

**T.C.
TURGUT ÖZAL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ GENETİK ANABİLİM DALI**

ALZHEIMER HASTALIĞINDA CD33 GEN POLİMORFİZMİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**Hazırlayan
Şakire Serap MEMİK**

**Tez Danışmanı
Prof.Dr. Esra GÜNDÜZ**

Ankara-2016

**T.C.
TURGUT ÖZAL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ GENETİK ANABİLİM DALI**

ALZHEIMER HASTALIĞINDA CD33 GEN POLİMORFİZMİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**Hazırlayan
Şakire Serap MEMİK**

**Tez Danışmanı
Prof.Dr. Esra GÜNDÜZ**

Ankara-2016

**Turgut Özal Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi
tarafından desteklenmiştir
(Proje No: 004-10-2013)**

BİLİMSEL ETİK BİLDİRİM SAYFASI

Turgut Özal Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- Tez içindeki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda ilgili eserlere bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu,
- Atıfta bulunduğum eserlerin tümünü kaynak olarak gösterdiğimi,
- Kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı,
- ve bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya başka bir üniversitede başka bir tez çalışması olarak sunmadığımı beyan ederim.

25/01/2016

İmza

Şakire Serap MEMİK

Tez Danışmanı:.....

Prof. Dr. Esra GÜNDÜZ, Turgut Özal Üniversitesi

KABUL VE ONAY SAYFASI

Sağlık Bilimleri Enstitü Müdürlüğüne;

Şakire Serap MEMİK tarafından hazırlanan “Alzheimer Hastalığında CD33 Gen Polimorfizmi” başlıklı bu çalışma, 25/01/2015 tarihinde yapılan savunma sınavı sonucunda (oybirliği/oyçokluğu) ile başarılı bulunarak jürimiz tarafından Tıbbi Genetik Anabilim Dalında Yüksek lisanstezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı, Tez Danışmanı:.....

Prof.Dr.Esra GÜNDÜZ, Turgut Özal Üniversitesi

Üye :.....

Yrd.Doç.Dr. Muradiye ACAR, Turgut Özal Üniversitesi

Üye :.....

Doç.Dr Hüseyin SARIBAŞAK, Şifa Üniversitesi

ONAY : Butezi, yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve kabul edilmiştir./...../ 2016 tarih ve sayılı Sağlık Bilimleri Enstitü Yönetim Kurulu kararı ile onaylanmıştır.

Doç. Dr. M. Hüsamettin ERDAMAR
Enstitü Müdürü

Doç.Dr.Hüsamettin ERDAMAR
Turgut Özal Üniversitesi
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

ÖNSÖZ

Bu tezin teorik temellerinin oluşturulması, deneylerin gerçekleştirilmesi, verilerin toplanıp istatistiğinin yapılarak yorumlanması ve yazılması aşamalarında desteklerini sunan ve her zaman her konuda destek olup çalışmaya teşvik eden hocalarımız Tıbbi Genetik Anabilim Dalı Başkanı Prof.Dr. Esra GÜNDÜZ'e, Prof.Dr. Mehmet GÜNDÜZ'e, Yrd.Doç.Dr. Muradiye ACAR'a, Yrd.Doç.Dr. Ömer Faruk HATİPOĞLU'na ve tüm diğer hocalarıma yardımlarından dolayı en içten teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmalar sırasında desteklerini esirgemeyen Tıbbi Genetik Anabilim Dalındaki arkadaşlarımdan Gülhan KAYA, Hacer Esra GÜRSES CİLA, Dilara İPEKER ACER, Bilge KALYONCU, Birsen BEKÇİ, Gizem SEVİNÇ, Tuğçe YAŞAR, Gülsüm ERCAN, Nazlı KÜRT'e ayrıca tüm yüksek lisans, doktora öğrencilerine ve çalışanlarına çok teşekkür ederim.

Tez çalışmalarım boyunca manevi destek olan annem Ayfer Memik'e, babam Uğur Memik'e ve kardeşim Serhat Memik'e teşekkür ederim.

Ankara 2016
Şakire Serap MEMİK

ÖZET

MEMİK, Şakire Serap. Alzheimer Hastalığında CD33 Gen Polimorfizmi, Yüksek Lisans Tezi, Ankara, 2016.

Alzheimer progresif bir nörodejeneratif hastalıktır. Alzheimer hastalığını önceden tahmin etmek zordur. Alzheimer hastalığı için birçok çalışma halen yürütülmekte olmasına rağmen, hastalık tam olarak anlaşılamamıştır. Alzheimer hastalığı ilerleyici demans özelliğe sahip bir hastalıktır. Hastalarda, bellek kaybı, edinilmiş becerileri yapmakta güçlük, kişilik- davranış değişiklikleri, dili kullanmada, konuşulanları anlamada bozukluk, yol bulamama, aritmetik yapamama, içe kapanma gibi durumlar gözlenebilir. Bu durumlar ayrı ayrı veya birarada da olabilir. Alzheimer hastalığı için kesin tanı ancak post-mortem dönemde nöropatolojik yöntemlerle konulmaktadır. Alzheimer hastalığının tanısına katkı sağlayacak biyomarkırlar bulunursa, hastalığın erken teşhis ile belirlenebileceği tahmin edilmektedir. Alzheimer hastalığında, insan genomundaki bazı genlere ait polimorfizmlerin rol oynadığı bilinmektedir. Bu genlerden biri CD33 genidir. Sialik asit bağlanan Ig benzeri lectin (SIGLEC) ailesinin üyesidir. CD33 geni Alzheimer hastalığının patogenezinde potansiyel kilit rol oynar. CD33'ün insan beyinde mikrogliyalarda eksprese olduğu gösterilmiştir. Yapılan GWAS (genome-wide association study) çalışmalarında, CD33 geninin promoter bölgesinde (-373) bulunan rs3865444 polimorfizminin Alzheimer hastalığı ile ilişkili olduğu ortaya konmuştur. Bu çalışmamızda sağlıklı kişilerin ilerleyen zamanlarında Alzheimer Hastalığı'na yakalanma riskini belirleyen ve erken tanıda kullanılacak biyomarkırların tanımlanması amaçlanmıştır. Bu amaçla, AH için önemli risk faktörü genlerinden olan CD33gen polimorfizminin genotip ve allel frekansları Türk hastalarda oluşan çalışma grubumuzdaki 58 Alzheimer hastası ve 53 demans öyküsü olmayan kontrol grubu bireylerde değerlendirilmiştir. Sonuç olarak, CD33 geni rs3865444 polimorfizmi ve Alzheimer hastalığı arasında anlamlı bir ilişki bulunamamıştır.

Anahtar Kelimeler: Alzheimer Hastalığı; CD33 Geni; Polimorfizm; rs3865444; Biyomarker

ABSTRACT

MEMİK, Şakire Serap. CD33 Gene Polymorphism in Alzheimer Disease, Master's Thesis, Ankara,2016.

Alzheimer's disease is a progressive neurodegenerative disease. Prognosticating is a challenge for Alzheimer's disease. Although many studies are still being conducted, the disease has not been fully understood. Alzheimer's disease is progressive dementia. The symptoms observed in patients are memory problems, changes in processing speed, attention, and trouble finding the right words to identify objects, express thoughts or take part in conversations, difficulty concentrating and thinking, especially about abstract concepts like numbers, depression, social withdrawal, mood swings, distrust in others, irritability and aggressiveness, changes in sleeping habits, wandering, loss of inhibitions. These symptoms can be observed separately or combined. Alzheimer's disease diagnose in the post-mortem period by methods of neuropathological diagnosis. If biomarkers are found, that will contribute to the diagnosis of Alzheimer's disease, with early detection of the disease. For Alzheimer's disease, some of the polymorphism in human genes are known to play a role. CD33 is a member of the sialic acid-binding Ig-like lectin (SIGLEC) family of receptor. Genome-wide association study has revealed that the rs3865444 polymorphism in the CD33 gene is associated with susceptibility to Alzheimer's disease. Polymorphism of the CD33 gene, shown in studies, increases the risk of Alzheimer's. Early diagnosis of this disease can contribute to find out more effectively therapies for Alzheimer. Therefore, in this study, finding biomarkers for diagnosis of Alzheimer's disease are aimed. For this purpose, genotip and allel frequency were examined in CD33 gene rs3865444 polymorphisms. From Turkish society, 58 patient who has Alzheimer disease and 53 people who are control group were examined. In conclusion, there is no significant relation, between CD33 gene and Alzheimer disease.

Keywords : Alzheimer's Disease; CD33 gene; Polymorphism rs3865444; Biomarker

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
BİLİMSEL ETİK BİLDİRİM SAYFASI	
KABUL VE ONAY SAYFASI	
ÖNSÖZ.....	i
ÖZET.....	ii
ABSTRACT	iii
İÇİNDEKİLER	iv
SİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİ	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ	viii
RESİMLER DİZİNİ	ix
TABLolar DİZİNİ	x
1 GİRİŞ VE AMAÇ	1
2 GENEL BİLGİLER.....	3
2.1 Alzheimer Hastalığı	3
2.1.1 Alzheimer Hastalığının Tarihçesi	3
2.1.2 Alzheimer Hastalığı ve Demans.....	4
2.1.3 Alzheimer Hastalığının Klinik Özellikler	4
2.1.4 Alzheimer Hastalığının Epidemiyolojisi.....	8
2.1.5 Alzheimer Hastalığının Patogenezi ve Nöropatolojisi.....	9
2.1.6 Nörofibriller yumaklar	9
2.1.7 Amiloid plaklar	10
2.1.8 Mikroglia.....	13
2.1.9 Alzheimer Hastalığının Etiyolojisi.....	16
2.2 Alzheimer Hastalığının Genetiği	16
2.2.1 Erken Başlangıçlı Alzheimer Hastalığı ile İlişkili Genler.....	17
2.2.1.1 Amiloid Prekürsör Proteinden (APP)	17

2.2.1.2	PSEN.....	17
2.2.2	Geç Baslangıçlı Alzheimer Hastalığı ile İlişkili Genler.....	18
2.2.2.1	Cluster of Differentiation 33 (CD33).....	18
2.2.2.1.1	CD33 Sentez Yerleri	19
2.2.2.1.2	CD33 ve Alzheimer Hastalığı	19
3	GEREÇ VE YÖNTEM.....	21
3.1	Periferik Kandan DNA İzolasyonu.....	21
3.2	DNA Amplifikasyonu.....	22
3.3	Primerlerin Dilüe Edilmesi	23
3.4	Gradyent PCR.....	23
3.5	PCR.....	25
3.7	CD33 geni rs3865444 polimorfizmi için enzim kesimi	26
3.8	Agaroz Jel Elektroforezi	27
3.9	Sekans İşlemi	27
3.9.1	Örneklerin Exosap İle Muamelesi.....	27
3.9.2	Sekans PCR'ın Yapılması:	28
3.9.3	Sephadex Hazırlanışı.....	28
3.10	Deneylerde Kullanılan Cihazlar	29
4	BULGULAR.....	30
4.1	Gradyent PCR Elektroforez Sonucu	30
4.2	PCR Elektroforez Sonucu	30
4.3	NIaIII Enzim Kesimi PCR Elektroforez Sonucu	31
4.4	Sekans	32
4.5	İstatistiksel Değerlendirme	32
5	TARTIŞMA VE SONUÇ.....	35
	KAYNAKÇA	38

SİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİ

Simge	Açıklama
A β :	Amiloid- β
AchEIs:	Asetilkolinesteraz inhibitörleri
ADGC:	Alzheimer Hastalığı Genetik Konsorsiyumu
AH:	Alzheimer Hastalığı
APOE:	Apolipoprotein E
APP:	Amiloid Prekursör Protein
Arg:	Arjinin
ASO-PCR:	Allel Spesifik Oligonükleotid Polimeraz Zincir Reaksiyonu
Bç:	Baz çifti
BIN1:	Bridging integrator 1
CD33:	Cluster of Differentiation 33
DNA:	Deoksiribonükleik asit
EBAH:	Erken Başlangıçlı Alzheimer hastalığı
EDTA:	Etilendiamin tetraasetik asit
FAH:	Familyal Alzheimer Hastalığı
GDNF:	Glial hücre kaynaklı nörotrofik faktör (glial cell derived neurotrophic factor)
GBAH:	Geç Başlangıçlı Alzheimer Hastalığı
GWAS:	Genome-wide Association Study
HDL:	Yüksek yoğunluklu lipoprotein
HKB:	Hafif Kognitif Bozukluk
ITAM :	Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif
ITIM:	Immunoreceptor Tyrosine-based Inhibition Motif
LDL:	Düşük yoğunluklu lipoprotein
MAPT:	Microtubule Associating Protein Tau
MI:	Karşılıklı Bilgi (Mutual Information)
MMDT:	Mini Mental Durum Testleri
MRI:	Manyetik rezonans görüntüleme

μ l:	Mikrolitre
MSS:	Merkezi Sinir Sistemi
NINCDS:	National Institute of Neurological and Communicative Disorders and
/ADRDA:	Stroke/Alzheimer's Disease and Related Disorders Association
NMDA:	N-metil-D-aspartat
nt:	Nükleotit
NFY:	Nöro Fibriler Yumak
PACT:	PKR aktive edici protein
PAMPs:	Patojenik Moleküler Paternleri
PSEN1:	Presenilin 1
PSEN2:	Presenilin 2
PCR:	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
SAGE:	Gen ekspresyonunun seri analizi (Serial analysis of gene expression)
SIGLEC:	Sialik Asit Bağlanan Ig Benzeri Lectin
SMMT:	Standardize Mini Mental Test
SMV:	Destek Kuvvet Araçları (Super vector machines)
UTR:	Translasyon olmayan bölge (Untranslated region)
VLDL-R:	Çok düşük yoğunluklu lipoprotein reseptörü

ŞEKİLLER DİZİNİ

	<u>Sayfa No</u>
Şekil 1 Nörofibriler yıkımın aşamaları	10
Şekil 2 AH'nda senil plak oluşumunda yer alan proteinler:	11
Şekil 3 Nöron Ölümü	13
Şekil 4 Mikroglia sinyal yolağı:	14
Şekil 5 Overaktif mikroglia sinir hücrelerine toksik etki yapabilir	15
Şekil 6 CD33 Geninin Şeması [96]	19
Şekil 7 CD33 Sekans Dizisi (NCBI: gi 568815579:51222837-51242259 Homo sapiens CD 33, chromosome 19, GRCh38 Primary Assembly)	23
Şekil 8 NLaIII enzimi tanıma dizisi	26
Şekil 9 CD33 rs3865444 polimorfizmi	32

RESİMLER DİZİNİ**Sayfa No**

Resim 1	CD33gradyent PCR sonucunda elde edilen agaroz jel elektroforez görüntüsü	30
Resim 2	CD33PCR amplifikasyon ürünlerinin agaroz jel görüntüsü.....	31
Resim 3	CD33RFLP ürünlerinin agaroz jel görüntüsü.....	31

TABLOLAR DİZİNİ

	<u>Sayfa No</u>
Tablo 1 Alzheimer Hastalığında Klinik Bulguları	5
Tablo 2 Alzheimer Hastalığı Klinik Evreleri	6
Tablo 3 CD33 için PCR’da kullanılan primerlerin dizileri	22
Tablo 4 CD33 Gradyent PCR için kullanılan solüsyon karışımı	24
Tablo 5 İzlenen Gradyent PCR programı	24
Tablo 6 Pcr Reaksiyon Karışımı.....	25
Tablo 7 İzlenen PCR programı.....	25
Tablo 8 NLaIII (HinIII) enzimi için kesim koşulları.....	26
Tablo 9 İzlenen PCR programı.....	27
Tablo 10 Sekans PCR için miks karışımı	28
Tablo 11 İzlenen PCR programı.....	28
Tablo 12 CD33 alel dağılımları 1	33
Tablo 13 CD33 alel dağılımları 2	33
Tablo 14 Cinsiyet Dağılımları	33
Tablo 15 AH ile diğer hastalıkları karşılaştırılması	34

1 GİRİŞ VE AMAÇ

Demans, zihinsel faaliyetlerde artan bozulmayla, bireyin günlük aktivitelerini bağımsız yürütmede zorluklar yaşaması halidir. Hafıza kaybı, öğrenmede ve konuşmada zorluk, akıl yürütme ve yargılamada problemler en sık görülen belirtilerdir [1]. Demans, erişkin Merkezi Sinir Sistemi'nin (MSS) tahribi sonucu, kognitif alanın hasarına ve günlük yaşam faaliyetlerinin eski haliyle devam ettirilememesine sebep olan, kalıcı ve giderek artan klinik bir hastalıktır [2]. Demans türleri arasında en sık görülen Alzheimer Hastalığı (AH)'dır. AH yaşa bağımlı ve tedavisi olmayan nörodejeneratif bir hastalıktır [3]. AH, demans vakalarının %50-70'ini oluşturmaktadır [1].

AH ilk olarak Alman nöropatolog ve psikiyatrist Dr. Alois Alzheimer tarafından 1900'lü yılların başlarında tanımlanmıştır. AH ölüm sebebi istatistiklerinde dördüncü sırada olduğu görülmektedir. İleri yaş AH'nda en önemli risk faktörüdür. 65 yaş ve sonrasında her beş yılda bir prevalansı ikiye katlanmaktadır [4]. Demansa neden olan diğer nedenlerin devre dışı bırakılmasıyla AH'nın klinik tanısı yapılmaktadır. Fakat kesin tanı post-mortem aşamada nöropatolojik araştırmalar sayesinde mümkündür [5]. Bundan dolayı AH'nın teşhisine destek olacak teşhis yöntemlerine (biyomarkır) gereksinim vardır. Ayrıca çalışılan biyomarkırın, hastalığın teşhisinde prognozun saptanmasına katkı sağlamakla birlikte hastalığa yatkınlığı da tespit edebilmelidir. Bunun yanısıra AH'nı diğer demans türlerinden de ayırabilmelidir [4].

Yaşlılık AH'nda risk olmakla birlikte her yaşlı Alzheimer olmamaktadır. İnsan genomundaki bazı genlere ait toplu polimorfizmlerin bu sonucu çıkardığı düşünülmektedir. Bilinen risk faktörlerinden biri CD33 geni olmasına karşın bu allelin Türk toplumundaki sıklığı bilinmemektedir.

AH riskinin sağlıklı iken bilinmesi bu hastalığın erken teŖhis ile daha etkin m¼cadele edilmesini sağlayacaktır. Bu çerçevede çalışmamızda sağlıklı kişilerin ileriki yaşlarında AH'na yakalanma riskini tespit eden biyomarkırların belirlenmesi hedeflenmektedir. Bu kapsamda AH ile bağlantılı olan CD33 genine aitrs3865444 polimorfizmi Alzheimer hastaları ve sağlıklı bireyler ¼zerinde incelenip hastalıkla bağlantıları araştırılmıştır.

2 GENEL BİLGİLER

2.1 Alzheimer Hastalığı

2.1.1 Alzheimer Hastalığının Tarihçesi

AH 1907 yılında ilk kez Dr. Alois Alzheimer tarafından yürütülen bir çalışma sonucunda bulunmuştur. Bu sonuç dört buçuk yıl boyunca 51 yaşındaki bir kadın hastanın takibi ile tespit edilmiştir. Bu hastalığa klinik şefi Dr. Emil Kraepelin “Alzheimer” adını koymuştur [6]. Dr. Alois hastada şuur kaybı, kişilik değişikliği, konuşma bozukluğu ve apraksisi belirtilerine rastlamıştır. Bunu bir vaka olarak tanımlamış ve daha sonra vakanın otopsi materyali üzerine çalışmalar yapmıştır [7, 8]. Yapılan otopsi çalışmasında normalden farklı olarak gümüş pozitif nörofibriler yumaklar gözlemlenmiştir. Bu gözlemler sonucunda serebral kortikal sinir hücresi kaybı ve senil plakları ortaya çıkararak hastalığı tanımlamıştır [9]. 1960'lara kadar AH ender rastlanan ve ileri yaşta başlayan bir hastalık olarak değerlendiriliyordu [10]. Lakin son zamanlarda yapılan çalışmalar bu kanıyı değiştirmiştir. AH, otuzlu yaşlardan itibaren herhangi bir yaşta başlayan, etyolojisi tespit edilemeyen, ilerleyici demansa sebep olan bir hastalık olarak kabul edilmektedir [11].

1960-1970'lerde AH ile ilgili yapılan araştırmalarda, serebral kortikal lezyonların yapısı incelenmiş ve bazı nörotransmitterlerde eksiklikler tespit edilmiştir. 1980-1990'larda moleküler biyoloji ve genetik dallarında yapılan çalışmalar bu hastalığa yeni bir bakış açısı getirmiştir. 1984'te amiloid beta (A β) peptidi izole edilip saflaştırılmıştır. 1987'de A β 'nın spesifik proteini olan Amyloid Precursor Protein (APP) klonlanmıştır [12, 13]. Bu sayede AH'da patogenez mekanizmalarının aydınlatılması için basamak olmuştur.

2.1.2 Alzheimer Hastalığı ve Demans

Demans; muhakeme, hafıza, algılama ve düşünme yetisinde oluşan beceri kaybı demektir. Halk arasında “bunama” olarak bilinmektedir [14]. Demans, sürdürüldüğü yaşam faaliyetlerinin geri dönüşmeyecek şekilde kaybına sebep olur. Diğer bir deyişle, demans kognitif fonksiyonlarda giderek artan ve kalıcı kayba sebep olan klinik bir bozukluktur [15].

Demansın en sık görülen formu AH’ dir. AH, limbik sistem dejenerasyon kökenli bir hastalıktır. İleriki evrelerinde neokortikal bölgenin hasara maruz kalmasıyla yakın bellek bozuklukları gösterir. Devam eden süreçte, kognitif işlevlerde bozulmaların gözlemlendiği sendromdur. Erken teşhisi üzerine yapılan çalışmalardan net bir sonuç alınmadığından, demansla ortaya çıkan belirtiler hastalığın ilerlemiş aşamalarıdır [2].

AH; moleküler biyoloji ve genetik, hücre biyolojisi, biyokimya, nörobiyoloji ve yapısal biyoloji gibi biyolojik disiplinlerin incelediği bir hastalıktır. AH genetik incelemeler açısından heterojenite gösteren poligenik bir hastalıktır [16, 17].

Demans çeşitlerinin büyük bir kısmının tam bir tedavisi yoktur. Bu durum hastanın ve hastaya bakım sağlayanların sosyal ve ekonomik yönden sıkıntı yaşamalarına neden olur. Bu nedenden dolayı hastalığın erken döneminde teşhisi önem arz etmektedir [16].

2.1.3 Alzheimer Hastalığının Klinik Özellikler

Bellek kaybı, konuşma bozukluğu, apraksi ve agnozi AH’nın klinik göstergelerinin başında gelmektedir. AH’nın belirtilerini kognitif, davranışsal ve işlevsel olarak üç gruba ayırabiliriz. Demans tanısı belirtilerin sorgulanması ile belirlenir. AH’nın klinik bulguları aşağıdaki tabloda yer almaktadır.

Tablo 1 Alzheimer Hastalığında Klinik Bulguları [18]

<p>Kognitif Belirtiler:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Yakın Bellek Kaybı: Yakın zamana ait olayların (kişisel ve güncel) unutulması - Uzak Bellek Kaybı: Çocukluk ve gençlik dönemine ait olayların unutulması (İlkokul öğretmeni, okuduğu okullar, evlilik vs) - Dikkat Zayıflığı: Zihin toplayamama - Görsel-Mekansal İşlevlerde Kayıp: Yabancı-tanıdık mekanlarda kaybolma - Dil (lisan) Bozukluğu: Kelime bulma, anlama, okuma ve yazmada güçlükler - Yürütücü İşlevlerde Zorluk: Problem çözme, yargılamada güçlükler ve soyutu algılayamamak - Apraksi: Sonradan öğrenilen motor beceri gerektiren hareketleri yapamama (alet kullanma, giyinmede güçlükler,vs) - Agnozi: Bedeninin çeşitli bölümlerini ve nesnelere tanıyamama, birbirinden ayıramama
<p>Davranışsal Belirtiler:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Kişilik bozuklukları: Sosyal uyumsuzluk, apati ve disinhibisyon - Duygu bozuklukları: İsteksizlik, asabilik, üzüntü ve huzursuzluk - Algı Bozuklukları: Halisunasyonlar - Düşünce Bozuklukları: Hırsızlık, sadakatsizlik ve diğer halisunasyonlar
<p>İşlevsel Belirtiler:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Günlük Yaşam Aktivitelerini Gerçekleştirememe: İş hayatı, ekonomik işler, seyahat, sosyal ilişkiler ve alışverişte zorluk çekme - Evde Günlük Yaşam Aktivitelerini Gerçekleştirememe: Hobiler, ev aletleri kullanma, yemek pişirme, diğer ev işlerinde zorluk çekme - Kendi Bakımını Gerçekleştirememe: Yemek yeme, temizlenme, giyinmede zorluk çekme

Hastadan ve hastanın yakınından birlikte hastalığın öyküsü alınmalıdır [18]. Devamında mental ve nörolojik muayene yapılır. Mental durum muayene sonuçları incelenirken hastanın eğitim düzeyi ve kültür seviyesi dikkate alınmalı ve değerlendirmeler ona göre yapılmalıdır. Hastanın davranışları da dikkatli incelenir. Tüm laboratuvar testleri ve yukarıda belirtilen incelemeler sonucunda hastalığa teşhis konur. Yapılan testler arasında biyokimya laboratuvar testi; kan testi, tiroid fonksiyon ölçümü, vitamin B12 testi ve kranyal BT incelemesi bulunmaktadır. Tercihen MRG incelemesi de yapılmaktadır. Ayrıca aile öyküsünde AH hastalığı bulunan bireylerde genetik incelemeler de yapılabilir [19]. İlerleyici bir hastalık olması sebebiyle, AH demans şiddetine göre altı klinik evreye ayrılmaktadır [20]. Bu evreler tablo 2’de yer almaktadır.

Tablo 2 Alzheimer Hastalığı Klinik Evreleri

a) Preklinik evre
b) Erken “şüpheli” AH
c) Hafif evre AH
d) Orta evre AH
e) Ağır evre AH

AH’nın ilk evresi olan Preseptomatik dönemde otopsi yapılan hastaların beyninde yavaş ilerleyen bir patolojik yapı tespit edilmiştir. Fakat bu hastaların davranışlarında ve günlük faaliyetlerinde azalma gözlenmemiştir. Preklinik safhada, nöropsikolojik testler aracılığıyla bellekte kolaylıkla fark edilemeyen kayıplar tespit edilebilir. Ama bu kayıplar bireyin günlük faaliyetlerinde görünürde bir aksamaya neden olmaz [21, 22].

Bir sonraki evre olan Hafif (Erken) Dönem AH’nda, semptomların başlaması sinsi bir şekilde seyredir. Genellikle hastalığın başlangıç aşaması net olarak tespit edilemez. Semptomlar unutkanlıkla başlar. Hastalar doktora başvurduğunda kognitif bozukluğun yıllarca ilerlediği fark edilir. Hafıza kaybı erken evrede görülen en önemli belirtidir. Hasta iş hayatında, özel yaşantısında ve karar vermede sıkıntılar

çekmeye başlar. Unutkanlığın başlamasıyla yeni öğrenilen bilginin kaydında sorun yaşanır. Bu da konuşulanların unutulmasına, konulan eşyaların yerinin bulunamaması gibi sıkıntılara yol açabiliyor. Fakat geçmiş döneme ait hafızada sorun yaşanmaz. Unutkanlıkların artmasına paralel olarak diğer kognitif faaliyetlerdeki bozulma işaretleri de fark edilmeye başlanır. Az da olsa hastalarda mekan ve zaman uyumunda sorunlar yaşanmaktadır. Hasta aşına olduğu yerleri bile bulmakta zorlanır, yardıma ihtiyaç duyar. Bildiği konuları hatırlamakta zorlanır. Günlük işlerini yapmaya devam eder fakat eski itinaı gösteremez. Problem çözme ve yargılama kabiliyeti bozulur. Öğrenme ve komplike işleri yapmakta güçlük çeker. Kaliteli uyku uyuyamaz. Bu aşamada, dış görünümü ve temizlik gibi hayati ihtiyaçlarını görmede önemli bir sorun yaşanmamaktadır. Ama taşıt kullanma, banka hesap işleri ve cihaz kullanma gibi faaliyetlerde yavaş yavaş sorun yaşamaya başlar ve giderek daha az verimli olur. Lisan bozuklukları, sözcükleri hatırlamada zorluk çekme ve bekleyerek konuşma ile sözlü ve yazılı anlatımda azalma görülür. Çevreye duyarsızlaşmayla birlikte sosyal kişiliğinde değişikliklere rastlanabilir. Bu belirtilerde hastalığın göstergesi olabilir. Mini Mental Durum Testleri (MMDT) sıklıkla kognitif durum tarama testinde eğilimli vakalarda çoğunlukla 20–25 arası puan gözlenmektedir [23-25]. Nörolojik muayenelerde farklılıklara rastlanmamaktadır.

Ekseriyetle hastalık başladıktan sonra 4 ila 7 yıl sonra AH'nın orta dönemi yaşanır. Hasta dışarıdaki bağımsız yaşantısını kaybederek çevresindeki insanlara bağımlı hale gelir ve durum giderek artar. Yeni bilgi öğrenmek neredeyse imkansız hale gelmiştir. Hasta çevresindekilerin kimliklerini ve akrabalık derecelerini ayırt edemeyebilir. Algılama, okuma ve yazma git gide azalır. Hafıza kaybının sebep olduğu unutkanlık gittikçe çoğalır. Tanıdığı ve bildiği yerlerde bile kaybolabilir. Kıyaslama, sorun giderme, günlük faaliyetleri yerine getirme giderek bozulmuştur. Bu aşamada araç kullanma ve diğer karışık faaliyetler yapılamamaktadır. Konuşma fonksiyonu daha da bozulur. Cümleleri tamamlayamaz ve boşluklar vererek konuşur. Çevredeki insanlar hastayı anlamakta zorlanır. Bütün hastalarda olmasa bile yıkıcı davranışlar gözlenebilir. Hırsızlık (örneğin bulamadığı eşyasını çalındığına dair yargı), terk edilme duygusu ile yalnız kalmaktan korkar ve yakınlarını sürekli çevresinde ister. Ayrıca, sadakatsizlik hezeyanları, kendini acındırma, mutsuzluk

hali, tedirginlik, hareketlilik, zaman kavramının karışması (gece-gündüz ayıramama), uyku düzensizlikleri, sözlü taciz ve fiziki saldırganlık, ileri düzeyde şüphe ve halüsinasyonlar gözlenir. Bu süreç hasta yakınları için sıkıntılı bir evredir. Hastanın bu dönemde tedavi kurumlarından birine yatırılması gerekebilir. Mini Mental Durum Testleri 10–19 puan arasındadır. Tomografi ve MR sonuçları normal veya hafif atrofiktir [26].

AH'nın Ağır (Geç) Döneminde hastan hayati temel işlevlerinde tamamiyle bağımlı hale gelmiştir. Hasta akrabalarını tanıyamadığı gibi aynada görüntüsünü bile tanıyamaz hale gelir. Hayati fonksiyonlarında (yemek yiyebilme, yıkanma, giyinme) gibi temel gereksinimlerde tam bağımlı hale gelmiştir. Motor işlevlerdeki hasar sonrasında ekstrapiramidal fonksiyon bozuklukları, nöbetler ve denge kaybı görülür. Bu evrenin sonunda yutma güçlüğü de gözlenir. Üriner ve fekal inkontinans mevcuttur. Son aşamada hasta hiç birşeyi algılayamaz ve yatağa bağımlı hale gelir. Disfaji ve kilo kayıpları gözlenir. Temel nörolojik muayenede tonus değişiklikleri, parkinsonyen belirtiler izlenir. Mini Mental Durum Testleri 0-9 arasındadır. Pulmoner emboli, pnömoni, ürosepsis, aspirasyon ve yeterli beslenememe gibi sebeplerden dolayı yaşamı sona erer [3, 23, 27].

2.1.4 Alzheimer Hastalığının Epidemiyolojisi

Demans çeşitlerinin %50-60'ını AH oluşturur. Demansın en çok rastlanan formudur. Genellikle gelişmiş ülkelerde 60-64 yaşlarında demans sıklığı %1'in altındadır. Yaşlanma ile 85 yaş ve üzerindeki kişilerde bu oran %24-33 aralığına yükselir.

Araştırmalar sonucu 2001 senesinde 24 milyondan fazla insanın demanstan etkilendiği tespit edilmiştir. Bu oranın her yirmi yılda bir ikiye katlanacağı tahmin edilmektedir. Ayrıca ortalama yaşam süresinin artmasıyla birlikte 2040'ta 81 milyona ulaşabileceği öngörülmektedir. Yapılan araştırmalarda, Türkiye'deki demans hastalarının %48.8'nin Alzheimer tipi demans olduğu saptanmıştır [28, 29].

2.1.5 Alzheimer Hastalığının Patogenezi ve Nöropatolojisi

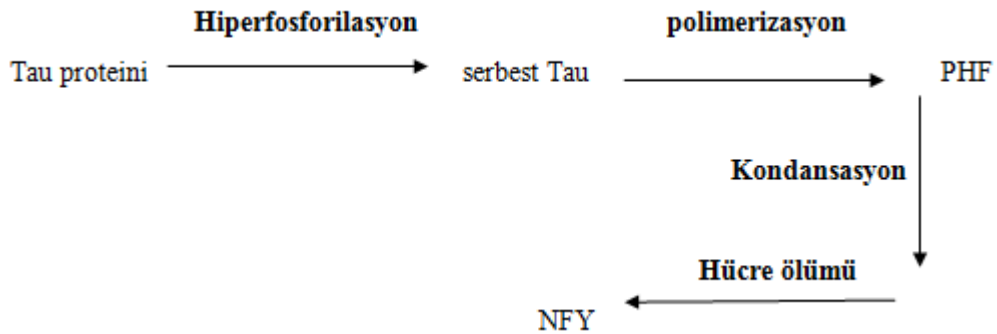
Demansın önemli bir bölümünü oluşturan AH progresif nörodejeneratif bir hastalıktır. AH, histopatolojik ve morfolojik olarak hücre dışında A β plaklarının oluşumu ile, hücre içinde ise nörofibrilar yumakların (tau) birikiminin gözleendiği bir hastalıktır. Bu oluşumların AH'daki nörodejenerasyonda önemli bir rol üstlendiği düşünülmektedir [4, 30]. Yapılan histopatolojik çalışmalar sonucunda hastaların beyinlerinin hipokampus ve neokorteks gibi farklı alanlarında senil plakların ve nörofibriler ipliklerin oluştuğu görülmüştür. Ayrıca geniş sinir hücresi kaybına rastlanmıştır. Sinaps kaybı, sinir hücresi kaybı, nörofibriler yumaklar, amiloid plaklar, kolinerjik innervasyonun kaybı, gliozis-inflamasyonun kaybı ve diğer nörotransmitterlerin kaybı AH'nın nöropatolojisindeki etkenler arasındadır [31].

Genetik ve çevresel faktörlerin rol aldığı AH patogenezi karmaşık hastalıktır. Genellikle kalıtsal AH'nda bazı spesifik proteinlere rastlanmıştır [28]. AH patogenezinde beta amiloid peptidin, tau proteinlerinin ve Apolipoprotein E (APOE) proteinlerinin etkili olduğu gözlenmiştir [32]. Çeşitli dokularda A β 'nin prekürsör proteini olan β Amiloid prekürsör proteininin (APP) eksprese edildiği tespit edilmiştir. Stres, büyüme hormonları, sitokinler gibi farklı ajanlarla APP ekspresyonu tetiklenebilmektedir [33].

2.1.6 Nörofibriller yumaklar

Fosforile tau proteinleri AH'daki nörofibriller yumakların (NFY) ana bileşeni dir. Tau proteini çoğunlukla sinir hücrelerinde görülmekle beraber çekirdekli olan hücrelerde bulunmaktadır. Bu protein, mikrotübüllere bağlanarak mikrotübüllerin oluşmasında görev alır. Tau 17. kromozomdaki Mikrotübül Asosiyasyon Protein Tau (MAPT) geni tarafından kodlanır. Bu gen 16 ekzondan oluşmaktadır. Tau molekül ağırlığı az olan bir proteindir. Mikrotübül oluşumu, hücre iskeletinin formunun korunmasında ve aksoplazma iletiminin sağlanmasında görev alır. Araştırmalar sonucunda hiperfosforillenmiş tau proteinlerinin NFY'nin yapısında bulunduğu gösterilmiştir [34]. Yetişkin bir insanın beyinde tau proteininin altı farklı izoformu

görülmektedir [35, 36]. Nörodejenerasyon aşamasında tau proteini normalden fazla olarak fosforillenir. Yapılan çalışmalarda tau proteininin 39 farklı bölgeden fosforillenebildiği tespit edilmiştir. Tau proteinlerinin modifikasyonları sonucu mikrotübüllere bağlanmasında azalmaya sebep olduğu ve bununda aksonal taşımada aksaklıklara neden olduğu düşünülmektedir [4, 37, 38]. Sinir hücresi tahribatının en çok olduğu beyin kısımlarında NFY'ler görülür. NFY'ler demansın şiddeti ile bağlantılıdır [34, 39, 40]. Birinci kromozomda bulunan tau gen mutasyonlarının sebep olduğu "Frontotemporal Demans" hastalığında, AH'de gözlenen NFY'lere rastlanmıştır. Nörodejenerasyonun sadece frontal ve temporal bölgede gerçekleştiği durumlarda Amiloid Beta ($A\beta$) patolojisi gözlenmez. Bu tespitler hastalığın başlangıcında "amiloid hipotezinin" olduğu ve tau ile bağlantılı patolojinin akabinde oluştuğu ihtimalini desteklemektedir [37, 41]. AH patogenezinde kinazlar ve fosfatazlar tau proteininin hiperfosforilasyonuna sebep olarak mikrotübüllere bağlanma ilgisini azaltırlar. Bağlanmamış fosforile tau çözülemeyen çift sarmallı filamanlara (PHF) polimerize olur. Bu oluşumlar gittikçe sinir hücrelerinin içerisinde NFY'ler şeklinde çoğalırlar. NFY'ler bir süre sonra hücre iskeleti bütünlüğünü ve aksonal taşımayı bozarak hücre ölümüne sebep olur [34] (Şekil1).

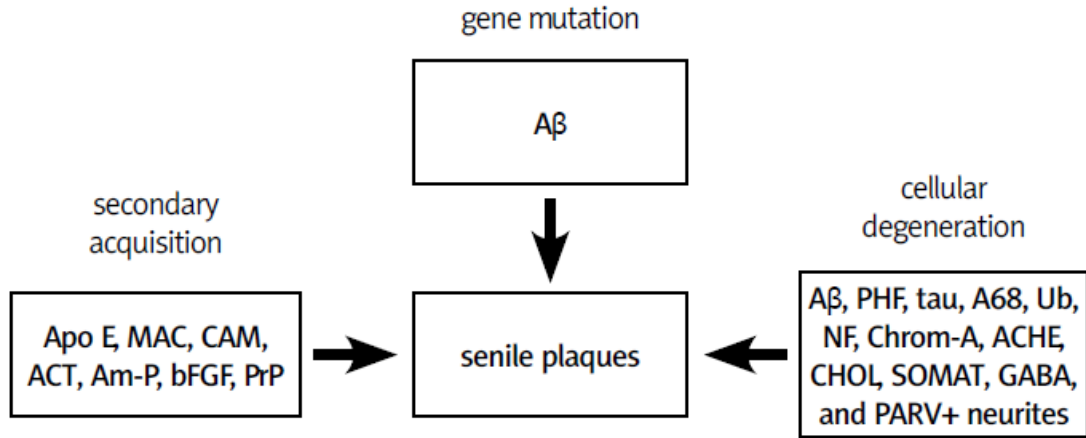


Şekil 1 Nörofibriler Yıkımın Aşamaları

2.1.7 Amiloid plaklar

AH, senil plaklar olarakta adlandırılan amiloid beta ($A\beta$) plaklarının birikimi ve hiperfosforile tau protein içerennörofibriller ile karakterize bir hastalıktır.

Ekstraselüler β -amiloid fibrillerin birikimi ile senil plaklar oluşur. Akut evre proteinleri olan α -antichymotrypsin [42], α 2-macroglobulin [43], mediator interleukin-6 [44], hücre içi adhezyon molekülleri örnek CAM1 [45], apolipoprotein E (apoE), apolipoprotein D [46], vitronectin [47], tamamlayıcı protein C1q, C4 ve C3 [48], katepsin B/D [49], bazı glia hücreleri olan astrosit ve mikroglia [50] gibi birçok molekül ile senil plaklar ilişkilidir. Plaklar allocortex, bazal ganglionlar, beyin sapı ve beyincik gibi insan beyninin çeşitli yerlerinde gözlemlenebilmesine rağmen primer sensor, motor ve görsel bölgelerde oluşan plak oluşumu Alzheimer hastalığında semptomatik değildir [51] (Şekil2).



Şekil 2 AH'nda Senil Plak Oluşumunda Yer Alan Proteinler

A β (amyloid Beta), ACHE (acetylcho- linesterase), ACT (α 1-antichymotrypsin), Am-P (Amyloid-P), Apo E (Apolipoprotein E), bFGF (basic fibroblast growth factor), CAM (cell adhesion molecule), CHOL (cholinergic), Chrom-A (chromogranin-A), GABA (γ -amino butyric acid positive neurites), MAC (membrane attack complex), PARV (parvalbumin positive neurites), PrP (prion protein), SOMAT (somatostatin positive neurites), Ub (ubiquitin) [52].

Kan damarlarının ve beyindeki sinir hücrelerinin dış çeperinde toplanan amiloid beta (A β) peptid birleşiklerinin amiloid plakların temelinin oluşturduğu bilinmektedir [53]. 19. kromozomdan kodlanan ve tam olarak görevi tespit edilemeyen bir transmembran protein olan APP'nin metabolizma ürünleri Amiloid beta (A β) proteininin oluşumunda yer alır. APP normal şartlar altında sinir hücresi transmembran proteindir. APP'nin, nöronal stres veya hasar ile doğal nöroprotektif ajan olduğu düşünülmektedir. Ayrıca, APP'nin glutamat eksitoksisitesinden sinir

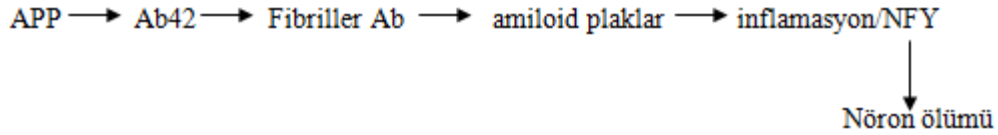
hücrelerini koruyup, Ca²⁺ konsantrasyonunu indirgeyerek, nöronal stres veya hasardan doğal sinir hücresi koruyucu olduğu düşünülmektedir.

Alfa, beta ve gama sekretazlar olarak bilinen üç proteaz, APP metabolizmasında rol alır. Alfa sekretaz APP'yi, A β bölgesinin ortalarında bulunan ekstraselüler bölgeden keserek tam bir A β parçasının oluşumunu olanaksız hale getirir. Beta ve gama sekretazlar, sırasıyla, A β bölgesinin hemen dışındaki, N- ve C- uçlarında işlevlerini göstererek, tam A β 'yı bölerek ortaya ürünleri çıkarırlar. Gama sekretazın işlevini yaptığı kesim bölgesine göre, oluşan A β parçası, 39–40 aminoasitlik kısa bir parça veya 42–43 aminoasitlik uzun bir parça olabilir. Uzun A β , çözünürlüğü olmayan lifler oluşturmaya daha yatkın olmakla birlikte nörotoksisite olasılığı daha yüksektir. Çözünürlüğü potansiyel olarak bulunmayan ve plaklara çökelebilen A β 17–42 parçası, diğer bir APP parçası alfa ve gama sekretazların ortak etkisiyle oluşur. Neticede, alfa sekretaz aktivitesiyle hücre kültürlerinde sinir hücreleri üzerinde nörotrofik etkileri gösterilmiş olan çözünebilir APP oluşmaktadır. β ve gama sekretazların aktiviteleri sonucunda ise etkin bir şekilde bölgesel nörotoksik tesir gösteren katı ve nöritik β kıvrımlı plaklar [agregatlar] meydana gelmektedir [54]. Bu β kıvrımlı plakların serebral neokortekste çok veya orta sıklıkta gösterilmeleri AH'nin kesin tanısı açısından lüzumludur [55].

J. Hardy tarafından öne sürülen “amiloid kaskadı hipotezine” göre beyindeki A β üretimi ve yıkımı arasındaki dengesizlik hastalığın önemli nedenlerindedir [56, 57]. Ancak bugün “amiloid kaskadı hipotezi”, hastalığın şiddeti ile amiloid plak sayısı arasında korelasyonun olamaması ya da kognitif bozukluğu olmayan hastalarda amiloid plakların gözlemlenmesi gibi yeni bulguları açıklamada yetersiz kalmaktadır [34, 58]. Yapılan son çalışmalar, çözünen oligomerik A β düzeyleri ile kognitif bozulma arasında daha iyi bir korelasyon olduğunu göstermiştir [58]. Ayrıca *in-vitro* çalışmalar oligomerik A β türlerinin, fibriler türlerden daha toksik olduğunu göstermiştir [59].

Amiloid plak formasyonu, İnflamasyon ve Nörofibriler iplikcikler olmak üzere iki yolakla sinir hücresi ölümünde etkin rol oynar. Beyin hücrelerinin iki tipi

olan astrositler ve mikroglialar, immün/inflamatuar yanıtta etkilidir. Aktive olmuş mikroglia hücreleri serbest radikallerle birleşir. Aktive olmuş astrosit ve mikroglialar sinir hücrelerinin ölümüne neden olur [60] (Şekil 3).



Şekil 3 Nöron Ölümü

AH, 3 aşamada karakterize edilir. 1. evre; amiloid oluşumu ağırlıklı olarak frontal, temporal ve occipital lobların bazal bölümlerinde gözlenir. 2. Evrede tüm izocortical association bölgesinde plak formasyonu gözlenir. 3. Evrede, striatum, talamus, hipotalamus, subtalamik nukleus ve kırmızı nucleus gibi beyincik ve subkortikal nuclei moleküler tabakasında plakların varlığı gözlenir [61].

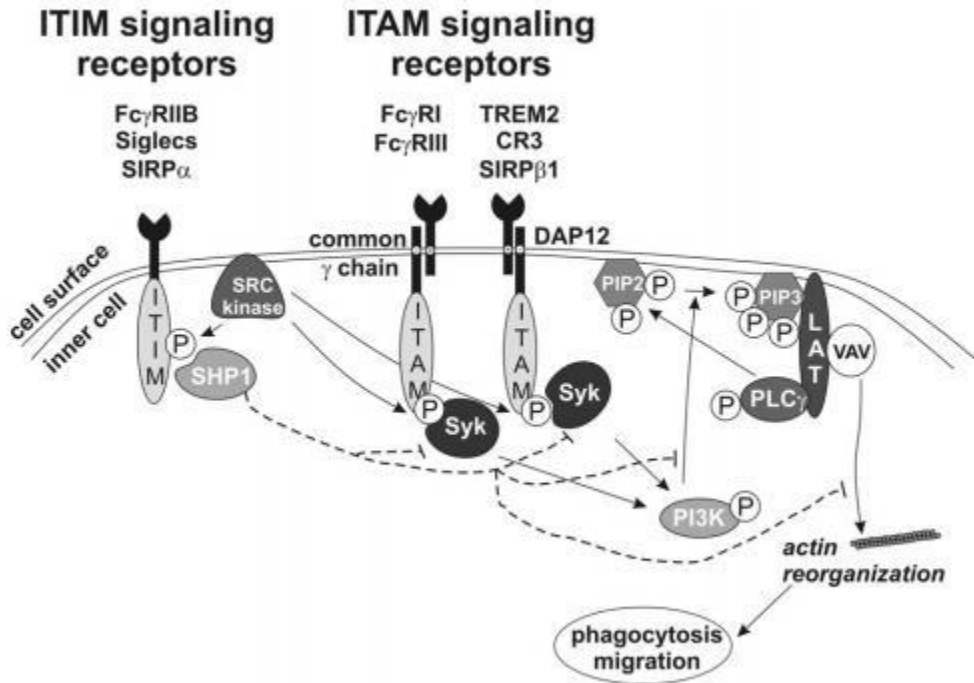
2.1.8 Mikroglia

Mikroglia and astrositler gibi beyindeki hücrelerle AH'nda oluşan plakların yakın ilişkisi vardır [62]. Mikroglia hücreleri, merkezi sinir sisteminde bulunan bağışıklık hücreleridir ve beynin doğuştan gelen bağışıklık sisteminden sorumludur. Prenatal mikrogliaların mezenkimal hücrelerden türediği bilinmektedir. Embriyonik gelişim döneminde, mikroglia ilk kez neuroepitheliumda görünür ve ikinci perinatal aşamasına kadar beyni doldurur. Ayrıca, mikroglia göçü sadece embriyonik gelişim döneminde oluşmaz. Enfeksiyonların veya patolojik durumların meydana gelmesi ihtimaline karşın hasarlı dokuya göç ederler.

Patojen ya da doku hasarı mevcutken microglia morfolojisini değiştirir ve reaktif oksijen türleri gibi sitotoksik molekülleri salgılayan pro-inflamatuar hücre tipini oluşturur. Ayrıca, mikroglia hücreleri onkojen kökenli beyin hücrelerini fagositoz etme özelliğine sahiptir ve immün hücrelerini aktive eder. Merkezi sinir sisteminde (CNS), fagositozu düzenleyen farklı türlerde reseptörler sentezlenir.

Moleküle göre düzenleyici reseptörlere bağlanır, ve ITAM (immunoreceptor tyrosine-based activation motif) veya ITIM (immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif) yolağı aktive edilir [63]. Miyeloid hücreler yaklaşık 20 ITAM sinyal reseptörlerini eksprese eder[64]. Transmembranda iki ITAM aktivatör reseptör ve adaptör protein bulunur. Ligandın bağlanması ile, bu iki reseptörün ilişkisi Src kinazının aktivasyonuna yol açar. Src kinazın aktivasyonu, ile Syk kinazların fosforilasyonunu izler.

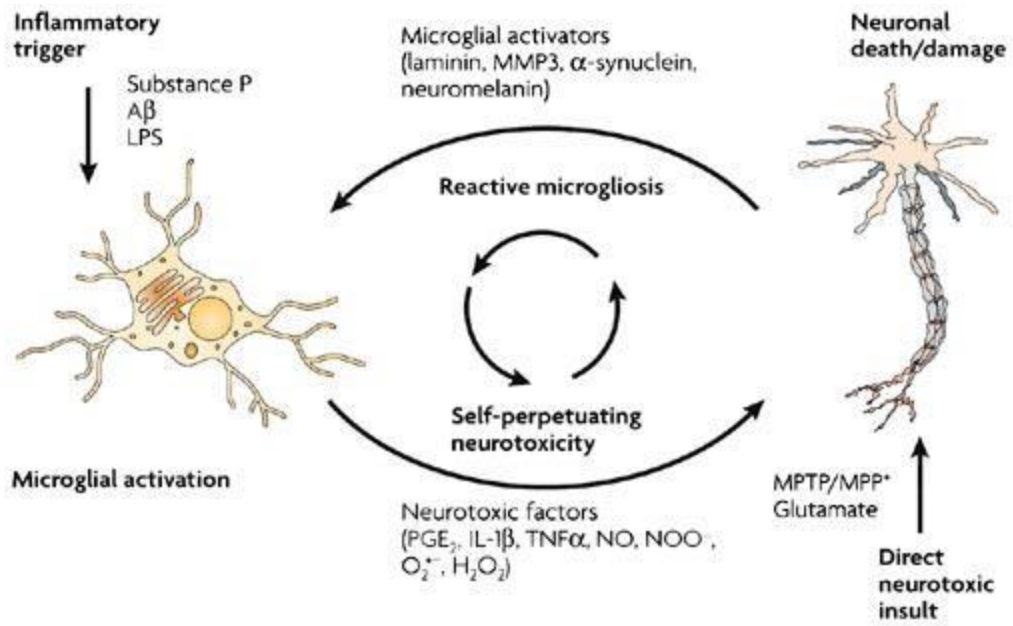
Aktivasyon ve fosforilasyon olayları dizisi fagositoza ve aktinlerin yeniden organize olmasıyla mikrogliaların göçüne neden olur. Ayrıca, ITIM sinyal molekülleri, ITAM sinyal yolağını fosfataz aktivitesi ile karşı-regüle eder [65]. Bu sinyal yolakları negatif ve pozitif mikroglia aktivasyonu arasında denge oluşturur (Şekil 4). Yolaklar ne zaman düzgün çalışmazsa, mikroglial fagositozun bozulmasına bağlı olarak bazı sorunlar ortaya çıkmaktadır [66].



Şekil 4 Mikroglia Sinyal Yolağı

ITAM sinyalleri mikroglia aktivatory sinyallemeği başlatarak fagositoz ve göçe sebep olur. ITIM sinyalleri ise ITAM ara sinyal moleküllerini defosforile ederek önleyici sinyallere neden olur [67].

Mikrogliaların AH ile ilişkisi birçok çalışmada gösterilmiştir [68]. AH dokularında yapılan otopsi sonrası A β içeren plaklar etrafında aktive olmuş mikrogliaların varlığının arttığı gözlenmiştir [69]. Başlangıçta, mikrogliaların artışı nöronal ölüme mikroglial tepki olarak kabul edildi. Fakat daha sonraki çalışmalar, A β karşı bir tepki olarak mikrogliaların arttığı anlaşılmıştır [70, 71]. Ve bu tepkinin sinir hücrelerine toksik etki yaptığı anlaşılmıştır [72, 73]. Buna ek olarak, yapılan hücre kültürü çalışmalarında, mikrogliaların fagositoz yoluyla A β 'lerin uzaklaştırılmasında rol aldığı tespit edilmiştir [74] (Şekil 5). Ayrıca, en başarılı amiloid temizleme tedavilerinin mikroglia aktivasyonu ile doğrudan bağlantılı olduğu bulunmuştur [75].



Şekil 5 Overaktif Mikroglia Sinir Hücrelerine Toksik Etki Yapabilir [76].

Mikroglial hücreler; TLRs (Toll-benzeri reseptörleri), mikroglial fagositozu ve inflammatuar yanıtları indüklemeye yeteneğine sahip olan scavenger reseptörleri bulundurur [77]. Bu tür reseptörler patojenik moleküler paternleri (PAMPs) ve ökaryotik hücrelerin dış yüzeyi üzerinde glikoproteinlerin ve lipidlerin meydana getirdiği değişiklikleri algılar [78]. İnsan beyni β -amiloidlere bağlanabilen ve amiloid fibril oluşumunda yer alan siyalikleşmiş glikolipit ve gangliosidler açısından

zengin bir kaynaktır. Nöritik plaklar cluster ve APOE proteinleri gibi yüksek derecede siyalikleşmiş protein ve lipidler içerir [79].

Çünkü bu yüksek derecede siyalikleşmiş bileşim β -amiloid olarak toplanması plakların immun sistemden kaçmasına yol açabilir [80]. AH'nda Siglec11 ve CD33 ile ilgili SIGLEC'lerin bağışıklıktan kaçmada rol aldığı düşünülmektedir [81].

2.1.9 Alzheimer Hastalığının Etiyolojisi

Geç oluşan Alzheimer hastalığının etiyolojisi multifaktöriyeldir. Birçok genetik ve çevresel faktörler AH'nın başlangıç ve sürecini belirlemektedir. Bu faktörlerin AH ile bağlantısı net olarak bilinmemektedir [82].

Demans çeşitlerinde olduğu gibi AH'nda da, yaş mühim bir risk faktörüdür. AH'nın prevalansı 60 yaşın altında enderken, 85 ve üzeri yaşlarda ortalama %50'yi bulur. AH, erkeklerde kadınlara oranla daha az rastlanır. Yapılan araştırmalarda, istatistiklere göre kadınlarda AH'na daha çok rastlanmasının sebebi olarak yaşlı kadın nüfus oranının erkeklere oranla daha fazla olmasından olduğu tespit edilmiştir [83]. Genetik riskte demans öyküsünde önemli bir faktördür. Anne, baba, kardeşleri arasında AH olan kişilerin AH'na yatkınlık oranı yakınlarında AH olmayanlara göre 3-4 kat daha fazladır [84]. Eğitim seviyesi düşük olan bireylerde AH insidansı 1.5 kat arttırdığı gözlenmiştir [85]. Uzun süreli alkol tüketimi, baş travmaları, kalp-damar hastalıkları ve diğer risk faktörlerinin de AH riskini yükselttiği bilinmektedir [55, 86]. AH'nın birçok çeşidi multifaktöriyel olmasına rağmen bazı ailesel AH'nın otozomal dominant geçiş gösterdiği bilinmektedir [60].

2.2 Alzheimer Hastalığının Genetiği

Genel olarak AH'nın iki türü bulunmaktadır: Geç başlangıçlı sporadik AH ve erken başlangıçlı AH

2.2.1 Erken Başlangıçlı Alzheimer Hastalığı ile İlişkili Genler

APP, PSEN1 ve PSEN2 genlerinde bulunan mutasyonların erken başlangıçlı AH ile bağlantılı olduğu saptanmıştır. Bu proteinlerin nöronal plastisitede rol aldıkları bilinen transmembran proteinlerdir [87, 88].

2.2.1.1 Amiloid Prekürsör Proteinden (APP)

Erken gelişen Alzheimer hastalığı için etkili kabul edilen ilk gen APP'dir. Bu gen kromozom 21q21.2'deki bir gen bölgesi tarafından sentezlenmektedir. APP'den Beta amiloid peptit oluşmaktadır. APP'nin aminoasit diziliminde valin yerine izolösin, fenilalanin ya da glisin değişimi olması mutasyona neden olur. Bu da amiloid depolanmasında rol oynar. Ve sonuç olarak bu erken yaşta AH'nın görülmesine yol açmaktadır [89]. APP tüm hücrelerde 2 major yolla aşamalı olarak metabolize edilir. Hücrelerde en çok görülen yolak alfa sekretazın kestiği ve N-truncated A β peptidin oluştuğu yolaktır. Bu kesme işlemini bazen farklı enzimler yapar. Genellikle beta-sekretaz ve gama-sekretaz 40 ve 42 aminoasitlik A β izoformlarının oluşumuna neden olurlar [33, 90].

2.2.1.2 PSEN

PSEN1 kromozom 14q24.3'deki gen bölgesi tarafından sentezlenirken, PSEN2 kromozom 1q42.1'deki gen bölgesi tarafından sentezlenmektedir. Her iki PSEN'de primer olarak sinir hücrelerinde ve daha az oranda glia hücrelerinde bulunur. 1995'te yapılan çalışmalar sonucunda PSEN1 ve PSEN2'nin Alzheimer üzerinde etkili olduğu belirlenmiştir. Bu genler, 467 ve 448 rezidüden oluşan 7-9 transmembran domainden oluşan polipeptid oluşturmaktadır. Bu polipeptidlerin tam fonksiyonları henüz net olarak bilinmemektedir [91]. PSEN'lerin ekspresyonu yaş ilerledikçe azalır. Sinir hücrelerindeki bu azalma, AH'nın gelişiminde etkilidir. Bunun tersine, astrositler PSEN seviyesine göre nörodejenerasyonda etkilidir [33]. PSEN1 rezidüleri endoplazmik retikulum/golgi kompleksinde bulunmaktadır[92]. PSEN ekspresyonundaki küçük bir değişim AH patolojisi ve APP'nin üretimi için

major etkili olabilmektedir. Apoptozis boyunca PSEN1 ekspresyonunun azaldığı, PSEN2 ekspresyonunun da arttığı belirlenmiştir [33]. Özellikle, PSEN1 ekspresyon seviyesinin azalmasının Alzheimer hastalığında etkin olduğu bilinmektedir [33, 60].

2.2.2 Geç Başlangıçlı Alzheimer Hastalığı ile İlişkili Genler

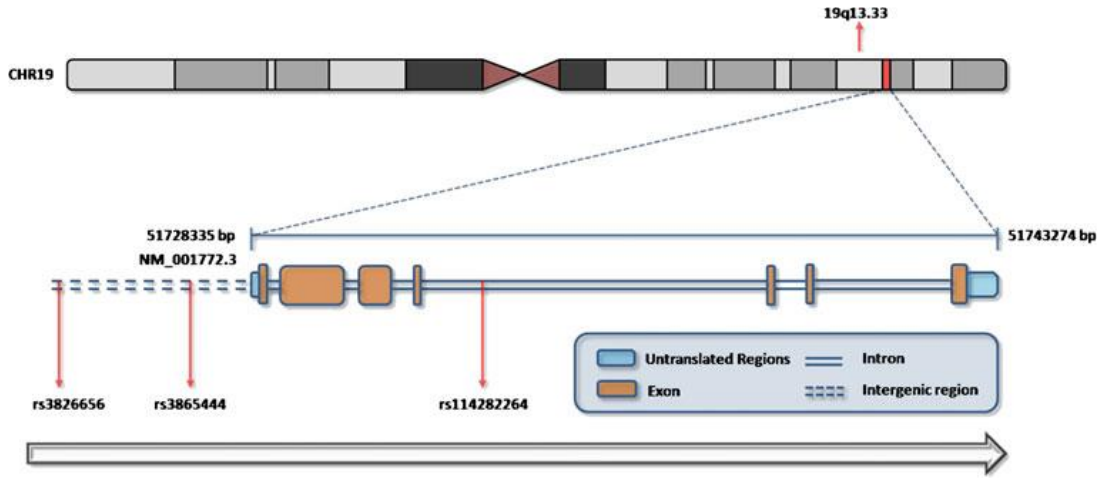
Alzheimer Hastalığı Genetik Konsorsiyumu (ADGC) tarafından geç başlangıçlı AH'lerde yapılan GWAS'a göre geç başlangıçlı AH'ye yatkınlık oluşturduğu düşünülen 10 gen bildirilmiştir; APOE, CR1, CLU, PICALM, BIN1, EPHA1, MS4A, CD33, CD2AP ve ABCA7 [93]. GBAH gibi kompleks ve heterojen hastalıklar basit kalıtım kalıbına sahip değildir. Bununla ilişkili olan çoklu minör genlerde meydana gelen mutasyonlar ve polimorfizmler, hem birbirleriyle hemde genetik olmayan faktörlerle ilişkilidirler [94].

2.2.2.1 Cluster of Differentiation 33 (CD33)

CD33, 67 kDa'lık tip I transmembran glikoproteinidir [95]. Sialik asit bağlanan Ig benzeri lectin (SIGLEC) ailesinin üyesi olan CD33 geni 19q13.33 lokasyonunda bulunmaktadır ve transmembran reseptör kodlamaktadır. CD33 geni 18,797 baz çiftinden (bc)'den ve 7 ekzondan oluşmaktadır [96] (Şekil 6).

CD33 proteini, sialik asidin tanınmasından sorumlu hücre dışı N-terminal V-set immüoglobulin domaininden ve C2 tipi immüoglobulin tekrarından oluşur. İnsan CD33 proteinini iki korunmuş sitoplazmik tirozin temelli motifleri vardır: Membran-proksimal immüno reseptör tirozin bazlı inhibisyon motifi (ITIM) ve distal membran ITIM benzeri motif. ITIM ve ITIM-benzeri motifler inhibitör sinyal transdüksiyonunda görev alır [96].

CD33clatrin bağımsız endositoz aracılığıyla immün hücre-hücre etkileşimleri tetikler [97]. CD33 Hücre-hücre etkileşimlerini tetiklediği gibi immün hücrelerin normal fonksiyonlarını inhibe eder [96]. CD33, karbohidrat-bağlayıcı protein olan ve hücrel aktiviteyi inhibe eden lektin gibi işler görür [95].



Şekil 6 CD33 Geninin Şeması [96]

2.2.2.1.1 CD33 Sentez Yerleri

CD33 birçok farklı hücre tarafından sentezlenir. CD33, bağışıklık ve hematopoetik hücrelerden salgılanır. Siglec (glikolipidlerin, glikoproteinlerin sialik reziduları tanımak) aracılığıyla yapılan hücre-hücre etkileşimleri immün yanıtları inhibe edebilir veya kısıtlayabilir. CD33; immün ve malignan hücrelerde adhezyon, endositoz, monositler tarafından sitokin salınımının inhibisyonu ve immün hücre büyüme gibi çeşitli hücresel süreçlerde yer almaktadır [98]. CD33; myeloid progenitor hücrelerde, olgun monositlerde ve makrofajlarda ekspres olur [95].

2.2.2.1.2 CD33 ve Alzheimer Hastalığı

Son yıllarda yapılan çalışmalarda, Siglec-3 olarak adlandırılan CD33 geni AH çok önem kazanmıştır. CD33 geninde rs3865444 tek nükleotid polimorfizmi (SNP) geç başlangıçlı AH (LOAD) ile ilişkilendirilmiştir [99].

CD33 geni, GWAS (genome-wide association studies) çalışmalarında Alzheimer hastalığına dair orjinal risk faktörleri arasında tespit edilmiştir [100].

Yapılan GWAS (genome-wide association study) çalışmalarında, CD33 geninde (-373 G/T) bulunan rs3865444 polimorfizminin Alzheimer hastalığı ile ilişkili olduğu ortaya konmuştur [101].

CD33, AH patogeneğinde potansiyel kilit rol oynar. CD33'ün insan beyinde mikroglialarda eksprese olduğu gösterilmiştir. Bu ekspresyon Amiloid Beta 42 (A β 42) mikroglial alımını inhibe ederek A β patolojisi teşvik eder. Özellikle, bu yeni bulgu, AH'nın yeni tedavi yaklaşımları için uygulanmaktadır [102, 103].

CD33 geninde bulunan rs3865444C risk alelinin Alzheimer hastalığına yatkınlık oluşturduğu tahmin edilmektedir. rs3865444C alelinin, genç ve ileri yaş bireylerin monositlerinde daha fazla hücre yüzey ekspresyonu yaptığı tespit edilmiştir [95].

CD33 lokusu değişmiş monosit fonksiyonu ile ilgili ilişkili bulunmuştur. Bu da doğuştan gelen immünolojiye dahil edilebilir dolayısıyla AH ilerlemesine neden olabilir. rs3865444 polimorfizminin artmış CD33 ekspresyonu ile ilişkili olduğundan kognitif bozukluk ve AH'ye sebep olabileceği önerilmektedir. CD33 genindeki mutasyonlar miyeloid fonksiyon bozuklukları ve amiloid patolojisi ile ilişkilendirilebilir. Böylece AH ilerlemesinde rol oynayabileceği düşünülmüştür [95]. Türk hastalarda ise CD33 geni rs3865444 polimorfizm daha önce araştırılmamıştır.

3 GEREÇ VE YÖNTEM

Bu araştırmada, Turgut Özal Üniversitesi Tıp Fakültesi Nöroloji Polikliniğine başvuran ve yapılan nörolojik muayneler ve Mini-Mental Durum Testi sonucunda Alzheimer Hastası tanısı almış 65 yas üstü hasta ve demans öyküsü bulunmayanaynı yaş grubu sağlıklı bireylerden toplanan periferik kanlar kullanıldı. 58 vaka ve 53 kontrol toplam 111 kişiden kan örnekleri toplandı. Vaka ve kontrol grubuna dahil edilen bireylerin istatistik analizi için gerekli olan bilgileri kaydedildi. Çalısmaya dahil edilen hasta ve kontrollere ait kan örnekleri Turgut Özal 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 yapıncaya kadar kısa süreliğine +4°C’de uzun süreliğine -70 °C’de saklandı.

3.1 Periferik Kandan DNA İzolasyonu

Periferik kandan DNA izolasyonu Fenol-Kloroform metodu kullanılarak yapıldı. Steril 15 ml’ lik falkon tüpüne 9 ml RBC Lysis Buffer (1x) ve üzerine 3 ml periferik kan konuldu. 10 dakika oda sıcaklığında inkübe edilip, 2000g’ de 10 dakika santrifüj edildi. Santrifüj edildikten sonra pellet korunacak şekilde, süpernatant yavaş yavaş dökülerek uzaklaştırıldı. Pelletin üzerine 350 µl 10-10 TE konuldu, pipetaj yapılarak pellet temiz bir ependorf tüpüne aktarıldı. Üzerine 20 µl %10 SDS ve 8 µl proteinase K(Qiagen Lot No:136259198) eklenip vorteks yapıldı. 15 dakika 70 °C’ de inkübe edildikten sonra örnekler 37 °C’ de overnight inkübe edildi. Overnight inkübasyon sonrası pellet tamamen çözüldükten sonra geri kalan işlemlere devam edildi. 5000 rpm’ de 15 dakika santrifüj edildi. Süpernatantın üzerine 20 µl 5 M NaCl konuldu. 400 µl Fenol(Sigma P4557) eklendi. 15000 rpm’ de 15 dakika 4 °C’ de santrifüj edildi. İki faz görüldü, üstteki şeffaf faz temiz bir ependorf tüpüne

aktarıldı. 400 µl CIA(Sigma C0549-1PT) eklendi hızlıca alt üst edildi. 15000 rpm' de 15 dakika 4 °C' de santrifüj edildi. İki faz görüldü, üstteki şeffaf faz temiz bir ependorfa aktarıldı. Bu aşama iki kez tekrarlandı. Santrifüj sonrası üstde ki şeffaf kısım temiz bir ependorf tüpüne aktarıldı. Üzerine 1ml %100 etanol eklendi ve DNA elde edildi. Elde edilen DNA %75'lik ethanolle yıkandı ve santrifüj edildi. Santrifüj sonrası etanol uzaklaştırıldı ve DNA 10-15 dk kurumaya bırakıldı. Son olarak 100 µl 1-1 TE koyularak DNA'nın çözünmesi sağlandı. DNA'lar spektrofotometrede ölçümleri yapıldıktan sonra -20 °C'de saklandı.

3.2 DNA Amplifikasyonu

PCR (Polymerase Chain Reaction) için CD33 genine spesifik aşağıda tablo3'te belirtilen forward ve reverse primerler dizayn edilerek sentezletildi ve rs3865444G/Tpolimorfizminin araştırılması için aşağıdaki primerler kullanılarak 354 bp'lik bölge çoğaltıldı (Şekil 7).

Tablo 3 CD33 İçin PCR'da Kullanılan Primerlerin Dizileri

Forward	5' CAG ACC CAC ACA TGC TCA GA 3'
Reverse	5' TCT TCT TTG TTT CTC TGC CCC A 3'

```

CGAGGGTCAGCTCGGCCCAGCCGACAACCCCTCTCCACAGCCACTCACCTGCCACA
GCAGGGGCAGCAGTAGCAGCAGCGGCATGCTTGAGGAAGCAGCTTCCAGGGCTTCTGTG
TGAGCAGAAAAGAGGAAGGGAGTGAGGGGGAAGGACTACAGGGCCGGACAGGAAGCTGGG
AGGAGCAGGAGACCTCAGCCCTGCATGGAAGAGGAACCTCAGACCCACACATGCTCAGA
                                     ↘ FORWARD PRIMER
GCTTGTCCCTCCACACAGATTGACCCTCATGGGCCAGAGATGCCAGAGACCCGCCAGA
GATGGGAGGAGATGGAGCAGAATCTGAGTCTTGCCTTCCAGGAGCACCAGAGCCTGGATC
AGTACCTTCAGGGCCATCTGAGACATGCGAACCCCATGTCTAAAGTCTTCCACTCTGAG
GTGCTTTTCTGTGCACAACCTGTTACACCAGGGCTGATCACTGCTGGCCTGGCCCGAGTC
GCAGCCTCACCTAGATCCAT
K ← snp REVERSE PRIMER
GGGTGTTTAGTCCAGCAGGATATAGGATTCTATAGGGTCCGTGTGAGTGTCTGGGGCAGA
GAAACAAAGAAAGGTCTAGGTAAAGTGAAGGTGGCAGCCATTCAATTTATTCATTCATTC
ACTAAAGATATAGTGAGTGACAGAGCAGGAGCACCGTCATCTCGGAGAAACACTGCCTCT
TTAAGTTCCAATTTCTTTCTAGCCTCATGCAATTTCAAGGAAATCACTTCTCTGCTAACT
ACAAGCAACCAGAAAGAGCAGACAGTGAACACAGATAAGACAGCTCGGGCACAGAGGGA
GGTAGGGGGAGAGTCTCTTGAGTTACTGCCAACTTCACCCTCATACAATGGCCCTAGTA
AAACAGTGGGCCTTAATAAGCAAATTCCTTTCCCTTCAGGTGCACTAAGATAGGGAAGCT
AAAAGCAGACTCAGTGGGTATGCCTGTAGCTGCAGAAAGATGTATGGGTACAGACACACA
CCTCTCTCTCCAGATAAGC

```

K=G

Şekil 7 CD33 Sekans Dizisi (NCBI: gi|568815579:51222837-51242259 Homo sapiens CD 33, chromosome 19, GRCh38 Primary Assembly)

3.3 Primerlerin Dilüe Edilmesi

Liyofilize durumdaki primerlere kullanma talimatında belirtilen miktarda 1XTE (Tris EDTA) eklenerek ve 100 pikomol/mikrolitre'lik stok çözeltiler hazırlandı. PCR işleminde kullanılmak üzere stoktan 20 pikomol/mikrolitre'lik konsantrasyonlu 100 mikrolitrelik dilüe edilmiş primerler hazırlandı.

3.4 Gradyent PCR

CD33 için gradyent PCR yapıldı ve DNA bantlarının en iyi görüldüğü sıcaklık primerlerin bağlanma sıcaklığı olarak belirlendi. Deneylerde kullanılacak

olan gradyent PCR işlemi için belirlenen karışım solüsyonu şu şekilde belirlendi: Total PCR reaksiyon karışımı her bir örnek için 25 mikrolitre olacak şekilde hazırlandı. 10X buffer, MgCl₂ (25mM), dNTP, primerler, H₂O ve Taq Polimeraz'dan oluşan karışım her bir reaksiyon tüpüne dağıtıldı ve en son DNA örnekleri eklendi. Gradyent PCR için kullanılan solüsyon karışımı tablo 4'te, izlenen gradyent PCR programı tablo 5'te yer almaktadır.

Tablo 4 CD33 Gradyent PCR İçin Kullanılan Solüsyon Karışımı

Solüsyon	Miktar
10X Buffer	2,5 µl
MgCl ₂	2,5µl
Dntp	0,5 µl
Forward Primer	0,5 µl
Reverse Primer	0,5 µl
Taq polimeraz	0,2 µl
H ₂ O	16,3µl
DNA	2 µl
Toplam	25 µl

Tablo 5 İzlenen Gradyent PCR Programı

Ön Denatürasyon	95 °C	5 dakika	
Denatürasyon	95 °C	30 saniye	38 döngü
Primer bağlanma	58-66 °C	30 saniye	
Uzama	72 °C	1 dakika	
Son uzama	72 °C	5 dakika	

3.5 PCR

Total PCR reaksiyon karışımı her bir örnek için 25 mikrolitre olacak şekilde hazırlandı. 10X buffer, MgCl₂ (25mM), dNTP, primerler, H₂O ve Taq Polimerazdan oluşan karışım her bir reaksiyon tüpüne dağıtıldı ve en son DNA örnekleri eklendi. PCR için kullanılan solüsyon karışımı tablo 6'da, izlenen gradyent PCR programı tablo 7'de yer almaktadır.

Tablo 6 Pcr Reaksiyon Karışımı

Solusyon	MİKTAR
10X Buffer	2,5 µl
MgCl ₂	2,5µl
Dntp	0,5 µl
Forward Primer	0,5 µl
Reverse Primer	0,5 µl
Taq polimeraz	0,2 µl
H ₂ O	16,3µl
Toplam	25 µl

Tablo 7 İzlenen PCR Programı

Denatürasyon	95 °C	5 dakika	
Denatürasyon	95 °C	30 saniye	38 döngü
Primer bağlanma	66 °C	30 saniye	
Uzama	72 °C	1 dakika	
Son uzama	72°C	5 dakika	

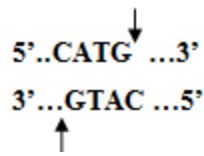
3.6 Agaroz Jel Elektroforezi

Polimorfizmin olduğu bölgenin dizisini PCR sonucunda elde ettiğimiz PCR ürünleri ile çoğaltmış olduk. Araştırdığımız tek nükleotid polimorfizmlerini tespit etmek için bu bölgeleri tanıyan Restriksiyon enzimleri (RE) kullanılarak alel tespiti yapıldı.

Agaroz jel elektroforezi ile PCR ürünlerinin amplifikasyonlarının kontrolü yapıldıktan sonra enzimatik kesim işlemine geçildi. Kesim sonucunda 15 µl DNA, 1 µl 6XLoading dye ile karıştırılarak kuyucuklara yüklendi ve 100 V'de 45 dk yürütüldükten sonra U.V. transliminatörde görüntülendi.

3.7 CD33 geni rs3865444 polimorfizmi için enzim kesimi

NLaIII (Thermo Scientific) enzimi ile 354 bp'lik genom bölümü, 11, 14, 38, 73,103 ve 115 bp'lik parçalara kesildi. Enzim GATG dizilerinin olduğu yerden kesmektedir (Şekil 8). NLaIII (HinIII) enzimi için kesim koşulları tablo 8'de yer almaktadır.



Şekil 8 NLaIII Enzimi Tanıma Dizisi

Tablo 8 NLaIII (HinIII) Enzimi İçin Kesim Koşulları

PCR ürünü	10 µl
Enzim	0,1 µl
10XGreen Buffer	2,5 µl
Water	12,4 µl
İnkübasyon	Overnight

3.8 Agaroz Jel Elektroforezi

CD33 gen bölgesinin PCR ürünlerinin çoğalıp çoğalmadığını kontrol etmek için %2'lik agaroz jelde PCR ürünleri yürütüldü. 100 ml 1X TAE (Tris/ Asetik Asit /EDTA) tamponunun içine 2 gr agaroz (İnvitrogen kat no: 16500-100g) konuldu. Mikrodalgada agaroz iyice eriyinceye kadar tutuldu. 3,8 µl etidyum bromid ilave edildikten sonra jel kalıba dökülerek 20-25 dakika donmaya bırakıldı. PCR ürünlerinden 5 µl alınarak 1 µl 6XLoading dye ile karıştırılıp kuyucuklara yüklendi. Jel, 100 V'de 45 dk yürütüldükten sonra U.V. transliminatörde görüntüledi. Çoğaltılan CD33 gen bölgesinin enzim kesimi yapıldıktan sonra genotiplemeyi yapmak için %4'lük agaroz jelde yürütüldü.

3.9 Sekans İşlemi

Elde edilen RFLP ve PCR sonuçlarını doğrulamak için bazı örneklerin sekansı aşağıda yazıldığı gibi yapıldı.

3.9.1 Örneklerin Exosap İle Muamelesi

PCR tüplerinin içine 2 µl Exosap konuldu.Üzerine 5µl örnekten eklenir ve tablo 9'da yer alan termal cycler programına konuldu.

Tablo 9 İzlenen PCR Programı

başlangıç denatürasyonu	37°C	30 dakika
son uzama	80°C	15 dakika
son sıcaklık	4°C	

3.9.2 Sekans PCR'ın Yapılması:

Sekans PCR için hazırlanan miks karışımı her bir tüpe 8 µl paylaştırıldı ve üzerine 2µl exosapla muamele edilmiş DNA'lar eklendi. Sekans PCR'da kontrol olarak PGEM kullanıldı. PGEM ve bir örnek için hazırlanan mix karışımı tablo 10'da, izlenen PCER programı tablo 11'de gösterilmektedir.

Tablo 10 Sekans PCR İçin Miks Karışımı

Solüsyon	Miktar	PGEM	Miktar
BigDye	2µL	BigDye	2µl
5XBuffer	2µL	5XBuffer	2µl
Primer (Reverse veya Forward)	2µL	M13 Primer	2µl
Nuclease free su	2µL	Nuclease free su	2µl
		Pgem	2µl

Tablo 11 İzlenen PCR Programı

Denatürasyon	96 °C	1 dakika	
Denatürasyon	96 °C	15 saniye	25 döngü
Primer bağlanma	50 °C	15 saniye	
Uzama	60 °C	4 dakika	
Son uzama	Yok		

3.9.3 Sephadex Hazırlanışı

1 gr toz sephadex tartılarak falkon tüpe alınır. Üzerine 14 ml milli su ilave edilerek vörteklenir 1 saat bekletilir. Sekans PCR amplikasyonundan sonra PCR ürünleri sephadex kolon pürifilasyonu ile pürifiye edildi. Örnekler ABI-3130 analizör sekans cihazına yüklendi ve sonuçlar değerlendirildi.

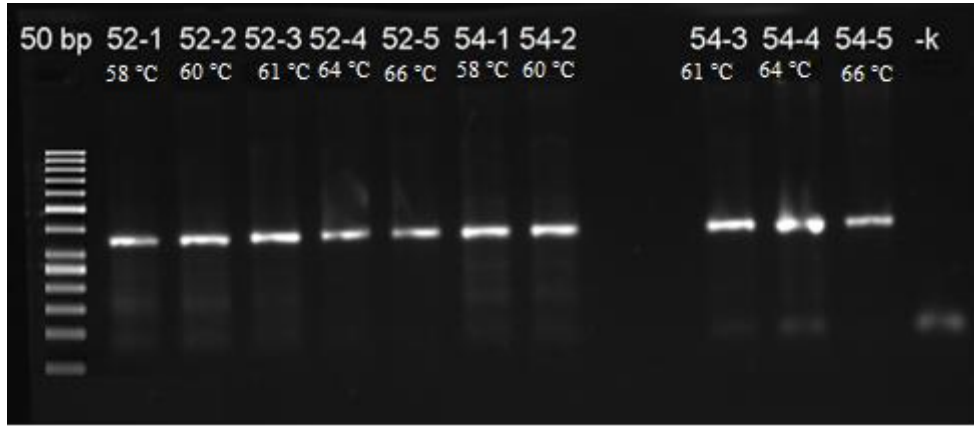
3.10 Deneylerde Kullanılan Cihazlar

- Hettich Rotina 380R santrifüj (Germany)
- Nüve Bench Top santrifüj (Turkey)
- Memmert Benmari WNB-14 (Germany)
- Shimadzu AUW220D Hassas terazi (Japan)
- Herolab UV transluminator (Germany)
- ABI-3130 Sekans Analayzer Cihazı
- VWR International Vortex (Germany)
- Scotsman AF80 Buz makinesi (IL, USA)
- VWR Galaxy Ministar spin arttırıcı (Korea)
- Thermo Scientific OWL EASYCASTTM B2 Jel elektroforez sistemi (USA)
- Techne TC-3000X PCR cihazı (normal PCR)(USA)
- Techne TC-5000 PCR cihazı (Gradient PCR)(USA)
- Shimadzu UV-Pharmaspec 1700 spektrofotometre (Japan)
- Shimadzu Biotech Biospec-nano spektrofotometre (Japan)
- Thermo Scientific Barnstead Easypure II ultra saf su cihazı (USA)
- Techne Dri-Block DB-2D heatblock (UK)
- Consort EV265 elektroforez güçkaynağı (Belgium)
- Cleaver Scientific MSCHOICE elektroforez tankı
- Mikrodalga fırını SAMSUNG MV71E (Korea)
- VWR advanced VMS-C7 manyetik karıştırıcı(Korea)

4 BULGULAR

4.1 Gradyent PCR Elektroforez Sonucu

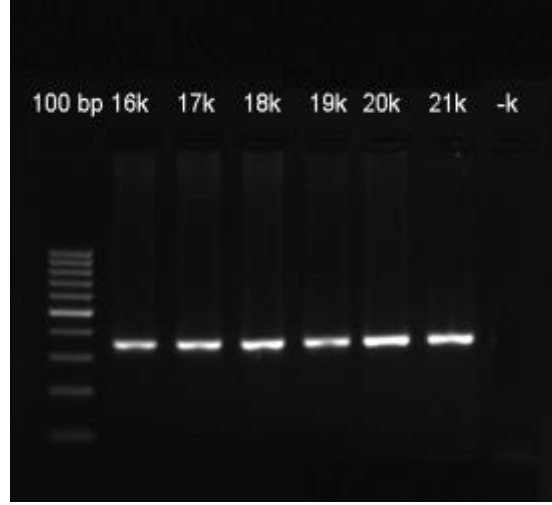
Gradyent PCR yapılan DNA örnekleri agaroz jelde yürütülerek bantlar 354 bp uzunluğu karşılayacak şekilde elde edildi. Optimize sıcaklığın 66°C olduğuna karar verildi.



Resim 1 CD33gradyent PCR Sonucunda Elde Edilen Agaroz Jel Elektroforez Görüntüsü

4.2 PCR Elektroforez Sonucu

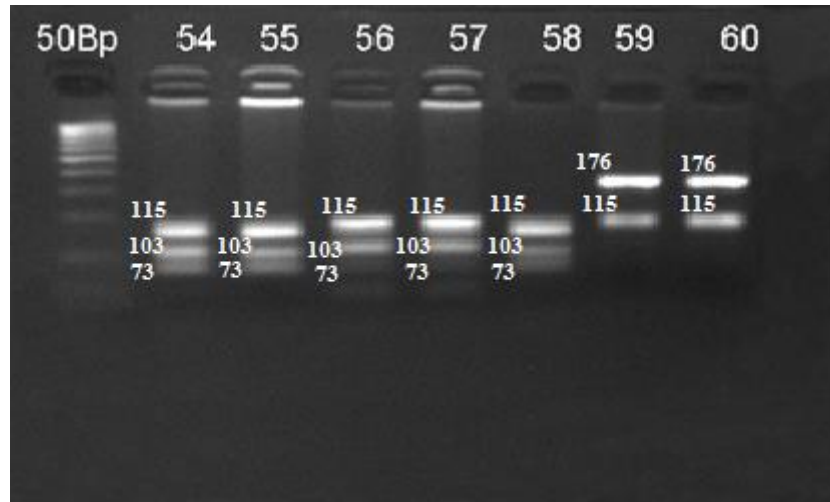
Araştırdığımız bölgenin PCR ürününü değerlendirmek için, %2'lik agaroz jelde yürütülerek 354 bp uzunluğu karşılayacak şekilde elde edildi. U.V transliminatörde görüntülendi.



Resim 2 CD33PCR Amplifikasyon Ürünlerinin Agaroz Jel Görüntüsü

4.3 NlaIII Enzim Kesimi PCR Elektroforez Sonucu

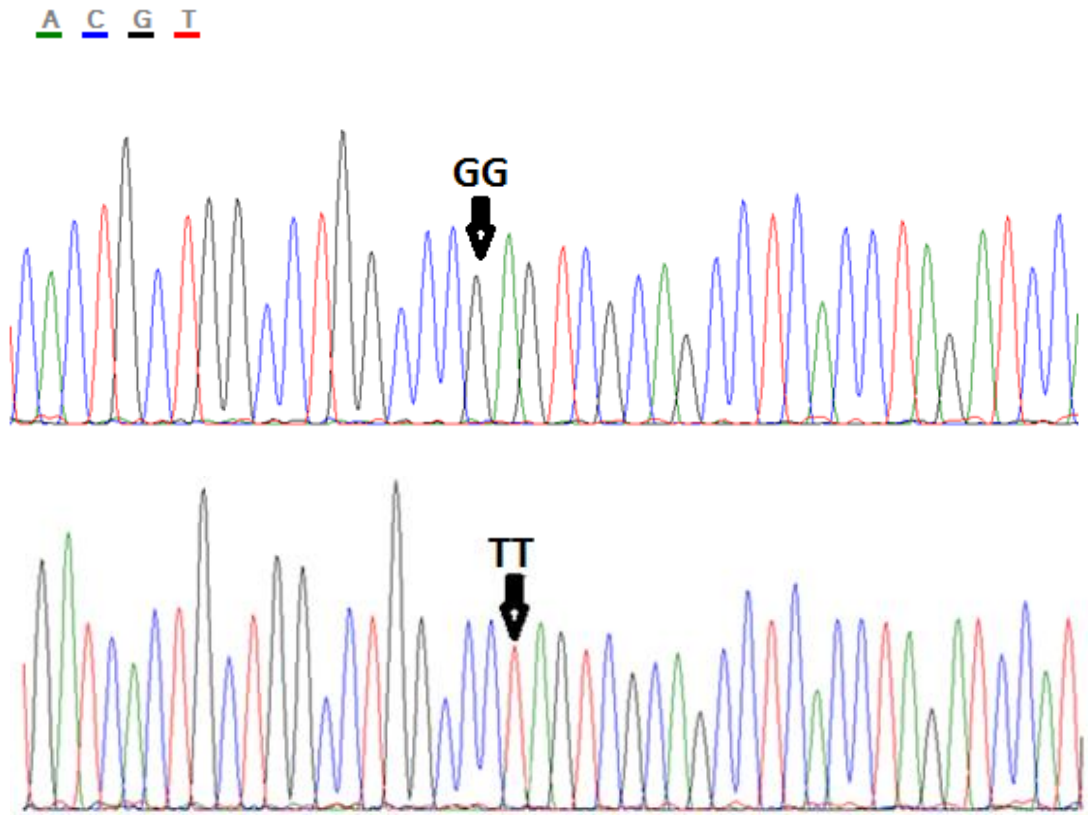
Araştırdığımız bölgenin RFLP sonucunu değerlendirmek için, yapılan enzim kesimleri %3'lük agaroz jelde yürütülerek 176 bp, 115 bp, 103 bp ve 73 bp uzunluğu karşılayacak şekilde elde edildi. U.V transliminatörde görüntüledi.



Resim 3 CD33RFLP Ürünlerinin Agaroz Jel Görüntüsü

4.4 Sekans

PCR ürünlerinin varlığı tespit edildikten sonra bazı örnekler DNA sekans yapılarak CD33 geninin elde edilen sonuçları doğrulandı. PCR amplikasyonundan sonra PCR ürünleri sephadex kolon pürifilasyonu ile pürifiye edildi. Örnekler ABI-3130 sekans cihazına yüklendi ve sonuçlar değerlendirildi.



Şekil 9 CD33 rs3865444 Polimorfizmi

4.5 İstatistiksel Değerlendirme

İstatistiksel analizler SPSS (Statistical Package for Social Sciences, version 16) paket programı kullanılarak klinik bulgular ile genotipler arasındaki ilişki

incelendi. Hasta ve kontrol grupları arasındaki allel ve genotip frekanslarını karşılaştırmak için ki kare testi kullanılarak P değerleri hesaplandı. P değeri $P < 0.05$ için anlamlı kabul edildi.

Elde edilen istatistik sonuçları aşağıda verilmiştir.

Tablo 12 CD33 Alel Dağılımları 1

	CD33			TOTAL
	GG	GT	TT	
AH	32 (%55,2)	24 (%41,4)	2 (%3,4)	58 (%100)
KONTROL	33 (%63,5)	16 (%30,8)	5 (%8,6)	52 (%100)
TOTAL	65	40	7	110

Kontrol grubu ve vaka grubunda GG genotipinin bulunma sıklığı istatistiksel olarak anlamlı değil ($p = 0,213$).

Tablo 13 CD33 Alel Dağılımları 2

	CD33			P-DEĞERİ
	GG	GT + TT	TOTAL	
AH	32 (%55,2)	26 (%44,8)	58 (%100)	P=0,199
KONTROL	33 (%63,5)	21 (%36,2)	52 (%100)	
TOTAL	65	40	7	

Vaka ve kontrol gruplarında cinsiyet dağılımı istatistiksel olarak anlamlı değildir ($p = 0,199$).

Tablo 14 Cinsiyet Dağılımları

	AH	Kontrol	P-Değeri
KADIN	28	28	P=0,199
ERKEK	17	18	
TOTAL	45	46	

Vaka ve kontrol grupları ile Alzheimer hastalığı ile iskemik kalp hastalığı, hipertansiyon, diabet ve ailede Alzheimer hastalığı arasında istatistiksel olarak anlamlı fark yoktur ($P>0.05$).

Tablo 15 AH İle Diğer Hastalıkları Karşılaştırılması

		AH	KONTROL	TOTAL	P-DEĞERİ
İSKEMİK KALP HASTALIĞI	VAR	8	18	26	P= 0,213
	YOK	37	23	60	
HİPERTANSİYON	VAR	34	29	63	
	YOK	11	14	25	
DİABET	VAR	13	10	23	
	YOK	32	33	65	
AİLEDE AH	VAR	14	3	17	
	YOK	27	12	39	

5 TARTIŞMA VE SONUÇ

AH yaşa bağlı olarak gelişen, geri dönüşümü olmayan nörodejeneratif hastalık olmakla beraber yaşlı bireylerde demans çeşitleri arasında en çok görülenidir [3]. AH ölüm istatistikleri sıralamasında dördüncü sırada bulunmaktadır. Bu hastalıkta en önemli risk faktörü ileri yaştır. 65 yaş sonrasında prevalansı her beş yılda bir ikiye katlanmaktadır [4]. Alzheimer hastalığının klinik tanısı yapılırken demansa neden olan diğer faktörler devre dışı bırakılır. Fakat kesin teşhis post-mortem dönemde nöropatolojik inceleme ile yapılabilmektedir [5]. Bundan dolayı hastalığın teşhisine katkıda bulunacak biyomarkırlara gereksinim vardır. AH'nın teşhisinde kullanılacak biyomarkırın hastalığı diğer demans türlerinden ayırabilmeli. Ayrıca, biyomarkır prognozun belirlenmesine katkı sağlamalı ve hastalığa yatkınlığı belirlemelidir. Yaşı ilerleyen her birey Alzheimer hastalığına yakalanmamaktadır. Bunda insan genomundaki bazı genlere ait kombine polimorfizmlerin rol oynadığı düşünülmektedir.

AH'da önemli olduğu söylenen fakat Türkiye'de hiç çalışılmamış bir gen olan CD33 geninin AH riskini etkilediği düşünülmektedir. CD33 genine ait rs3865444 polimorfizminin Alzheimer riskini arttırdığı tespit edilmiştir [104]. Yavaş ilerleyen Alzheimer hastalığında sağlıklı iken Alzheimer riskinin bilinmesi ile erken teşhis ve tedavi olasılığı arttırılmış olacaktır. Bu nedenle bu çalışmamızda sağlıklı kişilerin ilerleyen zamanlarında AH'na yakalanma riskini belirleyeceğini düşündüğümüz biyomarkırlardan önemli gen olan CD33 genini inceledik. Bu amaçla bu hastalığa ilişkin en önemli aday genlerden biri olan CD33 genine ait rs3865444 polimorfizmini araştırdık. Türk toplumunda daha önce CD33 geni ve rs3865444 polimorfizmi ile ilgili yapılmış çalışma bulunmamaktadır. Çalışmamız için 58 AH ve 54 kontrol kullanıldı. Çalışmaya katılan bireylere ait nörolojik muayeneler yapıldı. Psikolojik test sonuçları ve istatistiksel analiz için gerekli olan bilgiler elde edildikten sonra sonuçlara ulaşıldı.

Sonuç olarak Alzheimer hastalarındaki CD33 genine ait vaka gruplarındaki genotip dağılım yüzdeleri GG için %55,2, GT için %41,4 ve TT için %3,4 olarak bulunmuştur. Kontrol grubundaki CD33 genotipleri dağılım yüzdesi GG için %63,5, GT için %30,8 ve TT için %8,6 olarak bulunmuştur. Kontrol grubuna göre vaka grubunda T allelinin ve TT genotipinin bulunma sıklığı istatistiksel olarak anlamlı değildir ($p > 0,05$). Sonuç olarak gruplar arasında anlamlı bir fark yoktur. Fakat son yıllarda yapılan araştırmalarda anlamlı olan çalışmalar da vardır [104]. CD33 geninde rs3865444 tek nükleotid polimorfizmi (SNP) geç başlangıçlı AH (LOAD) ile ilişkilendirilmiştir [99]. CD33 geni, GWAS (genome-wide association studies) çalışmalarında Alzheimer hastalığına dair orjinal risk faktörleri arasında tespit edilmiştir [100]. Yapılan GWAS (genome-wide association study) çalışmalarında, CD33 geninin promoter bölgesinde (-373 G/T) bulunan rs3865444 polimorfizminin Alzheimer hastalığı ile ilişkili olduğu ortaya konmuştur [101]. Araştırmanın sonucunun verilen referanslardan farklı çıkması yani istatistiksel olarak anlamlı çıkmamasının sebebi nispeten küçük örnek grubunda çalışılmış olması gösterilebilir. Daha sonra yapılacak çalışmalarda daha geniş popülasyon grubunda çalışılmasında fayda görülmektedir.

Çalışmamızda ayrıca CD33 genine ait farklı genotipleri farklı hastalıklarla kıyasladık. Sonuç olarak vaka ve kontrol grupları arasında CD33 geni genotipleri ile istemik kalp, hipertansiyon ve diyabet hastalığı olanlar arasında anlamlı bir sonuç bulamadık ($p > 0.05$). Ailesinde Alzheimer olanlar ile CD33 genotipleri arasında da istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamadı ($p > 0,05$).

Son dönemlerde yapılan çalışmalarda CD33 geni rs3865444 polimorfizminin AH patogenezi mekanizması üzerine incelemeler yapılmıştır. CD33'ün insan beyninde mikroglialarda eksprese olduğu gösterilmiştir. Bu ekspresyon Amiloid Beta 42 (A β 42) mikroglial alımını inhibe ederek A β patolojisi teşvik ettiği tespit edilmiştir. CD33 geninde bulunan rs3865444 risk alelinin Alzheimer hastalığına yatkınlık oluşturduğu tahmin edilmektedir. rs3865444 risk alelinin, genç ve ileri yaş bireylerin monositlerinde daha fazla hücre yüzey ekspresyonu yaptığı tespit edilmiştir. CD33 lokusu değişmiş monosit fonksiyonu ile ilgili ilişkili bulunmuştur.

Bu da doğuştan gelen immünolojiye dahil edilebilir dolayısıyla AH ilerlemesine neden olabilir. Rs3865444 polimorfizminin artmış CD33 ekspresyonu ile ilişkili olduğundan kognitif bozukluk ve AH'ye sebep olabileceği önerilmektedir. CD33 genindeki mutasyonlar miyeloid fonksiyon bozuklukları ve amiloid patolojisi ile ilişkilendirilebilir. Böylece AH ilerlemesinde rol oynayabilir [95]. Sonuç olarak, AH'nın patogenezinde CD33'ün rolünü tam olarak anlamak için yeni çalışmalarla farklı yollarla birlikte incelemek gerekir.

CD33 geninin AH ile ilişkisini tam olarak anlamak için gelecekteki araştırmalar çok değerli olacaktır. Ayrıca, AH riskini arttıran CD33 geninin derinlemesine araştırmak hastalığın başlangıcı veya ilerlemesi ile ilişkiyi daha iyi değerlendirmek için gerekli olacaktır.

CD33 geni ve rs3865444 polimorfizmi ile alakalı www.alzgene.org sitesinde yapılmış olan çalışmalar olmakla birlikte bu sitede Türkiye'de AH ve CD33 geni rs3865444 polimorfizminin birlikte yapmış oldukları etki ile alakalı yapılmış bir çalışma bulamadık. Bizim elde ettiğimiz verilerin daha sonra yapılacak olan araştırmalar için faydalı olacağına inanıyoruz. Sonuçta bizim yapmış olduğumuz bu çalışma genellikle Ankara ilinde yapılmış küçük çaplı bir çalışmadır. Özellikle tüm Türkiye'yi kapsayacak daha geniş çaplı bir çalışmanın yapılmasında fayda görülmektedir. Son olarak, CD33 geni ile ilgili yeni bulgular ve yeni tedavi yaklaşımlarının, AH için CD33 tabanlı bir tedavi stratejisi olması konusunda daha fazla araştırma için yeni yollar açmasını umuyoruz. Bizim AH için CD33 geninin yeni tedavi yolları geliştirebileceğine dair düşüncemiz devam etmektedir.

KAYNAKÇA

1. Hampel H., P.D., Teipel S., *future of Alzheimer's disease: the next 10 years*. 2011.
2. Gürvit, İ.H., *Demans sendromu, Alzheimer hastalığı ve Alzheimer dışı demanslar*. 2004, İstanbul: Nobel Tıp Kitabevi.
3. Öge, A.E., Zarko, B. S. ve Bilgiç B. , *Nöroloji. Sinir sisteminin dejeneratif hastalıkları: Demans Sendromu, Alzheimer Hastalığı ve Alzheimer dışı demanslar*. 2004, İstanbul: Nobel Tıp Kitapevleri. 367-417.
4. Davinelli, S., et al., *The "Alzheimer's disease signature": potential perspectives for novel biomarkers*. Immun Ageing, 2011. **8**: p. 7.
5. Jellinger, K.A., *Diagnostic accuracy of Alzheimer's disease: a clinicopathological study*. Acta Neuropathol, 1996. **91**(2): p. 219-20.
6. Tanrıdağ, O., *Alzheimer hastalığı: yüzyıllık öykü*. Nöropsikiyatri Arşivi, 1999. **36**: p. 61-69.
7. O'Brien, R.J. and P.C. Wong, *Amyloid precursor protein processing and Alzheimer's disease*. Annu Rev Neurosci, 2011. **34**: p. 185-204.
8. Purves, D., Augustine, G. J., Fitzpatrick, D., Lawrence, C., LaMantia, A., McNamara, J. O., Williams, S. ve Mark, S. , *Neuroscience. Sinauer Associates*. 2001.
9. Glenner, G.G. and C.W. Wong, *Alzheimer's disease: initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein*. Biochem Biophys Res Commun, 1984. **120**(3): p. 885-90.
10. Kang, J., et al., *The precursor of Alzheimer's disease amyloid A4 protein resembles a cell-surface receptor*. Nature, 1987. **325**(6106): p. 733-6.
11. Feldman, H.H., et al., *Diagnosis and treatment of dementia: 2. Diagnosis*. CMAJ, 2008. **178**(7): p. 825-36.

12. Arslantas, D., et al., *Prevalence of dementia and associated risk factors in Middle Anatolia, Turkey*. J Clin Neurosci, 2009. **16**(11): p. 1455-9.
13. Robert, L., *Nussbaum. Thompson & Thompson Genetics in Medicine*, ed. 6. 2004: W.B. Saunders Company.
14. *American Psychiatric Association, Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders (DSM-IV)*. 2000.
15. Theuns, J. and C. Van Broeckhoven, *Transcriptional regulation of Alzheimer's disease genes: implications for susceptibility*. Hum Mol Genet, 2000. **9**(16): p. 2383-94.
16. DeKosky, S.T. and K. Marek, *Looking backward to move forward: early detection of neurodegenerative disorders*. Science, 2003. **302**(5646): p. 830-4.
17. Köroğlu, E., *Mental Bozuklukların Tanısal ve Sayımsal El Kitabı*. DSM-IV, ed. 4. 1994, Ankara: Hekimler Yayın Birliği.
18. Sadowski, M.P., J. Scholtzova. H, , *Links between the pathology of Alzheimer's disease and vascular dementia*. Neurochem Res 29, 2004: p. 1257-1266.
19. Terry, R.D., Katzman. R , Bick. K.L., , *Alzheimer Disease*. Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins ed. 2. 1999.
20. Folstein, M.F., S.E. Folstein, and P.R. McHugh, *"Mini-mental state". A practical method for grading the cognitive state of patients for the clinician*. J Psychiatr Res, 1975. **12**(3): p. 189-98.
21. Teri, L., J.P. Hughes, and E.B. Larson, *Cognitive deterioration in Alzheimer's disease: behavioral and health factors*. J Gerontol, 1990. **45**(2): p. P58-63.
22. Eker, E., *Alzheimer Hastalığı Ve Diğer Demanslar Türkiye Klinikleri Dahili Tıp Bilimleri Dergisi*, 2005. **1**: p. 3-16.
23. Ferri, C.P., et al., *Global prevalence of dementia: a Delphi consensus study*. Lancet, 2005. **366**(9503): p. 2112-7.
24. Mott, R.T. and C.M. Hulette, *Neuropathology of Alzheimer's disease*. Neuroimaging Clin N Am, 2005. **15**(4): p. 755-65, ix.
25. Spires-Jones, T.L., et al., *Tau pathophysiology in neurodegeneration: a tangled issue*. Trends Neurosci, 2009. **32**(3): p. 150-9.

26. Selkoe, D.J., *Alzheimer's disease: genes, proteins, and therapy*. Physiol Rev, 2001. **81**(2): p. 741-66.
27. Marambaud, P. and N.K. Robakis, *Genetic and molecular aspects of Alzheimer's disease shed light on new mechanisms of transcriptional regulation*. Genes Brain Behav, 2005. **4**(3): p. 134-46.
28. Adalbert, R., J. Gilley, and M.P. Coleman, *Abeta, tau and ApoE4 in Alzheimer's disease: the axonal connection*. Trends Mol Med, 2007. **13**(4): p. 135-42.
29. Bi, X., *Alzheimer disease: update on basic mechanisms*. J Am Osteopath Assoc, 2010. **110**(9 Suppl 8): p. S3-9.
30. Galimberti, D. and E. Scarpini, *Progress in Alzheimer's disease*. J Neurol, 2012. **259**(2): p. 201-11.
31. Castellani, R.J., et al., *Phosphorylated tau: toxic, protective, or none of the above*. J Alzheimers Dis, 2008. **14**(4): p. 377-83.
32. Hanger, D.P., et al., *Novel phosphorylation sites in tau from Alzheimer brain support a role for casein kinase 1 in disease pathogenesis*. J Biol Chem, 2007. **282**(32): p. 23645-54.
33. Ercan, A., *Kaplan & Sadock Klinik Psikiyatri, El Kitabı.*, ed. 2. 1999, İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri 31-35.
34. Arriagada, P.V., et al., *Neurofibrillary tangles but not senile plaques parallel duration and severity of Alzheimer's disease*. Neurology, 1992. **42**(3 Pt 1): p. 631-9.
35. Gomez-Isla, T., Hollister, R., West, H., *Neuronal loss correlates with but exceeds neurofibrillary tangles in Alzheimer disease*. Ann Neurol, 1997. **41**: p. 17.
36. Yates, D., Mcloughlin, D.M. , *The molecular pathology of Alzheimer's disease*. Psychiatry, 2007. **7**: p. 1-5.
37. Masters, C.L., et al., *Amyloid plaque core protein in Alzheimer disease and Down syndrome*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1985. **82**(12): p. 4245-9.
38. Simmons, L.K., et al., *Secondary structure of amyloid beta peptide correlates with neurotoxic activity in vitro*. Mol Pharmacol, 1994. **45**(3): p. 373-9.

39. Blennow, K., M.J. de Leon, and H. Zetterberg, *Alzheimer's disease*. Lancet, 2006. **368**(9533): p. 387-403.
40. Hardy, J.A. and G.A. Higgins, *Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis*. Science, 1992. **256**(5054): p. 184-5.
41. Pike, K.E., et al., *Beta-amyloid imaging and memory in non-demented individuals: evidence for preclinical Alzheimer's disease*. Brain, 2007. **130**(Pt 11): p. 2837-44.
42. Ma, J., et al., *Amyloid-associated proteins alpha 1-antichymotrypsin and apolipoprotein E promote assembly of Alzheimer beta-protein into filaments*. Nature, 1994. **372**(6501): p. 92-4.
43. Van Gool, D., et al., *alpha 2-Macroglobulin expression in neuritic-type plaques in patients with Alzheimer's disease*. Neurobiol Aging, 1993. **14**(3): p. 233-7.
44. Shalit, F., et al., *Elevated interleukin-6 secretion levels by mononuclear cells of Alzheimer's patients*. Neurosci Lett, 1994. **174**(2): p. 130-2.
45. Rozemuller, J.M., et al., *Microglial cells around amyloid plaques in Alzheimer's disease express leucocyte adhesion molecules of the LFA-1 family*. Neurosci Lett, 1989. **101**(3): p. 288-92.
46. Desai, P.P., et al., *Apolipoprotein D is a component of compact but not diffuse amyloid-beta plaques in Alzheimer's disease temporal cortex*. Neurobiol Dis, 2005. **20**(2): p. 574-82.
47. Akiyama, H., et al., *Immunohistochemical localization of vitronectin, its receptor and beta-3 integrin in Alzheimer brain tissue*. J Neuroimmunol, 1991. **32**(1): p. 19-28.
48. Eikelenboom, P., et al., *Complement activation in amyloid plaques in Alzheimer's dementia*. Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol, 1989. **56**(4): p. 259-62.
49. Smith, M.A., R.N. Kalaria, and G. Perry, *Alpha 1-trypsin immunoreactivity in Alzheimer disease*. Biochem Biophys Res Commun, 1993. **193**(2): p. 579-84.

50. Krabbe, G., et al., *Functional impairment of microglia coincides with Beta-amyloid deposition in mice with Alzheimer-like pathology*. PLoS One, 2013. **8**(4): p. e60921.
51. Serrano-Pozo, A., et al., *Neuropathological alterations in Alzheimer disease*. Cold Spring Harb Perspect Med, 2011. **1**(1): p. a006189.
52. Armstrong, R.A., *The molecular biology of senile plaques and neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease*. Folia Neuropathol, 2009. **47**(4): p. 289-99.
53. Aizenstein, H.J., et al., *Frequent amyloid deposition without significant cognitive impairment among the elderly*. Arch Neurol, 2008. **65**(11): p. 1509-17.
54. Tomic, J.L., et al., *Soluble fibrillar oligomer levels are elevated in Alzheimer's disease brain and correlate with cognitive dysfunction*. Neurobiol Dis, 2009. **35**(3): p. 352-8.
55. Bertram, L. and R.E. Tanzi, *The current status of Alzheimer's disease genetics: what do we tell the patients?* Pharmacol Res, 2004. **50**(4): p. 385-96.
56. Lapane, K.L., et al., *Gender differences in predictors of mortality in nursing home residents with AD*. Neurology, 2001. **56**(5): p. 650-4.
57. Lobo, A., et al., *Prevalence of dementia and major subtypes in Europe: A collaborative study of population-based cohorts. Neurologic Diseases in the Elderly Research Group*. Neurology, 2000. **54**(11 Suppl 5): p. S4-9.
58. Gao, S., et al., *The relationships between age, sex, and the incidence of dementia and Alzheimer disease: a meta-analysis*. Arch Gen Psychiatry, 1998. **55**(9): p. 809-15.
59. St George-Hyslop, P.H., et al., *The genetic defect causing familial Alzheimer's disease maps on chromosome 21*. Science, 1987. **235**(4791): p. 885-90.
60. Kivipelto, M., et al., *Midlife vascular risk factors and Alzheimer's disease in later life: longitudinal, population based study*. BMJ, 2001. **322**(7300): p. 1447-51.
61. Braak, H. and E. Braak, *Neuropathological staging of Alzheimer-related changes*. Acta Neuropathol, 1991. **82**(4): p. 239-59.

62. Itagaki, S., et al., *Relationship of microglia and astrocytes to amyloid deposits of Alzheimer disease*. J Neuroimmunol, 1989. **24**(3): p. 173-82.
63. Napoli, I., K. Kierdorf, and H. Neumann, *Microglial precursors derived from mouse embryonic stem cells*. Glia, 2009. **57**(15): p. 1660-71.
64. Ivashkiv, L.B., *Cross-regulation of signaling by ITAM-associated receptors*. Nat Immunol, 2009. **10**(4): p. 340-7.
65. Lowell, C.A., *Src-family and Syk kinases in activating and inhibitory pathways in innate immune cells: signaling cross talk*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2011. **3**(3).
66. Sierra, A., et al., *Janus-faced microglia: beneficial and detrimental consequences of microglial phagocytosis*. Front Cell Neurosci, 2013. **7**: p. 6.
67. Linnartz, B. and H. Neumann, *Microglial activatory (immunoreceptor tyrosine-based activation motif)- and inhibitory (immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif)-signaling receptors for recognition of the neuronal glycoalyx*. Glia, 2013. **61**(1): p. 37-46.
68. Block, M.L. and J.S. Hong, *Microglia and inflammation-mediated neurodegeneration: multiple triggers with a common mechanism*. Prog Neurobiol, 2005. **76**(2): p. 77-98.
69. McGeer, P.L., et al., *Reactive microglia in patients with senile dementia of the Alzheimer type are positive for the histocompatibility glycoprotein HLA-DR*. Neurosci Lett, 1987. **79**(1-2): p. 195-200.
70. Combs, C.K., et al., *Inflammatory mechanisms in Alzheimer's disease: inhibition of beta-amyloid-stimulated proinflammatory responses and neurotoxicity by PPARgamma agonists*. J Neurosci, 2000. **20**(2): p. 558-67.
71. Qin, L., et al., *Microglia enhance beta-amyloid peptide-induced toxicity in cortical and mesencephalic neurons by producing reactive oxygen species*. J Neurochem, 2002. **83**(4): p. 973-83.
72. Barger, S.W. and A.D. Harmon, *Microglial activation by Alzheimer amyloid precursor protein and modulation by apolipoprotein E*. Nature, 1997. **388**(6645): p. 878-81.

73. Meda, L., et al., *Activation of microglial cells by beta-amyloid protein and interferon-gamma*. *Nature*, 1995. **374**(6523): p. 647-50.
74. D'Andrea, M.R., G.M. Cole, and M.D. Ard, *The microglial phagocytic role with specific plaque types in the Alzheimer disease brain*. *Neurobiol Aging*, 2004. **25**(5): p. 675-83.
75. Wilcock, D.M., et al., *Passive amyloid immunotherapy clears amyloid and transiently activates microglia in a transgenic mouse model of amyloid deposition*. *J Neurosci*, 2004. **24**(27): p. 6144-51.
76. Block, M.L., L. Zecca, and J.S. Hong, *Microglia-mediated neurotoxicity: uncovering the molecular mechanisms*. *Nat Rev Neurosci*, 2007. **8**(1): p. 57-69.
77. Salminen, A. and K. Kaarniranta, *Siglec receptors and hiding plaques in Alzheimer's disease*. *J Mol Med (Berl)*, 2009. **87**(7): p. 697-701.
78. Weinbaum, S., J.M. Tarbell, and E.R. Damiano, *The structure and function of the endothelial glycocalyx layer*. *Annu Rev Biomed Eng*, 2007. **9**: p. 121-67.
79. Kida, E., N.H. Choi-Miura, and K.E. Wisniewski, *Deposition of apolipoproteins E and J in senile plaques is topographically determined in both Alzheimer's disease and Down's syndrome brain*. *Brain Res*, 1995. **685**(1-2): p. 211-6.
80. Bernardo, A., et al., *Elimination of GD3 synthase improves memory and reduces amyloid-beta plaque load in transgenic mice*. *Neurobiol Aging*, 2009. **30**(11): p. 1777-91.
81. O'Reilly, M.K. and J.C. Paulson, *Siglecs as targets for therapy in immune-cell-mediated disease*. *Trends Pharmacol Sci*, 2009. **30**(5): p. 240-8.
82. Raiha, I., et al., *Alzheimer's disease in Finnish twins*. *Lancet*, 1996. **347**(9001): p. 573-8.
83. Tanzi, R.E., *A genetic dichotomy model for the inheritance of Alzheimer's disease and common age-related disorders*. *J Clin Invest*, 1999. **104**(9): p. 1175-9.
84. Selkoe, D.J., *Amyloid beta-protein and the genetics of Alzheimer's disease*. *J Biol Chem*, 1996. **271**(31): p. 18295-8.

85. Li, L. and L.S. Chin, *The molecular machinery of synaptic vesicle exocytosis*. Cell Mol Life Sci, 2003. **60**(5): p. 942-60.
86. Mahley, R.W., *Apolipoprotein E: cholesterol transport protein with expanding role in cell biology*. Science, 1988. **240**(4852): p. 622-30.
87. Mahley, R.W., et al., *Genetic defects in lipoprotein metabolism. Elevation of atherogenic lipoproteins caused by impaired catabolism*. JAMA, 1991. **265**(1): p. 78-83.
88. Rall, S.C., Jr., K.H. Weisgraber, and R.W. Mahley, *Human apolipoprotein E. The complete amino acid sequence*. J Biol Chem, 1982. **257**(8): p. 4171-8.
89. Mahley, R.W., et al., *Turkish Heart Study: lipids, lipoproteins, and apolipoproteins*. J Lipid Res, 1995. **36**(4): p. 839-59.
90. Hernandez, F., Avila, J. , *Tauopathies*. Cell Mol Life Sci., 2007. **64**: p. 2219-2233.
91. Zannis, V.I., et al., *Proposed nomenclature of apoE isoproteins, apoE genotypes, and phenotypes*. J Lipid Res, 1982. **23**(6): p. 911-4.
92. Zannis, V.I. and J.L. Breslow, *Human very low density lipoprotein apolipoprotein E isoprotein polymorphism is explained by genetic variation and posttranslational modification*. Biochemistry, 1981. **20**(4): p. 1033-41.
93. Utermann, G., A. Steinmetz, and W. Weber, *Genetic control of human apolipoprotein E polymorphism: comparison of one- and two-dimensional techniques of isoprotein analysis*. Hum Genet, 1982. **60**(4): p. 344-51.
94. Wardell, M.R., P.A. Suckling, and E.D. Janus, *Genetic variation in human apolipoprotein E*. J Lipid Res, 1982. **23**(8): p. 1174-82.
95. Bradshaw, E.M., et al., *CD33 Alzheimer's disease locus: altered monocyte function and amyloid biology*. Nat Neurosci, 2013. **16**(7): p. 848-50.
96. Jiang, T., et al., *CD33 in Alzheimer's disease*. Mol Neurobiol, 2014. **49**(1): p. 529-35.
97. Tateno, H., et al., *Distinct endocytic mechanisms of CD22 (Siglec-2) and Siglec-F reflect roles in cell signaling and innate immunity*. Mol Cell Biol, 2007. **27**(16): p. 5699-710.

98. Von Gunten, S., & Bochner, B. S. , *Basic and clinical immunology of Siglecs*. Annals of the New York Academy of Sciences, 2008(1143): p. 61-82.
99. Hollingworth, P., Harold, D., Sims, R., Gerrish, A., Lambert, J.-C., Carrasquillo, M. M., Abraham, R., *Common variants at ABCA7, MS4A6A/MS4A4E, EPHA1, CD33 and CD2AP are associated with Alzheimer's disease*. Nature genetics, 2011. **43(5)**(429–35).
100. Kamboh M.I., D.F.Y., Wang X., Minster R.L., Carrasquillo M.M., Pankratz V.S., Younkin S.G., Saykin A.J.;Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative, Jun G., Baldwin C., Logue M.W., Buros J., Farrer L., Pericak-Vance M.A., Haines J.L., Sweet R.A., Ganguli M., Feingold E., Dekosky S.T., Lopez O.L., Barmada M.M., *Genome-wide association study of Alzheimer's disease*. Transl Psychiatry. **15;2:e117**.
101. Malik, M., et al., *CD33 Alzheimer's risk-altering polymorphism, CD33 expression, and exon 2 splicing*. J Neurosci, 2013. **33(33)**: p. 13320-5.
102. Griciuc, A., et al., *Alzheimer's disease risk gene CD33 inhibits microglial uptake of amyloid beta*. Neuron, 2013. **78(4)**: p. 631-43.
103. Karch, C.M., et al., *Expression of novel Alzheimer's disease risk genes in control and Alzheimer's disease brains*. PLoS One, 2012. **7(11)**: p. e50976.
104. Tan, L., et al., *Association of GWAS-linked loci with late-onset Alzheimer's disease in a northern Han Chinese population*. Alzheimers Dement, 2013. **9(5)**: p. 546-53.