

T.C.

HALIÇ ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK BÖLÜMÜ

**PRESENİLİN 1 cDNA 'SININ KLONLANMASI VE AİLESEL ALZHEIMER
HASTALIĞI PATOGENEZİNDE ETKİN MUTASYONLARI TAŞIYAN
VEKTÖRLERİN OLUŞTURULMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Hazırlayan

DENİZ ŞUMNULU

Tez Danışmanı

Yrd. Doç. Dr. BAKİ YOKEŞ

Şubat 2010

İSTANBUL

T.C.
HALIÇ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜNE

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı Moleküler Biyoloji ve Genetik Programı Yüksek Lisans öğrencisi **Deniz ŞUMNULU** tarafından hazırlanan **“Presenilin 1 CDNA’sının Klonlanması ve ailesel Alzheimer Hastalığı Patogenezinde Etkin Mutasyonları Taşıyan Vektörlerin Oluşturulması”** adlı bu çalışma jürimizce Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Sınav Tarihi : 23.02.2010

(Jüri Üyesinin Ünvanı , Adı , Soyadı ve Kurumu) :

İmzası :

Jüri Üyesi: Yrd.Doç.Dr.Baki YOKEŞ
Danışman-HAL.Üniv.Mol.Biy.ve Gen.ABD Öğr.Üyesi

.....

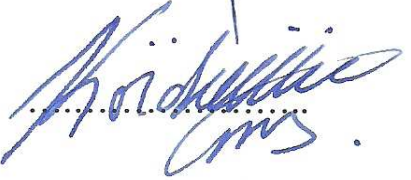

Jüri Üyesi : Doç.Dr.Haşmet HANAĞASI
İst.Üniv. Öğr.Üyesi

.....

Jüri Üyesi : Yrd.Doç.Dr.Nagehan ERSOY
HAL.Üniv. Mol.Biy.ve Gen.ABD Öğr.Üyesi

.....


Jüri Üyesi : Yrd.Doç.Dr.Kürşat ÖZDİLLİ
HAL.Üniv. Hemşirelik ABD Öğr.Üyesi (Yedek)
(Tıbbi Biyoloji)

.....


Jüri Üyesi : Yrd.Doç.Dr.Alper Tunga AKARSUBAŞI
İ.T.Ü. Öğr.Üyesi (Yedek)

.....

TEŐEKKÜR

Bu zorlu süreçte bir an olsun yalnız bırakmayan Yrd. Doç. Mehmet Baki Yokeş'e, sürekli yardımlarından dolayı Yrd. Doç. Ergül Bereber'e ve gerek laboratuvar gerekse kaynak sağladığı için Haliç Üniversitesine sonsuz teşekkürü bir borç bilirim.

Deniz Şumnulu

20 Şubat 2010

İÇİNDEKİLER

	SAYFA
SEMBOLLER VE KISALTMALAR	V
ŞEKİL LİSTESİ	VII
TABLO LİSTESİ.....	VIII
ÖZET.....	IX
ABSTRACT.....	X
1. GİRİŞ	1
1.1. Alzheimer Hastalığı.....	1
1.2. Kalıtsal Alzheimer Hastalığında Etken Genler	4
1.2.1. Apolipoprotein E	4
1.2.2. Amyloid Precursor Protein(APP) Geni	5
1.2.3. Presenilinler	8
2. AMAÇ	12
3. MATERYAL	13
3.1. XL-1 Bakterileri, DNA ve RNA Örnekleri	13
3.2. Kullanılan Araç ve Gereçler.....	14
3.3. Kullanılan Kimyasallar.....	15
3.4. Primerler	16
4. YÖNTEM.....	17
4.1. PSEN1 cDNA'sının Klonlanmasında İzlenen Yöntemin Ana Hatları ..	17
4.2. pcDNA3 vektörünün <i>Bam</i> HI ve <i>Xba</i> I restriksiyon enzimleri ile kesilmesi	17
4.3. pBluescript II sk(+) vektörünün <i>Bam</i> HI ve <i>Xba</i> I enzimleri ile kesilmesi	19
4.4.PSEN1 cDNA dizisinin pBluescript II sk(+) vektörüne klonlanması.....	19
4.5. XI-1 hücrelerinin transformasyonu.....	20
4.6. XI-1 Transform bakterilerden plazmit izolasyonu.....	20
4.7. Dizi analizi	21
4.8. PSEN1 cDNA'sı Üzerinde Yönlendirilmiş Mutasyon Oluşturma	21

4.9. XI-1 Transform bakterilerden mutant plazmit izolasyonu ve DNA dizi analizi	22
5. SONUÇ	24
KAYNAKLAR	28
ÖZGEÇMİŞ	37

SEMBOLLER ve KISALTMALAR

A, G, C, T : Adenin, Guanin, Sitozin, Timin

AAH: Ailesel Alzheimer hastalığı

AH: Alzheimer hastalığı

Amp/*Amp*^R : Amfisilin/Amfisilin direnç geni

ApoE: Apolipoprotein E

APP: Amiloid prekürsör protein

A β : Amyloid β protein

A β 40: Amyloid β protein 1-40 (40 amino asit)

A β 42: Amyloid β protein 1-42 (42 amino asit)

bç : Baz çifti

cDNA: Tamamlayıcı DNA

Da: Dalton

dATP: Deoksiadenozin trifosfat

dCTP: Deoksisitozin trifosfat

dGTP : Deoksiguanin trifosfat

dH₂O: Distile su

dk : Dakika

DNA : Deoksiribonükleik asit

dNTP : Deoksinükleotid trifosfat

dsDNA: Çift zincirli DNA

dTTP: Deoksitimin trifosfat

E.coli: Escherichia coli

EBAAH: Erken Başlangıçlı Ailesel Alzheimer Hastalığı

EDTA : Etilendiamintetraasetik asit

EtOH: Etanol

kb: Kilobaz

lacZ: İzopropil- β -D-tiyogalaktopiranosit

L-APP: Lökosit ilişkili amiloid prekürsör protein

LB : Luria Bertani

M : Molar

mg : Miligram

ml: Mililitre

mM : Milimolar

NaCl: Sodyum klorür

ng: Nanogram

PCZ : Polimeraz zincir reaksiyonu

PSEN1: Presenilin 1

PSEN2: Presenilin 2

sn: Saniye

U : Ünite

V: Hacim

X-gal : 5-bromo-4-kloro-3-indolil- β - \square -galaktopiranozit

α : Alfa

β : Beta

ϵ :Epsilon

μ g : Mikrogram

μ l : Mikrolitre

$^{\circ}$ C: Santigrat derece

Tm: Erime sıcaklığı

ŞEKİL LİSTESİ

	SAYFA
Şekil 1.1. Alzheimer Hastalığı'nı tanımlayan Dr. Alois Alzheimer.....	1
Şekil 1.2: Senil plak oluşumu.....	2
Şekil 1.3. Nörofibriller yumaklar	2
Şekil 1.4. ApoE'nin konfigürasyonu.....	4
Şekil 1.5. APOE alalleri arasındaki dizi farkı.....	5
Şekil 1.6. APP molekülünün nöronal hücre yüzeyi ile bağlantısı	7
Şekil 1.7. APP'nin sekretaz enzimleri tarafından kesilmesi	7
Şekil 1.8. APP'nin α - β - γ -sekretazlar tarafından kesilerek β -amiloid oluşumu..	7
Şekil 1.9. Beta-Amiloid plak oluşumunun temsili resmi	8
Şekil 1.10. Presenilin 1 proteinin a.a. dizisi, ekzonlara göre dağılımı, hücre içi ve hücre dışı katlanmaları	9
Şekil 1.10. Presenilin 1 proteinin a.a. dizisi, ekzonlara göre dağılımı, hücre içi ve hücre dışı katlanmaları	10
Şekil 3.1. pBluescript II SK (+/-) fajmidler	13
Şekil 3.2. pBluescript II SK (+/-) çoklu klonlama bölgesi	13
Şekil 4.1. Yöntemin ana basamakları	18
Şekil 5.1. pcDNA3 ve pBlueScript II sk (+) vektörlerinin BamHI restriksiyon enzimi ile kesilmesi	25
Şekil 5.2. BamHI ile kesildikten sonra XbaI restriksiyon enzimi ile ikinci kez kesilen pcDNA3 vektörü	25
Şekil 5.3. PSEN1 insertinin pBlueScript II sk (+) vektörüne klonlanması	25
Şekil 5.4. pBlueScript II sk (+) vektörü ile transformasyona uğramış XL-1 Blue <i>E. coli</i> kolonileri.....	26
Şekil 5.5. Beyazkoloni oluşumu.....	26
Şekil 5.6. PSEN1 taşıyan pBlueScript II sk (+) vektörünün dizi analizi	26
Şekil 5.7. PSEN1 cDNA dizi üzerinde oluşturulan Val89Leu mutasyonu	27
Şekil 5.8. PSEN1 cDNA dizi üzerinde oluşturulan Ile439Val mutasyonu	27

TABLO LİSTESİ

SAYFA

Tablo 1.1. Ailevi Alzheimer hastalığı genleri ve gen mutasyonlarının amiloid kaskad hipotezi ile ilişkisi	3
Tablo 3.1. pBluescript II SK (+/-) vektörü dizi organizasyonu	14
Tablo 3.2. Kullanılan aletler	15
Tablo 3.3 Kimyasallar	16
Tablo 3.4. Primer dizileri	16
Tablo 4.1. Yönlendirilmiş mutageniz için PZR protokolü	22

GENEL BİLGİLER

Adı ve Soyadı : Deniz ŞUMNULU
Anabilim Dalı : Moleküler Biyoloji ve Genetik
Programı : Moleküler Biyoloji ve Genetik
Tez Danışmanı : Yrd. Doç. Dr. Mehmet Baki YOKEŞ
Tez Türü ve Tarihi : Yüksek Lisans, Şubat 2010

PRESENİLİN 1 cDNA'SININ KLONLANMASI VE AİLESEL ALZHEIMER HASTALIĞI PATOGENEZİNDE ETKİN MUTASYONLARI TAŞIYAN VEKTÖRLERİN OLUŞTURULMASI

ÖZET

Bu çalışmada pcDNA3 vektörü üzerinde bulunan Presenilin 1 geninin cDNA'sı *Bam*HI ve *Xba*I restriksiyon enzimleri ile kesilerek çıkarılmış, ve pBluescript II SK (+) vektörünün çoklu klonlama bölgesinde yer alan *Bam*HI ve *Xba*I kesim noktaları arasına klonlanmıştır. Klonlanan vektör ile transform edilen XL-1 Blue *E. Coli* hücreleri LB/Agar katı besiyerinde üretilerek beyaz koloni oluşturan pozitif koloniler plazmid izolasyonu için seçilmiştir. Transformasyonun gerçekleştirildiği ve plazmid üzerinde Presenilin cDNA'sı bulunduğu DNA dizi analizi ile gösterilmiştir.

Klonlanan cDNA dizisi üzerinde yönlendirilmiş mutagenез ile Val89Leu ve Ile439Val mutasyonları oluşturulmuştur. XL-1 Blue hücreleri mutant cDNA dizisi taşıyan vektörlerle transform edilerek, mutant cDNA dizileri taşıyan saf kültürler elde edilmiştir. İleride Haliç Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Laboratuvarında yapılacak olan hücre kültürü çalışmalarında söz konusu mutasyonların etkilerinin çalışılabilmesi için gerekli vektörel alt yapı sağlanmıştır.

Anahtar Kelimeler: Alzheimer Hastalığı, Presenilin 1, mutasyon, klonlama

GENERAL KNOWLEDGE

Name and Surname : Deniz ŞUMNULU
Field : Molecular Biology and Genetics
Program : Molecular Biology and Genetics
Supervisor : Assist. Prof.Dr.Mehmet Baki YOKEŞ
Degree Awarded and Date : Master – February 2010

CLONING OF PRESENILIN 1 cDNA AND CONSTRUCTION OF VECTORS CARRYING FAMILIAL ALZHEIMER'S DISEASE CAUSING MUTATIONS

ABSTRACT

In this study, the cDNA of Presenilin 1 gene was cut out from pcDNA3 vector by *Bam*HI and *Xba*I enzymes. The cDNA fragment was further inserted to the multiple cloning site of the pBluescript II SK (+) vector, between the *Bam*HI and *Xba*I recognition sites. XL-1 Blue E.coli cells were transformed with the vector. The positive formed white colonies on LB/Agar medium and were selected for plasmid DNA isolation. The transformation and the presence of Presenilin 1 cDNA on the vector was confirmed by DNA sequence analysis.

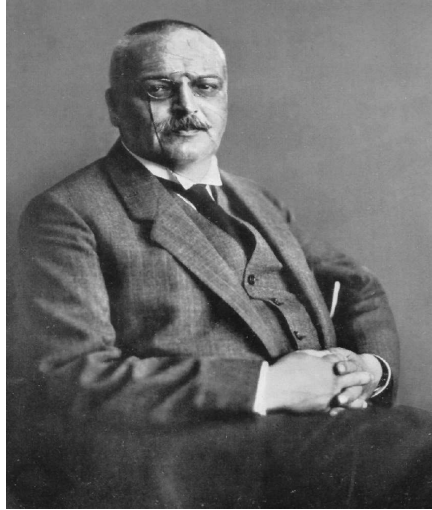
The cloned cDNA sequence was subjected to site-directed mutagenesis in order to construct vectors carrying Val89Leu and Ile439Val mutations. The XL-1 Blue cells were transformed by the mutant clones to obtain mutant colonies. As a result of this study, useful vector constructs were created in Halic University, Molecular Biology and Genetics Laboratory, which will be essential in the future studies for investigating the effects of the Presenilin 1 mutations in cell cultures.

Keywords: Alzheimer's Disease, Presenilin 1, mutation, cloning

1. GİRİŞ

1.1. Alzheimer Hastalığı

Alzheimer hastalığı (AH), 1907’de Alois Alzheimer (Şekil 1.1) tarafından tanımlanmış, bireylerde ileri yaşlarda çok sık görülen; anlama ve kavrama kabiliyeti kaybına sebep olan bir hastalıktır.

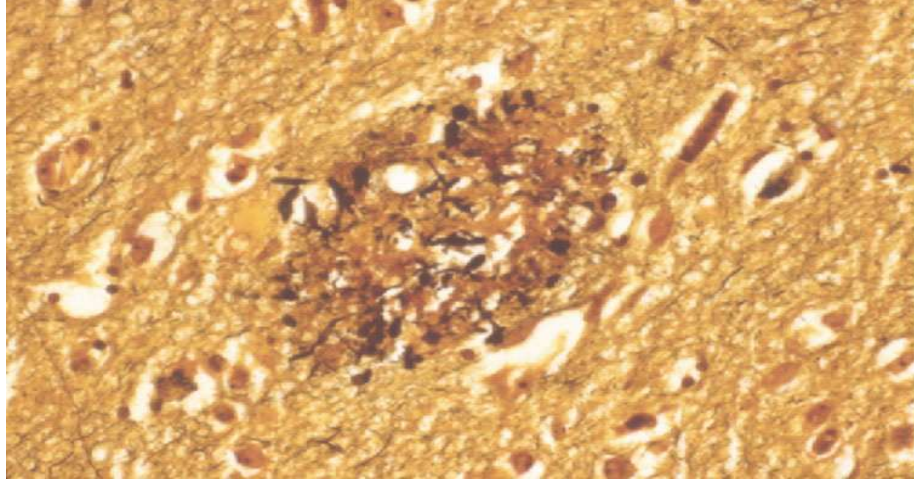


Şekil 1.1. Alzheimer Hastalığı’nı tanımlayan Dr.Alois Alzheimer (1864-1915).

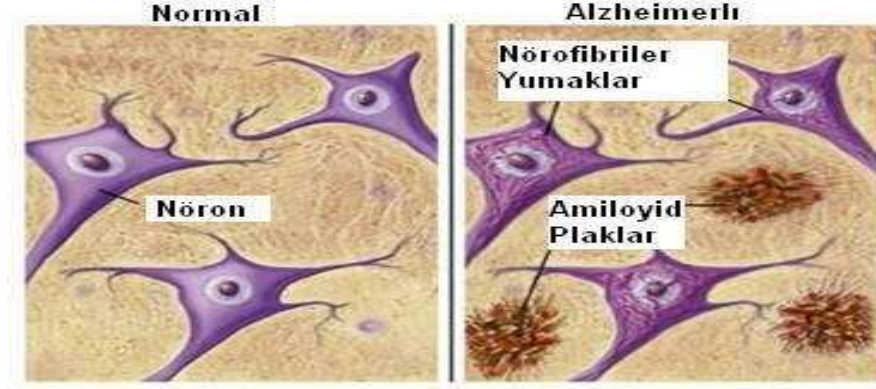
<http://www.uic.edu/depts/mcne/founders/page0002.html> (Görüntüleme

Tar.:19.03.09)

AH’ nın genellikle ilk belirtileri hafıza kaybı, dil unutmak ve davranış bozukluklarıdır. Nörolojik incelemeler, nörofizyolojik test ve beyin görüntüleme yöntemleri temel alınarak AH’nın *in vivo* olarak tanısı hakkında ancak bir kısım bilgi elde edilebilir, buna karşın AH’nın diğer tip demanslardan kesin olarak ayırt edilebilmesi için ancak ölüm sonrası araştırmalar yapılmalıdır. Ölüm sonrası AH’ı iki farklı nöropatolojik ayırt edici özellikle tanımlanabilir; senil plaklar ve nörofibriler yumaklar (Bacsikai; 2002, Chui;1993, Mori; 2000).



Şekil 1.2. Senil Plak Oluşumu (Schenk; 1999)



Şekil 1.3. Nörofibriller yumaklar (Klunk; 2004).

AH'lığı genellikle iki farklı yaş aralığına göre sınıflandırılır. Eğer hastalık kendini 65 yaşın altında gösteriyorsa erken başlangıçlı AH ("presenile") olarak adlandırılır, buna karşın geç başlangıçlı ("senile") AH'lığı 65 yaşın üstünde meydana gelmektedir. Birçok araştırma neticesine göre aile öyküsü bilinen kalıtsal otozomal baskın AH'nın görülme sıklığı, sporadik forma göre çok daha azdır.

Tanımlanmış üç farklı gende mutasyon meydana gelmesi, erken başlangıçlı ailesel AH'na (EBAAH) neden olur ve bu durumun otozomal baskın kalıtımda görülme sıklığı hemen hemen 100%'dür. Bu üç gen; amiloid prekürsör (öncül) proteini (APP), presenilin1 (PSEN1) ve presenilin2 (PSEN2) genleridir (Lendon; 1997, Schellenberg; 1995). Bununla birlikte mendel dağılımına göre bu üç genin hastalığıdaki etkisi, hastalığa neden olan faktörlerin tamamının ancak 5%'ini oluşturmaktadır (Shastry; 1999). Buna göre, AH'nın birçok formu hem çevresel hemde genetik faktörlerin birlikte sebep olduğu kompleks bir etiolojiye bağlıdır.

Apolipoprotein E (APOE) geni, sporadik geç başlangıçlı AH'nın meydana gelmesinde etkili bir risk faktörü olduğu açıklanmıştır. Geç başlangıçlı AH aileleriyle genetik bağıntısı açısından lokalizasyonuna bağlı olarak APOE hastalık lokusu olarak tanımlanmıştır (Lusis; 1986). Bununla birlikte, APOE'nin bir aleli olan APOE $\epsilon 4$ 'ün ailesel kalıtım göstermeyen AH vakalarının yaklaşık 50%'inde varlığı saptanmıştır (Corder; 1993). Bu durum, diğer şüphelenilen genlerinde var olduğunu ve bu genlerin farklı polimorfizmlerinin AH için risk faktörü olabileceğini ortaya koymaktadır (Shastri). AH ile ilişkilendirilebilme ihtimali olan birçok genetik faktör olmasına rağmen bunlardan sadece bir kaçının hastalık için etken olduğu düşünülmektedir (Tablo 1.1)

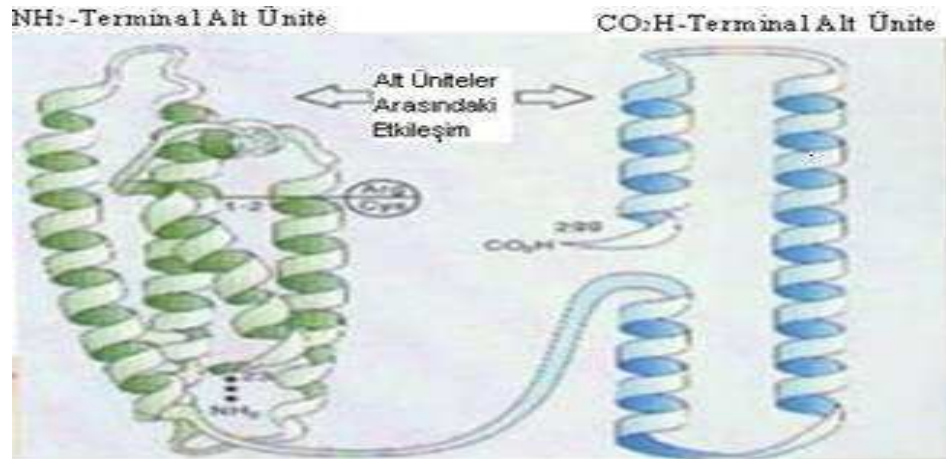
Tablo 1.1. Ailevi Alzheimer hastalığı genleri ve gen mutasyonlarının amiloid kaskad hipotezi ile ilişkisi (Rochi ve ark.,2003).

Gen	Kromozomal lokasyon	Başlama yaşı	Ailesel ve/veya Rastgele	Hastalık olasılığı
APP	21q21.3-q22.05	Erken	Ailesel	Kesin
PS1	14q24.3	Erken	Ailesel	Kesin
PS2	1q31-q42	Erken	Ailesel	Kesin
APOE	19q32.2	Geç	Ailese ve Rastgele	Kesin
$\alpha 2M$	12p	Geç	Rastgele	Kesin Değil
LRP	12	Geç	Rastgele	Kesin Değil
LBP-1c/CP2/LSF	12	Geç	Rastgele	Kesin Değil
ACE	17q23	Geç	Rastgele	Kesin Değil
VLDL-R	9pter-p23	Geç	Rastgele	Kesin Değil
BChE	3q26.1-q26.2	Geç	Rastgele	Kesin Değil
ACT	14q32.1	Geç	Rastgele	Kesin Değil
IDE	10q23-q25	Geç/Erken	Ailesel ve Rastgele(?)	Kesin Değil
TfC2	3q21	Geç	Rastgele	Kesin Değil
catD	11p15.5	Geç/Erken	Ailesel ve Rastgele	Kesin Değil
BH	17q11.1-q11.2	Geç/Erken	Rastgele	Kesin Değil
TGF- $\beta 1$	19q13.1-q13.3	Geç	Rastgele	Kesin Değil
5-HTT	17q11.1-q12	Geç	Rastgele	Kesin Değil
APOE promoter	19q32.2	Geç/Erken	Rastgele	Kesin Değil
NOS3	7q35	Geç	Rastgele	Kesin Değil
CST3	20p11.2	Geç	Rastgele	Kesin Değil
PS1 promoter	14q24	Erken	Ailesel/Rastgele	Kesin Değil

1.2.Kalıtsal Alzheimer Hastalığında Etken Genler

1.2.1.Apolipoprotein E

Apolipoprotein E (APOE) 34,200Da moleküler ağırlığında bir plazma glikoproteinidir. Karaciğerde, beyindeki astrositlerde, nöronlarda, makrofajlarda ve monosit gibi diğer tip hücrelerde sentezlenir (Siest; 1995). ApoE, nöronal büyüme ve hasar boyunca kolesterol metabolizmasından sorumludur (Mahley; 1988). Bundan başka insanlarda sinir rejenerasyonunda, birçok lipolitik enzimin immunoregülasyonunda ve aktivasyonunda önemli yer tutar (Mahley; 2000, Vancea; 2000). ApoE 299 amino asit (a.a.) içermektedir, amino terminal domaini reseptör bağlanma kısmı içeren stabil globular yapıdadır (1-191 a.a.), karboksi terminal kısmı ise lipoprotein içerip helikal yapıdadır ve daha az stabildir (216-299 a.a. içerir) (Wiesgraber; 1994).



Şekil 1.4. ApoE'nin konfügirasyonu.

(<http://www.med.nyu.edu/barlow/images/apoe.jpg>) (Görüntüleme Tar.: 19.03.09)

Utermann ve arkadaşları tarafından, insan serumu üzerinde ilk ApoE polimorfizmi tanımlanmıştır (Uterman; 1979). Daha sonra Zannis ve arkadaşları, ApoE nin izoelektrik noktalarını ele alarak üç büyük ApoE (ApoE2, ApoE3, ApoE4) izoformunu tanımlamıştır ve bu lokusların her bir aleli $\epsilon 2, \epsilon 3, \epsilon 4$ olarak adlandırılmıştır. Bu izoformlar 112. ve 158. a.a. lerdeki iki farklı a.a. bakımından birbirinden farklıdır (Zannis; 1981).

E2: NH ₂ -----Cys112-----Cys158-----COOH
E3: NH ₂ -----Cys112-----Arg158-----COOH
E4: NH ₂ -----Arg112-----Arg158-----COOH

Şekil 1.5. APOE alalleri arasındaki dizi farkı.

Her bir alelin bulunma frekansı yaklaşık olarak ϵ_2 : 0.11, ϵ_3 : 0.72, ϵ_4 : 0.17 dir (Zannis). Corbo ve Scacchi, ϵ_3 alelinin populasyonda en çok bulunma ihtimalini göstermişlerdir (Corbo; 1999). Buna karşın ϵ_4 alelinin görülme sıklığı erkeklere göre kadınlarda daha fazladır (Payami; 1996). APOE geni 19 kromozomun 19q kolunun C3 lokusunda yer almaktadır (Lusis; 1986).

Birçok çalışma ϵ_4 aleli ile geç başlangıçlı sporadik AH arasında bağlantı kurmuştur. Bu çalışmalardan ilki ve en önemlisi Corder ve arkadaşları tarafından yapılmıştır (Corder; 1994), bu çalışmaya göre ϵ_4 alelinin etkisi “doza bağımlı” olup, AH riskini, allel sayısının artması ile, 20-90% arasında arttırmakla birlikte hastalığın gelişim yaşını 84 ten 68’e kadar geri çekebilmektedir. Erken başlangıçlı AH ailelerinde ϵ_4 alleli ile ilgili benzer bir etki de APP geni mutasyonu üzerinde görülmüştür (Levy-Lahad; 1995, Sorbi; 1995). Buna karşın bu alelin PSEN1 Mutasyonlarına bağlı, erken başlangıçlı AH hastalığının meydana gelmesinde herhangi bir etkisi görülememiştir (Van; 1994) ϵ_2 alelinin ise AH’a karşı koruyucu etkisinin olduğu saptanmıştır (Corder). ApoE’lerin farklı izoformları A β peptidine [Strittmatter; 1993 (a)] ve tau proteinine [Strittmatter; 1994 (b)] bağlanması açısından farklılık gösterir. ApoE4, ApoE3 e göre A β peptidine çok daha hızlı bağlanır. ApoE4 formu, tau proteinine in vitro olarak bağlanmazken, ApoE2 ve ApoE3 bağlanır (Wiesgraber). Bu da ApoE3 ile tau’nun bağlanması neticesinde, tau fosforilasyonunun ve nörofibriller tangle’ların engellenmesine açıklayıcılık kazandırabilir (Strittmatter).

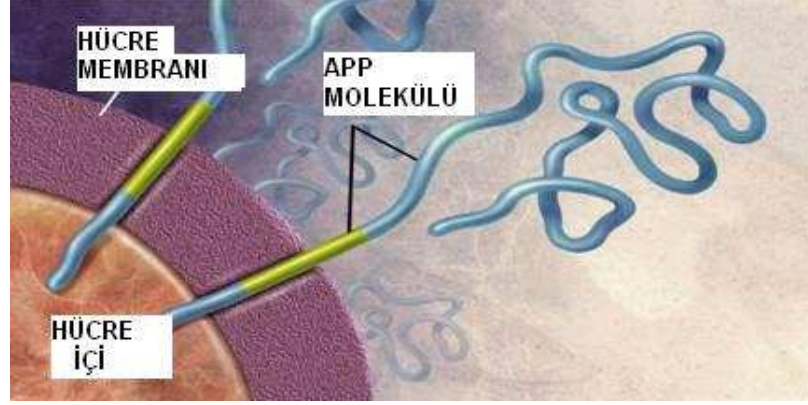
1.2.2. Amyloid Precursor Protein (APP) Geni

Alzheimer ile APP’nin genetik bağlantısını anlamak için yapılan ilk çalışmalar 1980’lerin ortalarında başlamıştır. Çalışmalar, Down sendromlu bireylerden 30 yaşının üstüne kadar yaşayabilenlerin, klinik ve nöropatolojik özellikleriyle ilişkilendirilmiştir [Mann; 1988 (a), Mann; 1985 (b)]. Bu çalışmalar 21.

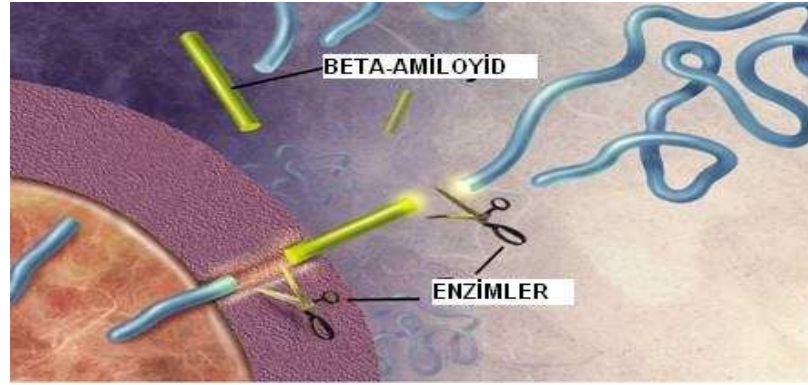
kromozomdaki ilgili genin ekstra bir kopyasının olması sonucu meydana gelen Down sendromunun fenotipte Alzheimer hastalığıyla örtüşebileceğini ortaya çıkarmıştır (Wisniewski; 1985). Gerçektende 21. kromozomun 21q bölgesinde, otozomal dominant erken başlangıçlı ailesel Alzheimer hastalığı açısından ilk genetik bağlantı keşfedilmiştir (Hyslop; 1987). Aynı zamanda başka bir grupta APP'nin, 21. kromozom üzerindeki gen kodlayıcı bölgesini saptamıştır ve APP geni, kalıtsal alzheimer hastalığı için saptanan ilk gen olmuştur (Goldgaber; 1987, Tanzi; 1987). Son olarakta APP geninin tüm dizisi çıkartılmış, görüntülenmesi sağlanmış ve APP gen lokusunda hastalığa neden olabilecek ilgili mutasyonlar saptanmıştır (Goate;1991, Hendriks; 1992, Mullan; 1992). APP geni 18 ekzon içermektedir ve 7,8 ve 15 ekzonların alternatif kırılmalarına bağlı olarak en az sekiz farklı APP proteini izoformu meydana gelmektedir (Kitaguchi; 1988). APP bütün hücrelerde en az iki farklı proteolitik kesilmeye mağruz kalır. Birinci yolak; APP'nin (çözünmüş APP) ekstraselüler N-terminal ucunu salgılamaktan sorumlu olan, APP'nin kesilmesiyle A β 40 peptidinin meydana gelmesini sağlayan membran bağımlı α -sekretaz aktivitesini içerir. Bu yol amiloidojenik değildir ve β -amiloid peptid formunun oluşmasının önüne geçer (Selkoe; 1994). Diğer kesilme yolağı endozomal-lizozomal kompartman içinde gerçekleşir ve β -sekretaz aktivitesi ile APP; 671 ve 672 a.a.'lık iki zincire bölünür ve buda A β peptidinin N-terminal kısmını verir. Ek olarak üçüncü bir γ -sekretaz aktivitesiyle A β peptidlerinin farklı kombinasyonlarının salınımları gerçekleşir. γ -sekretaz aktivitesi farklı uzunluktaki peptidlerin salgılanması açısından kritik rol oynar: Amiloidojenik form olmayan 712-713 a.a.'lık peptidin, endozomal-lizozomal sistem içinde parçalanarak oluşan 40 a.a. uzunluğundaki A β peptidi en genel formdur. Buna karşın son derece fibrillojenik ve nöro toksik form olan 42 ve 43 a.a. dan oluşan peptidler (A β 42-43) 714 a.a. peptidin kırılmasıyla oluşur (Koo; 1994). Sağlıklı hücrelerde APP molekülleri kesilip A β hücre yüzey proteinleri üretmektedir ve bazı hipotezlere göre APP'nin; kinezin ile sinaptik vesiküller arasında bir reseptör molekül rolü oynadığı düşünülmektedir:

APP'nin fonksiyonu halen tam olarak anlaşılamamıştır. *In vitro* çalışmalar, salgılanan APP'nin fonksiyonunun; hücre bölünmesini, hücre adhezyonunu ve PC12 hücrelerinin nöratif büyümesini teşvik eden nöron büyüme faktörlerini kontrol eden bir otokrin faktör olabileceğini işaret etmektedir (Milward; 1992, Saitoh; 1989, Villa; 2001). Diğer bazı çalışmalara göre APP'nin sinyal transdüksiyonundan sorumlu

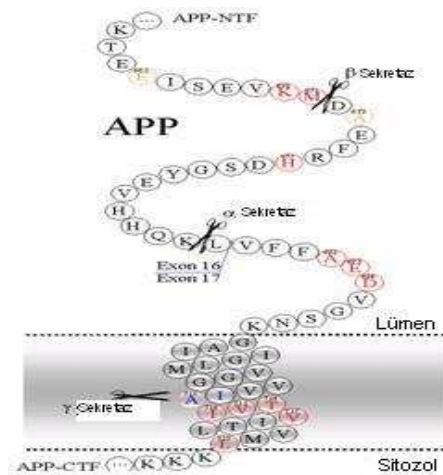
olduğu (Nishimoto; 1993) veya transkripsiyonu düzenleyen diğer proteinlerle ilişkili olduğu tahmin edilmektedir (Cao; 2001).



Şekil 1.6. APP molekülünün nöronal hücre yüzeyi ile bağlantısı (Schenk)

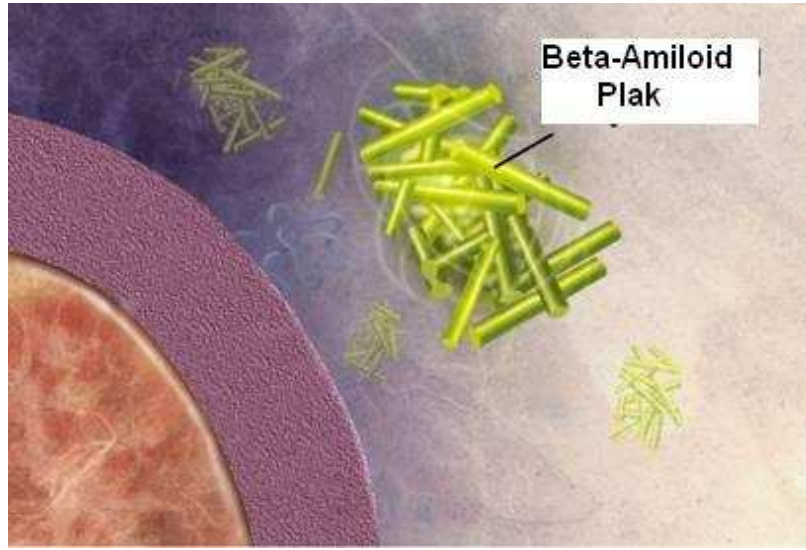


Şekil 1.7. APP'nin sekretaz enzimleri tarafından kesilmesi.(Schenk)



Şekil 1.8. APP'nin α-β-γ-sekretazlar tarafından kesilerek β-amiloid oluşumu.
(<http://mayoresearch.mayo.edu/mayo/research/mcj/Amyloid.cfm>) (Görüntülenme

Tar.: 19.03.09)



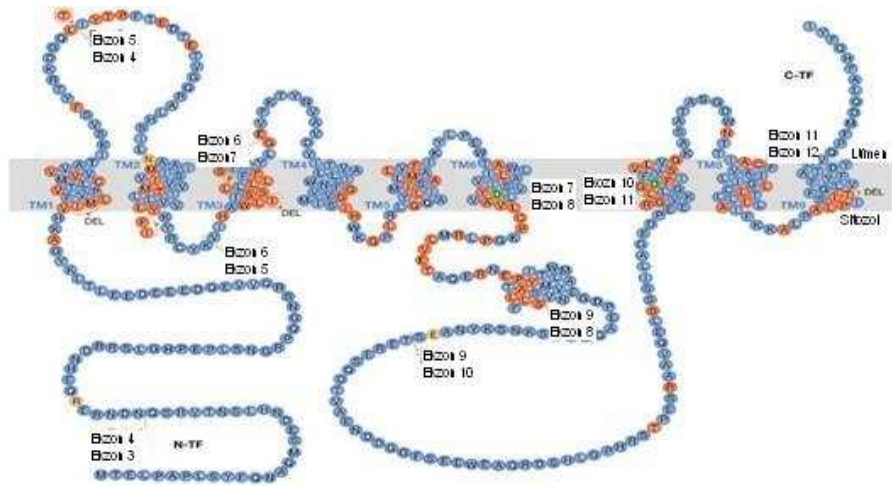
Şekil 1.9. Beta-Amiloid plak oluşumunun temsili resmi (Schenk).

APP geni mutasyonunun, 65 yaş altı meydana gelen tüm FAD'ların 5%'inden fazlasını meydana getirdiği düşünülmektedir. APP geninin 17. ekzonunda direkt nükleotid dizi analizleri yapılmasıyla, erken başlangıçlı AH'lı ailelerde birçok anlamlı mutasyon keşfedilmiştir. İlk mutasyon Goate ve arkadaşları tarafından bir İngiliz ailesinde saptanmıştır (Goate;). 717. kodondaki ("London mutasyonu") Valin→izolösin yerdeğiştirilmesi neticesinde meydana gelen mutasyon, başka birçok erken başlangıçlı AH ailesinde de saptanmıştır. Bundan başka 717. kodonda Val→Phe, Val→Leu ve Val→Gly gibi diğer mutasyonlarda rastlanmıştır da (Chatrier-Harlin; 1991, Murrell;) en yaygın rastlanılanı Val→Ile mutasyonudur (Brooks; 1995, Campion; 1996, Fidani; 1992, Funickh; 2000, Goate, Matsumura; 1996, Sorbi; 1993, Sorbi; 1995, Yoshioka; 1991). Bundan başka farklı kodonlarda, farklı kültürlere ait mutasyonlarda belirlenmiştir.

1.2.3.Presenilinler

Birçok erken başlangıçlı AH ailede, APP geninde herhangi bir mutasyona rastlanılmaması başka AH lokuslarının da olabileceğini akla getirmiştir. 1992 de bölgesel klonlama stratejisi kullanılarak 14. kromozomun uzun kolu üzerinde AH ile ilişkili bir lokus saptanmış ve bağlantı analizleri neticesinde birkaç sene sonra PSEN1 olarak adlandırılan genin varlığı saptanmıştır (Sherrington; 1995, Broeckhoven; 1992). Genetik harita üzerinde 1q31-q42 bölgesinde bulunan ikinci bir gende PSEN1 ile gösterdiği homoloji esas alınarak bulunmuştur (Levy-Lahad; 1995).

Bu iki gendeki mutasyonların (PSEN1 ve PSEN2), erken başlangıçlı AD vakalarının tümünün yaklaşık 80%'üne neden olduğu düşünülmektedir. Bu iki gen birbiriyle yüksek homoloji gösteren (67% benzer), presenilin1 ve 2 olarak adlandırılan multi-spaning transmembran proteinlerini kodlamaktadır. Presenilinler farklı türler arasında da yüksek korunum göstermektedir. Her iki gende 13 ekzon içermektedir, bunlardan 10'u (ekzon 3-12) kodlaması yapılan diziyi içermektedir, diğer ekzonlar ise translasyonu yapılmayan bölgeleri içermektedir (Clark; 1995, Prihar; 1996). PSEN1, 467 a.a. lık, PSEN2 ise 448 a.a. lık protein kodlamaktadır ve bu proteinlerin öncelikli yerleşkeleri; endoplazmik retikulum, golgi aparatı ve çekirdek zarfı içindedir (Kovaks; 1996).



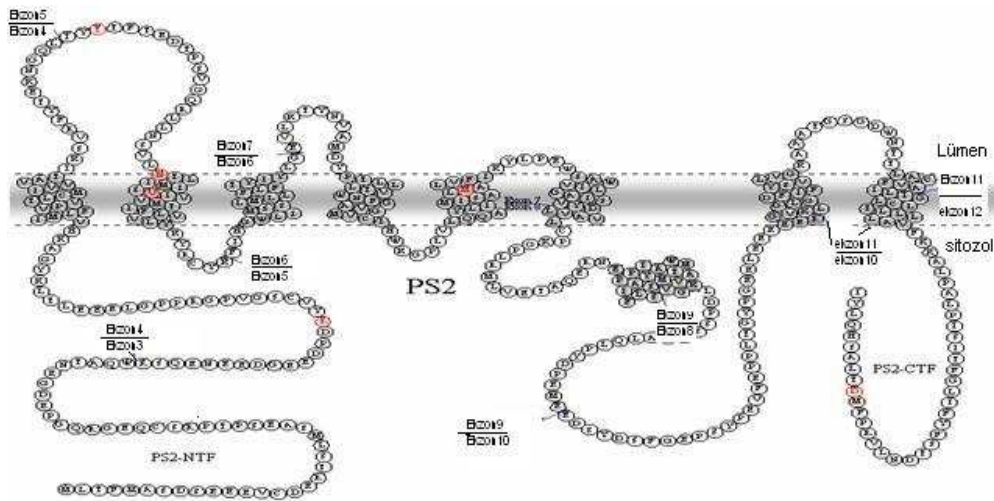
Şekil 1.10. Presenilin 1 proteinin a.a. dizisi, ekzonlara göre dağılımı, hücre içi ve hücre dışı katlanmaları

<http://www.nature.com/embor/journal/v8/n2/full/7400899.html> (Görüntüleme Tar.: 19.03.09)

PSEN'lerin yapısına bakıldığında sekizli transmembran domaini ile birlikte bir hidrofilik intracellular loop bölgesi içermektedir; farklı fiziksel şartlarda her bir PSEN, başka proteinlerle çoklu kompleks altyapılar meydana getirebilmektedir. PSEN proteinleri stabil N- ve C- terminal bölgelerini oluşturmak üzere bir fizyolojik proteolitik kırılmaya mağruz kalırlar (Thinakaran; 1997). Özellikle memeli beyinde, PSEN'lerin bu işlenmiş parçalarına kolayca rastlanılabilmektedir. Bununla birlikte PSEN'lerdeki bu kırılma olayının rolü henüz çok net değildir. Hayvan modelleri temel alınarak (null PSEN1 mutant), PSEN'in fonksiyonu üzerine kurulan bazı hipotezlere göre, PSEN'lerin gelişim morfogenezinde rol oynadığı ileri sürülmüştür (Shen; 1997). Bunların aynı zamanda spesifik proteinlerin, proteolitik işlenmesine yardımcı olabileceği düşünülmektedir. Bununla ilgili bir delil PSEN1'in, APP ve

Notch transmembran metabolizmasından sorumlu olan γ -secretase enzimi aktivitesine sahip olduğu veya en azından γ -sekretaz için bir kofaktör olduğu yönündedir (Amtul; 2002, Berezovska; 2000, Haass; 1999). Bunu destekleyen bir hipotez, son zamanlarda tanımlanmış olan γ -sekretaz'a bağlanarak inhibe eden seçici ve spesifik bir PSEN heterodimerinin var oluşudur (Esler; 2000). Diğer bazı çalışmalarda PSEN2'de olduğu gibi, PS'lerin kontrollü hücre ölümünü düzenlediği yönündedir, burada PSEN2'nin C terminal kısmı apoptozu inhibe etmekle görevlidir (Valter; 1999). Günümüzde PSEN1 geni üzerinde 170'den fazla mutasyon tanımlanmıştır, buna karşın PSEN2 üzerinde sadece 10 tane missense mutasyon mevcuttur (www.molgen.ua.ac.be/ADMutations).

PSEN1'de meydana gelen missense mutasyonlar en patojenik mutasyonlardır, bunlardan ikisi altı nükleotidlik insersiyon (Rogaeva; 2001) ve biride üç nükleotidlik delesyonudur (Cruts; 1998). Bu mutasyonlar öncelikli olarak yüksek korunumlu transmembran domaininde gelişmektedir. Bunlardan hiçbirisi çerçeve kayması meydana getiren mutasyon değildir, aynı zamanda proteinin kesilmesinde neden olmaz. Sadece iki kesilme defekti kapsamlı olarak tanımlanmıştır: PSEN1'deki intron 8'de meydana gelen bir kırılma noktası mutasyonu, 9. ekzonun anlatımı yapılan kısmında bir delesyona neden olmakla birlikte kodon 290'da bir a.a. yerdeğiştirme meydana getirir (Citron; 1997).



Şekil 1.11. Presenilin 2 proteinin a.a. dizisi, ekzonlara göre dağılımı, hücre içi ve hücre dışı katlanmaları <http://www.alzforum.org/res/com/mut/pre/diagram2.asp> (GörüntülenmeTar.: 25.03.09)

Kullanılan mutant PSEN1'lerin moleküler mekanizmalarına bağı olarak onların patojenik etkileri henüz tam olarak ortaya çıkarılamamıştır. Mutant PSEN1'lerle transfekte olmuş hücre hattı ele alındığında A β peptidlerinin miktarında artma görülmüştür (Borchelt; 1996). *In vivo* deneyler mutant PSEN1 proteininin, uzun A β 'ların depolanması yerine, γ -sekretaz aktivitesi aracılığıyla APP'lerin; β -amyloid, C-terminal uçlarında fonksiyon gösterdiğini ortaya koymaktadır (Wolfe; 1999, Sudoh; 1998). Bundan başka birçok deney mutant PSEN1 seviyesinin artmasının, endoplazmik retikulum ve golgi'nin kompartmanlarında yüksek seviyede fibrillojenik A β 42'nin depolanmasına neden olduğunu göstermiştir (Sudoh). Bu aktivite, PSEN'in normal fizyolojik rolünden başka PSEN1 proteininin AAH'la ilişkili olarak birçok fonksiyonu olduğunu göstermesiyle birlikte, AAH'nın kalıtımında bir takım otozomal dominant özelliklerde gereksinim vardır. Ek olarak Mutant PSEN1'lerde, A β 42'nin artmasıyla ilgili olarak hiçbir PSEN-interaksiyon proteininin direkt rolü gözlemlenememiştir (Saura; 2000). 4 farklı ailede saptanan PSEN1 8. intronunun kesim noktasında meydana gelen diffüz senil plaklarından morfolojik olarak farklı, değişik nöropatolojik özellikte plakların meydana gelmesine neden olmuştur (Crook; 1998). Bu plakların ne amiloid fibriller şeklinde çekirdekte depolandığı, ne distrofik nöritleri çevreledikleri, ne de inflamatuvar yanıtı tetikledikleri gözlenmiştir. Aynı özellikler, AH'nın patogenezi için anahtar rolü oynamayan A β depolanması içinde önerilmiştir, fakat ekstraselüler agregasyondan önce A β 42'nin nörotoksik etkisinin oluşması, kalsium homeostazını etkileyebileceği veya serbest radikallerin üretimini arttırabileceği veya bazı intraselüler sinyal patikasını dağıtabileceği için pek ilgi çekmemiştir (Hardy; 1997). Bu işlemler, AH nöropatolojisi ve amiloid plak dağıtımı arasındaki korelasyonda senil plakların oluşumunu açıklamak açısından tümüyle farklı gerçekleşir. Son olarak, APP'lerin kaspazlar tarafından kesilmesinin amiloid toksisiteye neden olabileceği rapor edilmiştir. PSEN1 ve PSEN2 genlerindeki mutasyonlara bağı olarak, presenilinlerin kaspaz kesim mekanizmaları değişebilmekte, buda belkide AH'nın moleküler patolojisi açısından önemli yer tutmaktadır (Pellegrini; 1999, Weidemann; 1999)

2. AMAÇ

Alzheimer hastalığı birçok farklı etkene bağlı bir hastalıktır. Bu etkenlerden bir kısmı kalıtsal sebeplere bağlı meydana gelirken bir kısmı sporadiktir. Kalıtsal Alzheimer, sporadik Alzheimer hastalığına göre görülme sıklığı son derece düşüktür. Ancak kalıtsal Alzheimer hastalığının, giriş bölümünde belirtilen genlerin (APP, PSEN1, ApoE, girişte belirtilmemiş PSEN2) birinde veya aynı anda bir kaçında meydana gelen mutasyonlar sonucu oğul döllere aktarılma ihtimali %15'tir. Alzheimer hastalığı erken başlangıçlı ve geç başlangıçlı Alzheimer hastalığı olarak iki ayrılmıştır.

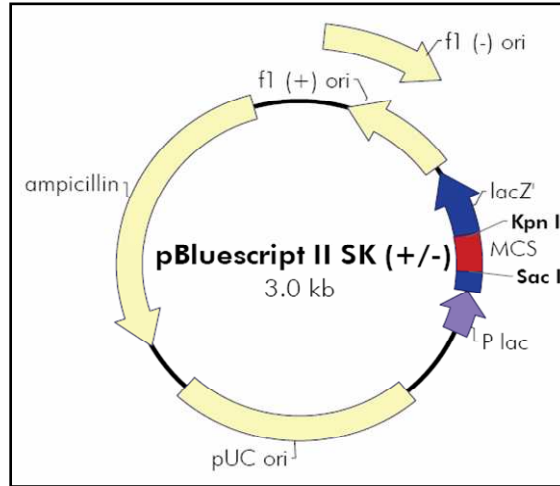
PSEN1 geni üzerinde meydana gelen anlamlı mutasyonlar sonucunda erken başlangıçlı Alzheimer hastalığının meydana gelme ihtimali %60-70'tir. PSEN1 geninde 170'ten fazla mutasyon tanımlanmıştır ve halen tanımlanmaktadır. Bu mutasyonların küçük bir kısmı (5-6) herhangi bir hastalık yaratmazken, geri kalanı Alzheimer hastalığına neden olmaktadır. Bu mutasyonların Alzheimer hastalığını meydana getirmesindeki öneminin bir kısmı sadece ölü bireylerin otopsileri ve biyopsileri sonucu beyin dokularındaki skar (yara) benzeri miyofibriler yumaklar ve amiloyid plaklarla açıklanırken, geri kalan büyük kısmı doku ve hücre kültürleri üzerinde açıklanmıştır. Yapılan doku ve hücre kültürü araştırmaları neticesinde, PSEN1 geni üzerinde mutasyonlar meydana getirilmiş ve bu mutasyonlara bağlı olarak farklı oranlarda A β 40 ve A β 42 üretildiği gözlemlenmiştir. Sonuç olarak üretilen A β 42 miktarının, A β 40 miktarına göre daha yüksek olması durumunda miyofibriler yumaklar ve amiloyid plaklar oluşarak Alzheimer hastalığının meydana geldiği açıklanmıştır.

Bu tezin amacı, A β 42 miktarında artış meydana getirebilecek Val89Leu ve Ile439Val mutasyonlarının PSEN1 cDNA'sı üzerinde yönlendirilmiş mutagenез ile oluşturulması ve mutant cDNA dizilerinin pBluescript II sk(+) fajemid vektörlerine klonlanarak XL-1 Blue bakterilerine yerleştirilmesidir.

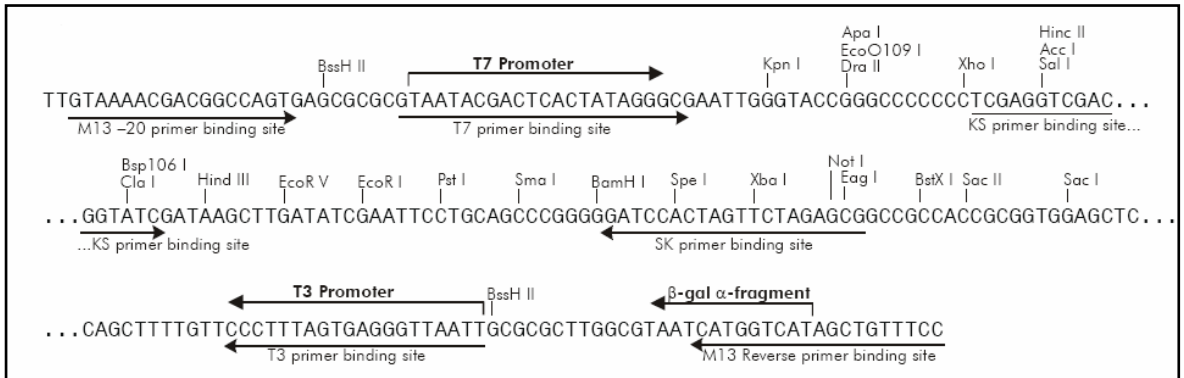
3.MATERYAL

3.1. XL-1 Bakterileri, DNA ve RNA Örnekleri

XL-1 Blue bakterileri, pBluescript II sk(+) fajemid vektörü (Şekil 3.1), pWhitescript vektörü Haliç Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü tarafından temin edilmiştir. PSEN1 cDNA'sı taşıyan pcDNA3 vektörünün (Promega) *SmaI* resktriksiyon enzimi kesim noktasına (Şekil 3.2) klonlanmış şekilde Flanders Interuniversity, Bioteknoloji Enstitüsü, Nörojenetik Laboratuvarı (Antwerp Üniversitesi, Belçika) tarafından sağlanmıştır (Tablo 3.1).



Şekil 3.1. pBluescript II SK (+/-) Fajmidler



Şekil 3.2. pBluescript II SK (+/-) Çoklu Klonlama Bölgesi (598-826 dizisini göstermektedir).

Tablo 3.1. pBluescript II SK (+/-) Vektörü dizi organizasyonu.

Özellik	Nükleotid Pozisyonu
ss-DNA replikasyonunun f1 (+) orijini [pBluescript SK (+)]	135–441
ss-DNA replikasyonunun f1 (-) orijini [pBluescript SK (-)]	21–327
β -galaktosidaz α -fragmentini kodlayıcı dizi (lacZ')	460–816
Çoklu klonlama bölgesi	653–760
T7 promotör transkripsiyon başlatıcı bölge	643
T3 promotör transkripsiyon başlatıcı bölge	774
Lac promotörü	817–938
pUC replikasyon orijini	1158–1825
Ampisilin dirençli (<i>bla</i>) ORF	1976–2833

3.2. Kullanılan Araç ve Gereçler

Tez çalışması esnasında kullanılan bütün cihazlar Haliç Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Araştırma Laboratuvarından temin edilmiştir (Tablo 3.2).

3.3. Kullanılan Kimyasallar

Bu çalışmada kullanılan tüm kimyasallar (Tablo) Stratagene (A.B.D.), Roche (Almanya), Fermentas (EU) ve Eczacıbaşı'nın (Türkiye) firmalarının ürünleridir. Kullanılan kimyasallar ve içerikleri Tablo 3.3'de gösterilmiştir.

Tablo 3.2. Kullanılan aletler.

Santrifüjler:	MiniSpin Plus Eppendorf Santrifüj Cihazı (Hamburg, Almanya)
PCR Cihazları:	TC-512 PCR Cihazı MiniOpticon Real Time PCR System MJ Mini Personal Thermal Cycler (Bio-Rad, USA)
Su Pürifikasyonu:	MiliPore Su Saflaştırma Cihazı
Elektroforez Sistemleri:	EC250-90 Thermo Electron Corporation Power Pac Basic (Bio-Rad,USA)
Agaroz jel görüntüleme cihazı	
Derin dondurucular:	-20 ⁰ C (Arçelik, Türkiye) -80 ⁰ C (Thermo, Çin)
Buzdolabı:	+4 ⁰ C (Beko,Türkiye)
Vorteks:	Heidolph Reax Top (Almanya)
Magnetik Karıştırıcı:	Heidolph MR 3001(Almanya)
PH/Sıcaklık Ölçer:	Hanna (Park East Drive Woonsocket, USA)
Mikropipetler:	Thermo FinnpiPET (Çin)
Dri-Block:	Techne
Hassas Terazı:	Kern KB
Pipet uçları:	5 ml 160510, Costar 10 ml 4488, 50 ml'lik plastik pipet ucu
Kültür petripleri:	TPP 35 mm-93040, TPP 60 mm-93060, TPP 100 mm
Cam pastör pipeti:	Isolab
Kültür tüpleri:	Tpp 15 ml ve 50 ml-90050

Tablo 3.3 Kimyasallar

Enzimler	DNA modifiye edici enzimler	T4 DNA Ligaz, Alkalın fosfataz
	Polimerazlar	DNA polimerazlar (Pfu DNA polimeraz, Taq DNA polimeraz, Tgo DNA Polimeraz; Roche, Almanya)
	Restriksiyon enzimleri	<i>Bam</i> HI Restriksiyon Enzimi (Fermentas)
<i>Kpn</i> I Restriksiyon Enzimi (Roche, 3000U(10U/ µl))		
PZR kimyasalları	dATP, dTTP, dGTP,dCTP	Fermentas (herbiri 100mM)
	Steril su(dH ₂ O)	Roche, Mannheim, Almanya
Jel elektroforez kimyasalları	10X TBE Buffer	1M Tris-HCl, 900 mM Borik Asit, 20 mM Na ₂ EDTA
	6X Loading Buffer	0.2 % BPB, 0.2 % xylene cyanol FF, 60 % gliserol, 60 mM EDTA
	Etidyum Bromür	10mg/ml
	% 1'lik agaroz jel	100 ml 0.5X TBE+ 1 gr agaroz
	Agaroz	Prona Agarose Basica Le
	1 Kb DNA Markör	Fermentas
DNA ekstraksiyonu	Alkol	%70'lik Etanol, Absolut Etanol
	TE buffer	20 mM Tris (pH 8.0), 0.1 mM Na ₂ EDTA (pH 8.0)
<i>E. coli</i> besi yeri	LB Agar	7 g NaCl, 7 g tryptone, 3,5 g maya özütü, 1 lt distile su, tetrasiklin (15mg/ml), ampisilin (50mg/ml), 100ul IPTG (10mM), 100ul X-Gal (2%)
	LB Broth	10 g NaCl, 10 g tryptone, 5g maya özütü, 1 lt distile su, tetrasiklin (15mg/ml), ampisilin (50mg/ml)

3.4. Primerler

Çalışmada PZR ve yönlendirilmiş mutagenез için kullanılan primer dizileri Tablo 3.4'de verilmiştir.

Tablo 3.4. Primer Dizileri

İşlem	Primer	Dizi	T _m
PZR	T3	5'-AATTAACCCTCACTAAAGGG-3'	49.3°C
	T7	5'-GTAATACGACTCACTATAGGGC-3'	51.9°C
Mutagenез	Val89Leu_F	TCATGCTCTTTGTCCCTTTGACTCTCTGCATGGTG	70.6 °C
	Val89Leu_R	CACCATGCAGAGAGTCAAAGGGACAAAGAGCATGA	70.6 °C
	ile439val_F	CAGCTCTTCCAATCTCCGTCACCTTTGGGCTTGTT	71.8 °C
	ile439val_R	AACAAGCCCAAAGGTGACGGAGATTGGAAGAGCTG	71.8 °C

4.YÖNTEM

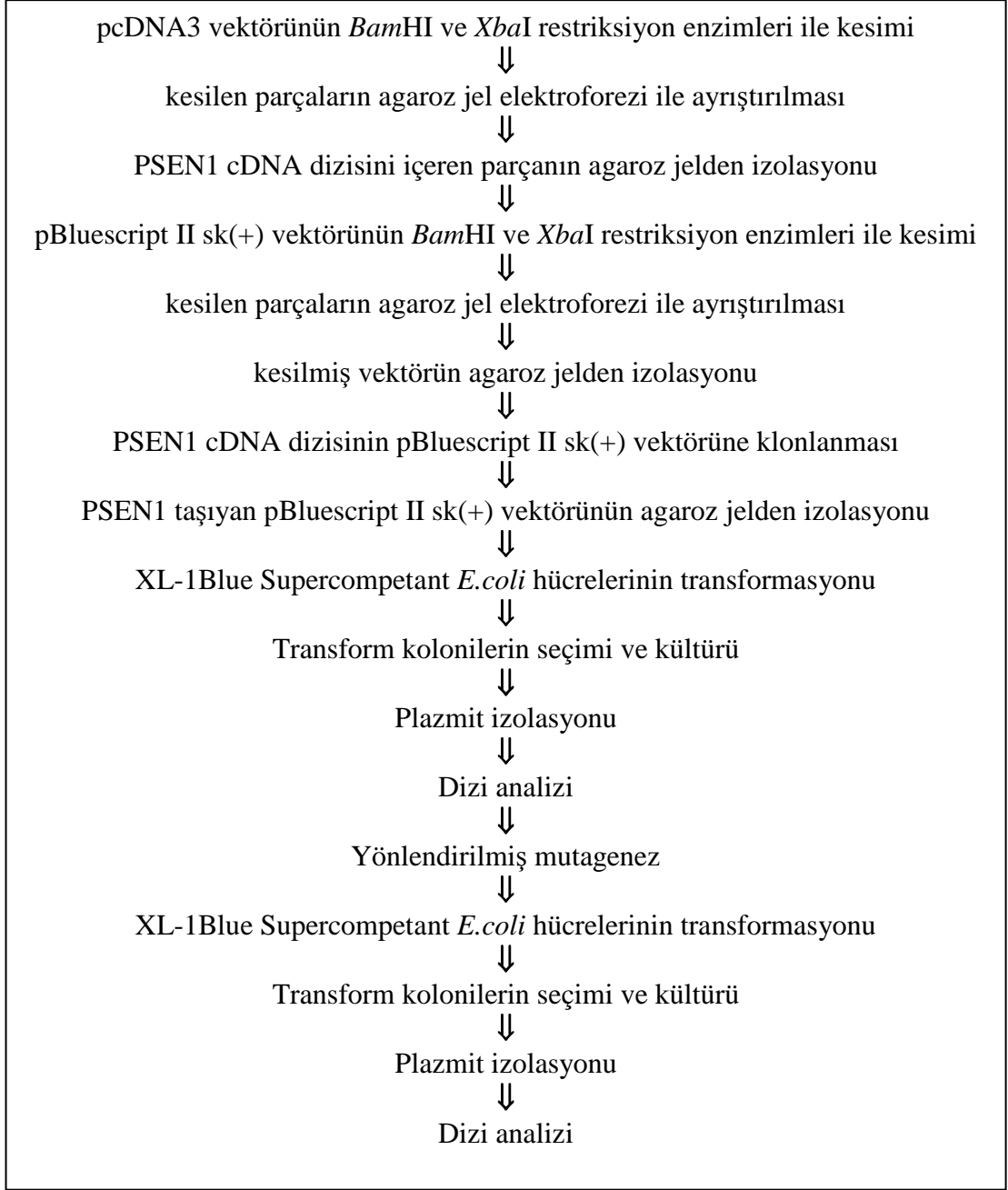
4.1. PSEN1 cDNA'sının Klonlanmasında İzlenen Yöntemin Ana Hatları

Antwerp Üniversitesi Nörojenetik Laboratuvarından sağlanan PSEN1 cDNA'sı pcDNA3 vektörü içine klonlanmıştır. Ancak 7306 baz büyüklüğünde olan bu vektör bakteri transformasyonunda, büyüklüğü nedeniyle düşük transformasyon verimine yol açmaktadır. Bu nedenle tez kapsamında pcDNA3 içinde yer alan PSEN1 cDNA dizisi bu vektörden çıkarılarak daha küçük boylu olan pBluescript II sk(+) vektörüne klonlanması amaçlandı. Kodlayıcı bölge üzerinde oluşturulmak istenilen mutasyonlar PSEN1 dizisi pBluescript II sk(+) vektörüne klonlandıktan sonra yönlendirilmiş mutagenез yöntemi ile oluşturuldu. Tez kapsamında uygulanan yöntemin ana basamakları Şekil 4.1'de gösterilmiştir.

4.2. pcDNA3 vektörünün *Bam*HI ve *Xba*I restriksiyon enzimleri ile kesilmesi

1ng pcDNA3 vektörü 10 ünite *Bam*HI restriksiyon enzimi ile 37°C'de 3 saat boyunca kesildi. Reaksiyon karışımı 1 µl pcDNA3 çözeltisi, 1,5 µl reaksiyon tampon çözeltisi, 0,2 µl *Bam*HI enzimi, 17,3 µl ddH₂O ile hazırlandı. Kesim sonrası ürünler %0,7'lik agaroz jelde 150 V'ta 35dk yürütüldü. Kesilmiş vektör bandı UV ışığında agaroz jelden bistüri ile kesilerek 1,5ml'lik eppendorf tüpe konuldu. Plazmit izolasyon kiti (Agarose Gel DNA Extraction Kit, Roche) kullanılarak agaroz jelden izole edildi. İzole edilen vektör 15µl ddH₂O içinde çözüldü.

*Bam*HI ile kesilmiş olan vektör 10 ünite *Xba*I restriksiyon enzimi ile 37°C'de 3 saat boyunca kesildi. Reaksiyon çözeltisi 15µl ddH₂O içinde çözülmüş vektör çözeltisi, 1 µl *Xba*I enzimi, 2 µl reaksiyon tampon çözeltisi ve 2 µl ddH₂O ile hazırlandı. Kesim sonrası ürünler %0,7'lik agaroz jelde 150 V'ta 35dk yürütüldü.



Şekil 4.1. Tez kapsamında kullanılan yöntemin ana basamakları.

PSEN1 dizisini taşıyan DNA bandı UV ışığında agaroz jelden birstüri ile kesilerek 1,5ml'lik eppendorf tüpe konuldu. Plazmit izolasyon kiti (Agarose Gel DNA Extraction Kit, Roche) kullanılarak agaroz jelden izole edildi. İzole edilen vektör 15µl ddH₂O içinde çözüldü.

4.3. pBluescript II sk(+) vektörünün BamHI ve XbaI enzimleri ile kesilmesi

1ng pBluescript II sk(+) vektörü 10 ünite BamHI restriksiyon enzimi ile 37°C'de 3 saat boyunca kesildi. Reaksiyon karışımı 1 µl pBluescript II sk(+) çözeltisi, 1,5 µl reaksiyon tampon çözeltisi, 0,2 µl BamHI enzimi, 17,3 µl ddH₂O ile hazırlandı. Kesim sonrası ürünler %0,7'lik agaroz jelde 150 V'ta 35dk yürütüldü. Kesilmiş vektör bandı UV ışığında agaroz jelden bistüri ile kesilerek 1,5ml'lik eppendorf tüpe konuldu. Plazmit izolasyon kiti (Agarose Gel DNA Extraction Kit, Roche) kullanılarak agaroz jelden izole edildi. İzole edilen vektör 15µl ddH₂O içinde çözüldü.

BamHI ile kesilmiş olan vektör 10 ünite XbaI restriksiyon enzimi ile 37°C'de 3 saat boyunca kesildi. Reaksiyon çözeltisi 15µl ddH₂O içinde çözülmüş vektör çözeltisi, 1 µl XbaI enzimi, 2 µl reaksiyon tampon çözeltisi ve 2 µl ddH₂O ile hazırlandı. Kesim sonrası ürünler %0,7'lik agaroz jelde 150 V'ta 35dk yürütüldü. Kesilmiş vektör bandı UV ışığında agaroz jelden bistüri ile kesilerek 1,5ml'lik eppendorf tüpe konuldu. Plazmit izolasyon kiti (Agarose Gel DNA Extraction Kit, Roche) kullanılarak agaroz jelden izole edildi. İzole edilen vektör 15µl ddH₂O içinde çözüldü.

4.4. PSEN1 cDNA dizisinin pBluescript II sk(+) vektörüne klonlanması

Kesildikten sonra agaroz jelden izole edilmiş pBluescript II sk(+) vektörü 1U Calf Intestinal Phosphatase (Roche) ve 2µl 10X reaksiyon tampon çözeltisi ile 37°C'de 1 saat inkübe edilerek 5' uçlarının fosfat köklerinin koparılması sağlandı. İnkübasyon sonrasında reaksiyon tüpü 65°C'de 15 dk. bekletilerek enzimin deaktive olması sağlandı. Vektör PZR pürifikasyon kiti (High Pure PCR product Purification Kit, Roche) kullanılarak saflaştırıldı ve 15µl ddH₂O içinde çözüldü.

Ligasyon reaksiyonu için 2µl vektör vektör(0.1 µg), 3µl insert (0,2µg), 1µl ATP (10mM), 1µl 10X ligaz tampon çözeltisi, 0,5µl T4 DNA ligaz (4U/µl) ve 2,5µl ddH₂O karıştırılarak 4°C'de gece boyu inkübe edildi. Elde edilen ürün miktarı çok düşük olduğu için PSEN1 geni taşıyan vektör agaroz jelden izole edilmeden, reaksiyon solüsyonu doğrudan transformasyon için kullanıldı.

4.5. XI-1 hücrelerinin transformasyonu

XL-1 Blue Super Competant *E.coli* hücreleri PSEN1 içeren pBluescript vektörü ile transform edildi. Bu aşamada kontrol amaçlı olarak PSEN1 içermeyen vektörle transform edilen *E. coli* hücrelerinin ve transform olmamış *E. coli* hücrelerinin de ekimi yapıldı. Her bir transformasyon ayrı ayrı 15ml'lik falkon tüpler içinde gerçekleştirildi. -80C'de saklanan stok XL-1 Blue hücreleri buz üzerinde çözüldü. Önceden buz üzerinde soğutulmuş olan falkon tüplerden 1.tüpe 100µl XL-1 Blue hücresi ve 1µl pBluescript, 2. tüpe 100µl XL-1 Blue hücresi ve 15µl PSEN1 içeren pBluescript vektör çözeltisi, 3. tüpe ise sadece 100µl XL-1 Blue hücresi konuldu. Buz üzerinde ısıtılmadan karıştırılan tüpler yine buz üzerinde 30dk bekletildi. Ardından 42°C su banyosunda 45sn bekletildikten sonra, hemen buza konarak 2dk bekletildi. Daha sonra tüplere önceden 37°C'ye ısıtılmış SOC besi yerinden 900µl eklenerek 37°C'de 1 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında her tüpten 200µl hücre kültürü ampisilin, IPTG ve X-Gal içeren katı agar besiyerlerine ekilerek 37°C'de gece boyu inkübe edildi.

4.6. XI-1 Transform bakterilerden plazmit izolasyonu

Agar plate üzerinde seçilen koloni steril öze yardımıyla 10ml'lik ampisilinli sıvı LB içeren falkon tüpe aktarıldı. 37°C'de 4 saat inkübasyon sonrasında falkonlar 4°C'de 5000g'de 10 dakika santrifüj edildi.

İzolasyon için Qiagen firmasının DNA İzolasyon Mini Kit ürünü kullanıldı. Santrifüj sonrasında süpernatant atılıp pellet üzerine toplam 4ml RNaz ve RNaz süspansiyonu eklenip yavaşça çalkalandı. Tübün içine 4ml lizis tamponu eklenerek 6 ila 8 kez alt üst edilerek karıştırıldı ve oda sıcaklığında 3 dakika inkübe edildi. Süspansiyonun içine daha evelden soğutulmuş olan nötralizasyon tamponundan 4ml eklendi, zaman kaybetmeden süspansiyon alt üst edilerek homojen hale gelinceye kadar yavaşça karıştırıldı ve hemen ardından 5 dakika buz üzerinde inkübe edildi. Solüsyonun mat beyaz hale geldiği gözlemlendi. Katlanmış filtre kağıtlarından her biri, temiz falkonlar üzerine dengeli bir şekilde konuldu ve filtre kağıtları az bir miktar denge tamponu ile ıslatıldı. Mat beyaz haldeki süspansiyonlar filtre kağıtları üzerine dikkatli bir şekilde dökülerek süspansiyonun tamamının filtre kağıdının

altında bulunan temiz falkon tüplerine geçmesi beklenildi. Bu sırada yeni temiz falkon tüplerine filtreli kolonlar yüzüklerle sabitlendi. Kolonların filtreleri 2.5ml denge tamponu ile dengelendi. Süspansiyon kolona döküldü ve alttaki temiz tübe tüm süspansiyonun geçmesi beklenildi. Kolon 5ml yıkama tamponu ile yıkandı böylece hedef plazmid harici moleküller kolondan uzaklaştırıldı. Kolon yeni bir falkona yerleştirilerek daha önceden 50°C sıcaklığa çıkarılmış olan 2.5ml elüsyon tamponu ile yıkandı. Bu işlem ikinci kez tekrarlandı. Falkondaki solüsyon istenilen hedef plazmidleri içermektedir. Elde edilen plazmidler oda sıcaklığında 3.6ml izopropanol ile presipite edildi. Hemen ardından 60 dakika boyunca, 13000g'de, 4°C'de santrifüj yapıldı. Santrifüj sonrası süpernatant dikkatlice uzaklaştırıldı. Plazmidler daha önceden soğutulmuş 3ml 70% etanol ile 20 dakika 13000g'de, 4°C'de santrifüj edildi. Santrifüj sonrası etanol uzaklaştırılarak tüplerin dibinde kalan pellet yaklaşık 10 dakika süreyle kurutuldu. Plazmid DNA'sı içeren her bir tüpteki pellet üzerine 50µl TE tampon çözeltisi eklenildi. Elde edilen DNA çözeltisinin 2µl'si %0,7'lik agaroz jelde yürütülerek kalitesine bakıldı.

4.7.Dizi analizi

PSEN1 cDNA dizisinin pBluescript vektörüne istenildiği gibi klonlanıp klonlanmadığı DNA dizi analizi ile belirlendi. Elde edilen vektör çözeltisinden 10µl'si pBluescript çoklu klonlama bölgesinin 5' tarafında bulunan T7 ve 3' tarafında bulunan T3 primerleri ile birlikte dizi analizi için MACROGEN (Güney Kore) firmasına gönderildi. Dizi analizi her iki taraftan da gerçekleştirildi. Analiz sonuçları Chormas Pro (Technesium) programı ile değerlendirildi.

4.8.PSEN1 cDNA'sı Üzerinde Yönlendirilmiş Mutasyon Oluşturma

PSEN1 CDNA'sı üzerinde Val89Leu ve Ile439Val mutasyonları oluşturmak için QuikChange® XL Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratgene) kullanıldı. Yönlendirilmiş mutagenез reaksiyonu 5 µl reaksiyon tampon çözeltisi, 5µl PSEN1 içeren pBluescript vektör çözeltisi, 2 µl düz primer, 2 µl ters primer, 1 µl dNTP karışımı, 3 µl QuickSolution, 32 µl ddH₂O ve 1 µl *PfuTurbo* polimeraz enzimi ile hazırlandı. Yönlendirilmiş mutagenез reaksiyonunun kontrolü için ayrı bir reaksiyon

tüpü hazırlandı. Bu tüp içine pBlueScript ve PSEN1 primerleri yerine pWhiteScript (2 µl) ve kontrol primerleri (her birinden 1,25 µl) konuldu. Bu kontrol primerler, pWhiteScript üzerinde bulunan LacZ geninde yer alan STOP kodon mutasyonunu düzelterek pWhiteScript dizisini pBlueScript dizisine çevirmektedir. Yönlendirilmiş mutagenез reaksiyonu başarılı bir şekilde uygulanırsa bu vektörle transform edilen *E. coli* hücreleri beyaz yerine mavi koloniler oluşturur.

Hazırlanan tüpler polimeraz zincir reaksiyonu aletine konularak TABLO 4.1’de verilen çevrim protokolüne göre mutant zincir sentezi sağlandı.

Tablo 4.1. Yönlendirilmiş mutagenез için PZR protokolü.

Segment	Çevrim	Sıcaklık	Zaman
1	1	95°C	1 dk
2	18	95°C	50 sn
		60°C	50 sn
		68°C	6 dk
3	1	68°C	7 dk

Yönlendirilmiş mutagenез sonucunda yeni sentezlenen DNA zincirleri mutasyon taşır ancak kalıp olarak kullanılan zincirler wild-type dizi içerir ve ortamdan uzaklaştırılmaları gerekir. Bu nedenle mutagenез sonucunda elde edilen çözeltiliye 1 µl (10 ünite) *DpnI* restriksiyon enzimi eklenerek 37°C’de 1 saat inkübe edildi. *DpnI* metillenmiş DNA üzerinde bulunan 5’-Gm6ATC-3’ dizilerini tanır ve A-T arasından düz uçlu keser. Bu şekilde metilli olan kalıp DNA zinciri parçalanırken, yeni sentezlenen mutant DNA zinciri tek parça olarak kalır.

XL-1 Blue hücreleri Bölüm 4.5’de anlatıldığı gibi *DpnI* ile kesilen vektörlerle transform edildi ve ampisilin, IPTG ve X-Gal içeren plate’lere ekilerek gece boyu inkübe edildi.

4.9. XL-1 Transform bakterilerden mutant plazmit izolasyonu ve DNA dizi analizi

Mutasyon taşıdığı düşünülen transform bakteri kolonilerinden Bölüm 4.6’da anlatıldığı gibi plazmit izole edildi ve %0,7’lik agaroz jelde kalitesi kontrol edildi. Mutant plazmitin 10 µl’si mutasyonu çevreleyen primerlerle birlikte MACROGEN

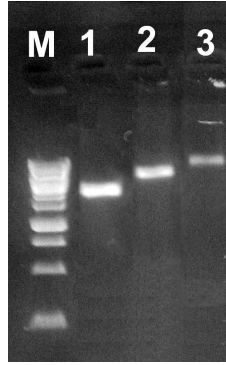
(Güney Kore) firmasının gönderildi, mutasyonlu bölgenin her iki taraftan da dizi analizi yapıldı. Analiz sonuçları Chormas Pro (Technesium) programı ile değerlendirildi.

5. SONUÇ:

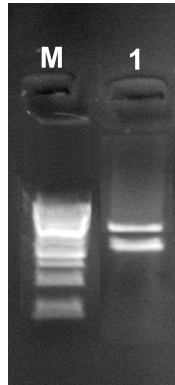
Mutasyona uğradıklarında Erken Başlangıçlı Ailesel Alzheimer Hastalığına neden olan üç gen bilinmektedir; PSEN1, PSEN2, APP. APOE geninde görülen E4 alelinin ise hastalık için risk faktörü olduğu hemen hemen tüm toplumlarda gösterilmiştir. Hastalığın patalojinde önemli rol oynayan Amiloid-Beta peptidlerinin sekretaz enzimleri tarafından yanlış kırılmaları neticesinde oluştuğu düşünülmektedir. PSEN1 ve PSEN2 genlerinin kodlayıcı bölgelerinde oluşan mutasyonların toplam A β miktarını değiştirmese de, A β 42 oranında artışa neden olduğu savunulmaktadır. Ancak bazı nokta mutasyonları üzerine hücre kültürlerinde yapılan çalışmalarda A β 42 artışı gözlenmemiştir. Bu durum, PSEN mutasyonlarının farklı mekanizmalarla hastalığa yol açabileceğini düşündürmektedir. Literatürde bu konudaki deneysel çalışmalar yetersizdir. PSEN mutasyonlarının hastalığın mekanizmasındaki rolünün anlaşılabilmesi için PSEN mutasyonu taşıyan hücre kültürlerine ihtiyaç duyulmaktadır. Bu tez kapsamında laboratuvarımızda PSEN1 geninin klonlanması, yönlendirilmiş mutagenез ile farklı mutasyonlara sahip vektörler oluşturulması amaçlanmıştır.

Bu tez çalışması sonucunda PSEN1 cDNA'sı pBluescript II sk(+) vektörünün *Bam*HI ve *Xba*I kesim noktaları arasına klonlanmıştır (Şekil 5.1-5.3). İnsert pBluescript vektörü üzerinde bulunan LacZ geni içine klonlanmış olduğu için, insert taşıyan vektör ile transformasyona uğramış olan XL-1 Blue *E. coli* hücreleri alfa komplementasyon gösteremedikleri için besi yerinde bulunan X-Gal'ı metabolize edememiş ve beyaz renkli koloniler oluşturmuştur (Şekil 5.4 ve 5.5). Her ne kadar ligasyon öncesi vektörün 5' fosfat grupları fosfataz ile kesilmiş olsa da bu işlemin tam olarak gerçekleşmediği transformasyon sonrasında ortaya çıkan mavi kolonilerden anlaşılmaktadır. Transformasyon veriminin düşük olduğu görülmüştür. Beyaz kolonilerin hedef inserti içerdiği DNA dizi analizi ile kanıtlanmıştır (Şekil 5.6). PSEN1 cDNA'sı üzerinde Val89Leu (Şekil 5.7) ve Ile439Val (Şekil 5.8) mutasyonları yönlendirilmiş mutagenез ile başarıyla oluşturulmuştur. İnsert içeren vektör saflaştırılarak stok solüsyon halinde -80°C'de ileriki çalışmalar için saklanmaktadır. Ayrıca bu vektörü taşıyan XL-1 Blue *E. coli* hücreleri de kompetan hale getirilerek -80°C'de depolanmıştır.

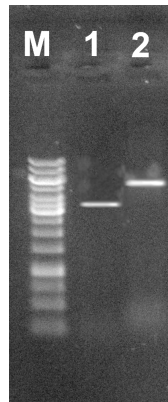
Oluşturulan bu iki sürekli anlamlı mutasyon daha sonra ökaryotik hücre kültürlerinde ekspresyon analizi için kullanılabilir. Protein ekspresyonu neticesinde A β 42 seviyesinde herhangi bir artış olup olmadığı saptanıp, bu durumun erken başlangıçlı AH üzerindeki etkisi tartışılabilir.



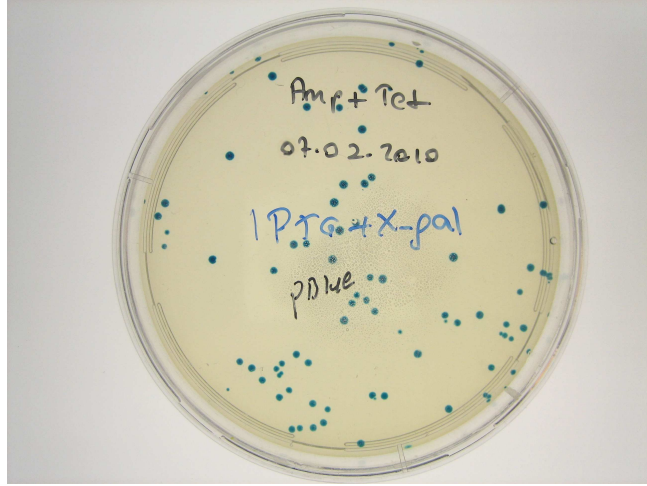
Şekil 5.1. pcDNA3 ve pBlueScript II sk (+) vektörlerini BamHI restriksiyon enzimi ile kesilmesi. M) 1 kb Markör; 1) Kesilmiş pBlueScript II sk (+); 2) kesilmiş pcDNA3, 3) kesilmemiş pcDNA3.



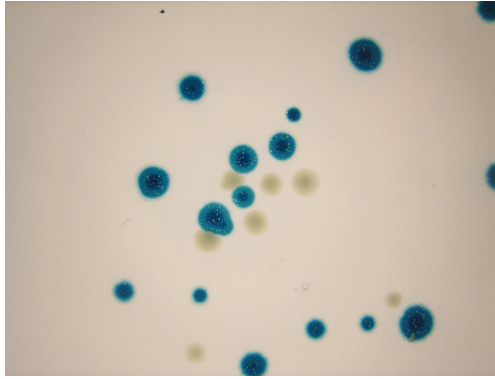
Şekil 5.2.. BamHI ile kesildikten sonra XbaI restriksiyon enzimi ile ikinci kez kesilen pcDNA3 vektörü. M) 1kb Markör, 1) kesilmiş pcDNA3 vektörü, alt bant PSEN1 taşıyan insert.



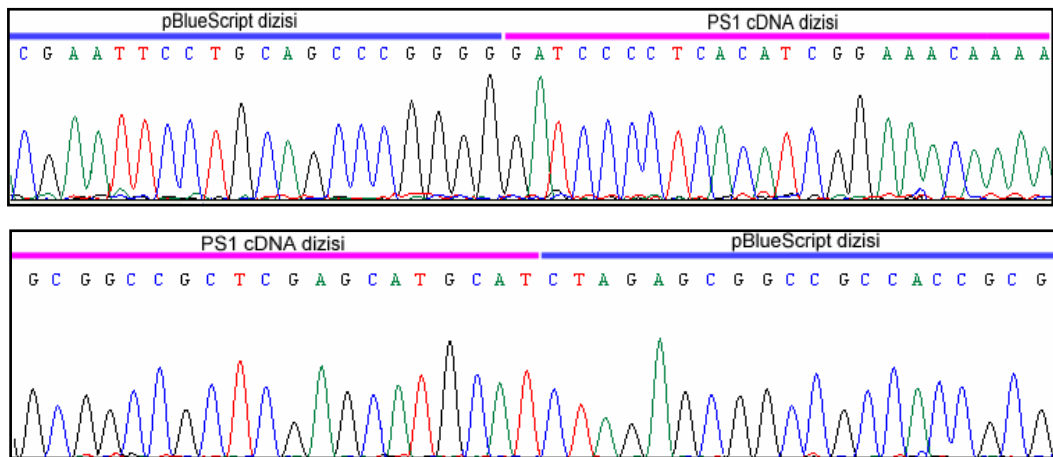
Şekil 5.3. PSEN1 insertinin pBlueScript II sk (+) vektörüne klonlanması. M) 1kb Markör; 1) Kesik pBlueScript; 2) İnsert almış pBlueScript.



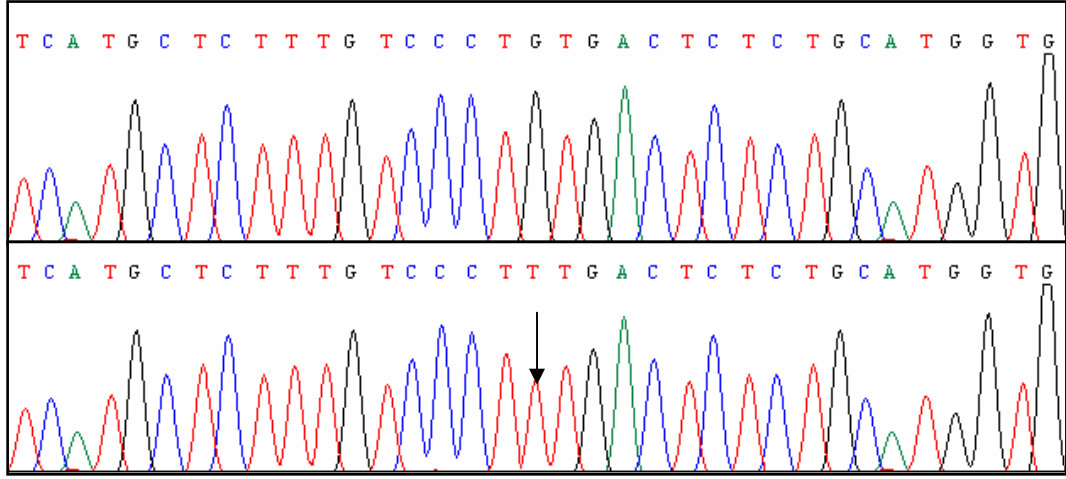
Şekil 5.4. pBlueScript II sk (+) vektörü ile transformasyona uğramış XL-1 Blue *E. coli* kolonileri.



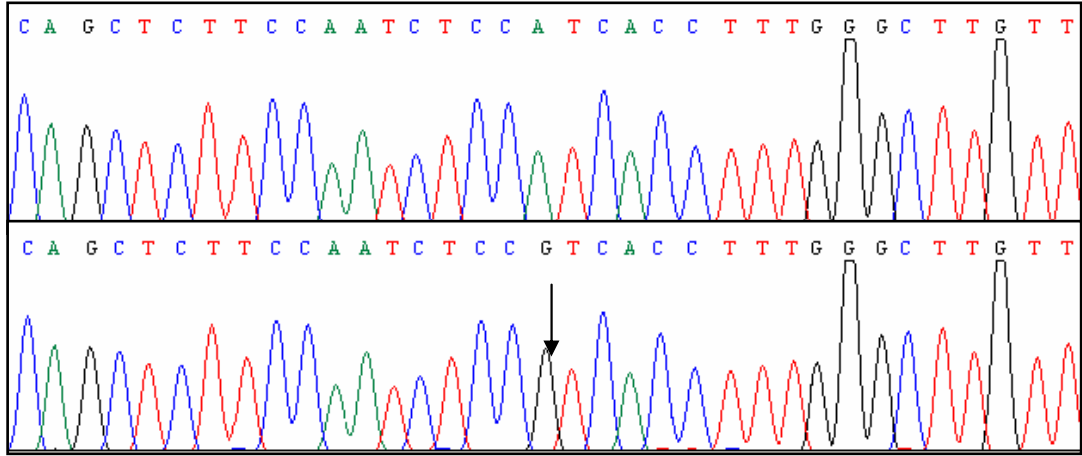
Şekil 5.5. Beyaz koloni oluşumu. PSEN1 inserti içeren pBlueScript II sk (+) vektörü ile transformasyona uğramış XL-1 Blue *E. coli* kolonilerinin lacZ geninin çalışmaması nedeniyle oluşan koloniler beyazdır.



Şekil 5.6. PSEN1 taşıyan pBlueScript II sk (+) vektörünün dizi analizi. Üst panel PSEN1 cDNA dizisinin başladığı 5' taraf, alt panel PSEN1 cDNA dizisinin bittiği 3' taraf.



Şekil 5.7.. PSEN1 cDNA dizi üzerinde oluşturulan Val89Leu mutasyonu. Üst panel wild-type dizi, alt panel mutant dizi, ok mutasyonun yeri.



Şekil 5.8.. PSEN1 cDNA dizi üzerinde oluşturulan Ile439Val mutasyonu. Üst panel wild-type dizi, alt panel mutant dizi, ok mutasyonun yeri.

KAYNAKLAR

Amtul, Z., Lewis, P.A., Piper, S., Crook, R., Baker, M., Findlay, K., Singleton, A., Hogg, M., Younkin, L., Younkin, S.G., Hardy, J., Hutton, M., Boeve, B.F., Tang-Wai D., Golde, T.E. (2002). A presenilin 1 mutation associated with familial frontotemporal dementia inhibits gamma-secretase cleavage of APP and notch, *Neurobiol. Dis.* 9: 269-273.

Bacsikai B.J., Klunk W.E., Mathis C.A., Hyman B.T. (2002). Imaging amyloid-beta deposits in vivo, *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 22: 1035-1041.

Berezovska O., Jack C., McLean P., Aster J.C., Hicks C., Xia W., Wolfe M.S., Weinmaster G., Selkoe D.J., Hyman B.T. (2000). Rapid Notch1 nuclear translocation after ligand binding depends on presenilin-associated gamma-secretase activity, *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 920: 223-226.

Borchelt D.R., Thinakaran G., Eckman C.B., Lee M.K., Davenport F., Ratovitsky T., Prada C.M., Kim G., Seekins S., Yager D., Slunt H.H., Wang R., Seeger M., Levey A.I., Gandy S.E., Copeland N.G., Jenkins N.A., Price D.L., Younkin S. G., Sisodia S.S. (1996). Familial Alzheimer's disease-linked presenilin 1 variants elevate Abeta 1-42/1-40 ratio in vitro and in vivo, *Neuron* 17: 1005-1013.

Brooks W.S., Martins R.N., De Voecht J., Nicholson G.A., Schofield P.R., Kwok J.B., Fisher C., Yeung L.U., Van Broeckhoven C. (1995). A mutation in codon 717 of the amyloid precursor protein gene in an Australian family with Alzheimer's disease, *Neurosci. Lett.* 199: 183-186.

Campion D., Brice A., Hannequin D., Charbonnier F., Dubois B., Martin C., Michon A., Penet C., Bellis M., Calenda A., Martinez M., Agid Y., Clerget-Darpoux F. (1996). French Alzheimer's disease study group, *J. Med. Genet.* 33: 661-664.

Cao X., Sudhof T.C. (2001). A transcriptionally active complex of APP with Fe65 and histone acetyltransferase Tip60, *Science* 293: 115-120.

Chatrier-Harlin M.C., Crawford F., Houlden H., Warren A., D. Hughes, L. Fidani, Goate A., Rossor M., Roques P., Hardy J. (1991). Early-onset Alzheimer's disease caused by mutations at codon 717 of the beta-amyloid precursor protein gene, *Nature* 353: 844-846.

Chui H.C., Tierney M., Zarow C., Lewis A., Sobel E., Perimutter L.S. (1993). Neuropathologic diagnosis of Alzheimer disease: interrater reliability in the assessment of senile plaques and neurofibrillary tangles, *Alzheimer Dis. Assoc. Disord.* 7: 48-54.

Citron M., Westaway D., Xia W., Carlson G., Diehl T., Levesque G., Johnson-Wood K., Lee M., Seubert P., Davis A., Kholodenko D., Motter R., Sherrington R., Perry B., Yao H., Strome R., Lieberburg I., Rommens J., Kim S., Schenk D., Fraser P., St George-Hyslop P., Selkoe D.J. (1997). Mutant presenilins of Alzheimer's disease increase production of 42-residue amyloid beta-protein in both transfected cells and transgenic mice, *Nat. Med.* 3: 67-72.

Clark R.F., Hutton M., Fuldner R.A., Froelich S., Karan E., Talbot C., Crook R., Lendon C., Prihar G., He C., Korenblat K., Martinez A., Wragg M., Busfield F., Behrens M.I., Myers A., Norton J., Morris J., Mehta N., Pearson C., Lincoln S., Baker M., Duff K., Zehr C., Perez-Tur J., Houlden H., Ruiz A., Ossa J., Lopera F., Acros M., Madrigal L., Collinge J., Humphreys C., Asworth A., Sarnes S., Fox N., Harvey R., Kennedy A., Roques P., Cline R.T., Philips C.A., Venter J.C., Forsell L., Axemann K., Lilius L., Johnston J., Cowburn R., Viitanen M., Winblad B., Kosik K., Haltia M., Pöyhönen M., Dickson D., Mann D., Neary D., Snowden J., Lantos P., Lannfelt L., Rossor M., Roberts G.W., Adams M.D., Hardy J., Goate A. (1995). The structure of the presenilin1 (S182) gene and identification of six novel mutations in early onset AD families, *Nat. Genet.* 11: 219-222.

Corbo R.M., Scacchi R. (1999). Apolipoprotein E (ApoE) allele distribution in the world: is APOE*4 a 'thrifty' allele? *Ann. Hum. Genet.* 63: 301-310.

Corder E., Saunders A., Risch N., Strittmatter W., Schmechel D., Gaskell P., Rimmler J., Locke P., Conneally P., Schmader K., Small G., Roses A., Haines J., Pericak-Vance M. (1994). Protective effect of apolipoprotein E type 2 allele for late onset Alzheimer disease, *Nat. Genet.* 7: 180-184.

Corder E.H., Saunders A.M., Strittmatter W.J., Schmechel D., Gaskell P., Rimmler J., Locke P., Conneally P., Schmader K., Small G., Roses A., Haines J., Pericak-Vance M. (1994). Protective effect of apolipoprotein E type 2 allele for late onset Alzheimer Disease, *Nat. Genet.* 7: 180-184.

Corder E.H., Saunders A.M., Strittmatter W.J., Schmechel D.E., Gaskell P.C., Small G.W., Roses A.D., Haines J.L., Pericak-Vance M.A. (1993). Gene dose of apolipoprotein E type ϵ 4 allele and the risk of Alzheimer' disease in late onset families, *Science* 261: 921-923.

Crook R., Verkkoniemi A., Perez-Tur J., Mehta N., Baker M., Houlden H., Farrer M., Hutton M., Lincoln S., Hardy J., Gwinn K., Somer M., Paetau A., Kalimo H., Ylikoski R., Poyhonen M., Kucera S., Haltia M. (1998). A variant of Alzheimer's

disease with spastic paraparesis and unusual plaques due to deletion of exon 9 of presenilin 1, *Nat. Med.* 4: 452-455.

Cruts M., Van Dujin C.M., Backhovens H., Van den Broeck M., Wehnert A., Serneels S., Sherrington R., Hutton M., Hardy J., St George-Hyslop P.H., Hofman A., Van Broeckhoven C. (1998). Estimation of the genetic contribution of presenilin-1 and -2 mutations in a population-based study of presenile Alzheimer disease, *Hum. Mol. Genet.* 7: 43-51.

Esler W.P., Kimberly W.T., Ostaszewski B.L., Dielh T.S., Moore C.L., Tsai J.Y., Rahmati T., Xia W., Selkoe D.J., Wolfe M.S. (2000). Transition-state analogue inhibitors of gamma-secretase bind directly to presenilin-1, *Nat. Cell. Biol.* 2: 428-434.

Fidani L., Rooke K., Chartier-Harlin M.C., Hughes D., Tanzi R., Mullan M., Roques P., Rossor M., Hardy J., Goate A. (1992). Screening for mutations in the open reading frame and promoter of the beta-amyloid precursor protein gene in familial Alzheimer's disease: identification of a further family with APP717 Val→Ile, *Hum. Mol. Genet.* 1: 165-168.

Funickh U., Muller-Thomsen T., Mann U., Eggers C., Marksteiner J., Meins W., Binetti G., Alberici A., Hock C., Nitsch R.M., Gal A. (2000). High prevalence of pathogenic mutations in patients with early-onset dementia detected by sequence analyses of four different genes, *Am. J. Hum. Genet.* 66: 110-117.

Goate A., Chartier-Harlin M.C., Mullan M., Brown J., Crawford F., Fidani L., Giuffra L., Haynes A., Irving N., James L., Mant R., Newton P., Rooke K., Roques P., Talbot C., Pericak-Vance M., Roses A., Williamson R., Rossor M., Owen M., Hardy J. (1991). Segregation of a missense mutation in the amyloid precursor protein gene with familial Alzheimer's disease, *Nature* 349: 704-706.

Goldgaber D., Lerman M.I., McBride O.W., Saffiotti U., Gajdusek D.C. (1987). Characterization and chromosomal localization of cDNA encoding brain amyloid of Alzheimer's disease, *Science* 235: 877-880.

Guillozet A.L., Smiley J.F., Mash D.C., Mesulam M.M. (1997). Butyrylcholinesterase in the life cycle of amyloid plaques, *Ann. Neurol.* 42: 909-918.

Haass C., De B. (1999). Strooper, The presenilins in Alzheimer's disease-proteolysis holds the key, *Science* 286: 916-919.

Hardy J. (1997). Amyloid the presenilins and Alzheimer's disease, *Trends Neurosci.* 20: 154-159.

Hendriks L., Van Dujin C.M., Cras P., Cruts M., Van Hul W., Van Harskamp F., Warren A., McInnis M.G., Antonarakis S.E., Martin J.J., Hofman A., Van

BRoeckhoven C. (1992). Presenile dementia and cerebral haemorrhage linked to a mutation at codon 692 of the beta-amyloid precursor protein gene, *Nat. Genet.* 1: 218-221.

<http://mayoresearch.mayo.edu/mayo/research/mcj/Amyloid.cfm>

<http://www.alzforum.org/res/com/mut/pre/diagram2.asp>

<http://www.fermentas.com>

<http://www.med.nyu.edu/barlow/images/apoe.jpg>

<http://www.nature.com/embor/journal/v8/n2/full/7400899.html>

<http://www.uic.edu/depts/mcne/founders/page0002.html>

Kitaguchi N., Takahashi Y., Tokushima Y., Shiojiri S., Ito H. (1988). Novel precursor of Alzheimer's disease amyloid protein shows protease inhibitory activity, *Nature* 331: 530-532.

Klunk W.E., Engler H., Nordberg A., Wang Y., Blomqwist G., Holt G.P. et al. (2004). Imaging brain amyloid in Alzheimer's disease with Pittsburg compound-B, *Annals of Neurology*, 55:306-319.

Koo E.H., Squazzo S.L. (1994). Evidence that production and release of amyloid beta-protein involves the endocytic pathway, *J. Biol. Chem.* 269: 17386-17389.

Kovaks D.M., Fausett H.J., Page K.J., Kim T.W., Moir R.D., Merriam D.E., Hollister R.D., Hallmark O.G., Mancini R., Felsenstein K.M., Hyman B.T., Tanzi R.E., Wasco W. (1996). Alzheimer-associated presenilins 1 and 2: neuronal expression in brain and localization to intracellular membranes in mammalian cells, *Nat. Med.* 2: 224-229.

Lendon C.L., Talbot C.J., Craddock N.J., Han S.W., Wragg M., Morris J.C., Goate A.M. (1997). Genetic association studies between dementia of the Alzheimer's type and three receptors for apolipoprotein E in a Caucasian population, *Neurosci. Lett.* 222: 187-190.

Levy-Lahad E., Lahad A., Wijsman E.M., Bird T.D., Schellenberg G.D. (1995). Apolipoprotein E genotypes and age of onset in early-onset familial Alzheimer's disease, *Ann. NEurol.* 38: 678-680.

Levy-Lahad E., Wasco W., Poorkaj P., Romano D.M., Oshima J., Pettigell W.H., Yu C., Jondro P.D., Schmidt S.D., Wang K., Crowley A.C., Fu Y.-H., Gunette S.y., Galas D., Nemens E., Wijsman E.M., Bird T.D., Schellenberg G.D., Tanzi R.E. (1995). Candidate gene for chromosome 1 familial Alzheimer's disease locus, *Science* 269: 973-977.

- Lusis A.J., Heinzmann C., Sparkes R.S., Scott J., Knott T.J., Geller R., Sparkes M.C., Mohandas T. (1986). Regional mapping of human chromosome 19: organization of genes for plasma lipid transport (APOC1; -C2; and -E and LDLR) and the genes C3; PEPD; and GPI, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 83: 3929-3933.
- Mahley R. W. (1988). Apolipoprotein E: cholesterol transport protein with expanding role in cell biology, *Science* 240: 622-630.
- Mahley R.W., Rall Jr. S.C. (2000). Apolipoprotein E: far more than a lipid transport protein, *Ann. Rev. Genomics Hum. Genet.* 1: 507-537.
- Mann D.M. (1985). The pathological association between Down syndrome and Alzheimer's disease, *Mech. Age Dev.* 43: 99-136.
- Mann D.M. (1998). Alzheimer's disease and Down's syndrome, *Histopathology* 13: 125-127.
- Matsumura Y., Kitamura E., Myoshi K., Yamamoto Y., Furuyama J., Sugihara T. (1996). Japanese siblings with missense mutation (717 Val→Ile) in amyloid precursor protein of early-onset Alzheimer's disease, *Neurology* 46: 1721-1723.
- Milward E.A., Papadopoulos R., Fuller S.J., Moir R.D., Small D., Beyreuther K., Masters C.L. (1992). The amyloid protein precursor of Alzheimer's disease is a mediator of the effects of nerve growth factor on neurite outgrowth, *Neuron* 9: 129-137.
- Mori H. (2000). Untangling Alzheimer's disease from fibrous lesions of neurofibrillary tangles and senile plaques, *Neuropathology* 20: s55-s60.
- Mullan M., Crawford F., Axelman K., Houlden H., Lilius L., Winblad B., Lannfelt L. (1992). A pathogenic mutation for probable Alzheimer's disease in the APP gene at the N-terminus of β -amyloid, *Nat. Genet.* 1: 345-347.
- Murrell J., Farlow M., Ghetti B., Benson M.D. (1991). A mutation in the amyloid precursor protein associated with hereditary Alzheimer's disease, *Science* 254: 97-99.
- Murrell J.R., Hake A.M., Quaid K.A., Farlow M.R., Ghetti B. (2000). Early-onset Alzheimer's disease caused by a new mutation (V717L) in the amyloid precursor protein gene, *Neurol.* 57: 885-887.
- Nishimoto I., Okamoto T., Matsuura Y., Takahashi S., Okamoto T., Murayama Y., Ogata E. (1993). Alzheimer amyloid protein precursor complexes with brain GTP-binding protein G(o), *Nature* 362: 75-79.
- Payami H., Zarepari S., Montee K.R., Sexton G.J., Kaye J.A., Bird T.D., Yu C.E., Wijisman E.M., Heston L.L., Litt M., Schellenberg G.D. (1996). Gender difference in

apolipoprotein E- associated risk for Alzheimer's disease: a possible due to the higher incidence of Alzheimer disease in women, *Am. J. Hum. Genet.* 58: 803-811.

Pellegrini L., Passer B.J., Tabaton M., Ganjei J.K., D'Adamio L. (1999). Alternative non-secretase processing of Alzheimer's beta-amyloid precursor protein during apoptosis by caspase-6 and -8, *J. Biol. Chem.* 274: 21011-21016.

Perez-Tur J., Froelich S., Prihar G., Crook R., Baker M., Duff K., Wragg M., Busfield F., Lendon C., Clark R.F., Roques P., Fuldner R.A., Johnston J., Cowburn R., Forsell C., Axelman K., Lilius L., Houlden H., Karran E., Roberts G.W., Lannfelt L., Hutton M. (1995). A mutation in Alzheimer's disease destroying a splice acceptor site in the presenilin-1 gene, *NeuroReport* 7: 297-301.

Prihar G., Fuldner R.A., Perez-Tur J., Lincoln S., Duff K., Crook R., Hardy J., Philips C.A., Venter C., Talbot C., Clark R.F., Goate A., Li J., Potter H., Karran E., Roberts G.W., Hutton M., Adams M.D. (1996). Structure and alternative splicing of the presenilin-2 gene, *NeuroReport* 7: 1680-1684.

Rogaeva E.A., Fafel K.C., Song Y.Q., Medeiros H., Sato C., Liang Y., Richard E., Rogaeve E.I., Frommelt P., Sadovnick A.D., Meschino W., Rockwood K., Boss M.A., Mayeux R., St George-Hyslop P. (2001). Screening for PS1 mutations in a referral-based series of AD cases: 21 novel mutations, *Neurology* 57: 621-625.

Saitoh T., Sundsmo M., Roch J.M., Kimura N., Cole G., Schubert D., Oltersdorf T., Schenk D.B. (1989). Secreted form of amyloid beta protein precursor is involved in the growth regulation of fibroblasts, *Cell* 58: 615-622.

Saura C.A., Tomita T., Soriano S., Takahashi M., Leem J.Y., Honda T., Koo E.H., Iwatsubo T., Thinakaran G. (2000). The nonconserved hydrophilic loop domain of presenilin (PS) is not required for PS endoproteolysis or enhanced abeta 42 production mediated by familial early onset Alzheimer's disease-linked PS variants, *J. Biol. Chem.* 275: 17136-17142.

Schellenberg G.D. (1995). Progress in Alzheimer's disease genetics, *Curr. Opin. Neurol.* 8: 262-267.

Schenk et al. (1999). Immunization with amyloid-beta attenuates Alzheimer-disease-like pathology in the PDAPP mouse. *Nature* 400: 173-177.

Selkoe D.J. (1994). Normal and abnormal biology of the beta-amyloid precursor protein, *Ann. Rev. Neurosci.* 17: 489-517.

Shastri B.S., Giblin F.J. (1999). Genes and susceptible loci of Alzheimer's disease, *Brain Res. Bull.* 48: 121-127.

Shen J., Bronson R.T., Chen D.F., Xia W., Selkoe D.J., Tonegawa S. (1997). Skeletal and CNS defects in Presenilin-1-deficient mice, *Cell* 89: 629-639.

Sherrington R., Rogaev E.I., Liang Y., Rogava E.A., Levesque G., Ikeda M., Chi H., Lin C., Li G., Holman K. (1995). Cloning of a gene bearing missense mutations in early-onset familial Alzheimer's disease, *Nature* 375: 754-760.

Siest G., Pillot G., Regis-Bailly A., Leininger-Muller B., Steinmetz J., Galteau M.-M., Visvikis S. (1995). Apolipoprotein E: an important gene and protein to follow in laboratory medicine, *Clin. Chem.* 41: 1068-1086.

Sorbi S., Nacmias B., Forleo P., Piacentini S., Amaducci L., Provinciali L. (1993). APP717 and Alzheimer's disease in Italy, *Nat. Genet.* 4: 10.

Sorbi S., Nacmias B., Piacentini S., Latorraca S., Amaducci L. (1995). Epistatic effect of APP717 mutation and apolipoprotein E genotype in familial Alzheimer's disease, *Ann. Neurol.* 38: 124-127.

St George-Hyslop P.H., Tanzi R.E., Polinsky R.J., Haines J.L., Nee L., Watkins P.C., Myers R.H., Feldman R.G., Polen D., Drachman D. (1987). The genetic defect causing familial Alzheimer's disease maps on chromosome 21, *Science* 235: 885-890.

Strittmatter W.J., Weisgraber K.H., Goedert M., Saunders A.M., Huang D, Corder E.H., Dong L.M., Jakes R., Alberts M.J., Gilbert J.R., Han S.-H., Hulette C., Einstein G., Schmechel D.E., Pericak-Vance M.A., Roses A.D. (1994). Hypothesis: microtubule instability and paired helical filament formation in the Alzheimer disease brain are related to apolipoprotein E genotype, *Exp. Neurol.* 125: 163-171.

Strittmatter W.J., Weisgraber K.H., Huang D.Y., Dong L.-M., Salvesen G.S., Pericak-Vance M., Schmechel D., Saunders A.M., Goldgaber D., Roses A.D. (1993). Binding of human apolipoprotein E to synthetic amyloid beta peptide: isoform-specific effects and implications for late-onset Alzheimer disease, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90: 8098-8102.

Sudoh S., Kawamura Y., Sato S., Wang R., Saido T.C., Oyama F., Sakaki Y., Komano H., Yanagisawa K. (1998). Presenilin 1 mutations linked to familial Alzheimer' disease increase the intracellular levels of amyloid beta-protein 1-42 and its N-terminally truncated variant(s) which are generated at distric sites, *J. Neurochem.* 71: 1535-1543.

Tanzi R.E., Gusella J.F., Watkins P.C., Bruns G.A., St George-Hyslop P., Van Keuren M.L., Patterson D., Pagan S., Kurnit D.M., Neve R.L. (1987). Amyloid beta protein gene: cDNA mRNA distribution and genetic linkage near the Alzheimer locus, *Science* 235: 880-884.

Thinakaran G., Harris C.L., Ratovitski T., Davenport F., Slunt H.H., Price D.L., Borchelt D.R., Sisodia S.S. (1997). Evidence that levels of presenilins (PS1 and PS2) are coordinately regulated by competition for limiting cellular factors, *J. Biol. Chem.* 272: 28415-28422.

Uterman G., Pruin N., Steinmetz A. (1979). Polymorphism of apolipoprotein E. III. Effect of a single polymorphic gene locus on plasma lipid levels in man, *Clin. Genet.* 15: 63-72.

Van Broeckhoven C., Backhovens H., Cruts M. (1992). Mapping of a gene predisposing to early onset Alzheimer's disease to chromosome 14q24.3, *Nat. Genet.* 2: 335-339.

Van Broeckhoven C., Backhovens H., Cruts M., Martin J.J., Crook R., Holuden H., Hardy J. (1994). APOE genotype does not modulate age of onset in families with chromosome 14 encoded Alzheimer's disease, *Neurosci. Lett.* 169: 179-180.

Vancea J.E., Campenotb R.B., Vancec D.E. (2000). The synthesis and transport of lipids for axonal growth and nevre regeneration, *Biochim. Biophys. Acta* 1486: 84-96.

Villa A., Latasa M.J., Pascual A. (2001). Nivre growth factor modulates the expression and secretion of beta-amyloid precursor protein through different mechanisms in PC12 cells, *J. Neurochem.* 77: 1077-1084.

Walter J., Schindzielorz A., Grungberg J., Haass C. (1999). Phosphorylation of presenilin-2 regulates its cleavage by caspases and retards progression of apoptosis, *Proc. Natl. Acad Sci. U.S.A.* 96: 1391-1396.

Weidemann A., Paliga K., Drwang U., Reinhard F.B., Schuckert O., Evin G., Masters C.L. (1999). Proteolytic processing of the Alzheimer's disease amyloid precursor protein within its cytoplasmic domain by caspase-like proteases, *J. Biol. Chem.* 274: 5823-5829.

Wiesgraber K.H. (1994). Apolipoprotein E: structure-function relationships, *Adv. Port. Chem.* 45: 249-320.

Wisniewski K.E., Dalton A.J., Crapper-McLachlan D.R., Wen G.Y, Wisniewski H.M. (1985). Alzheimer's disease in Down's syndrome: clinicopathologic studies, *Neurology* 35: 957-961.

Wolfe M.S., Xia W., Ostaszewski B.L., Diehl T.S., Kimberly W.T., Selkoe D. (1999). Two transmembrane aspartates in presenilin-1 required for presenilin endoproteolysis and gamma-secretase activity, *Nature* 398: 513-517.

www.molgen.ua.ac.be/ADMutations

Yoshioka K., Miki T., Katsuya T., Ogihara T., Sakaki Y. (1991). The 717Val→Ile substitution in amyloid precursor protein is associated with familial Alzheimer's disease regardless of ethnic groups, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 178: 1141-1146.

Yoshizawa T., Komatsuzaki Y., Iwamoto H., Mizusawa H., Kanazawa I. (1993). Screening of the mis-sense mutation producing the 717Val→Ile substitution in the amyloid precursor protein in Japanese familial and sporadic Alzheimer's disease, *J. Neurol. Sci.* 117: 12-15.

Zannis V.I., Just P.W., Breslow J.L. (1981). Human apolipoprotein E isoprotein subclasses are genetically determined, *Am. J. Hum. Genet.* 33: 11-24.

ÖZGEÇMİŞ

Deniz Şumnulu 2 Mart 1982 de Ankara'da doğdu. Orta öğretimini 1998 yılında Ankara Etimesgut Lisesi'nde tamamladı. 2002 yılında Haliç Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü'nde Lisans eğitimine başlayıp bu bölümden Haziran 2006 tarihinde mezun oldu. 2006-2007 yılları arasında yaptığı askerlik görevinden sonra. 2007 Eylül ayında Haliç Üniversitesi Fen bilimleri Enstitüsü Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalında Yüksek Lisans eğitimine başladı.