

# Kalsinörin Mekanizması ve Kalsinörin İnhibitörlerinin Alzheimer Hastalığının Tedavisindeki Önemi (Kalsinörin ve Alzheimer Hastalığı)

## Mechanism of Calcineurin and Importance of Calcineurin Inhibitors in the Treatment of Alzheimer's Disease (Calcineurin and Alzheimer's disease)

\* Fatma Gonca KOÇANCI  
\* Belma ASLIM

\* Gazi Üniversitesi, Fen  
Fakültesi, Biyoloji Bölümü,  
Teknikokullar, Ankara

### Öz

Alzheimer hastalığı (AH), hafızanın sürekli bir şekilde azalması ile karakterize olan, tedavi edilemeyen, yaşa bağlı nörodejeneratif bir hastalıktır. AH'nin nedenleri tam olarak açıklanamamış olsa da, tau proteinlerinin hiperfosforilasyonunun, mikrotübül stabilizasyonun ve iyon dengesinin bozulmasının, inflamasyon oluşumunun ve apoptozun AH ile ilişkili olduğu bilinmektedir. AH tedavisi için hali hazırda geliştirilen ilaçlar olmasına rağmen, bunlar ancak semptomları yavaşlatarak hastalığın ilerlemesini geciktirmektedir. Mevcut ilaçların klinik çalışmalarda ve pratikte yararları minimaldir ve hiçbiri tam anlamıyla bir tedavi sağlayamamaktadır. Bu nedenle, AH üzerinde etkili olacak koruyucu ve tedavi edici potansiyeli olan yeni ajanların belirlenme çalışmaları önemli bir araştırma alanı haline gelmiştir. Bir treonin ve serin protein fosfataz olan kalsinörin, AH'de hiperaktivasyonunu kanıtlayan *in vitro*, *ex vivo* ve hayvan modellerine ilişkin bilgiler giderek artmaktadır. Bu derleme, kalsinörin mekanizmasını, AH'de görülen kalsinörin hiperaktivitesine ait kanıtları ve AH tedavisinde bir umut ışığı olarak kalsinörin inhibitörlerinin bellek onarımında, anti-inflamasyonda, tau defosforilasyonunda ve anti-apoptozda nasıl etki ettiğine dair ayrıntıları içermektedir.

**Anahtar Kelimeler:** Alzheimer hastalığı, kalsinörin, kalsinörin inhibitörleri

### Abstract

Alzheimer's disease (AD) is an untreatable age-related neurodegenerative disease characterized by progressive loss of memory. Although the exact cause(s) of AD is not well-understood, it is known that AD is associated with hyperphosphorylation of tau protein, disruption of microtubule stabilization and ion balance, development of inflammation and apoptosis. Although there are some drugs that currently being developed for the treatment of AD, they only delay the disease progression by alleviating the symptoms. The benefits of existing drugs in clinical trials and in practice are minimal and they do not provide a cure for these conditions. For this reason, studies on the particularly determination of new agents that have preventive and therapeutic potential on the AD become an important research field. There is growing amount of information from *in vitro*, *ex vivo*, and animal models, that evidence for hyperactivation of calcineurin, which is a threonine and

### Yazışma Adresi:

Uzm.Bio Gonca Koçancı, Gazi Üni.,  
Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü,  
06500, Teknikokullar/Ankara,  
Tel: (0312) 202 11 84  
Fax: (0312) 212 22 79  
E-mail: goncaok@gmail.com

serine protein fosfatase, in AD. This review details the evidence of calcineurin hyperactivity in AD and how calcineurin inhibitors, as a beacon of hope for treatment of AD, could manifest as memory repairment, anti-inflammation, tau dephosphorylation, and anti-apoptosis.

**Keywords:** Alzheimer's disease, calcineurin, calcineurin inhibitors

## Giriş

Alzheimer hastalığı (AH), 1906 yılında Dr. Alois Alzheimer tarafından karakterize edilen, merkezi sinir sisteminin (MSS) çeşitli kısımlarında nöron ve sinaps kayıpları nedeni ile ortaya çıkan; bilişsel işlevlerde azalma, öz bakım yetersizlikleri, çeşitli nöropsikiyatrik ve davranışsal bozukluklar ile karakterize, progresif nörodejeneratif bir hastalıktır (1). 2015 Dünya Alzheimer Raporunda (2) belirtildiği üzere, bu gün dünya çapında yaklaşık 46 milyon Alzheimer ya da demans vakası bulunduğu bilinmektedir. Bu rakamın 2030 yılında 74,7 milyon; 2050 yılında ise 131,5 milyon olması beklenmektedir. Alzheimer ve demansın küresel maliyetinin tüm dünyanın gayri safi milli hasılanın %1'ine denk geldiği tahmin edilmektedir. Bu rakam, depresyon, hipertansiyon, diyabet ve iskemik kalp hastalığına harcanan maliyetin üzerindedir (2). Günümüzde AH tedavisi için Food and Drug Administration (FDA) (Amerikan İlaç Dairesi) tarafından onaylanmış ilaçlar olmasına rağmen, (donepezil, rivastigmin, galantamin ve memantin) mevcut ilaçlar ancak semptomları yavaşlatarak hastalığın ilerlemesini geciktirmekte; tam anlamıyla bir koruma ve tedavi sağlayamamaktadır (3). Bunun yanında, kullanılmakta olan ilaçların bulantı, kusma, ishal baş dönmesi, baş ağrısı gibi yan etkileri de tespit edilmiştir (4). Bu nedenle, AH'nin tedavisine yönelik klinik, epidemiyolojik ve deneysel çalışmalar, alternatif ilaçların keşfi ve tedavi yöntemlerinin ortaya konulması üzerine yoğunlaşmıştır. Protein fosfataz 2B (PP2B) olarak da bilinen ve tüm ökaryotlarda korunmuş bir treonin ve serin protein fosfataz olan kalsinörin proteininin, AH fizyopatolojisinde tanımlanan durumlara eşlik ettiği bildirilmiştir. Kalsinörin substratları arasında AH ile ilişkili proteinlerden; aktive T hücrelerinin nükleer

faktörünün fosforile formları (NFAT); mikrotübüle bağlı protein olan tau; glikojen sentaz kinaz-3 beta (GSK-3β) ve Bcl-2 ilişkili ölüm proteinlerinin olduğu listelenmiştir (5). Kalsinörin mekanizmasında blokasyona sebep olan kalsinörin inhibitörleri ise AH tedavisi ve/veya önlenmesinde yeni bir umut ışığı olmuştur. Bu derleme makalede kalsinörin yapısı, AH oluşumu üzerindeki etki mekanizmaları ve kalsinörin inhibitörlerinin AH önlenmesindeki/ tedavisindeki önemi ortaya konulacaktır.

## 2. Genel Bilgiler

### 2.1. Kalsinörin yapısı

İlk 1976 yılında tespit edilmiş olan kalsinörin, 1979 yılında Klee ve arkadaşları tarafından (6), sığır beyin ekstraktından saflaştırılmış ve sinir sisteminin kalsiyum ( $Ca^{2+}$ ) ve kalmodulin bağlayıcı proteini olarak tanımlanmıştır. Sinir sisteminde lokalizasyonu ve  $Ca^{2+}$  bağlama özelliği temelinde "kalsi" ve "nörin" kelimelerinin birleşimiyle isimlendirilmiştir (6).

### 2.2. Kalsinörin fonksiyonları

Kalsinörin aktif bölgesi, demir ( $Fe^{2+}$ ) ve çinko ( $Zn^{2+}$ ) iyonlarının defosforilasyonundan sorumludur. Kalsinörin inaktif formunda katalitik domein, substrata erişimin engellenmesi için, otoinhibitör domein tarafından baskılanmış durumdadır. Hücre içi  $Ca^{2+}$  artışı, kalmodulini aktive ederek spesfik domeine bağlanmasını ve otoinhibitör domeinin aktif bölgeden ayrılmasını sağlayarak kalsinörini aktive edici yapısal değişikliklerin oluşmasını tetiklemektedir. Kalsinörin,  $Fe^{2+}$  molekülünün oksidasyonu ile tersine bir şekilde inaktive edilebilmektedir (7, 8).

İlk yapılan çalışmalarda fosfodiesteraz aktivitesini inhibe edici özelliğinden dolayı kalsinörin, fosfodiesteraz aktivitesini düzenleyici bir alt birim olabileceği öne sürülmüştür (9). Sonraki çalışmalar, kalsinörin, siklik nükleotid fosfodiesteraz ve adenilat siklazın  $Ca^{2+}$ / kalmodulin bağımlı izoenzimlerini inhibe ettiğini göstermiştir (10). Kalsinörin en çok beyin ve sinir sisteminde ifade olduğu tespit edilmiş olmasına karşın çalışmalar, bu fosfatazın tüm hücrelerde ifade olduğunu göstermiştir. Kalsinörin nöron ve kas

gelişimi, lenfosit aktivasyonu, kalp hipertrofisi, iskelet kas lifi çeşitlerinin geçişi ve iyon kanallarının ifadesi de dâhil olmak üzere çeşitli fizyolojik ve patolojik süreçlerde rol oynadığına dair bulgular açığa çıkmıştır (11).

### 2.3. Kalsinörin Alzheimer Hastalığı İle İlişkisi

AH, farklı histopatolojik lezyonlar eşliğinde bilişsel fonksiyonlarda ve hafızada işlev kaybı ile karakterize, ilerleyici semptomatik bir durumdur. AH'nin nöropatolojisini oluşturan değişiklikler arasında, tau proteininin hiperfosforilasyonu sonucunda oluşan nörofibriler yumaklar (NFY), nöronlar arasında anormal miktarda amiloid- $\beta$  (A $\beta$ ) birikmesi sonucunda oluşan senil plaklar, nöron kaybı, sinaps kaybı, kolinerjik inovasyon kaybı, gliyozis ve inflamasyonun yer aldığı gösterilmiştir (12).

1994'te AH için önemli bir model olan "kalsiyum hipotezi" ortaya atılmıştır (13). Bu hipotezde, hücrelerin kalsiyum düzeylerinde oluşan dengesizliğin, nörodejeneratif hastalıklardaki sinyal yolağı hasarları ve nöronal bozulmalardan sorumlu olabileceği ileri sürülmüştür. 2004'te ise, O'Day ve Myre (14) "kalsiyum hipotezi"nin bir uzantısı olarak "kalmadulin hipotezi"ni önermiştir. Bu hipotezde, A $\beta$  üretiminin, bir dizi kalsiyum-bağlayıcı protein tarafından düzenlenebileceği ileri sürülmüştür. Ca<sup>2+</sup>/kalmadulin bağımlı fosfataz olan kalsinörin hiperaktivasyonu, çeşitli AH modellerinde bildirilmiş ve anormal Ca<sup>2+</sup> sinyalizasyonunun kalsinörin ve kalmadulin arasındaki etkileşimi bozarak tau fosforilasyonunu ve nöron ölümünü arttırdığı ileri sürülmüştür. Erken ve geç başlangıçlı AH'li insan doku çalışmalarından elde edilen sonuçlarda, hem sporadik hem de ailesel AH patogenezinde merkezi bir faktör olarak kalsinörin hiperaktivasyonunun gerçekleştiği kanıtlanmıştır (5). AH'li kişilerde sağlıklı kişilere kıyasla fosfataz aktivitesinin azalmış olduğu; bunun aksine, kalsinörin aktivitesinin prefrontal bölgede anlamlı olarak yüksek olduğu tespit edilmiştir (15). Ayrıca AH modelleri ve patogenezi üzerinde yapılan çalışmalar, kalsinörin hiper aktivasyonunun, AH belirteçleri arasında sayılan sinaptik etkinlikteki azalma, sinaptik kayıp, tau hiperfosforilasyonu, A $\beta$  peptidinin hücre dışı alanlarda birikmesi, nöronal inflamasyon ve hücre ölümü ile ilişkili olduğunu da göstermiştir (5).

### 2.3.1. Kalsinörin Tau Protein İlişkisi İle AH Oluşumundaki Rolü

Mikrotübüllerin stabilizasyonu, hücre iskeletinin bütünlüğü ve aksonal transportta önemli rol alan tau proteininin, AH patogenezinde hiperfosforilasyona uğradığı ve mikrotübüllere bağlanma yeteneğinin bozulduğu, sonuç olarak nörofibriler yumaklar (NFY) şeklinde biriktiği tespit edilmiştir. NFY'lerin yapısal incelemeleri de, bunların çiftlenmiş helezon şeklinde liflerden (PHF) meydana geldiğini ve PHF'lerin tau proteininin hiperfosforilasyona uğramış formunun ana elamanı olduğunu göstermiştir (16). AH'li hayvan modellerinin ve AH'li insanların, postmortem beyin dokularında yapılan çalışmalarda, tau tiplerinin büyük oranda hiperfosforile olduğu tespit edilmiştir (17).

Kalsinörin ve tau ilişkisinin araştırıldığı ilk çalışmalar, kalsinörin tau proteinini defosforile edebileceği ve kalsinörin aktivitesindeki azalmanın da tau hiperfosforilasyonuna sebep olabileceği hipotezinin ortaya atılmasını sağlamıştır. Fakat bu hipotezin tam tersini düşündüren sonuçlar da mevcuttur. AH'li kişiler ile yaşları eşleştirilmiş kontrol gruplarının postmortem beyin dokularında kalsinörin aktivitesinin karşılaştırıldığı çalışmalarda, hipotezin aksine AH'li beyin dokularında kontrole kıyasla üç kat fazla kalsinörin aktivitesi tespit edilmiştir (18). Ayrıca, AH'li beyin dokularında, nörofibriler yumakları çevreleyen nöronların yüksek kalsinörin immünreaktivite gösterdiği de tespit edilmiştir (19). Bu durum, araştırmacıların kalsinörin ve tau proteini arasındaki ilişkiyi tekrar ele almalarına neden olmuştur. Bu yönde yapılan bir çalışmada bazal Ca<sup>2+</sup> seviyelerinde, kalsinörin-tau etkileşiminin gerçekleştiği; fakat hücre içi Ca<sup>2+</sup> artışının söz konusu olduğu durumlarda, aktive olan kalmadulinin, kalsinörine bağlanarak, kalsinörin-tau etkileşimini bozduğu tespit edilmiştir (5). Bu sonuçlar, artan Ca<sup>2+</sup> seviyesinin, bir yandan kalsinörin aktivasyonuna sebep olurken, diğer yandan taunun kalsinörin aracılı defosforilasyonun inaktivasyonuna sebep olduğunu açıklar niteliktedir. Dolayısıyla, bu durum kalsinörin aktivitesindeki artışın, tau proteininin hiperfosforilasyonuna neden olabileceğini göstermektedir.

### 2.3.2. Kalsinörinin Amiloid $\beta$ İlişkisi İle AH Oluşumundaki Rolü

Kalsinörinin, AH'nin bir diğer belirteci olan senil plaklar ile de ilişkili olabileceği tespit edilmiştir. Senil plaklar, A $\beta$  peptidinin hücre dışı alanlarda birikmesi sonucu oluşan yapılardır. A $\beta$ , 21. kromozomda kodlanan ve bir transmembran protein olan amiloid prekürsör proteininin (APP) metabolik ürünüdür. Başlangıçta, APP, 99 amino asitlik bir karboksi terminal fragmanını (CTF-99) ve çözünebilir amiloid prekürsör proteini  $\beta$ 'yi ( $sAPP\beta$ ) oluşturmak üzere  $\beta$ -sekretaz ile; daha sonra ise CTF-99, A $\beta$  ve APP hücre içi domeinini oluşturmak üzere  $\gamma$ -sekretaz ile parçalanır (20).  $\beta$  ve  $\gamma$ -sekretazlar sonucu ortaya çıkan A $\beta$  peptidinin, serebral neokortekste senil plaklar şeklinde birikmesi, AH'nin kesin tanısındaki belirteçlerden biridir. Hüresel bölgelerde artan A $\beta$ 'nin mitokondriyal ve sinaptik hasara sebep olarak nöronal dejenerasyona yol açtığı bildirilmiştir (21). Ayrıca, artan A $\beta$  seviyelerinin, hücre içi Ca<sup>2+</sup> düzeylerini etkileyerek kalsinörin hiperaktivitesine yol açabildiği de belirtilmiştir (22). AH'li fare modellerinde yapılan bir çalışmada, A $\beta$  toksisitesinin kalsinörinde hiperaktiviteye yol açtığı, bu hiperaktivitenin, sinaptik plastisitede, nöronal apoptozda ve davranışsal bozukluklarda artışa; dendrit boyunda, dendritik absorpsiyonunda ve nöritik distrofide ise azalmaya sebep olduğu gösterilmiştir (23). A $\beta$ 'nin ve kalsinörinin nöronların canlılığı üzerinde de merkezi bir rol oynadığı kaydedilmiştir. Nöronal kültürlerde uzun süreli A $\beta$  muamelesinin, apoptozisi teşvik ettiği bilinmektedir. Kalsinörinin, apoptozisde anahtar rol oynayan ve Bcl-2-ilişkili ölüm promoteri olan Bad proteininin defosforilasyonunda etkili olarak, apoptozisi teşvik ettiği bildirilmiştir. Kalsinörin tarafından defosforile olan Bad proteinin, mitokondriye geçiş yapabildiği, burada pro-apoptotik dimerleri oluşturabildiği, mitokondriden sitokrom c salınımını tetikleyebildiği ve programlanmış hücre ölümünü başlatabildiği bildirilmiştir (24).

### 2.3.3. Kalsinörinin Nöral İnflamasyon İlişkisi İle AH Oluşumundaki Rolü

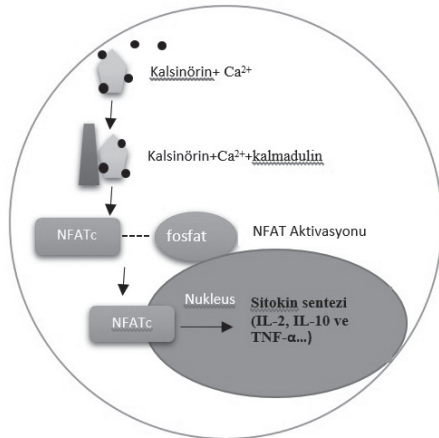
AH'nin gelişiminde inflamasyon süreçlerin etkili olduğu ve kalsinörinin, inflamasyonu yönlendiren elemanların regülasyonunda görev aldığı yapılan

çalışmalar ile kanıtlanmıştır. Merkezi sinir sistemi ile ilgili çoğu hastalıkta, bağışıklık sistemi hücrelerinden olan astrosit ve mikrogliaların aktive olduğu, aktive olmuş glial hücrelerin, AH'de görülen amiloid plakların oluşumuyla ilişkili olduğu bildirilmiştir (25). Aktive olmuş astrositlerin, inflamasyon ve oksidatif stres belirteçleri olup, sitokinlerin aşırı ifade edilmesinde etkili olduğu belirlenmiştir (26). Nöronlardaki pro-inflamatuar sitokin seviyelerinin aşırı yükselmesinin, sitotoksositeye yol açtığı ve AH gibi nörodejeneratif hastalıkların oluşumunda etkili olduğu bildirilmiştir (27).

Primer sıçan hipokampal kültürlerine aktive edilmiş kalsinörin transferinin, astrosit somatada belirgin bir kalınlaşma ile sonuçlandığı gösterilmiştir. Normal yaşlanma süreçlerindeki ve AH modeli farelerdeki hipokampus/neokortekste yapılan immünohistokimyasal çalışmalar da, aktive astrositlerde yoğun bir kalsinörin boyanmasının olduğunu göstermiştir (28). Normal beyinlerdeki nöronlarda, kalsinörinin çok zayıf şekilde ifade edildiği, buna karşılık beyin yaşlanmasında ve AH modellerinde görülen hücre içi Ca<sup>2+</sup> seviyesinin yükselmesi ile sonuçlanan nöronal Ca<sup>2+</sup> düzenlenmesi ve sinyalizasyonunun, nöronlardaki kalsinörin aktivitesini arttırdığı yapılan mikroarray çalışmaları ile saptanmıştır (29). Ca<sup>2+</sup> ve kalmadulin tarafından aktive edilen kalsinörinin, bağışıklık sisteminin en önemli elamanlarından biri olan T hücrelerini etkinleştiren bir enzim olduğu ve transkripsiyon faktörler ailesinin bir üyesi olan aktive edilmiş T hücrelerinin nükleer faktörünü (NFAT) defosforile ettiği kanıtlanmıştır (30). Defosforile olan sitosolik NFAT'ın (NFATc), aktif hale geçerek, interlökin 1 beta (IL-1 $\beta$ ), IL-2-6, IL-8, IL-10, IL-13, interferon gama (IFN- $\gamma$ ) ve tümör nekroz faktör alfa (TNF- $\alpha$ ) gibi proinflamatuar sitokin genlerinin ekspresyonunu sağlamak için çekirdek içine transloke olduğu da bilinmektedir (31). Kalsinörinin, bağışıklık sistemi hücrelerinde çeşitli sitokinlerin ve pro-inflamatuar faktörlerin (IL-1 $\beta$ , IL-2-6, IL-8, IL-10, IFN- $\gamma$  ve TNF- $\alpha$ ) seviyelerinde artışa sebep olduğu da kanıtlanmıştır (32) (Şekil 1).

IL-1 $\beta$ 'nin aşırı üretiminin, hipokampal nöronlarda indüklenebilir nitrik oksid sentaz (iNOS) üretimini tetiklediği, artan nitrik oksid düzeylerinin ise, nöronal

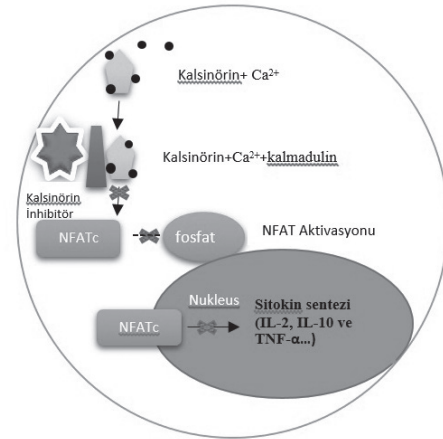
hasar ve ölüm süreçlerinde rol oynadığı kaydedilmiştir (33). Pleiotropik etkilere sahip bir sitokin olan IL-6'nın, özellikle senil plak formasyonunun erken basamaklarında görev aldığı, aşırı miktarlarda üretilen IL-6'nın, gliosis ve hipokampustaki kolinerjik iletinin bozulması gibi nöropatolojik durumla ilişkili olduğu, merkezi sinir sistemi enfeksiyonu, travmatik beyin hasarı, AH ve parkinson hastalığı da dahil olmak üzere çeşitli nörolojik bozukluklar ile ilişkili olduğu bilinmektedir (34). AH'lilerin beyin omurilik sıvısındaki IL-1 $\beta$  düzeyleri, vasküler demans hastaları ile kontrol grubuna göre belirgin ölçüde yüksek bulunmuştur (35). TNF- $\alpha$ 'nın, aşırı ifade edilmesinin doğrudan nöronal hücre ölümüne neden olduğu da kanıtlanmıştır (36). Walker (37) ve McGeer (38), AH'li beyin dokularında IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , seviyelerinde artış olduğunu kanıtlamıştır. AH'de gelişen nöroinflamasyon, tau proteininin hiperfosforilasyonu yoluyla NFY'lerin oluşmasına da neden olabilmektedir. Ayrıca IL-1, IL-6 ve nitrik oksidin, tau hiperfosforilasyonu ve NFY oluşumunda etkili olduğu da *in vitro* olarak kanıtlanmıştır (39). Tüm bu bulgular, kalsinörin mekanizmasının AH gelişiminde tek bir mekanizma üzerinde etkili olmayıp daha ziyade çoklu yollar vasıtasıyla etki edebileceğine dair bir kanıt niteliğindedir.



**Şekil 1:** Kalsinörin ve Ca<sup>2+</sup> kompleksinin NFATc tarafından sitokin sentezinin aktivasyonu üzerine etkisi

## 2.4. Kalsinörin İnhibitörleri ve Etki Mekanizmaları

Bağışıklık sistemi, potansiyel patojenlere karşı organizmanın bütünlüğünü sağlamak için işlev gören, özgül ve özgül olmayan, hücresel ve humoral faktörlerin karmaşık bir ağıdır. Bağışıklık sistemi, normalde organizmanın yararına etki gösterirken, organ transplantasyonlarında doku reddine sebep olabilen ve potansiyel hayat kurtarıcı tedavi seçeneklerinin uygulanmasını ciddi anlamda sınırlandırıcı etki gösterebilen komplikasyonlardan biridir. Zararlı ve uygunsuz immün yanıtın bastırılması, bu tip sorunların çözümünde önemli derecede etkili bir yoldur. Bağışıklık sistemini baskılayan ilaçların en yaygın olarak kullanılan sınıfı, kalsinörin inhibitörlerdir. Kalsinörin inhibitörlerin, kalsinörin-Ca<sup>2+</sup>-kalmazdulin kompleksine bağlanarak kalsinörin aktivasyonunu baskıladığı, dolayısıyla, NFATc'nin defosforilasyonu ve nükleusa translokasyonunun engellendiği kanıtlanmıştır. Böylece proinflamatuvar sitokinlerin ekspresyonu baskılanmış olur (Şekil 2).



**Şekil 2:** Kalsinörin inhibitörlerinin sitokin sentezini baskılaması

Kalsinörin endojen düzenleyicisi olan bazı proteinlerin, kalsinörin inhibitör özellik gösterdiği belirlenmiştir. İnsanda 14q21-q24 bölgesinde bulunan AKAP5 geni tarafından kodlanan bir A kinaz demirleyici proteini olan AKAP79 proteini, keşfedilen

ilk kalsinörin inhibitörüdür. AKAP79 proteininin, cAMP bağımlı protein kinaz (protein kinaz A), kalsinörin ve protein kinaz C (PKC)'nin nöronlardaki yoğunluklarını belirlediği bilinmektedir (40).

İnsanda 22. kromozomda bulunan CABIN1 geni tarafından kodlanan, 240 kDa'luk nükleer bir protein olan ve kalsinörin bağlama proteini olarak bilinen Cain/Cabin1 proteininin de kalsinörin inhibitör olarak görev yaptığı bilinmektedir. Bunlar kalsinörin homolog proteinlerdir (KHP) ve kalsinörin B yapısına benzerlik gösterirler (45). KHP'ler kalsinörin A'ya bağlanmak için kalsinörin B ile rekabete girerler ve kalsinörin A'nın Ca<sup>2+</sup> bağımlı aktivasyonunu engellerler. Bu proteinlerin fizyolojik rolü henüz belli olmamakla birlikte, Cabin grubu proteinlerin kalsinörine bağlandığında, kalsinörünün fosfataz aktivitesinin inhibisyona uğradığı tespit edilmiştir (41). Cabin'in aşırı ekspresyonunun, kalsinörin duyarlı elemanların transkripsiyonel aktivasyonunu ve NFAT'ın defosforilasyonunu engellediği bildirilmiştir (42). Bu sonuçlar, Cain/Cabin proteinlerinin, kalsinörin sinyali üzerinde negatif düzenleyici bir rolünün olduğuna işaret etmektedir.

Bazı virüslerin, özellikle Afrika domuzu ateşi virüsü, genomunda bulunan A238L proteininin de kalsinörine bağlanarak NFATc translokasyonunu engelleme yoluyla kalsinörin inhibitör etki gösterdiği tespit edilmiştir (47). A238L proteininin, kalsinörin etkileşim domeini bakımından NFATc aile üyeleri ile sekans benzerliğinin olduğu belirlenmiştir (42).

21. kromozomda bulunan ve Down sendromu olan bireylerde aşırı ifade edildiği bilinen kalsinörin regülatör 1 (RCAN1) (DSCR1 olarak da bilinmektedir) geninin de kalsinörin endojen düzenleyicisi olarak kalsinörin inhibitör etkisinin olduğu kanıtlanmıştır (44). RCAN1'in beyin, bağışıklık sistemi, kalp ve iskelet gelişimini etkilediği de kanıtlanmıştır. Ayrıca, mental retardasyon, kas hipotonisi ve immün yetmezliğin de dâhil olduğu tüm Down sendromu karakteristik patolojilerinde de indükleyici etkisinin olduğu düşünülmektedir. Down sendromlu hastalara benzer şekilde Alzheimer hastalarında da RCAN1'in aşırı ifade edildiği tespit edilmiştir. RCAN1'in düşük ya da yüksek dozlarda farklı fonksiyonlarının olduğu

kanıtlanmıştır. RCAN1'in düşük düzeylerde ifade edildiğinde, kalsinörin inhibitörü olarak çalıştığı, NFATc'nin çekirdek içine translokasyonunu engelleyerek nöral inflamasyonun ve apoptozun oluşumunda baskılayıcı etki gösterdiği belirlenmiştir. Buna karşılık, hücre içi RCAN1 düzeyinde meydana gelen artış ile kalsinörin-NFAT sinyalizasyonunu kolaylaştırıcı bir özellik kazandığı bildirilmiştir (45). RCAN1'in aşırı ekspresyonu sonucu, glikojen sentaz kinaz 3β (GSK3β) ve ekstraselüler sinyalle düzenlenen kinaz (ERK) vasıtasıyla fosforlandığı bilinmektedir. Fosforlanan RCAN1'in, kalsinörin aktivitesinde indükleyici etki gösterdiği, NFATc'nin nükleer lokalizasyonunu kolaylaştırdığı ve hücrelerde nöral inflamasyon ve apoptozdan sorumlu genlerin ifade edilmesini sağladığı kaydedilmiştir (46). 35 yaşını aşmış Down sendromu hastalarının hemen hemen hepsinde gelişen erken başlangıçlı AH'den RCAN1 seviyelerindeki artışa bağlı olarak gerçekleşen kalsinörin indüksiyonunun sorumlu olduğu öne sürülmüştür. Drosophila'da RCAN1'in ortaloğu olarak bulunan sarah'ın (SRA olarak da bilinmektedir) amiloid-β42 indüklenmiş nörolojik fenotipler üzerine etkisinin araştırıldığı bir çalışma da bu bulguları kanıtlar niteliktedir. AH'li kişilere benzer şekilde, Aβ42 eksprese eden sineklerde beyin SRA düzeylerinde artış gözlenmiştir. SRA'nın aşırı ekspresyonunun, sineklerde sağ kalım oranlarında azalmaya; Aβ42 kaynaklı nörolojik fenotiplerde ve nöronal hücre ölümünde ise artmaya sebep olduğu belirlenmiştir. Ayrıca, aşırı SRA ifade eden sineklerde, normal ekspresyon gösteren kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, mitokondriyal DNA ve ATP seviyelerinin azaldığı; buna karşın, oksidatif strese karşı duyarlılığın arttığı kaydedilmiştir (47). Bu bulgular, AH'de görülen RCAN1 artışının, Aβ42 ilişkili nöro patogenezi arttırıcı etkisinin olabileceğinin kanıtıdır.

## 2.5. Kalsinörin İnhibitörü İlaçlar ve Alzheimer Üzerine Etkileri

Siklosporin A (CsA) ve FK506 (takrolimus), başta organ transplantasyonu ve dermatoloji olmak üzere, klinikte en etkili bağışıklık baskılayıcı ilaçlardır. CsA ve FK506 uygulamasının, T hücrelerinin reseptöre (TCR) bağımlı aktivasyonunu, proliferasyonunu ve

farklılaşmasını inhibe ettiği bildirilmiştir. Ayrıca, her iki bileşiğin de NFATc aktivasyonunu engellediği kaydedilmiştir (48). İntraserebroventriküler Aβ enjeksiyonu yapılan farelerde ve transgenik AH fare modellerinde (Tg2576), akut FK506 uygulamasının, bilişsel bozukluğa sahip bu hayvanlarda kaybedilmiş hafıza fonksiyonlarının geri kazanılmasına sebep olduğu yapılan çalışmalarla kanıtlanmıştır (49). Bu çalışmalar, kalsinörünün fosforilasyona bağlı kinaz aktivitesinin, sinaptik plastisite ve hafıza oluşumu için hayati derecede önemli olduğunu kanıtlamıştır.

AH'li kişilerde ve hayvan modellerinde yapılan incelemelerde kalsinörin aktivitesinin arttığı gösterilmiştir. Bununla beraber AH'de görülen nöroinflamasyonun, artan kalsinörin aktivitesi ile ilişkili olduğu ve kalsinörin inhibitörlerinin oluşan inflamatuvar yanıtı baskılabileceği de kanıtlanmıştır. Periferik kan mononükleer hücrelerine inflamasyon indükleyici ajan uygulamasının ardından sitokin salınımı stümlü edilmiş, CsA ve FK506 uygulamalarının ise doz ile doğru orantılı bir şekilde IFN $\gamma$ , IL-2, IL-6 ve IL-10 sitokin seviyelerini düşürdüğü tespit edilmiştir (50). Ayrıca, izole edilmiş (+) T hücrelerine uygulanmış CsA ve FK506'nın, hücrelerdeki sitokin sekresyonunu belirgin derecede inhibe ettiği ve T hücre farklılaşmasını da önlediği tespit edilmiştir (51). Periferik kan mononükleer hücrelerine sitokin stimüle edici ajanların uygulanmasının ardından, CsA kalsinörin inhibitörünün sitokin salınımına etkisinin araştırıldığı bir çalışmada, CsA'nın IFN $\gamma$ , IL-17 ve IL-10 sitokinlerini inhibe ettiği tespit edilmiştir (52). Yapılan başka bir çalışmada, lenfositlerdeki kalsinörin inhibisyonunun kandaki CsA konsantrasyonu ile ters ilişkili olduğu gösterilmiştir. Hastaların %90'ında oral CsA alımından 2 saat sonra maksimum kalsinörin inhibisyonunun gerçekleştiği belirtilmiştir (53).

Her ne kadar yapılan bu *in vitro* ve hayvan model çalışmaları, kalsinörünü bloke eden ajanların, AH belirteçleri üzerinde iyileştirici etkisinin olduğunu kanıtlamış olsa da, kalsinörin inhibitörlerinin bağışıklık baskılayıcı özelliklerinden dolayı AH'li kişilerde bir iyileşmeye sebep olabileceği şüphe ile bakılan bir durum olmuştur. Kalsinörin aktivitesini engelleyen ajanlarının AH'nin gelişimini, olası ilerlemesini ve hatta tedavi edilmesini sağlayıcı etkisinin olabileceği,

ilk kez Giulio Tagliatela ve ekibinin (54) AH'li insan denekleri üzerine yapılan çalışmaları ile belirlenmiştir. Bu çalışmada, organ nakli yapılan ve doku reddinin oluşmasını engellemek için CsA ve FK506 ile tedavi edilen AH'li kişilerden elde edilen bulgular, tedavi uygulanmayan aynı yaşlardaki AH'li kişiler ile karşılaştırılmıştır. Organ nakli yapılan ve CsA veya FK506 tedavisine tabi tutulan 2644 kişinin klinik incelemelerinde, 8 kişinin AH'li olduğu tespit edilmiştir. Bu sekiz hastadan elde edilen bulgular, aynı yaşlardaki AH'li kişiler ile karşılaştırıldığında sonuçlar, tedavi uygulanan hastalardaki demans sıklığının, genel popülasyondaki demans sıklığına oranla, belirgin derecede düşük olduğunu göstermiştir (54). Bu çalışmadan elde edilen bulgular, hayvan çalışmalarını doğrular nitelikte olması ve kalsinörin inhibitörü ilaçların, AH'yi önleyici etkisinin ilk kez insanlar üzerinde gösterilmesi bakımından önemlidir. İmmün baskılama yapmayacak derecede düşük dozlarda, değişik kalsinörin inhibitörleri ile yeni tedavi yaklaşımlarının geliştirilmesi üzerine çalışmalar devam etmektedir.

### 3. Sonuç

Bu derlemede sunulan kanıtlar, normal yaşlanma süreçlerinde ve AH varlığında kalsinörin hiperaktivasyonun gerçekleştiğini, bunun da Aβ-aracılı Ca<sup>2+</sup> düzensizliği, tau hiperfosforilasyonu, nöral inflamasyon ve hücre ölümü gibi AH patofizyolojilerinin ortaya çıkmasında etkili olduğunu ortaya koymaktadır. Bu bakımdan bu güne kadar tespit edilmiş fakat AH tedavisinde ve/veya önlenmesinde tam başarı sağlayamayan ilaçların yerine, NFY ve senil plak oluşumunu engelleyici, anti-inflamatuvar ve anti-apoptotik aktiviteleri vasıtası ile çok yönlü etki gösterecek kalsinörin inhibitörleri, yeni ve daha etkin stratejilerin geliştirilmesine imkân verebilecektir. Bu yaklaşım, AH tedavisi ve/veya önlenmesi için yeni bir umut vadetmektedir.

### Kaynaklar

1. Lio A, Greenberg S, Growdon J. Current pharmacotherapy for Alzheimer's disease. *Annu Rev Med* 2006; 57: 513–533.
2. World Alzheimer Report 2015: The global impact

- of dementia. <https://www.alz.co.uk/research/world-report-2015> (ET: 13.10.2016).
3. Cummings J, Aisen PS, DuBois B, Frölich L, Jack CR Jr, et al. Drug development in Alzheimer's disease: the path to 2025. *Alzheimers Res Ther* 2016; 8: 39.
  4. Sun X, Jin L, Ling P. Review of drugs for Alzheimer's disease. *Drug Discov Ther.* 2012; 6 (6): 285-90.
  5. Reese LC, Tagliatela G. A role for calcineurin in Alzheimer's disease *Curr Neuropharmacol* 2011; 9: 685-692.
  6. Klee CB, Crouch TH, Krinks MH. Calcineurin: a calcium and calmodulin-binding protein of the nervous system. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1979; 76 (12): 6270-6273.
  7. Namgaladze D, Shcherbina I, Kienhofer J, Werner Hofer H, Ullrich V. Superoxide targets calcineurin signaling in vascular endothelium. *Biochim Biophys Res Commun* 2005; 334: 1061-1067.
  8. Tokoyoda K, Takemoto Y, Nakayama T, Arai T, Kubo M. Synergism between the calmodulin-binding and autoinhibitory domains on calcineurin is essential for the induction of their phosphatase activity. *J Biol Chem* 2000; 275 (16): 11728-11734.
  9. Klee CB, Krinks MH. Purification of cyclic 39, 59-nucleotide phosphodiesterase inhibitory protein by affinity chromatography on activator protein coupled to Sepharose. *Biochemistry* 1978; 17: 120-126.
  10. Wallace RW, Lynch TJ, Tallant EA, Cheung WY. Purification and characterization of an inhibitor protein of brain adenylate cyclase and cyclic nucleotide phosphodiesterase. *J Biol Chem* 1978; 254: 377-382.
  11. Aramburu J, Rao A, Klee CB. Calcineurin: from structure to function. *Curr Top Cell Regul* 2000; 36: 237-295.
  12. Roth M, Tomlinson BE, Blessed G. Correlation between scores for dementia and counts of "senile plaques" in cerebral grey matter of elderly subjects. *Nature* 1966; 209:109-110.
  13. Khachaturian ZS. Calcium hypothesis of Alzheimer's disease and brain aging. *Ann N Y Acad Sci*1994; 747: 1-11.
  14. O'Day DH, Myre MA. Calmodulin-binding domains in Alzheimer's disease proteins: Extending the calcium hypothesis. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 230: 1051-1054.
  15. Lian QY, Ladner CJ, Magnuson D, Lee JM. Selective changes of calcineurin (protein phosphatase 2B) activity in Alzheimer's disease cerebral cortex. *Exp Neurol* 2001; 167:158-165.
  16. Grundke-Iqbal I, Iqbal K, Quinlan M, Tung YC, Zaidi MS, Wisniewski HM. Microtubule-associated protein tau. A component of Alzheimer paired helical filaments. *J Biol Chem*1986; 261: 6084-6089.
  17. De Felice FG, Wu D, Lambert MP, Fernandez SJ, Velasco PT, Lacor PN, et al. Alzheimer's disease-type neuronal tau hyperphosphorylation induced by A $\beta$  oligomers. *Neurobiol Aging* 2008; 29: 1334-1347.
  18. Qian W, Yin X, Hu W, Shi J, Gu J, Iqbal IG. Activation of protein phosphatase 2B and hyperphosphorylation of tau in Alzheimer's disease. *Alzheimers Dis* 2011; 23(4): 617-627.
  19. Billingsley ML, Ellis C, Kincaid RL, Martin J, Schmidt ML, Lee VMY, et al. Calcineurin immunoreactivity in Alzheimer's-disease. *Exp Neurol* 1994; 126: 178-184.
  20. De Strooper B, Annaert W. Proteolytic processing and cell biological functions of the amyloid precursor protein. *J Cell Science* 2000; 113: 1857-1870.
  21. Mohandas E, Rajmohan V, Raghunath B. Neurobiology of Alzheimer's disease. *Ind J Psychiatry* 2009; 51: 55-61.
  22. Agostinho P, Oliveira C. Involvement of calcineurin in the neurotoxic effects induced by amyloid-beta and prion peptides. *Eur J Neurosci* 2003; 17: 1189-1196.
  23. Wu HY, Hudry E, Hashimoto T, Kuchibhotla K, Rozkalne A, Fan Z, et al. Amyloid beta induces the morphological neurodegenerative triad of spine loss, dendritic simplification, and neuritic dystrophies through calcineurin activation. *J Neurosci* 2010; 30: 2636-2649.
  24. Wang HG, Pathan N, Ethell IM, Krajewski S, Yamaguchi Y, Shibasaki F, et al. Ca<sup>2+</sup>-induced apoptosis through calcineurin dephosphorylation of BAD. *Science* 1999; 284: 339-343.
  25. Wisniewski HM, Terry RD. Morphology of the aging brain, human and animal. *Prog Brain Res* 1973; 40:167-186.
  26. Eddleston M, Mucke L. Molecular profile of reactive astrocytes-implications for their role in neurologic disease. *Neuroscience* 1993; 54:15-36.
  27. Ridet JL, Malhotra SK, Privat A, Gage FH. Reactive astrocytes: cellular and molecular cues to biological function. *Trends Neurosci* 1997; 20: 570-577.
  28. Norris CM, Kadish I, Blalock EM, Chen KC, Thibault V, Porter NM, et al. Calcineurin triggers



- reactive/inflammatory processes in astrocytes and is upregulated in aging and Alzheimer's models. *The Journal of Neuroscience* 2005; 25: 4649-4658.
- 29.Landfield PW, Campbell LW, Hao SY, Kerr DS. Aging-related increases in voltage-sensitive, inactivating calcium currents in rat hippocampus. Implications for mechanisms of brain aging and Alzheimer's disease. *Ann NY Acad Sci* 1989; 568: 95-105.
- 30.Williams CR, Gooch JL. Calcineurin inhibitors and immunosuppression - a tale of two isoforms. *Expert Rev Mol Med* 2012; 4 (14): e14.
- 31.Rao A, Luo C, Hogan PG. Transcription factors of the NFAT family: regulation and function. *Annu. Rev Immunol* 1997; 15: 707-747.
- 32.Chow CW, Rincon M, Davis RJ. Requirement for transcription factor NFAT in interleukin-2 expression. *Mol Cell Bio* 1999; 19: 2300-2307.
- 33.Phul RK, Shaw PJ, Ince PG, Smith ME. Expression of nitric oxide synthase isoforms in spinal cord in amyotrophic lateral sclerosis. *Amyotrophic Lateral Sclerosis* 2000; 1(4): 259-267.
- 34.Gruol DL, Nelson TE. Physiological and pathological roles of interleukin- 6 in the central nervous system. *Mol Neurobiol* 1997; 15: 307-339.
- 35.Cacabelos R, Barquero M, Garcia P, Alvarez XA, Varela de Seijas E. Cerebrospinal fluid interleukin-1beta (IL-1beta) in Alzheimer's disease and neurological disorders. *Methods Find Exp Clin Pharmacol* 1991; 13: 455- 458.
- 36.McNaull BB, Todd S, McGuinness B, Passmore AP. Inflammation and anti-inflammatory strategies for Alzheimer's disease. *Gerontology* 2010; 56: 3-14.
- 37.Walker D, McGeer E, McGeer P. Involvement of inflammation and complement in Alzheimer's disease. In: Antel J, Birnbaum G, Härtung H, editors. *Clinical Neuroimmunology* Oxford, Blackwell Scientific 1997; 172-188.
- 38.McGeer E, McGeer P. Inflammatory cytokines in the CNS. *CNS Drugs* 1997; 7: 214-287.
- 39.Quintanilla RA, Orellana DI, Gonzalez-Billault C, Maccioni RB. Interleukin-6 induces Alzheimer-type phosphorylation of tau protein by deregulating the cdk5/p35 pathway. *Exp Cell Res* 2004; 295: 245-257.
- 40.Coghlan VM, Perrino BA, Howard M, Langeberg LK, Hicks JB, Gallatin WM, et al. Association of protein kinase A and protein phosphatase 2B with a common anchoring protein. *Science* 1995; 267 (5194): 108-111.
- 41.Sun L, Youn HD, Loh C, Stolow M, He W, Liu JO. Cabin 1, a negative regulator for calcineurin signaling in T lymphocytes. *Immunity* 1998; 8(6): 703-711.
- 42.Crabtree GR. Calcium, calcineurin and the control of transcription. *J Biol Chem* 2001; 276: 2313-2316.
- 43.Miskin JE, Abrams CC, Goatley LC, Dixon LK. A viral mechanism for inhibition of the cellular phosphatase calcineurin. *Science* 1998; 281: 562-565.
- 44.Davies KJ, Ermak G, Rothermel BA, Pritchard M, Heitman J, Ahnn J, et al. Renaming the DSCR1/Adapt78 gene family as RCAN: regulators of calcineurin. *The FASEB Journal* 2007; 21: 3023-3028.
- 45.Abbasi S, Lee JD, Su B, Chen X, Alcon JL, Yang J, et al. Protein kinase-mediated regulation of calcineurin through the phosphorylation of modulatory calcineurin-interacting protein 1. *J Biol Chem* 2006; 281: 7717-7726.
- 46.Shin SY, Yang HW, Kim JR, Heo WD, Cho KH. A hidden incoherent switch regulates RCAN1 in the calcineurin-NFAT signaling network. *J Cell Sci* 2011; 124: 82-90.
- 47.Lee S, Bang SM, Hong YK, Lee JH, Jeong H, Park SH, et al. The calcineurin inhibitor Sarah (Nebula) exacerbates A $\beta$ 42 phenotypes in a Drosophila model of Alzheimer's disease. *Dis Model Mech* 2016; 9 (3):295-306.
- 48.Aoki Y, Kao PN. Erythromycin inhibits transcriptional activation of NF-kappa B, but not NFAT, through calcineurin-independent signaling in T cells. *Antimicrob Agents Chemother* 1999; 43: 2678-2684.
- 49.Dineley KT, Hogan D, Zhang WR, Taglialatela G. Acute inhibition of calcineurin restores associative learning and memory in Tg2576 APP transgenic mice. *Neurobiol Learn Mem* 2007; 88: 217-224.
- 50.Kuinose M, Iwagaki H, Morimoto Y, Kohka H, Kobashi K, Sadamori H, et al. Calcineurin antagonists inhibit interferon-gamma production by downregulation of interleukin-18 in human mixed lymphocyte reactions. *Acta Med Okayama* 2000; 54(5): 201-209.
- 51.Tsuda K, Yamanaka K, Kitagawa, H, Akeda T, Naka M, Niwa K, et al. Calcineurin inhibitors suppress cytokine production from memory T cells

and differentiation of Native T cells into cytokine-producing mature T cells. PLoS One 2012; 7(2): e31465.

52.Ramos S, Butler L, Kimbler T, Cao J, Grey J, Rogers E, et al. CRAC channel inhibitors block cytokine production with a pattern distinguishable from cyclosporine (P5216). The Journal of Immunology 2013; 190 (1 Supplement): 212.5.

53.Halloran PF, Helms LM, Kung L, Noujaim J. The temporal profile of calcineurin inhibition by cyclosporine in vivo. Transplantation 1999; 68: 1356-1361.

54.Taglialatela G, Rastellini C, Cicalese L. Reduced incidence of dementia in solid organ transplant patients treated with calcineurin inhibitors. J Alzheimers Dis 2015; 47 (2): 329-333.