

**T.C.  
HALIÇ ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI  
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK PROGRAMI**

**PRESENİLİN 2 cDNA'SININ KLONLANMASI VE  
AİLESEL ALZHEIMER HASTALIĞI  
PATOGENEZİNDE ETKİN MUTASYONLARI  
TAŞIYAN VEKTÖRLERİN OLUŞTURULMASI**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ / YÜKSEK LİSANS DÖNEM PROJESİ**

**Hazırlayan  
Gözde ÖZTAN**

**Danışman  
Yrd. Doç. Dr. BAKİ YOKEŞ**

**İstanbul – 2010**

T.C.  
**HALIÇ ÜNİVERSİTESİ**  
**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜNE**

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı Moleküler Biyoloji ve Genetik Programı Yüksek Lisans öğrencisi **Gözde ÖZTAN** tarafından hazırlanan **“Presenilin 2 CDNA’sının Klonlanması ve Ailesel Alzheimer Hastalığı Patogeneğinde Etkin Mutasyonları Taşıyan Vektörlerin Oluşturulması”** adlı bu çalışma jürimizce Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Sınav Tarihi : 22.02.2010

( 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

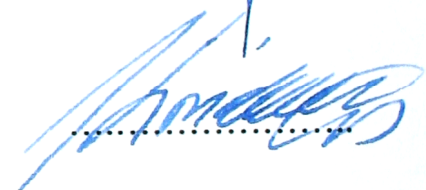
.....

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

Yüksek lisans tez çalışmamda büyük emeği geçen, her konuda yol gösteren ve benden yardımını esirgemeyen danışman hocam Sayın Yrd. Doç. Dr. M. Baki YOKEŞ'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

İstanbul,2010

Gözde ÖZTAN

## İÇİNDEKİLER

	Sayfa No.
<b>SEMBOLLER VE KISALTMALAR</b> .....	III
<b>ŞEKİLLER</b> .....	VI
<b>TABLolar</b> .....	VII
<b>ÖZET</b> .....	VIII
<b>SUMMARY</b> .....	IX
<b>1.GİRİŞ</b> .....	1
1.1.Alzheimer Hastalığı .....	1
1.2. Klinik Bulgular .....	3
1.3. Hastalığın Etiyolojisi .....	4
1.3.1. Erken Başlangıçlı Alzheimer Hastalığı .....	5
1.3.1.1 Erken Başlangıçlı Ailesel Alzheimer Hastalığı .....	6
1.3.1.2 Erken Başlangıçlı Sporadik Alzheimer Hastalığı .....	8
1.3.2 Geç Başlangıçlı Alzheimer Hastalığı .....	8
1.3.2.1 Geç Başlangıçlı Ailesel Alzheimer Hastalığı .....	9
1.3.2.2 Geç Başlangıçlı Sporadik Alzheimer Hastalığı .....	9
1.4.Patogenez .....	10
1.5. Alzheimer Hastalığının Moleküler Mekanizması .....	13
1.6.Alzheimer Hastalığının Moleküler Genetiği .....	15
1.6.1.ApoE .....	15
1.6.2. APP .....	17
1.6.2.1. APP Mutasyonları .....	20
1.6.3.Presenilinler .....	22
1.6.3.1. PSEN1 ve PSEN2 Özellikleri .....	22
1.6.3.2. PSEN1 ve PSEN2 Mutasyonları .....	24
1.6.3.3. PSEN2 molekülündeki FAD mutasyonları .....	27
1.6.3.4. PSEN1 ve PSEN2'nin türler arasındaki korunumu .....	31
1.6.3.5. Merkezi Sinir Sisteminde PSEN1 ve PSEN2 ekspresyonu .....	34
1.7. Alzheimer Hastalığına Kalıtsal Yatkınlıkla İlişkili Gen ve Proteinler .....	35
<b>2. AMAÇ</b> .....	37
<b>3.MATERYAL</b> .....	38
3.1. XL-1 Bakterileri, DNA ve RNA Örnekleri .....	38
3.2. Kullanılan Araç ve Gereçler .....	39
3.3. Kullanılan Kimyasallar .....	39
3.4. Primerler .....	41
<b>4.YÖNTEM</b> .....	42
4.1. pBluescript II sk(+) vektörünün <i>Bam</i> HI ve <i>Kpn</i> I enzimleri ile kesilmesi .....	42
4.2. pcDNA3 vektörünün <i>Bam</i> HI ve <i>Kpn</i> I restriksiyon enzimleri ile kesilmesi .....	42

4.3. pBluescript II sk(+) vektörünün <i>Bam</i> HI ve <i>Kpn</i> I enzimleri ile kesilmesi .....	44
4.4.PSEN2 cDNA dizisinin pBluescript II sk(+) vektörüne klonlanması.....	45
4.4.1. Xl-1 hücrelerinin transformasyonu.....	45
4.4.2.Xl-1 Transform bakterilerden plazmit izolasyonu.....	45
4.4.3.Dizi analizi .....	46
4.5.PSEN2 cDNA'sı Üzerinde Yönlendirilmiş Mutasyon Oluşturma .....	47
4.6. Xl-1 Transform bakterilerden mutant plazmit izolasyonu ve DNA dizi analizi .....	49
<b>5.SONUÇLAR</b> .....	49
<b>6.TARTIŞMA</b> .....	53
<b>7.KAYNAKLAR</b> .....	54
<b>8.ÖZGEÇMİŞ</b> .....	86

## SEMBOLLER ve KISALTMALAR

- A, G, C, T** : Adenin, Guanin, Sitozin, Timin  
**AAH**: Ailesel Alzheimer hastalığı  
**AH**: Alzheimer hastalığı  
**Amp/Amp<sup>R</sup>** : Amfisilin/Amfisilin direnç geni  
**AMPA**:  $\alpha$ -amino-3-hidroksi-5-metil-4-isoksazolpropionik asit  
**APLP-1**: Amyloid prekürsör benzeri protein-1  
**ApoE**: Apolipoprotein E  
**APP**: Amiloid prekürsör protein  
**A $\beta$** : Amyloid  $\beta$  protein  
**A $\beta$ 40**: Amyloid  $\beta$  protein 1-40 (40 amino asit)  
**A $\beta$ 42**: Amyloid  $\beta$  protein 1-42 (42 amino asit)  
**bç** : Baz çifti  
**Ca<sub>2</sub><sup>+</sup>**: Kalsiyum  
**CaMKII**: Ca<sup>2+</sup>/calmodulin bağımlı protein kinaz II  
**cDNA**: Tamamlayıcı DNA  
**CO<sub>2</sub>**: Karbondioksit  
**Da**: Dalton  
**dATP**: Deoksiadenozin trifosfat  
**dCTP**: Deoksisitozin trifosfat  
**dGTP** : Deoksiguanin trifosfat  
**dH<sub>2</sub>O**: Distile su  
**dk** : Dakika  
**DNA** : Deoksiribonükleik asit  
**dNTP** : Deoksinükleotid trifosfat  
**DPS**: Drosophila pseudoobscura  
**dsDNA**: Çift zincirli DNA  
**dTTP**: Deoksitimin trifosfat

**E.coli:** Escherichia coli  
**EBAAH:** Erken Başlangıçlı Ailesel Alzheimer Hastalığı  
**EBAH:** Erken Başlangıçlı Alzheimer Hastalığı  
**EBSAH:** Erken Başlangıçlı Sporadik Alzheimer Hastalığı  
**EDTA :** Etilendiamintetraasetik asit  
**ER:** Endoplazmik Retikulum  
**EtOH:** Etanol  
**GBAAH:** Geç Başlangıçlı Ailesel Alzheimer Hastalığı  
**GBAH:** Geç Başlangıçlı Alzheimer Hastalığı  
**gr:** Gram  
**HEK293:** İnsan embriyonik böbrek hücreleri  
**IP3:** İnositol trifosfat  
**kb:** Kilobaz  
**kDa:** Kilodalton  
**lacZ:** İzopropil- $\beta$ -D-tiyogalaktopiranosit  
**L-APP:** Lökosit ilişkili amiloid prekürsör protein  
**LB :** Luria Bertani  
**LTD:** Uzun dönem depresyon  
**LTP:** Uzun süre potansiyelizasyon  
**M :** Molar  
**MCS :** Çoklu klonlama bölgesi  
**mg :** Miligram  
**mGluR:** Metabotropik glutamat reseptörleri  
**ml:** Mililitre  
**mM :** Milimolar  
**mRNA:** Mesajcı Ribonükleik Asit  
**N2a:** Nöroblastoma hücreleri  
**NaCl:** Sodyum klorür  
**NFY:** Nörofibriler yumaklar  
**ng:** Nanogram  
**NMDA:** N-metil-D-aspartik asit reseptörleri

**PCR** : Polimeraz zincir reaksiyonu  
**PHF**: Çift helikal filamentler  
**PSEN1**: Presenilin 1  
**PSEN2**: Presenilin 2  
**R.O.** : Replikasyon orijini  
**RNAaz**: Ribonükleaz  
**SDS-PAGE** : Sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi  
**sn**: Saniye  
**SUMO**: Küçük ubiquitin benzeri değiştirici  
**U** : Ünite  
**V**: Hacim  
**VG**: Volga Germanları  
**wt**: Yabani tip  
**X-gal** : 5-bromo-4-kloro-3-indolil- $\beta$ -D-galaktopiranozid  
 $\alpha$  : Alfa  
 $\beta$  : Beta  
 $\epsilon$ :Epsilon  
 $\mu\text{g}$  : Mikrogram  
 $\mu\text{l}$  : Mikrolitre  
 $\Psi$ : hidrofobik amino asit  
 $^{\circ}\text{C}$ : Santigrat derece  
**Tm**: Erime sıcaklığı



## ŞEKİLLER

### Sayfa No.

Şekil 1.1. Beyindeki değişim .....	2
Şekil 1.2. Alzheimer hastalığında rol alan genetik belirleyiciler .....	4
Şekil 1.3. Mikroskop altındaki sağlıklı ve alzheimer'lı hücreler .....	10
Şekil 1.4. Alzheimer hastalığı boyunca sinir hücreleri ve beyindeki değişimler..	11
Şekil 1.5. ApoE'deki polimorfizmler .....	14
Şekil 1.6. Genetik linkage ve kontrol örneklerinin bağlantı düzenlenmesi ...	15
Şekil 1.7. PSEN2 molekülü .....	24
Şekil 1.8. PSEN2 FAD mutasyonlarında A $\beta$ seviyeleri .....	26
Şekil 1.9. PSEN2'in çoklu amino asit dizisi .....	28
Şekil 1.10. PSEN1'in çoklu amino asit dizisi .....	29
Şekil 3.1. pBluescript II SK (+/-) fajmidler .....	34
Şekil 3.2. pBluescript II SK (+/-) çoklu klonlama bölgesi .....	34
Şekil 4.1. Yöntemin ana basamakları .....	39
Şekil 5.1. pcDNA3 ve pBlueScript II sk (+) vektörlerini BamHI restriksiyon enzimi ile kesilmesi .....	46
Şekil 5.2. BamHI ile kesildikten sonra KpnI restriksiyon enzimi ile ikinci kez kesilen pcDNA3 vektörü .....	46
Şekil 5.3. PSEN2 insertinin pBlueScript II sk (+) vektörüne klonlanması .....	46
Şekil 5.4. PSEN2 taşıyan pBlueScript II sk (+) vektörünün dizi analizi .....	47
Şekil 5.5. PSEN2 cDNA dizi üzerinde oluşturulan Ala252Thr mutasyonu .....	47
Şekil 5.6. PSEN2 cDNA dizi üzerinde oluşturulan Pro334Arg mutasyonu .....	47

## TABLÖLAR

	<b>Sayfa No.</b>
<b>Tablo 1.1.</b> Ailevi alzheimer hastalığı genleri ve gen mutasyonlarının amiloid kaskad hipotezi ile ilişkisi .....	6
<b>Tablo 1.2.</b> İnsan APP genindeki missense mutasyonları .....	18
<b>Tablo 1.3.</b> İnsan PSEN1 genindeki missense mutasyonları .....	22
<b>Tablo 1.4.</b> İnsan PSEN2 genindeki missense mutasyonları .....	23
<b>Tablo 1.5.</b> Hücre kültürü çalışmalarında tespit edilen PSEN2 mutasyonları .....	25
<b>Tablo 1.6.</b> PSEN2 FAD mutasyonlarında A $\beta$ seviyeleri .....	27
<b>Tablo 1.7.</b> Alzheimer hastalığına kalıtsal yatkınlıkla ilişkili gen ve proteinler ...	32
<b>Tablo 3.1.</b> pBluescript II SK (+/-) vektörü .....	35
<b>Tablo 3.2.</b> Kullanılan aletler .....	36
<b>Tablo 3.3.</b> Kimyasallar .....	37
<b>Tablo 3.4.</b> Primer dizileri .....	37
<b>Tablo 4.1.</b> Yönlendirilmiş mutagenез koşulları .....	43

## GENEL BİLGİLER

Adı ve Soyadı : Gözde ÖZTAN  
Anabilim Dalı : Moleküler Biyoloji ve Genetik  
Programı : Moleküler Biyoloji ve Genetik  
Tez Danışmanı : Yrd. Doç. Dr. Baki Yokeş  
Tez Türü ve Tarihi : Yüksek Lisans – Şubat 2010

## ÖZET

### PRESENİLİN 2 cDNA'SININ KLONLANMASI VE AİLESEL ALZHEIMER HASTALIĞI PATOGENEZİNDE ETKİN MUTASYONLARI TAŞIYAN VEKTÖRLERİN OLUŞTURULMASI

Yapılan bu çalışmayla pcDNA3 vektörünün *SmaI* restriksiyon enzimi kesim noktası içine daha önceden klonlanmış olan Presenilin 2 geninin cDNA'sı *BamHI* ve *KpnI* restriksiyon enzimleri ile kesilerek çıkarılmış, aynı restriksiyon enzimlerinin kesim noktalarını taşıyan pBluescript II SK (+) vektörüne klonlanmıştır. Klonlanan vektör ile transform edilen XL-1 Blue *E. Coli* hücreleri LB/Agar katı besiyerinde üretilerek pozitif koloniler seçilmiştir. Seçilen pozitif kolonilerden plazmid DNA'sı izole edilmiş ve dizi analizi ile klonlamanın gerçekleştirildiği gösterilmiştir.

Klonlanan cDNA dizisi üzerinde yönlendirilmiş mutagenез ile Ala252Thr ve Pro334Arg mutasyonları oluşturulmuş ve XL-1 Blue hücreleri mutant cDNA dizisi taşıyan vektörlerle transform edilerek, bu vektörleri 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:** pcDNA3, Presenilin 2 geni, pBluescript II SK (+), XL-1 Blue

## GENERAL INFORMATION

Name and Surname : Gzde ZTAN  
Field : Molecular Biology and Genetics  
Program : Molecular Biology and Genetics  
Supervisor : Assist. Prof.Dr. Baki YOKEŞ  
Degree Awarded and Date : Master of Science – February 2010

## SUMMARY

### **CLONING OF PRESENILIN 2 cDNA AND CONSTRUCTION OF VECTORS CARRYING FAMILIAL ALZHEIMER’S DISEASE CAUSING MUTATIONS**

In this study, cDNA of Presenilin 2 gene which has been cloned to the SmaI restriction enzyme site of pcDNA3 was cut out by BamHI and KpnI enzymes. The cDNA fragment was further inserted between the BamHI and KpnI sites of the pBluescript II SK (+) vector. XL-1 Blue E.coli cells were transformed with the vector and positive colonies on LB/Agar medium were selected to plasmid DNA isolation. The transformation was confirmed by DNA sequence analysis.

The cloned cDNA sequence was changed by site-directed mutagenesis method to construct vectors carrying Ala252Thr and Pro334Arg mutations. The XL-1 Blue cells were transformed by the mutant clones to obtain pure 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 2 mutations in cell cultures.

**Keywords:** pcDNA3, Presenilin 2 gene, pBluescript II SK (+), XL-1 Blue

# 1. GİRİŞ

## 1.1. Alzheimer Hastalığı

Alzheimer hastalığı, çok yavaş ilerleyen, günlük yaşamsal aktivitelerde azalma ve bilişsel yeteneklerde bozulma ile karakterize olan, nöropsikiyatrik semptomların davranış değişiklikleriyle eşlik ettiği nörodejenaratif bir hastalıktır. AH, yaşlı popülasyonlarda en sık görülen demans türüdür. Hastalık, ilk tanımlandığı zamanlarda presenilin demans nedeni olarak bilinse de, yaşla birlikte artan senil demans nedenidir. AH, genç yaşlarda da ortaya çıkabilmektedir. Hastalığın ailevi olup olmadığına bağlı olarak başlangıç yaşı değişiklik gösterir (Kawas,1997).

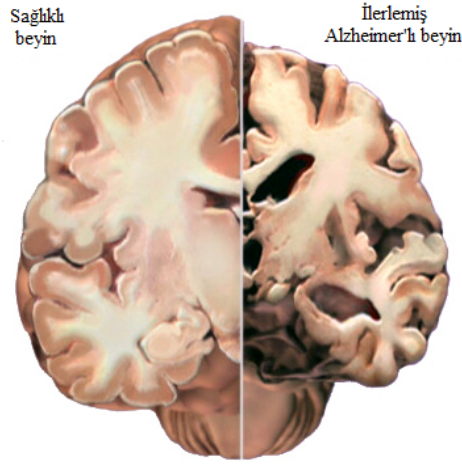
Klinik özellikler ve laboratuvar sonuçları ile olası Alzheimer Hastalığı tanısına varılabilirken, kesin tanının konulabilmesi için, ilerleyen demans bulguları olan vakalarda biyopsi ya da otopsi yapılarak Alzheimer hastalığına özgü patolojik bulgular saptanabilir. Tüm vakalarının %50-70'ini oluşturan Alzheimer hastalığı (AH), 65 yaş üzeri kişilerde %3-11, 85 yaş üzerinde ise %20-47 gibi yüksek bir prevalansa sahiptir (Kawas,1997). AH'nın erken başlangıçlı formları vakaların yalnızca %3-5'ini oluşturur ve otozomal dominant genetik geçiş özelliğine sahiptir.

Patolojik süreçte; temporoparietal korteks yoğun bir şekilde tutulmakta ve amiloid plak ve nörofibriler yumak oluşumu frontal lobuda etkilemektedir. Oluşan inflamatuvar cevap nöron kaybı ve atrofiyle sonuçlanmaktadır. Limbik sistem ile frontal ve temporal loblar arasındaki bağlantılarda kopmalar olur (Şekil 1.1).

Başlangıç döneminden sonra AH'da klinik belirtilerin başında amnezi, afazi, apraksive agnozi gelmektedir. Amnezi, Alzheimer hastalığında ilk semptom olup çoğu kez yeni bilgileri öğrenme yeteneğinin kaybıdır. Epizodik belleğin kaybı AH'da ana belirtidir. Epizodik bellek özellikle hipokampusla ilgilidir. Afazi, Alzheimer

hastalarında sık rastlanan bir bozukluktur. Spontan konuşmada kelime bulmada zorluk ve objeleri isimlendirme yeteneğinde bozukluk ilk görülen dil bozukluklarıdır.

Apraksi, sonradan öğrenilen, pratik olarak yapılan ve motor beceri gerektiren hareketleri uygulama becerisinin bozulmasıdır. Agnozi de hastanın bedeninin çeşitli bölümlerini tanıyamadığı görülür. Soyut kavramları kullanma becerisi bozulur. Karar verme yetisinde ve yargıda belirgin bozukluk görülür. (Eker, 2008)



Şekil 1.1. Beyindeki Değişim  
([http://www.alzheimer.ca/english/alzheimer\\_brain\\_mini\\_site/09.htm](http://www.alzheimer.ca/english/alzheimer_brain_mini_site/09.htm))

Alzheimer Hastalığının ortaya çıkmasında rol oynayan kesin risk faktörleri; yaş, aile öyküsü ve kişinin ApoE s4 aleline sahip olmasıdır (Amaducci ve diğ.,1992), (Kawas 1997), (Van ve diğ.,1991). Hastalığın diğer olası risk faktörleri; kadın cinsiyeti, düşük eğitim seviyesi, atherosklerotik karotid arter hastalığı, Down Sendromu, kafa travması, kalp krizi öyküsünün bulunması, hipertansiyon, atrial fibrilasyon, insüline bağımlı diyabet hastalığıdır (Kawas,1997), (La ve Williams, 1989), (Mendez ve diğ.,1992).

Annenin ileri yaşta olması, alkol tüketimi ve depresyon öyküsü, Alzheimer hastalığında risk faktörleri arasında yer almaktadır (Kawas,1997), (Rocca ve diğ.,

1991). AH'nın oluřma riskini azalttıđı dűőnűlen faktűrler ise ۆstrojen kullanımı ve non-steroid antiinflamatuvar ilaçlardır (McGeer ve diđ., 1997)

Son zamanlarda sigara kullanımının AH geliştirme riskini azalttığı bildirilmişse de, bu çalışmalar istatistiki sonuçlara dayandığı için henűz bir netlik kazanmamıştır (Riggs,1993). Yapılan alışmalar gűstermiřtir ki, sigara kullanımının Apo E e4 alleleline sahip bireylerde hastalık oluşma riskini azalttığı, Apo E e4 alleleline sahip olmayan bireylerde ise hastalık geliştirme riskini artırdığı şeklinde-dir.

Batı Avrupa ve Birleřik Amerika'da yapılan çalışmalar, demansların %50-70'inin Alzheimer hastalığı olduğunu gűstermektedir. Japonya ve Rusya'da multi infarkt demansların daha fazla olduğu tespit edilmiştir (Kawas, 1997). Batı toplumlarında AH için ampirik yaşam boyu risk %5'tir. Eđer hastanın birinci derece akrabasında 65 yaşından sonra başlayan AH var ise, AH açısından riski yaklaşık 3 ila 6 kat artmıştır. Eđer 70 yaşın altında AH tanısı alan bir kardeş ve aynı ۆykűlű ebeveyni varsa, riski 7 ila 9 kat artmıştır.

## **1.2. Klinik Bulgular**

Klinik açıdan Alzheimer hastalığı tanısı konulabilmesi için, ilerleyici hafıza kaybının ve en az iki farklı bilişsel alanda fonksiyon bozukluğunun olması, hastada klinik olarak demans tanısının konulmuş olması, bilinç bozukluğunun olmaması, demansa neden olabilecek herhangi bir sistemik hastalığın ya da nűrolojik hastalığın bulunmaması ve hastalığın başlangıcının 40 yař ve ۆzerinde olması gibi kriterlerin belirlenmesi gereklidir (Peterson ve diđ., 1997). Bellek kaybı olarak tanımlanan amnezi hastalığın temel bulgusu olup hastalık yakın bellek bozukluğuyla başlamaktadır. AH yakın hafıza, neden sonuç ilişkisi kurma, konsantrasyon, lisan, gűrsel algılama ve gűrsel-uzamsal fonksiyonları içeren kognitif fonksiyonların ilerleyici kaybıdır. Lisan bozukluğu daha çok transkortikal duyusal afazi ve anomik afazi karakterlerini gűstermektedir (Rossor ve diđ., 1996). Hatırlama problemleri ile başladığı için sıklıkla zararsız bir unutkanlık olduğu dűőnűlűr (Godbolt ve diđ., 2004), (Ringman ve diđ., 2005).

Depresyon, psikotik semptomlar, ajitasyon ve agresyon gibi davranış değişiklikleri hastalığın ilerlemesi sürecinde ortaya çıkabilmektedir. Konvülziyonlar hastaların %10'unda gözlenmektedir ve daha çok myoklonik karakterdedir (Cummings ve Kaufer, 1996).

Hastaların bazıları kognitif gerilemenin farkına varıp sinirli ve sabırsız olurken, diğerleri farkına varmaz. Zamanla hasta çalışamaz hale gelir, sürekli gözetim altında olması gerekir. Görgü kuralları ve yüzeysel sohbet edebilme yetenekleri şaşkıncı şekilde korunmuş olabilir.

AH ile ilgili diğer semptomlar ajitasyon, sosyal çekingenlik, halusinasyonlar, nöbetler, myoklonus ve parkinson-benzeri bulgulardır (Cummings ve diğ., 1998). Alzheimer hastalarına yapılan nörolojik muayenelerin, mental bozuklukların tespiti dışında normal sınırlar dahilinde bulunduğunu söylemek mümkündür. Bir takım primitif refleksleri hastaların çoğunda gözlemlemek mümkündür. Fakat; yürüme bozukluğu, ani kas kasılmaları gibi istemsiz hareketler ve ekstrapiramidal bulgular ağır ve ilerlemiş vakalarda izlenmektedir (Geldmacher ve Whitehouse, 1996).

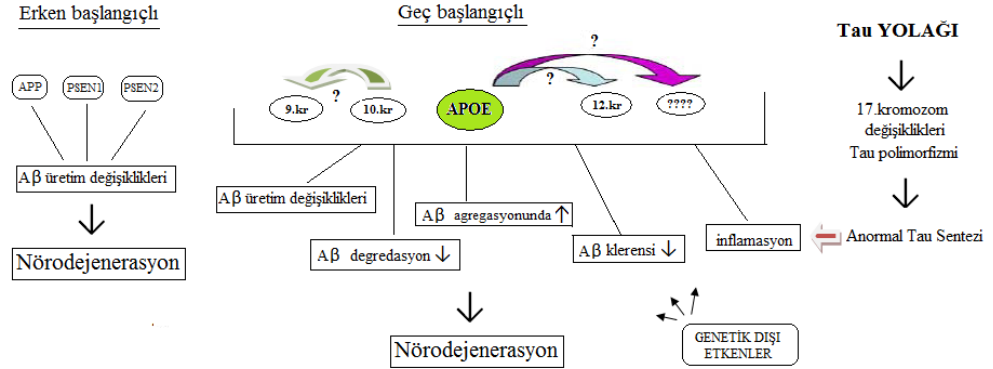
Alzheimer hastalarının ortalama yaşam süresi tanı konulduktan sonra 8 yıl kadardır. Hastalar bu süre zarfında tüm bilişsel işlevlerini kaybederler ve hastaların çoğu rijidite, mutizm ve inkontinans gelişmesiyle yatağa bağımlı hale gelirler. Tepki vermeyerek çevreye cevapsız hale gelir. Hastalarda en sık rastlanan ölüm nedenleri arasında zatürre bulunmaktadır. (Rossor ve diğ., 1996).

### **1.3. Hastalığın Etiyolojisi**

Yetmiş yaşın üzerindeki kişilerin yaklaşık %10'unda demans bunların yarısında AH vardır. AH panetnik, genetik açıdan heterojen bir hastalıktır; Hastaların yüzde 5'ten azı erken başlangıçlı ailesel, yüzde 15 ila 25'i geç başlayan ailesel ve yüzde 75'i sporadik vakalardır. Ailesel AH vakalarının yaklaşık yüzde 10'unda otozomal dominant kalıtım; geri kalanında multifaktöriyel kalıtım söz konusudur. AH hastalarının yüzde 1'inden azı Down sendromludur (Kukull ve diğ., 2002).



Alzheimer Hastalığının, geç başlangıçlı ve erken başlangıçlı olmak üzere iki tipi tanımlanmıştır (Şekil 1.2).



Şekil 1.2: Alzheimer hastalığında rol alan genetik belirleyiciler

### 1.3.1. Erken Başlangıçlı Alzheimer Hastalığı

EBAH'nın genetik belirleyici faktörü heterojendir. Vakaların bir kısmında, EBAH'nın otozomal dominant kalıtım gösterdiği gözlenmiştir (Żekanowski ve diğ., 2003). AH vakalarının yalnızca %10'u 65 yaş öncesi (EBAH) ortaya çıkmaktadır. EBAH'ında 65 yaşın altında semptomlar başlamaktadır (Fillely ve diğ., 2007).

Kromozom 21'deki Aβ prekürsör protein (APP) (Goate ve diğ., 1991), kromozom 14 üzerinde bulunan presenilin 1 (PSEN1) (Sherrington ve diğ., 1995) ve kromozom 1 üzerinde yer alan presenilin 2 (PSEN2) genlerinde (Levy-Lahad ve diğ., 1995), (Rogaev ve diğ., 1995) tam etkili (otozomal dominant) mutasyonların olduğu gözlenmiştir. Başlangıç yaşı dışında erken ve geç başlangıçlı AH klinik olarak ayırt edilemez. PSEN2 promotorunun 1550 bç yukarısındaki temel transkripsiyon başlangıç bölgesinde A delesyonu lokalize olmuştur ve EBAH'da risk faktörü olduğu ileri sürülmüştür.

Muhtemelen, temel transkripsiyon bölgesi delesyon A allelinin varlığında PSEN2 mRNA'sının up-regülasyonu boyunca etki etmektedir ve *in vitro* koşullarda

A $\beta$  peptidlerinin aşırı üretimine neden olmaktadır. Bu durum, ApoE4 alleli bulunmayan bir grup Alzheimer hastasında ve erken başlangıçlı Alzheimer hastalarının bulunduğu Rusya populasyonunda tespit edilmiştir (Riazanskaia ve diğ., 2002).

### **1.3.1.1 Erken Başlangıçlı Ailesel Alzheimer Hastalığı (EBAAH)**

Ailesel AH'nın (AAH) nörodejeneratif sürecinde APP, PSEN1 ve PSEN2 genleri etkindir. ApoE, AAH'da temel risk faktörüdür. PSEN1, PSEN2 ve APP genlerindeki mutasyonlar EBAAH'da A $\beta$ 42 sentezinin artmasına sebep olmaktadır. A $\beta$ 42/40 oranı artmakta veya A $\beta$ 'nin fibrilojenik formu elde edilmektedir (Cruts ve diğ., 2007).

Bazı EBAAH vakalarında APP, PSEN1 ve PSEN2 mutasyonlarına rastlanmamıştır (Scheuner ve diğ., 1996). PSEN1 mutasyonlarının penetransı tamdır ve genellikle ortalama 45 yaş civarında başlayan hızlı ve ilerleyici hastalığa neden olurlar (Fox ve diğ., 1997), (Gustafson ve diğ., 1998), (Menendez, 2004). APP mutasyonları da tam penetrans gösterir ve geç-başlangıçlı hastalığa benzer bir AH ilerleme hızına neden olur; başlangıç yaşı 40'lı yaşlarla 60'lı yılların başı arasındadır (Revesz ve diğ., 1997).

PSEN2 mutasyonları tam penetrans olmayabilir, başlangıcı 40 ila 75 yaş arasındadır ve hastalık seyri genelde yavaştır (Bird ve diğ., 1996). AAH mutasyonları, hem presenilin genleri (PSEN1 ve PSEN2) hem de APP'de AAH'nın ilerlemesiyle sonuçlanmaktadır (Chartier-Harlin ve diğ., 1991), (Goate ve diğ., 1991), (Levy-Lahad ve diğ., 1995), (Mullan ve diğ., 1992), (Murrell ve diğ., 1991), (Rogaeva ve diğ., 1995), (Sherrington ve diğ., 1995).

Bugünkü bilgilerimiz  $\beta$ -amiloid prekürsör protein metabolizmasındaki defektlerin AH'de görülen nöronal disfonksiyon ve ölümün nedeni olduğunu düşündürmektedir. Bu hipoteze uygun şekilde,  $\beta$ -amiloid prekürsör protein geni (APP), presenilin 1 geni (PSEN1) ve presenilin 2 geni (PSEN2) gibi genlerdeki mutasyonların erken başlangıçlı otozomal dominant AH ile ilişkili oldukları

saptanmıştır. Bu genlerdeki mutasyon prevalansı çalışmaya dahil edilme kriterlerine göre geniş farklılıklar göstermektedir; erken başlangıçlı otozomal dominant AH hastalarının yüzde 20 ila 70'inde PSEN1'de, yüzde 10 ila 15'inde, APP'de yüzde 5'ten azında PSEN2'de mutasyonlar gösterilmiştir (Sherrington ve diğ., 1996), (Campion ve diğ., 1999), (Janssen ve diğ., 2003), (Raux ve diğ., 2005). Ailevi Alzheimer olgularında bulunan gen mutasyonlarının amiloid plak oluşumunu, amiloid kaskad hipoteziyle ilişkili olarak artırdığı ileri sürülmektedir (Tablo 1.1) (Topcuoglu ve Selekler,1998).

Tablo 1.1. Ailevi Alzheimer hastalığı genleri ve gen mutasyonlarının amiloid kaskad hipotezi ile ilişkisi (Topcuoglu ve Selekler,1998)

<b>Kromozom</b>	<b>Gen ürünü</b>	<b>Başlangıç yaşı</b>	<b>Etkisi</b>
21	APP mutasyonları	erken	A $\beta$ salınımlında artış
14	Presenilin 1 mutasyonları	erken	A $\beta$ <sub>1-42</sub> salınımlında artış
1	Presenilin 2 mutasyonları	erken	A $\beta$ <sub>1-42</sub> salınımlında artış
19	ApolipoproteinE4 (polimorfizm)	geç	A $\beta$ 'nin amiloid plaklarda ve vasküler amiloid çökeltilerde artması; AH'nin daha erken başlangıcı

Presenilin 1, Presenilin 2 ve APP genlerinde farklı ailelerden birden fazla mutasyon tanımlanmış olup, tüm bu mutasyonlarının ortak özellikleri sonuçta, senil plakların ana komponenti olan ve APP'nin sekretaz enzimleri ile kesimi ile oluşan A $\beta$  ve uzun A $\beta$  peptid sentezinin artırılmasıdır (Hardy,1997).

Bu mutasyonlara sahip bireylerin plazmalarında normal bireylere oranla ve sporadik Alzheimer hastalarına oranla daha yüksek konsantrasyonda 42 aminoasitlik uzun A $\beta$  peptidinin bulunduğu gösterilmiştir. Yine bu bireylerin deri hücrelerinin

kültürünün, kültür ortamına daha fazla 42 aminoasitlik A $\beta$  peptidini saldığı görölmüştür (Borchelt ve diğ., 1996).

### **1.3.1.2 Erken Başlangıçlı Sporadik Alzheimer Hastalığı (EBSAH)**

Sporadik AH vakalarının sebeplerinin belirlenmesinde, somatik mutasyonların mekanizmaları üzerinde çeşitli incelemeler yapılmıştır. EBSAH görölen hastalarda, somatik ve germline mozaisizmi tanımlanmıştır. EBSAH görölen her bireyin presenilin-1 genindeki mutasyonlar için somatik mozaik olduğu ileri sürölmüştür ve AH için yeni bir moleküler mekanizma ortaya atılmıştır. Sporadik AH'larının serebral korteksinin %14'ü ve periferik lenfositlerinde %8 oranında mozaisizm bulunduğu tespit edilmiştir. Gen miktarının yaşa bağlı etkisi ve klinik fenotip özellikleri belirlenmiştir. Bu tespit, sporadik AH'nın etiyolojisi için önemli olmakla birlikte diğer sporadik nörodejeneratif hastalıkların (Parkinson hastalığı, motor nöron hastalığı, Creutzfeldt-Jakob hastalığı) etiyolojisinde de önemli etkiye sahiptir (Beck ve diğ., 2004).

### **1.3.2 Geç Başlangıçlı Alzheimer Hastalığı**

AH vakalarının çoğunluğu 65 yaş ve üzeri geç başlangıçlı (GBAH) olup, ailesel değildir (Tanzi, 1999). 2 yıl ile 25 yıl arasında değişmekle birlikte hastalık 8 ila 10 yıl sürer. Geç başlangıçlı AH ve APP mutasyonlarına sekonder AH'nin her ikisinde APOE allel  $\epsilon$ 4 hastalık başlangıcının doza-bağımlı etmenidir; yani başlangıç yaşı  $\epsilon$ 4 allellerinin kopya sayısı ile ters orantılıdır (Meyer ve diğ., 1998), (Khachaturian ve diğ., 2004).

Geç başlangıçlı AH'nın mendelyen geçişi gösterilememiştir; ancak ailesel ve sporadik geç başlangıçlı AH ile apolipoprotein E genindeki allel  $\epsilon$ 4 (APOE) arasında kuvvetli ilişki vardır. Normal kontrollerde  $\epsilon$ 4 frekansı yüzde 12 ila 15 iken, tüm AH vakalarında yüzde 35, ailede demans öyküsü olanlarda yüzde 45'tir. Erken

başlangıçlı AH'nın ve geç başlangıçlı AH'nın ailesel ve sporadik olmak üzere iki tipi bulunmaktadır.

### **1.3.2.1 Geç Başlangıçlı Ailesel Alzheimer Hastalığı**

GBAAH'da, AAH'na göre daha kompleksdir. GBAAH, genetik yönden heterojen ve tek bir APOE4 lokusuna sahip kompleks bir hastalıktır. APOE4, GBAAH geninin tek belirleyicisidir. Fakat, yüksek risk teşkil eden ε4 alleli ne gerekli ne de hastalığın ortaya çıkmasında yeterlidir (Corder ve diğ., 1993; Strittmatter ve diğ., 1993). GBAAH ailelere yapılan linkage (bağlantı) analizi neticesinde, çoklu candidate bölgelerinin bulunduğu tespit edilmiştir (Pericak-Vance ve diğ., 1997; Kehoe ve diğ., 1999; Curtis ve diğ., 2001; Olson ve diğ., 2001; Mayeux ve diğ., 2002; Blacker ve diğ., 2003; Scott ve diğ., 2003)

Beş kromozom üzerinde LOFAD analizi yapılmıştır. 19q üzerinde bulunan APOE'den ayrı, 19p13.2 kromozomu üzerinde ikinci LOFAD geni olduğu yönünde kuvvetli ispatlar olduğu tespit edilmiştir. Kromozom 10 üzerinde lokusun AH'la bağlantısının olduğu yönünde zayıf deliller vardır. Fakat, kromozom 9,12,21'deki lokuslarda LOFAD bağlantısının olduğu ispat edilmemiştir (Wijsman ve diğ., 2004).

### **1.3.2.2 Geç Başlangıçlı Sporadik Alzheimer Hastalığı**

GBSAH ve AAH'da nöropatolojik değişiklikler benzerdir. Hastalığın etiolojisinde yaygın seyir yönü paylaştıkları ileri sürülmüştür (Lippa ve diğ., 1996). Bu nedenle, bütün AH'nın yalnız %1-2'sinden presenilin mutasyonları sorumlu olmasına rağmen, AAH'nın moleküler seviyesinin belirlenmesi yaygın geç başlangıçlı sporadik AH'nın patofizyolojisinin anlaşılmasını sağlayabilmektedir.

Hastalık ileri yaşlarda görülmektedir. AH vakalarının çoğunluğunda geç başlangıçlı sporadik AH'nın sebepleri, birkaç genetik risk faktörleriyle ilgilidir (Saunders ve diğ., 1993a), (Saunders ve diğ., 1993b), (Strittmatter ve diğ., 1993).

Laboratuvar çalışmalarında, odaklanılan nokta geç başlangıçlı sporadik AH'nın etiyojisinde presenilinlerle bağlantının mümkün olduğudur. Sinir hücresi ve yaygın olarak insan beyninde presenilin ekspresyonunun olduğu gözlenmiştir (Kovacs ve diğ., 1996), (McMillan ve diğ., 1996). Geç başlangıçlı sporadik AH'da PSEN2 mRNA seviyelerinin indirildiği bildirilmiştir. Hastalığın ilerlemesinin presenilinlerin downregülasyonu ile ilişkili olabileceği ileri sürülmüştür.

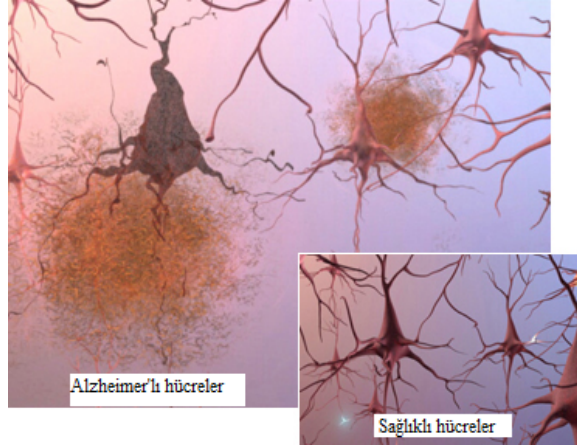
Takami ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada, (Takami ve diğ., 1997) bu bulguları desteklemişler ve PSEN1 ekspresyon seviyesinde azalmanın olduğunu ispatlamışlardır. Ancak diğer bir çok çalışmada bu azalma gözlemlenmemiştir (Ikeda ve diğ., 1997), (Johnston ve diğ., 1996), (Nishiyama ve diğ., 1996). Geç başlangıçlı sporadik AH'da presenilin seviyeleri değişiklik gösterse de, sonuçlar açık değildir.

#### **1.4.Patogenez**

Alzheimer Hastalığının patogenezinin açıklanmasında patolojik bulgular önem taşımaktadır. AH'nın makroskopik patoloji bulguları, korteks ve hipokampus bölgelerinde gözlenen diffüz atrofidir. Histolojik açıdan ele alındığında, hücre içinde biriken nörofibriller yumaklar, sinaptik kayıp, ekstrasellüler yerleşimli amiloid plaklar, granülovakuolar dejenerasyon, hipokampus ve asosiyasyon korteksinde kolinerjik hücre kayıpları patolojik bulgular arasında yer almaktadır (Braak ve Calne,1994) (Şekil 1.3).

Nörofibriller yumaklar, ikili helikal filamentlerden oluşup, bu filamentleri hiperfosforilize tau proteini oluşturmaktadır. Amiloid plakların ana komponenti ise "β sheat" konformasyonu ile biriken 39-43 aminoasitlik fibriller beta amiloid peptididir (Aβ). Amiloid plakların diğer komponentleri patolojik "şaperonlar" olarak adlandırılmakta ve Aβ'nin agregasyonunu, çökmesini ve toksisitesini artırdığı ileri sürülmektedir. Bunlar α-1-antikimotripsin, apolipoprotein E, semin amiloid P komponenti, bazal membrana bağlı heparan sülfat proteoglikon ve klasik kompleman yolun elemanlarıdır (Adams,1997), (Selkoe,1997).

Hastalığın patogenezi en iyi açıklayan amiloid kaskad hipotezinin temeli uzun A $\beta$ 'nin oluşmasına dayanmaktadır. A $\beta$  peptidi, Amiloid prokürsör proteininin (APP) sekretazlarla kopartılması sonucu oluşmaktadır.



Şekil 1.3. Mikroskop altındaki sağlıklı ve Alzheimer'lı hücreler  
([http://www.alzheimer.ca/english/alzheimer\\_brain\\_mini\\_site/10.htm](http://www.alzheimer.ca/english/alzheimer_brain_mini_site/10.htm))

AH'nın histopatolojik bulgularını oluşturan senil plaklar, nörofibrillar yumaklar, nöron kaybı artmış A $\beta$  oluşumuna ikincil olarak gelişmektedir. A $\beta$ 'nin fibriller oluşturarak lokal mikroglia ve astrositleri aktive ettiği, bu hücrelerden salınan moleküllerin nöronlarda nörotoksik ve nörotropik etkiler oluşturduğu düşünülmektedir. Nörotoksik etkilere maruz kalan nöronlarda dejeneratif değişiklikler meydana gelmektedir. Bu dejeneratif değişikliklere örnek olarak; tau proteininin hiperfosforilize olmasıyla çift helikal filamentler (PHF) oluşturması verilebilir (Şekil 1.4). Ayrıca A $\beta$ 'nin kalsiyum ve sodyum iyonlarına permeabilitesi artmış iyon kanalları gibi davranarak sitotoksositeye neden oldukları düşünülmektedir (Fraser ve diğ.,).

Hücre kültürü çalışmalarında A $\beta$  toksisite mekanizmasında A $\beta$  agregasyonunun önemli olduğu tespit edilmiştir (Pike ve diğ., 1991), (Busciglio ve diğ.,1992) ve A $\beta$ 42 peptidlerinin yüksek miktarda artışı APP'de FAD mutasyonlarının bulunduğunu desteklemektedir (Suzuki ve diğ., 1994). Düşük

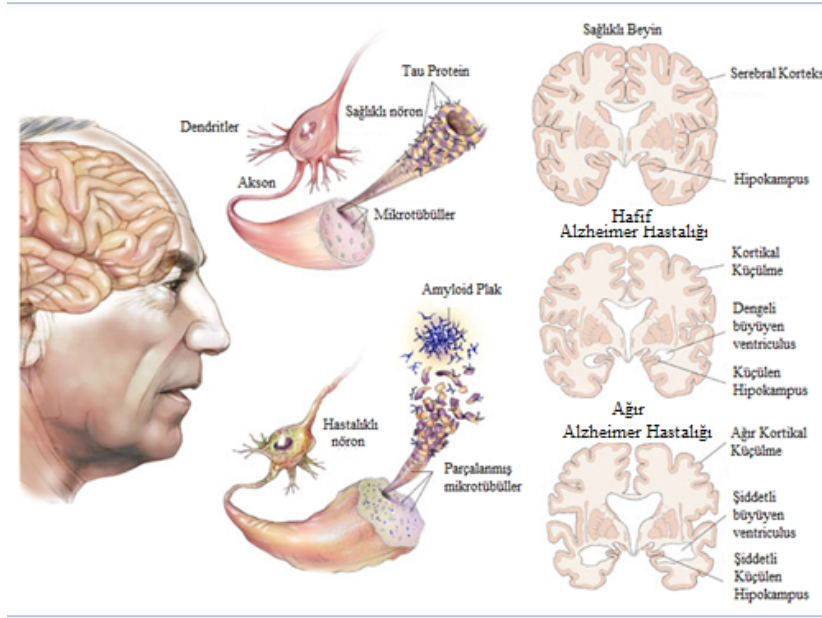
moleküler ağırlıktaki oligomerler geniş A $\beta$  fibrillerinden daha fazla toksik etkiye sahiptir (Roychaudhuri ve diğ., 2008).

ADDL olarak isimlendirilen az miktarda difüz olan A $\beta$  oligomerleri, nanomolar konsantrasyonlarda hipokampal kesit kültürlerinde nöral hücre ölümlerine yol açtığı tespit edilmiştir. ADDL'ler hipokampal uzun süre potansiyelizasyonu (LTP) inhibe eder. AH'da görülen hafıza kaybında potansiyel rol oynadığı ileri sürülmektedir (Lambert ve diğ., 1998).

Nöron soma ve nöritlerinde gelişen yapısal ve fonksiyonel değişiklikler, nöron kayıplarına, biyokimyasal değişikliklere ve nörotransmitter eksikliklerine neden olmaktadır (Selkoe,1997). Sonuç olarak; nöronlar programlanmış hücre ölümü olarak ifade edilen apoptoza uğrarlar.

AH özellikle hipokampustaki kolinerjik nöronları, neokortikal assosiasyon bölgesini ve diğer limbik yapıları ilgilendiren merkezi sinir sisteminin nörodejeneratif hastalığıdır. Nöropatolojisinde kortikal atrofi, hücre dışı sinir plakları, intranöronal nörofibriller iplikçikler ve serebral arter duvarlarında amiloid birikimi saptanır. Plaklar APOE ve A $\beta_{42/43}$ de dahil olmak üzere pek çok farklı protein içerir. Nörofibriller iplikçikler mikrotübüllerin birleşmesi ve bir arada tutulmalarını sağlayarak nöronal bütünlük, aksonal taşıma ve aksonal polaritenin korunmasında yardımcı olan hiperfosforile tau proteinlerinden oluşur (Nussbaum ve diğ., 2005,s:4).





Şekil 1.4. Alzheimer hastalığı boyunca sinir hücreleri ve beyindeki değişimler  
(<http://www.freewebs.com/rbannerm/>)

### 1.5 Alzheimer Hastalığının Moleküler Mekanizması

APP hemen her hücrede eksprese olan tek transmembran bölgesi olan bir proteindir. Bu proteinin  $\alpha$  ya da  $\beta$  yolu ile, daha isimleri tanımlanmamış sekretaz aktiviteleri ile kesilmesiyle; çözümlenmiş APP (sAPP), ucu kesilmiş APP ve  $A\beta$  proteinleri salınmaktadır.

$\alpha$ -yolunda  $\alpha$ -sekretaz aktivitesi sonucunda sAPP salınımı gerçekleşmektedir. sAPP, nörit büyümesi ve sinaptik kontakt gibi etkilere sebep olmaktadır. Ayrıca, hücre içi kalsiyum regülasyonunda işlev gördüğü ileri sürülmüştür.  $\beta$ -yolunda ise  $\beta$  ve  $\gamma$ -sekretaz aktiviteleri ile  $A\beta$  peptidi oluşmaktadır.  $A\beta$  uzunluğu,  $\gamma$ -sekretaz aktivitesi tarafından belirlenmektedir.  $A\beta$  uzunluğuna bağlı olarak  $A\beta$  nörotoksitesinin belirlenebileceği ileri sürülmüştür.  $A\beta$  nörotoksitesinde gerekli olan fibril oluşumunun  $A\beta_{42}$  ile,  $A\beta_{40}$ 'dan daha fazla olduğu görülmüştür. Hastalığın patogenezinde artmış  $\beta$ -yol aktivitesi sonucu hem sAPP'nin oluşmaması nedeniyle

fizyolojik fonksiyonların yeteri kadar gerçekleştirilememesi, hem de artmış A $\beta$ 'nin patolojik sürece neden olması düşünülmektedir (Hardy,1997).

$\beta$ -amiloid prekürsör proteini (APP) endoproteolitik parçalanma sonrası nörotropik ve nöroprotektif aktivite gösteren peptidler oluşturur. APP'nin endozomal-lizozomal kompartman içinde parçalanması 40 amino asitlik bir karbosit-terminal peptid (A $\beta_{40}$ ) oluşturur; A $\beta_{40}$ 'ın fonksiyonu bilinmemektedir. Buna karşın, APP'nin endoplasmik retikulum ya da cis-Golgideki parçalanması sonucu 42 ya da 43 aminoasitlik bir karbosit-terminal peptid (A $\beta_{42/43}$ ) hızla birikir ve in vitro ortamda, muhtemelen in vivo ortamda da nörotoksiktir. AH vakalarının beyinlerinde belirgin miktarda A $\beta_{42/43}$  birikimi vardır. APP, PSEN1 ve PSEN2'deki mutasyonlar A $\beta_{42/43}$  yapımını göreceli ya da mutlak olarak arttırırlar (Nussbaum ve diğ., 2005,s:4).

A $\beta$  agregasyonu, APP'yi de içeren nöral hücre yüzey proteinlerinin değişik şekillerde bağlanmasını teşvik eder. APP knockout farelerden kültüre edilen kortikal nöronlar, A $\beta$  toksisitesine direnç gösterirler (Lorenzo ve diğ., 2000). A $\beta$ ; APP oligomerizasyonunu, Asp-664'deki kaspaz kesimini, 31 tane C-terminal amino asiti içeren APP fragmentinin açığa çıkmasını teşvik etmektedir (Lu ve diğ., 2003), (Shaked ve diğ., 2006). APP C terminal fragment, overeksprese olduğunda nörotoksik etkiye sahip olur (Lu ve diğ., 2000) ve G-protein işaretli kaskadı aktive edebilmektedir (Sola Vigo ve diğ., 2008).

C-terminal kaspaz kesim bölgesi olan Asp-664'de oluşan ek mutasyonlarla birlikte İsveç ve Indiana FAD mutasyonları taşıyan APP'nin eksprese olduğu transgenik fare modellerinde meydana gelen patolojik ve davranışsal değişimlerin APP ile ilgili olabileceği fikri ortaya atılmıştır.

Asp-664 mutasyonu, A $\beta$  üretimine veya plak sayısına etki etmemiştir. Fakat; sinaps kaybı, astrogliosis ve spatial hafıza kaybını durdurmamıştır (Galvan ve diğ., 2006).Asp-664, toksik C-terminal fragmentinden dolayı ortaya çıkan patolojik değişiklikleri teşvik etmektedir veya Fe65 gibi sinyal proteinleri ve APP arasındaki fiziksel etkileşimleri değiştirmektedir (Lu ve diğ., 2000).

Nörofibriler yumaklar (NFY'ler), mikrotübül bağlı protein tau'nun çoğunlukla hiperfosforile formlarından oluşmuştur. Nörofibriler yumaklar,

mikrotübüllerden tau'ları ayırarak posttranslasyonel modifikasyonu ayarlarlar ve aksonal transporta engel olurlar.

Primer nöronal kültürlerin aynı bölgelerinde tau fosforilasyonu içeren (AH'da hiperfosforile olan) A $\beta$ 'nın agregre formlarda bulunduğu gözlenmiştir. Hücre kültürü çalışmaları tauca eksik nöronların A $\beta$  toksisitesine dirençli olabileceğini ileri sürmektedir (Busciglio ve diğ., 1995).

A $\beta$  toksisitesi, 17 kD'luk tau fragmentinin proteolitik etkisine eşlik etmektedir (Rapoport ve diğ., 2002), (Liu ve diğ., 2004). Tau knockout fareyle çaprazlanmış APP transgenik farelerde, endogenous tau'nun kavrama yönelik kayıplar üzerinde etkileri bulunmaktadır (Roberson ve diğ., 2007). Tau'nun tamamıyla delesyona uğramasıyla hayvanlarda spatial hafıza kayıpları bulunmadığı gözlenmiştir. Ayrıca; tek tau allellerinin delesyonu, spatial hafıza kayıplarını kısmi olarak engellemiştir (Yankner ve Lu, 2008).

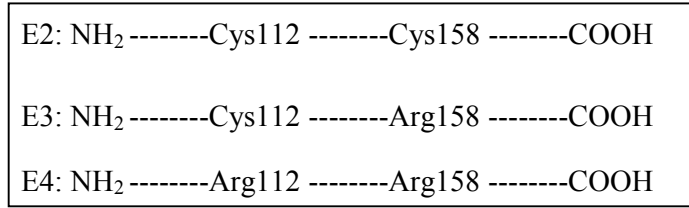
## **1.6.Alzheimer Hastalığının Moleküler Genetiği**

### **1.6.1.ApoE**

Apolipoprotein E (ApoE), 34.200 Da olan bir plazma glikoproteinidir. Beyindeki astrositler, nöronlar ve karaciğer tarafından ve makrofajlar ile monositleri içeren diğer hücre tipleri tarafından sentezlenmektedir (Siest ve diğ., 1995). ApoE, nöronal gelişim boyunca ve hasar sonrasında yeniden dağılım ve mobilizasyonla ilişkilidir (Mahley, 1988).

ApoE, insan oluşumu, sinir rejenerasyonu, immunoregülasyon ve birkaç lipolitik enzimlerin aktivasyonu gibi fonksiyonlarla da bağlantılıdır (Mahley ve Rall, 2000), (Vancea ve diğ., 2000). Bu glikoprotein, 299 amino asit içermektedir. Amino terminal domaini (1-191 rezidüeleri) reseptör binding içeren stabil globular yapıya sahiptir. Karboksi terminal domain (216-299 rezidüeleri), helikal, daha az stabil ve lipoprotein bağlayıcı fonksiyonları içermektedir (Wiesgraber, 1994).

İnsan serumunda ApoE polimorfizmi, ilk kez Utermann ve arkadaşları (Utermann ve diğ., 1979) tarafından tanımlanmıştır. Ayrıca, Zannis ve arkadaşları (Yu ve diğ., 2000) ApoE'nin üç temel izoformlarını (ApoE2, ApoE3 ve ApoE4) izoelektrik odaklaması aracılığıyla belirlemişlerdir ve ApoE için tek lokusta üç allelin ( $\epsilon_2$ ,  $\epsilon_3$  ve  $\epsilon_4$ ) sorumlu olduğu sonucu çıkarılmıştır. 112.rezidü ve 158.rezidü bölgelerinde amino asit dizileri, ApoE2, ApoE3 ve ApoE4 izoformlarında farklılık gösterir ( Rocchi ve diğ., 2003) (Şekil 1.5).

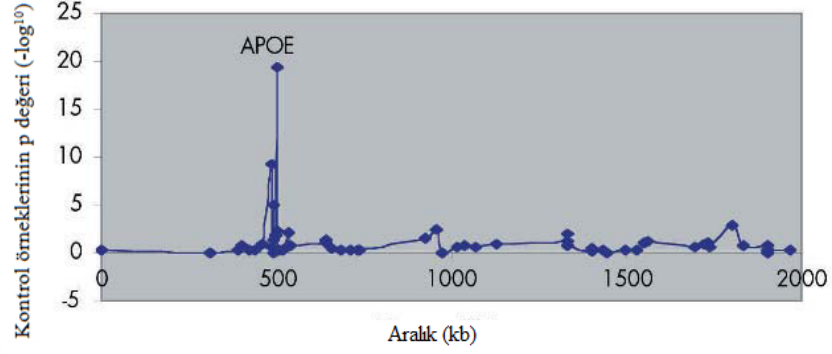


Şekil 1.5. ApoE'deki polimorfizmler  
(Rocchi ve diğ., 2003)

Bazı çalışmalar, Alzheimer hastalığının geç başlangıçlı ailesel ve sporadik formları ile  $\epsilon_4$  alleli arasında ilişki olduğunu göstermektedir. Corder ve arkadaşları (Corder ve diğ., 1993) tarafından çok önemli ve bir ilk olan çalışmada,  $\epsilon_4$  allelinin “doz-bağımlı” etkisinin olduğu bulunmuştur.

Bu durumda AH riski %20-90 oranında artmaktadır ve  $\epsilon_4$  allelinin sayısının artması, 68 ila 84 yaşından daha erken yaşlarda AH görülebileceği anlamına gelmektedir. APP genindeki mutasyonlarla ilişkili olarak, erken-başlangıçlı AH ailelerde  $\epsilon$  allelinin benzer etkisi gözlenmiştir (Lahad ve diğ., 1995), (Sorbi ve diğ., 1995).

Kolesterol transportunda görevli bir protein olan Apolipoprotein E'nin  $\epsilon_4$  alleli; normal beyaz popülasyonda %16, Alzheimer hastalarında ise %35-50 sıklıkta bulunması nedeniyle hastalığın majör faktörlerindedir. APOE4 testi yardımcı bir tanısal testtir ve asemptomatik kişilerde prediktif amaçlı kullanılmamalıdır (Nussbaum ve diğ., 2005,s:5).



Şekil 1.6. Genetik linkage ve kontrol örneklerinin bağlantı düzenlenmesi (Wright, 2005)

Kromozom 19'daki APOE genine komşu bölgenin karşısında bulunan SNP'ler ve AH arasında allelik bağlantı gösterilmektedir. Bu bağlantı, kromozom 19q'daki geniş bölgenin genetik dizisiyle (linkage) tespit edilmiştir (Şekil 1.6). (Wright, 2005)

### 1.6.2. APP

Alzheimer Hastalığı, serebrovasküler amiloidaz, nörofibriller yumaklar ve senil amyloid plaklar tarafından nöropatolojik olarak karakterize edilir (Muller-Hill ve Beyreuther, 1989) (Selkoe, 1991).  $\beta$ A4 amyloid protein, AH'li (Alzheimer hastalıklı) beyinlerde amyloid birikimlerinin temel proteinimsi bileşenidir.  $\beta$ A4 amyloid protein, geniş transmembran glikoproteinden itibaren metabolik yoldan (3-5) elde edilmiştir. Bu nedenle,  $\beta$ A4 amiloid prekürsör protein (APP) olarak ifade edilmektedir (Glennner ve Wong, 1984) (Masters ve diğ., 1985) (Tablo1.7).

Amiloid  $\beta$  prekürsör proteininin (APP) parçalanma ürünü olan A $\beta$ 42 peptidi beyinde ve serebrospinal sıvıda çok miktarda eksprese olur. A $\beta$ 42 serebrospinal sıvıda, plazmada olduğundan 50 kat daha fazla miktarda bulunur ancak, AH gelişen insanlarda plazma A $\beta$ 42 seviyeleri daha yüksek bulunmuştur. Geç başlangıçlı AAH hastalarında, plazma A $\beta$ 42 seviyesi erken başlangıçlı olgulardan yüksektir. APP 587

lizin ve APP595 lizin,  $\beta$ -sekretaz kesim bölgesinin hemen yakınında bulunurlar ve in vivo koşullarda SUMO proteinleri tarafından kovalent modifikasyona uğrarlar. A $\beta$  agregatlarının seviyeleri bu lizin rezidüelerinin sumoylasyonuna bağlı olarak azalmaktadır.

Ailesel Alzheimer hastalığıyla ilişkili olarak mutant V642F APP ile transfekte edilen hücrelerde SUMO E2 enzimi ubc9 ile birlikte SUMO-1'in overekspresyonu A $\beta$  agregatlarının seviyelerinin azalmasına neden olur (Zhang ve Sarge, 2008). Hedef proteinlerdeki lizin rezidüelerinin küçük ubiquitin benzeri değiştirici (SUMO) proteinlerine kovalent bağlanması veya sumolasyon, proteinlerin fonksiyonel özellikleri için önemli regülatör etkiye sahiptir (Hay, 2005),(Bossis ve Melchior, 2006).

SUMO proteinleri, SUMO E2 enzimi olan ubc9 tarafından hedef lizin rezidüelerine kovalent olarak bağlanır ve bu modifiye olmuş lizinler,  $\psi$ KXE/D ( $\psi$ :hidrofobik amino asit) konsensus dizisinde yer almaktadır (Desterro ve diğ., 1997), (Sampson ve diğ., 2001). Hücreler üç temel SUMO paroloğlarıyla (SUMO-1, SUMO2 ve SUMO-3) ile ifade edilmektedir. SUMO2 ve SUMO3, SUMO1'den daha fazla benzerlik gösterir (Hay, 2005), (Bossis ve Melchior, 2006).

APP moleküllerinin temel kısımları  $\beta$ A4 bölgesinin içinden preteolitik kesime uğrarlar ve çözünebilir, amyloidogenik olmayan ürünler elde edilir (Esch ve diğ., 1990), (Sisodia ve diğ., 1990). mRNA ekspresyonu neticesinde APP, kültür hücrelerinde olduğu gibi bütün dokularda tespit edilebilmelidir (Tanzi ve diğ., 1987), (Tanzi ve diğ., 1988), (Golde ve diğ., 1990). APP'nin biyolojik aktivitesi henüz anlaşılammıştır. Hücre-hücre ve hücre matris adezyonu (Schubert ve diğ., 1989), heparin-bağlayıcı (Schubert ve diğ.,1988) ve büyümeyi teşvik edici aktiviteleri (Saitoh ve diğ., 1989), (Milward ve diğ., 1992), nöronlarda sinir koruyucu (Mattson ve diğ., 1993) gibi özelliklerinin olduğu söylenebilir.

APP ile ilgili diğer görüşler, reseptör aktivitesi (Kang ve diğ., 1987), (Nishimoto ve diğ., 1993), sinaptik fonksiyon (Schubert ve diğ., 1991) ve proteinaz inhibisyonunu (Kitaguchi ve diğ., 1988), (Ponte ve diğ., 1988), (Miyazaki ve diğ., 1993) kapsamaktadır. APP ailesi farklı izoformlardan oluşmaktadır. Bu farklı

izoformlar, APP geni tarafından kodlanan 19 ekzonun alternatif splicingiyle meydana gelmiştir (Yoshikai ve diğ., 1990), (Kang ve Muller-Hill 1989) ve amino asitlerdeki uzunluklarına göre adlandırılmıştır. APP695 mRNA'sı ekzon 7 ve ekzon 8'de bulunmayan, beyindeki fazla miktardaki APP transkriptidir (Tanzi ve diğ., 1988), (Neve ve diğ., 1988), (Golde ve diğ., 1990), (Kang ve Muller-Hill 1990). Periferel organlardaki primer translasyon ürünleri, APP770 ve APP751 izoformları olarak bulunmaktadır (Tanzi ve diğ., 1988), (Kitaguchi ve diğ., 1988), (Ponte ve diğ., 1988). Bu izoformlar ekzon 8'de yer almamaktadır.

Ekzon 7'de bulunmayan APP714 mRNA izoformlarının RNA seviyeleri tespit edilmiştir (Golde ve diğ., 1990), (Kang ve Muller-Hill 1990). Kunitz-tip serin proteaz inhibitörüyle büyük homoloji gösteren 57 amino asitlik domaini kodlar (Tanzi ve diğ., 1988), (Kitaguchi ve diğ., 1988), (Ponte ve diğ., 1988). Ekzon 8, MRC OX-2 antijeniyle homoloji gösteren 19 amino asitlik domaini kodlar (Clark ve diğ., 1985).

APP geninin diğeri iki transkripti tanımlanmıştır. Her ikisi de C terminali kesik non-amyloidogenik formları kodlar. Bu nedenle, APRP563 mRNA (amiloid prekürsör ilişkili protein) ve APRP365 mRNA olarak gösterilmektedir (De Sauvage ve Octave, 1989), (Jacobsen ve diğ., 1991).

Çoğu gruplar tarafından yaşla ilgili çalışmalar ve AH'da ekzon 7 ve ekzon 8'in alternatif splicingi, çeşitli APP mRNA'larının ekspresyon değişimlerine göre AH'da APP değişim süreci amyloid birikimi üzerinde etki yaratmaktadır (Neve ve diğ., 1988), (Golde ve diğ., 1990), (Palmert ve diğ., 1988), (Oyama ve diğ., 1991). Ancak bu sonuçlar tutarsızdır (Sandbrink ve diğ., 1994).

Alternatif olarak, APP geninde tanımlanan ekzon 15'deki 54 bp'ı kapsayan splice bölge kullanılabilir (Konig ve diğ., 1992). Bu ekzon, 18 amino asit için kodlama yapmaktadır ve 16 amino asitlik APP'nin  $\beta$ A4 bölgesinden önce gelmektedir. APP transkriptleri, ekzon 15'in dışında ilk olarak, mikroglia hücreleri ve periferel lökositlerde tanımlanmıştır ve lökosit ilişkili APP (L-APP) mRNA'larını ifade etmektedir (Konig ve diğ., 1992). Protein seviyesinde LAPP'lerin astrositçe zengin kültürlerde eksprese olduğu tespit edilmiştir (Monning ve diğ., 1992).

Ekzon 15'deki alternatif splicingin regülasyonundan sonra immunogenik uyarıya yanıt oluştuğu tespit edilmiştir. L-APP'ler immunokomponent hücre aktivitesi rol oynamaktadır (Monning ve diğ., 1992). L-APP mRNA ekspresyonunun dokuya spesifik regülasyonunun analizi henüz gerçekleştirilememiştir.

Periferal sisteme ait dokularda L-APP mRNA ekspresyonu çalışılmış ve primer kültür beyin hücreleri ve farklı beyin dokularında L-APP mRNA ekspresyonu karşılaştırılmıştır. Merkezi sinir sistemini de içeren bütün dokularda L-APP mRNA izoformları tespit edilmiştir. Fakat nöronların primer kültüründe gözlenmemiştir (Sandbrink ve diğ., 1994).

APP mutasyonuna sahip farelerde yapılan çalışmalar neticesinde, transgenik farelerde 42 aminoasitlik A $\beta$ 'nın 14, 40 aminoasitlik A $\beta$ 'nın ise 5 kat arttığı gösterilmiştir (Adams, 1997) (Selkoe, 1997). Amiloid kaskad hipotezi ve diğer bir çok hipotez, Alzheimer hastalığının patofizyolojisini tam olarak açıklayamamaktadır.

#### **1.6.2.1.APP Mutasyonları**

APP geni kromozom 21 üzerinde lokalize olmaktadır (Goate ve diğ., 1991). APP genindeki mutasyonlar, az bulunmaktadır. Dünya çapındaki 25 aileden daha az etki etmektedir. Fakat; bütün bu mutasyonlar ya birlikte lokalize olmuşlardır ya da A $\beta$  dizisiyle bağlantılıdır. Erken başlangıçlı FAD'la birlikte segregasyonun görüldüğü APP geninde birkaç missense mutasyonu tanımlanmıştır (Tablo 1.2). (Czech ve diğ., 2000).



Tablo 1.2. İnsan APP genindeki missense mutasyonları (Czech ve diğ.,2000)

Kodon	Mutasyon	Fenotip	Referans
665	Gln→Asp	Geç başlangıçlı AH, segregasyon yok.	(Peacock et al., 1994)
670/671	Lys-Met→Asn-Leu	FAD	(Mullan et al., 1992)
673	Ala→Thr	Hastalık yok.	(Peacock et al., 1992)
692	Ala→Gly	FAD ve serebral kanama	(Hendriks et al., 1992)
693	Glu→Gly Glu→Gln	Geç başlangıçlı AH 1.HCHWA-D(Hereditary Cerebral Hemorrhage with Amyloidosis- Dutch Type),segregasyon yok.	(Kamino et al., 1992) (Levy et al., 1990)
713	Ala→Val Ala →Thr	Şizofreni AH, segregasyon yok.	(Jones et al., 1992) (Carter et al., 1992)
716	Ile→Val	FAD	(Eckman et al., 1997)
717	Val→Ile Val→Phe Val→Gly	FAD FAD FAD	(Goate et al., 1991) (Murrell et al., 1991) (Chartier-Harlin et al., 1991)

Belçikalı hasta grubunda (n=750, başlangıç yaşı= 75. 0+8.6, 75.0-8.6) APP promoterında genetik varyasyon çalışması yapılmıştır. 7 hastada üç farklı APP promoter mutasyonunun (-369 C→G, -534 G→A ve -479 C→T) olduğu gözlenmiştir. 70 yaş üzerindeki hastalarının APPV717I mutasyonu taşımalarına rağmen hiçbir hasta APP lokus duplikasyonu taşımamaktadır (Brouwers ve diğ., 2006).

Kalıtıl ailesel Alzheimer hastalığındaki (FAD), V642I,V642F ve V642G nokta mutasyonları, APP<sub>695</sub>'de tespit edilmiştir. Bu mutantların (FAD-APP'ler) ekspresyonu, DNA fragmentasyonuna bağlı olarak klonlanan COS hücrelerinin apoptoza uğramalarına neden olmaktadır. Apoptoza sebep olan üç tane bulunan

FAD-APP'ler olası V642 mutantlarıdır. Normal APP<sub>695</sub>'in apaptoz üzerinde etkisi yoktur. FAD-APP indüklenmiş apaptoz, bcl 2 ve heteromerik G proteinlerine duyarlı olduğu gözlenmiştir. Sinapslar dendritlere yakın olan diğer nöronlardan salınan nörotransmitterlerin bağlanacağı reseptörleri içeren özelleşmiş yapılardır.

### **1.6.3.Presenilinler**

#### **1.6.3.1. PSEN1 ve PSEN2 Özellikleri**

1992 yılında kromozom 14'ün uzun kolundaki lokus, linkage analiziyle belirlenmiştir ve birkaç sene sonra gen, PSEN1 olarak tanımlanmıştır ve konumsal klonlama stratejisine göre izole edilmiştir (Sherrington ve diğ., 1995), (Broeckhoven ve diğ., 1992). PSEN1'le homoloji gösteren ikinci bir gen (PSEN2) bulunmuştur.

Harita üzerinde PSEN2 1q31-q42 olarak yer alırken (Levy-Lahad ve diğ., 1995), PSEN2 14q24.3 olarak lokalize olmuştur. PSEN1 ve PSEN2 genlerindeki mutasyonlar %80 oranında ailesel erken başlangıçlı AD'na yol açmaktadır. Bu genler, Presenilin 1 ve 2 (PS1ve PSEN2) olarak tanımlanan iki tane çok zincirli transmembran proteinler (%67 benzer) için kodlama yapmaktadır.

Presenilinler, türler arasında yüksek derecede benzerlik gösterirler. Her gen, total olarak 13 ekzondan meydana gelmektedir. Ekzon 3-12 olmak üzere; 10 ekzon kodlayıcı dizi içermektedir. Diğer ekzonlar, translasyona uğramamış bölgeleri kodlar (Clark ve diğ., 1995), (Prihar ve diğ., 1996). PSEN1 ve PSEN2; çekirdek zarında, golgi aparatında ve E.R'da lokalize olan 467-448 amino asitlik proteini kodlamaktadır (Kovacs ve diğ., 1996). PSEN1 ve PSEN2 genleri FAD'li ailelerde pozisyonel klonlama stratejileri ile tanımlanmıştır. Bu proteinlerin gerçek işlevlerinin ne olduğu bilinmemektedir (Nussbaum ve diğ., 2005). Yapılan çalışmalar, PSEN1(Presenilin 1) ile yüksek homoloji gösteren PSEN2'de meydana gelen mutasyonların otozomal dominant, ailesel Alzheimer hastalığına (FAD) sebep olduğunu göstermektedir.

Volga Germanları (VG) olarak bilinen FAD taşıyan 8 akrabadan oluşan grupta konumsal klonlama ve dizi analiziyle FAD teşhis edilmiştir. VG'larda, dizi analizi ve geniş genom taramasıyla FAD'ın kromozom 1 üzerinde lokalize olduğu tespit edilmiştir. Bu analiz, AH taşıyan bireylerin varlığı ve genetik heterojenlik tarafından anlaşılması zordur. VG FAD bölgesinin lokalize olduğu PSEN2 geninde, nokta mutasyonu (N141I) olduğu tespit edilmiştir. Erken başlangıçlı AH'nın dışında, FAD klinik ve nöropatolojik olarak sporadik AH'dan ayırt edilemez. AH'nın monogenik formları seyrek olduğu halde sporadik formları yaygındır (Wright, 2005). Erken başlangıçlı ailesel Alzheimer hastalığının (FAD) patolojik mekanizmalarında presenilinler (PS) önemlidir.

Kültür hücrelerinde PSEN2'deki Volga Alman (N141I) mutasyonu ve wild-tip PSEN2 için cDNA'lar eksprese edilmiş ve ardından transfekte proteinlerin ve C-terminal A $\beta$ 'ların (amyloid  $\beta$  proteinlerin) metabolizmaları test edilmiştir. Volga Alman(N141I) mutasyonu; PSEN2 metabolizmasında önemli bir değişikliğe sebep olmamıştır. COS-1 hücreleri, C-terminal fragmenti veya N141I mutant PSEN2 ve insan  $\beta$  amyloid precursor protein ( $\beta$ APP) için cDNA'lerle iki misli transfekte edilmiştir (Tomita ve diğ., 1997).

Ek olarak; fare N2A nöroblastoma hücreleri, stabil olarak yalnız N141I mutant PSEN2 ile transfekte edilmiştir. Wild-tip PSEN2'nin ekspresyonuyla karşılaştırıldığında A $\beta$ 42 (43) residüelerinin 1,5 ila 10 kat daha fazla A $\beta$  ile sonlandığı görülmüştür. Bu sonuçlar, FAD ile bağlantılı PSEN2 mutasyonunun (N141I) A $\beta$ / $\beta$ APP metabolizmasını değiştirdiğini göstermektedir (Tomita ve diğ., 1997).

### 1.6.3.2. PSEN1 ve PSEN2 Mutasyonları

PSEN1 geninde, 120'den fazla farklı mutasyon tanımlanmıştır (<http://www.molgen.ua.ac.be/ADmutations>). Bunlardan sadece 8 tane missense mutasyonu PSEN2'de tanımlanmıştır. Ekzon 4'de bir tane (Cruts ve diğ., 1998), Ekzon 5'de dört tane (Finckh ve diğ., 2000),(Lao ve diğ., 1998), (Levy-Lahad ve diğ., 1995), (Rogaev ve diğ., 1995). Ekzon 7'de iki tane (Finckh ve diğ., 2000), (Rogaev ve diğ., 1995) ve Ekzon 12'de bir tane (Lleo ve diğ., 2001) mutasyon bulunmaktadır.

PSEN1 geninde çok sayıda patojenik mutasyon bulunmaktadır. Bu patojenik mutasyonlar, iki tane esanükleotid insersiyonu (Rogaeva ve diğ.,2001) ve bir tane trinükleotid delesyonu (Beck ve diğ., 2002) olmak üzere missense mutasyonlarıdır. Bu mutasyonlar, yüksek korunumlu transmembran domainlerde ağırlıklı olarak lokalize olmuşlardır. 65 yaşından önce görülen, ailesel erken başlangıçlı AH'da otozomal dominant transmisyon (aktarma) tanımlanmıştır. Bu vakalar, oldukça nadirdir. Dünya çapında yalnız 120 ailenin, determinist (belirleyici) mutasyonlar taşıdığı bilinmektedir (St. George-Hyslop, 1998).

Otozomal dominant ailesel AH'da (FAD) kromozom 14 üzerinde presenilin 1 geninde mutasyonlar meydana gelmektedir (Sherrington et al., 1995). Bu değerler, bütün erken başlangıçlı vakaların %30-50'si içindir (Cruts et al., 1996) ve 55 yaş öncesi AH'nın temel sebebidir. PSEN1 için 50'den fazla missense mutasyonu bilinmektedir (Tablo 1.3) (Czech ve diğ.,2000). Homolog PSEN2 geni ve türler arasında korunan amino asit rezidüelerinde PSEN1 mutasyonları meydana gelmektedir.

PSEN2, kromozom 1 üzerinde lokalize olmaktadır ve bu gendeki mutasyonlar, iki ailede tanımlanmıştır (Rogaev et al., 1995). Bu ailelerde, PSEN2 mutasyonlarının 40 ve 80 yaş aralığında değişkenlik gösterdiği tespit edilmiştir (Tablo 1.4). (Czech ve diğ.,2000)

Tablo 1.3. İnsan PSEN1 genindeki missense mutasyonları (Czech ve diğ.,2000)

Kodon	Mutasyon	Fenotip	Referans
79	Ala →?	FAD, 64 yaş başlangıçlı	(St. George-Hyslop, 1998)
82	Val → Leu	FAD, 55 yaş başlangıçlı	(Campion et al., 1995)
96	Val → Phe	FAD	(Kamino et al., 1996)
115	Tyr →His	FAD, 37 yaş başlangıçlı	(Campion et al., 1996)
115	Tyr→Cys	FAD	(Hardy, 1997)
117	Pro →Leu	FAD	(Wisniewski et al., 1998)
120	Glu→Asp	FAD, 48 yaş başlangıçlı	(St. George-Hyslop, 1998)
120	Glu→Lys	FAD	(Hardy, 1997)
123	Lys→ Glu	FAD	(Yasuda et al., 1999)
135	Asn→Asp	FAD	(Hardy, 1997)
139	Met→Thr	FAD, 49 yaş başlangıçlı	(Campion et al., 1996)
139	Met→Val	FAD, 40 yaş başlangıçlı	(Alzheimer's Disease Collaborative Group, 1995)
139	Met → Lys	FAD	(Dumanchin et al., 1998)
143	Ile → Phe	FAD	(Hardy, 1997)
143	Ile → Thr	FAD, 35 yaş başlangıçlı	(Cruts et al., 1995)
146	Met → Leu	FAD, 45 yaş başlangıçlı	(Sherrington et al., 1995)
146	Met → Val	FAD, 38 yaş başlangıçlı	(Alzheimer's Disease Collaborative Group, 1995)
146	Met → Ile	FAD, 40 yaş başlangıçlı	(St. George-Hyslop, 1998)
163	His → Arg	FAD, 50 yaş başlangıçlı	(Sherrington et al., 1995)
163	His → Tyr	FAD, 47 yaş başlangıçlı	(Alzheimer's Disease Collaborative Group, 1995)
171	Leu → Pro	FAD, 40 yaş başlangıçlı	(Ramirez-Duenas et al., 1998)
209	Gly → Val	FAD	(Kamino et al., 1996)
213	Ile → Thr	FAD	(Kamino et al., 1996)
231	Ala → Thr	FAD, 52 yaş başlangıçlı	(Campion et al., 1995)
231	Ala → Val	FAD	(Hardy, 1997)
233	Met → Thr	FAD, 35 yaş başlangıçlı	(Kwok et al., 1997)
235	Leu → Pro	FAD, 32 yaş başlangıçlı	(Campion et al., 1996)
246	Ala→Glu	FAD, 55 yaş başlangıçlı	(Sherrington et al., 1995)

Tablo 1.3. (devamı)

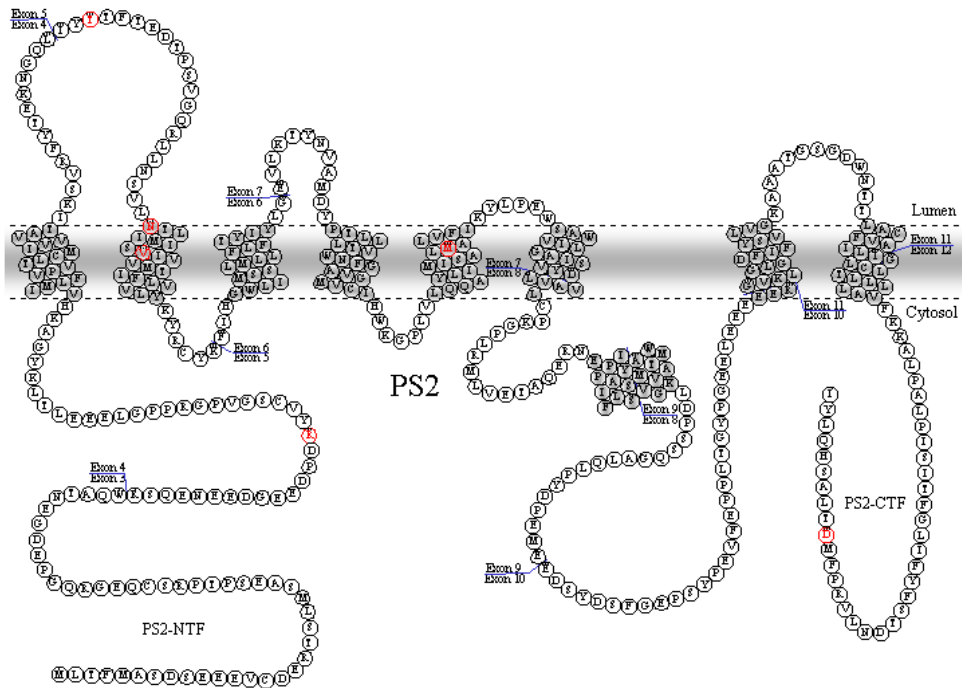
Kodon	Mutasyon	Fenotip	Referans
250	Leu→Ser	FAD	(Hardy, 1997)
260	Ala→Val	FAD, 40 yaş başlangıçlı	(Ikeda et al., 1996)
262	Leu→Phe	FAD, 50 yaş başlangıçlı	(Forsell et al., 1997)
263	Cys→Arg	FAD, 47 yaş başlangıçlı	(St. George-Hyslop, 1998)
264	Pro→Leu	FAD, 45 yaş başlangıçlı	(Campion et al., 1995)
267	Pro→Ser	FAD, 35 yaş başlangıçlı	(Alzheimer's Disease Collaborative Group, 1995)
269	Arg→Gly	FAD	(Hardy, 1997)
269	Arg→His	FAD	(Hardy, 1997)
273	Glu→Ala	FAD	(Kamimura et al., 1998)
278	Arg→Thr	FAD	(Kwok et al., 1997)
280	Glu→Ala	FAD, 47 yaş başlangıçlı	(Alzheimer's Disease Collaborative Group, 1995)
280	Glu→Gly	FAD, 42 yaş başlangıçlı	(Alzheimer's Disease Collaborative Group, 1995)
282	Leu→Arg	FAD	(Aldudo et al., 1998)
285	Ala→Val	FAD, 50 yaş başlangıçlı	(Ikeda et al., 1996)
286	Leu→Val	FAD, 50 yaş başlangıçlı	(Sherrington et al., 1995)
291-319	Delesyon	FAD	(Crook et al., 1998; Perez-Tur et al., 1996)
317	Glu→Gly	FAD	(Hardy, 1997)
384	Gly→Ala	FAD, 35 yaş başlangıçlı	(Cruts et al., 1995)
392	Leu→Val	FAD, 25-40 yaş başlangıçlı	(Campion et al., 1995)
410	Cys→Tyr	FAD, 48 yaş başlangıçlı	(Alzheimer's Disease Collaborative Group, 1995)
426	Ala→Pro	FAD	(Hardy, 1997)
436	Pro→Ser	FAD	(Hardy, 1997)

Tablo 1.4. İnsan PSEN2 genindeki missense mutasyonları (Czech ve diğ.,2000)

Kodon	Mutasyon	Fenotip	Referans
141	Asn → Ile	FAD (Volga Germanları), 50-65 yaş başlangıçlı	(Rogaev et al., 1995)
239	Met →Val	FAD (Floransa), değişken yaş aralığı	(Rogaev et al., 1995)

### 1.6.3.3. PSEN2 molekülündeki FAD mutasyonları

AH mutasyon databazından R62H, T122P, S130L, N141I, V148I, M239V, M239I, M430T ve D439A olmak üzere 9 tane PSEN2 FAD mutasyonu rapor edilmiştir (Şekil 1.7) (Walker ve diğ., 2005). Dil bozukluğu ile karakterize edilen nöropatolojik bağımlı erken başlangıçlı AH sahip hastalar üzerinde çalışmalar yapılmıştır.



Şekil 1.7. PSEN2 Molekülü

Ekzon 11’de yer alan PSEN2 genindeki yeni missense mutasyonları için heterozigot olan hastalarda korunumlu residüe olan 393.pozisyonda metiyonin ile valin arasında amino asit substitüsyonu olduğu tespit edilmiştir. İn vitro koşullarda PSEN2 V393M cDNA ekspresyonu sonucunda A $\beta$  42/40 peptid oranında saptanabilir bir artış olmadığı gözlenmiştir (Lindquista ve diğ., 2008) (Tablo 1.5).

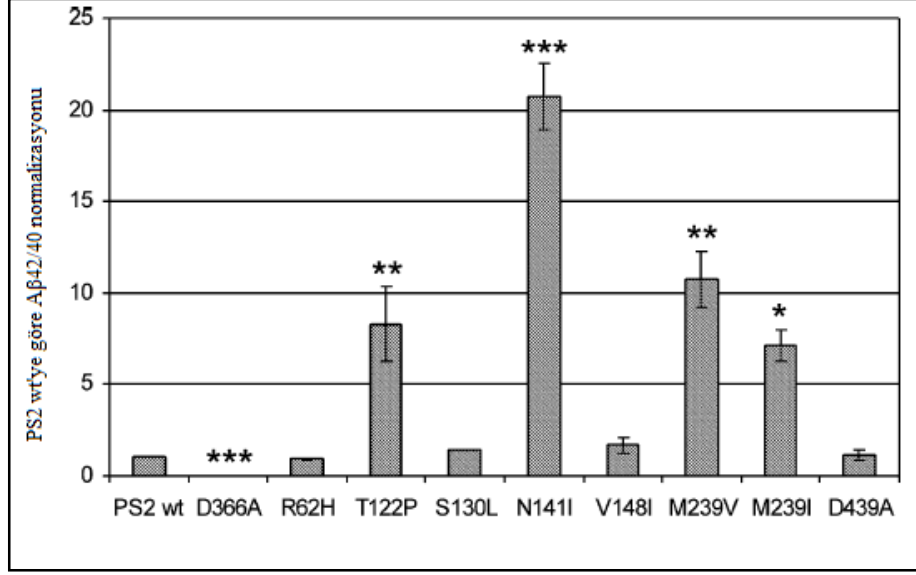
PS 1/2<sup>-/-</sup> hücrelerinde APP<sup>sw</sup> ile ko-ekspresye olan A $\beta$ ’ların seviyesi üzerinde FAD mutasyonlarının etkisi olduğu belirlenmiştir. APP wt yerine ELISA deteksiyonunun kolay yapılmasını sağlayan yüksek A $\beta$  seviyesine sahip APP<sup>sw</sup> kullanılmıştır. T122P, N141I, M239V ve M239I FAD mutasyonlarında A $\beta$  seviyesi ve A $\beta$  42/40 önemli ölçüde yüksektir. R62H, S130L, V148I ve D439A mutasyonlarında A $\beta$  seviyesi ve A $\beta$  42/40 önemli bir değişiklik yoktur (Şekil 1.8, Tablo 1.6) (Walker ve diğ., 2005).

Tablo 1.5. Hücre Kültürü Çalışmalarında Tespit Edilen PSEN2 Mutasyonları

Mutasyon	Hücre tipi	A $\beta$ oranı	Vektör çeşidi	Gen transferi yöntemi
1. PSEN2 Arg62His	MEF	A $\beta$ 42/40 oranında artış yok	pcDNA3	Lipofeksiyon metodu (Walker ve diğ., 2005)
2. PSEN2 Arg71Trp				(Guerreiro ve diğ., 2008)
3. PSEN2 Ala85Val				(Piscopo ve diğ., 2008) (Piscopo ve diğ., 2005)
4.PSEN2 Thr122Pro	MEF	A $\beta$ 42/A $\beta$ 40 oranında artış var	pcDNA3	Lipofeksiyon metodu (Walker ve diğ., 2005)
5.PSEN2 Thr122Arg				(Binetti ve diğ., 2003)
6.PSEN2 Ser130Leu	MEF	A $\beta$ 42/40 oranında artış yok	pcDNA3	Lipofeksiyon metodu (Walker ve diğ., 2005)
7.PSEN2 Val139Met				(Bernardi ve diğ., 2008)
8.PSEN2 Asn141Ile	COS-1	A $\beta$ 42(43) miktarında artış var	pcDNA3	DEAE-dextran metodu (Tomita ve diğ., 1997)
PSEN2 Asn141Ile	HEK293	A $\beta$ 42/A $\beta$ 40 oranında artış var	EcoT22I kesimli adenovirüs DNA	COS/TPC metodu (Araki ve diğ.,2001)
PSEN2 Asn141Ile	MEF	A $\beta$ 42/A $\beta$ 40 oranında artış var	pcDNA3	Lipofeksiyon metodu (Walker ve diğ., 2005)
PSEN2 Asn141Ile	SH-SY5Y	A $\beta$ 42/A $\beta$ 40 oranında artış var	pCEP4	Kalsiyum fosfat metodu (Takeda ve diğ., 2004)
PSEN2 Asn141Ile	COS-1	A $\beta$ 42/A $\beta$ 40 oranında artış var	pcDNA3	DEAE-dextran metodu (Tomita ve diğ., 1997)
PSEN2 Asn141Ile	N2a	A $\beta$ 42/A $\beta$ 40 oranında artış var	pcDNA3	Lipofeksiyon metodu(Tomita ve diğ., 1997)



Mutasyon	Hücre tipi	A $\beta$ oranı	Vektör çeşidi	Gen transferi yöntemi
9. PSEN2 Leu143His				(Guerreiro ve diğ., 2008)
10. PSEN2 Val148Ile	MEF	A $\beta$ 42/40 oranında artış yok	pcDNA3	Lipofeksiyon metodu (Walker ve diğ., 2005)
11. PSEN2 Met174Val				(Andreoli ve diğ., 2008)  (Clarimón ve diğ., 2008)  (Guerreiro ve diğ., 2008)
12. PSEN2 Gln228Leu				(Zekanowski ve diğ., 2003)
13. PSEN2 Met239Val	MEF	A $\beta$ 42/A $\beta$ 40 oranında artış var	pcDNA3	Lipofeksiyon metodu (Walker ve diğ., 2005)
14. PSEN2 Met239Ile	MEF	A $\beta$ 42/A $\beta$ 40 oranında artış var	pcDNA3	Lipofeksiyon metodu (Walker ve diğ., 2005)
15. PSEN2 Ala252Thr				(Guerreiro ve diğ., 2008)
16. PSEN2 Pro334Arg				(Lleo ve diğ., 2002a)  (Lleo ve diğ., 2002b)
17. PSEN2 Val393Met	HEK293	A $\beta$ 42/40 oranında artış yok	pCMVZeo ve pcDNA3	Lipofeksiyon metodu (Lindquista ve diğ., 2008)
18. PSEN2 Thr430Met				(Lleo ve diğ., 2002b)
19. PSEN2 Asp439Ala	MEF	A $\beta$ 42/40 oranında artış yok	pcDNA3	Lipofeksiyon metodu (Walker ve diğ., 2005)
20. PSEN2 Arg29His				(Guerreiro ve diğ., 2008)
21. PSEN2 Ser175Cys				(Piscopo ve diğ., 2008)
22. PSEN2 Tyr231Cys				(Marcon ve diğ., 2008)



Şekil 1.8. PSEN2 FAD mutasyonlarında Aβ seviyeleri

N141I ve M239V patojenik missense mutasyonlarıdır. İki mutasyonda geniş ailelere ayrılmıştır ve amino asit değişikliği korunmamıştır. Sel-12 (*C.elegans*'ın presenilin homologu) ve PSEN1, PSEN2'de amino asit korunumu olduğu ortaya çıkmıştır. Her iki mutasyonun PSEN2 protein (PS2p)'nin varsayılan transmembran domainleri (TMD'ler) olduğu ortaya konulmuştur. Bunlar; N141I 'deki TMDII ve M239V'deki TMDV'dir. R62H mutasyonu 62 yaş üzeri sporadik AH'da gözlenmiştir ve ailesel segregasyon başlamamaktadır.

Tablo 1.6. PSEN2 FAD mutasyonlarında A $\beta$  seviyeleri

PSEN2	A $\beta$ 42 +/- SE	p değeri	A $\beta$ 40 +/- SE	p değeri	A $\beta$ 42/40 +/- SE	p değeri
wt	1.00		1.00		1.00	
D366A	0.00	<0.001	0.00	<0.001	0.00	<0.001
R62H	0.93 +/- 0.07		1.01 +/- 0.13		0.92 +/- 0.05	
T122P	2.92 +/- 0.49	<0.001	0.36 +/- 0.03	<0.001	8.30 +/- 2.04	<0.001
S130L	1.22 +/- 0.07		0.86 +/- 0.04		1.42 +/- 0.01	
N141I	3.74 +/- 0.12	<0.001	0.18 +/- 0.02	<0.001	20.76 +/- 1.81	<0.001
V148I	1.58 +/- 0.13		0.99 +/- 0.17		1.67 +/- 0.42	
M239V	3.30 +/- 0.20	<0.001	0.31 +/- 0.02	<0.001	10.75 +/- 1.50	<0.01
M239I	3.14 +/- 0.28	<0.001	0.44 +/- 0.01	<0.01	7.13 +/- 0.85	<0.05
D439A	0.85 +/- 0.19		0.76 +/- 0.01		1.12 +/- 0.27	

#### 1.6.3.4. PSEN1 ve PSEN2'nin türler arasındaki korunumu

Presenilin homolojisi sadece memeli veya vertebralarda değil, her türlü organizmada bulunmuştur. Presenilinler, meyve sinekleri (*D.melanogaster*) (*D. melanogaster*; Boulianne et al., 1997; Hong and Koo, 1997) ve nematodlar (*C.elegans*) (*C. elegans*; Levitan and Greenwald, 1995) ve insanlara uzak türlerde olmak üzere hayvanlar alemi boyunca bulunmaktadır.

Çoklu amino asit dizisi, domuz ve insan PSEN2 arasında % 97.8'lik dizi benzerliği olduğunu göstermektedir ve 1 dışında korunmuş 10 değişikliğin olduğu tespit edilmiştir (Şekil 1.9) (Madsen ve diğ., 2007). Domuz ve fare amino asit dizileri arasında %95'lik dizi benzerliği ve 8 dışında 20 korunmuş değişikliğin olduğu gözlenmiştir. İnek PSEN2, 449 amino asit uzunluğundadır. %98.2'lik dizi benzerliği bulunmaktadır ve 4 dışında 18 korunumlu substitüsyon bulunmaktadır.

S.scrofa	PSEN2	MLTFMADSEEEVCDERTSLMSAESPTPRSCQEGRQLEDGESAAQWRSDSEEDHEE-D	59
B.taurus	PSEN2	MLTFMADSEEEVCDERTSLMSAESPTPRSCQDGRQLEDGESAAQWRSDSEEDHEEED	60
H.sapiens	PSEN2	MLTFMADSEEEVCDERTSLMSAESPTPRSCQEGRQLEDGENTAQRWQSEEDGEE-D	59
M.musculus	PSEN2	MLAFMADSEEEVCDERTSLMSAESPTSRSCQEGRPQPEDGESTAQWRTQSEEDCEE-D	59
		** : ***** , **** : * * **** : **** : * . **** * *	
		+	
S.scrofa	PSEN2	PDRYVCSGVPGRPPGLEEEELTKYGAKHVIIMLFVVPVTLCMIVVVVATIKSVRFYTEKNGQL	119
B.taurus	PSEN2	PDRYVCSGVPGRPPGLEEEELTKYGAKHVIIMLFVVPVTLCMIVVVVATIKSVRFYTEKNGQL	120
H.sapiens	PSEN2	PDRYVCSGVPGRPPGLEEEELTKYGAKHVIIMLFVVPVTLCMIVVVVATIKSVRFYTEKNGQL	119
M.musculus	PSEN2	PDRYVCSGAPGRPSGLEEEELTKYGAKRVIIMLFVVPVTLCMIVVVVATIKSVRFYTEKNGQL	119
		**** , *** , **** , ***** , ***** , ***** , ***** , *****	
		+	
S.scrofa	PSEN2	IYTPFTEDTPSVGQRLNLSVLNLTIMISVIVVMTIFLVVLYKYRCYKFIHGWLITSSML	179
B.taurus	PSEN2	IYTPFSEDTPSVGQRLNLSVLNLTIMISVIVVMTIFLVVLYKYRCYKFIHGWLIMSSML	180
H.sapiens	PSEN2	IYTFTEDETPSVGQRLNLSVLNLTIMISVIVVMTIFLVVLYKYRCYKFIHGWLIMSSML	179
M.musculus	PSEN2	IYTPFTEDTPSVGQRLNLSVLNLTIMISVIVVMTIFLVVLYKYRCYKFIHGWLIMSSML	179
		*** , * : ***** , ***** , ***** , ***** , ***** , *****	
		+	
S.scrofa	PSEN2	LFLFTYIYLGEVLKTYNVAMDYPTLFLTVWNFGAVGMVCIHWKGPLWQQAYLIMISALM	239
B.taurus	PSEN2	LFLFTYIYLGEVLKTYNVAMDYPTLFLTVWNFGAVGMVCIHWKGPLWQQAYLIMISALM	240
H.sapiens	PSEN2	LFLFTYIYLGEVLKTYNVAMDYPTLLFLTVWNFGAVGMVCIHWKGPLWQQAYLIMISALM	239
M.musculus	PSEN2	LFLFTYIYLGEVLKTYNVAMDYPTLFLAVWNFGAVGMVCIHWKGPLALQQAYLIVISALM	239
		***** , * : ***** , ***** , ***** , ***** , ***** , *****	
		+	
S.scrofa	PSEN2	ALVFIKYLPEWSAWVILGAI SVYDLVAVLC PKGPLRMLVETAQERNEPIFPALIYSSAMV	299
B.taurus	PSEN2	ALVFIKYLPEWSAWVILGAI SVYDLVAVLC PKGPLRMLVETAQERNEPIFPALIYSSAMV	300
H.sapiens	PSEN2	ALVFIKYLPEWSAWVILGAI SVYDLVAVLC PKGPLRMLVETAQERNEPIFPALIYSSAMV	299
M.musculus	PSEN2	ALVFIKYLPEWSAWVILGAI SVYDLVAVLC PKGPLRMLVETAQERNEPIFPALIYSSAMV	299
		***** , * : ***** , ***** , ***** , ***** , ***** , *****	
		R	
S.scrofa	PSEN2	WTVGMAKLDPSSQGALQLPYDPEMEEDSYDSFGEPSYPEVFEPLPGYPGEELEEEERGG	359
B.taurus	PSEN2	WTVGMAKLDPSSQGALQLPYDPEMEEDSYDSFGEPSYPEVFEPLPGYPGEELEEEERGG	360
H.sapiens	PSEN2	WTVGMAKLDPSSQGALQLPYDPEMEEDSYDSFGEPSYPEVFEPLTGYPGEELEEEERGG	359
M.musculus	PSEN2	WTVGMAKLDPSSQGALQLPYDPEMEEDSYDSFGEPSYPEAFEAFLPGYPGEELEEEERGG	359
		***** , * : ***** , ***** , ***** , ***** , ***** , *****	
		+	
S.scrofa	PSEN2	VKLGGLDFIFYSVLVGKAAATGSGDWNTTLACFVAAILIGLCLTLLLLAVFKKALPALPIS	419
B.taurus	PSEN2	VKLGGLDFIFYSVLVGKAAATGSGDWNTTLACFVAAILIGLCLTLLLLAVFKKALPALPIS	420
H.sapiens	PSEN2	VKLGGLDFIFYSVLVGKAAATGSGDWNTTLACFVAAILIGLCLTLLLLAVFKKALPALPIS	419
M.musculus	PSEN2	VKLGGLDFIFYSVLVGKAAATGSGDWNTTLACFVAAILIGLCLTLLLLAVFKKALPALPIS	419
		***** , * : ***** , ***** , ***** , ***** , ***** , *****	
		+	
S.scrofa	PSEN2	ITFGLIFYFSTDNLVRFPMDFLASHQLYI	448
B.taurus	PSEN2	ITFGLIFYFSTDNLVRFPMDFLASHQLYI	449
H.sapiens	PSEN2	ITFGLIFYFSTDNLVRFPMDFLASHQLYI	448
M.musculus	PSEN2	ITFGLIFYFSTDNLVRFPMDFLASHQLYI	448
		***** , * : ***** , ***** , ***** , ***** , ***** , *****	

Şekil 1.9. PSEN2'in çoklu amino asit dizisi (Madsen ve diğ., 2007)

PSEN1'in çoklu amino asit dizisi, domuz ve insan proteinleri arasında %92'lik dizi benzerliği olduğu ortaya koymuştur (Şekil 1.10). İki dizi arasında onbiri korunumlu substitüsyon olmak üzere 34 amino asit değişikliği gözlenmiştir. Domuz ve fare amino asit dizileri karşılaştırıldığında %89'luk benzerlik olduğu ve 16 dışında korunmuş 50 amino asit değişikliği olduğu tespit edilmiştir. İnek PSEN1 geni porcine proteiniyle %94'lük benzerlik gösteren 478 amino asit içermektedir ve 12 dışında 28 amino asit substitüsyonu korunmuştur. (Madsen ve diğ., 2007)



mutantlarının defektif fenotiplerinden kurtulması mümkündür (Baumeister ve diğ., 1997; Levitan ve diğ., 1996). Presenilinler, hayvanlarda olduğu kadar bitkilerde de bulunmaktadır. Genom dizi analizi, bitkilerden *Arabidopsis thaliana*'da presenilin homolojisinin olduğunu ortaya koymuştur. Bu presenilin benzeri protein, primer dizi seviyesinde insan PSEN1 ile % 33'lük homoloji paylaşmaktadır (Czech ve diğ., 2000).

#### **1.6.3.5. Merkezi Sinir Sisteminde PSEN1 ve PSEN2 ekspresyonu**

PSEN1 için 7 ve 2.7 kb'lık ve PSEN2 için 2.3 ve 2.6 kb'lık (Rogaev ve diğ., 1995; Sherrington ve diğ., 1995). iki temel mRNA transkriptini oluşturan 12 ekzon, PSEN1 ve PSEN2 genleri tarafından kodlanmaktadır (Hutton ve diğ., 1996; Levy-Lahad ve diğ., 1996). Presenilinler, çok miktarda eksprese edilirler; transkriptler, beyin ve periferal dokularda tespit edilmiştir (Rogaev et al., 1995; Sherrington ve diğ., 1995). İnsanların ve kemirgenlerin merkezi sinir sisteminde, presenilin mRNA ve protein ekspresyonu nöronlar için gereklidir ve nöronlar beyin boyunca geniş bir şekilde yayılmıştır (Boissiere ve diğ., 1996; Deng ve diğ., 1996b; Kovacs ve diğ., 1996; Moussaoui ve diğ., 1996; Quarteronnet ve diğ., 1996; Suzuki ve diğ., 1996).

PSEN2'nin bölgesel dağılım örnekleri, PSEN1 ile benzerlik gösterir. Her iki protein, çok sayıda nöronal hücre body'lerinde ko-lokalle olur. PSEN1, hücre body'lerinde lokalize olur ve nöronlarda işlenmektedir. Oysa ki, yalnız PSEN2 hücre body'lerinde bulunur. Fakat; nadiren nöronlarda işlenmektedir (Blanchard et al., 1997). AH patolojisi, merkezi sinir sistemiyle sınırlı olmasına karşın, 2-3 kb'lık PSEN2 transkripti bütün dokularda eksprese edilmektedir. Beyindeki genel ekspresyon seviyesi pankreas, kalp ve iskelet kası gibi diğer dokulardan daha düşüktür. Pankreas, kalp ve iskelet kasında PSEN2 ekspresyon seviyesi yüksektir (Levy-Lahad ve diğ., 1995), (Rogaev ve diğ., 1995), (Levy-Lahad ve diğ., 1996).

Beyinde, *in situ* mesajcı RNA (mRNA) hibridizasyonu, yaygın PSEN2 ekspresyonunu göstermektedir ve özellikle nöronlarda ortaya çıkmaktadır. Temporal

lobda, entorhinal korteks’de, parahipokampal kıvrımda (gyrus), hipokampal tabakada ekspresyon yüksektir (Kovacs ve diğ., 1996), (Deng ve diğ., 1996).

PSEN2 mRNA seviyeleri, nöral kayıplar dışında AH beyinde ne gibi etkilere sahip olduğu belirsizdir. AH’sı beş denek ve dört kontrolle yapılan çalışmada PSEN2 mRNA seviyelerinde önemli bir farklılık olmadığı görülmüştür. Fakat; bir AH vakada PSEN2 mRNA seviyesinin yüksek olduğu gözlenmiştir (Deng ve diğ., 1996). 7 AH’sı ve 3 kontrolün olduğu bir başka çalışmada, hipokampusta her nörondaki PSEN2 mRNA azalışının AH ile bağlantılı olduğu bulunmuştur. Ancak; hipokampal astrositlerde PSEN2 mRNA artışı olmuştur (Takami ve diğ., 1997).

### **1.7. Alzheimer Hastalığına Kalıtsal Yatkınlıkla İlişkili Gen ve Proteinler**

AH’nın otozomal dominant kalıtıldığı ailelerde her bireyin AH’ye neden olan mutasyonu kalıtma riski %50’dir. Bazı PSEN2 mutasyonları dışında tam penetrans olması ve başlangıç yaşının aile içinde aynı kalması genetik danışma verilmesini gerektirir. Günümüzde APP, PSEN1 ve PSEN2’deki mutasyonlar için klinik DNA testleri mevcuttur; DNA testi sadece genetik danışma verilmesi amacıyla yapılmalıdır (Nussbaum ve diğ., 2005,s:5).

Tablo 1.7. Alzheimer Hastalığına Kalıtsal Yatkınlıkla İlişkili Gen ve Proteinler

Gen	Proteinin Özellikleri	Normal İşlevi	Familial Alzheimer Hastalığındaki (FAD)Rolu
Amiloid prekürsör protein ( $\beta$ APP)	Endozomlar, lizozomlar ER ve Golgide bulunan tek bir transmembran 'spaning' protein. Normal de $\beta$ APP transmembran domaini içinde endoproteolitik olarak yıkılır, bu nedenle çok az miktarda $\beta$ -amiloid peptid( $A\beta$ ) oluşur.	Bilinmiyor	B-amiloid peptid ( $A\beta$ ) senil plakların temel bileşenidir. Özellikle $A\beta_{42}$ şeklinde olmak üzere artmış $A\beta$ yapımı temel patojenik olaydır.<10 FAD mutasyonu bilinmektedir. Bunlar muhtemelen $A\beta_{42}$ yapımını artırmaktadır.
Presenilin 1 (PSEN1)	Gerek beyin içi ve gerekse beyin dışındaki çeşitli hücre tiplerinde 5-10 membran 'spaning' protein vardır. ER hücre içi membranları, Golgi ve karakterize edilmemiş diğer sitoplazmik veziküllerde lokalizedir.	Bilinmiyor, fakat $\beta$ APP'nin $\gamma$ -sekretaz ile yıkımı için gereklidir. Bazı veriler bu proteinin $\gamma$ -sekretaz olabileceğini telkin etmektedir.	$\beta$ APP ve türevi olan proteininin 'trafficking'inde rol oynayabilir. FAD'de 40'dan fazla mutasyon. Muhtemelen işlev kazanma şeklindedir ve $A\beta_{42}$ yapımı artar.
Presenilin 2 (PSEN2)	Yapısı PSEN1'e benzer. Maksimum ekspresyonu beyin dışındadır. Lokalizasyonu PSEN1'deki gibidir. PSEN1'in etkisine benzer etkiye sahip olabilir.	Bilinmiyor	Sadece iki yanlış anlamlı (missense) mutasyon tanımlanmıştır.
Apolipoprotein E(APOE)	Çeşitli plazma lipoproteinlerinin(VLDL gibi) protein bileşenidir. APOE mRNA'sı transkripsiyonu nöronlarda yoktur; protein ekstrasellüler bölgeden nöronlara alınır.	Nöronlardaki normal işlevi bilinmez. Beyin dışında APOE doku ve hücreler arasında lipid transportunda yer alır. İşlevinin kaybı bir tip hiperlipoproteinemiye (tip III) neden olur.	Bir Alzheimer hastalığına yatkınlık geni APOE senil plakların bir bileşenidir.



## 2. AMAÇ

Alzheimer Hastalığı olgularının büyük bir yüzdesi sporadiktir. Ancak hastalığın etiolojisinde genetik faktörlerin rol oynadığına dair kesin kanıtlar vardır. Bugüne kadar elde edilen bulgular üç gende (APP, PSEN1 ve PSEN2) görülen nokta mutasyonlarının otozomal dominant kalıtmı, erken başlangıçlı, Ailesel Alzheimer Hastalığına yol açtığını göstermiştir.

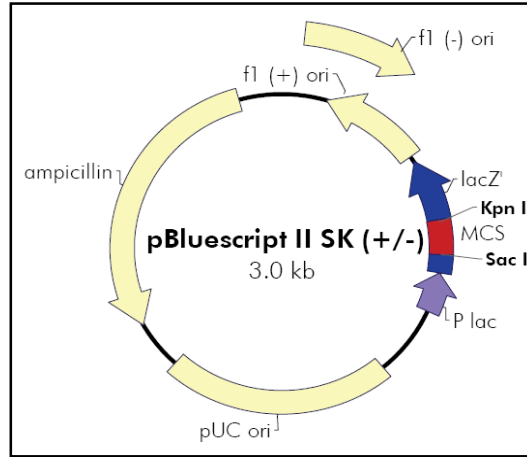
Hücre kültürleri üzerinde yapılan çalışmalarda PSEN1 geni üzerinde meydana gelen bazı anlamlı mutasyonların A $\beta$ 40/A $\beta$ 42 oranında değişimlere yol açtığı gösterilmiştir. PSEN2 geninin hücre kültürleri üzerindeki etkilerini araştıran çalışma sayısı çok azdır.

Bu tezde; PSEN2 geni cDNA'sının klonlanması ve cDNA dizinde yönlendirilmiş mutagenез ile Ala252Thr ve Pro334Arg nokta mutasyonlarının oluşturulması amaçlanmıştır. İleride laboratuvarımızda yapılacak hücre kültürleri deneylerinde kullanılmak üzere mutant dizileri taşıyan vektörleri içeren kompetan *E. coli* stokları oluşturulmuştur.

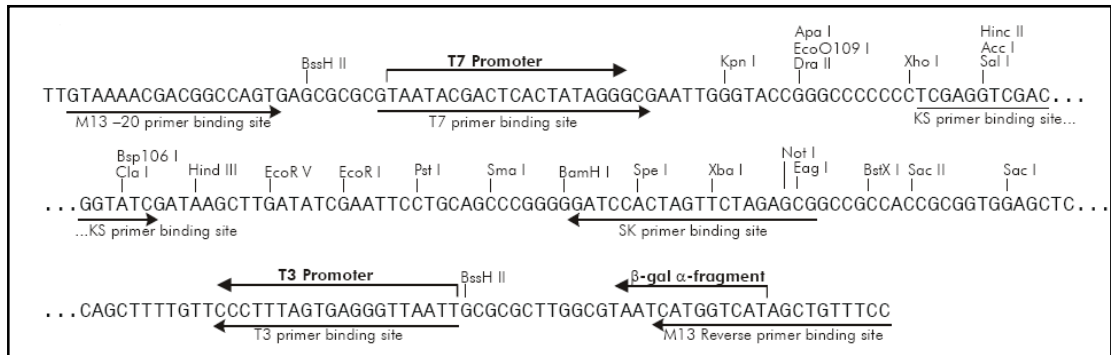
### 3.MATERYAL

#### 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. PSEN2 cDNA'sı taşıyan pcDNA3 vektörünün (Promega) *SmaI* restriksiyon enzimi kesim noktasına (Şekil 3.2) klonlanmış şekilde Flanders Interuniversity, Bioteknoloji Enstitüsü, Nörogenetik 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

Özellik	Nükleotid Pozisyonu
ss-DNA replikasyonunun fl (+) orijini [pBluescript SK (+)]	135–441
ss-DNA replikasyonunun fl (-) orijini [pBluescript SK (-)]	21–327
$\beta$ -galaktosidaz $\alpha$ -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 Cyclers (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 <sup>0</sup> C (Arçelik, Türkiye) -80 <sup>0</sup> C (Thermo, Çin)
Buzdolabı:	+4 <sup>0</sup> 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 <sub>2</sub> O)	Roche, Mannheim, Almanya
Jel elektroforez kimyasalları	10X TBE Buffer	1M Tris-HCl, 900 mM Borik Asit, 20 mM Na <sub>2</sub> 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 <sub>2</sub> 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), ampicilin (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), ampicilin (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 <sub>m</sub>
PZR	PS2cF1	CTGAAGGAACCTGAGACAG	52.2 <sup>0</sup> C
	PS2cF2	GCAAGCTATTGGAGCTGAAG	53.9 <sup>0</sup> C
Mutagenез	Ala252Thr_F	TACCTCCCAGAGTGGTCCACGTGGGTCATCCTGGGCG	72.2 °C
	Ala252Thr_R	CGCCCAGGATGACCCACGTGGACCACTCTGGGAGGTA	72.5 °C
	Pro334Arg_F	GACAGTTTTGGGGAGCGTTTCATACCCCGAAGTC	65.8 °C
	Pro334Arg_R	GACTTCGGGGTATGAACGCTCCCCAAAAGTTC	66.0 °C

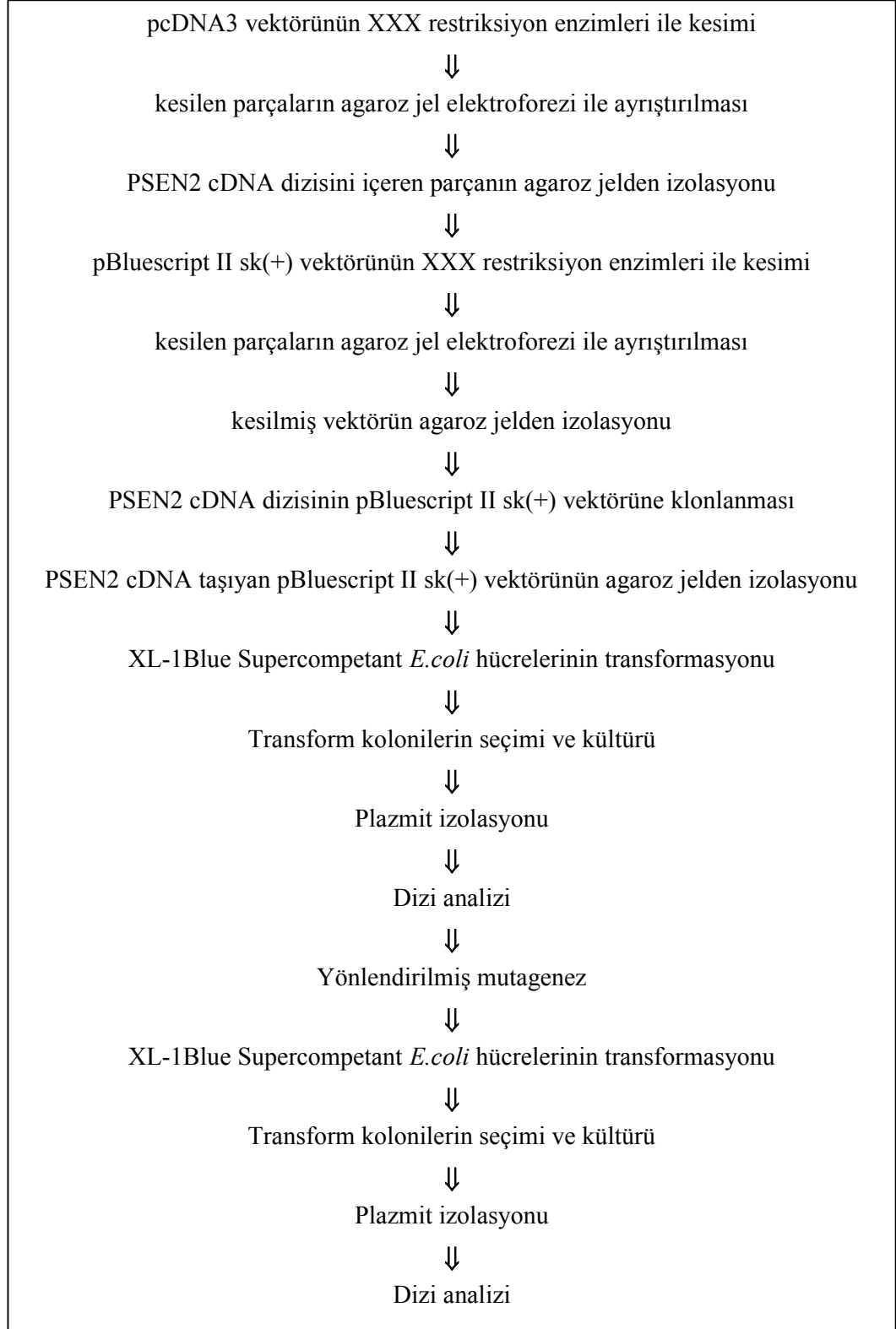
## 4.YÖNTEM

### 4.1. pBluescript II sk(+) vektörünün *Bam*HI ve *Kpn*I enzimleri ile kesilmesi

Antwerp Üniversitesi Nörogenetik Laboratuvarından sağlanan PSEN2 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 PSEN2 cDNA dizisi bu vektörden çıkarılarak daha küçük boylu olan pBluescript II sk(+) vektörüne klonlanması amaçlandı. Kodlayıcı bölge üzerinde oluşturulmak istenilen mutasyonlar PSEN2 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 *Kpn*I restriksiyon enzimleri ile kesilmesi

1 ng 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 ddH<sub>2</sub>O ile hazırlandı. Kesim sonrası ürünler %0,7'lik agaroz jelde 150 V'ta 35dk yürütüldü. Kesilmiş vektör bandı UV ışığında agaroz jelden birstüri ile kesilerek 1,5ml'lik eppendorf tüpe konuldu. Plazmit izolasyon kiti kullanılarak agaroz jelden izole edildi. İzole edilen vektör 15 µl ddH<sub>2</sub>O içinde çözüldü.



Şekil 4.1.Yöntemin ana basamakları

*Bam*HI ile kesilmiş olan vektör 10 ünite *Kpn*I restriksiyon enzimi ile 37°C'de 3 saat boyunca kesildi. Reaksiyon çözeltisi 15 µl ddH<sub>2</sub>O içinde çözülmüş vektör çözeltisi, 1 µl *Kpn*I enzimi, 2 µl reaksiyon tampon çözeltisi ve 2 µl ddH<sub>2</sub>O ile hazırlandı. Kesim sonrası ürünler %0,7'lik agaroz jelde 150 V'ta 35dk yürütüldü. PSEN2 dizisini taşıyan DNA bandı UV ışığında agaroz jelden bistüri ile kesilerek 1,5ml'lik eppendorf tüpe konuldu. Plazmit izolasyon kiti kullanılarak agaroz jelden izole edildi. İzole edilen vektör 15 µl ddH<sub>2</sub>O içinde çözüldü.

#### **4.3. pBluescript II sk(+) vektörünün *Bam*HI ve *Kpn*I enzimleri ile kesilmesi**

1 ng pBluescript II sk(+) vektörü 10 ünite *Bam*HI 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 *Bam*HI enzimi, 17,3 µl ddH<sub>2</sub>O 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 kullanılarak agaroz jelden izole edildi. İzole edilen vektör 15 µl ddH<sub>2</sub>O içinde çözüldü.

*Bam*HI ile kesilmiş olan vektör 10 ünite *Kpn*I restriksiyon enzimi ile 37°C'de 3 saat boyunca kesildi. Reaksiyon çözeltisi 15 µl ddH<sub>2</sub>O içinde çözülmüş vektör çözeltisi, 1 µl *Kpn*I enzimi, 2 µl reaksiyon tampon çözeltisi ve 2 µl ddH<sub>2</sub>O 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 kullanılarak agaroz jelden izole edildi. İzole edilen vektör 15 µl ddH<sub>2</sub>O içinde çözüldü.



#### **4.4. PSEN2 cDNA dizisinin pBluescript II sk(+) vektörüne klonlanması**

##### **4.4.1. XL-1 hücrelerinin transformasyonu**

XL-1 Blue süper kompetant *E.coli* hücreleri PSEN2 içeren pBluescript vektörü ile transform edildi. Bu aşamada kontrol amaçlı olarak PSEN2 içermeyen vektörle transform edilen *E. coli* hücrelerinin ve transform olmamış *E. coli* hücrelerinin de ekimi yapıldı. Her bir transformasyon ayrı ayrı 15 ml'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 PSEN2 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.

##### **4.4.2. XL-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 4 ml RNaz ve RNaz süspansiyonu eklenip yavaşça çalkalandı. Tübün içine 4 ml lizis tamponu eklenerek 6 ila 8 kez alt üst edilerek karıştırıldı ve oda sıcaklığında 3 dakika inkübe edildi. Süspansiyonun içine daha evvelden soğutulmuş olan nötralizasyon tamponundan 4

ml 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 3.6 ml 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 3 ml 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.

#### **4.4.3.Dizi analizi**

PSEN2 cDNA dizisinin pBluescript vektörüne istenildiği gibi klonlanıp klonlanmadığı DNA dizi analizi ile belirlendi. Elde edilen vektör çözeltisinden 10 µl'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.

#### 4.5.PSEN2 cDNA'sı Üzerinde Yönlendirilmiş Mutasyon Oluşturma

PSEN2 CDNA'sı üzerinde Val89Leu ve Ile439Val mutasyonları oluşturmak için QuikChange® XL Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene) kullanıldı. Yönlendirilmiş mutagenез reaksiyonu 5 µl reaksiyon tampon çözeltisi, 5µl PSEN2 içeren pBluescript vektör çözeltisi, 2 µl düz primer, 2 µl ters primer, 1 µl dNTP karışımı, 3 µl QuickSolution, 32 µl ddH<sub>2</sub>O ve 1 µl *PfuTurbo* polimeraz enzimi ile hazırlandı. Yönlendirilmiş mutagenез reaksiyonunun kontrolü için ayrı bir reaksiyon tüpü hazırlandı. Bu tüp içine pBlueScript ve PSEN2 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 koşulları.

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 taşıyıcı olarak kullanılan zincirler wild-type dizi içerir ve

ortamdan uzaklaştırılmaları gerekir. Bu nedenle mutagenез sonucunda elde edilen çözeltiye 1 µl (10 ünite) *DpnI* restriksiyon enzimi eklenerek 37°Cde 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 4.4.1.'de anlatıldığı gibi *DpnI* ile kesilen vektörlerle transform edildi ve ampisilin, IPTG ve X-Gal içeren plate'lere ekilerek gece boyu inkübe edildi.

#### **4.6. XI-1 Transform bakterilerden mutant plazmit izolasyonu ve DNA dizi analizi**

Mutasyon taşıdığı düşünülen transform bakteri kolonilerinden 4.4.2.'de 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) firmasına gönderildi, mutasyonlu bölgenin her iki taraftan da dizi analizi yapıldı. Analiz sonuçları Choromas Pro (Technesium) programı ile değerlendirildi.

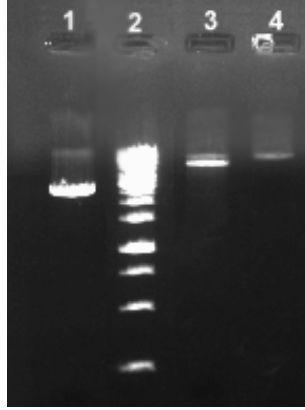
## 5. SONUÇ:

PSEN1, PSEN2, APP ve APOE genlerindeki herhangi bir mutasyonun erken başlangıçlı AH'na neden olabilmektedir. Meydana gelen mutasyonlardan bazıları anlamsız (hastalığa neden olan herhangi bir protein artışı göstermeyen) iken birçoğu anlamlı mutasyondur (hastalık veya üretilen proteinde değişiklik meydana getiren). APOE genindeki alleller ise hastalık için risk faktörü teşkil etmektedir. Amiloid-Beta peptidlerinin sekretaz enzimleri tarafından yanlış kırılmaları neticesinde oluşan A $\beta$ 42 peptidi erken başlangıçlı AH'nı meydana getirmektedir. PSEN2 geninin kodlayıcı bölgelerinde oluşan mutasyonların toplam A $\beta$  miktarını değiştirmese de, A $\beta$ 42 oranında artışa neden olduğu savunulmaktadır. Ancak nokta mutasyonları üzerine hücre kültürlerinde yapılan çalışmalarda A $\beta$ 42 artışı gözlenmemiştir. Bu durum, PSEN2 mutasyonlarının farklı mekanizmalarla hastalığa yol açabileceğini düşündürmektedir. Literatürde bu konudaki deneysel çalışmaların yetersiz olduğu görülmektedir. PSEN2 mutasyonlarının hastalığın mekanizmasındaki rolünün anlaşılabilmesi için PSEN2 mutasyonu taşıyan hücre kültürlerine ihtiyaç duyulmaktadır. Bu tez kapsamında laboratuvarımızda PSEN2 geninin klonlanması, yönlendirilmiş mutagenез ile farklı mutasyonlara sahip vektörler oluşturulması amaçlanmıştır.

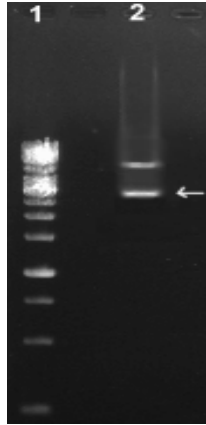
Yapılan deneyler sonucunda PSEN2 cDNA'sı pBluescript II sk(+) vektörünün *Bam*HI (Şekil 5.1) ve *Kpn*I (Şekil 5.2) kesim noktaları arasına klonlanmıştır (Şekil 5.3, Şekil 5.4). İnsert edilmiş PSEN2 cDNA'sı üzerinde Ala252Thr (cDNA üzerindeki 252. baz Alanin→Treonin mutasyonu) (Şekil 5.5) ile Pro334Arg (cDNA üzerindeki 334. baz Prolin→Arginin mutasyonu) (Şekil 5.6) sürekli mutasyonları 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.

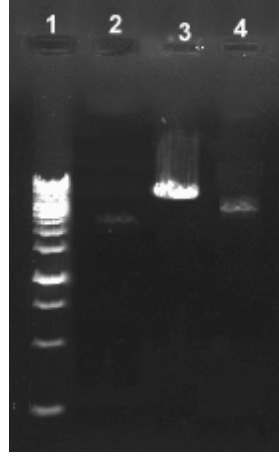
Protein ekspresyonu neticesinde A $\beta$ 42 seviyesinde herhangi bir artış olup olmadığı saptanıp, bu durumun erken başlangıçlı AH üzerindeki etkisi tartışılabilir.



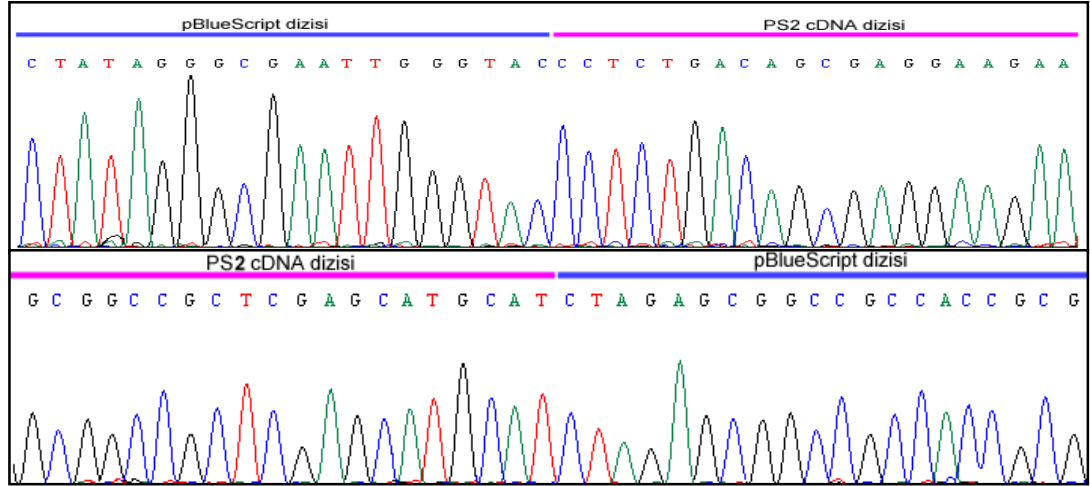
Şekil 5.1. pcDNA3 ve pBlueScript II sk (+) vektörlerinin BamHI restriksiyon enzimi ile kesilmesi. 1) Kesilmiş pBlueScript II sk (+); 2) 1 kb Markör; 3) kesilmiş pcDNA3, 4) kesilmemiş pcDNA3.



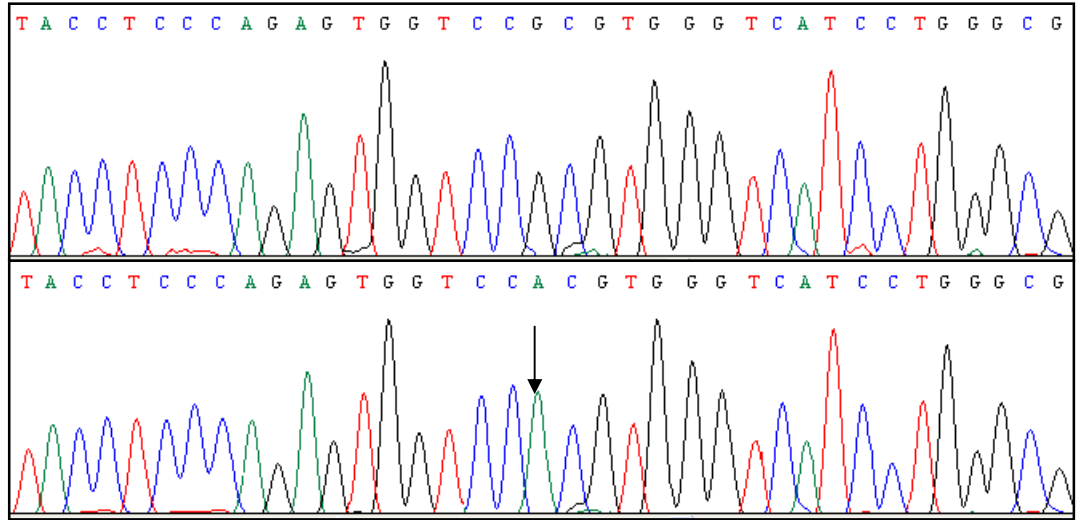
Şekil 5.2. BamHI ile kesildikten sonra KpnI restriksiyon enzimi ile ikinci kez kesilen pcDNA3 vektörü. 1) 1kb Markör, 2) kesilmiş pcDNA3 vektörü, alt bant PSEN2 taşıyan insert.



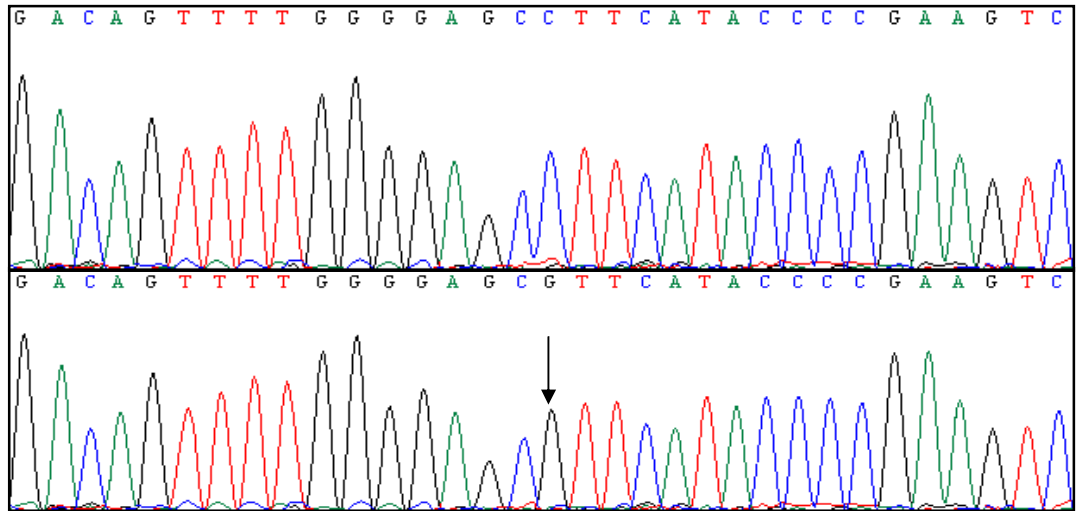
Şekil 5.3. PSEN2 insertinin pBlueScript II sk (+) vektörüne klonlanması



Şekil 5.4. PSEN2 taşıyan pBlueScript II sk (+) vektörünün dizi analizi, Üst panel: PSEN2 cDNA dizisinin başladığı 5' taraf, altpanel dizinin bittiği 3' taraf.



Şekil 5.5. PSEN2 cDNA dizi üzerinde oluşturulan Ala252Thr mutasyonu. Üst panel wild-type dizi, alt panel mutant dizi, ok mutasyonun yeri.



Şekil 5.6. PSEN2 cDNA dizi üzerinde oluşturulan Pro334Arg mutasyonu. Üst panel wild-type dizi, alt panel mutant dizi, ok mutasyonun yeri.



## 6.TARTIŞMA

Alzheimer hastalığı bazı belirtileri açısından yaşlılığa bağlı olarak beyinde oluşan değişiklikleri taklit etmesine rağmen esasında yaşlanma sürecinin normal bir bileşeni değildir. Beyinde senil plaklar ve sinir lifleri yumakları denilen anormal protein oluşumlarının birikimi sonucunda hücre ölümü meydana gelmektedir. Yaşla birlikte Alzheimer hastalığı oluşma riski artmakta olup, 65 yaşından sonra başlayan geç başlangıçlı AH'nın kalıtsal olmadığı düşünülmektedir. PSEN1,PSEN2,APP genlerindeki mutasyonlar Alzheimer hastalığına neden olan anormal proteinler oluşturmaktadır. Başka genlerde tanımlanmış olup bunların geç başlangıçlı Alzheimer geliştirme riski taşıdıkları ancak doğrudan bu hastalığa neden olmadığı söylenebilir. Günümüzde araştırma amacıyla presenilin 1 geni, presenilin 2 geni ve amiloid öncülü protein geni testleri yapılmaktadır. Yapılan tez çalışmasında PSEN2 cDNA'sı üzerinde Ala252Thr (cDNA üzerindeki 252. baz Alanin→Treonin mutasyonu) ile Pro334Arg (cDNA üzerindeki 334. baz Prolin→Arginin mutasyonu) anlamlı mutasyonları oluşturularak ökaryotik hücre kültürlerinde ekspresyon analizi yapma imkanı sağlanmıştır. Bunun sonucunda da protein düzeyinde A $\beta$ 42 oranında herhangi bir artış olup olmadığı saptanabileceğinden erken başlangıçlı AH üzerindeki etkisinin belirlenmesine yönelik adım atılmıştır.

## 7.KAYNAKLAR

ADAMS C; Alzheimer's Disease Research; "A game of connect the dots", Gerontology Vol:43:8-19, 1997

AMADUCCI L, FALCINI M, LIPPI A; "Descriptive epidemiology and risk factors for Alzheimer's disease" Acta Neurol Scand, Vol:139:21-25, 1992

ARAKI W, YUASA K, TAKEDA S, TAKEDA K, SHIROTANI K, TAKAHASHI K, TABIRA T.; "Pro-apoptotic effect of presenilin 2 (PSEN2) overexpression is associated with down-regulation of Bcl-2 in cultured neurons" Journal of Neurochemistry, 79:1161-1168, 2001

BAUMEISTER, R, LEIMER, U, ZWECKBRONNER, I, JAKUBEK, C, GRUNBERG, J, HAASS, C; "Human presenilin-1, but not familial Alzheimer's disease (FAD) mutants, facilitate Caenorhabditis elegans Notch signalling independently of proteolytic processing" Genes and Function, Vol:1:149-159, 1997

BECK J.A., JANSSEN J.C., CAMPHELL T.A., DICKINSON A., FOX N.C., HARVEY R.J., HOULDEN H., ROSSOR M.N., COLLINGE J.; "Early onset familial Alzheimer's disease:mutation frequency in 31 families" Neurobiol.Aging 23 (1S): S311, 2002

Bi, X., CHEN, J., DANG, S., WENTHOLD, R.J., TOCCO, G., BAUDRY, M; "Characterization of calpain-mediated proteolysis of GluR1 subunits of alpha-amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole-4-propionate receptors in rat brain" J. Neurochem, Vol:68, 1484-1494, 1997

BIRD TD, LEVY-LAHAD E, POORKAJ P, SHARMA V, NEMENS E, LAHAD A, LAMPE TH, SCHELLENBERG GD; “Wide range in age of onset for chromosome 1--related familial Alzheimer's disease” *Ann Neurol*, Vol:40: 932–6, 1996

BLACKER D, BERTRAM L, SAUDERS A, MOSCARILLO T, ALBERT M, WIENER H, PERRY R, COLLINS J, HARRELL L, GO R, MAHONEY A, BEATY T, FALLIN M, AVRAMOPOULOU D, CHASE G, FOLSTEIN M, MCINNIS M, BASSETT S, DOHENY K, PUGH E, TANZI R.; “Results of a high-resolution genome screen of 437 Alzheimer's disease families” *Hum Mol Genet* 12:23–32, 2003

BLANCHARD, V., CZECH, C., BONICI, B., CLAVEL, N., GOHIN, M., DALET, K., REVAH, F., PRADIER, L., IMPERATO, A., MOUSSAOUI, S, “Immunohistochemical analysis of presenilin 2 expression in the mouse brain: distribution pattern and co-localization with presenilin 1 protein” *Brain Res* Vol:758: 209-217, 1997

BOISSIERE, F., PRADIER, L., DELAERE, P., FAUCHEUX, B., REVAH, F., BRICE, A., AGID, Y., HIRSCH, E.C; “Regional and cellular presenilin 2 (STM2) gene expression in the human brain” *Neuroreport* Vol:7, 2021-2025, 1996

BORCHELT DR. THINAKARAN G, ECKMAN CB; “Familial Alzheimer's disease-linked presenilin 1 variants elevate Abeta 1-42/1-40 ratio in vitro and in vivo” *Neuron* Vol: 17:1005-1013, 1996

BOSSIS G., MELCHIOR F.; “SUMO: regulating the regulator” *Cell Div.* 1:13, 2006

BOULIANNE, G.L., LIVNE-BAR, I., HUMPHREYS, J.M., LIANG, Y., LIN, C., ROGAEV, E., ST GEORGE-HYSLOP, P; “Cloning and characterization of the Drosophila presenilin homologue” Neuroreport Vol:8, 1025-1029, 1997

BRAAK H, BRAAK E; “Pathology of Alzheimer's disease”, CALNE DB (Ed): “Neurodegenerative Diseases” Saunders, 585-613,1994

BREDT, D.S, NICOLL, R.A, “AMPA receptor trafficking at excitatory synapses” Neuron Vol:40:361–379, 2003

BROUWERS, N.; SLEEGERS, K.; ENGELBORGHES, S.; BOGAERTS, V.; SERNEELS, S.; KAMALI, K.; CORSMIT, E.; DE LEENHEIR, E.; MARTIN, J.J; DE DEYN, P.P; VAN BROECKHOVEN, C.; THEUNS, J.; “ Genetic risk and transcriptional variability of amyloid precursor protein in Alzheimer's disease” Brain, No:129:2984-2991, 2006

BUSCIGLIO, J., LORENZO, A., YEH, J., YANKNER, B. A.; “Beta -amyloid fibrils induce tau phosphorylation and loss of microtubule binding” Neuron Vol:14(4), 879-888,1995

BUSCIGLIO, J., LORENZO, A., YANKNER, B. A.; “ Methodological variables in the assessment of beta amyloid neurotoxicity” Neurobiol. Aging Vol:13(5), 609-612,1992

CAMPION D, DUMANCHIN C, HANNEQUIN D, DUBOIS B, BELLIARD S, PUEL M, THOMAS-ANTERION C, MICHON A, MARTIN C, CHARBONNIER F, RAUX G, CAMUZAT A, PENET C, MESNAGE V, MARTINEZ M, CLERGET-DARPOUX F, BRICE A, FREBOURG T; “Early-onset autosomal dominant Alzheimer disease: prevalence, genetic heterogeneity, and mutation spectrum” Am J Hum Genet Vol:65: 664–70, 1999

CARROLL, R.C., LISSIN, D.V., VON ZASTROW, M., NICOLL, R.A., MALENKA, R.C.; “Rapid redistribution of glutamate receptors contributes to long-term depression in hippocampal cultures” *Nat. Neurosci.* Vol:2:454–460, 1999

CHAN, S.L., GRIFFIN, W.S., MATTSON, M.P.; “Evidence for caspase-mediated cleavage of AMPA receptor subunits in neuronal apoptosis and Alzheimer's disease” *J. Neurosci. Res.* Vol:57:315–323, 1999

CHARTIER-HARLIN M.C., CRAWFORD F., HOULDEN H., WARREN A., HUGHES D., FIDANI L.; “Early-onset Alzheimer's disease caused by mutations at codon 717 of the beta-amyloid precursor protein gene” *Nature* 353:844–846, 1991

CHOI, D.W.; “Calcium: still center-stage in hypoxic-ischemic neuronal death” *Trends Neurosci.* Vol:18:58–60, 1995

CHRISTIAN C., GÜNTER T., LAURENT P.; “Presenilins and Alzheimer's disease: biological functions and pathogenic mechanisms” *Progress in Neurobiology* Vol:60:363-384, 2000

CLARIMÓN J, GUERREIRO R, LLEÓ A, GUARDIA C, BLES A, GÓMEZ-ISLA T, BOADA M, BULLIDO MJ, FERRER I, MARTÍNEZ-LAGE P, MASDEU J, MOLINA L, MOLINUEVO JL, PASTOR P, PÉREZ-TUR J, REY MJ, SÁNCHEZ-VALLE R, TÀRRAGA L, VALDIVIESO F, SINGLETON A, HARDY J.; “Genetic screening in a large cohort of early-onset Alzheimer's disease patients from Spain: novel mutations in the amyloid precursor protein and presenilins” *Alzheimer's & Dementia* 4 Supp 2: T583, 2008

CLARK R.F., HUTTON M., FULDNER R.A., FROELINCH S., KARRAN E., TALBOT C., CROOK R., LENDON C., PRÍHAR G., HE C., KORENBLAT K., MARTÍNEZ 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., RUÍZ A., OSSA J., LOPERA F., ACROS F.,M., MADRÍGAL L., COLLINGE J., HUMPHREYS C., ASWORTH A., SARNER S., FOX N., HARVEY R., KENNEDY A., ROQUES P., CLÍNE R.T., PHÍLÍPS C.A., VENTER J.C., FORSELL L., AXELMAN K., LÍLÍUS L., JOHNSTON J., COWBURN R., VÍITANEN M., WÍNBLAD B., KOSÍK K., HALTÍA M., PÖYHENEN M., DÍCKSON D., MANN D., NEARY D., SNOWDEN J., LANTOS P., LANNFELT L., ROSSOR M., ROBERTS G.W., ADAMS M.D., HARDY J., GOATE A.; “The structure of the presenilin 1(S182) gene and identification of six novel mutations in early onset AD families” *Nat.Genet.*11:219-222, 1995

CLARK, M. J., GAGNON, J., WÍLLÍAMS, A. E, BARCLAY, A. N.; “MRC OX-2 antigen: a lymphoid/neuronal membrane glycoprotein with a structure like a single immunoglobulin light chain” *EMBO J.* Vol: 4:113-118, 1985

CONN, P.J., PÍN, J.P.; “Pharmacology and functions of metabotropic glutamate receptors”. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* Vol:37:205–237, 1997

COOPER, GEOFFREY M; HAUSMAN, ROBER E; “The Cell: A Molecular Approach”, Third Edition, Boston University,2006

CORDER E.H., SAUNDERS A.M., STRÍTTMATTER W.J., SCHMECHEL D.E., GASKELL P.C., SMALL G.W., ROSES A.D., HAÍNES J.L., PERÍCAK-VANCE M.A.; “Gene dose of apolipoprotein E type  $\epsilon$ 4 allele and the risk of Alzheimer’s disease in late onset families” *Science* Vol:261:921-923, 1993

COUTINHO, V., KNOPFEL, T.; “Metabotropic glutamate receptors: electrical and chemical signaling properties” *Neuroscientist* Vol:8, 551–561, 2002

CRUTS M., DUIJN C.M.V., BACKHOVENS H., BROECK M.V.D, WEHNERT A., SERNEELS S., SHERRINGTON R., HUTTON M., HARDY J., ST GEORGE-HYSLOP P.H., HOFMAN A., BROECKHOVEN C.V.; “Estimation of the genetic contribution of presenilin-1 and presenilin 2 mutations in a population-based study of presenile Alzheimer’s disease” *Hum.Mol.genet.* 7:43-51, 1998

Cruts M.; Alzheimer Disease and Frontotemporal Dementia Mutation Database, 2007

CRUTS, M., HENDRIKS, L., VAN BROECKHOVEN, C.; “The presenilin genes: a new gene family involved in Alzheimer's disease pathology” *Hum. Mol. Genet* Vol:5, 1449-1455, 1996

CUMMINGS JL, KAUFER D: “Neuropsychiatric aspect of Alzheimer's disease” *Neurology* Vol:47:876-883,1996

CUMMINGS JL, VINTERS HV, COLE GM, KHACHATURIAN ZS.; “Alzheimer's disease: etiologies, pathophysiology, cognitive reserve and treatment opportunities” *Neurology* 51 Suppl. 1: 2–17, 1998

CURTIS D, NORTH B, SHAM P.; “A novel method of twolocus linkage analysis applied to a genome scan for late onset Alzheimer’s disease” *Ann Hum Genet* 65:473–482, 2001

DE SAUVAGE, F., OCTAVE, J.-N.; “A novel mRNA of the A4 amyloid precursor gene coding for a possibly secreted protein” *Science* Vol:245:651-653, 1989

DENG, G., SU, J.H., COTMAN, C.W.; “Gene expression of Alzheimer-associated presenilin-2 in the frontal cortex of Alzheimer and aged control brain” FEBS Lett Vol:394:17-20, 1996b

DESTERRO J.M., THOMSON J., HAY R.T.; “Ubch9 conjugates SUMO but not ubiquitin” FEBS Lett. 417: 297–300, 1997

DİNGLEDİNE, R., BORGES, K., BOWİE, D., TRAYNELİS, S.F.; “The glutamate receptor ion channels” Pharmacol. Rev. Vol:51:7–61, 1999

EKER, E.; “Türkiye’de Sık Karşılaşılan Psikiyatrik Hastalıklar”, İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, Sempozyum Dizisi, No:62: 85-110, Mart 2008

ESCH, F. S., KEİM, P. S., BEATTİE, E. C., BLACHER, R. W., CULWELL, A. R., OLTERS DORF, T., MCCLURE, D., WARD, P. J.; “Cleavage of amyloid beta peptide during constitutive processing of its precursor” Science Vol:248:1122-1124, 1990

FİLLEY CM, ROLLİNS YD, ANDERSON CA, ARCİNİEGAS DB, HOWARD KL, MURRELL JR, BOYER PJ, KLEİNSCHMİDT-DEMASTERS BK, GHETTİ B.; “The Genetics of Very Early Onset Alzheimer Disease” Cog Behav Neurol Vol:20 No:3:149–156, 2007

FİNCKH U., MULLER-THOMSEN T., MANN U., EGGERS C., MARKSTEİNER J., MEİNS W., BİNETTİ G., ALBERİCİ A., HOCK C., NİTSCH R.M., GAL A., “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, 2000



FOX NC, KENNEDY AM, HARVEY RJ, LANTOS PL, ROQUES PK, COLLINGE J, HARDY J, HUTTON M, STEVENS JM, WARRINGTON EK, ROSSOR MN.; “Clinicopathological features of familial Alzheimer's disease associated with the M139V mutation in the presenilin 1 gene. Pedigree but not mutation specific age at onset provides evidence for a further genetic factor” *Brain*, Vol:120 No:3:491–501, 1997

FRASER SP, SUH YH, DJAMGOZ MBA: “Ionic effects of the Alzheimer's disease  $\beta$ -amyloid precursor protein and its metabolic fragments” *Trends Neurosci* 117; 20(2):67-72,1997

GACIA M., SAFRANOW K., GABRYELEWICZ T., STYCZYŃSKA M., PEPLOŃSKA B., DZIEDZIEJKO V., JAKUBOWSKA K., CHLUBEK D., ŻEKANOWSKI C., BARCİKOWSKA M.; “Two polymorphisms of presenilin-2 gene (PSEN2) 50 regulatory region are not associated with Alzheimer's disease (AD) in the Polish population” *J Neural Transm* 115: 85–90, 2008

GALVAN, V., GOROSTIZA, O. F., BANWAÏT, S., ATAÏE, M., LOGVINOVA, A. V., SĪTARAMAN, S., CARLSON, E., SAGĪ, S. A., CHEVALLIER, N., JĪN, K., GREENBERG, D. A., BREDESEN, D. E.; “Reversal of Alzheimer's-like pathology and behavior in human APP transgenic mice by mutation of Asp664” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103(18), 7130-7135, 2006

GELDMACHER DS. WHITEHOUSE PJ.; “Evaluation of Dementia” *N.Engl J Med.* 335{5}:330-336, 1996

GLENNER G.G., WONG C.W.; “Alzheimer's disease: initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein” *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 120:885-890,1984

GOATE A., CHARTIER H.M.C., MULLAN M., BROWN J., CRAWFORD F., FIDANI L., GIUFFRA L., HAYNES A., IRVING N., JAMES L.; “Segregation of a missense mutation in the amyloid precursor protein gene with familial Alzheimer's disease” *Nature* 349(6311):704-706, 1991

GODBOLT AK, CIPOLOTTI L, WATT H, FOX NC, JANSSEN JC, ROSSOR MN  
“The natural history of Alzheimer disease: a longitudinal presymptomatic and symptomatic study of a familial cohort” *Arch Neurol.* 61: 1743–8, 2004

GOLDE, T. E., ESTUS, S., USIAK, M., YOUNKIU, L. H., AND YOUNKIN, S. G.;  
“Expression of beta amyloid protein precursor mRNAs: recognition of a novel alternatively spliced form and quantitation in Alzheimer's disease using PCR”  
*Neuron* 4(2):253–267, 1990

GUERREIRO RJ, BAQUERO M, BLES A, BOADA M, BRÁS JM, BULLIDO MJ, CALADO A, CROOK R, FERREIRA C, FRANK A, GÓMEZ-ISLA T, HERNÁNDEZ I, LLEÓ A, MACHADO A, MARTÍNEZ-LAGE P, MASDEU J, MOLINA-PORCEL L, MOLINUEVO JL, PASTOR P, PÉREZ-TUR J, RELVAS R, OLIVEIRA CR, RIBEIRO MH, ROGAEVA E, SA A, SAMARANCH L, SÁNCHEZ-VALLE R, SANTANA I, TÀRRAGA L, VALDIVIESO F, SINGLETON A, HARDY J, CLARIMÓN J; “Genetic screening of Alzheimer's disease genes in Iberian and African samples yields novel mutations in presenilins and APP” *Neurobiology of Aging*, 2008

GUSTAFSON L, BRUN A, ENGLUND E, HAGNELL O, NILSSON K, STENSMYR M, OHLIN AK, ABRAHAMSON M.; “A 50-year perspective of a family with chromosome-14-linked Alzheimer's disease” *Hum Genet.* 102: 253–7, 1998

HARDY J: “Amyloid, the presenilins and Alzheimer's disease” *Trend Neurosci* 20(4): 154-159, 1997

HARKANY, T., ABRAHAM, I., TÍMMERMAN, W., LASKAY, G., TOTH, B., SASVARI, M., KONYA, C., SEBENS, J.B., KORF, J., NYAKAS, C., ZARANDI, M., SOOS, K., PENKE, B., LUITEN, P.G.; “Beta-amyloid neurotoxicity is mediated by a glutamatetriggered excitotoxic cascade in rat nucleus basalis” *Eur. J. Neurosci.* 12:2735–2745, 2000

HAY R.T.; “SUMO: a history of modification” *Mol. Cell* 18:1–12, 2005

HAYASHI, Y., SHI, S.H., ESTEBAN, J.A., PICCINI, A., PONCER, J.C., MALINOW, R.; “Driving AMPA receptors into synapses by LTP and CaMKII: requirement for GluR1 and PDZ domain interaction” *Science* 287:2262–2267, 2000

HUTTON, M., BUSFIELD, F., WRAGG, M., CROOK, R., PEREZ-TU, R.J., CLARK, R.F., PRIHA, R.G., TALBOT, C., PHILLIPS, H., WRIGHT, K., BAKER, M., LENDON, C., DUE, K., MARTÍNEZ, A., HOULDEN, H., NICHOLS, A., KARRAN, E., ROBERTS, G., ROQUES, P., ROSSOR, M., VENTER, J.C., ADAMS, M.D., CLINE, R.T., PHILLIPS, C.A., GOATE, A.; “Complete analysis of the presenilin 1 gene in early-onset Alzheimer's disease” *Neuroreport* 7:801-805, 1996

IKEDA I., URAKAMI K., ISOE K., OHNO K., NAKASHIMA K.; “The expression of presenilin-1 mRNA in skin fibroblasts from Alzheimer's disease” *Dement. Geriatr. Cogn. Disord.* 9:145–148, 1997

JACOBSEN, J. S., BLUME, A. J., AND VÍTEK, M. P.; “Quantitative measurement of alternatively spliced amyloid precursor protein mRNA expression in Alzheimer's disease and normal brain by S<sub>1</sub> nuclease protection analysis” *Neurobiol. Aging* 12:585-592, 1991

JANSSEN JC, BECK JA, CAMPBELL TA, DICKINSON A, FOX NC, HARVEY RJ, HOULDEN H, ROSSOR MN, COLLINGE J.; “Early onset familial Alzheimer's disease: Mutation frequency in 31 families” *Neurology* 60: 235–9, 2003

JOHNSTON J.A., FROELICH S., LANNFELT L., COWBURN R.F.; “Quantification of presenilin-1 mRNA in Alzheimer's disease brains” *FEBS Lett* 394:279–284, 1996

KANG, J., LEMAIRE, H. G., UNTERBECK, A., SALBAUM, J. M., MASTERS, C. L., GRZESCHIK, K. H., MULTHAUP, G., BEYREUTHER, K., AND MUELLER-HILL, B.; “The precursor of Alzheimer's disease amyloid A4 protein resembles a cell-surface receptor” *Nature*. 325(6106):733–736, 1987

KANG, J., MULLER-HILL, B.; “Differential splicing of Alzheimer's disease amyloid A4 precursor RNA in rat tissues: PreA4595 mRNA is predominantly produced in rat and human brain” *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 166, 1192-1200, 1990

KANG, J., MULLER-HILL, B.; “The sequence of the two extra exons in rat preA4” *Nucleic Acids Res*, Vol:17(5):2130, 1989

KAWAS CH; “Epidemiology of Alzheimer's Disease. in: *Dementia Update*”, American Academy of Neurology 49th Annual Meeting, American Academy of Neurology Press, 23-38, 1997

KEHOE P, WAVRANT-DE VRËEZE F, CROOK R, WU WS, HOLMANS P, FENTON I, SPURLOCK G, NORTON N, WILLIAMS H, WILLIAMS N, LOVESTONE S, PE'REZ-TUR P, HUTTON M, CHARTIER-HARLIN M, SHEARS S, ROEHL K, BOOTH J, VAN VOORST W, RAMIĆ D, WILLIAMS J, GOATE A, HARDY J, OWEN MJ.; "A full genome scan for late onset Alzheimer's disease" *Hum Mol Genet* 8: 237–245, 1999

KHACHATURIAN AS, CORCORAN CD, MAYER LS, ZANDI PP, BREITNER JC "Apolipoprotein E epsilon4 count affects age at onset of Alzheimer disease, but not lifetime susceptibility: The Cache County Study" *Arch Gen Psychiatry* 61: 518–24, 2004

KITAGUCHI, N., TAKAHASHI, Y., TOKUSHIMA, Y., SHIOJIRI, S., ITO, H.; "Novel precursor of Alzheimer's disease amyloid protein shows protease inhibitory activity" *Nature* 331,530-532, 1988

KONIG, G., MONNING, U., CZECH, C., PRIOR, R., BANATI, R. B., SCHREITER-GASSER, U., BAUER, J., MASTERS, C. L., BEYREUTHER, K.; "Identification and differential expression of a novel alternative splice isoform of the betaA4 amyloid precursor protein (APP) mRNA in leukocytes and brain microglial cells" *J. Biol. Chem.* 267:10804-10809, 1992

KOVACS 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.; "Alzheimer-associated presenilins 1 and 2: neuronal expression in brain and localization to intracellular membranes in mammalian cells" *Nat.Med.* Vol:2:224-229, 1996

KUKULL WA, HIGDON R, BOWEN JD, MCCORMICK WC, TERI L, SCHELLENBERG GD, VAN BELLE G, JOLLEY L, LARSON EB.; “Dementia and Alzheimer disease incidence: a prospective cohort study” Arch Neurol. 59: 1737–46, 2002

LAI F, WILLIAMS RS.; “A prospective study of Alzheimer disease in Down Syndrome” Arch Neurol. 46:849-853, 1989

LAMBERT, M. P., BARLOW, A. K., CHROMY, B. A., EDWARDS, C., FREED, R., LIOSATOS, M., MORGAN, T. E., ROZOVSKY, I., TROMMER, B., VIOLA, K. L., WALS, P., ZHANG, C., FINCH, C. E., KRAFFT, G. A., KLEIN, W. L.; “Diffusible, nonfibrillar ligands derived from Abeta1-42 are potent central nervous system neurotoxins” Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. A. 95(11): 6448-6453, 1998

LAO J.I., BEYER K., FERNANDEZ-NOVOA L., CACABELOS R.; “A novel mutation in the predicted TM2 domain of the presenilin 2 gene in a Spanish patient with late-onset Alzheimer’s disease ” Neurogenetics 1: 293-296, 1998

LEE, R.K., WURTMAN, R.J., COX, A.J., NITSCH, R.M.; “Amyloid precursor protein processing is stimulated by metabotropic glutamate receptors” Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 92:8083–8087, 1995

LEVITAN, D., DOYLE, T.G., BROUSSEAU, D., LEE, M.K., THINAKARAN, G., SLUNT, H.H., SISODIA, S.S., GREENWALD, I.; “Assessment of normal and mutant human presenilin function in *Caenorhabditis elegans*” Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93, 14940-14944, 1996

LEVITAN, D., GREENWALD, I.; "Facilitation of lin-12-mediated signalling by sel-12, a *Caenorhabditis elegans* S182 Alzheimer's disease gene" *Nature* 377:351-354, 1995.

LEVY-LAHAD E., LAHAD A., WIJSMAN E.M., BIRD T.D., SCHELLENBERG G.D.; "Apolipoprotein E genotypes and age of onset in early-onset familial Alzheimer's disease" *Ann.neurol.*Vol:38:678-680, 1995

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., GUENETTE S.Y., GALAS D., NEMENS E., WIJSMAN E.M., BIRD T.D., SCHELLENBERG G.D., TANZI R.E.; "Candidate gene for chromosome 1 familial Alzheimer's disease locus" *Science* Vol: 269(5226):973-977, 1995

LEVY-LAHAD, E., POORKAJ, P., WANG, K., FU, Y.H., OSHIMA, J., MULLIGAN, J., SCHELLENBERG, G.D.; "Genomic structure and expression of STM2, the chromosome 1 familial Alzheimer's disease gene" *Genomics* 34:198-204, 1996

LINDQUISTA, S. G; HASHOLT L; BAHL J. M. C; HEEGAARD N. H. H; ANDERSENA B. B; NØRREMØLLE A; STOKHOLM J; SCHWARTZD M; BATBAYLI M; LAURSEN H; PARDOSSI-PIQUARD R; CHEN F; GEORGE-HYSLOP P.ST; WALDEMAR G; NIELSEN J. E.; "A novel presenilin 2 mutation (V393M) in early-onset dementia with profound language impairment" *European Journal of Neurology*, doi:10.1111/j.1468-1331.2008.02256.x, 2008

LÍPPA C.F., SAUNDERS A.M., SMÍTH T.W., SWEARER J.M., DRACHMAN D.A., GHETTI B.; “Familial and sporadic Alzheimer’s disease: neuropathology cannot exclude a common pathway”, *Neurology* Vol: 46 (1996) 406–412.

LÍU, T., PERRY, G., CHAN, H. W., VERDÍLE, G., MARTÍNS, R. N., SMÍTH, M. A., ATWOOD, C.S.; “Amyloid- $\beta$ -induced toxicity of primary neurons is dependent upon differentiation associated increases in tau and cyclin-dependent kinase 5” *J. Neurochem.* 88(3):554-563, 2004

LLEO A, BLESAS R, QUERALT R, EZQUERRA M, MOLÍNUEVO JL, PENACASANOVA J, ROJO A, OLÍVA R “Frequency of mutations in the presenilin and amyloid precursor protein genes in early-onset Alzheimer disease in Spain” *Archives of Neurology* Vol:59: 1759-1763, 2002b

LLEO A, CASTELLVÍ M, BLESAS R, OLÍVA R; “Uncommon polymorphism in the presenilin genes in human familial Alzheimer's disease: not to be mistaken with a pathogenic mutation” *Neuroscience Letters* Vol:318: 166-168, 2002a

LLEO A, BLESAS R, GENERE J, CASTELLÍ M, PASTORM P, QUERALT R, OLÍVA R; “A novel presenilin 2 gene mutation (D439A) in a patient with early-onset Alzheimer’s disease” *Neurology*, Vol:57:1926-1928, 2001

LORENZO, A., YUAN, M., ZHANG, Z., PAGANETTI, P. A., STURCHLER-PÍERRAT, C., STAUFENBIEL, M., MAUTÍNO, J., VÍGO, F. S., SOMMER, B., YANKNER, B. A.; “Amyloid beta interacts with the amyloid precursor protein: a potential toxic mechanism in Alzheimer's disease” *Nat. Neurosci.* 3(5), 460-464, 2000



LU, D. C., RABÍZADEH, S., CHANDRA, S., SHAYYA, R. F., ELLERBY, L. M., YE, X., SALVESEN, G. S., KOO, E.H., BREDESEN, D. E.; “A second cytotoxic proteolytic peptide derived from amyloid beta-protein precursor” *Nat. Med.* 6(4):397-404, 2000

LU, D. C., SHAKED, G. M., MASLIAH, E., BREDESEN, D. E., KOO, E. H.; “Amyloid beta protein toxicity mediated by the formation of amyloid-beta protein precursor complexes” *Ann. Neurol.* 54(6):781-789, 2003

MADSEN L.B., THOMSEN B., LARSEN K., BENDIXEN C., HOLM I.E., FREDHOLM M., JØRGENSEN A.L, NIELSEN A.L.; “Molecular characterization and temporal expression profiling of presenilins in the developing porcine brain” *BMC Neuroscience* 8:72 doi:10.1186/1471-2202-8-72, 2007

MAHLEY R.W., RALL JR S.C.; “Apolipoprotein E:far more than a lipid transport protein” *Ann.Rev. Genomics Hum. Genet.*1:507-537, 2000

MAHLEY R.W.; “Apolipoprotein E:cholesterol transport protein with expanding role in cell biology” *Science* 240:622-630, 1988

MARCON G, GIACCONE G, DÍFEDE G, GIOVAGNOLI AR, TAGLIAVINI F “A novel missense mutation in Psen2 gene associated with a clinical phenotype of frontotemporal dementia” *Alzheimer's & Dementia* 4 Supp 2: T590, 2008

MASTERS, C. L., MULTHAUP, G., SIMMS, G., POTTGIESSER, J. MARTINS, R. N., AND BEYREUTHER, K.;“Neuronal origin of a cerebral amyloid: neurofibrillary tangles of Alzheimer's disease contain the same protein as the amyloid of plaque cores and blood vessels” *EMBO J.* 4:2757-2763, 1985

MATTSON, M. P., CHENG, B., CULWELL, A. R., ESCH, F. S., LIEBERBURG, I., AND RYDEL, R. E.; "Evidence for excitoprotective and intraneuronal calcium-regulating roles for secreted forms of the beta-amyloid precursor protein" *Neuron* 10(2):243-254, 1993

MAYEUX R, LEE J, ROMAS S, MAYO D, SANTANA V, WILLIAMSON J, CIAPPA A, RONDON H, ESTEVEZ P, LANTIGUA R, MEDRANO M, TORRES M, STERN Y, TYCKO B, KNOWLES J.; "Chromosome-12 mapping of late-onset Alzheimer disease among Caribbean Hispanics" *Am J Hum Genet* 70:237-243, 2002

MCGEER PL, SCHULZER M. MCGEER EG; "Arthritis and antiinflammatory agents as possible protective factors for Alzheimer's disease: A review of 17 epidemiologic studies" *Neurology*,47:425-432, 1997

MCMILLAN P.J., LEVERENZ J.B., POORKAJ P., SCHELLENBERG G.D., DORSA D.M.; "Neuronal expression of STM2 mRNA in human brain is reduced in Alzheimer's disease" *J. Histochem. Cytochem.* 44:1215-1222, 1996

MENDEZ MF, UNDERWOOD KL, ZANDER BA.; "Risk factors in Alzheimer's disease; A clinicopathologic study" *Neurology*, 42:770-775,1992

MENENDEZ M.; "Pathological and clinical heterogeneity of presenilin 1 gene mutations" *J Alzheimers Dis.* 6: 475-82, 2004

MEYER MR, TSCHANZ JT, NORTON MC.; "APOE genotype predicts when--not whether--one is predisposed to develop Alzheimer disease" *Nat Genet.*19: 321-2, 1998

MÍGUEL-HÍDALGO, J.J., ALVAREZ, X.A., CACABELOS, R., QUACK, G.; “Neuroprotection by memantine against neurodegeneration induced by beta amyloid(1–40) ” Brain Res. 958:210–221, 2002

MÍLLER, E.K., COHEN, J.D.; “An integrative theory of prefrontal cortex function”. Annu. Rev. Neurosci. 24, 167–202, 2001

MÍLWARD, E. A., PAPADOPOULOS, R., FULLER, S. J., MOÏR, R. D., SMALL, D., BEYREUTHER, K., MASTERS, C. L.; “The amyloid protein precursor of Alzheimer's disease is a mediator of the effects of nerve growth factor on neurite outgrowth” Neuron 129:129-137, 1992

MÍYAZAKÍ, K., HASEGAWA, M., FUNAHASHÍ, K., UMEDA, M.; “A metalloproteinase inhibitor domain in Alzheimer amyloid protein precursor” Nature 362:839-841, 1993

MONNÍNG, U., KONÍG, G., BANATÍ, R. B., MECHLER, H., CZECH, C., GEHRMANN, J., SCHREÏTER GASSER, U., MASTERS, C. L., BEYREUTHER, K.; “Alzheimer beta A4-amyloid protein precursor in immunocompetent cells” J. Biol. Chem. 267:23950-23956, 1992

MOUSSAOUÍ, S., CZECH, C., PRADIÉR, L., BLANCHARD, V., BONÍCÍ, B., GOHÍN, M., IMPERATO, A., REVAH, F.; “Immunohistochemical analysis of presenilin-1 expression in the mouse brain” FEBS Lett 383:219-222, 1996

MULLAN M., HOULDEN H., WÍNDELSPECHT M., FÍDANÍ L., LOMBARDÍ C., DÍAZ P.; “A locus for familial early-onset Alzheimer's disease on the long arm of chromosome 14, proximal to the alpha 1 antichymotrypsin gene” Nat. Genet. 2:340–342, 1992

MULLER-HILL, B., BEYREUTHER, K.; "Molecular biology of Alzheimer's disease" *Annu. Rev. Biochem.* 58:287-307, 1989

MURRELL J., FARLOW M., GHETTI B., BENSON M.D.; "A mutation in the amyloid precursor protein associated with hereditary Alzheimer's disease" *Science* 254:97-99, 1991

NEVE, R. L., FINCH, E. A., DAWES, L. R.; "Expression of the Alzheimer amyloid precursor gene transcripts in the human brain" *Neuron* 1, 669-677, 1988

NISHIMOTO, I., OKAMOTO, T., MATSUURA, Y., TAKAHASHI, S., OKAMOTO, T., MURAYAMA, Y., OGATA, E.; "Alzheimer amyloid protein precursor complexes with brain GTP-binding protein G(o)" *Nature* 362:75-79, 1993

NISHIYAMA K., MURAYAMA S., SUZUKI T., MITSUI Y., SAKAKI Y., KANAZAWA I.; "Presenilin 1 mRNA expression in hippocampi of sporadic Alzheimer's disease patients" *Neurosci. Res.* 26:75-78, 1996

NUSSBAUM, ROBERT L; MCLNNES, RODERICK R; WILLARD, HUNTINGTON F; Thompson & Thompson Genetics in Medicine, 2005

OLSON J, GODDARD K, DUDEK D.; "The amyloid precursor protein locus and very-late-onset Alzheimer disease" *Am J Hum Genet* 69:895-889, 2001

OYAMA, F., SHIMADA, H., OYAMA, R., TITANI, K., IHARA, Y.; "Differential expression of beta amyloid protein precursor (APP) and tau mRNA in the aged human brain: individual variability and correlation between APP-751 and four-repeat tau" *J. Neuropath. Exp. Neurol.* 50,560-578, 1991

PALMERT, M. R., GOLDE, T. E., COHEN, M. L., KOVACS, D. M., TANZI, R. E., GUSELLA, J. F., USIAK, M. F., YOUNKIN, L. H., YOUNKIN, S. G.; Amyloid protein precursor messenger RNAs: differential expression in Alzheimer's disease. *Science* 241(4869):1080–1084, 1988

PARAMESHWARAN, K.; DHANASEKARAN, M.; SUPPIRAMANIAM V.; “Amyloid beta peptides and glutamatergic synaptic dysregulation” *Experimental Neurology* No:210:7-13, 2008

PERICAK-VANCE MA, BASS MP, YAMAOKA LH, GASKELL PC, SCOTT WK, TEVWEDAW HA, MENOLD MM, CONNEALLY PM, SMALL GW, VANCE JM, SAUNDERS AM, ROSES AD, HAINES J.; “Complete genomic screen in late-onset familial Alzheimer’s disease. Evidence for a new locus on chromosome 12” *JAMA* 278:1237–1241, 1997

PETERSON RC. GRAFF-RADFORD N, KNOPMAN D.; “Case studies in Alzheimer's disease: An Interactive media approach. In *Dementia Update*” American Academy of Neurology 49th Annual Meeting, American Academy of Neurology Press 1-47, 1997

PIKE, C. J., WALENCEWICZ, A. J., GLABE, C. G., COTMAN, C. W.; “Aggregation-related toxicity of synthetic beta-amyloid protein in hippocampal cultures”. *Eur. J. Pharmacol.* 207(4):367-368, 1991

PIN, J.P., DUVOISIN, R.; “The metabotropic glutamate receptors: structure and functions” *Neuropharmacology* 34, 1–26, 1995

PISCOPO P, TALARICO G, SPADONI O, MALVEZZI-CAMPEGGI L, CRESTINI A, GASPARINI M, VANACORE N, LENZI GL, POCCHIARI M, CONFALONI A, BRUNO G “A novel Italian presenilin 2 mutation (S175Y)” *Alzheimer's & Dementia* 4 Supp 2: T595, 2008

PONTE, P., GONZALEZ-DEWHITT, P., SCHILLING, J., MILLER, J., HSU, D., GREENBERG, B., DAVIS, K, WALLACE, W., LIEBERBURG, I., FULLER, F., CORDELL, B.; “A new A4 amyloid mRNA contains a domain homologous to serine proteinase inhibitors” *Nature* 331(6156):525-527, 1988

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.; “Structure and alternative splicing of the presenilin-2 gene” *NeuroReport* 7:1680-1684, 1996

QUARTERONET, D., PRADIER, L., CZECH, C., DELALONDE, L., BURGEVIN M.C., DOBLE, A., PETITET, F.; “Localization of presenilin-1 mRNA in rat brain” *Neuroreport* 7:2587-2591, 1996

RAO, S.G., WILLIAMS, G.V., GOLDMAN-RAKIC, P.S.; “Destruction and creation of spatial tuning by disinhibition: GABA(A) blockade of prefrontal cortical neurons engaged by working memory” *J. Neurosci.* 20:485–494, 2000

RAPOPORT, M., DAWSON, H. N., BINDER, L. I., VITEK, M. P., FERREIRA, A.; “Tau is essential to beta-amyloid-induced neurotoxicity” *Proc. Natl. Acad. Sci.* 99(9):6364-6369, 2002

RAUX G, GUYANT-MARECHAL L, MARTIN C, BOU J, PENET C, BRICE A, HANNEQUIN D, FREBOURG T, CAMPION D.; “Molecular diagnosis of autosomal dominant early onset Alzheimer's disease: an update” *J Med Genet* 42: 793–5, 2005

REVESZ T, MCLAUGHLIN JL, ROSSOR MN, LANTOS PL.; “Pathology of familial Alzheimer's disease with Lewy bodies” *J Neural Transm Suppl.* 51: 121–35, 1997

RIAZANSKAIA N, LUKIW WJ, GRIGORENKO A, KOROVAITSEVA G, DVORYANCHIKOV G, MOLIKA Y, NICOLAOU M, FARRER L, BAZAN NG, ROGAEV E.; “Regulatory region variability in the human presenilin-2 (PSEN2) gene: potential contribution to the gene activity and risk for AD” *Mol Psychiatr* 7: 891–898, 2002

RIGGS JE; “Smoking and Alzheimer's disease: Protective effect or differential survival bias? ” *Lancet* 342:793-794,1993

RINGMAN JM, DIAZ-OLAVARRIETA C, RODRIGUEZ Y, CHAVEZ M, FAIRBANKS L, PAZ F, VARPETIAN A, MALDONADO HC, MACIAS-ISLAS MA, MURRELL J, GHETTI B, KAWAS C.; “Neuropsychological function in nondemented carriers of presenilin-1 mutations” *Neurology* 65: 552–8, 2005

ROBERSON, E. D., SCEARCE-LEVIE, K., PALOP, J. J., YAN, F., CHENG, I. H., WU, T., GERSTEIN, H., YU, G. Q., MUCKE, L.; “Reducing endogenous tau ameliorates amyloid beta-induced deficits in an Alzheimer's disease mouse model” *Science* 316(5825): 750-754, 2007

ROCCA WA, VAN DUÏJN CM, CLAYTON D.; “Maternal age and Alzheimer's disease; A collaborative re-analysis of casecontrol studies” International Journal of Epidemiology 20:S21-S27, 1991

ROCCHÌ, A; PELLEGRÌNÌ, S; SÌCÌLIANO, G; MURRÌ, L; “ Causative and respectibility genes for Alzheimer’s disease: a review” Brain Research Bulletin, 1-24, 2003

ROGAEV E.I., SHERRINGTON R.,ROGAEVA E.A, LEVESQUE G., IKEDA M., LIANG Y., CHÌ H., LÌN C., HOLMAN K., TSUDA T.; “Familial Alzheimer’s disease in kindreds with missense mutations in a gene on chromosome 1 related to the Alzheimer’s disease type 3 gene ”Nature Vol: 376(6543):775-778, 1995

ROGAEVA E.A., FAFEL K.C., SONG Y.Q., MEDEIROS H., SATO C., LIANG Y., RICHARD E., ROGAEV E.I., FROMMELT P., SADOVNICK A.D., MESCHINO W., ROCKWOOD K., BOSS M.A., MAYEUX R., ST GEORGE-HYSLOP P.; “Screening for PSEN1 mutations in a referral-based series of AD cases: 21 novel mutations” Neurology Vol:57:621-625, 2001

ROGAEVA E.A., SHERRINGTON R., ROGAEVA E.A., LEVESQUE G., IKEDA M., LIANG Y.; “Alzheimer’s disease in kindreds with missense mutations in a gene on chromosome 1 related to the Alzheimer’s disease type-3 gene”, Nature Vol:376:775–778,1995

ROSSOR MN, BRADLEY WG, DAROFF RB, FENICHEL GM, MARSDEN CD.; “The Dementias” In: Neurology in Clinical Practice-The Neurological Disorders Vol. 2 Chap. 71, Second edition:1583-1624, 1996



ROYCHAUDHURI, R., YANG, M., HOSHI, M.M., TELOW, D. B.; “Amyloid beta-protein assembly and Alzheimer disease” J. Biol. Chem. 284(8):4749-53,2008

SAITO, T., SUNDSMO, M., ROCH, J. M., KIMURA, N., COLE, G. M., SCHUBERT, D., OLTERS DORF, T., SCHENK, D. B.; “Secreted form of amyloid beta protein precursor is involved in the growth regulation of fibroblasts” Cell 58(4):615–622, 1989

SAMPSON D.A., WANG M., MATUNIS M.J.; “The small ubiquitin-like modifier-1(SUMO-1) consensus sequence mediates Ubc9 binding and is essential for SUMO-1 modification” J. Biol. Chem. Vol:276:21664–21669, 2001

SANDBRINK, R.; MASTERS CL; BEYREUTHER, K.; “ $\beta$ A4-Amyloid Protein Precursor mRNA Isoforms without Exon 15 Are Ubiquitously Expressed in Rat Tissues Including Brain, but Not in Neurons” The Journal Of Biological Chemistry Vol:269, No:2: 1510-1517, 1994

SAUNDERS A.M, SCHMADER K, BREITNER J.C, BENSON M.D, BROWN W.T, GOLDFARB L; “Apolipoprotein E  $\epsilon$  4 allele distributions in late-onset Alzheimer’s disease and in other amyloid forming diseases” Lancet, Vol:342:710–711, 1993a

SAUNDERS A.M, STRITTMATTER W.J, SCHMECHEL D, ST. GEORGE HYSLOP P.H, PERIAK-VANCE M.A, JOO S.H, “Association of apolipoprotein E allele  $\epsilon$  4 with late-onset familial and sporadic Alzheimer’s disease”, Neurology Vol: 43:1467–1472, 1993b

SCHEUNER D, ECKMAN C, JENSEN M.; “Secreted amyloid beta-protein similar to that in the senile plaques of Alzheimer's disease is increased in vivo by the presenilin 1 and 2 and APP mutations linked to familial Alzheimer's disease” *Nat Med.* 2:864–870, 1996

SCHUBERT, D, SCHROEDER, R., LACORBIÈRE, M., SAÏTOH, T., COLE, G.; “Amyloid beta protein precursor is possibly a heparan sulfate proteoglycan core protein” *Science* 241(4862):223–226, 1988

SCHUBERT, D., JÏN, L.W., SAÏTOH, T., COLE, G.; “ The regulation of amyloid beta protein precursor secretion and its modulatory role in cell adhesion” *Neuron* 3 (6):689-694, 1989

SCHUBERT, W., PRIOR, R., WEIDEMANN, A., DIRCKSEN, H., MULTHAUP, G., MASTERS, C. L., BEYREUTHER, K.; “ Localization of Alzheimer beta A4 amyloid precursor protein at central and peripheral synaptic sites” *Brain Res.* 563 (1-2):184–194, 1991

SCOTT W, HAUSER E, SCHMECHEL D, WELSH-BOHMER K, SMALL G, ROSES A, SAUNDERS A, GILBERT J, VANCE J, HAÏNES J, PERÏCAK-VANCE M.; “Ordered-subsets linkage analysis detects novel Alzheimer disease loci on chromosomes 2q34 and 15q22” *Am J Hum Genet* 73:1041–1051, 2003

SELKOE DJ: “Neuropathology and molecular biology of Alzheimer Disease” In *Dementia Update. American Academy of Neurology 49th Annual Meeting*, American Academy of Neurology Press, 39-61, 1997

SELKOE, D. J.; “The molecular pathology of Alzheimer's disease” *Neuron* 6,487-498, 1991

SHAKED, G. M., KUMMER, M. P., LU, D. C., GALVAN, V., BREDESEN, D. E., KOO, E. H.; “Abeta induces cell death by direct interaction with its cognate extracellular domain on APP (APP 597-624)” *FASEB J.* 20(8):1254-1256, 2006

SHERRINGTON R, FROELICH S, SORBÌ S, CAMPION D, CHÌ H, ROGAEVA EA, LEVESQUE G, ROGAEV EI, LÌN C, LIANG Y, IKEDA M, MAR L, BRÌCE A, AGÌD Y, PERCY ME, CLERGET-DARPOUX F, PIACENTINI S, MARCON G, NACMIAS B, AMADUCCI L, FREBOURG T, LANNFELT L, ROMMENS JM, ST GEORGE-HYSLOP PH.; “Alzheimer's disease associated with mutations in presenilin 2 is rare and variably penetrant” *Hum Mol Genet.* Vol: 5: 985–8, 1996

SHERRINGTON R., ROGAEV E.I., LIANG Y., ROGAEVA E.A., LEVESQUE G., IKEDA M., CHÌ H. LÌN C., LÌ G., HOLMAN K.; “Cloning of a gene bearing missense mutations in early-onset familial Alzheimer's disease” *Nature* 375(6534):754– 760, 1995

SHIGEMOTO, R., KINOSHITA, A., WADA, E., NOMURA, S., OHISHI, H., TAKADA, M., FLOR, P.J., NEKI, A., ABE, T., NAKANISHI, S., MIZUNO, N.; “Differential presynaptic localization of metabotropic glutamate receptor subtypes in the rat hippocampus” *J. Neurosci.* Vol:17:7503–7522, 1997

SIEST G., PÌLLOT G., RÈGIS-BAÏLLY A., LEININGER-MULLER B., STEINMETZ J., GALTEAU M.M., VÌSVIKÌS S.; “Apolipoprotein E: an important gene and protein to follow in laboratory medicine”, *Clin.Chem.*41:1068-1086, 1995

SÌSODÌA, S. S., KOO, E. H., BEYREUTHER, K., UNTERBECK, A., PRÌCE, DL.; “Evidence that beta-amyloid protein in Alzheimer's disease is not derived by normal processing” *Science* 248(4954):492–495, 1990

SOLA VÍGO, F., KEDIKIAN, G., HEREDIA, L., HEREDIA, F., ANEL, A. D., ROSA, A. L., LORENZO.; “A Amyloid-beta precursor protein mediates neuronal toxicity of amyloid beta through Go protein activation” *Neurobiol. Aging*, 2008

SONG, I., HUGANIR, R.L.; “Regulation of AMPA receptors during synaptic plasticity” *Trends Neurosci.* 25:578–588, 2002

SORBI S., NACMIAS B., PIACENTINI S., LATORRACA S., AMADUCCI L.; “Epistatic effect of APP 717 mutation and apolipoprotein E genotype in familial Alzheimer’s disease” *Ann. Neurol.* 38:124-127, 1995

ST. GEORGE-HYSLOP, P.H., “Role of genetics in tests of genotype, status, and disease progression in early-onset Alzheimer's disease” *Neurobiol. Aging* 19, 133-137, 1998

STRITTMATTER W.J., SAUNDERS A.M., SCHMECHEL D., PERICAK-VANCE M., ENGHILD J., SALVESEN GS., ROSES AD.; “Apolipoprotein E: high-avidity binding to beta-amyloid and increased frequency of type 4 allele in late-onset familial Alzheimer disease”, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 90:1977–1981, 1993

SUZUKI N, CHEUNG TT, CAI XD, ODAKA A, OTVOS JR L, ECKMAN C, GOLDE TE, YOUNKIN SG.; “An increased percentage of long amyloid beta protein secreted by familial amyloid beta protein precursor (beta APP717) mutants” *Science* 264:(5163):1336-1340, 1994

SUZUKI, N., CHEUNG, T. T., CAI, X. D., ODAKA, A., OTVOS, L., JR., ECKMAN, C., GOLDE, T. E., AND SUZUKI, T., NISHIYAMA, K., MURAYAMA, S., YAMAMOTO, A., SATO, S., KANAZAWA, I., SAKAKI, Y.; "Regional and cellular presenilin 1 gene expression in human and rat tissues" Biochem. Biophys. Res. Commun 219, 708-713, 1996

TAKAMI K., TERAÍ K., MATSUO A., WALKER D.G., MCGEER P.L.; "Expression of presenilin-1 and -2 mRNA in rat and Alzheimer's disease brains" Brain Res. 748: 122-130, 1997

TAKEDA K, ARAKI W, TABIRA T.; "Enhanced generation of intracellular A $\beta$ 42 amyloid peptide by mutation of presenilins PSEN1 and PSEN2" European Journal of Neuroscience Vol:19:258 264,2004

TANZI RE.; "A genetic dichotomy model for the inheritance of Alzheimer's disease and common age-related disorders" J Clin Invest 104(9):1175-1179,1999

TANZI, R. E., GUSELLA, J. F., WATKINS, P. C., BRUNS, G. A. P., ST GEORGE-HYSLOP, P., VAN KEUREN, M. L., PATTERSON, D., PAGAN, S., KURNIT, D. M., NEVE, R. L.; "Amyloid beta protein gene: cDNA, mRNA distribution, and genetic linkage near the Alzheimer locus" Science 235 (4791):880-884, 1987

TANZI, R. E., MCCLATCHEY, A. I., LAMPERTI, E. D., VILLA-KOMAROFF, L., GUSELLA, J. F., NEVE, R. L. "Protease inhibitor domain encoded by an amyloid protein precursor mRNA associated with Alzheimer's disease" Nature 331(6156):528-30, 1988

TOMITA T; MARUYAMA K; SAIDO TC; KUME H; SHINOZAKI K; TOKUHIRO S; CAPELL A; WALTER J; GRÜNBERG J; HAASS C; IWATSUBO T; OBATA K.; “The presenilin 2 mutation (N141I) linked to familial Alzheimer disease (Volga German families) increases the secretion of amyloid b protein ending at the 42nd (or 43rd) residue” *Neurobiology, Proc. Natl. Acad. Sci USA*, Vol:94: 2025–2030, 1997

TOPCUOGLU ES, SELEKLER K; “Alzheimer Disease” *Turkish Journal of Geriatrics Geriatri* 1 (2): 63-67, 1998

TSUJIMURA, A., YASOJIMA, K., HASHIMOTO-GOTOH, T.; “Cloning of *Xenopus* presenilin-alpha and -beta cDNAs and their differential expression in oogenesis and embryogenesis”. *Biochem. Biophys. Res. Commun* 231:392-396, 1997

TYSZKIEWICZ, J.P., YAN, Z.; “Beta-amyloid peptides impair PKC-dependent functions of metabotropic glutamate receptors in prefrontal cortical neurons” *J. Neurophysiol.* 93, 3102–3111, 2005

UTERMANN G., PRUIN N., STEINMETZ A.; “ Polymorphism of apolipoprotein E. III. Effect of a single polymorphic gene locus on plasma lipid levels in man” *Clin. Genet.* 15:63-72, 1979

VAN BROECKHOVEN C., BACKHOVENS H., CRUTS M.; “ Mapping of a gene predisposing to early onset Alzheimer’s disease to chromosome 14q24.3”, *Nat.Genet* Vol:2 335-339, 1992

VAN DUIJN CM, STIJNEN T, HOFMAN A.; “Risk factors for Alzheimer's disease: Overview of the Eurodem collaborative re-analysis of case-control studies”. *International Journal of Epidemiology* 20:S4-S12, 1991

VANCEA J.E., CAMPENOTB R.B., VANCEC D.E.; “The synthesis and transport of lipids for axonal growth and nerve regeneration” *Biochim. Biophys. Acta* 1486:84-96, 2000

WALKER, ES; MARTÍNEZ, M; BRUNKAN, AL; GOATE A.; “Presenilin 2 familial Alzheimer's disease mutations result in partial loss of function and dramatic changes in A $\beta$  42/40 ratios” *Journal of Neurochemistry*, No:92:294–301, 2005

WENK, G.L., PARSONS, C.G., DANYSZ, W.; “Potential role of N-methyl-Daspartate receptors as executors of neurodegeneration resulting from diverse insults: focus on memantine”. *Behav. Pharmacol.* 17, 411–424, 2006

WIESGRABER K.H.; “Apolipoprotein E:structure-function relationships” *Adv. Prot. Chem.*45:249-320, 1994

WIJSMAN EM., DAW EW, EN YU C, PAYAMÍ H, STEINBART EJ, NOCHLÍN D, CONLON EM, BIRD TD, SCHELLENBERG GD.; “Evidence for a Novel Late-Onset Alzheimer Disease Locus on Chromosome 19p13.2” *Am. J. Hum. Genet.* 75:398–409, 2004

WRIGHT, A.F; “Neurogenetics II: complex disorders” *Neurol Neurosurg Psychiatry* No:76:623-631, 2005

YANKNER, BA; LU, T; “Amyloid  $\beta$ -Protein Toxicity and the Pathogenesis of Alzheimer's Disease” *The Journal Of Biological Chemistry*, 2008

YOSHIKAI, S., SASAKI, H., DOHURA, K., FURUYA, H., SAKAKI, Y.;  
“Genomic organization of the human amyloid beta-protein precursor gene” *Gene*  
87(2):257–263, 1990

YU G., NISHIMURA M., ARAWAKA S., LEVITAN D., ZHANG L., TANDON  
A., SONG Y.Q., ROGAEVA E., CHEN F., KAWARAI T., SUPALA A.,  
LEVESQUE L., YU H., YANG D.S., HOLMES E., MILMAN P., LIANG Y.,  
ZHANG D.M., XU D.H., SATO C., ROGAEV E., SMITH, C.JANUS M., ZHANG  
Y., AEBERSOLD R., FARRER L.S., SORBI S., BRUNI A., FRASER P., ST  
GEORGE-HYSLOP P.; “Nicastrin modulates presenilin-mediated notch/glp-1 signal  
transduction and betaAPP processing” *Nature* 407:48-54, 2000

ZEKANOWSKI C, STYCZYŃSKA M, PEPLŃSKA B, GABRYELEWICZ T,  
RELIGA D, ILKOWSKI J, KIJANOWSKA-HAŁADYNA B, KOTAPKA-MINC S,  
MIKKELSEN S, PFEFFER A, BARCZAK A, ŁUCZYWEK E, WASIAK B,  
CHODAKOWSKA-ŻEBROWSKA M, GUSTAW K, ŁACZKOWSKI J, SOBÓW  
T, KUŹNICKI J, BARCIKOWSKA M.; “Mutations in presenilin 1, presenilin 2  
and amyloid precursor protein genes in patients with early-onset Alzheimer’s disease  
in Poland” *Experimental Neurology* Vol:184: 991-996, 2003

ZHANG YQ, SARGE KD; “Sumoylation of amyloid precursor protein negatively  
regulates A $\beta$  aggregate levels” *Biochemical and Biophysical Research  
Communications*, No:374:673–678, 2008



## **INTERNET**

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

[http://www.alzheimer.ca/english/alzheimer\\_brain\\_mini\\_site/09.htm](http://www.alzheimer.ca/english/alzheimer_brain_mini_site/09.htm)

[http://www.alzheimer.ca/english/alzheimer\\_brain\\_mini\\_site/10.htm](http://www.alzheimer.ca/english/alzheimer_brain_mini_site/10.htm)

<http://www.freewebs.com/rbannerm/>

<http://www.molgen.ua.ac.be/ADmutations>

## 8.ÖZGEÇMİŞ

1984 yılında İstanbul'da doğdu. 1995 yılında Emin Ali Yaşın İlköğretim Okulunda ilk öğrenimini, 1998 yılında Hırkai-Şerif İlköğretim Okulunda orta öğrenimini ve 2002 yılında Cibali Süper Lisesinde lise öğrenimini tamamladı. 2003 yılında Haliç Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümünde lisans eğitimine başlayarak 2007 yılında Moleküler Biyolog ve Genetikçi ünvanıyla dönem birincisi olarak mezun oldu. Aynı yıl Haliç Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümünde yüksek lisans öğrenimine başladı. Ayrıca, Anadolu Üniversitesi Açıköğretim Fakültesi İşletme Bölümünde lisans eğitimine devam etmektedir.

