

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

**ASC PROTEİNİNİN A β VE AL TİPİ AMİLOİD YAPILARI İLE
BİRLİKTELİĞİNİN ARAŞTIRILMASI**

Zihni Ekim TAŞKIRAN

Tıbbi Biyoloji Programı

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**ANKARA
2007**

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

**ASC PROTEİNİNİN A β VE AL TİPİ AMİLOİD YAPILARI İLE
BİRLİKTELİĞİNİN ARAŞTIRILMASI**

Zihni Ekim TAŞKIRAN

Tıbbi Biyoloji Programı

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. Engin YILMAZ**

**ANKARA
2007**

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim süresince bana her konuda destek olan, tüm bilimsel aktivitelerde bana yer vererek araştırma yapmam için beni teşvik eden, tez çalışmamda bilimsel birikimini ve değerli katkılarını esirgemeyen, danışmanım Sayın Prof. Dr. Engin Yılmaz'a,

Bilgilerini ve tecrübesini her zaman benimle paylaşan, çalışmalarım sırasında büyük sabır ve özveri gösteren, karşılaştığım en küçük sorunla bile ilgilenme inceliğinde bulunan Sayın Dr. Banu Peynircioğlu'na,

Yüksek lisans eğitimim süresince her zaman desteğini hissettiğim Tıbbi biyoloji Anabilim Dalı'nda görev yapan hocalarım, Sayın Prof. Dr. Meral Özgüç, Prof. Dr. Ahmet Kart, Prof. Dr. Şükriye Ayter, Prof. Dr. Hayat Erdem Yurter, Prof. Dr. Serap Emre, Prof. Dr. Pervin Dinçer, Yrd. Doç. Dr. Çetin Kocaefe, Öğr. Gör. Dr. Didem Dayangaç Erden ve Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'nda görevli tüm arkadaşlarıma,

Tez çalışmama sağladığı değerli bilimsel katkılarından dolayı Patoloji Anabilim Dalı'nda görev yapan Sayın Prof. Dr. Figen Söylemezoğlu'na,

İmmünboyama deneylerinde bana yol gösteren, hazırlanan preparatların fotoğraflanmasında büyük emek harcayan Pediatrik Patoloji Anabilim Dalı'nda görev yapan Sayın Prof. Dr. Diclehan Orhan, Prof. Dr. Şafak Güçer ve tüm Pediatrik Patoloji çalışanlarına,

Ürettiği ASC antikorunu karşılıksız olarak bizimle paylaşma nezaketini gösteren, Shinshu Üniversitesi'nde (Japonya) görev yapan Sayın Dr. Junya Masumoto'ya,

Bilim yolunda ilerlemem için her fedakarlığı yapan, bana daima destek olan sevgili aileme,

En içten duygularıyla teşekkür ederim.

ÖZET

Taşkıran, Z.E. ASC Proteininin A β ve AL Tipi Amiloid Yapıları ile Birlikteliğinin Araştırılması. Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyoloji Programı Yüksek Lisans Tezi, Ankara, 2007. Amiloid, çeşitli klinik bozukluklarda vücudun birçok doku ve organında genellikle hücreler arasında depolanan ve çözünmeyen protein birikimleridir. ASC proteini AA tipi amiloid fibrilleri ile birarada bulunmaktadır. Bu tez çalışmasında, ASC proteininin A β ve AL tipi amiloid yapıları ile birarada bulunup bulunmadığı araştırıldı.

12 Alzheimer hastasının otopsi beyin materyallerinde yapılan immünohistokimya çalışmaları sonucunda, senil plaklar ve serebrovasküler amiloid birikimleri ile ASC proteininin birlikte yer aldığı gösterildi. Bu birliktelik, ASC-A β immünfloresan eş boyaması ile doğrulandı. Ayrıca, bu hasta materyallerinde yapılan immünboyamalar sonucunda ASC proteininin gliyal hücrelerin yanısıra bazı nöronlarda da ifade olduğu ve bu ifadenin bazı hücrelerde *speck* şeklinde olduğu gösterildi.

AL tipi amiloid geliştiren 5 hastanın biyopsi materyalleri üzerinde yapılan immünohistokimya çalışmaları sonucunda, AL tipi amiloid fibrillerinde ASC proteininin biriktiği gösterildi.

ASC'nin AA tipi amiloid fibrillerinde olduğu gibi A β ve AL tipi amiloid fibrilleri ile de birlikte bulunduğu gösterilmesi, ASC'nin amiloid oluşum mekanizmasında önemli bir rolü olabileceğine işaret etmektedir. İleride yapılacak fonksiyonel araştırmalar ile ASC'nin amiloid oluşum mekanizmasındaki rolü açığa çıkarılabilecektir.

Anahtar Kelimeler: Amiloid, ASC, A β , AL tipi amiloid, Alzheimer.

Bu çalışma, TÜBİTAK 105 S 364 'GENTEPE' projesi tarafından desteklenmiştir.

ABSTRACT

Taşkıran, Z.E. Investigation of the co-localization of ASC protein with A β and AL Type Amyloid Fibrils. Hacettepe University Institute of Health Sciences Medical Biology Programme Master of Science Thesis, Ankara, 2007. Amyloid is an extra cellular insoluble protein aggregate which accumulates in several tissues in various clinical conditions. The co-localization of ASC protein with AA type amyloid fibrils has previously been demonstrated by our group. In this study, the possible co-localization of ASC with A β and AL type amyloid fibrils is investigated.

Immunohistochemical staining of paraffin-embedded tissues from brain post-mortem samples of 12 Alzheimer's disease patients revealed co-localization of ASC protein with senile plaques and cerebrovascular amyloid deposits. This co-localization was confirmed by ASC-A β co-staining by using immunofluorescence staining technique. Furthermore, immunostaining experiments of Alzheimer's disease patients' post-mortem tissue samples demonstrated neuronal ASC expression, in addition to glial cells which was shown to be as speck like aggregates in some cells.

Immunohistochemical staining of paraffin-embedded tissues of 5 patients suffering from AL type amyloid development revealed co-localization of ASC protein with AL type amyloid fibrils. The results of this study showed that ASC may play an important role in amyloid development. Further functional studies are required to explore the link between ASC and amyloid fibril formation.

Keywords: Amyloid, ASC, A β , AL type amyloid, Alzheimer's disease.

This study is supported by TÜBİTAK 105 S 364 'GENTEPE' project.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
İÇ KAPAK SAYFASI	i
ONAY SAYFASI	ii
TEŞEKKÜR	iii
ÖZET	iv
ABSTRACT	v
İÇİNDEKİLER	vi
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ	ix
TABLolar DİZİNİ	xi
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Amiloid Fibrillerinin Oluşum Mekanizması	3
2.2. Ailevi Akdeniz Ateşi ve Amiloid İlişkisi	5
2.3. ASC - AA Tipi Amiloid İlişkisi	6
2.4. Amiloid Tiplerinin Sınıflandırılması	9
2.5. AA Tipi Amiloid	11
2.6. Amiloid Beta	11
2.7 AL Tipi Amiloid	14
3. BİREYLER VE YÖNTEMLER	16
3.1. Bireyler	16
3.2. Çalışmada Kullanılan Kimyasal Malzemeler ve Çözeltiler	16
3.2.A. Kongo Kırmızısı Boyaması	16
3.2.B. İmmünohistokimya Boyaması	16
3.2.C. İmmünofloresan Boyama	18
3.3. Yöntemler	19
3.3.A. Kongo Kırmızısı Boyaması	19
3.3.B. İmmünohistokimya Boyaması	20
3.3.C. İmmünofloresan Boyama	22

4. BULGULAR	23
4.1. ASC Proteininin Aβ ile Birlikte Yerleşimi	23
4.1.A. ASC Proteininin Alzheimer Beyin Dokusundaki İfadesi	23
4.1.B. Senil Plakta Aβ - ASC Birlikteliği	25
4.1.C. Kongofilik Anjitopati'de Aβ - ASC Birlikteliği	28
4.2. ASC Proteininin AL Tipi Amiloid Fibrilleri ile Yerleşimi	30
5. TARTIŞMA	33
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	37
KAYNAKLAR	38
EK	

SİMGELER VE KISALTMALAR

AAA	Ailevi Akdeniz ateşi
AA	<i>Amyloid Associated Protein</i>
A β	Amiloid Beta
AL	İmmünglobulin hafif zincir amiloidi
APP	<i>Amyloid Precursor Protein</i>
ASC	<i>Apoptosis associated Speck like protein containing a CARD</i>
ATTR	<i>Amyloid transthyretin</i>
CARD	<i>Caspase recruitment domain</i>
CAPS	<i>Cryopyrin Associated Syndromes</i>
cDNA	<i>Complementary DNA</i>
DAB	Diaminobenzidin
DAPI	Diamidinophenylindole
GAG	Glikozaminoglikan
HIDS	<i>Hyper IgD syndrome</i>
HRP	<i>Horseradish peroxidase</i>
IAPP	<i>Islet Amyloid Polypeptide</i>
Ig	İmmünglobulin
MEFV	<i>MEditerranean FeVer</i>
NF κ B	<i>Nuclear Factor kappa-b</i>
NSAID	<i>Non-steroidal anti-inflammatory drugs</i>
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PSTPIP1	<i>Proline serine threonine phosphatase interacting protein</i>
PyD	<i>Pyrin domain</i>
SAA	Serum Amiloid A
SAP	Serum Amiloid Proteini
TBS	<i>Tris Buffered Saline</i>
TRAPS	<i>Tumour Necrosis Factor Associated Periodic Syndrome</i>
VL	<i>Variable domain</i>

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa
2.1. Amiloid fibrillerinin oluşum mekanizması	4
2.2. Hücre ölümü devam ederken <i>speck</i> in hücre dışına çıkışı ve hücre olmayan alanda bulunan <i>speck</i>	7
2.3. Böbrek biyopsilerinde, AA Tipi Amiloid Fibrilleri ile ASC proteininin birlikteliği	8
2.4. Amiloid Beta fibrillerinin oluşum mekanizması	12
2.5. Senil plak tipleri	14
3.1. İmmünohistokimya metodunun şema ile çizimi	20
4.1. Alzheimer hastası beyin korteksinde ASC proteininin immünohistokimyasal ifadesi	23
4.2. Alzheimer hastası beyin korteksinde ASC proteininin <i>speck</i> şeklinde gösterilmesi	24
4.3. Senil plakta kongo kırmızısı ile polarize mikroskopide yeşil çift kırınım	25
4.4. Alzheimer hastasının beyin korteksinde senil plaklarda ve damar duvarında A β birikiminin immünohistokimyasal olarak gösterilmesi	26
4.5. Alzheimer hastasının beyin korteksinde bir senil plağın korunda ASC proteininin <i>speck</i> şeklinde birikiminin gösterilmesi	26
4.6. ASC-A β immünofloresan eş boyaması ile bir senil plağın amiloid kor kısmında ASC ve A β 'nin birlikte yer aldığı gösterilmesi	27
4.7. Damar duvarında kongo kırmızısı boyaması ile polarize ışık mikroskopide yeşil çift kırınım veren A β fibrilleri	28
4.8. Damar duvarındaki A β birikiminin immünohistokimyasal olarak gösterilmesi	28
4.9. ASC-A β immünofloresan eş boyaması ile bir damar duvarında A β ve ASC'nin birlikte yer aldığı gösterilmesi	29
4.10. Böbrek dokusunda kongo kırmızısı boyaması ile polarize ışık mikroskopide yeşil çift kırınım veren AL tipi amiloid fibrilleri	30
4.11. Konjonktival biyopsi örneğinde kongo kırmızısı boyaması ile polarize	31

ışık mikroskopide yeşil çift kırınım veren AL tipi amiloid fibrilleri	
4.12. Baskın plazma klonlarının immünohistokimyasal olarak belirlenmesi	31
4.13. Böbrek dokusundaki AL tipi amiloid fibrilleri ile ASC'nin aynı bölgelerde yer aldığı immünohistokimyasal olarak gösterilmesi	32
4.14. Konjonktival biyopsi örneğinde AL tipi amiloid nodüllerinde ASC'nin varlığının immünohistokimyasal olarak gösterilmesi.	32

TABLULAR DİZİNİ

	Sayfa
Tablo 2.1. Bazı amiloid tipleri ve öncül proteinleri	10
Tablo 3.1. İmmünohistokimya çalışmalarında kullanılan birincil antikorlar	22

1.GİRİŞ

Proteinlerin yapısında veya işlevinde meydana gelen değişiklikler hastalıkların ortaya çıkmasına neden olmaktadır. Bazı durumlarda, hatalı katlanan proteinler üst üste birikerek çözünmeyen fibril benzeri yapılar oluştururlar (1). Vücudun birçok doku ve organında hücreler arasında depolanan ve çözünmeyen protein birikimleri amiloid olarak adlandırılmaktadır. Katı, dallanma göstermeyen ve belirli bir uzunluğu olmayan fibrillerden oluşan amiloid, proteolitik sindirime dirençli ve kolay çözülemeyen bir yapıdır. Amiloid birikimi olan dokuda, hücreler arası iletişimin bozulmasından dolayı, hücre ölümü artmakta ve sonuçta doku (ya da organ) işlev göremez hale gelmektedir (2,3).

Amiloid proteinleri, depolandıkları doku, organ ve hastalığa göre farklılık göstermektedir. Romatoid artrit ve ailevi Akdeniz ateşi gibi otoinflamatuar hastalıklar, *carpal tunnel* sendromu, korneal distrofiler, tiroid kanserleri ile Alzheimer ve Parkinson hastalığı gibi nörolojik hastalıklar amiloid gelişiminin görüldüğü bazı hastalıklardır (4-7).

Ailevi Akdeniz ateşi (AAA), AA tipi amiloid gelişiminin görüldüğü bir hastalıktır. Otozomal resesif kalıtım gösteren AAA hastalığına, MEFV (*MEditerranean FeVer*) genindeki mutasyonlar sebep olmaktadır. MEFV geni Pyrin isimli, inflamatuvar yolakta görevli bir proteini kodlamaktadır (8). Önceki çalışmalarda, Pyrin ile ilişkisi olduğu bilinen ASC (*Apoptosis associated Speck like protein containing a Caspase recruitment domain*) (9) proteininin, AA tipi amiloid fibrilleri ile birarada bulunduğu gösterilmiştir (10). Bu bulgu, ASC proteininin, amiloid gelişiminde bir rolü olabileceğini işaret etmektedir. Bu nedenle, ASC proteininin yaygın görülen A β veya AL tipi amiloid yapıları ile birlikte bulunup bulunmadığının da araştırılması gerekmektedir.

Tez çalışmasının ilk bölümünde, ASC proteininin A β fibrilleri ile birlikte bulunup bulunmadığı araştırılmıştır. Alzheimer hastalarının beyin otopsi materyallerinden hazırlanan kesitlerden birinde Kongo kırmızısı boyaması ile amiloid fibrilleri görüntüledikten sonra, ardışık kesitlerden birinde A β immünohistokimya boyaması ile amiloid tiplendirmesi yapılırken, bir diğer ardışık kesitte ASC immünohistokimya boyaması yapılmış ve A β birikimlerinde ASC proteininin varlığını araştırılmıştır. Ayrıca, ASC-A β immünofloresan eş-boyaması yapılarak, iki proteinin yerleşimi aynı preparat üzerinde de incelenmiştir.

Tez çalışmasının ikinci bölümünde, ASC proteininin AL tipi amiloid fibrilleri ile birlikteliği araştırılmıştır. AL tipi amiloid gelişimi gösteren hastaların amiloid birikimi olan dokularından hazırlanan kesitlerden birinde Kongo kırmızısı boyaması ile amiloid fibrilleri görüntüledikten sonra, ardışık kesitlerde Ig Kappa ve Ig Lambda immünohistokimya boyamaları ile amiloid tiplendirmesi yapılmıştır. AL tipi amiloid birikimlerinde ASC proteininin varlığını görebilmek için bir diğer ardışık kesitte ASC immünohistokimya boyaması yapılmıştır.

ASC proteininin yaygın görülen amiloid tiplerinde fibrillerle birlikte olup olmadığının araştırılması, amiloid patogenezinin aydınlatılmasına ve yeni tedavi yaklaşımlarının geliştirilmesine katkı sağlayacaktır.

2. GENEL BİLGİLER

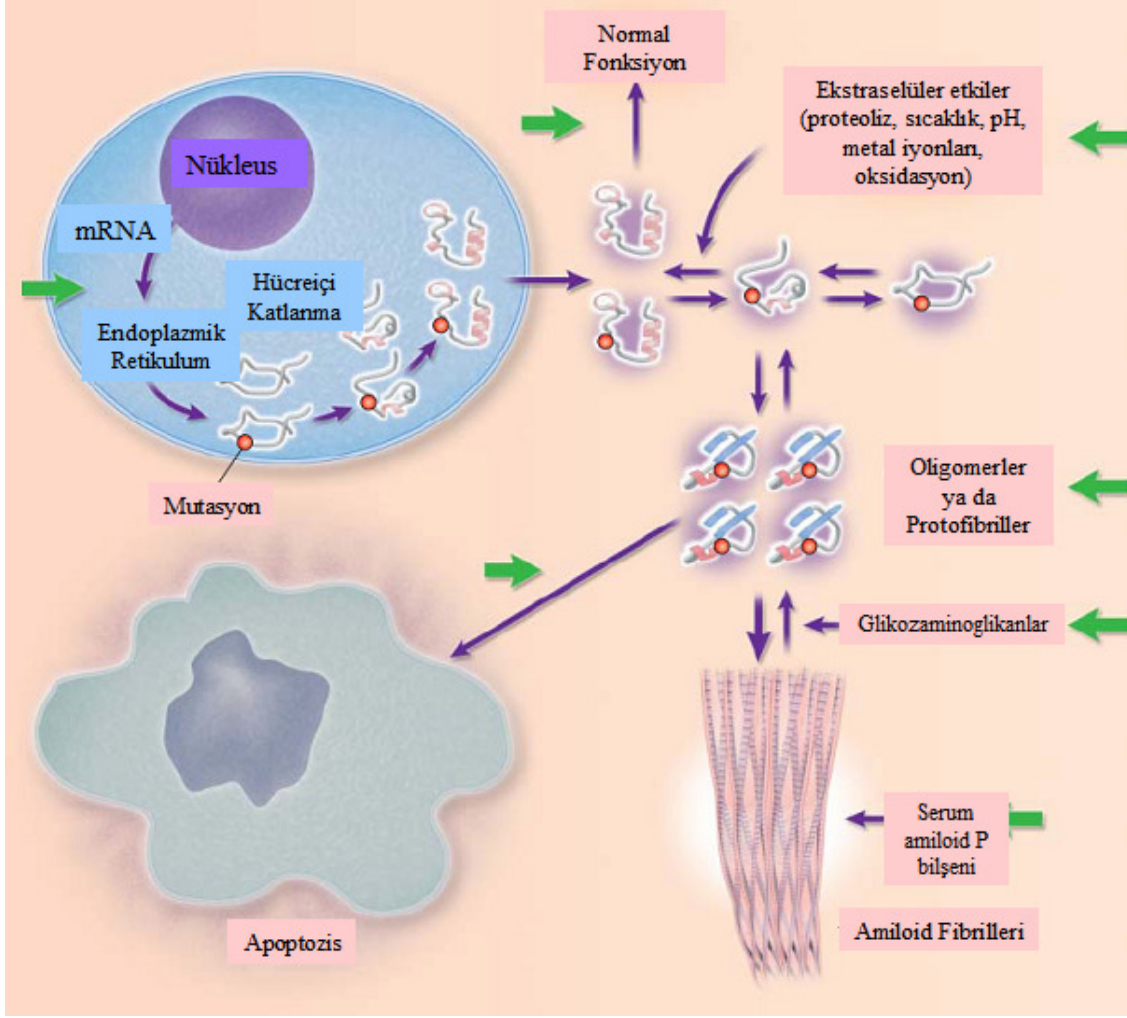
2.1. Amiloid Fibrillerinin Oluşum Mekanizması

Amiloid öncülü proteinler ortak bir yapı ya da amino asit dizisi içermemektedirler. Bu nedenle, amiloid fibrillerinin yapısına katılan proteinler farklılık göstermektedir.. Bugüne kadar 26 farklı proteinin amiloid öncülü olarak farklı amiloid tiplerini oluşturdukları tespit edilmiştir (11).

Amiloid öncülü proteinler, miktarlarının artmasına veya bu proteinleri kodlayan genlerdeki mutasyonlara ya da polimorfizmlere bağlı olarak proteazlar tarafından yıkılamazlar veya farklı enzimler tarafından yıkılarak birikime neden olacak proteinleri oluştururlar (3,11). Bazı öncül proteinler (IAPP ve gelsolin gibi) proteolitik kesime uğramadan amiloid oluşumuna katılmaktadır (12).

Amiloid proteinleri kararsız yapıda olup, çevresel faktörlerin etkisiyle (sıcaklık, pH, metal iyonları, okside edici ajanlar gibi) yapılarında beta tabakası katlanmaları oluşmaya başlamaktadır. (13). Beta tabakası şeklinde katlanan proteinler birbirlerine bağlanarak fibril öncülü birikimleri oluşturmaktadırlar. Bu aşamaya çekirdek fazı da denilmektedir. Amiloid çekirdeği veya protofibril olarak tanımlanan bu yapıların, hücreleri apoptoza yönlendirdiği düşünülmektedir (13).

Bu aşamanın devamında amiloid fibrillerinin uzaması görülmektedir. Bu süreçte amiloid fibrillerinin yapısına, amiloid proteinlerini biraraya getirdikleri düşünülen ve tüm amiloid tiplerinde bulunan glikozaminoglikanlar da katılmaktadır (14). Amiloid proteinleri, fibril öncüllerine katılarak uzama fazını sürdürürken, bu yapıya en son olarak SAP (Serum Amiloid Proteini) katılarak çözünmez yapıdaki amiloid fibrillerini oluşturmaktadır (Şekil 2.1) (13,15).



Şekil 2.1. Amiloid fibrillerinin oluşum mekanizması (13).

2.2. Ailevi Akdeniz Ateşi ve Amiloid İlişkisi

Ailevi Akdeniz ateşi (AAA), ülkemizde yaygın görülen (1:1070) otoinflamatuvar hastalıklardan birisidir (16). AAA hastalığının en ciddi etkisi, klinik tabloya amiloid gelişiminin eklenmesidir (17). AAA hastalarında görülen amiloid, AA tipi amiloid olup, böbrek, gastrointestinal sistem, karaciğer, dalak, kalp ve testis gibi organları tutmaktadır (17).

Böbrekte glomerüllerde ve tübüllerde biriken amiloid, nefrotik sendroma ve kronik organ yetmezliğine sebep olmaktadır. AAA hastalığının tedavisinde kullanılan kolşisin ise sadece tekrarlayan, ağrılı ateş ataklarına karşı etkili olmayıp, aynı zamanda bu hastalarda görülen amiloid gelişimini de % 1'lere kadar indirmektedir (18,19).

AAA hastalığı, MEFV (*MEditerranean FeVer*) (20,21) adı verilen genden kodlanan Pyrin proteinindeki hatalar sonucu ortaya çıkmaktadır. İnflamatuvar yolakta görevli olan Pyrin'in işlevi tam olarak anlaşılammış olmasına rağmen inflamasyonu baskılayıcı bir rol oynadığı düşünülmektedir (8).

Hücre düzeyindeki işlevini açıklayabilmek için, Pyrin'i ifade eden hücrelerde bu proteinin ilişkiye girdiği proteinler saptanmaya çalışılmaktadır. Bu proteinlerin işlevleri üzerindeki etkisi analiz edilerek, Pyrin'in işlevi hakkında bilgi sahibi olunabileceği düşünülmektedir (22). Bu amaçla yapılan maya iki hibrit sistemi çalışmaları sayesinde Pyrin proteini ile ilişkili bir çok protein saptanmıştır. Pyrin ile ilişkili proteinler; ASC (*Apoptosis-associated speck like protein containing a caspase recruitment domain*) (23), PSTPIP1 (*Proline serine threonine phosphatase interacting protein*) (24), ve Siva proteinleridir (25).

ASC proteini apoptotik hücrelerde *speck* şeklinde ifade edilen birikimlerin oluşumuna sebep olan protein olarak tanımlanmaktadır (23). ASC yapısal olarak incelendiğinde, amino ucunda Pyrin bölgesi (PyD) ve karboksi ucunda *Caspase Recruitment* bölgesi (CARD) içeren 195 amino asit uzunluğunda bir proteindir. ASC'nin, PyD bölgesi sayesinde, diğer PyD içeren proteinlerle (örneğin, *Cryopyrin*, PYPAF7, DEFCAP proteinleri gibi) etkileşime girdiği gösterilmiştir (26). ASC'nin işlevinde önemli olan bölgesi CARD bölgesidir (23).

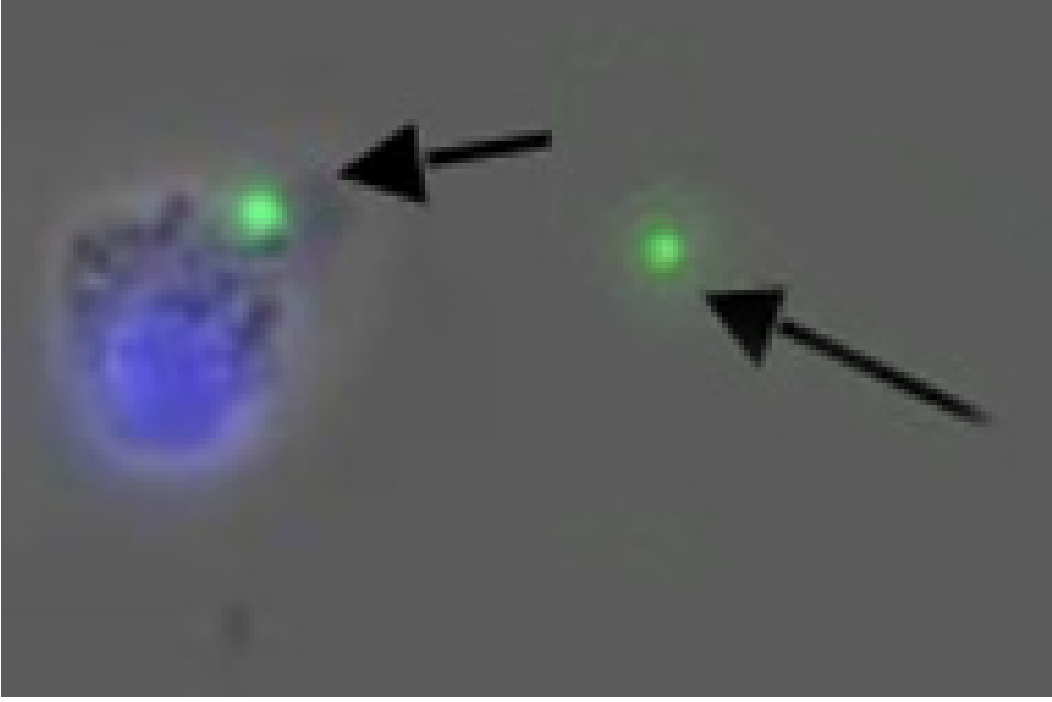
ASC'nin; 1. Apoptozda,
2. IL-1 β 'nin işlenmesi ve salgılanmasında,
3. İnflamatuvar cevabın başlaması ve yayılmasında etkili bir transkripsiyon faktörü olan NF-kB aktivasyonunda rol oynadığı düşünülmektedir (27).

2.3. ASC - AA Tipi Amiloid İlişkisi

Pyrin-ASC ilişkisini araştıran çalışmalarda, Pyrin ve ASC cDNA'larını içeren vektör kasetlerinin birlikte transfekte edildiği hücre kültürlerinde, Pyrin'in ASC *speck*leriyle birlikte bulunduğu gösterilmiştir (9). Mutant Pyrin'in ASC *speck*lerinin sayısını arttırdığı, ayrıca AAA hastalığının tedavisinde kullanılan kolşisin, ASC transfeksiyonu yapılan hücrelerde *speck* oluşumunu azalttığı da gözlenmiştir (10).

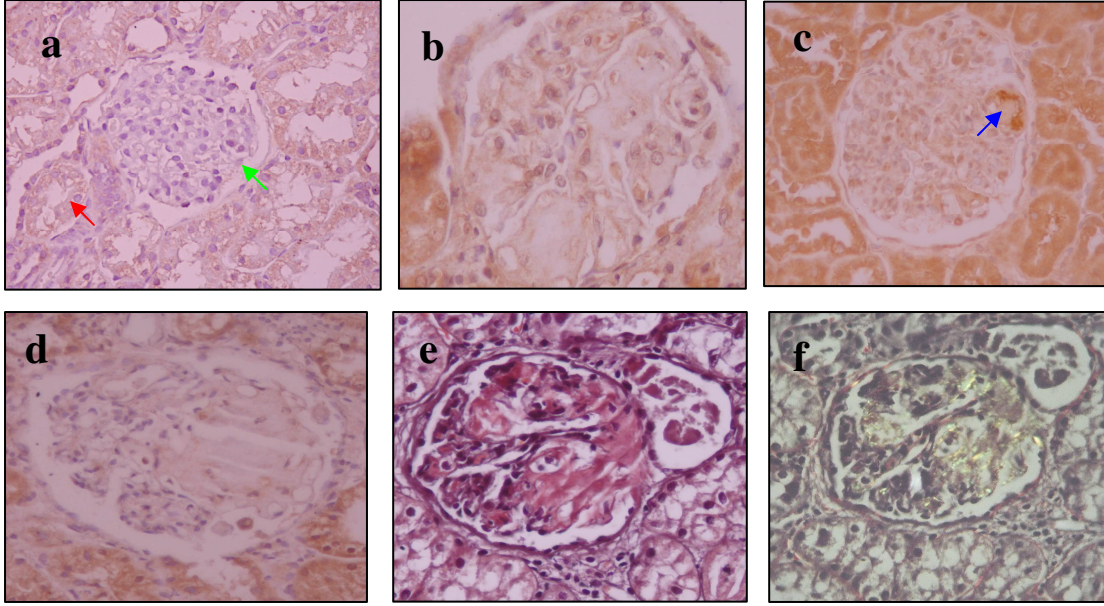
Kolşisin AAA hastalarında amiloid oluşumunu %1'lere kadar düşürmesi ve hücre kültüründe ASC *speck*lerinin sayısının azalmasına neden olması; ASC *speck*lerinin amiloid fibrillerinin biraraya gelmesinde etkili olabileceğini düşündürmektedir.

Buna ek olarak, hücre kültüründe yapılan çalışmalarda, hücre ölümünden sonra ASC *speck*lerinin hücre dışı bölgede bulunabildiğinin gösterilmesi (Şekil 2.2), ASC *speck*lerinin *in vivo*'da hücre dışı bölgede amiloid öncülü proteinlerin biraraya gelmesinde etkili olabileceklerini göstermektedir (10).



Şekil 2.2. Hücre ölümü devam ederken *speck*in hücre dışına çıkışı (solda) ve hücre olmayan alanda bulunan bir *speck* (sağda) (10).

Bu hipotezi test etmek amacı ile, amiloid geliştirmiş AAA hastalarının parafin bloklar içerisinde arşivlenmiş böbrek biyopsi materyallerinden hazırlanan ardışık preparatlarda, immünohistokimya tekniği ile ASC proteini ve Kongo kırmızısı boyaması ile amiloid fibrilleri görüntülenmiştir. Amiloid geliştiren ve geliştirmeyen böbrek dokuları ASC ifadesi açısından karşılaştırıldığında ASC proteini, amiloid geliştirmeyen bireylere ait glomerüllerde ifade edilmezken, AAA hastalarına ait amiloid geliştiren glomerüllerde ifade edildiği ve ASC'nin AA tipi amiloid fibrilleri ile birlikte bulunduğu gösterilmiştir (Şekil 2.3) (10).



Şekil 2.3. a) Kontrol insan böbrek biyopsisinde ASC proteininin, tübülüs epitelinde ifade edildiğinin, glomerülde ifade edilmediğinin immünohistokimyasal olarak gösterilmesi. (ASC, 200X) b-c) Glomerüler amiloid birikimi gösteren böbrek biyopsisinde immünohistokimyasal ASC ifadesi. (ok: speck benzeri birikim) (ASC, 400X) d-f) Amiloid birikimi gösteren bir glomerülden hazırlanan seri kesitlerde; immünohistokimyasal ASC ifadesi (d), kongo kırmızısı ile ışık mikroskopik görünüm (e), kongo kırmızısı ile polarize ışık altında çift kırınım saptanması (f) (400X).

Bu veriler, ASC proteininin, amiloid gelişiminde bir tetikleyici olarak rol oynayabileceğini düşündürmektedir. Ayrıca, ASC'nin diğer amiloid tiplerinde de, fibrillerle birlikte bulunup bulunmadığının araştırılması gerekmektedir.

2.4. Amiloid Tiplerinin Sınıflandırılması

Amiloid tipleri yapı itibariyle birbirine benzese de öncül proteinleri birbirinden farklıdır. Öncül proteinin birikimi amiloid oluşumunu başlatan ilk basamaktır. Aynı amiloid öncül proteinleri biraraya gelerek amiloid fibrillerini oluşturmaktadır (Tablo 2.1). Fibrillerin kütlece büyük kısmını amiloid öncülü proteinler oluşturur (13). Farklı amiloid tiplerinin içerdiği proteinler birbirinden farklıdır. Örneğin ATTR tipi amiloid transtiretin monomerlerinin birikmesiyle oluşurken, AL tipi amiloid immünglobulin hafif zincirlerinin birikmesiyle oluşmaktadır (12).

Amiloid birikimi, sistemik veya lokalize olarak iki gruba ayrılmaktadır (28). Sistemik amiloidler ile lokalize amiloidler arasındaki temel farklılık, öncül proteinin ifade edildiği dokudan kaynaklanmaktadır. Lokalize amiloidlerin öncül proteinleri, amiloidin geliştiği dokudan sentezlenirken, sistemik amiloidlerde öncül protein farklı bir dokudan sentezlenir. Öncül protein plazma aracılığıyla taşındığından sistemik amiloidler vücudun herhangi bir dokusunda (beyin hariç) görülebilmektedir (29).

Sistemik amiloidlere verilebilecek en iyi örnek AA tipi amiloiddir. Karaciğerde sentezlenen Serum Amiloid A (SAA) plazma aracılığıyla bütün vücudu dolaşır. Çeşitli dokularda (böbrek, gastrointestinal sistem, tiroid, testis, kalp gibi), dokunun içinde bulunduğu çevre şartları sebebiyle yeterince yıkılamadığında, AA proteini (*Amyloid Associated Protein*) şeklinde birikir. AA proteinleri de beta tabakası yapısı kazanıp biraraya gelerek amiloid fibrillerinin oluşumuna sebep olur (30).

Lokalize amiloidlere verilebilecek en iyi örnek ise, Alzheimer Hastalığı'nda görülen Amiloid Beta ($A\beta$)'dir (7). Beyin hücrelerinde ifade edilen bir zar proteini olan APP (*Amyloid Precursor Protein*)'nin yıkım ürünü olan 40-42 amino asitlik $A\beta$ peptidi, beyin dokusunda hücre dışı bölgede birikerek amiloid oluşumuna sebep olmaktadır (7).

Tablo 2.1. Bazı amiloid tipleri ve öncül proteinleri (2).

Amiloid Tipi	Öncül protein	Yayılm	Kalıtım	Hastalık veya Görüldüğü Doku
A β	APP (A β Protein Öncüsü)	Lokalize	Kazanılmış, Kalıtsal	Alzheimer Hastalığı
AprP	Prion Proteini	Lokalize	Kazanılmış, Kalıtsal	Creutzfeldt-Jakob Hastalığı
ABri	ABri Protein Öncüsü	Lokalize	Kalıtsal	İngiliz Ailesel Demansı
Acys	Sistatin C	Lokalize	Kalıtsal	Kalıtsal Serebral Amiloid
A β 2M	Beta2-mikroglobulin	Lokalize, Sistemik	Kazanılmış	Kronik Hemodiyaliz
AL	İmmünglobulin Hafif Zincirleri	Lokalize, Sistemik	Kazanılmış	Miyelom ilişkili
AA	Serum Amiloid A	Sistemik	Kazanılmış	İnflamasyon ilişkili
ATTR	Transtiretin	Sistemik	Kazanılmış, Kalıtsal	Ailesel Amiloid Polinöropati
AapoAI	Apolipoprotein A-I	Sistemik	Kalıtsal	Karaciğer, Böbrek, Kalp
AApoAII	Apolipoprotein A-II	Sistemik	Kalıtsal	Böbrek, Kalp
Agel	Gelsolin	Sistemik	Kalıtsal	Fin Kalıtsal Amiloid
Alys	Lizozim	Sistemik	Kalıtsal	Böbrek, Karaciğer, Dalak
Afib	Fibrinojen A α chain	Sistemik	Kalıtsal	Böbrek

2.5. AA Tipi Amiloid

AA tipi amiloid, sistemik amiloidlerin en yaygınıdır. Tüm sistemik amiloid vakalarının %45'ini oluşturmaktadır (30). Serum Amiloid A (SAA) proteininin proteolizi sonucu meydana gelen AA proteininin birikimiyle oluşmaktadır (31). Bir akut faz bileşeni olan SAA'nın normal durumda plazmadaki miktarı 10µg/ml'den az iken, akut inflamasyon sırasında 1000 kat artmaktadır (31). Bu miktar artışı, SAA'nın tam olarak katabolize edilmesini engellemektedir. Proteoliz sonucu meydana gelen SAA'nın amino uç parçaları (AA proteinleri), amiloid fibrillerinin yapıtaşını oluşturmaktadır (30).

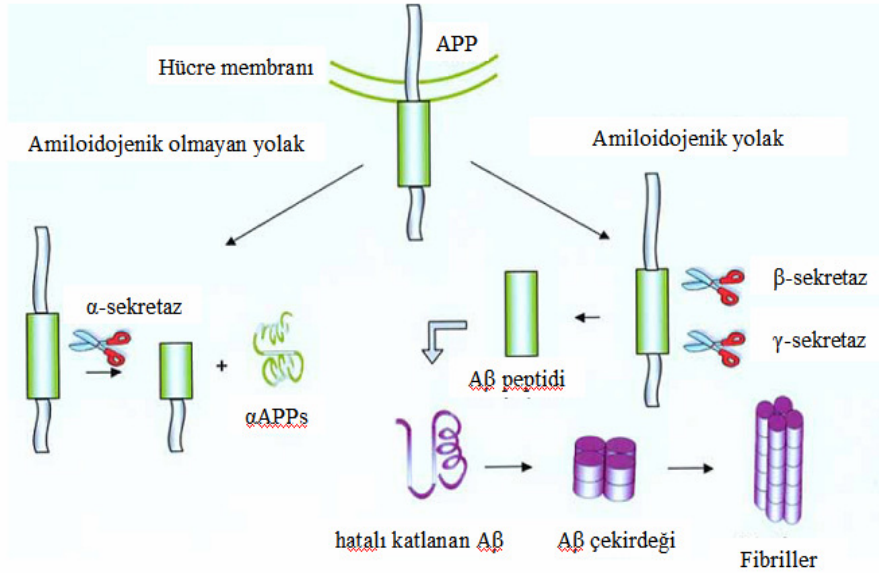
Ailevi Akdeniz ateşi (AAA) (32), *Cryopyrin Associated Syndromes* (CAPS), *Tumour Necrosis Factor Associated Periodic Syndrome* (TRAPS) (33), *Hyper IgD syndrome* (HIDS) (34) gibi kalıtsal otoinflamatuvar hastalıklarda amiloid patogenezi en ciddi bulgu olarak ortaya çıkmaktadır. AA tipi amiloid, otoinflamatuvar hastalıkların yanısıra kronik enfeksiyonlarda da (HIV enfeksiyonu, kronik kutanöz ülserler gibi) görülebilmektedir (35).

2.6. Amiloid Beta

Amiloid Beta'nın (A β) öncülü olan APP (*Amyloid Precursor Protein*) tüm beyin dokusunda ifade olan bir transmembran proteindir ve hücrede iki farklı şekilde yıkılmaktadır. APP, γ -sekretaz ve α -sekretaz enzimleriyle kesildiğinde oluşan peptid amiloid fibrilleri oluşturabilecek karakterde değildir ve yıkılabilmektedir. Ancak APP'nin γ -sekretaz ve β -sekretaz enzimleriyle kesilmesi durumunda oluşan 40-42 amino asitlik peptid (A β) amiloid oluşturabilme özelliğindedir (Şekil 2.4). Amiloidin oluşması için 40-42 amino asitlik peptidin fazla miktarda oluşması ve yeterince yıkılamaması gerekmektedir (7).

Amiloid Beta birikimi, beyinde gri maddede görülmektedir ve senil plak olarak adlandırılmaktadır. Alzheimer hastalığının patogenezinde önemli rol oynayan senil plakların, demans durumunda olmayan erişkin bireylerin beyin dokularında da yaşlanmaya bağlı olarak ortaya çıktığı bilinmektedir. Patolojik olarak bir bireyin Alzheimer tanısı alması için beyin korteksinin 1 mm³'ünde 200'den fazla senil plağın bulunması gerekmektedir (36).

Amiloid Beta, senil plakların yanı sıra beyin damarları çevresinde de birikebilmektedir. Bu patolojiye kongofilik anjiyopati veya serebrovasküler amiloid denilmektedir (36,37). Alzheimer hastalarının beyin dokusunda görülen serebrovasküler amiloid, yaşlanmaya ve bazı fizyolojik koşullara bağlı olarak, demans durumu dışında da ortaya çıkabilmektedir. Bu nedenle, Alzheimer hastalığının patolojik tanısında serebrovasküler amiloid bir ayırıcı tanı olarak değerlendirilmemektedir.

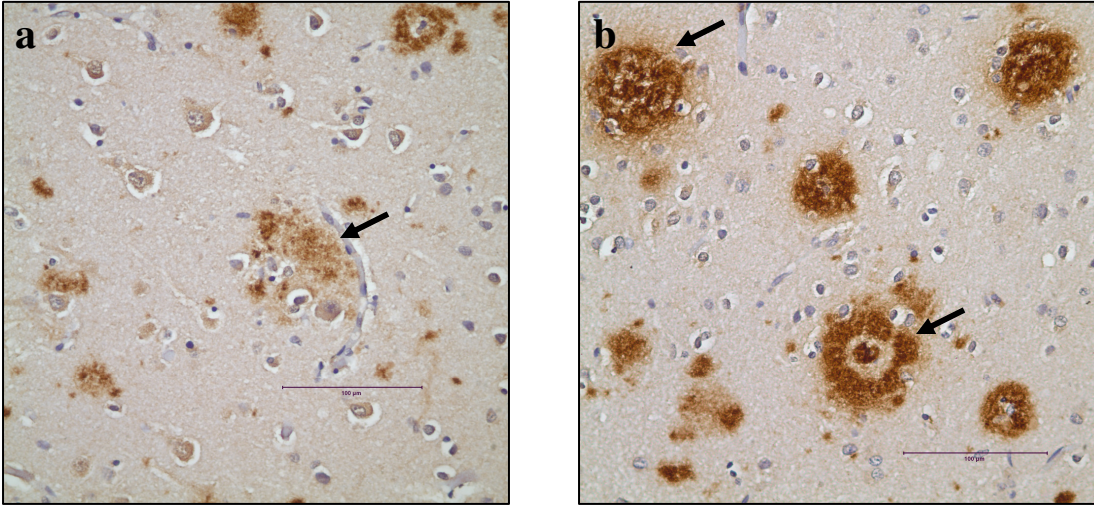


Şekil 2.4. Amiloid Beta fibrillerinin oluşum mekanizması (38).

Senil plaklar, genellikle amiloid kor içermeyen ‘difüze’ plak ve amiloid kor içeren ‘klasik’ plak olarak 2 grupta sınıflandırılmaktadır (Şekil 2.5) (36).

Difüze plak, senil plağın erken dönemdeki formudur. Çözünebilir olan α -helix yapısındaki A β peptidleri, difüze plağın oluşumunun devamında beta tabakası yapısı kazanarak çözünmez hale gelir ve amiloid koru oluşturur. Bu aşamada senil plak, amiloid kor içeren klasik plak yapısını kazanır.

Plak oluşumundaki bu dinamik süreç sebebiyle, Alzheimer hastalarından alınan beyin dokularında yapılan histolojik incelemelerde, aynı kesitte farklı tipte plaklar görülebilmektedir. Alzheimer hastalığının erken dönemlerinde olan hastalarda difüze plaklar sayıca fazla iken, hastalığın geç dönemlerinde amiloid korlu klasik plakların sayısının arttığı gösterilmiştir (37).



Şekil 2.5. Alzheimer hastasına ait beyin korteksinde a) difüze plak b) klasik plak'ın immünohistokimyasal olarak A β proteini ile gösterilmesi. (ölçek :100 μ m)

2.7. AL Tipi Amiloid

B hücre proliferasyon hastalıklarında, artan immünglobülin sentezi sonucunda yeterince yıkılamayan immünglobulin hafif zincirleri amiloid oluşumuna sebep olmaktadır. Biriken amiloid öncülü protein, immünglobülin hafif zinciri değişken bölgesinin amino uç kısmından oluşmaktadır. Beyin hariç vücudun her yerinde (özellikle kalp, böbrek, akciğer, karaciğer, dalak, gastrointestinal sistem, deri, eklemler, lenf nodları ve periferik sinir sistem) depolanabilmektedir (39). AL tipi amiloid, Avrupa ve A.B.D.'de en sık görülen amiloid tipidir. İngiliz toplumunda her 1500 kişiden 1'inin AL tipi amiloid sebebiyle hayatını kaybettiği rapor edilmiştir (40).

AL tipi amiloid, hem lokalize hem de sistemik olarak görülebilmektedir. Genç yaşta bireylerde genellikle lokalize AL tipi amiloid görülmektedir. Sistemik AL tipi amiloid ise, genellikle yaşlı erkek popülasyonunda görülmekte, organ yetmezliğine ve ölüme neden olmaktadır. Organ tutulumunda böbrek %50 ile ilk sırada bulunmasına rağmen hastaların birçoğunda kalp tutulumu da görülmekte olup, kardiyak semptomlar en önemli bulguları oluşturmaktadır (40).

AL tipi amiloid görülen olguların bir kısmını miyelom hastaları oluşturmaktadır. Miyelom olmayan hasta gruplarında, B hücreli lenfoproliferatif neoplastik süreç görülmeyebilir. Bu grup hastalarda B hücre klonları hücreli proliferasyon yerine, aşırı immünglobulin sentezi yaparlar. Bu nedenle, bu olguların serumlarında ya da idrarlarında anormal monoklonal hafif zincirleri görülmektedir. (39, 41).

AL tipi amiloid fibrilleri monoklonal immünglobulin hafif zincirlerinin, özellikle VL (*variable domain*) kısımlarının birikimiyle oluşmaktadır. Bu protein dizileri, gen içindeki yeniden düzenlenmeler ile meydana gelen değişken ve kişiye özel dizilerdir (40).

Bu değişkenlikten ötürü, *kappa* ve *lambda* hafif zincirlerinin antikoru ile yapılan immünboya yoluyla AL tipi amiloid fibrilleri görüntülenememektedir (41). Ancak bu antikolar ile plazma hücre popülasyonundaki baskın klonun *kappa* veya

lambda izotipinde olduğu belirlenmektedir. AL tipi amiloid vakalarında *lambda* hafif zincirlerinin birikimi *kappa* hafif zincirlerine oranla (4:1) daha sık gör÷lmektedir (39, 40).

3. BİREYLER VE YÖNTEMLER

3.1 Bireyler

Bu tez çalışmasına Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı'nda AL tipi amiloid tanısı konulmuş 5 bireyin biyopsi materyali, Alzheimer hastalığı tanısı konulmuş 3 bireyin otopsi materyali ve Abcam Firmasından (Cambridge, İngiltere) satın almak suretiyle temin edilen 9 adet Alzheimer hastalığı tanısı almış bireyin otopsi materyali dahil edilmiştir.

Tüm çalışmalar Hacettepe Üniversitesi Tıbbi, Cerrahi ve İlaç Araştırma Etik Kurulu'nun onayı alınarak (Karar No: LUT 07/11-13) gerçekleştirilmiştir (EK).

3.2 Çalışmada Kullanılan Kimyasal Malzemeler ve Çözeltiler

3.2.A Kongo Kırmızısı Boyaması

Ksilol (Merck)

Etanol (%98'lik) (Riedel-de Haen)

Hematoksilen (Santa Cruz)

Alkalin Sodyum Klorür Çözeltisi (Sigma)

Kongo Kırmızısı Çözeltisi (Sigma)

3.2.B İmmünohistokimya Boyaması

Ksilol (Merck)

Etanol (%98'lik) (Riedel-de Haen)

Formik Asit (%95) (Merck)

% 10 Hidrojen Peroksit Çözeltisi : 0.1 ml/ml (v/v)

1X TBS (pH 7.4) : *Tris Buffered Saline*

Tris baz (Sigma) 20 mM
NaCl (Carlo Erba) 137 mM

% 1 Bloklama Tamponu : Sığır serum albumini 0.1 g (Sigma)
1X TBS 10 ml

Birincil Antikorlar : anti-ASC fare antikoru (J.Masumoto tarafından
hediye edildi)
fare anti-A β antikoru (Sigma)
fare anti-Ig Kappa (Sigma)
fare anti-Ig Lambda (Sigma)

İkincil Antikorlar (Dako) : Biyotin bağı anti-fare
Biyotin bağı anti-keçi
Biyotin bağı anti-tavşan

Streptavidin bağı yabanturbu peroksidaz enzimi (Dako)
Kromojen Kiti (Zymogen) : DAB (3,3 Diaminobenzidin)
Hidrojen Peroksit
Peroksidaz Enzim Tamponu

Hematoksilen (Santa Cruz)
%1'lik Amonyak Çözeltisi : 0.1 ml/ml (v/v)

3.2.C İmmünfloresan Boyama

1X PBS (pH 7.4)	: <i>Phosphate buffered saline</i>
	NaCl (Carlo Erba) 14 mM
	KCL (Carlo Erba) 3 mM
	KH ₂ PO ₄ (Carlo Erba) 0.9 mM
	NaHPO ₄ (Merck) 6.4 mM
Triton X-100 (Sigma)	: 0.2% / PBS(v/v)
Keçi Serumu (Sigma)	: 10% / PBS (v/v)
Sığır serum albumini (Sigma)	: 10% / PBS (w/v)
<i>Tween 20</i>	: 0.1% / PBS (v/v)
Birincil Antikorlar	:keçi anti-ASC poliklonal antikor (Santa Cruz) fare anti-A β monoklonal antikor (Sigma)
Floresan İşaretli İkincil Antikorlar	: anti-fare AF488 (Molecular Probes) anti-keçi AF568 (Molecular Probes)
DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) (Sigma)	
<i>ProLong Antifade Kit</i> (Molecular Probes)	

3.3 Yöntemler

Bu tez çalışmasında ASC ve amiloid fibrilleriyle birarada olup olmadıklarının gösterilmesi için, Alzheimer ve AL tipi amiloid geliştiren hastalara ait dokulardan ardışık kesitler (her örnek için ortalama 5 kesit) hazırlandı. Bu ardışık kesitlerde; amiloid fibrillerinin görüntülenmesi için Kongo Kırmızısı boyaması, ASC proteininin yerleşimini göstermek için *anti-ASC* antikoruna ile ASC immünohistokimya boyaması ve amiloid tiplendirmesi için de anti-A β , anti-Ig Kappa, anti-Ig Lambda antikorları ile immünohistokimya boyamaları yapıldı. Ayrıca ASC-A β yerleşimini aynı preparat üzerinde incelemek için Alzheimer hastalarının kesitlerinde, ASC-A β immünofloresan eş boyaması yapıldı.

3.3.A Kongo Kırmızısı Boyaması

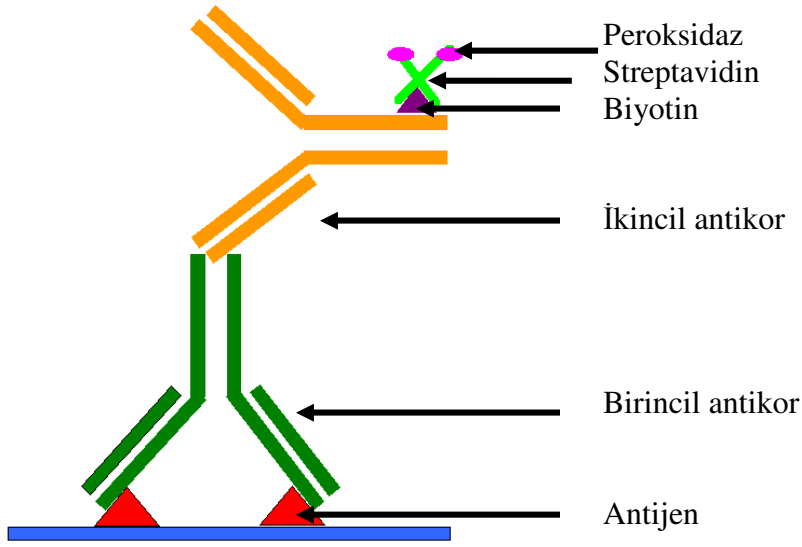
Kongo kırmızısı boyaması, dokularda biriken amiloid fibrillerinin polarize ışık altında çift kırınım vererek elma yeşili renginde görülmesini sağlayan bir histokimya tekniğidir.

Tez çalışmasında, parafin bloklara gömülmüş dokulardan 5 mikron kalınlığında alınan doku kesitleri, dokuların daha iyi tutunduğu lizin kaplı lamlara alındı. Bu preparatlar sırasıyla 25 dakika ksilolde ve 15 dakika etanolde (%98'lik) inkübe edilerek doku etrafındaki parafin uzaklaştırıldı. Parafinden temizlenen doku örnekleri 3 dakika distile suda bekletilerek hidrate edildi. Preparatlar 3 dakika hematoksilen içerisinde inkübe edilerek hücre çekirdekleri boyandı. Preparatlardaki fazla hematoksilen boyasının uzaklaştırılması için çeşme suyu ile yıkama yapıldı. Preparatlar alkalik sodyum klorür çözeltisinde 20 dakika bekletildikten sonra Kongo kırmızısı çözeltisi içerisinde alınıp 20 dakika inkübe edildi. Son aşamada kesitler %98'lik etanol ve ksilolden geçirdikten sonra *mounting medium* damlatılıp lamelle kapatıldı. Hazırlanan preparatlar ışık mikroskopunda polarize ışık altında değerlendirildi.

3.3.B İmmünohistokimya Boyaması

İmmünohistokimya boyaması, dokulardaki proteinlerin yerleşimini görüntülemekte kullanılan, antijen-antikor bağlanmasına dayalı bir *in situ* tekniktir.

Tez çalışmasında kullanılan immünohistokimya metodu, lokalizasyonu araştırılan proteini tanımaya özgül birincil antikor, bu antikora bağlanmaya eğilimli biotine bağlı ikincil antikor, streptavidine bağlı peroksidaz enzimi ve kromojen kullanılarak yapılır. Birincil antikor ile ikincil antikorun bağlanmasının ardından, ikincil antikora bağlı biyotin, peroksidaz enzimine bağlı streptavidine bağlanır. Bu seri bağlanmalar sonucu, araştırılan proteinin bulunduğu yere bir peroksidaz enzimi bağlanmış olur. Bu aşamada, preparatlara hidrojen peroksit, hidrojen peroksidaz enzim tamponu ve kromojen (indikatör) uygulanır ve mikroskop altında proteinin bulunduğu bölgelerde, indikatörün yükseltgenmesine bağlı olarak kahverengi renk görülür (Şekil 3.1).



Şekil 3.1. İmmünohistokimya metodunun şema ile çizimi.

Tez çalışmasında, parafin bloklara gömülmüş amiloid gelişimi olan dokulardan 5 mikron kalınlığında alınan doku kesitleri, lizin kaplı lamlara alındı. Bu örnekler sırasıyla 25 dakika ksilolde ve 15 dakika etanolde (%98'lik) bekletilerek doku etrafındaki parafin uzaklaştırıldı. Beyin dokusu diğer dokulara göre daha zor sabitlenmektedir. Bu nedenle, sabitleme işlemi sırasında normal bir doku 3 saat formaldehitte inkübe edilirken, beyin dokuları daha uzun süre inkübe edilir. Bu işlem sırasında antijen epitopları kapanabileceğinden, beyin dokularında yapılan boyamalarda, antijen epitoplarının açığa çıkartılması için örnekler 2 dakika boyunca formik asit içerisinde bekletildi. Bu işlemin devamında endojen peroksidaz aktivitesini yok etmek için dokular 30 dakika süreyle %10'luk hidrojen peroksit çözeltisinde bekletildi. TBS ile yapılan 15 dakikalık yıkamanın ardından serum bloklama aşaması için TBS içinde hazırlanan %1'lik BSA çözeltisi kullanıldı ve 60 dakika oda ısısında (22-25°C) bekletildi. Bu aşamadan sonra örnekler birincil antikor (birincil antikorların seyreltmeleri tablo 3.1'de verilmiştir) ile 16-18 saat +4°C'de inkübe edildi. İnkübasyondan sonra TBS ile 15 dakika yıkama yapıldı. Örnekler, ikincil antikor ile 60 dakika oda ısısında inkübe edildi. TBS ile yapılan 15 dakikalık yıkamanın ardından örnekler Streptavidin-HRP ile 30 dakika oda ısısında inkübe edildi. Örnekler TBS ile 15 dakika yıkandıktan sonra DAB (diaminobenzidin) çözeltisi ile 3 dakika oda ısısında inkübe edildi. TBS ile 5 dakika yıkama yapıldı ve çekirdek boyaması için preparatlara 30 saniye hematoksilen boyası uygulandı. Çeşme suyu ile yapılan yıkamanın ardından sırasıyla hacimce %1'lik amonyaklı su, çeşme suyu ve % 98'lik etanolden geçirilen örnekler, kurutulup ksilolden geçirildi. Lamaların üzerine *mounting medium* damlatıldı ve lamel ile kapatıldı. Hazırlanan preparatlar ışık mikroskopunda değerlendirildi.

Tablo 3.1. İmmünohistokimya çalışmalarında kullanılan birincil antikorlar.

Birincil Antikor	Antikor Tipi	Üretici	Seyreltme Oranı
fare anti-ASC	Monoklonal	Junya Masumoto ¹	Süpernatant ²
fare anti-A β	Monoklonal	Sigma	1:1000
fare anti-Ig Kappa	Monoklonal	Sigma	1:100
fare anti-Ig Lambda	Monoklonal	Sigma	1:50

3.3.C İmmünofloresan Boyama

Floresan boyama, doku ve hücrelerdeki moleküllerin florokrom olarak adlandırılan renk veren kimyasal maddelerle işaretlenmeleri ile görünür hale getirilmesi tekniğidir.

Parafinden uzaklaştırılan dokular 2 dakika süreyle %95'lik formik asit içerisinde inkübe edildi (beyin dokusu kesitleri) ve antijen epitoplalarının açığa çıkması sağlandı. Sonraki aşamada dokular, %10 keçi serumu, %10 sığır serum albumin ve %0.1 Tween 20 / PBS solüsyonu ile bloke edildi. Birincil antikorlar, ASC için 1:150, A β için 1:1000 seyreltim ile kullanıldı ve 16-18 saat süreyle +4°C'de inkübasyon yapıldı. İkincil antikor olarak anti-keçi AF568 1:1000 ve anti-fare AF488 1:1000 seyreltme oranı ile kullanıldı. Birincil ve ikincil antikor bağlanması sonrası hücre çekirdekleri için DAPI boyaması yapıldı. Lamaların üzerine *mounting medium* damlatıldı ve lamel ile kapatıldı.

¹ Japon araştırmacı J. Masumoto'nun (Shinshu Üniversitesi) tarafından üretilip hediye edilen antikor.

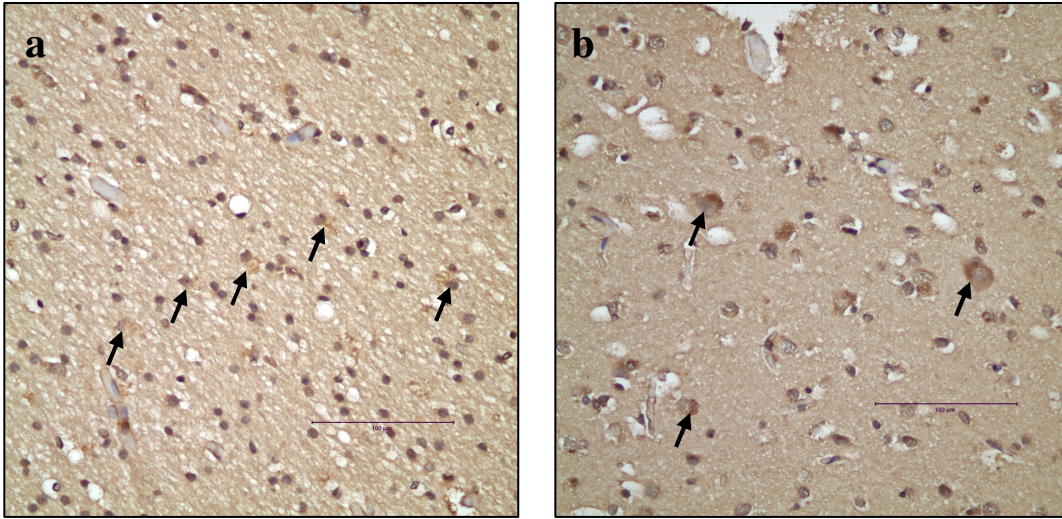
² Hibridoma teknolojisi ile elde edilen saflaştırılmamış antikor süpernatantı.

4. BULGULAR

4.1 ASC Proteininin A β ile Yerleşimi

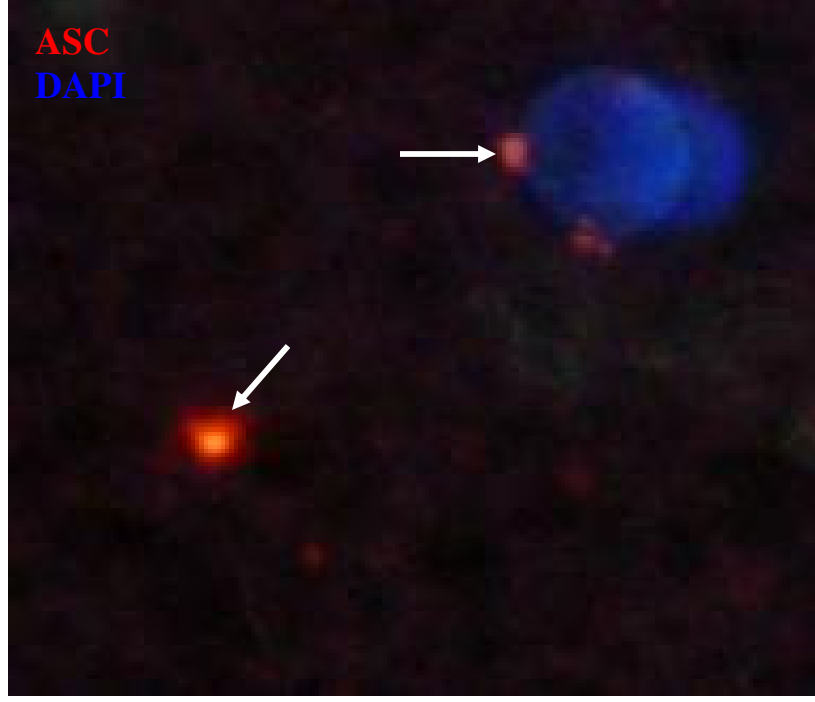
4.1.A. ASC Proteininin Alzheimer Beyin Dokusundaki İfadesi

ASC proteininin beyin dokusunda gliyal hücrelerle ifade olduğu, nöronlarda ASC ifadesinin olmadığı bilinmektedir (42,43). Tez çalışmamızda, Alzheimer hastalarına ait beyin dokularında yapılan immünohistokimya çalışmaları sonucunda, ASC'nin gliyal hücrelerin yanısıra bazı nöronlarda da ifade edildiği gözlemlendi (Şekil 4.1).



Şekil 4.1. Alzheimer hastası beyin korteksinde, ASC protein ifadesinin immünohistokimyasal olarak gösterilmesi. (a) gliyal hücreler (b) nöronlar (ölçek: 100 µm)

İmmünohistokimya ve immünofloresan boyamaları sonucunda, gliyal hücrelerde ve nöronlarda ASC *speck*lerine benzer sitoplazmik ASC birikimleri gözlemlendi (Şekil 4.2). Beyin dokusunda hücre olmayan bölgelerde de *speck* benzeri yapıların bulunduğu gözlemlendi (Şekil 4.2).

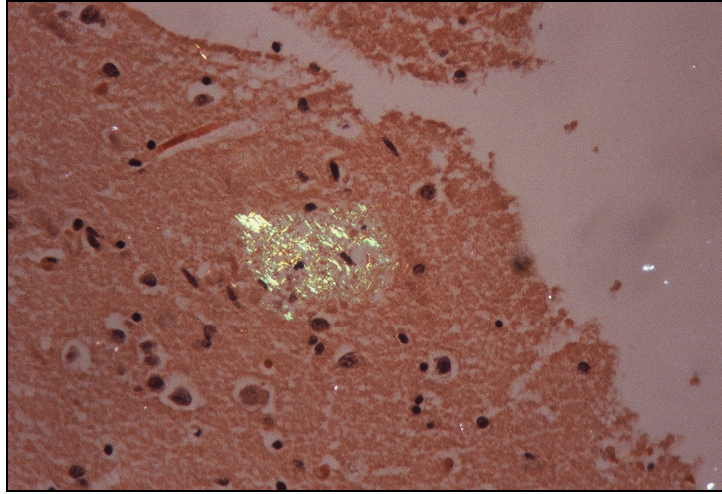


Şekil 4.2. Alzheimer hastası beyin korteksinde ASC proteininin immünofloresan boyama ile hücre çekirdeğinin kenarında (sağda) ve hücreler arası mesafede (solda) *speck* şeklinde gösterilmesi.

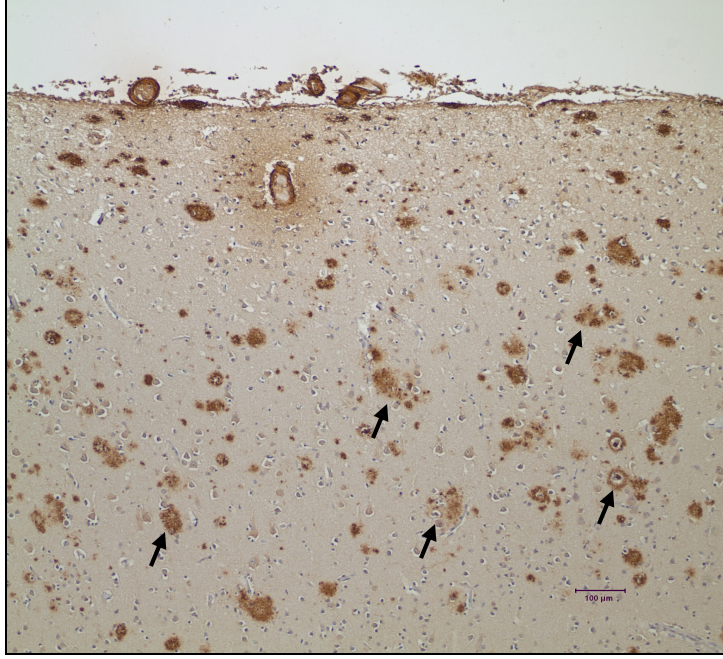
4.1.B. Senil Plakta A β - ASC Birliktekiği

Alzheimer hastalarına ait beyin dokularından hazırlanan kesitlerde kongo kırmızısı boyaması (Şekil 4.3) yapılarak amiloid birikimleri görüntülendi. Bu örneklerin ardışık kesitlerinde immünohistokimya boyaması yapılarak bu amiloid birikimlerinin A β birikimleri olduğu gösterildi (Şekil 4.4). Diğer ardışık kesitte immünohistokimya boyaması ile senil plakların merkezinde *speck* benzeri ASC birikimlerinin bulunduğu gösterildi (Şekil 4.5).

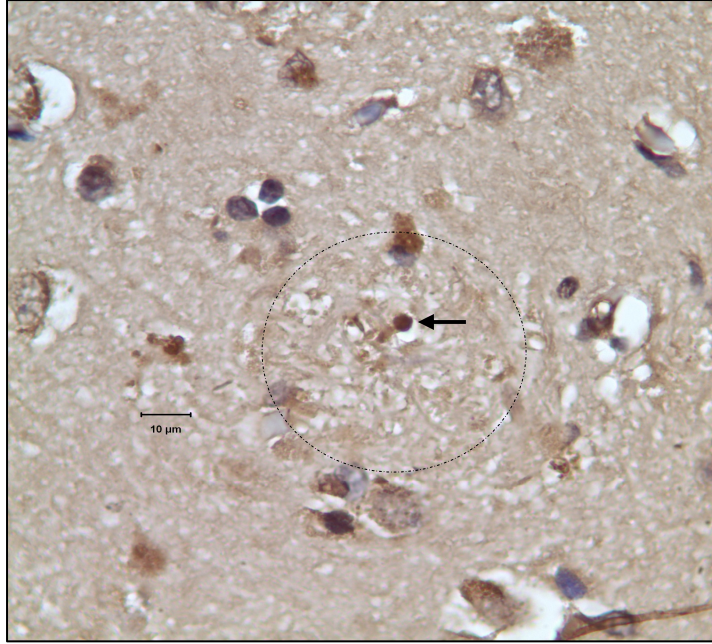
Bu birlikteliği doğrulamak için yapılan ASC-A β immünofloresan eş boyaması yapıldı. Senil plakların merkezindeki amiloid kor kısımlarında ASC bulunduğu aynı preparat üzerinde gösterildi. (Şekil 4.6).



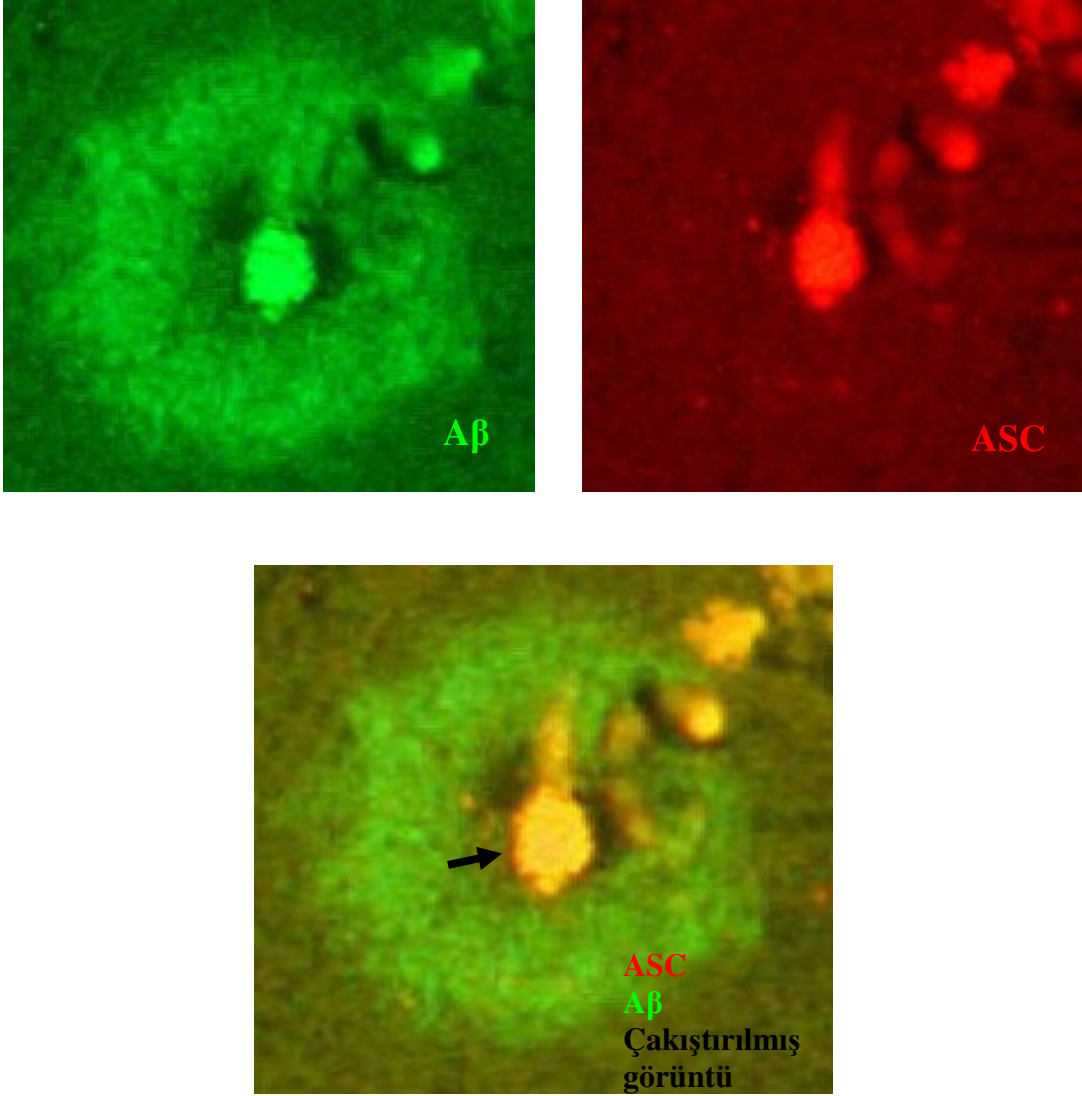
Şekil 4.3. Alzheimer hastasının beyin korteksindeki bir senil plakta amiloid korunda, kongo kırmızısı ile polarize mikroskobide yeşil çift kırınım (200X).



Şekil 4.4. Alzheimer hastasının beyin korteksinde senil plaklarda ve damar duvarında A β birikiminin immünohistokimyasal olarak gösterilmesi. (ölçek :100 μ m)



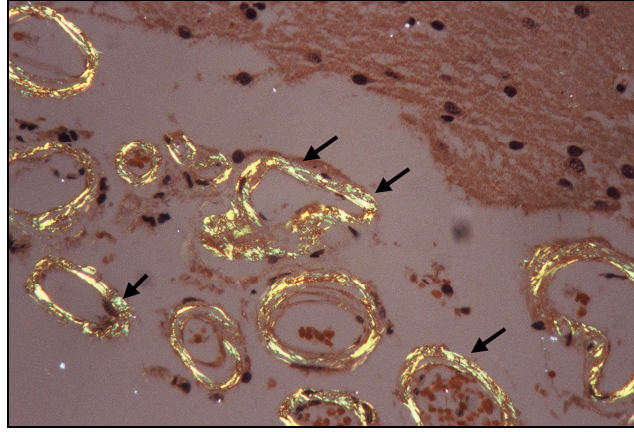
Şekil 4.5. Alzheimer hastasının beyin korteksinde bir senil plağın korunda ASC proteininin *speck* şeklinde birikiminin immünohistokimyasal olarak gösterilmesi. (ölçek:10 μ m)



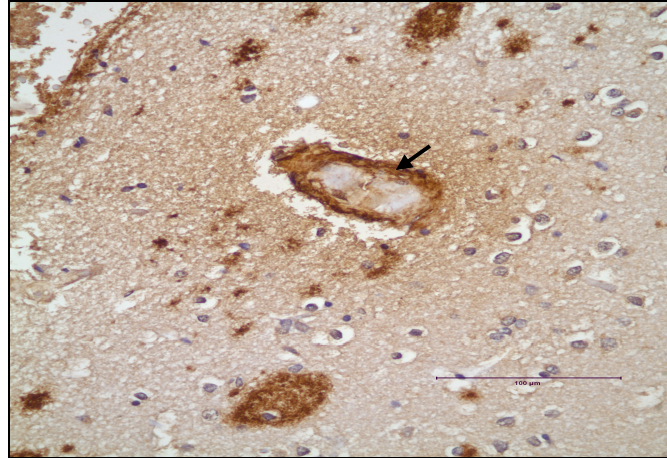
Şekil 4.6. ASC-A β immünfloresan eş boyaması ile bir senil plağın amiloid kor kısmında ASC ve A β 'nın birlikte yer aldığı gösterilmesi.

4.1.C. Kongofilik Anjiyopati'de A β - ASC Birliktekiği

Alzheimer hastalarına ait beyin dokusu kesitlerinde damar çevresinde de A β fibrilleri birikerek kongofilik anjiyopati patolojisi (serebrovasküler amiloid) oluşturmaktadır. Şekil 4.7'de Kongo Kırmızısı boyaması ile bir kongofilik anjiyopati görüntülenmiştir. Şekil 4.8'de damar çevresindeki bu amiloid birikimlerinin A β birikimi olduğu immünohistokimya boyaması ile gösterilmiştir.

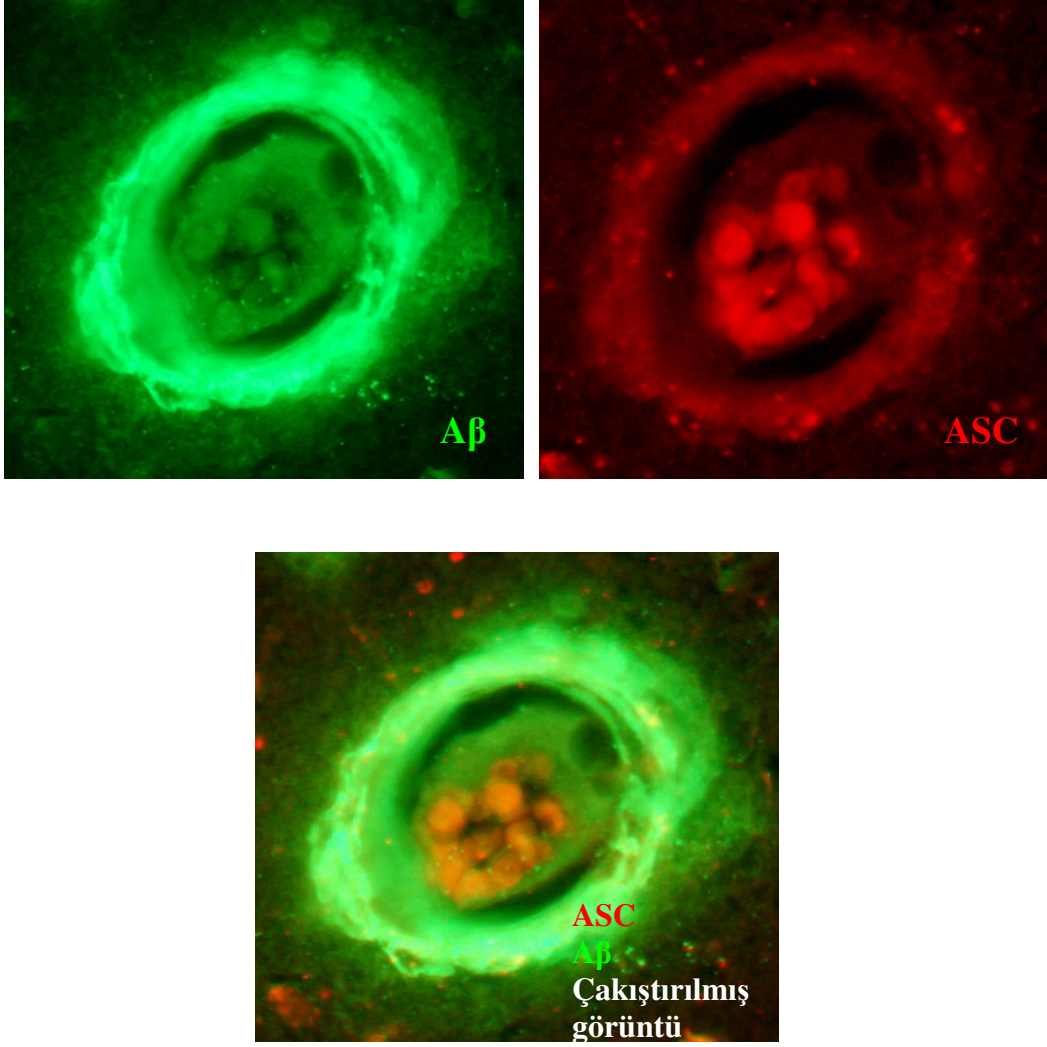


Şekil 4.7. Alzheimer hastasının beyin korteksinde bir damar duvarında kongo kırmızısı boyaması ile polarize ışık mikroskobide yeşil çift kırınım veren A β fibrilleri (200 X).



Şekil 4.8. Alzheimer hastasının beyin korteksinde damar duvarında A β protein birikiminin immünohistokimyasal olarak gösterilmesi (ölçek : 100 µm).

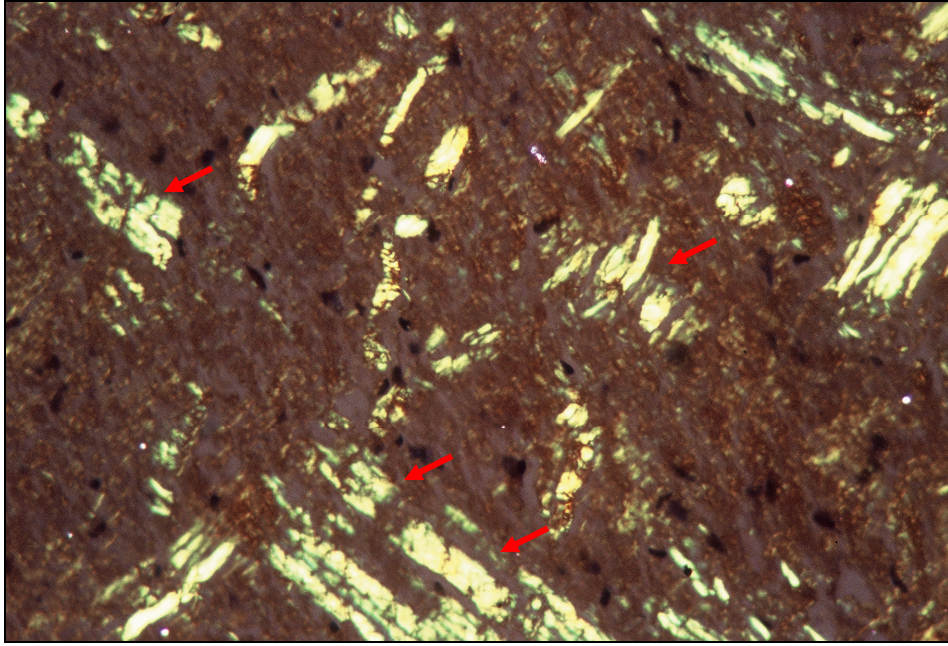
ASC proteininin kongofilik anjiyopatide A β ile birarada olduğu, ASC-A β immünfloresan eş boyaması ile doğrulandı (Şekil 4.9).



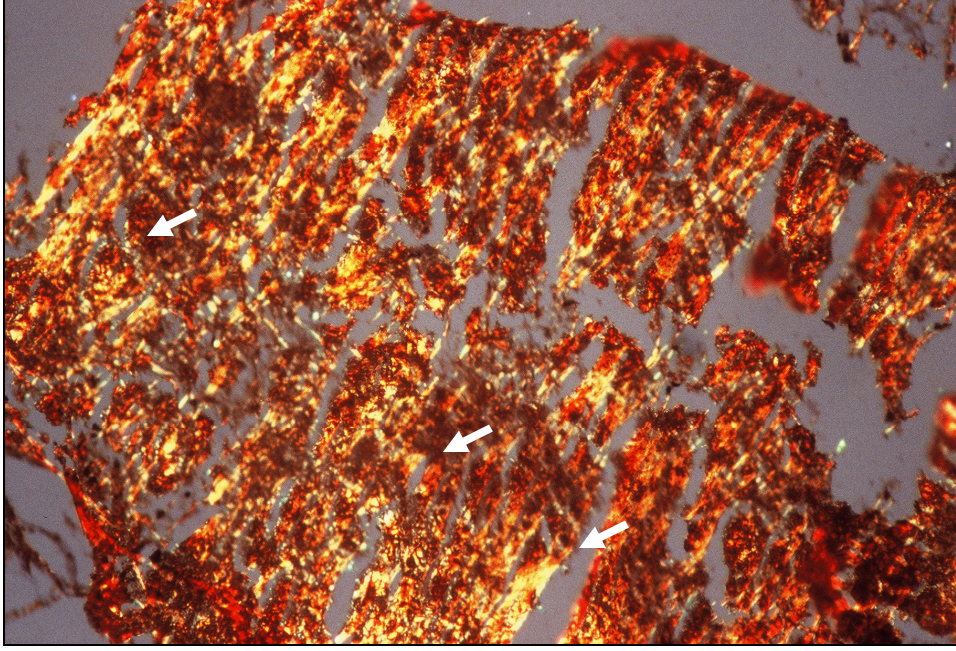
Şekil 4.9. ASC-A β immünfloresan eş boyaması ile bir damar duvarında A β ve ASC'nin birlikte yer aldığı gösterilmesi.

4.2. ASC Proteininin AL Tipi Amiloid Fibrilleri ile Yerleşimi

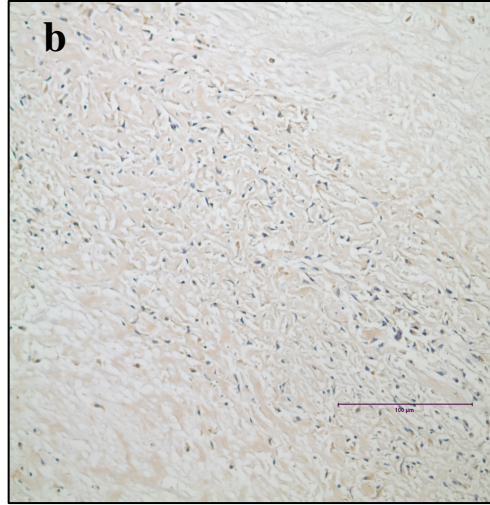
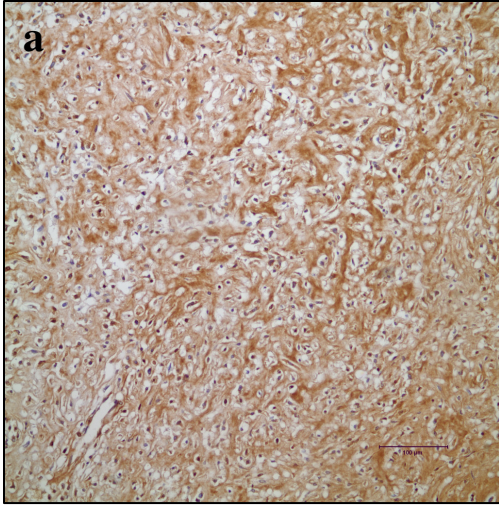
Nefrotik sendrom tanısı ile böbrek biyopsisi alınan 4, gözde plak oluşumu sebebiyle göz dokusu biyopsisi alınan 1 hastanın parafin blok materyallerinden hazırlanan kesitlerden birine Kongo Kırmızısı boyaması yapıldı ve amiloid fibrillerinin yerleşimi belirlendi (Şekil 4.10 ve Şekil 4.11). Diğer kesitlerde, AL tipi amiloid tiplendirmesi Ig *Kappa* ve Ig *Lambda* monoklonal antikolarıyla yapılan immünohistokimya boyaması ile gösterildi (Şekil 4.12). AL tipi amiloid fibrillerinin olduğu bölgelerde ASC proteininin varlığı immünohistokimya ile gösterildi. (Şekil 4.13 ve Şekil 4.14).



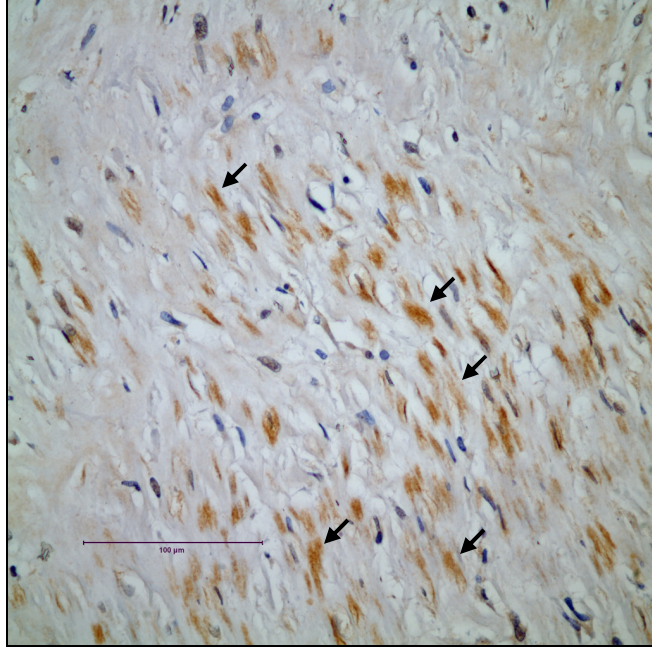
Şekil 4.10 Böbrek dokusunda kongo kırmızısı boyaması ile polarize ışık mikroskobide yeşil çift kırınım veren AL tipi amiloid fibrilleri (400 X).



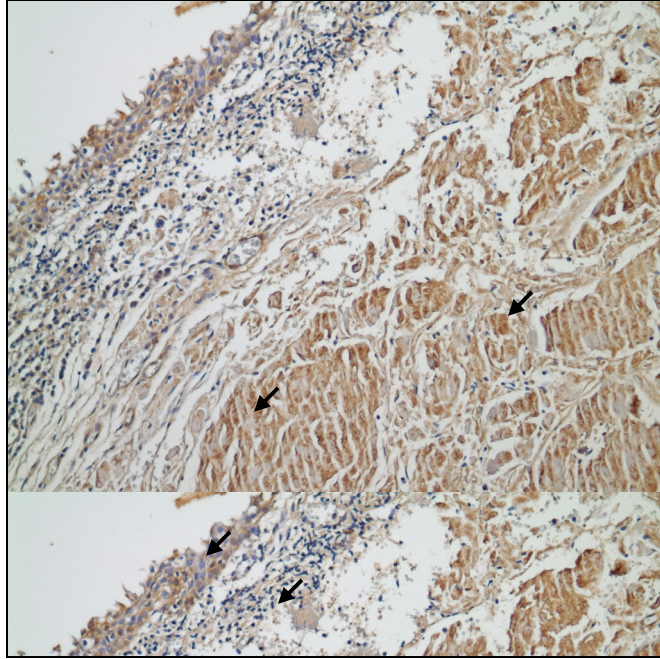
Şekil 4.11 Konjunktival biyopsi örneğinde kongo kırmızısı boyaması ile polarize ışık mikroskopide yeşil çift kırınım veren AL tipi amiloid fibrilleri (400 X).



Şekil 4.12. Nefrotik sendromu olan bir hastanın böbrek dokusundaki baskın klonun immünohistokimyasal olarak belirlenmesi. (a) Baskın Ig Lambda klonu. (b) Ig Kappa (ölçek: 100 μ m).



Şekil 4.13. Böbrek dokusundaki AL tipi amiloid fibrilleri ile ASC'nin aynı bölgelerde yer aldığı immünohistokimyasal olarak gösterilmesi (ölçek:100 µm).



Şekil 4.14. Konjonktival biyopsi örneğinde AL tipi amiloid nódüllerinde ASC'nin varlığının immünohistokimyasal olarak gösterilmesi (ölçek:100 µm).

5. TARTIŞMA

İlk kez 1854 yılında Alman bilim adamı Rudolph Virchow tarafından ortaya atılan amiloid terimi (2-4) özellikle son yıllarda bilim dünyasında önemli bir araştırma konusu haline gelmiştir. Bunun şüphesiz en önemli sebebi, günümüzün en yaygın hastalıklarından biri olan Alzheimer hastalığında amiloid patogenezinin görülüyor olmasıdır. Nörodejeneratif hastalıklardan otoinflamatuvar hastalıklara ve bazı kanserlerden enfeksiyon hastalıklarına kadar geniş bir yelpazede amiloid yapıların görülüyor olması amilod patogenezinin çözülmesine yönelik araştırmaların artmasına neden olmuştur.

Ailevi Akdeniz ateşi de amiloid birikiminin görüldüğü ve ülkemizde sık görülen otoinflamatuvar hastalıklardan birisidir. AAA hastalığında görülen AA tipi amiloid patogenezini aydınlatmaya yönelik yapılan çalışmalarda, Pysin proteini ile ilişki proteinlerden ASC'nin, AA tipi amiloid fibrilleri ile birarada bulunduğu ve ASC'nin amiloid gelişimi görülen doku bölgelerinde ifade değişikliği gösterdiği ortaya çıkarılmıştır (10). Bu bulgular, ASC proteininin amiloid patogenezinde bir rolü olabileceğinin ilk bulgularıdır.

Yaygın görülen amiloid tipleri olan A β ve AL tipi amiloid yapılarda, ASC proteininin amiloid fibrilleri ile birlikteliği bu tez çalışması kapsamında araştırılmıştır.

Tez çalışmasının ilk bölümünde ASC proteininin A β amiloid fibrilleri ile aynı bölgede yerleşip yerleşmediği incelenmiştir. Alzheimer hastalarının beyin temporal lob kesitlerinde yapılan; immünboyamalar sonucunda, senil plaklarda ve damar çevresindeki amiloid birikimlerinde ASC proteininin A β fibrilleri ile birlikte bulunduğu gösterilmiştir.

İnflamasyonun tetiklenmesine bağlı olarak ASC ifadesinin arttığı (44) ve ifade artışına bağlı olarak *speck* oluşumunun hızlandığı bilinmektedir (9). İmmünboyama yapılan örnekler değerlendirildiğinde, beyin temporal lobundaki gliyal hücrelerin yanısıra nöronların da ASC'yi ifade ettiği ve ASC ifadesinin glial ve nöron hücrelerinin

bazılarında *speck*ler şeklinde olduğunun gösterilmesi önemli bir bulgu olmuştur. Bu bulgular, Alzheimer hastalığı seyirinde, beyin dokusundaki ASC ifadesinin değişebileceğini göstermektedir.

Alzheimer hastalığı inflamatuvar hastalıklar kapsamına alınmamasına rağmen inflamasyonla yakından ilişkilidir (45-47). Bunun en önemli göstergesi, yaşamboyu *NSAID* (steroid olmayan anti-inflamatuvar ilaçlar) kullanan bireylerin, ilaç kullanmayanlara oranla Alzheimer hastası olma risklerinin düşük olmasıdır (45-47). Alzheimer hastalığının patogenezinde başrol oynayan senil plakların yapıtaşı olan A β peptidinin, NF κ B bağımlı yolağı uyararak nöroinflamasyonu başlattığı bilinmektedir (48). Bu bilgiler, Alzheimer hastalığında inflamatuvar bir cevabın olduğunun göstergesidir. Ayrıca, senil plakların çevresinde biriken mikrogliyalardan ve *reaktif* astrositlerin; interlökinler (49,50), prostaglandinler (45), lökotrinler (47), tromboksanlar (45,46), koagülasyon faktörleri (46), kompleman faktörleri (51-53), proteazlar (54), proteaz inhibitörleri (45) gibi pro-inflamatuvar molekülleri sentezlemesi, Alzheimer hastalığındaki inflamasyonun diğer bir kanıtıdır. Bu bilgiler ve tez çalışmasından elde edilen bulgular birleştirildiğinde, A β -ASC ilişkisinin inflamasyon penceresinden incelenebileceği düşünülebilir. A β peptidinin beyinde inflamasyonu tetiklemesi ile birlikte ASC ifadesinin artışa geçerek *speck* oluşumunu arttırabileceği düşünülmüştür. Bu nedenle ASC ifadesindeki artışın kantitatif olarak gösterilmesi gerekmektedir.

Hücrelerde, lipofüskin olarak adlandırılan lizozomal yağ granülleri bulunmaktadır. Bu granüllerin sayısı yaşlanma sürecinde ve nörodejeneratif hastalıklarda artmaktadır (55). Lipofüskin granülleri immünboyama çalışmalarında, otofloresans özellik göstermekte ve kromojenle boyanmalarından ötürü yalancı pozitiflik verebilmektedirler (56). ASC *speck*leri yapı olarak bu granüllere benzediğinden, ASC ifadesinden bahsedilirken lipofüskinlerin varlıkları da unutulmamalıdır. ASC ifadesinin mRNA düzeyinde kantitatif olarak araştırılması, ifade değişiminin desteklenmesi açısından önemlidir.

Senil plakların oluşumundaki dinamik süreç gözününe alındığında, ASC *speck*lerinin, senil plakların yoğunlaşmasında etkili olabileceği düşünülmektedir. Hücre kültürü modelleri ve/veya *in vivo* hayvan modelleri ile yapılacak çalışmalarda ASC proteini ile A β fibrillerinin oluşum mekanizması daha ayrıntılı incelenmelidir.

Tez çalışmasının ikinci bölümünde ASC proteininin AL tipi amiloid birikimi ile yerleşimi incelendiğinde, AL tipi amiloid geliştiren hastaların biyopsi materyallerinde, ASC proteininin AL tipi amiloid fibrilleri ile birlikte bulunduğu gösterilmiştir. Bu bölgelerdeki ASC ifadesinin *speck* şeklinde değil, amiloid fibrilleri boyunca difüze şekilde olduğu görülmüştür. ASC *speck*leri ile AL tipi amiloid fibrillerinin olası ilişkisi görüntülenememiştir. AL tipi amiloid fibrilleri oluştuktan sonra hastalardan biyopsi alındığı için, *speck*ler ile olgunlaşmamış fibrilleri görüntülemek mümkün olmamaktadır. ASC *speck*leri ile A β ilişkisini göstermek, senil plak oluşumundaki dinamizm sebebiyle mümkün olabilmıştır. Ayrıca bu gözlem sonucu, ASC *speck*lerinin olgun amiloid fibrilleri oluşurken dağıldığı ve fibril yapısına katıldığı düşünülmektedir. Bu nedenle ASC proteini, amiloid öncülü peptidlerin biraraya gelmesini sağlayan bir harç gibi işlev görüyor olabilir.

Grubumuzun, ASC proteininin AA tipi amiloid fibrilleriyle birlikteliğini göstermesinden sonra bu tez çalışmasında, ASC'nin yaygın görülen diğer amiloid tipleri olan A β ve AL tipi amiloid fibrilleri ile de birlikteliği gösterilmiştir. Yaygın görülen amiloid tiplerinde ASC proteininin fibrillerle birlikte bulunduğu bilgisi, ASC'nin amiloid oluşum mekanizmasında bir rolü olabileceği fikrini desteklemiştir. ASC'nin amiloid oluşum mekanizmasındaki olası rolü henüz bilinmemektedir. Bu rolü açığa çıkarmak için *in-vitro* ve *in-vivo* amiloid modelleri üzerinde incelemeler yapılması gerekmektedir.

Tüm amiloid tiplerinde fibrillerle birlikte bulunan SAP ve GAG gibi bazı ortak moleküller vardır. Bu moleküllerin amiloid fibrillerini proteolitik yıkıma karşı dirençli kıldığı düşünülmektedir. Bir akut faz proteini olan SAP, plazmada serbest halde bulunurken, GAG'lar hücre dışı matrisin en önemli bileşenleri olarak bilinirler.

Dolayısıyla bu bileşenlerin hücre dışı bölgede biriken amiloid fibrillerine katılımı, amiloid oluşumunun son aşamasında görülmektedir.

Bu çalışmadan elde edilen en önemli bulgulardan birisi de SAP ve GAG'ların yanısıra ASC'nin de yaygın görülen amiloid fibrilleri ile bir arada bulunmasıdır. SAP ve GAG'lardan farklı olarak ASC sitoplazmada yerleşim göstermektedir. ASC, sadece *speck*ler meydana geldiğinde hücreler arası bölgede bulunabilmektedir. Olgun amiloid fibrillerinde, ASC immünboyanması *speck* şeklinde değil, dağınık bir görünümde dir. Bu bulgular birlikte değerlendirildiğinde, ASC *speck*lerinin amiloid fibril oluşumunun başlangıç safhasında bir rol oynayabileceği düşünülmektedir.

Amiloid tipleri öncül proteinler itibariyle farklı olsalar da, yapı olarak benzerlik göstermektedirler. Yaygın görülen amiloid tiplerinde ortak bileşenlerin tanımlanması, amiloid oluşum mekanizmasının incelenmesi açısından önemlidir. Ayrıca, ASC'nin amiloid oluşum mekanizmasındaki rolü aydınlatıldığında, amiloid patogenezinin tedavisine yönelik yeni tedavi yöntemlerinin geliştirilmesine olanak sağlayacaktır.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

- Alzheimer hastalarının beyin korteksinde glial hücrelerin yanı sıra bazı nöronlarda da ASC ifadesinin olduğu gösterilmiştir.
- Alzheimer hastalarının beyin korteksindeki ASC ifadesinin, bazı hücrelerde *speck* şeklinde olduğu gösterilmiştir.
- Senil plakların amiloid kor kısımlarında ASC proteininin A β ile birlikte yerleştiği gösterilmiştir.
- Kongofilik anjiyopati olan bölgelerde ASC proteininin A β ile birlikte bulunduğu gösterilmiştir.
- AL tipi amiloid fibrilleri ile ASC proteininin birlikte yerleştiği gösterilmiştir.
- A β fibrillerinin inflamasyonu tetiklemesine bağlı olarak ASC ifadesinin değiştiğini ispat edebilmek için, ASC ifadesindeki artışın kantitatif olarak gösterilmesi gerekmektedir.
- ASC proteininin amiloid oluşum mekanizmasındaki rolünü açıklayabilmek için, *in vitro* ve *in vivo* amiloid modelleri üzerinde çalışmalar yapılmalıdır.

KAYNAKLAR

1. Chaudhuri, T.K., Paul S. (2006). Protein-misfolding diseases and chaperone-based therapeutic approaches. *FEBS J*, 273 (7):1331-1349.
2. Westermark P. (2005). Aspects on human amyloid forms and their fibril polypeptides. *FEBS J*, 272(23):5942-5949.
3. Jahn, T.R. ve Radford, S.E. (2005). The Yin and Yang of protein folding. *FEBS J*, 272(23):5962-5970.
4. Makin, O.S. ve Serpell, L.C. (2005). Structures for amyloid fibrils. *FEBS J*, 272(23):5950-5961.
5. Sipe, J.D. ve Cohen, A.S. (2000). History of the amyloid fibril. *J Struct Biol*, 130 (2-3):88-98.
6. Van der Hilst, J.C., Simon, A., Drenth, J.P. (2005). Hereditary periodic fever and reactive amyloidosis. *Clin Exp Med*, 5 (3):87-98.
7. Morgan, C., Colombres, M., Nunez, M.T., Inestrosa, N.C. (2004). Structure and function of amyloid in Alzheimer's disease. *Prog Neurobiol*, 74 (6):323-349.
8. Centola, M., Wood, G., Frucht, D.M., Galon, J., Aringer, M., Farrell, C. ve ark. (2000). The gene for familial Mediterranean fever, MEFV, is expressed in early leukocyte development and is regulated in response to inflammatory mediators. *Blood*, 95:3223-3231.
9. Richards, N., Schaner, P., Diaz, A., Stuckey, J., Shelden, E., Wadhwa, A. ve ark. (2001). Interaction between pyrin and the apoptotic speck protein (ASC) modulates ASC-induced apoptosis. *J Biol Chem*, 276 (42):39320-39329.
10. Waite, A.L., Balci Peynircioglu, B., Schaner, P., Taskiran, Z.E., Richards, N., Orhan, D. ve ark. The expression of ASC in renal tissues of FMF patients with amyloidosis; postulating a role for ASC in AA type amyloid deposition. *Journal of Cellular Physiology* (baskıda).
11. Bellotti, V., Nuvolone, M., Giorgetti, S., Obici, L., Palladini, G., Russo, P. ve ark. (2007). The workings of the amyloid diseases. *Ann Med*, 39(3):200-207.
12. Kapurniotu, A. (2001). Amyloidogenicity and cytotoxicity of islet amyloid polypeptide. *Biopolymers*, 60(6):438-459.

13. Merlini, G. ve Bellotti, V. (2003). Molecular mechanisms of amyloidosis. *N Engl J Med*, 49(6):583-596.
14. Li, J.P., Galvis, M.L., Gong, F., Zhang, X., Zcharia, E., Metzger, S. ve ark. (2005). In vivo fragmentation of heparan sulfate by heparanase overexpression renders mice resistant to amyloid protein A amyloidosis. *PNAS* 102 (18):6473-6477.
15. Tennent, G.A., Lovat, L.B., Pepys, M.B. (1995). Serum amyloid P component prevents proteolysis of the amyloid fibrils of Alzheimer disease and systemic amyloidosis. *PNAS*, 92 (10):4299-4303.
16. Ozen, S., Karaaslan, Y., Ozdemir, O., Saatci, U., Bakkaloglu, A., Koroglu, E. ve ark. (1998). Prevalence of juvenile chronic arthritis and familial Mediterranean fever in Turkey: a field study. *J Rheumatol*, 25: 2445–2449.
17. Mimouni, A., Magal, N., Stoffman, N., Shohat, T., Minasian, A., Krasnov, M. ve ark. (2000). Familial Mediterranean fever: effects of genotype and ethnicity on inflammatory attacks and amyloidosis. *Pediatrics*, 105 (5):E70.
18. Zemer, D., Pras, M., Sohar, E., Modan, M., Cabili, S., Gafni, J. (1986). Colchicine in the prevention and treatment of the amyloidosis of familial Mediterranean fever. *N Engl J Med*, 314 (16):1001-1005.
19. Shtrasburg, S., Pras, M., Gal, R., Salai, M., Livneh, A. (2001). Inhibition of the second phase of amyloidogenesis in a mouse model by a single-dose colchicine regimen. *J Lab Clin Med*, 138 (2):107-111.
20. International FMF Consortium. (1997). Ancient missense mutations in a new member of the RoRet gene family are likely to cause familial Mediterranean fever. *Cell*, 90 (4):797-807.
21. French FMF Consortium. (1997). A candidate gene for familial Mediterranean fever. *Nat Genet*, 17(1):25-31.
22. Gumucio, D.L., Diaz, A., Schaner, P., Richards, N., Babcock, C., Schaller, M. ve ark. (2002). Fire and ICE: the role of pyrin domain-containing proteins in inflammation and apoptosis. *Clin Exp Rheumatol*, 20 (4 Suppl 26):45-53.

23. Masumoto, J., Taniguchi, S., Ayukawa, K., Sarvotham, H., Kishino, T., Niikawa, N. ve ark. (1999). ASC, a novel 22-kDa protein, aggregates during apoptosis of human promyelocytic leukemia HL-60 cells. *J Biol Chem*, 274 (48):33835-33838.
24. Shoham, N.G., Centola, M., Mansfield, E., Hull, K.M., Wood, G., Wise, C.A. ve ark. (2003). Pyrin binds the PSTPIP1/CD2BP1 protein, defining familial Mediterranean fever and PAPA syndrome as disorders in the same pathway. *PNAS*, 11;100(23):13501-13506.
25. Balci, Peynircioğlu, B., Waite, A., Hu, C., Richards, N., Stauach-Grosse, A., Yilmaz, E. ve ark. Pyrin, product of MEFV locus, interacts with the proapoptotic protein, Siva. *Journal of Cellular Physiology*, (baskıda).
26. Mariathasan, S., Newton, K., Monack, D.M., Vucic, D., French, D.M., Lee, W.P. ve ark. (2004). Differential activation of the inflammasome by caspase-1 adaptors ASC and Ipaf. *Nature*, 8;430(6996):213-8.
27. Masumoto, J., Kobayashi, H., Nakamura, T., Kaneko, Y., Ota, H., Hasegawa, M. ve ark. (2006). Regulation of the ASC expression in response to LPS stimulation is related to IL-8 secretion in the human intestinal mucosa. *Biochem Biophys Res Commun*, 346 (3):968-973.
28. Lachmann, H.J. ve Hawkins, P.N. (2006). Systemic amyloidosis. *Curr Opin Pharmacol*, 6(2):214-220.
29. Picken, M.M. (2007). New insights into systemic amyloidosis: the importance of diagnosis of specific type. *Curr Opin Nephrol Hypertens*, 16 (3):196-203.
30. Urieli-Shoval, S., Linke, R.P., Matzner, Y. (2000). Expression and function of serum amyloid A, a major acute-phase protein, in normal and disease states. *Curr Opin Hematol*, 7(1):64-69.
31. Gershoni-Baruch, R., Brik, R., Zacks, N., Shinawi, M., Lidar, M., Livneh, A. (2003). The contribution of genotypes at the MEFV and SAA1 loci to amyloidosis and disease severity in patients with familial Mediterranean fever. *Arthritis Rheum*, 48 (4):1149-1155.
32. Livnen, A., Langevitz, P., Shinar, Y., Zaks, N., Kastner, D.L., Pras, M. ve ark. (1999). MEFV mutation analysis in patients suffering from amyloidosis of Familial Mediterranean fever. *Amyloid*, 6: 1-6.

33. Hull, K.M., Drewe, E., Aksentijevich, I., Singh, H.K., Wong, K., McDermott, E.M. ve ark. (2002). The TNF receptor-associated periodic syndrome (TRAPS): emerging concepts of an autoinflammatory disorder. *Medicine (Baltimore)*, 81 (5):349-368.
34. Lachmann, H.J., Goodman, H.J., Andrews, P.A., Gallagher, H., Marsh, J., Breuer, S. ve ark. (2006). AA amyloidosis complicating hyperimmunoglobulinemia D with periodic fever syndrome: a report of two cases. *Arthritis Rheum*, 54(6):2010-2014.
35. Osick, L.A., Lee, T.P., Pedemonte, M.B., Jacob, L., Chauhan, P., Navarro, C. ve ark. (1993). Hepatic amyloidosis in intravenous drug abusers and AIDS patients. *J Hepatol*, 19(1):79.
36. D'Andrea, M.R., Cole, G.M., Ard, M.D. (2004). The microglial phagocytic role with specific plaque types in the Alzheimer disease brain. *Neurobiol Aging*, 25 (5):675-683.
37. Oide, T., Kinoshita, T., Arima, K. (2006). Regression stage senile plaques in the natural course of Alzheimer's disease. *Neuropathol Appl Neurobiol*, 32 (5):539-556.
38. Estrada, L.D. ve Soto, C. (2007). Disrupting β -Amyloid Aggregation for Alzheimer Disease Treatment. *Current Topics in Medical Chemistry*, 7,115-126
39. van Gameren, I.I., Lokhorst, H., Hazenberg, B.P., Vellenga, E. (2004). Therapeutic options in systemic AL amyloidosis. *Neth J Med*, 62(4):106-113.
40. Comenzo, R.L., Zhang, Y., Martinez, C., Osman, K., Herrera, G.A. (2001). The tropism of organ involvement in primary systemic amyloidosis: contributions of Ig V(L) germ line gene use and clonal plasma cell burden. *Blood*, 98: 714-720.
41. Kuci, H., Ebert, M.P., Rocken, C. (2007). Anti-lambda-light chain-peptide antibodies are suitable for the immunohistochemical classification of AL amyloid. *Histol Histopathol*, 22 (4):379-387.
42. Martinez, R., Schackert, G., Esteller, M. (2007). Hypermethylation of the proapoptotic gene TMS1/ASC: prognostic importance in glioblastoma multiforme. *J Neurooncol*, 82(2):133-139.
43. Stone, A.R., Bobo, W., Brat, D.J., Devi, N.S., Van Meir, E.G., Vertino, P.M. (2004). Aberrant methylation and down-regulation of TMS1/ASC in human glioblastoma. *Am J Pathol*, 165(4):1151.

44. Shiohara, M., Taniguchi, S., Masumoto, J., Yasui, K., Koike, K., Komiyama, A. ve ark. (2002). ASC, which is composed of a PYD and a CARD, is up-regulated by inflammation and apoptosis in human neutrophils. *Biochem Biophys Res Commun*, 24;293(5):1314-1318.
45. Tuppo, E.E. ve Arias, H.R. (2005). The role of inflammation in Alzheimer's disease. *Int J Biochem Cell Biol*, 37(2):289-305.
46. Heneka, M.T. ve O'Banion, M.K. (2007). Inflammatory processes in Alzheimer's disease. *J Neuroimmunol*, 184(1-2):69-91.
47. Zilka, N., Ferencik, M., Hulin, I. (2006). Neuroinflammation in Alzheimer's disease: protector or promoter? *Bratisl Lek Listy*, 107(9-10):374-383.
48. Combs, C.K., Johnson, D.E., Karlo, J.C., Cannady, S.B., Landreth, G.E. (2001). Inflammatory mechanisms in Alzheimer's disease: inhibition of beta-amyloid-stimulated proinflammatory responses and neurotoxicity by PPARgamma agonists. *J Neurosci*, 15;20(2):558-567.
49. Griffin, W.S., Sheng, J.G., Roberts, G.W., Mrak, R.E. (1995). Interleukin-1 expression in different plaque types in Alzheimer's disease: significance in plaque evolution. *J Neuropathol Exp Neurol*, 54(2):276-281.
50. Griffin, W.S., Stanley, L.C., Ling, C., White, L., MacLeod, V., Perrot, L.J. ve ark. (1989). Brain interleukin 1 and S-100 immunoreactivity are elevated in Down syndrome and Alzheimer disease. *PNAS*, 86(19):7611-7615.
51. Afagh, A., Cummings, B.J., Cribbs, D.H., Cotman, C.W., Tenner, A.J. (1996). Localization and cell association of C1q in Alzheimer's disease brain. *Exp Neurol*, 138(1):22-32.
52. Bergamaschini, L., Donarini, C., Gobbo, G., Parnetti, L., Gallai, V. (2001). Activation of complement and contact system in Alzheimer's disease. *Mech Ageing Dev*, 122(16):1971-1983.
53. Bradt, B.M., Kolb, W.P., Cooper, N.R. (1998). Complement-dependent proinflammatory properties of the Alzheimer's disease beta-peptide. *J Exp Med*, 3;188(3):431-438.

54. Abraham, C.R., Selkoe, D.J., Potter, H. (1988) Immunochemical identification of the serine protease inhibitor alpha 1-antichymotrypsin in the brain amyloid deposits of Alzheimer's disease. *Cell*, 26;52(4):487-501.
55. Terman, A. ve Brunk, U. (2004). Lipofuscin. *Int J Biochem Cell Biol*, 36 (8): 1400-1404.
56. Monici, M. (2005). Cell and tissue autofluorescence research and diagnostic applications. *Biotechnol Annu Rev*, 11:227-256.