.
7. 10.000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi.
8. Toplama tüpü değiştirildi.
9. High Pure filtre tüpüne 500 µl Inhibitor Removal Buffer kondu.
10. 10.000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi.
11. Toplama tüpü değiştirildi.
12. High Pure filtre tüpüne 500 µl Wash Buffer kondu.
13. 10.000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi.
14. Toplama tüpü değiştirildi.
15. High Pure filtre tüpüne 500 µl Wash Buffer eklendi.
16. 10.000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi.
17. 13.000 rpm'de 10 saniye santrifüj edildi.
18. High Pure filtre tüpü eppendorf tüpe aktarıldı.

19. High Pure filtre tüpüne 40 µl 70°C'de bekleyen Elution Buffer kondu.
20. 1 dakika oda ısısında inkübe edildi.
21. 10.000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi.
22. High Pure filtre tüpüne 70°C'ye ısıtılan 40 µl Elution Buffer kondu.
23. Bir dakika oda sıcaklığında inkübasyonu takiben 10.000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi.
24. İşlem basamakları sonunda 80 µl çözücü içinde çözülmüş genomik DNA elde edildi.

İzolasyon sonrası elde edilen her örnek için DNA miktar ve saflık tayini spektrofotometre (Nanodrop ND-1000) kullanılarak ölçüldü. DNA örnekleri etiketlenerek analize kadar -20°C'de saklandı.

3.2.2. ApoE Genotiplenmesi

Elde edilen DNA örnekleri kullanılarak LightCycler-ApoE mutasyon belirleme kiti (Roche Diagnostics) ile kodon 112 ve 158 polimorfik bölgelerini içeren Apo E geninin 265 bp'lik fragmenti amplifiye edildi. Amplikon, PCR döngülerinin annealing fazında hibridize olan spesifik probalar kullanılarak floresans ile belirlendi.

DeneySEL işlemler aşağıda verilen sırayla gerçekleştirildi:

1. Kit kullanılıncaya kadar -20°C'de bekletildi. Malzeme tekrar tekrar dondurup çözme işlemlerinden uzak tutuldu.
2. Kullanılan malzemeler (özellikle LC ApoE Mutasyon Belirleme Karışımı (Vial 1, sarı kapak) parlak ışıktan mümkün olduğunca korundu.
3. PCR Master karışımları hazırlanmaya başlanmadan önce Light Cycler açıldı ve cihazın self-test yapması sağlandı. Pass raporu alındıktan sonra önceden yüklenmiş olan aşağıdaki protokol seçildi

Denatürasyon

Döngü Program Verisi	Değer
Döngü	1
Analiz modu	Yok
Sıcaklık hedefleri	Segment I
Hedef sıcaklık (°C)	95
İnkübasyon süresi (sn)	1:00
Sıcaklık geçiş oranı (°C/sn)	20
İkinci hedef sıcaklık (°C)	0
Basamak boyutu (°C)	0
Basamak gecikmesi (döngü)	0
Yakalama modu	Yok

Amplifikasyon

Döngü Program Verisi	Değer		
Döngü	45		
Analiz modu	Kantifikasyon		
Sıcaklık hedefleri	1	2	3
Hedef sıcaklık (°C)	95	60	72
İnkübasyon süresi (sn)	0	10	10
Sıcaklık geçiş oranı (°/sn)	20	20	20
İkinci hedef sıcaklık (°C)	0	0	0
Basamak boyutu (°C)	0	0	0
Basamak gecikmesi (döngü)	0	0	0
Yakalama modu	Yok	Tek	Yok

Erime Eğrisi Analizi

Döngü Program Verisi	Değer		
Döngü	1		
Analiz modu	Erime eğrisi		
Sıcaklık hedefleri	1	2	3
Hedef sıcaklık (°C)	95	42	80
İnkübasyon süresi (sn)	30	4:00	0
Sıcaklık geçiş oranı (°C/sn)	20	20	0.1
İkinci hedef sıcaklık (°C)	0	0	0
Basamak boyutu (°C)	0	0	0
Basamak gecikmesi (döngü)	0	0	0
Yakalama modu	Yok	Yok	Sürekli

Soğutma

Döngü Program Verisi	Değer
Döngü	1
Analiz modu	Yok
Sıcaklık hedefleri	I
Hedef sıcaklık (°C)	40
İnkübasyon süresi (sn)	30
Sıcaklık geçiş oranı (°C/sn)	20
İkinci hedef sıcaklık (°C)	0
Basamak boyutu (°C)	0
Basamak gecikmesi (döngü)	0
Yakalama modu	Yok

4. Hasta listesi girişi yapıldı ve sistem hazır duruma getirildi.
5. +4°C'de bekletilen soğuk blok üzerinde 1.5 ml'lik reaksiyon tüpü ve hazırlanacak reaksiyon sayısına göre kapiller yerleştirildi.
6. 1.5 ml'lik reaksiyon tüpünde reaksiyon sayısına göre tabloda verildiği şekilde master miks hazırlandı.

Sıra No	İçerik	Hacim
1	PCR grade su	12 µl
2	LC Apo E reaksiyon karışımı	2 µl
3	LC Apo E mutasyon belirleme karışımı	4 µl
4	Total hacim	18 µl

7. Her kapillere 18 µl master karışımı dağıtıldı.
8. Her çalışmada bir negatif ve bir pozitif kontrol kullanıldı. Negatif kontrol için ilk kapillere 2 µl PCR grade su, pozitif kontrol için ise son kapillere pozitif kontrol (vial 3'ten) 2 µl son miktar 20 µl olacak şekilde eklendi.
9. Diğer kapillerlere analiz edilecek örnekler sırasıyla 2'şer µl dağıtıldı.
10. 5 sn 2500 rpm'de kapillerler adaptörleriyle birlikte santrifüj edildi.
11. Kapillerler karusele yerleştirildi
12. Karusel LC cihazına yerleştirilerek kapak dikkatlice kapatıldı ve program başlatıldı.

13. Analiz işlemi, yaklaşık 40 dakikalık döngü sonunda Light Cycler'a ait 4.0 analiz programı kullanılarak yapıldı.

14. Kodon 112'nin analizi F2 kanalından (640nm); kodon 158'in analizi ise F3 kanalından (705nm) kanalında yapıldı.

15. Tm (melting temperature)'deki +/- 2.5°C'lik sapmalar kabul edildi.

16. Sonuçlar aşağıda verilen bilgilere göre değerlendirildi.

Kanal 2 (F2) / Kodon 112 genotip ilişkisi

	Erime pik sayısı	Erime pikine ait Tm
Homozigot genotip (CGC)	1	62.5°C
Heterozigot genotip (CGC/ TGC)	2	62.5°C/56.0°C
Homozigot genotip (TGC)	1	56.0°C

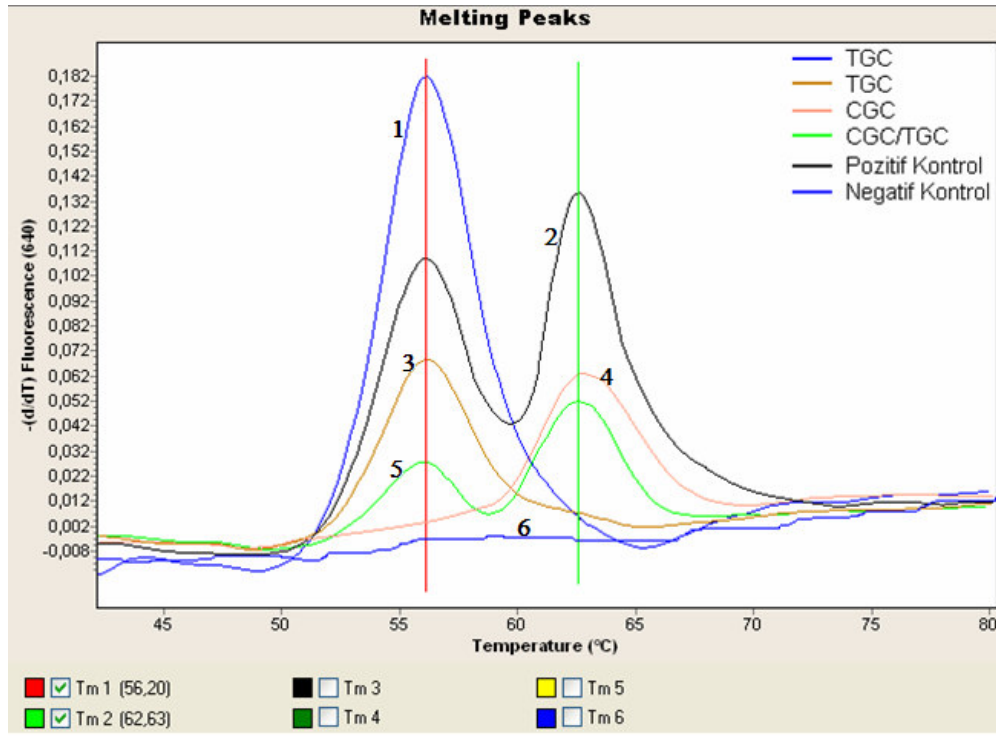
Kanal 3 (F3) / kodon 158 genotip ilişkisi

	Erime pik sayısı	Erime pikine ait Tm
Homozigot genotip (CGC)	1	66 °C
Heterozigot genotip (CGC/ TGC)	2	66°C/57.5 °C
Homozigot genotip (TGC)	1	57.5 °C

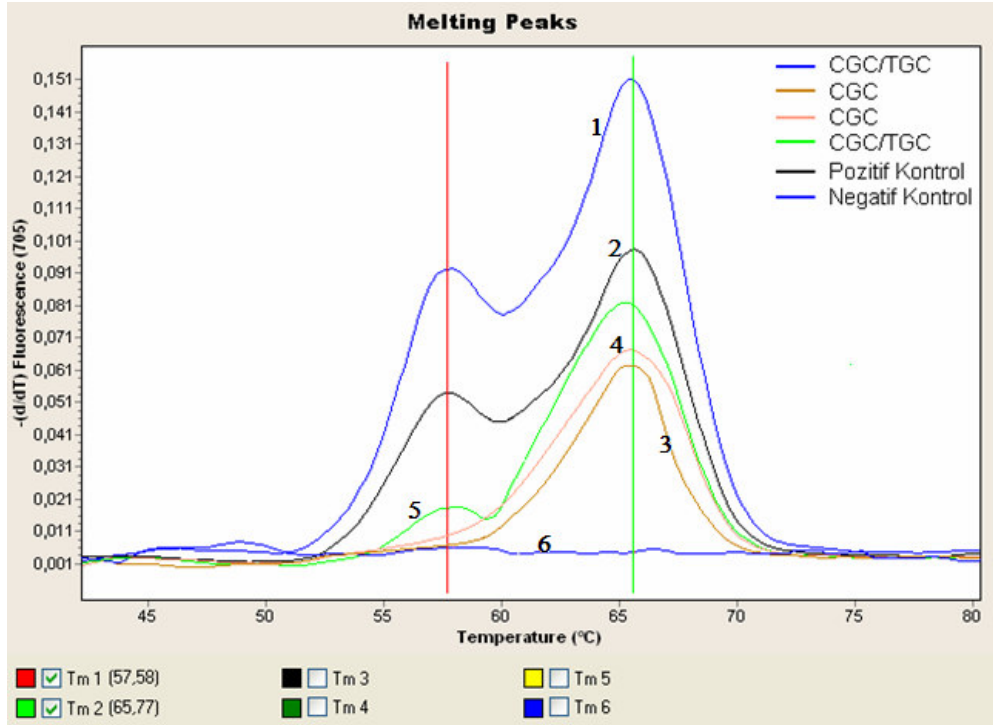
Alellere göre ilişkilendirme:

Genotip	Kodon 112- genotip ilişkisi	Kodon 158- genotip ilişkisi
ε2/ε2	TGC	TGC
ε3/ε3	TGC	CGC
ε4/ε4	CGC	CGC
ε2/ε3	TGC	CGC/TGC
ε2/ε4	CGC/ TGC	CGC/ TGC
ε3/ε4	CGC/ TGC	CGC

Genotip	LightCycler ApoE Kit Erime Sıcaklıkları			
	Kodon 112		Kodon 158	
	56°C	62.5°C	57.5°C	66°C
$\epsilon 2/\epsilon 2$				
$\epsilon 2/\epsilon 3$				
$\epsilon 2/\epsilon 4$				
$\epsilon 3/\epsilon 3$				
$\epsilon 3/\epsilon 4$				
$\epsilon 4/\epsilon 4$				



Şekil 3.2.2.1: Apo E $\epsilon 2$, $\epsilon 3$ ve $\epsilon 4$ polimorfizmlerine ilişkin genotiplerin kodon 112'ye ait erime eğrisi analizi.



Şekil 3.2.2.2: Apo E ϵ_2 , ϵ_3 ve ϵ_4 polimorfizmlerine ilişkin genotiplerin kodon 158'e ait erime eğrisi analizi.

Pik No	Kodon 112- genotip ilişkisi	Kodon 158- genotip ilişkisi	Genotip
1	TGC	CGC/TGC	ϵ_2/ϵ_3
2	CGC/ TGC	CGC/ TGC	ϵ_2/ϵ_4
3	TGC	CGC	ϵ_3/ϵ_3
4	CGC	CGC	ϵ_4/ϵ_4
5	CGC/ TGC	CGC/ TGC	ϵ_2/ϵ_4
6	-	-	Negatif Kontrol

3.2.3. IL-1 α C-889T Genotipleme

Elde edilen DNA örnekleri kullanılarak IL-1 α C-889T ToolSet™ for LightCycler™ kiti (Genes-4U) kullanılarak C-889T polimorfik bölgesini içeren IL-1 α geninin 136 bp'lik fragmenti amplifiye edildi. Amplikon, PCR döngülerinin annealing fazında hibridize olan spesifik probolar kullanılarak floresans ile belirlendi.

Deneysel işlemler aşağıda verilen sırayla gerçekleştirildi:

1. Kit kullanılıncaya kadar -20°C 'de bekletildi. Malzeme tekrar tekrar dondurup çözme işlemlerinden uzak tutuldu.
2. Kullanılan malzemeler ışıktan mümkün olduğunca korundu.
3. PCR Master karışımları hazırlanmaya başlanmadan önce Light Cycler açıldı ve cihazın self-test yapması sağlandı. Pass raporu alındıktan sonra önceden yüklenmiş olan aşağıdaki protokol seçildi.

Döngü Program Verisi	Değer
Döngü	1
Analiz modu	Yok
Sıcaklık hedefleri	1
Hedef sıcaklık ($^{\circ}\text{C}$)	95
İnkübasyon süresi (sn)	30
Sıcaklık geçiş oranı ($^{\circ}/\text{sn}$)	20
İkinci hedef sıcaklık ($^{\circ}\text{C}$)	0
Basamak boyutu ($^{\circ}\text{C}$)	0
Basamak gecikmesi (döngü)	0
Yakalama modu	Yok

Amplifikasyon

Döngü Program Verisi	Değer		
Döngü	50		
Analiz modu	Yok		
Sıcaklık hedefleri	1	2	3
Hedef sıcaklık ($^{\circ}\text{C}$)	95	55	72
İnkübasyon süresi (sn)	5	10	7
Sıcaklık geçiş oranı ($^{\circ}/\text{sn}$)	20	20	5
İkinci hedef sıcaklık ($^{\circ}\text{C}$)	0	0	0
Basamak boyutu ($^{\circ}\text{C}$)	0	0	0
Basamak gecikmesi (döngü)	0	0	0
Yakalama modu	Yok	Tek	Yok

Erime Eğrisi Analizi

Döngü Program Verisi	Değer		
Döngü	1		
Analiz modu	Erime Eğrisi		
Sıcaklık hedefleri	1	2	3
Hedef sıcaklık (°C)	95	40	85
İnkübasyon süresi (sn)	30	60	0
Sıcaklık geçiş oranı (°/sn)	20	20	0.2
İkinci hedef sıcaklık (°C)	0	0	0
Basamak boyutu (°C)	0	0	0
Basamak gecikmesi (döngü)	0	0	0
Yakalama modu	Yok	Tek	Sürekli

Soğutma

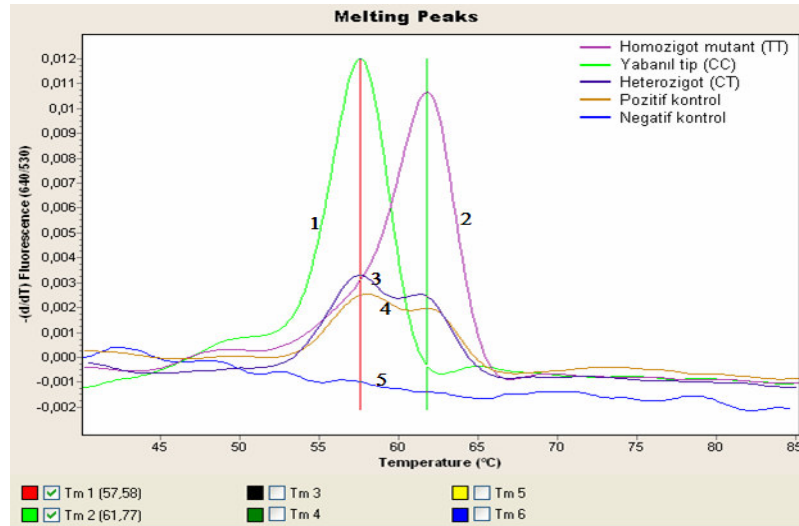
Döngü Program Verisi	Değer
Döngü	1
Analiz modu	Yok
Sıcaklık hedefleri	1
Hedef sıcaklık (°C)	40
İnkübasyon süresi (sn)	30
Sıcaklık geçiş oranı (°/sn)	20
İkinci hedef sıcaklık (°C)	0
Basamak boyutu (°C)	0
Basamak gecikmesi (döngü)	0
Yakalama modu	Yok

- Hasta listesi girişi yapıldı ve sistem hazır duruma getirildi.
- +4°C'de bekletilen soğuk blok üzerinde 1.5 ml'lik reaksiyon tüpü ve hazırlanacak reaksiyon sayısına göre kapiller yerleştirildi.
- 1.5 ml'lik reaksiyon tüpünde reaksiyon sayısına göre tabloda verildiği şekilde master miks hazırlandı.

Sıra No	İçerik	Hacim
1	Çözünmüş OligoTool IL 1 α -889 -16	2.8 μ l
2	IL 1 α -889 -T çözücüsü	10.4 μ l
3	25 mM MgCl ₂	0.8 μ l
4	Master Hibridizasyon Probları 10x	2 μ l
	Toplam	16 μ l

7. Her kapillere 16 µl master karışımı dağıtıldı.
8. Her çalışmada bir negatif ve bir pozitif kontrol kullanıldı. Negatif kontrol için ilk kapillere 4 µl IL 1 α -889 -T çözücüsü, pozitif kontrol için ise son kapillere Pozitif Kontrol'den 4 µl son miktar 20 µl olacak şekilde eklendi.
9. Diğer kapillerlere analiz edilecek örnekler sırasıyla 4'er µl dağıtıldı.
10. 5 sn 2500 rpm'de kapillerler adaptörleriyle birlikte santrifüj edildi.
11. Kapillerler karusele yerleştirildi.
12. Karusel LC cihazına yerleştirilerek kapak dikkatlice kapatıldı ve program başlatıldı.
13. Analiz işlemi yaklaşık 40 dakikalık döngü sonunda Light Cycler'a ait 4.0 analiz programı kullanılarak yapıldı.
14. T_m (melting temperature)'deki $\pm 2.5^{\circ}\text{C}$ 'lik sapmalar kabul edildi.
15. Sonuçlar aşağıdaki tabloda verilen bilgilere göre değerlendirildi.

	Erime pik sayısı	Erime pikine ait T _m
Homozigot genotip (CC889)	1	57,8°C
Heterozigot genotip (CT889)	2	57,8°C/62,1°C
Homozigot genotip (TT889)	1	62,1°C



Şekil 3.2.3.1: IL-1 α C-889T polimorfizmine ilişkin genotiplerin erime eğrisi analizi.

Pik No	Genotip
1	Yabancıl Tip (CC)
2	Homozigot mutant (TT)
3	Heterozigot (CT)
4	Pozitif Kontrol (CT)
5	Negatif Kontrol

3.2.4. Verilerin İstatistiksel Olarak Değerlendirilmesi

İstatistik analizleri, SPSS 15.0 ve MiniTab programları kullanılarak yapıldı. Olgu ve kontrol gruplarında *ApoE* $\epsilon 2$, $\epsilon 3$ ve $\epsilon 4$ polimorfizmleri ve *IL-1 α* C889T polimorfizmi genotip frekansları χ^2 testi, alel frekansları ise ikili oran testi kullanılarak karşılaştırıldı. Alzheimer hasta grubunda *ApoE* geni $\epsilon 4$ aleli ile *IL-1 α* geninde yer alan C889T genotiplerinin birlikteliği χ^2 testi kullanılarak istatistiksel olarak değerlendirildi. Ailesinde demans öyküsü bulunan olgular ile bulunmayan olgularda $\epsilon 4$ alel frekansı χ^2 testi kullanılarak istatistiksel olarak karşılaştırıldı.

4. BULGULAR

Bu çalışmada, olası Alzheimer tanısı almış olgular ile demans öyküsü bulunmayan sağlıklı kontrollerde *ApoE* $\epsilon 2$, $\epsilon 3$ ve $\epsilon 4$ polimorfizmleri ve *IL-1 α* C889T polimorfizmi genotipleme yapıldı. Çalışmaya alınan kontrol ve olgu gruplarının demografik özellikleri Tablo 4.1’de verildi.

Tablo 4.1: Kontrol ve olgu gruplarının demografik özellikleri

	Kontrol grubu (n=60)	Olgu grubu (n=95)
Yaş	73.95 \pm 6.0	73.44 \pm 6.9
Cinsiyet	28K/32E	46K/49E
Ailede demans öyküsü	0	71

4.1. ApoE Geni $\epsilon 2$, $\epsilon 3$ ve $\epsilon 4$ Polimorfizmlerinin Genotip ve Alel Frekansı

ApoE geni $\epsilon 2$, $\epsilon 3$ ve $\epsilon 4$ polimorfizmleri insanda, $\epsilon 2/\epsilon 2$, $\epsilon 2/\epsilon 3$, $\epsilon 2/\epsilon 4$, $\epsilon 3/\epsilon 3$, $\epsilon 3/\epsilon 4$, $\epsilon 4/\epsilon 4$ olmak üzere altı farklı genotip şeklinde bulunmaktadır. Çalışmamızda *ApoE* geninde yer alan söz konusu polimorfizmler, olası Alzheimer tanısı almış olgular ile demans öyküsü bulunmayan sağlıklı kontrollerde değerlendirildi.

ApoE geni $\epsilon 2$, $\epsilon 3$ ve $\epsilon 4$ polimorfizmlerine ilişkin genotipleme çalışmasına ait genotip ve alel frekansları olgu ve kontrol grubu için Tablo 4.1.1 ve Tablo 4.1.2’de verildi.

Kontrol grubunda, $\epsilon 2/\epsilon 3$ genotipine sahip birey sayısı 1 (%1.7), $\epsilon 3/\epsilon 3$ genotipine sahip birey sayısı 56 (%93.3), $\epsilon 3/\epsilon 4$ genotipine sahip birey sayısı 3 (%5.0) olarak bulundu. Kontrol grubunda $\epsilon 2/\epsilon 2$, $\epsilon 2/\epsilon 4$ ve $\epsilon 4/\epsilon 4$ genotip yapısına sahip bireye rastlanmadı (Tablo 4.1.1).

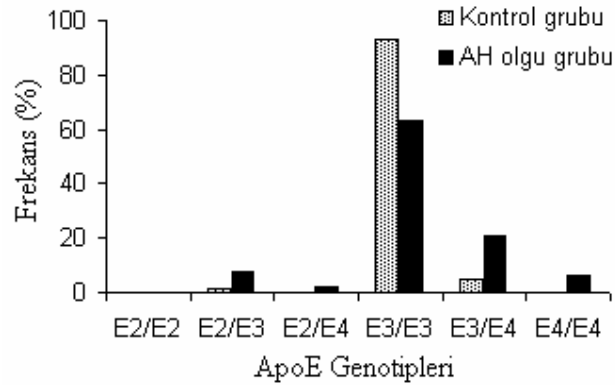
Olgu grubunda, $\epsilon 2/\epsilon 3$ genotipine sahip birey sayısı 7 (%7.4), $\epsilon 2/\epsilon 4$ genotipine sahip birey sayısı 2 (%2.1), $\epsilon 3/\epsilon 3$ genotipine sahip birey sayısı 60 (%63.2), $\epsilon 3/\epsilon 4$ genotipine sahip birey sayısı 20 (%21.1) ve $\epsilon 4/\epsilon 4$ genotipine sahip birey sayısı 6 (%6.3)

olarak bulundu. Olgu grubunda $\epsilon 2/\epsilon 2$ genotip yapısına sahip bireye rastlanmadı (Tablo 4.1.1).

Genotip frekansları ($\epsilon 2/\epsilon 2$, $\epsilon 2/\epsilon 3$, $\epsilon 2/\epsilon 4$, $\epsilon 3/\epsilon 3$, $\epsilon 3/\epsilon 4$, $\epsilon 4/\epsilon 4$) χ^2 testi kullanılarak istatistiksel olarak karşılaştırıldığında, $\epsilon 3/\epsilon 3$, $\epsilon 3/\epsilon 4$, $\epsilon 4/\epsilon 4$ genotipleri açısından, kontrol ve olgu grubu arasında anlamlı fark bulundu ($p < 0.05$). $\epsilon 3/\epsilon 3$ genotip frekansı kontrol grubunda olgu grubuna göre anlamlı düzeyde yüksekti. $\epsilon 3/\epsilon 4$ ve $\epsilon 4/\epsilon 4$ genotiplerinin frekansı ise olgu grubunda kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde yüksekti (Tablo 4.1.1).

Tablo 4.1.1: Kontrol ve olgu grubunda *ApoE* genotip frekanslarının dağılımı

Genotip	Kontrol grubu n=60 (%)	AH olgu grubu N=95 (%)	p
$\epsilon 2/\epsilon 2$	0 (0.0)	0 (0.0)	-
$\epsilon 2/\epsilon 3$	1 (1.7)	7 (7.4)	0.152
$\epsilon 2/\epsilon 4$	0 (0.0)	2 (2.1)	0.522
$\epsilon 3/\epsilon 3$	56 (93.3)	60 (63.2)	0.000
$\epsilon 3/\epsilon 4$	3 (5.0)	20 (21.1)	0.006
$\epsilon 4/\epsilon 4$	0 (0.0)	6 (6.3)	0.042



Şekil 4.1.1: Kontrol ve olgu grubunda *ApoE* genotip frekanslarının dağılımı.

Kontrol ve olgu grubu arasında $\epsilon 4$ alelinin varlığı bakımından fark anlamlı düzeyde ($p=0.00$) belirlendi (Tablo 4.1.2). Kontrol ve olgu grubu $\epsilon 4$ aleli taşıma

durumlarına göre gruplandırıldığında, kontrol grubunda $\epsilon 4$ pozitif birey sayısı 3 (%5.0) ve $\epsilon 4$ negatif birey sayısı 57 (%95.0) olarak belirlendi. Olgu grubunda $\epsilon 4$ pozitif birey sayısı 28 (%29.5) ve $\epsilon 4$ negatif birey sayısı 67 (%70.5) olarak bulundu (Tablo 4.1.2).

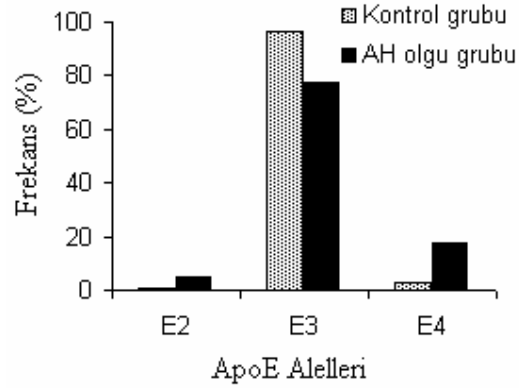
Tablo 4.1.2: Kontrol ve olgu grubunda *ApoE* $\epsilon 4$ alelinin varlığı (pozitif) veya yokluğu (negatif)

Genotip	Kontrol grubu n=60 (%)	AH olgu grubu n=95 (%)	P
$\epsilon 4$ pozitif	3 (5.0)	8 (29.5)	0.000
$\epsilon 4$ negatif	57 (95.0)	67 (70.5)	

Kontrol grubunda $\epsilon 2$ alelinin frekansı 1 (%0.8), $\epsilon 3$ alelinin frekansı 116 (%96.7) ve $\epsilon 4$ alelinin frekansı 3 (%2.5) olarak bulundu. Olgu grubunda $\epsilon 2$ alelinin frekansı 9 (%4.7), $\epsilon 3$ alelinin frekansı 147 (%77.4) ve $\epsilon 4$ alelinin frekansı 34 (%17.8) olarak bulundu (Tablo 4.1.3). *ApoE* genine ait $\epsilon 2$, $\epsilon 3$ ve $\epsilon 4$ alel frekansları ikili oran testi kullanılarak istatistiksel olarak karşılaştırıldığında, kontrol ve olgu grupları arasında anlamlı fark bulundu ($p < 0.05$). $\epsilon 3$ alel frekansı kontrol grubunda olgu grubuna göre anlamlı düzeyde yüksekti. $\epsilon 2$ ve $\epsilon 4$ alellerinin frekansı olgu grubunda kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde yüksekti (Tablo 4.1.3).

Tablo 4.1.3: Kontrol ve olgu grubunda *ApoE* alel frekanslarının dağılımı

Alel	Kontrol grubu n=120 (%)	AH olgu grubu N=190 (%)	P
$\epsilon 2$	1 (0.8)	9 (4.7)	0.026
$\epsilon 3$	116 (96.7)	147 (77.4)	0.000
$\epsilon 4$	3 (2.5)	34 (17.8)	0.000



Şekil 4.1.2: Kontrol ve olgu grubunda *ApoE* alel frekanslarının dağılımı.

Ailesinde demans öyküsü bulunan olgular ile bulunmayan olgularda $\epsilon 4$ alel frekansı χ^2 testi kullanılarak istatistiksel olarak karşılaştırıldı. 95 olgunun 24'ünün (%25.2) ailesinde demans öyküsü bulunurken, 71'inin (%74.8) yoktu. Ailesinde demans öyküsü bulunan olgular ile bulunmayan olgular $\epsilon 4$ alel frekansı açısından anlamlı düzeyde farklı bulundu ($p < 0.05$). $\epsilon 4$ alel frekansı, ailesinde demans öyküsü bulunan olgularda anlamlı düzeyde yüksekti (Tablo 4.1.4).

Tablo 4.1.4: Ailesinde demans öyküsü olan veya olmayan olgu grubunda *ApoE* alellerinin dağılımı

Alel	Ailesinde demans öyküsü olmayan AH n=142 (%)	Ailesinde demans öyküsü olan AH n=48 (%)	P
$\epsilon 2$	7 (4.9)	2 (4.1)	0.823
$\epsilon 3$	115 (81.0)	32 (67.0)	0.058
$\epsilon 4$	20 (14.0)	14 (29.2)	0.036

4.2. IL-1 α C889T Polimorfizminin Genotip ve Alel Frekansı

IL-1 α geninin C889T polimorfizmi açısından insanda CC, CT ve TT olmak üzere üç genotip mevcuttur. Çalışmamızda IL-1 α geninde yer alan C889T polimorfizmi için kontrol ve olgu grupları değerlendirildi.

Kontrol ve olgu grubu için IL-1 α C889T polimorfizmine ilişkin genotipleme çalışmasına ait genotip ve alel frekansları Tablo 4.1.1 ve Tablo 4.1.2’de verildi.

Kontrol grubunda, CC genotipine sahip birey sayısı 36 (%60.0), CT genotipine sahip birey sayısı 23 (%37.3) ve TT genotipine sahip birey sayısı 1 (%1.7) olarak bulundu (Tablo 4.2.1).

Olgu grubunda, CC genotipine sahip birey sayısı 52 (%54.7), CT genotipine sahip birey sayısı 37 (%38.9) ve TT genotipine sahip birey sayısı 6 (%6.3) olarak bulundu (Tablo 4.2.1).

CC, CT ve TT genotip frekansları χ^2 testi kullanılarak istatistiksel olarak karşılaştırıldığında, kontrol ve olgu grubu arasındaki fark önemsizdi (p>0.05) (Tablo 4.2.1).

Tablo 4.2.1: Kontrol ve olgu grubunda IL-1 α C889T genotip frekanslarının dağılımı

Genotip	Kontrol grubu n=60 (%)	AH olgu grubu n=95 (%)	P
CC	36 (60.0)	52 (54.7)	0.519
CT	23 (37.3)	37 (38.9)	0.939
TT	1 (1.7)	6 (6.3)	0.249

Kontrol grubunda C alelinin frekansı 95 (%79.2) ve T alelinin frekansı 25 (%20.8) olarak bulundu. Olgu grubunda C alelinin frekansı 141 (%74.2) ve T alelinin frekansı 49 (%25.8) olarak bulundu (Tablo 4.2.2).

İnterlökün 1 alfa genine ait C ve T alel frekansları İkili Oran Testi kullanılarak istatistiksel olarak karşılaştırıldığında kontrol ve olgu grupları arasındaki fark önemsizdi ($p>0.05$) (Tablo 4.2.2).

Tablo 4.2.2: Kontrol ve olgu grubunda *IL-1 α* C889T alel frekanslarının dağılımı

Alel	Kontrol grubu n=120 (%)	AH olgu grubu n=190 (%)	P
C	95 (79.2)	141 (74.2)	0.310
T	25 (20.8)	49 (25.8)	0.310

4.3. *IL-1 α* C889T ve *ApoE* ϵ 2, ϵ 3 ve ϵ 4 Polimorfizmlerinin Birlikte Değerlendirilmesi

Çalışmamızda Alzheimer hasta grubunda *ApoE* geni ϵ 4 aleli ile *IL-1 α* geninde yer alan C889T genotiplerinin birlikteliği χ^2 testi kullanılarak istatistiksel olarak değerlendirildiğinde, ϵ 4 alelini taşıyan ve taşımayan AH'ları arasında *IL-1 α* C889T genotip frekansları açısından fark önemsizdi ($p>0.05$) (Tablo 4.3.1).

Tablo 4.3.1: ϵ 4 aleli taşıyan ve taşımayan AH'larında CC, CT ve TT genotiplerinin dağılımı

Genotip	ϵ 4 aleli taşıyan AH n=28 (%)	ϵ 4 aleli taşımayan AH n=67 (%)	p
CC	18 (64.3)	34 (50.7)	0.194
CT	10 (35.7)	27 (40.3)	
TT	0	6 (9.0)	

5. TARTIŞMA

Alzheimer hastalığı (AH), bilişsel işlevlerde bozulma, günlük yaşam aktivitelerinde azalma ve davranışsal ve psikolojik bozukluklarla sonuçlanan ilerleyici bir nörodejeneratif hastalıktır (58). Özellikle geç başlangıçlı Alzheimer hastalığı durumunda AH'nin etiyolojisi multifaktöriyeldir. Birçok genetik ve çevresel faktör Alzheimer hastalığının gelişimi için risk faktörlerini belirlemekte, hastalığın oluşum yaşını ve ilerleyişini etkilemektedir. Bu faktörlerin çoğunun gerçek katkısı, önemi ve etkileşimleri hala tam olarak anlaşılamamıştır. Hastalığın etiyolojisi hala yoğun araştırma konuları arasındadır (5).

AH için birçok aday risk geni analiz edilmiş, ancak bu genlerin hastalık ile ilişkileri hakkında birbirinden farklı sonuçlar elde edilmiştir.

Bu tez çalışmasında, *ApoE* genine ait $\epsilon 2$, $\epsilon 3$ ve $\epsilon 4$ alelleri ile *IL-1 α -C889T* polimorfizmi birlikte incelenerek hastalıkla ilişkileri araştırılmıştır. Çalışmamız, ülkemizde bu iki polimorfizmin birlikte değerlendirildiği, ilk çalışma olacaktır. Bu çalışmada eş zamanlı PCR yöntemi ilk kez *IL-1 α -C889T* polimorfizmine ait genotipleme çalışması için kullanılmış olacaktır.

5.1. *ApoE* geni $\epsilon 2$, $\epsilon 3$ ve $\epsilon 4$ Polimorfizmleri ile Alzheimer Hastalığının İlişkisi

Apolipoprotein E (*ApoE*) 299 amino asitten oluşan 34.1 kDa moleküler ağırlığa sahip bir glikoproteindir (101). *ApoE* geni 19. kromozomun uzun kolunda lokalize, 4 ekzon ile 3 introna sahip 3597 bp uzunluğunda bir gendir. *ApoE*'deki iki polimorfik bölge $\epsilon 2$, $\epsilon 3$ ve $\epsilon 4$ olmak üzere üç alel ile sonuçlanmaktadır (133). Alzheimer hastalığı için bilinen en önemli risk faktörlerinden biri *ApoE*'nin $\epsilon 4$ izoformunun varlığıdır. Epidemiyolojik çalışmalar *ApoE* $\epsilon 4$ taşıyıcılarının AH için daha yüksek bir riske sahip olduklarını, ayrıca *ApoE* $\epsilon 4$ 'ün hastalığın gelişiminden ve erken oluşumundan sorumlu olduğunu göstermektedir (13).

Çalışma grubumuzda *ApoE* genindeki $\epsilon 2$, $\epsilon 3$ ve $\epsilon 4$ polimorfizmlerinin genotip frekansları kontrol grubunda, $\epsilon 2/\epsilon 3$ (%1.7), $\epsilon 3/\epsilon 3$ (%93.3), $\epsilon 3/\epsilon 4$ (%5.0), olgu grubunda, $\epsilon 2/\epsilon 3$ (%7.4), $\epsilon 2/\epsilon 4$ (%2.1), $\epsilon 3/\epsilon 3$ (%63.2), $\epsilon 3/\epsilon 4$ (%21.1), $\epsilon 4/\epsilon 4$ (%6.3), olarak bulundu. *Apo E* geni $\epsilon 2$, $\epsilon 3$ ve $\epsilon 4$ alellerinin genotip frekansları değerlendirildiğinde gruplar arasında $\epsilon 3/\epsilon 3$, $\epsilon 3/\epsilon 4$, $\epsilon 4/\epsilon 4$ genotipleri açısından, kontrol ve olgu grupları arasında anlamlı farklar saptandı. $\epsilon 3/\epsilon 3$ genotip frekansı kontrol grubunda, olgu grubuna göre anlamlı düzeyde yüksekti. $\epsilon 3/\epsilon 4$, $\epsilon 4/\epsilon 4$ genotiplerinin frekansı ise olgu grubunda kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde yüksekti.

de-Andrade ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada genotip frekansları kontrol grubunda, $\epsilon 2/\epsilon 2$ (%1), $\epsilon 2/\epsilon 3$ (%10.0), $\epsilon 2/\epsilon 4$ (%3.0), $\epsilon 3/\epsilon 3$ (%68.0), $\epsilon 3/\epsilon 4$ (%16.0), $\epsilon 4/\epsilon 4$ (%2.0) ve olgu grubunda, $\epsilon 2/\epsilon 3$ (%4.0), $\epsilon 2/\epsilon 4$ (%9.0), $\epsilon 3/\epsilon 3$ (%35.0), $\epsilon 3/\epsilon 4$ (%35.0), $\epsilon 4/\epsilon 4$ (%17) olarak rapor edilmiştir. Bu çalışmada da bizim çalışmamızda olduğu gibi Alzheimer olgu grubunda $\epsilon 2/\epsilon 2$ homozigot bireye rastlanmamıştır. Ancak söz konusu çalışmadan farklı olarak bizim çalışmamızda kontrol grubunda $\epsilon 4/\epsilon 4$ homozigot genotipli bireye rastlanmamıştır (20).

Brezilya'da yapılan bir çalışmada genotip frekansları kontrol grubunda, $\epsilon 2/\epsilon 3$ (%7.0), $\epsilon 2/\epsilon 4$ (%2.0), $\epsilon 3/\epsilon 3$ (%72.0), $\epsilon 3/\epsilon 4$ (%16.0), $\epsilon 4/\epsilon 4$ (%3.0); olgu grubunda, $\epsilon 2/\epsilon 3$ (%1.0), $\epsilon 3/\epsilon 3$ (%53.0), $\epsilon 3/\epsilon 4$ (%41.0), $\epsilon 4/\epsilon 4$ (%5.0) olarak rapor edilmiştir. Souza ve arkadaşları $\epsilon 3/\epsilon 4$ genotip frekansını olgu grubunda, $\epsilon 3/\epsilon 3$ genotip frekansını ise kontrol grubunda anlamlı düzeyde yüksek rapor etmişlerdir. Bu sonuçlar çalışmamız ile uyumludur. Bizim çalışmamızla benzer olarak söz konusu çalışmada Alzheimer olgu grubunda $\epsilon 2/\epsilon 2$ homozigot bireye rastlanmamıştır. Bu çalışma kontrol grubunda $\epsilon 4/\epsilon 4$ genotipli bireylerin olması ve olgu grubunda $\epsilon 2/\epsilon 4$ genotipli birey olmaması ile bizim çalışmamızdan farklıdır (117).

İşbir ve arkadaşlarının 35 Alzheimer hastası ve 29 kontrol üzerinde yaptıkları çalışmada genotip frekansları AH olgu grubunda $\epsilon 2/\epsilon 3$ %5.7, $\epsilon 2/\epsilon 4$ %2.9, $\epsilon 3/\epsilon 3$ %74.3, $\epsilon 3/\epsilon 4$ %14.3, $\epsilon 4/\epsilon 4$ %2.9; kontrol grubunda ise $\epsilon 2/\epsilon 3$ %3.4, $\epsilon 3/\epsilon 3$ %93.1, $\epsilon 3/\epsilon 4$ %3.4

bulunmuştur (52). Bizim çalışmamızda da benzer olarak olgu grubunda $\epsilon 2/\epsilon 2$, kontrol grubunda ise $\epsilon 2/\epsilon 2$ ve $\epsilon 4/\epsilon 4$ genotiplerine rastlanmamıştır. Bizim çalışmamızda da benzer olarak olgu grubunda $\epsilon 2/\epsilon 2$ ve kontrol grubunda $\epsilon 2/\epsilon 2$ ve $\epsilon 4/\epsilon 4$ genotipleri belirlenmedi.

Yokeş ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada genotip frekansları AH olgu grubunda $\epsilon 2/\epsilon 3$ (%7.4), $\epsilon 3/\epsilon 3$ (%63.2), $\epsilon 3/\epsilon 4$ (%29.4), kontrol grubunda ise $\epsilon 2/\epsilon 3$ (%11.8), $\epsilon 2/\epsilon 4$ (%0.8), $\epsilon 3/\epsilon 3$ (%71.7), $\epsilon 3/\epsilon 4$ (%15.7) bulunmuştur. Bu çalışmada olgu grubunda $\epsilon 2/\epsilon 2$, $\epsilon 2/\epsilon 4$ ve $\epsilon 4/\epsilon 4$; kontrol grubunda ise $\epsilon 2/\epsilon 2$ ve $\epsilon 4/\epsilon 4$ genotiplerine rastlanmamıştır. Bizim çalışmamızda da benzer olarak olgu grubunda $\epsilon 2/\epsilon 2$ ve kontrol grubunda $\epsilon 4/\epsilon 4$ genotipleri belirlenmedi (132).

Verilerimiz olgu ve kontrol grubu $\epsilon 4$ aleli taşıma durumlarına göre gruplandırıldığında kontrol grubunda $\epsilon 4$ pozitif birey sayısı 3 (%5.0), $\epsilon 4$ negatif birey sayısı 57 (%95.0) olarak belirlendi. Olgu grubunda ise $\epsilon 4$ pozitif birey sayısı 28 (%29.5), $\epsilon 4$ negatif birey sayısı 67 (%70.5) olarak belirlendi. $\epsilon 4$ alelinin varlığına göre çalışma grubumuz değerlendirildiğinde olgu ve kontrol grubu arasında anlamlı fark bulundu.

Verilerimiz alel frekansı açısından değerlendirildiğinde kontrol grubunda $\epsilon 2$ %0.8, $\epsilon 3$ %96.7 ve $\epsilon 4$ %2.5 olarak; olgu grubunda ise $\epsilon 2$, $\epsilon 3$ ve $\epsilon 4$ alellerinin frekansı sırasıyla %4.7, %77.4 ve %17.8 olarak saptandı. de-Andrade ve arkadaşlarının çalışmasında ise alel frekansları kontrol grubunda $\epsilon 2$ (%7.5), $\epsilon 3$ (%81.0) ve $\epsilon 4$ (%11.5) olarak; olgu grubunda ise $\epsilon 2$ (%7.0), $\epsilon 3$ (%54.0) $\epsilon 4$ (%39.8) olarak rapor edilmiştir (20). de-Andrade ve arkadaşlarının çalışmasında bizim çalışmamız ile uyumlu olarak $\epsilon 3$ alel frekansı kontrol grubunda, $\epsilon 4$ alelinin frekansı da olgu grubunda anlamlı düzeyde yüksekti. Bizim çalışmamızda farklı olarak $\epsilon 2$ alel frekansı olgu grubunda anlamlı düzeyde yüksekti.

Souza ve arkadaşlarının çalışmasında kontrol grubunda $\epsilon 2$ %4, $\epsilon 3$ %84 ve $\epsilon 4$ %12 olarak; olgu grubunda ise $\epsilon 2$ %1.0, $\epsilon 3$ %74.0 ve $\epsilon 4$ alel frekansı %25.0 olarak rapor edilmiştir (117). Bizim çalışmamız ile uyumlu olarak $\epsilon 3$ alel frekansı kontrol grubunda, $\epsilon 4$ alel frekansı da olgu grubunda anlamlı düzeyde yüksekti. Bizim çalışmamızdan farklı olarak $\epsilon 2$ alel frekansı kontrol grubunda anlamlı düzeyde yüksekti.

Yapılan bir diğer çalışmada Apo E $\epsilon 4$ alelini taşıyan bireylerin oranı kontrol grubuna (%14.2) göre Alzheimer hasta grubunda (%28.6) önemli düzeyde farklı bulunmuştur (120).

Lavados ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada kontrol ve olgu gruplarında $\epsilon 2/\epsilon 2$ ve $\epsilon 4/\epsilon 4$ genotiplerine rastlanmamıştır. Bu çalışmada, genotip ve alel frekansları açısından olgu ve kontrol grubu arasında fark rapor edilmemiştir (66).

Clarimon ve arkadaşları 2003 yılında yaptıkları çalışmada *ApoE* gen polimorfizmleri kontrol ve Alzheimer hasta grubu arasında genotip frekansı dağılımı açısından anlamlı fark bulmuşlardır. Bu çalışmada Apo E $\epsilon 4$ alel frekansı Alzheimer hasta grubunda (%30) kontrol grubuna (%8) göre anlamlı düzeyde yüksek bulunmuştur (15).

İşbir ve arkadaşlarının çalışmasında $\epsilon 2$, $\epsilon 3$ ve $\epsilon 4$ alel frekansları sırasıyla kontrol grubunda 1.7, 96.5 ve 1.7; olgu grubunda ise 4.2, 84.2 ve 11.4 olarak rapor edilmiştir. Bu çalışma alel frekansları açısından kontrol grubundaki $\epsilon 2$ frekansı hariç bizim çalışmamız ile paralellik göstermektedir (52).

Türkiye’de yapılan bir çalışmada *ApoE* geni alel frekansı açısından değerlendirildiğinde kontrol grubunda $\epsilon 2$ (%6.3), $\epsilon 3$ (%85.4) ve $\epsilon 4$ (%8.3); olgu grubunda ise $\epsilon 2$ (%3.7), $\epsilon 3$ (%81.6) ve $\epsilon 4$ (%14.7) olarak rapor edilmiştir. Söz konusu çalışmada alel frekansları kontrol grubundaki $\epsilon 2$ frekansı hariç bizim çalışmamız ile benzerdir. Aynı çalışmada alel frekansları açısından da bizim çalışmamıza paralel olarak $\epsilon 4$ alel frekansı olgu grubunda anlamlı düzeyde yüksek bildirmişlerdir (132).

Ülkemizde Denizli yöresinde 62 hasta ve 56 kontrol üzerinde yapılan bir diğer çalışmada ise Apo E $\epsilon 4$ alelini taşıyan bireylerin oranı kontrol grubuna (%9.0) göre AH olgu grubunda (%21.0) önemli düzeyde farklı bulunmuştur (2). Bu çalışmanın sonuçları da çalışmamız ile uyum göstermektedir.

Geç başlangıçlı Alzheimer hastalığı için rapor edilen pek çok risk faktörü arasında *ApoE* $\epsilon 4$ taşıyıcılığı ve ailede demans öyküsünün varlığı da yer almaktadır (27). Ailesinde demans hikayesi olan AH olgularımızda *ApoE* $\epsilon 4$ alel frekansını ailesinde demans hikayesi olmayanlara göre anlamlı düzeyde yüksek bulduk. Bu sonuç, *ApoE* $\epsilon 4$ aleli ile ailesinde demans hikayesinin bulunması etkenlerinin birlikteliğinin AH için riski arttırabildiğini göstermektedir. Nitekim Huang ve arkadaşlarının çalışması da sonuçlarımızı desteklemektedir (47, 48).

Bizim çalışmamızda olduğu gibi yapılan birçok çalışmada da $\epsilon 4$ aleli ile AH arasında kuvvetli ilişki rapor edilmiştir (44, 72, 108, 126). Tablo 5.1.1.'de farklı populasyonlarda *ApoE* geni $\epsilon 2$, $\epsilon 3$ ve $\epsilon 4$ polimorfizmlerine ait genotip ve alel frekansları verilmiştir.

ApoE polimorfizmleri özellikle geç başlangıçlı Alzheimer hastalığının sıklığı üzerine etkilidir. Genel olarak tüm bireyler Alzheimer hastalığı açısından risk altındadır fakat bu sürecin gelişimi *ApoE* genotipi ile yakından ilişkilidir. Nitekim literatürde Alzheimer hastalığını karakterize eden nöropatolojik değişiklikler ile *ApoE* $\epsilon 4$ alelini ilişkilendiren çalışmalar bulunmaktadır. Bizim çalışmamız da literatür ile uyumlu olarak geç başlangıçlı Alzheimer hastalığının gelişiminde $\epsilon 4$ alelinin önemini gösterir niteliktedir. Ayrıca çalışmamızda ailesinde Alzheimer öyküsü olan olgularda $\epsilon 4$ alel frekansının yüksek olması da bu hastalığın kalıtsal temelinin yadsınamaz olduğuna ve $\epsilon 4$ alelinin hastalığa yatkınlıkta kuvvetli bir marker olabileceğine işaret etmektedir. Diğer taraftan çalışma sonuçlarımızda literatürden farklı olarak Alzheimer hasta grubunda kontrol grubuna göre $\epsilon 2$ alel frekansını anlamlı düzeyde yüksek bulduk. Oysa literatürde Alzheimer hastalığı için $\epsilon 2$ alelinin koruyucu etkiye sahip olabileceğini

belirten çalışmalar mevcuttur. Bizim çalışma sonuçlarımızdaki farkın muhtemel sebeplerinden biri $\epsilon 2$ alel frekansının Alzheimer olgu grubunda literatürdeki oran ile benzeşmesine rağmen kontrol grubumuzda düşük olmasıdır. Bu durum iki grup arasında anlamlı fark gözlenmesine nedenlerinden biri olabilir . Bir diğer açıklama ise çalışma grubumuzda $\epsilon 2$ alelinin Alzheimer hastalığı için koruyucu bir niteliğinin olmadığı gözlenmesidir.

5.2. *IL-1 α* C889T polimorfizmi ile Alzheimer Hastalığının İlişkisi

İnsanda 2'nci kromozomun uzun kolundaki (2q13) 430 kb'lik bir bölgede kümelenmiş *IL-1* ailesinin üç geni tanımlanmıştır [14]. Bu genlerden ikisinin ürünü olan *IL-1 α* ve *IL-1 β* , *IL-1* reseptör tipI'e bağlanarak sinyal uyumunu sağlamaktadır. Üçüncü genin ürünü olan *IL-1* reseptör antagonisti (*IL-1Ra*) reseptöre bağlanır fakat kompetitif bir inhibitör olarak rol oynayarak hücre içi sinyal mekanizmasını başlatmamaktadır (10).

İnsan *IL-1 α* geni 10.5 kb'dır (29). *IL-1* mRNA'sını kodlayan 7 ekzon ve 6 introna sahiptir (4). *IL-1 α* geninin promotör bölgesinde yer alan C889T polimorfizmi açısından insanda CC, CT ve TT olmak üzere üç genotip mevcuttur. Çalışmamızda *IL-1 α* geninde yer alan C889T polimorfizmi için kontrol ve olgu grubu değerlendirildi.

Çalışmamızda kontrol grubunda genotip frekansları CC (%60.0), CT (%37.3), TT (%1.7) olarak bulundu. Olgu grubunda ise genotip frekansları, CC (%54.7), CT (%38.9), TT (6.3) olarak bulundu. Çalışmamızda *IL-1 α* geni C889T polimorfizmi genotip frekansları açısından kontrol ve hasta grubu arasında fark bulunmadı.

Kontrol grubunda alel frekansları C (%79.2) ve T (%20.8) olarak bulundu. Olgu grubunda ise alel frekansları C (%74.2) ve T (%25.8) idi. Çalışmamızda *IL-1 α* geni C889T polimorfizmi C ve T alel frekansları açısından kontrol ve hasta grubu arasında fark bulunmamıştır.

Hedley ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada *IL-1 α* geni C889T polimorfizmi açısından genotip frekansları, kontrol grubunda CC (%43.6), CT (%47.9) ve TT (%8.5); geç başlangıçlı Alzheimer hastası olgu grubunda CC (%41.6), CT (%43.2) ve TT (%15.2) olarak belirtilmiştir (42). Bu çalışma bizim çalışmamızdan hem genotip frekansları açısından farklı bir dağılım hem de kontrol ve hasta grubu arasında TT genotip frekansı açısından anlamlı farklılık göstermektedir.

Jhoo ve arkadaşları (54), Alzheimer hastası kadınlar ve kontrol grubu arasında *IL-1 α* C889T polimorfizmi açısından alel ve genotip frekanslarında önemli farklılıklar belirlemiştir. Bu araştırmacılar, genotip frekanslarını kontrol grubunda CC (%85.2) ve CT (%14.8); geç başlangıçlı Alzheimer olgu grubunda ise CC (%89.7) ve CT (%10.3) olarak bulmuşlardır. Ayrıca, kontrol ve geç başlangıçlı Alzheimer olgu grubunda alel frekanslarını sırasıyla C (%92.6), T (%7.4) ve C (%94.9), T (%5.1) olarak belirlemişlerdir (54).

Clarimon ve arkadaşları (15), 2003 yılında yaptıkları çalışmada *IL-1 α* C889T polimorfizmi açısından kontrol ve Alzheimer hasta grubu arasında genotip frekansı dağılımını farksız bulmuşlardır. Bu araştırmacılar, genotip frekanslarını kontrol grubunda CC (%47), CT (%38) ve TT (%15); Alzheimer olgu grubunda ise CC (%54), CT (%37) ve TT (%8) olarak bulmuşlardır. Ayrıca, kontrol ve geç başlangıçlı Alzheimer hastası grubunda T alel frekansını sırasıyla (%34) ve (%27) olarak belirlemişlerdir (15).

Seripa ve arkadaşları ise yaptıkları çalışmada *IL-1 α* geni C889T polimorfizmi TT genotip frekansı açısından hem İtalyan hemde Amerika popülasyonlarında hasta ve kontrol grubu arasında fark bulduklarını rapor etmişlerdir (112). Benzer şekilde, Bosco ve ark. (8), İtalya'da yaptıkları çalışmada da TT genotip frekansı açısından AH ve kontrol grubu arasında anlamlı fark bulmuştur. Literatürde bu sonuçları destekleyen çalışmalar mevcuttur (42).

Bizim çalışmamıza benzer olarak Fidani ve arkadaşlarının Yunanistan'da yaptığı çalışmada *IL-1 α* geni C889T polimorfizmi ile Alzheimer hastalığı arasında ilişki bulunmadığı belirtilmiştir (24). Literatürde sonuçlarımızı destekleyen bir çok çalışma mevcuttur (35, 59, 61, 63, 71, 85, 95, 120, 124).

Tablo 5.2.1.'de farklı populasyonlarda *IL-1 α* geni C889T polimorfizmine ait genotip ve alel frekansları verilmiştir. Görüldüğü üzere *IL-1 α* geni C889T polimorfizminin Alzheimer hastalığı üzerine etkisinin olup olmadığı henüz netlik kazanmamıştır. Bazı çalışmalar söz konusu polimorfizmi hastalık ile ilişkisiz bulurken bazıları da yalnızca erken başlangıçlı olgularda ilişki tesbit etmiştir. Bu farklılıkların bir sebebi muhtemelen çalışmaların farklı etnik gruplardan olan farklı büyüklük ve yaştaki Alzheimer populasyonlarında yapılmış olmasıdır. Bir diğer olası sebep ise *IL-1 α* geni C889T polimorfizminin hastalık üzerindeki etkisini başka genlere ait polimorfik varyantlar ile etkileşerek göstermesidir.

5.3. ApoE ϵ 4 Aleli ve *IL-1 α* C889T Genotiplerinin Birlikteliği

Multifaktöriyel hastalıklar üzerine etkili olan genler etkilerini diğer genler ve çevre ile etkileşerek ortaya koyar. Alzheimer gibi karmaşık patofizyolojiye sahip olan hastalıklar söz konusu olduğunda genetik temelli çalışmalar son dönemde genler arası ilişkilerin de incelenmesini zorunlu kılmıştır.

Biz de çalışmamızda multifaktöriyel bir hastalık olan Alzheimer hastalığı üzerine *Apo E ϵ 4* aleli ve *IL-1 α* C889T genotiplerinin birlikte etkisini değerlendirdik. Bu açıdan yapılan değerlendirmede olgu grubunda ϵ 4 alelinin varlığı veya yokluğu ile *IL-1 α* geni C889T polimorfizmi genotipleri arasında fark belirlenmedi.

Diğer taraftan, Combarros ve arkadaşları ise *Apo E ϵ 4* alelinin varlığında *IL-1 α* (-889) T aleli taşıyanların AH'ye ilişkin rölatif riskinin bu aleli taşımayanlara göre yaklaşık iki kat fazla olduğunu rapor etmişlerdir (11).

Jhoo ve arkadaşları *IL-1 α* C889T polimorfizmi T aleli ile *Apo E* ϵ 4 alelini birlikte değerlendirdiklerinde ϵ 4 alelinin varlığı veya yokluğunun *IL-1 α* C889T polimorfizmi T aleli ile AH arasındaki ilişkiyi etkilemediğini rapor etmişlerdir (54). Seripa ve arkadaşları da *IL-1 α* TT ve *ApoE* genotipleri arasında ilişki bulmadıklarını bildirmişlerdir (112). Yine Hayes ve arkadaşları da *IL-1 α* alel ve genotip frekans dağılımları ile *ApoE* ϵ 4 alelini taşıyan ve taşımayanlar arasında fark bulmadıklarını rapor etmişlerdir (41). *IL-1 α* geni C889T polimorfizmi ve *ApoE* geni polimorfizmlerinin AH ile ilişkisini araştıran bir çok çalışmada da benzer sonuçlar rapor edilmiştir (129).

Tablo. 5.3.1. Farklı populasyonlarda ApoE geni $\epsilon 2$, $\epsilon 3$ ve $\epsilon 4$ Polimorfizmlerinin genotip ve alel frekansları

Araştırmacı / Yayın tarihi	Çalışmanın yapıldığı populasyon	Genotip Frekansları (%)												Alel Frekansları (%)					
		Olgu Grubu						Kontrol Grubu						Olgu Grubu			Kontrol Grubu		
		$\epsilon 2/\epsilon 2$	$\epsilon 2/\epsilon 3$	$\epsilon 2/\epsilon 4$	$\epsilon 3/\epsilon 3$	$\epsilon 3/\epsilon 4$	$\epsilon 4/\epsilon 4$	$\epsilon 2/\epsilon 2$	$\epsilon 2/\epsilon 3$	$\epsilon 2/\epsilon 4$	$\epsilon 3/\epsilon 3$	$\epsilon 3/\epsilon 4$	$\epsilon 4/\epsilon 4$	$\epsilon 2$	$\epsilon 3$	$\epsilon 4$	$\epsilon 2$	$\epsilon 3$	$\epsilon 4$
Bizim çalışmamız	Türkiye	0.0	7.4	2.1	63.2	21.1	6.3	0.0	1.7	0.0	93.3	5.0	0.0	4.7	77.4	17.8	0.8	96.7	2.5
İşbir ve ark. /2001	Türkiye	0.0	5.7	2.9	74.3	14.3	2.9	0.0	3.4	0.0	93.1	3.4	0.0	4.2	84.2	11.4	1.7	96.5	1.7
Yokeş ve ark. / 2005	Türkiye	0.0	7.4	0.0	63.2	29.4	0.0	0.0	11.8	0.8	71.7	15.7	0.0	3.7	81.6	14.7	6.3	85.4	8.3
Aybek ve ark. 2007	Türkiye	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	21.0	-	-	9.0
de-Andrade ve ark. /2000	Avrupa	0.0	4.0	9.0	35.0	35.0	17.0	1.0	10.0	3.0	68.0	16.0	2.0	7.0	54.0	39.8	7.5	81.0	11.5
Souza ve ark. / 2003	Brezilya	0.0	1.0	0.0	53.0	41.0	5.0	0.0	7.0	2.0	72.0	16.0	3.0	1.0	74.0	25.0	4.0	84.0	12.0
Clarimón ve ark. / 2003	İspanya	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	30.0	-	-	8.0
Tang et al 2004	Çin	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	28.6	-	-	14.2
Hayes ve ark. / 2004	İngiltere	6.2	0.6	0.2	34.0	43.0	16.0	12.6	1.0	0.2	61.0	25.0	0.2	-	-	-	-	-	-
Lavados ve ark. / 2005	Şili	0.0	11.8	17.6	47.1	23.5	0.0	0.0	22.2	0.0	55.6	22.2	0.0	15.0	65.0	20.0	11.0	78.0	11.0
Sando ve ark. / 2008	Norveç	0.3	7.4	6.6	28.2	42.3	15.2	0.7	17.1	4.1	55.8	20.0	2.3	7.3	53.1	39.6	11.3	74.3	14.3

Tablo. 5.3.2. Farklı popülasyonlarda *IL-1 α* C889T polimorfizminin genotip ve alel frekansları

		Genotip Frekansları (%)						Alel Frekansları (%)			
		Olgu Grubu			Kontrol Grubu			Olgu Grubu		Kontrol Grubu	
Araştırmacı / Yayın tarihi	Çalışmanın yapıldığı popülasyon	CC	CT	TT	CC	CT	TT	C	T	C	T
Bizim çalışmamız	Türkiye	54.7	38.9	6.3	60.0	37.3	1.7	74.2	25.8	79.2	20.8
Clarimón ve ark./ 2003	İspanya	54.0	37.0	8.0	47.0	38.0	15.0	73.0	27.0	66.0	34.0
Wang ve ark./ 2007	Tayvan	82.5	17.5	0.0	75.2	22.9	1.9	91.2	8.8	86.7	13.3
Bosco ve ark./ 2004	İtalya	-	-	-	-	-	-	64.8	35.2	70.1	29.9
Hedley ve ark. / 2002	Avustralya	41.6	43.2	15.2	43.6	47.9	8.5	-	-	-	-
Jhoo ve ark./ 2004	Çin	89.7	10.3	0.0	85.2	14.8	0.0	94.9	5.1	92.6	7.4
Seripa ve ark. / 2005	İtalya	52.0	40.0	8.0	58.0	39.2	2.8	-	-	-	-
Seripa ve ark. / 2005	ABD	43.0	48.8	8.3	43.0	45.2	11.8	-	-	-	-
Hayes ve ark./ 2004	İngiltere	44.0	46.0	10.0	44.0	43.0	12.0	-	-	-	-

6. SONUC

Bu çalışmada *ApoE* geni $\epsilon 2$, $\epsilon 3$, $\epsilon 4$ ve *IL-1 α* C889T polimorfizmlerinin Alzheimer hastalığı ile ilişkisi bu polimorfizmlerin olgu ve kontrol grubundaki genotip ve alel frekanslarının dağılımına bakılarak değerlendirilmiştir. Bu tez çalışmasının sonuçları şöyle özetlenebilir:

1. *ApoE* geni $\epsilon 2$, $\epsilon 3$, $\epsilon 4$ polimorfizmine ilişkin genotipler açısından, kontrol ve olgu grubu arasında anlamlı fark bulundu.
2. $\epsilon 3/\epsilon 3$ genotip frekansı kontrol grubunda, $\epsilon 3/\epsilon 4$, $\epsilon 4/\epsilon 4$ genotip frekansları ise olgu grubunda anlamlı düzeyde yüksekti.
3. $\epsilon 3$ alel frekansı kontrol grubunda, $\epsilon 2$ ve $\epsilon 4$ alel frekansları ise olgu grubunda anlamlı düzeyde yüksekti.
4. Ailesinde Alzheimer öyküsü olan olgularda $\epsilon 4$ alel frekansı yüksekti.
5. *IL-1 α* geni C889T polimorfizmine ilişkin genotip ve alel frekanslarının dağılımı kontrol ve olgu grubu arasında farksızdı.
6. Olgu grubunda $\epsilon 4$ alelinin varlığı veya yokluğu ile *IL-1 α* C889T polimorfizmi genotipleri arasında fark belirlenmedi.

Çalışma sonuçlarımıza göre *ApoE* $\epsilon 4$ aleli Alzheimer hastalığı ile kuvvetli asosiyasyon göstermektedir. Diğer taraftan *IL-1 α* C889T polimorfizmi ile hastalık arasında herhangi bir ilişki belirlemedik.

Literatür bilgileri ve çalışma sonuçlarımız birlikte değerlendirildiğinde hem *ApoE* hem de *IL-1 α* geni polimorfizmlerinin Alzheimer hastalığı ile ilişkisi açısından pek çok farklı sonuç olduğu görülmektedir. Bu farklı sonuçların olası sebeplerinden biri çalışmaların farklı etnik kökenden, farklı sayıda, farklı nitelikte olgu grupları üzerinde yapılması olabilir. Bir diğeri ise Alzheimer gibi kompleks multifaktöryel hastalıklarda hastalığın oluşum ve gelişiminde etkisi olan pek çok farklı gen ve polimorfizmin bir arada, etkileşim halinde ve çevre ile birlikte sürece katılmasıdır. Bu durum Alzheimer hastalığı gibi multifaktöryel hastalıklar üzerinde yapılan genetik temelli çalışmaların

sonuçlarının tekrar edilebilirliği için en büyük problemlerden biridir. Bu bağlamda, bu tez çalışmasında elde ettiğimiz sonuçların daha geniş olgu grupları, daha çok sayıda aday gen ve polimorfizmin birlikte değerlendirilerek araştırılması gerektiği kanısındaız.

Alzheimer gibi modern dünyada yaşam süresi ve kalitesinin artması ile giderek daha da büyüyen sağlık sorunları için gelecekte bulunacak olası ozmler bu hastalıkların moleküler mekanizmalarının daha iyi anlaşılmasını gerektirmektedir. Alzheimer hastalığına neden olan genetik risk faktörlerinin iyi anlaşılması; hastalığa yatkınlığın, hastalık ortaya çıkmadan önce belirlenmesini ve belki de kişinin risk profiline uygun önleyici tedavilerin uygulanabilmesini mümkün kılacaktır. Kişinin yaşamını son dekatta önlenemez biçimde zora sokan Alzheimer hastalığının önlenmesi ve tedavisi için genetik ve farmakogenetik çalışmalar umut olacaktır.

7. KAYNAKLAR

1. Arendt, T., 2001, Disturbance of neuronal plasticity is a critical pathogenetic event in Alzheimer's disease, *Int J Dev Neurosci*, 19, 231-245 p.
2. Aybek, H., Ercan, F., Aslan, D., Sahiner, T., 2007, Determination of malondialdehyde, reduced glutathione levels and APOE4 allele frequency in late-onset Alzheimer's disease in Denizli, Turkey, *Clin Biochem.*, 40(3-4), 172-176 p.
3. Baskin, F., Smith, G.M., Fosmire, J.A., Rosenberg, R.N., 1997, Altered apolipoprotein E secretion in cytokine treated human astrocyte cultures, *J Neurol Sci*, 148, 15-18 p.
4. Bensi, G., Raugei, G., Palla, E., Carinci, V., Tornese, B.D., Melli, M., 1987, Human interleukin-1 beta gene, *Gene*, 52, 95 p.
5. Bertram, L. and Tanzi, R.E., 2004, The current status of Alzheimer's disease genetics: what do we tell the patients? *Pharmacol Res*, 2004, 50, 385-396 p.
6. Boschert, U., Merlo-Pich, E., Higgins, G., Roses, A.D., Catsicas, S., 1999, Apolipoprotein E expression by neurons surviving excitotoxic stress, *Neurobiol Dis*, 6, 508-514 p.
7. Bogdanovic, N., Corder, E., Lannfelt, L., Winblad, B., 2002, ApoE polymorphism and clinical duration determine regional neuropathology in Swedish APP (670, 671) mutation carriers: implications for late-onset Alzheimer's disease, *J Cell Mol Med*, 6, 199-214.
8. Bosco, P., Gueant-Rodriguez, R.M., Anello, G., Romano, A., Namour, B., Spada, R.S., Caraci, F., Tringali, G., Ferri, R., Gueant J., 2004, Association of IL-1 RN*2 allele and methionine synthase 2756 AA genotype with dementia severity of sporadic Alzheimer's disease, *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 75, 1036-1038 p.
9. Buttini M, Akeefe H, Lin C, Mahley RW, Pitas RE, Wyss-Coray T, Mucke L. 2000 Dominant negative effects of apolipoprotein E4 revealed in transgenic models of neurodegenerative disease. *Neuroscience.*; 97: 207-210.
10. Calvo, J., Martínez, N., Etxagibel, A., Calleja, S., Sáez-Torres, C., Sedeño, M., Julià, R., Muncunill, J., Matamoros, N., Gayà, A., 2002, Allelic frequencies of polymorphic variants of cytokine genes (IL1A, IL1B, IL1RN, IL6, IL10, IL12p40, and IFNG) in a Spanish population, *Immunologia*, 21, 76-86 p.
11. Combarros, O., Sanchez-Guerra, M., Infante, J., Llorca, J., Berciano, J., 2002, Gene dose-dependent association of interleukin-1A [-889] allele 2 polymorphism with Alzheimer's disease, *J Neurol*, 249, 1242-1245 p.
12. Cedazo-Minguez, A., Huttinger, M., Cowburn, R.F., 2001, Beta-VLDL protects against A beta(1-42) and apoE toxicity in human SH-SY5Y neuroblastoma cells, *Neuroreport*, 12, 201-206 p.
13. Cedazo-Minguez, A. 2007, Apolipoprotein E and Alzheimer's disease: Molecular mechanisms and therapeutic opportunities, *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 11, 1227-1238 p.
14. Clark, B.D., Collins, K.L., Gandy, M.S., Webb, A.C., Auron, P.E., 1986, Genomic sequence for human prointerleukin 1 beta: Possible evolution from a reverse transcribed prointerleukin 1 alpha gene, *Nucleic Acids Res*, 14, 7897-1986 p.

15. Clarimón, J., Bertranpetit, J., Calafell, F., Boada, M., Tàrraga, L., Comas, D., 2003, Joint analysis of candidate genes related to Alzheimer's disease in a Spanish population, *Psychiatr Genet*, 13(2), 85-90 p.
16. Claustres M., 2004, Frequency and Nature of mutations, and the methods to detect them, 4th HUGO Mutation Detection Training Course, Course Booklet, Newcastle, UK, 6-21 p.
17. Cummings, J.L., Benson, D.F., 1992, *Dementia: A Clinical Approach* 2nd ed. Boston Butterworth Heinemann.
18. Cutler, R.G., Kelly, J., Storie, K., Pedersen, W.A., Tammara, A., Hatanpaa, K., Troncoso, J.C., Mattson, M.P., 2004, Involvement of oxidative stress-induced abnormalities in ceramide and cholesterol metabolism in brain aging and Alzheimer's disease, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101, 2070-2075 p.
19. Di Patre, P.L., Read, S.L., Cummings, J.L., Tomiyasu, U., Vartavarian, L.M., Secor, D.L., Vinters, H.V., 1999, Progression of clinical deterioration and pathological changes in patients with Alzheimer disease evaluated at biopsy and autopsy, *Arch Neurol*, 56, 1254-1261 p.
20. de-Andrade, F.M., Larrandaburu, M., Callegari-Jacques, S.M., Gastaldo, G., Hutz, M.H., 2000, Association of apolipoprotein E polymorphism with plasma lipids and Alzheimer's disease in a Southern Brazilian population, *Braz J Med Biol Res*, 33(5), 529-537 p.
21. Dong, L-M., Wilson, C., Wardell, M.R., Simmons, T., Mahley, R.W., Weisgraber, K.H., Agard, D.A., 1994, Human apolipoprotein E. Role of arginine 61 in mediating the lipoprotein preferences of the E3 and E4 isoforms, *The Journal of Biological Chemistry*, 269, 22358-22365 p.
22. Du, Y., Dodel, R.C., Eastwood, B.J., Bales, K.R., Gao, F., Lohmuller, F., Muller, U., Kurz, A., Zimmer, R., Evans, R.M., Hake, A., Gasser, T., Oertel, W.H., Griffin, W.S., Paul, S.M., Farlow, M.R., 2000, Association of an interleukin 1 alpha polymorphism with Alzheimer's disease, *Neurology*, 55, 480-483 p.
23. Farrer, L.A., Cupples, L.A., Haines, J.L., Hyman, B., Kukull, W.A., Mayeux, R., Myers, R.H., Pericak-Vance, M.A., Risch, N., van Duijn, C.M., 1997, Effects of age, sex, and ethnicity on the association between apolipoprotein E genotype and Alzheimer disease. A meta-analysis. ApoE and Alzheimer Disease Meta Analysis Consortium, *Jama* 278, 1349-1356 p.
24. Fidani, L., Goulas, A., Mirtsou, V., Petersen, R.C., Tangalos, E., Crook, R., Hardy, J., 2002, Interleukin-1A polymorphism is not associated with late onset Alzheimer's disease, *Neurosci Lett*, 323(1), 81-83 p.
25. Fitzpatrick, A.L., Kuller, L.H., Lopez, O.L., Kawas, C.H., Jagust, W., 2005, Survival following dementia onset: Alzheimer's disease and vascular dementia, *J Neurol Sci*, 229-230, 43-49 p.
26. Forero, D.A., Casadesus, G., Perry, G., Arboleda, H., 2006, Synaptic dysfunction and oxidative stress in Alzheimer's disease: emerging mechanisms, *J Cell Mol Med.*, 10(3), 796-805 p.
27. Fratiglioni, L., Ahlbom, A., Viitanen, M., Winblad, B., 1993, Risk factors for late-onset Alzheimer's disease: a population-based, case-control study, *Ann Neurol*, 33, 258-266 p.
28. Frisoni, G.B., Testa, C., Sabattoli, F., Beltramello, A., Soininen, H., Laakso, M.P., 2005, Structural correlates of early and late onset Alzheimer's disease: voxel based morphometric study, *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 76, 112-114 p.

29. Furutani, Y., Notake, M., Fukui, T., Ohue, M., Nomura, H., Yamada, M., Nakamura, S., 1986, Complete nucleotide sequence of the gene for human interleukin 1 alpha, *Nucleic Acids Res*, 14, 3167-1986 p.
30. Ganguli, M., Dodge, H.H., Chen, P., Belle, S., DeKosky, S.T., 2000, Ten-year incidence of dementia in a rural elderly US community population: the MoVIES Project, *Neurology*, 54(5), 1109-1116 p.
31. Gao, S., Hugh, C., Hendrie, M.B., Hall, K.S., Hui, S., 1998, The Relationships Between Age, Sex, and the Incidence of Dementia and Alzheimer Disease, *Arch Gen Psychiatry*, 55, 809-815 p.
32. George-Hyslop, P.H., Tanzi, R.E., Polinsky, R.J., Haines, J.L., Nee, L., 1987, The Genetic defect causing familial Alzheimer disease maps on chromosome 21, *Science*, 235, 885-890 p.
33. Goedert, M., 1993, Tau-protein and the neurofibrillary pathology of Alzheimer's disease, *Trends Neurosci*, 16, 460-465 p.
34. Goshen, I. and Yirmiya, R., 2007, The Role of Pro-inflammatory Cytokines in Memory Processes and Neural Plasticity. In: *Psychoneuroimmunology*, 4E, Chapter 16, I, 337-366 p.
35. Green, E.K., Harris, J.M., Lemmon, H., Lambert, J.C., Chartier-Harlin, M.C., St Clair, D., Mann, D.M., Iwatsubo, T., Lendon, C.L., 2002, Are interleukin-1 gene polymorphisms risk factors or disease modifiers in AD? *Neurology*, 58(10), 1566-1568 p.
36. Griffin, W.S.T., Stanley, L.C., Ling, C., 1989, Brain interleukin-1 and S100 immunoreactivity are elevated in Down syndrome and Alzheimer disease, *Proc Natl Acad Sci USA*, 86, 7611-7615 p.
37. Griffin, W.S. and Mrak, R.E., 2002, Interleukin-1 in the genesis and progression of and risk for development of neuronal degeneration in Alzheimer's disease, *J Leukoc Biol*, 72(2), 233-238 p.
38. Griffin, W.S., 2006, Inflammation and neurodegenerative diseases, *Am J Clin Nutr*, 83(2), 470-474 p.
39. Grimaldi, L.M., Casadei, V.M., Ferri, C., Veglia, F., Licastro, F., Annoni, G., Biunno, I., De Bellis, G., Sorbi, S., Mariani, C., Canal, N., Griffin, W.S., Franceschi, M., 2000, Association of early-onset Alzheimer's disease with an interleukin-1alpha gene polymorphism, *Ann Neurol*, 47, 361-365 p.
40. Gurland, B.J., Wilder, D.E., Lantigua, R., Stern, Y., Chen, J., Killeffer, E.H., Mayeux, R., 1999, Rates of dementia in three ethnorracial groups, *Int J Geriatr Psychiatry*, 14, 481-493 p.
41. Hayes, A., Green, E.K., Pritchard, A., Harris, J.M., Zhang, Y., Lambert, J.C., Chartier-Harlin, M.C., Pickering-Brown, S.M., Lendon, C.L., Mann, D.M.A., 2004, A polymorphic variation in the interleukin 1A gene increases brain microglial cell activity in Alzheimer's disease, *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 75, 1475-1477 p.
42. Hedley, R., Hallmayer, J., Groth, D.M., Brooks, W.S., Gandy, S.E., Martins, R.N., 2002, Association of Interleukin-1 Polymorphisms with Alzheimer's Disease in Australia, *Ann Neurol*, 51, 795-797 p.
43. Higuchi, R., Fockler, C., Dollinger, G., Watson, R., 1993, Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions, *Biotechnology*, 11, 1026-1030 p.
44. Hollingworth, P., Dowzell, K., Williams, A., Keates, S., Abraham, R., Morgan, A., Foy, C., Archer, N., Powell, J., Lovestone, S., 2008, The ApoE E4 allele does not affect rate of cognitive and functional decline in late onset Alzheimer's disease (AD): Findings from the UK Medical

- Research council (MRC) genetic resource for AD The Journal of the Alzheimer Association, 4, 521p.
45. Hoyert, D.L. and Rosenberg, H.M., 1997, Alzheimer's disease as a cause of death in the United States, Public Health Rep, 112, 497-505 p.
 46. <http://www.molgen.ua.ac.be/ADmutations>
 47. Huang, Y., 2006, Molecular and cellular mechanisms of apolipoprotein E4 neurotoxicity and potential therapeutic strategies, Curr Opin Drug Discov Devel, 9, 627-641 p.
 48. Huang, W., Qiu, C., von Strauss, E., Winblad, B., Fratiglioni, L., 2004, ApoE Genotype, Family History of Dementia and Alzheimer Disease Risk, Arch Neurol, 61, 1930-1934 p.
 49. Hy, L.X. and Keller, D.M., 2000, Prevalence of AD among whites: a summary by levels of severity, Neurology, 55, 198-204 p.
 50. Iivonen, S., 2005, Genetic and Expressional Studies of Alzheimer's Disease Candidate Genes Emphasis on CYP19, Seladin-1 and HSPG2 Genes, Department Of Neurology Series Of Reports, No 77.
 51. Iqbal, K., Alonso Adel, C., Chen, S., Chohan, M.O., El-Akkad, E., Gong, C.X., Khatoon, S., Li, B., Liu, F., Rahman, A., Tanimukai, H., Grundke-Iqbal, I., 2005, Tau pathology in Alzheimer disease and other tauopathies, Biochim Biophys Acta, 1739, 198-210 p.
 52. Isbir, T., Agaçhan, B., Yilmaz, H., Aydin, M., Kara, I., Eker, D., Eker, E., 2001, Interaction between apolipoprotein-E and angiotensin-converting enzyme genotype in Alzheimer's disease, Am J Alzheimers Dis Other Demen., 16(4), 205-210 p.
 53. Jarrett, J.T., Berger, E.P., Lansbury, P.T., 1993, The carboxy terminus of the beta-amyloid protein is critical for the seeding of amyloid formation—implications for the pathogenesis of Alzheimer's disease, Biochemistry, 32, 4693-4697 p.
 54. Jhoo, J.H., Park, W.Y., Kim, K.W., Lee, K.H., Lee, D.Y., Youn, J.C., Suh, Y.J., Seo, J.S., Woo, J.I., 2004, No Evidence of Association of Interleukin 1A (-889) Genetic polymorphism with Alzheimer's Disease in Koreans, Genomics & Informatics, 2(2), 81-85 p.
 55. Jobling, S.A., Auron, P.E., Gurka, G., Webb, A.C., McDonald, B., Rosenwasser, W., Gehrke, L., 1988 Biological activity and receptor binding of human prointerleukin-1p and subpeptides, J Biol Chem, 263, 16372-1988 p.
 56. Kaplan, H.I. ve Sadock, B.J., 2004, Klinik Psikiyatri (Çeviri: E. Abay, editör), İstanbul, Nobel Tıp Kitabevleri.
 57. Kaufman, D., 1991, Myland-Clinical Neurology for Psychiatrists. Dementia, Philedelphia WB Saunders Company, 107-145 p.
 58. Kemper, P. and Murtaugh, C.M., 1991, Lifetime use of nursing home care, New Eng J Med, 324, 595-600 p.
 59. Ki, C.S., Na, D.L., Kim, D.K., Kim, H.J., Kim, J.W., 2001, Lack of association of the interleukin-1alpha gene polymorphism with Alzheimer's disease in a Korean population, Ann Neurol, 49(6), 817-818 p.
 60. Kivipelto, M., Helkala, E.L., Laakso, M.P., 2001, Midlife vascular risk factors and Alzheimer's disease in later life: longitudinal, population based study, BMJ, 322(7300), 1447-1451 p.

61. Kolsch, H., Ptok, U., Bagli, M., Papassotiropoulos, A., Schmitz, S., Barkow, K., Kockler, M., Rao, M. L., Maier, W., Heun, R., 2001, Gene polymorphisms of interleukin-1alpha influence the course of Alzheimer's disease, *Ann Neurol*, 49(6), 818-819 p.
62. Kumar, V., Cotran, R.S., Robbins, S.L., 2000, *Basic Pathology*, W.B. Saunders Company.
63. Kuo, Y. M., Liao, P.C., Lin, C., Wu, C.W., Huang, H.M., Lin, C.C., Chuo, L.J., 2000, Lack of association between interleukin-1alpha polymorphism and Alzheimer disease or vascular dementia, *Alzheimer Dis. Assoc. Disord*, 17(2), 94-97 p.
64. Kuo, Y.M., Crawford, F., Mullan, M., Kokjohn, T.A., Emmerling, M.R., Weller, R.O., Roher, A.E., 2000b, Elevated A beta and apolipoprotein E in A betaPP transgenic mice and its relationship to amyloid accumulation in Alzheimer's disease, *Mol Med*, 6, 430-439 p.
65. Lapane, K.L., Gambassi, G., Landi, F., Sgadari, A., Mor, V., Bernabei, R., 2001, Gender differences in predictors of mortality in nursing home residents with AD, *Neurology*, 56, 650-654 p.
66. Lavados, M., Farías, G., Rothhammer, F., Guillon, M., Mujica, M.C., Maccioni, C., Maccioni, R.B., 2005, ApoE alleles and tau markers in patients with different levels of cognitive impairment, *Arch Med Res*, 36(5), 474-479 p.
67. Lee, V.M.Y., Balin, B.J., Otvos, L. et al., 1991, A68-a major subunit of paired helical filaments and derivatized forms of normaltau, *Science*, 251, 675-678 p.
68. Levi, O., Dolev, I., Belinson, H., Michaelson, D.M., 2007, Intraneuronal amyloid-beta plays a role in mediating the synergistic pathological effects of apoE4 and environmental stimulation, *J Neurochem*, 103, 1031-1040 p.
69. Li, Y., Wang, J., Sheng, J.G., Liu, L., Barger, S.W., Jones, R.A., Van Eldik, L.J., Mrak, R.E., Griffin, W.S.T., 1998, S100β increases levels of b-amyloid precursor protein and its encoding mRNA in rat neuronal cultures, *J Neurochem*, 71, 1421-1428 p.
70. Li, Y., Barger, S.W., Liu, L., Mrak, R.E., Griffin, W.S., 2000, S100beta induction of the proinflammatory cytokine interleukin-6 in neurons, *J Neurochem*, 74(1), 143-150 p.
71. Li, X.Q., Zhang, J.W., Zhang, Z.X., Chen, D., Qu, Q.M., 2004, Interleukin-1 gene cluster polymorphisms and risk of Alzheimer's disease in Chinese Han population, *J Neural Transm*, 111(9), 1183-1190 p.
72. Licastro, F., Porcellini, E., Caruso, C., Lio, D., Corder, E.H., 2006, Genetic risk profiles for Alzheimer's disease: integration of ApoE genotype and variants that up-regulate inflammation, *Neurobiol Aging*, 28(11), 1637-1643 p.
73. Lobo, A., Launer, L.J., Fratiglioni, L., Andersen, K., Di Carlo, A., Breteler, M.M., Copeland, J.R., Dartigues, J.F., Jagger, C., Martinez-Lage, J., Soininen, H., Hofman, A., 2000, Prevalence of dementia and major subtypes in Europe: A collaborative study of population-based cohorts, *Neurologic Diseases in the Elderly Research Group*, *Neurology*, 54, 4-9 p.
74. Lohmann S., Lehmann L., Tabiti K., 2000, Fast and Flexible Single Nucleotide Polymorphism (SNP) Detection with the LightCycler System Roche Molecular Biochemicals, Penzberg, Germany, *Biochemica* no 4
75. Mahley, R.W., Nathan, B.P., Pitas, R.E., 1996, Apolipoprotein E. Structure, function, and possible roles in Alzheimer's disease, *Ann N Y Acad Sci*, 777, 139-145 p.

76. Mahley, R.W. and Huang, Y., 2006, Apolipoprotein (apo) E4 and Alzheimer's disease: unique conformational and biophysical properties of apoE4 can modulate neuropathology, *Acta Neurol Scand Suppl.*, 185, 8-14 p.
77. Manelli, A.M., Bulfinch, L.C., Sullivan, P.M., LaDu, M.J., 2007, Abeta 42 neurotoxicity in primary co-cultures: effect of apoE isoform and Abeta conformation, *Neurobiol Aging*, 28, 1139-1147 p.
78. Mann, D.M., Yates, P.O., Marcyniuk, B., 1985, Some morphometric observations on the cerebral cortex and hippocampus in presenile Alzheimer's disease, senile dementia of Alzheimer type and Down's syndrome in middle age, *J Neurol Sci*, 69, 139-159 p.
79. Mark, R.E. and Griffin, W.S.T., 2001, Interleukin-1, neuroinflammation, and Alzheimer's disease, *Neurobiol Aging*, 22, 903-908 p.
80. Mayeux, R., 2003, Epidemiology of neurodegeneration, *Annu Rev Neurosci*, 26, 81-104 p.
81. McGeer PL and McGeer E.G., 2003 Innate immunity, local inflammation, and degenerative disease. *Sci Aging Knowledge Environ.* 29p.
82. McLean, J.W., Tomlinson, J.E., Kuang, W.J., Eaton, D.L., Chen, E.Y., Fless, G.M., Scanu, A.M., Lawn, R.M., 1987, Cdna Sequence Of Human Apolipoprotein(A) Is Homologous To Plasminogen, *Nature*, 330, 132-137 p.
83. Mesulam, M., 2004, Davranışsal ve Kognitif Nörolojinin İlkeleri (Çeviri Editörü I.Hakan Gürvit), Oxford University Pres. Inc. Yelkovan Yayıncılık.
84. Michikawa, M., Fan, Q.W., Isobe, I., Yanagisawa, K., 2000, Apolipoprotein E exhibits isoform-specific promotion of lipid efflux from astrocytes and neurons in culture, *J Neurochem*, 74, 1008-1016 p.
85. Minster, R.L., DeKosky, S.T., Ganguli, M., Belle, S., Kamboh, M.I., 2000, Genetic association studies of interleukin-1 (IL-1A and IL-1B) and interleukin-1 receptor antagonist genes and the risk of Alzheimer's disease, *Ann Neurol*, 48(5), 817-819 p.
86. Mrak, R.E., Sheng, J.G., Griffin, W.S.T., 1996, Correlation of astrocytic S100 β expression with dystrophic neurites in amyloid plaques of Alzheimer's disease, *J Neuropathol Exp Neurol*, 55, 273-279 p.
87. Namba, Y., Tomonaga, M., Kawasaki, H., 1991, Apolipoprotein-E immunoreactivity in cerebral amyloid deposits and neurofibrillary tangles in Alzheimer's-disease and kuru plaque amyloid in Creutzfeldt-Jakob disease, *Brain Res*, 541, 163-166 p.
88. Nicklin, M.J., Barton, J.L., Nguyen, M., FitzGerald, M.G., Duff, G.W. and Kornman, K. (2002) A sequence-based map of the nine genes of the human interleukin-1 cluster. *Genomics*, 79, 718-25.+
89. Ogunniyi, A., Baiyewu, O., Gureje, O., Hall, K.S., Unverzagt, F., Siu, S.H., Gao, S., Farlow, M., Oluwole, O.S., Komolafe, O., Hendrie, H.C., Epidemiology of dementia in Nigeria: results from the Indianapolis-Ibadan study, *Eur J Neurol*, 7, 485-490 p.
90. Ota, M., Fukushima, H, Kulski, J.K., Inoko, H., 2007, Single nucleotide polymorphism detection by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism, *Nat Protoc*, 2(11), 2857-64 p.
91. Özbabalık, B.D. 2007, Alzheimer Demans ve Serebral İskemi, *Türk Serebrovasküler Hastalıklar Dergisi*, 13(2), 33-35 s.

92. Paik, Y.K., Chang, D.J., Reardon, C.A., Davies, G.E., Mahley, R.W., Taylor, J.M., 1985, Nucleotide sequence and structure of the human apolipoprotein E gene,(Alu sequences/apo-E4 genotype/5' flanking region/S1 nuclease mapping/intron), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82, 3445-3449 p.
93. Papassotiropoulos, A., Hock, C., Nitsch, R.M., 2001, Genetics of interleukin 6: implications for Alzheimer's disease, *Neurobiol Aging*, 22, 863-871 p.
94. Pearson, J.V., Huentelman, M.J., Halperin, R.F., Tembe, W.D., Melquist, S., Homer, N., Brun, M., Szelinger, S., Coon, K.D., Zismann, V.L., Webster, J.A., Beach, T., Sando, S.B., Aasly, J.O., Heun, R., Jessen, F., Kolsch, H., Tsolaki, M., Daniilidou, M., Reiman, E.M., Papassotiropoulos, A., Hutton, M.L., Stephan, D.A., Craig, D.W., 2007, Identification of the genetic basis for complex disorders by use of pooling-based genomewide single-nucleotide- polymorphism association studies, *Am J Hum Genet*, 80(1), 126-139 p.
95. Pirskanen, M., Hiltunen, M., Mannermaa, A., Iivonen, S., Helisalmi, S., Lehtovirta, M., Koivisto, A. M., Laakso, M., Soininen, H., and Alafuzoff, I., 2002, Interleukin 1 alpha gene polymorphism as a susceptibility factor in Alzheimer's disease and its influence on the extent of histopathological hallmark lesions of Alzheimer's disease, *Dement Geriatr Cogn Disord*, 14(3), 123-127 p.
96. Polvikoski, T., Sulkava, R., Myllykangas, L., Notkola, I.L., Niinisto, L., Verkkoniemi, A., Kainulainen, K., Kontula, K., Perez-Tur, J., Hardy, J., Haltia, M., 2001, Prevalence of Alzheimer's disease in very elderly people: a prospective neuropathological study, *Neurology*, 56, 1690-1696 p.
97. Pryor, R.J., Wittwer, C. T. , 2006, Real-time polymerase chain reaction and melting curve analysis, *Methods Mol Biol*, 336,19-32p.
98. Raiha, I., Kaprio, J., Koskenvuo, M., et al., 1996, Alzheimer's-disease in Finnish twins, *Lancet* 347, 573-578 p.
99. Rall, S.C.J., Weisgraber, K.H., Mahley, R.W., 1982b, Human apolipoprotein E; the complete amino acid sequence, *The Journal of Biological Chemistry*, 257, 4171-4178 p.
100. Rall, S.C., Weisgraber, K.H., Mahley, R.W., 1986, Isolation and characterization of apolipoprotein E. *Methods Enzymol.*, 128, 273-287 p.
101. Rapp, A., Gmeiner, B., Huttinger, M., 2006, Implication of apoE isoforms in cholesterol metabolism by primary rat hippocampal neurons and astrocytes, *Biochimie*, 88, 473-483 p.
102. Raskind, M.A., Carta, A., Bravi, D., 1995, Is early-onset Alzheimer disease a distinct subgroup within the Alzheimer disease population? *Alzheimer Dis Assoc Disord*, 1, 2-6 p.
103. Rocchi, A., Pellegrini, S., Siciliano, G., Murri, L., 2003, Causative and susceptibility genes for Alzheimer's disease: a review, *Brain Res Bull*, 61, 1-24 p.
104. Roche Applied Science, Technical Note, No. LC 18/2004
105. Rogers, J.T., Leiter, L.M., McPhee, J., Cahil, C.M., Zhan, S.S., Potter, H., Nilsson, L.N., 1999, Translation of the alzheimer amyloid precursor protein mRNA is up-regulated by interleukin-1 through 5'-untranslated region sequences, *J Biol Chem*, 274(10), 6421-6431 p.
106. Roher, A.E., Kuo, Y.M., Kokjohn, K.M., Emmerling, M.R., Gracon, S., 1999, Amyloid and lipids in the pathology of Alzheimer disease, *Amyloid*, 6, 136-145 p.
107. Roses A. D., 1997, *Molecular Genetics in Clinical Practice Alzheimer's Disease: The Genetics of Risk*, Copyright (C). The McGraw-Hill Companies.

108. Sando, S.B., Melquist, S., Cannon, A., Hutton, M.L., Sletvold, O., Saltvedt, I., White, L.R., Lydersen, S., Aasly, J.O., 2008, APOE epsilon4 lowers age at onset and is a high risk factor for Alzheimer's disease; a case control study from central Norway, *BMC Neurol.*, 16(8), 9 p.
109. Selekler, K., 2003, Alzheimer Hastalığı: patoloji, klinik, tanı ve ayırıcı tanı. Modern Tıp Semineri.26. Alzheimer ve diğer demanslar. Ed. Kaynak Selekler Ankara: Güneş Kitabevi.
110. Selkoe D. J., 2001, Alzheimer's Disease: Genes, Proteins, and Therapy. *Physiological Reviews* Vol. 81, No. 2,
111. Sergeant, N., Delacourte, A., Buee, L., 2005, Tau protein as a differential biomarker of tauopathies, *Biochim Biophys Acta*, 1739: 179-197 p.
112. Seripa, D., Matera, M.G., Dal Forno, G., Gravina, C., Masullo, C., Daniele, A., Binetti, G., Bonvicini, C., Squitti, R., Palermo, M.T., Davis, D.G., Antuono, P., Wekstein, D.R., Dobrina, A., Gennarelli, M., Fazio, V.M., 2005, Genotypes and haplotypes in the IL-1 gene cluster: analysis of two genetically and diagnostically distinct groups of Alzheimer patients, *Neurobiol Aging*, 26(4), 455-464 p.
113. Sheng, J.G., Ito, K., Skinner, R.D., Mrak, R.E., Rovnaghi, C.R., Van Eldik, L.J., Griffin, W.S., 1996, In vivo and in vitro evidence supporting a role for the inflammatory cytokine interleukin-1 as a driving force in Alzheimer pathogenesis, *Neurobiol Aging*, 17(5), 761-766 p.
114. Sheng, J.G., Mrak, R.E., Griffin, W.S., 1997, Neuritic plaque evolution in Alzheimer's disease is accompanied by transition of activated microglia from primed to enlarged to phagocytic forms, *Acta Neuropathol*, 94(1),1-5 p.
115. Sheng, J.G., Zhu, S.G., Jones, R.A., Griffin, W.S.T., Mrak, R.E., 2000, Interleukin-1 promotes expression and phosphorylation of neurofilament and tau proteins in vivo, *Exp Neurol*, 163(2), 388-391 p.
116. Sheng, J.G., Mrak, R.E., Jones, R.A., Brewer, M.M., Zhou, X.Q., McGinness, J., Woodward, S., Bales, K., Paul, S.M., Cordell, B., Griffin, W.S., 2001, Neuronal DNA damage correlates with overexpression of interleukin-1beta converting enzyme in APPV717F mice, *Neurobiol Aging*, 22(6), 895-902 p.
117. Souza, D.R., de Godoy, M.R., Hotta, J., Tajara, E.H., Brandão, A.C., Pinheiro Júnior, S., Tognola W.A., dos Santos, J.E., 2003, Association of apolipoprotein E polymorphism in late-onset Alzheimer's disease and vascular dementia in Brazilians, *Braz J Med Biol Res*, 36(7), 919-923 p.
118. Steinkasserer, N.K., Spurr, S., Cox, P., Jeggo, R.B., Sim, N., 1992, The human IL-1 receptor antagonist gene (IL1RN) maps to chromosome 2q14- q21, in the region of the IL-1 alpha and IL-1 beta loci, *Genomics*, 13, 654-657 p.
119. Strittmatter, W.J., Weisgraber, K.H., Goedert, M., Saunders, A.M., Huang, D., Corder, E.H., Dong, L.M., Jakes, R., Alberts, M.J., Gilbert, J.R., et al., 1994, Hypothesis: microtubule instability and paired helical filament formation in the Alzheimer disease brain are related to apolipoprotein E genotype, *Exp Neurol*, 1994, 125, 163-171 p.
120. Tang, M.N., Zhang, Z.X., Han, H.Y., Liu, X.H., Shen, Y., 2004, Analysis on association between the polymorphisms in apolipoprotein E, interleukin-1 alpha genes and Alzheimer's disease in Chengdu area, *Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi*, 21(2), 176-178 p.
121. Tanzi, R.E., 1997, Alzheimer disease: Biology, diagnosis and therapeutics, K Iqbal (Ed), John Wiley&Son Ltd, s.63-111.

122. Tanzi, R.E., 1999, A genetic dichotomy model for the inheritance of Alzheimer's disease and common age-related disorders, *J Clin Invest*, 104, 1175-1179 p.
123. Tebbutt, S. J., James, A., Pare, P. D., 2007, Single-Nucleotide Polymorphisms and Lung Disease, *CHEST*, 131, 1216–1223p.
124. Tsai, S.J., Liu, H.C., Liu, T.Y., Wang, K.Y., Hong, C.J., 2003, Lack of association between the interleukin-1alpha gene C(-889)T polymorphism and Alzheimer's disease in a Chinese population, *Neurosci Lett*, 343(2), 93-96 p.
125. Valasek, M. A., Repa, J. J., 2005, The power of real-time PCR *Adv Physiol Educ* 29, 151–159 p.
126. van der Flier, W.M., Pijnenburg, Y.A.L., Schoonenboom, S.N.M., Dik, M.G., Blankenstein, M.A., Scheltens, P., 2008, Distribution of ApoE genotypes in a memory clinic cohort, *Dement Geriatr Cogn Disord*, 25, 433-438 p.
127. Verkhratsky, A. and Toescu, E.C., 2006, Neuronal-glia networks as substrate for CNS integration, *J Cell Mol Med*, 10, 826-836 p.
128. Wang, H.K., Hsu, W.C., Fung, H.C., Lin, J.C., Hsu, H.P., Wu, Y.R., Hsu, Y., Hu, F.J., Lee-Chen, G.J., Chen, C.M., 2007, Interleukin-1alpha and -1beta promoter polymorphisms in Taiwanese patients with dementia, *Dement Geriatr Cogn Disord*, 24(2), 104-110 p.
129. Walsh, J.S., Welch, H.G., Larson, E.B., 1990, Survival of outpatients with Alzheimer-type dementia, *Ann Intern Med*, 113, 429-434 p.
130. Vitkovic, L. Bockaert, J., Jacque, C., 2000, Inflammatory cytokines: neuromodulators in normal brain, *J Neurochem*, 74, 457-471 p.
131. Xu, P.T., Gilbert, J.R., Qiu, H.L., Ervin, J., Rothrock-Christian, T.R., Hulette, C., Schmechel, D.E., 1999, Specific regional transcription of apolipoprotein E in human brain neurons, *Am J Pathol*, 154, 601-611 p.
132. Yokeş et al., 2005, Apolipoprotein E Genotyping in Turkish Alzheimer Patients. *Balkan Journal of Medical Genetics*, 8(1&2): 57-63
133. Zannis, V.I., Breslow, J.L., SanGiacomo, T.R., Aden, D.P., Knowles, B.B., 1981, Characterization of the major apolipoproteins secreted by two human hepatoma cell lines, *Biochemistry*, 20, 7089-7096 p.
134. Zannis, V.I., Cole, F.S., Jackson, C.L., Kurnit, D.M., Karathanasis, S.K., 1985, Distribution of apolipoprotein A-I, C-II, C-III, and E mRNA in fetal human tissues. Time-dependent induction of apolipoprotein E mRNA by cultures of human monocyte-macrophages, *Biochemistry* 24, 4450-4455 p.

ÖZGEÇMİŞ

ADI SOYADI : S. Handan YILDIZ
UNVANI : Uzm. Biyolog
LİSANS : Hacettepe Üniv. Biyoloji Bölümü 1999.
YÜKSEK LİSANS : Afyon Kocatepe Üniv. Sağ. Bil. Ens. Tıbbi Biyoloji AD, 2004.
YÜKSEK LİSANS TEZİ : “Afyon Yöresinde Ailevi Akdeniz Ateşi (FMF) Tanılı Olgularda MEFV Mutasyonlarının İncelenmesi”
(Danışman: Prof. Dr. Mustafa SOLAK)
ÜYELİKLERİ : Tıbbi Genetik Derneği
Tıbbi Biyoloji Derneği
YABANCI DİL : İngilizce
E-POSTA ADRESİ : handanyildizus@yahoo.com

YAYINLAR

Uluslararası Hakemli Dergilerde Yayımlanan Makaleler

1. Evirgen N., Solak M., Dereköy S., Erdoğan M., **Yıldız H.**, Eser B., Arıkan S., Erkoç A.: “Genotyping for Cx26 And Cx30 Mutations in Cases with Congenital Hearing Loss”, *Genetic Testing*, 12 (2):253-256, 2008.
2. Solak M., **Yıldız H.**, Köken R., Erdogan Ö. M., Eser B., Şen T., Evirgen N., Erdem S., Arıkan E.: “Analysis of Familial Mediterranean Fever Gene Mutations in 202 Patients with Familial Mediterranean Fever”, *Genetic Testing*, 341-344, 2008.
3. Solak M., **Yıldız H.**, Köken R., Erdogan Ö. M., Eser B., Şen T., Evirgen N., Erdem S.: “Analysis of MEFV Gene Mutations in 165 Patients Formerly Diagnosed as Familial Mediterranean Fever” *Turkiye Klinikleri J Med Sci* 28:117-122, 2008.
4. Çam F.S., Gül D., Tunca Y., Fıstık T., Erdoğan Ö. M., **Yıldız H.**, Erdem S., Solak M.: “Analysis of The Dermatoglyphics in Turkish Patients with Klinefelter's Syndrome”, *Hereditas*, 145:163-166, 2008.

Ulusal Hakemli Dergilerde Yayımlanan Makaleler

1. Solak M., Fıstık T., Eser B., Söylemez Z., **Yıldız H.**, Erdoğan Ö. M., Çağalayan S., Yüksel E., Şamlı H., Erdem S.: “Afyonkarahisar Kocatepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Tıbbi Genetik Laboratuvarı'nda Sitogenetik Analizler”, *Osmangazi Tıp Derg.*, 29(2):93-99, 2007.

2. Solak M., Fıstık T., Erdogan Ö. M., **Yıldız H.**, Eser B.: “Non- Obstruktif Azoospermik Erkeklerde 3/21 Translokasyonu ile 9 İnversonu Birlikteliği” *Osmangazi Tıp Dergisi*, 30(1):34-39, 2008.
3. Solak M., Güler C., Eser B, Fıstık T., Erdogan Ö. M., **Yıldız H.**, Söylemez Z.: “Klinefelter Sendromlu Beş Olguda Sitogenetik ve Moleküler Analizler” *Osmangazi Tıp Dergisi*, 30(1): 119-126, 2008.

Uluslararası Bilimsel Toplantılarda Sunulan Ve Bildiri Kitabında (Proceedings) Basılan Bildiriler

1. Evirgen N., Dereköy FS., Eser B., Erdogan MÖ., **Yıldız H.**, Solak M.: “Genotyping for Cx26 and Cx30 Gene Mutations in The Cases with Congenital Hearing Loss”, **6th. European Congress of Oto-Rhino-Laryngology, Head and Neck Surgery**, June 30-July 4, Vienna, Austria, 2007. Final Programme and Abstracts books, June 30-July 4, Vienna, Austria, 2007. *Eur Arch Otorhinolaryngol*, Suppl 1, 264:233, 2007.
2. Solak M., Fıstık T., Eser B., Söylemez Z., **Yıldız H.**, Erdogan Ö. M., Çağlayan S., Yüksel E., Şamlı H., Şimşek S.: “Cytogenetic Analyses in Medical Biology Department in Afyonkarahisar Kocatepe University” **6th European Cytogenetics Conference**, 07-10 July İstanbul, 2007. Final Programme and Abstracts books, İstanbul, July 07 – 10, 2007, *Chromosome Research*, Vol 15, Number 1, 116, 2007.

Ulusal Bilimsel Toplantılarda Sunulan Ve Bildiri Kitabında Basılan Bildiriler

1. Eser B., Fıstık T., **Yıldız H.**, Erdoğan M., Şamlı H., Solak M.: “48,XXY,+21 Karyotipli Bir Olgu” , 2. *Ege Genetik Sempozyumu*, 24 Kasım, Afyonkarahisar, 2006.
2. Evirgen N., Solak M., Dereköy S., Erdogan M., Eser B., **Yıldız H.**, Erkoç A., Arıkan S.: “Genotyping for Cx26 and Cx30 Gene Mutations in The Cases with Congenital Hearing Loss”, *II. Ulusal Moleküler Tıp Kongresi*, 24-26 Mart, İstanbul, 2007.
3. Eser O, Erdoğan M., Cosar E., **Yıldız H.**, Koken R., Eser E., Büyükbas S., Solak M: “The C677T Polymorphism of the Methylenetetrahydrofolate Reductase Gene and Folic Acid, Vitamin B₁₂, Homocysteine Levels in Turkish Children with Neural-Tube Defects: A Case-Control Study”, *II. Ulusal Moleküler Tıp Kongresi*, 24-26 Mart, İstanbul, 2007.
4. Eser O, **Yıldız H.**, Cosar E., Eser B., Erdoğan M., Kocabaş V., Aslan A., Solak M: “Metabolic Effects of A1298C Polymorphism of Methylenetetrahydrofolate Reductase Gene in Turkish Children with Neural-Tube Defects: A Case-Control Study”, *II. Ulusal Moleküler Tıp Kongresi*, 24-26 Mart, İstanbul, 2007.
5. Cosar M., Eser B., Eser O, Aslan A., Boyacı G., Erdoğan M., **Yıldız H.**, Büyükbas S., Solak M: “Spina Bifidalı Hastalarda Methylenetetrahydrofolate Reductase (MTHFR) Geninin C677T ve A1298C Polimorfizmlerinin Analizi ve Biyokimyasal Parametrelerinin Değerlendirilmesi”, *Türk Nöroşirürji Derneği*,

XXI. Bilimsel Kongresi, Türk Nöroşirürji Dergisi Cilt:17 Ek Sayı, 20- 24 Nisan, Antalya, 2007.

6. Solak M., **Yıldız H.**, Erdogan Ö. M., Köken R., Eser B., Evirgen N.: “Ailevi Akdeniz Ateşi Ön Tanısı İle Başvuran 202 Olgunun MEFV Geni Mutasyonlarının İncelenmesi” *X. Ulusal Tıbbi Biyoloji ve Genetik Kongresi*, 6-9 Eylül, Belek-Antalya, 2007.
7. Solak M., Fıstık T., Erdogan Ö. M., **Yıldız H.**, Eser B.: “Non- Obstruktif Azoospermik Erkeklerde 3/21 Translokasyonu İle 9 İnversiyonu Birlikteliği” *X. Ulusal Tıbbi Biyoloji ve Genetik Kongresi*, 6-9 Eylül, Belek-Antalya, 2007.
8. Coşar M., Erdoğan M., Eser O., Eser B., Aslan A., **Yıldız H.**, Korkmaz S., Yavaş G.F., Solak M.: “Psödötümör Serebri Hastalarının C677T MTHFR, A1298C MTHFR ve Faktör V Leiden Gen Polimorfizmlerinin Analizi” **Türk Nöroşirürji Derneği XXII. Bilimsel Kongresi**, 18-22 Nisan 2008, Antalya, Türk Nöroşirürji Derg, Cilt: 18, s.184, 2008.

Yazılan Kitaplar veya Kitaplarda Bölümler

1. Yıldız M., **Yıldız H.** : **Biyolojide Laboratuvar Teknikleri ve Uygulamaları**. Afyon Kocatepe Üniversitesi Yayınları No: 48 Afyon, 2003 (I. Baskı).
2. Yıldız M., **Yıldız H.** : **Biyolojide Laboratuvar Teknikleri ve Uygulamaları**. Afyon Kocatepe Üniversitesi Yayınları No: 48 Afyon, 2007 (II. Baskı).

PROJELERDE YAPTIĞI GÖREVLER

1. Nöral tüp defektli olgularda MTHFR geninde C677T ve A1298C mutasyonlarının analizi, AKÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu (051.TIP.40), Yardımcı Araştırmacı, 2005-2007.
2. Dejeneratif Disk Hernili hastalarda Aggreccan Gen Polimorfizminin araştırılması, AKÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu (051.TIP.44), Yardımcı Araştırmacı, 2005-2007.
3. Hafif Kognitif Bozukluk veya Alzheimer'lı Olgular ve Aterosklerozlu Olgularda Apolipoprotein E Polimorfizminin ve Protein Profillerinin Araştırılması, AKÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu (051.TIP.06), Yardımcı Araştırmacı, 2005-.
4. Vitamin D Reseptör *Apal* polimorfizm ve Osteoporoz İlişkisi, AKÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu (051.TIP.07), Yardımcı Araştırmacı, 2005-.
5. Alzheimerli Olgularda İnterlökin -1 Alfa Geni C(-889)T Polimorfizmi Genotipleme Çalışması, AKÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu (06.TIP.25), Yardımcı Araştırmacı, 2006-.
6. Dejeneratif Disk Hernili Hastalarda Vitamin D Reseptör Gen ve Aggreccan Gen Polimorfizmlerinin Araştırılması, AKÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu (06.TIP.27), Yardımcı Araştırmacı, 2006-.

7. Östrojen Reseptör Alfa Geni ve COLIA1 Genleri Polimorfizmleri ile Osteoporoz İlişkisinin Araştırılması, AKÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu (06.TIP.28), Yardımcı Araştırmacı, 2006-.

ULUSAL KONGRE, PANEL, KONFERANS KATILIMLARI

1. **Diabetes Mellitusla İlgili Güncel Gelişmeler**, Afyon, 21 Ekim 2001
2. **Hacettepe Üniversitesi Sürekli Tıp Eğitimi Etkinlikleri Tıpta Moleküler Biyolojik Uygulamalar Kursu**, Ankara, 9 Mayıs 2002
3. **V. Ulusal Prenatal Tanı ve Tıbbi Genetik Kongresi**, Konya, 09-12 Ekim, 2002.
4. **8. Ulusal Tıbbi Biyoloji Kongresi**, Adana, 14-17 Ekim, 2003.
5. **II. Ulusal Tıbbi Genetik Sempozyumu** “ Genetik Hastalıkların Moleküler Patolojisi” Sivas, 6-7 Kasım 2003.
6. **I. Ulusal Moleküler Tıp Kongresi**, Hilton Convention Center-İstanbul, 16-19 Nisan 2005.
7. **Hacettepe Üniversitesi European Science Foundation Konferansı**, Ankara, 25 Nisan 2005.
8. **Türk İmmünoloji Derneği Bölge Toplantıları IV**, Afyon Kocatepe Üniversitesi, 25-26 Kasım, 2005.
9. **2. Ege Genetik Sempozyumu**, İkbal Termal Otel – Afyonkarahisar, 24 Kasım, 2006.

BİLİMSEL KURS VE SEMİNER KATILIMLARI

1. Proteomik ve Uygulamaları, Potsdam Univ, Faculty of Mathematics and Naturel Science, 26.02. - 03.03.2007.

RUTİN TETKİK HİZMETLERİNE KATILIM

Ocak 2006 –Nisan 2007 Dönemi Rutin Moleküler Genetik Tetkikleri (Bu döneme ilişkin **PCR-RFLP**, **PCR-ELISA**, **VNTR** ve **Real-Time PCR** yöntemleriyle yapılan **476 tetkikte** fiilen **rutin sorumlusu** olarak görev almıştır).

DİĞER ETKİNLİKLER

1. Solak M., Ovalı H.F., Aktepe F., Dereköy F.S., Özdemir M., **Yıldız H.**, Yeşilçay Y.: “Eğiticilerin Eğitimi Kursu Eğitimde Ölçme ve Değerlendirme Rehberi, Afyon Kocatepe Üniversitesi Tıp Fakültesi-Afyon, 2004.
2. 2. Ege Genetik Sempozyumu, 24 Kasım, Afyonkarahisar, 2006 (Düzenleme Kurulu Üyesi).