

ALZHEİMER HASTALARININ LENFOSİTLERİNDE rRNA İFADELENMESİNİN ARAŞTIRILMASI
The Investigation of the rRNA Expression in Lymphocytes of Alzheimer Patients

Hilal ÜNLÜ AKALIN¹, Hamiyet ALTINDAŞ², Yahya KARAMAN³,
Halil DEMİRTAŞ², Nalan İMAMOĞLU⁴

Özet : Alzheimer hastalığı (AH), orta ve geç yaşlarda görülen, geriye dönüşümsüz nörodejeneratif bir hastalıktır. Çekirdekçik oluşturan DNA bölgeleri (nücleolar organizör bölgeleri=NORs), akrosentrik kromozomların sekonder darlık bölgelerinde bulunan ribozomal genleri ifade ederler. AH hastalarının beyinlerinde β -amiloid depozitleri artmış durumdadır. β -amiloid protein geni ribozomal DNA senteziyle ilgili olan kromozom 21'de lokalizedir. Ayrıca, ribozomal genlerin aktif transkripsiyonel durumu ve gümüş boyanabilmesi arasında bir korelasyon olduğu görülür. Böylece, AH ile akrosentrik kromozomlardaki ribozomal genler arasında bir ilişkinin bulunması muhtemeldir. Çalışmamızda, Alzheimer hastaları ve kontroller arasında ribozomal genlerin aktivitesinin karşılaştırılması amacıyla, 20 Alzheimer hastası ve 20 sağlıklı kontrol (10 genç ve 10 yaşlı) kişinin lenfosit kültürleri yapıldı. Metafazlardaki total Ag+ akrosentrik kromozom sayıları ve Ag+ 21. kromozom sayıları değerlendirildi. Total Ag+ akrosentrik kromozom sayıları ve Ag+ 21. kromozom sayıları açısından Alzheimer hastaları ile kontrol grupları arasında istatistiksel olarak fark görülmedi ($P>0.05$). Sonuç olarak, Alzheimer hastalarındaki Ag+ akrosentrik kromozom sayısı, ribozomal genlerin aktivitesiyle bağlantılı olarak değişim göstermemiştir. Bununla birlikte, Alzheimer hastalarındaki ribozomal genlerin aktivitelerindeki değişiklikler üzerine destekleyici ileri çalışmalara ihtiyaç vardır.

Anahtar kelimeler: Alzheimer hastalığı, çekirdekçik oluşturan bölgeler, kromozom 21, satellit birleşmesi

Alzheimer hastalığı (AH), orta ve ileri yaşlarda görülen ilerleyici nörodejeneratif bir hastalıktır ve kortikal demansların en sık görülenidir (1, 2). AH'da patolojik olarak senil (nöritik) plaklar ve nörofibriller

¹ Bilim Uz. Erc.Ün.Sağlık Bil.Ens, Tıbbi Biyoloji AD, Kayseri

² Prof.Dr.Erc.Ün.Tıp Fak, Tıbbi Biyoloji AD, Kayseri

³ Prof.Dr.Erc.Ün.Tıp Fak, Nöroloji AD, Kayseri

⁴ Arş.Gör.Erc.Ün.Sağ.Bil.Ens,Tıbbi Biyoloji AD, Kayseri

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

In our study, in order to compare activities of ribosomal genes in patients with AD and controls, lymphocytes of 20 AD patients and 20 healthy controls (10 elderly and 10 young) were cultivated. The total number of Ag+ acrocentric chromosomes and the number of Ag+ chromosome 21 in metaphases was evaluated. There was no statistically significant difference between AD patients and control groups with regard to the number of Ag+ acrocentric chromosomes and Ag+ chromosome 21 ($p>0.05$).

As a result, the number of Ag+ acrocentric chromosomes in AD patients did not change in proportion to activity of ribosomal genes. However, further studies are required to support alterations on the activities of ribosomal genes in AD patients.

Key words: Alzheimer's disease; chromosome 21; nucleolus organizer regions; satellite association

yumakların varlığı karakteristiktir (3). AH'nın genetik incelemelerinde değişik genler tanımlanmıştır. Bunlar β -amiloid prekürsör protein (APP), presenilin-1 (PS-1), presenilin-2 (PS-2) ve apolipoprotein E (ApoE)'dir. PS-1 geni 14 nolu kromozomda, PS-2 geni 1 nolu kromozomda, ApoE geni 19 nolu kromozomda ve β -amiloid

Bu çalışma Erciyes Üniversitesi Araştırma Fonu tarafından 01.11.03 nolu proje ile desteklenmiştir.

prekürsör protein geni 21 nolu kromozomda yer almaktadır (4).

İnsanlarda beş çift akrosentrik kromozom vardır ve nükleolar organizatör bölgeler (NORs) bu kromozomların sekonder darlık olarak bilinen satelit köklerinde yer alırlar (5). Genetik olarak aktif olan NOR'ların gümüş ile boyanabildiği belirlenmiştir ve ribozomal genlerin aktif transkripsiyonel durumu ile gümüş boyanabilmesi arasında bir korelasyon vardır (6-8). AH hastalarında (9) ve yaşa bağlı olarak (10) Ag+ akrosentrik kromozom sayılarının değiştiği gösterilmiştir. Bu çalışmadaki amacımız, AH hastaları ve kontrol gruplarının (genç ve yaşlı kontrol grupları) mitojenle uyarılmış lenfositlerinde, metafaz alanlarındaki akrosentrik kromozomların gümüş boyama tekniği kullanarak NOR aktivitelerini karşılaştırmak ve değerlendirmektir.

GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmamıza 10 yaşlı ve 10 genç sağlıklı kontrol ile Nöroloji Anabilim Dalı'nda 6 ay – 3 yıl önce kesin tanısı konmuş, 20 Alzheimer hastası alınmıştır. Genç kontrol grubunun yaş aralığı 18-25'dir. Yaşlı kontrol grubunun yaş aralığı (55-87 yıl) çalışmamıza katılan Alzheimer hastalarıyla paralel tutulmuştur. Çalışmamıza katılan alzheimer hastalarının ve kontrol gruplarının, cinsiyetleri, sigara ve alkol kullanıp kullanmadığı, Alzheimer hastalığı açısından aile öyküsü olup olmadığı, hastanın başka bir rahatsızlığı olup olmadığı ve bu rahatsızlıktan dolayı ilaç kullanıp kullanmadığı, dikkate alınmıştır.

Hasta ve kontrollerden alınan periferik kanlar, steril koşullarda Nutrient Mixture F-10 (Biol. Ind.), %25 fetal kalf serum (Biol. Ind.), %1.5 fitohemaglutinin (Biol. Ind.), 100 U/ml penisilin, ve 100 µg/ml streptomisin (Biol. Ind.)'den oluşan lenfosit kültür ortamını içeren kültür tüplerine ekilmiştir. Sonra tüpler, inkubasyon için 37 °C lik etüve konmuştur. 70. saatte kolşisin (0.1 mg/ml) eklenmiş ve 72. saatte çıkarım yapılmıştır. Çıkarım sonrası elde edilen hücre süspansiyonundan preparatlar hazırlanmıştır (11).

Kültür işlemi sonucunda elde edilen preparatlar, ilk önce 1-2 dakika distile suda bekletilmiş ve daha sonra havada kurutulmuştur. Havada kurutulmuş preparatlar daha sonra içinde distile su ile ıslatılmış kurutma kağıdının bulunduğu petri kabının içerisine yerleştirilmiştir. Preparatların üzerine % 50'lik AgNO₃ ve % 2'lik Jelatin / Formik asit karışımından oluşan gümüş boyama solusyonundan 3-4 damla damlatılmış ve üzerleri lamelle kapatılmıştır. Sonra petri kabının kapağı kapatılıp, etrafı ışık almayacak şekilde alüminyum folyo ile sarılıp 37 °C'lik etüvede 15 dakika bekletilmiştir. 15 dakikanın sonunda etüvden çıkarılan preparatlar üzerlerindeki lameller düşünceye kadar distile su ile yıkanmıştır. Preparatlar mikroskopta incelendiğinde, kaliteli ve homojen olarak gümüş ile boyanmış metafazlar elde edilmiştir (12, 13).

Çalışmamızda uygulanan NOR boyama işleminden sonra gümüşle boyanmış metafaz alanlarında akrosentrik kromozomlarının tanımlanabilmesi için ASG (Asetik-Saline-Giemsa) yöntemi kullanılmıştır (14). ASG yönteminde NOR boyaması yapılmış preparatlar, 2 x SSC (0.03 M trisodyum sitrat ve 0.3 M NaCl) tamponunda 60° C'de 60 dk inkübe edilmiştir. Sonra preparatlar, distile sudan geçirilip % 2'lik Giemsa ile 90 dk. boyanmış ve G- bantlar elde edilmiştir.

Işık mikroskobunda, her bir hasta, yaşlı ve genç kontrol için 20 metafaz alanı incelenmiş ve gümüş ile boyanmış tüm akrosentrik kromozomlar ve 21. kromozomlar kaydedilmiştir. Elde edilen değerler Kruskal-Wallis testi kullanılarak karşılaştırılmıştır.

BULGULAR

Çalışmamıza 20 Alzheimer hastası (15 kadın, 5 erkek), 10 sağlıklı genç kontrol (6 kadın, 4 erkek) ve 10 sağlıklı yaşlı kontrol (5 kadın, 5 erkek) alınmıştır. Alzheimer hastalarının yaşları 42 ve 84 yılları (yaş ortalaması±S.S.=68.25±11.23), genç kontrol grubunun yaşları 18 ve 25 yılları (yaş ortalaması±S.S.= 22.10±2.51) ve yaşlı kontrol grubunun yaşları ise 55 ve 87 yılları (yaş ortalaması±S.S.= 66.90±9.77) arasında değişmektedir. Yaşlı ve genç kontrol grupları ile hasta grupları Ag+ total akrosentrik kromozom (p=0.415) ve Ag+ kromozom 21 sayıları açısından (p=0.129) Kruskal-Wallis testi ile karşılaştırıldığında

istatistiksel olarak gruplar arasında bir fark bulunamamıştır ($\alpha=0.05$). Her bir hasta, ve kontroller için Ag+ total akrosentrik kromozom ve Ag+ kromozom 21 sayılarına ait min-max ve

ortanca değerleri Tablo I'de verilmiştir. Hasta ve yaşlı kontrol grubundan birer bireye ait; ASG ile bantlanmış ve AgNO₃ ile boyanmış akrosentrik kromozomlar Şekil 1'de görülmektedir.



Şekil 1. Alzheimer hastasına (a) ve yaşlı kontrole (b) ait ASG ile bantlanmış ve AgNO₃ ile boyanmış akrosentrik kromozomlar

Tablo I. Hasta ve kontrol gruplarındaki total Ag+ akrosentrik kromozom ve Ag+ 21. kromozom sayılarının min-max, ortanca ve p değerleri

	Alzheimer hasta grubu (n=20)		Genç kontrol grub (n=10)		Yaşlı kontrol grubu (n=10)		P
	Ortanca	Min-max	Ortanca	Min-max	Ortanca	Min-max	
Ag+ 21. kromozom sayısı	33,000	16-30	37,500	29-40	33,500	21-40	0.129
Total Ag+ kromozom sayısı	151,000	121-186	161,000	139-194	152,500	127-175	0.415

TARTIŞMA

Bu çalışmada, araştırma grubunu oluşturan 20 Alzheimer hastası ile kontrol grubunu oluşturan 20 sağlıklı bireyde (10 genç ve 10 yaşlı kişi), ribozomal genlerin aktivitesini karşılaştırmak için metafaz alanlarındaki akrosentrik kromozomların gümüşle boyanmalarına göre Ag+ total akrosentrik ve Ag+ kromozom 21 sayıları değerlendirilmiştir.

Ag+ total akrosentrik kromozom ve Ag+ kromozom 21 sayıları için hasta, yaşlı ve genç kontrol grupları karşılaştırıldığında aralarında anlamlı bir fark bulunamamıştır ($p>0.05$). Lezhava (10) yaşa bağlı olarak 13. ve 21. kromozomlardaki Ag+ NOR sayılarında azalma olduğunu göstermiştir. Bizim çalışmamızda ise yaşlı ve genç kontrollerdeki 21. kromozom ve total akrosentrik kromozomların Ag+ NOR sayıları arasında bir fark bulunamamıştır. Payão ve arkadaşları da (9) bizim bulgularımıza zıt olarak Alzheimer hastalarında yaşlı ve genç kontrollere göre Ag+ NOR ve Ag+ kromozom 21 sayılarının azaldığını bulmuşlardır. Bu çalışmanın sonuçlarından Alzheimer hastalarında yaşlı ve genç kontrollere göre ribozomal genlerin aktivitesinde azalma olduğu söylenebilir. Çalışmamızda ise, Ag+ total akrosentrik ve Ag+ kromozom 21 sayılarına ait bulgularımız Alzheimer hastalarında yaşlı ve genç kontrollere göre ribozomal genlerin aktivitesinin azalmadığını göstermektedir. Ancak, daha önceki çalışmamızda Alzheimer hastalarında NOR yüzey/toplam çekirdek yüzey alan oranları bulunmuş, ve yaşlı ve genç kontrollere ait NOR yüzey/toplam çekirdek yüzey alan oranları ile karşılaştırılmıştır; hasta ve yaşlı kontrol grubu

arasındaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu ($p=0.035$) ve Alzheimer hastalarında NOR yüzey/toplam çekirdek yüzey alan oranlarının azaldığı gösterilmiştir (15).

Sonuçlarımızla önceki çalışmaların sonuçlarının uyumluluk göstermemesi Alzheimer hastalarında ribozomal gen regülasyonuna ilişkin ileri çalışmaların ve literatürdeki bulgular arasındaki farklılığın nedenlerinin araştırılmasının gerekliliğini düşündürmüştür.

KAYNAKLAR

1. Katzman RN. Medical progress. Alzheimer's disease. *New Engl J Med* 1986, 314: 964–973.
2. Breteler MM, Claus JJ, van Duijn CM, Launer U, Hofman A. Epidemiology of Alzheimer disease. *Epidemiol Rev* 1992,14:59-82.
3. Kachaturian ZS. Diagnosis of Alzheimer's disease. *Arch Neurol* 1985, 42: 1097–1105.
4. Karaman Y. Alzheimer Hastalığı ve Diğer Demanslar. *Kayseri* 2002, 90-210.
5. Goodpasture C, Bloom S E, Hsu TC, Arrighi FE: Human nucleolus organizers: the satellites or the stalks? *Am J Hum Genet* 1976, 28:559-566.

6. Goodpasture C, Bloom S E. Visualization of nucleolar organizer regions in mammalian chromosomes using silver staining. *Chromosoma* 1975, 53:37-50.
7. Howell WM, Denton TE, Diamond JR. Differential staining of the satellite regions of human acrocentric chromosomes. *Experientia* 1975, 31:260-262.
8. Schwarzscher HG, Mikelsaar AV, Schnedl W. The nature of the Ag-staining of nucleolus organizer regions. Electron- and light-microscopic studies on human cells in interphase, mitosis, and meiosis. *Cytogenet Cell Genet* 1978, 20: 24-39.
9. Payão SLM, Smith M de AC, Kormann-Bortolotto MH, Toniolo J. Investigation of the Nucleolar Organizer Regions in Alzheimer's Disease. *Gerontology* 1994, 40: 13-17.
10. Lezhava TA. The activity of nucleolar organizer regions of human chromosomes in extreme old age. *Gerontology* 1984, 30: 94-99.
11. Rooney DE, Czepulkowski BH, *Human Cytogenetics(vol I), Constitutional Analysis, Practical Approach Series, IRL Press Ltd, Oxford, 1992, 31-54.*
12. Lindner LE. Improvements in the silver-staining technique for Nuclear Organizer Regions (AgNOR). *J Histochem Cytochem* 1993, 41:439-445.
13. Demirtaş H, İmamoğlu N, Dönmez H, Cücer N, Yılmaz A, Candemir Z. Condensed chromatin surface and NORs surface enhancement in mitogen-stimulated lymphocytes of Down's syndrome patients. *Ann Genet*, 2001, 44: 77-82.
14. Sumner AT, Evans HJ, Buckland KA New Technique for distinguishing between human chromosomes. *Nature new Biol* 1971, 232:31-32
15. Ünlü-Akalın H. Alzheimer hastalarının lenfositlerinde rRNA ifadenmesinin araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Kayseri 2003.