



TÜRKİYE CUMHURİYETİ

ACIBADEM ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**SPORADİK ALZHEIMER HASTALIĞINDA DNA HEDEF
GEN VARYANTLARININ TARANMASI**

Tuğçe İLHAN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BİYOKİMYA ve MOLEKÜLER BİYOLOJİ YÜKSEK LİSANS PROGRAMI

DANIŞMAN

Prof. Dr. Meltem MÜFTÜOĞLU

İKİNCİ DANIŞMAN

Prof. Dr. M. Cengiz YAKICIER

İSTANBUL-2016

Bu çalışma, 114Z875 proje numarası ile TÜBİTAK 1001 Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Projelerini Destekleme Programı tarafından desteklenmiştir.

TEZ ONAYI

Anabilim Dalı: Biyokimya
Program: Biyokimya ve Moleküler Biyoloji Tezli Yüksek Lisans Programı
Tez Başlığı: Sporadik Alzheimer Hastalığında DNA Hedef Gen Varyantlarının Taranması
Öğrencinin Adı-Soyadı: Tuğçe İlhan
Savunma Sınavı Tarihi: 23 / 06 / 2016

Bu tez çalışması jürimiz tarafından Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı	Prof. Dr. Meltem MÜFTÜOĞLU Acıbadem Üniversitesi	
Tez Danışmanı	Prof. Dr. Meltem MÜFTÜOĞLU Acıbadem Üniversitesi	
İkinci Tez Danışmanı	Prof. Dr. Cengiz YAKİCİER Acıbadem Üniversitesi	
Üye	Prof. Dr. Batu ERMAN Sabancı Üniversitesi	
Üye	Yrd. Doç. Dr. Zeynep Tokcaer KESKİN Acıbadem Üniversitesi	
Üye	Yrd. Doç. Dr. Emre DENİZ Acıbadem Üniversitesi	

Acıbadem Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliği'nin ilgili maddeleri uyarınca bu tez yukarıdaki jüri tarafından onaylanmış ve Sağlık Bilimleri Yönetim Kurulu kararıyla kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Mert ÜLGEN

Enstitü Müdürü



BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün aşamalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim.

23.06.2016

Tuğçe İLHAN

Bugünü görebilmeyi ne kadar çok istediğini bildiğim ve en az onun görmek istediği kadar benim de görmesini dilediğim babama,

ÖNSÖZ ve TEŞEKKÜR

Bu çalışmada, sporadik Alzheimer hastalığında etkili olabilecek DNA hedef gen varyantlarının taranması amaçlanmıştır.

Bu çalışma, 114Z875 proje numarası ile TÜBİTAK 1001 Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Projelerini Destekleme Programı tarafından desteklenmiştir. Desteklerinden dolayı TÜBİTAK'a ve bu çalışmanın yapılabilmesi için sağlanan bütün olanaklar adına Acıbadem Üniversitesi'ne teşekkür ederim.

Bu çalışmanın hayata geçmesini sağlayan, çalışmanın her aşamasında beni tecrübesi ve bütün bilgi birikimiyle yönlendirerek, sabrını ve yardımlarını esirgemeyen değerli tez danışmanım Prof. Dr. Meltem Müftüoğlu'na; katkılarından ve desteğinden dolayı değerli ikinci tez danışmanım Prof. Dr. Cengiz Yakıcıer'e; ve projeye katkılarından Doç. Dr. Nadja de Souza Pinto'ya,

Yüksek lisans eğitimim boyunca bana destek olan ve her anımda yanımda olan çalışma ve dönem arkadaşlarıma ve özellikle bu sürecin bana kattığı bütün dostlarıma,

Hayatıma girdiği günden beri en büyük destekçim olan, tez dönemi boyunca hayatın bana getirdiği bütün olumsuzluklara rağmen devam edebilecek motivasyonu bulmamı sağlayan Yılmaz'a,

Bugüne kadar aldığım her kararda sorgusuz yanımda olan, bütün eğitim hayatım boyunca maddi ve özellikle manevi desteklerini esirgemeyen, yaşadığımız hiçbir zorluğun beni düşürmesine izin vermeyip elimi hiçbir zaman bırakmayan canım aileme, en içten sevgilerimle teşekkür ederim.

Tuğçe İLHAN

İÇİNDEKİLER

BEYAN	iii
ÖNSÖZ ve TEŞEKKÜR.....	v
İÇİNDEKİLER	vi
ŞEKİLLER LİSTESİ	ix
TABLolar LİSTESİ.....	x
KISALTMALAR	xi
ÖZET.....	xiii
SUMMARY	xiv
1. GİRİŞ ve AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Alzheimer Hastalığı (AH).....	3
2.2. DNA Hasarı ve Baz Eksizyon Tamir (BER) Yolağı.....	6
2.3. Sporadik AH ve Baz Eksizyon Tamir (BER) Yolağı	8
2.4. DNA Polimeraz Beta (<i>POL β</i>)	12
3. GEREÇ ve YÖNTEM.....	17
3.1. Sporadik Alzheimer, Asemptomatik Alzheimer ve Kontrol Örnekleri	17
3.2. DNA Ölçümü ve Hazırlanması	17
3.3. Ion Personal Genome Machine™ (PGM™) Sistem'i ile Yeni Nesil Dizileme	17
3.3.1. Primer Dizaynı	18
3.3.2. Kütüphanenin Hazırlanması.....	19

3.3.2.1. Hedef Bölgelerin Çoğaltılması.....	19
3.3.2.2. Hedef Bölgelerin Kısmi Olarak Kesilmesi	20
3.3.2.3. Barkod Adaptörlerinin Bağlanması.....	21
3.3.2.4. Çoğaltılamayan Kütüphanenin Arındırılması	21
3.3.2.5. Kütüphanelerin Konsantrasyonlarının Eşitlenmesi.....	21
3.3.2.5.A. Equalizer™ Küreciklerinin (Bead) Yıkaması.....	22
3.3.2.5.B. Kütüphaneye Equalizer™ Capture ve Equalizer™ Küreciği Eklenmesi.....	22
3.3.2.5.C. Eşitlenmiş Kütüphanenin Ayrıştırılması	22
3.3.3. İyon Küre Cisimciği (Ion Sphere™ Particles) Pozitif Kalıbın (Template) Hazırlanması.....	23
3.3.3.1. Ion OneTouch™ 2 (OT2) Sisteminin Hazırlanması	23
3.3.3.2. Amplifikasyon Karışımının Hazırlanması	24
3.3.4. İyon Küre Cisimciği Pozitif Kalıbın Zenginleştirilmesi	24
3.3.5. Ion Personal Genome Machine® (PGM™) Sistemi'nin Hazırlanması	26
3.3.5.1.A. Klorür Yıkaması.....	27
3.3.5.1.B. Su Yıkaması	27
3.3.5.2. Sistemin Başlatılması	27
3.3.5.3. dNTP Solüsyonlarının Hazırlanması.....	27
3.3.6. İyon Küre Cisimciği Pozitif Kalıbın Çipe Yüklenmesi	28
3.3.6.1. Zenginleştirilen İyon Küre Cisimciği Pozitif Kalıbın Çipe Yüklemek İçin Hazır Hale Getirilmesi	28

3.3.6.2. Çip Kontrolü	28
3.3.6.3. Yüklemeye Hazır Hale Gelen İyon Küre Cisimciği Pozitif Kalıbın Çipe Yükleneşmesi	29
3.4. Data Analizi	29
4. BULGULAR	30
4.1. Sporadik Alzheimer, Asemptomatik Alzheimer ve Kontrol Örneklerinin Değerlendirilmesi	30
4.2. DNA örneklerinin saflığı ve konsantrasyonu	31
4.3. Ion Personal Genome Machine™ (PGM™) Sistem'i ile Pol β Geninin Yeni Nesil Dizilenmesi	31
4.3.1. Örnek sayısının hesaplanması	31
4.3.2. Yarı-iletken çip yükleme sonuçları	31
4.3.3. Ion Torrent PGM sistemi ile Pol β genine yönelik yeni nesil dizileme analizi sonuçları	32
5. TARTIŞMA ve SONUÇ	42
6. KAYNAKLAR	45
EK 1. Pol β geni primer dizileri	55

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil.1 AH'nin patolojik gelişimi A) Beilchowsky yöntemi ile boyanmış amiloid plak ve nörofibriler yumak B) Amiloid plakların ve nörofibriler yumakların Braak evrelerine göre dağılımı (1).....	5
Şekil.2 Baz eksizyon tamir yolağı.....	7
Şekil.3 DNA <i>POL β</i> gen yapısı (16)	14
Şekil.4 Ion PGM™ sisteminde yeni nesil sekanslama basamakları	18
Şekil.5 <i>POL β</i> gen yapısı. Yeşil bölge: ekzon, Mavi bölge: İntron, Kırmızı bölge: Primerin kapsamadığı bölgeler	19
Şekil.6 Ion OneTouch™ 2 cihazı.....	23
Şekil.7 Ion OneTouch™ Enrichment System cihazı	25
Şekil.8 Ion PGM™ cihazı.....	26
Şekil.9 A) Ion 316™ Chip Kit v2 B) Ion 318™ Chip Kit v2.....	28
Şekil. 10 Yeni nesil dizileme yükleme analizi.....	32
Şekil.11 IGV görüntü örneği.....	33

TABLolar LİSTESİ

Tablo.1 BER yolağında görev alan genlerin AH patogeneğinde ki rolleri	10
Tablo.2 BER yolağı genlerinde bulunan polimorfizmler ve AH ilişkisi	13
Tablo.3 <i>POL β</i> gen primerinin özellikleri	18
Tablo.4 Multipleks PZR koşulları.....	20
Tablo.5 Kısmi kesim PZR koşulları.....	20
Tablo.6 Barkod bağlanması için gerekli PZR koşulları	21
Tablo.7 Kütüphane çoğaltması için gerekli PZR koşulları	22
Tablo.8 Amplifikasyon karışımı	24
Tablo.9 Sekiz-kuyucuklu şerit plaka dağılımı	25
Tablo.10 AH değerlendirme kriterleri (40-42).	30
Tablo.11 PGM Ion Torrent yeni nesil dizi analizi kullanılarak çalışılan örneklerde <i>POL β</i> geninde saptanan genetik varyasyonlar. Het:Heterozigot, hom: Homozigot AD-Sporadik Alzheimer hastası post-mortem beyin dokusu, AS-Asemptomatik Alzheimer hastası post-mortem beyin dokusu, CT-Kontrol post-mortem beyin dokusu, AH-sporadik Alzheimer hastası kan örneği, KT-kontrol kan örneği. SNV-Single nucleotide variant, MNV- Multi-nucleotide variant, INDEL-insersiyon-delesyon. Kırmızı: ekzon değişimi	35
Tablo.12 <i>POL β</i> geninde ilk olarak bu çalışmada tanımlanmış genetik değişimler	39
Tablo.13 Sadece Alzheimer hasta grubunda bulunan <i>POL β</i> genine ait genetik değişimler.....	40
Tablo.14 Minör allel frekansı %1'den küçük olan polimorfizmler.....	40
Tablo.15 Belirlenen polimorfizmler için literatür taraması sonuçları.....	41

KISALTMALAR

AH:	Alzheimer hastalığı
Ala:	Alanin
AP:	Amiloid plaklar
<i>APE1:</i>	AP endonükleaz 1
APP:	Amiloid öncü protein
<i>APOE:</i>	Apiloprotein E
Arg:	Arginin
AS:	Aseptomatik Alzheimer hastalığı
Asp:	Aspartik asit
Aβ:	Amiloid beta
BER:	Baz eksizyon tamir
Cys:	Sistein
dNTP:	deoksinükleotid
dRP:	Deoxyribosephosphate
DSÖ:	Dünya Sağlık Örgütü
<i>FEN1:</i>	Flap endonükleaz 1
Gln:	Glutamin
Glu:	Glutamik asit
His:	Histidin
LP-BER:	Uzun yama-baz eksizyon tamir yolağı
Lys:	Lizin
Met:	Metionin
<i>MUTYH:</i>	mutY DNA glycosylase
<i>NEIL1:</i>	Endonükleaz VIII-benzeri 1 DNA glikozilaz
NFY:	Nörofibriler yumaklar

<i>OGG1:</i>	8-okzoguanin DNA glikozilaz
<i>PARP1:</i>	Poly ADP-Ribose Polymerase 1
<i>POL β:</i>	Polimeraz beta
<i>Pro:</i>	Prolin
<i>PSN1:</i>	Presenilin 1
<i>PSN2:</i>	Presenilin 2
<i>Ref:</i>	Referans
<i>rs:</i>	referans SNP
<i>Ser:</i>	Serin
<i>SNP:</i>	“single nucleotide polymorphism” (tek nükleotid değişimi)
<i>SP-BER:</i>	Kısa-yama baz eksizyon tamiri
<i>UDG:</i>	Urasil DNA glikozilaz
<i>Val:</i>	Valin
<i>XRCC1:</i>	X-ray repair cross-complementing protein 1
<i>8-OHdG:</i>	8-hydroxy-2' -deoxyguanosine
<i>8-OHG:</i>	8-hydroxyguanosine
<i>8-oxodG:</i>	8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine

ÖZET

Demansın en sık görülen türü olan, Alzheimer hastalığı (AH) çok etkenli sebeplerle ortaya çıkan kompleks nörodejeneratif bir hastalıktır. Erken teşhisin sporadik AH'nın ilerlemesini yavaşlattığının ve semptomlarını azalttığının saptanmasıyla sporadik AH için genetik risk faktörü tarama çalışmaları hız kazanmıştır. Sporadik Alzheimer hastalarının post-mortem beyin dokularında, Alzheimer fare modellerinde ve hücre hatlarında, spesifik bir baz eksizyon DNA tamir (BER) geni olmayan fare modelleri ve hücre hatlarında yapılan biyokimyasal, moleküler, hücresel ve davranış çalışmaları sporadik AH'nin etiyolojisi ve patolojisi ile BER mekanizmasında meydana gelen hasarlar arasındaki ilişkiyi ortaya çıkarmıştır. BER yolağında görev alan proteinlerden biri olan POL β 'nin ifade, miktar ve aktivitesinin sporadik AH'da çok düşük düzeyde olduğu ve total BER kapasitesinin POL β 'ya bağlı olarak düştüğü gösterilmiştir. Bu nedenle, bu çalışmada, sporadik Alzheimer hastalarının post-mortem beyin dokularında *POL β* geni lokusu hedefe yönelik yeni nesil sekanslama yöntemiyle taranmıştır. *POL β* geninin 12. ekzonunda yerleşik rs3136797 (pro242arg) polimorfizmi ve 63 adet intronik polimorfizm saptanmıştır. Yaptığımız çalışmada elde ettiğimiz genetik değişimler arasında sadece Alzheimer hastalarında görülen polimorfizmlerden bazıları ilk kez bu çalışmada tespit edilmiştir ve toplumdaki sıklığı bilinmemektedir. AH dışındaki hastalıklar ile ilişkilendirilmiş ve maf değeri %1'in altında olan bazı polimorfizmler Alzheimer hastalarında ilk kez bu çalışmada gösterilmiştir. Alzheimer hasta grubunun çoğunluğunda belirgin bir şekilde öne çıkan bir polimorfizm olmasa da aynı kişide birden fazla *POL β* geni polimorfizmi saptanmış olup, bu ek (additive) bir etki yaratabilir. Bu çalışmada saptanan polimorfizmlerin, sporadik AH tanısında bir biyobelirteç olup olamayacağını göstermek için, popülasyon çalışmaları ile örnek sayısı artırılıp, önemli olabileceği düşünülen genetik varyantların toplumdaki sıklığı araştırılarak, sporadik Alzheimer hastalarındaki sıklığı ile karşılaştırılmalıdır. Yeni bulunan genetik değişimlerin hastalığın etiopatolojisindeki rolleri işlevsel olarak araştırılmalıdır.

Anahtar kelimeler: Alzheimer hastalığı, baz eksizyon tamiri, biyobelirteç, polimorfizm, yeni nesil dizileme

SUMMARY

Alzheimer's disease (AD) is a multifactorial complex neurodegenerative disorder and it is the most frequent type of dementia. By discovering that, an early diagnosis slows down the progression of sporadic AD and reducing its symptoms, research studies about genetic risk factors of sporadic AD has been accelerated. The relationship between base excision repair (BER) damages and AD etiology and pathology has come to light by biochemical, molecular, cellular and behavioral researches on post-mortem brain tissues of sporadic Alzheimer patients, mouse models, cell lines and also knockout mouse models for specific BER genes. Research studies have shown that, in sporadic AD, BER protein POL β expression, activity and amount is at low levels and total BER capacity has decreased depending on low levels of POL β . Therefore during this research post-mortem brain tissues from AD patients has scanned for *POL β* gene locus with next-generation sequencing. Rs3136797 (pro242arg) polymorphism located in exon 12 of *POL β* gene and 63 intronic polymorphisms have been detected. Among the genetic variations found in this study, some of the polymorphisms detected only in Alzheimer patients and are discovered for the first time with this study and their frequency in the population is not known. Polymorphisms related with other than AD and with minor allele frequency (maf) lower than 1% has been shown in Alzheimer patients for the first time in this study. Although there is no significantly dominating polymorphism in majority of the AD patients, more than one *POL β* gene polymorphism has found in one patient which can cause an additive effect. To find out whether these polymorphisms could be considered as a biomarker for sporadic AD, sample numbers should be increased with population studies, frequency of the variants which are considered to be important in the population should be investigated and compared with the frequency in sporadic AD patients. The roles of newly discovered genetic variant on AD etiology should be studied functionally in future researches.

Key words: Alzheimer disease, base excision repair, biomarker, next-generation sequencing, polymorphism

1. GİRİŞ ve AMAÇ

Alzheimer hastalığı (AH) çok etkenli sebeplerle ortaya çıkan kompleks nörodejeneratif bir hastalıktır. Yapılan araştırmalar Dünya genelinde 36 milyonun üzerinde Alzheimer hastası olduğunu ve 2050 yılına gelindiğinde bu sayının katlanarak artacağını ortaya koymaktadır (www.who.int). Türkiye’de ise AH’ye sahip 400 bin civarında insan olduğu bildirilmiştir. Serebral korteks ve hipokampusun geniş alanlarına etki eden ve demansın en sık görülen tipi olan Alzheimer hastada öncelikle hafıza ve muhakeme yeteneğini kaybetme ve idrak sorunları geliştirme olarak kendini göstermektedir (1,2). Histopatolojik olarak ise AH’nin iki belirgin imzası bulunmaktadır; amiloid betanın hücre dışı ortamda ve damarların duvarlarında birikmesiyle oluşan amiloid plaklar ve tau proteininin nöronlarda birikmesiyle oluşan nörofibriler yumaklar (3,4). Alzheimer hastalarının %90’ı, kalıtsal olmayan geç başlangıçlı (>65 yaş) sporadik Alzheimer hastalarıdır. Sporadik AH’nin etiyolojisi tam olarak anlaşılamamakla birlikte hastalığın bu formunun oluşmasında yaşlanmanın ve çevresel faktörler önemli bir rol oynadığı bilinmektedir (1). Sporadik AH’nin erken teşhisi sayesinde, tedaviye kısa sürede başlayarak hastalık seyrinin yavaşlatılabilmesi ve böylece semptomların azaldığının saptanması, sporadik AH erken teşhisinde kullanılacak aday genetik risk faktörlerinin taranması yönünde yapılan çalışmaların önemini ortaya koymaktadır. Sporadik AH’ye yatkınlıkta bugüne kadar sadece *APOE* gen varyantları bilinmekte ancak bu varyantlar sporadik AH ile çok kuvvetli bir bağlantı göstermedikleri için hastalığın tanısında yaygın olarak kullanılmamaktadır (2).

Nöronların yaşam süresi ve kendilerinin kopyalama yeteneklerinden yoksun olmaları göz önünde bulundurulduğunda, DNA tamir mekanizmaları genom bütünlüğünün sağlanması, nöron kayıplarının önüne geçilmesi ve canlılarda nöral fonksiyonların yaşamları boyunca düzgün işleyebilmesi açısından önemli rol oynar (4). Alzheimer hastalarının beyin dokularından alınan örneklerle yapılan çalışmalarda bu dokulara ait DNA üzerinde oksidatif DNA baz lezyonlarının yüksek seviyelerde bulunduğu ve BER yolağında görev alan bazı enzimlerin aktivitelerinde düşüş olduğu gösterilmiştir (5-8). Polimeraz β (*POL* β) BER mekanizmasında DNA sentezinden sorumlu polimerazdır. *Pol* β ile fare embriyolarında yapılan

Çalışmalarda, *Pol β* geninde meydana gelecek hasarların nöronal gelişim bozukluğına yol açabileceği gösterilmiştir (9). Nöron hücreleri üzerinde yapılan deneylerde *POL β* bozukluğunun nöron, hücrelerinin oksidatif strese daha duyarlı hale gelmesine ve merkezi sinir sistem gelişiminin bozulmasına neden olduğu görölmüşür (9,10).

Projenin amacı, günümüzde ve gelecekte önemi giderek artan ve toplum sağlığı sorunu olan sporadik AH'nın erken tanısını sağlayarak risk altındaki popölasyonu belirleyebilmek için hastalığın genetik risk faktörü olan gen veya gen varyantlarını saptamak ve AH patogeneğinde BER yolağı moleküler mekanizmasını aydınlatabilecek yeni yollar açmaktır. Erken tanı ile uygulanmaya başlayacak tedavi, hastalığın ilerlemesini yavaşlatarak ve semptomlarını azaltarak sporadik Alzheimer hastalarının sağkalım sürelerini, hastaların ve hasta yakınlarının yaşam kalitelerini ve çalışabilme kapasitelerini artırarak tedavinin ekonomik yükünü azaltacaktır.

2. GENEL BİLGİLER

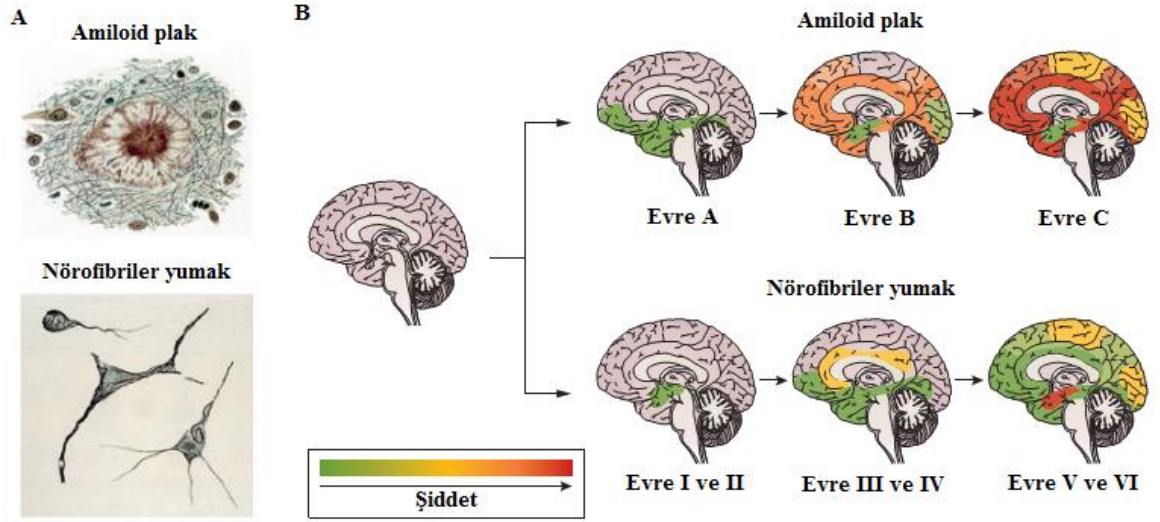
2.1. Alzheimer Hastalığı (AH)

Nörodejeneratif hastalıklar bütün dünyada olduğu gibi Türkiye’de de önemli bir sağlık problemi olarak karşımıza çıkmaktadır. Dünya sağlık örgütünün (DSÖ) verilerine göre nörodejeneratif bir hastalık olan AH tüm dünyada 36 milyonun üzerinde insanı etkilemektedir (www.who.int, erişim tarihi: 10 Mart 2016). Dünya popülasyonunun yaşlanması ile bu sayının 2050 yılında 4 katına çıkacağı dolayısıyla dünya genelinde 85 kişiden 1’inde AH görüleceği tahmin edilmektedir. Türkiye’de ise Alzheimer hasta sayısının 400 bin civarında olduğu bildirilmiştir. Nüfusun yaşlanmasına paralel olarak artış gösteren AH, dünyada görülen ölüm nedenleri arasında 6. Sıradadır. DSÖ verilerine göre Türkiye 2050 yılında dünyada en fazla Alzheimer hastası olacak 4 ülkeden biridir. Toplumda AH’nın 60-65 yaş arası görülme sıklığı yaklaşık olarak %0,1 iken 85 yaşın üzerinde görülme sıklığı %47’ye kadar çıkmaktadır. AH’nın, hastaları ve ailelerini de hesaba katıldığında çok geniş bir kitleyi ilgilendiren bir hastalık olmasının yanısıra bir halk sağlığı sorunu olduğu da açıkça görülmektedir. (<http://alzheimerderneği.org.tr>, erişim tarihi: 10 Mart 2016).

Demansın en yaygın formu olan AH çok etkenli sebeplerle ortaya çıkan kompleks ve progresif nörodejeneratif bir hastalıktır. AH, hafıza kaybı, bilişsel fonksiyon bozukluğu, hareket ve koordinasyon yeteneği kaybı ve çeşitli nöropsikiyatrik semptomlarla karakterize edilir. Erken safhalarda hafıza ve muhakeme yeteneğini kaybetme ve idrak sorunları kendini gösterirken daha sonraki safhalarda, hafıza kaybının boyutları artar ve hastalarda paranoya ve sanrı gibi semptomlar gelişir. Son safhalara doğru hastalar iletişim kurma yeteneklerini tamamen kaybederler ve dışa muhtaç hale gelirler (1,2). AH’ye sahip olan hastalarda fizyolojik olarak öncelikle frontal ve temporal lob etkilenirken hastalık neokorteksin diğer bölgelerine doğru hastadan hastaya değişen hızda ilerler (1).

Histopatolojik olarak AH’nin iki belirgin imzası bulunmaktadır; amiloid plaklar (AP) ve nörofibriller yumak (NFY) oluşumu. Bunların yanında sinaps-nöron kaybı, gliosis, inflamasyon, diğer nörotransmitter sistemlerinde kayıplar ve beyinde belirgin bir atrofi de saptanır. Amiloid plakların temel bileşeni amiloid β ($A\beta$) peptididir. $A\beta$

peptidi, bir transmembran proteini olan amiloid öncü proteininden (APP) değişen uzunluklara sahip (38-43 aminoasit uzunluğunda) peptidler halinde proteolitik yolla oluşan APP'nin metabolizma ürünüdür. β sekretaz enzimi APP'yi amino ucundan keserek 40 veya 42 aminoasitlik $A\beta$ 'yı meydana getirir. 42 aminoasit uzunluğunda olan $A\beta$ izoformu diffüz plaklar halinde çökerek amiloid plakları oluşturur. AH ile ilişkilendirilmiş bütün genetik mekanizmalarda, gamma sekretaz kompleksinin, yapısında bulunan proteinleri kodlayan genlerde ve $A\beta$ peptidini uzaklaştırmakta sorumlu olan genlerde mutasyonlar meydana geldiği saptanmıştır. Bu mutasyonların $A\beta_{42}$ 'nin normalden çok daha fazla eksprese edilmesine ve bunun sonucunda $A\beta_{42}$ 'nin birikiminin β -yapraklarının oluşmasına sebep olduğu gösterilmiştir (11,12). Nörofibriler yumakların temel bileşeni olan TAU proteini mikrotübül asosiye proteinler ailesinde bulunur. TAU proteini aksonal mikrotübüllerin stabilizasyonundan, hücre iskelet bütünlüğünün sağlanmasından sorumludur ve aksonal transportta görev alır. TAU hiperaktif kinazlar ve hipoaktif fosfatazlar tarafından hiperfosforile hale getirildiğinde mikrotübüllere bağlanma yeteneğini kaybeder ve çözilemeyen çift sarmallı filamanlar polimerize olur. AH'lerin beyin dokuları ve omurilik sıvıları ile yapılan incelemelerde toplam TAU ve fosforillenmiş TAU seviyelerinin arttığı, 3 ve 4 tekrarlı izoformlarının yer aldığı gözlemlenmiştir. TAU proteininin artmasına neden olan mekanizma açıklığa kavuşturulabilmiş değildir. Amiloid plakların ve nörofibriler yumakların AH evrelerinde bulunma şiddeti şekil.1'de gösterilmiştir (13).



Şekil.1 AH'nin patolojik gelişimi A) Beilcshowsky yöntemi ile boyanmış amiloid plak ve nörofibriler yumak B) Amiloid plakların ve nörofibriler yumakların Braak evrelerine göre dağılımı (1)

AH'yi erken başlangıçlı ve geç başlangıçlı veya sporadik AH olarak iki ana grupta inceleyebiliriz. Erken başlangıçlı AH (<65 yaş) grubunda yer alan, ailesel AH otozomal dominant olarak kalıtılır ve ender görülür (%5-10). Ailesel AH için otozomal dominant geçişten sorumlu 3 gen tanımlanmıştır: amiloid prekürsör protein (*APP*) geni, presenilin 1 (*PSN1*) geni ve presenilin 2 (*PSN2*) geni. Bu genlerde bulunan mutasyonların A β 42 üretiminin artmasında rol aldığı gösterilmiştir. Alzheimer hastalarının büyük bir kısmı, %90'ı, kalıtsal olmayan geç başlangıçlı (>65 yaş) sporadik Alzheimer hastalarıdır ve görülme sıklığının her beş yılda bir iki katına çıktığı bildirilmiştir. Sporadik AH'nin etiyolojisi tam olarak anlaşılamamakla birlikte hastalığın bu formunun oluşmasında yaşlanma ve çevresel faktörler, risk faktörleri olarak kabul edilmektedir (14). Erken teşhisin AH'nin ilerlemesini yavaşlattığının ve semptomlarını azalttığının saptanmasıyla hız kazanan sporadik AH için genetik risk faktörü tarama çalışmaları sonucunda hastaların %20'sinde görülen *APOE4* geninde bulunan polimorfizmler genetik risk faktörü olarak kabul edilmiştir. Normal popülasyonda *APOE*'nin en sık görülen alleli *E3* (%70) iken *E4* alleli %20 sıklıkla görülmektedir. Yapılan çalışmalar AH'ye sahip toplumda *E4*allelinin görülme sıklığının iki katına çıktığını göstermiştir (15). Ancak bu varyantlar sporadik AH ile çok kuvvetli bir bağlantı göstermedikleri için hastalığın tanısında yaygın olarak

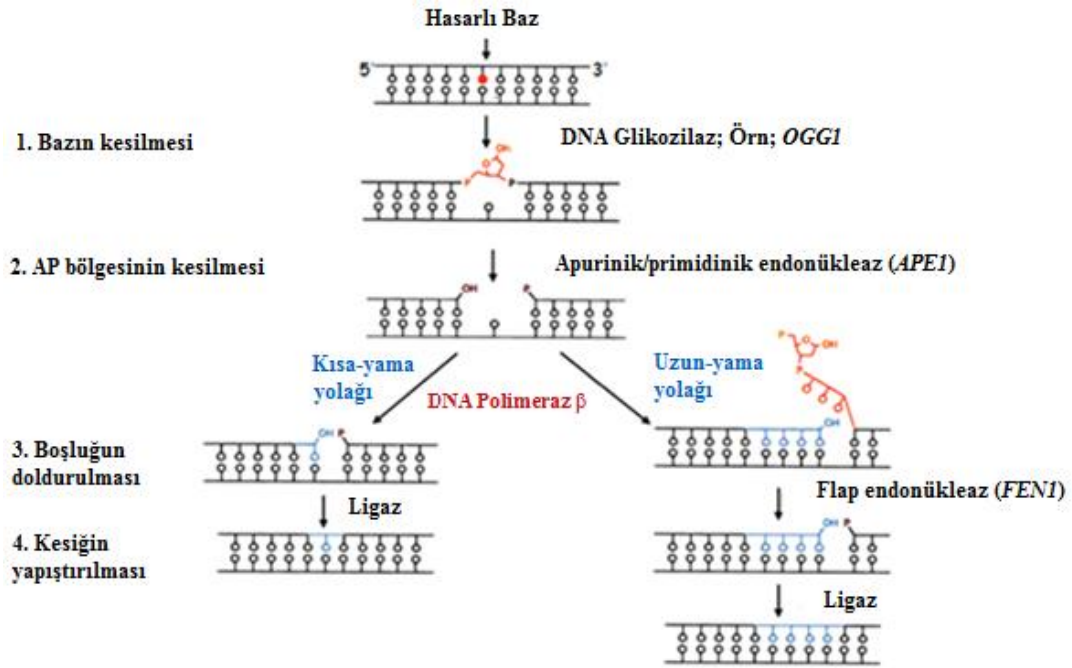
kullanılmamaktadır. Son yıllarda DNA tamir mekanizmaları, özellikle baz eksizyon tamir (BER) yolağı genleri bu araştırmaların odağı haline gelmiş fakat sporadik AH ile bağlantılı bir gen/gen varyantı henüz saptanamamıştır.

Aseptomatik AH, bilme yetisini korumasına ve AH kliniğine dair bir belirti göstermemesine rağmen, β -amiloid plaklar, nörofibriler yumaklar ve nörofil iplikçikler gibi AH patolojisine ait oluşumlara neden olan bir hastalıktır. Bu oluşumlar şiddeti ve lokasyonu açısından, hafif bilişsel bozukluk ve AH ile benzerlik göstermektedir. Aseptomatik AH anterior singulat girus ve CA1 hipokampüste bulunan kortikal nöronların aşırı büyümesiyle ilişkilendirilmiştir. Nöronların aşırı büyümesi nöronal somayı etkilediği gibi çekirdek ve çekirdekçikleri de etkilemiştir ve AH lezyonlarının anatomik değişimi ile benzerlik gösterdiği saptanmıştır (43).

2.2. DNA Hasarı ve Baz Eksizyon Tamir (BER) Yolağı

Çevresel ve endojen ajanların DNA'da oluşturduğu oksidatif baz hasarları, monofonksiyonel baz modifikasyonları ve tek zincir kırıkları, temel olarak BER yolağı ile tamir edilir. BER yolağı çok basamaklı bir yoldur; hem çekirdekte hem de mitokondride bulunur. Çekirdek ve mitokondrideki BER yolağının mekanizması benzerdir (şekil.2) fakat bu mekanizmanın bazı basamaklarında farklı proteinler rol oynar. BER yolunun ilk basamağında DNA hasarına özgü DNA glikozilaz enzimleri görev alır. DNA glikozilazlar modifiye olmuş veya uygun olmayan DNA bazlarını tanır ve baz ile şeker arasındaki N-glikozidik bağı keserek DNA zincirinde abazik bölgeyi oluşturur. İnsanda farklı oksidatif DNA hasarını tanıyarak substrat olarak kullanan farklı DNA glikozilaz enzimleri bulunur; örneğin, 8-okzoguanin DNA glikozilaz'ın (*OGGI*) temel substratı 8-OHGua; endonükleaz VIII-benzeri 1 DNA glikozilaz'ın (*NEIL1*) ana substratları FapyGua, FapyAde ve 5-OHU, urasil DNA glikozilaz'ın (*UDG*) temel substratı ise urasildir (32). DNA glikozilazlar farklı substratlara özgü olmalarıyla birlikte aynı DNA hasarı için de aktivite gösterebilirler. DNA glikozilazlar ile hasarlı baz kesildikten sonra oluşan abazik bölgenin AP endonükleaz 1 (*APE1*) ile kesilmesiyle DNA zincirinde tek nükleotidlik boşluk meydana gelir. BER yolağı ya tek nükleotid sentezi (kısa-yama BER; SP-BER) ya da oligodeoksinükleotid zincirinin yerinden kaydırılmasına neden olan birkaç nükleotid sentezi (uzun-yama BER; LP-BER) yapar. SP-BER yolağının sentez basamağında

çekirdekte polimeraz β (*POL β*), mitokondride ise DNA polimeraz γ (*POL γ*) görev alır. Proliferatif hücrelerin LP-BER yolağında ise çekirdekte *POL β* ile birlikte PCNA-bağlı (proliferatif hücre çekirdek antijeni) polimerazlar (polimeraz δ ve polimeraz ϵ) görev alır. Son yıllarda yapılan araştırmalar, post-mitotik sinir hücrelerinde LP-BER yolağında sadece *POL β* enziminin sentezden sorumlu olduğunu göstermiştir. Bu durum, beyinde sinir hücrelerinin canlılığının korunmasında *POL β* 'nin önemli bir rol oynadığını göstermektedir. LP-BER yolağında DNA zincirinin kaydırılmasından sonra flap endonükleaz 1 (*FEN1*) proteini kaydırılmış zinciri keser ve polimeraz ve ligaz enzimi ile DNA zinciri birleştirilerek BER yolağı tamamlanır. Hücrelerin hangi koşullarda LP-BER'a yöneldiği henüz tam olarak açıklanamamıştır (32,33).



Şekil.2 Baz eksizyon tamir yolağı

2.3. Sporadik AH ve Baz Eksizyon Tamir (BER) Yolağı

Nöronların yaşam süresi ve kendilerini kopyalama yeteneklerinden yoksun olmaları göz önünde bulundurulduğunda, DNA tamir mekanizmaları genom bütünlüğünün sağlanması, nöron kayıplarının önüne geçilmesi ve canlılarda nöral fonksiyonların yaşamları boyunca düzgün işleyebilmesi açısından önemli rol oynar. Beyin, kan-beyin bariyeri sayesinde kandan gelebilecek DNA hasar faktörlerinden korunsa da hücresel solunum sırasında ortaya çıkan radikal türler nedeniyle oluşan spontane bozulmalara ve reaksiyonlara karşı koruma sağlamaz. Beyin yüksek metabolizma hızı nedeniyle, oksidatif strese diğer organlara göre daha çok maruz kalır ve bu nedenle BER mekanizması beyinde hücre bütünlüğünün sağlanmasında öncelikli önem taşır.

Oksidatif hasar ile AH arasındaki ilişkiyi incelemek için yapılan çalışmalarda AH'ye sahip kişilerden alınan örneklerde ve post-mortem beyin dokularında oksidatif hasarın arttığı gösterilmiştir (19-21). Alzheimer hastalarından ve kontrollerden alınan kan örneklerinde oksidize pürin ve primidinlerin karşılaştırılması sonucu AH örneklerinde anlamlı artış olduğu saptanmıştır. Aynı şekilde, AH ve kontrol post-mortem beyinlerinin ön, temporal, parietal loblarından ve beyinciklerinden alınan kesitlerde nükleer DNA'da oksidize pürin ve primidinlerin arttığı görülmüştür (19,20). Sporadik AH ve kontrollerin post-mortem beyin dokularında 8-oxodG ve urasil insizyon aktivitelerine bakıldığında AH'lerde kontrol grubuna göre daha düşük olduğu görülmüştür. Aynı zamanda bu dokularda UDG ve POL β protein miktarları karşılaştırıldığında AH dokularında daha az miktarda bulunduğu saptanmıştır (21). Preklinik AH beyin dokuları ve kontrol dokularında 8-OHG seviyeleri karşılaştırıldığında preklinik AH dokularında artış olduğu gözlemlenmiştir (20). AH doku ve kan örneklerinde yapılan bu araştırmalar AH patogenezi ve oksidatif stres arasında anlamlı bir ilişki olduğunu ortaya koymaktadır. Preklinik AH örneklerinde yapılan çalışmalar ise oksidatif stresin AH patogenezinin erken evrelerinde etkili olmaya başladığının göstergesidir. Alzheimer hastalarının ve kontrollerin omurilik sıvılarından alınan örnekler de nükleer DNA'da 8-OHdG seviyeleri karşılaştırıldığında Alzheimer hastalarında daha yüksek olduğu görülmüştür. Aynı örneklerde serbest 8-OHdG seviyelerine bakıldığında Alzheimer

hastalarından alınan örneklerin seviyelerinin daha yüksek olduğu görülmüştür (7). Serbest 8-OHdG'nin Alzheimer hastalarında daha yüksek olması AH patolojisinde oksidatif stresin tek başına etkili olmadığını, oksidatif stresi tamir etmekle sorumlu olan baz eksizyon tamir yolağında oluşan hasarların da bir etken olduğunu ortaya koymuştur.

Baz eksizyon tamir yolağı ile AH'yi ilişkilendirmek için bu yolda görev alan genlerin hastalık patogenezeine olan etkileri araştırılmıştır (22-29). APE1 gen ifadesi susturulmuş nöron kültürleri oksidatif stresi arttıran cisplatin ile muamele edildiklerinde, reaktif oksijen türlerinde ve apoptoza giden hücre miktarında artış olduğu görülmüştür (22). Glutamat merkezi sinir sisteminde bulunan önemli bir nörotransmitterdir ve glutamat sinyalizasyonunun APE1 ekspresyonunu arttırabildiği gösterilmiştir (23). Glutamat miktarının bu duruma etkisi üzerine yapılan çalışmalarda belirli bir seviyeye kadar glutamatın BER fonksiyonunu arttırıcı özellik gösterdiği fakat artan miktarlarının zehirleyici etkisi olduğu gösterilmiştir (23). Nöron kültüründe APE1 ve Poly (ADP-Ribose) Polymerase 1 (PARP1) genlerinin inhibe edilmesiyle nöronlarda sinaptik fonksiyonda gelişme olduğu saptanmıştır (24). Fare modellerinde yapılan çalışmalarda PARP1 aktivasyonunun iltihaba neden olan ara ürünlerin üretilmesini kontrol ettiği ve ekspresyonunun azalmasının anormal nöron iltihaplanmasına yol açtığı görülmüştür (25). AH ve kontrol gruplarından alınan post-mortem beyin dokusu örneklerinde PARP1 gen anlatımı karşılaştırıldığında, AH grubunda gen anlatımının düşük olduğu saptanmıştır (26). Sporadik AH, hafif kognitif bozukluk ve kontrol grubundan alınan post-mortem beyin dokusu örneklerinde OGG1 gen anlatımı karşılaştırıldığında, AH ve hafif kognitif bozukluk gruplarında kontrol gruplarına göre anlamlı düşüş olduğu gözlemlenmiştir. OGG1'in düşüklüğünün NFY'lar ile ilişkilendirilmiş ve nöronlarda distrofik nörit oluşumunda rol oynadığı ortaya koyulmuştur. Hafif kognitif bozukluk grubunda, AH grubuna benzeri düşüklük gözlemlenmesi OGG1'de oluşan hasarın hastalığın patolojisinde erken dönemde rol oynadığını göstermektedir (27). Urasil DNA Glikosilaz (UDG) geninin AH ve kontrol grubu post-mortem beyin dokularında seviyesinin karşılaştırılması sonucu AH grubunda düşük çıktığı ortaya koyulmuştur. Fare nöron kültüründe UDG gen anlatımının bastırılması sonucunda nöronlarda apoptozun arttığı gösterilmiştir (28). Pol β heterozigot fareler ile yapılan

çalışmalarda farelerin AH benzeri fenotip geliştirdiği görülmüştür. Fareler de hafıza gelişiminde ve hipokampal sinaptik esneklikte problemler olduğu görülmüştür. Otofaji de sorunlar olması farelerin beyinde A β birikimine yol açmış ve amiloid plaklar oluşmuştur. Farelerin transkriptom profillerinin insan Alzheimer hastalarının profilleriyle büyük ölçüde benzerlik gösterdiği saptanmıştır (29). BER yolağında görev alan genler ile AH gelişimi arasında ki ilişkinin, bu genlerde ortaya çıkan sorunların AH patogenezinde nasıl bir rol oynadığı tablo.1’de özetlenmiştir.

Tablo.1 BER yolağında görev alan genlerin AH patogenezinde ki rolleri

Gen	Fenotip	DNA tamiri ve AH ilişkisi	Referans
<i>APE1</i>	Nöron kaybı	�DNA tamiri – �A β – �AH	22
	Glutamat sinyalizasyonu	�DNA tamiri – �Glutamat – �AH	23
	Sinaptik fonksiyon bozukluğu	�DNA tamiri – �Sinaptik fonksiyon – �AH	24
<i>PARP1</i>	Sinaptik fonksiyon bozukluğu	�DNA tamiri – �Sinaptik fonksiyon – �AH	25
	Anormal nöron iltihaplanması	�DNA tamiri – �İltihaplanma – �AH	26
<i>OGG1</i>	Nörofibriler yumak oluşumu	�DNA tamiri – �Hiperfosforile TAU – �AH	27
<i>UDG</i>	Nöron kaybı	�DNA tamiri – Nöron kaybı � – �AH	28
<i>POL �</i>	A β birikimi ve plak oluşumu	�DNA tamiri – �A β – �AH	29
	Nöron kaybı	�DNA hasarı – �A β – �AH	

BER yolağında görev alan genlerde bulunan polimorfizmlerin AH gelişimi ile ilişkisini meydana çıkarmak için bu polimorfizmler, AH ve kontrol gruplarında çalışılmıştır (34-39). *APE1* geni ile yapılan çalışmalar, sigara i imine bağlı gelişen akciğer ve meme kanseri gelişmesinde Asp148Glu polimorfizminin risk arttırıcı faktör olabileceğini ortaya koymuştur (44). *APE1* geninde bulunan üç yanlış anlamlı polimorfizmden, Asp148Glu %5’ten büyük minör alel frekansına sahiptir. Bu polimorfizmin *APE1* fonksiyonunda değişime sebep olduğu gösterilmesine rağmen,

AH ve kontrol grupları arasında anlamlı bir frekans değişimi göstermemesi, AH gelişiminde bir risk faktörü olmadığının göstergesidir (34). *OGGI* geninde bulunan Ser326Cys polimorfizmi bundan önce yapılan çalışmalarda, meme, akciğer, yumurtalık, üst solunum yolu ve sindirim sistemi ve gastrointestinal kanserleri ile Arg46Gln polimorfizmi ise akciğer ve böbrek tümörleri ile ilişkilendirilmiştir (45,46). Ser326Cys polimorfizminin AH patogenezindeki ilişkisine bakıldığında, yapılan *in vitro* çalışmalarda, bu değişimin *OGGI* aktivitesinde düşüşe neden olduğu gösterilmiştir. Cys/Cys homozigot varyantına sahip bireylerde 8-oxoG tamirinde problem olduğu görülmüştür. AH ve kontrol grubu arasında ise bu polimorfizm frekansında bir değişim bulunmamıştır. Kontrol ve AH grubunda anormal homozigot GG Ser326Cys değişiminin dağılımının ise aynı olduğu gösterilmiştir. (34-36). Arg46Gln değişiminin *OGGI* üzerindeki etkisine bakıldığında ise *OGGI*-Ser46 fragmanının *OGGI*-Gln46 fragmanına göre daha aktif olduğu gösterilmiştir. Arg46Gln polimorfizmi ile AH arasında bir korelasyon bulunamamıştır, homozigot GG Arg46Gln polimorfizmine sahip bireylerin dağılımı hasta ve AH gruplarında paralellik göstermektedir (36). *XRCC1* genine ait Arg194Trp, Arg280His ve Arg399Gln polimorfizmlerinin AH ile ilişkisi incelenmiştir. Arg194Trp polimorfizmi, akciğer, üst solunum yolu ve sindirim sistemi, mide ve kalın bağırsak ve deri kanserinde risk faktörünü arttırıcı rol oynamaktadır. Kanser riski arttırıcı rolünün yanı sıra kemoterapi ve radyoterapi nedeni ile gelişebilecek akut miyeloid lösemi de koruyucu bir etken olabileceği gösterilmiştir (46). Arg194Trp polimorfizminin *Xrcc1* fonksiyonuna etkisi ise fareler ile yapılan deneylerde gözlemlenmiştir. Bu polimorfizme sahip farelerde *Xrcc1* fonksiyonunun tam olarak gerçekleşmediği görülmüştür. Bu polimorfizmin frekansı AH ve kontrol grupları arasında bir değişim göstermemektedir (37,38). Arg280His polimorfizminin üst akciğer, solunum yolu ve sindirim sistemi, mesane, alkole bağlı mide ve prostat kanseri riskini arttırabileceği, meme kanserinde hem risk arttırıcı rol oynadığı hem de radyoterapiye karşı olumsuz yanıt oluşmasına sebep olabileceği gösterilmiştir (46). Arg280His ile yapılan *in vitro* çalışmalarda, bu polimorfizmi taşımanın, BER aktivitesine etki ederek DNA hasarına daha yatkın hale getirdiği gösterilmiştir. AH ve kontrol grupları arasında Arg280His polimorfizmine bakıldığında ise bu polimorfizmin AH riski ile bir ilişkisi olmadığı görülmüştür (34). Arg399Gln

polimorfizmi yapılan çalışmalar sonucu, akciğer, üst solunum yolu ve sindirim sistemi, mesane, mide, karaciğer ve pankreas kanseri ile ilişkilendirilmiştir (46). polimorfizmine sahip G/A genotipine sahip bireylerin G/G genotipine sahip bireylere göre AH'ye daha duyarlı olduğu gösterilmiştir. Diğer bilinmeyen alelik varyantlar ile arasında bağlantı dengesizliği olmasının bu ters etkiyi yarattığı düşünülmektedir (37). *PARP1* genine ait Val762Ala polimorfizmi servikal, akciğer ve mide kanseriyle ve gliyoma ile ilişkilendirilmiştir ve bu kanserlerin riskini arttırdığı gösterilmiştir (47). Asp81Asp polimorfizminin ise hodgkin dışı lenfoma riskini azalttığı gösterilmiştir (48). Val762Ala polimorfizmlerinin fonksiyona olan etkisi incelendiğinde, C/C varyantının PARP1 enziminin katalitik bölgesinde yer alan bir değişim olduğu ve enzim aktivitesini düşürdüğü bulunmuştur. Val762Ala polimorfizminde C alelinin AH riskini arttırdığı, T alelinin ise bu riski azalttığı gösterilmiştir (37, 39). Val762Ala ve Asp81Asp polimorfizmleri beraber incelendiğinde AH grubu ve kontroller arasında anlamlı bir fark gözlemlenmemiştir. Fakat Asp81Asp T, Val762Ala T (Ht3) ve Asp81Asp C, Val762Ala C (Ht4) genotipleri ayrı ayrı incelendiğinde AH riskini arttırdığı gözlemlenmiştir (39). *MUTYH* geninde bulunan Gln324His polimorfizmi yapılan çalışmalarda kalın bağırsak kanseri ve akciğer kanseri ile ilişkilendirilmiş ve risk arttırıcı rol oynadığı ortaya koyulmuştur (49, 50). AH patogenezi ile arasındaki ilişki incelendiğinde bu polimorfizmin AH patogeneze etki etmediği görülmüştür (37). Ber yolağında görev alan genlerde bulunan polimorfizmler ile AH arasındaki ilişki tablo.2'de özetlenmiştir.

2.4. DNA Polimeraz Beta (*POL β*)

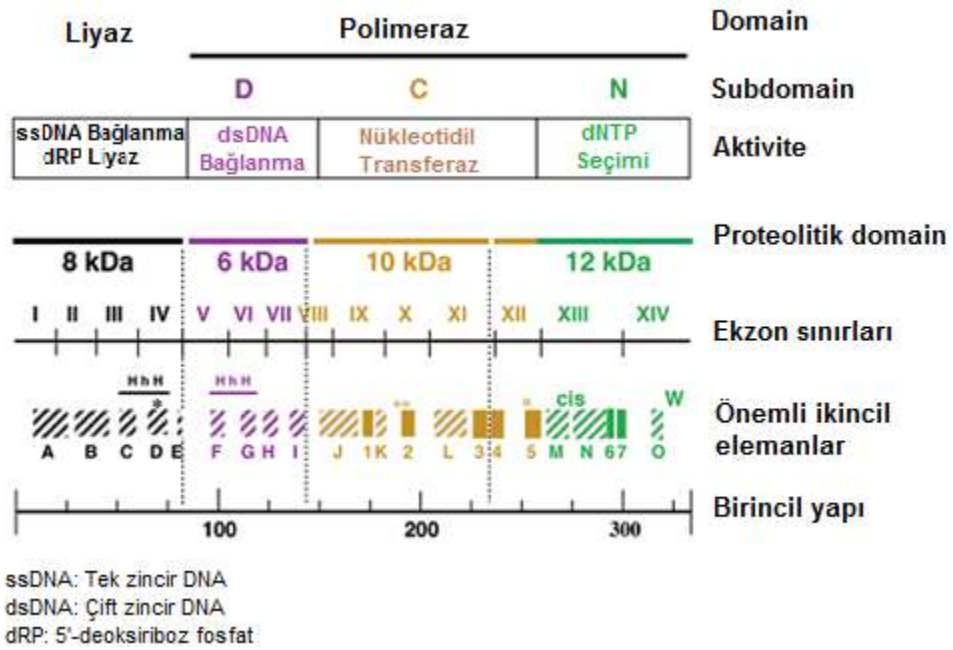
DNA'nın nükleik asit formunda yeni kopyalarının oluşmasından sorumlu polimerazlar sekans homolojileri ve kristal yapı analizlerine göre 7 aile altında incelenmektedirler (A, B, C, D, X, Y ve RT). Tüm omurgalı türlerinde 39-kDA'lık bir peptid halinde bulunan *POL β*, X ailesine aittir. Farklı memeli türleri arasında sekansının yüksek oranda korunmuş olması, sağ kalım için *POL β*'nin önemli bir role sahip olma ihtimalini ortaya koymaktadır. *POL β* geninin yapısında 14 adet boyutları 50 ve 233 bp uzunluk arasında değişen ekzon ve 13 adet boyutları 96 bp ve 6,5 kb

arasında değişen intron bulunmaktadır. *POL β* polimeraz aktivitesinin yanı sıra AP liyaz ve 5'-dRP liyaz aktivitesine de sahiptir. Liyaz aktivitesi ile 5'-şeker-fosfat

Tablo.2 BER yoluğı genlerinde bulunan polimorfizmler ve AH ilişkisi

Gen	Polimorfizm	Alel değişimi	AH/Kontrol Odds Ratio	AH patogenezi ile ilişkisi	Ref
<i>APE1</i>	rs3136820 (Asp148Glu)	T⇒G	91/93 1.08 (0.70-1.68)	Anlamli bir ilişki yok	34
<i>OGG1</i>	rs1052133 (Ser326Cys)	C⇒G	91/93 1.32 (0.83-2.11)	Anlamli bir ilişki yok	34
			178/146 1.04 (0.70-1.55)		35
			41/51 1.60 (0.81-3.14)		36
	rs104893751 (Arg46Gln)	G⇒A	41/51 -	Anlamli bir ilişki yok	36
<i>XRCC1</i>	rs1799782 (Arg194Trp)	C⇒T	120/110 0.680 (0.208–2.223)	Anlamli bir ilişki yok	37
			98/95 2.06 (0.97-4.37)		38
	rs25489 (Arg280His)	G⇒A	91/93 0.53 (0.24-1.14)	Anlamli bir ilişki yok	34
	rs25487 (Arg399Gln)	G⇒A	120/110 0.485(0.271–0.870)	+A/A genotipi ↓AH riski	37
<i>PARP1</i>	rs1136410 (Val762Ala)	T⇒C	120/110 T/C: 4.159(1.978–8.745) T/T: 0.240 (0.114–0.556)	+T/C genotipi ↑AH riski +T/T genotipi ↓AH riski	37
			120/111 0.75 (0.52-1.09)		39
	rs1805404 (Asp81Asp)	C⇒T	120/111 0.76 (0.53-1.11)	+Ht3 ve Ht4 genotipi ↑AH riski	39
<i>MUTYH</i>	rs3219489 (Gln324His)	G⇒C	120/110 0.827 (0.470–1.455)	Anlamli bir ilişki yok	37
+ Anlamli bir ilişki var - Anlamli bir ilişki yok ↓ Riski düşürüyor ↑ Riski arttırıyor					

kalıntısını uzaklaştırarak akış aşağı DNA dizisinde 5'-fosfat bırakır. Liyaz ve polimeraz sırasıyla, 8 kDa'lık ve 31 kDa'lık iki farklı domainde yer almaktadırlar. Polimeraz domaini 3 alt domaine sahiptir: çift zincir DNA bağlanması, nükleotidil transferaz, dNTP seçimi. Şekil.3'te *POL β* üzerinde bulunan α -sarmalı (çizgili kutular), β -yaprakları (dolu kutular) ve ekzon sınırları gösterilmiştir (16).



Şekil.3 DNA *POL β* gen yapısı (16)

Memelilerde *POL β* seviyesi beyinde diğer organlara göre daha yüksektir. *POL β* seviyesi cenin beyinde genel olarak yüksekken yetişkinlerde bu seviye hipotalamus ve beyincikte diğer bölgelere göre daha yüksektir. *POL β* gen anlatımının beyinde diğer organlara göre daha yüksek olması bölünmeyen hücrelerde sahip olduğu önemli rolü ortaya koymaktadır. Çoğalabilen hücreler ve başkalaşan nöronlarda polimeraz δ ve polimeraz ϵ seviyeleri karşılaştırıldığında bölünemeyen hücrelerde büyük ölçüde düştüğü, *POL β* seviyesinin ise yükseldiği ya da aynı kaldığı gösterilmiştir. Bölünemeyen hücrelerde hem SP-BER'de hem de LP-BER'de

POL β daha öne çıkan bir rol oynamaktadır. LP-BER’de *POL β*, *PCNA* bağımlı polimeraz aktivitesine alternatif olarak görev yapmaktadır. Bölünemeyen hücrelerde polimeraz ve liyaz aktivitesinin bölünebilen hücrelere göre daha düşük olduğu saptanmıştır (30).

POL β geni çıkarılmış (knockout) homozigot (*POL β* $-/-$) farelerde yapılan çalışmalarda, diğer BER genlerinin aksine *POL β* susturulmasının embriyonik dönemde ölümle sonuçlanmadığı ama *POL β* susturulmuş farelerin diğerlerine göre daha ufak olduğu ve doğum sonrası nefes alma refleksi geliştirmedikleri gösterilmiştir. Geç dönem gelişimi kaynaklı ölümler nöronal farklılaşmada meydana gelen problemler ile ilişkilendirilmiştir (31). Farelerin beyin zarlarında, dorsal kök ganglionlarında ve arkabeyinde DNA hasarı kaynaklı apoptoz olduğu belirtilmiştir. Beyin dışında diğer organlarda histolojik olarak bir anormallik olmaması *POL β* geni ve beyin gelişimi arasındaki ilişkiyi ortaya koymuştur (31). *POL β* heterozigot (*POL β* $+/-$) farenin geliştirilmesi ile *POL β* geninin AH patogenezindeki rolü aydınlatılmıştır. *POL β* aktivitesi tam olarak çalışmayan farelerde DNA hasar birikiminde anlamlı yükseliş gözlemlenmiştir. İnsan AH hastalarına benzer olarak Aβ birikimi ve otofaji hasarı kaynaklı nöron ölümleri görülmüştür. *POL β* geninin düşük oranda gen anlatımına sahip olması farelerde hafıza sorunlarına ve sinaptik esneklik sorunlarına neden olmuştur (29).

AH ve kontrol gruplarından alınan post-mortem inferior yan loblarından ve beyinciklerinden alınan örneklerde tek-nükleotid boşluk doldurma aktivitesine ve *POL β* protein seviyelerine bakılmıştır. AH grubunda *POL β* seviyesi kontrol grubuna göre daha düşük çıkmıştır ve tek-nükleotid boşluk doldurma aktivitesinin düşük olduğu gözlemlenmiştir. Total BER kapasitesinin *POL β*’ya bağlı olarak düşmesi, AH patogenezinde *POL β* gen anlatımında meydana gelen problemlerin etkili olduğunu ortaya koymuştur (19). Braak skoruna göre sınıflandırılmış post-mortem AH ve kontrol beyin dokularından alınan örneklerde *POL β* seviyeleri karşılaştırıldığında AH grubunda Braak skoru ile *POL β* seviyesi arasında bir ilişki ortaya çıktığı görülmüştür. Braak 5 ve 6’da 3 ve 4’e göre anlamlı bir düşüş olduğu saptanmıştır. AH grubunda genel olarak kontrol grubuna göre *POL β* seviyesinin daha düşük olduğu gösterilmiştir (31).

POL β genine ait bildirilmiş, 189 tek nükleotid polimorfizmi bulunmaktadır. Mesane kanseriyle yapılan çalışmada bakılan 43 tek nükleotid değişimi arasından intronik rs3136717 değişimi artan kanser riski ile ilişkilendirilmiştir (51). Pankreas kanserinde hayatta kalımla ilgili yapılan çalışmalarda, intronik rs2272615 ve rs2953993 değişimlerinin bulunmasının hayatta kalım süresinin iki katına çıkardığı gösterilmiştir (52). Yapılan çalışmalar arg137'nin *POL β* geninin katalitik bölgesinde yer aldığını ve *PCNA* ile etkileşiminde düzenleyici rol oynadığını göstermiştir. Rs200062558 (arg137gln) polimorfizminin *POL β* polimeraz aktivitesini düşürdüğünü ve *PCNA* ile etkileşimini azalttığı ortaya koyulmuştur ve bu nedenle kanser oluşumuna yol açabileceği hipotezi gelişmiştir (53). Meme kanseri ile yapılan çalışmalarda rs121909672 (lys289met) polimorfizmine ait Met/Met genotipinin ve rs3136797 (Pro242Arg) polimorfizmine ait Pro/Arg genotipinin kanser riskini arttırdığı ortaya koyulmuştur (54). Yapılan *invitro* çalışmalarda rs3136797 (Pro242Arg) polimorfizminin antimutajen olarak etki ettiği görülmüş ve bununla paralel olarak kolon kanserinde risk düşürücü faktör olarak belirlenmiştir. Bu çalışmaların aksine, *POL β* geninin kodlayan bölgesinin dizilenmesiyle yapılan çalışmalarda rs3136797 (Pro242Arg) polimorfizminin prostat kanseri dokularında bulunduğunu fakat aynı hastalara ait lenfositlerde bulunmadığı ve akciğer kanseri prognozunda olumsuz bir etkiye sahip olduğu görülmüştür (55).

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Sporadik Alzheimer, Aseptomatik Alzheimer ve Kontrol Örnekleri

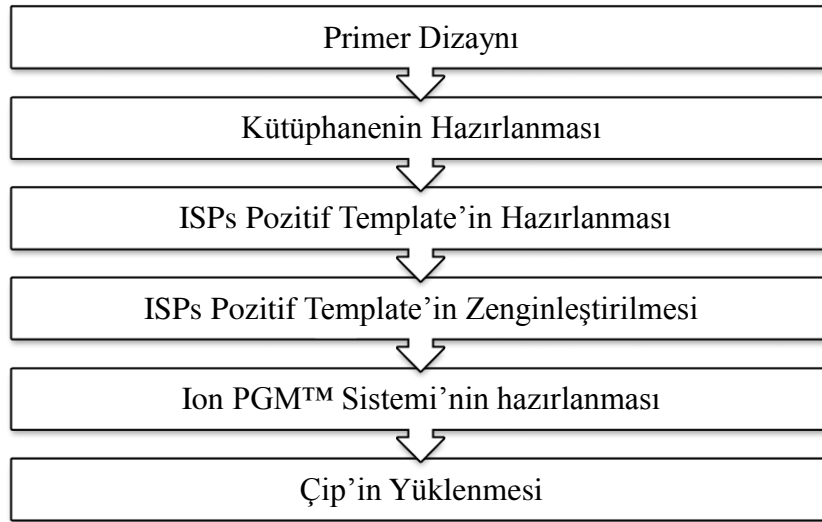
Bu çalışmada, 11 sporadik ve 11 aseptomatik Alzheimer hastası ve nörolojik bulgusu olmayan 10 bireyin post-mortem beyin dokularından (beyincik; serebellum) izole edilen DNA örnekleri kullanılmıştır. BER mekanizması hasarının sporadik AH'nın patolojisine etkisini araştıran Doç. Dr. Nadja de Souza Pinto, Sao Paulo Üniversitesi, Brezilya ile ortaklaşa yürüttüğümüz araştırmada kullanılan sporadik ve aseptomatik Alzheimer hastası ve nörolojik bulgusu olmayan bireylerin post-mortem beyin dokularından Qiagen DNA izolasyon kiti ile total DNA'lar izole edilmiş ve Dr. de Souza Pinto tarafından grubumuza gönderilmiştir. Araştırmanın etik kurul rapor numarası; B.30.2.ACÜ.0.00.00.050-06/45'dir.

3.2. DNA Ölçümü ve Hazırlanması

Post-mortem DNA örneklerinin saflığı ve konsantrasyonu NanoDrop™ 2000/2000c Spectrophotometers (Thermo Fisher Scientific, USA) ve/veya Qubit® dsDNA HS Assay kiti (Thermo Fisher Scientific, USA) kullanılarak ölçüldü. Qubit kitinin protokolü takip edilerek gerçekleştirilen ölçümler için; 199 µL Qubit® dsDNA BR reaktifi ve 1 µL Qubit® dsDNA BR tamponu birleştirilerek çalışma solüsyonu hazırlandı. 190 µL çalışma solüsyonu üzerine 10 µL standart 1 ve standart 2 eklenerek standart grafikleri çizildi. Daha sonra 198 µL çalışma solüsyonu üzerine 2 µL DNA örneklerinden eklenerek DNA'ların konsantrasyon ölçümleri yapıldı. Ölçüm sonucunda A260/280 oranı 1,8 nm ile 2 nm, A260/230 oranı ise 2 nm ile 2,2 nm arasında olan DNA örnekleri çalışmada kullanılmak üzere seçildi.

3.3. Ion Personal Genome Machine™ (PGM™) Sistem'i ile Yeni Nesil Dizileme

DNA örneklerinin Ion PGM™ Sistem'i (Ion Torrent, Thermo Fisher Scientific) ile gerçekleştirilen yeni nesil dizileme aşamaları şekil.4'te gösterilmektedir.



Şekil.4 Ion PGM™ sisteminde yeni nesil sekanslama basamakları

3.3.1. Primer Dizaynı

“Ion AmpliSeq™ Designer” (<https://www.ampliseq.com/browse.action>) programı ve insan referans genomu GRCh37-hg19 kullanılarak *POL β* geninin hedef gen sekanslaması için primer dizaynı yapıldı. Tablo.3'te *POL β* geninin hedef gen sekanslaması için dizayn edilen primerlerin özellikleri gösterilmektedir. Primer dizaynı yapılırken promoter bölgelerini de dahil etmek için genin başlangıç lokasyonu olarak chr8:42195157 ve bitiş lokasyonu olarak chr:42229331 belirlendi.

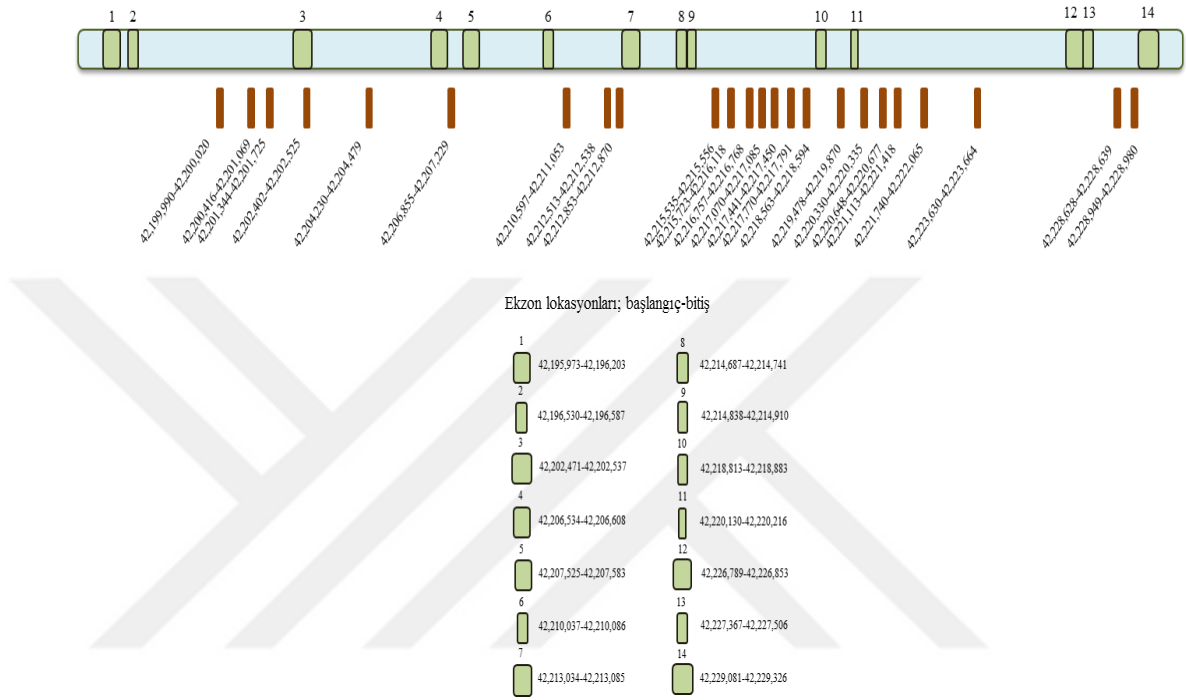
Tablo.3 *POL β* gen primerinin özellikleri

Gen	Genom	Panel	DNA çeşidi	Kromozom başlangıcı	Kromozom bitişi	Hedef baz çifti	Kapsanan baz çifti	Amplikon sayısı	Kapsama yüzdesi (%)
POL β	İnsan (hg19)	IAD79844	Standart DNA	42195472	42229331	33859	29916	124	88.35

Dizayn edilen primerler *POL β* geninin %88.35'ini kapsamaktadır. Primerin amplikon uzunlukları 125 bp-375 bp arasında ve iki amplikon havuzu olarak dizayn edilmiştir. *POL β* geninin ekzon ve intron bölgeleri ve sekans için dizayn edilen primerlerin kapsamadığı bölgeler Şekil.5'te *POL β* gen yapısı üzerinde

gösterilmektedir. Ekzonlar arasında sadece ekzon 3'te 123 bç lik bir alan kapsamamaktadır. *POL β* geninin primer baz dizisi Ek 1'de verilmiştir.

POLB:chr8:42195472:42229331



Şekil.5 *POL β* gen yapısı. Yeşil bölge: ekzon, Mavi bölge: İntron, Kırmızı bölge: Primerin kapsamadığı bölgeler

3.3.2. Kütüphanenin Hazırlanması

Sekanslamanın ilk aşaması olan kütüphane hazırlanması; *POL β* geninin çoğaltılması, amplikonların saflaştırılması ve Ion 318™ Chip Kit v2'ye eşit konsantrasyonlarda kütüphane yüklenebilmesi amacıyla yapıldı.

3.3.2.1. Hedef Bölgelerin Çoğaltılması

Yöntem 3.3.1.'de dizayn edilen primerler kullanılarak *POL β* geni multipleks polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ile çoğaltıldı. Multipleks PZR için Ion AmpliSeq™ Kütüphane Kit 2.0 içerisinde bulunan Ion AmpliSeq™ HiFi Master karışım kullanıldı. İki primer havuzundan her biri için birer adet 96-kuyucuklu PZR

plakasına (PCR Plate, 96-well, non-skirted, Thermo Fisher Scientific, USA, AB0600) DNA örneklerinden 24 ng/6 µl (4 ng/µl) dağıtıldı. Örneklerin üzerine, 4 µL HiFi Karışımı ve 6 µL primer havuzlarından eklenerek termal ısı cihazında (Bio-Rad T100™ Thermal Cycler) tablo.4'te gösterilen PZR koşulları ile Pol β gen bölgesi çoğaltıldı.

Tablo.4 Multipleks PZR koşulları

Etap	Adım	Sıcaklık	Zaman
Tutma	Enzim aktifleşmesi	99 °C	2 dk
22 Döngü	Denatürasyon	99 °C	15 sn
	Bağlanma ve Uzatma	60 °C	4 dk
Tutma	—	10 °C	Tutma

3.3.2.2. Hedef Bölgelerin Kısmi Olarak Kesilmesi

PZR ile çoğaltılan ampliconlara barkod adaptörlerinin (Ion Xpress™ Barcode Adapters 1-16 Kit ve Ion Xpress™ Barcode Adapters 17-32 Kit) bağlanması ve ampliconların fosforillenerek ligaz enzimi için substrat hale getirilmesi için Ion AmpliSeq™ FuPa reaktifi ile ampliconların ucundan kısmi kesim yapıldı. Multipleks PZR ile çoğaltılan örneklerin üzerine 10 µL FuPa reaktifi dağıtılarak tablo.5'te yer alan koşullar kullanılarak termal ısı cihazında kesim gerçekleştirildi.

Tablo.5 Kısmi kesim PZR koşulları

Sıcaklık	Süre
50 °C	10 dk
55 °C	10 dk
60 °C	20 dk
10 °C	Maksimum 1 saate kadar tutma

3.3.2.3. Barkod Adaptörlerinin Bağlanması

Sekanslama sonucunda her bir örneğin ayrı değerlendirilebilmesi için aynı Ion 318™ Chip Kit v2'ye yüklenecek her hastaya farklı bir barkod atanarak örnekler etiketlendi. Barkodlar 1:4 oranında, 2 µL Ion P1 Adaptör, 2 µL Ion Xpress™ Barkod ve 4 µL nükleaz içermeyen su kullanılarak seyreltildi. Seyreltilen barkodlardan amplikonların üzerine 2 µL eklendi. Barkod eklenmiş amplikonların üzerine Ion AmpliSeq™ Kütüphane Kit 2.0 içerisinde yer alan Switch solüsyonu ve DNA ligazdan 2 µL eklenerek termal ısı cihazında tablo.6'da yer alan PZR koşulları ile barkodların amplikonlara bağlanması sağlandı.

Tablo.6 Barkod bağlanması için gerekli PZR koşulları

Sıcaklık	Süre
22 °C	60 dk
72 °C	10 dk
10 °C	En fazla 1 saate kadar

3.3.2.4. Çoğaltılamayan Kütüphanenin Arındırılması

Agencourt AMPure XP reaktifi (Beckman Coulter, U.S.A) kullanılarak çoğaltılan kütüphanelerin, reaktif içerisinde yer alan paramanyetik küreciklere bağlanması sayesinde, bağlanmayan barkodların, primerlerin, nükleotidlerin, tuzların ve enzimlerin uzaklaşmasını sağlandı. Barkod bağlanan amplikonların üzerine reaktiften 45 µL eklendi, oda ısısında ve ardından manyetik tutucu (DynaMag™-96 Side Magnet, Thermo Fisher Scientific) üzerinde inkübe edilerek fragmanların küreciklere bağlanması sağlandı. Küreciklere bağlanan fragmanlara 2 kez 150 µL % 70'lik etanol eklenerek yıkandı ve daha sonra etanol tamamen uzaklaştırıldı.

3.3.2.5. Kütüphanelerin Konsantrasyonlarının Eşitlenmesi

Ion Library Equalizer™ Kit kullanılarak kütüphanelerin konsantrasyonları ~ 100 pM'e eşitlendi. Önce arındırılan kütüphanenin üzerine önce 50 µL Platinum® PCR SuperMix High Fidelity ve 2 µL Equalizer™ primeri eklendi ve manyetik tutucu

üzerine alınarak 2 dk süre ile inkübe edildi. İnkübasyon sonrası kütüphanelerden yaklaşık 50 µL süpernatant yeni plakaya aktarıldı ve termal ısı cihazında tablo.7’de yer alan koşullar ile kütüphane çoğaltıldı.

Tablo.7 Kütüphane çoğaltması için gerekli PZR koşulları

Evre	Sıcaklık	Süre
Tutma	98 °C	2 dk
7 Döngü	98 °C	15 sn
	64 °C	1 dk
Tutma	10 °C	En fazla 1 saate kadar

3.3.2.5.A. Equalizer™ Küreciklerinin (Bead) Yıkama

Equalizer™ kürecikleri önceden yıkanarak kullanıma hazır hale getirildi. Örnek başına 3 µL Equalizer™ küreciği, üzerine örnek başına 6 µL Equalizer™ yıkama tamponu eklenerek, manyetik rak üzerinde 3 dk süre ile inkübe edildi ve daha sonra süpernatant uzaklaştırılarak yıkama işlemi gerçekleştirildi. Equalizer™ kürecikleri tekrar örnek başına 6 µL Equalizer™ yıkama tamponu ile süspansiyon haline getirildi.

3.3.2.5.B. Kütüphaneye Equalizer™ Capture ve Equalizer™ Küreciği Eklenmesi

Çoğaltılan kütüphanelerin üzerine 10 µL Equalizer™ Capture eklenerek 10 dk süre ile inkübe edildi ve üzerine 3.3.2.5.1. de hazırlanan Equalizer™ küreciklerinden 6 µL eklendi. Karışım önce 5 dk oda ısısında inkübe edilerek kütüphanelerin küreciklere bağlanması sağlandı. Daha sonra 2 dk süre ile manyetik tutucu üzerinde inkübe edilen örneklerden süpernatant uzaklaştırılarak manyetik küreciklere bağlanan kütüphaneler 2 kez 150 µL Equalizer™ yıkama tamponu eklenerek yıkandı.

3.3.2.5.C. Eşitlenmiş Kütüphanenin Ayırıştırılması

Yıkanan kütüphaneyi manyetik küreciklerden ayırmak için 100 µL Equalizer™ elüsyon tamponu eklenen örnekler 5 dk, 32°C’de inkübe edildi. Elüsyonu tamamlamak için 32°C’den alınan örnekler manyetik tutucu üzerine alınarak oda

ısısında 5 dk daha inkübe edildi. Küreciklerden tamamen ayrılan kütüphaneler yeni plakaya aktarıldı.

3.3.3. İyon Küre Cisimciği (Ion Sphere™ Particles) Pozitif Kalıbın (Template) Hazırlanması

Konsantrasyonları eşitlenmiş olan kütüphanelere, bir küreciğe bir amplikon bağlanması ve küreciklere bağlanan amplikonların bir yağ damlası içerisinde milyonlarca kopyaya çoğaltılması için Ion OneTouch™ 2 (OT2) cihazı (şekil.6) ile emülsiyon bazlı PZR yapıldı.



Şekil.6 Ion OneTouch™ 2 cihazı

3.3.3.1. Ion OneTouch™ 2 (OT2) Sisteminin Hazırlanması

Ion PGM™ Template OT2 400 kit içerisinde yer alan Ion OneTouch™ reaktif tüplerine Ion One Touch yağı ve Ion PGM OT2 kurtarma solüsyonu koyularak OT2

cihazına yerleştirildi yerleştirildi. Ion OneTouch™ kurtarma tüpleri içerisine 150 µL Ion One Touch kırma solüsyonu eklendikten sonra ve Ion OneTouch™ amplifikasyon plakası ile haznelerine yerleştirilerek cihaz PZR işlemine hazır hale getirildi.

3.3.3.2. Amplifikasyon Karışımının Hazırlanması

Konsantrasyonları eşitlenen kütüphanelerde 10 µL alınarak bir tüpte karıştırıldı ve bu karışımdan 5 µL alınıp, üzerine 20 µL nükleaz içermeyen su eklenerek kütüphane karışımı seyreltildi. Tablo.8’de yer alan karışım sırasıyla içerisinde 800 µL Ion PGM™ Hi-Q™ reaktif karışımı olan 2 ml tüpe eklendi ve karışım Ion PGM One Touch Plus reaksiyon birleştirme filtresine yüklendi. Yüklenen karışımın üzerine 1,7 ml Ion One Touch reaksiyon yağı dikkatlice yüklenerek filtre OT2 cihazına yerleştirildi ve PZR başlatıldı.

Tablo.8 Amplifikasyon karışımı

Sıra	Bileşen	Hacim
1	Nükleaz içermeyen su	25 µL
2	Ion PGM™ Hi-Q™ Enzim karışımı	50 µL
3	Seyreltilmiş kütüphane	25 µL
4	Ion PGM™ Hi-Q™ iyon küre cisimciği	100 µL
—	Toplam	200 µL

3.3.4. İyon Küre Cisimciği Pozitif Kalıbın Zenginleştirilmesi

Emülsiyon PZR sonrası bağlanamayan kürecikler ile amplikonların uzaklaştırılması ve PZR ürünlerinin yıkanması için “Ion OneTouch™ Enrichment System (ES)” cihazı ile izleyen aşamalar uygulanarak zenginleştirme işlemi yapıldı (şekil.7). PZR ürünlerinin üzerindeki süpernatant tüpün dibinde 100 µL kalacak şekilde uzaklaştırıldı ve peletler çözülerek üzerlerine 500 µL Ion OneTouch™ yıkama solüsyonu eklendi ve iyon küre cisimciği pozitif kalıplar yeni bir tüpte birleştirildi. Yeni tüpte bulunan iyon küre cisimciği pozitif kalıp 2 dk 15,500 g’de santrifüjlendi ve süpernatant tüpün dibinde 100 µL kalacak şekilde uzaklaştırıldı. 280 µL Tween solüsyonu ve 40 µL 1 M NaOH birleştirilerek Melt-Off solüsyonu

hazırlandı. 13 μ L Dynabeads® MyOne™ Streptavidin C1 kürecikleri manyetik rakta 2 dk inkübe edildi. Süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra pellet 130 μ L MyOne™



Şekil.7 Ion OneTouch™ Enrichment System cihazı

kürecik yıkama solüsyonu ile süspansiyon hale getirildi. 8-kuyucuklu şerit plaka tablo.9’da belirtilen şekilde yüklenerek plaka Ion OneTouch™ ES cihazına yerleştirildi. 0.2 ml PZR tüpüne 10 μ L nötrleştirme solüsyonu koyuldu ve örnek toplama haznesine yerleştirilerek zenginleştirme işlemi başlatıldı.

Tablo.9 Sekiz-kuyucuklu şerit plaka dağılımı

Kuyucuk no	Kuyucuğa aktarılacak reaktif
1	Birleştirilen ISPs Pozitif Template’in tamamı
2	130 μ L Dynabeads® MyOne™ Streptavidin C1 kürecikleri
3	300 μ L Ion OneTouch™ yıkama solüsyonu
4	300 μ L Ion OneTouch™ yıkama solüsyonu
5	300 μ L Ion OneTouch™ yıkama solüsyonu
6	Boş
7	300 μ L taze hazırlanmış “Melt-off” solüsyonu
8	Boş

3.3.5. Ion Personal Genome Machine® (PGM™) Sistemi'nin Hazırlanması

Ion PGM™ sistemi (şekil.8) yarı iletken çip ile çalışmaktadır. Bu çipin yüzeyinde bulunan nanoölçek boyutundaki kuyucuklar, iyon değişimine duyarlı mini pH prensibiyle çalışmaktadır. Sisteme yüklenen dNTP solüsyonları, çipe yüklenen iyon küre cisimciği pozitif kalıbın üzerinden her seferinde farklı dNTP yollanarak 15 sn aralıklarla geçirilir ve her dNTP bağlanmasında ortaya çıkan H^+ iyonu ortamdaki pH'yı değiştirir. Bu kimyasal değişim, voltajı artırır ve bu sayede sistem bu değişimi dijital bilgiye dönüştürür. dNTP geçirilmesi bittiğinde sistem bu dijital bilgileri biraraya getirerek örneklerin DNA dizisini ortaya çıkartır.



A	Dokunmatik Ekran
B	Çip Haznesi
C	Topraklama Plakası
D	Güç Düğmesi
E	Reaksiyon Tüpleri
F	1 numaralı Yıkama Şişesi (W1 Pozisyonu)
G	2 numaralı Yıkama Şişesi (W2 Pozisyonu)
H	3 numaralı Yıkama Şişesi (W3 Pozisyonu)
I	Atık Şişesi

Şekil.8 Ion PGM™ cihazı

3.3.5.1. Ion PGM™ Cihazının Yıkama

Sekanslama işlemi başlatılmadan önce aşağıda belirtilen yıkama işlemleri kanalların tıkanmaması için düzenli olarak yapıldı.

3.3.5.1.A. Klorür Yıkaması

Klorür yıkama aşaması, cihaz düzenli olarak kullanıldığında haftada bir kez olmak üzere, bundan daha uzun aralıklarda kullanıldığı takdirde cihaz her açıldığında uygulandı. 1L 18 M-ohm su içerisinde çözölen Ion PGM yıkama tabletine ek olarak içerisinde 1 ml 1M NaOH eklendi ve enjeksiyon ile 0.45 µm lik filtreden geçirilerek W1 şişesine aktarıldı ve şişe W1 pozisyonuna takıldı. W2 ve W3 pozisyonlarına yıkama şişeleri yerleştirilerek klorür yıkaması başlatıldı.

3.3.5.1.B. Su Yıkaması

Su yıkama aşaması her çip çalışması öncesi uygulanarak cihaz temizlendi. Su yıkaması için 250 ml lik bir şişeye 250 ml 18 M-ohm su doldurularak W1 pozisyonuna takıldı ve yıkama başlatıldı.

3.3.5.2. Sistemin Başlatılması

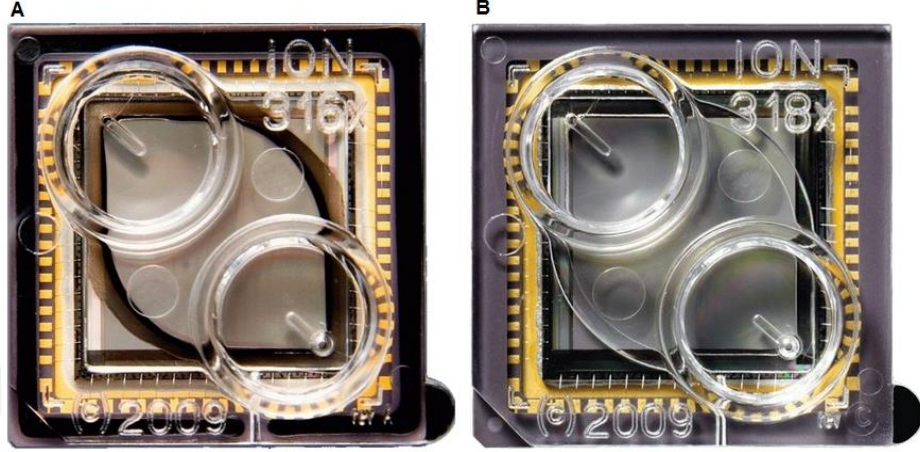
Ion PGM™ sisteminin sekanslamaya hazır hale gelebilmesi için cihaz W1, W2 ve W3 şişeleri içerisinde hazırlanan solösyonları kullanarak pH sını 7.49-7.60 aralığına getirdi. Bu solösyonlardan öncelikle iki numaralı yıkama şişesinin içeriğı hazırlandı. İki numaralı yıkama şişesi nitrojen gazı ile 5 dk muamele edilerek 18 M-ohm su ile dolduruldu ve üzerine Ion PGM Sequencing 400 v2 W2 solösyonu ve 70 µL 100 mM NaOH eklenerek, W2 pozisyonuna takıldı. Daha sonra bir numaralı yıkama şişesine 350 µL 100 mM NaOH konularak, W1 pozisyonuna takıldı. Son olarak üç numaralı yıkama şişesine 50 ml Ion PGM Sequencing 200 v2 1X W3 solösyonu konularak, W3 pozisyonuna takıldı.

3.3.5.3. dNTP Solösyonlarının Hazırlanması

Ion PGM cihazının pH ayarlaması yapıldıktan sonra sekanslama için kullanılacak dNTP'lerden 20 µL reaksiyon tüplerine eklenerek cihaza takıldı ve böylece cihaz sekanslamaya tamamen hazır hale geldi.

3.3.6. İyon Küre Cisimciği Pozitif Kalıbın Çipe Yüklenmesi

Sekanslama için deneylerde şekil.9’da gösterilen 1 gb veri kapasitesine sahip “Ion 316™ Chip Kit v2” ve 2 gb veri kapasitesine sahip “Ion 318™ Chip Kit v2” (Thermo Fisher Scientific, USA) yarı iletken çipleri kullanıldı.



Şekil.9 A) Ion 316™ Chip Kit v2 B) Ion 318™ Chip Kit v2

3.3.6.1. Zenginleştirilen İyon Küre Cisimciği Pozitif Kalıbın Çipe Yüklemek İçin Hazır Hale Getirilmesi

Zenginleştirilen iyon küre cisimciği pozitif kalıba 5 μ L kontrol iyon küre partikülleri (control ion sphere particles) eklendi ve 15,500 g’de 2 dk santrifüj yapıldı. Süpernatant tüpte 15 μ L kalacak şekilde uzaklaştırıldı ve üzerine 12 μ L sekans primeri (sequencing primer) eklenerek 95 °C’de 2 dk, 37 °C’de 2 dk inkübe edildi. İnkübasyon sonrası üzerine 3 μ L Ion PGM™ sekanslama 400 v2 polimerazı eklenerek 5 dk süre ile oda ısısında inkübasyona bırakıldı.

3.3.6.2. Çip Kontrolü

İyon küre cisimciği pozitif kalıp çipe yüklenmeden önce deneyde kullanılacak çipte bir sorun olmadığından emin olmak için yeni çip cihaza yerleştirilerek Ion PGM cihazının çip kontrolü yapması sağlandı. Çip kontrolü bittikten sonra çipin içerisindeki sıvı tamamen uzaklaştırıldı.

3.3.6.3. Yüklemeye Hazır Hale Gelen İyon Küre Cisimciği Pozitif Kalıbın  ipe Yüklenmesi

İnkübasyon sonrası iyon küre cisimciği pozitif kalıp  ipe yavaşça yüklendi. Yükleme sonrası ilk olarak 30 sn santrifüjlendi ve daha sonra 2 kez pipetaj yapılarak ve ters yönlerde santrifüjlenerek  ip üzerindeki kuyucuklara, örneklerin eşit olarak dağılması sağlandı. Sıvı tamamen uzaklaştırılarak  ip cihaza yerleştirildi ve dizileme işlemi başlatıldı.

3.4. Data Analizi

Sekans verileri online “Ion Reporter™” yazılımı kullanılarak analiz edildi (<https://ionreporter.thermofisher.com/ir/>).

4. BULGULAR

4.1. Sporadik Alzheimer, Asemptomatik Alzheimer ve Kontrol Örneklerinin Değerlendirilmesi

Bu çalışmada, 11 sporadik (yaş ortalaması: 82.72 ± 6.32), 11 asemptomatik Alzheimer hastası (yaş ortalaması: 83.27 ± 5.71) ve nörolojik bulgusu olmayan 10 bireyin (yaş ortalaması: 76.80 ± 7.52) post-mortem beyin dokularından izole edilen DNA örnekleri kullanılmıştır. Çalışmaya alınan 11 sporadik ve 11 asemptomatik Alzheimer hastasının klinik tablosu değerlendirildiğinde sporadik Alzheimer hastalarında klinik demans derecelerinin (CDR) orta ve ciddi olarak dağıldığı (klinik demans derecelendirme ortalaması: $2,8 \pm 0,4$) asemptomatik Alzheimer hastalarının klinik demans derecelerinin ise sıfır yani yok olduğu gözlemlenmiştir. Sporadik Alzheimer hastalarının Braak evrelerinin 5. ve 6. evre arasında dağılım gösterdiği, asemptomatik Alzheimer hastalarının Braak evrelerinin ise 4. ve 5. evreler arasında dağılım gösterdiği görülmüştür. CERAD (“Consortium to Establish a Registry for Alzheimer’s Disease”) değerlendirmelerine bakıldığında sporadik ve asemptomatik Alzheimer hastalarının B ve C evrelerinde dağılım gösterdiği gözlemlenmiştir. AH değerlendirilmesinde kullanılan klinik kriterler tablo.10’da gösterilmiştir. Klinik demans dercelendirmesi hem hasta yakınına hem de hastanın kendisine yöneltilen soruların cevaplandırılmasına göre değerlendirilmektedir. Braak evreleri amyloid plaklar ve nörofibriler yumakların oluşum şiddetine ve lokasyonuna göre bir derecelendirme sunmaktadır. CERAD değerlendirmesi ise AH’nin histopatolojik bulgularının, demans seviyesi ile birarada değerlendirilmesiyle ortaya çıkmaktadır.

Tablo.10 AH değerlendirme kriterleri (40-42).

Klinik demans dereceleri	0: Yok 1: Hafif 0.5: Şüpheli	2: Orta 3: Ciddi
Braak evreleri	I-II: transentorinal evre, klinik olarak sessiz III-IV: limbik evre, yeni başlayan AH V-VI: neokortikal evre, tam gelişmiş AH	
CERAD değerlendirmesi	A: AH’ye ait histolojik kanıt yok B: Plak oluşumu var ama demans öyküsü yok C: Demans öyküsü var ama AH’ye sebep olacak lezyonlar yok.	

4.2.DNA örneklerinin saflığı ve konsantrasyonu

DNA örnekleri 10 mM pH, 8.0 TE solüsyonunda çözölmüştür. DNA örneklerinin saflığı ve konsantrasyonu NanoDrop™ 2000/2000c Spektrofotometre ile belirlendikten sonra A260/280 oranı 1,8 nm ile 2 nm, A260/230 oranı ise 2 nm ile 2,2 nm arasında olan DNA örnekleri çalışmada kullanılmak üzere seçilmiştir. Daha sonra, Ion Torrent PGM™ sistemi ile yeni nesil sekanslamasında kullanılmak üzere seçilen DNA örneklerinin dsDNA konsantrasyonunu belirlemek amacıyla "Qubit® dsDNA HS Assay" kiti kullanılarak Qubit cihazında ölçüm gerçekleştirildi. Qubit ölçümü gerçekleştirilen örneklerde 24 ng/6 µL (4ng/µL) konsantrasyona sahip dilüsyonlar hazırlandı.

4.3. Ion Personal Genome Machine™ (PGM™) Sistem'i ile Pol β Geninin Yeni Nesil Dizilenmesi

4.3.1. Örnek sayısının hesaplanması

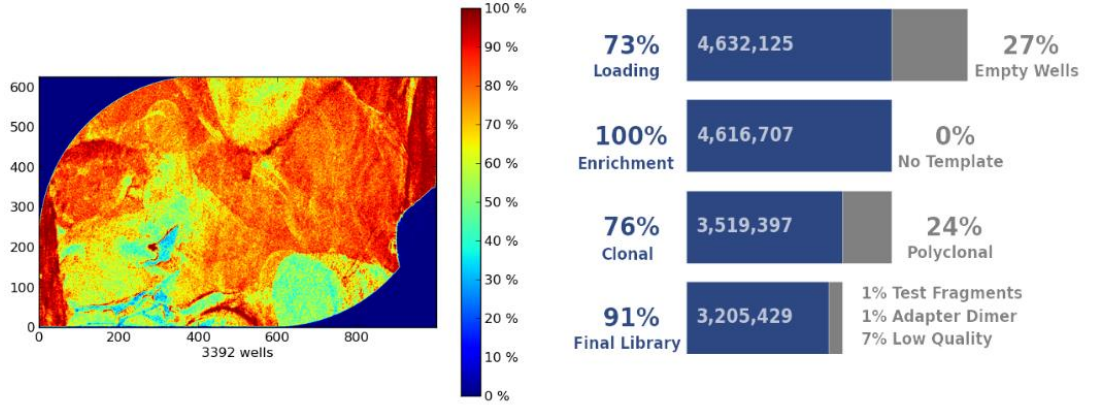
Herbir yarı-iletken çipe yüklenecek örnek sayısının (n) belirlenmesi için aşağıdaki formöl kullanıldı;

Çip kapasitesi = primer havuzlarının büyüklüğü x kapsama oranı x örnek sayısı (n)

800.000.000 (Ion 316™ yarı-iletken çip)= 60030 kb x 416,5 x 32 örnek

4.3.2. Yarı-iletken çip yükleme sonuçları

Şekil.10'da özeti verilen, Ion 316™ yarı-iletken çip kullanılarak gerçekleştirilen dizileme sonucunda çip yüklemesinin %73'lük başarıyla gerçekleştiği göröldü. Zenginleştirilmesi başarıyla gerçekleşen kütüphaneden, %24 oranındaki poliklonalite, %1 oranındaki test fragmanları, %1 oranında oluşan adaptör dimerleri ve %7 oranında düşük kaliteye sahip okumalar çıkartıldıktan sonra 3.205.429 kullanılabilir okuma elde edildi. Yüzde iki ve daha az hata payı ile 531 milyon okuma (AQ17) alınırken, %1 ve daha az hata payı ile 402 milyon okuma (AQ20) alınmıştır. Hatasız alınan okuma sayısı 374 milyondur (perfect). Bu çalışmada, hatasız olarak alınan en uzun okuma 330 bç uzunluğundadır (şekil 10). Çalışmanın kapsama ortalaması 426,307'dir.

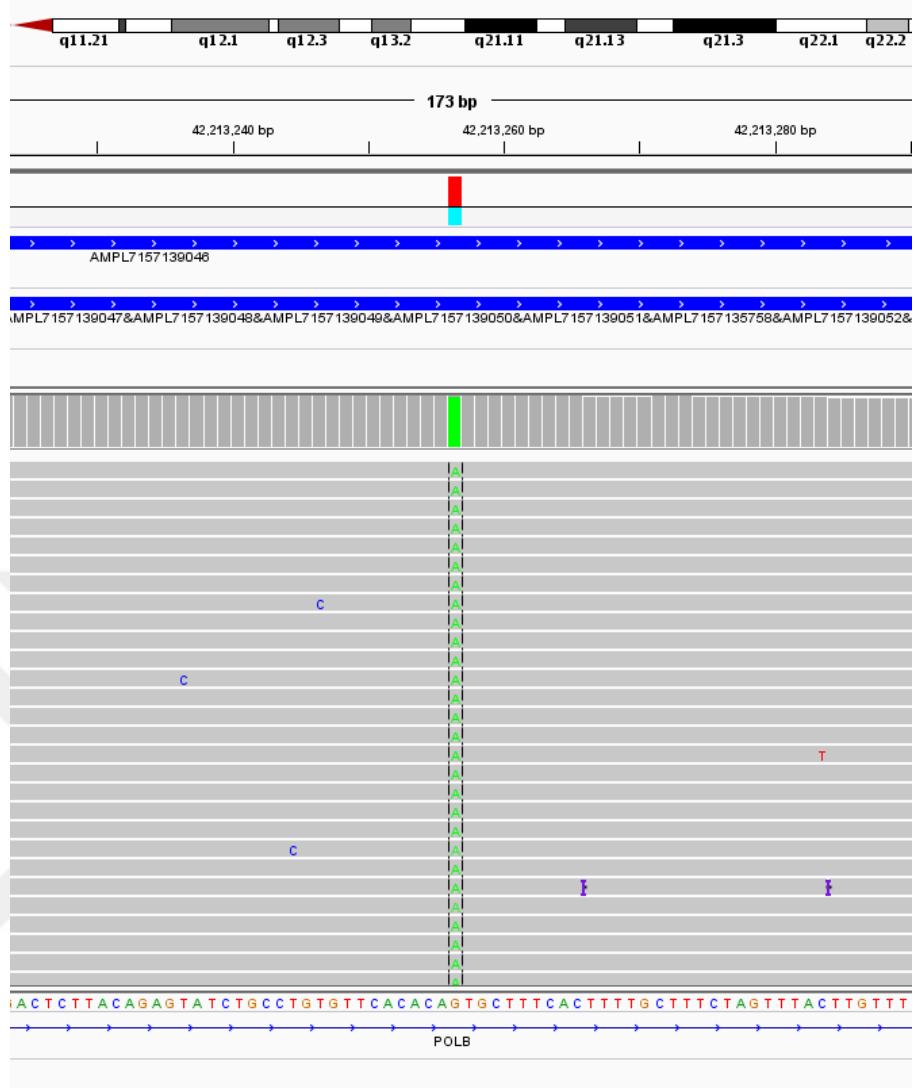


531 M			
AQ17 Total Bases			
Alignment Quality			
	AQ17	AQ20	Perfect
Total Number of Bases [bp]	531 M	492 M	374 M
Mean Length [bp]	176	168	133
Longest Alignment [bp]	338	333	330
Mean Coverage Depth [x]	0.2	0.2	0.1

Şekil. 10 Yeni nesil dizileme yükleme analizi

4.3.3. Ion Torrent PGM sistemi ile Pol β genine yönelik yeni nesil dizileme analizi sonuçları

Pol β geninin yeni nesil dizileme analizi çalışmalarından elde ettiğimiz genetik değişimlerin genel özeti tablo.11’de verilmiştir. Genetik değişimlerin analizi ve kontrolü için “EMBL-EBI” ve “Wellcome Trust Sanger Institute” ortak projesi olan “Ensembl” (<http://grch37.ensembl.org/index.html>), “National Center for Biotechnology Information” ile “National Human Genome Research Institute” ortaklığıyla oluşturulmuş “Single Nucleotide Polymorphism Database (dbSNP)” (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/index.html>) ve “National Institutes of Health” ve “Starr Cancer Consortium” a ait olan “Integrative Genomics Viewer (IGV)” kullanılmıştır. IGV görüntüsüne örnek olarak çalışılan örnekler arasında en sık rastlanan genetik değişim şekil.11’de gösterilmektedir.



Şekil.11 IGV görüntü örneği

Bu çalışmada, hedefe yönelik yeni nesil dizileme analizleri sonucunda, *POL β* geninde, okuma sayısı 20'den yüksek toplam 64 adet genetik değişim bulunmuştur (tablo.11). Bu genetik değişimlerden 56 tanesi tek nükleotid değişimi, 7 tanesi insersiyon/delesyon değişimi ve bir tanesi çoklu nükleotid değişimidir. Bu çalışmada saptanan genetik değişimler arasından, daha önce bildirilmemiş 10 genetik değişim tablo.12'de gösterilmektedir. *POL β* geninin yeni nesil dizileme analizi sonucunda sadece Alzheimer hasta grubunda saptanan genetik değişimler tablo.13'de gösterilmiştir. Alzheimer hasta grubundan sadece AH1'de, *POL β* geninin 12.ekzonunda, chr8:42,226,805 pozisyonunda, yer alan rs3136797 genetik değişimi dışında saptanan bütün genetik değişimler intronda yer almaktadır (tablo.11 ve 13).

rs3136797 tek nükleotid polimorfizmi, POL β proteininde pro242arg değişimine yol açmaktadır.

Elde ettiğimiz tek nükleotid değişimleri içerisinde minör alel frekansı (maf) %1'den küçük olan değişimler, tablo.14'de sunulmaktadır. Yapılan araştırmalarda, bu çalışma sonucunda saptanan genetik değişimlerden bazıları farklı hastalıklarla ilişkilendirilmiştir (51, 56-70). *POL β* genine ait bu genetik değişimler tablo.15'de gösterilmektedir.

Bu çalışmada saptanan tek nükleotid değişimleri arasında aynı genetik değişime ait hem homozigot hem de heterozigot genotipe rastlanmıştır (tablo.11). Homozigot ve heterozigot değişimlerden 90 tanesi hem hasta hem de kontrol grubunda, 18 tanesi sadece kontrol grubunda, 20 tanesi ise sadece Alzheimer hasta grubunda bulunmaktadır. rs137925877 (T/C), rs191616829 (A/G) ve bundan önce bildirilmeyen chr8:42,198,528 ve chr8:42,211,161 lokasyonlarında bulunan değişimler sadece AS grubunda bulunmuştur. rs3136745 (A/A), rs3136747 (A/G ve A/A), rs3136749 (G/G), rs141438316 (T/C), rs116620522 (C/G), rs56119015 (G/A), rs371129021 (GC/G), rs2272615 (A/G), rs181418680 (A/G), rs3136797 (C/G), rs189508852 (A/G) ve bundan önce bildirilmeyen chr8:42,209,452 ve chr8:42,223,593 pozisyonunda bulunan değişimler sadece AH grubunda bulunmuştur. rs3136771 (G/T ve A/G), rs2272615 (A/G) ve bundan önce bildirilmeyen chr8:42,212,545 ve chr8:42,223,593 pozisyonlarında bulunan değişimler hem AS hem de AH grubunda saptanmıştır (tablo.11 ve tablo.13).

Tablo.11 PGM Ion Torrent yeni nesil dizi analizi kullanılarak çalışılan örneklerde *POL β* geninde saptanan genetik varyasyonlar. Het:Heterozigot, hom: Homozigot AD-Sporadik Alzheimer hastası post-mortem beyin dokusu, AS-Aseptomatik Alzheimer hastası post-mortem beyin dokusu, CT-Kontrol post-mortem beyin dokusu, AH-sporadik Alzheimer hastası kan örneği, KT-kontrol kan örneği. SNV-Single nucleotide variant, MNV- Multi-nucleotide variant, INDEL- insersiyon-delesyon. Kırmızı: ekzon değişimi

Gen ve kromozom lokasyonu	Rs numarası	Ref Genotipi	Genomik bölgesi	Mutasyon çeşidi	MAF	Ref SNP	Genotipi	Hom/Het	Hasta kodu	Hasta/Kontrol
<i>POL β</i>										
Chr 8: 42196441	rs3136717	C	intron	SNV	0.269	C/T	C/T	het	AH1, AH3, CT4	2/1
							T/T	hom	AH2,AH6, AH7,AH11, AS3, AS4, AS10, CT1, CT9, CT10	7/3
Chr 8: 42197472	rs137925877	T	intron	SNV	0.001	T/C	T/C	het	AS9	1/0
Chr 8: 42197747	rs3136718	A	intron	SNV	0.245	A/C	C/C	hom	AH1, AH2, AH6, AH7, AS3, AS4, CT1, CT10	6/2
Chr 8: 42198528	nd	AG	intron	INDEL	nd	nd	A/A	het	AS10	1/0
Chr 8: 42199294	rs3136722	A	intron	SNV	0.109	A/T	A/T	het	CT3, CT4	0/2
							A/A	hom	AH1, AH2, AH7, AS3,AS4, CT1, CT10	5/2
Chr 8: 42199628	nd	A	intron	SNV	nd	nd	A/C	het	CT3	0/1
Chr 8: 42200207	rs2979895	G	intron	SNV	0.242	G/A	G/A	het	AH3, CT4	1/1
							A/A	hom	AH1, AH2, AH6, AS3, AS4, CT1, CT10	5/2
Chr 8: 42200338	rs2953993	T	intron	SNV	0.242	T/C	T/C	het	CT4, CT10	0/2
							C/C	hom	AH1, AH2, AS3,AS4, CT1	4/1
Chr 8: 42201087	rs2976239	A	intron	SNV	0.113	A/C	A/C	het	AH8, CT3, CT4, CT5, CT8	1/4
							A/A	hom	AH1, AH2, AH3, AH4, AH6, AH7, AS2, AS3, AS4, AS6, AS7, AS8, AS9, AS10, AS11, CT1, CT2, CT6, CT7, CT9, CT10	15/6
Chr 8: 42201147	rs369260796	AAGG	intron	INDEL	0.281	-/GG	AAGG/A	het	AH1, AH3, AH8, AS8, CT4, CT5, CT6, CT8	4/4
	rs200265657	A		SNV	nd	A/G	A/A	hom	AH2, AH4, AH6, AH7, AS2, AS3, AS4, AS6, AS7, AS10, AS11, CT1, CT2, CT7, CT9, CT10	11/5
Chr 8: 42202040	rs6474390	T	intron	SNV	0.245	T/G	T/G	het	AH2, AH3, AS3, AS8, AS9, CT2, CT4, CT5, CT8	5/4
							G/G	hom	AH1, AH2, AH6, AH7, AS2, AS3, AS4, AS6, AS7, CT1, CT7	9/2

Chr 8: 42203463	rs2976240	G	intron	SNV	0.058	A/G	A/G	het	CT4, CT8	0/2
							A/A	hom	AH1, AH2, AH3, AH4, AH6, AH7, AS2, AS3, AS4, AS6, AS7, AS8, AS9, AS10, CT1, CT2, CT3, CT5, CT6, CT7, CT9, CT10	14/8
Chr 8: 4220406	rs3136735	TAT	intron	INDE L	nd	-/T	TAT/ TT	het	CT3	0/1
Chr 8: 42204176	rs3136738	T	intron	SNV	0.247	C/T	T/C	het	AH3, AS8, AS9, AS10, CT4	4/1
							C/C	hom	AH1, AH2, AH6, AH7, AH11, AS3, AS4, CT1, CT2, CT6, CT7, CT9, CT10	7/6
Chr 8: 42205080	rs3136739	A	intron	SNV	0.021	nd	A/G	het	AS9, CT6	1/1
Chr 8: 42205458	rs3136740	C	intron	SNV	0.024	C/T	C/T	het	CT3	0/1
Chr 8: 42207234	rs2976244	T	intron	SNV	0.245	A/T	T/A	het	AH3, CT4	1/1
							A/A	hom	AH1, AH2, AH6, AH7, AH11, AS3, AS4, AS10, CT1, CT9, CT10	8/3
Chr 8: 42207347	rs3136744	A	intron	SNV	0.105	A/C	A/C	het	CT3	0/1
Chr 8: 42207481	rs3136745	C	intron	SNV	0.023	C/G	C/G	het	AH1, AS9, CT6	2/1
							A/A	hom	AH2	1/0
Chr 8: 42208331	rs3136747	A	intron	SNV	0.023	A/G	A/G	het	AH1	1/0
							A/A	hom	AH2	1/0
Chr 8: 42208797	rs3136748	C	intron	SNV	0.136	C/T	C/T	het	AH3, CT3	1/1
Chr 8: 42208935	rs1916168 29	A	intron	SNV	0.001	A/G	A/G	het	AS9	1/0
Chr 8: 42208964	rs3136749	T	intron	SNV	0.023	C/T	T/C	het	AH1, AS9, CT6	2/1
							G/G	hom	AH2	1/0
Chr 8: 42209095	rs2953994	G	intron	SNV	0.246	A/G	G/A	het	AH3, CT4	1/1
							A/A	hom	AH1, AH2, AH6, AH7, AH11, AS3, AS4, CT1, CT10	7/2
Chr 8: 42209452	nd	T	intron	SNV	nd	nd	T/C	het	AH4	1/0
Chr 8: 42209504	rs2979896	C	intron	SNV	0.245	C/A	C/A	het	AH3, AH8, AS8, AS9, CT4, CT5, CT8	4/3
							A/A	hom	AH1, AH2, AH4, AH6, AH7, AS2, AS3, AS4, AS6, AS7, AS10, AS11, CT1, CT2, CT6, CT7, CT9, CT10	12/6
Chr 8: 42211088	rs3546160 7	GT	intron	INDE L	0.011	-/T	GT/G	het	CT3, CT5	0/2
Chr 8: 42211161	nd	T	intron	SNV	nd	nd	T/C	het	AS2	1/0
Chr 8: 42212545	nd	T	intron	INDE L	nd	nd	TG/T G	hom	AH1, AH6, AS3, AS7	4/0
Chr 8: 42212547	rs2976238	T	intron	SNV	0.243	G/T	T/G	het	AH1, AH3, AH4, AH6, AS2, AS3, AS4, AS6, AS7, AS8, AS9, CT2, CT4, CT5, CT8, CT9	11/5
							G/G	hom	AH2, AS3, CT1, CT6, CT9	2/3
Chr 8: 42213256	rs2953983	G	intron	SNV	0.243	G/A	G/A	het	AH3, AH8, AS8, AS9, CT4, CT5, CT8	4/3
							A/A	hom	AH1, AH2, AH4, AH6, AH7, AH11, AS2, AS3, AS4, AS6, AS7, AS10, AS11, CT1, CT2, CT6, CT7, CT9, CT10	13/6
Chr 8: 42214175	rs3136758	G	intron	SNV	0.023	A/G	G/A	het	AS9, CT6	1/1
Chr 8: 42214272	rs1414383 16	T	intron	SNV	0.001	C/T	T/C	het	AH1	1/0
Chr 8: 42215194	nd	GC	intron	SNV	nd	nd	G/G	hom	AH2, AS4, CT4	2/1

Chr 8: 42215605	rs1166205 22	C	intron	SNV	0.02	C/G	C/G	het	AH8	1/0
Chr 8: 42216301	nd	T	intron	SNV	nd	nd	T/G	het	CT1	0/1
Chr 8: 42216341	rs5942307 4	A	intron	SNV	0.246	A/C/ T	A/C	het	AH3, AS8, AS9, CT3, CT4, CT5, CT8	3/4
Chr 8: 42216941	rs3136760	C	intron	SNV	0.002	C/T	C/T	het	CT3	0/1
Chr 8: 42218396	rs3136765	C	intron	SNV	0.023	C/T	C/T	het	AH1, AS9, CT6	2/1
Chr 8: 42218467	rs3136766	T	intron	SNV	0.023	C/T	T/C	het	AH1, AS9, CT6	2/1
Chr 8: 42218510	rs5611901 5	G	intron	SNV	nd	nd	G/A	het	AH1	1/0
Chr 8: 42219026	rs3136771	G	intron		0.023	G/T	G/T	het	AH1, AS9	2/0
Chr 8: 42219048	rs2272615	A	intron	SNV	0.271	A/G	A/G	het	AH1, AH3, AH8, AS8	4/0
							G/G	hom	CT3	0/1
Chr 8: 42219304	rs3711290 21: rs3560923 4	GC	intron	INDEL	nd	C/T	GCT/ GT	het	AH1, AH3, AS8, CT3, CT4, CT5, CT6, CT8	3/5
						- /C/T	GC/G	het	AH4	1/0
							GT/G T	hom	AS9, CT3	1/1
Chr 8: 4222071	rs1199363 8	G	intron	SNV	0.107	A/G	G/A	het	AS9, CT3	1/1
Chr 8: 42222113	rs3136781	A	intron	SNV	0.274	A/C	A/C	het	AH1, AH3, CT4	2/1
							C/C	hom	AS9, CT3	1/1
Chr 8: 42222582	nd	GT	Intron	MNV	nd	nd	CA/C A	hom	CT9	0/1
Chr 8: 42223593	nd	T	intron	SNV	nd	nd	T/G	het	AH1, AH3, AH6	3/0
							G/G	hom	AH2, CT9	1/1
Chr 8: 42223692	rs1814186 80	A	intron	SNV	0.001	A/G	A/G	het	AH1	1/0
Chr 8: 42224391	rs3136789	A	intron	SNV	0.022	A/G	A/G	het	AS9, CT6	1/1
Chr 8: 42225016	rs3136790	A	intron	SNV	0.271	A/C	A/C	het	AH1, AH3, AS8, CT4, CT6, CT8	3/3
					nd	A/C	C/C	hom	AS9, CT3	1/1
Chr 8: 42226129	rs3136793	C	intron	SNV	0.244	C/G	C/G	het	AH3, AS8, AS9, CT4, CT8	3/2
							G/G	hom	CT3	0/1
Chr 8: 42226554	rs3136794	A	intron	SNV	0.267	A/G	A/G	het	AH1, AH3, AH8, AS8, CT4, CT6, CT8	4/3
							G/G	hom	AS9, CT3	1/1
Chr 8: 42226616	rs3136795	G	intron	SNV	0.051	A/G	G/A	het	CT4, CT8	0/2
Chr 8: 42226805	rs3136797	C	ekzon Pro242 Arg	SNV Misse nse variant	0.009	C/G	C/G	het	AH1	1/0
Chr 8: 42227786	rs5581880 5	T	intron	SNV	nd	G/T	T/G	het	CT4	0/1
Chr 8: 42227787	rs3136806	T	intron	SNV	nd	G/T	T/G	het	AH3, AS8, AS9, CT3, CT4, CT8	3/3
Chr 8: 42227788	nd	T	intron	SNV	nd	nd	T/G	het	CT3, CT4, CT8	0/3

Chr 8: 42228618	rs3136811	C	intron	SNV	0.247	C/G	C/G	het	AH3, AS9, CT4	2/1
				SNV			G/G	hom	CT3	0/1
Chr 8: 42228644	rs1113705 66	A	intron	SNV	0.023	A/G	A/G	het	AH1, AS9, CT6	2/1
Chr 8: 42228941	rs4526344	G	intron	SNV	0.131	C/G	G/C	het	AH3, AS8, AS9, CT3	3/1
42229028	rs1895088 52	A	intron	SNV	0.001	A/G	A/G	het	AH1	1/0
Chr 8: 42229059	rs2307163	G	intron	INDE L	0.247	-/T	G/GT	het	AH3,CT4	1/1



Tablo.12 *POL β* geninde ilk olarak bu çalışmada tanımlanmış genetik değişimler

Gen ve kromozom lokasyonu	Rs numarası	Ref Genotipi	Genomik bölgesi	Mutasyon çeşidi	MAF	Ref SNP	Genotipi	Hom/Het	Hasta kodu	Hasta/Kontrol
<i>POL β</i>										
Chr 8: 42198528	nd	AG	intron	INDEL	nd	nd	A/A	het	AS10	1/0
Chr 8: 42199628	nd	A	intron	SNV	nd	nd	A/C	het	CT3	0/1
Chr 8: 42209452	nd	T	intron	SNV	nd	nd	T/C	het	AH4	1/0
Chr 8: 42211161	nd	T	intron	SNV	nd	nd	T/C	het	AS2	1/0
Chr 8: 42212545	nd	T	intron	INDEL	nd	nd	TG/TG	hom	AH1, AH6, AS3, AS7	4/0
Chr 8: 42215194	nd	GC	intron	SNV	nd	nd	G/G	hom	AH2, AS4, CT4	2/1
Chr 8: 42216301	nd	T	intron	SNV	nd	nd	T/G	het	CT1	0/1
Chr 8: 42222582	nd	GT	İntron	MNV	nd	nd	CA/CA	hom	CT9	0/1
Chr 8: 42223593	nd	T	intron	SNV	nd	nd	T/G	het	AH1, AH3, AH6	3/0
							G/G	hom	AH2, CT9	1/1
					nd	A/C	C/C	hom	AS9, CT3	1/1
Chr 8: 42227788	nd	T	intron	SNV	nd	nd	T/G	het	CT3, CT4, CT8	0/3

Tablo.13 Sadece Alzheimer hasta grubunda bulunan *POL β* genine ait genetik değişimler

Gen ve kromozom lokasyonu	Rs numarası	Ref Genotipi	Genomik bölgesi	Mutasyon çeşidi	MAF	Ref SNP	Genotipi	Hom/Het	Hasta kodu	Hasta/Kontrol
<i>POL β</i>										
Chr 8: 42197472	rs137925877	T	intron	SNV	0.001	T/C	T/C	het	AS9	1/0
Chr 8: 42198528	nd	AG	intron	INDEL	nd	Nd	A/A	het	AS10	1/0
Chr 8: 42208331	rs3136747	A	intron	SNV	0.023	A/G	A/G	het	AH1	1/0
Chr 8: 42208935	rs191616829	A	intron	SNV	0.001	A/G	A/G	het	AS9	1/0
Chr 8: 42208964	rs3136749	T	intron	SNV	0.023	C/T	T/C	het	AH1, AS9, CT6	2/1
Chr 8: 42209452	nd	T	intron	SNV	nd	Nd	T/C	het	AH4	1/0
Chr 8: 42211161	nd	T	intron	SNV	nd	nd	T/C	het	AS2	1/0
Chr 8: 42212545	nd	T	intron	INDEL	nd	nd	TG/TG	hom	AH1, AH6, AS3, AS7	4/0
Chr 8: 42214272	rs141438316	T	intron	SNV	0.001	C/T	T/C	het	AH1	1/0
Chr 8: 42215605	rs116620522	C	intron	SNV	0.02	C/G	C/G	het	AH8	1/0
Chr 8: 42218510	rs56119015	G	intron	SNV	nd	nd	G/A	het	AH1	1/0
Chr 8: 42219026	rs3136771	G	intron		0.023	G/T	G/T	het	AH1, AS9	2/0
Chr 8: 42219048	rs2272615	A	intron	SNV	0.271	A/G	A/G	het	AH1, AH3, AH8, AS8	4/0
Chr 8: 42219304	rs371129021: rs35609234	GC	intron	INDEL	nd	C/T	GCT/GT	het	AH1, AH3, AS8, CT3, CT4, CT5, CT6, CT8	3/5
Chr 8: 42223593	nd	T	intron	SNV	nd	nd	T/G	het	AH1, AH3, AH6	3/0
Chr 8: 42223692	rs181418680	A	intron	SNV	0.001	A/G	A/G	het	AH2, CT9	1/1
Chr 8: 42226805	rs3136797	C	ekzon Pro242Arg	SNV Missense variant	0.009	C/G	C/G	het	AH1	1/0
Chr 8: 42229028	rs189508852	A	intron	SNV	0.001	A/G	A/G	het	AH1	1/0

Tablo.14 Minör allel frekansı %1'den küçük olan polimorfizmler

Hasta kodu	MAF değeri	Kromozom lokasyonu	Rs numarası
AH1	0.001	Chr 8: 42214272	rs141438316
	0.001	Chr 8: 42223692	rs181418680
	0.009	Chr 8: 42226805	rs3136797
	0.001	Chr 8: 42229028	rs189508852
AS9	0.001	Chr 8: 42197472	rs137925877
	0.001	Chr 8: 42208935	rs191616829
CT3	0.002	Chr 8: 42216941	rs3136760

Tablo.15 Belirlenen polimorfizmler için literatür taraması sonuçları

Gen ve kromozom lokasyonu	Rs numarası	MAF	Ref SNP	Hasta kodu	Hasta/ Kontrol	Referans
<i>POL β</i>						
Chr 8: 42196441	rs3136717	0.269	C/T	AH1, AH3, CT4	2/1	51, 56, 57, 58
				AH2, AH6, AH7, AH11, AS3, AS4, AS10, CT1, CT9, CT10	7/3	
Chr 8: 42200207	rs2979895	0.242	G/A	AH3, CT4	1/1	58
				AH1, AH2, AH6, AS3, AS4, CT1, CT10	5/2	
Chr 8: 42200338	rs2953993	0.242	T/C	CT4, CT10	0/2	52, 58, 59
				AH1, AH2, AS3, AS4, CT1	4/1	
Chr 8: 42205080	rs3136739	0.021	nd	AS9, CT6	1/1	60
Chr 8: 42207234	rs2976244	0.245	A/T	AH3, CT4	1/1	61
				AH1, AH2, AH6, AH7, AH11, AS3, AS4, AS10, CT1, CT9, CT10	8/3	
Chr 8: 42208964	rs3136749	0.023	C/T	AH1, AS9, CT6	2/1	62
				AH2	1/0	
Chr 8: 42212547	rs2976238	0.243	G/T	AH1, AH3, AH4, AH6, AS2, AS3, AS4, AS6, AS7, AS8, AS9, CT2, CT4, CT5, CT8, CT9	11/5	63
				AH2, AS3, CT1, CT6, CT9	2/3	
42213256	rs2953983	0.243	G/A	AH3, AH8, AS8, AS9, CT4, CT5, CT8	4/3	58, 64, 65, 66
				AH1, AH2, AH4, AH6, AH7, AH11, AS2, AS3, AS4, AS6, AS7, AS10, AS11, CT1, CT2, CT6, CT7, CT9, CT10	13/6	
42219048	rs2272615	0.271	A/G	AH1, AH3, AH8, AS8	4/0	58, 59
				CT3	0/1	
42225016	rs3136790	0.271	A/C	AH1, AH3, AS8, CT4, CT6, CT8	3/3	66
		Nd	A/C	AS9, CT3	1/1	
42226805	rs3136797	0.009	C/G	AH1	1/0	58, 66, 67, 68, 69, 70

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Sporadik Alzheimer hastalarının post-mortem beyin dokularında, Alzheimer fare modellerinde ve hücre hatlarında, spesifik bir BER geni olmayan (knock out) fare modelleri ve hücre hatlarında yapılan biyokimyasal, moleküler, hücresel ve davranış çalışmaları sporadik AH'nın etiyolojisi ve patolojisi ile BER mekanizmasının hasarı arasındaki ilişkiyi ortaya çıkarmıştır (22-29). BER hasarının normal yaşlanma ve demans arasında geçiş dönemi olarak kabul edilen hafif kognitif bozukluk tanısı konan bireylerin post-mortem beyin dokularında da görülmesi, BER hasarının AH'nın erken başlangıçlı döneminde de gözlenebileceğini ortaya koymuştur (27). Bu sonuçlar, BER yolağında görev alan faktörlerin sporadik AH'nın erken tanısını sağlayabilmek ve risk altındaki popülasyonu belirleyebilmek için önemli genetik risk faktörleri olabileceğini göstermektedir.

Yapılan araştırmalar, BER yolağında görev alan proteinlerden biri olan *POL β*'nin ekspresyon, protein miktarı ve enzim aktivitesinin sporadik AH'da çok düşük düzeyde olduğunu ve total BER kapasitesinin *POL β*'ya bağlı olarak düştüğünü göstermiştir (71-73). Ayrıca, *POL β*'nin bir allelinin delesyonu ile oluşturulan farelerde (3xTg AD) AH fenotipine ve patofizyolojisine benzer bir hastalık gelişmiştir. Bu farelerde hücre içi Aβ plak oluşumunun arttığı, nörodejenerasyonun hızlandığı, sinaptik hasar ve kognitif bozukluk olduğu gözlenmiştir (74). Tüm bu araştırmalar sonucunda ortaya çıkan bulgular, sporadik AH'nın etiyoloji ve patolojisinde *POL β*'nin önemini vurgulamaktadır. Bu nedenle, bu çalışmada sporadik AH için genetik risk faktörü adayı olarak, BER genleri arasından *POL β* geni seçilerek, sporadik Alzheimer hastalarının post-mortem beyin dokularında hedefe yönelik yeni nesil genomik sekanslama yöntemiyle taranmıştır. Böylece, AH'da biyokimyasal, moleküler ve hücresel düzeyde incelenen *POL β* proteini (29-31), bu çalışmada genetik açıdan da incelenerek, *POL β* geninde ifade ve fonksiyon değişikliğine neden olabilecek ve/veya hastalığın etiyopatolojisinde rol oynayabilecek genetik varyantların ortaya çıkarılması amaçlanmıştır.

Bu çalışmada, *POL β* geninin kodlayan ve kodlamayan bölgelerinin hedefe yönelik yeni nesil dizilemesi sonucunda, bu çalışmada ilk kez saptanan ve daha önce bildirilmiş toplam 64 genetik değişim bulunmuştur. İncelenen örneklerden sadece bir

sporadik Alzheimer hasta örneğinde, ekzonda lokalize (12. ekzon) polimorfizm saptanmıştır. *POL β* geninin 12. ekzonunda yer alan rs3136797 polimorfizmi *POL β* proteininde pro242arg değişimine yol açmaktadır. Pro242arg değişiminin *POL β* proteininin fonksiyonu üzerine etkisi henüz bildirilmemiştir. Bu polimorfizmin, meme kanser riskini artırdığı, fakat antimitojen etki göstererek kolon kanseri riskini düşürücü bir etki gösterdiği bildirilmiştir (54,55). *POL β* geninin kodlayan bölgesinin dizilenmesiyle yapılan çalışmalarda ise rs3136797 polimorfizminin prostat kanserine ve akciğer kanseri prognozunda risk faktörü olduğu gösterilmiştir (67). Bu çalışmalar, rs3136797 polimorfizminin işlevsel bir önemi olabileceğine işaret etmektedir.

Bu çalışmada saptanan *POL β* genindeki polimorfizmlerin bir bölümü kanser ile ilişkilendirilmiştir. Rs3136717 polimorfizminin mesane kanseri riskini artırdığı, rs42212547 polimorfizminin ise prostat kanseri riskini artırdığı gösterilmiştir (51,63). Öte yandan, pankreas kanserinde sağkalım ile ilgili yapılan çalışmalarda, intronik rs2272615 ve rs2953993 polimorfizmlerinin bulunmasının sağkalım süresini iki katına çıkardığı gösterilmiştir (52). Akciğer kanserine beta karoten ve retinol etkisinin DNA tamir genotipleriyle ilişkisini araştıran bir çalışma, rs2976244 polimorfizminin bu kanser tipi için risk faktörü olmadığını ortaya koymuştur (61). İnsanlarda uzun ömürlülükle ilişkilendirilebilecek genleri bulmak adına 11 yıl boyunca izlenen Danimarka halkı ile yapılan çalışmada, *POL β* geninde bulunan rs2953983 polimorfizminin uzun yaşam için artı bir faktör olduğu ortaya koyulmuştur (64). rs3136717 polimorfizminin sistemik lupus eritematozus hastalığı ile ilişkisi olmadığı bildirilmiştir (56). İtronik rs3136717, rs2979895, rs2953993, rs2953983, rs2272615 ve ekzonik rs3136797 polimorfizmlerinin antropolojik olarak belirlenmiş insan popülasyonları arasındaki değişimi incelenmiştir. Afrikalı ve Afrikalı olmayan popülasyonlar arasında, haplotip frekanslarında göze çarpan değişiklikler bulunmuştur (58). Doku plazminojen aktivatörü dolaşımına diğer genlerin etkisini incelemek için yapılan genom çapında ilişkilendirme çalışmalarında, rs3136739 polimorfizminin bir etkisi olmadığı ortaya konmuştur (60).

POL β geninin regülatör bölgelerini de içeren yeni nesil dizileme analizi sonucunda bu çalışmada elde edilen genetik değişimlerin hiçbirisi genin 5'- ve 3'-

ucunda yer almamaktadır. *POL β* geninin promotor bölgesinde ve miRNA'ları içeren 3'-ucunda SNP saptanmaması, bu hastalarda *POL β* geninin ifadesini etkileyen bir SNP olmadığını göstermektedir. Ancak, bu çalışma ile intronik bölgede saptanan SNP'lerin gen ifadesine etkileri araştırılmalıdır.

Bu çalışmada, sadece bazı sporadik Alzheimer hastalarında bulunan ancak kromozom 8 de yerleşik chr8:42,209,670 gibi daha önce bildirilmemiş ve toplumdaki sıklığı (toplumumuzdaki sıklığı da bilinmemektedir) bilinmeyen polimorfizmler bulunmuştur (tablo.12). Aynı zamanda, sadece bazı sporadik Alzheimer hastalarında saptanan, daha önce bildirilmiş olmakla beraber maf değeri %1'in altında olan polimorfizmler saptanmıştır; örneğin, *POL β* -rs3136797 (tablo.13). Bu polimorfizmlerin anlamlı olup olmadığının araştırılması önem taşımaktadır. Alzheimer hasta grubunun çoğunluğunda belirgin bir şekilde öne çıkan bir polimorfizm olmasa da aynı kişide birden fazla *POL β* geni polimorfizminin bulunması ek (additive) bir etki yaratabilir. Bu çalışmada saptanan polimorfizmlerin, sporadik AH için bir biyobelirteç olup olamayacağını göstermek için, popülasyon çalışmaları ile örnek sayısı artırılıp, önemli olabileceği düşünülen genetik varyantların toplumdaki sıklığı araştırılarak, sporadik Alzheimer hastalarındaki sıklığı ile karşılaştırılmalıdır. Yeni bulunan genetik değişimlerin hastalığın etiopatolojisindeki rolleri işlevsel olarak araştırılmalıdır.

6. KAYNAKLAR

1. "Alzheimer's Disease." National Institute on Aging. National Institutes of Health, 1 May 2015. Web. 27 Jan. 2016.
2. Masters, Colin L., Randall Bateman, Kaj Blennow, Christopher C. Rowe, Reisa A. Sperling, and Jeffrey L. Cummings. "Alzheimer's Disease." *Nature Reviews Disease Primers* (2015): n. pag.
3. Copedde, Fabio, and Lucia Migliore. "Evidence Linking Genetics, Environment, and Epigenetics to Impaired DNA Repair in Alzheimer's Disease." *Journal of Alzheimer's Disease* (2010): 953-66.
4. Copedde, Fabio, and Lucia Migliore. "DNA Damage and Repair in Alzheimers Disease." *Current Alzheimer Research* 6.1 (2009): 36-47.
5. M.A. Lovell, S. Soman, M.A. Bradley, Oxidatively modified nucleic acids in preclinical Alzheimer's disease (PCAD) brain, *Mech. Ageing Dev.* 132 (2011) 443–448.
6. S.P. Gabbita, M.A. Lovell, W.R. Markesbery, "Increased nuclear DNA oxidation in the brain in Alzheimer's disease." *J. Neurochem.* 71 (1998) 2034–2040.
7. Lovell MA, Gabbita SP and Markesbery WR. "Increased DNA oxidation and decreased levels of repair products in Alzheimer's disease ventricular CSF." *J Neurochem* 72: 771-776 (1999).
8. Lovell MA, Xie C and Markesbery WR. "Decreased base excision repair and increased helicase activity in Alzheimer's disease brain." *Brain Res* 855: 116-23 (2000).
9. Sugo, N., Y. Aratani, Y. Nagashima, Y. Kubota, and H. Koyama. "Neonatal Lethality with Abnormal Neurogenesis in Mice Deficient in DNA Polymerase Beta." *The EMBO Journal* 19.6 (2000): 1397-404.
10. Peter S., Yang JL, Ferrarelli LK, Tian J, Tadokoro T, Kulkarni A, Weissman L, Keijzers G, Wilson DM, Mattson MP, and Bohr VA. "Modulation of DNA Base Excision Repair during Neuronal Differentiation." *Neurobiology of Aging* 34.7 (2013): 1717-727.

11. Golde, T. E., Eckman, C. B. & Younkin, S. G. "Biochemical detection of A β isoforms: implications for pathogenesis, diagnosis, and treatment of Alzheimer's disease." *Biochim. Biophys. Acta* 1502, 172–187 (2000).
12. Selkoe, D. J. Alzheimer's disease: genes, proteins, and therapy. *Physiol. Rev.* 81, 741–766 (2001).
13. Kumar-Singh, S. et al. Mean age-of-onset of familial Alzheimer disease caused by presenilin mutations correlates with both increased A β 42 and decreased A β 40. *Hum. Mutat.* 27, 686–695 (2006).
14. Gleichmann, Marc et al. "Molecular Changes in Brain Aging and Alzheimer's Disease Are Mirrored in Experimentally Silenced Cortical Neuron Networks." *Neurobiology of aging* 33.1 (2012): 205.e1–205.e18. PMC. Web. 29 Apr. 2016.
15. Knopman, D. S., S. T. Dekosky, J. L. Cummings, H. Chui, J. Corey-Bloom, N. Relkin, G. W. Small, B. Miller, and J. C. Stevens. "Practice Parameter: Diagnosis of Dementia (an Evidence-based Review): Report of the Quality Standards Subcommittee of the American Academy of Neurology." *Neurology* 56.9 (2001): 1143-153. Web.
16. Beard, William A., and Samuel H. Wilson. "Structure and Mechanism of DNA Polymerase β ." *ChemInform* 37.21 (2006): n. pag.
17. Kadioglu, Ela, Semra Sardas, Selcuk Aslan, Erdal Isik, and Ali Esat Karakaya. "Detection of Oxidative DNA Damage in Lymphocytes of Patients with Alzheimer's Disease." *Biomarkers* 9.2 (2004): 203-09. Web.
18. Gabbita, S. Prasad, Mark A. Lovell, and William R. Markesbery. "Increased Nuclear DNA Oxidation in the Brain in Alzheimer's Disease." *Journal of Neurochemistry* 71.5 (2002): 2034-040. Web.
19. Weissman, L., D.-G. Jo, M. M. Sorensen, N. C. De Souza-Pinto, W. R. Markesbery, M. P. Mattson, and V. A. Bohr. "Defective DNA Base Excision Repair in Brain from Individuals with Alzheimer's Disease and Amnestic Mild Cognitive Impairment." *Nucleic Acids Research* 35.16 (2007): 5545-555. Web.
20. Lovell, Mark A., Sony Soman, and Melissa A. Bradley. "Oxidatively Modified Nucleic Acids in Preclinical Alzheimer's Disease (PCAD) Brain."

- Mechanisms of ageing and development 132.8-9 (2011): 443–448. PMC. Web. 5 May 2016.
21. Lovell, Mark A., S. Prasad Gabbita, and William R. Markesbery. "Increased DNA Oxidation and Decreased Levels of Repair Products in Alzheimer's Disease Ventricular CSF." *Journal of Neurochemistry* 72.2 (1999): 771-76. Web.
 22. Kim, Hyun-Suk, Chunlu Guo, Eric L. THomozigotpson, Yanlin Jiang, Mark R. Kelley, Michael R. Vasko, and Suk-Hee Lee. "APE1, the DNA Base Excision Repair Protein, Regulates the Removal of Platinum Adducts in Sensory Neuronal Cultures by NER." *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 779 (2015): 96-104. Web.
 23. Yang, Jenq-Lin, Peter Sykora, David M. Wilson, Mark P. Mattson, and Vilhelm A. Bohr. "The Excitatory Neurotransmitter Glutamate Stimulates DNA Repair to Increase Neuronal Resiliency." *Mechanisms of Ageing and Development* 132.8-9 (2011): 405-11. Web.
 24. Hou, Yujun, Hyundong Song, Deborah L. Croteau, Mansour Akbari, and Vilhelm A. Bohr. "Genome Instability in Alzheimer Disease." *Mechanisms of Ageing and Development* (2016): n. pag. Web.
 25. Zeng, Jianying, Jenny Libien, Fatima Shaik, Jason Wolk, and A. Iván Hernández. "Nucleolar *PARP-1* Expression Is Decreased in Alzheimer's Disease: Consequences for Epigenetic Regulation of RDNA and Cognition." *Neural Plasticity* 2016 (2016): 1-9. Web.
 26. El-Hamoly, Tarek et al. "Activation of Poly(ADP-Ribose) Polymerase-1 Delays Wound Healing by Regulating Keratinocyte Migration and Production of Inflammatory Mediators." *Molecular Medicine* 20.1 (2014): 363–371. PMC. Web. 7 May 2016.
 27. Shao, Changxing, Shuling Xiong, Guo-Min Li, Liya Gu, Guogen Mao, William R. Markesbery, and Mark A. Lovell. "Altered 8-oxoguanine Glycosylase in Mild Cognitive Impairment and Late-stage Alzheimer's Disease Brain." *Free Radical Biology and Medicine* 45.6 (2008): 813-19. Web.

28. Weissman, L., D.-G. Jo, M. M. Sorensen, N. C. De Souza-Pinto, W. R. Markesbery, M. P. Mattson, and V. A. Bohr. "Defective DNA Base Excision Repair in Brain from Individuals with Alzheimer's Disease and Amnestic Mild Cognitive Impairment." *Nucleic Acids Research* 35.16 (2007): 5545-555. Web.
29. Sykora, P., M. Misiak, Y. Wang, S. Ghosh, G. S. Leandro, D. Liu, J. Tian, B. A. Baptiste, W.-N. Cong, B. M. Brennerman, E. Fang, K. G. Becker, R. J. Hamilton, S. Chigurupati, Y. Zhang, J. M. Egan, D. L. Croteau, D. M. Wilson, M. P. Mattson, and V. A. Bohr. "DNA Polymerase Deficiency Leads to Neurodegeneration and Exacerbates Alzheimer Disease Phenotypes." *Nucleic Acids Research* 43.2 (2014): 943-59. Web.
30. Sykora, Peter, David M. Wilson, and Vilhelm A. Bohr. "Base Excision Repair in the Mammalian Brain: Implication for Age Related Neurodegeneration." *Mechanisms of Ageing and Development* 134.10 (2013): 440-48. Web.
31. Copani, A., J. J. M. Hoozemans, F. Caraci, M. Calafiore, E. S. Van Haastert, R. Veerhuis, A. J. M. Rozemuller, E. Aronica, M. A. Sortino, and F. Nicoletti. "DNA Polymerase-beta Is Expressed Early in Neurons of Alzheimer's Disease Brain and Is Loaded into DNA Replication Forks in Neurons Challenged with Beta-Amyloid." *Journal of Neuroscience* 26.43 (2006): 10949-0957. Web.
32. Hegde, Muralidhar L., Tapas K. Hazra, and Sankar Mitra. "Early Steps in the DNA Base Excision/single-strand Interruption Repair Pathway in Mammalian Cells." *Cell Res Cell Research* 18.1 (2008): 27-47. Web.
33. Iyama, Teruaki, and David M. Wilson. "DNA Repair Mechanisms in Dividing and Non-dividing Cells." *DNA Repair* 12.8 (2013): 620-36. Web.
34. Parildar-Karpuzoğlu, Hande, Semra Doğru-Abbasoğlu, Hasmet A. Hanagasi, Berrin Karadağ, Hakan Gürvit, Murat Emre, and Müjdat Uysal. "Single Nucleotide Polymorphisms in Base-excision Repair Genes *HOGG1*, *APE1* and *XRCC1* Do Not Alter Risk of Alzheimer's Disease." *Neuroscience Letters* 442.3 (2008): 287-91. Web.

35. Coppedè, Fabio, Michelangelo Mancuso, Annalisa Lo Gerfo, Maria Laura Manca, Lucia Petrozzi, Lucia Migliore, Gabriele Siciliano, and Luigi Murri. "A Ser326Cys Polymorphism in the DNA Repair Gene *HOGG1* Is Not Associated with Sporadic Alzheimer's Disease." *Neuroscience Letters* 414.3 (2007): 282-85. Web.
36. Dorszewska, Jolanta, Bartosz Kempisty, Joanna Jaroszevska-Kolecka, Agata Różycka, Jolanta Florczak, Margarita Lianeri, Paweł P. Jagodziński, and Wojciech Kozubski. "Expression and Polymorphisms of Gene 8-Oxoguanine Glycosylase 1 and the Level of Oxidative DNA Damage in Peripheral Blood Lymphocytes of Patients with Alzheimer's Disease." *DNA and Cell Biology* 28.11 (2009): 579-88. Web.
37. Kwiatkowski, Dominik, Piotr Czarny, Piotr Galecki, Agnieszka Bachurska, Monika Talarowska, Agata Orzechowska, Kinga Bobinska, Anna Bielecka-Kowalska, Tadeusz Pietras, Janusz Szemraj, Michael Maes, and Tomasz Sliwinski. "Variants of Base Excision Repair Genes *MUTYH*, *PARP1* and *XRCC1* in Alzheimer's Disease Risk." *Neuropsychobiology* 71.3 (2015): 176-86. Web.
38. Doğru-Abbasoğlu, S., G. Aykaç-Toker, H. A. Hanagasi, H. Gürvit, M. Emre, and M. Uysal. "The Arg194Trp Polymorphism in DNA Repair Gene *XRCC1* and the Risk for Sporadic Late-onset Alzheimer's Disease." *Neurological Sciences Neurol Sci* 28.1 (2007): 31-34. Web.
39. Liu, Hsin-Ping, Wei-Yong Lin, Bor-Tsang Wu, Shu-Hsiang Liu, Wen-Fu Wang, Chon-Haw Tsai, Chun-Cheng Lee, and Fuu-Jen Tsai. "Evaluation of the Poly(ADP-ribose) Polymerase-1 Gene Variants in Alzheimer's Disease." *Journal of Clinical Laboratory Analysis J. Clin. Lab. Anal.* 24.3 (2010): 182-86. Web.
40. Braak, Heiko, and Eva Braak. "Staging of Alzheimer's Disease-related Neurofibrillary Changes." *Neurobiology of Aging* 16.3 (1995): 271-78. Web.
41. "The Clinical Dementia Rating." KNIGHTADRC. Washington University School of Medicine, n.d. Web. 07 June 2016.
42. Mirra, S. S., A. Heyman, D. Mckeel, S. M. Sumi, B. J. Crain, L. M. Brownlee, F. S. Vogel, J. P. Hughes, G. V. Belle, and L. Berg. "The

- Consortium to Establish a Registry for Alzheimer's Disease (CERAD): Part II. Standardization of the Neuropathologic Assessment of Alzheimer's Disease." *Neurology* 41.4 (1991): 479. Web.
43. Iacono, Diego et al. "Mild Cognitive Impairment and Asymptomatic Alzheimer Disease Subjects: Equivalent B-Amyloid and Tau Loads With Divergent Cognitive Outcomes." *Journal of neuropathology and experimental neurology* 73.4 (2014): 295–304. PMC. Web. 12 June 2016.
 44. Ji, Ya-Nan, Ping Zhan, Jing Wang, Li-Xin Qiu, and Li-Ke Yu. "*APE1* Asp148Glu Gene Polymorphism and Lung Cancer Risk: A Meta-analysis." *Molecular Biology Reports Mol Biol Rep* 38.7 (2010): 4537-543. Web.
 45. Chevillard, Sylvie, J. Pablo Radicella, Céline Levalois, Jérôme Lebeau, Marie-France Poupon, Stéphane Oudard, Bernard Dutrillaux, and Serge Boiteux. "Mutations in *OGG1*, a Gene Involved in the Repair of Oxidative DNA Damage, Are Found in Human Lung and Kidney Tumours." *Oncogene* 16.23 (1998): 3083-086. Web.
 46. Hung, R. J. "Genetic Polymorphisms in the Base Excision Repair Pathway and Cancer Risk: A HuGE Review." *American Journal of Epidemiology* 162.10 (2005): 925-42. Web.
 47. Qin, Qin, Jing Lu, Hongcheng Zhu, Liping Xu, Hongyan Cheng, Liangliang Zhan, Xi Yang, Chi Zhang, and Xinchen Sun. "*PARP-1* Val762Ala Polymorphism and Risk of Cancer: A Meta-Analysis Based on 39 Case-Control Studies." *PLoS ONE* 9.5 (2014): n. pag. Web.
 48. Jin, Xue, Hee Kim, Il-Kwon Lee, Kyeong-Soo Park, Hyeoung-Joon Kim, Jin-Su Choi, Sang Juhng, and Chan Choi. "*PARP-1* Val762Ala Polymorphism Is Associated with Reduced Risk of Non-Hodgkin Lymphoma in Korean Males." *BMC Medical Genetics BMC Med Genet* 11.1 (2010): 38. Web.
 49. Kasahara, Mayumi, Kayo Osawa, Kana Yoshida, Aiko Miyaishi, Yasunori Osawa, Natsuko Inoue, Akimitsu Tsutou, Yoshiki Tabuchi, Kenichi Tanaka, Masahiro Yamamoto, Etsuji Shimada, and Juro Takahashi. "Association of *MUTYH* Gln324His and *APEX1* Asp148Glu with Colorectal Cancer and Smoking in a Japanese Population." *J Exp Clin Cancer Res Journal of Experimental & Clinical Cancer Research* 27.1 (2008): 49. Web.

50. Miyaishi, Aiko, Kayo Osawa, Yasunori Osawa, Natsuko Inoue, Kana Yoshida, Mayumi Kasahara, Akimitsu Tsutou, Yoshiki Tabuchi, Kazuo Sakamoto, Noriaki Tsubota, and Juro Takahashi. "*MUTYH* Gln324His Gene Polymorphism and Genetic Susceptibility for Lung Cancer in a Japanese Population." *J Exp Clin Cancer Res Journal of Experimental & Clinical Cancer Research* 28.1 (2009): 10. Web.
51. Garcia-Closas, M. "Genetic Variation in the Nucleotide Excision Repair Pathway and Bladder Cancer Risk." *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention* 15.3 (2006): 536-42. Web.
52. Li, Donghui, Yanan Li, Li Jiao, David Z. Chang, Garth Beinart, Robert A. Wolff, Douglas B. Evans, Manal M. Hassan, and James L. Abbruzzese. "Effects of Base Excision Repair Gene Polymorphisms on Pancreatic Cancer Survival." *International Journal of Cancer Int. J. Cancer* 120.8 (2007): 1748-754. Web.
53. Guo, Z., L. Zheng, H. Dai, M. Zhou, H. Xu, and B. Shen. "Human DNA Polymerase Polymorphism, Arg137Gln, Impairs Its Polymerase Activity and Interaction with *PCNA* and the Cellular Base Excision Repair Capacity." *Nucleic Acids Research* 37.10 (2009): 3431-441. Web.
54. Sliwinski, Tomasz, Pawel Ziemba, Zbigniew Morawiec, Michal Kowalski, Marek Zadrozny, and Janusz Blasiak. "Polymorphisms of the DNA Polymerase β Gene in Breast Cancer." *Breast Cancer Res Treat Breast Cancer Research and Treatment* 103.2 (2006): 161-66. Web.
55. Moreno, V. "Polymorphisms in Genes of Nucleotide and Base Excision Repair: Risk and Prognosis of Colorectal Cancer." *Clinical Cancer Research* 12.7 (2006): 2101-108. Web.
56. Li, Yuan, Ziyan Wu, Shulan Zhang, Si Chen, Ping Li, Jing Li, Chongwei Cao, Bin Liu, Fengchun Zhang, and Yongzhe Li. "Genetic Variants of *I κ B* Kinase β (*IKBKB*) and Polymerase β (*POLB*) Were Not Associated with Systemic Lupus Erythematosus Risk in a Chinese Han Population." *PLOS ONE PLoS ONE* 10.7 (2015): n. pag. Web.
57. Wei, Hua, Ashish Kamat, Meng Chen, Hung-Lung Ke, David W. Chang, Jikai Yin, H. Barton Grossman, Colin P. Dinney, and Xifeng Wu.

- "Association of Polymorphisms in Oxidative Stress Genes with Clinical Outcomes for Bladder Cancer Treated with Bacillus Calmette-Guérin." *PLoS ONE* 7.6 (2012): n. pag. Web.
58. Yamtich, Jennifer, William C. Speed, Eva Straka, Judith R. Kidd, Joann B. Sweasy, and Kenneth K. Kidd. "Population-specific Variation in Haplotype Composition and Heterozygosity at the *POLB* Locus." *DNA Repair* 8.5 (2009): 579-84. Web.
 59. Chelala, C., A. Khan, and N. R. Lemoine. "SNPnexus: A Web Database for Functional Annotation of Newly Discovered and Public Domain Single Nucleotide Polymorphisms." *Bioinformatics* 25.5 (2008): 655-61. Web.
 60. Huang, J., J. E. Huffman, M. Yamakuchi, S. Trompet, F. W. Asselbergs, M. Sabater-Lleal, D.-A. Tregouet, W.-M. Chen, N. L. Smith, M. E. Kleber, S.-Y. Shin, D. M. Becker, W. Tang, A. Dehghan, A. D. Johnson, V. Truong, L. Folkersen, Q. Yang, T. Oudot-Mellkah, B. M. Buckley, J. H. Moore, F. M. K. Williams, H. Campbell, G. Silbernagel, V. Vitart, I. Rudan, G. H. Tofler, G. J. Navis, A. Destefano, A. F. Wright, M.-H. Chen, A. J. M. De Craen, B. B. Worrall, A. R. Rudnicka, A. Rumley, E. B. Bookman, B. M. Psaty, F. Chen, K. L. Keene, O. H. Franco, B. O. Boehm, A. G. Uitterlinden, A. M. Carter, J. W. Jukema, N. Sattar, J. C. Bis, M. A. Ikram, M. M. Sale, B. McKnight, M. Fornage, I. Ford, K. Taylor, P. E. Slagboom, W. L. McArdle, F.-C. Hsu, A. Franco-Cereceda, A. H. Goodall, L. R. Yanek, K. L. Furie, M. Cushman, A. Hofman, J. C. M. Witteman, A. R. Folsom, S. Basu, N. Matijevic, W. H. Van Gilst, J. F. Wilson, R. G. J. Westendorp, S. Kathiresan, M. P. Reilly, R. P. Tracy, O. Polasek, B. R. Winkelmann, P. J. Grant, H. L. Hillege, F. Cambien, D. J. Stott, G. D. Lowe, T. D. Spector, J. B. Meigs, W. Marz, P. Eriksson, L. C. Becker, P.-E. Morange, N. Soranzo, S. M. Williams, C. Hayward, P. Van Der Harst, A. Hamsten, C. J. Lowenstein, D. P. Strachan, and C. J. O'donnell. "Genome-Wide Association Study for Circulating Tissue Plasminogen Activator Levels and Functional Follow-Up Implicates Endothelial *STXBP5* and *STX2*." *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 34.5 (2014): 1093-101. Web.

61. Doherty, Jennifer A et al. "DNA Repair Genotype and Lung Cancer Risk in the Beta-Carotene and Retinol Efficacy Trial." *International Journal of Molecular Epidemiology and Genetics* 4.1 (2013): 11–34. Print.
62. Asimit, Jennifer L., Yun Yoo, Daryl Waggott, Lei Sun, and Shelley B. Bull. "Region-based Analysis in Genome-wide Association Study of Framingham Heart Study Blood Lipid Phenotypes." *BMC Proc BMC Proceedings* 3.Suppl 7 (2009): n. pag. Web.
63. Dobashi, Y., T. Shuin, H. Tsuruga, H. Tsuruga, S. Torigoe, and Y. Kubota. "DNA Polymerase β Gene Mutation in Human Prostate Cancer." *Cancer Research* 54.11 (1994): n. pag. Print.
64. Soerensen, Mette, Serena Dato, Qihua Tan, Mikael Thinggaard, Rabea Kleindorp, Marian Beekman, Rune Jacobsen, H. Eka D. Suchiman, Anton J.m. De Craen, Rudi G.j. Westendorp, Stefan Schreiber, Tinna Stevnsner, Vilhelm A. Bohr, P. Eline Slagboom, Almut Nebel, James W. Vaupel, Kaare Christensen, Matt Mcgue, and Lene Christiansen. "Human Longevity and Variation in GH/IGF-1/insulin Signaling, DNA Damage Signaling and Repair and Pro/antioxidant Pathway Genes: Cross Sectional and Longitudinal Studies." *Experimental Gerontology* 47.5 (2012): 379-87. Web.
65. Ness, Brian Van, Christine Ramos, Majda Haznadar, Antje Hoering, Jeff Haessler, John Crowley, Susanna Jacobus, Martin Oken, Vincent Rajkumar, Philip Greipp, Bart Barlogie, Brian Durie, Michael Katz, Gowtham Atluri, Gang Fang, Rohit Gupta, Michael Steinbach, Vipin Kumar, Richard Mushlin, David Johnson, and Gareth Morgan. "Genomic Variation in Myeloma: Design, Content, and Initial Application of the Bank On A Cure SNP Panel to Detect Associations with Progression-free Survival." *BMC Medicine BMC Med* 6.1 (2008): 26. Web.
66. Vrabec, Jeffrey T., Liqian Liu, Bingshan Li, and Suzanne M. Leal. "Sequence Variants in Host Cell Factor C1 Are Associated With Ménière's Disease." *Otology & Neurotology* 29.4 (2008): 561-66. Web.
67. Makridakis, Nick M., and Juergen K. V. Reichardt. "Translesion DNA Polymerases and Cancer." *Front. Gene. Frontiers in Genetics* 3 (2012): n. pag. Web.

68. Zhu, Yong, Aaron Hoffman, Xifeng Wu, Heping Zhang, Yawei Zhang, Derek Leaderer, and Tongzhang Zheng. "Correlating Observed Odds Ratios from Lung Cancer Case-control Studies to SNP Functional Scores Predicted by Bioinformatic Tools." *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 639.1-2 (2008): 80-88. Web.
69. An, ChangLong, Desheng Chen, and Nick M. Makridakis. "Systemic Biochemical Analysis of Somatic Missense Mutations in *FNA* Polymerase Beta Found in Prostate Cancer Reveal Alteration of Enzymatic Function." *Human mutation* 32.4 (2011): 415-423. PMC. Web. 19 June 2016.
70. Moreno, V., F. Gemignani, S. Landi, L. Gioia-Patricola, A. Chabrier, I. Blanco, S. González, E. Guino, G. Capellà, and F. Canzian. "Polymorphisms in Genes of Nucleotide and Base Excision Repair: Risk and Prognosis of Colorectal Cancer." *Clinical Cancer Research* 12.7 (2006): 2101-108. Web.
71. Swain, Umakanta, and Kalluri Subba Rao. "Age-dependent Decline of DNA Base Excision Repair Activity in Rat Cortical Neurons." *Mechanisms of Ageing and Development* 133.4 (2012): 186-94. Web.
72. Weissman, L., D.-G. Jo, M. M. Sorensen, N. C. De Souza-Pinto, W. R. Markesbery, M. P. Mattson, and V. A. Bohr. "Defective DNA Base Excision Repair in Brain from Individuals with Alzheimer's Disease and Amnesic Mild Cognitive Impairment." *Nucleic Acids Research* 35.16 (2007): 5545-555. Web.
73. Jeppesen, Dennis Kjølhed, Vilhelm A. Bohr, and Tinna Stevnsner. "DNA Repair Deficiency in Neurodegeneration." *Progress in Neurobiology* 94.2 (2011): 166-200. Web.
74. Sykora, P., M. Misiak, Y. Wang, S. Ghosh, G. S. Leandro, D. Liu, J. Tian, B. A. Baptiste, W.-N. Cong, B. M. Brennerman, E. Fang, K. G. Becker, R. J. Hamilton, S. Chigurupati, Y. Zhang, J. M. Egan, D. L. Croteau, D. M. Wilson, M. P. Mattson, and V. A. Bohr. "DNA Polymerase Deficiency Leads to Neurodegeneration and Exacerbates Alzheimer Disease Phenotypes." *Nucleic Acids Research* 43.2 (2014): 943-59. Web.

EK 1. *Pol β* geni primer dizileri

Amplikon	Başlangıç	Bitiş	Primer havuzu	İleri primer	Geri primer
AMPL716027 6555	42195157	42195182	Havuz 1	CCAGATTCTCTAC AGCAACTACGT	GTGAACCATGCCG AGAACAGGAAT
AMPL716009 0200	42195467	42195489	Havuz 2	GGTTGGCAGGTGT ACTAACACG	GAAGACCTGGAGT TTTGACCTAAGATA TTA
AMPL715870 5911	42195748	42195774	Havuz 1	GGGAAAGGATTCC AGATAAACTACTGA	AGTGTTTCAGAACC AGGGACTAGA
AMPL715575 7227	42196060	42196083	Havuz 2	CAAGTCCTGGTAC CTCCTTCAAG	CTACCCTACCCACT GGACTGT
AMPL715713 8981	42196230	42196255	Havuz 1	CTTTCTTCTTTTCCT TCCAGCCTCTT	GCTCGGGTGAACA AGAACCA
AMPL715713 8982	42196459	42196482	Havuz 2	CCCTTCCAGAAAA CAGTTCTCGT	CAGCCTCGATTCTT GCTTTTTCC
AMPL715713 8983	42196664	42196686	Havuz 1	GCCCAGTGGATATT TGGTCCAT	CCTGGTGAGATGA ACAAGGACA
AMPL715713 8984	42196968	42196992	Havuz 2	CTGATCCTGATCCT TGTCCTTGT	TGTGGACCATTGGA GTTTAGGAGTTG
AMPL715713 8985	42197112	42197134	Havuz 1	GGTCTCGCTGTGG TATGATCAT	TTTGCTTTTAAGAG CTGAGGGACTT
AMPL715713 8986	42197378	42197400	Havuz 2	GGTGTCTAGCTCTC CTTAGCCTA	GGACTGGGACTTC TTGAGTAAATGAT
AMPL715713 8987	42197508	42197533	Havuz 1	AAATCTTCATTCT TGCTGGACTT	GCATGAAACAAAAG TTTTGACCATTG AC
AMPL715713 8988	42197811	42197838	Havuz 2	GGAAAAATTCCACA TCCGATCTCATGTA	AGTCAAGAATGGC AAGATTGCCA
AMPL715713 8989	42198108	42198133	Havuz 1	GCCCTTAGCCCTCT TTTCTTACTTC	CAATCAGCTCTGA ACTGTGTGGA
AMPL715713 8990	42198247	42198269	Havuz 2	TATCCCAAGTCAG CTCCCTTCT	GTAGGGAATCACC TGCTTTTCCA
AMPL715713 8991	42198563	42198588	Havuz 1	TTGCTTAACGGGTA TGGTATGAGTG	CACATGACTGATGA TGAATCTGAAAAG AC
AMPL715713 8992	42198872	42198894	Havuz 2	ACTGTGTTTGCCT GCTCCTTTA	TTCCCACTGCAGTT CAGCATAA
AMPL715713 8993	42199162	42199184	Havuz 1	TGTGGAGGTGGGC AAGAATTAC	TGGAAGATAAAGA TGCTTACAAGAAA CAGT
AMPL715713 8994	42199458	42199488	Havuz 2	CCTTCATCATGTCT GAAGTTATGCTATT CT	CGATAATACAATGT AGAAAGCATTGAT GGT
AMPL715713 8995	42199658	42199680	Havuz 1	CCTCCATCCAGGT CACCAAAAA	ACACACCCAAATA GAGGATGATAGTTC ATA
AMPL715713 8997	42199989	42200021	Havuz 2	TATATGAACTATCA TCCTCTATTTGGGT GTGT	GGACTTTGTATAA GTTGTTAAGAATAA GGCCTA
AMPL715713 9302	42200075	42200107	Havuz 1	TACCATCTTGTCAT CTTTAAGTTTCATT TGGT	CACACGCAGCCCT TGGATA
AMPL715713 9303	42201039	42201070	Havuz 2	AAAAAGTAACATA GGTATCCATAAGC AGATC	CTGGCCTACGTCTA ACTTTTAAAGTATC T
AMPL715713 9304	42201702	42201726	Havuz 1	CTGTAATCCTAGCT GGTTCACACC	CTGGCCTAATTTTC TACCTCCATATGG

AMPL715713 9003	42202018	42202039	Havuz 2	GGTGGTCTGTCAG CTCATCTG	CAAATATCTATGCT TATGCTTTCACCAA GA
AMPL715713 5855	42202169	42202199	Havuz 1	GGTGAAACATCAT CTCCACTAAAATA CAAG	CATCAAGGCCTTAA TTTTTCTTAAACTG GA
AMPL715713 9005	42202500	42202526	Havuz 2	CACACAAAATAAA GAGTGGAGCTGAA	GTGCCACTTGGTC ACTCTTCTTAA
AMPL715713 9006	42202795	42202823	Havuz 1	ACATGTAATCAG TTGAATTTCAACTT G	CAAAATAATCTGTT CCCAAGCATTTTCA G
AMPL715713 9007	42203048	42203076	Havuz 2	GGGTCACATGCCT CGTTAATTTGTAAT A	TGGTCCTTAAATTT AAGGAACCTTGAA TCA
AMPL715713 9008	42203321	42203354	Havuz 1	CTATCTATTGACAA TCAGATTGTTGTCT CATCT	GGCTCAAGGCAGT GGATCAC
AMPL715713 9009	42203411	42203442	Havuz 2	TTTGTGAAAGATG TCAAATTATCATGG CTTT	AGGAGGTGATAAC TATCAGGACCTG
AMPL715713 9010	42203735	42203756	Havuz 1	CAGCCTGAGATGC CTTTTGAG	CTGCAGCAGTAAG CTGTGATTATG
AMPL715713 9011	42203855	42203879	Havuz 2	TAACCTTCTCAGG AGATGAGCCAT	GCAGTTATGGTCCA GTCATGGT
AMPL715713 5699	42204046	42204073	Havuz 1	GCATGCTCCATCAC ACTCAGATATTTT	GGTAATGTTATGAC TCTGAAGGGCAA
AMPL715713 9013	42204451	42204480	Havuz 2	ACTTTAATTCTGAG TTTCTGTCTTGGTG A	AATTACTGAGGAGT AATTCCAGAAATG G
AMPL715713 9014	42204716	42204748	Havuz 1	TCCTTTTCACAATT ATTGAAGAATCAC AGAGT	CTGGAAATTTTCAGA TTTCTAGAATTACT GAGAA
AMPL715713 9015	42204987	42205020	Havuz 2	TCCTTCTTAGTAAC GGAAGTAATAGAT TCTTCT	AGATAGAAATGAA CAAAAGATTTAGG AAGCAGA
AMPL715713 9016	42205228	42205250	Havuz 1	ATGAGCCTGAGCA GTTTCCTTT	TCTTTCTCCACACT GCATGTATTTGAT
AMPL715713 9017	42205504	42205532	Havuz 2	ACCAAAGTTGCAA ATTAAACAAGACA CT	AGAGCAGAGATCC TGCTTTTTCATTTT
AMPL715713 9018	42205743	42205768	Havuz 1	TTTTTGATCACCTG TATGCCAGTCA	CCCTAGAGTTTCTC ATTCACCATGT
AMPL715713 9019	42206030	42206056	Havuz 2	CCCTGAGAACTTA GGCATATTCTTGG	CCAGTGAAAATAA ATTCTCCCGAAGAC A
AMPL715713 9020	42206326	42206353	Havuz 1	TTCTCAGAGTTTCC CTTTTGTCATTCA	AGTTGCTAAAAAC TCATCAATCTTTTC AGC
AMPL715713 9021	42206514	42206544	Havuz 2	ATTTCTAATTTTCC ATGTAGCCTGGAG TAG	AACGATCTTTTCA CAAAGTTTATAATC TCT
AMPL715713 5716	42207201	42207230	Havuz 1	CGGCCATCTTTTAG AATTTCTATGTTTA C	CCTGGGTGACCCA CACAAAATT
AMPL715713 9022	42207351	42207381	Havuz 2	ACTCTGTTATTAC CTATTACTCCTTAG GT	AACTAACTGACGA TTGTGTCTGCTTAA
AMPL715713 9023	42207565	42207587	Havuz 1	CTCGAGTTAGTGG CATTGGGTA	ATGCTCAGAGAAA CAAAAGAGGCCAA

AMPL715713 9024	42207855	42207880	Havuz 2	CCATTTCTCCGTG TGCATCTATT	CCATAAAGATGAG AGCACTAAAGCCT T
AMPL715713 9025	42208156	42208186	Havuz 1	TTTTTGACACTGG CTGAAGTAAAGAT TAAC	GTAATAAGGCAGG AGAGTCACCTTAC
AMPL715713 9026	42208413	42208442	Havuz 2	GTGTCTTATTCTGC TATCTAGGCTAGAG T	TCAACTTTCAGTTC TCTTGCCTAGAAA A
AMPL715713 4131	42208677	42208702	Havuz 1	ACCACAAGGTGTT TTAGAGAGCATC	CAGCATAGAAGAA ACAGAACTGAACT C
AMPL715713 9027	42208763	42208787	Havuz 2	GCAGAGCCAGATT TGAACCCATAT	GAAGGACACTGAA ACCTAGAAAGATG AA
AMPL715713 9028	42209064	42209086	Havuz 1	GCACCAGCTAGAT TTGTGACCT	TTCAAGAGAAGAG AAAAACTAGGATG CAT
AMPL715713 9029	42209377	42209399	Havuz 2	CATAGCACCTCATA CCGTCCT	GGCCATTATGTGTC AGATACTTTCCTG
AMPL715713 9030	42209679	42209706	Havuz 1	CCCACTTACATTCT TATCTCTGCTACA	TCAACATTGGGTG AAACTTGGGA
AMPL715713 9031	42209953	42209981	Havuz 2	GCAGCTCTTCTTAC TATTAAGACATGGT	GCCCTGGTTCTTGG TCTTCTTA
AMPL715713 9032	42210255	42210288	Havuz 1	CCATCATAAACATT TTAGGTTGTAACT TAAC	AGGTTGGTTCTTGG TCTTCTTCTTTT
AMPL715713 9305	42211021	42211054	Havuz 2	GGTTATTAAAGGA ATTTTTGCTTTCAA AGAAAA	TAAGGTCATCCCAC TCTAATAAAGTAGT GG
AMPL715713 9038	42211244	42211266	Havuz 1	TTTTGGAGACTGA CCTGGCTTT	AATACCTCCAAGA AACCACAGATTC
AMPL715713 9039	42211547	42211576	Havuz 2	GACAGCTTATATGA GAGAAATTGATTGG CT	GCATGCTTCAAAA GCAATTCCTACAAG
AMPL715713 9040	42211846	42211873	Havuz 1	CTCCAGAGGGAAT GTGTATATTTGTGG	TTCTGGGCAGACA GAGCAAGAC
AMPL715713 9041	42212037	42212070	Havuz 2	CAGGTACAGTAAT AATTTTCCTTTCAA TGGAAT	CATTAGCACTGAGT AGTAGATTTGTGCA
AMPL715713 5868	42212354	42212374	Havuz 1	CCGGCTCAACAGG ATTTTGA	AGAATCACACCAA ATTTTACTGACTAT AGTGG
AMPL715713 9043	42212506	42212539	Havuz 2	AAATTAAACCACT ATAGTCAGTAAAA TTTGGTG	GAGCTAGATAAAA GTGACTCTTCAGG G
AMPL715713 5869	42212850	42212871	Havuz 1	CTGGCCCTGAAGA GTCACCTT	CAAGTGTCAAAAAG AAAATCTGCCATCT TA
AMPL715713 9046	42213047	42213076	Havuz 2	TGAAGATAAATTG AACCATCATCAGC GAA	CCCTGCTAAAAGTC AAAAGAATAAGGG A
AMPL715713 9047	42213257	42213287	Havuz 1	TGCTTTCACTTTTG CTTTCTAGTTTACT TG	GTTCCAGACTATA TCTGGCACA
AMPL715713 9048	42213552	42213582	Havuz 2	CTACTAGGCATGTT TCTATATCAGCATC AA	CACCTCCATTTACT ACAGAAATGCCA
AMPL715713 9049	42213782	42213804	Havuz 1	TGAGAGACCTGGA TGGTATGGT	GGGTCTTTCTGAG ATAACAAAAATGTC CT
AMPL715713 9050	42214025	42214048	Havuz 2	GCACAGTGTAGGA ACCATCACTA	AGTTTACCGCTCTT ATATCCTGCAAAAT TA

AMPL715713 9051	42214260	42214288	Havuz 1	GTTGTCTGAGTTTA TGTTGCAGGATAG T	CAGATCATTTCTCAC AAATCAAGGCTAG
AMPL715713 5758	42214528	42214552	Havuz 2	CCCAATTTTGCTGT TGTCATCTCA	ACCAAGTGACACT CTCAATTCTAATCA AAG
AMPL715713 9052	42214724	42214753	Havuz 1	GAGATGTTACAAA TGCAAGTAAGATG TGT	GCAAAAATAACCC AAGATTAGGAAGTA TGT
AMPL715713 9053	42214881	42214903	Havuz 2	TTGCTACAGTCTGT GGCAGTTT	GGAAAAAGAAAGG TAAATTAACAAAAC TACCCA
AMPL715713 9054	42215187	42215211	Havuz 1	CCTTTTGGCTGGAT GATAGTGAAG	TCTTATAGAAAAC TGGGCAGTTGGG
AMPL715713 5871	42215535	42215557	Havuz 2	GCCCAACTGCCCA AGTTTTCTA	GCGCCTGGCCAAA AGTTAATATTTT
AMPL715713 6570	42216086	42216119	Havuz 1	TGTTAGAGTAGATA GAGTAGATACCTG AACTGA	CTCCAACCTAGAT TCTTACAGCAGC
AMPL715713 9307	42216151	42216174	Havuz 2	AGTAGGTGATGGC CTATCAGGAA	GCTGTGCTTCCAAA TCTACATTTTGAAA A
AMPL715713 9309	42216430	42216458	Havuz 1	CAAATAAGAATCT CCTTAGGTGGGAA CT	ATGTAACTTTATGA AAGAAAGGGAGAG AAG
AMPL715713 9310	42216736	42216769	Havuz 2	AGTATACCATCTTT ATTTCTTTCTCTC TCCCT	CCCAGGCAACATA GTAAAACCATG
AMPL715713 9311	42217058	42217086	Havuz 1	TTTTTGGTAGGGA CATGGTTTTACTAT G	GCGGACTGGATAA ACAAATGAAGTAT G
AMPL715713 9313	42217191	42217218	Havuz 2	TTTTTGTAGCTGTG TAACATTCAGTTG	AAAAAGAAGACTA GACTGAATGTGTAC TG
AMPL715713 9064	42217427	42217451	Havuz 1	GTTTCCATGGATGT CCAGTACACA	CCAAATATTTAAAT ATAAAGAAGGCCA GGCC
AMPL715713 9314	42217770	42217792	Havuz 2	CGGCCTGGCCTTC TTTATATTT	CATATGTAAAAGCA TCCACTATAGTGCC T
AMPL715713 9067	42217928	42217957	Havuz 1	GAAAGGGAGGAG ATAGATTGGATTCT TTT	GAGAGATCCAGGC ACTCTCTTTT
AMPL715713 9068	42218229	42218259	Havuz 2	TTGAGTTCAACCAT AAGAATTGAAATG AGT	GGCATTAGATATAC ATTGCATACAACGA GT
AMPL715713 9070	42218566	42218595	Havuz 1	TCGTTGTATGCAAT GTATATCTAATGCC A	GACAGAAGACACA TATGAGATTGTCCA T
AMPL715713 9071	42218745	42218767	Havuz 2	GCTTGGTTCCATTT GCCCAATT	CAGCAACTCATGG AAGAATAATAGGTA TCC
AMPL715713 9072	42218997	42219026	Havuz 1	TCTGAAGAGCTTT GTACTGATTGAATT CT	TGTTTCACCTTCCA AAGGCATATATTCT AA
AMPL715713 9073	42219219	42219248	Havuz 2	CTTCTATTAGAAAA CCTGTGAAGGCAA AA	CGGCCATCTCTATG TTTTCTAATGT
AMPL715713 9315	42219840	42219871	Havuz 1	GAAAACTCATGTT AAAAATGTTTTCTT CCCG	TTAGAGACACAGT CTTGCTATATTGCA C
AMPL715713 9316	42219991	42220017	Havuz 2	CCATGATTGTACCT GTGAATAGCACA	CCCTGCTATTATTT TCTTTAAAGTCTCA TG

AMPL715713 9317	42220305	42220336	Havuz 1	GAATTACAGTCAC CAAATAGAGTATC CATGA	GGCATCCTGCTGAT TATTTTCTTTCTTT T
AMPL715713 6859	42220648	42220678	Havuz 2	AAAAAGAAAGAA AAATAATCAGCAG GATGC	CCATGCCCAGGCCT AATTAACCT
AMPL715713 9077	42220729	42220757	Havuz 1	TTCTCCACTTGTA ATAACACGTGTCAT	AGCAGATTATGCCT AATTAACCCATTCT TT
AMPL715713 9322	42220818	42220839	Havuz 2	CAGCGGATTACAA GGTCAGGT	AAAACTTACTGT GTGTCAAAGTCATT ACTG
AMPL715713 9326	42221391	42221419	Havuz 1	TGATTCTGTATAAA CACCAACAGGAAG G	ATCTTAATTCTAGG CTGGGCACG
AMPL715713 9327	42221397	42221421	Havuz 2	TGTATAAACACCA ACAGGAAGGCA	AAAAAGGAACATA GAATCTTAATTCTA GGCT
AMPL715713 9084	42222043	42222066	Havuz 1	GGGCCTCTTCTTTC TTAAGGTGA	ACTAATTTTAGCAC ATCCACTCTCCAAA
AMPL715713 9085	42222128	42222152	Havuz 2	CCGGGTGATATGA CTGAAAGGAAA	CCACTGTGCCTACT ATTTTAACCATTTT T
AMPL715713 9086	42222314	42222341	Havuz 1	GGGTAATAGGGAG TTCCTGTTTAAATG	TTGTATGTGTGTGG GTTAAATATACACA
AMPL715713 9087	42222617	42222648	Havuz 2	AAAAATAGATGGC CAATAGATGGTAA ATTGT	AAAGTTCGTTTGG AAGCATTGTAAAG T
AMPL715713 9088	42222712	42222739	Havuz 1	TTAGTGGGCTGTG AAAGTGATTTTCT	CCAGACGTAGCAA GATACTTTTCTACT G
AMPL715713 9089	42223018	42223048	Havuz 2	TCCTAAAAACAGT ATCTGCTAGACAA GTTG	GCCTGGCCCTTTTA CCTTGTAAT
AMPL715713 9090	42223286	42223313	Havuz 1	AAACCAACAGAAAG CTATAGGAATCCA G	CCAGCCCACTAGAT TATACTTTTTCCTTT T
AMPL715713 9092	42223636	42223665	Havuz 2	GAAAAAGTATAAT CTAGTGGGCTGGA TGT	CTGAGATGGATTCC TATGTCGCAA
AMPL715713 9093	42223939	42223969	Havuz 1	AGATTCAGGTGAC AATAAGAACAAGA AACT	ACTCAGGCCTTTTA GAAGTAAATCCAC
AMPL715713 9094	42224232	42224259	Havuz 2	GCTCCATTACTAAT ACTCTGTATGGCA	TGCTCACTCTCCTC ATTCTGTCT
AMPL715713 9095	42224544	42224570	Havuz 1	GAAGGGATAGAAA GAGAGAGGATGGT	CCCTAAGTCTCATG TTCTCAATGAGG
AMPL715713 9096	42224846	42224872	Havuz 2	TGCAGGAGGCAGT ATTAAATAGTGTG	ATGGAATGAGAAT GGTTTATTTCACTA CCT
AMPL715713 9097	42225029	42225057	Havuz 1	GCTTCTAAAAGGA AATTGGCTGCAAA AT	CAAAATACTGAAAT CTGAATGGCACTC A
AMPL715713 9098	42225327	42225353	Havuz 2	AGTTTCCTCTGCAT TCAACTATTGGT	TCATGGCTTTGTTC CTTTCCTCAA
AMPL715713 9099	42225600	42225624	Havuz 1	GCACTTCAGAAAA AGTGCAGGAAA	CCTCAAGAGTGGT CAAGTTAACACA
AMPL715713 9100	42225904	42225934	Havuz 2	TTTCTATTTTGCTG AGTGAAAAAGTAT GGC	CTAGAAGGGAGAA AGACACGGAAAAAT AAGA
AMPL715713 9101	42226171	42226199	Havuz 1	AATTACCTGTGAA GGAAGAAAGTGAT CC	ACAGACATCAAAA TAAACAGAAGAGA GCAA

AMPL715713 9102	42226431	42226460	Havuz 2	TTTGTTTTCTTCTT CCTGCATAATCATC G	AGCTCTAGAATTCT GAGCACTTTTAACT T
AMPL715713 9103	42226621	42226650	Havuz 1	ATAGAAAGGTAGG GATAGTGTATTGCT CA	AAGAACATATGGCT CTTGGGAGTAAAA A
AMPL715713 9104	42226916	42226946	Havuz 2	CCTGTTTGTATCTT GGAGTTCACATTC ATA	CAAAATACCAAAG ATAAGCCTAAGTGG TCT
AMPL715713 9105	42227217	42227243	Havuz 1	GCAGTCTACCTCAT GATAGTCTTCTC	GAAGGTTTGCTAA ACCAAAGTATCTTT GAA
AMPL715713 9106	42227519	42227549	Havuz 2	GTGTGTATTAGAGA TCATCTCTCATCTG GA	GTGGCACTGAAAA CAATGATACTTGAG
AMPL715713 9107	42227799	42227828	Havuz 1	TTTTGCTGTTGTTT AATGTACCTCTAG GA	GCAAGCCAAAGGA ATTAGAATCTGAAT TTA
AMPL715713 9108	42228103	42228125	Havuz 2	TCAGTGTGCATAC CAGCAACAT	CAACTCGGTTCTTG GACTAGCA
AMPL715713 5895	42228414	42228441	Havuz 1	CCATGGTTGGATA AGCTTGTCTAGAT	AAAAAGACACTGA CTACCTCTATCCT
AMPL715713 9333	42228619	42228640	Havuz 2	CTCCTGGGAGAGG ATAGAGGT	AAAAAGAAAATGG TAACCAAGTCACTA AAAA
AMPL715713 9335	42228950	42228981	Havuz 1	TTTTTAGTGACTTG GTTACCATTTTCTT TTT	GGATACAGGCCTCA TTCGCTC
AMPL715713 9113	42229133	42229155	Havuz 2	CATCCAGTGGAAA TACCGGGAA	GGTAATGTGGTTTA TAGCATAGAGCAG AAT

EK 5

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	Tuğçe	Soyadı	İlhan
Doğum Yeri	Ankara	Doğum Tarihi	18/12/1992
Uyruğu	T.C.	TC Kimlik No	12673096914
E-mail	tuce.ilhan@gmail.com	Tel	+905462404240

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mezuniyet Yılı
Doktora/Uzmanlık	-	-
Yüksek Lisans	Acıbadem Üniversitesi	2016
Lisans	İstanbul Bilgi Üniversitesi	2014
Lise	Özel Büyük Kolej	2010

İş Deneyimi (Sondan geçmişe doğru sıralayın)

Görevi	Kurum	Süre (Yıl - Yıl)
1. Araştırma asistanı	Acıbadem Üniversitesi	2015-2016

Yabancı Dilleri	Okuduğunu Anlama*	Konuşma*	Yazma*
İngilizce	Çok iyi	Çok iyi	Çok iyi
Almanca	Zayıf	Zayıf	Zayıf
Fransızca	Zayıf	Zayıf	Zayıf

* Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin

Yabancı Dil Sınav Notu #								
KPDS	YDS	IELTS	TOEFL IBT	TOEFL PBT	TOEFL CBT	FCE	CAE	CPE
	85							

Başarılmış birden fazla sınav varsa, tüm sonuçlar yazılmalıdır

KPDS: Kamu Personeli Yabancı Dil Sınavı; YDS: Yabancı Dil Sınavı; IELTS: International English Language Testing System; TOEFL IBT: Test of English as a Foreign Language-Internet-Based Test TOEFL PBT: Test of English as a Foreign Language-Paper-Based Test; TOEFL CBT: Test of English as a Foreign Language-Computer-Based Test; FCE: First Certificate in English; CAE: Certificate in Advanced English; CPE: Certificate of Proficiency in English

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
ALES Puanı	75,17641	76,10663	68,27375
(Diğer) Puanı			

Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma becerisi
Microsoft Office	Çok iyi
Matlab	Orta
Autocad	Zayıf

*Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin

Uluslararası ve Ulusal Yayınları/Bildirileri/Sertifikaları/Ödülleri/Diğer

* Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin

TUĞÇE İLHAN

**ACIBADEM ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

YÜKSEK LİSANS

İSTANBUL-2016