

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

**ALZHEIMER HASTALIĞINDA ERKEN TANIYI SAĞLAYACAK
BIOMARKERLARIN TANIMLANMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**Hazırlayan
Gülhan KAYA**

**Tez Danışmanı
Prof.Dr. Mehmet GÜNDÜZ**

Ankara-2013

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

**ALZHEIMER HASTALIĞINDA ERKEN TANIYI SAĞLAYACAK
BIOMARKERLARIN TANIMLANMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**Hazırlayan
Gülhan KAYA**

**Tez Danışmanı
Prof.Dr. Mehmet GÜNDÜZ**

Ankara-2013

**Turgut Özal Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi
tarafından desteklenmiştir
(Proje No: P23/ P53011102_G(1992))**

ONAYLAMA SAYFASI

Gülhan KAYA tarafından hazırlanan “Alzheimer hastalığında erken tanımı sağlayacak biomarkerların tanımlanması” başlıklı bu çalışma, 09/01/2014 tarihinde yapılan savunma sınavı sonucunda (*oybirliği/oyçokluğu*) ile başarılı bulunarak jürimiz tarafından Tıbbi Genetik Anabilim Dalında Yüksek lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

.....
Doç.Dr.Esra GÜNDÜZ
Anabilim Dalı Başkanı

.....
Prof.Dr.Mehmet GÜNDÜZ

.....
Doç.Dr. Hüsamettin ERDAMAR

.....
Yrd.Doç.Dr. Muradiye ACAR

.....
Yrd.Doç.Dr. Ömer Faruk HATİPOĞLU

ÖNSÖZ

Bu tezin teorik temellerinin oluşturulması, ön hazırlıkların ve deneylerin gerçekleştirilmesi, verilerin toplanıp istatistiğinin yapılarak yorumlanması ve yazılması aşamalarında ve Tıbbi Genetik Anabilim Dalının bütün imkanları ile laboratuvarı istifademe sunan ve her zaman şefkatli ve merhametli bir şekilde bize her konuda destek olup çalışmaya teşvik eden başta Tıbbi Genetik Anabilim Dalı Başkanı Doç.Dr. Esra GÜNDÜZ'e tez danışmanım Prof.Dr. Mehmet GÜNDÜZ'e, teknikleri öğrenmem konusunda sürekli ve sabırlı bir şekilde gayret sarf edip öğrenmemi sağlayan Yrd. Doç.Dr. Muradiye ACAR'a ve tüm Tıbbi Genetik Anabilim Dalı hocalarıma yardımlarından dolayı en içten teşekkürlerimi sunarım.

Örneklerin toplanması konusunda yardımcı olan Nöroloji Anabilim Dalı Başkanı Prof.Dr. Atilla İLHAN'a ve örneklerin toplanması ve hasta bilgilerine ulaşmam konusunda yardımcı olan Nöroloji Anabilim Dalı asistanı sevgili Burcu ACAR'a, bana manevi destek sağlayan Tıbbi Genetik Anabilim Dalındaki çalışma arkadaşlarımdan Serap DEDE, Zahide Nur ÜNAL, Esra GÜMÜŞ ve Esra SEYHAN'a ve tüm yüksek lisans öğrencilerine, ve Tez çalışmalarım boyunca benden desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen maddi manevi her zaman yanımda olan fedakar eşim Ahmet KAYA'ya ve manevi destekçilerim olan biricik kızlarım Reyhan ve Zehranur'a ve dualarıyla sürekli yanımda olan değerli anneme çok teşekkür ederim.

Ankara 2013

Gülhan KAYA

ÖZET
ALZHEIMER HASTALIĞINDA ERKEN TANIYI SAĞLAYACAK
BIOMARKERLARIN TANIMLANMASI

Gülhan KAYA

Alzheimer hastalığı (AH); yakın hafıza, neden sonuç ilişkisi, konsantrasyon, dil, görsel algılama ve görsel uzamsal fonksiyonları içeren kognitif fonksiyonların ilerleyici kaybıdır. AH'na bugün dünyada 35 milyon kişinin yakalandığı düşünülmektedir. Özellikle 75 yaşından sonra hızla artmakta ve oran %20-30 ları bulmaktadır. AH'nın klinik tanısı kesin kriterlerine rağmen sekonder nedenlerin ve diğer demansif hastalıkların dışlanması ile konur. Tanıda altın standart klinik AH tanısı almış kişinin beyinde tipik nöropatolojik değişikliklerin gözlenmesidir. Bu patolojik değişiklikler ilerleyici sinaptik bozulma ve nöron kaybının yanı sıra hücre dışı amiloid-beta plaklarının birikimi, hücre içinde ise hiperfosforillenmiş tau proteinini içeren nörofibriler yumakların oluşumudur. Fakat bugün amiloid-beta plaklarının birikimini ve nörofibriler yumakların oluşumunu başlatan sebeplerin ne olduğu tam olarak bilinmemektedir. Bu durum birçok genin etkileşimi ile oluşmakta ve buna çevresel faktörlerde katkıda bulunmaktadır. Şu ana kadar bilinen en major risk faktör göstergesi APOE genine ait E4 allelidir. Fakat E4 allelide sadece az bir kısmı temsil etmekte ve tek başına yeterli değildir. GWAS (Genome Wide Association Studies) çalışmaları sonucunda APOE'den sonra AH için en önemli risk faktörünün BIN1 geni olduğu düşünülmektedir. Bu açıdan bakılınca AH için spesifik biyomarkır tanımlanması çok önemlidir.

Bu çalışmamızda, AH için en önemli risk faktörü genlerinden olan ApoE geni E2, E3, E4 polimorfizmleri ve BIN1 gen polimorfizminin genotip ve allel frekansları çalışma grubumuzdaki 53 Alzheimer hastası ve 56 demans öyküsü olmayan kontrol grubu bireylerde değerlendirilmiştir.

Sonuç olarak, Alzheimer hastalığı ile APOE E4 aleli arasında anlamlı bir ilişki bulunurken, BIN1 geni ve Alzheimer hastalığı arasında anlamlı bir ilişki bulunamamıştır.

Anahtar Kelimeler: Alzheimer Hastalığı, APOE, BIN1, Polimorfizm, Biyomarker

SUMMARY

BIOMARKERS IN THE EARLY DIAGNOSIS OF ALZHEIMER'S DISEASE

Gülhan KAYA

Alzheimer's Disease is characterized with an impairment in cognitive functions such as short time memory, concentration, visual perception, executive functions. Approximately 35 million people suffer from Alzheimer's Disease today. The incidence increases especially after the age 75, up to %20-30. The diagnosis of Alzheimer's Disease is made with diagnostic criteria and the exclusion of other ethiological factors of dementia. The gold standard for the diagnosis of Alzheimer's Disease is observing neuropathological changes. These neuropathological changes include the extracellular accumulation of amyloid-beta plaques, intracellular accumulation of neurofibrillary tangles, which include hyperphosphorylated tau protein, along with progressive synaptic and neuronal loss. The factors precipitating Alzheimer's disease is still not completely known. It is thought to be a consequence of the interactions of multiple genetic and environmental factors. The E4 allele of APOE gene is the best known risk factor for Alzheimer's disease, yet it represents only a small ratio of the genetic factors. According to the studies held by GWAS(Genome Wide Association Studies), BIN1 gene was found to be the most important risk factor for Alzheimer's Disease following the APOE gene. In this perspective, BIN1 is a specific biomarker for Alzheimer's Disease.

In our study, we included 53 Alzheimer and 56 control group patients to examine the polymorphism and allele frequency of ApoE(e2,e3,e4) and BIN1 genes.

In conclusion, there was a strong association between Alzheimer's disease and ApoE E4 allele, while no relation was seen in with BIN1 gene polymorphism.

Key words: Alzheimer's disease, ApoE, BIN1, Polymorphism, Biomarker

İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
ÖNSÖZ	i
ÖZET	ii
SUMMARY	iii
İÇİNDEKİLER	iv
SİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİ	vi
TABLolar DİZİNİ	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ	ix
RESİMLER DİZİNİ	x
1 GİRİŞ VE AMAÇ	1
2 GENEL BİLGİLER	2
2.1 Alzheimer Hastalığı	2
2.1.1 Alzheimer Hastalığının Tarihçesi	2
2.1.2 Alzheimer Hastalığı ve Demans	3
2.1.3 Alzheimer Hastalığının Tanı Kriterleri	3
2.1.4 Alzheimer Hastalığının Klinik Özellikleri.....	7
2.1.5 Alzheimer Hastalığının Epidemiyolojisi.....	11
2.1.6 Alzheimer Hastalığının Patogenezi ve Nöropatolojisi.....	12
2.1.7 Nörofibriller yumaklar	13
2.1.8 Amiloid plaklar	14
2.1.9 Alzheimer Hastalığının Etiyolojisi.....	15
2.2 Alzheimer Hastalığının Genetiği.....	16
2.2.1 Erken başlangıçlı Alzheimer Hastalığı (EBAH) İle İlişkili Genler ...	16
2.2.1.1 Amiloid Prekürsör Proteinden (APP).....	17
2.2.1.2 PSEN	18
2.2.2 Geç başlangıçlı Alzheimer Hastalığı ile İlişkili Genler	18
2.2.2.1 Apolipoprotein E (APOE).....	18
2.2.2.1.1 APOE'nin Genel Yapısı	21
2.2.2.1.2 APOE Sentez Yerleri.....	23
2.2.2.1.3 APOE'nin Beyindeki Metabolizması.....	23
2.2.2.1.4 APOE ve Alzheimer Hastalığı	25
2.2.2.2 BIN1 Geni [Bridging integrator 1].....	26
2.2.2.2.1 Alzheimer Hastalığı ve BIN1 Geni.....	26
2.2.2.2.2 BIN1 Geninin Genetik Özellikleri	27

2.2.2.2.3	AH ve BIN1 Geninin Genetiği.....	28
2.2.2.2.4	AH ve BIN1 Arasında Epigenetik İlişki	29
2.2.2.2.5	Tau ve BIN1	29
2.2.2.2.6	Endositoz Taşınımında BIN1 Geninin Rolü	29
2.2.2.2.7	BIN1 ve İnflamasyon	30
2.2.2.2.8	Apoptoz ve BIN1	30
2.3	Polimorfizm	30
3	GEREÇ VE YÖNTEM	31
3.1	Periferik Kandan DNA İzolasyonu	31
3.2	DNA Amplifikasyonu	32
3.3	Primerlerin Sulandırılması	34
3.4	Gradyent PCR	35
3.5	PCR	37
3.9	Agaroz Jel Elektforezi	40
3.10	Sekans İşlemi	41
3.10.1	Örneklerin Exosap İle Muamelesi	41
3.10.2	Sekans PCR'ın Yapılması:	41
3.10.3	Sephadex Hazırlanışı	42
4	DENEYLERDE KULLANILAN CİHAZLAR	43
5	BULGULAR	44
5.1	APOE Gradyent PCR Elektforez Sonucu	44
5.2	BIN1 Gradyent PCR Elektforez Sonucu	44
5.3	APOE PCR Elektforez Sonucu	45
5.4	Hha1 Enzim Kesimi PCR Elektforez Sonucu.....	46
5.5	BIN1 PCR Elektforez Sonucu	47
5.6	Sekans Sonuçları	48
5.6.1	E2 / E3 Polimorfizmi.....	48
5.6.2	E3/E4 Polimorfizmi.....	48
5.6.3	E3/E3 Polimorfizmi.....	49
5.6.4	BIN1 ASO PCR Polimorfizm Sonuçları.....	50
5.7	İstatistiksel Değerlendirme.....	50
6	SONUÇLAR	57
7	TARTIŞMA	59
8	KAYNAKLAR	68

SİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİ

Simge	Açıklama
A β :	Amiloid- β
AchEls:	Asetilkolinesteraz inhibitörleri
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
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
HDL:	Yüksek yoğunluklu lipoprotein
HKB:	Hafif Kognitif Bozukluk
LDL:	Düşük yoğunluklu lipoprotein
MAPT:	Microtubule Associating Protein Tau
MI:	Karşılıklı Bilgi (Mutual Information)
MRI:	Manyetik rezonans görüntüleme
μ l:	Mikrolitre
NINCDS /ADRDA:	National Institute of Neurological and Communicative Disorders and Stroke/Alzheimer's Disease and Related Disorders Association
NMDA:	N-metil-D-aspartat
nt:	Nükleotit
NFY:	Nöro Fibriler Yumak
PACT:	PKR aktive edici protein

PSEN1:	Presenilin 1
PSEN2:	Presenilin 2
PCR:	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
SAGE:	Gen ekspresyonunun seri analizi (Serial analysis of gene expression)
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



TABLOLAR DİZİNİ

Tablo 1 Alzheimer Hastalığı Tanı Kriterleri.....	4
Tablo 2 DSM-IV Alzheimer Tipi Demans İçin Tanı Kriterleri.....	6
Tablo 3 Alzheimer Hastalığında Klinik Bulgular.....	8
Tablo 4 Alzheimer Hastalığı Klinik Evreleri	9
Tablo 5 Erken Başlangıçlı AH İle İlişkili Genler Ve Etkinlikleri	17
Tablo 6 AH'da etkili olduğu düşünülen genlere ait yolaklar.....	26
Tablo 7 APOE için PCR'da kullanılan primerlerin dizileri.....	32
Tablo 8 ASO-PCR'da kullanılan primerlerin dizileri.....	33
Tablo 9 APOE Gradyent PCR için kullanılan solüsyon karışımı.....	35
Tablo 10 İzlenen Gradyent PCR programı.....	36
Tablo 11 BIN1 Geni Gradyent ASO-PCR için kullanılan solüsyon karışımı.....	36
Tablo 12 İzlenen Gradyent PCR programı.....	36
Tablo 13 Apoe İçin Pcr Reaksiyon Karışımı.....	37
Tablo 14 İzlenen PCR programı.....	37
Tablo 15 CFO1(Hha1) enzimi için kesim koşulları.....	38
Tablo 16 BIN1 İÇİN ASO-PCR REAKSİYON KARIŞIMI.....	40
Tablo 17 İzlenen PCR programı.....	40
Tablo 18 izlenen PCR programı.....	41
Tablo 19 Sekans PCR için miks karışımı.....	42

Tablo 20 izlenen PCR programı.....	42
------------------------------------	----

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1 Alzheimer Hastalığının Klinik Seyri.....	9
Şekil 2 Nörofibriler yıkımın aşamaları.....	14
Şekil 3 APOE geninin kromozom 19'daki lokasyonu.....	19
Şekil 4 Apolipoprotein E2'nin amino asit dizilimi.....	20
Şekil 5 İnsan Apolipoprotein E genin yapısı.....	21
Şekil 6 insan APOE proteininin yapısı.....	22
Şekil 7 Apolipoprotein E'nin merkezi sinir sistemi hücreleri arasında lipidlerin yeniden dağılımındaki rolü ve APOE'nin izoformlarının nöropatolojik üzerindeki özgül farklılıkları.....	24
Şekil 8 BIN1 geninin kromozom 2'deki lokasyonu.....	28
Şekil 9 APOE Rs429358 polimorfizmi.....	48
Şekil 10 APOE Rs7412 Polimorfizmi.....	48
Şekil 11 APOE Rs 429358 Polimorfizmi.....	48
Şekil 12 APOE Rs7412 Polimorfizmi.....	49
Şekil 13 APOE Rs429358 Polimorfizmi.....	49
Şekil 14 APOE Rs7412 Polimorfizmi.....	49
Şekil 15 BIN1 rs744373 gen polimorfizmi.....	50

RESİMLER DİZİNİ

Resim 1 APOE gradyent PCR sonucunda elde edilen agaroz jel elektroforez görüntüsü.....	44
Resim 2 BIN1 gradyent PCR sonucunda elde edilen agaroz jel elektroforez görüntüsü.....	45
Resim 3 APOE PCR amplifikasyon ürünlerinin agaroz jel görüntüsü.....	45
Resim 4 APOE RFLP ürünlerinin agaroz jel görüntüsü.....	46
Resim 5 BIN1 ASO PCR amplifikasyon ürünlerinin agaroz jel görüntüsü.....	47

1 GİRİŞ VE AMAÇ

Alzheimer Hastalığı (AH) yaşa bağımlı ve geri dönüşümsüz nörodejeneratif bir hastalık olup yaşlılarda demans türleri arasında en sık görülenidir [1]. İlk olarak 1900'lü yılların başında Alman psikiyatris ve nöropatolog Dr. Alois Alzheimer tarafından tanımlanmıştır. AH' lığı toplumdaki genel ölüm oranı sıralamasında dördüncü sırada yer almaktadır. Hastalık için en önemli risk faktörü ileri yaştır ve 65 yaş sonrasında prevalansı her beş yılda bir ikiye katlanmaktadır [2]. Alzheimer hastalığının klinik tanısı demansa sebep olan diğer nedenlerin ekarte edilmesi ile yapılmaktadır. Kesin tanı ise ancak post-mortem dönemde nöropatolojik inceleme ile mümkündür [3]. Bu nedenle hastalığın tanısına katkı sağlayacak biyomarkırlara ihtiyaç söz konusudur. AH' da incelenen biyomarkır, hastalığın tanısında prognozun belirlenmesine katkı sağlayabileceği gibi hastalığa yatkınlığı da belirleyebilmeli, hatta hastalığı diğer demans türlerinden de ayırmalıdır [2].

Yaşın ilerlemesiyle bazı insanlar AH 'na yakalanırken diğer bazıları etkilenmemektedir. Bu farklılıkta ise insan genomundaki bazı genlere ait kombine polimorfizmlerin rol oynadığına inanılmaktadır. Ancak bu güne kadar bu polimorfizmler tam olarak belirlenememiştir. Biz de bu çalışmamızda AH 'na yatkınlıkta Türk toplumunda etkili olabilecek bazı polimorfizmleri belirlemeyi amaçladık.

AH' da bilinen en önemli risk faktörü APOE genine ait E4 alleli olmasına karşın bu allelin Türk toplumundaki AH'da görülme sıklığı farklılık göstermektedir. Türk toplumunda bu allelin görülme sıklığı farklılık göstermesine rağmen ülkemizdeki genetik tanı testlerinde de APOE E4 alleli çalışılmakta ve sonuçlar değerlendirilmektedir.

Ayrıca, APOE geni E4 alleli AH' da en önemli risk faktörü olarak tanımlansa da bu polimorfizm bütün Alzheimer vakalarını açıklamakta yeterli kalmamakta, farklı genlerin Alzheimer üzerindeki etkisi araştırılmaya devam edilmektedir. AH etyopatogenezinde önemli bir başka aday gen ise BIN1 (Bridging İntegrator 1)'dir. Türk toplumunda hiç çalışılmamış olan BIN1 (Bridging İntegrator 1) geni ile tau proteini arasındaki ilişkinin AH riskini etkilediği düşünülmektedir. BIN1 geninin

aynı zamanda endositoz taşınımı, inflamasyon, kalsiyum dengesi ve apoptoz dahil olmak üzere çeşitli hücrel fonksiyonları etkilediği bilinmektedir.

Sağlıklı iken Alzheimer riskinin bilinmesi yavaş ilerleyen bu hastalığın erken tanı ile daha etkili tedavi edilmesini, bir takım önlemler olarak hastalığın başlangıcının geciktirilmesini, AH' da etkili olan çevresel faktörlerden kaçınarak tedbir almayı, kişinin ve/veya ailesinin ilerideki hayatlarında yaşayabilecekleri problemlere karşı hazırlıklı olmasını sağlamak gibi avantajlar sunacaktır. Bu nedenle bu çalışmamızda sağlıklı kişilerin ilerleyen zamanlarında AH 'na yakalanma riskini belirleyen biyomarkırların tanımlanması amaçlanmıştır. Bu amaçla AH ile ilişkili olan APOE genine ait E2, E3 ve E4 allelleri ile bu hastalığa ilişkin aday genlerden biri olan BIN1 genine ait polimorfizmler sağlıklı ve Alzheimer hastalarında incelenip hastalıkla ilişkileri araştırılmıştır.

2 GENEL BİLGİLER

2.1 Alzheimer Hastalığı

2.1.1 Alzheimer Hastalığının Tarihçesi

Alzheimer hastalığı (AH) ilk kez 1907 yılında Dr. Alois Alzheimer tarafından dört buçuk yıl takip ettiği 51 yaşındaki Auguste D. adındaki bir kadın hastada tanımlamıştır. Bu hastalık tanımlandıktan sonra "Alzheimer" adını klinik şefi Dr. Emil Kraepelin vermiştir [5]. Dr. Alois, hastada ilerleyici şuur kaybı, kişilik değişikliği, konuşma bozukluğu ve apraksisi bulunan bir vaka tanımlamış ve birkaç yıl sonra hastanın otopsi materyalini incelemiştir. Hastanın otopsisinde gümüş boyası ile anormal boyanma örneği gözlemlemiştir yani, gümüş pozitif nörofibriler yumaklar, serebral kortikal nöron kaybı ve senil plaklar olarak bilinen değişiklikleri ortaya koyarak bu hastalığı tanımlamıştır [4,6]. AH 1960'lara kadar çok nadir görülen ve geç yaşta başlayan bir hastalık olarak biliniyordu [7]. Fakat son yıllarda yapılan çalışmalar sonucunda bu görüş değişmiştir. AH, otuzlu yaşlarından sonra başlayıp herhangi bir yasta ortaya çıkan, etiyojisi bilinmeyen, ilerleyici demansa neden olan bir hastalık olarak da tanımlanmaktadır [8]. AH ile ilgili yapılan

çalışmalar 1960-1970'lerde serebral kortikal lezyonların yapısı, spesifik nörotransmitterlerde eksikliklerin anlaşılması ile başlamıştır. Özellikle 1980-1990'larda moleküler biyolojik ve genetik alanındaki çalışmalar, AH' deki moleküler değişikliklere yeni bir bakış açısı getirmiştir. 1984'te Glanner ve Wong amiloid beta (A β) peptidini izole edip saflaştırmış, 1987'de ise Glanner ve Wong'un çalışmaları Kang ve ark. tarafından doğrulanmış, A β 'nın öncü proteini olan Amyloid Precursor Protein (APP) klonlanmıştır [9,10]. Yapılan bu çalışmalar, AH' da patogeneze yönelik mekanizmaları aydınlatmak için basamak oluşturmuştur.

2.1.2 Alzheimer Hastalığı ve Demans

Demans yani bunama, kronik ve progresif bir durum olup, günlük yaşam aktivitelerini etkileyecek düzeyde başta bellek olmak üzere davranış ve günlük yaşam aktivitelerinin geri dönüşümsüz kaybı olarak birden fazla kognitif fonksiyonda ilerleyici ve kalıcı kayıpla karakterize olan klinik bir bozukluktur [11]. AH demans nedenleri arasında ilk sırada yer alırken, vasküler demans (VaD) ikinci en sık demans nedeni olarak bilinir [12].

AH; moleküler genetik, hücre biyolojisi, biyokimya, sinir bilimi ve yapısal biyoloji gibi biyolojik disiplinlerin de ilgilendiği bir hastalıktır. Yakın hafıza, neden sonuç ilişkisi, konsantrasyon, dil, görsel algılama ve görsel uzamsal fonksiyonları içeren bilişsel fonksiyonların ilerleyici kaybıdır [13,1].

Demans tiplerinin çoğunun tam bir tedavisi yoktur bu da hastanın ve hastaya bakım verenlerin sosyal ve ekonomik alanlarda sıkıntı yaşamalarına yol açar. Bu durumda hastalığın erken dönemde tanınmasını önemli hale getirmektedir [14].

2.1.3 Alzheimer Hastalığının Tanı Kriterleri

Alzheimer Hastalığı'nın klinik tanısı demansa yol açabilen diğer nedenler ekarte edilerek yapılmaktadır. Kesin tanı ise ancak post-mortem dönemde nöropatolojik incelemeler sonucunda mümkün olmaktadır. Alzheimer hastalığının klinik tanısı için yayınlanmış olan ve bugün yaygın biçimde Ulusal ve Nörolojik ve İletişim Hastalıkları Enstitüsü ve İnme-Alzheimer Hastalığı ve İlişkili Hastalıklar Derneği

(NINCDS-ADRDA) [15], Tanısal ve Sayımsal El Kitabı (DSM-IV) [16] tanı kriterleri kullanılmaktadır (Tablo 1,2). Bu kriterler bellek veya lisan görsel-uzaysal yetiler veya yürütücü işlevler gibi bilişsel işlevlerde bozulmayı ön görür. Yapılan postmortem İncelemeler sonucunda NINCDS-ARDRA kriterlerinin %85 oranında doğruluk gösterdiği bildirilmiştir [3].

Tablo 1 Alzheimer Hastalığı Tanı Kriterleri

I. MUHTEMEL Alzheimer Hastalığı klinik tanı kriterleri şunları içerir:

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

II. MUHTEMEL Alzheimer Hastalığı tanısı şunlarla desteklenir:

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

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

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

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

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

V. MÜMKÜN Alzheimer Hastalığı tanı kriterleri şunlardır:

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

VI. KESİN Alzheimer Hastalığı tanısı kriterleri şunlardır:

- Muhtemel Alzheimer Hastalığı klinik kriterleri
- Biyopsi ya da otopsiyle elde edilen histopatolojik kanıtlar.

Tablo 2 DSM-IV Alzheimer Tipi Demans İçin Tanı Kriterleri [19].

A. Birden fazla bilişsel alanı içeren bozukluk kendini aşağıdaki iki maddeyi de kapsayacak şekilde gösterir

1. Bellek bozukluğu (yeni bir bilgi öğrenme ve öğrenilmiş eski bir bilgiyi hatırlama yeteneğinin bozulması)

2. Aşağıda sıralanan bilişsel bozuklardan en az biri:

a. Afazi (dil bozukluğu)

b. Apraksi (motor işlevlerin normal olmasına karşın belirli motor eylemleri yerine getirilmesi yeteneğinde bozulma)

c. Agnozi (duysal işlevlerin salim olmasına karşın nesnelere tanımakta güçlük)

d. Yürütücü işlevlerde bozulma (planlama, organize etme, sıralama, soyutlama)

B. A1 ve A2 kriterlerinde tanımlanan bilişsel bozukluklar toplumsal ve mesleki işlevselliği ciddi biçimde bozmakta ve eski işlevsellik düzeyine göre anlamlı bir gerilemeyi temsil etmektedir.

C. Seyir, sinsi başlangıç ve yavaş ilerleyici kognitif yıkım özelliklerindedir.

D. A1 ve A2 kriterlerinde tanımlanan bilişsel bozukluklar aşağıda sıralanan nedenlerden herhangi birine bağlı değildir:

1. Bellek ve diğer bilişsel işlevlerde ilerleyici bozulmaya neden olabilecek merkez sinir sistemine ait diğer durumlar (örn. serebrovasküler hastalık, Parkinson hastalığı, Huntington hastalığı, subdural hematoma, normal basınçlı hidrosefali, beyin tümörü)

2. Demansa neden olabileceği bilinen sistemik durumlar (örn. Hipotiroidizm, B12 vitamini ya da folik asit eksikliği, niasin eksikliği, hiperkalsemi, nörosifilis, HIV enfeksiyonu)

3. İlaçlar ve madde kullanımı ile ilgili durumlar

E. Bozukluklar delirium seyri dışında ortaya çıkmıştır.

F. Bozukluk başka bir Eksen I hastalığı ile açıklanabilir nitelikte değildir.

AH 'nın tanısında kullanılan laboratuvar testleri genellikle diğer hastalıkları dışlamaya ve tedavi edilebilir demans nedenlerini ortaya çıkarmaya yöneliktir. Tam kan, böbrek ve karaciğer fonksiyon testleri, elektrolitler, B12 vitamini, plazma glikozu, folik asit, tiroit fonksiyon testleri, risk altında olan hastalarda HIV serolojisi bakılmaktadır [17].

Hastaya klinik tanı kriterlerine göre, Alzheimer tanısı konulduğu anda, beyinde belirgin miktarda nronsal kayıp ve nöropatolojik değişiklik meydana gelmiş demektir. Bu hasarın bir kısmının geri döndürülmesi mevcut olan ve henüz deneme aşamasındaki bazı ilaçlarla mümkün olsa da, nöroprotektif ilaçlarla yapılacak bir tedaviye AH hafif semptomatik dnemdeyken, hatta bu dönemden bile önce başlanması daha ideal olacaktır. Bu nedenle, geri dönüşsüz nöronal hasar ortaya çıkmadan önce beyin fonksiyonlarındaki erken değişiklikleri tespit edebilecek sensitif belirteçler geliştirilmesi gerekmektedir [18].

2.1.4 Alzheimer Hastalığının Klinik zellikleri

Alzheimer hastalığının klinik belirtilerinin başında bellek kaybı, lisan bozukluğu, apraksi ve agnozi gelmektedir. AH 'nın belirtilerini Kognitif, Davranışsal ve İşlevsel olmak üzere üç ana kategoride sınıflandırabiliriz. Demans tanısı bu alanların sorgulanması ile belirlenir (Tablo 3).

Tablo 3 Alzheimer Hastalığında Klinik Bulgular [19]

Kognitif	Yakın Bellek	Yakın geçmişe ait kişisel ve güncel olayların unutulması
	Uzak Bellek	İlkokul öğretmeni, okuduğu okullar, evlilik vs
	Dikkat	Dalgalanma, konsantrasyon, çelişilebilirlik
	Görsel-Mekânsal İşlevler	Yabancı-tanıdık mekânlarda dolaşabilme, kaybolma
	Dil (lisan bozukluğu)	Kelime bulma, anlama, okuma-yazmada güçlükler
	Yürütücü İşlevler	Problem çözme, yargılama, soyutlama bozuklukları
	Apraksi	Sonradan öğrenilen pratik olarak yapılan ve motor beceri gerektiren hareketleri yapma becerisinin bozulması (Alet kullanma, giyinmede güçlükler vs)
	Agnozi	Bedeninin çeşitli bölümlerini, Nesnelere tanıyamaması, birbirinden ayıramama
Davranışsal	Kişilik Değişiklikleri	Apati, disinhibisyon, sosyal uygunsuzluk
	Duygu durum bozuklukları	Keder, isteksizlik, huzursuzluk, yerinde duramama, sinirlilik, uygunsuz neşe
	Algı Bozuklukları	Görsel ve diğer halisünasyonlar
	Düşünce Bozuklukları	Hırsızlık, sadakatsizlik ve diğer halisünasyonlar
İşlevsel	Günlük Yaşam Aktiviteleri	İş yaşamı, yolculuk, mali işler, alışveriş, sosyal ilişkiler
	Evde Günlük Yaşam Aktiviteleri	Hobiler, ev aygıtlarını kullanma, yemek pişirme, diğer ev işleri
	Kendine Bakım	Yemek yeme, yıkanma, giyinme, makyaj, tıraş olma

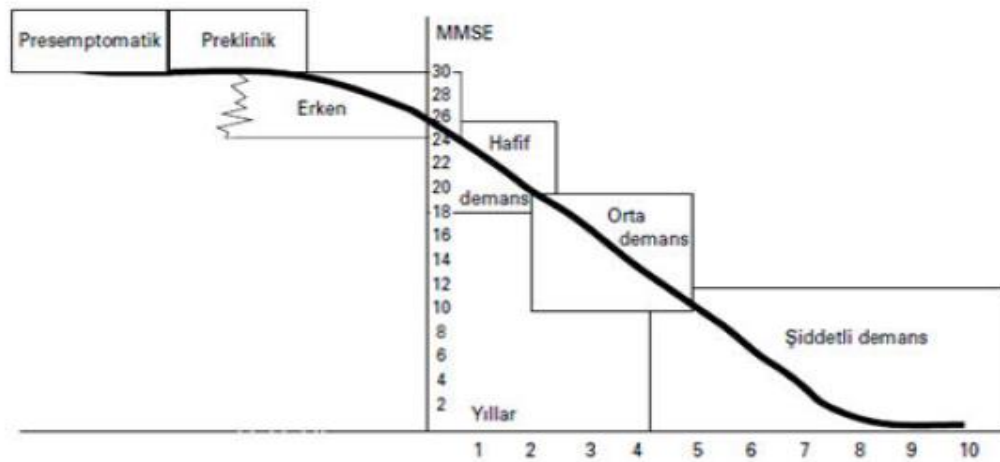
Demanslı hastadan uygun şekilde öyküsü alındıktan sonra mutlaka hastanın yakınından da eş zamanlı olarak öyküsü alınmalıdır [19]. Daha sonra mental durum muayenesi ve nörolojik muayenenin yapılması gereklidir. Mental durum muayenesinde elde edilen bulgular eğitim ve sosyokültürel seviyeye göre farklılık

gösterebilir. Dolayısıyla hastaların mental durum muayenesi sonuçlarını değerlendirilirken bu faktörler göz önünde bulundurulmalıdır. Aynı zamanda hastanın davranışsal belirtileri de kaydedilir. Ve bunların sonucunda laboratuvar testlerinin desteği de alınarak demans sendromuna neden olan hastalığın tanısı konmuş olur. Demans tanısı konulan veya şüphelenilen her hastaya basit bir biyokimya, tam kan sayımı, tiroit fonksiyon testleri, serum vitamin B12 incelenmesi ve kranyal BT veya tercihen MRG incelemesi yapılmalıdır. Aile öyküsü olan, nedeni gösterilememiş erken başlangıçlı demansı bulunan hastalarda ileri bir genetik inceleme de yapılabilir [20].

Alzheimer hastalığı ilerleyici bir hastalık olması nedeniyle, demans şiddetine göre altı sınıfa ayrılmaktadır (Tablo 4).

Tablo 4 Alzheimer Hastalığı Klinik evreleri [24].

1. Preseptomatik dönem,
2. Preklinik dönem,
3. Erken “şüpheli” Alzheimer hastalığı,
4. Hafif evre Alzheimer hastalığı,
5. Orta evre Alzheimer hastalığı,
6. Ağır evre Alzheimer hastalığı,



Şekil 1 Alzheimer Hastalığının Klinik Seyri

Preseptomatik evrede, otopsi yapılan kişilerin beyinde yavaş ilerleyen bir patolojik sürecin varlığı bulunmuştur. Ancak davranışsal semptomlarda, günlük aktivitelerde bozulma, performansta azalma yoktur. Preklinik evrede, özellikle hafızada kolaylıkla fark edilmeyen kayıplar nöropsikolojik testlerle saptanabilir. Fakat bu kayıplar günlük aktivitelerde herhangi bir aksamaya yol açmaz [22,23].

Hafif (Erken) Dönem AH' da başlangıç semptomları sinsi biçimde başlar ve sıklıkla hastalığın başlangıç zamanı kesin olarak bilinemez. Belirtiler hafif unutkanlıkla başlar ve hastalar hekime başvurmadan önce belirsiz bir kognitif bozukluk yıllarca ilerler. Erken evrede en önemli özellik bellek bozukluğudur. Hasta karar vermede, ev ve iş hayatında sorunlar yaşamaya başlar. Başlayan unutkanlık konuşulanların tekrarlanmasına, eşyaların kendi başına bulunamayacak şekilde yanlış yerlere konulması ve konuşmaların ve olayların hatırlanamaması şeklinde olur. Yeni öğrenilen bilginin kaydında oluşan bu bozukluk yakın dönem olaylarının veya yeni tanışılan insanların isimlerinin hatırlanamaması ile sonuçlanır. Buna karşın geçmişte edinilmiş bilgiler rahatlıkla hatırlanabilir. Unutkanlık artmaya başladıkça diğer kognitif aktivitelerdeki bozulma belirtileri de belirgin olarak ortaya çıkmaya başlar. Hafif olarak mekân ve zaman oryantasyon kusuru vardır ve hasta iyi bildiği yerleri bile bulmak için yardıma ihtiyaç duyar veya tarihi hatırlayıp söyleyebilmek için bazı hatırlatmalara ihtiyaç duyabilir. Ev işlerini yapmaya devam eder ama aynı özeni gösteremez. Muhakeme etme ve problem çözme yeteneği de bozulmuştur; sıklıkla iç görü kaybolur ve yeni öğrendiği veya karmaşık işlerde zorlanır. Uyku kalitesi bozulmaya başlar. Giyinme ve yıkanma gibi temel ihtiyaçları gidermede henüz ciddi bir sorun yoktur. Fakat yavaş yavaş motorlu taşıt kullanma, banka hesaplarını düzenleme, alet edevat kullanma gibi günlük aktivitelerde giderek daha az verimli hale gelir. Dil bozuklukları, kelime bulmada güçlük, duraklayarak konuşma, oral veya yazılı ifadenin azalmasını içerir. Girişkenliğin kaybı ve çevresine ilgisizlik gibi kişilik değişiklikleri sıklıkla görülür ve bu da hastalığın habercisi olabilir. Kognitif alan durum tarama testi olarak kullanılan Mini Mental Durum Testleri (MMDT) genellikle eğilimli olgularda 20–25 puan arası değişir [24,25]. Temel nörolojik muayene genellikle normaldir.

Orta Dönem AH, genellikle hastalığın başlangıcından 4 ile 7 yıl sonraki dönemdir. Hasta ev dışındaki bağımsızlığını tamamen yitirerek giderek artan bir

şekilde başkalarına bağımlı hale gelir. Artık yeni bir şeyler öğrenme hemen hiç mümkün değildir. Hasta akrabalarının yakınlık derecelerini ve kimliklerini karıştırabilir. Anlama, okuma ve yazma giderek bozulur. Unutkanlığın şiddeti giderek artar. İyi bildiği çevrede bile kaybolabilir. Muhakeme etme, problem çözme, yemek ve ev işlerini yapma belirgin olarak bozulmuştur. Bu evrede araba kullanma ve diğer karmaşık aktiviteler terk edilmiştir. Dil işlevleri daha da kötüleşir. Tamamlanamayan ve boşluklar içeren cümlelerle konuşur bu yüzden anlaşılması zorlaşır. Her hastada görülmesi de yıkıcı davranışlar genellikle ortaya çıkar. Hırsızlık (örn: koyduğu yeri hatırlayamadığı nesnenin çalındığı gibi yanlış inanışlar), terk edilme (yalnız kalmaktan korkar ve yakınlarını sürekli yanında ister), sadakatsizlik hezeyanları, ajitasyon, huzursuzluk, yerinde duramama, gece gündüz disoryantasyonu, uyku bozuklukları, sözle ve fiziki saldırganlıklar, aşırı şüphecilik ve halüsinasyonlar hasta yakınları için oldukça sıkıntılı bir süreçtir ve bir kuruma yatışı gerektirebilir. MMDT yaklaşık 10–19 puan arasında değişir. Komputere tomografileri ve MR görüntülemeleri normal veya hafif atrofiktir [26].

Ağır (Geç) Dönem AH, hastanın neredeyse en temel işlevlerde bile tamamen bakıcısına bağımlı hale geldiği bir dönemdir. Sadece bellek parçacıkları kalır. Hasta yakınlarının ve aynada kendi yüzünü tanıyamaz. Yemek yeme, yıkanma, giyinme gibi temel aktivitelerde tam yardım gerekmektedir. Ekstra piramidal fonksiyon bozuklukları, jeneralize tonik-klonik nöbetler ve düşmeler gibi motor komplikasyonlar ortaya çıkabilir. Bu dönemin sonuna doğru yutma güçlüğü de ortaya çıkar. Üriner ve fekal inkontinans mevcuttur. Terminal evrede hasta tamamen yatağa bağımlı ve hiç bir şeyi anlamaz durumdadır. Disfaji ve kilo kaybı sıktır. Temel nörolojik muayenede yürüyüş bozuklukları, tonus değişiklikleri, parkinsonyen bulgular belirginleşir. MMDT yaklaşık olarak 0-9 arasındadır. Ölüm çoğunlukla pulmoner emboli, pnömoni, ürosepsis, aspirasyon veya beslenememe gibi uzun süre yatağa bağımlı olmaktan dolayı oluşan komplikasyonlar nedeniyle olur [1,24,27].

2.1.5 Alzheimer Hastalığının Epidemiyolojisi

AH, tüm demans türlerinin % 50-60'ını oluşturur. Demansın en sık görülen formudur. Özellikle batı dünyasında 60-64 yaşlarında demans görülme sıklığı %1'in

altındayken, bu oran yaşlanma ile hızlı bir artış gösterir ve 85 yaş ve üzeri bireylerde bu oran % 24-33'e ulaşır.

Yapılan çalışmalar 2001 yılında demansın 24 milyondan fazla insanı etkilediği ve bu oranın her yirmi yılda bir ikiye katlanacağını ve ortalama yaşam süresinde beklenen artışla beraber 2040 yılında 81 milyona ulaşabileceği tahmin edilmektedir. Yapılan çalışmalar Türkiye'de demans oranının ortalama % 8,4 olduğunu ve bu oranında % 48,8'nin Alzheimer tipi demans olduğunu göstermiştir [28,29].

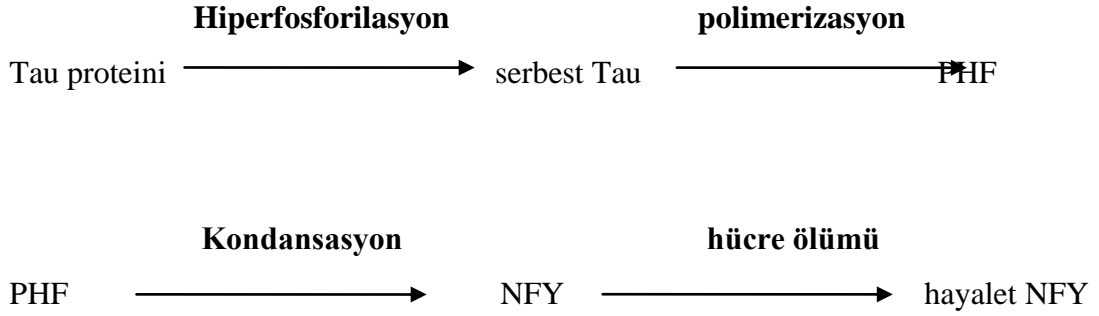
2.1.6 Alzheimer Hastalığının Patogenezi ve Nöropatolojisi

Alzheimer, demansın büyük bir kısmını oluşturan progresif nörodejeneratif bir hastalıktır. AH, histopatolojik ve morfolojik olarak hücre dışında A β plaklarının ve hücre içinde de nörofibriller yumakların (tau) birikimi ile karakterize olup, bu değişimlerin AH' deki nörodejenerasyon da aktif rol oynadığı düşünülmektedir [2, 34]. Hastaların beyinlerinde yapılan histopatolojik çalışmalar beynin hipokampus ve neokorteks gibi farklı bölgelerinde senil plakların ve nörofibriller ipliklerin var olduğunu ayrıca geniş nöronal kaybın oluştuğunu göstermiştir. Alzheimer hastalığının nöropatolojisindeki etkenleri şu şekilde sıralayabiliriz; sinaps kaybı, nöron kaybı, amiloid plaklar, nörofibriller yumaklar, gliosis-inflamasyonun kaybı, kolinerjik innervasyonun kaybı ve diğer nörotransmitterlerin kaybı [31].

AH patogenezi, genetik ve çevresel faktörlerin beraber oluşturdukları kompleks bir yapıdır. Bazı hastalarda sporadik olarak gelişirken özellikle ailesel kalıtsal tiplerinde tespit edilen bazı proteinler vardır [32]. Beta amiloid peptid, tau proteinleri ve izoform 4 tipindeki kolesterol transporting Apolipoprotein E (APOE) proteinlerinin AH patogenezinde etkili olduğu tespit edilmiştir [33]. A β 'nın prokürsor proteini olan β Amiloid prekürsor proteini (APP) çeşitli dokularda eksprese edilmektedir. APP ekspresyonu; stres, büyüme hormonları, sitokinler gibi çeşitli ajanlarla indüklenebilmektedir [1].

2.1.7 Nörofibriller yumaklar

Alzheimer'deki nörofibriller yumakların (NFY) temel bileşeni fosforile tau proteinleridir. Tau proteini genellikle nöronlarda bulunmasına rağmen çekirdekli olan tüm hücrelerde görülmektedir. Bu proteinin fonksiyonu mikrotübüllere bağlanıp, mikrotübül oluşumunda rol oynar. Tau 17. kromozomdaki bir gen tarafından kodlanan düşük molekül ağırlıklı bir proteindir. Mikrotübüllerin sabitleştirilmesinde, hücre iskeletinin bütünlüğünün sağlanmasında ve aksoplazma ulaşımının sürdürülmesinde önemli rol oynar. Yapılan çalışmalar NFY 'nin hiperfosforillenmiş tau proteinlerini içerdiğini göstermektedir [34]. Tau proteinini, Mikrotübül Asosiye Protein Tau (MAPT) geni kodlar ve bu gen 16 ekzondan oluşmaktadır. Yetişkin bir bireyin beyinde alternatif kesilim (*splicing*) sonucu tau proteininin altı adet izoformu oluşmaktadır [35,36]. Nörodejenerasyon sırasında tau anormal bir şekilde fosforillenir. Bugüne kadar tau proteininin 39 farklı bölgeden fosforillenebildiği gözlemlenmiştir. Bu modifikasyonların tau'nun mikrotübüllere bağlanma ilgisinin azalmasında rolü olduğu ve sonucunda ise aksonal transportta bozulmalara yol açtığı düşünülmektedir [2, 37, 38]. NFY 'lar nöronal yıkımın en fazla olduğu beyin bölgelerinde görülür ve demansın şiddeti ile koreledir [34, 39, 40]. Birinci kromozomda yer alan tau gen mutasyonları "Frontotemporal Demans" adını alan bir klinik tabloya yol açar. Bu hastalıkta AH 'da gözlenen NFY 'lar saptanır. Nörodejenerasyon un frontal ve temporal bölgede sınırlı olduğu bu tabloda A β patolojisi gözlenmez. Tüm bu bulgular "amiloid hipotezinin" hastalığın başlangıcında yer aldığı, tau ile ilişkili patolojinin ise daha sonradan ortaya çıktığını desteklemektedir [41]. AH patogenezinde hiperaktif kinazlar ve/veya hipoaktif fosfatazlar tau proteininin hiperfosforilasyonuna yol açarak mikrotübüllere bağlanma yeteneğini bozarlar. Bağlanmamış fosforile tau çözülemeyen çift sarmallı filamanlara (PHF) polimerize olur. Bunlar zamanla sinir hücresi içinde NFY 'lar şeklinde yoğunlaşırlar. NFY 'lar sonunda hücre iskeleti bütünlüğünü ve aksonal iletiyi bozarak hücre ölümüne neden olur. Hücre ölümüyle ortaya çıkan ekstrasellüler NFY'a 'hayalet yumak' denir [34].



Şekil 2 nörofibriller yıkımın aşamaları

2.1.8 Amiloid plaklar

Amiloid plakların kaynağının kan damarları ve beyindeki nöronların dış yüzeyinde biriken amiloid beta ($A\beta$) peptid komplekslerinin olduğu bilinmektedir [42]. Amiloid plakların temel bileşeni olan amiloid beta proteini ($A\beta$), 19. Kromozomda kodlanan ve işlevi tam olarak bilinmeyen bir transmembran protein olan APP'nin metabolizma ürünlerindedir. APP normal nöron transmembran proteindir. APP'nin, nöronal stres veya hasar ile doğal nöroprotektif ajan olduğu düşünülmektedir. Ayrıca, APP'nin glutamat eksitoksisitesinden nöronları koruyup, Ca^{+2} konsantrasyonunu indirgeyerek, nöronal stres veya hasardan doğal nöron koruyucu olduğu düşünülmektedir.

APP metabolizmasında alfa, beta ve gama sekretazlar olarak adlandırılan üç proteaz iş görür. Alfa sekretaz APP'yi, $A\beta$ bölgesinin ortalarına rastlayan ekstrasellüler bölgede keserek tam bir $A\beta$ parçasının oluşumunu olanaksız kılarken β ve gama sekretazlar etkilerini, sırasıyla, $A\beta$ bölgesinin hemen dışındaki, N- ve C- uçlarında göstererek, bütün $A\beta$ 'yi içeren bölünme ürünleri ortaya çıkartırlar. Gama-sekretaz'ın etkinlik gösterdiği kesim bölgesine göre, oluşan $A\beta$ parçası, kısa (39–40 aminoasit) veya uzun (42–43 aminoasit) olabilir. Uzun $A\beta$, çözünürlüğü olmayan lifler oluşturmaya daha yatkındır ve nörotoksisite olasılığı daha yüksektir. Potansiyel olarak çözünürlüğü olmayan ve plaklara çökelebilen diğer bir APP parçası alfa ve gama sekretazların ortak etkisiyle oluşan $A\beta$ 17–42 parçasıdır. Sonuç olarak, alfa-sekretaz aktivitesiyle hücre kültürlerinde nöronlar üzerinde nörotrofik etkileri

gösterilmiş olan çözünebilir APP oluşurken β ve gama sekretazların aktiviteleri sonucunda belirgin derecede bölgesel nörotoksik etkiler çıkartan katı ve nöritik β kıvrımlı plaklar (agregatlar) oluşmaktadır. Bu β kıvrımlı plakların serebral neokortekste bol veya orta yoğunlukta gösterilmeleri AH'nen kesin tanısı için gerekmektedir [43].

J. Hardy tarafından öne sürülen “amiloid kaskadı hipotezine” göre beyindeki A β üretimi ve yıkımı arasındaki dengesizlik hastalığın önemli nedenlerindedir [2, 44, 45]. 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 [34,46,47]. Yapılan son çalışmalar, çözünen oligomerik A β düzeyleri ile kognitif bozulma arasında daha iyi bir korelasyon olduğunu göstermiştir [46]. Ayrıca *in-vitro* çalışmalar oligomerik A β türlerinin, fibriller türlerden daha toksik olduğunu göstermiştir.

Amiloid plak formasyonu, inflamasyon ve nörofibriller iplikçikler olmak üzere iki yolakla nöron 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 nöronların hücre ölümüne neden olur [48].

2.1.9 Alzheimer Hastalığının Etiyolojisi

Geç oluşan Alzheimer hastalığının etiyolojisi multifaktöryel dir. Birçok genetik ve genetik olmayan faktörler Alzheimer hastalığının oluşum yaşını ve gidişatını belirlemektedir. Bu faktörlerin Ahuna olan gerçek katkısı, önemi ve etkileşimleri tam olarak bilinmemektedir [49].

Yaş, tüm demanslarda olduğu gibi Alzheimer da en önemli bir risk faktörüdür. Hastalığın prevalansı 60 yaşından önce nadirken, 85 ve üzeri yaşlarda yaklaşık %50'ye yükselir [50]. AH, kadınlarda erkeklerden daha sık görüldüğü bilinmektedir. Yapılan bazı çalışmalarda bu durumun ilerleyen yaşlarda kadın nüfus oranının erkeklerden daha fazla olması nedeninden olduğu bildirilmiştir [51]. Ailede demans öyküsü de etkili faktörlerden biridir. Birinci derece akrabalarında

(ebeveynleri, çocukları, kardeşleri) Alzheimer öyküsü olan bireylerin hastalıktan etkilenmiş bir yakını olmayanlara göre Alzheimer hastalığına yatkınlıkları 3-4 kat daha fazladır [52]. Düşük eğitim düzeyinin de Alzheimer hastalığı insidansını 1,5 kat arttırdığı bilinmektedir [53]. Yapılan çalışmalar 35 yaşın üzerindeki Down sendromlu kişilerde, AH gelişim riskinin yüksek olduğunu göstermiştir. Bu kişilerde, Alzheimer hastalarının beynindeki benzer lezyonların geliştiği rapor edilmiştir [54]. Uzun yıllar alkol kullanımı, kafa travmaları, kardiyovasküler hastalıklar ve risk faktörleri gibi pek çok farklı faktörün de Alzheimer riskini arttırdığı bilinmektedir [55]. Birkaç ailesel AH otozomal dominant geçiş göstermesine karşın birçok durumda hastalığın kalıtımı multifaktöriyeldir. Yapılan monozigot ikiz çalışmaları, %18-41 arasında değişen konfordansın olduğunu ve bu uygunluk oranları ile AH tek bir otozomal dominant gen ile tam olarak açıklanamayacağını göstermiştir [56].

AH için 100'den fazla aday risk geni analiz edilmiş ve birçok çalışmada bu aday genlerden en çok dördünün (*APP*, *PSEN1*, *PSEN2* ve *APOE*) hastalıkla ilişkili olduğu bildirilmiştir. Bu genlerden en fazla *APOE*'nin, geç başlangıçlı AH ile yakından bir ilişki içinde olduğu bilinmektedir [48].

2.2 Alzheimer Hastalığının Genetiği

Genel olarak Alzheimer hastalığının geç başlangıçlı sporadik AH ve erken başlangıçlı FAH olmak üzere iki türü bulunmaktadır.

2.2.1 Erken başlangıçlı Alzheimer Hastalığı (EBAH) İle İlişkili Genler

EBAH'nın yaklaşık yüzde ellisi daha önceden iyi bilinen *APP*, *PSEN1* ve *PSEN2* genlerinde bulunan mutasyonlarla belirlenmiştir [57]. Bu proteinler normal işlevleri çok iyi bilinmeyen, nöronal plastisitede rol oynadıkları bilinen transmembran proteinleridir.

Tablo 5 Erken başlangıçlı AH ile ilişkili genler ve etkinlikleri [57]

Gen	Açık İsmi	Başlangıç Yaşı	Kromozom	Protein	Mekanizma	Etkisi
APP	Amiloid perkürsor protein	43-62	21q21.2	APP	MUTASYON/TRİZOMİ	Farklı APP yapımı, Amiloid beta üretiminde artış
PSEN1	Presenilin 1	29-62	14q24.3	S182	MUTASYON	Amiloid beta üretiminde artış
PSEN2	Presenilin 2	40-88	1q31-q42	STM2	MUTASYON	Amiloid beta üretiminde artış

2.2.1.1 Amiloid Prekürsor 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 peptid oluşmaktadır. APP'nin aminoasit diziliminde valin yerine izolösin, fenilalanin ya da glisin değişimi olması mutasyona neden olur buda amiloid depolanmasında rol oynar. Ve sonuç olarak bu erken yaşta AH 'nen görülmesine yol açmaktadır [58]. APP tüm hücrelerde 2 majör yolla aşamalı olarak metabolize edilir. Hücrelerde en çok görülen yolak alfa sekretazın kestiği ve N-truncated A β peptidin oluştuğu yolaktır. Bu kesme işlemi bazen farklı enzimler yapar. Genellikle beta-sekretaz ve gama-sekretaz 40 ve 42 aminoasitlik A β izoformlarının oluşumuna neden olurlar. [1,32].

2.2.1.2 PSEN

PSEN 1 kromozom 14q24.3'deki gen bölgesi tarafından sentezlenirken, PSEN2 kromozom 1q42.1'deki gen bölgesi tarafından sentezlenmektedir. Her iki PSEN'de primer olarak nöronlarda 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 polipeptit oluşturmaktadır. Bu polipeptitlerin tam fonksiyonları henüz net olarak bilinmemektedir [59]. PSEN'lerin ekspresyonu yaş ilerledikçe azalır. Nöronlardaki bu azalma, AH 'nen gelişiminde etkilidir. Bunun tersine, astrositler PSEN seviyesine göre nörodejenerasyon da etkilidir [1]. PSEN1 rezidüleri endoplazmik retikulum /golgi kompleksinde bulunmaktadır [60]. PSEN ekspresyonundaki küçük bir değişim AH patolojisi ve APP'nin üretimi için majör etkili olabilmektedir. Apoptozis boyunca PSEN1 ekspresyonunun azaldığı, PSEN2 ekspresyonunun da arttığı belirlenmiştir [1]. Özellikle, PSEN1 ekspresyon seviyesinin azalmasının Alzheimer hastalığında etkin olduğu bilinmektedir [1,48].

2.2.2 Geç başlangıçlı Alzheimer Hastalığı ile İlişkili Genler

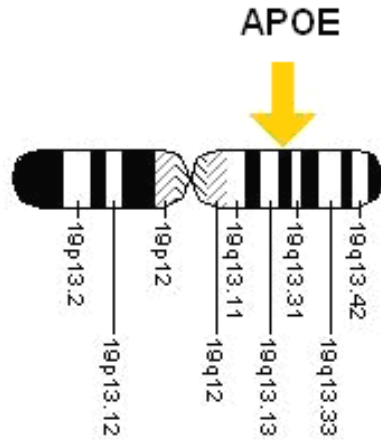
Alzheimer Hastalığı Genetik Konsorsiyumu (ADGC) tarafından geç başlangıçlı AH' da yapılan GWAS'a göre geç başlangıçlı AH' ye yatkınlık oluşturduğu düşünülen 10 gen bildirilmiştir; APOE, CR1, CLU, PICALM, BIN1, EPHA1, MS4A, CD33, CD2AP ve ABCA7 [61]. GBAH gibi kompleks ve heterojen hastalıklar basit kalıtım kalıbına sahip değildir. Bununla ilişkili olan çoklu minör genlerde meydana gelen mutasyonlar ve polimorfizmler, hem birbirleriyle hem de genetik olmayan faktörlerle ilişkilidirler [62].

2.2.2.1 Apolipoprotein E (APOE)

APOE plazma lipoproteinlerinin başlıca bileşenlerinden biri olup lipit metabolizmasında merkezi bir rol oynar [63]. düşük dansiteli lipoprotein (LDL) reseptör ailesinin hücre yüzey reseptörleriyle etkileşime girip lipoproteinlerin

taşımasını sağlar ve merkezi sinir sisteminde hasar gören nöronların tamirine katılır [64].

APOE, 299 aminoasitten oluşan 34 kilo daltonluk asidik bir proteindir [65]. APOE'nin E2, E3 ve E4 şeklinde üç yaygın izoformu vardır [66,67]. Bu üç kodominant allel çiftlerin kombinasyonuna göre altı farklı genotipin, üç homozigot (E2/2, E3/3, E4/4) ve üç heterozigot (E2/3, E2/4, E3/4) ortaya çıkmasına neden olur [68-71]. APOE'nin polimorfik allellerinden en yaygın olanı popülasyonda %77 sıklıkla görülen E3 allelidir. Diğer allellerin popülasyonda görülme sıklığı ise E4 için %15 ve E2 için %8'dir [72]. Bu izoformları kodlayan gen insanlarda 19. kromozomun uzun kolunda yer alır (19q13.2) [73].



Şekil 3 APOE geninin kromozom 19'daki lokasyonu

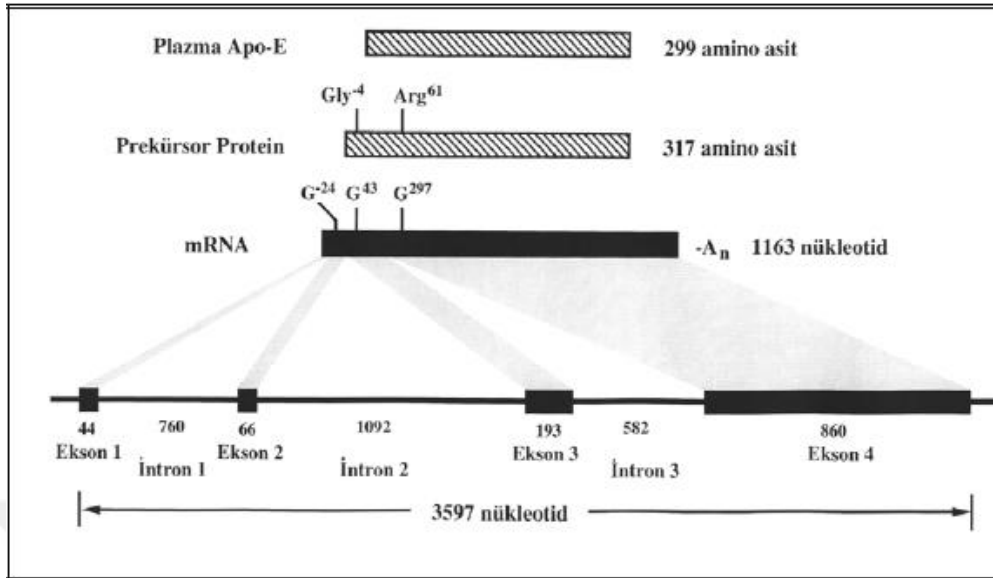
(<http://ghr.nlm.nih.gov/gene=APOE>)

APOE geni 3597 baz çiftinden (bç)'den oluşmaktadır. Dört ekzon ve üç introndan oluşup 299 aminoasitlik bir polipeptit üretir [65,73]. Şekil-4'de örnek olarak Apolipoprotein E2'nin amino asit dizilimi gösterilmektedir.

H₂N-Lys-Val-Glu-Gln-Ala-Val-Glu-Thr-Glu-Pro-Glu-Pro - Glu - Leu - Arg - Gln - Gln-Thr-Glu - Trp - Gln-Ser-Gly-Gln-Arg-Trp-Glu-Leu-Ala-Leu-Gly-Arg-Phe-Trp-Asp-Tyr-Leu-Arg-Trp-Val-Gln-Thr-Leu-Ser-Glu-Gln-Val-Gln-Glu-Glu-Leu-Leu-Ser-Ser-Gln-Val-Thr-Gln-Glu -Leu-Arg-Ala-Leu-Met-Asp-Glu -Thr-Met-Lys-Glu-Leu-Lys-Ala-Tyr-Lys-Ser-Glu-Leu-Glu-Glu-Gln-Leu-Thr-Pro-Val-Ala-Glu-Glu-Thr-Arg-Ala-Arg-Leu-Ser-Lys-Glu-Leu-Gln-Ala-Ala-Gln-Ala-Arg-Leu-Gly-Ala-Asp-Met-Glu-Asp-Val-Cys[112.aa]-Gly-Arg-Leu-Val-Gln-Thr--Arg-Gly-Glu-Val-Gln-Ala-Met-Leu-Gly-Gln-Ser-Thr-Glu-Glu-Leu-Arg-Val-Arg-Leu-Ala-Ser-His-Leu-Arg-Lys-Leu-Arg-Lys-Arg-Leu-Leu-Arg-Asp-Ala-Asp-Asp-Leu-Gln-Lys-Cys[158.aa]-Leu-Ala-Val-Tyr-Gln-Ala-Gly-Ala-Arg-Glu-Gly-Ala-Glu-Arg-Gly-Leu-Ser-Ala-Ile-Arg-Glu-Arg-Leu-Gly-Pro-Leu-Val-Glu-Gln-Gly-Arg-Val-Arg-Ala-Ala-Thr-Val-Gly-Ser-Leu-Ala-Gly-Gln-Pro-Leu-Gln-Glu-Arg-Ala-Gln-Ala-Trp-Gly-Glu-Arg-Leu-Arg-Ala-Arg-Met-Glu-Glu-Met-Gly-Ser-Arg-Thr-Arg-Asp-Arg-Leu-Asp-Glu-Val-Lys-Glu-Gln-Val-Ala-Glu-Val-Arg-Ala-Lys-Leu-Glu-Glu-Gln-Ala-Gln-Gln-Ile-Arg-Leu-Gln-Ala-Glu-Ala-Phe-Gln-Ala-Arg-Leu-Lys-Ser-Trp-Phe-Glu-Pro-Leu-Val-Glu-Asp-Met-Gln-Arg-Gln-Trp-Ala-Gly-Leu-Val-Glu-Lys-Val-Gln-Ala-Ala-Val-Gly-Thr-Ser-Ala-Ala-Pro-Val-Pro-Ser-Asp-Asn-His-COOH

Şekil 4 Apolipoprotein E2'nin amino asit dizilimi [74]

APOE geninin bütün intronları G-T nükleotidleri ile başlayıp, A-G nükleotidleri ile bitmektedir. 5' → 3' doğrultusunda bakıldığında ekzonları 44, 66, 193 ve 860 nükleotid uzunluğunda intronlar ise 760, 1092 ve 582 nükleotid uzunluklarındadır. APOE geni 1163 nükleotidlik mRNA'yı kodlamaktadır. Burada ortaya çıkan primer translasyon ürünü, co-translasyonel olarak bölünen 18 amino asitli sinyal peptidi içeren 317 aminoasitlik bir proteindir. Olgun protein plazmaya salgılandığında 299 amino asitten meydana gelir [75]. APOE'nin gen yapısı Şekil 5'te gösterilmektedir.



Şekil 5 İnsan Apolipoprotein E genin yapısı. Mahley 1993'ten alınmıştır [75].

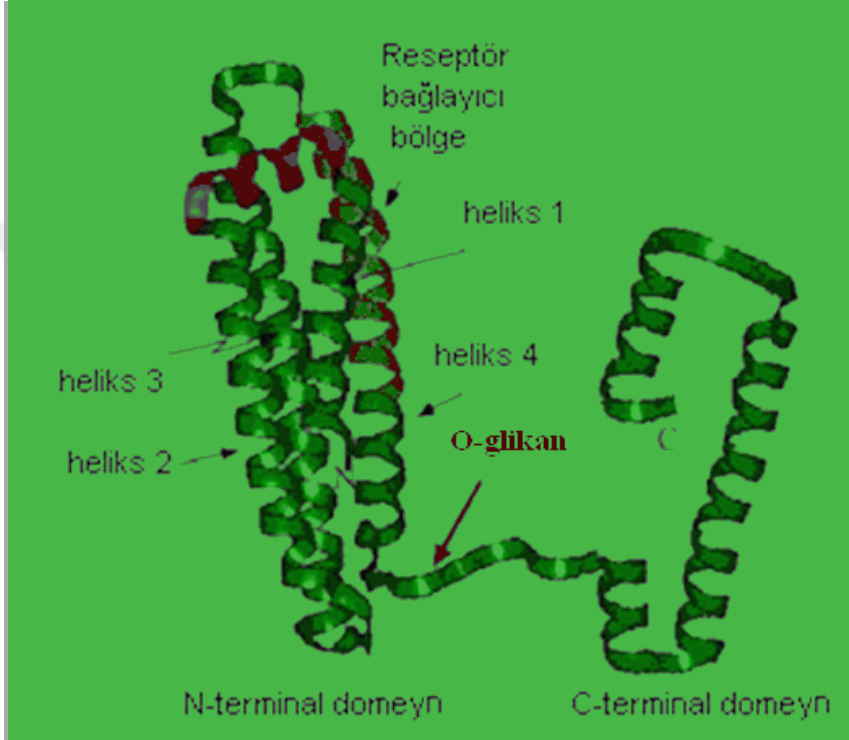
2.2.2.1.1 APOE'nin Genel Yapısı

APOE karboksil ve amino uç olmak üzere iki yapısal kısımdan oluşur. Amino ucu 22 kilodaltondur, 1-191 arası amino asit (aa) içerir ve lizin ile arjinine zengin reseptör bağlama bölgelerini bulundurur. Bu bölgeler 136-150. amino asitler arasındadır [76]. Karboksil ucu ise 10 kilodaltondur, 225-299 arası aa içerir ve APOE'yi lipoproteinlere bağlayan önemli lipid bağlama belirleyicilerini bulundurur [77]. APOE'nin asıl lipoprotein bağlama unsurları karboksil uç kısmın 244-272. amino asitlerinde bulunmaktadır [78-80].

APOE LDL reseptörlerine bağlanmayı sağlar. Polimorfik amino asit rezidüleri APOE'nin farklı elektroforetik formlarının oluşmasını sağlar ve reseptörlere bağlanma aktivitelerini değiştirir [81]. APOE'nin bütün şekilleri lipitlere bağlanır ancak lipoprotein reseptörlerine bağlanma afinitesi APOE E2'den APOE E3 ve APOE E4'e doğru artar [75,82].

APOE proteini N-terminal domeyni ve C-terminal domeyni olmak üzere iki yapısal domainden oluşur. N terminal domeyni 4 heliks boyunca uzanır [83]. C-terminal domeyni ise helikal bir yapıya sahiptir (şekil 7) [84]. Her bir yapısal domeyni farklı fonksiyonlardan sorumludur ve bağımsız katlanmalar gösterir [85,86]. Heliks 4'de LDL-reseptör bağlayıcı bölgesi bulunmaktadır. Bu bölgede LDL

reseptör ailesinin ligand bağlayıcı domeyninde, asidik rezidülerle etkileşime girdiği düşünülen, lizin ve arjinin rezidülerinin zengin olduğu bir bölgedir [87]. N-terminal domeyni lipitlere bağlansa da, esas lipoprotein bağlayıcı elementler C-terminal domainde bulunur [87,88].



Şekil 6 insan APOE proteininin yapısı

(<http://www.bmsf.unsw.edu.au/research/projects/APOE.html>)

Üç esas APOE izoformu, polipeptit zincirinin 112 ve 158'inci pozisyonundaki sistein/arjinin değişikliği ile birbirlerinden ayrılmaktadır. APOE E2'de her iki pozisyonunda sisteine, APOE e4'de her iki pozisyonunda arjinine ve APOE E3'de 112. pozisyonunda sistein varken 158. pozisyonunda arjinin vardır. APOE E3 ve APOE E4'ün amino-terminal domainlerin X ışını kristal yapılarının APOE E4'deki iki yan zincirin APOE E3'deki pozisyonlarına göre konformasyonel değişikliklere maruz kaldığı bilinmektedir [89]. Bu değişiklik, izoformlar arasında üç boyutlu yapıların oluşmasına ve lipid bağlanma özelliklerini etkilemektedir. APOE E4'de amino asit değişikliği, pozisyon 61'deki arjinin ve pozisyon 255'deki glutamik asit arasındaki bir tuz-köprüsünün oluşumuyla meydana gelen yapısal bir değişiklikle

sonuçlanmaktadır [90]. çeşitli APOE fenotiplerinin terminolojisi bunların izoelektrik fokuslama pozisyonlarına ve oldukça yaygın izoform olan APOE E3 ile ilişkili yapılarına dayanmaktadır [91]. Terminolojide E1, E2, E3, E4 vs. terimleri izoelektrik fokuslama da her bir APOE varyantının pozisyonunu tanımlamakta ve parantez içerisindeki takip eden kod ise değişikliğe uğramış aminoasidin adını ve bölgesini göstermektedir. APOE E2 (Arg158@Cys) ve APOE E4 (Cys112@Arg) şeklinde gösterilir. Bununla birlikte, daha uygun olduğu için bu izoformlar basit bir şekilde APOE E2, APOE E3 ve APOE E4 olarak ifade edilmekte ve diğer varyantlar daha açıklayıcı gösterimlerle belirtilmektedir [92].

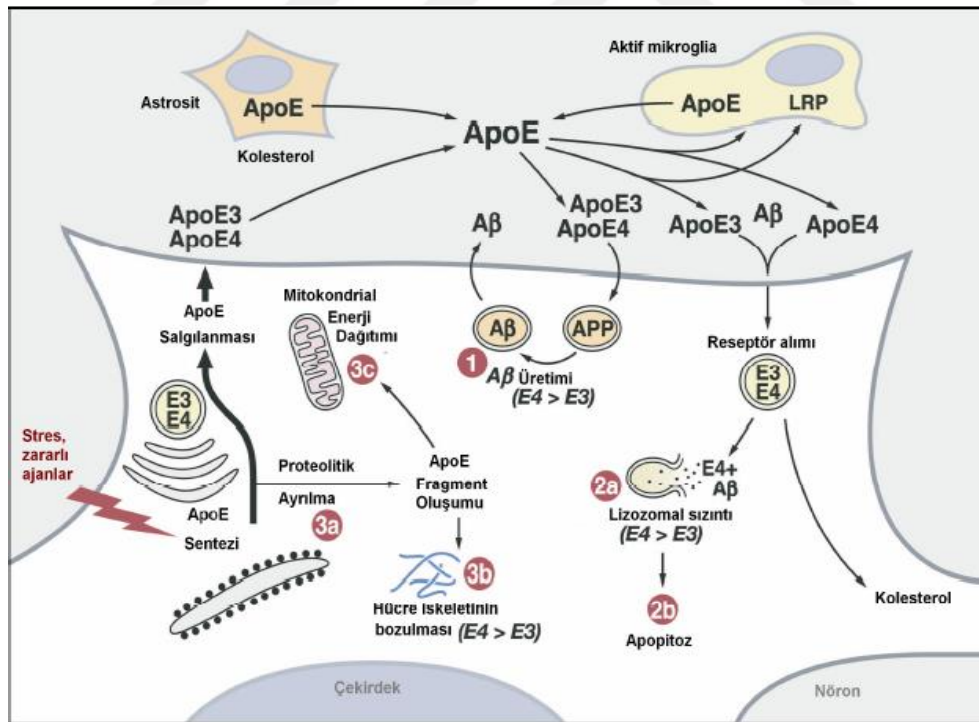
2.2.2.1.2 APOE Sentez Yerleri

APOE birçok farklı hücre tarafından sentezlenir. Özellikle sentez yeri karaciğerdeki hepatik parankimal hücrelerdir. Kolesterol ile yüklü olan tüm makrofajlar APOE sentezler ve hücre dışına salar. Bununla birlikte arterdeki düz kas hücreleri, derideki keratinositler, ovaryumlar, adrenal, testis, dalak ve böbreklerde de APOE sentezlenir. APOE-mRNA düzeyinin en yüksek olduğu organ karaciğer ve ikinci olarak da beyindir. Beyindeki APOE sentezinden sorumlu olan asıl hücreler astrositlerdir. Serebrospinal sıvı beyinden türetilen yüksek düzeyde APOE içerir [62]. APOE diğer proteinlerden farklı olarak merkezi sinir sisteminde astrositler, glial hücreler, schwann hücreleri ve oligodendrositler tarafından da sentezlenir [93-97]. APOE gerek merkezi gerekse periferik sinir sistemindeki kolesterolün taşınmasında önemli bir rol oynar [98]

2.2.2.1.3 APOE'nin Beyindeki Metabolizması

APOE'nin beyinde önemli rolleri vardır. APOE merkezi sinir sisteminin ana apolipoproteinlerinden biridir. APOE E2 ve APOE E3 APOE E4'e göre hücrelerin yenilenmesi ve normal faaliyetlerini göstermelerinde daha etkilidir. APOE'nin izoformlarına özgü etkisi çeşitli çalışmalarda kültürü yapılan sinir hücrelerinde nörit uzaması denilen yeni uzantıların oluşması ile gösterilmiştir. APOE E3 nörit büyümesini teşvik ederken APOE E4'ün inhibe ettiği gözlenmiştir. APOE E4'ün

nörit uzamasındaki inhibisyonunun, mikrotübül stabilizasyonunu etkileyerek hücre iskeletinin değişimine yol açabileceği bilinmektedir. Bu değişimin mikrotübül stabilizasyon proteininden (Tau) kaynaklandığı düşünülmektedir. APOE E3, Tau proteinine bağlanarak bu proteini hiperfosforilasyondan korur aksi takdirde Hiperfosforilasyon Tau'nun mikrotübül stabilizasyon yeteneğini inhibe eder (şekil 8) [99]. APOE E4'ün bazı zararlı etkileri vardır. Bunlardan biri Amiloid β ($A\beta$) üretimini artırmasıdır. $A\beta$ bir transmembran glikoproteini olan amiloid öncü proteinden bir dizi proteolitik işlemle geçerek üretilir. $A\beta$ beyinde hücre dışı boşlukta senil plaklar olarak depolanır. Bu senil plaklar ise beyinde Alzheimer gibi bazı hastalıklarda görülmektedir. APOE E4'ün bir diğer etkisi ise $A\beta$ 'nın indüklediği lizozomal sızıntı ve apoptoz üzerinedir. Üçüncü zararlı etki ise sitozolde nörotoksit APOE E4 fragmentlerinin, nörona özgü proteolizisi arttırmasıdır. Bunun sonucunda hücre iskeleti bozulur ve mitokondrial fonksiyon bozukluğu meydana gelir [99].



Şekil 7 Apolipoprotein E'nin merkezi sinir sistemi hücreleri arasında lipitlerin yeniden dağılımındaki rolü ve APOE'nin izoformlarının nöropatolojik üzerindeki özgül farklılıkları [85].

2.2.2.1.4 APOE ve Alzheimer Hastalığı

Beyindeki APOE sentezini ve salgılanmasını yöneten mekanizmalar henüz tam olarak bilinmemektedir. Sttrimatter ve arkadaşları tarafından 1993 yılında yapılan bir çalışma sonucunda Alzheimer hastalığı ve APOE E4 arasındaki ilişki ilk olarak ortaya çıkartılmıştır [81]. APOE polimorfizmlerinin birçok hastalık için risk faktörü oluşturduğu bilinmektedir. APOE polimorfizmleri ile Alzheimer, kalıtsal hiperlipoproteinemi, ateroskleroz, zayıf düşünsel yetenek ve sinir hücrelerinde yeni uzantıların (nörit) oluşumundaki yavaşlama ile ilgili bağlantılar bulunmuştur. Bu alanda yapılan ilk çalışmalarda otopsi yapılan sporadik AH olduğu bilinen bireylerin yaklaşık olarak %64'ünün bir E4 alleli taşıyıcısı olduğu bilinmektedir [93]. E4'ün AH için büyük bir risk faktörü olduğu yapılan birçok çalışmada gösterilmiştir [32,77,87,93,]. Yine yapılan çalışmalar sonucunda otopsi yapılan AH' da E4 alleli bakımından homozigot olanlarda senil plak gelişiminin diğerlerine göre daha fazla olduğunu ve E4 varlığının da sadece riski arttırmadığını aynı zamanda hastalığın ortaya çıkma yaşında düşürdüğünü göstermektedir [38].

APOE bunamayla sonuçlanan birçok hastalığın patogenezi ve hücrel cevabından sorumlu olan birinci proteindir [67,91]. APOE nöronların işlevlerinin sürdürülmesinde ve tamirinde önemli bir rol oynamaktadır [100,101]. Örneğin sinir hasarına cevap olarak APOE miktarında fark edilir düzeyde bir artış olduğu bilinmektedir [102]. APOE AH' da nörofibriller yumakların protein bileşeni olan tau aracılığı ile yumaklara kolayca bağlanarak miktarının artmasını sağlamaktadır. Aynı şekilde APOE senil plakların başlıca protein bileşeni olan Amiloid β aracılığı ile senil plaklara kolayca bağlanarak miktarının artmasına neden olmaktadır [58]. Yapılan in vitro deneyler sonucunda APOE E3'ün tersine APOE E4'ün amiloid β peptidi ile oldukça stabil bir kompleks oluşturduğu bilinmektedir. Amiloid β peptid immünreaktif plaklarının sayısı, çapı ve yoğunluğunun hastanın APOE genotipi ile ilişkili olduğu bilinmektedir [58]. E4/E4 alleli taşıyan bireylerde Amiloid β plaklarının E3/E3 alleli taşıyanlara göre daha yoğun ve daha büyük olduğu bilinmektedir.

2.2.2.2 BIN1 Geni [Bridging integrator 1]

Bridging Integrator 1 (BIN1 ya da amphiphysin 2 olarak da bilinir) geni, son zamanlarda, Apolipoprotein E (APOE)'den sonra geç başlayan Alzheimer hastalığı için en önemli risk faktörü olarak tespit edilmiştir. Yapılan çalışmalar BIN1 geninin bilinen işlevlerini, GBAH ile ilgili polimorfizmlerini, hem de olası fizyolojik etkilerini ortaya koymuştur. Ortaya çıkan veriler göstermektedir ki BIN1 geni ve tau proteini arasındaki ilişki öncelikle AH riskini etkiler. Bu da hastalığın patogenezinde AH tedavisi için yeni tedavi yöntemleri sunabilir. BIN1 geni aynı zamanda endositoz taşınımı, inflamasyon, kalsiyum dengesi ve apoptoz dahil olmak üzere çeşitli hücrel fonksiyonları etkilediği bilinmektedir.

2.2.2.2.1 Alzheimer Hastalığı ve BIN1 Geni

Karmaşık ve çok faktörlü nörodejeneratif bir hastalık olan Alzheimer yaşlılarda demansın en çok görülen şeklidir. Alzheimer hastalığı, hasta yakınları ve toplum için büyük bir yük oluşturmaktadır. Apolipoprotein E (APOE) GBAH (Geç Başlangıçlı Alzheimer Hastalığı) yatkınlık genine ilave olarak son yıllarda, geniş genom bağlantı çalışmaları (GWAS) dokuz gen daha belirledi [103-107]. Elde edilen bu yeni yatkınlık genleri rastgele değil, olası fonksiyonel ilişkilerine göre belirlendi. Elde edilen bu genlerin potansiyel hastalıklarla ilişkilerinin olduğu bulunmuştur. Aşağıda bu genler ile AH ve bunların etkili olduğu yollar özetlenmiştir [108-110].

Tablo 6 AH' da etkili olduğu düşünülen genlere ait yollar

Endositoz yolağı	BIN1, PICALM ve CD2AP;
Bağışıklık sistemi fonksiyonu	CLU, CR1, CD33, MS4A, ABCA7 ve EPHA1
Lipid metabolizması yolağı	APOE, CLU ve ABCA7
Tamamlayıcı sistem	CR1, CLU, CD2AP ve ABCA7

Bu genler arasında, *BIN1* (amphiphysin 2/ *AMPH2*) geni Alzgene veritabanına göre (<http://www.alzgene.org/>) *APOE* 'den sonra en önemli genetik yatkınlık geni olarak tanımlanır [111,112]. Çok sayıda çalışmada AH patogenezinde *APOE*'ye benzer şekilde *BIN1* geninde risk oluşturduğu bilinmektedir. AH patogenezinde *BIN1* geninin katkıları altında yatan mekanizmalar hala tam olarak anlaşılmış olmasa da, birçok yolakları tartışılmıştır. AH patogenezinde hastalık riski ve ayrıntılı mekanizmaları etkileyen potansiyel moleküler yolların daha fazla araştırılması ve bu yeni etkileşimlerin GBAH biyolojisi ve tedavi için yeni hedefler sağlayacağı düşünülmektedir.

2.2.2.2 *BIN1* Geninin Genetik Özellikleri

BIN1 geni kromozom 2q14.3 üzerinde bulunur ve en az 20 ekzon kodlar [113]. Başlangıçta, Wechsler'in-Reya ve ark. 19 ekzon olduğunu söylemişlerdi [114], daha sonra 1 tane ekzonun gözden kaçtığı ekzon 6 ve 7 arasında ekzon 6a'nın olduğu fark edildi. *BIN1* geni ilk olarak myc-etkileşimi, C-terminali SH3 ve bir N-terminal BAR (Bin1/Amphiphysin/RVS167) etki alanına sahip bir tümör baskılayıcı olarak tanımlanmıştır [115]. *BIN1* geni her yerde olmasına rağmen, en fazla beyin ve kasta eksprese olur [114]. Bu gen tarafından üretilen çok sayıda bağlantı fonksiyonlarına bakıldığında karmaşık ve son derece düzenli olduğu görülmektedir. *BIN1* clathrin aracılı endositoz (clathrin-mediated endocytosis) ve hücre içi endositoz taşınımında (intracellular endosome trafficking) rol oynamaktadır [113,116]. *BIN1* oluşturulan boru şeklindeki zar yapıları yoluyla hücresel boru membran mikrotübül iskeletini bağlar [117], ve bu Alzheimer hastalarının beyinlerinde nörofibriller düğümlerin oluşumunda önemli bir patolojik özellik gösterebilir. *BIN1* geni aynı zamanda hücre yaşlanması ve apoptozu etkileyen hücre fonksiyonu için çok önemlidir [118,119]. *BIN1*'in primer hücrelerde onkogen kaynaklı yaşlanma ile ilgili temel bir rol oynadığı tespit edilmiştir [120], ayrıca, erken aşamalarında kanseri kısıtlamaya yardımcı olduğu da bilinmektedir.

2.2.2.2.4 AH ve BIN1 Arasında Epigenetik İlişki

Epigenetik işlevlerde genom ve çevre arasındaki etkileşim için merkezi düzenleyiciler bulunmaktadır. Anormal Epigenetik değişiklikler AH patogenezinde önemli bir unsurdur ve AH'nın multifaktöriyel patolojisini anlamak için bütünleştirici bir çerçeve sağlamıştır [130,131]. Bu nedenle, Epigenetik değişikliklerle ilgili haritaların oluşturulmasından sorumlu genlerin genetik varyasyonları ve ifade profilleri hakkında önemli bilgilerin elde edilmesi gerekir. Ve AH tedavisi için Epigenom yeni yollar açabilir.

2.2.2.2.5 Tau ve BIN1

AH'ların beyinde hücre dışı amiloid plaklar ve hücre içi nörofibriller yumakların olması AH'in en önemli patolojik özelliklerindedir. AH'da nörofibriller yumaklar tau proteini ihtiva eden eşleştirilmiş sarmal iplikler oluşturur ve bu düğümler, demans ile korelasyon göstermektedir. Son zamanlarda yapılan çalışmalar anormal fosforile tau (p-tau)'nun AH'ların beyinlerinde oldukça erken görüldüğünü göstermektedir [132,133]. Yapılan çalışmalar sonucunda tau-aracılı nörodejenerasyon ile ilişkili hücreyel yolaklar bulunmuştur ve tau AH tedavisi için potansiyel bir hedef olarak kabul edilmiştir [134].

İlginç bir şekilde, BIN1 sitoplazmik bağlayıcı protein 170 (CLIP-170) mikrotübül ilişkili protein ile etkileşime girebilir ve bu etkileşim sonucunda mikrotübüller tarafından üretilen bir çekme kuvveti ile BIN1 içsel tubulating kapasitesini artırabilir [117].

2.2.2.2.6 Endositoz Taşınımında BIN1 Geninin Rolü

Amphiphysin ailesinin bir üyesi olarak BIN1, bir GTPaz olan kılıf oluşturucu proteine bağlanır ve Reseptör aracılı endositoz (RAE), diğer adıyla klatrin bağımlı endositoz, (hücresinin; içeri alınacak moleküllere özgü reseptör bölgelere sahip proteinleri içeren hücre zarı veziküllerinin içe doğru kıvrılarak, molekülleri içine

aldığı bu işlemde)'da önemli bir rol oynar [135,136]. Amphiphysin 1 ve BIN1 ekspresyonundan yoksun farelerde öğrenme zorluğunun beyindeki sinaptik vezikül geri dönüşümündeki sıkıntılardan kaynaklandığı bilinmektedir [137]. Endositozu düzenlemenin yanı sıra BIN1, protein ve lipidler gibi büyük moleküllerin hücre içi taşınımı için de önemli olabilir [138].

2.2.2.2.7 BIN1 ve İnflamasyon

İlginç bir şekilde, *BIN1* 'den yoksun mozaik farelerde yaşlanma sırasında inflamasyon [iltihap] daha fazla oranda görüntülenmektedir [139]. inflamasyon ile ilişkili AH patojenezinde BIN1 geninin rolü daha fazla araştırılması gerekmektedir.

2.2.2.2.8 Apoptoz ve BIN1

Aslında bir c-MYC-etkileşim proapoptotik tümör baskılayıcı olarak tanımlanan BIN1, fiziksel olarak belirli MYC bağlayıcı etki yoluyla c-MYC faaliyetini engeller ve onkogenik fonksiyonlarını durdurur. Çeşitli çalışmalar BIN1 in hücre döngüsünün kontrolünde önemli bir rol oynadığını ve bir kaspaz-bağımsız bir işlem yoluyla apoptoza neden olduğunu göstermiştir [118,119].

2.3 Polimorfizm

Polimorfizm bir popülasyondaki birden fazla çeşitliliği gösteren gözlenebilir özelliği ifade etmektedir. Herhangi bir hastalığa ya da hastalığa yatkınlığa neden olan DNA dizisindeki varyasyonların popülasyonda görülme sıklığı %1'den fazla ise "Polimorfizm", %1'den az ise "mutasyon" olarak adlandırılır. Farklı bireylerin kromozomlarına bakıldığında, aynı kromozomun belirli bir bölgesindeki DNA parçasının yüksek oranda benzerlik gösterdiği ve popülasyondan rastgele seçilen iki insan arasında herhangi 1200 bp uzunluğundaki DNA dizisinde ortalama bir baz çiftinin farklı olduğu bilinmektedir [81]. İnsan genomunda 2013 temmuz ayı itibarı ile 62 milyon SNP olduğu bilinmektedir. Polimorfizmlerin yaklaşık %90'nını oluşturan ve insan genomunun farklılığının nedeni olarak bilinen SNP'ler Alzheimer, kardiovasküler sistem hastalıkları, osteoporoz, çeşitli kanser türleri ve diyabet gibi pek

çok karmaşık hastalığa yatkınlığı arttırmakta ya da azaltmaktadır [71]. SNP genotiplemeesi genetik haritalama, etken madde araştırmaları, farmakogenetik ve popülasyon genetiği gibi çalışmalar için son yıllarda tercih edilen araştırma yöntemlerinden birisidir [81].

3 GEREÇ VE YÖNTEM

Bu araştırmada, Turgut Özal Üniversitesi Tıp Fakültesi Nöroloji Polikliniğine başvuran ve yapılan nörolojik muayeneler ve Mini-Mental Durum Testi sonucunda Alzheimer Hastası tanısı almış 65 yas üstü 53 vaka ve demans öyküsü bulunmayan aynı yaş grubu sağlıklı 56 kontrol toplam 109 kişiden alınan kan örnekleri kullanıldı. Vaka ve kontrol grubuna dahil edilen bireylerin istatistik analizi için gerekli olan bilgileri kaydedildi. Çalışmaya 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 yapılıncaya 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 ilave edildi. 10 dakika oda sıcaklığında inkübe edilip, 2000g’ de 10 dakika santrifüj yapıldı. Santrifüjden sonra pellet korunacak şekilde, süpernatant yavaş yavaş dökülerek uzaklaştırıldı. Pelletin üzerine 350 µl 10-10 TE eklendi, 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, ABD) 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, ABD) 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 ethanol 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

APOE geni rs429358 T > C ve rs7412 C > T polimorfizminin araştırılması için aşağıdaki primerler kullanılarak 303 bp'lik bölge çoğaltıldı.

Tablo 7 APOE için PCR'da kullanılan primerlerin dizileri

Forward	5' CGGGCACGGCTGTCCAAGGAG 3'
Reverse	5' CTGGTGGAAACAGGGCCGCGTG 3'

>gi|163954918:5001-8612 Homo sapiens apolipoprotein E (APOE), RefSeqGene on chromosome 19

CAACTGACCCCGGTGGCGGAGGAGACG **CGGGCACGGCTGTCCAAGGAGC**

4.Exon

Forward

“ Polimorfizm”

rs429358 T>C



TGCAGGCGGCGCAGGCCCGGCTGGGCGCGGACATGGAGGACGTGTGCGG
 CCGCCTGGTGCAGTACCGCGGCGAGGTGCAGGCCATGCTCGGCCAGAGC
 ACCGAGGAGCTGCGGGTGCGCCTCGCCTCCACCTGCGCAAGCTGCGTA

“ Polimorfizm”

rs7412 C>T



AGCGGCTCCTCCGCGATGCCGATGACCTGCAGAAGCGCCTGGCAGTGTA
 CCAGGCCGGGGCCCGCGAGGGCGGCCGAGCGCGGCCTCAGCGCCATCCG
 CGAGCGCCTGGGGCCCCTGGTGGAAACAGGGCCGCGTGCGGGCCGCCAC

Reverse



BIN1 geni rs744373 T > C polimorfizminin araştırılması için yapılan ASO-PCR’da aşağıdaki primerler kullanılarak 766 bp’lik bölge çoğaltıldı.

Tablo 8 ASO-PCR’da kullanılan primerlerin dizileri

Forward	5’ CCATCTTCTT CTGCTCTCCC AG 3’
Reverse	5’ ATGC CTCCTCTCTC CGTCTT 3’
Forward-V	5’ AGGGACAGGCA GGTCTGAGGC 3’
Reverse-W	5’ TCTCAGAGGCT GCCCATG 3’

>gnl|dbSNP|rs744373|allelePos=501|totalLen=1001|taxid=9606|snpclass=1|alleles='C/T'|mol=Genomic|build=137

ATGGCATGCTGCCCACTCCCAGGCCAGT **CCATCTTCTTCTGCTCTCCCAGC**

Forward →

ACCCCTCTGTGGGCTCGGGCCACGGTGCTGCAGGGGCTCTGAAGCGG
 GAGGGTGCTTTGGCCCTTGACTGGAGGGGCAGGTTCTT CCTCAAAGTCC
 TCCTGTCTTTCTGCAAGAAAAGCAGCTGCAGCCCAGTTCT GCAGGAGATT
 ATTAGTATGTCAGGGACTTCAAAGGCTGAAGGGAAAGTTGCACAAGCCC
 CATGACCAGCCTCCACTGCA AATTAGGCCT CGCTGGTGAC CTAGGCACC
AGGGACAGGCA GGTCTGAGGC

Forward-V →

Y → “Polimorfizm” rs744373 T > C

Reverse-W ←

CTCAGAGGCTGCCCATGATGCTGCCCTGGCTTTCAGACCAGGACTTCTCC
 AGTGTCTCCCAGGGTCATCCTGGGAGTTAGTCAGGTCAAAGTGAGATCCC
 TCAGCTCCCACACCCCACCCACACTGACCAGCAATGTCCTTCCCTGCC
 TGCTTCTCTTCCGTCCCCATGGGGGCTAACACCCCTCCTGCACCCCTGGA
 GCTCCTGTTCTGTGGCTAAGATGTGGTCCGCATTAATCTTTGGGCAGACT
 TCCAAATC TTCCTTCCCC TATGGGTGGA AATGGACACT AGACCTTCTT
 GTAAGTCCCTTGGTCACCCAGCCCTGTCTGTTCCATCTT GGCATGGAG
 ATGGGGTCAGCAGACTCCAGCTTCCCAGCATGGCCCCCTTTC AGGCCTTGGC
 TCTTCTTCTCATTCTCCCCACCCCGTCTCCTGTACGGCATCCCAC
 CCCAGG**ATGC CTCCTCTCTC CGTCTT**CCCCCGTCTCCCAC CCCACACCCT

Reverse ←

3.3 Primerlerin Sulandırılması

Liyofilize durumdaki primerlere kullanma talimatında belirtilen miktarda 1XTE (Tris EDTA) eklenerek ve 100 pmol/ul stok çözeltiler hazırlandı. PCR

işleminde kullanılmak üzere stoktan 20 pmol/ μ l konsantrasyonlu 100 μ l sulandırılmış primerler hazırlandı.

3.4 Gradyent PCR

APOE ve BIN1 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, Taq Polimeraz ve DMSO'dan oluşan karışım her bir reaksiyon tüpüne dağıtıldı ve en son DNA örnekleri eklendi.

Tablo 9 APOE Gradyent PCR İçin Kullanılan Solüsyon Karışımı

Solüsyon	Miktar
10X Buffer	2,5 μ l
MgCl ₂	2,5 μ l
dNTP	0,5 μ l
Forward Primer	0,5 μ l
Reverse Primer	0,5 μ l
Taq polimeraz	0,2 μ l
DMSO	1 μ l
H ₂ O	15,3 μ l
DNA	2 μ l

Tablo 10 İzlenen Gradyent PCR Programı

Ön Denatürasyon	94 °C	5 dakika	
------------------------	-------	----------	--

Denatürasyon	94 °C	30 saniye	38 döngü
Primer bağlanma	60-71 °C	30 saniye	
Uzama	72 °C	1 dakika	
Son uzama	72 °C	5 dakika	

Tablo 11 BIN1 Geni Gradyent ASO-PCR İçin Kullanılan Solüsyon Karışımı

Solüsyon	Miktar
10X Buffer	2,5 µl
MgCl ₂	3 µl
dNTP	0,2 µl
Forward Primer	0,2 µl
Reverse Primer	0,1 µl
Forward-V Primer	0,1 µl
Reverse-W Primer	0,2 µl
Taq polimeraz	0,2 µl
DMSO	1 µl
H ₂ O	15,7µl
DNA	2 µl

Tablo 12 İzlenen Gradyent PCR Programı

Ön Denatürasyon	94 °C	5 dakika	38 döngü
Denatürasyon	94 °C	30 saniye	
Primer bağlanma	55-65 °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 µl olacak şekilde hazırlandı. 10X buffer, MgCl₂ (25mM), dNTP, primerler, H₂O, DMSO ve Taq Polimerazdan oluşan karışım her bir reaksiyon tüpüne dağıtıldı ve en son DNA örnekleri eklendi.

Tablo 13 APOE İçin 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
DMSO	1 µl
H ₂ O	15,3µl

Tablo 14 İzlenen PCR Programı

Denatürasyon	94 °C	5 dakika	
Denatürasyon	94 °C	30 saniye	38 döngü
Primer bağlanma	71 °C	30 saniye	
Uzama	72 °C	1 dakika	
Son uzama	72°C	5 dakika	

3.6 DNA'nın Enzimatik Kesimi

PCR sonucunda elde ettiğimiz PCR ürünleri bize sadece polimorfizmin olduğu bölgenin dizisini vermektedir. Araştırdığımız tek nükleotid polimorfizmlerini

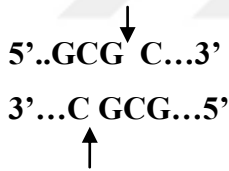
tespit etmek için bu bölgeleri tanıyan restriksiyon enzimleri (RE) kullanılarak allel tespiti yapıldı.

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 APOE Geni rs429358 T > C ve rs7412 C > T Polimorfizmi İçin Enzim Kesimi

CFO1(Hha1) (New England Biosystems, MA02451,ABD) enzimi ile 303 bp'lik genom bölümü, 91,83,72 ve 48 bp'lik parçalara kesildi. Enzim GCGC dizilerinin olduğu yerden C bazını kesmekteydi.

HhaI enzimi tanıma dizisi



Tablo 15 CFO1(Hha1) Enzimi İçin Kesim Koşulları

CFO1(Hha1)	
PCR ürünü	5 µl
CFO1(Hha1) enzimi	0,5 µl
10XGreen Buffer	1 µl
water	8,5 µl
İnkübasyon	37 °C de 45 dk

Apo-ε1 allele = rs429358(C) + rs7412(T) = SESSİZ ALLEL

Apo-ε2 allele = rs429358(T) + rs7412(T)

Apo-ε3 allele = rs429358(T) + rs7412(C) = EN YAYGIN TİP

Apo-ε4 allele = rs429358(C) + rs7412(C) = ALZHEİMER RİSKİ

Apo-ε4/ε4 allele = rs429358(C;C) + rs7412(C;C) = YÜKSEK ALZHEİMER RİSKİ
(<http://snpedia.com/index.php/APOE>)

Genotipleme:

ε2 /ε2 = 91bp + 83bp

ε3 /ε3= 91bp + 48bp

ε4 /ε4= 72bp + 48bp

ε2 /ε3= 91bp +83bp +48bp

ε2 /ε4= 91bp + 83bp + 72bp + 48bp

ε3/ε4= 91bp + 72bp + 48bp

3.8 ASO-PCR (Allel Spesifik Olügonükleotid- Polimeraz Zincir Reaksiyonu):

Bu yöntemde total ASO-PCR reaksiyon karışımı yapılan optimizasyon çalışmaları sonucunda her bir örnek için 25 mikro litre olacak şekilde hazırlandı. 10X buffer, MgCl₂ (25mM), dNTP, primerler, H₂O, DMSO ve Taq Polimerazdan oluşan karışım her bir reaksiyon tüpüne dağıtıldı ve en son DNA örnekleri eklendi. Normal PCR' dan farklı olarak ASO-PCR' da özel olarak dizayn edilen 2 farklı primer daha kullanıldı. Bu primerlerdeki tek fark birinde Varyant C allel primeri bulunurken diğerinde bunun yerine Wild type T allel primerinin bulunması idi.

Tablo 16 BIN1 İçin ASO-PCR Reaksiyon Karışımı.

Solusyon	MİKTAR
10X Buffer	2,5 µl
MgCl ₂	3 µl
dNTP	0,2 µl
Forward Primer	0,2 µl
Reverse Primer	0,1 µl
Forward-V Primer	0,1 µl
Reverse-W Primer	0,2 µl
Taq polimeraz	0,2 µl
DMSO	1 µl
H ₂ O	15,7µl
DNA	2 µl

Tablo 17 İzlenen PCR Programı

Denatürasyon	94 °C	5 dakika	
Denatürasyon	94 °C	30 saniye	38 döngü
Primer bağlanma	64 °C	30 saniye	
Uzama	72 °C	1 dakika	
Son uzama	72 °C	5 dakika	

3.9 Agaroz Jel Elektroforezi

APOE ve ASO-PCR gen bölgesinin PCR ürünlerinin amplifikasyonu 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 6X Loading dye ile karıştırılıp kuyucuklara yüklendi.

Jel, 100 V'de 45 dk yürütüldükten sonra U.V. transliminatörde görüntülendi. Çoğaltılan APOE gen bölgesinin enzim kesimi yapıldıktan sonra genotiplemeyi yapmak için %4'lük agaroz jelde yürütüldü.

3.10 Sekans İşlemi

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

3.10.1 Örneklerin Exosap İle Muamelesi

PCR tüplerinin içine 2 µl Exosap konuldu. Üzerine 5µl örnekten eklendi ve aşağıdaki termal cycler programına konuldu.

Tablo 18 izlenen PCR programı

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

3.10.2 Sekans PCR'ın Yapılması:

Sekans PCR için kazırlanan miks karışımından her bir tüpe 8 µl paylaşılır ve üzerine 2µl exosapla muamele edilmiş DNA'lar eklenir. Sekans PCR'da kontrol olarak PGEM kullanıldı. PGEM ve bir örnek için hazırlanan karışım aşağıdaki tabloda gösterilmektedir.

Tablo 19 Sekans PCR İçin Miks Karışımı

solüsyon	Miktar	PGEM	Miktar
BigDye	2 μ L	BigDye	2 μ l
5XBuffer	2 μ L	5XBuffer	2 μ l
Primer (Reverse veya Forward)	2 μ L	M13 Primer	2 μ l
Nuclease free su	2 μ L	Nuclease free su	2 μ l
		Pgem	2 μ l

Tablo 20 İzlenen PCR Programı

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

3.10.3 Sephadex Hazırlanışı

1 gr toz sephadex tartılarak falkon tüpe alınır. Üzerine 14 μ l bidistile su ilave edilerek vortekslenir 1 saat bekletilir. Sekans PCR amplikasyonundan sonra PCR ürünleri sephadex kolon pürifilasyonu ile pürifiye edildi. Örnekler KB-3130 analiz cihazına yüklendi ve sonuçlar değerlendirildi.

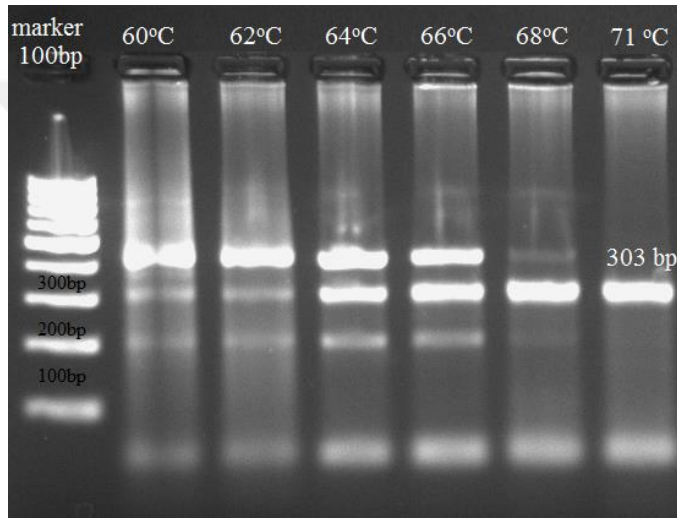
4 DENEYLERDE KULLANILAN CİHAZLAR

Hettich Rotina 380R santrifüj (Germany)
Nüve Bench Top santrifüj (Turkey)
Memmert Benmari WNB-14 (Germany)
Shimadzu AUW220D Hassas terazi (Japan)
Herolab UV transluminator (Germany)
KB-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)
Schimadzu UV-Pharmaspec 1700 spektrofotometre (Japan)
Schimadzu 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)

5 BULGULAR

5.1 APOE Gradyent PCR Elektroforez Sonucu

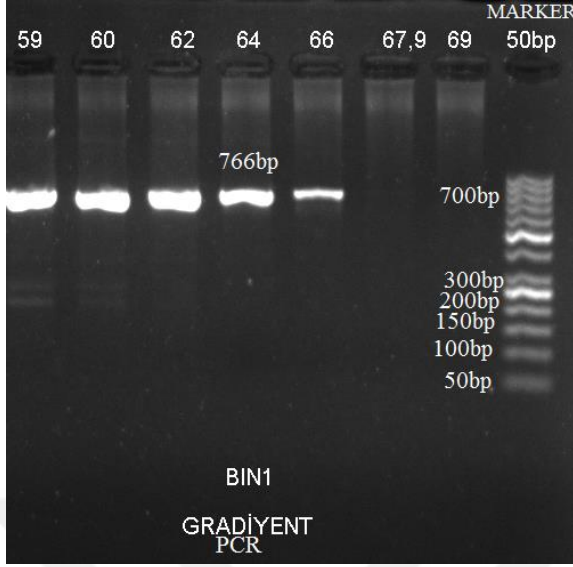
Gradyent PCR yapılan DNA örnekleri agaroz jelde yürütülerek bantlar 373 bp uzunluğu karşılayacak şekilde elde edildi. Optimize sıcaklığın 71 °C olduğuna karar verildi.



Resim 1 APOE gradyent PCR sonucunda elde edilen agaroz jel elektroforez görüntüsü

5.2 BIN1 Gradyent PCR Elektroforez Sonucu

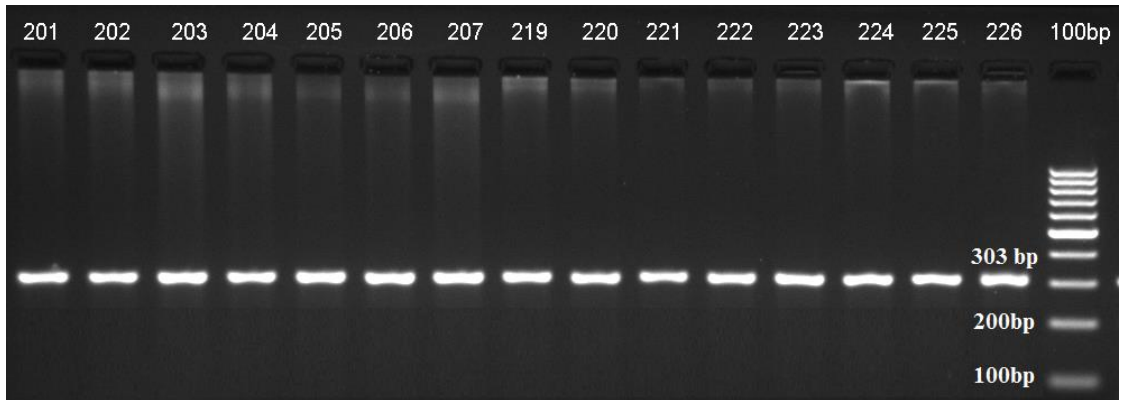
DNA örnekleri agaroz jelde yürütülerek bantlar 766 bp uzunluğu karşılayacak şekilde elde edildi. En iyi optimize sıcaklığın 64 °C olduğuna karar verildi.



Resim 2 BIN1 gradyent PCR sonucunda elde edilen agaroz jel elektroforez görüntüsü

5.3 APOE PCR Elektroforez Sonucu

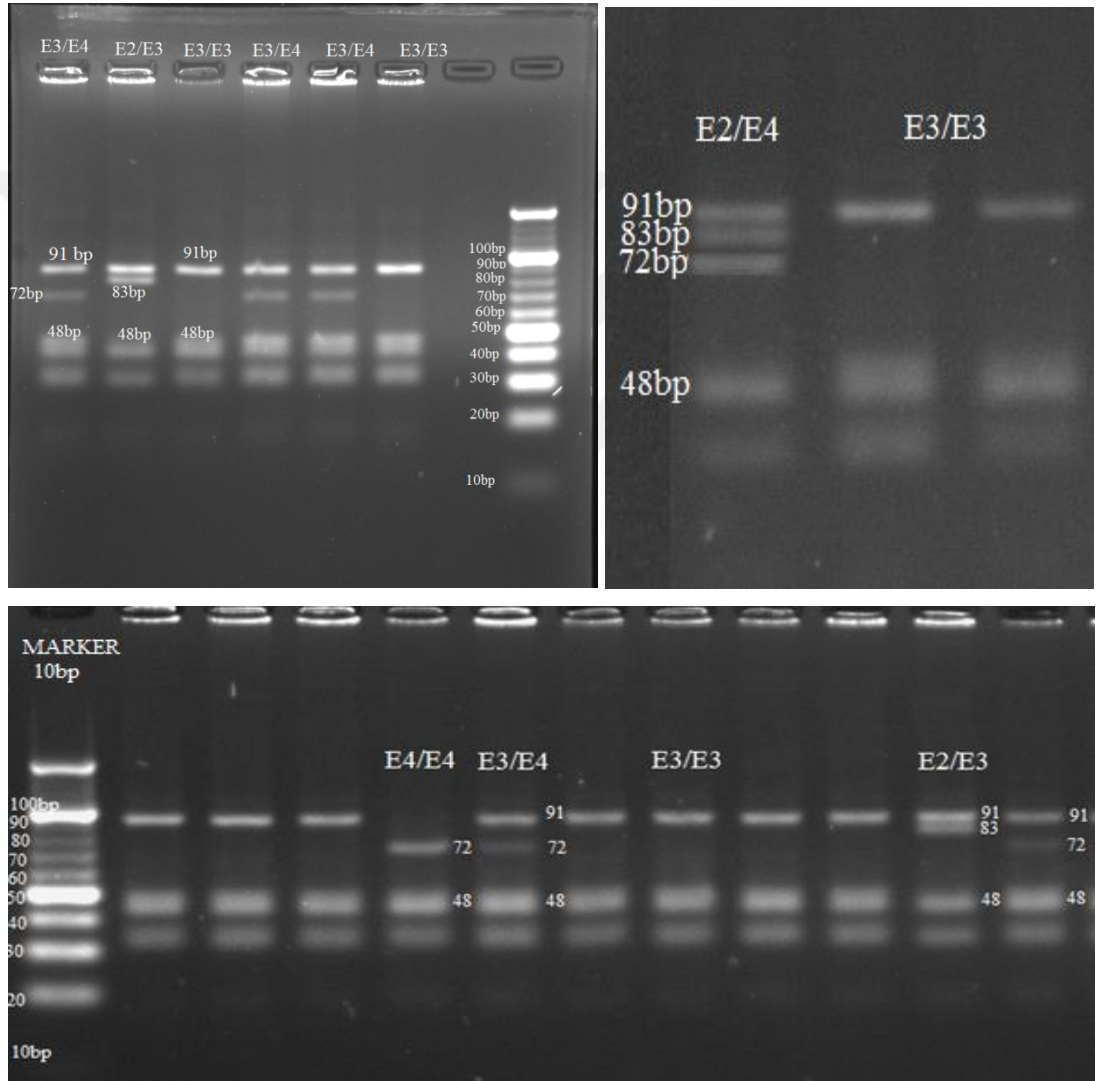
Araştırdığımız bölgenin PCR ürününü değerlendirmek için, %2'lik agaroz jelde yürütülerek 373 bp uzunluğu karşılayacak şekilde elde edildi. U.V transliminatörde görüntülandı.



Resim 3 APOE PCR amplifikasyon ürünlerinin agaroz jel görüntüsü

5.4 Hha1 Enzim Kesimi PCR Elektroforez Sonucu

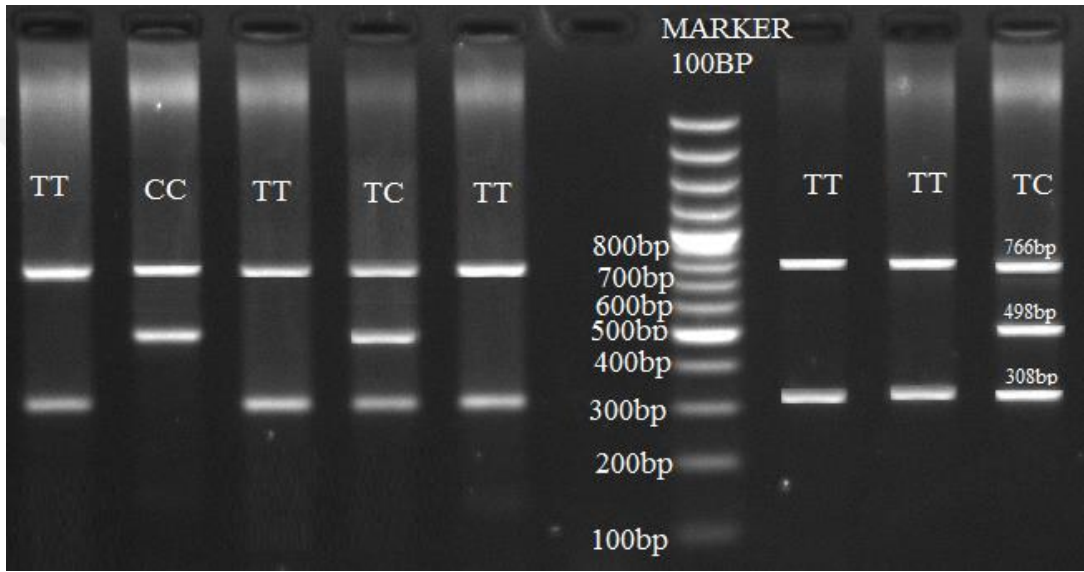
Araştırdığımız bölgenin RFLP sonucunu değerlendirmek için, yapılan enzim kesimleri %4'lük agaroz jelde yürütülerek 91 bp, 83 bp, 72 bp ve 48 bp uzunluğu karşılayacak şekilde elde edildi. U.V transliminatörde görüntülendi.



Resim 4 APOE RFLP ürünlerinin agaroz jel görüntüsü

5.5 BIN1 PCR Elektroforez Sonucu

Araştırdığımız bölgenin PCR ürününü değerlendirmek için, ASO PCR ürünleri %2'lik agaroz jelde yürütülerek 766 bp, 498 bp ve 308 bp uzunluğu karşılayacak şekilde elde edildi. U.V. transliminatörde görüntülendi.

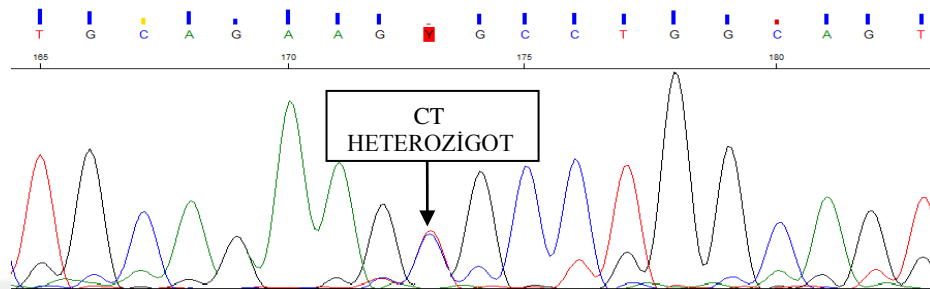


Resim 5 BIN1 ASO PCR amplifikasyon ürünlerinin agaroz jel görüntüsü

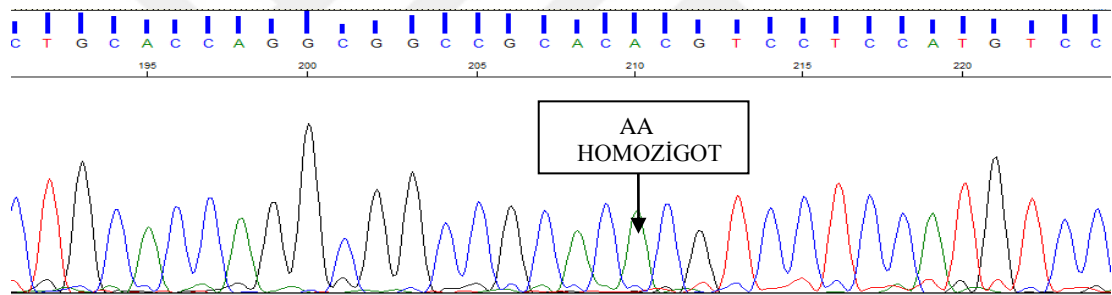
PCR ürünlerinin varlığı tespit edildikten sonra bazı örnekler DNA sekans yapılarak APOE ve BIN1 genlerinin elde edilen sonuçları doğrulandı. PCR amplifikasyonundan sonra PCR ürünleri sephadex kolon pürifikasyonu ile pürifiye edildi. Örnekler KB-3130 sekans cihazına yüklendi ve sonuçlar değerlendirildi.

5.6 Sekans Sonuçları

5.6.1 E2 / E3 Polimorfizmi

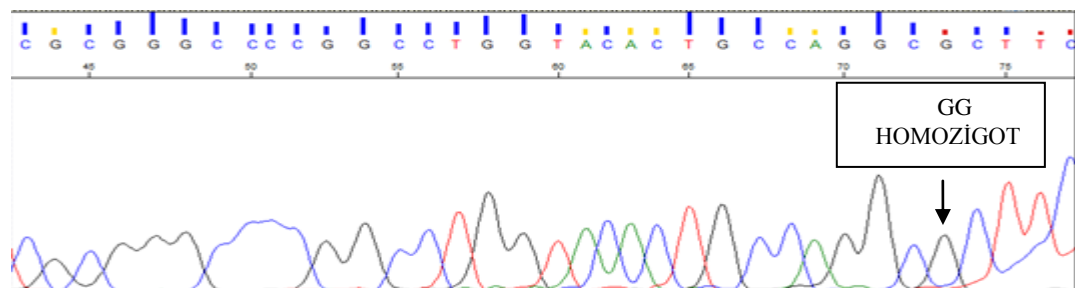


Şekil 9 APOE Rs429358 polimorfizmi

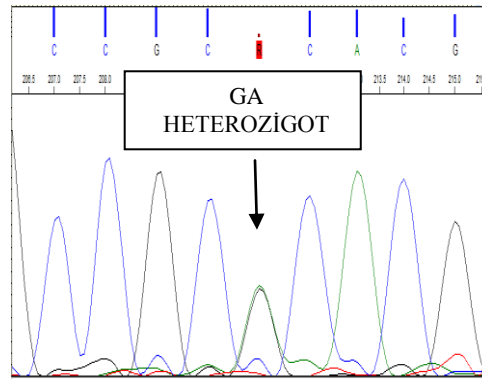


Şekil 10 APOE Rs7412 Polimorfizmi

5.6.2 E3/E4 Polimorfizmi

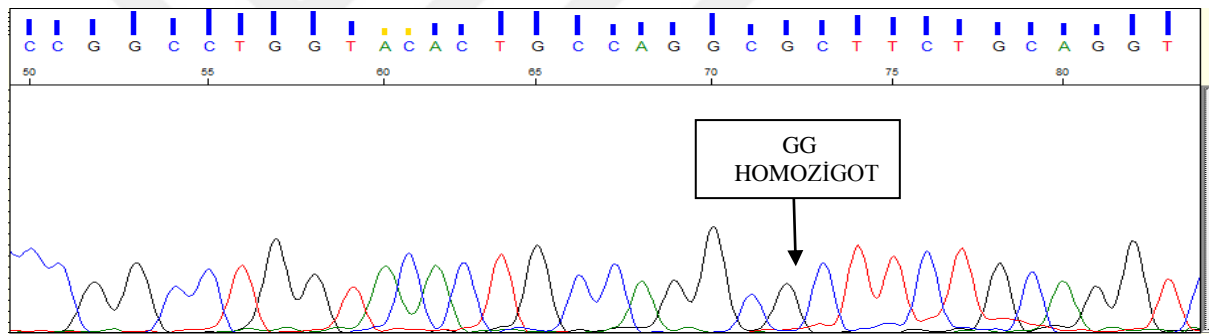


Şekil 11 APOE Rs 429358 Polimorfizmi

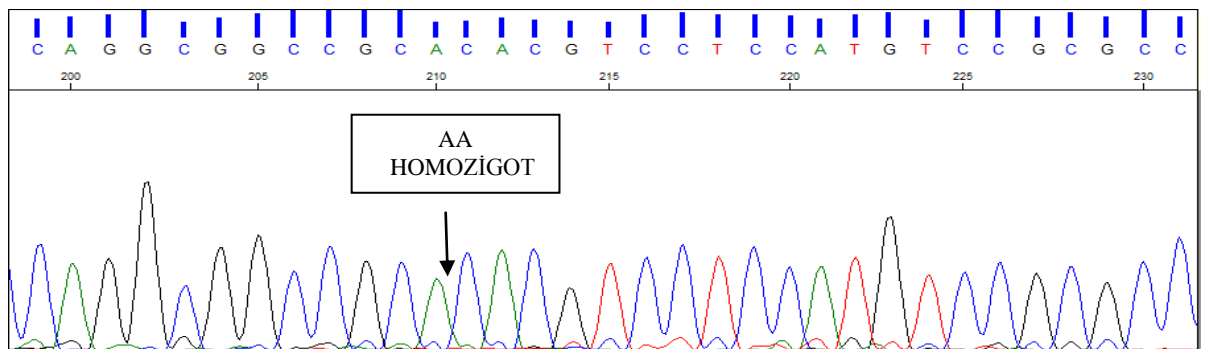


Şekil 12 APOE Rs7412 Polimorfizmi

5.6.3 E3/E3 Polimorfizmi

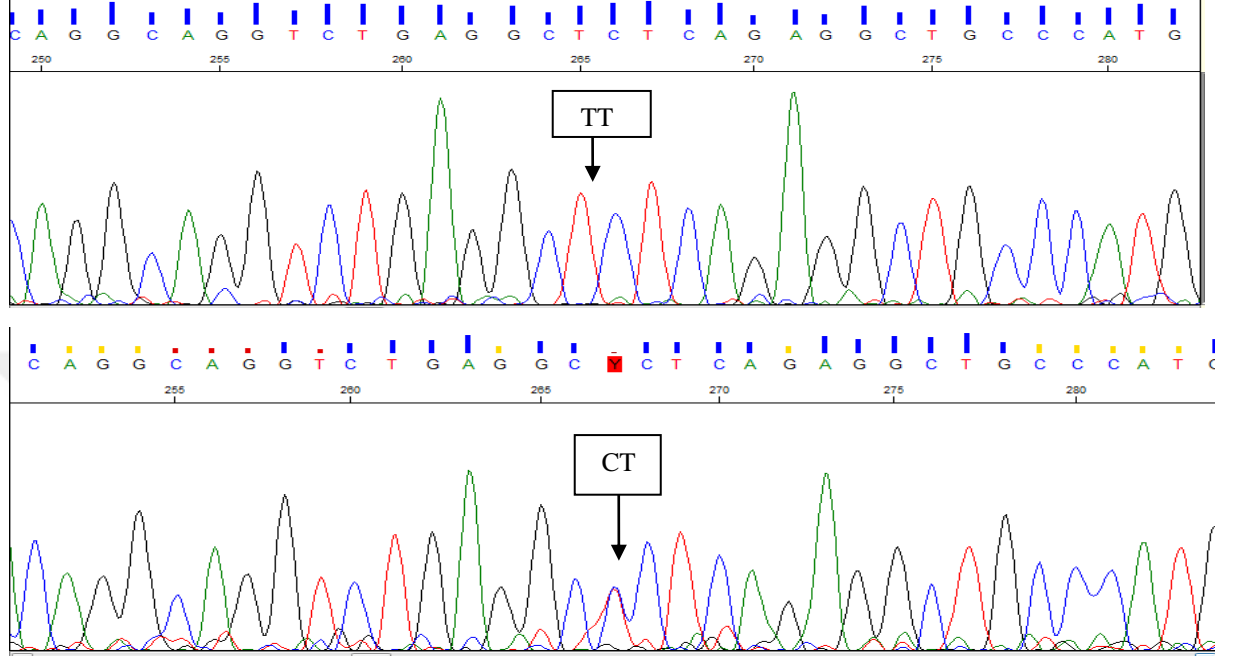


Şekil 13 APOE Rs429358 Polimorfizmi



Şekil 14 APOE Rs7412 Polimorfizmi

5.6.4 BIN1 ASO PCR Polimorfizm Sonuçları



Şekil 15 BIN1 rs744373 gen polimorfizmi

5.7 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.

Hasta ve kontrol grupları arasındaki APOE allel dağılımları

	APOE					TOTAL
	E3/E3	E4/E4	E2/E3	E2/E4	E3/E4	
AH	31 (%58.5)	3 (%5.7)	4 (%7.5)	0 (%0)	15 (%28.3)	53 (%100)
KONTROL	38 (%67.9)	0 (%0)	10 (%17.9)	1 (%1.8)	7 (%12.5)	56 (%100)
TOTAL	69 (%63.3)	3 (%2.8)	14 (%12.8)	1 (%0.9)	22 (%20.2)	109 (%100)

Kontrol grubuna göre vaka grubunda E4 allelinin bulunma sıklığı istatistiksel anlamlılık olarak daha fazla ($p < 0,05$). Vaka grubuna göre kontrol grubunda E2 allelinin bulunma sıklığı istatistiksel olarak daha anlamlı ($p=0,067$).

	APOE							P-Değeri
	E4 Alleli	Diğer	Total	P-Değeri	E2 Alleli	Diğer	Total	
AH	18 (%34)	35 (%66)	53 (%100)	P<0,05	4 (%7.5)	49 (%92.5)	53 (%100)	P=0,067
Kontrol	8 (%14.3)	48 (%85.7)	56 (%100)		11 (%19.6)	45 (%80.4)	56 (%100)	
Total	26 (%23.9)	83 (%76.1)	109 (%100)		15 (%13.8)	94 (%86.2)	109 (%100)	

Vaka ve kontrol grupları ile APOE ve BIN1 allelleri arasında cinsiyet dağılımı benzer bulundu ($p>0,05$).

	ÇALIŞMA GRUBU			APOE		
	AH	Kontrol	P-Değeri	E4 Alleli	E2 + E3 Alleli	P-Değeri
KADIN	29 (%54.7)	36 (%64.3)	P=0,309	12 (%18.5)	53 (%81.5)	P=0,108
ERKEK	24 (%45.3)	20 (%35.7)		14 (%31.8)	30 (%68.2)	
TOTAL	53 (%100)	56 (%100)		26 (%23.9)	83 (%76.1)	
BIN1						
	CC+CT	TT	P-Değeri			
KADIN	26 (%65)	39 (%56.5)	P=0,385			
ERKEK	14 (%35)	30 (%43.5)				
TOTAL	40 (%100)	69 (%100)				

Vaka ve kontrol grupları arasında iskemik kalp hastalığı yönünden istatistiksel olarak anlamlı fark olmasının yanında hipertansiyon, diabet, geçirilmiş inme(stroke), kolesterol, trigliserit ve ailede Alzheimer hastalığı yönünden istatistiksel olarak anlamlı fark yoktur.

		AH	KONTROL	TOTAL	P-DEĞERİ
İSKEMİK KALP HASTALIĞI	VAR	10 (%38.5)	16 (%61.5)	26 (%100)	P<0,05
	YOK	42 (% 62.7)	25 (%37.3)	67 (%100)	
KOLESTEROL	VAR	2 (%6.7)	10 (%29.4)	12 (%18.8)	P<0,05
	YOK	28 (%93.3)	24 (%70.6)	52 (%81.2)	
HİPERTANSİYON	VAR	39 (%79.6)	31 (%70.5)	70 (%75.3)	P= 0,308
	YOK	10 (% 20.4)	13 (% 29.5)	23 (%24.7)	
DİABET	VAR	15 (% 30.6)	11 (%25.6)	26 (%28.3)	P= 0,593
	YOK	34 (% 69.4)	32 (%74.4)	66 (%71.7)	
İNME (STROKE)	VAR	7 (%14.3)	8 (%18.2)	15 (%16.1)	P= 0,610
	YOK	42 (%85.7)	36 (%81.8)	78 (%83.9)	
TRİGLİSERİT	YÜKSEK	8 (%26.7)	10 (%29.4)	18 (%28.1)	P= 0,807
	NORMAL	22 (%73.3)	24 (%70.6)	46 (%71.9)	
AİLEDE AH	VAR	5 (%25)	4 (%66.7)	9 (%34.6)	P=0,138
	YOK	15 (%75)	2 (%33.3)	17 (%65.4)	

Vaka ve kontrol grupları ile APOE genotipleri arasında kolesterol, geçirilmiş stroke hikayesi, iskemik kalp hastalığı, trigliserit düzeyi ve ailede Alzheimer hastalığı yönünden istatistiksel olarak anlamlı fark yoktur ($P>0.05$).

		APOE					TOTAL	P-DEĞERİ
		E3/E3	E4/E4	E2/E3	E2/E4	E3/E4		
İSKEMİK KALP HASTALIĞI	VAR	18 (%69.2)	0 (%0)	3 (%11.5)	0 (%0)	5 (%19.2)	26 (%100)	P>0.05
	YOK	40 (%59.7)	3 (%4.5)	9 (%13.4)	1 (%1.5)	14 (%20.9)	67 (%100)	
	TOTAL	58 (%62.4)	3 (%3.2)	12 (%12.9)	1 (%1.1)	19 (%20.4)	93 (%100)	
KOLESTEROL	VAR	10 (%83.3)	0 (%0)	1 (%8.3)	-	1 (%8.3)	12 (%100)	P= 0,577
	YOK	34 (%65.4)	1 (%1.9)	6 (%11.5)	-	11 (%21.2)	52 (%100)	
	TOTAL	44 (%68.8)	1 (%1.6)	7 (%10.9)	-	12 (%18.8)	64 (%100)	
İNME (STROKE)	VAR	10 (%66.7)	0 (%0)	3 (%20)	0 (%0)	2 (%13.3)	15 (%100)	P>0.05
	YOK	49 (%62.8)	3 (%3.8)	9 (%11.5)	1 (%1.3)	16 (%20.5)	78 (%100)	
	TOTAL	59 (%63.4)	3 (%3.2)	12 (%12.9)	1 (%1.1)	18 (%18.4)	93 (%100)	
TRİGLİSERİT	YÜKSEK	13 (%72.2)	0 (%0)	2 (%11.1)	-	3 (%16.7)	18 (%100)	P>0.05
	NORMAL	31 (%67.4)	1 (%2.2)	5 (%10.9)	-	9 (%19.6)	26 (%100)	
	TOTAL	44 (%68.8)	1 (%1.6)	7 (%10.9)	-	12 (%18.8)	64 (%100)	
AİLEDE AH	VAR	5 (%55.6)	1 (%11.1)	0 (%0)	-	3 (%33.3)	9 (%100)	P>0.05
	YOK	12 (%70.6)	0 (%0)	2 (%11.8)	-	3 (%17.6)	17 (%100)	
	TOTAL	17 (%65.4)	1 (%3.8)	2 (%7.7)	-	6 (%23.1)	26 (%100)	

Vaka ve kontrol grupları ile APOE E4 alleli arasında hipertansiyon yönünden anlamlı bir fark varken ($P<0,05$), geçirilmiş stroke hikayesi, iskemik kalp hastalığı, diabet ve ailede Alzheimer hastalığı yönünden istatistiksel olarak anlamlı fark yoktur ($P>0,05$).

		APOE			P-DEĞERİ
		E4 Alleli	Diğer Alleller	TOTAL	
HİPERTANSİYON	VAR	21 (%30)	49 (%70)	70 (%100)	P<0,05
	YOK	2 (%8.7)	21 (%91.3)	23 (%100)	
	TOTAL	23 (%24.7)	70 (%75.3)	93 (%100)	
DİABET	VAR	4 (%15.4)	22 (%84.6)	26 (%100)	P=0,229
	YOK	18 (%27.3)	48 (%72.7)	66 (%100)	
	TOTAL	22 (%23.9)	70 (%76.1)	92 (%100)	
İNME (STROKE)	VAR	2 (%13.3)	13 (%86.7)	15 (%100)	P=0,508
	YOK	20 (%25.6)	58 (%74.4)	78 (%100)	
	TOTAL	22 (%23.7)	71 (%76.3)	93 (%100)	
İSKEMİK KALP HASTALIĞI	VAR	5 (%19.2)	21 (%80.8)	26 (%100)	P=0,444
	YOK	18 (%26.9)	49 (%73.1)	67 (%100)	
	TOTAL	23 (%24.7)	70 (%75.3)	93 (%100)	
AİLEDE AH	VAR	4 (%44.4)	5 (%55.6)	9 (%100)	P=0,188
	YOK	3 (%17.6)	14 (%82.4)	17 (%100)	
	TOTAL	7 (%26.9)	19 (%73.1)	26 (%100)	

Hasta ve kontrol grupları arasındaki BIN1 allel dağılımları

	BIN1			TOTAL
	TT	CC	TC	
AH	35 (%66)	3 (%5.7)	15 (%28.3)	53 (%100)
KONTROL	34 (%60.7)	3 (%5.4)	19 (%33.9)	56 (%100)
TOTAL	69 (%63.3)	6 (%5.5)	34 (%31.2)	109 (%100)

Kontrol grubuna göre vaka grubunda CC genotipinin bulunma sıklığı istatistiksel olarak anlamlı değil ($p > 0,05$).

	BIN1			P-DEĞERİ
	CC	CT + TT	TOTAL	
AH	3 (%5.7)	50 (%94.3)	53 (%100)	P>0,05
KONTROL	3 (%5.4)	53 (%94.6)	56 (%100)	
TOTAL	6 (%5.5)	103 (%94.5)	109 (%100)	

Vaka ve kontrol grupları arasında BIN1 geni C alleli ile hipertansiyon hastalığı olanlar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark vardır ($p < 0,001$). Fakat diabetes hastalığı, ailede Alzheimer hastalığı, kolesterol, trigliserit düzeyi, geçirilmiş stroke hikayesi ve iskemik kalp hastalığı olanlar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktur ($p > 0,05$).

		BIN1			P-DEĞERİ
		CC + CT	TT	TOTAL	
AİLEDE AH	VAR	3 (%33.3)	6 (%66.7)	9 (%100)	P>0,05
	YOK	6 (%35.3)	11 (%64.7)	17 (%100)	
	TOTAL	9 (%34.6)	17 (%65.4)	26 (%100)	
HİPERTANSİYON	VAR	17 (%24.3)	53 (%75.7)	70 (%100)	P<0,05
	YOK	15 (%65.2)	8 (%34.8)	23 (%100)	
	TOTAL	32 (%34.4)	61 (%65.6)	93 (%100)	
DİABET	VAR	10 (%38.5)	16 (%61.5)	26 (%100)	

	YOK	22 (%33.3)	44 (%66.7)	66 (%100)	P=0,642
	TOTAL	32 (%34.8)	60 (%65.2)	92 (%100)	
TRİGLİSERİT	YÜKSEK	9 (%50)	9 (%50)	18 (%100)	P>0,05
	NORMAL	14 (%30.4)	32 (%69.6)	46 (%100)	
	TOTAL	23 (%35.9)	41 (%64.1)	64 (%100)	
KOLESTEROL	VAR	4 (%33.3)	8 (%66.7)	12 (%100)	P>0,05
	YOK	19 (%36.5)	33 (%63.5)	52 (%100)	
	TOTAL	23 (%35.9)	41 (%64.1)	64 (%100)	
İSKEMİK KALP HASTALIĞI	VAR	9 (%27.3)	17 (%28.3)	26 (%28)	P>0,05
	YOK	24 (%72.7)	43 (%71.7)	67 (%72)	
	TOTAL	33 (%100)	60 (%100)	93 (%100)	
İNME (STROKE)	VAR	3 (%9.4)	12 (%19.7)	15 (%16.1)	P>0,05
	YOK	29 (%90.6)	49 (%80.3)	61 (%100)	
	TOTAL	32 (%100)	61 (%100)	93 (%100)	

Alzheimer hastalarına yapılan MMDT testi sonucunda APOE geni E4 alleli ve BIN1 geni C alleli taşıyan ve taşımayanlardaki puan tablosu.

MMDT Puanı	APOE			BIN1		
	E4 Alleli	Diğer Alleller	Total	CC-CT	TT	Total
5-10	0 (%0)	2 (%100)	2 (%100)	1 (%50)	1 (%50)	2 (%100)
10-15	3 (%50)	3 (%50)	6 (%100)	2 (%33.3)	4 (%66.7)	6 (%100)
15-20	4 (%40)	6 (%60)	10 (%100)	3 (%30)	7 (%70)	10 (%100)
20-25	7 (%38.9)	11 (%61.1)	18 (%100)	5 (%27.8)	13 (%72.2)	18 (%100)
25<X	0 (%0)	3 (%100)	3 (%100)	1 (%33.3)	2 (%66.7)	3 (%100)
Total	14 (%35.9)	25 (%64.1)	39 (%100)	12 (%30.8)	27 (%69.2)	39 (%100)

Vaka ve kontrol grupları arasında BIN1 ve APOE genlerine ait genotip dağılımları.

BIN1 * APOE Crosstabulation

			APOE					Total
			E3/E3	E4/E4	E2/E3	E2/E4	E3/E4	
BIN1	TT	Count	41	3	9	0	16	69
		% within BIN1	59,4%	4,3%	13,0%	,0%	23,2%	100,0%
		% within APOE	59,4%	100,0%	64,3%	,0%	72,7%	63,3%
		% of Total	37,6%	2,8%	8,3%	,0%	14,7%	63,3%
	CC	Count	4	0	1	0	1	6
		% within BIN1	66,7%	,0%	16,7%	,0%	16,7%	100,0%
		% within APOE	5,8%	,0%	7,1%	,0%	4,5%	5,5%
		% of Total	3,7%	,0%	,9%	,0%	,9%	5,5%
	TC	Count	24	0	4	1	5	34
		% within BIN1	70,6%	,0%	11,8%	2,9%	14,7%	100,0%
		% within APOE	34,8%	,0%	28,6%	100,0%	22,7%	31,2%
		% of Total	22,0%	,0%	3,7%	,9%	4,6%	31,2%
Total	Count	69	3	14	1	22	109	
	% within BIN1	63,3%	2,8%	12,8%	,9%	20,2%	100,0%	
	% within APOE	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	
	% of Total	63,3%	2,8%	12,8%	,9%	20,2%	100,0%	

6 SONUÇLAR

Yapmış olduğumuz bu çalışmada sağlıklı kişilerin ilerleyen zamanlarında AH'na yakalanma riskini belirleyecek biyomarkırlardan en önemlisi olan APOE genine ait E2,E3 ve E4 allelleri için rs429358 ve rs7412 polimorfizimleri ile bu hastalığa ilişkin en önemli aday genlerden biri olan BIN1 genine ait rs744373 polimorfizmini araştırdık. Çalışmamız Türkiye'de bu iki polimorfizmin birlikte araştırıldığı ilk çalışmadır. Çalışmamız için 53 AH ve 56 kontrol kullanıldı ve çalışmaya katılan bireylere ait nörolojik muayneler, yapılan psikolojik testler ve istatistiksel analiz için gerekli olan bilgiler elde edildikten sonra sonuçlara ulaşıldı. Bu tez çalışmasının sonuçları maddeler halinde şöyle özetlenebilir:

1. Vaka ve kontrol grupları arasında cinsiyet dağılımı benzer bulundu.
2. Vaka ve kontrol grupları arasında ailede Alzheimer hastalığı yönünden anlamlı bir fark bulunamadı.
3. Alzheimer hastalarında APOE E4 alleli daha fazla bulunurken, kontrol grubunda E2 alleli daha fazla bulundu.
4. Kontrol grubunda E4/E4 genotipi hiç bulunmazken AH'da E4/E4 genotipi bulundu.

5. Kontrol grubunda vaka grubuna göre iskemik kalp hastalığının görülme oranının istatistiksel olarak daha fazla olduğu bulundu. Fakat hasta sayımız az olduğu için bu sonucun başka çalışmalarla doğrulanması gerekmektedir.
6. Vaka ve kontrol grupları arasında hipertansiyon, diabet, inme (stroke), trigliserit yönünden bir fark bulunamadı.
7. Kontrol grubunda vaka grubuna göre kolesterol görülme oranı istatistiksel olarak daha anlamlı bulundu fakat APOE genotipleri arasında kolesterol yönünden anlamlı bir fark bulunamadı.
8. Vaka ve kontrol grupları arasında APOE geni E4 alleli bulunan kişilerde hipertansiyon hastalığının daha fazla görüldüğü bulundu fakat diabet, inme (stroke), kolesterol, trigliserit ve iskemik kalp hastalığı yönünden bir fark bulunamadı.
9. Vaka ve kontrol grupları arasında APOE geni genotipleri ile trigliserit, geçirilmiş inme, iskemik kalp hastalığı arasında anlamlı bir fark bulunamadı.
10. Hasta ve kontrol grupları arasındaki BIN1 geni allel dağılımları arasında anlamlı bir fark bulunamadı.
11. Vaka ve kontrol grupları arasında BIN1 geni genotipleri ile ailede Alzheimer hastası olanlar arasında anlamlı bir fark bulunamadı.
12. Vaka ve kontrol grupları arasında BIN1 geni C alleli taşıyanların hipertansiyon hastalığına yakalanma oranının daha düşük olduğu bulundu fakat diyabet, kolesterol, trigliserit, geçirilmiş stroke hikayesi ve iskemik kalp hastalığı arasında anlamlı bir fark bulunamadı.

Elde ettiğimiz sonuçlar Alzheimer hastalığı ile Apoe E4 alleli arasında kuvvetli bir ilişki olduğunu gösterirken, BIN1 genine ait rs744373 polimorfizmi ile anlamlı bir ilişki olmadığını göstermektedir. Yapmış olduğumuz çalışmayı literatürde daha önce yapılmış olan çalışmalarla karşılaştırdığımız zaman pek çok farklı sonucun olduğu görülmektedir. Bu farklı sonuçların sebeplerinin farklı sayı ve nitelikteki vaka grupları, geçmiş, genetik ve çevresel faktörler, etnik köken, farklı etnik gruplar olduğu söylenebilir. Bunun yanında Alzheimer gibi multifaktöryel hastalıklarda hastalığın her aşamasında etkisi olan birçok gen ve polimorfizmin bir birleriyle etkileşim içinde olup bu süreci etkilediği de bilinmektedir.

Sonuçlarımız daha önce yayınlanmış genetik çalışmalarına ek olarak AH'nın tek bir nedenden kaynaklanmadığını kökenide pek çok faktörün rol oynadığını göstermektedir. Bizim elde ettiğimiz bu bulguların ileride yapılacak olan çalışmalar için faydalı olacağına inanıyoruz. Bizim yapmış olduğumuz bu çalışma küçük çaplı bir çalışmadır. Özellikle tüm Türkiye'yi temsil etmesi bakımından farklı illeride kapsayan ve hasta bilgilerinde tam olduğu daha geniş çaplı, daha çok aday gen ve polimorfizmin birlikte değerlendirildiği bir çalışma ile bu bilgilerin desteklenmesi gerektiği kanısındayız.

7 TARTIŞMA

Alzheimer Hastalığı (AH) yaşa bağımlı ve geri dönüşümsüz nörodejeneratif bir hastalık olup yaşlılarda demans türleri arasında en sık görülenidir [1]. AH toplumdaki genel ölüm oranı sıralamasında dördüncü sırada yer almaktadır. Hastalık için en önemli risk faktörü ileri yaştır ve 65 yaş sonrasında prevalansı her beş yılda bir ikiye katlanmaktadır [2]. Alzheimer hastalığının klinik tanısı demansa sebep olan diğer nedenlerin ekarte edilmesi ile yapılmaktadır. Kesin tanı ise ancak post-mortem dönemde nöropatolojik inceleme ile mümkündür [3]. Bu nedenle hastalığın tanısına katkı sağlayacak biyomarkırlara ihtiyaç söz konusudur. AH'da tanımlanması beklenen biyomarkırın özellikleri hastalığı diğer demans türlerinden ayırması, prognozun belirlenmesine katkı sağlaması ve hastalığa yatkınlığı belirlemesidir. Yaşın ilerlemesiyle bazı insanlar Alzheimer'a yakalanırken diğer bazıları etkilenmemektedir. Bu farklılıkta ise insan genomundaki bazı genlere ait kombine polimorfizmlerin rol oynadığına inanılmaktadır. Ancak bu güne kadar bu polimorfizmler tam olarak belirlenememiştir. Bilinen en önemli risk faktörü APOE

genine ait E4 alleli olmasına karşın bu allelin Türk toplumundaki AH'da görülme sıklığı farklılık göstermektedir. Bizim çalışmamızda bunu destekler nitelikte olup APOE geni E4 allelinin etkisinin diğer genlerle ve çeşitli çevresel faktörlerin etkisiyle değişebilir olduğunu göstermektedir. AH'da önemli olduğu söylenen fakat Türkiye'de hiç çalışılmamış bir başka gen BIN1 (Bridging Integrator 1)'dir. BIN1 geni ve tau proteini arasındaki ilişkinin AH riskini etkilediği düşünülmektedir. BIN1 geninin aynı zamanda endositoz taşınımı, inflamasyon, kalsiyum dengesi ve apoptoz dahil olmak üzere çeşitli hücrel fonksiyonları etkilediği de bilinmektedir. BIN1 genine ait farklı polimorfizmlerin (örn. SNP rs744373 ve rs7561528) Alzheimer riskini arttırdığı tespit edildiğinden dolayı, yavaş ilerleyen bu hastalıkta sağlıklı iken Alzheimer riskinin bilinmesi ile erken teşhis ve tedavi olasılığı artırılmış olacaktır. Bu nedenle bu çalışmamızda sağlıklı kişilerin ilerleyen zamanlarında AH'na yakalanma riskini belirleyeceğini düşündüğümüz biyomarkırlardan en önemli iki gen olan APOE ve BIN1 genlerini inceledik. Bu amaçla APOE genine ait E2,E3 ve E4 allelleri için rs429358 ve rs7412 polimorfizimleri ile bu hastalığa ilişkin en önemli aday genlerden biri olan BIN1 genine ait rs744373 polimorfizmini araştırdık. Türkiye'de daha önce APOE geni E4 alleli ile ilgili yapılmış olan çalışmalar olmasına karşın, çalışmamız Türkiye'de bu iki polimorfizmin beraber ele alınarak araştırıldığı ilk çalışma olacaktır. Çalışmamız için 53 AH ve 56 kontrol kullanıldı ve çalışmaya katılan bireylere ait nörolojik muayneler, yapılan psikolojik testler ve istatistiksel analiz için gerekli olan bilgiler elde edildikten sonra sonuçlara ulaşıldı.

Sonuç olarak Alzheimer hastalarındaki APOE allel dağılım yüzdeleri E3/E3 için % 58,5, E4/E4 için %5,7, E2/E3 için %7,5, E2/E4 için %0, E3/E4 için % 28,3 olarak bulunmuştur. Kontrol grubunda ise APOE allel dağılım yüzdeleri E3/E3 için % 67,9, E4/E4 için %0, E2/E3 için %17,9, E2/E4 için %1,8, E3/E4 için % 12,5 olarak bulunmuştur. Elde edilen sonuçlara göre gruplarda en fazla E3/E3 genotipinin bulunduğu görülmektedir. E3 alleli, toplumda en sık görülen formdur ve ana form olarak kabul edilir. Bilindiği gibi AH'nın gelişimi açısından APOE E4 geni risk faktörü ve APOE E2 geni koruyucu faktör kabul edilmekte [140], allele göre artan riski ise E4>E3>E2 olarak bilinmektedir [141]. Bizim çalışmamızda bu durumu doğrulamaktadır ve aynı zamanda daha önce yapılan çalışmalarla benzer sonuç vermektedir. Örneğin Avrupada yapılan bir çalışmada APOE allel dağılım yüzdeleri

vaka grubunda, E2/E3 için %4.0, E2/E4 için %9.0, E3/E3 için %35.0, E3/E4 için %35.0, E4/E4 için %17 kontrol grubunda, E2/E2 için %1, E2/E3 için %10, E2/E4 için %3.0, E3/E3 için %68.0, E3/E4 için %16.0, E4/E4 için %2 olarak bulunmuştur. Bu çalışmada bizim çalışmamızda olduğu gibi vaka grubunda E2/E2 genotipine sahip bireyler yoktur, çalışmamızdan farklı olarak kontrol grubunda E4/E4 genotipine sahip bireyler vardır [142]. Başka bir çalışmada APOE allel dağılım yüzdeleri vaka grubunda, E2/E3 için %5.7, E2/E4 için %2.9, E3/E3 için %74.3, E3/E4 için %14.3.0, E4/E4 için %2.9 kontrol grubunda E2/E3 için %3.4, E3/E3 için %93.1, E3/E4 için %3.4 olarak bulunmuştur. Bu çalışmada da kontrol grubunda E4/E4 genotipine sahip bireyler yoktur. Aynı zamanda hem vaka hem de kontrol grubunda bizim çalışmamızdaki gibi E2/E2 genotipine rastlanmadı [143]. Başka bir çalışmada APOE allel dağılım yüzdeleri vaka grubunda, E2/E3 için %7.4, E3/E3 için %63.2, E3/E4 için %29.4 kontrol grubunda E2/E3 için %11.8, E2/E4 için %0.8, E3/E3 için %71.7, E3/E4 için %15.7 olarak bulunmuştur. Bu çalışmada diğer çalışma gibi bizim çalışmamızla benzer olarak vaka ve kontrol grubunda E2/E2 ve kontrol grubunda E4/E4 genotipleri görülmedi [144]. Bir diğer çalışmada APOE allel dağılım yüzdeleri vaka grubunda, E2/E3 için %1.0, E3/E3 için %53, E3/E4 için %41.0 E4/E4 için %5.0 kontrol grubunda E2/E3 için %7.0, E2/E4 için %2.0, E3/E3 için %72.0, E3/E4 için %16.0, E4/E4 için %3.0 olarak bulunmuştur. Bu çalışmada bizim çalışmamızdan farklı olarak kontrol grubunda E4/E4 genotipli bireyler vardır buna karşı vaka grubunda E2/E4, E2/E2 ve kontrol grubunda E2/E2 genotipli birey olmaması ile bizim çalışmamıza benzerdir [145]. Başka bir çalışmada da vaka ve kontrol gruplarında E2/E2 ve E4/E4 genotiplerine rastlanmamıştır [146].

Bizim çalışmamızda kontrol grubuna göre vaka grubunda E4 allelinin bulunma sıklığı istatistiksel anlamlılık olarak daha fazla ($p < 0,05$). Kontrol grubunda E4/E4 genotipi bulunmazken vaka grubunda E4/E4 genotipi daha fazla bulunmakta aynı şekilde E4 allelide vaka grubunda daha fazla bulunmakta bu da yapılan çoğu çalışma gibi APOE E4 geninin AH yatkınlık geni olduğunu ıspatlamaktadır. Avrupada yapılan bir çalışmada bizim çalışmamızla uyumlu olarak E3 allel frekansı kontrol grubunda, E4 allelinin frekansı da vaka grubunda anlamlı düzeyde yüksekti sadece bizim çalışmamızdan farklı olarak E2 allel frekansı vaka grubunda daha yüksekti [142]. Brezilyada yapılan bir çalışmada bizim çalışmamızla uyumlu olarak E2 ve E3

allel frekansları kontrol grubunda, E4 allel frekansında vaka grubunda yüksekti [145]. Yapılan bir diğere çalışmada da E4 allelini taşıyan bireylerin oranı vaka grubunda anlamlı olarak daha yüksek bulunmuştur [147]. Başka bir çalışmada da benzer sonuç bulunmuştur [148]. Türkiye’de yapılan iki çalışmada E4 alleli vaka grubunda daha yüksek bulunurken bizim çalışmamızın tersine vaka grubunda E2 allelinin frekansında yüksek bulunmuştur [143, 144]. Yine Türkiye’de yapılan bir diğere çalışmada E4 allelinin varlığı kontrol grubuna göre daha fazla bulunmuştur [149]. Yine literatüre baktığımızda Akdeniz bölgesindeki Araplarda AH ve APOE genotipleri ile ilgili yapılmış az sayıdaki çalışmalardan biri olan Tunus’da yapılmış bir çalışmaya göre AH ile E4 allel sıklığı anlamlı bir ilişki göstermiştir [150]. Çalışmada E4 allel sıklığı hasta grubunda (%31,65) kontrol grubuna (%12,65) göre daha yüksek oranda bulunarak Tunuslular için AH’na yatkınlık oluşturmaktadır. Yine farklı ülkelerde yapılan çalışmalarda da benzer sonuçlar bulunmuştur. Türkiye [151], Fransa [152], Kanada [153], İnan [154], Yunanistan [155], Japonya [156], İspanya ve Fas [157] gibi ülkelerde yapılan çalışmalar bizim sonuçlarımızla aynı doğrultudadır. Farklı İtalya bölgelerinde (Sicilya, Sardunya ve Apulia) yapılan diğere çalışmalarda da kontrol grubuna göre hasta grubunda daha yüksek E4 allelinin bulunmasında yine çalışmamızla benzer sonuçlar göstermektedir [158-160]. Ancak bu ilişki kesin değildir APOE E4 allelinin AH için risk teşkil etmediği çalışmalarda vardır. Bu çalışmalar Kenya [161], Nijerya [162], Kamerun ve Nil bölgesinde yaşayan Afrikalılar [163] ve Kuzey İsrail’de Wadi Ara Arapları [164]’nda yapılmıştır. Aynı zamanda Afrikan Amerikalılar ve Amerikan İspanyollarında yapılan çalışmalarda da benzer sonuçlar bulunmuştur [165,166]. Çelişkili bu sonuçlar AH’na etki eden APOE E4 allelinin diğere etkili genler [167] ve olası çevresel etkiler ile değişebilir olduğunu göstermiştir. Sonuç olarak bu çalışmada E4 allel dağılımının hasta ve kontrol grupları arasında anlamlı bir fark oluşturduğu gösterilmiştir. APOE E4 alleli Fransa[168], İtalya[158], İnan[154], İspanya[157], Kore [169], Tunus[150], ve Çin[170] popölasyonlarında olduğu gibi diğere birçok araştırmada da AH için riski arttırdığı bulunmuştur [171-174].

Bizim çalışmamızdan farklı olarak vaka ve kontrol gruplarında E2/E2 genotipinin görüldüğu çalışmalar da vardır ama bu çalışmalarda da genellikle vaka gruplarında

E4/E4 genotipinin görülme oranı daha fazladır bu da yine çalışmamızla uyumludur [173,175].

APOE polimorfizmleri özellikle geç başlangıçlı Alzheimer hastalığı ile ilişkilidir. Tüm bireylerin AH'na yakalınma riski vardır fakat bunun *APOE* genotipleri ile yakından ilişkili olduğu bilinmektedir. Literatürde, bahsettiğimiz gibi E4 alleli ve AH'nı ilişkilendiren çalışmalar vardır. Bizim çalışmamızda literatür ile uyumlu olarak Alzheimer hastalığının gelişiminde E4 allelinin etkili olduğunu gösterir niteliktedir. Yine literatürde Alzheimer için E2 allelinin koruyucu etkiye sahip olabileceğini gösteren çalışmalar vardır. Bizim çalışmamızda da vaka grubuna göre kontrol grubunda E2 allelinin bulunma sıklığı daha fazla buda E2 allelinin AH karşı koruyucu olduğunu gösteren çalışmaları doğrulamaktadır.

GBAH'da etkili olan pek çok risk faktöründen biride ailede AH ve E4 alleli taşıyıcılığıdır. Çalışmamızda tüm vakaların aile öyküsüne ulaşamadı ama ulaşabildiğimiz kadarına baktığımızda ailede demans hikayesi bulunan bireylerde E4 allelinin daha fazla bulunduğu görüldü buda yapılan bazı çalışmaları doğrular niteliktedir [176,177].

Cinsiyet ve E4 alleli arasında anlamlı sonuçların bulunduğu çalışmalar vardır [170,178-180]. Fakat bizim çalışmamızda vaka ve kontrol grupları arasında cinsiyet dağılımı benzer bulundu ($p=0,309$) ve cinsiyet ve *APOE* E4 allel frekansları arasında da anlamlı bir fark görülmedi ($p=0,108$).

AH görülme sıklığı yaşla birlikte artar. Bizim çalışmamızda bunu doğrular niteliktedir. Farklı çalışmalarla da bu durum gösterilmiştir. Örneğin Tunus'da yapılan bir çalışmaya göre [150], Kuzey Afrika'da Arap ve Müslümanlardan oluşan bir popülasyonda 1956 yılında % 4,1 olan yaşlı nüfusu 2004 yılında %9,6'ya yükselmiştir [181]. Değişen bu yaş ortalaması AH oluşumunu belirgin bir şekilde etkilemiştir [182]. Yine yapılan bu çalışmaya göre 65 yaş üstü demans yaygınlığı %3,7 dir [183].

Doğru AH tanısı için eğitim düzeyi, okuma-yazma durumu, cinsiyet, yaş gibi bilgilerin yanı sıra doğru ve güvenilir nöropsikolojik testler kullanılmalıdır [183-188]. Eksik bilgilerle demans tanısı yapmak güvenilir sonuç vermez [189]. Sonuç olarak *APOE* E4 allelinin varlığı AH için ne gereklidir ne de yeterlidir [178,190]. AH tek bir nedenden kaynaklanmadığı kökeninde birçok faktörün etkili olduğu

düşünülmektedir. Bu yüzden AH altında yatan mekanizmaların tam olarak ortaya çıkartılması gerekmektedir. Bunun için biz de çalışmamızda vaka ve kontrol gruplarını farklı açılardan da karşılaştırmayı düşündük. Vaka ve kontrol gruplarını hipertansiyon ($p=0,308$), diyabet ($p=0,593$), geçirilmiş inme(stroke) ($p=0,610$) ve trigliserit ($p= 0,807$) yönünden karşılaştırdık ve sonuçta istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı ($p=0,138$). İskemik kalp hastalığı ve kolesterol yönünden ise istatistiksel olarak anlamlı fark bulundu ($p < 0,05$). Vaka ve kontrol grupları ile APOE genotipleri arasında kolesterol yönünden istatistiksel olarak anlamlı fark yoktur ($p= 0,577$).

Vaka ve kontrol grupları arasında APOE geni E4 alleli ile cinsiyet ($p=0,108$), ailede Alzheimer hastası ($p=0,188$), iskemik kalp hastalığı ($p=0,444$), geçirilmiş inme (stroke) hikayesi ($p=0,508$), diyabet hastalığı ile trigliserit düzeyi yüksek olanlar ve kolesterolü olanlar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktur ($p > 0,05$). Ancak hipertansiyon hastalığına yakalanma oranı istatistiksel olarak anlamlıdır ($p < 0,05$).

Vaka ve kontrol grupları arasında APOE geni genotipleri ile geçirilmiş stroke hikayesi, iskemik kalp hastalığı hikayesi ve trigliserit düzeyi yüksek olanlar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktur ($p > 0,05$).

Yapılan çalışmalar düşük eğitim düzeyi ve yaşın demansla ilişkili olduğunu göstermiştir. Eğitim yetersizliği, bellek kaybının hızlı ve erken yaşlarda oluşmasına neden olabilmektedir. Erken yaşlarda alınan eğitimin, neokortikal sinaptik dansiteyi etkileyerek bilişsel kapasiteyi arttırdığı ve demans açısından koruyuculuk sağladığı bilinmektedir [191-197]. Çalışmamızda vaka gruplarına ait eğitim düzeyi bilgileri eksik olduğu için tam bir sonuca ulaşamadık ama var olan bilgiler bu sonuçları doğrulamaktadır.

Özetle biz APOE E4 allelinin vaka grubunda yüksek frekanslarını bulduk. Sonuçlarımız daha önce yayınlanmış genetik çalışmalarına ek olarak AH'nın tek bir nedenden kaynaklanmadığını kökeninde pekçok faktörün rol oynadığını göstermektedir [198]. Etnik köken, geçmiş, genetik ve çevresel faktörler, farklı etnik gruplar AH riskine katkıda bulunur.

APOE geninden sonra AH'da etkili olduğu bilinen BIN1 genine ait vaka gruplarındaki genotip dağılım yüzdeleri TT için %66, CC için %5,7 ve TC için

%28,3 olarak bulunmuştur. Kontrol grubundaki BIN1 genotipleri dağılım yüzdesi TT için %60,7, CC için % 5,4 ve TC için %33,9 olarak bulunmuştur. Kontrol grubuna göre vaka grubunda C allelinin ve CC genotipinin bulunma sıklığı istatistiksel olarak anlamlı değildir ($p > 0,05$). Sonuç olarak gruplar arasında anlamlı bir fark yoktur. Fakat anlamlı olan çalışmalar da vardır [197].

APOE riskinin olmadığı bir çalışmada BIN1 geninin önemli ölçüde ilişkili tek nükleotid polimorfizmi (SNP) olasılık oranı (OR) ve nüfusa atfedilebilir fraksiyonu (PAF) sırasıyla %1.20 ve % 6 olduğu tahmin edilmektedir [123]. Bu da çalışmamızı kısmen desteklemektedir. AH transgenik fare modellerinde yaşlı farenin BIN1 ekspresyonunun değiştiği Alzheimerlı beyinlerde gösterilmiştir [199]. BIN1 ekspresyonunun son başlangıç yaşı ve kısa hastalık süresi ile ilişkili olduğu bildirilmiştir [200]. Biz de çalışmamızda BIN1 genine ait farklı genotipleri farklı hastalıklarla kıyasladık. Sonuç olarak vaka ve kontrol grupları arasında BIN1 geni genotipleri ile kolesterol ve trigliserit düzeyi yüksek olanlar arasında anlamlı bir sonuç bulamadık ($p > 0.05$). Ailesinde Alzheimer olanlar ile BIN1 genotipleri arasında da istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktur ($p > 0,05$). Sadece vaka ve kontrol grupları arasında BIN1 geni C alleli ile hipertansiyon hastalığı olanlar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark vardır ($p < 0,001$). Vaka ve kontrol grupları arasında BIN1 geni C alleli ile diyabet, kolesterol, trigliserit düzeyi yüksek, geçirilmiş stroke hikayesi, iskemik kalp hastalığı hikayesi, ailede Alzheimer hastalığı olanlar ve cinsiyet arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktur ($p > 0,05$).

Genom genelinde yapılan çalışmalar (GWAS) BIN1 geni rs744373 polimorfizminin beyaz ırkta (Kafkas) Alzheimer hastalığı ile ilişkili olduğunu bulmuştur. Son zamanlarda Doğu Asya (Çin ve Japonya)'da yapılan bir çalışmada bu polimorfizm araştırılmış ve sonuçta anlamlı bir ilişki bulunmuştur [201]. Yapılan çalışmalar rs744373 polimorfizminin farklı etnik kökenlerde farklı sonuçlar verdiğini gösterdi. Doğu Asya'da yapılan bu çalışmada da 744373 polimorfizmi Doğu Asya ve beyaz ırkta (Kafkas) Alzheimer ile ilişkisi benzer bulundu. Bu çalışma Doğuya AH ile rs744373 polimorfizmi arasındaki ilişkiyi gösteren ilk çalışmadır. AH ve rs744373 polimorfizmi arasında ilişki ile ilgili tam sonuca ulaşamayan çalışmalar da vardır [202,203].

BIN1 geninin Protein fonksiyonları üzerindeki etkilerini onaylamak ve AH ile ilişkisini tam olarak anlamak için gelecekteki araştırmalar çok değerli olacaktır. Ayrıca, AH riskini arttıran BIN1 geninin birden fazla fonksiyonel türevleri muhtemelen vardır gözardı edilemez. Diğer fonksiyonel türevleri derinlemesine araştırmak hastalığın başlangıcı veya ilerlemesi ile ilişkiyi daha iyi değerlendirmek için gerekli olacaktır. BIN1 geninin genetik varyantları hastalığın farklı şekilde ilerlemesini etkiler, bunun için AH gruplara bölmek ve her BIN1 genotipi için ayrı ayrı bilişsel gerileme oranını analiz etmek önemli olacaktır. Ayrıca, tek bir SNP'le olan ilişki analizi genetik riskleri tanımlamak için yetersiz olabilir. MLGPs (Multilocus genotype patterns, çoklu lokus genotip modeller) de SNP ler birleştirilerek farklı GBAH duyarlılık lokusları şu anda bir bireyin bilişsel performansı üzerindeki etkisini göstermiştir [204]. Bu nedenle, AH için bireyin genetik riskini tahmin etmek için MLGPs yeni bir analitik yaklaşım sağlayabilir.

AH için BIN1 önemli bir faktördür. GWAS tarafından belirlenen genler, GBAH nın patofizyolojik süreci için yeni bir bakış açısı getirmiştir. Elde edilen bulgular endositoz, sinaptik işlev bozukluğu, bağışıklık sistemi ve lipid metabolizması gibi hastalık sürecine dahil yeni yollara odaklanmak gerektiğini belirtmektedir [205].

APOE, Clusterin (CLU) ve Complement Receptor 1 (CR1) hakkında AH ile ilgili büyük miktarda veri mevcut olduğu halde, BIN1 in nörodejenerasyonu hakkında çok az veri vardır. Bu nedenle, AH patogenezinde BIN1 in rolünü ve potansiyel moleküler yolakları daha iyi araştırmak gerekir. AH'da BIN1 geninin patogenik yapısı altında yatan mekanizmalar tam olarak anlaşılamamış olmasına rağmen birkaç olası yolak tespit edilmiştir. Buna ek olarak, başka bağlamlardaki BIN1 faaliyeti bize AH potansiyel rolünü anlamada yardımcı olabilir. Son çalışmalar BIN1 ve tau arasındaki fiziksel etkileşimi, yabani tip fare beyinlerinde [206] tau yolu ile etkileşerek meydana gelen BIN1 artışının AH riskini arttırdığını gösterdi. Yapılacak derinlemesine çalışmalar sonucunda BIN1 ve taunun ayrıntılı mekanizmasını açıklamak mümkün olacaktır. Bizim AH için BIN1 geninin yeni tedavi yolları geliştirebileceğine dair inançlarımız var.

Sonuç olarak, AH'nın patogeneğinde BIN1'in rolünü tam olarak anlamak için yeni çalışmalarla farklı yollarada bakmak gerekir. BIN1'in beyindeki nörofibriller yumaklar ve tau ile bir ilişkisi olduğu bilinmektedir [133]. Bu nedenle BIN1'in nöron ve AH tedavisinde yeni bir tedavi yolu açması hedeflenmektedir. BIN1 potansiyel olarak Ca taşınımı sonucunda tau miktarını etkileyerek AH ların beyinlerindeki otofaji işlevini etkileyebilir buda AH tedavisi için önemli olabilecek bir özelliktir [207]. BIN1 genini Tau patolojisi üzerindeki potansiyel etkilerinin yanı sıra endositoz ve taşınımı, bağışıklık sistemi, beyinde iltihaplanma, kalsiyum mekanizması ve apoptozda bir düzenleyici olduğu da bilinmektedir. İleride yapılacak olan çalışmalar BIN1'in etkili olduğu bu yolların her biri ile ilgili ayrıntılı mekanizmaların açığa çıkması açısından önemli olacaktır. BIN1'in promotor bölgesindeki DNA metilasyonu değişikliklerinin AH'da mevcut olduğu gösterilmiştir buna ek olarak, BIN1 ekspresyonundaki epigenetik düzenlemeler AH için yeni bir tedavi şekli olabilir. A β üretimini azaltmaya yönelik tedavi yaklaşımlarına ilave olarak elde edilen yeni bulgular daha fazla molekülün ve yollarının araştırılmasına ve yeni tedavi metodlarının geliştirilmesi için yeni yöntemler geliştirilebileceğini umuyoruz.

BIN1 geni ve rs744373 polimorfizmi ile alakalı www.alzgene.org sitesinde yapılmış olan çalışmalar mevcut biz burada Türkiye'de AH ve BIN1 geni rs744373 polimorfizmi ile nede BIN1 ve APOE genlerinin birlikte yapmış oldukları etki ile alakalı yapılmış bir çalışma bulamadık [208]. Bizim elde ettiğimiz bu bulguların ileride yapılacak olan çalışmalar için faydalı olacağına inanıyoruz. Sonuçta bizim yapmış olduğumuz bu çalışma genellikle Ankara ilinde yapılmış küçük çaplı bir çalışmadır. Özellikle tüm Türkiye'yi temsil etmesi bakımından farklı ilerde kapsayan daha geniş çaplı bir çalışma ile bu bilgilerin desteklenmesi gerekmektedir. Son olarak, BIN1 ve APOE genleri ile ilgili bu yeni bulgular ve yeni tedavi yaklaşımlarının, AH için APOE ve BIN1 tabanlı bir tedavi stratejisi olması konusunda daha fazla araştırma için yeni yollar açmasını umuyoruz.

8 KAYNAKLAR

1. Öge, A. E., Zarko, B. S. ve Bilgiç B. (2004). Nöroloji. Sinir sisteminin dejeneratif hastalıkları: Demans Sendromu, Alzheimer Hastalığı ve Alzheimer dışı demanslar. *İstanbul, Nobel Tıp Kitapevleri*, 367-417.
2. Davinelli, S., Intrieri, M., Russo, C., Di Costanzo, A., ve ark. (2011). Alzheimer's disease signature": potential perspectives for novel biomarkers. *Immun Ageing*. **20**, 8
3. Jellinger, K.A. (1996). Diagnostic accuracy of Alzheimer's disease: a clinicopathological study. *Acta Neuropathol*, **91**, 219–220
4. Selekler, K., (2003). Alzheimer Hastalığı: patoloji, klinik, tanı ve ayırıcı tanı. Modern Tıp Semineri.26. Alzheimer ve diğer demanslar. Ed. Kaynak Selekler Ankara: Güneş Kitabevi.
5. Tanrıdağ, O. (1999). Alzheimer hastalığı: yüzyıllık öykü. *Nöropsikiyatri Arşivi*, **36**, 61-69.
6. O'Brien, R. J. ve Wong, P. C. (2011). Amyloid precursor protein processing and Alzheimer's disease. *Annu Rev Neurosci*. **34**, 185-204.

7. Purves, D., Augustine, G. J., Fitzpatrick, D., Lawrence, C., LaMantia, A., McNamara, J. O., Williams, S. ve Mark, S. (2001). *Neuroscience. Sinauer Associates*
8. Glenner, G. G. ve Wong, C. W. (1984). Alzheimer's disease: initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein. *Biochem Biophys Res Commun.* **120**, 885–90.
9. Kang, J., Lemaire, H. G., Unterbeck, A., Salbaum, J. M., ve ark. (1987). The precursor of Alzheimer's disease amyloid A4 protein resembles a cell-surface receptor. *Nature.* **325**, 733–36.
10. Feldman, H. H., Jacova, C., Robillard, A. ve ark. (2008). Diagnosis and treatment of dementia:2. Diagnosis. *CMAJ* **178**, 825-36.
11. Arslantas, D., Ozbabalik, D., Metintas, S. ve ark (2009). Prevalence of dementia and associated risk factors in Middle Anatolia, Turkey. *J Clin Neurosci.* **16**, 1455–1459.
12. Robert, L. (2004) Nussbaum. *Thompson & Thompson Genetics in Medicine*, (6. Ed.), *W.B. Saunders Company*.
13. Theuns, J. ve Broeckhoven, C.V. (2000). Transcriptional regulation of Alzheimer's disease genes: implication for susceptibility. *Hum. Mol. Genet.* **9**, 2383-2394
14. McKhann, G., Drachman, D., Folstein, M., Katzman, R., Price, D. ve Stadlan, E.M. (1984). Clinical diagnosis of Alzheimer's disease: report of the NINCDS-ADRDA WorkGroup under the auspices of Department of Health and Human Services TaskForce on Alzheimer's Disease. *Neurology.* **34**, 939–44.
15. Koroğlu, E. (1994) Mental Bozuklukların Tanısal ve Sayımsal El Kitabı. (4. Baskı) (DSM-IV). *Hekimler Yayın Birliği*, Ankara.
16. Ercan, A. (1999) Kaplan & Sadock Klinik Psikiyatri, El Kitabı. (2. Baskı) *Nobel Tıp Kitabevleri*, İstanbul, 31-35.

17. DeKosky, S. T. (2003) Marek Looking backward to move forward: early detection of neurodegenerative disorders. *Science*. **302**, 830.
18. Gurvit, D. H. (2002). Demans sendromu. Alzheimer Hastalığı ve Alzheimerdışı demanslar. *Noroloji Ders Kitabı. Güneş Kitabevi*. 367-415.
19. Bailey, P. (2007) Biological markers in Alzheimer's disease. *Can J Neurol Sci*. **34**, 72-76.
20. Alzheimer's disease facts and figures.(2009). *Alzheimers Dement*. 5. 234-270.
21. Brion, J. P. (1998). The role of neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease. *Acta neurol Belg*. **98**, 165-174.
22. Sadowski, M. Pankiewicz, J. Scholtzova. H, ve ark. (2004). Links between the pathology of Alzheimer's disease and vascular dementia. *Neurochem Res* **29**, 1257-1266.
23. Terry, R.D., Katzman. R , Bick. K.L., ve ark. (1999). Alzheimer Disease. Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins. (2nd ed), 11–25
24. Folstein, M.F., Folstein, S.E., McHaugh, G.R, (1975). Mini-mental state: a practical method for grading the cognitive state of patients for the clinican. *J. Psychiatr. Res*. **12**, 189-198
25. Eker, E., (2005) Alzheimer Hastalığı Ve Diğer Demanslar Türkiye Klinikleri Dahili Tıp Bilimleri DergisiPsikiyatri. 1, 3-16.
26. Teri, L., Hughes, J.P., Larson, E.B. (1990). Cognitive deterioration in Alzheimer's disease: Behavioral and health factors. *Journal of Gerontology* **45**, 58–63.
27. Feri, C.P., Prince, M., Brayne, C., ve ark. (2005). Global prevalence of dementia: a Delphi consensus study. *Lancet* **366**, 2112-2117.

28. Mott, R.T., Hulette, C.M. (2005). Neuropathology of Alzheimer's Disease. *Neuroimaging Clin N Am.* **15**, 755-7.
29. Spires-Jones, T.L., Stoothoff, W.H., Calignon, A., Jones, P.B., ve ark. (2009). Tau pathophysiology in neurodegeneration: a tangled issue. *Trends Neurosci.* **32**, 150-9.
30. Selkoe, D.J. (2001). Alzheimer's disease: genes, proteins, and therapy. *Physiol Rev.*, **81**, 741-66.
31. Marambaud, P., Robakis, N.K. (2005). Genetic and molecular aspects of Alzheimer's disease shed light on new mechanisms of transcriptional regulation. *Genes Brain Behav.*, 134-46.
32. Adalbert, R., Gilley, J., Coleman, M.P. (2007). A beta, tau and ApoE4 in Alzheimer's disease: the axonal connection. *Trends Mol Med.*, **13**,135-42.
33. Bi, X. (2010). Alzheimer disease: update on basic mechanisms. *J Am Osteopath Assoc.* 110 (9 Suppl 8):S3-9
34. Galimberti, D., Scarpini, E. (2011) Progress in Alzheimer's disease. *J Neurol.*
35. Castellani, R.J., Nunomura, A., Lee, H., Perry, G., ve ark. (2008). Phosphorylated tau: toxic, protective, or none of the above. *J. Alzheimers Dis.*, **14**, 377-383.
36. Hernandez, F., Avila, J. (2007) Tauopathies. *Cell Mol Life Sci.*, **64**, 2219-2233.
37. Hanger, D.P., Byers, H.L., Wray, S., Leung, K.Y., ve ark. (2007). Novel phosphorylation sites in tau from Alzheimer brain support a role for casein kinase 1 in disease pathogenesis. *J Biol Chem.*, **282**, 23645-23654.
38. Arriagada, P.V., Growdon, J.H., Hedley-Whyte, E.T., Hyman, B.T. (1992). Neurofibrillary tangles but not senile plaques parallel duration and severity of Alzheimer disease. *Neurology.*, **42**, 631-639.

39. Gomez-Isla, T., Hollister, R., West, H., ve ark. (1997). Neuronal loss correlates with but exceeds neurofibrillary tangles in Alzheimer disease. *Ann Neurol.*, **41**, 17-
40. Yates, D., Mcloughlin, D.M. (2007). The molecular pathology of Alzheimer's disease. *Psychiatry.*, **7**, 1-5.
41. Masters, C.L., Simms, G., Weinman, N.A. (1985). Amyloid plaque core protein in Alzheimer's disease and Down syndrome. *Proc Natl Acad Sci USA.*, **82**, 4245–4249
42. Simmons, L.K., May, P.C., Tomaselli, K.J., Rudel, R.E., Fuson, K.S., Brigham, E.F., Wright, S., Lieberburg, I., Becker, G.W., Brems, D.N. (1994). Secondary structure of amyloid beta peptide correlates with neurotoxic activity in vitro. *Mol Pharmacol.*, **45**, 373–379
43. Hardy, J.A., Higgins, G.A. (1992). Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis. *Science.*, **256**, 184-185.
44. Blennow, K., de Leon, M.J., Zetterberg, H. (2006). Alzheimer's disease. *Lancet.*, **368**, 387-403.
45. Pike, K.E., Savage, G., Villemagne, V.L., ve ark. (2007). Betaamyloid imaging and memory in nondemented individuals: evidence for preclinical Alzheimer disease. *Brain.* **130**, 2837-2844
46. Aizenstein, H.J., Nebes, R.D., Saxton, J.A., ve ark. (2008). Frequent amyloid deposition without significant cognitive impairment among the elderly. *Arch Neurol.*, **65**, 1509-1517.
47. Tomic, J.L., Pensalfini, A., Head, E., Glabe, C.G. (2009). Soluble fibrillar oligomer levels are elevated in Alzheimer disease brain and correlate with cognitive dysfunction. *Neurobiol Dis.*, **35**, 352- 358.
48. Bertram, L. and Tanzi, R.E., (2004), The current status of Alzheimer's disease genetics: what do we tell the patients? *Pharmacol Res.*, **50**, 385-396.

49. Lobo, A., Launer, L.J., Fratiglioni, L., Andersen, K., Di Carlo, A., Breteler, M.M., Copeland, J.R., Dartigues, J.F., Jagger, C., Martinez-Lage, J., Soininen, H., Hofman, A., (2000), Prevalence of dementia and major subtypes in Europe: A collaborative study of population-based cohorts, Neurologic Diseases in the Elderly Research Group, *Neurology*, **54**, 4-9.
50. Lapane, K.L., Gambassi, G., Landi, F., Sgadari, A., Mor, V., Bernabei, R., (2001), Gender differences in predictors of mortality in nursing home residents with AD, *Neurology*, **56**, 650-654p.
51. Gao, S., Hugh, C., Hendrie, M.B., Hall, K.S., Hui, S., (1998), The Relationships Between Age, Sex, and the Incidence of Dementia and Alzheimer Disease, *Arch Gen Psychiatry*, **55**, 809-815.
52. Ganguli, M., Dodge, H.H., Chen, P., Belle, S., DeKosky, S.T., (2000), Ten-year incidence of dementia in a rural elderly US community population: the MoVIES Project, *Neurology*, **54**, 1109-1116.
53. George-Hyslop, P.H., Tanzi, R.E., Polinsky, R.J., Haines, J.L., Nee, L., (1987), The Genetic defect causing familial Alzheimer disease maps on chromosome 21, *Science*, **235**, 885-890.
54. Kivipelto, M., Helkala, E.L., Laakso, M.P., (2001), Midlife vascular risk factors and Alzheimer's disease in later life: longitudinal, population based study, *BMJ*, **322**, 1447-1451.
55. Raiha, I., Kaprio, J., Koskenvuo, M., et al., (1996), Alzheimer's-disease in Finnish twins, *Lancet* **347**, 573-578.
56. <http://www.molgen.ua.ac.be/ADmutations>
57. Tanzi, R.E., (1999), A genetic dichotomy model for the inheritance of Alzheimer's disease and common age-related disorders, *J Clin Invest*, **104**, 1175-1179.

58. Selkoe, D.J. (1996). Amyloid β protein and the genetics of Alzheimer's disease. *J. Biol. Chem.*, **271**, 18295-18300.
59. Li, L., Chin, L.S. (2003). The molecular machinery of synaptic vesicle exocytosis. *Cell Mol Life Sci.*, **60**, 942-79
60. Naj, A.C., Jun, G., Beecham, G.W., Wang, L.S., ve ark. (2011). Common variants at MS4A4/MS4A6E,CD2AP, CD33 and EPHA1 are associated with late-onset Alzheimer's disease. *Nat Genet.*, **43**, 436-41.
61. Bertram, L. and Tanzi, R.E., (2004). The current status of Alzheimer's disease genetics: what do we tell the patients? *Pharmacol Res*, **50**, 385-396.
62. Mahley, R.W., (1988). Apolipoprotein E: Cholesterol transport protein with expanding role in cell biology, *Science*, **240**, 622-630.
63. Weisgraber, K.H., ve Mahley, R.W., (1996). Human apolipoprotein E: the Alzheimer's disease connection, *FASEB J.*, **10**, 1485-1494.
64. Rall, S. C Jr., Weisgraber K. H. ve Mahley RW (1982) Human apolipoprotein E. The complete amino acid sequence. *Journal of Biological Chemistry* **257**, 4171-4178
65. Mahley, R. W., Weisgraber, K. H., Innerarity, T. L. ve Rall, S. C. (1991). Genetic defects in lipoprotein metabolism. Elevation of atherogenic lipoproteins caused by impaired catabolism. *JAMA*. **265**, 78-83.
66. Mahley RW, Paloğlu KA, Atak Z, Dawson-Pepin J, Langlois AM (1995). Turkish heart study. Lipids lipoproteins and apolipoproteins. *J Lipid Res*. **36**, 839-59
67. Zannis, V.I., Breslow, J.L., Utermann, G., Mahley, R.W., Weisgraber, K.H., Havel, R.J., Goldstein, J.L., Brown, M.S., Schonfeld, G., Hazzard, W.R., Blum, C., (1982). Proposed nomenclature of apoE isoproteins, apoE genotypes, and phenotypes, *J Lipid Res*. **23**, 911-4.

68. Zannis, V.I. and Breslow, J.L., (1981), Human Very Low Density Lipoprotein Apolipoprotein E Isoprotein Polymorphism Is Explained by Genetic Variation and Posttranslational Modification, *Biochemistry*, **20**, 1033-1041.
69. Utermann, G., Steinmetz, A., and Weber, W., (1982). Genetic control of human apolipoprotein E polymorphism: comparison of one- and two-dimensional techniques of isoprotein analysis, *Hum. Genet.*, **60**, 344-351
70. Wardell, M. R., Suckling, P. A., and Janus, E. D., (1982). Genetic variation in human apolipoprotein E, *J. Lipid Res.* **23**,1174-1182.
71. Menzel, H. J., Kladetzky, R. G., and Assmann, G., (1983). Apolipoprotein E polymorphism and coronary artery disease, *Arteriosclerosis*, **3**, 310-315.
72. Scott, J., Knott, T. J., Shaw, D. J. ve ark. (1985). Localization of genes encoding apolipoprotein CI,CII, and E to the p13---cen region of human chromosome 19. *Hum Genet*;**71**, 144–6.
73. Stanley C. Rall, Jr., Karl H. Weisgraber, and Robert W. Mahley (1982). Human apolipoprotein E. The complete amino acid sequence. *J Biol Chem.* Apr **257**, 4171-8.
74. Mahley, R.W. (1993). Aterogenezin hücresel ve moleküler biyolojisi: Kolesterol taşınması ve lipoprotein metabolizması., İstanbul.
75. Innerarity, T. L., Friedlander, E. J., Rall, S. C. Jr., Weisgraber , K. H. ve Mahley, R. W. (1983) The receptor-binding domain of human apolipoprotein E. Binding of apolipoprotein E fragments. *Journal of Biological Chemistry* **258**, 12341–12347.

76. Wetterau, J. R., Aggerbeck, L. P., Rall, S. C. Jr. ve Weisgraber K. H. (1988) Human apolipoprotein E3 in aqueous solution. I. Evidence for two structural domains. *Journal of Biological Chemistry* **263**, 6240–6248
77. Dong, L.-M. ve ark. (1994) Human apolipoprotein E. Role of arginine 61 in mediating the lipoprotein preferences of the E3 and E4 isoforms. *J. Biol. Chem.* **269**, 22358–22365
78. Danny, M. H., Clare A., Peters-Libeu ve Karl, H. (2006) Weisgraber Apolipoprotein E structure: insights into function *TRENDS in Biochemical Sciences* **31**, 445-54.
79. Weisgraber, K. H., Innerarity, T. L., Mahley, R. W., (1982), Abnormal lipoprotein receptor-binding activity of the human E apoprotein due to cysteine-arginine interchange at a single site, *J. Biol. Chem.* **257**, 2518-2521.
80. Rall, S. C., Jr., Weisgraber, K. H., Innerarity, T. L., Mahley, R. W., (1982). Structural basis for receptor binding heterogeneity of apolipoprotein E from type III hyperlipoproteinemic subjects. *Proc, Natl. Acad. Sci. USA* **79**,4696-4700.
81. Poirier, J., Davignon, J., Bouthillier, D., Kogan, S., Bertrand, P., Gauthier, S., (1993), Apolipoprotein E polymorphism and Alzheimer's disease, *Lance* **342**, 697-699.
82. Wilson, C., Wardell, M.R., Weisgraber, K.H., Mahley, R.W., Agard, D.A., (1991). Three-dimensional structure of the LDL receptor-binding domain of human apolipoprotein E, *Science* **252**, 1817–1822.
83. Segrest, J.P., Jones, M.K., De Loof, H., Brouillette, C.G., Venkatachalapathi, Y.V., Anantharamaiah, G.M., (1992). The amphipathic helix in the exchangeable apolipoproteins: a review of secondary structure and function, *J. Lipid Res.* **33**, 141–166.

84. Wetterau, J.R., Aggerbeck, L.P., Rall, S.C. Jr, Weisgraber, K.H., (1988), Human apolipoprotein E3 in aqueous solution. I. Evidence for two structural domains, *J. Biol. Chem.* **263**, 6240–6248.
85. Morrow, J.A., Segall, M.L., Lund-Katz, S., Phillips, M.C., Knapp, M., Rupp, B., Weisgraber, K.H., (2000), Differences in stability among the human apolipoprotein E isoforms determined by the amino-terminal domain, *Biochemistry*, **39**, 11657–11666.
86. Weisgraber, K.H., (1994), Apolipoprotein E: Structure–function relationships, *Adv. Protein Chem.* **45**, 249–302.
87. Dong, L. M., Wilson, C., Wardell, M.R., Simmons, T., Mahley, R.W., Weisgraber, K.H., Agard, D.A., (1994). Human apolipoprotein E. Role of arginine 61 in mediating the lipoprotein preferences of the E3 and E4 isoforms, *J. Biol. Chem.* **269**, 22358.
88. Wetterau, J. R., Aggerbeck, L. P., Rall, S. C. Jr. ve Weisgraber K. H. (1988) Human apolipoprotein E3 in aqueous solution. I. Evidence for two structural domains. *Journal of Biological Chemistry* **263**, 6240–6248.
89. Mahley, R.W., Nathan, B.P., Pitas, R.E., (1996). Apolipoprotein E. Structure, function, and possible roles in Alzheimer's disease, *Acad Sci*, **777**, 139-145.
90. Rall, S.C., Weisgraber, K.H., Mahley, R.W., (1986). Isolation and characterization of apolipoprotein E. *Methods Enzymol.*, **128**, 273-287.
91. Rapp, A., Gmeiner, B., Huttinger, M., (2006). Implication of apoE isoforms in cholesterol metabolism by primary rat hippocampal neurons and astrocytes, *Biochimie*, **88**, 473-483.
92. Pitas, R., Boyles, J., Lee, S., Foss, D., ve Mahley, R., (1987). Astrocytes synthesize apolipoprotein E and metabolize apolipoprotein E-containing lipoproteins, *Biochim. Biophys. Acta.* **917**, 148–161.

93. Rebeck, G., Reiter, J., Strickland, D., and Hyman, B., (1993). Apolipoprotein E in sporadic Alzheimer's disease: allelic variation and receptor interactions, *Neuron*, **11**, 575–580.
94. Mahley, R.W., (1988). Apolipoprotein E: Cholesterol transport protein with expanding role in cell biology, *Science*, **240**, 622-630.
95. Paik, Y. K., Chang, D. J., Reardon, C. A., Davies, G. E., Mahley, R.W., Taylor, J. M., (1985). Nucleotide sequence and structure of the human apolipoprotein E gene. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **82**, 3445–9.
96. Hixson, J.E., Vernier, D.T., (1990). Restriction isotyping of human apolipoprotein E by gene amplification and cleavage with HhaI. *J Lipid Res*. **31**, 545–8.
97. Das, H.K., McPherson, J., Bruns, G.A., Karathanasis, S.K., Breslow, J.L., (1985). Isolation, characterization, and mapping to chromosome 19 of the human apolipoprotein E gene. *J Biol Chem*. **260**, 6240.
98. Mahley, R.W., Weisgraber, K.H., Huang, Y., (2006). Apolipoprotein E4: a causative factor and therapeutic target in neuropathology, including Alzheimer's disease, *Proc Natl Acad Sci U S A*, **103**, 5644-51.
99. Morishima-Kawashima, M. and Ihara, Y., (2002). Alzheimer's Disease: Amyloid Protein and Tau, *Journal of Neuroscience Research*, **70**, 392–401.
100. Brecht, W.J. ve ark. (2004) Neuron-specific apolipoprotein E4 proteolysis is associated with increased tau phosphorylation in brains of transgenic mice. *J. Neurosci*. **24**, 2527–2534
101. Cedazo-Mínguez, A. (2007). Apolipoprotein E and Alzheimer's disease: Molecular mechanisms and therapeutic opportunities, *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, **11**, 1227-1238.

102. Boschert, U., Merlo-Pich, E., Higgins, G., Roses, A.D., Catsicas, S., (1999). Apolipoprotein E expression by neurons surviving excitotoxic stress, *Neurobiol Dis.* **6**, 508–514.
103. Harold, D. et al. (2009) Genome-wide association study identifies variants at CLU and PICALM associated with Alzheimer's disease. *Nat. Genet.* **41**, 1088–1093.
104. Lambert, J.C. et al. (2009) Genome-wide association study identifies variants at CLU and CR1 associated with Alzheimer's disease. *Nat. Genet.* **41**, 1094–1099.
105. Seshadri, S. et al. (2010) Genome-wide analysis of genetic loci associated with Alzheimer disease. *JAMA* **303**, 1832–1840.
106. Naj, A.C. et al. (2011) Common variants at MS4A4/MS4A6E, CD2AP, CD33 and EPHA1 are associated with late-onset Alzheimer's disease. *Nat. Genet.* **43**, 436–441.
107. Hollingworth, P. et al. (2011) Common variants at ABCA7, MS4A6A/MS4A4E, EPHA1, CD33 and CD2AP are associated with Alzheimer's disease. *Nat. Genet.* **43**, 429–435.
108. Morgan, K. (2011) The three new pathways leading to Alzheimer's disease. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* **37**, 353–357.
109. Carter, C. (2011) Alzheimer's disease: APP, gamma secretase, APOE, CLU, CR1, PICALM, ABCA7, BIN1, CD2AP, CD33, EPHA1, and MS4A2, and their relationships with herpes simplex, C.pneumoniae, other suspect pathogens, and the immune system. *Int. J. Alzheimers Dis.*, 501862.
110. Schellenberg, G.D. and Montine, T.J. (2012) The genetics and neuropathology of Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol.* **124**, 305–323.
111. Bertram, L. et al. (2007) Systematic meta-analyses of Alzheimer disease genetic association studies: the AlzGene database. *Nat. Genet.* **39**, 17–23.

112. Chapuis, J. et al. (2013) Increased expression of BIN1 mediates Alzheimer genetic risk by modulating tau pathology. *Mol. Psychiatry* <http://dx.doi.org/10.1038/mp.2013.1>.
113. Ren, G. et al. (2006) The BAR domain proteins: molding membranes in fission, fusion, and phagy. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **70**, 37–120.
114. Wechsler-Reya, R. et al. (1997) Structural analysis of the human BIN1 gene. Evidence for tissue-specific transcriptional regulation and alternate RNA splicing. *J. Biol. Chem.* **272**, 31453–31458.
115. Sakamuro, D. et al. (1996) BIN1 is a novel MYC-interacting protein with features of a tumour suppressor. *Nat. Genet.* **14**, 69–77.
116. Pant, S. et al. (2009) AMPH-1/Amphiphysin/Bin1 functions with RME-1/Ehd1 in endocytic recycling. *Nat. Cell Biol.* **11**, 1399–1410.
117. Meunier, B. et al. (2009) The membrane-tubulating potential of amphiphysin 2/BIN1 is dependent on the microtubule-binding cytoplasmic linker protein 170 (CLIP170). *Eur. J. Cell Biol.* **88**, 91–102.
118. Galderisi, U. et al. (1999) Induction of apoptosis and differentiation in neuroblastoma and astrocytoma cells by the overexpression of Bin1, a novel Myc interacting protein. *J. Cell. Biochem.* **74**, 313–322.
119. Elliott, K. et al. (2000) The c-Myc-interacting adaptor protein Bin1 activates a caspase-independent cell death program. *Oncogene.* **19**, 4669–4684.
120. Wajapeyee, N. et al. (2008) Oncogenic BRAF induces senescence and apoptosis through pathways mediated by the secreted protein IGFBP7. *Cell* **132**, 363–374.
121. Lambert, J.C. et al. (2011) Evidence of the association of BIN1 and PICALM with the AD risk in contrasting European populations. *Neurobiol. Aging* **32**, 756–756.

122. Lee, J.H. et al. (2011) Identification of novel loci for Alzheimer disease and replication of CLU, PICALM, and BIN1 in Caribbean Hispanic individuals. *Arch. Neurol.* **68**, 320–328.
123. Carrasquillo, M.M. et al. (2011) Replication of BIN1 association with Alzheimer's disease and evaluation of genetic interactions. *J. Alzheimers Dis.* **24**, 751–758.
124. Kamboh, M.I. et al. (2012) Genome-wide association study of Alzheimer's disease. *Transl. Psychiatry* **2**, 117.
125. Hu, X. et al. (2011) Meta-analysis for genome-wide association study identifies multiple variants at the BIN1 locus associated with lateonset Alzheimer's disease. *PLOS ONE.* **6**, 16616.
126. Wijsman, E.M. et al. (2011) Genome-wide association of familial lateonset Alzheimer's disease replicates BIN1 and CLU and nominates CUGBP2 in interaction with APOE. *PLOS Genet.* **7**, 1001308.
127. Logue, M.W. et al. (2011) A comprehensive genetic association study of Alzheimer disease in African Americans. *Arch. Neurol.* **68**, 1569–1579.
128. Tan, L. et al. (2012) Association of GWAS-linked loci with late-onset Alzheimer's disease in a northern Han Chinese population. *Alzheimers Dement.* <http://dx.doi.org/10.1016/j.jalz.2012.08.007>.
129. Chung, S.J. et al. (2013) Association of GWAS top hits with late-onset Alzheimer disease in Korean population. *Alzheimer Dis. Assoc. Disord.* <http://dx.doi.org/10.1097/WAD.0b013e31826d7281>.
130. Schmidt, C. et al. (2012) Alzheimer's disease: genetic polymorphisms and rate of decline. *Dement. Geriatr. Cogn. Disord.* **33**, 84–89.
131. Mastroeni, D. et al. (2011) Epigenetic mechanisms in Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging* **32**, 1161–1180.

132. Braak, H. and Del Tredici, K. (2011) The pathological process underlying Alzheimer's disease in individuals under thirty. *Acta Neuropathol.* **121**, 171–181.
133. Nakamura, K. et al. (2012) Proline isomer-specific antibodies reveal the early pathogenic tau conformation in Alzheimer's disease. *Cell* **149**, 232–244.
134. Himmelstein, D.S. et al. (2012) Tau as a therapeutic target in neurodegenerative disease. *Pharmacol. Ther.* **136**, 8–22.
135. Taylor, M.J. et al. (2011) A high precision survey of the molecular dynamics of mammalian clathrin-mediated endocytosis. *PLoS Biol.* **9**, 1000604.
136. Wigge, P. and McMahon, H.T. (1998) The amphiphysin family of proteins and their role in endocytosis at the synapse. *Trends Neurosci.* **21**, 339–344.
137. DiPaolo, G. et al. (2002) Decreased synaptic vesicle recycling efficiency and cognitive deficits in amphiphysin 1 knockout mice. *Neuron* **33**, 789–804.
138. Leprince, C. et al. (2003) Sorting nexin 4 and amphiphysin 2, a new partnership between endocytosis and intracellular trafficking. *J. Cell Sci.* **116**, 1937–1948.
139. Chang, M.Y. et al. (2007) Bin1 ablation increases susceptibility to cancer during aging, particularly lung cancer. *Cancer Res.* **67**, 7605–7612.
140. Parasuraman R, Greenwood Pm, Sunderland T. (2002). The Apolipoprotein E Gene, Attention, and Brain Function. *Neuropsychology*, **16**, 254-274.
141. Lahiri Dk, Sambamurti K, Bennett Da. (2004). Apolipoprotein gene and its interaction with the environmentally driven risk factors: molecular, genetic and epidemiological studies of Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*, **25**, 651-660.
142. de-Andrade, F.M., Larrandaburu, M., Callegari-Jacques, S.M., Gastaldo, G., Hutz, M.H., (2000). Association of apolipoprotein E polymorphism with plasma lipids and Alzheimer's disease in a Southern Brazilian population, *Braz J Med Biol Res*, **33**, 529-537.

143. Isbir, T., Agaçhan, B., Yilmaz, H., Aydin, M., Kara, I., Eker, D., Eker, E., (2001). Interaction between apolipoprotein-E and angiotensin-converting enzyme genotype in Alzheimer's disease, *Am J Alzheimers Dis Other Demen.*, **16**, 205-210.
144. Yokes ve ark., (2005). Apolipoprotein E Genotyping in Turkish Alzheimer Patients. *Balkan Journal of Medical Genetics*, **8**, 57-63
145. Souza, D.R., de Godoy, M.R., Hotta, J., Tajara, E.H., Brandão, A.C., Pinheiro Júnior, S., Tognola W.A., dos Santos, J.E., (2003). Association of apolipoprotein E polymorphism in late-onset Alzheimer's disease and vascular dementia in Brazilians, *Braz J Med Biol Res.* **36**, 919-923.
146. Lavados, M., Fariás, G., Rothhammer, F., Guillon, M., Mujica, M.C., Maccioni, C., Maccioni, R.B., (2005). ApoE alleles and tau markers in patients with different levels of cognitive impairment, *Arch Med Res*, **36**, 474-479.
147. Tang, M.N., Zhang, Z.X., Han, H.Y., Liu, X.H., Shen, Y., (2004). Analysis on association between the polymorphisms in apolipoprotein E, interleukin-1 alpha genes and Alzheimer's disease in Chengdu area, **21**, 176-178.
148. Clarimón, J., Bertranpetit, J., Calafell, F., Boada, M., Tàrraga, L., Comas, D., (2003). Joint analysis of candidate genes related to Alzheimer's disease in a Spanish population, *Psychiatr Genet.* **13**, 85-90.
149. Aybek, H., Ercan, F., Aslan, D., Sahiner, T., (2007). Determination of malondialdehyde, reduced glutathione levels and APOE4 allele frequency in late-onset Alzheimer's disease in Denizli, Turkey, *Clin Biochem.*, **40**, 172-176.
150. Rassas, A. A., Mrabet, K. H., Hadj, F. S., Sahnoun, S., Batti H., Oudiaa, Z. N., Cherif, A., Anane N., Ben A. N., Messaoud T., Mrabet A., (2011). High APOE epsilon 4 allele frequencies associated with Alzheimer disease in a Tunisian population *Springer-Verlag*.

151. Malle E, Pfeiffer KP, Dugi K, Pfeiffer C, Glaum M, Oezcuemez M et al (1996) Polymorphisms of apolipoprotein A-IV and E in a Turkish population living in Germany. *Hum Genet* **98**, 285–290
152. Chartier-Harlin MC, Parfitt M, Legrain S, Pe´rez-Tur J, Brousseau T, Evans A et al (1994) Apolipoprotein E, epsilon 4 allele as a major risk factor for sporadic early and late-onset forms of Alzheimer’s disease: analysis of the 19q13.2 chromosomal region. *Hum Mol Genet* **4**, 569–574.
153. Betard C, Robitaille Y, Gee M, Tiberghien D, Larrive´e D, Roy P et al (1994) Apo E allele frequencies in Alzheimer’s disease, Lewy body dementia, Alzheimer’s disease with cerebrovascular disease and vascular dementia. *Neuroreport* **15**, 1893–1896.
154. Raygani A, RahimiZ KharaziH, Tavilani H, Pourmotabbed T (2006) Association between apolipoprotein E polymorphism and serum lipid and apolipoprotein levels with Alzheimer’s disease. *Neurosci Lett* **408**, 68–72.
155. Cariobu MA, Kokkofitou A, Manoli P, Christou S, Karagrigoriou A, Middleton L (1995) Under expression of the apolipoprotein E2 and E4 alleles in the Greek Cypriot population of Cyprus. *Genet Epidemiol* **12**, 489–497.
156. Norihiro T, Akinori M, Tamao T, Hiroyuki A, Takashi A, The Japanese Genetic Study Consortium for Alzheimer disease et al (2009) Genetic association study on and around the APOE in late-onset Alzheimer disease in Japanese. *Genomics* **93**, 441–448.
157. Valveny N, Esteban E, Kandi M, Moral P (1997) APOE Polymorphism in Spanish and Moroccan populations. *Clin Genet* **51**, 354–356.
158. Bosco P, Gueant-Rodríguez R, Anello G, Spada R, Romano A, Caraci F et al (2005) Allele e4 of APOE is a stronger predictor of Alzheimer risk in Sicily than in continental South Italy. *Neurosci Lett* **388**, 168–172.

159. Piscopo P, Manfredi A, Malvezzi-Campeggi L, Crestini A, Spadoni O, Cherchi R et al (2006) Genetic study of Sardinian patients with Alzheimer's disease. *Neurosci Lett.* **398**, 124–128.
160. Poli M, Benerini Gatta L, Lovati C, Mariani C, Galimberti D, Scarpini E et al (2008) Interaction between the APOE 4 allele and the APH-1b c?651T[G SNP in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* **29**, 1494–1501.
161. Gureje O, Ogunniyi A, Baiyewu O, Price B, Unverzagt FW et al (2006) APOE epsilon4 is not associated with Alzheimer's disease in elderly Nigerians. *Ann Neurol* **59**, 182–185.
162. Heckmann JM, Low WC, De Villiers C, Rutherford S, Vorster A, Rao H et al (2004) Novel presenilin 1 mutation with profound neurofibrillary pathology in an indigenous Southern African family with early-onset Alzheimer's disease. *Brain* **127**, 133–142.
163. Osuntokun BO, Sahota A, Ogunniyi AO, Gureje O, Baiyewu O, Adeyinka A et al (1995) Lack of an association between apolipoprotein E epsilon 4 and Alzheimer's disease in elderly Nigerians. *Ann Neurol* **38**, 463–465.
164. Farrer LA, Friedland RP, Bowirrat A, Waraska K, Korczyn A, Baldwin C (2003) Genetic and environmental epidemiology of Alzheimer's disease in Arabs residing in Israel. *J Mol Neurosci* **20**, 207–212
165. Maestre G, Ottman R, Stern Y, Mayeux R (1995) Apolipoprotein E and Alzheimer's disease: ethnic variation in genotype risks. *Ann Neurol* **37**, 254–259.
166. Hendrie HC, Hall KS, Hui S (1995) Apolipoprotein E genotypes and Alzheimer's disease in a community study of elderly African Americans. *Ann Neurol* **37**, 118–121.
167. Seripa D, Panza F, Franceschi M, D' Onofrio G, Solfrizzi V, Dallapiccola B, Pilotto A (2009) Non-apolipoprotein E and apolipoprotein E genetics of sporadic Alzheimer's disease. *Ageing Res Rev* **8**, 214–236.

168. Lambert JC, Pasquier F, Cotel D, Frigard B, Amouyel P, Chartier-Harlin MC (1998) A new polymorphism in the ApoE promoter associated with risk of developing Alzheimer disease. *Hum Med Genet* **3**, 533–540.
169. Kim KW, Jhoo JH, Lee KU, Lee DY, Lee JH, Youn JY, Lee BJ, Han SJ, Woo JI (1999) Association between apolipoprotein E polymorphism and Alzheimer's disease in Koreans. *Neurosci Lett* **277**, 145–148.
170. Mak YT, Chiu H, Woo J, Kay R, Chan YS, Hui E, Sze KH, Lun C, Kwok T, Pang CP (1996) Apolipoprotein E genotype and Alzheimer's disease in Hong Kong elderly Chinese. *Neurology* **46**, 146–149.
171. Hollingworth, P., Dowzell, K., Williams, A., Keates, S., Abraham, R., Morgan, A., Foy, C., Archer, N., Powell, J., Lovestone, S., 2008, The ApoE E4 allele does not affect rate of cognitive and functional decline in late onset Alzheimer's disease (AD): Findings from the UK Medical Research Council (MRC) genetic resource for AD *The Journal of the Alzheimer Association*, **4**, 521.
172. Licastro, F., Porcellini, E., Caruso, C., Lio, D., Corder, E.H., (2006). Genetic risk profiles for Alzheimer's disease: integration of ApoE genotype and variants that up-regulate inflammation, *Neurobiol Aging*. **28**, 1637-1643.
173. Sando, S.B., Melquist, S., Cannon, A., Hutton, M.L., Sletvold, O., Saltvedt, I., White, L.R., Lydersen, S., Aasly, J.O., (2008). APOE epsilon4 lowers age at onset and is a high risk factor for Alzheimer's disease; a case control study from central Norway, *BMC Neurol.*, **16**, 9.
174. Vander, F., W.M., Pijnenburg, Y.A.L., Schoonenboom, S.N.M., Dik, M.G., Blankenstein, M.A., Scheltens, P., 2008, Distribution of ApoE genotypes in a memory clinic cohort, *Dement Geriatr Cogn Disord*, **25**, 433-438.
175. Hayes, A., Green, E.K., Pritchard, A., Harris, J.M., Zhang, Y., Lambert, J.C., Chartier-Harlin, M.C., Pickering-Brown, S.M., Lendon, C.L., Mann, D.M.A., 2004, A polymorphic variation in the interleukin 1A gene increases brain microglial cell activity in Alzheimer's disease, *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, **75**, 1475-1477 .

176. Huang, Y., 2006, Molecular and cellular mechanisms of apolipoprotein E4 neurotoxicity and potential therapeutic strategies, *Curr Opin Drug Discov Devel*, **9**, 627-641.
177. Huang, W., Qiu, C., von Strauss, E., Winblad, B., Fratiglioni, L., (2004). ApoE Genotype, Family History of Dementia and Alzheimer Disease Risk, *Arch Neurol*, **61**, 1930-1934.
178. Thomas P, Fenech M (2007) A review of genome mutation and Alzheimer's disease. *Mutagenesis* **22**, 15–33.
179. Lopez OL, Pouse S, Kamboh M, Androer R, Gallego ML, Becker JT et al (1998) Apolipoprotein E polymorphism in Alzheimer's disease: a comparative study of two search populations from Spain and the USA. *Eur Neurol* **39**, 229–233.
180. Payami H, Zhu M, Montimurro J, Keefe R, McCulloch Cc, Moses L. (2005). One step closer to fixing association studies: evidence for age- and genderspecific allele frequency variations and deviations from Hardy-Weinberg expectations in controls. *Human Genetics*, **118**, 322-330.
181. Hajjem S, Achour N (2001) Espe'rance de vie sans incapacite' de la population tunisienne age. *Institut National de la Sante' Publique, Tunis*, 17–25
182. Hajem S, Mrabet A (2008) Epide'miologie des de'mences en Tunisie. *La Tunisie Medicale* **86**, 744–745.
183. Bellaj T, Ben Jemaa S, Attia Romdhane N, Dhiffallah M, Bouaziz M, Mrabet A (2008) Mini mental state examination Arabic version (A-MMSE): reliability, validity and normative data. *La Tunisie Medicale* **86**, 768–776.
184. Ben Jemaa S, Bellaj T, Attia Romdhane N, Oudiala Zakraoui N, Cherif A et al (2008) Arabic version of the Alzheimer's disease assessment scale cognitive subscale (A-ADAS COG). *La Tunisie Medicale* **86**, 777–785.

185. Ben Jemaa S, Bellaj T, Attia Romdhane N, Cherif A, Oudjaa Zakraoui N, Bouaziz M et al (2008) Frontal assessment battery: reliability, validity and standardization of an Arabic form. *La Tunisie Medicale* **86**, 793–800.
186. Bellaj T, Ben Jemaa S, Anane N, Attia Romdhane N, Ben Youssef K, Kahouaji H et al (2008) Geriatric depression scale Arabic version: reliability, validity and normative data. *La Tunisie Medicale* **86**, 801–808.
187. Ben Hamouda I, Attia Romdhane N, Ben Youssef K, Mhenni C, Mrabet A (2008) Interrater reliability of the clinical dementia rating scale in Tunisia. *La Tunisie Medicale* **86**, 764–767.
188. Attia Romdhane N, Ben Hamouda I, Ben Youssef K, Mhenni C, Ouenniche S, Mrabet A (2008) Reliability and validity of instrumental activities in daily living scale in Tunisia. *La Tunisie Medicale* **86**, 764–767.
189. Chien-Hsiun C, Toshiki M, Elston R, Kariuki M, Hall K, Unverzagt F et al (2010) A comparative study to screen dementia and APOE genotypes in an ageing East African population. *Neurobiol Aging* **31**, 732–740.
190. Richard F, Amouyel P (2001) Genetic susceptibility factors for Alzheimer's disease. *Eur J Pharmacol* **412**, 1–12.
191. Argyriadou S, Melissopoulou H, Krania E, Karagiannidou A, Vlachonicolis I, Lionis C. (2001). Dementia and depression: two frequent disorders of the aged in primary health care in Greece. *Fam Pract.* **18**, 87-91.
192. Richards SS, Hendrie HC. (1999). Diagnosis, management and treatment of Alzheimer disease: a guide for the internist. *Arch Intern Med.* **159**, 789- 798.
193. Di Carlo A, Baldereschi M, Amaducci L, Maggi S, Grigoletto F, Scarlato G. et al. (2000). Cognitive impairment without dementia in older people: prevalence, vascular risk factors, impact on disability. The Italian longitudinal study on aging. *J Am. Geriatr Soc.* **48**, 775-782.

194. Geerlings MI, Jonker C, Bouter LM, Ader HJ, Schmand B. (1999) Association between memory complaints and incident Alzheimer's disease in elderly people with normal baseline cognition. *Am J Psychiatry*. **156**, 531-537.
195. den Heijer T, Geerlings MI, Hoebek FE, Hofman A, Koudstaal PJ, Breteler MM. (2006). Use of hippocampal and amygdalar volumes on magnetic resonance imaging to predict dementia in cognitively intact elderly people. *Arch Gen psychiatry* **63**, 57-6240.
196. Colucci M, Cammarata S, Assini A, Croce R, Clerici F, Novello C, et al. (2006). The number of pregnancies is a risk factor for Alzheimer's disease. *Eur J Neurol*. **13**, 1374-1377.
197. McDowell I, Xi G, Lindsay J, Tierney M. (2007). Mapping the connections between education and dementia. *J Clin Exp Neuropsychol*. **29**, 127-141.
198. Carrillo MariaC, Blackwell Andrew, Hampel Harald, Lindborg Johan, Sperling Reisa, Schenk Dale et al (2009) Early risk assessment for Alzheimer's disease. Alzheimer's Dementia. *Neurol Sci* **33**, 33-37.
199. Yang, S. et al. (2008) Comparative proteomic analysis of brains of naturally aging mice. *Neuroscience* **154**, 1107-1120.
200. Karch, C.M. et al. (2012) Expression of novel Alzheimer's disease risk genes in control and Alzheimer's disease brains. *PLOS ONE*. **7**, 50976.
201. Liua G. ve ark. (2013). BIN1 gene rs744373 polymorphism contributes to Alzheimer's disease in EastAsian population, *Neurosci Lett*. Jun **7**, 47-51. doi: 10.1016/j.neulet.2013.02.075.
202. T. Ohara, T. Ninomiya, Y. Hirakawa, K. Ashikawa, A. Monji, Y. Kiyohara, S. Kanba, M. Kubo, (2012). Association study of susceptibility genes for late-onset Alzheimer's disease in the Japanese population, *Psychiatr. Genet*. **22**, 290-293.

203. L. Tan, J.T. Yu, W. Zhang, Z.C. Wu, Q. Zhang, Q.Y. Liu, W. Wang, H.F. Wang, X.Y. Ma, W.Z. Cui, (2012). Association of GWAS-linked loci with late-onset Alzheimer's disease in a northern Han Chinese population, *Alzheimers Dement.*
204. Barral, S. et al. (2012) Genotype patterns at PICALM, CR1, BIN1, CLU, and APOE gene are associated with episodic memory. *Neurology* **78**, 1464–1471.
205. Jones, L. et al. (2010) Genetic evidence for the involvement of lipid metabolism in Alzheimer's disease. *Biochim. Biophys. Acta.* **1801**, 754–761.
206. Kingwell, K. (2013) Alzheimer disease: BIN1 variant increases risk of Alzheimer disease through tau. *Nat. Rev. Neurol.* **9**, 184.
207. Anekonda, T.S. and Quinn, J.F. (2011) Calcium channel blocking as a therapeutic strategy for Alzheimer's disease: the case for isradipine. *Biochim. Biophys. Acta* **1812**, 1584–1590.
208. L. Bertram, M.B. McQueen, K. Mullin, D. Blacker, R.E. Tanzi, (2007). Systematic meta-analyses of Alzheimer disease genetic association studies: the AlzGen database, *Nat. Genet.* **39**, 17–23.