



T.C.  
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



**DOKTORA TEZİ**

**İLERLEYİCİ SUPRANÜKLEER FELÇ'li İNSAN  
BEYİN DOKULARINDA mikroRNA  
PROFİLLERİNİN KARŞILAŞTIRILMASI**

**Derya ÖZCİĞER**

**Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı**

**Moleküler Biyoloji ve Genetik Programı**

**DANIŞMAN**

**Doç. Dr. Bedia PALABIYIK**

**II. DANIŞMAN**

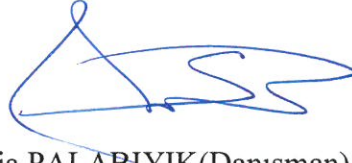
**Prof. Dr. M. Cengiz YAKICIER**

**Temmuz, 2018**

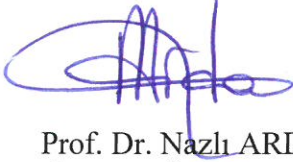
**İSTANBUL**

Bu çalışma, 3.07.2018 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, Moleküler Biyoloji ve Genetik Programında Doktora tezi olarak kabul edilmiştir.


**Tez Jürisi**



Doç. Dr. Bedia PALABIYIK(Danışman)  
İstanbul Üniversitesi  
Fen Fakültesi



Prof. Dr. Nazlı ARDA  
İstanbul Üniversitesi  
Fen Fakültesi



Prof. Dr. Ergün PINARBAŞI  
Sivas Cumhuriyet Üniversitesi  
Tıp Fakültesi



Prof. Dr. Ayşegül TOPAL SARIKAYA  
İstanbul Yeni Yüzyıl Üniversitesi  
Tıp Fakültesi



Prof. Dr. Gülrüh ALBAYRAK  
İstanbul Üniversitesi  
Fen Fakültesi



20.04.2016 tarihli Resmi Gazete’de yayımlanan Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin 9/2 ve 22/2 maddeleri gereğince; Bu Lisansüstü teze, İstanbul Üniversitesi’nin aboneli olduğu intihal yazılım programı kullanılarak Fen Bilimleri Enstitüsü’nün belirlemiş olduğu ölçütlere uygun rapor alınmıştır.

Bu tez, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yürütücü Sekreterliğinin 54580 numaralı projesi ile desteklenmiştir.

## ÖNSÖZ

Bu çalışmada, ilerleyici supranükleer felç hastalığının bilinen temel patolojik bulgusu olan tau patolojisine bağlı olarak otopsi beyin kesitlerinde miRNA seviyelerindeki değişimleri tespit ederek patolojinin mekanizması aydınlatılmak istenmiştir.

Nadir bir hastalık olması, klinik teşhisinin zor olması, bu hastalıkla ilgili güvenilir bir çalışmanın ancak kesin teşhisi konulmuş otopsi beyin materyallerinden yapılabilmesi, bu dokuların temini çalışılmasındaki zorluklar ve sınırlı imkanlarla yapılan çalışmanın planlanmasında daha bir çok darboğazda bana destek olan herkese teşekkürü bir borç bilirim.

Özellikle, bu sürecin en başından beri her bir zorluğunu birlikte göğüslediğimiz ve candan desteği, hoşgörüsü ve sabrı ile beni cesaretlendiren, bu çalışmanın olmazsa olmazı, sevgili danışman hocam Doç.Dr. Bedia PALABIYIK'a sonsuz teşekkür ederim. En yoğun zamanlarında bile büyük bir sevecenlik ve hoşgörü ile hiçbir yardımını esirgemeyen, gecenin kaçı olursa olsun çekinmeden arayıp yardım alabildiğim, vizyonu ve sunduğu imkanlarla gelişimimde büyük katkısı olan ikinci danışmanım olarak hep yolumu açan sevgili hocam Prof.Dr. Cengiz YAKICIER'e ne kadar teşekkür etsem azdır. Doktora sürecimde gerek değerli fikirleriyle yaptıkları katkıları, gerekse yapabileceklerime güvenip beni tüm samimiyetleri ile destekleri için değerli hocalarım Prof.Dr. Ergün PINARBAŞI, Prof.Dr. Nazlı ARDA, Prof.Dr. Güneş KIZILTAN ve Prof.Dr. Gülruh ALBAYRAK'a çok teşekkür ederim. Sevgili lise arkadaşım ve çalıştığı her konuda titizliği ve başarısından hep emin olduğum, tavsiye ve gözlemleri benim için değerli olan Uzman Dr. Zeynep TOSUNER'e bu değerli dokuların incelenmesi konusunda verdiği destekten dolayı teşekkür ederim. Yıllar boyunca her türlü teknik konuda desteklerini esirgemeyen Öykü İRİGÜL ve Ümit FIRAT'a ayrıca teşekkürler.

Bu süreçte her türlü nazımı çeken ve beni destekleyen sevgili anneme ve biricik ablama, sabahlara kadar benimle birlikte çalışan, fedakarlıkları ve desteği için, sevgili nişanlım Deniz ŞENALP'e minnettarım. Benim için bu çalışmanın asıl sebebi olan, eğitim deyince imkansız tanımayan, verdiği mücadelelerle gerçek bir savaşçı olduğunu gösteren biricik babama ne kadar teşekkür etsem azdır.

Temmuz 2018

Derya ÖZCİĞER

# İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ÖNSÖZ .....	iv
İÇİNDEKİLER.....	v
ŞEKİL LİSTESİ .....	vii
TABLO LİSTESİ.....	ix
SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ.....	xi
ÖZET .....	xii
İLERLEYİCİ SUPRANÜKLEER FELÇ'li İNSAN BEYİN DOKULARINDA mikroRNA PROFİLLERİNİN KARŞILAŞTIRILMASI.....	xii
SUMMARY .....	xiv
<b>1. GİRİŞ .....</b>	<b>1</b>
<b>2. GENEL KISIMLAR.....</b>	<b>3</b>
2.1. NÖRODEJENERASYONDA TAU PROTEİNİNİN ÖNEMİ.....	3
2.1.1. Tau Proteininin Fosforlanması .....	5
2.1.2. Tau Patolojisinde Bilinen Genetik Etkenler ve MAPT Geninin Kırpılması .....	7
2.2. MİRNA'LARIN NANOSTRING YÖNTEMİ İLE İNCELENMESİ.....	9
2.3. MİRNA'LARIN NÖRODEJENERASYONDAKİ ÖNEMİ .....	11
2.4. LOCUS CERULEUS BÖLGESİNİN ÖNEMİ .....	14
<b>3. MALZEME VE YÖNTEM.....</b>	<b>16</b>
3.1. OTOPSİ BEYİN KESİTLERİNDE İMMUNHİSTOKİMYASAL İNCELEME.....	16
3.1.1. Parafinin Uzaklaştırılması ve İmmunhistokimya Boyaması .....	16
3.2. ARRAY ÇALIŞMASI İÇİN ÖRNEKLERİN HAZIRLANMASI .....	17
3.2.1. Parafinin Uzaklaştırılması .....	18
3.2.2. RNA İzolasyonu .....	19
3.3. MİRNA'LARIN NANOSTRING PLATFORMUNDA ÇALIŞILMASI.....	20
3.3.1. Örneklerin Hazırlanması .....	21
3.3.2. Hedef miRNA'ların Problarla Hibridizasyonu.....	23
3.3.3. miRNA'ların Ciplere Aktarımı.....	23
3.3.4. Çiplerin Taranması ve Verilerin Eldesi .....	24
3.4. VERİLERİN İNCELENMESİ .....	24
3.4.1.1. Pozitif Kontroller .....	25

3.4.1.2. <i>Negatif Kontroller</i> .....	26
3.4.2. <i>Örneklerin Gruplandırılması ve Karşılaştırılması</i> .....	27
3.4.2.1. <i>Örneklerin Gruplandırılması</i> .....	28
3.4.2.2. <i>Örneklerin Karşılaştırılması</i> .....	28
<b>4. BULGULAR</b> .....	<b>31</b>
4.1. İMMUNHİSTOKİMYASAL BOYAMA .....	31
4.2. PARAFİNİN UZAKLAŞTIRILMASI VE RNA İZOLASYONU .....	34
4.3. ELDE EDİLEN VERLERİN DEĞERLENDİRMESİ.....	35
<b>5. TARTIŞMA VE SONUÇ</b> .....	<b>42</b>
<b>KAYNAKLAR</b> .....	<b>51</b>
<b>EKLER</b> .....	<b>56</b>
EK 1. İ.Ü.İTF Klinik Araştırmalar Etik Kurulu Raporu, Sayı:554, 3sayfa.....	56
EK 1. (devam): İ.Ü.İTF Klinik Araştırmalar Etik Kurulu Raporu, Sayı:554, 3sayfa .....	57
EK 1. (devam): İ.Ü.İTF Klinik Araştırmalar Etik Kurulu Raporu, Sayı:554, 3sayfa .....	58
<b>ÖZGEÇMİŞ</b> .....	<b>59</b>

## ŞEKİL LİSTESİ

### Sayfa No

- Şekil 2.1:** İSF ve KBD’de Tau (AT8) immunoreaktivitesi ile tespit edilmiş histopatolojik bulgular Kovacs (2015)’tan uyarlanmıştır.....4
- Şekil 2.2:** Sağlıklı ve hasarlı nöronlarda normal ve anormal tau oluşumları. Wikipedia.org’dan uyarlanmıştır.....6
- Şekil 2.3:** Tau proteininin normal ve anormal fosforilasyonu, anormal tau filamentlerinin oluşumu, De Vos ve diğ. (2011) ’den uyarlanmıştır. ....7
- Şekil 2.4:** MAPT geninde saptanan mutasyonlar. MAPT geni ve bu gene ait mutasyonlar gen üzerinde şematize edilmiştir. Sun ve diğ. (2015)’den uyarlanmıştır. ....8
- Şekil 2.5:** MAPT geninde alternatif kırılma ile oluşan tau izoformları. MAPT genine ait ekzonlar Sun ve diğ., (2016)’den uyarlanmıştır.....8
- Şekil 2.6:** ‘target-probe complex’ nin oluşumu (www.nanostring.com’dan alıntıdır).....10
- Şekil 2.7:** ‘Nanostring nCounter® miRNA Expression Assays’in çalışma prensibi. Nanostring Technologies (2015)’den alınmıştır.....10
- Şekil 2.8:** Tau RNA’ında alternatif kırılmanın düzenlenmesinde görev alan ve MAPT genine ait ekzon 10’nun kırılmasında etkili olan miRNA’lar gösterilmiştir. Hébert ve diğ. (2012)’den uyarlanmıştır. ....12
- Şekil 2.9:** miRNA’ların ekstraselüler veziküller(Ev) (a) ve lökositler içinde (b), enflamasyonlu bölgeden kan-beyin bariyerini geçerek nöronlara taşınmaları. Ridder ve diğ., (2014)’den uyarlanmıştır. ....13
- Şekil 2.10:** Locus ceruleus'un konumu. Locus ceruleus'un, ponsa ait temsili yatay kesitte konumu ile insan beynindeki yeri şematik olarak gösterilmiştir. Bouret ve Sara (2010) ve <http://www.learnneurosurgery.com/progressive-supranuclear-palsy.html>’den uyarlanmıştır. ....14
- Şekil 3.1:** Eşlenik slaytlarda patolojik doku sınırlarının belirlenmesi. Aynı kesitteki sağlıklı ve patolojik doku alanlarının ayrı tüplere aktarılması. ....19
- Şekil 3.2:** miRNA’lara miRtaq dizilerinin eklenmesi. RNA izolatlarında bulunan miRNA’ların, özgün köprü molekülleri ile her bir miRNA’ya özgü tasralanmış miRtaq dizisinin ligasyon yöntemi ile birleştirilmesi, hedef moleküllerin oluşumu (www.nanostring.com’dan uyarlanmıştır).....22
- Şekil 3.3:** Kapalı ve otomatik bir sistem olan nanostring hazırlama istasyonu (www.nanostring.com’dan alınmıştır).....24

<b>Şekil 3.4:</b> miRNA komplekslerinin görüntülenmesi. Cam çiplere yüklenmiş miRNA kompleksleri/hedef-prob komplekslerinin nanostring tarayıcısında elektrik alan etkisiyle mikroskobik olarak barkodlarının okunması (www.nanostring.com'dan uyarlanmıştır). .....	24
<b>Şekil 3.5:</b> Temsili olarak çip yüzeyindeki, gözlenebilen alan (FOV) ve bağlanma yoğunluğu (nSolver eğitim videosundan uyarlanmıştır). .....	25
<b>Şekil 3.6:</b> Pozitif kontrol problemlerinin oluşturduğu doğrusal grafik (temsili). Ayrıca, en düşük pozitif kontrolün (Pozitif E), negatif kontrollerle kıyaslanarak eşik değerinin belirlenmesi de gösterilmektedir (nSolver eğitim videosundan uyarlanmıştır).....	26
<b>Şekil 4.1:</b> Negatif kontrol preparatlarında locus ceruleusa özgül mavi pigmentlerin belirlenmesi. ....	31
<b>Şekil 4.2:</b> ISF tanımlı kesitlerde tau birikiminin tespiti. Sırası ile PD139 :%10, PD75: %30, PD108:%1, PD302:%1, PD178:%20, PD173:%3, PD169:%5, PD87:%5, PD147:%20 tau birikimi tespit edilen nöronlar gösterilmiştir. ....	32
<b>Şekil 4.3:</b> Negatif kontrollerde tau immün reaktivitesi kontrolü. Tau immün reaktivitesi tüm alanlarda %0 olarak gözlemlendi. ....	33
<b>Şekil 4.4:</b> Kesitlerde tau immün reaktivite yüzdesinin belirlenmesi (a), patolojik ve sağlıklı bölgelerin ayrılması (b). Yüksek tau immün reaktivitesi (%0 üzerinde) gösteren nöronların yoğun olarak buldukları bölgeler mavi daire içine alındı (a). immunhistokimya ile 'patolojik (P) ve sağlıklı (S) olarak sınırlandırılan preparatların şablon olarak kullanımı (b). ....	34
<b>Şekil 5.1:</b> Patolojik, sağlıklı ve kontrol dokularında temsili örneklerin anlamlı miRNA seviyeleri. D1,D2,D3 patolojik grup; D7,D9 sağlıklı grup; D11,D12 kontrol grubuna ait örneklerdir. ....	48



## TABLO LİSTESİ

### Sayfa No

<b>Tablo 3.1:</b> Parafinin uzaklaştırması aşamasında doku kesitlerinin bulunduğu slaytlara uygulanan işlemlerin sırası. ....	18
<b>Tablo 3.2:</b> Örnek hazırlığı protokolünün, termal döngü cihazındaki basamakları. ‘miRNA_Expression_Assay_User_Manual’den alınmıştır. ....	21
<b>Tablo 3.3:</b> Çalışılan parafin kesitlerin gruplandırması. ‘D’ çalışma numarası, ‘P’ patolojik bölgeyi, ‘S’ sağlam bölgeyi, ‘K’ sağlıklı kontrol bireylere ait örnekleri belirtmektedir. ....	27
<b>Tablo 4.1:</b> Kontrol ve İSF tanılı locus ceruleus doku kesitlerinde tau-immun reaktivitesi gösteren hücrelerin oranı. PD numaraları doku bankasına ait olup, parantez içindeki numaralar bu çalışmada, çalışma sırasına göre verilen numaralardır. ....	32
<b>Tablo 4.2:</b> Array çalışmasına alınmak üzere parafin kesitlerden elde edilen total RNA'ların çalışma numaralarına göre banka kodları, konsantrasyonları ve saflıkları, kesitlerde tau patoloji gösteren hücrelerin ‘%’ oranları. ....	34
<b>Tablo 4.3:</b> MinK/MaxP oranlarında farklılık gösteren miRNA’ların listesi ve normalize değer oranları. Karşılaştırmada en az bir verinin eşik değerini geçmesi ‘*’, her iki verinin de geçmesi ‘**’ olarak belirtilmiştir. Her iki verinin de eşik altında kaldığı durumlar ise belirtilmiştir. ....	35
<b>Tablo 4.4:</b> MinK/MaxP-4 oranlarında farklılık gösteren miRNA’ların listesi ve normalize değer farkları. Karşılaştırmada en az bir verinin eşik değerini geçmesi ‘*’, her iki verinin de geçmesi ‘**’ olarak belirtilmiştir. Her iki verinin de eşik altında kaldığı durumlar ise belirtilmemiştir. ....	36
<b>Tablo 4.5:</b> MinK-10/MaxP-4 oranlarında farklılık gösteren miRNA’ların listesi ve normalize değer farkları. Karşılaştırmada en az bir verinin eşik değerini geçmesi ‘*’, her iki verinin de geçmesi ‘**’ olarak belirtilmiştir. Her iki verinin de eşik altında kaldığı durumlar ise belirtilmemiştir. ....	37
<b>Tablo 4.6:</b> MinP-4/MaxK-10 oranlarında farklılık gösteren miRNA’ların listesi ve normalize değer farkları. Her iki grubun verileri de eşik altında kalmasına karşın grupları iyi temsil ettikleri için karşılaştırma sunuldu. ....	37
<b>Tablo 4.7:</b> MinK-10/MaxS oranlarında farklılık gösteren miRNA’ların listesi ve normalize değer farkları. Karşılaştırmada en az bir verinin eşik değerini geçmesi ‘*’, her iki verinin de geçmesi ‘**’ olarak belirtilmiştir. Her iki verinin de eşik altında kaldığı durumlar ise belirtilmemiştir. ....	38

- Tablo 4.8:** D5 (Sağlıklı) bölgesinin, D4 (Patolojik) bölgesine göre en az iki kat fazla miktarda olan miRNA'lar ve oranları. En az bir verinin eşik değerini geçmesi '\*', her iki verinin geçmesi '\*\*' olarak belirtildi. Her iki verinin de eşik altında kaldığı durumlar ise belirtilmedi. ....38
- Tablo 4.9:** D4 (Patolojik)'ün, D5 (Sağlıklı)'e göre anlatımı en az iki kat artan miRNA'lar. En az bir verinin eşik değerini geçmesi '\*', her iki verinin de geçmesi '\*\*' olarak belirtildi.....39
- Tablo 4.10:** D5/D4 karşılaştırmasında iki katın altında ve bir katın üzerinde farklılık gösteren miRNA'lar ile MinS/MaxP'de benzer farklılık gösteren ortak miRNA'lar ve değerleri. Karşılaştırmada en az bir verinin eşik değerini geçmesi '\*', her iki verinin de geçmesi '\*\*' olarak belirtildi. Her iki verinin de eşik altında kaldığı durumlar ise belirtilmedi. ....40
- Tablo 4.11:** Gruplar arası karşılaştırmalarda belirgin motifler gösteren ve dahil oldukları grupları temsilen miRNA'lar ve normalize değerleri. Anlatım seviyeleri P>S>K olarak anlamlı ve belirgin motifler sergileyen miRNA'lar gösterilmiş ve bu miRNA'lar arasında yüksek anlatım ve güvenilirlikte değer veren miRNA'lar ve değerleri gri ile belirtilmiştir. *miR-548* ailesinin üç üyesi ayrıca vurgulanmıştır.....41
- Tablo 5.1:** MinK/MaxP ve MinK/MaxP-4'e göre  $MinK-10 \geq 2x MaxP-4$  değişimleri.  $MinK-10 \geq 2x MaxP-4$  karşılaştırılmasında ilk defa gözlenen miRNA değişimleri ve diğer karşılaştırma grupları ile ilişkileri ayrıca belirtilmiştir.....45

## SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ

<b>Simgeler</b>	<b>Açıklama</b>
$\mu$ l	: litrenin milyonda biri olan hacim birimidir.
%	: yüze
°C	: santigrad derece
$\mu$	: mikron
mg	: miligram
X	: sayı katı
dk	: dakika
sn	: saniye
/	: oran
>	: karşılaştırmalarda kullanılan büyüktür ifadesi
<	: karşılaştırmalarda kullanılan küçüktür ifadesi

<b>Kısaltmalar</b>	<b>Açıklama</b>
<b>ERK</b>	: hücre dışı sinyalle düzenlenen kinaz
<b>FFPET</b>	: formalinle fikslenmiş parafine gömülmüş doku
<b>HRP</b>	: horseradish peroksidaz enzimi. Özellikle immunhistokimya da görüntüleme için kullanılan, bakır ve hidrojen peroksitle reaksiyona girdiğinde mikroskop altında kahverengi görüntü veren bir enzim.
<b>İSF</b>	: ilerleyici supranükleer felç
<b>KBD</b>	: kortikobazal dejenerasyon
<b>MAPT</b>	: mikrotübül ilişkili protein tau
<b>miRNA</b>	: miRNA, küçük kodlama yapmayan RNA molekülleridir.
<b>NINDS-SPSP</b>	: National Institute of Neurological Disorders and Stroke and The Society for PSP
<b>Prob</b>	: Hedef moleküllere özgün bağlanabilen sentetik moleküllerdir.
<b>R (Repeat domain)</b>	: Proteinde yer alan tekrarlı domenler olarak tanımlanmıştır.
<b>Sub-haplotip</b>	: Belirtilen haplotipin bir alt tipi olarak kullanılmıştır.
<b>QC</b>	: kalite kontrol

## ÖZET

### DOKTORA TEZİ

# İLERLEYİCİ SUPRANÜKLEER FELÇ’li İNSAN BEYİN DOKULARINDA mikroRNA PROFİLLERİNİN KARŞILAŞTIRILMASI

Derya ÖZCİĞER

İstanbul Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Danışman : Doç. Dr. Bedia PALABIYIK

II. Danışman : Prof. Dr. M.Cengiz YAKICIER

İlerleyici supranukleer felç (İSF), ileri yaşlarda ortaya çıkan, diğer bazı nörodejeneratif hastalıklarla klinik olarak karıştırılabilen nadir bir hastalıktır. İSF’li hastalara ait beyin dokularındaki hücrelerde ‘tau proteininin aşırı fosforlanarak hücre içinde birikmesi ile hücresel birçok mekanizmanın bozulması ve nöron ölümleri tespit edilmiştir. Patolojik tau birikimini tetikleyen mekanizmalar henüz tam olarak bilinmemektedir. Ancak, literatürde bu patolojiyle ilişkili bazı miRNA (mikroRNA)’lar bildirilmiştir. Üretildikleri hücrelerin yanı sıra farklı hücrelere ve dokulara etki edebilen, küçük düzenleyici moleküller olan miRNA’lar, birçok hastalık ile ilişkilendirilmiş olup, patolojik mekanizmaların araştırılmasında, markır ve farmakolojik hedeflerin belirlenmesinde önemlidir.

Bu çalışmada, İSF patolojisine bağlı olarak değişen miRNA anlatım seviyelerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Çalışma için, İSF’li ve sağlıklı vericilere ait locus ceruleus otopsi beyin kesitleri ‘Multiple Sclerosis and Parkinson’s Tissue Bank’ beyin bankasından temin edilmiştir. Öncelikle, immunhistokimya yöntemiyle locus ceruleus otopsi beyin kesitlerinde anormal tau birikimlerinin tespiti yapılmıştır. Ardından, 800 miRNA’nın seviyelerindeki değişiklikler, PSP örneklerinde immünoreaktivite gösteren patolojik ve reaktivite göstermeyen sağlıklı bölgelerde ve sağlıklı verici kontrollerinde incelenmiştir. miRNA seviyelerinin tespitinde, moleküler barkodlama esasına dayalı hassas ve çok sayıda hedefi tespit edebilen tarama sistemi olan ‘NanoString nCounter®’ platformu kullanılmıştır.

Yapılan incelemeler sonucunda, İSF'li dokuların tau patolojisi gösteren hücrelerinin yoğunlaştığı bölgelerde, gene İSF'li dokuların tau patolojisi göstermeyen bölgeleri ve sağlıklı kontrol dokuları ile kıyaslandığında, miRNA anlatım düzeylerinde genel bir düşüş saptanmıştır. Bu incelemelerde, seviyelerinde anlamlı ve belirgin bir şekilde düşüş gösteren 24 adet miRNA tespit edilmiştir. Dahası, tespit edilen bu miRNA'lar arasında dört adet üyesi bulunan 'hsa-miR-548 ailesi'nin tau patolojisiyle ilişkili olabileceği düşünülmektedir.

Temmuz 2018, 75. sayfa.

**Anahtar kelimeler:** İlerleyici Supranukleer Felç, mikroRNA, locus ceruleus, tau, nanostring



## **SUMMARY**

### **Ph.D. THESIS**

## **COMPARISON of microRNA PROFILING of PROGRESSIVE SUPRANUCLEAR PALSY in HUMAN BRAIN TISSUES**

**Derya ÖZCİĞER**

**İstanbul University**

**Institute of Graduate Studies in Science and Engineering**

**Department of Molecular Biology and Genetics**

**Supervisor : Assoc. Prof. Dr. Bedia PALABIYIK**

**Co-Supervisor : Prof. Dr. M. Cengiz YAKICIER**

Progressive Supranuclear Palsy (PSP) is a rare late onset disease that can be confused clinically with some other neurodegenerative diseases. Many cellular mechanisms are dysregulated and neuronal death is detected due to the aggregation of hyperphosphorylated tau proteins in the PSP affected brain tissue cells. The triggering mechanism underlying the pathological tau aggregation is not totally determined yet. However, some miRNAs (microRNA) associated with the tau pathology have been reported in the literature. miRNAs, which are small regulatory molecules capable of effecting gene expressions of different cells and tissues as well as the cells they are produced in, have been associated with many diseases, are important in the study of pathological mechanisms, identification of marker and pharmacological targets.

In this study, it was aimed to determine the expression levels of miRNAs that changed depending on pathogenesis of PSP. For the study, locus ceruleus autopsy brain sections of the donors 'diagnosed with PSP' and healthy donors were provided by the 'Multiple Sclerosis and Parkinson's Tissue Bank'.

Firstly, abnormal tau deposits were detected in the sections of the locus ceruleus autopsy brain tissues by using immunohistochemistry. Subsequently, changes in the levels of 800 miRNAs

were examined in pathological regions showing immunoreactivity and not reactivity in PSP samples, and healthy donor controls. To detect the miRNA expression levels, the 'NanoString nCounter®' platform, which based on molecular barcoding approach can detect multiple targets sensitively, was used.

As a result of the investigations, an overall decrease in expression levels of miRNAs was observed when the areas rich in tau pathology containing cells of PSP tissues were compared with the areas without tau pathology of PSP tissues and healthy control tissues. In this study, 24 miRNAs were detected that significantly and meaningful decreased in expression levels. Moreover, Of these miRNAs detected, it is thought that the 'hsa-miR-548 family with four members may be associated with tau pathology.

July 2018, 75 pages.

**Keywords:** Progressive Supranuclear Palsy, microRNA, locus ceruleus, tau, nanostring



## 1. GİRİŞ

İlerleyici supranukleer felç (İSF), 40'lı yaşlardan itibaren ilerleyen yaşla belirtileri ortaya çıkan, nadir gözlenen nörodejeneratif bir hastalıktır. Tipik olarak denge, yürüme, göz hareketleri ve görüş üzerinde etkisi vardır. Ancak konuşma, yutkunma, davranış ve düşünce gibi farklı bir çok fonksiyonu da etkileyebilmektedir. Klinik olarak benzerlik gösterdiği nörodejeneratif hastalıklar bulunması nedeni ile bu nadir hastalığın ayırıcı tanısı zordur. Bu nedenle hastalığın kesin tanısı ancak, bazal ganglia ve beyin köküne ait otopsi beyin dokularında patolojik tau proteini birikimlerinin tespiti ile yapılabilmektedir (Respondek ve diğ., 2013).

İSF'nin ayırıcı teşhisinin zor olması ve patolojisine ait moleküler mekanizmanın tam olarak bilinmemesi nedeniyle henüz hastalığın tanı ve izlenmesinde kullanılabilen standart moleküler bir yöntem mevcut değildir. Bu mekanizmaların anlaşılmasında ve moleküler hedeflerin belirlenmesinde, dejenerasyon bölgesi üzerinde yapılabilecek çalışmalar büyük önem taşımaktadır. Özellikle ilerleyen yaşla, çevresel faktörlerin de etkisiyle ortaya çıkan bu hastalığın araştırılmasında epigenetik yaklaşımlar şarttır. Epigenetik hedeflerden miRNA'lar, hem DNA metilasyonu ile etkileşim içinde olmaları (Shivakumar ve diğ., 2017), hem de mRNA düzeyinde gen anlatımlarını etkileyebilmeleri açısından, farmakolojik hedefler ve markır adayları olarak görülmektedir (Piletič ve Kunej, 2016). Bu nedenle, epigenetik düzeyde gen anlatımlarında düzenleyici rol alan, çevresel faktörler ve yaşla değişik profiller gösteren mirRNA'lar, İSF patolojisinin araştırılmasında ideal moleküler hedeflerdendir.

Diğer taraftan, İSF 'de tau patolojisinden başlıca etkilenen bölge olan beyin kökünde yer alan pigmentli hücrelere sahip 'locus ceruleus' bölgesinin norepinefrin salgılayarak stres ve dışsal etkilere bağlı olarak beynin bir çok bölümünü ve sempatik sinir sistemini uyardığı bilinmektedir. Bu bölgenin dış kaynaklı toksik etkilere maruz kalması ile nörodejeneratif, psikiyatrik ve demiyelinizasyona sebep olan hastalıklara yol açabileceği belirtilmiştir (Pamphlett, 2014). Dış kaynaklı etkilerle iç dengenin sağlanmasında rol alan 'locus ceruleus' bölgesindeki, yine çevresel etkenler ve yaşam evrelerine göre genlerin işleyişlerinde düzenleyici rol alan miRNA değişimlerinin incelenmesi, ileri yaşta belirti veren ve büyük oranda çevresel faktörlerle ortaya çıkan nörodejeneratif hastalıkların oluşum mekanizmalarına ışık tutabilir.



Bu çalışmada, İSF patolojisinin ‘locus ceruleus’ bölgesi üzerindeki moleküler etkisi aydınlatılmak istenmiştir. Bu nedenle, İSF’li ve sağlıklı vericilere ait ‘locus ceruleus’ otopsi beyin kesitlerinde, bu bölgedeki patolojik etkiyle değişen miRNA anlatım seviyelerinin karşılaştırılması yapılmıştır. İSF patolojisinin etki alanlarının belirlenebilmesi için, İSF hastalığının kesin teşhisinde temel patolojik kriter olan anormal tau protein birikimlerinin tespiti (Respondek ve diğ., 2013) gerekmektedir. Bu nedenle, doku kesitlerindeki anormal tau birikimleri, immunhistokimya yöntemi kullanılarak, tau antikoruyla immun reaktivite gösteren bölgelerin tespitiyle belirlenmiştir. İmmun reaktivite gösteren bölgelerin patolojik etkileri yansıtması beklendiği için bu bölgeler, sağlıklı ve kontrol bölgelerle karşılaştırılmalı olarak incelenmiştir. Bu bölgelerin miRNA seviyelerindeki değişimlerin karşılaştırılması, eşzamanlı olarak çok sayıda miRNA’nın anlatım profilini çıkartabilen, hassas bir sistem olan, NanoString teknolojisi ile gerçekleştirilmiştir. Kullanılan bu sistemin temeli, enzimatik bir çoğaltma işlemi olmadan, doğrudan örnekteki hedef miRNA’ların barkodlanmasına ve her miRNA’ya özgün barkodların mikroskobik olarak sayılarak kaydedilmesine dayanmaktadır.

Bu çalışmada ‘Multipl Skleroz ve Parkinson Doku Bankası’ tarafından İSF tanısı konulmuş locus ceruleus otopsi beyin dokularının patolojik ve patolojik olmayan bölgeleri ile sağlıklı bireylere ait dokular kontrol olarak kullanılarak, patolojiye bağlı değişen miRNA anlatım seviyeleri karşılaştırılmıştır. Bu karşılaştırmaya göre, anlatım seviyelerinde belirgin olarak farklılık tespit edilen 24 miRNA’nın, tau patolojisine bağlı moleküler değişimi aydınlatması beklenmektedir. Bu değişimlerin anlamlandırılması, hastalığın tedavisine ışık tutabilecek yeni moleküler hedeflerin belirlenmesi için önemlidir. Ayrıca, beyin materyallerinde tau patolojisiyle ilişkili belirgin farklılıklar gösteren miRNA’ların ya da miRNA hedeflerinin kan, beyin omurilik sıvısı gibi dokularda da farklılıklar göstermesi, bu dokular kullanılarak hastalığın tanı ve teşhisinde etkili markırların keşfine ışık tutabilir.

## 2. GENEL KISIMLAR

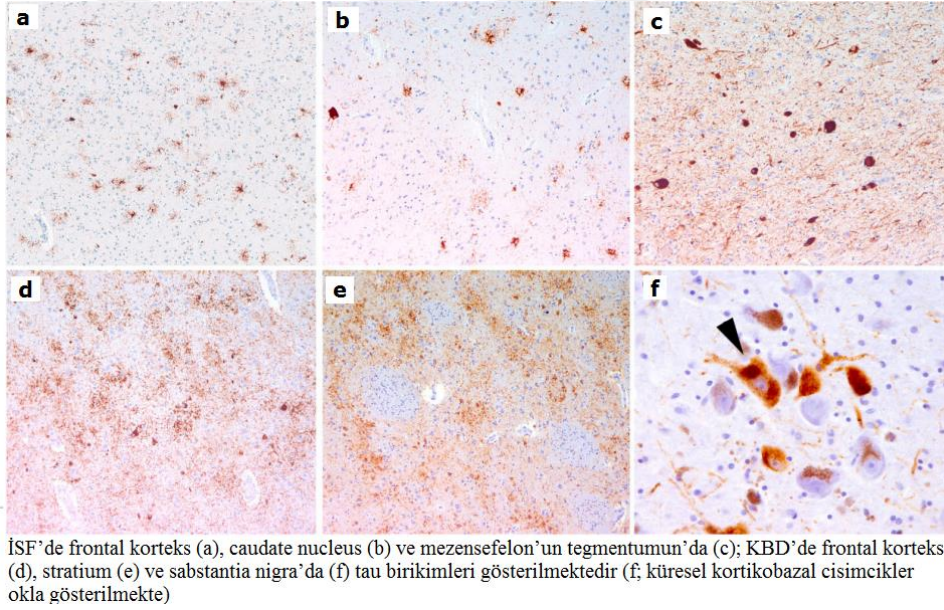
İlerleyici supranükleer felç (İSF), 1964 yılında tanımlanan, ‘Steele-Richardson-Olszewski sendromu’ olarak da bilinen ve atipik parkinsonizm grubuna dahil nadir rastlanan bir nörodejeneratif hastalıktır (Steele ve diğ., 1964). Bu hastalık 40’lı yaşlardan itibaren belirtiler göstermeye başlayan, yaşla birlikte ilerleyen ve ileri evrelerinde diğer bazı nörodejeneratif hastalıklarla benzeşen klinik sergilemektedir. Tipik olarak denge, yürüme, göz hareketleri ve görüş üzerinde etkisi vardır. Ancak, konuşma, yutkunma, davranış ve düşünce gibi farklı bir çok fonksiyonu da etkileyebilmektedir. İSF’nin ayırıcı tanısı için NINDS-SPSP (National Institute of Neurological Disorders and Stroke and The Society for PSP) ölçütlerine göre, hastalığın ilk yılında postüral dengesizlik nedeniyle gözlenen düşmeler ve yavaş vertikal seyirme ya da supranükleer bakış paralizisi belirtileri esas alınmıştır (Respondek ve diğ., 2013). NINDS-SPSP ayrıca, İSF’nin ayırıcı klinik tanısının zor olması nedeniyle, hasasiyet ve özgünlüğü arttıracak ölçütler belirleyerek, olguları ‘mümkün’ ve ‘muhtemel’ İSF olguları olarak sınıflandırmaya çalışmıştır (Respondek ve diğ., 2013). Ancak, mevcut bilgilerle bu hastalığın kesin tanısı, otopsi beyin materyallerinde bazal ganglia ve beyin kökünde patolojik tau proteini birikimlerinin tespitine dayanmakta olup NINDS-SPSP’e göre altın standart olarak değerlendirilmektedir.

### 2.1. NÖRODEJENERASYONDA TAU PROTEİNİNİN ÖNEMİ

Çoğu nörodejeneratif hastalığın histopatolojisinde bir ya da birkaç proteinin anormal şekilde birikimi gözlenir. Bu nöropatolojik birikimler, hücrelerin işlevlerini etkiler ve etkilenen bölgelerde hücre dejenerasyonları gerçekleşir. Yakın zamanda, nörodejeneratif bir hastalık olan Alzheimer’lı beyin dokularında yapılan bir çalışma ile, patolojik tau protein birikimlerinin nükleus içerisine girerek nükleer dejenerasyona sebep olduğu ve bu dejenerasyonun protein sentezinin sekteye uğraması nedeni ile mitokondri sayısı ve dağılımında azalma olduğu mikroskopik yöntemlerle ortaya konulmuştur (Wee ve diğ., 2018). Bu denli kritik bir etkiye sahip tau proteininin, anormal yapısı ve birikimi ‘Taupatiler’ olarak adlandırılan bir grup nörodejeneratif hastalığın histopatolojisinde belirgin olarak gözlenir (Avila ve diğ., 2004). En iyi bilinen taupati gurubu hastalığı Alzheimer olmakla birlikte, bu hastalıkta tau birikimini takiben amiloyid plak oluşumu nedeniyle, bu hastalık, ikincil taupati olarak gruplandırılır. Ancak, İSF ve hem klinik hem de nöropatolojik olarak İSF’ye benzerlik gösteren kortikobazal

dejenerasyon (KBD)'un patolojisinde, tau proteinin işlevindeki ve düzenlenmesindeki bozukluğun merkezi rol oynaması nedeni ile, İSF ve KBD birincil tauopati gurubunda yer alır (Williams ve Lees, 2009; Kovacs, 2015).

Taupati grubu hastalıklarının ayrımları, patolojiden etkilenen: beyin bölgelerine, hücre tiplerine ve patolojik birikintilerde yer alan farklı tau proteini izoformlarına göre yapılabilmektedir (Kovacs, 2015). İSF ve KBD'nin patolojilerindeki ve genetik alt yapılarında benzerlikler bulunmasına karşın, majör olarak etkilenen beyin bölgeleri farklılık göstermektedir (Şekil 2.1). Tau birikimleri KBD'de çoğunlukla önbeyni etkilerken İSF'de medulla, pons ve serebellum bölgelerini etkilemektedir (Dickson ve diğ., 1999). Ayrıca, İSF'de subkortikal düğümlerle (tangles) birlikte astroglialardaki belirgin tau patolojisinin gözlenmesi ve bu iki hastalığın patolojisinde farklı tau türlerinin bulunması İSF'yi histopatolojik olarak KBD'den farklı kılar (Clavaguera ve diğ., 2013).

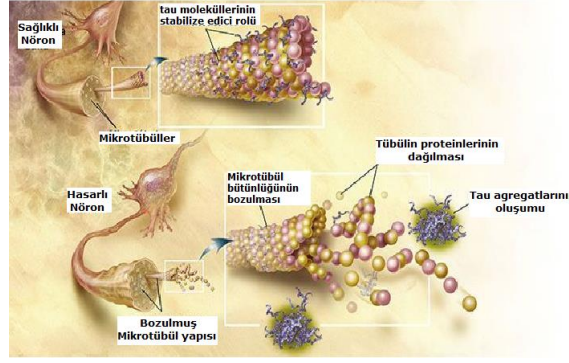


**Şekil 2.1:** İSF ve KBD'de Tau (AT8) immunoreaktivitesi ile tespit edilmiş histopatolojik bulgular Kovacs (2015)'tan uyarlanmıştır.

### 2.1.1. Tau Proteininin Fosforlanması

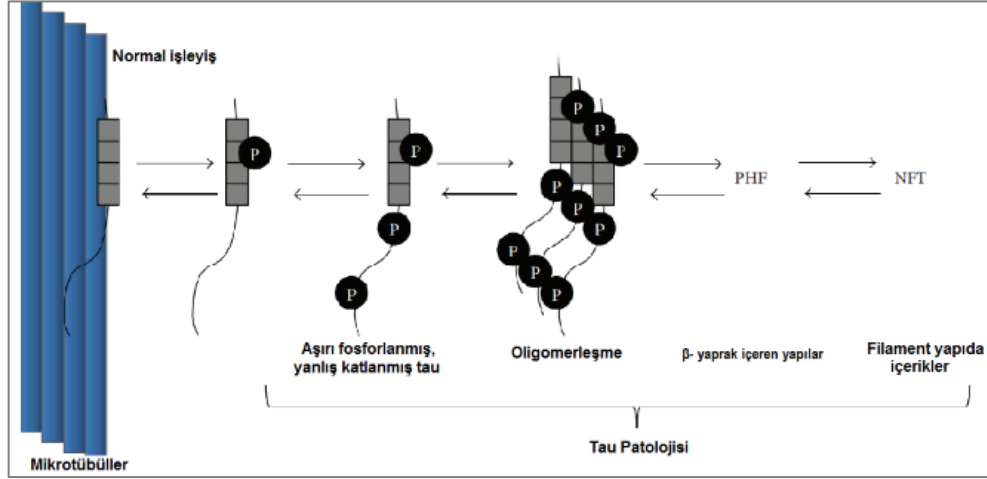
İkincil taupatilerde, Alzhiemer’da amiloid plaklar gibi, tau birikimlerini tetikleyici etkiler tahmin edilirken (Villemagne ve diğ., 2017), birincil taupatilerde tau birikimlerinin oluşumunu tetikleyici mekanizmalara ait çok fazla somut bilgi mevcut değildir. Ancak yapılan çalışmalar, çevresel etkenlerin, tau proteininin gen düzeyinde ve translyasyon sonrası birikimlerin oluşumuna katkıda bulunduğunu göstermektedir (Pittman ve diğ., 2006). Tau birikimlerini oluşturan anormal fibril oluşumuna etkisi olabilecek mekanizmalar: tau proteinini kodlayan MAPT (microtubule-associated protein tau) geninde alternatif kırılmalar, N- ve C- uç sonlandırmaları, asetilasyon, glikozilasyon, oksidatif ve nitratif hasarlar, transglutaminasyon, deaminasyon, tau oligomerizasyonu ve fosforlanmasıdır (Kovacs ve diğ., 2010). Tau patolojisinde zararlı işlevsel etkisi olduğu bilinen en önemli post translyosomal modifikasyonlardan birisi ise taunun aşırı fosforlanmasıdır (Iqbal ve diğ., 2009).

Proteinlerin fosforlanması, proteinlere ilgili kinaz enzimleri tarafından fosfat gruplarının eklenmesiyle gerçekleşir. Belirli bakiyelerden fosforlanarak aktif hale gelen proteinler, hücre içinde çeşitli işlevleri gerçekleştirirler. İşlevlerini tamamlamış aktif proteinlerin fosfat grupları fosfotaz enzimleri ile uzaklaştırılarak inaktif hale getirilirler. Tau proteininin fosforlanarak aktifleşmesinin, taunun temel görevleri olan: mikrotübüllerin yapısının ve kararlılığının korunması (Esmaeli-Azad ve diğ., 1994), sinyal moleküllerinin vesiküller transportu, mitokondrilerin akson boyunca taşınması, dendiritlerin pozisyonlanması, DNA’nın hücre stresinden korunması ve tau proteinlerinin serbest hale geçmesinde önemli rolü vardır (Avila ve diğ., 2004; Noble ve diğ., 2013). Tau proteinin temel işlevlerinden olan mikrotübül yapısının kararlılığının sağlanması, **Şekil 2.2**’de şematize edilmiştir. Şekilde sağlıklı bir nöronun aksonunda bütünlük içinde tutulan mikrotübül filamentleri ve hasarlı bir nöronun, anormal tau işlevi nedeniyle dağılmış mikrotübül yapısı ile anormal tau birikimleri gösterilmektedir.



**Şekil 2.2:** Sağlıklı ve hasarlı nöronlarda normal ve anormal tau oluşumları. Wikipedia.org'dan uyarlanmıştır.

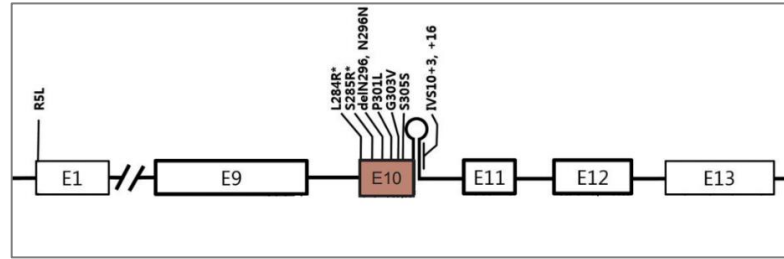
Hücre içerisindeki işlevlerini normal bir şekilde gerçekleştirebilmek için tau proteinleri, kinaz enzimleri tarafından bilinen iki ya da üç bakiyesinden fosforlanırlar (Noble ve diğ., 2013). Ancak, gerek tauyu fosforlayan kinazların anormal aktivitesi, gerek defosfotazların yetersizliği, gerekse tauyu kodlayan MAPT geninin kırılması ya da tau proteininin işlenmesi aşamasındaki aksaklıktan ötürü aşırı fosforlanmaya meyilli tau türleri oluşur. Meydana gelen aşırı fosforlanmış toksik tau proteinleri, mikrotübüllerden ayrılarak birbirleriyle oligomerleşirler (**Şekil 2.3**) ve suda çözünmeyen yığınlar oluştururlar. Bu toksik yığınlar yıkımlarından sorumlu proteozomları da inhibe ederek kümülatif bir etki gösterirler (Oddo ve diğ., 2004; Poppek ve diğ., 2006; Keck ve diğ., 2003). Diğer taraftan, mikrotübülleri bir arada tutarak hücre iskeletinin kararlılığını sağlayan tau proteinlerinin iskeletten ayrılması, mikrotübül bütünlüğünün bozulmasına ve böylece hücresel birçok mekanizmanın işlevini yitirmesine, dolayısıyla hücre ölümüne sebep olurlar (De Vos, ve diğ., 2011).



**Şekil 2.3:** Tau proteininin normal ve anormal fosforilasyonu, anormal tau filamentlerinin oluşumu, De Vos ve diğ. (2011) 'den uyarlanmıştır.

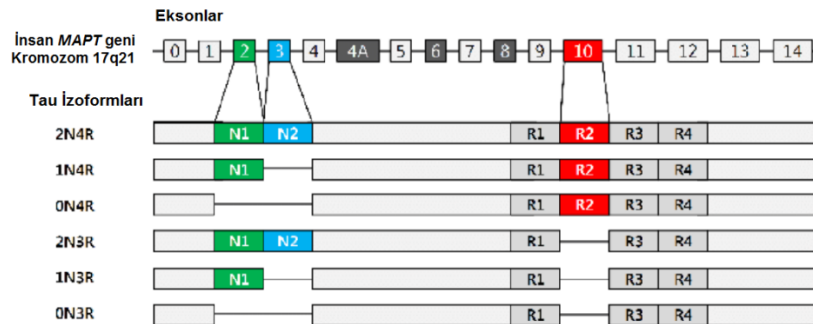
### 2.1.2. Tau Patolojisinde Bilinen Genetik Etkenler ve MAPT Geninin Kırpılması

Taupati gurubu hastalıklarda bu derece önemli rolü olan tau proteinini kodlayan, kromozom 17'nin q kolunun q31.21 bölgesinde yer alan MAPT (microtubule-associated protein tau) genine ilişkin yeni bulgular, gelişen moleküler teknikler sayesinde elde edilmeye devam etmektedir. MAPT geninin dışında İSF ile ilişkilendirilmiş STX6, EIF2AK3 ve MOBP genlerine ait varyantlar da bulunmaktadır (Hoglinger ve diğ., 2011). Bunlar arasında MAPT, tau proteinini kodlaması nedeni ile, en çok çalışılanıdır. Yapılan incelemelerde MAPT genini içeren yaklaşık 1MB'lık inversiyon ile oluşan H1 haplotipi İSF ve KBD'de risk faktörü olarak gösterilmiştir (Baker ve diğ., 1999; Houlden ve diğ., 2001). Bu H1 haplotipinin bir alt tipi olan, MAPT geninin birinci eksonundan önceki bölgede, tek nükleotid değişimi ile farklılık gösteren H1C1 sub-haplotipi ise İSF'de tau anlatımının artışı ile güçlü bir şekilde ilişkilendirmiştir (Pastor ve diğ., 2016; Pittman ve diğ., 2005; Myers 2007). Hatta MAPT genine ait intron 0'da yapılan metilasyon çalışmaları, incelenen İSF hastalarında bu bölgede hipometilasyon ve artmış gen anlatımı göstermektedir (Huin ve diğ., 2016). MAPT'ta yapılan incelemelerde dikkat çekici diğer bir mekanizma genin kırılmasıdır. MAPT geninin 10'uncu eksonunun, genin anlatımına dahil olup olmaması ile farklı sayıda bağlanma domaini içeren tau türleri oluşur. MAPT geninde tespit edilen mutasyonların büyük çoğunluğunun (9/10) ekson 10'da ve kırılma bölgesinde yer aldığı (Şekil 2.4) bildirilmiştir (Sun ve diğ., 2015).



**Şekil 2.4:** MAPT geninde saptanan mutasyonlar. MAPT geni ve bu gene ait mutasyonlar gen üzerinde şematize edilmiştir. Sun ve diğ. (2015)'den uyarlanmıştır.

Yetişkin bir insan beyninde, MAPT geninde alternatif kırılımlar ile oluşan altı adet tau izoformunun anlatımı yapılır (Goedert ve diğ., 1989; Spillantini ve Goedert, 2013). Bu altı izoform, N-terminal bölgesinde ekson 2 ve/veya 3'ün bulunmalarına göre, 3 ve ekson 10 içerip içermemelerine göre de 2 varyasyonla oluşmaktadır (**Şekil 2.5**). C-terminalinde yer alan dizi tekrarlarından oluşan mikrotübül bağlanma domenleri, ekson 9, 10, 11 ve 12'de kodlanır. Bağlanma domenindeki bu tekrar dizileri, tau proteini ile mikrotübül arasındaki etkileşimleri sağlar. Ekson 10'da yer alan tekrar dizisinin dahil edilmesine göre 4R(E10+) ya da 3R(E10-) izoformları oluşur (Andreadis ve diğ., 1992; Goedert ve diğ., 1989; Andreadis, 2005). Bu izoformların oranı (3R/4R) normal bireylerde dengede iken, tau patolojisi gösteren bireylerde fibrilleşmeye meyilli 4R'de artış görülür (Stamelou ve diğ., 2010; Espíndola, 2018).



**Şekil 2.5:** MAPT geninde alternatif kırılma ile oluşan tau izoformları. MAPT genine ait ekzonlar Sun ve diğ., (2016)'den uyarlanmıştır

## 2.2. miRNA'ların NANOSTRING YÖNTEMİ İLE İNCELENMESİ

Her geçen gün gelişen moleküler teknikler, bu küçük moleküllerin hassas ve doğru şekilde belirlenmesine olanak vermektedir. Bu nedenle az miktarda elde edilebilen ve son derece değerli İSF'li otopsi beyin materyallerinin çalışılmasında nanostring teknolojisi tercih edilmiştir.

Nanostring sisteminde, örneklerde bulunan 800 miRNA'nın anlatımındaki değişimlerin belirlenebilmesi için birkaç basamaklı bir protokol uygulanmaktadır. Bu uygulamalardaki genel mantık sırasıyla;

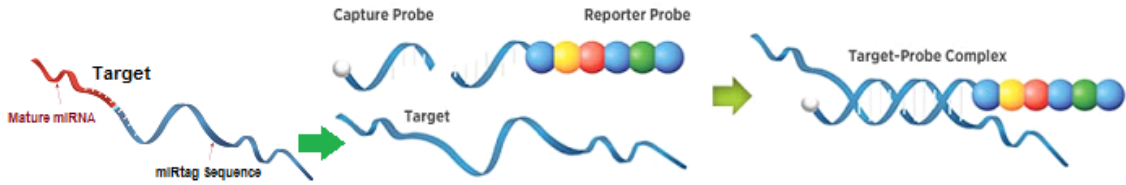
- a) Küçük miRNA dizilerinin özgün olarak belirlenebilir daha büyük moleküller haline getirilmesi,
- b) Elde edilen bu yeni moleküllerin tanımlanabilmesi için altı adet farklı renkte ve farklı kombinasyonlarda florofor içeren problarla bağlanarak kimliklendirme yapılması ve kimliklenen bu moleküllerin 'array' yüzeyine tutunabilmesi için biyotin bağlı yakalayıcı problarla hibridizasyonu,
- c) Kompleks bir yapı kazanmış belirtici ve yakalayıcı problu bu molekülün kapalı bir sistemde array yüzeyine bağlanması,
- d) 'Array' yüzeyinde sabitlenmiş olan bu kompleks ve barkodlu moleküllerin elektrik alan altında ipliksi bir dizilim gösteresiyle mikroskopik olarak barkodların sayılması
- e) nSolver Analiz sisteminde, her bir barkodlu miRNA sayısının, çalışma esnasında eklenmiş iç kontrol molekülleri ile birlikte değerlendirilmesi

olarak özetlenebilir.

Örneklerin hazırlanmaları aşamalarında (a ve b) hedef miRNA'lar, miRtag dizileriyle özgün olarak birleşerek 'hedef moleküller'ini oluştururlar. Bu şekilde oluşturulan uzun ve özgün dizi olan hedef molekülleri, array yüzeyine bağlanabilmek için biyotin işaretli yakalayıcı problar (capture probe) ve kimliklendirme için belirtici problar (reporter probe) ile hibridize olabilirler. Belirtici problar, tarama cihazı tarafından miRNA'ların kimliklerinin mikroskopik olarak tanımlanıp, sayılarının belirlenebilmesi için farklı renkte özgün barkodlar içermektedirler. belirtici problemlerin barkodlama (kimliklendirme) sistemi, hedef moleküllerine özgü diziler ile birlikte, altı farklı pozisyonda yer alan dört florofordan oluşmaktadır.

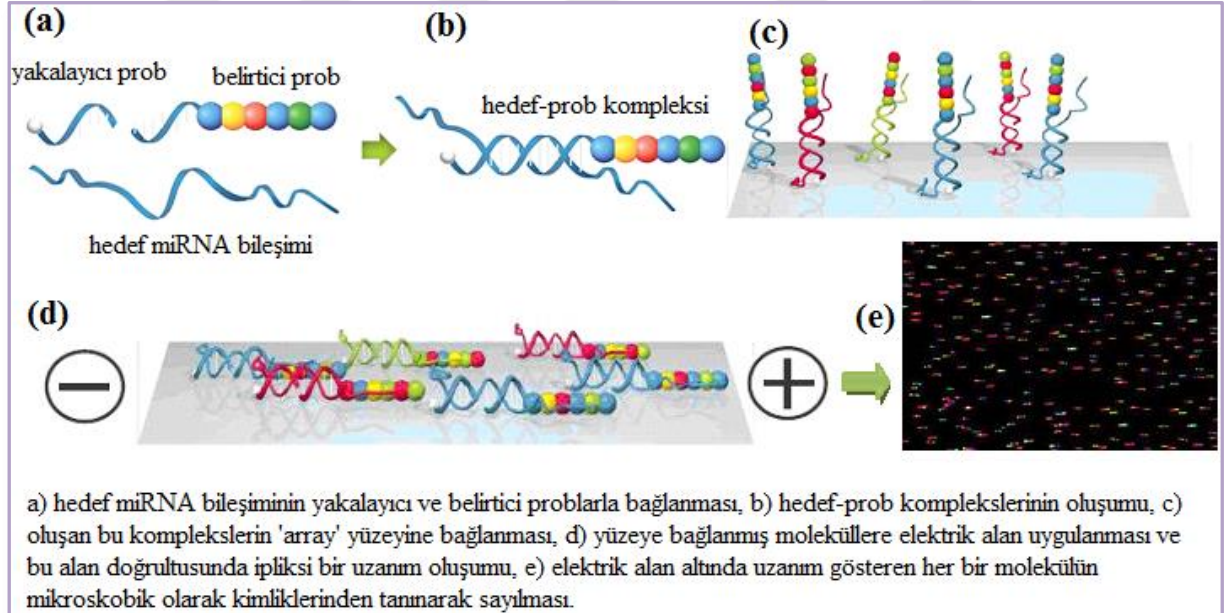


Hibridizasyon aşaması ile hedef molekülleri, yakalayıcı probeları ve belirtici probeları ile birlikte hedef-prob Komplekslerini (target-probe Complex) oluştururlar (Şekil 2.6).



Şekil 2.6: 'target-probe complex' nin oluşumu (www.nanostring.com'dan alıntıdır).

Nanostring teknolojisi temelli yapılan çalışmanın detayları 'Malzeme ve Yöntem' bölümünde ele alınmış olup çalışma düzeneği genel hatları ile Şekil 2.7'de gösterilmiştir.



Şekil 2.7: 'Nanostring nCounter® miRNA Expression Assays'in çalışma prensibi. Nanostring Technologies (2015)'den alınmıştır.

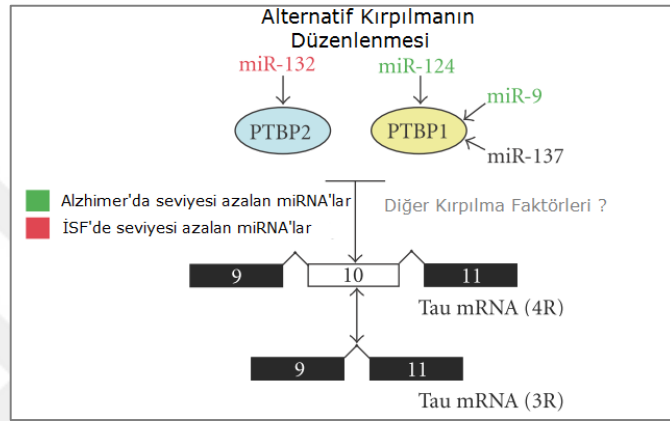
Bu teknoloji, hedef molekülleri enzimatik bir çoğaltım olmaksızın, az miktardaki materyalden doğrudan kimliklendirerek belirleyebilmektedir. Ayrıca çoklu miRNA hedeflerini eş zamanlı olarak tespit edebilmesi ve bunu parafin dokular gibi kaliteli nükleik asit eldesi zor ve az miktardaki örneklerden yapabilmektedir. Bu nedenlerden ötürü tercih ettiğimiz ‘Nanostring teknoloji’si, bu çalışmada amaçlanan, az sayıda parafin beyin kesitinden, belirlenen bölgelerdeki miRNA’ların hassas olarak miktarlarının ölçümü için en uygun yöntemdir. ‘Nanostring’ teknolojsi kullanılarak, parafine gömülü dokuların veya beyin dokularının çalışıldığı araştırmalar bulunmaktadır (DeCicco ve diğ., 2015; Kolbert ve diğ., 2013).

### 2.3. miRNA’LARIN NÖRODEJENERASYONDAKİ ÖNEMİ

Kırılma mekanizmasıyla farklı protein izoformlarının oluşumunda miRNA’ların rolü önemlidir. miRNA’lar, kodlama yapmayan küçük RNA’lar olup, hücre çekirdeğinde kodlanmayan DNA dizilerinden ya da intronlardan oluşurlar. Olgun, işlevsel yapılarına kavuşabilmeleri için hücre sitoplazmasında ileri işlemlerden geçerek argonat proteini ile birleşirler. İlgili hücre içindeki hedef mRNA’larla dizi eşleşmesi göstererek, ya mRNA’nın proteine dönüşmesine engel olurlar ya da yavaş bir mekanizmayla yıkımına yol açarlar. miRNA’lar, bu mekanizmayla mRNA’ları baskılayarak genlerin / proteinlerin işlevlerini dolaylı olarak kontrol ederler. Tek bir miRNA’nın yüzlerce mRNA’yı etkileyebilme kapasitesi ise birden çok genin anlatım motifini düzenler. Diğer taraftan, yaşa ya da dejenerasyona bağlı olarak hücre işlevlerindeki değişimler veya telomeraz aktivitesinin azalması gibi yapısal değişiklikler, miRNA’ların düzenlenmesini etkiler (Dimmeler ve Nicotera, 2013).

miRNA’ların hedef aldıkları proteinlerin işlevlerine bağlı olarak miktarlarındaki artış ya da azalışları, o proteinlerin sorumlu oldukları mekanizmalardaki işleyişi etkiler. Alternatif kırılma mekanizmasıyla farklı protein izoformlarının oluşumunda düzenleyici rol alan miRNA’lar, kırılma faktörleri, cis-elementleri çeşitli proteinler ve kinazlarla birlikte etki gösterirler (Sun ve diğ., 2016). Neuro2a hücre hatlarında yapılan işlevsel çalışmada, PTBP1 ve PTBP2 nöronal kırılma faktörlerini hedef alarak, MAPT geninin 10’uncu eksonunun kırılmasıyla 4R:3R oranını düzenleyen miR-132, miR-124, miR-137 ve miR-9 miRNA’ları tespit edilmiştir (Smith ve diğ., 2011). Tau’nun kırılmasında göre, 4 adet tekrar domeninin tamamını içeren 4R tau izoformu miktarının, bir tane tekrar domeninin dışlanması ile oluşan 3R tau izoformu miktarına oranındaki(4R:3R) artış, tau patolojisiyle ilişkilendirilmiştir (Chen

ve diğ., 2010). Çalışmalara göre, miR-124, miR-137 ve miR-9'un artışına bağlı olarak 3R taşıyan tau türlerinin artışı gözlenirken, miR-132'deki düşüğe bağlı olarak PTBP2 kırılma faktörünün anlatımındaki artışın 4R oranının artmasına sebep olduğu gösterilmiştir. Bu nedenle, İSF hastalığında artmış 4R oranının mekanizmasının aydınlatılmasında miR-132 aday miRNA olarak değerlendirilmiştir (Smith ve diğ., 2011; Hébert ve diğ., 2012).

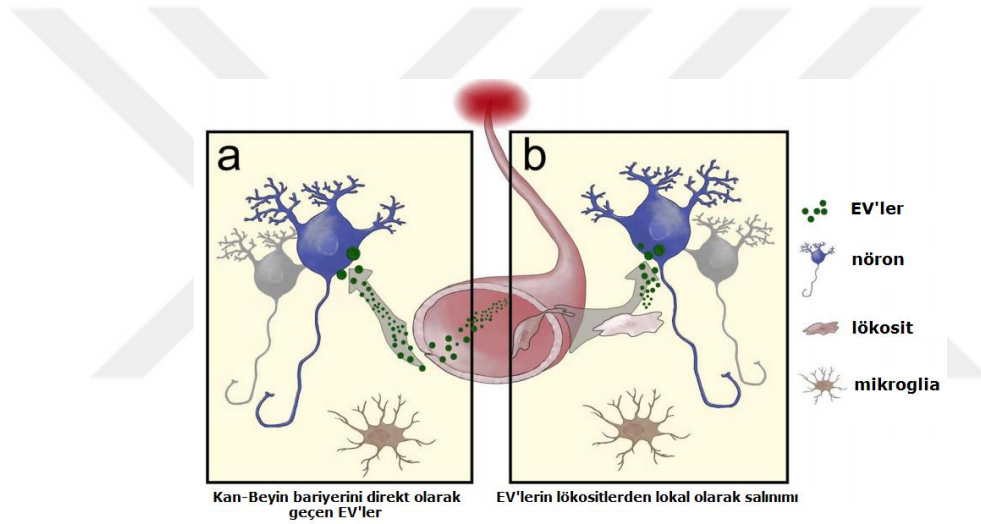


**Şekil 2.8:** Tau RNA'sında alternatif kırılmanın düzenlenmesinde görev alan ve MAPT genine ait ekzon 10'nun kırılmasında etkili olan miRNA'lar gösterilmiştir. Hébert ve diğ. (2012)'den uyarlanmıştır.

Ayrıca, tau patolojisinde önemli bir mekanizma olan taunun fosforlanmasında miRNA'ların etkileri araştırılmaktadır. Alzheimer modeli rekombinant *E.coli* hücrelerinden elde edilen izolalarda, miR-16, miR-15, miR-195 ve miR-497'nin, taunun fosforlanmasında görev alan ERK1/2 (Hücre dışı sinyallerle düzenlenen kinazlar)'nin (Drewes, 1992) işleyişini etkilediği gözlenmiştir (Hébert ve diğ., 2012). Ancak, fare modeli ve SH-SY5Y hücre hatlarında yapılan çalışmada, fizyolojik koşullarda ERK1/2'nin farmakolojik olarak inhibe edilmesinin tau fosforlanmasını etkilemediği göstermiştir (Noël ve diğ., 2015). Dolayısıyla, *in vitro* ortamlarda yanıltıcı bulgular elde edilebileceği için bu çalışmaların fizyolojik ortamında yapılmasının önemi ortaya konulmuştur.

miRNA'lar, sadece sentezlendikleri hücreler içinde bulunmayıp, ekstraselüler vesiküllerle hücre dışına salınarak diğer hücre ve dokulara iletilmekte ve aynı mekanizmayla alıcı hücrelerin gen anlatımını etkileyebilmektedirler (Valadi ve diğ., 2007; Frühbeis ve diğ., 2013). Bu

özellikleri, hücrelerin birbirlerini etkilemesiyle ilerleyen nörodejeneratif hastalıklar açısından oldukça önemlidir. miRNA'lar, yakın dokulardaki hücrelerin gen anlatım profillerini etkileyebilmelerinin yanısıra, kan beyin bariyerini geçebilen moleküllerden olmaları (Ridder ve diğ., 2014) bakımından da önemlidirler. miRNA'lar mikropartiküller içinde (ekzozom, mikrovesiküller ve apoptatik cisimler) ya da RNA bağlayıcı proteinlerle (argonat2) veya lipoprotein kompleksleri (high-density lipoprotein, HDL) aracılığıyla yıkılmadan kanda taşınırlar (Creemers ve diğ., 2012). Ayrıca, miRNA'ların, ekstraselüler veziküller (Ev) ya da lökositler içerisinde taşınarak, enflamasyonlu bölgeden kan-beyin bariyerini geçip nöronlara iletildiği bilinmektedir (Ridder ve diğ., 2014) (Şekil 2.9).



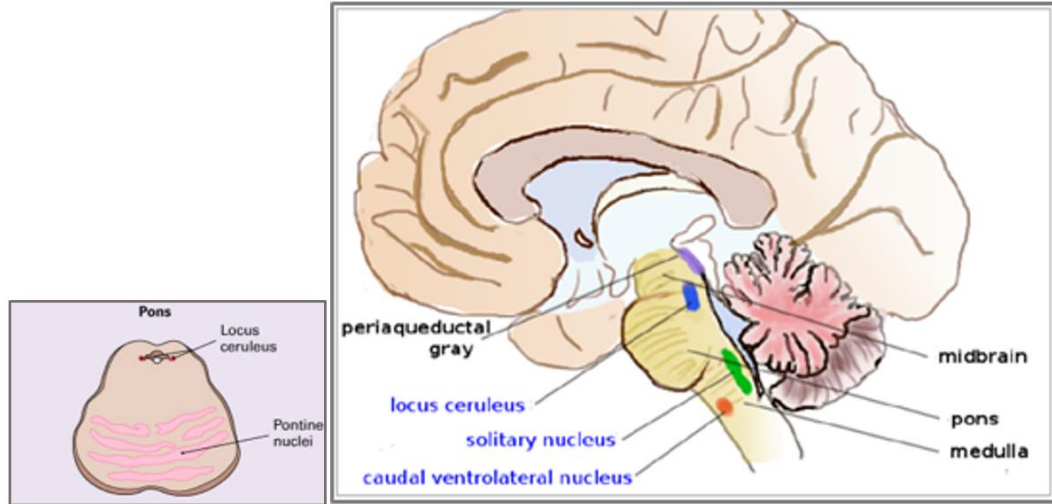
**Şekil 2.9:** miRNA'ların ekstraselüler veziküller (Ev) (a) ve lökositler içinde (b), enflamasyonlu bölgeden kan-beyin bariyerini geçerek nöronlara taşınmaları. Ridder ve diğ., (2014)'den uyarlanmıştır.

Son yıllarda birçok beyin merkezli hastalığa sahip bireylerden, eldesi kolay olan, kan dokusunda miRNA'ların izlenmesi hastalıklarla ilişkili moleküler belirteçlerin aranmasında önem kazanmıştır. Ancak nörodejeneratif hastalıkların tanısına yardımcı olabilecek belirteç arayışlarının doğrudan kandan yapılması bu hastalıkların; kompleks ve kümülatif etkilerle oluşması, bireye göre farklılık göstermesi, yaşa bağlı diğer hastalıkların da etkisinin bulunması ve klinik olarak sıkça biribiri ile karıştırılması nedeni ile oldukça zordur. Bu nedenle ilk aşamada patolojinin çıkış yeri olan dokuların belirlenmesi ve sağlıklı dokularla karşılaştırılması önemlidir. Beyin dokularından elde edilen bulguların aynı zamanda kan ve beyin omurilik

sıvılarından (BOS) elde edilen miRNA profilleri ile karşılaştırılmasında bu hastalıklara özgü belirteçlerin tanımlanmasında büyük önem taşımaktadır.

#### 2.4. LOCUS CERULEUS BÖLGESİNİN ÖNEMİ

Çalışmada, İSF patolojisinden etkilenen beyin kökünün dorsal bölgesinde yer alan locus ceruleus bölgesine (Bouret ve Sara, 2010) ait otopsi beyin materyalleri incelenmiştir. Locus ceruleusun insan beynindeki konumu **Şekil 2.10**'da şematize edilmiştir.



**Şekil 2.10:** Locus ceruleus'un konumu. Locus ceruleus'un, ponsa ait temsili yatay kesitte konumu ile insan beynindeki yeri şematik olarak gösterilmiştir. Bouret ve Sara (2010) ve <http://www.learnneurosurgery.com/progressive-supranuclear-palsy.html>'den uyarlanmıştır.

İSF patolojisinden başlıca etkilenen bölgelerin beyin kökü ve supranükleer bölge olması nedeniyle locus ceruleusun beyindeki diğer nükleuslara yakınlığı ve beyin kökü ile temas halinde olması bu bölgenin İSF patolojisinden etkilenebileceğine işaret etmektedir. Nitekim, 1979 yılında Yagishita ve diğ. tarafından elektron mikroskopuyla İSF otopsi materyallerine ait locus ceruleus bölgesindeki tau birikimleri görüntülenmiştir. Fakat, İSF patolojisinde locus ceruleusun incelenmesine yönelik çalışmalar ancak son yıllarda artış göstermiştir. 2009 yılında Grimbergen ve diğ.'nin, Parkinson hastalığında duruş bozukluğunun dopamin ile ilişkili

olmayıp, noradrenerjik nöronların kaybına bağlı geliştiği hipotezini öne sürmesi, parkinson ve İSF gibi duruş bozukluğu gözlenen hastalıklarda, noradrenalin üretim yeri olan locus ceruleus dejenerasyonun etkisini gündeme getirmiştir. Ayrıca bu çalışmada, adım atma fonksiyonu da locus ceruleus ile ilişkilendirilmiştir. Uyarılara karşı locus ceruleus'dan yapılan noradrenalin salgısının başta ön beyin olmak üzere bir çok beyin merkezini uyararak, stresse karşı tepki oluşumu, dikkat, duygular, motivasyon, karar verme, öğrenme ve hafıza üzerinde etki gösterdiği düşünülmektedir (Grimbergen ve diğ., 2009).

Passamonti ve diğ.(2018) tarafından İSF'nin de dahil olduğu nörodejenratif hastalık grubu olan frontotemporal lobar dejenerasyon (FTLD) olgularında davranışsal olarak ortak klinik tablo olan duyarsızlık/ilgisizlik durumunun anatomik ve nörokimyasal temelleri irdelemiştir. Locus ceruleus bölgesindeki dejenerasyona bağlı azalan noradrenalin salgısıyla, adaptasyonun sağlanması, eylem başlatımı için tetikleme, devam eden eylemlerin durdurulması gibi işlevlerin etkilendiği öne sürülmüş ve bu bölge FTLD'de farmakolojik bir hedef olarak gösterilmiştir (Passamonti ve diğ., 2018).

Bu nedenlerle, dışsal uyarılarla ilişkili, İSF'de dejenerasyon merkezi ile temasta, beyinin bir çok bölgesiyle etkileşim halinde olan ve İlerleyici Supranükleer Felç hastalığında temel olarak gözlenen duruş ve denge bozukluğu, bazı durumlarda bilinç, davranış bozuklukları gibi semptomlarla ilişkili locus ceruleus bölgesinde dejenerasyona bağlı miRNA düzeyinde değişimlerin tespit edilmesi amaçlanmıştır.

Özetle bu çalışmada locus ceruleus bölgesinin tercih edilme nedenleri 1) dışsal uyarılar ve beyin bir çok bölgesiyle etkileşim halinde olması, 2) İSF'nin temel dejenerasyon bölgesi olan beyin kökü ile teması, 2) İSF'de temel olarak gözlenen duruş ve denge bozukluğu, bilinç (bazı durumlarda), davranış bozuklukları gibi semptomlarla ilişkili olmasıdır. Bu çalışmada, belirtilen nedenlerle İSF hastalığı ile güçlü ilişkilerinin olduğu düşünülen locus ceruleus bölgesinde, patolojiye bağlı olarak miRNA'ların anlatım düzeylerinde oluşabilecek değişimlerin tespit edilmesi amaçlanmıştır.

### 3. MALZEME VE YÖNTEM

Doktora tez çalışması kapsamında otopsi beyin kesitleri immunhistokimyasal incelendikten sonra (3.1) bu kesitlerden RNA izolasyonu ve moleküler çalışmalar gerçekleştirilmiştir (3.2). Son olarak da elde edilen veriler değerlendirilmiştir (3.3). Yöntemler bakımından üç ana başlıkta incelenecektir.

#### 3.1. OTOPSİ BEYİN KESİTLERİNDE İMMUNHİSTOKİMYASAL İNCELEME

Çalışmada, tau patolojisi içeren İSF tanılı ve sağlıklı bireylere ait otopsi beyinlerinden elde edilmiş, parafine gömülü locus ceruleus kesitleri kullanıldı. Yaşları 58 ve 92 arasında, 9 İSF hastası ve 4 sağlıklı bağışçıya (vericiye) ait otopsi beyin dokuları, klinik ve nöropatolojik bilgiler ile birlikte ‘Multiple Sclerosis and Parkinson’s’ beyin doku bankasından sağlandı. Hasta bireylere ait kesitlerin, hem tau patolojisi gösteren hücrelerin yoğun olduğu bölgeleri hem de bu patolojinin gözükmediği sağlıklı bölgeleri bir arada içermesi istendi. Hem hastalara hem de sağlıklı kontrollere ait dokuların her birinden immunhistokimya çalışması için 7 mikronluk 2, moleküler çalışmalar için ise 10 mikronluk 3’er adet kesit talep edildi. Bu koşullara uygun olarak seçilen parafin bloklardan alınan kesitler, oda ısısı koşullarında beyin bankasından sağlanmıştır.

Eşlenik (replika) olan bu kesitlerden 7 mikron olanların birer adedi, immunhistokimya çalışma şartlarının optimizasyonu için kullanıldı. Diğer 7 mikron olan kesitler ise bu optimizasyonla belirlenen çalışma koşullarına göre işlendi. 10 mikron olan kesitler ise total RNA eldesi için kullanıldı.

##### 3.1.1. Parafinin Uzaklaştırılması ve İmmunhistokimya Boyaması

İmmunhistokimya incelemesinde kullanılmak üzere alınan 7 mikronluk kesitlerden parafinin uzaklaştırılması ve immunhistokimya boyaması ‘BenchMark ULTRA’ otomatize sisteminde gerçekleştirildi. Dokuların boyanabilmesi için gömülü oldukları parafinden tamamen

arındırılmaları 72°C’de 20dk ‘EZ Prep (10x), Roche’ solusyonuyla muamele edilecek şekilde cihazın parafin protokolünde gerçekleştirildi. İmmunhistokimya çalışması ise ‘ultraView Universal DAB Detection Kit’ protokolü izlenerek yapıldı. Kesitler parafinin uzaklaştırılmasını takiben, antijen ortaya çıkarma (retrieval), antikor inkubasyonu, ikincil boyama (counterstaining), suyun uzaklaştırılması ve destek ortamı (mounting medium) ile sabitleme işlemlerinden geçirilerek mikroskopik olarak incelendi.

Dokuların fiksasyonu sırasında oluşan metilen köprüleri, doku yapısındaki proteinler ile çapraz bağlanma yaparak maskeleye neden olabilmektedirler. Bu nedenle, parafinin uzaklaştırılmasını takiben doku kesitlerinin 36dk CC1(EDTA) ile muamele edilmesiyle ‘antijen ortaya çıkarma (retrieval)’ işlemi yapılarak köprülerin kırılması sağlandı. Antikor erişimine açık hale gelen tau proteininin epitoplari, insan tau proteinine özgü monoklonal tavşan antikoruna olan ve 1/1000 oranında seyreltilen ‘Anti-Tau antikor [E178] (Abcam)’u ile 32 dk inkübe edildi. İkincil antikor olarak HRP (horseradish peroxidase) enzimi bağlı ‘keçi anti-tavşan’ antikoruna kullanıldı (Bakır sülfat ve hidrojen peroksit eklenmesi ile tepkimeye giren HRP enzimi, tau immün reaktivitesini, mikroskop altında kahverengi olarak gözlenir hale getirmektedir). Bu işlemin ardından doku ve hücrelerin boyanmasını sağlamak için, 16 dk hematoksilen muamelesi yapılarak 4 dk anti zıt boyama için ‘bluingreagent’ uygulandı. Bünyesindeki suyu tamamen uzaklaştırılan kesitler, destek ortamı kullanılarak sabitlendi. Son olarak entellan kullanılarak lamelle kapatıldıktan sonra dokular x200 ve x400 büyütmede ışık mikroskopunda incelendi.

### **3.2. ARRAY ÇALIŞMASI İÇİN ÖRNEKLERİN HAZIRLANMASI**

İmmunhistokimyasal boyanarak tau patolojisi içeren alanları belirlenen kesitler, array çalışmasında şablon olarak kullanılmıştır. Aynı parafin dokulara ait 10 mikron olarak alınmış olan eşlenik kesitler array çalışması için işleme alındı. Dokuların içerisindeki RNA hedeflerine ulaşabilmek için, önce dokuların gömülü olduğu parafinin uzaklaştırılması, sonra dokunun parçalanması ve hücre içi içerik ile kimyasal artıkların uzaklaştırılması gerekmektedir. Bu nedenle ilk olarak dokular parafinden arındırıldı. Daha sonra, şablon kesitlerinde belirlenen patoloji sınırlarına göre ayrıştırılarak RNA izolasyonu yapıldı ve array çalışmasına alındı.



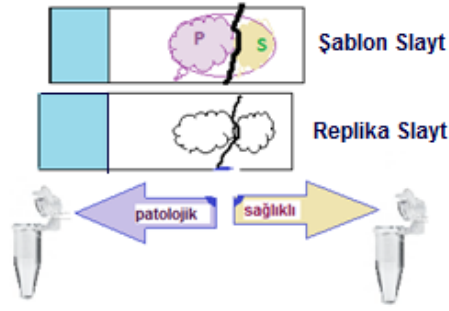
### 3.2.1. Parafinin Uzaklaştırılması

Dokuların parçalanabilmesi için öncelikli olarak eşlenik slaytlar (lamlar)'a parafin uzaklaştırma işlemi uygulandı. Slaytlar üzerindeki parafinin uzaklaştırma işlemi ayrı ayrı cam şalelerde tablo 3.1'deki sıraya göre gerçekleştirildi.

**Tablo 3.1:** Parafinin uzaklaştırması aşamasında doku kesitlerinin bulunduğu slaytlara uygulanan işlemlerin sırası.

Kullanılan Kimyasal / Uygulama	Uygulama Süresi
1. Histoclear (deparafinizasyon solusyonu) (şale 1)	10-15 sn çalkalama + 2 dk bekleme
2. Histoclear (şale 2)	sn çalkalama + 2 dk bekleme
3. Etanol (%100)	10-15 sn çalkalama+ 2 dk bekleme
4. Slaytları 5-10 dk oda ısısında kurumaya bırakma (kuruma süresi doku boyutuna göre değişebilir)	
5. Boyalı slaytların şablon olarak kullanılarak, kuruyan slaytlar üzerinde patolojik alanları kalemle çizme	
6. %3'lük gliserol	slayt daldırma
7. Slaytlardan belirlenen patolojik alanları kazıyarak eppendorf tüplere aktarma	
8. Kalan sağlıklı alanları kazıyarak ayrı eppendorf tüplere aktarma	

Parafini uzaklaştırılan eşlenik slaytlardan, immunhistokimya boyama yapılmış şablon slaytlar ölçüt alınarak, patolojik ve sağlıklı bölgeler ayrı kazınıp ilgili tüplere aktarıldı. Bu ayrıma göre, takip eden moleküler çalışmaların verilerinin değerlendirilmesinde tüm örnekler, 'Patolojik Grup (P)', 'Sağlıklı Grup(S)' ve 'Kontrol Grup (K)' olarak sınıflandırıldı.



**Şekil 3.1:** Eşlenik slaytlarda patolojik doku sınırlarının belirlenmesi. Aynı kesitteki sağlıklı ve patolojik doku alanlarının ayrı tüplere aktarılması.

### 3.2.2. RNA İzolasyonu

Dokulardan total RNA'nın eldesi ticari kit (High Pure FFPE RNA izolasyon, Roche) kullanılarak gerçekleştirildi. Ependorf tüplere alınan dokularda parçalama enzimatik olarak sağlandı. Bu amaçla aşağıdaki basamaklar uygulandı;

- Doku bulunan eppendorf tüpüne; 100 µl doku lizis tamponu (TLB) + 16 µl %10 SDS + 120 µl proteinaz-K eklendi.
- Tüp birkaç dk karıştırıldı ve santrifüjde çöktürüldü.
- 55°C'de 12 saat inkübe edildi.

(On iki saatin sonunda dokuların tamamen parçalanarak homojenize olduğu ve eppendorların içindeki tamponun şeffaf bir görünüm aldığı gözlemlendi.)

- Süre sonunda örnekler 30 sn spin edildi ve 80°C'de 15 dk bekletildi.
- Dnaz, DNaz inkübasyon tamponuna eklenerek Dnaz reaktifi hazırlandı. Reaksiyon için gerekli miktar; (N+1)x90 µl DIB + (N+1)x10 µl DNase olarak hesaplandı (N:RNA izolasyon sayısı).
- Her bir örneğe 325 µl PBB (parafin bağlanma tamponu) ve 325 µl %100 ETOH eklenerek karıştırıldı ve 30 sn süre ile spin yapıldı.
- Örnek, toplama tüpünün üzerine yerleştirilmiş filtre tüpüne aktarılarak 6000 x g'de 30 sn santrifüj yapıldı.

- h) Filtre yeni toplama tüpüne aktarıldı ve tamamen kurutmak için 16000 x g' de 2 dk döndürüldü.
- i) Filtre yeni toplama tüpüne taşındı, hazırlanan 100 µl DNaz reaktifi (e) filtreye eklendi ve oda ısısında 15 dk inkübe edildi.
- j) Filtreye 500 µl yıkama tamponu-I eklendi ve santrifüj 20-30 sn 6000xg'de gerçekleştirildi.
- k) Taşınan filtre üzerine 500 µl yıkama tamponu-II konularak aynı koşullarda (j) santrifüj yapıldı.
- l) Madde 'k' tekrarlandı ve 16000xg'de 2dk santrifüj yapıldı.
- m) Filtre 1,5' luk RNaz içermeyen tübe taşınarak, 30 µl elüsyon tamponu eklendi.
- n) Oda ısısında 1 dk bekletilen tüpler 6000xg'de 1 dk santrifüj edilerek RNA, kolondan alındı.
- o) İzole edilen RNA 2 dk maksimum hızda döndürülerek cam boncuklardan arındırıldı ve -80°C'de saklandı.

Elde edilen total RNA'nın konsantrasyonu 'nanodrop' spektrofotometresi ile hesaplandı. Her örnekten alınan 1 µl RNA'nın A260 /A280 ve A260 /A230 dalga boyu oranlarındaki absorbans değerleri ölçülmüştür. İzolasyonu takiben yapılan moleküler çalışma için kit çalışma klavuzunda önerilen minimum RNA konsantrasyon değeri 33ng/µl, protein kontaminasyonu (260/280)  $\geq 1,9$  ve organik bileşenlerin kontaminasyonu (260/230)  $\geq 1,8$  olarak belirtilmektedir. Ölçümler yapılarak, uygun örnekler çalışmada kullanıldı.

### 3.3. miRNA'ların NANOSTRING PLATFORMUNDA ÇALIŞILMASI

MiRNA'ların örneklerdeki gerçek miktarlarının belirlenebilmesi için: miRNA'ları özgün olarak tanıyabilen, çoğaltma basamağı ve enzim kullanımı olmaksızın doğrudan mikroskopik kimliklerine göre veri oluşturabilen 'nCounter, NanoString' platformunda, 'NanoString Human v3 miRNA Assay Kit'i kullanılmıştır. Temel olarak, örneklerin hazırlanması, hedef miRNA'ların çip zeminine sabitleyen ve kimliklendirmeye yarayan problarla hibridizasyonu, kapalı otamasyon sistemi olan hazırlık istasyonunda yıkama ve çiplere aktarımı, çiplerin taranması aşamaları miRNA Anlatım Analizi arrayi (miRNA Expressionassay User Manuel, NanoString Technologies)'nin kılavuzuna uygun olarak uygulanmıştır.

### 3.3.1 Örneklerin Hazırlanması

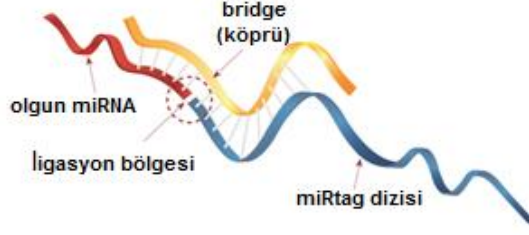
RNA ölçüm değerlerine göre, 3'ü kontrol (K), 4'ü patolojik (P) ve 5'i de sağlıklı (S) bölgeyi temsil eden on iki örnek, D1-D12 sırası ile array çalışmasına alındı (Çalışmaya alınan örneklerin, banka kodları, RNA konsantrasyon değerleri ve patoloji oranları **Tablo 4.2**'de belirtilmektedir).

Örneklerin hazırlanması aşaması birbirini takip eden; bağlanma (annealing), ligasyon (ligation) ve saflaştırma (purification) işlemleri ile yapıldı. Bu işlemler, 'thermocycler' cihazında **Tablo 3.2**'de gösterildiği gibi, bağlanma, ligasyon ve saflaştırma programlarında gerçekleştirildi.

**Tablo 3.2:** Örnek hazırlığı protokolünün, termal döngü cihazındaki basamakları. 'miRNA\_Expression\_Assay\_User\_Manual'den alınmıştır.

PROGRAM	SICAKLIK	ZAMAN
Bağlama	94°C	1 dk
	65°C	2 dk
	45°C	10 dk
	48°C	Beklet
Ligasyon	48°C	3 dk
	47°C	3 dk
	46°C	3 dk
	45°C	5 dk
	65°C	10 dk
Saflaştırma	4°C	Beklet
	37°C	1 saat
	70°C	10 dk
	4°C	Beklet

Örneklerin hazırlanması aşamasında amaç, küçük dizilere sahip miRNA'ların, total RNA örneklerindeki miktarlarının hassas şekilde belirlenmesini sağlamaktır. Kullanılan ticari kit ('nCounter miRNA Expression Assay', NanoString Technologies) içerisinde, 800 adet miRNA'ya özgün olarak tasarlanmış sentetik moleküller olan miRtag dizileri bulunmaktadır. Dizi özgün köprüler kullanılarak, 'miRtag' dizileri ilgili miRNA'larla eşleşerek bağlandı, bağlanmayan moleküller enzim saflaştırması ile uzaklaştırıldı (**Şekil 3.2**).



**Şekil 3.2:** miRNA'lara miRtag dizilerinin eklenmesi. RNA izolatlarında bulunan miRNA'ların, özgün köprü molekülleri ile her bir miRNA'ya özgü tasralanmış miRtag dizisinin ligasyon yöntemi ile birleştirilmesi, hedef moleküllerin oluşumu (www.nanostring.com'dan uyarlanmıştır).

Örnek hazırlığında izlenen protokol aşağıda ayrıntılı olarak maddeler halinde verildi.

- miRNA çalışma kontrolleri (miRNA Assay Controls) 1:500 olacak şekilde seyreltildi (499  $\mu$ l RNase-içermeyen H<sub>2</sub>O , 1  $\mu$ l'lik çalışma kontrol tüpüne eklenir).
- Annealing ana karışımı : 13  $\mu$ l Annealing tampon + 26  $\mu$ l nCounter miRNA Tag Reaktifi + 6.5  $\mu$ l seyreltilmiş olan miRNA çalışma kontrollerinden eklenerek oluşturuldu.
- 0,2  $\mu$ l'lik 12 kuyucuklu tüplerdeki her bir kuyucuğa, hazırlanan ana karışımdan 3,5  $\mu$ l dağıtıldı.
- Bu 12 kuyucuğa sırası ile RNA örneklerinden 3'er  $\mu$ l dağıtıldı.
- Tüpler, termal döngü cihazında hazırlanan bağlanma programında tutuldu.
- Bu sırada ligasyon basamağı için, 9.5  $\mu$ l PEG ve 13  $\mu$ l Bağlama tamponu karıştırılarak, bağlama ana karışımı hazırlandı.
- Sıcaklık 48°C'ye geldiğinde, örneklerin her birine hazırlanan bağlama karışımından 2.5  $\mu$ l dağıtılarak karıştırıldı ve cihaza yerleştirildi.
- 48°C'de 5 dk boyunca tutulduktan sonra üzerine, 1 $\mu$ l ligaz enzimi eklenerek ligasyon programına devam edildi.
- Ligasyon programının tamamlanmasıyla, örneklerin içinde 1'er  $\mu$ l ligasyon temizleme enzimi (Ligation Clean-Up Enzyme) eklenerek saflaştırma aşaması uygulandı.
- Saflaştırma programı tamamlanınca örneklerin üzerine 40  $\mu$ l RNaz-içermeyen H<sub>2</sub>O eklendi.

### 3.3.2 Hedef miRNA'ların Problarla Hibridizasyonu

Hazırlık aşaması tamamlanan örneklerde, hedef miRNA'lar miRtag dizileriyle spesifik olarak birleşerek 'hedef moleküller'ini oluşturdu. Hedef molekülleri, array yüzeyine bağlanabilmek için biyotin işaretli yakalayıcı problemleri ve kimliklendirme için belirtici problemleriyle hibridize olabilecek yapıya getirildi.

Hibridizasyon hazırlıklarında izlenen protokol aşağıda maddeler halinde belirtilmiştir.

- a) 130 µl'lik hibridizasyon tamponunun tamamı, 130 µl'lik belirtici prob tüpüne eklenerek hibridizasyon ana karışımı hazırlandı.
- b) Karışım, hazırlanan mixten 20 µl olacak şekilde kuyulara dağıtıldı.
- c) Bir önceki aşamada hazırlanan hedef molekülleri 85°C'de 5dk denature edilerek hızla buza aktarıldı.
- d) Örneklerin 5'er µl'si kuyulardaki hibridizasyon ana karışımına eklendi.
- e) Termal döngü cihazında sıcaklığın 65°C'ye ulaşması beklendi.
- f) Tüplere hızla 5'er µl yakalayıcı probdan eklenerek, karıştırıldıktan sonra 65°C'de 12 saat süre ile bekletildi.

### 3.3.3. miRNA'ların Ciplere Aktarımı

Hibridizasyon sonrasında, örneklerin çipe aktarımı ve bağlanmamış moleküllerin uzaklaştırılması için kapalı ve otomatik bir sistem olan nanostring hazırlama istasyonu kullanıldı (**Şekil 3.3**). Çip ve tampon çözeltiler ile manyetik boncuklar içeren plaka 20 dk oda ısısında bekletildi. Termal döngü cihazında on iki saati dolduran örnekler ile çip ve plaka hazırlama istasyonuna yerleştirildi (User Manual | nCounter® Analysis System).



**Şekil 3.3:** Kapalı ve otomatik bir sistem olan nanostring hazırlama istasyonu (www.nanostring.com'dan alınmıştır).

### 3.3.4. Çiplerin Taranması ve Verilerin Eldesi

Cam çiplerin yüzeylerine sabitlenen barkodlu miRNA kompleksleri (hedef-prob kompleksleri)'nin okunabilmesi için, hazırlık cihazından çıkarılan cam çip daha sonra nanostring tarayıcısına yerleştirildi. Her bir molekülden kaç adet olduğunu tarayıcı içerisinde bulunan floresan mikroskop sistemi ile kaydedildi. Barkod niteliğindeki kodlanmış floroforların, doğru dizimde tanınabilmesi için elektrik akımı uygulandı ve bu akım sayesinde moleküllerin çip yüzeyinde tek bir yöne doğru 'iplikler' gibi dizilmesi sağlandı. Böylece cihaz, elektrik alanı altında, her bir moleküle özgü barkodu tanıyarak sayım yaparak verileri oluşturdu (Şekil.3.4).



**Şekil 3.4:** miRNA komplekslerinin görüntülenmesi. Cam çiplere yüklenmiş miRNA kompleksleri/hedef-prob komplekslerinin nanostring tarayıcısında elektrik alan etkisiyle mikroskopik olarak barkodlarının okunması (www.nanostring.com'dan uyarlanmıştır).

## 3.4. VERİLERİN İNCELENMESİ

MiRNA'ların azalan ve artan anlatım düzeyleri, hedef-prob komplekslerinin sayımına dayanılarak kaydedilen verilere göre belirlenmektedir. Çip yüzeyinde her bir örnek için 555

alanda görüntülenebilen barkodlu 800 hedef-probun gerçek molekül sayıları, mikroskobik olarak 'nCounter, NanoString' tarayıcısında okutularak veriler oluşturulmuştur. Bu veriler nCounter, NanoString' platformuna uyumlu 'nSolver Software analiz sistemi'nde değerlendirilmiştir.

Görüntülenebilen alan (field of view , FOV, Şekil 3.5) sayısı, bağlanma yoğunluğu (binding density, Şekil 3.5) ve içerdiği kontroller esas alınarak, tarayıcıdan RCC dosyaları olarak nSolver analiz sistemine yüklenen verilerin kalite kontrolleri (Quality check, QC) yazılım tarafından otomatik olarak yapıldı.



**Şekil 3.5:** Temsili olarak çip yüzeyindeki, gözlenebilen alan (FOV) ve bağlanma yoğunluğu (nSolver eğitim videosundan uyarlanmıştır).

Ayrıca, örnek hazırlanması esnasında her bir örneğe kit içeriğinde bulunan özgün dizilere sahip sentetik moleküller (External RNA Control Consortium, ERCC) eklendi. Analiz programında bu moleküller, örneklerin bireysel iç kontrolleri olarak baz alındı. Çalışmanın kalitesinin test edilmesinde, farklı örneklerin normalizasyonunda, arka planının elimine edilmesinde ve ligasyonun başarısının kontrolünde kullanılan bu sentetik moleküller, 'Pozitif Kontroller', 'Negatif Kontroller', 'Pozitif ve Negatif Ligasyon Kontrolleri'dir.

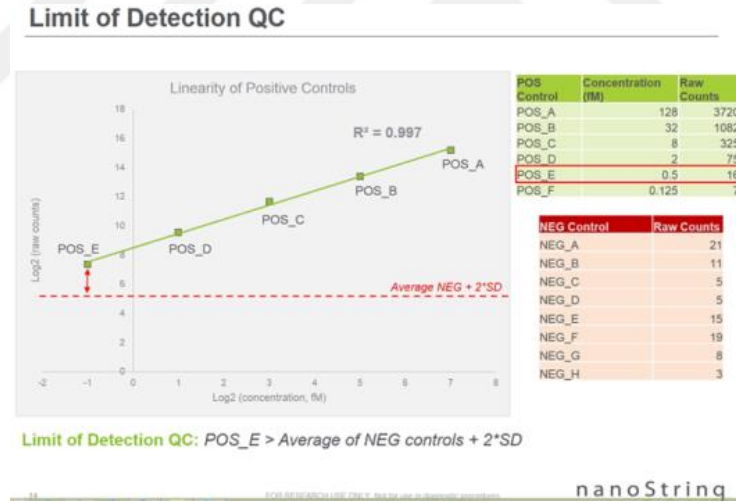
#### 3.4.1.1. Pozitif Kontroller

Ligasyona ihtiyaç duymadan, kendilerine özgü probolar tarafından tanınıp bağlanan sentetik mRNA dizileri pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. Kit içeriğinde bulunan bu sentetik mRNA'lar altı farklı dilüsyonda olup (0.125, 0.5, 2, 8, 32, 128 fM), her bir örnek için doğrusal bir grafik oluştururlar (Şekil 3.6). Program tarafından otomatik olarak oluşturulan grafiğin



doğrusallığı ve en düşük konsantrasyondaki pozitif kontrolün eşik değerinden yüksek olması, çalışmanın güvenilirliğini gösterir. Analiz programı tarafından otomatik olarak gerçekleştirilen bu hesaplamalar, ayrıca 'excell' programı ile yapılarak teyid edildi. Her örnekteki pozitif kontrollerin aritmetik ortalama değeri 'normalizasyon faktörü' olarak belirlendi ve o örnekte sayılan her bir miRNA değeri ile çarpılarak normalize edildi. Her bir örnek için yapılan bu hesaplama sayesinde normalize edilen örnekler birbirleri ile karşılaştırılabildi. Her bir örneğin 'Tespit edilebilen seviyedeki kalite limit değeri (Limit of detection QC)', o örnekteki en düşük konsantrasyonlu (0.5fM) pozitif kontrol (Pozitif E) molekülünün sayısı baz alınarak **Denklem 3.1**'deki gibi belirlendi.

$$\text{Pozitif\_E} > \text{Negatif kontrollerin ortalaması} + 2 \times \text{Standart Sapma} \quad (3.1)$$



**Şekil 3.6:** Pozitif kontrol problemlerinin oluşturduğu doğrusal grafik (temsili). Ayrıca, en düşük pozitif kontrolün (Pozitif E), negatif kontrollerle kıyaslanarak eşik değerinin belirlenmesi de gösterilmektedir (nSolver eğitim videosundan uyarlanmıştır).

### 3.4.1.2. Negatif Kontroller

Negatif kontrol molekülleri olarak, reaksiyon içinde bulunması beklenmeyen 'özgün sentetik hedef mRNA' dizilerine özgü problemler kullanıldı. Böylece, reaksiyonda herhangi bir hedef dizisi

olmadığı için, negatif kontrol problemlerinin yaptığı bağlantılar tamamen spesifik olmayıp, zemin kirliliği olarak tanındı. Negatif kontroller çalışmanın kalite kontrolü ve eşik değerinin belirlenmesi için gereklidir. Her bir örnek için eşik değerinin belirlenmesi, normalize edilmemiş ham verilerde ‘Negatif Kontrol’lerin ortalama değerleri esas alınarak hesaplandı (**Denklem 3.2**). Çalışmamızda ‘Negatif\_C’ kontrolü, tüm örneklerde, kabul edilebilenden çok daha yüksek değerler verdiği için çapraz reaksiyon gerçekleştirdiği düşüncesiyle hesaplama dışı bırakılmıştır.

$$\text{Eşik Değeri} = \text{Negatif kontrollerin ortalaması} + 2x \text{ Standart Sapma} \quad (3.2)$$

### 3.4.2. Örneklerin Gruplandırılması ve Karşılaştırılması

Her bir örneğin bireysel olarak eşik değerlerinin belirlenmesi ve normalizasyonlarının yapılmasının ardından örnekler **Tablo 3.3**'de gösterildiği gibi gruplandırıldı. Her bir bireye ait doku kesitinin, patolojik bölgesinde tespit edilen anormal tau proteini birikimli hücrelerin oranı TAU oranı olarak belirtildi. Yüzde ‘Tau oranı belirlenen kesitlerin patoloji gösteren bölgeleri ‘%P’, aynı kesitin patoloji göstermeyen sağlam bölgeleri ‘%S’ olarak isimlendirilmiştir.

**Tablo 3.3:** Çalışılan parafin kesitlerin gruplandırılması. ‘D’ çalışma numarası, ‘P’ patolojik bölgeyi, ‘S’ sağlam bölgeyi, ‘K’ sağlıklı kontrol bireylere ait örnekleri belirtmektedir.

Patolojik Grup (P)	Çalışma Sırası	Tau Oranı (%P)	Sağlıklı Grubu (S)	Çalışma Sırası	Tau Oranı (%S)	Kontrol Grubu (K)	Çalışma Sırası	Tau Oranı (%)
		D1		30			D5	3
	D2	20		D6	5		D11	0
	D3	20		D7	1		D12	0
	D4	3		D8	5			
				D9	1			

### 3.4.2.1. Örneklerin Gruplandırılması

Elde edilen verilere göre grupların normalize edilen değerlerinin karşılaştırması her miRNA için Patolojik, ‘Sağlıklı’, Kontrol ve izlenen sapmalara göre ‘Patolojik-4’ ile ‘Kontrol-10’ olarak yapıldı.

**Patolojik Grup:** İSF’li bireylere ait parafin kesitte tau patolojisinin görüldüğü bölgelerden yeterli konsantrasyonda RNA elde edilen örneklerdir (D1, D2, D3, D4).

**Sağlıklı Grup:** İSF’li bireylere ait parafin kesitte tau patolojisinin gözlenmediği bölgelerden yeterli konsantrasyonda RNA elde edilen örneklerdir (D5, D6, D7, D8, D9).

**Kontrol Grup:** Tamamen sağlıklı kontrol olarak çalışılan, herhangi bölgesinde patoloji gözlenmeyen bireylere ait parafin kesitlerden yeterli konsantrasyonda RNA elde edilen örneklerdir (D10, D11, D12).

**Patolojik-4 Grup:** Bulunduğu patolojik grup içerisinde belirgin sapmalar gösteren 4 numaralı örneğin dışlandığı gruptur (D1, D2, D3).

**Kontrol-10 Grup:** Bulunduğu kontrol grubu içerisinde belirgin sapmalar gösteren 10 numaralı örneğin dışlandığı gruptur (D11, D12).

### 3.4.2.2. Örneklerin Karşılaştırılması

İstatistiksel olarak az sayıda, fakat testin kendi minimum analiz kapasitesi olan ‘her grupta minimum 3 örnek’ kuralına göre yeterli olan verilerimizde, her bir gruba ait uç değerlerin en belirgin farkları incelendi. Grupların miRNA anlatım düzeylerindeki farkın anlamlılığı, her gruba ait minimum (Min) ve maksimum (Max) değerlerin karşılaştırılması esas alınarak hesaplandı. Bir grubun Minimum değeri, diğer grubun maksimum değerinden en az iki kat daha fazla ise bu veri anlamlı olarak değerlendirildi. Karşılaştırmalarda kullanılan değerler, direkt olarak her bir miRNA’ya ait barkodun okunmasından elde edilen molekül sayılarının, örnek içerisine eklenmiş pozitif kontrol sayımları normalizasyonu ile belirlenmiştir.

**MinK/MaxP:** Kontrol gurubunun minimum miRNA değerlerinin, patolojik grubun maksimum miRNA’değerlerinin en az iki katı olduğu miRNA’lar değerlendirmeye alındı.

**MinK/MaxP-4:** Kontrol gurubunun minimum miRNA değerlerinin, patolojik-4 grubun maksimum miRNA'değerlerinin en az iki katı olduğu miRNA'lar değerlendirmeye alındı.

**MinK-10/MaxP-4:** Kontrol-10 gurubunun minimum miRNA değerlerinin, patolojik-4 grubun maksimum miRNA'değerlerinin en az iki katı olduğu miRNA'lar değerlendirmeye alındı.

**MinP/MaxK:** Patolojik guruba ait minimum miRNA değerlerinin, Kontrol grubuna ait maksimum miRNA'değerlerinin en az iki katı olduğu eşik üstü miRNA'lar değerlendirmeye alındı.

**MinP-4/MaxK-10:** Bu değerlendirmede, patolojik-4 gurubunun minimum miRNA değerlerinin, kontrol-10 grubun maksimum miRNA'değerlerinin en az iki katı olduğu miRNA'lar değerlendirmeye alındı.

**MinK/MaxS:** Kontrol gurubunun minimum miRNA değerlerinin, sağlıklı grubun maksimum miRNA'değerlerinin en az iki katı olduğu eşik üstü bir miRNA'lar değerlendirmeye alındı.

**MinK-10/MaxS:** Kontrol-10 gurubunun minimum miRNA değerlerinin, sağlıklı grubun maksimum miRNA'değerlerinin en az iki katı olduğu miRNA'lar değerlendirmeye alındı.

**MinS/MaxK:** Sağlıklı gurubunun minimum miRNA değerlerinin, kontrol grubun maksimum miRNA'değerlerinin en az iki katı olduğu eşik üstü miRNA'lar değerlendirmeye alındı.

**MinS/MaxK-10:** Sağlıklı gurubunun minimum miRNA değerlerinin, kontrol-10 grubun maksimum miRNA'değerlerinin en az iki katı olduğu eşik üstü miRNA'lar değerlendirmeye alındı.

**MinS/MaxP:** Sağlıklı gurubunun minimum miRNA değerlerinin, patolojik grubun maksimum miRNA'değerlerinin en az iki katı olduğu eşik üstü miRNA'lar değerlendirmeye alındı.

**MinS/MaxP-4:** Bu değerlendirmede, sağlıklı gurubunun minimum miRNA değerlerinin, patolojik-4 grubun maksimum miRNA'değerlerinin en az iki katı olduğu eşik üstü miRNA'lar değerlendirmeye alındı.

**MinP/MaxS:** Patolojik gurubunun minimum miRNA değerlerinin, sağlıklı grubun maksimum miRNA'değerlerinin en az iki katı olduğu eşik üstü miRNA'lar değerlendirmeye alındı.

**MinP-4/MaxS:** Patolojik gruptan 4 numaralı örneği dışladığımızda, patolojik-4 grubundaki miRNA'ların minimum miRNA değerlerinin, sağlıklı grubun maksimum miRNA' değerlerinin en az iki katı olduğu eşik üstü miRNA'lar değerlendirmeye alındı.

**D4/D5 ve D5/D4 Oranları:** D4 ve D5, aynı bireye ait PD173 doku bankası kodlu kesitinde yer alan patolojik (D4) ve sağlıklı (D5) bölgelerinden izole edilen örneklerin verileridir. Bu bireye ait kesitin patolojik alandaki tau patoloji oranı %3'tür. D4 ve D5 karşılaştırmalarında, en az iki kat fark olarak ( $D5 \geq 2x D4$ ,  $D4 \geq 2x D5$ ) tespit edilen miRNA'ların verileri **Tablo 4.8 ve Tablo 4.9'da** listelendi.

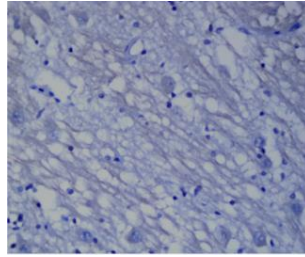
D5/D4 karşılaştırmaları baz alınarak, sağlıklı ve patolojik guruplarda paralel değerlendirmeler yapılarak fark oluşturan miRNA'lar **Tablo 4.10'da** gösterildi.

## 4. BULGULAR

İmmunhistokimyasal boyama sonucunda yapılan gözlemler ile array çalışması sonucunda elde edilen miRNA'ların anlatım düzeylerindeki artış ve azalışlar birlikte değerlendirilmiştir.

### 4.1. İMMUNHİSTOKİMYASAL BOYAMA

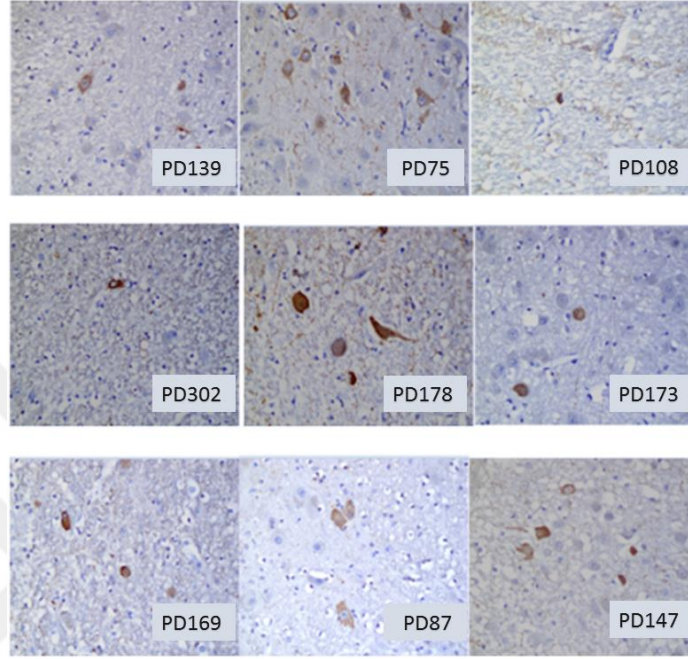
Tau proteinlerinin hücrelerde birikimi ile karakterize edilen İSF patolojisine bağlı bölgesel farklılıklar, aynı otopsi beyin kesitlerine ait sağlıklı ve patolojik alanların immunhistokimyasal olarak boyanması ile ortaya kondu. Parafinin dokulardan uzaklaştırmasından sonra locus cereleus bölgesine ait dokuz adet İSF'li ve dört adet sağlıklı kontrol otopsi beyin dokularında, tau reaktivitesi gösteren alanlar anti-tau antikoruna (*Anti-Tau antikor* [E178], Abcam) ile belirlendi. Başarılı bir şekilde boyanan dokuların genel morfolojik incelemesinde; tüm kesitlerde locus ceruleus bölgesine özgü mavi pigmentli nöronların gözlenmesi ile doku kesitlerinin istenilen bölgeye ait olduğu teyit edildi (**Şekil 4.1**). Tau-immunreaktivitesine yönelik yapılan incelemede ise büyük sitoplazmalı nöronların gövde ve aksonlarında, astrositlerin hücre içi sitoplazmik yapılarında tau birikimleri gözlemlendi.



**Şekil 4.1:** Negatif kontrol preparatlarında locus ceruleusa özgü mavi pigmentlerin belirlenmesi.

Patolojik değerlendirmeye göre, İSF'li kesitlerde (PD139, PD75, PD108, PD302, PD178, PD173, PD169, PD87, PD147) bulunan nöronların yaklaşık %1-30'unda belirgin tau birikimi (immunreaktivite) gözlemlendi (**Şekil 4.2**). Ayrıca bu kesitlerde, x400 büyütmede yapılan incelemelerde, büyük sitoplazmalı nöronların sitoplazmalarında yoğun, aksonlarında ise

kısmen tau birikimleri gözlemlendi (Şekil 4.2). Sağlıklı vericilere ait Kontrol doku kesitlerinde ise tau birikimine rastlanmadı (Şekil 4.1).



**Şekil 4.2:** İSF tanı kesitlerde tau birikiminin tespiti. Sırası ile PD139 :%10, PD75: %30, PD108:%1, PD302:%1, PD178:%20, PD173:%3, PD169:%5, PD87:%5, PD147:%20 tau birikimi tespit edilen nöronlar gösterilmiştir.

İSF tanı kesitlerde, tau birikimi gösteren hücrelerin belirli bölgelerde yoğun olduğu izlendi. Yoğun miktarda reaktivite gösteren hücrelerin bulunduğu bölgelerde tau birikimi gösteren nöronların o bölgedeki toplam nöronlara yüzdesi **Tablo 4.1**'de verildi.

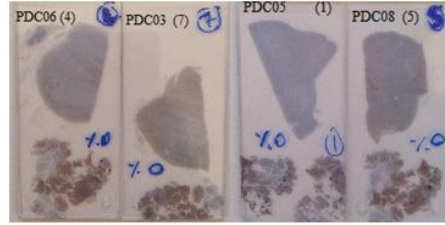
**Tablo 4.1:** Kontrol ve İSF tanıli locus ceruleus doku kesitlerinde tau-immun reaktivitesi gösteren hücrelerin oranı. PD numaraları doku bankasına ait olup, parantez içindeki numaralar bu çalışmada, çalışma sırasına göre verilen numaralardır.

İSF Tanılı örnekler	Preparat ID	PD139 (2)	PD75 (3)	PD108 (6)	PD302 (8)	PD178 (9)	PD173 (10)	PD169 (11)	PD87 (12)	PD147 (13)
	% Tau	10	30	1	1	20	3	5	5	20

**Tablo 4.1 (devam):** Kontrol ve İSF tanılı locus ceruleus doku kesitlerinde tau-immun reaktivitesi gösteren hücrelerin oranı. PD numaraları doku bankasına ait olup, parantez içindeki numaralar bu çalışmada, çalışma sırasına göre verilen numaralardır.

Negatif Kontroller	Preparat ID	PDC05 (1)	PDC06 (4)	PDC08 (5)	PDC03 (7)
	% Tau	0	0	0	0

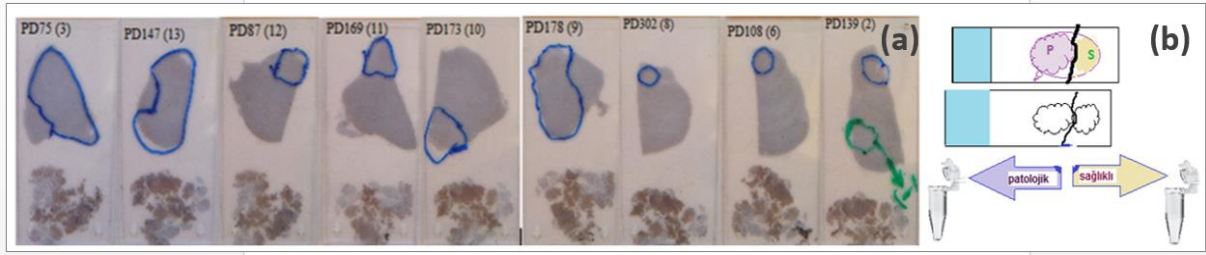
Sağlıklı vericilere ait kontrol doku kesitlerinde yoğun tau-immun reaktivitesi gösteren hücrelere rastlanmadı. Bu kesitlerde tau-immun reaktivite değeri %0 olarak saptandı (Şekil 4.3). İmmun boyama yapılmış aynı parafin dokunun eşlenik kesitleri bir sonraki aşama olan, miRNA çalışmasında kullanılmak üzere işleme alındı.



**Şekil 4.3:** Negatif kontrollerde tau immün reaktivitesi kontrolü. Tau immün reaktivitesi tüm alanlarda %0 olarak gözlemlendi.

İSF tanılı eşlenik kesitlerinde ise, boyanmış preparatlar patolojik ve sağlıklı alanların belirlenmesinde şablon olarak kullanıldı. Boyanan preparatlarda, yoğun miktarda reaktivite gösteren hücrelerin bulunduğu bölgeler daire içine alındı (Şekil 4.4). Daha sonra boyalı preparatlarda işaretlenen bölgeler şablon görevi yaparak ilgili eşlenik kesitlerde de aynı bölgeler belirlendi ve dikkatlice kazınarak bitişindeki bölgelerle ayrı şekilde moleküler çalışmalar gerçekleştirildi.





**Şekil 4.4:** Kesitlerde tau immün reaktivite yüzdesinin belirlenmesi (a), patolojik ve sağlıklı bölgelerin ayrılması (b). Yüksek tau immün reaktivitesi (%0 üzerinde) gösteren nöronların yoğun olarak buldukları bölgeler mavi daire içine alındı (a). immunhistokimya ile 'patolojik (P) ve sağlıklı (S) olarak sınırlandırılan preparatların şablon olarak kullanımı (b).

## 4.2. PARAFİNİN UZAKLAŞTIRILMASI VE RNA İZOLASYONU

Parafin örneklerden saf bir şekilde RNA eldesi zor olduğundan, çalışma için temin edilebilen az miktardaki dokulardan ancak uygun konsantrasyonda ( $\geq 33\text{ng}/\mu\text{l}$ ) ölçülen örnekler çalışmaya alınmıştır (**Tablo 4.2**). Elde edilen RNA konsantrasyonları, yüksek oranda tau birikimi içeren İSF'li preparatların patolojik alanlarından 39-52  $\text{ng}/\mu\text{l}$  olan dört örnek, düşük oranda tau birikimi içeren İSF'li preparatların sağlıklı alanlarında 53-91  $\text{ng}/\mu\text{l}$  olan beş örnek, ve sağlıklı kontrollerden 33-41  $\text{ng}/\mu\text{l}$  olan üç örnek ile çalışmaya devam edildi.

Tau birikim yüzdesi yüksek olan preparatların patolojik alanlarının daha geniş olması nedeniyle, bu preparatlardan patolojik alan örneği olarak daha fazla konsantrasyonda RNA elde edildi. Fakat bu preparatların sağlıklı alanlarının küçük olması nedeni ile aynı preparata ait sağlıklı ve patolojik alanların karşılaştırmalı çalışması mümkün olmadı.

**Tablo 4.2:** Array çalışmasına alınmak üzere parafin kesitlerden elde edilen total RNA'ların çalışma numaralarına göre banka kodları, konsantrasyonları ve saflıkları, kesitlerde tau patoloji gösteren hücrelerin '%' oranları.

Çalışma No	Banka Kodu	Alan Bilgisi	Ölçülen cont. ( $\text{ng}/\mu\text{l}$ ) (A260/A280) -(A260/A230)	Patoloji oranı	Cinsiyet, Yaş
D1	PD075	Patolojik Alan (P)	52,4 (1,845-1,724)	%30	Erkek,66
D2	PD147	Patolojik Alan (P)	48,4 (1,806-1,984)	%20	Erkek,69
D3	PD178	Patolojik Alan (P)	41,2 (1,746-1,304)	%20	Erkek,85
D4	PD173	Patolojik Alan (P)	39,2 (1,960-0,951)	%3	Erkek,75

**Tablo 4.2 (devam):** Array çalışmasına alınmak üzere parafin kesitlerden elde edilen total RNA'ların çalışma numaralarına göre banka kodları, konsantrasyonları ve saflıkları, kesitlerde tau patoloji gösteren hücrelerin '%' oranları.

Çalışma No	Banka Kodu	Alan Bilgisi	Ölçülen cont. (ng/µl) (A260/A280) -(A260/A230)	Patoloji oranı	Cinsiyet, Yaş
D5	PD173	Sağlıklı Alan (S)	59,2 (1,805-1,310)	%3	Erkek,75
D6	PD087	Sağlıklı Alan (S)	91,6 (1,877-1,659)	%5	Kadın, 79
D7	PD108	Sağlıklı Alan (S)	57,2 (1,744-0,973)	%1	Kadın, 69
D8	PD169	Sağlıklı Alan (S)	53,2 (1,822-1,478)	%5	Erkek,82
D9	PD302	Sağlıklı Alan (S)	87,2 (1,772-1,627)	%1	Erkek,92
D10	PDC003	Kontrol (K)	33,2 (1,66-1,277)	%0	Erkek,84
D11	PDC005	Kontrol (K)	38 (1,759-1,301)	%0	Erkek,58
D12	PDC006	Kontrol (K)	41,2 (1,807-1,212)	%0	Kadın, 82

### 4.3. ELDE EDİLEN VERLERİN DEĞERLENDİRMESİ

Çalışılan örnekler 'nSolver Software analiz sistemi' yazılımına yüklendi ve tüm örnekler kalite kontrol (QC) taramasını başarı ile geçti. Normalize edilen verilerin gruplandırılarak karşılaştırmasından elde edilen bulgular ilgili tablolarda belirtildi.

**MinK/MaxP:** Kontrol grubunun minimum miRNA değerlerinin, patolojik grubun maksimum miRNA değerlerinin en az iki katı olduğu miRNA'lardan her iki grubun da eşik değerini geçerek güçlü fark yaratanlar hsa-miR-1268a, hsa-miR-1290, hsa-miR-548q ve yalnız bir grubun eşik değerini geçerek fark yaratanlar ise hsa-miR-2116-5p, hsa-miR-590-5p, hsa-miR-644a olarak tespit edildi (**Tablo 4.3**).

**Tablo 4.3:** MinK/MaxP oranlarında farklılık gösteren miRNA'ların listesi ve normalize değer oranları. Karşılaştırmada en az bir verinin eşik değerini geçmesi '\*', her iki verinin de geçmesi '\*\*' olarak belirtilmiştir. Her iki verinin de eşik altında kaldığı durumlar ise belirtilmiştir.

MinK $\geq$ 2xMaxP		MinK $\geq$ 2xMaxP	
miRNA	Oran	miRNA	Oran
**hsa-miR-1268a	2,27	**hsa-miR-548q	2,05
**hsa-miR-1290	2,42	*hsa-miR-590-5p	2,19
*hsa-miR-2116-5p	2,24	*hsa-miR-644a	2,42

**MinK/MaxP-4:** Aynı karşılaştırma, patoloji oranı düşük olan D4 örneği dışlanarak sadece yüksek patoloji gösteren (%20-30) örnekler dahil edilerek yapıldığında, hsa-miR-1268a, hsa-miR-1290, hsa-miR-2116-5p, hsa-miR-590-5p ve hsa-miR-644'nın oranlarının değişmediği fakat hsa-miR-548q'nun farkının belirgin şekilde arttığı gözlemlendi. Ayrıca düşük pozitif örneğin dışlanmasıyla hsa-miR-548d-3p ve hsa-miR-549a farkları belirirken hsa-miR-4536-5p ve hsa-miR-548n her iki grupta da eşik değerinin üzerinde güvenilir fark gösterdiler (**Tablo 4.4**).

**Tablo 4.4:** MinK/MaxP-4 oranlarında farklılık gösteren miRNA'ların listesi ve normalize değer farkları. Karşılaştırmada en az bir verinin eşik değerini geçmesi '\*', her iki verinin de geçmesi '\*\*' olarak belirtilmiştir. Her iki verinin de eşik altında kaldığı durumlar ise belirtilmemiştir.

<b>MinK <math>\geq</math> 2x MaxP-4</b>	
miRNA	Oran
**hsa-miR-1268a	2,27
**hsa-miR-1290	2,43
*hsa-miR-2116-5p	2,24
**hsa-miR-4536-5p	2,38
*hsa-miR-548d-3p	2,11
**hsa-miR-548n	2,14
**hsa-miR-548q	5,21
*hsa-miR-549a	3,06
**hsa-miR-590-5p	2,19
*hsa-miR-644a	2,42

**MinK-10/MaxP-4:** Karşılaştırmasında düşük pozitif olan D4'ün yanısıra, kontrol grubunda, grubun genel miRNA motiflerine göre sapmalar gösteren D10 örneğinin de dışlanmasıyla değerlendirime yapıldı. Doku bankasından İSF negatif olarak teslim alınan D10 örneğinin sapmalar nedeni ile klinik ve patolojik kayıtlarının tekrar incelenmesi sonucunda, tau ilişkili bir hastalık olan Alzhiemer bulguları gösterdiği öğrenildi. Dolayısıyla, D10'un dışlanması ile ortaya çıkan yeni farklar Alzhiemer tipi tau patolojisi ile ortak mekanizmalara işaret edebilir.

Elde edilen yeni oranlara göre ilk kez beliren miRNA'lardan, hsa-miR-4531, hsa-miR-603, hsa-miR-549a ile hsa-miR-548 ailesi dikkat çekici farklar oluşturmuşlardır. Karşılaştırma sonucunda kıstaslarımıza uygun farklılık gösteren tüm miRNA ve oranları **Tablo 4.5**'de detaylandırıldı.

**Tablo 4.5:** MinK-10/MaxP-4 oranlarında farklılık gösteren miRNA'ların listesi ve normalize değer farkları. Karşılaştırmada en az bir verinin eşik değerini geçmesi '\*', her iki verinin de geçmesi '\*\*' olarak belirtilmiştir. Her iki verinin de eşik altında kaldığı durumlar ise belirtilmemiştir.

MinK-10 $\geq$ 2x MaxP-4					
miRNA	Oran	miRNA	Oran	miRNA	Oran
**hsa-miR-1268a	2,27	**hsa-miR-4531	4,38	**hsa-miR-548q	7,64
**hsa-miR-1290	5,87	*hsa-miR-4532	2,23	*hsa-miR-549a	6,23
*hsa-miR-944	2,35	**hsa-miR-4536-5p	2,76	**hsa-miR-590-5p	2,99
*hsa-miR-155-5p	2,33	*hsa-miR-5196-3p+hsa-miR-6732-3p	2,21	*hsa-miR-603	200,08
*hsa-miR-2116-5p	3,21	*hsa-miR-519b-5p+hsa-miR-519c-5p+hsa-miR-523-5p+hsa-miR-518e-5p+hsa-miR-522-5p+hsa-miR-519a-5p	2,14	*hsa-miR-644a	2,96
*hsa-miR-26a-5p	2,67	**hsa-miR-522-3p	2,17	**hsa-miR-6724-5p	2,27
**hsa-miR-30e-5p	2,15	*hsa-miR-548aa+hsa-miR-548t-3p	60,93	*hsa-miR-877-5p	4,22
*hsa-miR-3161	2,09	**hsa-miR-548ah-5p	2,05	**hsa-miR-4516	2,33
*hsa-miR-32-5p	3,72	*hsa-miR-548d-3p	2,11	**hsa-miR-548n	2,97
*hsa-miR-320d	2,55	**hsa-miR-548j-3p	3,58	LIG_POS_A	2,17
*hsa-miR-4455	3,83	*hsa-miR-548j-5p	2,03	LIG_POS_B	2,64

**MinP-4/MaxK-10:** Bu değerlendirmede, yüksek patoloji gösteren P-4 grubunun minimum miRNA değerlerinin, D10 dışlanarak tamamen sağlıklı kontrol grubuna oranla kıstaslarımıza uygun olarak anlatımında belirgin artış gösteren tek bir miRNA saptandı (**Tablo 4.6.**) 'hsa-miR-651-3p' olarak tanımlanan bu miRNA patoloji artışıyla doğru orantı gösterdi.

**Tablo 4.6:** MinP-4/MaxK-10 oranlarında farklılık gösteren miRNA'ların listesi ve normalize değer farkları. Her iki grubun verileri de eşik altında kalmasına karşın grupları iyi temsil ettikleri için karşılaştırma sunuldu.

MinP-4 $\geq$ 2x MaxK-10	
miRNA	Oranı
hsa-miR-651-3p	2,09

**MinK-10/MaxS:** D10'un dışlandığı tamamen sağlıklı kontrollerin, İSF'li kesitlerin tau patolojisi göstermeyen bölgelerine oranla daha yüksek anlatım gösteren miRNA'ları hsa-miR-548j-3p, hsa-miR-603 ve hsa-miR-548aa+hsa-miR-548t-3p olarak saptandı. MinK/MaxS

karşılaştırmasında fark yaratan bir miRNA'ya rastlanmadığı için, tespit edilen bu miRNA'lar genel tau patolojisine bağlı azalışla ilişkilendirildi (**Tablo 4.7**).

**Tablo 4.7:** MinK-10/MaxS oranlarında farklılık gösteren miRNA'ların listesi ve normalize değer farkları. Karşılaştırmada en az bir verinin eşik değerini geçmesi '\*', her iki verinin de geçmesi '\*\*' olarak belirtilmiştir. Her iki verinin de eşik altında kaldığı durumlar ise belirtilmemiştir.

MinK-10 $\geq$ 2x MaxS	
miRNA	Oranı
*hsa-miR-548aa+hsa-miR-548t-3p	6,50
**hsa-miR-548j-3p	2,27
**hsa-miR-603	6,34

minK / MaxS , minS / MaxP, MinS/MaxP-4, MinS / MaxK, MinS/MaxK-10, MinP / MaxK, MinP / MaxS, MinP-4/MaxS karşılaştırmalarında eşik değerleri üzerinde ya da anlamlı olarak fark yaratan (1,5 kat fark'a kadar incelendi) herhangi bir miRNA tespit edilmemiştir.

**D4/D5 ve D5/D4 Oranları:** Patolojik alanındaki tau oranı %3 olan, bireyin PD173 doku bankası kodlu kesitinde yer alan Patolojik (D4) ve Sağlıklı (D5) bölgelerin birbirlerine göre karşılaştırmaları yapıldı.

D5'de D4'e oranla daha yüksek anlatım gösteren miRNA'lar **Tablo 4.8**'de verildi Saptanan bu miRNA'lar aynı dokuda patolojiye bağlı düşüş göstermektedirler. Patoloji mekanizmasının aydınlatılmasında anlamlı olabilecek bu miRNA'larda hsa-let-7 ailesinin anlatım farkı ve tüm housekeeping mRNA'larda artış gözükürken B2M'nin aynı kaldığı saptanmıştır.

**Tablo 4.8:** D5 (Sağlıklı) bölgesinin, D4 (Patolojik) bölgesine göre en az iki kat fazla miktarda olan miRNA'lar ve oranları. En az bir verinin eşik değerini geçmesi '\*', her iki verinin geçmesi '\*\*' olarak belirtildi. Her iki verinin de eşik altında kaldığı durumlar ise belirtilmedi.

D5 $\geq$ 2x D4					
miRNA	Oranı	miRNA	Oranı	Housekeeping mRNA	Oranı
**hsa-let-7b-5p	11,19	*hsa-miR-513a-3p	2,07	**ACTB	2,59
*hsa-let-7c-5p	2,68	*hsa-miR-548m	2,25	**GAPDH	2,18

**Tablo 4.8 (devam) :** D5 (Sağlıklı) bölgesinin, D4 (Patolojik) bölgesine göre en az iki kat fazla miktarda olan miRNA'lar ve oranları. En az bir verinin eşik değerini geçmesi '\*', her iki verinin geçmesi '\*\*' olarak belirtildi. Her iki verinin de eşik altında kaldı kaldığı durumlar ise belirtilmedi.

D5 ≥ 2x D4					
miRNA	Oranı	miRNA	Oranı	Housekeeping mRNA	Oranı
**hsa-miR-125b-5p	4,06	*hsa-miR-620	2,00	**B2M	1,02 (Aynı)
*hsa-let-7g-5p	3,38	**hsa-miR-551b-3p	2,19	**RPL19	2,18
*hsa-miR-125a-5p	2,89	*hsa-miR-616-3p	2,35	**RPLP0	1,77
*hsa-miR-126-3p	2,71	*hsa-miR-650	2,21		
<i>Eşik altı</i> hsa-miR-1296-	3,13	*hsa-miR-760	2,35		
*hsa-miR-1298-5p	2,22	*hsa-miR-802	2,07		
*hsa-miR-1322	2,02	*hsa-miR-876-5p	2,12		
*hsa-miR-181a-5p	7,65	*hsa-miR-92a-3p	3,04		
*hsa-miR-218-5p	3,55	*hsa-miR-934	2,16		
*hsa-miR-219a-2-3p	5,01	*hsa-miR-936	2,28		
*hsa-miR-23b-3p	2,51	*hsa-miR-379-5p	2,19		
*hsa-miR-299-3p	2,27	*hsa-miR-4284	2,07		
*hsa-miR-29b-3p	4,74	**hsa-miR-4286	11,16		
*hsa-miR-3144-3p	2,13	**hsa-miR-4454+hsa-miR-7975	4,39		

D4'de D5'e oranla daha yüksek anlatım gösteren miRNA'lar Tablo 4.10'da detaylandırıldı. Aynı dokuda patolojinin oluşumu ile artış gösteren miRNA'lar hsa-miR-122-5p, hsa-miR-4536-5p, hsa-miR-601 ve hsa-548 ailesine ait hsa-miR-548d-3p, hsa-miR-548n ve hsa-miR-548q belirgin olarak gözlemlendi (**Tablo 4.9**).

**Tablo 4.9:** D4 (Patolojik)'ün, D5 (Sağlıklı)'e göre anlatımı en az iki kat artan miRNA'lar. En az bir verinin eşik değerini geçmesi '\*', her iki verinin de geçmesi '\*\*' olarak belirtildi.

D4 ≥ 2x D5	
miRNA	oranı
*hsa-miR-122-5p	98,19
**hsa-miR-376a-3p	2,25
*hsa-miR-4531	2,39
*hsa-miR-4536-5p	3,14
*hsa-miR-548d-3p	5,43
**hsa-miR-548n	2,61
**hsa-miR-548q	3,15
*hsa-miR-601	7,07

Paralel değerlendirmelerin karşılaştırılması iki kat farkın anlamlı kılabilceği için D5/D4 karşılaştırmaları baz alınarak, sağlıklı ve patolojik guruplarda daha düşük oranlar da fark oluşturan miRNA'lar **Tablo 4.10**'de gösterildi. Karşılaştırılan verilerde her grup için en az bir verinin eşik üstü değerinde olmasına dikkat edildi. D5/D4 oranı nispeten yüksek olduğu için MinS/MaxP değerlerinin her ikisi de eşik altında kalmış olsa da **Tablo 4.10**'de yer verildi. Karşılaştırmada hsa-miR-1290'nın tüm eşik değerlerinin üzerinde güvenilir bir şekilde, İSF'li bireylerin sağlıklı bölgelerinde daha yüksek seyrettiği ve patolojis ile ters orantılı bir değişim gösterdiği saptandı.

**Tablo 4.10:** D5/D4 karşılaştırmasında iki katın altında ve bir katın üzerinde farklılık gösteren miRNA'lar ile MinS/MaxP'de benzer farklılık gösteren ortak miRNA'lar ve değerleri. Karşılaştırmada en az bir verinin eşik değerini geçmesi '\*', her iki verinin de geçmesi '\*\*' olarak belirtildi. Her iki verinin de eşik altında kaldığı durumlar ise belirtilmedi.

miRNA	D5/D4	MinS/MaxP
hsa-miR-126-3p	*2,71	**1,29
hsa-miR-1290	**1,44	**1,16
hsa-miR-1307-5p	*1,45	*1,10
hsa-miR-185-5p	*1,30	**1,19
hsa-miR-210-3p	*1,19	*1,11
hsa-miR-301a-3p	*1,47	**1,13
hsa-miR-335-5p	*1,36	*1,21

Bulgular topluca değerlendirildiğinde, dahil olduğu gurubu temsil eden ve genel anlamda belirli motifler oluşturan örnekler dikkat çekmekte olup (P:D1,D2,D3; S:D7,D9; K:D11, D12), bu örneklerde belirgin farklar gösteren miRNA anlatım seviyelerinin normalize verileri Tablo 4.12'de gösterildi. İSF'li bireylerin tau patolojisi gösteren hücrelerinin yoğunlaştığı bölgelerde gene İSF'li bireylerin tau patolojisi göstermeyen bölgeleri ve sağlıklı bireylere ait kontrol dokuları ile kıyaslandığında, hsa-miR-125b-5p, hsa-miR-1268a, hsa-miR-1290, hsa-miR-2116-5p, hsa-miR-26a-5p, hsa-miR-3195, hsa-miR-32-5p, hsa-miR-4536-5p, hsa-miR-549a, hsa-miR-574-5p, hsa-miR-590-5p, hsa-miR-644a, hsa-miR-6724-5p, hsa-miR-877-5p, hsa-miR-944, hsa-miR-29b-3p, hsa-miR-4488, hsa-miR-4516, hsa-miR-4531, hsa-miR-4286, hsa-miR-548q, hsa-miR-548d-3p, hsa-miR-548j-3p ve hsa-miR-548n miRNA'larının anlatım

düzeylerinde anlamlı azalma tespit edildi. Ayrıca, hsa-miR-548 ailesine ait dört bireyinin belirgin değişim motifi içinde yer alması dikkat çekicidir.

**Tablo 4.11:** Gruplar arası karşılaştırmalarda belirgin motifler gösteren ve dahil oldukları grupları temsilen miRNA'lar ve normalize değerleri. Anlatım seviyeleri  $P>S>K$  olarak anlamlı ve belirgin motifler sergileyen miRNA'lar gösterilmiş ve bu miRNA'lar arasında yüksek anlatım ve güvenilirlikte değer veren miRNA'lar ve değerleri gri ile belirtilmiştir. miR-548 ailesinin üç üyesi ayrıca vurgulanmıştır.

miRNA'lar	Patolojik			Sağlıklı		Kontrol	
	D1	D2	D3	D7	D9	D11	D12
hsa-miR-125b-5p	314,00	309,57	119,15	805,57	1190,06	988,26	587,65
hsa-miR-1268a	21,93	36,36	14,23	228,54	180,63	82,56	321,22
hsa-miR-1290	38,88	37,40	32,01	152,36	177,98	228,25	296,66
hsa-miR-2116-5p	11,96	13,50	11,56	47,28	34,53	58,28	43,46
hsa-miR-26a-5p	16,95	21,82	16,01	58,67	54,90	58,28	93,53
hsa-miR-3195	19,94	29,09	32,01	116,46	86,78	38,85	164,39
hsa-miR-32-5p	13,96	9,35	12,45	28,90	38,07	55,85	51,96
hsa-miR-4536-5p	21,93	34,28	19,56	93,69	76,15	115,34	94,48
hsa-miR-548q	23,92	24,93	17,78	118,21	156,73	190,61	205,96
hsa-miR-549a	10,97	21,82	18,67	77,93	109,80	135,98	139,83
hsa-miR-574-5p	14,95	10,39	16,89	35,02	42,50	24,28	24,56
hsa-miR-590-5p	19,94	32,20	24,01	71,80	83,23	126,26	96,37
hsa-miR-644a	19,94	20,78	10,67	42,91	58,44	74,06	61,41
hsa-miR-6724-5p	21,93	19,74	16,89	62,17	66,41	49,78	98,26
hsa-miR-877-5p	13,96	18,70	17,78	49,03	57,56	78,92	79,36
hsa-miR-944	6,98	14,54	16,89	37,65	37,19	49,78	39,68
hsa-miR-29b-3p	121,61	91,42	48,91	150,61	272,72	448,00	179,51
hsa-miR-4488	54,83	38,44	26,68	80,56	81,46	165,12	102,04
hsa-miR-4516	51,84	49,86	34,68	97,19	129,28	131,12	120,93
hsa-miR-4531	13,96	37,40	14,23	59,54	89,43	163,90	179,51
<i>hsa-miR-548d-3p</i>	13,96	19,74	8,00	37,65	37,19	55,85	41,57
<i>hsa-miR-548j-3p</i>	27,91	35,32	22,23	46,41	55,78	143,26	126,60
<i>hsa-miR-548n</i>	9,97	38,44	16,01	56,92	79,69	196,68	114,32
hsa-miR-4286	3897,64	3692,97	1605,01	6779,04	14542,82	12568,18	5732,90

92 ve 66 yaş aralığında verici örnekleri ile yapılan bu çalışmada, tau patoloji birikimi ve buna bağlı miRNA değişimine ilişkin bir ilişki saptanmadı. Cinsiyete bağlı değişimlerin araştırılması için ise temin edilen vericilere ait dengeli cinsiyet grupları oluşturulamadığı için inceleme yapılamadı.



## 5. TARTIŞMA VE SONUÇ

İSF, ilerleyen yaşla belirtileri ortaya çıkan, nadir gözlenen nörodejeneratif bir hastalıktır. Hastalığın özellikle erken safhalarda klinik tanısının zorluğu, hastalık oluşum mekanizmalarının tam olarak bilinmemesi nedenleri ile ayırıcı tanısı ve erken teşhisinde kullanılacak moleküler bir yöntem henüz keşfedilememiştir. Ancak, hasta kaybedildikten sonra, bu hastalık, klinik bulgularıyla birlikte otopsi beyin dokularında dejenerasyon bölgelerindeki anormal tau birikimlerinin değerlendirilmesi ile tespit edilebilmektedir (Respondek ve diğ., 2013).

Çalışmamızda, dejenerasyondan etkilenen beyin bölgelerinde tau patolojisi gözlenen ve gözlenmeyen bölgeler arasında oluşabilecek miRNA anlatım farklılıklarının ortaya konması hedeflendi. Epigenetik düzeyde tespit edilebilen farklılıkların, patolojinin oluşumu ve ilerlemesinde rol alan moleküler mekanizmalara ışık tutulabileceği düşünülmektedir. Ayrıca, kan beyin bariyerini geçebilen nadir moleküllerden olan miRNA (Ridder ve diğ., 2014) değişimlerinin incelenmesi ile, bu hastalığın tanısı ve takibinde kullanılacak potansiyel belirteçler ve miRNA hedefleri de aydınlatılabilir (Piletič ve Kunej, 2016).

Bu çalışmada, İSF'li ve sağlıklı vericilere ait locus ceruleus bölgesi otopsi materyallerinde tau patolojisine bağlı olarak anlatım seviyelerinde değişiklik gösteren miRNA'ların belirlenmesi amaçlanmıştır. Bu kapsamda öncelikle hasta bireylerin dokularındaki patolojik bölgeler immunhistokimya yöntemi ile belirlendi. Sağlıklı kontrol dokularında tau patolojisine rastlanmazken (**Şekil 4.1**), İSF'li doku örneklerinin belli bölgelerinde yer alan astrosit ve nöronların sitoplazmalarında yoğun olarak ve ayrıca nöronların aksonlarında kısmen tau birikimlerinin gözlenmesi (**Şekil 4.2**), doku bankasını doğrulanmıştır. %1-30 aralığında tau birikimi tespit edilen dokuların patoloji gösteren bölgelerinin genişlikleri, patoloji oranları ile doğru orantılı olarak gözlenmiştir (**Şekil 4.4**). Ayrıca çalışmamız, patolojik olarak geniş yayılım gösteren dokularda tau oranlarının en yüksek düzeyde belirlenmesi (%20, %30), hücre dejenerasyonunun, rastgele dağınık şekilde olmayıp bir merkezden başlayarak yayıldığı ve yoğunlaştığını gösterdi.

Yaşları 66-92 aralığındaki vericilere ait dokuz adet farklı locus ceruleus doku kesitinde, tau patoloji oranının yaşla bir ilişkisi gözlenmedi (**Tablo 4.2**). Cinsiyete bağlı değişimlerin

saptanabilmesi için ise dengeli gruplar oluşturabilecek sayıda kadın ve erkek vericilere ait örneklerin bulunmaması nedeniyle cinsiyetin patoloji üzerindeki etkisi incelenemedi.

Örneklerden elde edilen miRNA seviyeleri gruplar halinde karşılaştırmalı olarak incelenmiştir. Bu gruplara ait kesitlerdeki patolojik bölgeler (D1,D2,D3,D4) GrupP, sağlıklı bölgeler (D5,D6,D7,D8,D9) GrupS ve kontrol preparatları (D10,D11,D12) GrupK olarak oluşturuldu. Ayrıca, buldukları grup içinde çok sayıda miRNA anlatımında gurubun diğer örneklerine göre belirgin sapmalar gösteren D4 ve D10'nun değerlendirme dışı bırakıldığı durumlara (ilgili grup-4 ve grup-10 olarak) göre de incelemeler yapıldı. Grupların karşılaştırılmasında, aynı miRNA'nın, her örnek grubundaki maksimum ve minimum normalize değerlerinin, diğer gruplardaki minimum ya da maksimum normalize değerlerinden en az iki kat fark göstermesi kriteri temel alındı.

Bu bağlamda, kontrol grubundaki miRNA'ların anlatım düzeyi referans alındığında, patolojik grupta **Tablo 4.3**'de listelenen altı adet miRNA'nın anlatım düzeylerinde düşüş olduğu ortaya konuldu. Özellikle *hsa-miR-1268a*, *hsa-miR-1290* ve *hsa-miR-548q*'nin her iki grupta da eşik değerlerinin üzerinde seyretmiş olması, bulguların güvenilirliğini arttırmıştır. Yapılan literatür incelemesinde, *hsa-miR-1268a* geninin polimorfizmleri tümör karsinogenezinde özellikle astrositoma ve hepatosellüler karsinoma ile (Long ve diğ., 2016; Li ve diğ., 2016) ilişkilendirilmiştir. Viral faktörlere tepki mekanizması ile ilişkilendirilen miR-548 ailesi (Yu ve diğ., 2017) bireyi olan *hsa-miR-548q* için, göz siniri ve omurilik tutulumu gözlenen nöromiyelitis optika hastalığının risk faktörü belirlenmesinde bu miRNA için patent başvurusunun bulunması (Keller ve diğ., 2017) göz sinirlerinin belirgin şekilde etkilendiği İSF hastalığı için *hsa-miR-548q*'nin önemini ortaya koymaktadır. Diğer bir majör bulgu olan *hsa-miR-1290* bir çok kanser tipi ile ilişkilendirilmesinin yanısıra, iskemik inmede hasta kanlarında yüksek anlatım göstermesi (Liu ve diğ., 2014) ve ALS hastalarının plazmalarında kontrollere göre anlatım seviyelerinde farklılık göstermesi (Cai ve Fan, 2013), bu miRNA'nın ortak bir mekanizmayla ilişkili olup, İSF hasta kanlarında da takip edilebilir bir moleküler hedef olabileceğine işaret etmektedir. Ancak, tau patolojisine bağlı olarak, belirgin şekilde düşüşleri tespit edilen bu üç miRNA'nın, İSF ya da tau patolojisi ile ilişkisi ilk defa ortaya konmuştur.

İn vitro çalışmalarda, tau patolojisi ile ilişkilendirilen miR-132, miR-124, miR-137, miR-9, miR-16, miR-15, miR-195 ve miR-497'nin (Smith ve diğ., 2011; Hébert ve diğ., 2012) gerçekleştirdiğimiz çalışmada, esas aldığımız değerlendirme kriterlerine göre bu miRNA

anlatım seviyelerinde gruplar arasında tau patolojisine bağlı genel geçer ve belirgin bir farklılık gözlenmemiştir.

Kontrol grubu ve patolojik gruptan sadece yüksek patoloji gösteren (%20-%30) üç örneğin dahil edildiği karşılaştırmada farklılık göstere on miRNA'dan özellikle, her iki grup için de eşik üstü güvenilir veri olarak fark yaratan hsa-miR-4536-5p ve hsa-miR-548n'nin, yüksek patoloji gösteren bölgelerde anlatım düzeylerinde belirgin düşüşler göstermesi dejenerasyonun seyri açısından anlamlı olabilir. Ayrıca, D4'ün dışlanmasıyla, hsa-miR-548q anlatımındaki düşüş katsayısının 2,05 birimlik'lik farktan 5,21 birimlik farka artmasıyla, bu miRNA'nın patoloji oranı ile ters orantılı bir anlatım seviyesi gösterdiği söylenebilir (**Tablo 4.3** ve **Tablo 4.4**).

Buldukları gruplarda sapmalar gösteren D4 (P grubu) ve D10 (K grubu) örneklerinin dışlanması ile patolojik ve kontrol gruplarının miRNA seviye karşılaştırmaları tekrarlanmıştır. Düşük oranda (%3) patoloji göstermesi ve uzun nöron sınırlarının belirlenmesinin güç olması nedeni ile D4 örneğinde sapmalar beklenmiştir. Fakat, banka tarafından sağlıklı kontrol olarak gönderilen ve tau patolojisine rastlanmayan D10 örneğinin sapma sebebi tam olarak açıklanamamıştır. Ancak, doku bankasından temin edilen bu örneğin vericisine ait klinik ve patolojik bilgiler incelendiğinde, İSF veya parkinson grubu bir teşhisi ya da aile hikayesi olmamasına ve locus ceruleus'da tau patolojisi görülmemesine karşın, substantia nigra'daki birçok pigmentli hücrede özellikle de aksonlarda belirgin tau birikimi bildirilmiştir. Ayrıca, A-beta peptid immunoreaktivitesi ile frontal lob, görsel korteks, subikulüm ve entorhinal korteks'de difüz plakların tespit edilmesi nedeniyle izokortikal seviye 2 ve entorhinal seviye 3 Alzheimer-tipi patoloji tespitinin kayıtlarında yer aldığı görülmüştür. Bilindiği üzere, Alzheimer patolojisinde anormal tau birikimleri, beta plaklarından sonra oluşan ikincil patolojik bir oluşumdur. Bu nedenle D10 dışlanarak yapılan karşılaştırmalarda yeni oluşan farklar, Alzheimer-tipi tau patolojisinin etkisinden bağımsız İSF hastalığına özgü olarak değerlendirilebilir. D10'un çıkarılmasıyla **Tablo 4.4** ve **Tablo 4.5**'te görüldüğü gibi, 'MinK/MaxP'de tespit edilen bazı miRNA'ların anlatımlarında görülen farklılıkların arttığı ve yeni farklılık gösteren eşik üstü değerlerde miRNA'ların belirlediği görülmektedir. Fakat, nSolver analiz programının gruplandırma yapabilmesi için o gruba ait en az üç örneğin olması gerekmektedir. Kontrol grubundan D10 çıkarıldığı durumda ise sadece iki örnek kalması nedeni ile değerlendirmenin güvenilirliği azalacağı için bu karşılaştırma sonuçlarının yorumlanmasında dikkate alınmamaktadır. Fakat, ileride daha fazla örnekleme yapılabilecek çalışmalarda anlamlandırılma olasılığı nedeni ile 'MinP-4/MaxK-10' verileri, bölüm 4'te ve bunlara ek

olarak **Tablo 5.1**'de diğer gruplarla değişimleri karşılaştırmalı olarak bildirilmeye değer görülmüştür.

**Tablo 5.1:** MinK/MaxP ve MinK/MaxP-4'e göre  $\text{MinK-10} \geq 2x \text{MaxP-4}$  değişimleri.  $\text{MinK-10} \geq 2x \text{MaxP-4}$  karşılaştırılmasında ilk defa gözlenen miRNA değişimleri ve diğer karşılaştırma grupları ile ilişkileri ayrıca belirtilmiştir.

MinK/MaxP ve MinK/MaxP-4'e göre $\text{MinK-10} \geq 2x \text{MaxP-4}$ Değişimleri					
miRNA	K/P	K/P-4	miRNA	K/P	K/P-4
**hsa-miR-1268a	aynı	aynı	*hsa-miR-4532	yeni	
**hsa-miR-1290	artış	artış	**hsa-miR-548q (D4/D5'e göre artış)	artış	artış
*hsa-miR-944	Yeni		*hsa-miR-549a	yeni	artış
*hsa-miR-155-5p	Yeni		**hsa-miR-590-5p	artış	artış
*hsa-miR-2116-5p	artış	artış	*hsa-miR-603 (MinK-10/2MaxS göre artış)	yeni	
*hsa-miR-26a-5p	Yeni		*hsa-miR-644a	artış	artış
**hsa-miR-30e-5p	Yeni		**hsa-miR-6724-5p	yeni	
*hsa-miR-3161	Yeni		*hsa-miR-877-5p	yeni	
*hsa-miR-32-5p	Yeni		**hsa-miR-4516	yeni	
*hsa-miR-320d	Yeni		**hsa-miR-548n (D4/D5'e göre artış)	yeni	artış
*hsa-miR-4455	Yeni		**hsa-miR-522-3p	yeni	
**hsa-miR-4531 (D4/D5'e göre artış)	Yeni		*hsa-miR-548aa+hsa-miR-548t-3p (MinK-10 $\geq$ 2MaxS göre artış)	yeni	
*hsa-miR-4532	Yeni		**hsa-miR-548ah-5p	yeni	
**hsa-miR-4536-5p (D4/D5'e göre azalış)	yeni	Artış	**hsa-miR-548j-3p (MinK-10 $\geq$ 2MaxS'ye göre artmış)	yeni	
*hsa-miR-5196-3p+hsa-miR-6732-3p	Yeni		*hsa-miR-548d-3p(D4/D5'egöre azalış)	yeni	aynı
*hsa-miR-519b-5p+hsa-miR-519c-5p+hsa-miR-523-5p+hsa-miR-518e-5p+hsa-miR-522-5p+hsa-miR-519a-5p				yeni	

Kontrol grubunun minimum miRNA değerlerinin, sağlıklı grubun maksimum miRNA değerlerinin (MinK/MaxS) en az iki katı fark yarattığı bir örneğe rastlanmazken, bu karşılaştırmada D10 örneği dışlandığında en az iki katı olduğu üç adet miRNA tespit edilmiştir (**Tablo 4.7**). Bunlardan, hepatit B'ye bağlı olarak tip I interferonu inhibe ettiği bilinen hsa-miR-548j-3p (Yu ve diğ., 2017) ile Alzheimer için risk faktörü olarak gösterilen hsa-miR-603 (Zhang ve diğ., 2016) incelendikleri gruplar içinde eşik üstü, güvenilir değerler vermiştir. D10'un dışlanması ile tespit edilen bu miRNA'lar, Alzheimer tipi ve İSF tipi tau patolojilerinin etkisi ile, locus ceruleus sağlıklı bölgelerinde anlatımları azalan miRNA'lar olarak değerlendirilmiştir. Ancak, sonuçlarını henüz almaya başladığımız paralel bir çalışmada hsa-miR-603'ün sağlıklı ve kontrol bireyleri arasında İSF'den bağımsız bir motif izlediği tespit edilmiştir.

Çalışmanın çıkışı, İSF'li örneklerde aynı kesitlere ait sağlıklı ve patolojik alanların karşılaştırılmasıyla elde edilecek miRNA anlatım farklılıklarının, patolojinin oluşum mekanizmasına ışık tutması yaklaşımıydı. Ancak, parafin dokularda nükleik asit izolasyonlarında genel bir sorun olan, kaliteli nükleik asit eldesi ve ayrıca doku bankasından az miktarda örnek temin edilebilmiş olması nedeni ile, moleküler çalışmaya uygun şartları karşılayabilen tek örnek olan PD173 banka kodlu örneğin iki ayrı alanı karşılaştırılabildiği tespit edilmiştir. Her ne kadar tek kesite ait iki farklı özellikteki alanlardan elde edilen verilerinin istatistiksel olarak anlamlandırılması zor olsa da, biyolojik olarak incelemelere ışık tutabileceği düşünülmektedir.

Patolojik bölgesindeki tau immunreaktivitesi %3 olarak tespit edilen PD173 kodlu örneğin, patolojik alanı D4 ve aynı kesitteki sağlıklı alanı D5 olarak isimlendirilmiştir. D5 (sağlıklı alan) anlatımlarının, D4 (patoloji gözüken alan) anlatımlarına göre en az iki kat fazla olduğu ( $D5 \geq 2 \times D4$ ) miRNA'lar **Tablo 4.8**'de verilmiştir. ' $D5 \geq 2 \times D4$ ' oranlamasında, her iki örneğin değerlerinin eşik değerleri üzerinde olan beş adet miRNA (hsa-let-7b-5p, hsa-miR-125b-5p, hsa-miR-551b-3p, hsa-miR-4286, hsa-miR-4454+hsa-miR-7975) tespit edilmiştir. Tespit edilen bu miRNA'ların D4 patolojik alanda, anlatımlarının patolojiye bağlı olarak azalış gösterdiği düşünülmektedir. Bu miRNA'lar, tau patolojisine özgü ve/veya hücre dejenerasyonunun ve hücre ölümlerinin belirteçleri olabilme potansiyeli taşımaktadırlar. Bu durum ayrıca kit içerisinde mevcut housekeeping genlerinin mRNA anlatım seviyelerinde belirgin farkları ile de hücrenin temel yapılarında dejenerasyona bağlı azalmayı desteklemektedir. Ancak, diğer housekeepinglerin oranlarında en az iki kat fark gözlenmesine

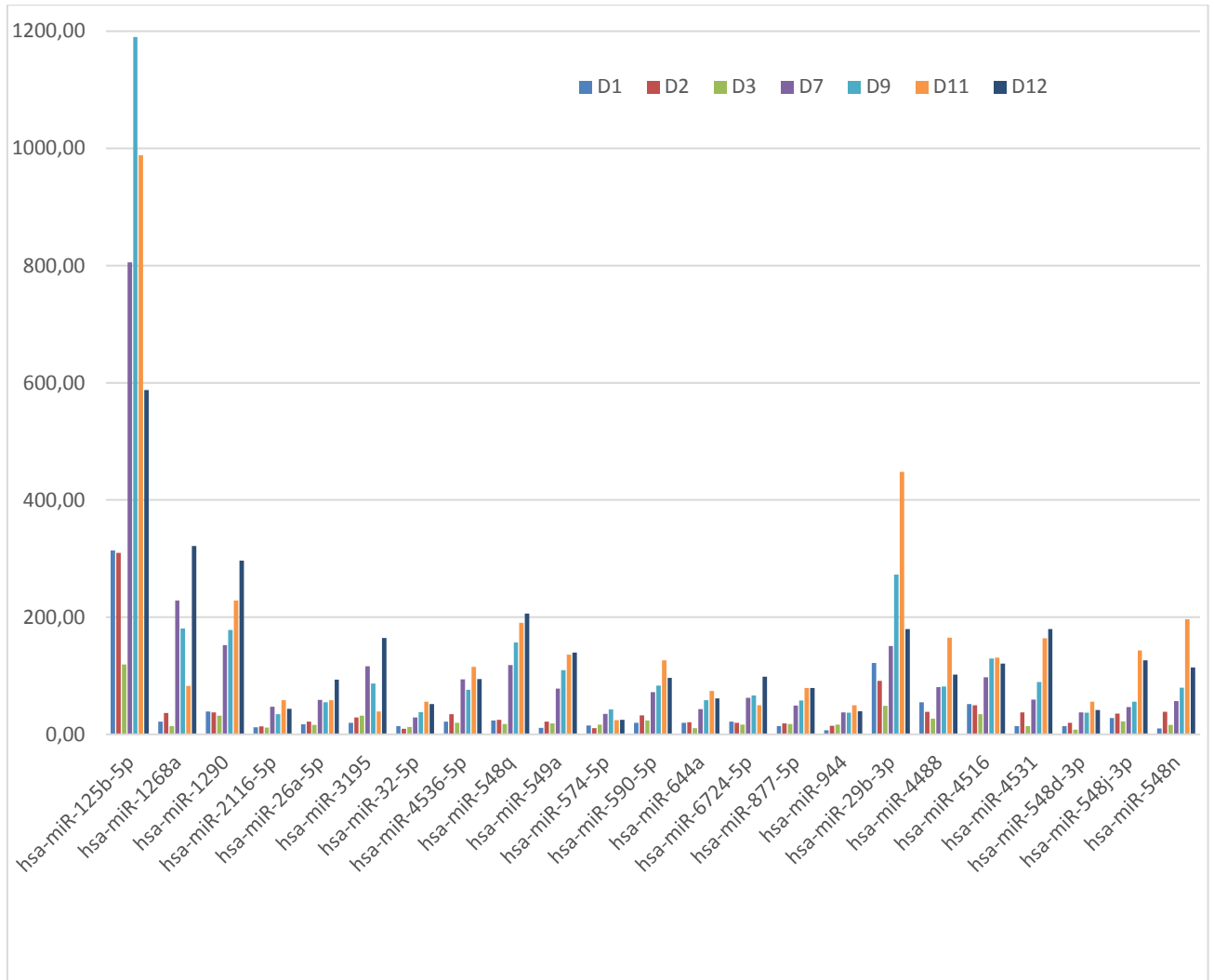
rağmen B2M housekeeping geninde herhangi bir değişiklik tespit edilmemiştir.  $\beta$ -2-microglobulin geni (B2M), kantitatif gen anlatım analiz çalışmalarında sıklıkla referans olarak tercih edilen ve nispeten anlatımı daha kararlı olan genlerdendir. Nörodejeneratif hastalıklarda RT-qPCR tekniğinde kullanılmak üzere, farklı beyin bölgelerine özgü kararlı ve güvenilir housekeeping genlerin olduğu ve B2M'nin İSF'li prefrontal kortekste daha güvenilir olmak üzere serebellum'da da kullanılabileceği gösterilmiştir (Rydbirk ve diğ., 2016). Ancak, bilğimiz dahilinde B2M'nin İSF'li locus ceruleus bölgesindeki stabilitesine ait bir çalışma bulunmamaktadır.

Az sayıdaki örnekle yapılan çalışmada, belirgin farkları tespit edebilmek için en az iki kat farklar dikkate alınarak, hassasiyet ve güvenilirlik açısından daha düşük oranlı olanlar gözardı edilmiştir. Ancak, paralel değerlendirmelerin karşılaştırılması iki kat farkın anlntındakileri de anlamlı kılabilceği için D5/D4 karşılaştırmaları baz alınarak, daha düşük oranlarla tespit edilmiş diğer grupların farklılıkları da birlikte incelenmiştir. Sağlıklı ve patolojik bölgeler arasında genel bir miRNA seviye değişim motifi aramak için, MinS/MaxP farkı, D5/D4 farkı ile birlikte **Tablo 4.10**'da gösterildiği şekilde değerlendirilmiştir. İSF'li bireylerin tau patolojisi gösteren hücrelerinin yoğunlaştığı bölgelerde gene İSF'li bireylerin tau patolojisi göstermeyen bölgeleri ile kıyaslandığında tek başına anlamlı bir bulgu elde edilemezken, bu karşılaştırma verilerinin PD173 nolu hastaya ait sağlıklı ve patolojik alan karşılaştırmasında elde edilen verilerle değerlendirilmesi sonucu hsa-miR-126-3p, hsa-miR-185-5p, hsa-miR-301a-3p ve beklenen şekilde hsa-miR-1290 miRNA ları anlatım düzeylerinde anlamlı azalma tespit edilmiştir.

PD173 kodlu kesitin, tau patolojisi etkisinde anlatımında artış gösteren miRNA'ların belirlenmesi ise patolojik alanda (D4) tespit edilen değerlerinin sağlıklı alandaki (D5) değerlerinin en az iki katı olması prensibi ( $D4 \geq 2 \times D5$ ) ile incelenmiştir (tablo 4.10'da verilmiştir). Patolojiden etkilenen ve hücre ölümlerinin gerçekleştiği varsayılan D4 bölgesinde bazı miRNA'ların anlatım düzeylerinin artması, hayatta kalım, komşu hücrelerin uyarılması ya da korunması gibi mekanizmalara hizmet edebileceği gibi tau patolojisine özgü mekanizmanın aydınlatılmasına rol oynayabilir. Özellikle, hsa-miR-122-5p, hsa-miR-548d-3p ve hsa-miR-601'de tespit edilen, eşik üstü ve yüksek oranlı bu farklar önem arz etmektedir.

Çalışmada elde edilen en çarpıcı bulgular ise patolojik, sağlıklı ve kontrol gruplarının karşılaştırılmasıyla, miRNA anlatım seviyelerinde belirgin şekilde tutarlılık gösteren örneklerin

verilerinde tespit edilmiştir. Bu örnekler sırası ile P(D1,D2,D3), S(D7,D9), K(D11,D12) gruplarında artan anlatım seviyeleri gösteren miRNA'larla dikkat çeken bir motif oluşturmuşlardır. Şekil 5.1'de dahil oldukları grupları en iyi temsil eden örneklere ait karşılaştırmalarda belirgin motifler gösteren miRNA'ların normalize değerlerine göre oluşturduğu grafik gösterilmektedir. **Tablo 4.11**'de değerleri verilen 23 miRNA'dan oluşturulmuş bu grafikte hsa-miR-4286'ya ait anlatım seviyeleri diğer miRNA'lara oranla çok yüksek olduğu için aynı grafikte gösterilememektedir.



**Şekil 5.1:** Patolojik, sağlıklı ve kontrol dokularında temsili örneklerin anlamlı miRNA seviyeleri. D1,D2,D3 patolojik grup; D7,D9 sağlıklı grup; D11,D12 kontrol grubuna ait örneklerdir.

Anlatım seviyeleri karşılaştırıldığında 24 miRNA'nın tamamı, patolojik grupta genel bir azalma gösterirken aynı miRNA'lar kontrol grubunda yüksek seyretmektedir. Çoğunlukla kontrol grubu, sağlıklı gruba oranla daha yüksek değerlerde seyretse de aynı ya da daha düşük seviyede gözlenen değerler de tespit edilmiştir. Bu durum, ancak düşük oranda patoloji gösteren ( $\leq 5\%$ ) dokulara ait örneklerden elde edilebilen sağlıklı alanların çalışılmış olması ve nöron hücrelerinin uzantı ve gövdelerinin geniş bir bölgede yayılım gösterebilmesi nedeniyle düşük oranlı patolojik alanın tam bir diseksiyonun sağlanamamış olması ile açıklanabilir. Nitekim, Sağlıklı gruba ait beş örneğin birbirleri arasında istikrarsız anlatımlar göstermesi ve düşük patoloji oranlı PD173 kodlu kesite ait D5 ve D4 bölgelerinde incelenen miRNA'larda beklenen motiflerin belirgin şekilde tespit edilememesi de bu savı desteklemektedir.

Fakat, örneklerde tau patolojisi gösteren hücrelerin yoğunlaştığı bölgeler ile tau patolojisi göstermeyen bölgeler kıyaslandığında anlatımında anlamlı azalma tespit edilen 24 miRNA'dan üç tanesi PD173 nolu preparatta da aynı motifi izlediği saptandı. PD173 nolu preparatta, tau patolojisi gösteren hücrelerin yoğunlaştığı bölge ile yine aynı dokunun tau patolojisi göstermeyen bölgesi kıyaslandığında hsa-miR-125b-5p, hsa-miR-29b-3p ve hsa-miR-4286 miRNA'ları anlatım düzeylerinde tespit edilen anlamlı azalma, bu miRNA'ların tau patolojisi ya da patolojiye bağlı nörodejenerasyonla ilişkisini güçlendirmektedir. hsa-miR-548 ailesine ait en az dört miRNA'nın anlatımındaki azalma ise özellikle bu miRNA ailesinin patolojisiyle ilişkili olabileceğine işaret etmektedir.

Sonuç olarak, yapılan bu çalışmayla İSF'li bireylerin tau patolojisi gözlenen locus ceruleus bölgelerinde miRNA anlatım düzeylerinde genel bir düşüş saptanmıştır. Patoloji gözlenmeyen ve sağlıklı kontrol kesitlerine göre, seviyelerinde anlamlı ve belirgin bir şekilde düşüş gösteren 24 adet miRNA'dan dört tanesi hsa-miR-548 ailesine aittir. Bu miRNA ailesi, yapılan çalışmalarda, virus enfeksiyonlarına karşı tepkinin düzenleyicileri olarak gösterilmiştir (Li ve diğ., 2013; Wen ve diğ., 2015; Yu ve diğ., 2017). Yaptığımız çalışmada, hsa-miR-548 ailesinin tau patolojisiyle ilişkili olabileceği gösterilmiş ve bu ailenin viral enfeksiyonlardaki rolü nedeniyle İSF ve diğer taupatilerde viruslerin olası etkisi dikkat çekmektedir.

Mevcut imkanlarla az sayıda örnekle yapılan bu çalışmada elde edilen verilerin daha güçlü bir şekilde desteklenebilmesi, eşik altı ya da sınırdaki verilerin çok daha hassas bir şekilde yeniden değerlendirilebilmesi için fazla sayıda örnekle tekrar edilmesi bu konuda yeni bilgiler



sağlayacaktır. Ayrıca, çalışmanın çıkış noktası olan, aynı dokuda sağlıklı ve patolojik bölgelerin farklılıklarını ortaya koymak imkanlar dahilinde kısmen mümkün olabilmektedir. Bu yaklaşımın, yüksek patoloji oranlı çok sayıda örnekle uygulanması, tau patolojisinin mekanizmasını daha belirgin şekilde aydınlatarak, muhtemel ilaç hedeflerini açığa çıkartabilir. Bu çalışma ile elde edilen bulguların İSF teşhisi konulmuş hastaların kanlarında incelenmesi, bu hastalık için aday moleküler belirteçlere ışık tutabilir.



## KAYNAKLAR

- Andreadis, A., Brown, W.M., Kosik, K.S., 1992, Structure and novel exons of the human tau gene, *Biochemistry*, 31(43), 10626-33.
- Andreadis, A., 2005, Tau gene alternative splicing: expression patterns, regulation and modulation of function in normal brain and neurodegenerative diseases, *Biochim Biophys Acta*, 1739(2-3), 91-103.
- Avila, J., Lucas, J.J., Perez, M., Hernandez, F., 2004, Role of Tau Protein in Both Physiological and Pathological Conditions, *Physiological Reviews*, 84, 361-384.
- Baker, M., Litvan, I., Houlden, H., et al., 1999, Association of an extended haplotype in the tau gene with progressive supranuclear palsy, *Human Molecular Genetics*, 8(4), 711-715.
- Bouret, S., Sara, S.J., 2010, *Locus ceruleus*, *Scholarpedia*, 5(3), 2845.
- Cai, B., Fan, D., (2013), Circulating miR-1285 and miR-29b as Potential Biomarkers For Amyotrophic Lateral Sclerosis, *Theme 5 Improving Diagnosis, Prognosis and Disease Progression*, Amyotrophic Lateral Sclerosis and Frontotemporal Degeneration, 14:sup2, 120-136, DOI: 10.3109/21678421.2013.838419
- Chen, S., Townsend, K., Goldberg, T.E., Davies, P., Conejero-Goldberg, C., (2010), MAPT isoforms: differential transcriptional profiles related to 3R and 4R splice variants, *J Alzheimers Dis.*, 22(4):1313-29. DOI: 10.3233/JAD-2010-101155
- Clavaguera, F., Akatsu, H., Fraser, G., Crowther, R.A., Frank, S., Hench, J., Probst, A., Winkler, D.T., Reichwald, J., Staufenbiel, M., Ghetti, B., Goedert, M., Tolnay, M., 2013, Brain homogenates from human tauopathies induce tau inclusions in mouse brain, *Proc Natl Acad Sci USA*, 110(23), 9535-9540.
- Creemers, E.E., Tijssen, A.J., Pinto, Y.M., 2012, Circulating MicroRNAs Novel Biomarkers and Extracellular Communicators in Cardiovascular Disease?, *Circulation Research*, 110(3), 483-495.
- De Vos, A., Anandhakumar, J., Van den Brande, J., Verduyck, M., Franssens, V., Winderickx, J., Swinnen, E., 2011, Yeast as a Model System to Study Tau Biology, *Int J Alzheimers Dis.*, 2011, 428970.
- DeCicco, D., Zhu, H., Brureau, A., Schwaber, J.S., Vadigepalli, R., 2015, MicroRNA network changes in the brain stem underlie the development of hypertension, *Physiological Genomics*, 47(9), 388-399.
- Dickson, D.W., 1999, Neuropathologic differentiation of progressive supranuclear palsy and corticobasal degeneration, *J Neurol*, 246, Suppl 2:II6-15.
- Dimmeler, S., Nicotera, P., 2013, MicroRNAs in age-related diseases, *EMBO Mol Med.*, 5(2), 180-190.

- Drewes, G., Lichtenberg-Kraag, B., Döring, F., Mandelkow, E.M., Biernat, J., Goris, J., Doree, M., Mandelkow, E., 1992, Mitogen activated protein (MAP) kinase transforms tau protein into an Alzheimer-like state, *EMBO J.*, 11(6), 2131-2138.
- Esmaeli-Azad, B., McCarty J.H., Feinstein, S.C., 1994, Sense and antisense transfection analysis of tau function: tau influences net microtubule assembly, neurite outgrowth and neuritic stability, *Journal of Cell Science*, 107(Pt 4), 869-879.
- Espíndola, S.L., Damianich, A., Alvarez, R.J., Sartor, M., Belforte, J.E., Ferrario, J.E., Gallo, J.M., Avale, M.E., 2018, Modulation of Tau Isoforms Imbalance Precludes Tau Pathology and Cognitive Decline in a Mouse Model of Tauopathy, *Cell Rep.*, 23(3), 709-715.
- Frühbeis, C., Fröhlich D., Kuo W.P., Krämer-Albers, E.M., 2013, Extracellular vesicles as mediators of neuron–glia communication'. *Frontiers in Cellular Neuroscience, Front Cell Neurosci.*, 7:182.
- Goedert, M., Spillantini, M.G., Jakes, R., Rutherford, D., Crowther, R.A., 1989, Multiple isoforms of human microtubule associated protein tau: sequences and localization in neurofibrillary tangles of Alzheimer's disease, *Neuron*, 3(4), 519-526.
- Grimbergen, Y.A., Langston, J.W., Roos, R.A., Bloem, B.R., 2009, Postural instability in Parkinson's disease: the adrenergic hypothesis and *locus ceruleus*, *Expert Rev. Neurother.*, 9(2), 279-290.
- Hebert, S.S., Sergeant, N., Buee, L., 2012, MicroRNAs and the Regulation of Tau Metabolism, *International Journal of Alzheimer's Disease*, 2012, 40656.
- Hoglinger, G.U., Melhem, N.M., Dickson, D.W., et al., 2011, Identification of common variants influencing risk of the tauopathy progressive supranuclear palsy, *Nat Genet*, 43(7), 699-705.
- Houlden, H., Baker, M., Morris, H.R., et al., 2001, Corticobasal degeneration and progressive supranuclear palsy share a common tau haplotype, *Neurology*, 56(12), 1702-1706.
- Huin, V., Deramecourt, V., Caparros-Lefebvre, D., et al., 2016, The MAPT Gene Is Differentially Methylated in the Progressive Supranuclear Palsy Brain, *Movement Disorders*, 31(12), 1883-1890.
- Iqbal, K., Liu, F., Gong, C.X., Alonso A.C., Grundke-Iqbal, I., 2009, Mechanisms of tau-induced neurodegeneration, *Acta Neuropathol*, 118(1), 53–69.
- Keck, S., Nitsch, R., Grune, T., Ullrich, O., 2003, Proteasome inhibition by paired helical filament-tau in brains of patients with Alzheimer's disease, *J Neurochem*, 85(1), 115–122.
- Keller, A., Kirsten, J., Staehler, C.F., Backes, C., Leidinger, P., Meese, E., 2017, Diagnosis of neuromyelitis optica vs. multiple sclerosis using miRNA biomarkers, U.S. patent application publication, <http://www.freepatentsonline.com/y2017/0130269.html>

- Kolbert, C.P., Feddersen, R.M., Rakhshan, F., Grill, D.E., Simon, G., Middha, S., Jin, Sung Yang., Simon, V., Schultz, D.A., Zschunke, M., et al., 2013, Multi-Platform Analysis of microRNA Expression Measurements in RNA from Fresh Frozen and FFPE Tissues, *PLoS ONE*, 8(1), e52517.
- Kovacs, G.G., 2015, Invited review: Neuropathology of tauopathies: Principles and Practice, *Neuropathology and Applied Neurobiology*, 41, 3-23.
- Kovacs, G.G., Botond, G., Budka, H., 2010, Protein coding of neurodegenerative dementias: the neuropathological basis of biomarker diagnostics, *Acta Neuropathol*, 119(4), 389–408.
- Li, X-B., Wang, J., Xu, A-D., Huang, J-M., Meng, L-Q., Huang, R-Y., Wang, J-L., 2016, The microRNA-1268a rs28599926 polymorphism modified diffusely infiltrating astrocytoma risk and prognosis, *Int J Clin Exp Med.*, 9(11):21615-21624
- Li, Y., Xie, J., Xu, X., Wang, J., Ao, F., Wan, Y., Zhu, Y., 2013, MicroRNA-548 down-regulates host antiviral response via direct targeting of IFN-lambda1, *Protein Cell.*, 4, 130-141.
- Liu D.Z., 2014, *Human microRNA Profiling Studies in Whole Blood: Subtype Classification of Ischemic Stroke*, *Vascular Mechanisms in CNS Trauma*, In: Lo, E.H., Lok, J., Ning, M.M., Whalen, M.J., Chapter 26, Springer Science & Business Media, New York, 452-454.
- Long, X.D., Huang, X.Y., Yao, J.G., Liao, P., Tang, Y.J., Ma, Y. and Xia, Q., 2016, Polymorphisms in the precursor microRNAs and aflatoxin B1-related hepatocellular carcinoma, *Mol Carcinog.*, 55: 1060-1072.
- Myers, A.J., Pittman, A.M., Zhao, A.S., et al., 2007, The MAPT H1c risk haplotype is associated with increased expression of tau and especially of 4 repeat containing transcripts, *Neurobiol Dis.*, 25(3), 561- 570.
- Noble, W., Hanger, D.P., Miller, C.C., Lovestone, S., 2013, The importance of tau phosphorylation for neurodegenerative diseases, *Front Neurol*, 4, 83.
- Noël, A., Poitras, I., Julien, J., Petry, E.R., Morin, F., Charron, J., Planel, E., 2015, ERK (MAPK) does not phosphorylate tau under physiological conditions in vivo or in vitro, *Neurobiology of Aging*, 36(2), 901-902.
- Oddo, S., Billings, L., Kesslak, J.P., Cribbs, D.H., LaFerla, F.M., 2004, A $\beta$  immunotherapy leads to clearance of early, but not late, hyperphosphorylated tau aggregates via the proteasome, *Neuron*, 43(3), 321–332.
- Pamphlett, R., 2014, Uptake of environmental toxicants by the locus ceruleus: a potential trigger for neurodegenerative, demyelinating and psychiatric disorders, *Med Hypotheses*, 82(1), 97-104.

- Passamonti, L., Lansdall, C.J., Rowe, J.B., 2018, The neuroanatomical and neurochemical basis of apathy and impulsivity in frontotemporal lobar degeneration, *Current Opinion in Behavioral Sciences*, 22, 14-20.
- Pastor, P., Moreno, F., Clarimon, J., et al., 2016, MAPT H1 haplotype is associated with late-onset Alzheimer's disease risk in APOE $\epsilon$ 4 noncarriers: results from the Dementia Genetics Spanish Consortium, *J Alzheimers Dis.*, 49(2), 343-352.
- Piletič, K., Kunej, T., 2016, MicroRNA epigenetic signatures in human disease, *Archives of Toxicology*, 90(10), 2405-2419.
- Pittman, A.M., Fung, H.C., de Silva, R., 2006, Untangling the tau gene association with neurodegenerative disorders, *Human Molecular Genetics*, 15, Spec No 2:R188-95.
- Pittman, A.M., Myers, A.J., Abou-Sleiman P., et al., 2005, Linkage disequilibrium fine mapping and haplotype association analysis of the tau gene in progressive supranuclear palsy and corticobasal degeneration, *J Med Genet*, 42(11), 837-846.
- Poppek, D., Keck, S., Ermak, G., Jung, T., Stolzing, A., Ullrich, O., Davies, K.J., Grune, T., 2006, Phosphorylation inhibits turnover of the tau protein by the proteasome: influence of RCAN1 and oxidative stress, *Biochemical Journal*, 400(3), 511-520.
- Respondek, G., Roeber, S., Kretzschmar, H., Troakes, C., Al-Sarraj, S., Gelpi, E., Gaig, C., Chiu, W.Z., Van Swieten, J.C., Oertel, W.H., Heoglinger, G.U., 2013, Accuracy of the National Institute for Neurological Disorders and Stroke/Society for Progressive Supranuclear Palsy and Neuroprotection and Natural History in Parkinson Plus Syndromes Criteria for the Diagnosis of Progressive Supranuclear Palsy, *Movement Disorders*, 28 (4).
- Ridder K., Keller, S., Dams, M., Rupp, A.K., Schlaudraff, J., ve diğ., 2014, Extracellular Vesicle-Mediated Transfer of Genetic Information between the Hematopoietic System and the Brain in Response to Inflammation, *PLoS Biology*, 12(6), e1001874.
- Rydbirk, R., Folke, J., Winge, K., Aznar, S., Pakkenberg, B., Brudek, t., 2016, Assessment of brain reference genes for RT-qPCR studies in neurodegenerative diseases, *Scientific Reports*, 6, Article number: 37116
- Shivakumar, M., Lee, Y., Bang, L., Garg, T., Sohn, K.A., ve Kim, D., 2017, Identification of epigenetic interactions between miRNA and DNA methylation associated with gene expression as potential prognostic markers in bladder cancer, *BMC Med Genomics*, 10(1):30, 65-75
- Smith, P.Y., Delay, C., Girard, J., et al., 2011, MicroRNA-132 loss is associated with tau exon 10 inclusion in progressive supranuclear palsy, *Human Molecular Genetics*, 20(20), 4016-4024.
- Spillantini, M.G., Goedert, M., 2013, Tau pathology and neurodegeneration, *Lancet Neurol*, 12(6), 609-622.

- Stamelou, M., Silva, R., Arias-Carrión, O., Boura, E., Höllerhage, M., Oertel, W.H., Müller, U., Höglinger, G.U., 2010, Rational therapeutic approaches to progressive supranuclear palsy, *Brain*, 133(6), 1578-90.
- Steele, J.C., Richardson, J.C., Olszewski, J., 1964, Progressive supranuclear palsy, *Arch Neurol*, 10, 333-359.
- Sun, Ah Park, Sang, II Ahn, Gallo, J., 2016, Tau mis-splicing in the pathogenesis of neurodegenerative disorders, *BMB Rep.*, 49(8), 405-413.
- Sun, Young Im, Young, Eun Kim, Yun, Joong Kim, 2015, Genetics of Progressive Supranuclear Palsy, *J Mov Disord.*, 8(3), 122-129.
- UltraView Universal DAB Detection Kit: [www.inseonmedics.co.kr/bbs/download.php?bo2.%20ultraView%20DAB%20Detection%20Kit%20package%20inserts%20\(2\).pdf](http://www.inseonmedics.co.kr/bbs/download.php?bo2.%20ultraView%20DAB%20Detection%20Kit%20package%20inserts%20(2).pdf)
- Valadi, H., Ekström K., Bossios A., Sjöstrand M., Lee, J.J., Lötvall J.O., 2007, Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells, *Nature Cell Biology*, 9(6), 654-659.
- Villemagne, V.L., Dore, V., Bourgeat, P., Burnham, S.C., Laws, S., Salvado, O., Masters, C.L., Rowe, C.C., 2017, Aβ-amyloid and Tau Imaging in Dementia, *Semin Nucl Med.*, 47(1), 75-88.
- Wee, M., Chegini, F., Power, J.H.T., Majd, S., 2018, Tau Positive Neurons Show Marked Mitochondrial Loss and Nuclear Degradation in Alzheimer's Disease, *Current Alzheimer Research*, DOI:10.2174/1567205015666180613115644.
- Wen, W., He, Z., Jing, Q., Hu, Y., Lin, C., Zhou, R., Wang, X., Su, Y., Yuan, J., Chen, Z., Yuan, J., Wu, J., Li, J., Zhu, X., Li, M., 2015, Cellular microRNA-miR-548g-3p modulates the replication of dengue virus, *J Infect.*, 70, 631-640.
- Williams, D.R., Lees, A.J., 2009, Progressive supranuclear palsy: clinicopathological concepts and diagnostic challenges, *Lancet Neurol*, 8, 270–9.
- Yagishita, S., Itoh, Y., Amano, N., Nakano, T., Saitoh, A., 1979, Ultrastructure of Neurofibrillary Tangles in Progressive Supranuclear Palsy, *Acta Neuropathol.*, 48(1), 27-30.
- Yu, K., Li, Q., Cheng, Q., Huang, C., Zheng, J., Chen, S., Ling, Q., Zhu, M., Chen, M., Shi, G., Li, N., 2017, MicroRNA-548j inhibits type I interferon production by targeting ZBTB11 in patients with chronic hepatitis B, *Biochem Biophys Res Commun.*, 488(4):628-633.
- Zhang, C., Lu, J., Liu, B., Cui, Q., and Wang, Y., 2016, Primate-specific miR-603 is implicated in the risk and pathogenesis of Alzheimer's disease, *Aging (Albany NY)*, 8(2): 272–290.

**EKLER****EK 1. İ.Ü.İTF Klinik Araştırmalar Etik Kurulu Raporu, Sayı:554, 3sayfa**

	<p style="text-align: center;">T.C. İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU</p>	
Sayı : 554		Tarih : 05.03.2015
Konu : Doç.Dr.Bedia PALABIYIK		
Doç.Dr.Bedia PALABIYIK Fen Fakültesi		
İlgi :Fen Fakültesinin 17/02/2015 gün ve 50774 sayılı yazısı		
<p>Sorumlu araştırmacılığını üstlendiğiniz ve Derya ÖZCİĞER'in yürüttüğü 2015496 dosya numaralı "İlerleyici Supranükleer Felç'li İnsan Beyin Dokularında mikroRNA Analizim Profillerinin Çıkarılması" başlıklı çalışma kurulumuzun 27/02/2015 tarih ve 04 sayılı toplantısında görüşülerek etik yönden uygun bulunmuş olup, tutanaklar ekte sunulmuştur.</p>		
Bilgilerinizi rica ederim.		
 Prof.Dr. A. Yağcı ÜRESİN İstanbul Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurul Başkanı		
Eki: İstanbul Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu Karar Formu		

## EK 1. (devam): İ.Ü.İTF Klinik Araştırmalar Etik Kurulu Raporu, Sayı:554, 3sayfa

İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALARI ETİK KURULU KARAR FORMU				
ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI		"İlerleyici Supranükleer Felç'li İnsan Beyin Dokularında mikroRNA Anlatım Profillerinin Çıkarılması"		
DEĞERLENDİRİLEN BELGELERİN DURUMU	Belge Adı	Tarihi	Versiyon Numarası	Dil
	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ	18/02/2013		Türkçe <input checked="" type="checkbox"/> İngilizce <input type="checkbox"/> Diğer <input type="checkbox"/>
	BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU*	<input checked="" type="checkbox"/>		Türkçe <input checked="" type="checkbox"/> İngilizce <input type="checkbox"/> Diğer <input type="checkbox"/>
	İLGİLİ RAPOR FORMU	<input type="checkbox"/>		Türkçe <input type="checkbox"/> İngilizce <input type="checkbox"/> Diğer <input type="checkbox"/>
	ARAŞTIRMA DEĞERİ	<input type="checkbox"/>		Türkçe <input type="checkbox"/> İngilizce <input type="checkbox"/> Diğer <input type="checkbox"/>
DEĞERLENDİRİLEN DİĞER BELGELER	Belge Adı	<input type="checkbox"/>	Açıklama	
	TÜRKÇE ETİKET ÖRNEĞİ	<input type="checkbox"/>		
	SİGORTA	<input type="checkbox"/>		
	ARAŞTIRMA BÜTÇESİ	<input checked="" type="checkbox"/>		
	BİYOLOJİK MATERYEL TRANSFER FORMU	<input type="checkbox"/>		
	HASTA KARTI/GÖNÜLLÜKLERİ	<input type="checkbox"/>		
	ILAN	<input type="checkbox"/>		
	YILLIK BİLDİRİM	<input type="checkbox"/>		
	SONUÇ RAPORU	<input type="checkbox"/>		
	GÜVENLİLİK BİLDİRİMLERİ	<input type="checkbox"/>		
DİĞER:	<input checked="" type="checkbox"/>	Araştırma Etik Başvurusundan Üst Yürütme Akademik Kurul Kararı, Literatür Kaynağı, Sorumluluk Paylaşım Belgesi, Olgu Rapor Formu, İlgili Elementlerin Bilgilendirilmesine Dair Belge, CV, CD		
KARAR BELGELERİ	Karar No:94	Tarihi: 27/03/2015		

İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALARI ETİK KURULU						
ÇALIŞMA ESASI		19.08.2011 tarihli, 28030 sayılı Resmî Gazetede yayımlanan Klinik Araştırmalar Hakkındaki Yönetmelik				
BAŞKANIN UNVANI / ADI / SOYADI		Prof. Dr. A. Yağcı ÖRESİN				
Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kararına	Cinsiyet	Araştırma ile ilgili *	Katılım **	İmza
Prof. Dr. A. Yağcı ÖRESİN	Farmakoloji ve Klinik Farmakoloji	İstanbul Tıp Fakültesi Etik Kurul Başkanı	E <input checked="" type="checkbox"/> K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> İ <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> İ <input checked="" type="checkbox"/>	
Prof. Dr. Berrin UMMAN	Kardiyoloji	İstanbul Tıp Fakültesi Etik Kurul Başkanı Yardımcısı	E <input type="checkbox"/> K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> İ <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/> İ <input type="checkbox"/>	
Prof. Dr. Ahmet GÜL	Röntgenoloji	İstanbul Tıp Fakültesi	E <input checked="" type="checkbox"/> K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> İ <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> İ <input checked="" type="checkbox"/>	
Prof. Dr. Oğuzhan ÇOBAN	Nöroloji	İstanbul Tıp Fakültesi	E <input checked="" type="checkbox"/> K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> İ <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/> İ <input type="checkbox"/>	
Dr. Servda ÖZEL YILDIZ	Biyostatistik	İ.Ü. İstanbul Tıp Fakültesi Biyostatistik	E <input type="checkbox"/> K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> İ <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/> İ <input type="checkbox"/>	

\* - Araştırma ile ilgili  
\*\* - Toplantıda bulunma

İ.Ü. İstanbul Tıp Fakültesi Klinik araştırmalar Etik Kurulu (13.04.2013 tarih, 28617 sayılı Resmî Gazetede yayımlanan Klinik Araştırmalar Hakkında Yönetmelik çerçevesinde kurulmuş ve T.C. Sağlık Bakanlığı Türkiye Hec ve Tıbbi Cihaz Kurumu tarafından onaylanmıştır. İlgili yönetmeliğin kapsamında kalan araştırmalar Sağlık Bakanlığından izin almak zorundadır. Yönetmeliğin kapsamı dışında kalan araştırmalar ise Etik Kurul bünyesinde değerlendirilerek 5 yıllık süre boyunca kuruludan değerlendirilerek olup Sağlık Bakanlığına tıbbi değildir.



## EK 1. (devam): İ.Ü.İTF Klinik Araştırmalar Etik Kurulu Raporu, Sayı:554, 3sayfa

## İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALARI ETİK KURULU KARAR FORMU

ETİK KURULU BİLGİLERİ	ETİK KURULUN ADI	İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALARI ETİK KURULU
	AÇIK ADRESİ	İ.Ü.İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ HULUSİ BEHÇET KÜTÜPHANESİ KAT:3 FATİH/İSTANBUL
	TELEFON	0 (212) 414 21 53
	FAKS	0 (212) 414 21 53
	E-POSTA	itifetikkurul@istanbul.edu.tr.

BAŞVURU BİLGİLERİ	ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	"İlerleyici Supranükleer Felç'li İnsan Beyin Dokularında mikroRNA Anlatım Profillerinin Çıkarılması"			
	ARAŞTIRMA PROTOKOL KODU	---			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACI UNVANI/ADI/SOYADI	Doç.Dr.Bedia PALABIYIK			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ UZMANLIK ALANI	Moleküler Biyoloji ve Genetik			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ BULUNDUĞU MERKEZ	İstanbul Üniversitesi Fen Fakültesi			
	DESTEKLEYİCİ	İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Birimi			
	DESTEKLEYİCİNİN YASAL TEMSİLCİSİ	---			
	ARAŞTIRMANIN FAZI	FAZ 1	<input type="checkbox"/>		
		FAZ 2	<input type="checkbox"/>		
		FAZ 3	<input type="checkbox"/>		
FAZ 4		<input type="checkbox"/>			
ARAŞTIRMANIN TÜRÜ	Yeni Bir Entegrasyon	<input type="checkbox"/>			
	Yüksek Doz Araştırması	<input type="checkbox"/>			
ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	Diğer ise belirtiniz :				
	TEK MERKEZ	ÇOK MERKEZLİ	ULUSAL	ULUSLAR ARASI	
	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	

## ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler	
Adı Soyadı	Derya ÖZCİĞER
Doğum Yeri	Kıbrıs
Doğum Tarihi	15.09.1981
Uyruğu	<input checked="" type="checkbox"/> T.C. <input type="checkbox"/> Diğer:
Telefon	05454056045
E-Posta Adresi	<a href="mailto:deryadata@yahoo.com.tr">deryadata@yahoo.com.tr</a>
Web Adresi	-

Eğitim Bilgileri	
Lisans	
Üniversite	Marmara Üniversitesi
Fakülte	Fen Edebiyat Fakültesi
Bölümü	Biyoloji
Mezuniyet Yılı	12.06.2004

Yüksek Lisans	
Üniversite	Nottingham Trent University
Enstitü Adı	School of Science and Technology
Anabilim Dalı	Bioscience
Programı	Biotechnology

Doktora	
Üniversite	İstanbul Üniversitesi
Enstitü Adı	Fen Bilimleri Enstitüsü
Anabilim Dalı	Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı
Programı	Moleküler Biyoloji ve Genetik Programı

Makale ve Bildiriler	
<b>Uluslararası Poster Bildirileri:</b>	
<p>1) K. Yararbas<sup>1,2</sup>, C. Sayar<sup>2</sup>, D. Ozciger<sup>2</sup>, S. Tumer<sup>2</sup>, C. Tavukcu<sup>2</sup>, N. Oncu<sup>2</sup>, Y. Alanay<sup>1</sup>. Possible Effect of IGFR1 Gene On Macrocephaly In a Patient With Unbalanced 6;15 Translocation With 6p25 Deletion And 15q26 Duplication. European Meeting on Psychosocial Aspects of Genetics, ESHG 2018 (Milan, Italy, June 16-19, 2018)</p>	
<p>2) Kanay Yararbas<sup>1</sup>, Ceyhan Sayar<sup>2</sup>, Derya Ozciger<sup>2</sup>, Sait Tumer<sup>2</sup>, Cemre Tavukcu<sup>2</sup>, Nihal Oncu<sup>2</sup>, Cumhur Ekmekci<sup>2</sup>, Aysegul Kuskucu<sup>3</sup>, Yasemin Alanay<sup>1</sup>. Mosaic Turner syndrome with complex karyotype and mild Kabuki-like phenotype. 11th European Cytogenetics Conference 2017 (Florence, Italy, July 1 - 4, 2017)</p>	

**Ulusal Bildiriler:**

- 1) Ender Altıok, Şirin Yüksel, Fulya Taylan, Ceyhan Sayar, Güven Yenmiş, Deniz Çınar, Derya Özciğer, Zuhale Erdil, Aysel Şebboy. Moleküler hematolojide dış kalite kontrollerin değeri. 35. Ulusal Hematoloji Kongresi, Antalya (7-10 Ekim 2009). Bildiri özetleri kitabı. Sayfa.100.
- 2) Şirin Yüksel, Fulya Taylan, Güven Yenmiş, Deniz Çınar, Derya Özciğer, Zuhale Erdil, Ceyhan Sayar, Ender Altıok. Moleküler Genetik Tanıda Kalite Yönetimi. Endokrin Hastalıklar ve Genetik Sempozyumu, Abant (8-10 Ekim 2009).
- 3) Şirin Yüksel, Fulya Taylan, Güven Yenmiş, Deniz Çınar, Derya Özciğer, Zuhale Erdil, Ceyhan Sayar, Ender Altıok. Osteogenesis imperfekta hastalığından sorumlu yeni mutasyonların tanımlanması ve koruyucu genetik tanıları. Endokrin Hastalıklar ve Genetik Sempozyumu, Abant (8-10 Ekim 2009).
- 4) Güven Yenmiş, Şirin Yüksel, Fulya Taylan, Deniz Çınar, Derya Özciğer, Ender Altıok. Kronik Myeloproliferatif Hastalıklarda JAK2-V617F mutasyonu oranlarındaki farklılıklar. 35. Ulusal Hematoloji Kongresi, Antalya (7-10 Ekim 2009). Bildiri özetleri kitabı. Sayfa.57.