

T.C  
ERCİYES ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**ALZHEİMER HASTALARININ LENFOSİTLERİNDE rRNA  
İFADELENMESİNİN ARAŞTIRILMASI**

HİLAL ÜNLÜ-AKALIN

Tezi Yöneten

Doç. Dr. Hamiyet ALTUNTAŞ

Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Kayseri  
Mart 2003

T.C  
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**ALZHEİMER HASTALARININ LENFOSİTLERİNDE rRNA  
İFADELENMESİNİN ARAŞTIRILMASI**

HİHAL ÜNLÜ-AKALIN

Tezi Yöneten

Doç. Dr. Hamiyet ALTUNTAŞ

Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

Kayseri  
Mart 2003



I  
T.C.  
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**ALZHEİMER HASTALARININ LENFOSİTLERİNDE rRNA  
İFADELENMESİNİN ARAŞTIRILMASI**

Hilal ÜNLÜ-AKALIN

Tezi Yöneten

Doç. Dr. Hamiyet ALTUNTAŞ

Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

Bu çalışma Erciyes Üniversitesi Araştırma Fonu  
Tarafından 01-11-03 nolu proje ile desteklenmiştir.

Kayseri  
Mart 2003

Bu çalışma jürimiz tarafından Erciyes Üniversitesi Tıbbi Biyoloji A.B.D.'nda yüksek lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

26.05.2003

JÜRİ:

Üye: Prof. Dr. Halil Demirtaş H. Demirtaş

Üye: Prof. Dr. Yahya Karaman

Üye: Doç. Dr. Hamiyet Altıntaş H. Altıntaş

ONAY:

Bu tezin kabulü Enstitü Yönetim Kurulunun .....tarih ve.....sayılı kararı ile onaylanmıştır.

09 TEM 2003

Enstitü Müdürü  
Prof. Dr. Sami AYDOĞAN  
Enstitü Müdürü  
Mühür ve imza



**ÖZET****ALZHEİMER HASTALARININ LENFOSİTLERİNDE rRNA İFADELENMESİNİN  
ARAŞTIRILMASI**

Alzheimer hastalığı (AH), orta ve geç yaşlarda görülen, genetik ve çevresel faktörlerin etkilediği, ilerleyici nörodejeneratif bir hastalıktır. Çekirdekçik oluşturan DNA bölgeleri (nücleolar organizer regions=NORs), akrosentrik kromozomların sekonder darlık bölgelerinde bulunan ribozomal genleri ifade ederler. Alzheimer ve Down sendromlu hastaların beyinde  $\beta$ -amiloid birikiminde artış vardır.  $\beta$ -amiloid geni, ribozomal DNA senteziyle ilgili akrosentrik bir kromozom olan 21. kromozomda bulunmaktadır. Ayrıca, ribozomal genlerin aktif transkripsiyonel durumu ve gümüş boyanabilmesi arasında bir korelasyon olduğu bilinmektedir. Böylece, AH ile akrosentrik kromozomlardaki ribozomal genler arasında bir ilişkinin bulunması muhtemeldir.

Çalışmamızda, AH hastaları ve kontroller arasında ribozomal genlerin aktivitesinin karşılaştırılması amacıyla, 20 Alzheimer hastası ve 20 sağlıklı kontrol (10 genç ve 10 yaşlı) kişinin lenfosit kültürleri yapılmış ve interfaz alanlarındaki total çekirdek ve NOR alan oranları ile metafaz alanlarındaki akrosentrik kromozomların Ag+ NOR dağılımları ve satellit asosiasyonları (SA) değerlendirilmiştir.

Bu değerlendirmelere göre AH hastalarının interfaz çekirdeklerindeki NOR alan oranlarının, yaşlı kontrol grubuna göre daha az olduğu bulunmuştur ( $P=0.035$ ). Alzheimer hastaları ile kontrol gruplarının akrosentrik kromozomlarının Ag+ NOR'ların segment büyüklükleri karşılaştırıldığında, AH hastalarında 22. kromozomun Ag+ NOR 1 segment derecesinin genç kontrollere göre arttığı bulunmuştur ( $P=0.018$ ). Alzheimer hastaları ve kontrol gruplarının Ag+ total kromozomlar, Ag+ 21. kromozomlar ve SA sıklıkları ve dağılımları karşılaştırıldığında istatistiksel olarak bir fark bulunamamış ( $P>0.05$ ), ancak SA'daki total kromozom sayısının Alzheimer hastalarında yaşlı kontrollere göre arttığı bulunmuştur ( $P=0.05$ ).

Sonuç olarak, Alzheimer hastalarında NOR alan oranlarının azalması, ribozomal genlerin aktivitesinde bir azalma olduğunu bize gösterebilir. Bununla birlikte, AH hastalarındaki ribozomal genlerin aktivitelerindeki değişiklikler üzerine destekleyici ileri çalışmalara ihtiyaç vardır.

**Anahtar kelimeler:** Alzheimer hastalığı; çekirdekçik oluşturan bölgeler; kromozom 21; satellit birleşmesi.

## SUMMARY

## THE INVESTIGATION OF THE rRNA EXPRESSION IN LYMPHOCYTES OF ALZHEIMER PATIENTS

Alzheimer's disease (AD) is a progressive and irreversible neurodegenerative disorder occurring with effects of genetic and environmental factors in middle or late life. DNA regions forming nucleolus (nucleolar organizer regions=NORs) expresses ribosomal genes present in secondary constriction regions of acrocentric chromosomes. There are increased deposits of  $\beta$ -amyloid in brain of the patients with AD and Down's syndrome.  $\beta$ -amyloid gene is located in acrocentric chromosome 21 which is related to for ribosomal DNA synthesis. Also, there seems to be a correlation between active transcriptional state and silver stainability. Therefore, it is possible that there is a relation between AD and ribosomal genes which were located in acrocentric chromosomes.

In our study, In order to compare activities of ribosomal genes in patients with AD and controls, lymphocytes of 20 AD patients and 20 healthy controls (10 young and 10 older) were cultivated. In addition to total nucleus and NOR surface proportions in interphase nucleus and silver stainability and satellite association (SA) of acrocentric chromosomes in metaphases were evaluated.

According to these evaluations the decrease in NOR surface proportions have been observed in interphase nucleus of AD patients compared with elderly controls ( $P=0.035$ ). When are compared with those of the sizes of Ag+ segments of acrocentric chromosomes of AD patients and control groups the Ag staining size 1 of the chromosome 22 from AD patients was found be increased in young controls ( $P=0.018$ ). There was no statistically significant difference between AD patients and control groups in terms of Ag+ acrocentric chromosomes, Ag+ chromosome 21 and SA frequency ( $P>0.05$ ). However, it has been shown that there is a significant increase of the total number of chromosome in SA from AD patients when compared with elderly controls ( $P=0.05$ ).

As a result, the decrease of NOR surface proportions in AD patients may show us a decrease in activity of ribosomal genes. However, further studies are required to support alterations on the activities of ribosomal genes in AD patients.

**Key Words:** Alzheimer's disease; nucleolus organizer regions; chromosome 21; satellite association.

## TEŞEKKÜR

Bu çalışmamın planlanmasında ve gerçekleşmesinde değerli bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım, Yüksek lisans eğitimimin yanı sıra her türlü konuda destek ve yakınlığını gördüğüm, değerli hocam Doç. Dr. Hamiyet Altuntaş'a, tez konumun belirlenmesinde ve materyallerimin toplanmasında bana yardımcı olan hocam Prof.Dr. Halil Demirtaş ve Nöroloji A.B.D öğretim üyesi Prof.Dr. Yahya Karaman'a, sürekli bir şekilde çalışmalarımı izleyip değerli zamanlarını ayırarak, maddi ve manevi katkılarını esirgemeyen başta hocam Prof.Dr.Yusuf Özkul'a ve hocam Prof.Dr. Munis Dünder'a, tez çalışmalarımın her aşamasında destek ve ilgilerini gördüğüm Uz.Dr. Çetin Saatçi, Arş.Gör.Nalan İmamoğlu ve Arş.Gör. Zuhale Hamurcu'ya keder arkadaşım Serpil Tekin'e teşekkür ederim.

Bu araştırmanın yapılması ve tezin hazırlanması sırasında, her aşamada maddi ve manevi yardımlarını esirgemeyen ve yoğun çalışma dönemlerimde beni anlayışla karşılayan, eşim Mehmet Akalın'a ve aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

## İÇİNDEKİLER

	sayfa
İÇ KAPAK .....	I
KABUL ONAY SAYFASI.....	II
ÖZET .....	III
SUMMARY.....	IV
İÇİNDEKİLER.....	V
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	VI
ŞEKİL LİSTESİ .....	VII
TABLO LİSTESİ .....	VIII
1. GİRİŞ VE AMAÇ .....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Alzheimer Hastalığı.....	3
2.1.1. Alzheimer Hastalığının Klinik Özellikleri .....	3
2.1.2. Alzheimer Hastalığının Tanısı .....	4
2.1.3. Alzheimer Hastalığında Risk Faktörleri.....	5
2.1.4. Alzheimer Hastalığının Epidemiyolojisi.....	6
2.1.5. Alzheimer Hastalığının Histopatolojik Tanısı.....	7
2.1.6. Alzheimer Hastalığının Genetiği.....	8
2.1.7. Alzheimer Hastalığı ile Down sendromu arasındaki ilişkiler .....	13
2.2. İnsan Lenfosit Çekirdeklerinin (Nükleolus) Yapısı .....	14
2.3. İnsanda NOR Bölgelerinin Genel Özellikleri .....	16
2.4. NOR' ların Gümüş Nitrat İle Boyanması.....	17
2.4.1. NOR Proteinleri (AgNOR proteinleri).....	18
3. YÖNTEMLER .....	20
3.1. Gereçler .....	20
3.2. Yöntem .....	22
3.2.1. Periferik Kandan Lenfosit Kültürü.....	23
3.2.2. NOR Boyama .....	25
3.2.3. İnterfaz Çekirdeklerindeki NOR Alanlarının Bilgisayar Programı İle Ölçülmesi .....	31
4. BULGULAR .....	35
5. TARTIŞMA – SONUÇ VE ÖNERİLER.....	42
6. KAYNAKLAR.....	45

## SİMGELER VE KISALTMALAR

AH	: Alzheimer Hastalığı
APP	: Amiloid Prekürsör Protein
APO E	: Apolipoprotein E
AgNO <sub>3</sub>	: Gümüş Nitrat
ASG	: Asetik Saline Giemsa
βA	: Beta Amiloid
BOS	: Beyin Omirilik Sıvısı
°C	: Santigrat derece
DS	: Down Sendromu
GTP	: Guanozintrifosfat
HSPA 2	: Heat-Shock Protein
KD	: Kilo Dalton
MR	: Manyetik Rezonans
MMSE	: Mini Mental State Exam
μm	: Mikrometre
nm	: Nanometre
NFD	: Nörofibriler Yumak
NP	: Nörotik Plak
NOR	: Nucleolus Organizer Region
PS	: Presenilin
RNAP I	: Ribonükleik Asit Polimeraz I
r(DNA)	: Ribozomal Deoksiribonükleik Asit
SA	: Satellit Assosiasyon
SSC	: Sodyum Saline Citrat

## ŞEKİL LİSTESİ

<u>Sekil Listesi</u>	<u>Sayfa</u>
Şekil 3.1 : NOR boyama uygulanmış lenfosit çekirdeği.....	27
Şekil 3.2 : Alzheimer hastasına (a) ve yaşlı kontrole (b) ait ASG ile bantlanmış ve AgNO <sub>3</sub> ile boyanmış akrosentrik kromozomlar ve satellit assosiasyonu.....	30
Şekil 3.3 : Analiz işleminde kullanılan program ve analiz edilecek olan lenfosit çekirdeği.....	32
Şekil 3.4 : NOR Bölgeleri Belirlenmiş bir lenfosit Çekirdeği.....	33
Şekil 3.5 : NOR bölgeleri hesaplanmış lenfosit çekirdeği.....	33
Şekil 3.6 : Çekirdek ve NOR alan bölgeleri belirlenmiş bir lenfosit çekirdeği.....	34

## TABLO LİSTESİ

<b><u>Tablo Listesi</u></b>	<b><u>sayfa</u></b>
<b>Tablo 4.1</b> : Alzheimer Hastaları ve Kontrol Gruplarındaki NOR alanı Ortalama Değerleri.....	37
<b>Tablo 4.2</b> : Hasta ve Kontrollerdeki Akrosentrik Kromozomların Ag+ NOR Segment Büyüklüklerine Göre Aldıkları Değerler.....	38
<b>Tablo 4.3</b> : Tablo 4.2'deki Hasta ve Kontrollere Ait Ortalama ve Standart Sapma Değerleri.....	39
<b>Tablo 4.4</b> : Hasta ve Kontrol Gruplarındaki Ag+ Kromozom Sayıları, Metafaz Alanları ve Satelit Assosiasyonu Yapan Kromozomların Durumlarını Gösteren Değerler.....	40
<b>Tablo 4.5</b> : Tablo 4.4'deki Hasta ve Kontrollere Ait Ortalama ve Standart Sapma Değerleri.....	41
<b>Tablo 4.6</b> : Hasta ve Kontrollerdeki Ag+ Kromozom Sayısına Göre Metafaz Sayılarının Ortalama Değerleri.....	41

## 1. GİRİŞ

Alzheimer hastalığı (AH), orta ve ileri yaşlarda görülen ilerleyici nörodejeneratif bir hastalıktır. Alzheimer hastalığı, beyinde yaygın olarak saptanan nörotik plaklar (NP) ve nörofibriler düğümlerle (NFD) karakterizedir. AH'nın genetik incelemelerinde değişik genler tanımlanmıştır. Bunlar  $\beta$  amiloid prekürsör protein (APP), presenilin-1 (PS-1), presenilin-2 (PS-2) ve apolipoprotein E (ApoE) olarak sıralanabilir. PS-1 geni 14 nolu kromozomda, PS-2 geni 1 nolu kromozomda, ApoE geni 19 nolu kromozomda ve  $\beta$ -amiloid prekürsör protein geni 21 nolu kromozomda yer almaktadır.  $\beta$ -amiloid geninin 21. kromozomda bulunuyor olması, Alzheimer hastalarında ve yaşlı Down Sendromlu hastalarda  $\beta$ -amiloid depositlerinin artması ve 40 yaş sonrası Down sendromu ile AH hastalarında nöropatolojik benzerliklerin bulunmuş olması AH ile DS arasında bir ilişki olduğunu düşündürmektedir (1-4). Ayrıca 21 nolu kromozom ribozomal DNA (rDNA) taşıyan akrosentrik bir kromozomdur. İnsanlarda beş çift akrosentrik kromozom vardır ve Nükleolar Organizer Regionlar (NORs) bu kromozomların sekonder darlık olarak bilinen satellit köklerinde yer alırlar ve 18S ve 28S rRNA için kodlayıcı genler içermektedirler. NOR insanda ve diğer ökaryotlarda kromozom üstünde "çekirdekçik oluşturan DNA bölgeleri" ni ifade eder (4). Genetik olarak aktif olan NOR'ların gümüş ile boyanabildiği belirlenmiştir ve ribozomal genlerin aktif transkripsiyonel durumu ile gümüş boyanabilmesi arasında bir korelasyon vardır. NOR boyama, çeşitli bitki ve hayvan dokularında interfaz yada hücre döngüsünün herhangi bir evresinde nükleolus (çekirdekçik) oluşturan bölgeleri görülebilir hale getirmek için kullanılan bir boyama tekniğidir. Bir adı da "gümüş boyama" (silver staining) dir. NOR'larda bulunan proteinler gümüş boyama ile ayırt

edilebilir. Gümüş boyama tekniğinin sonuçları; ribozomal genlerin fonksiyonel yapısının stabil olup olmadığını ve onların mendeliyen kalıtsal geçişini gösterir. Çalışmadaki amacımız, AH hastalarında ve kontrol grublarında (genç ve yaşlı kontrol grupları) NOR'ların aktivitesini gümüş boyama tekniği kullanarak karşılaştırmak ve AH hastalarında ribozomal genlerin aktivitesi ve gen regulasyonunu araştırmaktır.

Alzheimer hastalarında ribozomal genlerin aktivitesinin, karşılaştırılan genç ve yaşlı kontrollere göre azaldığı daha önce gösterilmiştir (1). Ancak bu çalışmada, sadece metafaz alanlarında kromozom 21'in gümüş boyanması ve satellit assosiasyonu (SA) açısından değerlendirmesi yapılmıştır. Bizim çalışmamızda ise, daha önceki çalışmalarımızla standardize ettiğimiz NOR boyama teknikleri (5, 6) kullanılarak, mitojenle uyarılmış insan lenfositlerinde hem interfaz alanlarında total nükleus ve NOR alanları bilgisayarda ölçülecek hem de metafaz alanlarındaki akrosentrik kromozomların gümüş boyanması ve SA dereceleri karşılaştırılacaktır. AH hastaları ile genç ve yaşlı kontrolleri arasında ribozomal genlerin aktivitesi açısından fark olup olmadığı konusunda elde edeceğimiz bulguların, AH'daki rRNA gen regulasyonunun anlaşılmasına katkıda bulunacağını düşünüyoruz.