

ALZHEİMER HASTALIĞINDA İPLİKSİ PROTEİNLER: MOLEKÜLER BİYOLOJİDE YENİ GÖRÜŞLER (*)

William E. Klunk ve Donald J. Abraham.
Pittsburg Üniv. Psikiyatri ve Tıbbi Kimya Bölümleri

Özet :

Alzheimer hastalarında (AH) tesbit edilen nörofibriler düğümler (NFD), nörit plakları (NP) ve serebrovasküler amiloidle ilgili son çalışmalar bu hastalığın moleküler biyolojisini anlamada yeni ufuklar açmıştır. Eşleşmiş helezoni lifler (EHL) başta gelen hücre içi ipliksi birikimlerdir. Bunlar normal hücre içi proteinlerden farklı görünmekle birlikte, 'tau' adı verilen bir mikrotubulus proteininin önemli bir komponentini de içerirler. Amiloid lifler AH'da hücre dışı ipliksi birikintileri meydana getirirler. Amiloid lifler, 43 amino asitten oluşan küçük bir proteinden meydana gelmiştir. Bazı araştırmacılar, eşleşmiş helezoni liflerin (EHL) bu proteinden oluştuğunu öne sürmüşlerse de, bu konu halen tartışmalıdır. Moleküler genetik çalışmalarda "beta-amiloid protein"nin dizisine sahip daha büyük bir proteini kodlayan bir genin varlığından söz edilmiştir. İlginç olan, bu gen, familyal AH geninin de yerleşim yeri olan 21 kromozom üzerinde yerleşmiştir, fakat bu iki gen birbirinden farklıdır. Bu anormal birikintilerin kökeni ile ilgili birkaç varsayım mevcuttur ve bunlar nörol kökenli olduğu varsayımından, merkezi sinir sistemi dışında meydana gelip kan yoluyla nakleldikleri varsayımına kadar uzanmaktadır. Bu son ilerlemelerin sonuçları oldukça önemlidir, çünkü AH ile ilgili kesin tanı olanaklarını ve bu ipliksi proteinlerin sentez, depolanma veya ortadan kaldırılmasınınin tedavi amacıyla düzenlenmesini (müdahalesini) gündeme getirmektedir.

Giriş :

Nörofibriler düğümler (NFD), nörit plakları (NP) ve serebrovasküler amiloidin varlığı, ilk defa Alzheimer tarafından 1907'de tanımlanmıştır. Bu yapılar, demansa neden olan bu hastalığın tanınmasında histopatolojik işaretler olarak uzun süredir bilinde ve bu oluşumların yapısı ve kaynağı ile ilgili sorular halen bilimsel tartışmalara neden olmaktadır. Beyinde depolanmalarına neden olan, eritilmez oluşları kimyasal yapılarının aydınlatılmasını zorlaştırmıştır. Bu proteinlerin eritilebilmeleri ve saflaştırılmaları ile ilgili son gelişmeler, moleküler biyolojide rutin olarak kullanılan birçok farklı tekniğin burada da uygulanabilmesini sağlamıştır. Bu çalışmalardan elde edilen bilgiler, NFD, NP ve serebrovasküler amiloidleri meydana getiren proteinlerin anlaşılmasındaki ufukmuzu ileri dereceye genişletmiştir.

Gelecekte, hasta yaşarken yapılacak tany ve tedaviye yönelik teknikler, bu ipliksi proteinlere yapılacak müdahalelere dayandırılacaktır. Bu nedenle, AH'nin tanısı ve tedavisiyle uğraşan klinisyenlerin NFD, NP ve serebrovasküler amiloidle ilgili temel fizyopatolojiden haberdar olmaları önemlidir. Bu gözden geçirme yazısında, kısaca AH'nin nöropatolojisini tartışıp, normal hücre yapısını oluşturan proteinlerle ilgili bazı temel bilgiler vereceğiz. Tartışmanın temelini,

NFD NP ve EHL ve amiloid liflerde bulunan anormal ipliksi proteinlerin doğası ile ilgili son buluşlar oluşturacaktır.

Bu gözden geçirme yazısında tartışılan çalışmaların çoğunda kullanılan moleküler genetik teknikler, bir çok psikiyatristin uzmanlık alanının dışında olduğundan bu tekniklerle ilgili kısa bir açıklamaya da yer verdik. Bu bölümün, okuyucunun bu çalışmaları anlamasına ve takdir etmesine yardımcı olacağını umuyoruz.

Nöropatoloji:

Günümüzde, AH'nin tanısındaki tek kesin test beyin histolojik muayenesidir. Bu korteks biopsisiyle de yapılır, fakat bu tipik olarak ancak ölümünden sonra yapılmaktadır. Işık mikroskopuyla incelendiğinde, AH'na değişik beyin bölgelerinde çok sayıda NFD ve NP'a rastlanmaktadır. NFD'ler çok sayıda eşleşmiş helezoni lif (EHL) ile dolu sinir hücreci cisimleridir. EHL'in ultrastrüktürel ayrıntıları sadece elektron mikroskopla görülebilir. NP ise merkezdeki amiloid protini çevreyene dejenerer akson ve dendrit topluluklarından oluşmaktadır. Elektron mikroskop ile NP merkezinin amiloid liflerinden oluştuğu görülmektedir. Plaklar ve düğümler entellektüel açıdan normal insanların yaşlılık yıllarında da görülebilir fakat sayıları AH'na görülenden çok daha azdır. Çok sayıda amiloid plakları AH'na ve yaşlı Down Sendromlu hastalara özgüdür, öte yandan NFD Guam-parkinsonizm demansı kompleksi, dementia pugilistica (8) ve postansafalitik parkinsonizm gibi diğer hastalıklarda da saptanmıştır. AH'da NFD ve NP birincil olarak serebral kortekste (özellikle asosiyasyon alanları), hippokampusta, amigdala, nukleus bazalis, locus coeruleus ve dorsalarafede ortaya çıkmasına karşın, 74 yaşından büyük olan AH'nin % 30'unda hiç neokortikal NFD'e rastlanmamıştır. Bu alanlar arasında özgül nörotransmitter sistemleri ile ilişkili özgül nöronlar görev yapmaktadır. Örneğin, nukleus bazalisten kortekste uzanan kolinerjik nöronlar seçici bir duyarlılık gösterirler, bu da serebral korteksteki kolın asetil transferazın % 50-90 kaybını açıklamaktadır.

Nedensel mi, İlişkili mi, Epifenomenal mi?

NFD, NP veya her ikisinin oluşumu AH'daki klinik bozuklukların ve patolojinin oluşumuna direkt olarak etkiliyor mu? Familyal AH'da (Şekle bakınız) özgül kromozom değişikliklerinin olması, böyle açık bir etyolojinin mümkün olduğunu gösterebilir. AH'da bu yapıların değişmez varlığı ve NFD ve NP'nin hücre ölümüyle ilişkili olması, herşeye rağmen etyolojiye ait soruları yanıtlamamaktadır. Drachman bu sorunun temelinde NFD ve NP'nin "kendini başlarına büyük bir ilgi kaynağı" mı, yoksa "harap olan veya ölen nöronların artıkları olarak daha az önemli mi oldukları" ikileminin yattığını ortaya koymuştur. Mann, Hardy ve ark. AH'da kortikal piramidal hücrelerdeki patolojik değişikliklerin NFD birikimiyle ilişkili olduğunu belirtmiştir. Bu çalışmacılar, NP'e etrafındaki dendritlerin nörofibriler dejenerasyonu sonucunda bu değişikliklerin ortaya çıktığını ve NP oluşumunun da NFD oluşumuna neden olduğunu öne sürmektedir. Bu modele göre, NP oluşumuna kan-beyin engelindeki defektler neden olmakta ve NP öncelikle hippokampus ve amigdala gibi kortikal ve allokortikal alanlarda, ikincil olarak da bu alanlara projekte olan subkortikal çekirdeklerde oluşmaktadır. Bu durum, AH'da ol-

duğu gibi farklı hücre tiplerine zarar vermektedir.

Mann'ın varsayımı, NFD oluşumunun non spesifik özelliğiyle, yani birçok demans oluşturan hastalıkta görülebilmesiyle tutarlılık göstermektedir. Bu durum, AH'dan sorumlu özgül hücresel değişikliğin NFD olduğu yolundaki görüşleri çürütmektedir. Drachman'a göre dementia pugilisticadaki kafa travması gibi non-spesifik bir olay ile NFD oluşumunun başlatılması da NFD'nin birincil hastalık sürecinde "zararsız epifenomen" olarak değerlendirilmesini desteklemektedir.

NP yapısındaki beta-amiloid proteinin AH'na neden olduğu yolunda daha güçlü varsayımlar öne sürülmektedir. Bu iddialar, NP proteinini kodlayan gen ile familial AH geninin 21 kromozomda aynı bölgede yerleşmiş olmasına dayandırılmaktadır. Son çalışmalarda ise bu genierin daha önce düşünüldüğü kadar yakından bağlantılı olmadığı ortaya koymuştur. Bu veriler NP proteinlerinin metabolizmasındaki bozuklukların familial AH'da birincil etyolojiyi oluşturmadığını göstermektedir. Bu genin non-familial AH ile ilişkisi de belirsizdir.

Korelasyon sorunu daha nettir. NFD ve NP'in tesbit edilen bir demans olmadığında (normal yaşlanma ve non-demansiyel yaşlı Down Sendromu) da mevcut olmasına karşın, birçok çalışma serebral kortekste ki NFD ve NP'in yoğunluklarının AH'in temel klinik özellikleri, demansın ağırlığı, temel nörotransmitter sistemlerindeki eksiklikler ve klinik olarak teşhis edilen AH'da büyük kortikal nöron sayısının azalması gibi bozukluklarla ilişkili olduğunu ortaya koymuştur.

Bu ilişkiden söz edilse de, NFD ve NP'in hala AH'in birincil fizyopatolojisi ile ilgili epifenomenler olabileceği düşünülmelidir. Nörotransmitter eksiklikleri, virüsler, inmün bozukluklar ve alüminyum gibi birçok farklı etyolojiler söz konusu edilmiştir. Selkoe'nun belirttiği gibi, NFD ve NP ile ilgili çalışmalar AH'da nöronal disfonksiyon mekanizmalarının nedensellikten daha önemli olduğuna işaret etmektedir.

Selkoe, bu iplikli proteinlerin anlaşılmasının, NFD ve NP'in oluşumundan önceki temel olaylarla ilgili önemli ipuçları vereceğini söylemiştir. Drachman, iplikli proteinler epifenomenler olsa da, AH'da esas patoloji bölgelerini ortaya koyarak etyolojiye ait yararlı ipuçları ortaya koyacaktır.

Özet olarak, NFD ve NP'in AH'nın nedeni olup olmadıklarına ait direkt, kesin bir kanıt yoktur. Şu anda sahip olduğumuz kanıt, indirekt olduğundan her iki yönde de yorumlanabilir. NFD ve NP sayısı ile AH'nın klinik özellikleri arasındaki ilişki, nedensellik sorununu aşmakta ve bu işaretleyicilerin etyolojideki rolüne ait kanıt eksikliği, bunların AH'in histopatolojik teşhisindeki yararlılıklarını ortadan kaldırmamaktadır.

Normal Hücre İskeleti:

Sitoskeletonun (hücre iskeletinin) işleviyle ilgili ayrıntılı tartışma bu yazının sınırlarını aşmaktadır. Kısaca, hücre yapısı, hücrenin mekansal organizasyonundan sorumlu yapıların bütünü olarak tanımlanır. Hücre iskeleti hücrenin şekli, çevre yapılarına bağlanması, hareketliliği ve hücre içinde veya dışına maddelerin taşınmasında önemli bir rol oynamaktadır. Temel hücresel olaylar (ör. Mitoz) hücre iskeletine bağlıdır, ayrıca habis hücrelere dönüşümün de hücre iskeletinde değişikliklerle yakından ilgili olduğu düşünülmek-

tedir.

Tüm normal hücrelerin hücre iskeleti 3 tip protein yapılarından oluşmaktadır, bunlar boyutları ile histolojik olarak ayırdedilebilirler (Şekil 1). Bunların en küçüğü filamentlerdir (6-10 nm çapında), bunlar aktin alt ünitelerinden oluşmaktadır. En büyükleri, mikrotübüllerdir (23 nm), bunlar alfa ve beta tubulinden meydana gelmiştir. Üçüncü tip proteinin çapı ikisinin ortası büyüklüktedir, (10-15 nm) bu nedenle orta boy filament adı almaktadır. Bir organizmanın tüm hücrelerinde filament ve mikrotübüller aynı yapıdadır, fakat orta boy filamentler hücre tipine özgüdür. Nöronlardaki orta boy filamentlere nörofilamentler denir, ve moleküler ağırlığı 67 kd, 160 kd ve 210 kd olan protein üçlülerinden meydana gelirler.

Bazı diğer proteinler, mikrotübüle bağlı proteinler de hücre iskeleti proteinlerinin komponentleridir. Mikrotübüle bağlı proteinlerden bir grubu yüksek molekül ağırlıklı moleküllerdir. Mikrotübüle bağlı protein-2, yaklaşık 270 kd molekül ağırlığına sahiptir ve bu mikrotübüle bağlı proteinler içinde yüksek molekül ağırlığı olanlardan biridir; ayrıca mikrotübüller ve nörofilamentler arasında bir bağlantı oluşturdukları düşünülmektedir. (Şekil 1) Bu proteinin fizyolojik rolü tam olarak anlaşılmamıştır. Mikrotübüle bağlı proteinlerin ikinci bir grubu tau olarak adlandırılmaktadır (yaklaşık 55-70 kd) ve mikrotübüllerle bağlı olarak bulunmaktadır. Tau ve mikrotübüle bağlı protein-2 mikrotübüllere yanarlardan bağlanmaktadır (Şekil 1), Tau proteinleri mikrotübüllerin in vitro olarak toplanmasına önyak olmakta fakat in vivo olarak bu proteinlerin fizyolojik işlevi bilinmemektedir.

Eşleşmiş Helezoni Lifler (EHL) ve Bağlı Proteinler:

Nörofibriller düğümler (NFD) büyük, nöronların perinükleer sitoplazmasında bağlı olarak bulunan ve hücre zarına bağlanmayan AH'nun beyinlerinde ışık mikroskopu ile tesbit edilen agregatlarıdır. Elektron mikroskobu ile incelendiğinde, NFD'in eşleşmiş helezoni liflerden (EHL) oluştuğu tesbit edilmiştir. EHL, NFD'de yer almalarına ek olarak nörit plaklar (NP) da da tesbit edilmiştir. Önceki araştırmacılar EHL'in aynı boyuttaki normal nörofilamentlerden türediğini öne sürmüşler ve her ikisini karşılaştıran çalışmalara önderlik etmişlerdir. Wischic'in öne sürdüğü gibi, asıl sorun EHL'in normal veya farklı nöronal proteinlerin olası birikintilerinde bir nokta mı, yoksa tamamen yeni bir proteinin farklı yapıdaki depolanması veya belirgin şekilde değişmiş bir protein mi olduğu noktasında düğümlenmektedir. Bu soru aşağıda dikkate alınmaktadır.

Eşleşmiş Helezoni Liflerin Ultrastrüktürü:

Kidd ve Terry birbirlerinden bağımsız olarak NFD'in ultrastrüktürel görüntüsünü ilk defa 1963'de tanımladılar. Kidd "eşleşmiş helezoni lifler" terimini kullandı ve en geniş çapı yaklaşık 22 nm, en dar çapı 10 nm olan ve her 80 nm'de bir birbirleri etrafında heliks şeklinde dönen 10 nm filamentlerin görüntüsünü tarif etti.

Bazı gruplar NFD'de başka tip filamentler tanımladılar da, diğerleri Kidd tarafından tanımlanan boyutlarda tek tip EHL grupları tesbit etmişlerdir.

Wisniewski ve Wen ENL'in "supra-ultra ince" kesitleri ile normal nörofilamentleri Elektronmikroskop ve fotoğraf

büyütmeleri yardımıyla 1.000.000-4.000.000 kez büyütülmüş görüntülerin bilgisayarlı görüntü analizi yoluyla karşılaştırılmıştır. Bu grup, EHL'in 8 "protofilament" ipliğinin bir heliks şeklinde "örülmesinden" meydana geldiğini bildirmiştir. Protofilament "örgüleri'nin" çapı yaklaşık 3.2 nm olup, her örgü arasında 4.7 nm olan uzunlamasına ipliklerle birleştirilmiştir. Bu, 4 iplikli örgülerden oluşan ve her bir örgünün 2 nm çapında olup, 2.7 nm ipliklerle birleştirilen nörofilamentlerden belirgin derecede farklıdır. Sonuçta EHL ve nörofibrillerin, bazı antigene benzer ortak özellikleri olan farklı polipeptidlerden oluştuğu ortaya konulmuştur. Bu veriler, Selkoe'nin EHL'in kovalent bağlarla çapraz bağlanmış nörofilamentler olduğu varsayımını desteklemektedir.

Eritildiğinde orta boy filamentler dezorganize olduğunda, yapıtaşları olan protofilamentlere ayrılırlar. Wischick, bir çalışmada, EHL'1 M alkoli içinde parçalanmış ve deneylerin büyük çoğunluğunda protofilamentlere ayırılmadan enine düzün çizgilerle ayrıldıkları görülmüştür. Uzunlamasına kıvrımlar ise, EHL'in orta hatında ortaya çıkmış, bu da eşleşmiş filamentler olduklarını desteklemiştir. Bilgisayarlı görüntü rekonstrüksiyonu yöntemiyle EHL'in düzenli olarak tekrarlayan alt ünitesinin iç yapısını açıklamak mümkün olmuştur. EHL'in bilgisayar destekli kesitleri her biri C-şeklindeki alt ünite çifflerini ortaya koymaktadır. Bu C-şeklindeki alt üniteler içinde, globüler yapıda üç bölüm görülmektedir. Wischic'e göre EHL kısa eksenli enine uzanan bir alt ünitenin bir araya gelmesinden ortaya çıkmıştır. Wischick, Hemogloblin molekülünde tek bir amino asidin yer değiştirmesiyle ortaya çıkan orak-hücreli anemide hücre içi liflerin toplanmasıyla bir benzerlik olduğuna dikkat çekmiştir.

Crowther ve Wischick'in yukarıda sözü edilen kesik görüntüsü 6 bölümden oluşmakta ve bu da Wisniewski ve Wen'in 8 "globülünü" hatırlatmaktadır. Öte yandan, bu iki model uzunlamasına protofilamentlerin varlığı konusunda fikir ayrılığına düşmektedir. Crowther ve Wischick uzunlamasına yapıardan söz etmemekte ve her iki model Wisniewski'nin uzunlamasına çubuklarının EHL parçalandığında enine çubukların üstünde parçalandığı varsayımıyla birbirlerine yaklaştırılabilir. Her iki varsayım da dikkatle karşılanmakla birlikte, bu iki çalışma EHL'in normal hücre iskeleti yapılarından farklı olduğunu ortaya koymaktadır.

Nörofibriller Düzümleri ve Eşleşmiş Helezoni Liflerle İlgili İmmunositokimyasal Çalışmalar:

Kidd ve Terry tarafından yapılan ilk EHL'in ultrastrüktürüne ait tanımlama NFD ve nörofilament ve mikrotübüller gibi normal hücre iskeleti elemanları arasındaki immunositokimyasal ilişkilere büyük ilgi uyandırdı. Miller ve ark. bu çalışmaları derlemiştir. Temelde, bazı nörofilament ve mikrotübüllü antikoları NFD ile, daha az sayıda antikör izole edilmiş EHL ile reaksiyona girer; ayrıca EHL antikoları ise ne nörofilamentlerle ne de mikrotübüllerle reaksiyona girer. Kuvvetlendirilmiş EHL freksiyonlarına karşı oluşan monoklonel antikolarla yapılan son çalışmalarda, bazı anti-EHL antikolarının bazı farklı nöronal ve glial proteinlerle (nörofilamentler dahil) karşılıklı reaksiyona girdiği gösterilmiştir. Bazı diğer yeni çalışmalarda ise, EHL ile reaksiyona giren her anti-nörofilament antikorumun mikrotübülse-bağlı-protein-tau'yu tanıdığı gösterilmiştir. Miller

EHL'in normal nörofilamentlerin basit bir karışımından oluşamayacağını, öyle olsaydı tüm nörofilament antikolarının NFD ve EHL'in işaretleyeceğini ileri sürmüştür. Buna karşın, bazı nörofilament antikolarının NFD'yi kuvvetle işaretledikleri öte yandan da normal nöronların perikaryonunu hafifçe boyadıkları dikkate alındığında, burada modifiye edilmiş bir "nörofilamentöz madde'nin yoğun şekilde biriktiği düşünülebilir.

Wischick, hücre cisminde meydana gelen her çözünmez polimerin mikrotübüller sistem tarafından dizilebileceğini tartışmıştır. Böylece, Metuzals tarafından ortaya koyulduğu gibi, EHL normal nörofilamentlerle bağlanabilir. Bu bağlantı nörofilament antikolarının NFD ile karşılıklı reaksiyona girebilmesini açıklayabilir. Yani, bu antikolar EHL dışında NFD'de boyanabilen elemanlar olabilir. Buna karşın, diğer bazı deneylerde SDS tampon çözeltisinde uzun süreli inkübasyonu sonucunda anti-nörofilament etkinliğinin yeniden gelişmesi bunu reddetmekte ve NFD'de in situ olarak yeralan bazı nörofilament epitoplarının EHL izole edildiğinde saklanmış olabileceğini düşündürmektedir.

Geniş ilgi uyandıran diğer hücre iskeleti elemanları da mikrotubulusa bağlı proteinlerdir. Mikrotubulusa bağlı protein-2nm 3 monoklonal antikordan birisi çalışmalarından birinde NFD'yi yoğun olarak in situ durumunda işaretlemiş, fakat SDS'den elde edilmiş NFD'yi işaretlememiştir. Diğer bir mikrotubulusa-bağlı-protein-tau'nun antikoları NFD ve EHL ile kuvvetle ve kalıcı olarak reaksiyona girerler.

Mikrotubulusa-Bağlı-Protein-Tau ile EHL İlişkisi:

Daha önce de belirtildiği gibi, tau esas olarak gelişen beyinde bulunan bir grup mikrotubulusa-bağlı-proteindir. Normalde, tau aksonlarda yer alır, fakat nöronal cisimler ve dendritlerde tesbit edilemez. Tau mikrotubulusların in vitro toplanmasını hızlandırmakla tanınır da, aynı zamanda in vitro olarak aktin filamentlerini birbirine bağlar. Bu etkinlikler, tau'nun fosforilasyon derecesiyle doğrudan ilişkilidir. Tau'nun in vivo rolü bilinmemektedir. Normal erişkin beyinde beyaz maddede yer alır, Alzheimer'li beyinde ise NFD ile üstüste gelen (çakışan) hücre cisminde bulunur. 1984'te Iqbal, Wisniewski ve ark. tarafından EHL'de tau-benzeri polipeptidlere rastlandığı bildirilmiş de, ilk anti-tau antiserumla işaretli NFD'in varlığı Brion ve ark. tarafından 1985'te ortaya konulmuştur. Birçok laboratuvar anti-EHL ve anti-tau antikolarının karşılıklı etkileşime girdiklerini onaylamıştır. Abzorsiyon çalışmaları tau'nun EHL'in birkaç antijen özelliği belirleyicisinden biri olduğunu göstermiştir. Nörit plakları (NP) merkezini çevreleyen EHL'de anti-tau antikoları tarafından işaretlenmekte, fakat NP merkezinin kendisi işaretlenmemektedir. (Boyanmamakta). Aslında, Katzman makalesinin yazıldığı tarihe kadar üzerinde çalışılan tüm tau'ya karşı oluşan monoklonal antikolar NFD ve EHL preparasyonlarıyla reaksiyona girmekte, ayrıca anti-EHL antikoları da tau ile reaksiyon vermektedir. Bu karşılıklı etkileşim bu makaleden bu yana halen onaylanmaktadır. Örneğin, tau antikoları, Pick hastalığı ve progresif supranükleer paralizisi gibi bozukluklarda, EHL'e benzer filamentöz biriktiricilerle de reaksiyona girdiğini, Joachim ve ark. EHL'den yoksun nöronlarda ve ayrı plaklar şeklinde kümeleşmeyen kalınlaşmış nöritlerde monoklonal anti-tau antikolarıyla birlikte yaygın perikaryal

boyanma olduğunu göstermişlerdir. Bunlar tau birikimi ve EHL oluşumunun erken evrelerini ortaya koyuyor olabilir.

Alzheimer'li beyin preparasyonlarının defosforilasyonu NFD ile anti-tau antikörlerinin reaktivitesini arttırmakta, bu da EHL'de tau'nun anormal fosforilasyona uğramış bir tipinin olduğunu düşündürmektedir. Bu anormal fosforilasyona uğramış tau, EHL'deki ubiuitin'in hedefi olabilir. Ubiuitin, 76 amino asitten meydana gelen bir protein olup, ATP'ye bağlı proteolitik sistem tarafından yıkılmaya namzet, kovalent bağlarla proteinlerle bağlıdır. Bu yolla yıkılan proteinler genellikle anormaldır ve doğal olarak kısa ömürlüdür. Mori ve ark. fosmik asitte lisilendopeptidaz ile muamele edilerek yıkılmış EHL preparasyonundan ubiuitin fragmanları izole etmişlerdir. Pery ve ark. ubiuitine özgü bir poliklonal antikörün NFD ve plak nöritleri boyadığını göstererek bu bulguyu desteklemişlerdir. Bu sonuçlar, EHL'in oluşumunun defektif bir ATP'ye bağımlı proteaz veya fosforilleşmiş tau'nun proteolize olağandışı direnç göstermesi sonucu ortaya çıktığını düşündürmektedir.

Kosik tau'nun EHL'deki varlığının NFD ve NP (nörit plaklar) da alüminyum birikmesinde açıklayabileceğini çünkü calmosulin'in tau ve alüminyum'a kuvvetli şekilde bağlandığını öne sürmüştür. Şu anda calmodulin'in EHL'e kuvvetle bağlandığını gösteren bir çalışma yoktur. Hatta NP'da alüminyum nöritlerde veya periferde değil (ki buralarda tau immunoreaktivitesi mevcuttur) merkezde toplanmıştır.

Destekleyici immunositokimyasal verilere rağmen, immunositokimyasal karşılıklı etkileşimle ilgili verileri yorumlarken tedbirli olmak gerekir, çünkü bu veriler EHL (veya komponentlerinin) ve tau'nun birbirinin eşi olduğu veya EHL'in tau'nun modifiye bir şekli olduğunu kanıtlamamaktadır. Antikor tarafından tesbit edilen antijen bölgesinin küçük olduğunu hatırladığımızda tutmalıdır. İqbal, birkaç amino asitten oluşan birbirinin eşi veya yakından ilişkili antijen bölgelerinin birbiriyle ilişkili olamayan moleküllerde bulunduğuna dikkat çekmiştir. Bu tip non-spesifik karşılıklı etkileşime bir örnekte, NFD'e karşı oluşan antikörlerle tavşan Ig G si arasındaki reaktivitedir. Bunlardan başka, tau ile reaksiyona girmeyen ve EHL'in merkez proteinlerinden biriyle reaksiyona girdiği düşünülen, saflaştırılmış Masters, EHL'in nörit plaklarındaki amiloid filorilleriyle aynı 4 kd proteinlerden oluşmakta olduğunu, yalnız N-terminallerinde heterojenite farklılığı olduğunu öne sürmüştür. NP proteinlerinin EHL ile birlikte saflaştırılması ile ilgili ciddi sorunlar vardır. Ayrıca, Wisniewski, Crowther ve Wischik tarafından tanımlanan globuler alt ünitelerin boyutu, daha yüksek moleküler ağırlıklarını (50-200 kd gibi) düşündürmektedir. Buna karşın, Guiryo ve ark'ın ilginç bir çalışmasında NP veya serebrovasküler amiloid şeklinde hücre dışı amiloid içermeyen Guam parkinsonizm-demans beyindeki atipik EHL kullanılarak Masters'in ilk bulgularını desteklemektedir. Guiryo, Masters'in grubunun daha önce Alzheimer hastalığında NF ve EHL'de bulunduğu aynı 4-4.5 kd proteini, atipik EHL'de bulmuştur.

EHL Çalışmalarının Özeti:

Alzheimer tarafından ilk çalışmasında tarif ettiği Alzheimer Hastalığının histolojik belirleyicilerinden biri NFD (Nörofibriler Düğümler)'dir. NFD, EHL'den oluşmaktadır. NFD terimi bu yapıların görüntüsünü tanımlamak için

Kidd tarafından ortaya atılmıştır. EHL, kendi etrafında, 80 nm'de bir sarımsık olan iki 10 nm'lik filamentlerden meydana gelmektedir. EHL nörofilamentlerle karşılaştırılrsa da, yapısal olarak eşsizdirler. İmmünohistokimyasal çalışmalar EHL ile, bir kısım normal hücre iskeleti proteinlerine karşı oluşan antikörlerin karşılıklı etkileşmelerini ortaya koymuştur. Bunun karşılığı olarak, EHL antikörleri normal hücre iskeleti yapılarıyla karşılıklı etkileşime girmezler. Şimdiye kadarki veriler EHL merkezi proteini antijen olarak eşsizdir fakat tau adı verilen mikrotubulusa bağlı proteinle yakından ilişkilidir. Bu ilişkinin temeli henüz iyi anlaşılmamıştır. EHL merkez proteininin kimyasal yapısı da bilinmemektedir.

Amiloid Fibriller ve Proteinler:

Alzheimer hastalığı ve Down Sendromu'nda, özellikle hippokampus ve neokortekstem yer alan nörit plakları, lokalize nöronal dejenerasyon alanlarıdır. Çoğunda, orta bölgeli veya merkezde fibriller formda dışı amiloid protein birikintileri yer alır. Merkezin etrafında sıklıkla NFD'den daha az miktarda EHL içeren şişmiş dendit ve okson gibi nöronal uzantılar vardır. Çoğunlukla, plakta astiosit infiltrasyonu da görülür. NP belirgin bir kısmı, alüminyum silikot denen ve iki defa Edvardson ve ark. tarafından saptanan bir inorganik maddeden meydana gelir.

Amiloid Fibrillerin Ultrastrüktürü:

Merz ilk olarak amiloid fibrillerin ultrastrüktürünü tanımlamıştır. Bu araştırmacı, 30-40 nm de bir kıvrılan 4-8 nm'lik helezoni fibrillerden söz etmiştir. Miyakawa hızlı dondurma metoduyla elde edilen, Down Sendrom'lu kişilerde amiloid fibrilleri incelemiştir. Bu çalışma grubu, globules alt ünitelerin heliks şeklinde sıkıca sarılmasından oluşan 13-15 nm çaplı içi boş çubuklardan meydana gelen amiloid fibrillerini incelemiştir. Her heliks döngüsü, 3-5 nm çaplı 5 alt üniteden oluşmaktadır.

Roher floresanla aktive edilmiş hücre ekleme metoduyla amiloid plak merkezi proteinini saflaştırdı ve merkezi proteinin 5.5-6nm ve 10-12 nm genişliğinde 2 tip filamentten meydana geldiğini buldu. Büyük filamentlerin, EHL'i hatırlatan ikili heliks yapısında oldukları görüldü.

Amiloid Fibrillerin İmmünohistokimyasına İlişkin Çalışmalar:

Nörofilament ve mikrotubullere karşı antiko'larla ilgili çalışmalar, NP merkezindeki amiloid fibrilleriyle karşılıklı etkileşebilirlik göstermemektedir. NFD'e karşı özgül antikolar da NP ile karşılıklı etkileşmezler. NFD'i boyayan anti-tau antikörleri NP merkeziyle reaksiyona girmez NP'e karşı antikörler NFD'i boyamaz. Beta-amiloid-proteinin sentetik analoglarına karşı antikörler, amiloid fibrilleri oluştururlar ve NP ve serebrovasküler amiloidi boyar, NFD'i boyamazlar, ayrıca immunogold metodu ile amiloid fibrilleri özgül olarak boyadıkları gösterilebilir. EHL'e karşı antikörler sentetik beta-amiloid-protein ile reaksiyona girmez. Bu immunolojik veriler amiloid fibrilleri oluşturan proteinlerin NFD ve EHL'de bulunulardan oldukça farklı olduğunu ortaya koymaktadır.

Beta-Amiloid-Proteinin (BAP) Kimyasal Bileşimi:

Glenner, Wong ve ark. Alzheimer hastalığı ve yaşlı Down Sendromlu vakalardaki serebrovasküler amiloidden "beta protein" adını verdikleri bir protein izole ettiler. BAP'ın, NP ile antijenik bileşenlerinin benzer olduğu görüldü. Ayrıca aminoasit dizilişini de elde ettiler (aşağıya bakınız). Down Sendromundaki BAP, 11 no.lu pozisyonundaki gln yerinde glu'nun yer alması ile farklılaşır.

Masters ve ark. A4 olarak adlandırdıkları 4 kd bir polipeptidi amiloid plak merkezlerinden izole etmişlerdir. Bu proteinin, Glenner'in Beta proteiniyle N-terminali heterojenliği dışında benzer aminoasit dizilişi gösterdiği ortaya konulmuştur. Ayrıca, Glenner, A 4'ün oligomerleri olduğuna inandığı daha büyük proteinlerde buldu. Roher ayrıca plak merkezleri saflaştırmış, fakat farklı proteinler ayırtamamıştır. Roher, Glenner ve Masters'in birbirlerinden bağımsız olarak bildirdikleri BAP aminoasit dizilişinden farklı plak merkezi aminoasitlerinin total bileşimlerini bulmuştur. Bu, BAP'a ek olarak plak merkezinde başka proteinler olduğunu veya BAP'ın başka bir büyük proteinin bir parçası olduğunu gösterebilir.

BAP'ın 28 amino asit dizisinin bir başka büyük proteinin fragmanı olduğu Kong'dan bu yana bilinmektedir. Kong, Masters ve ark BAP'ın 42 ve belki 43Mr amino asitle dizilişini göstermişlerdir. 4-5 Kd'lik dayanarak bundan daha büyük olamayacağını ifade ettiler.

Kong ve ark. bu diziyi verdi.

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
Asp	Ala	Glu	Phe	Ang	His	Asp	Ser	Gly	Tyr	Glu	Val	His	His	Gln
16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
Lys	Leu	Val	Phe	Phe	Ala	Glu	Asp	Val	Gly	Ser	Asn	Lys	Gly	Ala
31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	±	43	
Ile	Ile	Gly	Leu	Met	Val	Gly	Gly	Val	Val	Ile	Ala	+	Thr	

Aşağıda da belirtildiği gibi, Kong'un grubu bu diziyi de içeren 695 aminoasitlik bir proteini kodlayan bir CDNA tanımlamıştır.

Goldgaber ve Gaydusek yukarıdaki diziyi de içeren 97 aminoasitlik diziyi bir CDNA klonu belirlemiştir. Onlar da bu proteinin BAP öncülü olduğunu öne sürmüşlerdir. Tek tek aminoasit rezidülerinin hidrofobluğuna (hidropati analizi) dikkat edildiğinde, hücre zarı proteinleri benzer hidrofob ve hidrofil bölgelerin dönüşümünü ve geniş hidrofob bir alan gözlenmektedir.

İkincil yapıların komüter yardımcı incelemeleri beta-plili-bir yapı oluşturma eğilimi göstermektedir.

Bu, Glenner, Jones ve ark. ve Kirschner, Abraham ve Selkoe'nun çapraz-beta yapısına ilişkin X-ışını difraksiyonu verileriyle uygunluk göstermektedir. Eanes ve Glenner'in önceki çalışmalarında, çapraz beta yapısının genelde amiloid proteinleri için tipik olduğu öne sürülmüştür.

Castano ve ark. BAP'ın 1-28 ve 12-28 amino asitlerine karşılık gelen 2 polipeptid sentezlemiş ve bunların in vitro olarak fibriller oluşturduğunu bulmuşlardır. Bu fibriller kongo kırmızısı ile boyanmakta ve NP ve AH beyninden ve leptomeninklerden elektron mikroskobu ile izole edilen amiloid fibrillerine benzemektedir. Endojen amiloid, her iki polipeptide göre çok daha az çözünmektedir.

Castano bunu şu şekilde açıklamıştır. (1) BAP'ın dizil-

memiş bölümü (bu çalışma süresinde 29-43 dizilmemişti) çözünmezliği belirleyen bölüm olabilir. (2) Çözünmezlik alüminyum ve silikon da dahil, dokuya özgül faktörlerle belirlenebilir veya (3) BAP'ın ayrıştırılmasında çözünürlüğü etkileyen değişiklikler ortaya çıkabilir. İlk varsayımı, Goldgaber ve ark'ın 29-43 arası pozisyonlardaki bölümün oldukça hidrofob olduğu ve sudaki solusyonunda çözünürlüğü azalttığı yolundaki bulguları desteklemektedir. Castano ve Goreic'in son çalışmalarında 1-28 sentetik peptid fibrillerin x-ışını difraksiyon analizinde beta-plili tabaka dizilişi özelliğinde olduğunu göstermişlerdir. Ayrıca çözünmezliğin hidrofob C-ucuna bağlı olduğu ve fibril oluşumu ve beta-plili tabaka difraksiyon pattern'inin 14-28 no.lu dizide elde edilebildiği ortaya konulmuştur. 16-28 ve 18-28 dizileri gibi daha kısa peptidler fiyonk benzeri yapılar oluşturmuş ve beta-plili tabakalara benzer x-ışını difraksiyon patterni göstermişlerdir. BAP'ın 20-28 dizisi gibi daha da kısa olan peptidler ise ne elektron mikroskobu ne de x-ışını difraksiyon yöntemiyle tanımlanabilir yapılar göstermemişlerdir. Kirschner ve ark. sentetik BAP peptidlerinin elektron mikroskobik ve x-ışını difraksiyon patternlerini de incelemişlerdir. 1-28 dizisindeki peptid, in vivo koşullarda görülenlere benzer fibriller oluşturmuşlar ve NP merkezlerine benzer büyük düğümler şeklinde kümeleşmişlerdir. Bu peptid x-ışını difraksiyonu ile çapraz-beta dizilişi göstermiştir. Lysine-16 yerine alanin yerleştirmiş bir peptid, oldukça farklı, düzensiz polimer birikintiler oluşturmuş ve yüklü lysine -16-nm fibril oluşumu için gerekli olduğunu düşündürmüştür. Bu grup, aynı zamanda 18-28 dizisinin beta-plili tabakalar oluşturmaktadır.

Moleküler Genetik Tekniklerin Gözden Geçirilmesi:

BAP ile ilgili son moleküler genetik çalışmaları tartışmadan önce, bu tekniklerin temelini kısaca gözden geçirmek uygun olur. Özellikle farklı uzunluktaki parçaların polimorfizmi ve komplementer DNA (DNA) deneme tiplerinin farklı kullanımlarını anlamak gereklidir.

Kısıtlı parça uzunluğu polimorfizm çalışmaları, kısıtlayıcı emdonükleozlar denen bir grup enzimin DNA'yı belli baz dizilerinde kestikleri gerçeğini kullanmaktadır. Eğer böyle özgül bir diziyi bozan veya oluşturan bir mutasyon ortaya çıkarsa, sonuçta ortaya çıkan DNA patterni de değişecektir (Şekil 3). Eğer birinde ilgili gene ait işaretleyici varsa, bu pattern değişikliği (polimorfizm) DNA parçalarını ayıran bir jel üzerinde gözlenebilir. Kullanılan işaretleyici genellikle bir DNA deneme tipidir. Sıklıkla, ilgili genin baz dizisi bilinmemektedir (aynı familyal-Alzheimer Hast. veya Hunaington Hast. da olduğu gibi) kısıtlayıcı parça uzunluğu polimorfizmini ortaya koymak için ilgili gen veya yakınındaki bir diziyi hibridleşen (bağlanan) farklı tipler denebilir. Bunlara isimsiz deneme tipi denir. Eğer, BAP genleriyle ilgili çalışmalarda olduğu gibi, bir genin bir bölümünün baz dizilişi önceden kestirilebilirse, gene doğrudan bağlanabilecek kısa DNA parçaları sentezlenebilir. Sonuçta ortaya çıkan oligonükleotid'e özgül deneme tipi denir.

Kısıtlayıcı parça uzunluğu polimorfizmi (KPUP) iki şekilde kullanılabilir. Bir soyda KPUP'nin geçişi aynı soyda Alzheimer hastalığının geçişiyle karşılaştırılabilir. Eğer bunlar birlikte ayrılırsa, KPUP'in bu hastalığa neden olan genle özdeşleştiği düşünülebilir. Öte yandan, KPUP'in bili-

nen kromozom bölgesindeki genlerin bağlantısı da belirlenebilir. Bu yolla, KPUP'in kromozomal yerleşim bölgesi de belirlenebilmektedir.

Bu çalışmaları anlayabilmek için gerekli olan bir diğer kavram da DNA'dır. Komplementer DNA (DNA) birkaç metotla elde edilebilir (Şekil 4). Sıklıkla, DNA'nın "ters transkriptaz" adlı enzim tarafından sentezlenebilmesi için özgül bir mBNA'nın kalıp (model) olarak kullanılabilmesi mümkün olmaz. Bundan başka, eğer bir proteinin aminoasit dizilişi biliniyorsa, genin kodlama (yapı) dizisi de çıkarılabilir. Her amino asit en fazla 6 farklı kodon (yani alanin CGA, CGG, CGT veya CGC olabilir) ile kodlanabilir, bunun sonucu olarak çıkarılan diziliş insan geninin gerçek dizilişinden farklı olabilir. Belli bir aminoasit için ilk 2 baz aynı olduğundan, (alanin örneğinde görülebileceği gibi) çıkarılan diziliş en azından % 66 doğrudur. Özgüllük derecesi normalde yeterlidir. Eğer yeterli değilse, farklı kodonların tüm olası kombinasyonlarından oluşturulan oligonükleotid deneme tipleri kullanılarak hücreSEL DNA ile hidridleşecek tek deneme tipini bulmak gerekli olacaktır. Deneme tipleri sayıları, tek kodonları olan aminoasitler (metionin veya triptofan) seçilerek en aza indirgenebilir.

mRNA kalıbından veya direkt kimyasal metodlarla yapılsa da, DNA, orijinal gen DNA'sının 2 bandı birine "komplementerdir" ve bu nedenle gene bağlanır (hiloridleşir). Deneme tipi olarak kullanılabilmesi için DNA genellikle radyoaktif hale getirilir.

DNA oldukça kolay yönlendirilebilen (çok yönlü) olduğundan birçok farklı şekilde kullanılabilir (Şekil 5). İnsan geni belirleme çalışmaları (Kong, Goldgaber, Tanzi); kromozomal sublokalisasyon (Kong, Goldgaber, Tanzi, Robakis ve St. George-Hyslop); kantitatif gen ekspresyonu (Kong, Goldgaber, Tanzi, Bahmangar); gen dozajı çalışmalarını (Delabor, St. George-Hyslop, Tanzi, Podlisny) da DNA kullanılmıştır.

Şekil 5'te söz edildiği gibi metafaz kromozomların in situ hibridizasyonuna ek olarak, DNA tipleri kullanılarak kromozomal lokalizasyon da tesbit edilebilir, burada 23 insan kromozomundan biri ya da birkaçı olduğunda belli bir genin somatik hücre hibrid serisindeki varlığını saptayabiliriz. Bütün pozitif hibridlerdeki ortak kromozom, kromozom içeriğini verir (Kong, Goldgaber, Tanzi). Kromozomal sublokalisasyon, bilinen lokasyondaki genlerle bir genin bağlantısını belirleyerek tanımlanabilir.

Bir başka DNA kullanımını "in situ hibridizasyon histokimyasal deneylerde" önemlidir (Bahmanyar). Bu teknikte, in situ beyin kesitlerinde DNA, mRNA ile hibridleştirilmektedir; burada özgül mRNA düzeylerini belirlemek ve mikroskopik düzeyde genetik dizilimin kestirilebilmesi amaçlanmaktadır. Bu, ayrıca tek tek hücrelerde gen dizilimi ile ilgili anatomik bilgi de sunmaktadır.

BAP'ın Moleküler Genetiği:

Alzheimer Hastalığı genellikle sporadik olarak ortaya çıkar fakat bazı ailevi geçişli vakalar da vardır. Bu oranın % 33 olduğu bildirilmektedir. Ailevi AH'da geçiş otozomal dominantdır. Önceden söylendiği gibi, Down Sendromlu (Trisomi 21) hastalarda 50 yaşlarında AH benzer nöropatolojik değişiklikler % 100 oranında ortaya çıkmaktadır. Bu bulgu, 21.kromozom da yer alan bir genin ailevi AH'nun pato-

genezinde önemli olabileceğini düşündürmüştür. Bu varsayım ile ilgili bir sorun vardır, o da bir çalışmada, Down Sendromlu hastalarda, tipik nöropatolojiye sahip olsalar da, hepsinin klinik demans göstermediklerinin ortaya koyulmuş olmasıdır. Bu tartışmalıdır, çünkü mental retardasyon zeminiinde erken veya hafif demansın tesbiti oldukça zordur. St. George-Hyslop, Gusella ve ark. isimsiz bir DNA deneme tipiyle genetik bağlantı analizi kullanmışlardır. Bu yöntem histolojik olarak kanıtlanmış AH olan 4 büyük soyda gen lokalisasyonu amacıyla kullanılmıştır. Ailevi AH geninin 21.kromozomla, bağlantı analizi, somatik hücre hibridleri ve in situ kromozomal hibridizasyon yöntemleriyle eşleştiğini bulmuşlardır. Bu gen, 21. kromozomun Down Sendromu feaotiipiyle ilişkili bölgesinde değil (21 22), daha ziyade 21 11.2-21 21 bölgesinde yer almaktadır. Buna karşın, Down Sendromlu hastalarda 21.kromozom trisomisi farklı bantlarda da yer almaktadır, bu nedenle bu farklılık anlamlı olmayabilir.

Goldgaber ve Gajdusek, BAP'ın ilk 20 aminoasidine karşılık gelen (tekbüleden) 59 dizilik sentetik DNA deneme tipi oluşturmuşlardır. Bu tip ile, insan DNA kümesinden 4 temelde aynı DNA klonları belirlenmişlerdir. Bu çalışmanın sonunda BAP'ın genetik kodlaması oldukça "gizli"dir ve normal dokuda çözümlenebilir.

Tanzi, Neve ve ark.da insan fetus beyindeki BAP'ın kodlamasını yapan bir DNA klonu izole etmişlerdir. ilk 90 baz çiftinin diziliş analizi bu DNA klonunun Goldgaber'in kiyle aynı olmadığını göstermiştir. Hibridizasyon en güçlü beyin, böbrek, kalp ve dalakta tesbit edildi. Erişkin insan beyinde hibridizasyon en yüksek BAP mRNA düzeyi kortikal asosiasyon alanlarında tesbit edildi. BAP mRNA'nın görece yoğunluğunun, Alzheimer Hastalığında, NP dağılımıyla ilişkili olmadığı fakat serebrovasküler amloid ile ilişkili olduğu görüldü. Down Sendrom'u beyinde, normal kontrollerle oranla artmış miktarda BAP mRNA saptandı, fakat AH beyinde daha düşük miktarda BAP mRNA bulunduğu görüldü. Kısıtlayıcı parça uzunluğu polimorfizmi metodu ile AH varlığı olmaksızın, Tanzi, Goldgaber'den daha kesin bir şekilde BAP geninin lokalisasyonunu buldu.

Kong, Mastes ve ark'da insan fetus beyni DNA kümesinden (21.kromozom trisomisi olmayan) 3.2 kb DNA izole etmiştir. Bu DNA 78600 molekül ağırlığı olduğu hesaplanan 695 aminoasitlik bir proteinin kodunu verir (Şekil 6). Bu daha büyük protein, daha önce NP merkezlerinde saptanan BAP,n 43 aminoasitlik dizisini içerir. Bu protein bazı yönlere ilginçtir. Amino ucundan ilk 187'lik bölümünde sisteinden zengin bir bölge vardır, bu bölge moleküller arası disulfid bağlarının oluşmasında rol oynar. Daha sonraki 100'lük dizide 7 devamlı (bitişik) treonin yer alır, asit yapıdaki aminoasitlerden zengindir (28 glutamik asit ve 17 aspartik asit dizisi vardır). Bu bölge alüminyum gibi katyonları bağlayabilir. Bundan sonraki 308'lik dizi 467-469 ve 496-498 no'lu pozisyonlarda 2 potansiyel N-glikozilasyon bölgesi içerir. Bundan sonra 43 aminoasitlik BAP gelir. ilk 28'lik dizi transmembran bölgesindedir, hidrofob olan 29-43 dizisi bu bölgenin tam ortasındadır. Varsayılan transmembran bölümünü 3 lizin takip eder. Böylece, BAP'ın prekürsörlerinden meydana gelmesi için gerekli olan 2 bölünme, membran içinde ortaya çıkar ki, bu olağandışı bir durumdur.

Barnes aşağıdaki maddelerle moleküler genetik araştırmaları özetlemiştir. Ailevi AH'a neden olan bir ya da fazla gen 21.kromozomun aynı bölgesinde yer alır. Bu bölgedeki genlerin biri AH ve Down Sendrom'lu yaşlarda tesbit edilen NP merkezini meydana getiren BAP'ı kodlar. BAP'ın mRNA'sı beyinden başka birçok insan dokusunda da yer alır. Birçok farklı yaşlı memeli beyinde amiloid birikmesi ortaya çıkar. Bu verilerin hiçbiri AH'ın nedenini tam olarak ortaya koymamaktadır, fakat BAP'ın kodlanmasından sorumlu olan gende anormallik veya BAP'm prekürsör proteinin yapımında bozukluk savları güçlü adaylardır. BAP türler içinde iyi korunmuştur ve normal hücre fonksiyonunda önemli rolü olabilir.

Yukarıda sözü geçen buluşlar familial AH ve BAP genlerinin tek ve aynı gen olduğu varsayımına yol açmıştır. Bu, Delabar, Gajdusek ve ark'm AH olan 3 hastada bir fazla BAP gen kopyası olduğunu bulmalarına dayandırılmıştır. Sonraki çalışmalar bu bulguyu desteklememiştir. Familial AH ve BAP genlerinin rekombinasyonu sonucu, bu çalışmalarda, bu genlerin aynı olmadığı kanıtlanmıştır. Bu durumda, familial AH geninin, BAP geni üzerinde uzun süreli etkisi sonucu fenotipini meydana getirdiği ve AH'nun bu ikinci, bağımsız ve özgülleşmemiş gen tarafından meydana geldiği öne sürülebilir.

Durumu daha da karmaşıklaştıran bir başka bulgu Jenkins ve ark. tarafından bildirilmiştir. Bu grup, familial AH'lı kişilerden elde edilen hücrelerle Ebstein-Barr virüsünün in situ kromozomal hidridizasyonunu kullanmıştır. Burada 21, kromozom hidridizasyonuna ek olarak 9, kromozom hidridizasyonu da tesbit edilmiştir. Bu dizgenin doğal ortamda da geçerli olup olmadığını gelecekteki çalışmalar gösterecektir.

Bir başka çalışmada, monozigot ikizlerde AH konkordansının % 40 oranında olduğu ortaya koyulmuştur. Bu oran dizigot ikizlerdeki orana yakındır ve bu bulgu AH'nin tek otozomal dominant gen ile tam olarak açıklanamayacağını ortaya koymakta ve diğer olası mekanizmalar olan genetik değişim ve çevresel nedenleri de gündeme getirmektedir.

Amiloid Fibriller ve BAP Özeti:

Nöritik plaklar (NP) Alzheimer tarafından tanımlanan önemli bir histopatolojik işarettir. Bu yapılar sadece AH ve Down Sendromunda, bir de çok az sayıda normal yaşlarda görülür. NP, fibriller ve amiloid protein'den oluşmaktadır. Bu fibriller yapısal ve immunositokimyasal olarak eşleşmiş helezoni lifler (EHL)'den farklıdır.

Amiloid protein olan BAP prifiye edilmiş peptidden oluşur. Farklı boyutlardaki sentetik analogları, esas proteinde olduğu gibi beta-plak tabaka yapısında fibriller oluşturmaya eğilimlidirler.

BAP'ın aminoasit dizisinin elde edilmesi, moleküler genetik tekniklerinin AH'nın incelenmesinde kullanılmasına olanak tanımıştır. Bu yaklaşım, familial AH geninin 21.kromozomda yer aldığını göstermiştir. Bu kromozom bölgesi Down Sendrom fenotipi bölgesinin yanındadır. BAP geni bu bölgeye yakındır, fakat familial AH geninden farklıdır. Bu gen birçok insan ve diğer türlerin dokularında ortaya çıkar. BAP antikörleri yaşlı memelilerin beyinlerinde serebro-

vasküler amiloidi tanır. AH'da BAP geni dozajı artmadığı gibi, BAP mRNA düzeyleri de AH'da normalden daha azdır. BAP mRNA düzeyleri ve nörofibriller düğümler (NFD), nöritik plaklar (NP) ve serebrovasküler amiloidin yerleşim yerleri arasında doğrudan bir ilişki vardır. AH'nın açıklanmasında basit otozomal dominant gen varsayımının bazı ikiz çalışmalarıyla desteklenmediğini ve çevresel faktörlerin de bu hastalıkta rol oynayabileceğini hatırdan çıkarmak gerekir.

NFD ve NP'da Orta Bir Protein Var mı?

Yukarıda sözü edilen EHL ve amiloid fibrillerle ilgili veriler çok farklı olsa da, bazı son çalışmalar EHL, NFD ve NP'in amiloid fibrillerinin yani BAP'm temelini oluşturan tek bir protein olduğunu öne sürmektedir. Bu literatürde önemli tartışmalara ve zıtlıklara yol açmıştır (Anderton ve Willer ve Selkse).

EHL ve amiloid fibrillerin ultrastrüktür açısından çok farklı olduğu açıktır. Ayrıca, bu iki tip filament her zaman farklı hastalık durumlarında aynı anda bulunmazlar, 74 yaşından büyük AH vakalarının % 30'unda neokortekste hiç NFD saptanmamıştır. Örneğin, Guam parkinsonizm-demensisi, post ansefalitik parkinson hastalığı ve demencia pugilistica'da EHL'le beraber NFD görülmektedir. Bunlara karşın Masters, BAP'ın amiloid fibriller ve EHL'den zengin beyin fraksiyonlarından izole edilebileceği ve aminoasit dizisinin elde edilebileceğini bildirmiştir. Bu çalışmayla ilgili ilk eleştirilerde yazarlar Masters'm EHL fraksiyonlarının % 30-50 oranında saflaştırılmamış maddeden oluştuğunu öne sürmüşlerdir. Bu eleştirilerden sonra sadece EHL içeren Guam parkinsonizm demans beyni kullanılmıştır. Bu çalışmada EHL'in BAP içerdiği de bildirilmiştir. Her iki çalışmaya ait metolojik sorular ortaya atılmıştır.

Guam parkinsonizm-demensisi beyniyle elde edilen son verilere rağmen bazı sorulara yanıt verilmemiştir. Guam parkinsonizm-demensisindeki EHL AH'dakilerden ultrastrüktürel açıdan neden farklıdır? Neden AH'daki NP ve sentetik BAP antikörleri sadece NP ile reaksiyona girmektedir? Tau ve ubikitin gibi proteinlerin AH veya Guam-parkinsonizm-demensisinde görülen EHL'de varlığına ait bir bulgu tesbit edilmemesine rağmen, tau ve ubikitin EHL'm önemli komponentleri olduğuna dair önemli kanıtlar nasıl açıklanabilir? son olarak, neden immunolojik açıdan amiloid fibriller ve EHL çok farklıdır?

Özet olarak, amiloid fibrillerle EHL'in ortak bir proteine sahip oldukları varsayımı, temel olarak benzer aminoasit bileşimi ve her ikisinden de benzer küçük proteinlerin izole edilmesi gibi bulgulara dayanmaktadır. Total aminoasit bileşimi benzerlik göstermez, özellikle incelenen preparasyonlar saf değilse bu mümkün değildir. Bu saflaştırma eksikliği her iki fraksiyon la belli bir proteinin varlığını da açıklamaktadır. Bu yabancı madde problemi Guioy ve ark. tarafından ortadan kaldırılmış, farklı hastalıklar NP ve NFD varlığını değişkenliği, tau proteini EHL'e ve BAP'ı amiloid fibrillerle bağlayan immunositokimyasal kanıtlar ve açık ultrastrüktürel farklılık, tüm bunlar EHL ve amiloid fibrillerin özünü oluşturan ortak tek bir proteinin olmadığına kanıtlayan verilerdir.

NP ve NFD'in Kökenine Ait Varsayımlar:

AH'da NP ve EHL'in varlığı herkes tarafından kabul edilse de bu yapıların ayrıntılı bileşimi yukarıda tartışıldığı gibi oldukça gelişkilidir. Daha da gelişkili olan ise, AH beyinlerinde NP ve EHL'in nasıl biriktikiği sorunudur.

Birkaç farklı varsayım mevcuttur. Glenner, NP ve EHL'in oluşumundaki anahtarın serumdaki bir proteinde olduğunu öne sürmüştür. Vasküler amiloid birikmesinin anormal bir serum proteininden fibriller derivasyona bağlı olduğu bilgisinden yola çıkarak bundan sonraki hipotezi geliştirdi. BAP'a antijen yoluyla bağlı olan daha büyük bir protein normallerin, AH ve Down Sendromlu hastaların serumlarında tespit edilebilir. AH ve Down Sendromlulardakiler normal proteinin anormal izotopik bir varyantıdır. Serebral damarlar, kendilerine özgü metabolik sistemleri ve lizozom içermeleri nedeniyle, amiloid fibril oluşumuna yol açan anormal serum proteinini seçici olarak işler. Serebral damarlardaki amiloid fibril depolanma bölgelerinde kan beyin bariyerinde yavaş bir açılma olur. Miyakawa çalışmasında, incelenen tüm NP'in en az bir dejenerere amiloidli kapillerle ilişkili olduğunu bulmuştur. Kan-beyin bariyerinin açılması piramidal nöronları serum proteinleriyle ve amiloid proteinlerle karşılaştırması nedeniyle NFD oluşumu ile sonuçlanır. Glenner'e göre BAP hücre ortamı bozarak hücre içi EHL'in oluşumuna neden olur. Nöron ölümü ve nöronal artıkların proteolitik plak merkezlerinin oluşumuna yol açar. Bu modelin kendi içinde tutarlı olabilmesi için serebrovasküler amiloid'deki BAP'ın NP'deki 43 aminoasitin tümünü içerdığının gösterilmesi gereklidir, oysa şimdiye kadar 28 tanesi dizilebilmiştir. Öte yandan, NP'deki 43 aminoasit peptidin prekürsörünün serebrovasküler amiloid'deki 28 aminoasit peptid olduğunu ortaya koymak zor olabilir.

Bu varsayımın bir parçası olarak, BAP ile ortak antijenik özelliklere sahip anormal serum proteininin AH'da özgül bir kan testine temel olabileceği öne sürülmüştür. Bu amaçla birkaç monoklonal antikor incelenmiş de. Şimdiye dek tanı için bir serum protein testi geliştirilememiştir.

Selkoe, normal ve AH olanların plazmasında amiloid plak merkezine karşı poliklonal antiserumla karşılıklı reaksiyona giren 32 kd protein bulmuş fakat tanısal bir önemi olmadığı görülmüştür. Bu serum proteinine karşı oluşan antikorlar NP ve serebrovasküler amiloidi işaretlemektedir.

Pardridge ve ark. insan ve hayvan serumlarında ve insan BOS'unda, BAP poliklonal antikoruyla immunreaksiyona giren bir madde bulmuşlardır. İlginçtir ki, serum immunoreaktanı bir IgG'dir. Pardridge'in ortaya koyduğu gibi bunun yapay bir immunoreaktivite olduğu öne sürülmektedir. Selkoe'nun bildirdiğine göre Pardridge kontrol grubu ve AH'ın serum veya BOS'larında IgG yoğunluğunda bir farklılık bulunmamıştır. Down Sendromu serumda kontrolle-re oranla % 50 bir IgG fazlalığı saptanmıştır.

Selkoe AH ve Down Sendromunda, 21.kromozom üzerindeki beta-proteini kodlayan genin ekspresyonu veya bu gen ürününün metabolizmasına ilişkin anormal bir mekanizma öne sürmüştür. Bu anormallik amiloid fibril oluşumuna neden olmakta ve serebral ve meningeal damarları döşeyen endotel hücrelerce kontrol edilmektedir. Bu hızlanmış amiloid depolanması daha sonra temelen amiloid beta-proteinin nöronal toksitesi yoluyla NFD oluşumuna başlatı-

lır. Amiloid oluşumu, normal yaşlanmada da bir miktar meydana geldiğinden, Selkoe bu süreci normal yaşlanma sırasında "bir kontrolden kaçış" olarak tanımlamıştır. Bu varsayım daha önce Glenner tarafından ortaya koyulan ile uyum içindedir.

Dutsch-tipi amiloidozla birlikte olan herediter serebral hemorajili bir hastanın vasküler amiloiddeki BAP ile ilk 21 aminoasidi aynı olan bir proteinin varlığı Glenner ve Selkoe'nun varsayımını desteklemektedir. Çünkü, bu hastada amiloid, serebral damarlarda çok belirgindir, atipik NP'de amiloid daha azdır ve NFD hiç bulunmaz.

Master ve Guirouy EHL ve NP merkezlerinde A4 adını verdiği bir protein olduğunu bildirmişlerdir. Bu 4 kd bir proteindir ve N-ucu uzunluk heterojenliği dışında BAP ile aynı aminoasit dizisine sahiptir. Master, heterojenliği EHL'de en fazla, NP amiloidinde biraz daha az ve meningeal vasküler amiloidin ise homojen olduğunu ortaya koymuştur. Heterojenite derecesi yükseldikçe A4 monomerinin yaşı daha fazla olmaktadır. Masters'in senaryosuna göre A4 nöronal kökenlidir ve EHL'i oluşturan ilk yapılarıdır. Daha sonra, en son meydana gelen A4 nöronal dejenerasyon nedeniyle hücre dışı, boşluğa dökülmektedir. Sonuçta, fazla A4 kan damarlarının içi ve çevresinde depolanmış ve bunlar serebrovasküler amiloid dönüşecek olan en genç amiloidi oluşturmaktadır. Buna karşın, Pardridge parenkim-içi vasküler amiloidin heterojen olduğunu bulmuştur. Bu vasküler heterojenite Masters'in senaryosunu desteklemez.

Özet ve Sonuçlar:

Alzheimer hastalığı, kişisel açılara neden olan ve ulusal ekonomi açısından oldukça pahalı ve sık karşılaşılan bir hastalıktır. Etiyolojisi bilinmemektedir. Tanısı, otopside görülen nöritik plaklar ve nörofibriller düğümler gibi özgül neuropatolojik yapılar aracılığı ile koyulur. Ölümden önce tanı kesin değildir, ve vakaların % 20'sinde yanlışır.

Çok sayıda görülen nöritik plaklar Alzheimer hastalığı ve Down Sendromuna özgüdür. NP, beta-amiloid protein denilen 43 aminoasitlik bir proteinden meydana gelirler. Beta-amiloid proteini kodlayan gen 21.kromozomda, Down Sendromuna yol açan genlerin bulunduğu bölgeye yakındır, fakat familial AH geninden farklıdır. Beta amiloid protein geni hücre yüzeyi reseptörünün birçok özelliğine sahip 695 aminoasitlik bir proteini kodlar. Bu genin bir çok tür ve dokuda yer alması, Alzheimer hastalığı için bir kan testinin mümkün olduğunu ima etmektedir.

Nörofibriller düğümler Alzheimer hastalığından başka birkaç hastalıkta da görülmekte ve nöronal bozulmaya daha az özgül cevap olarak değerlendirilmektedir. NFD normal hücre iskeleti proteinleriyle karşılaştırılmış olan eşleşmiş helezoni liflerden oluşmuştur. Eşleşmiş helezoni lif merkezindeki proteinlerin kimyasal bileşimi bilinmemekte, fakat bu merkezi proteinlerin modifiye mikrotubulusa-bağlı-protein-tau ile yakından ilişkili olduğu ortaya konulmuştur. Bazı araştırmacılar EHL'in de beta-amiloid proteinlerden oluştuğunu öne sürmekte fakat bu durum henüz tartışmalıdır.

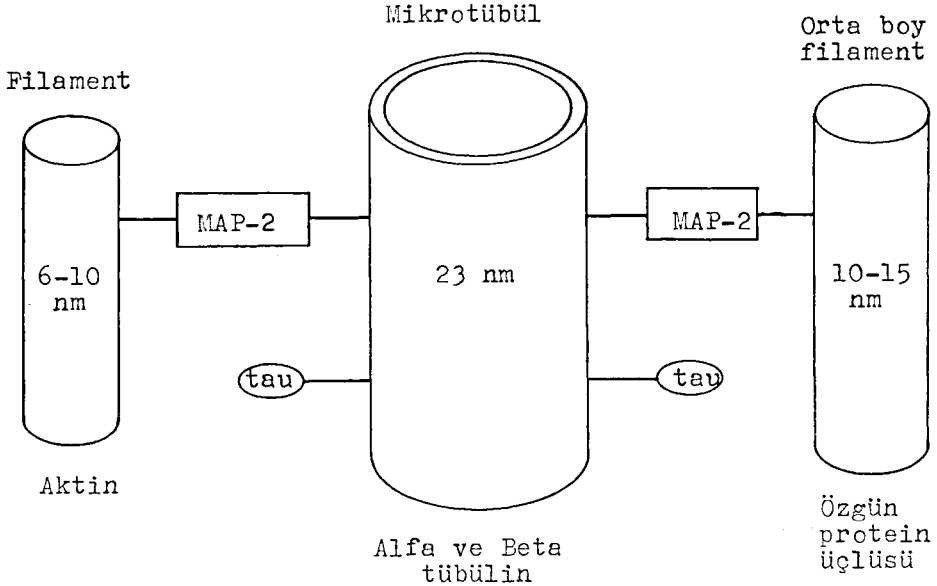
Nörofibriller düğümler ve nöritik plakların kökeni de hala kesin olarak tespit edilmemiştir, fakat bazıları beta-amiloid protein metabolizmasının düzenlenmesinde bir bo-

zukluğun esas sorumlu olduğu ve nörofibriller düğümlerin Alzheimer hastalığı ve Down Sendromu'nun yamsıra bazı hastalıklarda ortaya çıkan nöronal harabiyetin nonspesifik bir sonucu olduğunu iddia etmektedirler.

Alzheimer'li hasta beyinlerde görülen anormal filamentöz proteinler ile hastalık sürecinin ilişkisine ait bazı önemli sorulara halen yanıt verilmemiştir. Bu proteinlerin birikmesi doğrudan hücre ölümü, nörotransmitter eksiklikler ve demansa mı neden olmaktadır? Nörofibriller düğümler, nöritik plaklar ve serebrovasküler amiloid le ortaya çıkan

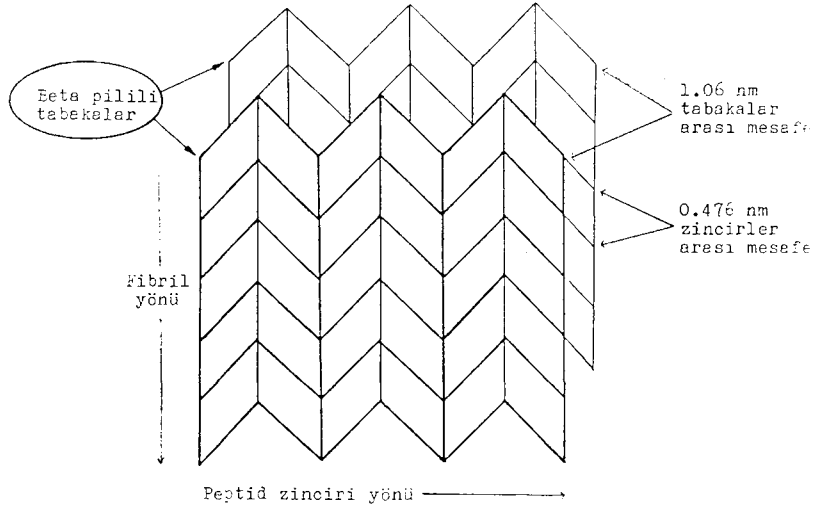
anormal protein birikmesi esas hastalık sürecinde yan-faktörler midir? Bu proteinlerin birikmesi primer hastalık sürecini gösterse de, demans ortaya çıkmadan önce bu anormal durumu tesbit edebilmeye ne kadar yaklaşmış durumdayız?

Şu anda, bu sorulara kesin bir yanıt verilmemiştir, fakat bu gözden geçirme yazısında sunulan bulgular, bu filamentöz proteinlerin oluşumunun Alzheimer hastalığında ortaya çıkan patolojik ve klinik değişikliklerde önemli ve gerekli bir adım olduğunu ortaya koymaktadır. Sonuçta, bu bulgular, yakın gelecekte, tanı ve tedaviye yönelik araştırmaların odağını oluşturacaktır.

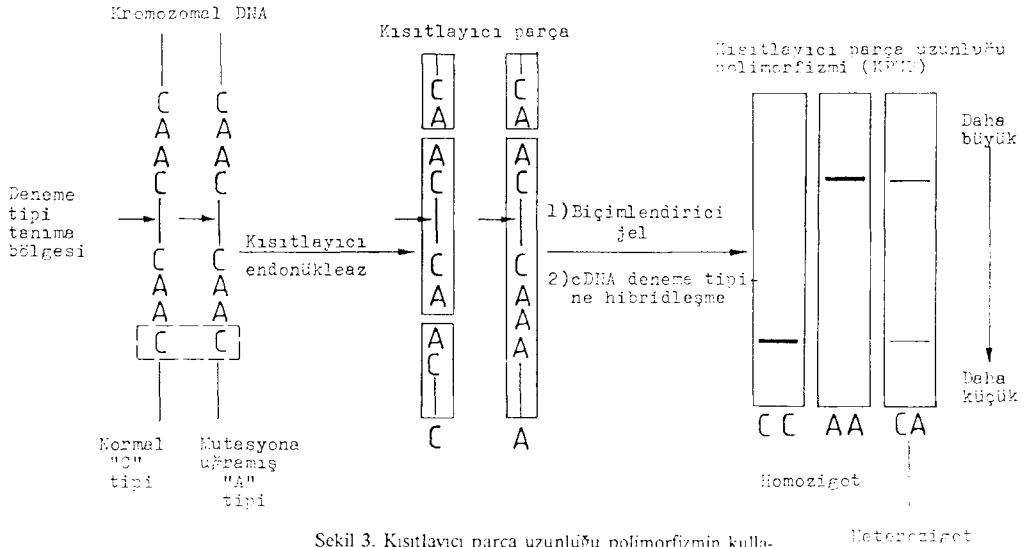


Şekil 1: Mikrotubule bağlı proteinlerin varsayımsal ara bağlantıları ve görelî boyutlarını ortaya koyan normal hücre iskelet proteinleri.

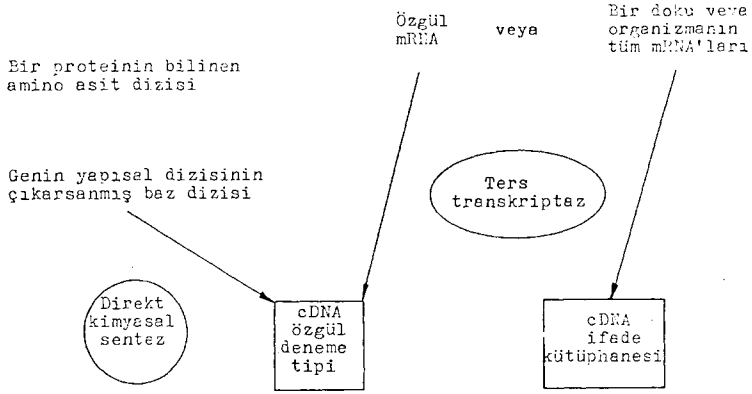
BAP Fibril Modeli



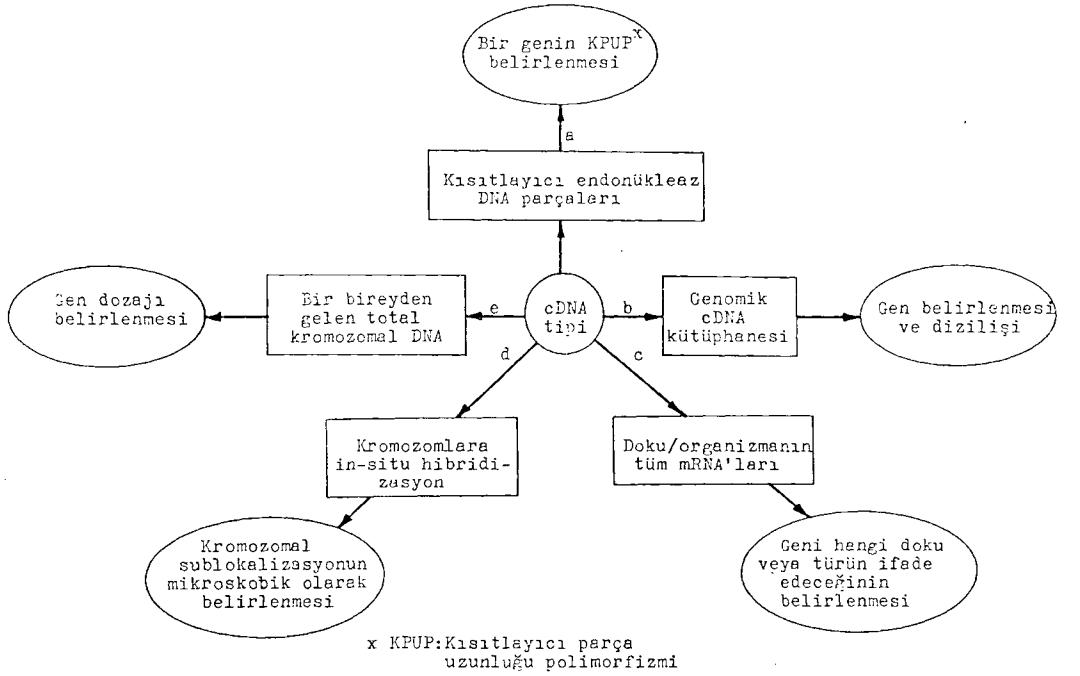
Şekil 2: 2 beta-pilili tabakanın diagramı. Burada tabakalararası mesafenin 1.06 nm, zincirlerarası mesafenin 0.476 nm olduğuna dikkat ediniz.



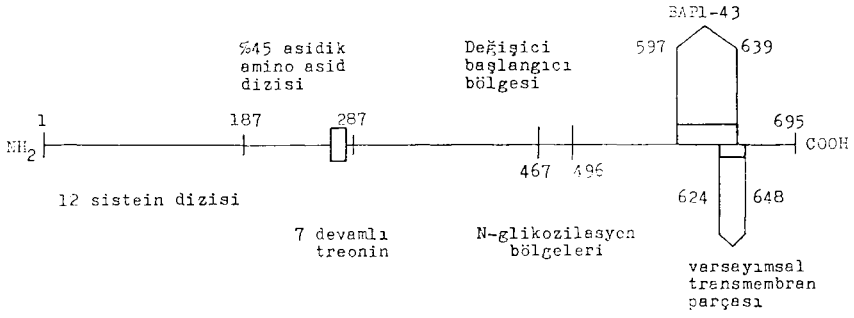
Şekil 3. Kısıtlayıcı parça uzunluğu polimerizmi kullanıma ait temel öğeler (*) yıldız DNA deneme tipine bağlanacak baz dizisini göstermekte, ince çizgi binlerce baz çiftini göstermektedir. DNA tek çizgi olarak gösterilmektedir. Kısıtlayıcı enzimin kullanımı özel DNA parça grupları ortaya çıkarmaktadır. Bunlar "biçimlendirici jel" üzerinde ayrılmaktadır. Bütün parçalar jel üzerinde yer alsa da, sadece radyoaktif işaretli DNA deneme tipi ile bağlanmalar görülmektedir. Homozigotların 2 benzer parçası, heterozigotların her iki parçası vardır.



Şekil 4: Özgül DNA deneme tipleri ve DNA "kütüphanesi" sentez metodları. DNA, özgül mRNA kalıbı kullanılarak ters transkriptaz enzimi (RNA'dan DNA yapan enzim) ile sentezlenebilir. (Metne Bakınız).



Şekil 5: DNA'nın kullanımı:



Şekil 6: BAP'm varsayımsal prekürsörünün çizimi, bu proteinin temel özelliklerini gösterir.