

**T.C.**  
**MERSİN ÜNİVERSİTESİ**  
**SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**  
**TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**ALZHEİMER HASTASI BİREYLERDE**  
**BAZI MİKRORNA'LARIN EKSPRESYONLARININ**  
**ARAŞTIRILMASI**

Arş. Gör. Mehmet Tuğhan KIZILTUĞ  
YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN  
Prof. Dr. Mehmet Emin ERDAL

MERSİN – 2016

T.C.  
MERSİN ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**ALZHEİMER HASTASI BİREYLERDE  
BAZI MİKRORNA'LARIN EKSPRESYONLARININ  
ARAŞTIRILMASI**

Arş. Gör. Mehmet Tuğhan KIZILTUĞ  
YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN  
Prof. Dr. Mehmet Emin ERDAL

Bu tez, Mersin Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından  
2015-TP2-1195 kodlu proje olarak desteklenmiştir.


Tez No: 304


MERSİN – 2016


## Mersin Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi Programı çerçevesinde yürütülmüş olan “Alzheimer Hastası Bireylerde Bazı MikroRNA’ların Ekspresyonlarının Araştırılması” adlı çalışma, aşağıdaki jüri tarafından Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi 15/07/2016

  
Prof. Dr. Mehmet Emin ERDAL  
Jüri Başkanı

  
Prof. Dr. İbrahim Ömer BARLAS  
Jüri Üyesi

  
Yrd. Doç. Dr. Şenay GÖRÜCÜ YILMAZ  
Jüri Üyesi

Bu tez, Enstitü Yönetim Kurulunun...18.07.2016...tarih ve 2016/234 sayılı kararı ile kabul edilmiştir.



## TEŞEKKÜR

Mersin Üniversitesi'nde göreve başladığımdan itibaren desteğini benden esirgemeyen, bilgi ve deneyimlerini paylaşarak bilgi birikimimi artıran, her türlü problemimde yanımda olarak zorluklarla başa çıkmamda bana yardımcı olan ve bundan sonraki tüm eğitimlerimde ve çalışmalarım da beraber olmayı arzu ettiğim, gelecekte de birlikte yapacağımız çalışmalarla birçok başarıya imza atacağımıza inandığım saygıdeğer danışman hocam Sn. Prof. Dr. Mehmet Emin ERDAL'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Yüksek eğitimimin tamamlanmasında yardımcı olan değerli hocalarım Sn. Prof. Dr. İ. Ömer BARLAS'a, Sn. Prof. Dr. Nurcan ARAS'a, Sn. Prof. Dr. Etem AKBAŞ'a Sn. Doç. Dr. Özlem İZCİ AY'a ve Sn. Yrd. Doç. Dr. M. Ertan AY'a, teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmamdaki kan örneklerinin toplanmasında yardımcı olan MEÜTF Nöroloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Sn. Prof. Dr. Aynur ÖZGE'ye, Sn. Dr. Hamit GENÇ'e ve Gaziantep Üniversitesi Beslenme ve Diyetetik Bölümü Öğretim Üyesi Sn. Yrd. Doç. Dr. Şenay Görücü YILMAZ'a ve tüm hastane çalışanlarına teşekkürü bir borç bilirim.

Tezimin istatistiksel analizlerinin yapılmasında MEÜTF Biyoistatistik ve Tıbbi Bilişim Anabilim Dalı'ndan Sn. Prof. Dr. Bahar TAŞDELEN'e ve Sn. Arş. Gör. Merve TÜRKEGÜN'e yardımlarından dolayı teşekkür ederim.

Eğitimlerim boyunca benimle beraber her türlü sıkıntıyı yaşayan, maddi ve manevi destek konusunda bir kez bile tereddüt yaşamayan değerli annem, babam ve ablama sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Eğitimimde her zaman bir adım önde olamamı sağlayan Türk Eğitim Vakfı'na, desteklerini benden esirgemeyen Ankara Şube Başkanı Sn. Ömer TURNA'ya ve bana bir abla sıcaklığıyla yaklaşan Sn. Ebru SEKİZKÖK'e minnettarlığımı bildirir, sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

# İÇİNDEKİLER

	Sayfa
<b>KABUL ONAY</b> .....	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.
<b>TEŞEKKÜR</b> .....	ii
<b>İÇİNDEKİLER</b> .....	iii
<b>ŞEKİLLER DİZİNİ</b> .....	v
<b>ÇİZELGELER DİZİNİ</b> .....	vii
<b>SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ</b> .....	viii
<b>ÖZET</b> .....	x
<b>ABSTRACT</b> .....	xi
<b>1. GİRİŞ</b> .....	1
<b>2. GENEL BİLGİLER</b> .....	3
2.1. Alzheimer Hastalığı .....	3
2.1.1. Alzheimer Hastalığının Tanımı .....	3
2.1.2. Alzheimer Hastalığının Tarihçesi .....	4
2.1.3. Alzheimer Hastalığının Tanı Kriterleri .....	5
2.1.4. Alzheimer Hastalığının Prevalansı ve İnsidansı .....	5
2.1.5. Alzheimer Hastalığının Risk Faktörleri .....	6
2.1.5.1. Değiştirilebilir Risk Faktörleri .....	6
2.1.5.2. Değiştirilemeyen Risk Faktörleri .....	7
2.1.6. Alzheimer Hastalığının Moleküler Nörobiyolojisi .....	8
2.1.6.1. Nörotik Plaklar ve Amiloid Beta Prekürsör Protein .....	9
2.1.6.2. Nörofibriler Yumaklar ve Tau .....	14
2.2. MikroRNA'lar .....	18
2.2.1. MikroRNA'ların Keşfi .....	18
2.2.2. MikroRNA'ların İsimlendirilmesi .....	19
2.2.3. MikroRNA'ların Genomik Lokasyonu .....	20
2.2.4. MikroRNA'ların Biyogenezi .....	22
2.2.4.1. Klasik miRNA Biyogenezi .....	22
2.2.4.2. Klasik Olmayan miRNA Biyogenezi .....	25
2.2.5. MikroRNA'lar Tarafından Gen Regülasyonu .....	26

2.2.6. Alzheimer Hastalığında MikroRNA'ların Önemi .....	27
2.2.7. Alzheimer Hastalığı ve Dolaşımdaki MikroRNA'ların Olası Biyobelirteçler Olarak Kullanılması .....	29
<b>3. GEREÇ ve YÖNTEM .....</b>	<b>31</b>
3.1. Çalışma Grubu .....	31
3.2. Gereçler.....	31
3.2.1. Cihazlar .....	31
3.2.2. Sarf ve Kimyasal Malzemeler.....	32
3.3. Periferik kandan RNA İzolasyonu .....	32
3.4. miRNA'ların Biyoinformatik Araçlarla Hedef Gen Analizleri .....	33
3.5. Real-Time PCR ile MikroRNA Ekspresyon Analizine Yönelik Primer ve Prob Dizayını.....	34
3.6. Real-Time PCR ile Ekspresyon Analizi .....	38
3.6.1. cDNA Eldesi .....	38
3.6.2. PCR Ürünlerinin Saptanması.....	38
3.6.3. Veri Analizi.....	39
3.7. İstatistiksel Analiz.....	40
<b>4. BULGULAR.....</b>	<b>41</b>
4.1. Kontrol ve Hasta Gruplarının Yaş ve Cinsiyet Bakımından Değerlendirilmesi..	41
4.1.1. Hasta Grubu .....	41
4.1.2. Kontrol Grubu.....	42
4.2. Ekspresyon Ölçümlerinin Veri Analizi.....	43
4.2.1. hsa-miR-132-3p Ekspresyonunun Değerlendirilmesi.....	45
4.2.2. hsa-miR-186-5p Ekspresyonunun Değerlendirilmesi.....	46
4.2.3. hsa-miR-195-5p Ekspresyonunun Değerlendirilmesi.....	47
4.2.4. hsa-miR-219a-5p Ekspresyonunun Değerlendirilmesi.....	47
4.2.5. hsa-miR-3163 Ekspresyonunun Değerlendirilmesi .....	48
4.2.6. hsa-miR-3613-3p Ekspresyonunun Değerlendirilmesi.....	49
<b>5. TARTIŞMA.....</b>	<b>50</b>
<b>6. SONUÇLAR ve ÖNERİLER.....</b>	<b>57</b>
<b>7. KAYNAKLAR .....</b>	<b>59</b>
<b>8. ÖZGEÇMİŞ .....</b>	<b>69</b>

## ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa
Şekil 2.1. Alzheimer hastalarının beyinlerinde gözlenen patolojik değişimler.....	9
Şekil 2.2. APP geninin yapısı .....	10
Şekil 2.3. APP protein yapısı.....	11
Şekil 2.4. Güncellenmiş protein veri bankası dayanan amiloid prekürsör protein (APP)'in tahmini üç-boyutlu yapısı ve olası görevleri .....	12
Şekil 2.5. APP'nin işlenmesi .....	13
Şekil 2.6. A $\beta$ 'nın seviyesi çevresel faktörler ya da genetik arkaplan nedeniyle değişimi.....	14
Şekil 2.7. İnsan tau geni, tau primer transkripti ve altı adet santral sinir sistemi tau izoformlarının şematik gösterimi.....	15
Şekil 2.8. 441 amino asidlik en uzun tau izoformunun fonksiyonel domainlerinin şematik gösterimi.....	16
Şekil 2.9. Tau-aracılı nörodejenerasyon .....	17
Şekil 2.10. MikroRNA'ların genomik lokasyonu ve yapısı .....	21
Şekil 2.11. Mirtron ve Karma miRNA'nın genomik lokalizasyonu.....	22
Şekil 2.12. Mikroişlemci kompleksin, pri-miRNA'nın tek zincirli RNA kuyruklarını, ~35 bp'lik kökü ve terminal ilmeği tanınması.....	23
Şekil 2.13. Klasik yol miRNA biyogenezi .....	24
Şekil 2.14. miRNA-mRNA interaksiyonu.....	25
Şekil 3.1. Pre-miRNA dizileri üzerine yerleşik olgun miRNA dizileri.....	35
Şekil 3.2. Endojen kontrol hsa-miR-26b-5p ekspresyon eğrisi .....	39
Şekil 4.1. Kontrol ve hasta gruplarına ait hsa-miR-132-3p, hsa-miR-186-5p, hsa-miR-195-5p, hsa-miR-219a-5p, hsa-miR-3163 ve hsa-miR-3613-3p'nin ekspresyon düzeylerinin veri grafikleri. ....	45
Şekil 4.2. Kontrol ve hasta grubunda hsa-miR-132-3p'ye ait ekspresyon düzey grafiği.....	46
Şekil 4.3. Kontrol ve hasta grubunda hsa-miR-186-5p'ye ait ekspresyon düzey grafiği.....	46

<b>Şekil 4.4.</b> Kontrol ve hasta grubunda hsa-miR-195-5p'ye ait ekspresyon düzey grafiği.....	47
<b>Şekil 4.5.</b> Kontrol ve hasta grubunda hsa-miR-219a-5p'ye ait ekspresyon düzey grafiği.....	48
<b>Şekil 4.6.</b> Kontrol ve hasta grubunda hsa-miR-3163'e ait ekspresyon düzey grafiği. ...	48
<b>Şekil 4.7.</b> Kontrol ve hasta grubunda hsa-miR-3613-3p'e ait ekspresyon düzey grafiği.....	49





## ÇİZELGELER DİZİNİ

	<b>Sayfa</b>
<b>Çizelge 3.1.</b> AH'de öngörülen miRNA'lar, hedef genler ve eşleşme skorları .....	33
<b>Çizelge 3.2.</b> miRNA RT-PCR ve Real-Time PCR primer-prob dizileri. ....	37
<b>Çizelge 4.1.</b> Kontrol ve hasta gruplarındaki kadın ve erkeklerin yaş ortalaması. ....	41
<b>Çizelge 4.2.</b> Kontrol ve hasta gruplarına ait yaş ortalamalarının değerlendirilmesi .....	42
<b>Çizelge 4.3.</b> Kontrol ve hasta gruplarına ait yaş ortalamalarının cinsiyet açısından değerlendirilmesi .....	42
<b>Çizelge 4.4.</b> Kontrol ve hasta gruplarının cinsiyet bakımından değerlendirilmesi .....	43
<b>Çizelge 4.5.</b> Kontrol ve hasta gruplarına göre ilgili miRNA'ların ekspresyon düzeyleri, minimum, maksimum ve p değerleri .....	44

## SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

<b>3'UTR</b>	: 3'Kodlanmayan Bölge,
<b>5'UTR</b>	: 5'Kodlanmayan Bölge,
<b><math>\alpha</math></b>	: Alfa
<b>A<math>\beta</math></b>	: Amiloid Beta
<b>ABD</b>	: Amerika Birleşik Devletleri
<b>AH</b>	: Alzheimer Hastalığı
<b>APOE</b>	: Apolipoprotein E
<b>APP</b>	: Amiloid $\beta$ Prekürsör Protein
<b><math>\beta</math></b>	: Beta
<b>BACE1</b>	: Beta Sekretaz 1
<b>BDNF</b>	: Beyin-türevli nörotrofik faktör
<b>BOS</b>	: Beyin Omirilik Sıvısı
<b>CREB</b>	: cAMP yanıt elemanına bağlanan protein 1
<b>DGCR8</b>	: DiGeorge Sendrom Kritik Bölge Gen 8
<b>DM</b>	: Diabetes Mellitus
<b>DSM-IV</b>	: Diagnostic and Statistic Manual of Mental Disorders, Fourth Edition (Zihinsel Hastalıkların Tanısal ve İstatistiksel El Kitabı 4. Baskı)
<b>EBAH</b>	: Erken Başlangıçlı Alzheimer Hastalığı
<b>EDTA</b>	: Etilendiamin Tetraasetik Asit
<b>EP300</b>	: E1A Bağlanma Proteini P300
<b>FOXO1a</b>	: Forkhead Box O1a
<b>FOXO3a</b>	: Forkhead Box O3a
<b>ICD-10</b>	: Uluslararası Hastalık Sınıflandırması 10 (International Classification of Disease 10)
<b>GBAH</b>	: Geç Başlangıçlı Alzheimer Hastalığı
<b>GSK3B</b>	: Glikojen Sentaz Kinaz-3-Beta
<b>KBH</b>	: Kronik Beyin Hipoperfüzyon
<b>MAP</b>	: Mikrotübül Asosiye Proteinler
<b>MAPT</b>	: Mikrotübül Asosiye Protein Tau

<b>miRNA</b>	: MikroRNA
<b>NFY</b>	: Nörofibriler Yumaklar
<b>NINCDS-ADRDA</b>	: National Institute of Neurological and Communicative Disorders and Stroke and Alzheimer's Disease and Related Disorders Association (Nörolojik ve İletişimsel Hastalıklar ve İnme/Alzheimer hastalığı ve İlişkili Hastalık Bağlantıları Enstitüsü)
<b>nt</b>	: Nükleotid
<b>PACT</b>	: PKR Protein Aktivatörü
<b>PAZ</b>	: Piwi-Argonaute-Zwille Domain
<b>PSEN-1</b>	: Presenilin-1
<b>PSEN2</b>	: Presenilin-2
<b>RNA PolIII</b>	: RNA Polimeraz II
<b>RISC</b>	: RNA-İndüklenmiş Susturucu Kompleks
<b>SIRT1</b>	: Sirtuin 1
<b>SORLA</b>	: Sorting Protein-Related Receptor with A-Type Repeats
<b>TRBP</b>	: Transaktivasyon-Yanıt RNA-Bağlayıcı Protein

## ÖZET

### Alzheimer Hastası Bireylerde Bazı Mikrorna'ların Ekspresyonlarının Araştırılması

Progresif nörodejeneratif bir bozukluk olan Alzheimer hastalığı (AH), yaşlılarda görülen en yaygın demanslardan biridir. AH, patolojik olarak ekstrasellüler amiloid plak birikimi, nörofibriler yumaklar, sinaps ve nöronal kayıplarla karakterizedir. Son yıllarda, artan raporlar mikroRNA (miRNA)'lar ve AH arasında direkt bir ilişkinin olduğunu göstermiştir. miRNA'lar, yaklaşık 22 nükleotit uzunluğunda olan tek zincirli RNA'lardır. Hedef mRNA'ların 3'UTR'siyle kısmi eşleşen bazlarla post-transkripsiyonel gen susturulmasında kılavuz bir molekül olarak işlev gösterirler. Hücre proliferasyonu, bölünmesi, farklılaşması, apoptoz, protein salgılanması ve doku gelişimi gibi çeşitli yollarda önemli rol oynarlar. Bu çalışmada, AH patogenezine yol açan genleri hedefleyen aday 6 miRNA'nın (hsa-miR-132-3p, hsa-miR-186-5p, hsa-miR-195-5p, hsa-miR-219a-5p, hsa-miR-3163 ve hsa-miR-3613-3p) ekspresyon seviyeleri, AH hasta (n=84) ve sağlıklı bireylerin (n=67) kan örneklerinde belirlendi. Kan örnekleri, etik hususlar göz önüne alınarak Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Nöroloji Anabilim Dalı'ndan elde edildi. Seçilen miRNA'lar, Real-time PCR'da karşılaştırmalı Ct yöntemi kullanılarak analiz edildi. Moleküler analizden elde edilen veriler Ki-kare testi, Shapiro-Wilk testi, Student t-testi, Mann-Whitney U testi ve Benjamini-Hochberg düzeltmesi kullanılarak istatistiksel olarak değerlendirildi. Değerlendirme sonucunda, kontrollerle karşılaştırıldığında AH'de hsa-miR-3163 ve hsa-miR-3613-3p'nin ekspresyonunun anlamlı bir biçimde arttığı, buna karşın hsa-miR-186-5p'nin ekspresyonunun ise önemli derecede azaldığı edildiği tespit edildi (p<0,05). Sonuç olarak bu bulgular, hsa-miR-186-5p, hsa-miR-3163 ve hsa-miR-3613-3p'nin AH nörodejenerasyonuna katkı sağlayabildiğini göstermiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Alzheimer hastalığı, miRNA, ekspresyon.

## ABSTRACT

### Investigation of Expression of Certain miRNAs in Patients with Alzheimer's Disease

Alzheimer's disease (AD) that is a progressive neurodegenerative disorder is the most common dementia among the elderly. It is pathologically characterized by extracellular amyloid plaques deposition, neurofibrillary tangles, synapse and neuronal loss. Recently, accumulating cases have demonstrated a direct link between microRNAs (miRNAs) and AD. miRNAs are single-stranded RNAs in approximately 22 nucleotides in length. They function as a guide molecule in post-transcriptional gene silencing by partially bases pairing with the 3'UTR of target mRNAs. They play important roles in several pathways such as cell proliferation, cell division, cell differentiation, apoptosis, protein secretion and tissue development. In this study, the expression levels of 6 candidate miRNAs (hsa-miR-132-3p, hsa-miR-186-5p, hsa-miR-195-5p, hsa-miR-219a-5p, hsa-miR-3163 and hsa-miR-3613-3p) targeted genes leading to AD pathogenesis in blood samples of AD patients (n=84) and controls (n=67) were determined. The samples by taking ethical statements into consideration were obtained from the Department of Neurology, Mersin University Faculty of Medicine. Selected miRNAs were analyzed by using comparative  $C_T$  method in Real-Time PCR. Data obtained from molecular analyze were statistically evaluated by using Chi-squared test, Shapiro–Wilk test, Student's t-test, Mann-Whitney U test and Benjamini-Hochberg correction. As a result of evaluation, it was identified that hsa-miR-3163 and hsa-miR-3613-3p were significantly upregulated in AD patients, while hsa-miR-186-5p were markedly downregulated in AD patients compared to controls ( $p<0,05$ ). In conclusion, these data indicate that hsa-miR-186-5p, hsa-miR-3163 ve hsa-miR-3613-3p may contribute to AD neurodegeneration.

**Key words:** Alzheimer's disease, miRNA, expression.

# 1. GİRİŞ

Nörodejeneratif hastalıklar, sinir sisteminin seçili bölgelerindeki nöron kaybıyla ilişkili ilerleyici nörolojik disfonksiyon ile karakterizedir (1). Bu hastalıklardan en sık görüleni Alzheimer hastalığı (AH)'dır. Endüstrileşmiş dünyadaki en ciddi sağlık problemlerinden biri olan AH, çoğunlukla yaşa-bağlı bunamanın en yaygın formudur (2). AH, ilerleyici, sinsi ve günümüzde tedavisi mümkün olmayan bir nörodejeneratif hastalıktır. Şu anda dünyada 24 milyon insan bu hastalıktan muzdariptir (3). 2050 yılına kadar, her 85 kişiden birinin bu hastalığa yakalanabileceği tahmin edilmektedir (4). AH insidansı, 65 yaş ve üstü bireylerde yaklaşık %13 ve 85 yaş ve üstü bireylerde ise yaklaşık %45'tir. AH'nin karakteristik nöropatolojik özellikleri; ekstrasellüler senil plaklarını oluşturan 39-43 arasında değişiklik gösteren amino asitlerden meydana gelen amiloid beta (A $\beta$ ) birikimi, intrasellüler nörofibriller yumakları (NFY) şekillendiren tau proteinin aşırı fosforilasyonu ve astrositlerin proliferasyonu ile beraber nöronal kayıptır (3, 5, 6). AH tanısında çoğu kaynaklar, ya klinik sendromlara ya da patolojinin anatomik dağılımına dayanarak bir sınıflandırma şemasını kullanmaktadır. Ancak son zamanlarda, klinik ve anatomik sınırlardan ziyade moleküler mekanizmalara dayalı bir sınıflandırma kullanılarak farklı yaklaşımlar elde edilmeye çalışılmaktadır. Özellikle, moleküler genetikte yaşanan büyük gelişmeler, AH'ye yeni bakış açıları kazandırmaktadır (1). Bu yeni bakış açılarından biri de AH'de mikroRNA (miRNA) ekspresyon profillerinin belirlenmesidir. AH'de yapılan *in vivo* ya da *in vitro* miRNA ekspresyon profillemeye çalışmalarında, yeniden düzenlenmiş miRNA ekspresyonlarının AH'ye neden olabileceği gösterilmiştir (7).

MikroRNA'lar, tek zincirli, küçük (yaklaşık 19-23 nükleotid uzunluğunda), endojen olarak eksprese edilen ve genellikle hedef mRNA transkriptlerin 3'kodlanmayan bölgesine (3'untranslated regions, 3'UTR) bağlanarak protein translayonunu post-transkripsiyonel olarak baskılayan küçük kodlanmayan RNA'ların evrimsel olarak korunmuş bir sınıfıdır (8, 9). Farklı hedef mRNA'ların susturulmasıyla miRNA'lar, doku gelişimi, hücre proliferasyonu, bölünmesi, farklılaşması, apoptoz, protein salgılanması ve viral enfeksiyonu dahil çeşitli regülatör yollarda önemli modülatör roller oynamaktadır (10). miRNA'ların anormal ekspresyonu ve disfonksiyonu, kanser, kardiyovasküler,

inflamatuvar ve nörögelişimsel hastalıklar dahil çok sayıda önemli klinik hastalıklarla ilişkilidir (11, 12).

Bu tezin kapsamında, AH gelişimine sebep olduğu düşünölen hsa-miR-132-3p, hsa-miR-186-5p, hsa-miR-195-5p, hsa-miR-219a-5p, hsa-miR-3163 ve hsa-miR-3613'ün ekspresyon profilleri belirlenerek hastalıkla olan ilişkisi ortaya konulacaktır. Böylelikle, bu bilgiler ışığında bu çalışmanın, gelecekte, AH'nin ilerleyişinin yavaşlatılması ya da durdurulmasını sağlayan moleküler mekanizmaların aydınlatılmasına, olası biyobelirteçlerin sayısının artırılmasına ve bunun sonucunda erken tanı ve etkin tedavi yöntemlerinin geliştirilmesine yönelik araştırmalara katkı sağlayabileceğı düşünölmektedir.



## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Alzheimer Hastalığı

#### 2.1.1. Alzheimer Hastalığının Tanımı

Latince'deki anlamıyla “yerleşmiş, varolan, edinilmiş olan zihnin sonradan yitirilmesi” anlamını taşıyan demans kelimesi, etimolojik olarak Latince zihin anlamına gelen mens kelimesinden türemiştir ve demens zihin yitirilmesi anlamına gelir. Demans, Yunancasıyla oligofreni (yetersiz zihin), Latincesiyle amensiyadan (zihin yokluğu) farklılık gösterir. Oligofrenik hastada gelişimsel nedenlerle normal zihinsel işlevler hiç kazanılmazken, demanslı hastada edinsel nedenlerle (genetik ya da çevresel, sıklıkla da ikisinin birlikte etkileriyle) kendinde mevcut olan kapasiteyi yitirme söz konusudur. Bu sebeple demans, erişkin merkezi sinir sisteminin hasarlanması sonucu gelişen zihinsel yeteneklerde bozulma şeklinde tanımlanmaktadır (13, 14).

Yaşlılarda demansın en sık nedeni olan AH; merkezi sinir sisteminin çeşitli kısımlarında nöron ve sinaps kayıpları nedeniyle ortaya çıkan, yüksek entelektüel işlevin çok yavaş bozulması, öz bakım yetersizlikleri, çeşitli nöropsikiyatrik ve davranışsal bozukluklar ile kendini gösteren progresif nörodejeneratif bir hastalıktır (15, 16). AH; erken hafıza bozuklukları, afazi (konuşma bozukluğu, konuşamama), agnozi (sağlam duyuşal işlev varlığında nesnelere veya insanları tanıma bozukluğu), apraksi (sağlam motor sistem varlığında motor eylemlerinin oluşmaması) gibi bilişsel yetersizlik ana özelliklerine sahip yaşa bağlı bir demanstır (17).

Alzheimer hastalığı, ailesel ve sporadik olmak üzere iki ayrı klinik bulgulara sahiptir. Her ikisinde nörolojik fonksiyon bozukluklarına yol açan inflamasyona, metabolik bozukluğa ve yanlış katlanmış proteinlerin agregasyonuna katkı sağlayan moleküler lezyonlarla karakterize edilmektedir. Erken başlangıçlı Alzheimer hastalığı (EBAH) olarakta nitendirilen ailesel Alzheimer hastalığı, genetik mutasyonlara bağlıdır, 60 yaşın altı bireyleri etkiler ve tüm Alzheimer vakalarının %5'inden daha azını oluşturur. Bununla birlikte geç başlangıçlı Alzheimer hastalığı (GBAH) olarakta referans edilen sporadik Alzheimer hastalığı ise, 60 yaş üzerindeki bireyleri etkileyen en yaygın çeşittir ve doğrudan kalıtsal geçiş modeli söz konusu değildir (18).



### 2.1.2. Alzheimer Hastalığının Tarihçesi

Alois Alzheimer, 14 Haziran 1864'te Almanya'da Franconia'da, Würzburg yakınlarındaki Marktbreit'ta doğdu. Matrikülasyon sertifikasında doğal bilimlerdeki üstün yeteneklerinden söz ediliyordu. Tübingen, Berlin, Aschaffenburg, Würzburg Üniversite'sinde okudu ve 1887'de Würzburg Üniversitesi'nden doktor diploması aldı. 1888'de Frankfurt'ta psikiyatri ihtisası yaptı ve kendini büyük ilgi duyduğu nöropatoloji dalında çalışmalara adanmıştı (19-21). Ünlü nörolog Franz Nissl ile birlikte serebral korteksin normal ve patolojik anatomisi hakkında, 1903'de ünlü psikiyatrist Emil Kraepelin ile Münih Üniversitesi Psikiyatri Kliniği'nde o dönemin yaygın hastalığı sifilizin sinir sistemindeki tahribat ile ilgili araştırmalarda bulundu (21).

25 Kasım 1901 yılında Auguste Deter, Alzheimer'ın çalışmalarını yürüttüğü Frankfurt hastanesine başvurdu. Hasta afazi, disoryantasyon, önceden kestirilemeyen davranışlar, paranoya, işitsel halüsinasyonlar ve belirgin fizyolojik bozuklukların yanı sıra anlama ve hafıza kaybı dahil ciddi semptomlara sahipti. 1903'te Alzheimer Frankfurt'tan ayrıldı ve kısa bir süre Heidelberg'de kaldıktan sonra Kraepelin'nin direktörü olduğu Münih Royal Psikiyatri Kliniği'nde göreve başladı. Orada, Alzheimer, Auguste D vakasını 8 Nisan 1906 tarihinde Frankfurt'ta ölümüne kadar takip etmeye devam etti ve daha sonra hastalığın nöropatolojik özelliklerini araştırma çalışmalarını tüm hızıyla sürdürdü (21).

Alzheimer Münih'ten, Frankfurt'taki eski kliniğinden hastanın klinik kayıtları ile otopsi yapmak için beynini istedi (21). Otopsi sayesinde Alzheimer'lı beyni karakterize eden iki patolojik lezyonlar olan ekstrasellüler senil plakları ve intranöral nörofibriller yumakları açıklığa kavuşturan (23, 24) Dr. Alzheimer, 1907'de sunduğu bu olguyu "Genel Psikiyatri ve Adli Tıp Dergisi (Allgemeine Zeitschrift für Psychiatrie und Psychisch-Gerichtliche Medizin)" nde "Serebral Korteksin Özgün Bir Hastalığı" başlığı altında yayınlarken AH'yi ilk kez tanımladı (19, 21). 1910'da Dr. Alzheimer'ın klinik şefi Kraepelin, yayımlanan Klinik Psikiyatri kitabının 8.baskısının 627. sayfasında, "Senil Beyin Hasarı" başlığından sonra "Alzheimer Hastalığı" terimini kullanarak hastalığa Alzheimer ismini verdi (21).

### **2.1.3. Alzheimer Hastalığının Tanı Kriterleri**

Demansın bir tipi olarak tanımlanan AH'nin tanısına yönelik temel sınıflandırılmada, Nörolojik ve İletişimsel Hastalıklar ve İnme/Alzheimer hastalığı ve İlişkili Hastalık Bağlantıları Enstitüsü (National Institute of Neurological and Communicative Disorders and Stroke and Alzheimer's Disease and Related Disorders Association; NINCDS-ADRDA), Zihinsel Hastalıkların Tanısal ve İstatistiksel El Kitabı 4. Baskı (Diagnostic and Statistic Manual of Mental Disorders, Fourth Edition; DSM-IV) ve Uluslararası Hastalık Sınıflandırması 10 (International Classification of Disease 10; ICD-10) tanı kriterleri kullanılmaktadır (25, 26). NINCDS-ARDRA'nın Alzheimer hastalığının klinik tanısı için önerdiği kriterler, hastalığın "olası", "mümkün" ve "kesin" tanımlarını belirlemektedir (25).

### **2.1.4. Alzheimer Hastalığının Prevalansı ve İnsidansı**

2015 Dünya Alzheimer Raporu'na göre, 2015 yılında dünya çapında 46,8 milyon kişinin demansla yaşadığı tahmin edilmektedir. Bu sayının her yirmi yılda yaklaşık ikiye katlanacağı, 2030 yılında 74,7 milyona ve 2050 yılında ise 131,5 milyona ulaşacağı öngörülmektedir. 2015 yılında dünya genelinde 9,9 milyon yeni demans vakası beklenmektedir ve bu durum her 3,2 saniyede yeni bir vakayı ifade etmektedir (27).

2016 yılında Amerika Birleşik Devletleri'nde (ABD) tahmini 5,4 milyon kişi Alzheimer hastasıdır. Bu sayı içerisinde tahmini 5,2 milyon hasta 65 yaş ve üstü iken, yaklaşık 200.000 hasta 65 yaş altındadır. 5,4 milyon hastanın %4'ü 65 yaş ve altı, %15'i 65-74 yaş arası, %44'ü 75-84 yaş arası ve %37'si 85 yaş ve üstüdür. Buna ek olarak, 65 yaş ve üstündeki 5,2 milyon hastadan 3,3 milyonu kadın hasta iken, 1,9 milyonunu erkek hastadır. İnsidansa bakıldığında ise, 2016 yılında 65 yaş ve üstü yaklaşık 476.000 kişide Alzheimer hastalığının gelişebileceği varsayılmaktadır. Yeni Alzheimer hasta vaka sayısı yaşla birlikte çarpıcı biçimde artış göstermektedir. 2016'te 65-74 yaşları arasında yaklaşık 63.000, 75-84 yaşları arasında yaklaşık 172.000, 85 yaş ve üstünde yaklaşık 241.000 yeni vaka olacağı tahmin edilmektedir. 2016 yılında ABD'de her 66 saniyede bir Alzheimer vakası ortaya çıkarken, 2050'de her 33 saniyede bir vaka gelişeceği öngörülmektedir. AH mortalite sayılarını incelediğimizde de, Centers for Disease Control

and Prevention (CDC) Sağlık İstatistikleri Ulusal Merkezi verilerine göre, 2013 yılında 84.767 kişi Alzheimer hastalığından yaşamını yitirmiştir. 2015 yılında ise, Chicago Health and Aging Project (CHAP) verilerine göre, 65 yaş ve üstü yaklaşık 700.000 Alzheimer hastasının yaşamını yitirebileceği tahmin edilmektedir (28).

Ülkemize baktığımızda, Türkiye Alzheimer Derneği'nin verilerine göre, 2015 yılında bilinen Alzheimer hasta sayının 450.000'i bulunduğ bildirilmiştir (29). 2014 yılında Alzheimer tanısı ile T.C. Sağlık Bakanlığı'na bağlı hastanelerde ilgili Teşhis İlişkili Gruplar (TİG) veritabanından elde edilen veriler incelendiğinde, toplam yatan 18.158 hastanın 7.911'i erkek (%43,6), 10.247'si kadın (%56,4) olduğu görülmüş ve hastalığın kadın ve erkeklerde en çok görülen yaş grubunun 70-84 yaş olduğu rapor edilmiştir (30). Türkiye İstatistik Kurumu (TÜİK) verilerine göre, 2011 yılında Alzheimer hastalığından ölen yaşlı nüfus oranı %2,9 iken, bu oran 2012 yılında %3,4, 2013 yılında ise %3,6'ya yükseldiği bildirilmiştir (31).

## **2.1.5. Alzheimer Hastalığının Risk Faktörleri**

### **2.1.5.1. Değiştirilebilir Risk Faktörleri**

**Hipertansiyon**, beyin dokusunda protein ekstrasvazasyonu sonucu kan-beyin bariyerinin vasküler devamlılığını etkileyerek AH riskini artırabilmektedir. Protein ekstrasvazasyonu sırasıyla hücre hasarına, nöronal veya sinaptik fonksiyonda kayba, apoptoza ve bilişsel bozukluğa yol açan A $\beta$  birikiminde artışa neden olabilmektedir (25).

**Diabetes Mellitus (DM)**, demans ve klinik AH'nin risk artışıyla ilişkilidir. Beyinde, A $\beta$  ve insülin, İnsulin Degreded Edici Enzim (IDE) ile parçalanmaktadır. DM'de, hiperinsülinemi nedeniyle IDE insülin tarafından doyurulur ve biriken A $\beta$  çökerek plak oluşturur. Ayrıca, hiperinsülinemi glikojen sentaz kinaz-3-beta (GSK3B)'yı aktive ederek tau proteinlerinin fosforilasyonunu artırır (32, 33).

Orta yaşta yüksek total serum **kolesterol düzeyi**, demans ve AH'nin artışıyla ilişkilidir. Bu ilişki, iki farklı mekanizma yoluyla açıklanabilir. Bu mekanizmaların ilki, yüksek kolesterol konsantrasyonları, kardiyovasküler ve serebrovasküler hastalıkların yüksek riski olan ateroskleroza sebep olurken, ikicisi ise yüksek kolesterol seviyesi beyinde yüksek miktarda amiloid birikimiyle ilişkilidir (32).

**Aşırı sigara kullanımı**, sigara içeriğindeki 4.000 maddenin oksidatif stres, nöronal dejenerasyonu ve plak oluşumunu tetiklediği bilindiğinden, AH riskini artırabilmektedir. Bununla birlikte, orta derecede alkol alımı demansa karşı koruyucu etki gösterirken, aşırı tüketim bilişsel kayıp ve demans riskini artırmaktadır (32).

Örgün **eğitimi** daha az yıl gören bireyler, daha fazla yıl örgün eğitim gören bireylere göre Alzheimer ve diğer demanslar için yüksek riskte olduğu bildirilmektedir. Bazı araştırmacılar, daha fazla eğitim alarak “kognitif rezerv”i geliştiren bireylerin, Alzheimer ya da başka demans semptomlarına yol açabilen beyindeki değişiklikleri daha iyi kompanze etme olanaklarına sahip olduğuna inanmaktadırlar. Kognitif rezerv hipotezine göre, ne kadar uzun eğitim görülürse beyindeki nöronlar arasındaki bağlantılar artar ve beyin kognitif görevini tamamlamak için, nöron-nöron bağlantıları değişik yolları kullanarak Alzheimer’ın erken beyin değişikliklerini kompanze etmeyi sağlar (28). Buna ek olarak, fazla sosyal ağ, yaşamda gaye, yüksek eğitim ve sosyoekonomik pozisyonun AH’ye karşı koruyucu etki gösterdiği iddia edilmektedir (28, 32).

**Hafif ve ciddi travmatik beyin hasarları**, Alzheimer ve diğer demansların gelişim riskini artırmaktadır. Hafif travmatik beyin hasarına sahip bireylerin, beyin hasarına sahip olmayan bireylerle karşılaştırıldığında Alzheimer ve diğer demansların iki kat gelişim riskiyle, buna karşın ciddi beyin hasarına sahip bireylerin 4,5 kat gelişim riskiyle ilişkili olduğu bildirilmiştir (28).

### 2.1.5.2. Değiştirilemeyen Risk Faktörleri

Alzheimer hastalığı için en büyük risk faktörü **yaştır** (28). Ancak bu durum, çoğu insanda yaş ilerledikçe AH gelişecek anlamına gelmez. Zaten çoğunda da gelişmez (34). 65 ve üstü yaştaki her 9 kişiden 1’i Alzheimer hastası iken, 85 ve üstü yaştaki yaklaşık her 3 kişiden 1’i Alzheimer hastasıdır (35, 36). Bununla birlikte, meta-analizden elde edilen sonuçlar, AH ve demans insidans oranlarının yaşta artan her 5 yıl için, 64 yaş öncesinde 3 kat, 75 yaş öncesinde 2 kat ve 85 yaş civarında ve öncesinde 1,5 kat arttığını göstermektedir (37).

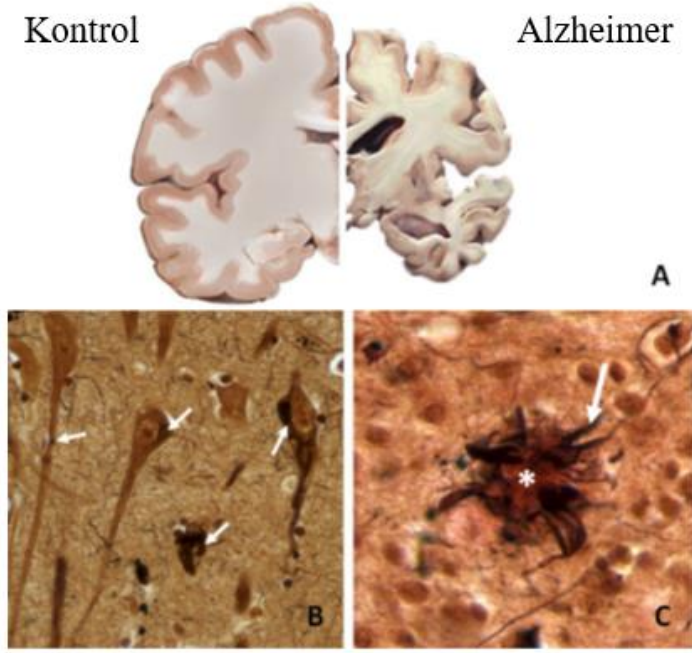
Alzheimer hastalığı için ana risk faktörü yaş olmasına karşın, **cinsiyette** en az yaş kadar önemli bir risk faktörüdür. AH’li kişilerin oranı, genelde kadınlarda erkeklere göre daha yüksektir (38). Kadınlarda görülen belirgin yüksek riske yönelik nedenler hala tam

olarak bilinmemekle beraber, kromozomal, gonadal veya hormonal farklılıklar gibi biyolojik farklılıklar önem ifade ettiği düşünülmektedir (39).

Alzheimer hastalığının **genetik etiyolojisi**, başlangıç yaşına bağlı olarak heterojenlik gösterir (39). EBAH (<60 yaş), tüm AH vakalarının yaklaşık %5-10'unu oluşturur (41) ve sıklıkla ailesel otozomal dominant olup tam penetran kalıtım gösterir (40). Bu oluşuma üç gendeki 200'den fazla mutasyondan herhangi biri neden olabilir. Bu genler, kromozom 21'deki A $\beta$  prekürsör protein (APP; 31 mutasyon), kromozom 14'teki presenilin-1 (PSEN1; 171 mutasyon) ve kromozom 1'deki presenilin-2'dir (PSEN2; 14 mutasyon). APP, PSEN1 ve PSEN2'deki yaygın mutasyonlar, A $\beta$ 42:A $\beta$ 40 oranını artırarak nörotoksik oligomerik gruplardaki A $\beta$ 'nin agregasyonuna yol açarlar (40-42). APP geninin aşırı ekspresyonu, A $\beta$ 'nin bilinen patojenik formu olan  $\beta$ 42'nin sentezini artırmasıyla plak oluşumunu artırır. APP'yi kodlayan gen kromozom 21'de bulunduğu için trizomi 21'li (Down sendromu) bireyler, eğer 40 yaşından sonra hayatta kalırlarsa, AH'nin karakteristik nöropatolojik özelliklerinin gelişmesi yüksek risktedir. Çünkü trizomi 21'deki APP geninin ekstra dozu, APP ürününün artışına neden olur ve bundan dolayı normal bireylerle karşılaştırıldığında serebral amiloid aşırı üretilir ki bu durum büyük olasılıkla genetik hasara sahip bireylerdeki EBAH gelişme yatkınlığını açıklamaktadır (41). Buna karşın, çoğu AH'li vakalar geç başlangıçlıdır (%90-95) ve 500'den daha fazla gen, GBAH aday genleri olarak test edilmiştir. AH patogenezi en fazla çalışılan apolipoprotein E'nin (APOE) izoformu  $\epsilon$ 4 alleli, ailesel ve sporadik erken-başlangıçlı ve GBAH'deki riski artırmaktadır, ancak bu bulgu hastalık etyopatogenezi açısından yeterli değildir (42, 43).

### **2.1.6. Alzheimer Hastalığının Moleküler Nörobiyolojisi**

Alzheimer hastalığı, nörotik plaklar ve nörofibriler yumaklara bağlı ciddi bir serebral atrofi ile karakterize edilir. Bu yapıların yoğunluğu bunamanın klinik durumuyla koreledir ve mevcudiyetleri post mortemde AH'nin kesin tanısını sağlamaktadır (Şekil 2.1) (44).



**Şekil 2.1.** Alzheimer hastalarının beyinlerinde gözlenen patolojik değişimler. (A) Solda normal beyin ve sağda ise sulkusta genişleme, ventrikül dilatasyon ve geniş çaplı hücre kaybıyla karakterize edilen Alzheimer hastasına ait beyin atrofi görüntüsü. (B) Gümüş boyama ile gösterilen beyaz oklarla işaretli nörofibriller yumaklar. (C) Çift boyama ile gösterilen yıldız işaretli amiloid birikintisi ve beyaz okla işaretli nörofibriller birikintisi (44).

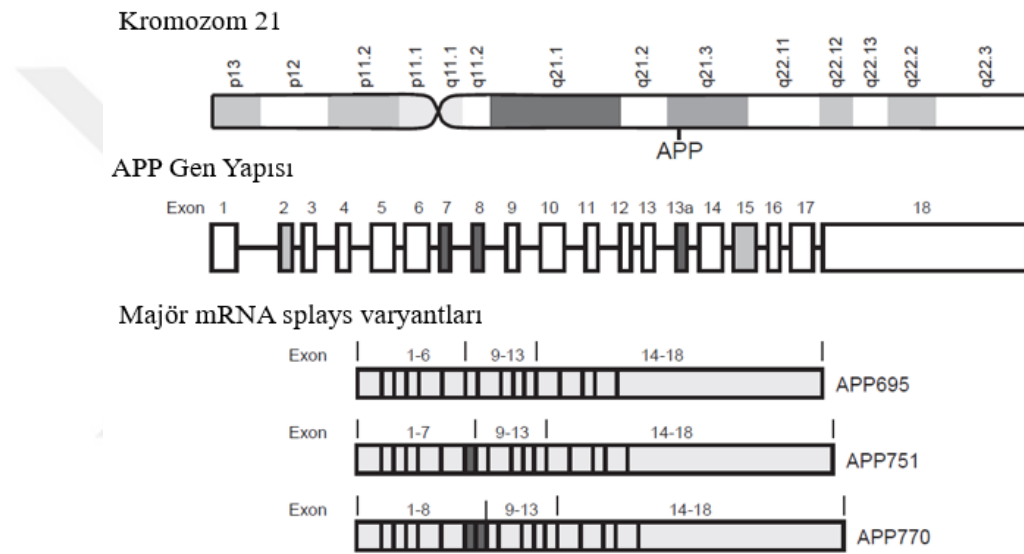
### 2.1.6.1. Nörotik Plaklar ve Amiloid Beta Prekürsör Protein

Nörotik plaklar,  $A\beta$  olarak bilinen bir peptidden oluşan insolübl bir merkeze sahip çapları 10-100  $\mu\text{m}$  arasında değişen ekstrasellüler birikimlerdir.  $A\beta$ , APP'den köken alan normal bir sekretuar ürün olarak oluşan 39-42 amino asitlik bir peptittir (44). APP, Alzheimer'lı beyinlerde amiloid plakların majör protein komponenti olan  $A\beta$  proteinin öncüsüdür. Geniş çeşitlilikteki memeli ve memeli olmayan hücrelerde eksprese edilen APP, tip-1 transmembran glikoproteindir (45).

İnsanlarda APP geni, kromozom 21q21.3'de lokalizedir (46). 18 ekzon içerir ve yaklaşık olarak 240 kilobaz uzunluğundadır. APP promoter sekansı APP geninin, hizmetçi genler sınıfının bir üyesi olduğunu gösterir. Bu promoter tipik TATA ve CAAT kutularından yoksundur, ancak çok sayıda transkripsiyon faktörlerinin bağlanması için SP-1, AP-1 ve AP-4 bölgeleri, ısı şok kontrol elementi ve iki Alu-tip tekrar sekansını içeren konsensüs sekanslarını yapısında bulundurur. SP-1, AP-1 ve AP-4 bölgeleri hücre farklılaşmasının yanı sıra hücre proliferasyonu ve mitozuyla ilişkili proteinlerin

ekspresyonunu regüle eder ve APP promoterdaki bu bölgelerin varlığı, APP'nin hücre büyümesi veya olgunlaşmasıyla ilişkili bir fonksiyona sahip olduğunu gösterir (45).

Transkripsiyon boyunca, APP mRNA'sının farklı splayzıngi, birkaç APP splayz varyantlarını meydana getirebilmektedir. APP'nin majör eksprese edilmiş izoformları 770, 751 veya 695 amino asid rezidülerine sahiptirler. APP751 ve APP695 izoformları ekzon 7 ve/veya 8'in splayz olması sonucunda üretilirler. Bununla birlikte, ekzon 15'den yoksun olmasıyla L-APP ve ekzon 2,7 ve 8'den yoksun olmasıyla APP639 gibi daha az yaygın splayz varyantları da rapor edilmiştir (Şekil 2.2) (44, 45).

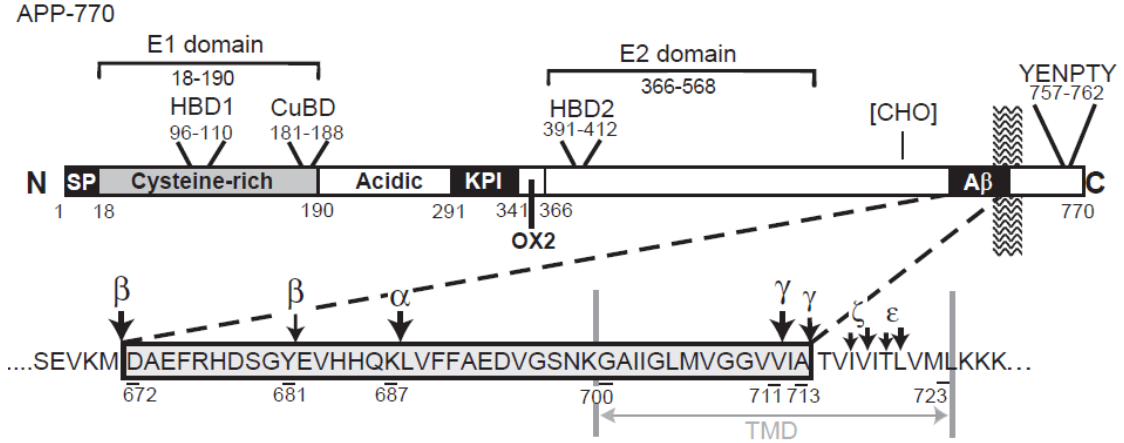


**Şekil 2.2.** APP geninin yapısı. APP geni kromozom 21q21.3'te lokalizedir ve 18 ekzona sahiptir. Ekzon 7,8'in farklı mRNA splayzıngi (koyu gri) 695, 751 ve 770 amino asid izoformlarının ekspresyonuna yol açabilmektedir. Ekzon 2 ve 15 (açık gri), APP639 ve L-APP'de splayz edilir (45).

APP mRNA, sinir sistemi (beyin, spinal kord, retina), immün sistem (timüs, dalak), kas (düz, kardiyak ve iskelet kası), böbrek, akciğer, pankreas, prostat bezi ve tiroid bezi dahil çeşitli dokularda eksprese edilmektedir. Bununla beraber, APP'nin mRNA splayz varyantları, farklı hücrelerde farklı miktarlarda eksprese edilirler (45). APP695 çoğunlukla nöronal hücrelerde, APP751 ve 770 izoformları glial hücrelerde, L-APP, lökositlerde, mikroglia ve astrositlerde eksprese edilirler (44, 45). APP639 ise çoğunlukla fetal dokuda, erişkinlerde de yalnız karaciğerde eksprese edilir (45).

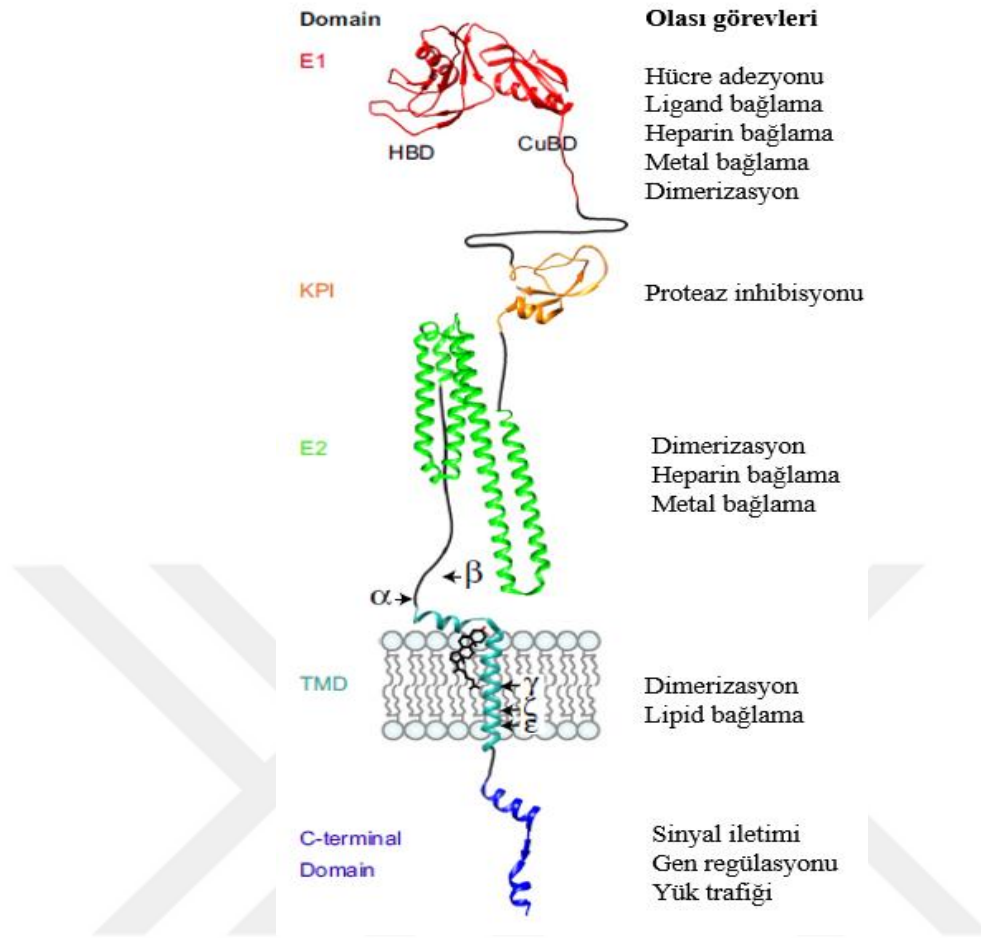
APP yapısal olarak integral tip-1 transmembran glikoprotein özelliğindedir. APP yapısının hücre-yüzey reseptör veya büyüme faktörü olarak rol oynayabildiği ortaya

konulmuştur. Kodlanmış protein büyük bir ektodomain (E1), asidik domain, helix-rich domain (E2) ve transmembran domain içine uzanan A $\beta$  sekans kısmını içerir. Nispeten kısa sitoplazmik domain, birkaç fosforilasyon bölgeleri ve YENPTY tasnif motifine sahip C-terminus'u içerir (Şekil 2.3 ve Şekil 2.4) (45).



**Şekil 2.3.** APP protein yapısı. APP’de, N-terminal sinyal peptid (SP) bulunur. E1 domaini, heparin-bağlayıcı domain (HBD1) ve bakır-bağlayıcı domain (CuBD)’den oluşur. E2 domaini ise ikinci bir heparin-bağlayıcı domain (HBD2) içerir. APP751 ve APP770’de Kunitz proteaz inhibitör (KPI) ve Ox-2 antijen domaini bulunur. E2 ve A $\beta$  arasındaki bölgede iki potansiyel N-bağlı glikozilasyon bölgeleri (CHO) vardır. Bu bölgede, ayrıca ekzon 15 splayz edildiğinde meydana gelen potansiyel kondroitin sülfat bağlı bölgede vardır. A $\beta$  bölgesinin amino asid sekansı, sekretaz kesim bölgeleriyle gösterilmiştir. İntrasellüler C-terminal domain bir YENPTY tasnif motifini içerir. TMD, transmembran domain (45).





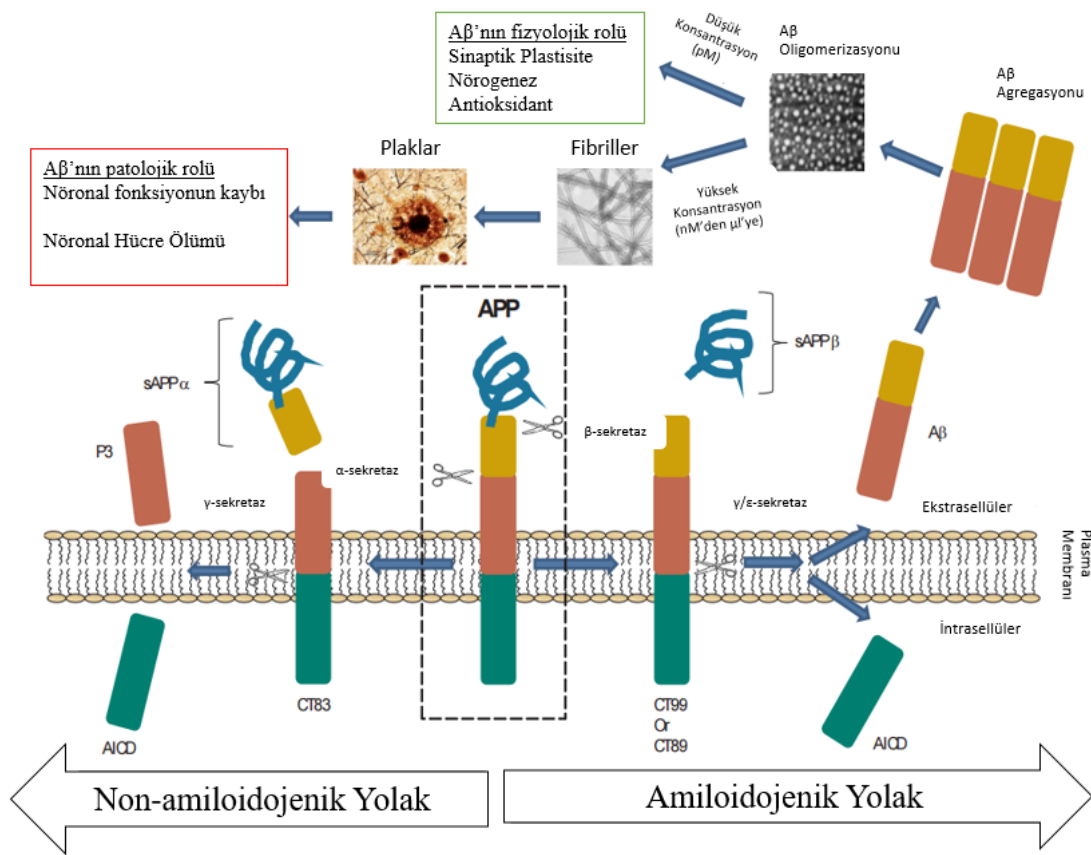
**Şekil 2.4.** Güncellenmiş protein veri bankasına dayanan amiloid prekürsör protein (APP)'in tahmini üç-boyutlu yapısı ve olası görevleri (45).

Ekspresyondan sonra, transle edilmiş APP polipeptidi N- ve O-glikozilasyon, fosforilasyon, tirozin sülfasyon, palmitoilasyonu içeren birtakım post-translayonel modifikasyonlara uğramaktadır. İlaveten APP, sekretazlar olarak adlandırılan enzimlerle post-translasyonel olarak işlem görür. Sekretazla parçalanmadan sonra farklı APP fragmentleri üretilir. APP işlenmesi için amiloidojenik yolak ve amiloidojenik olmayan yolak olmak üzere iki çeşit yolak vardır (44, 45).

Amiloidojenik olmayan (non-amiloidojenik) yolakta, APP'nin ekstrasellüler domain kısmı  $\alpha$ -sekretazlarla kesilir.  $\alpha$ -sekretaz, disintegrin ve metalloproteaz (ADAM; ADAM9, ADAM10 ve ADAM17 dahil, TACE olarakta bilinir) ailesine ait bir üyedir.  $\alpha$ -sekretaz (ADAM10), ekstrasellüler alan içine salınan solübl fragment (sAPP $\alpha$ ) ve C83 olarak tanımlanan karboksil terminal membran-bağlı ürün olmak üzere iki ürün meydana gelir. sAPP $\alpha$ , nörotrofik ve nöroprotektif fonksiyonlara sahiptir. Daha sonra C83 fragmenti  $\gamma$ -sekretaz tarafından kesilir. Sonuçta, 6 kDa'luk fragment olan APP

intraselüler C-terminal domain (AICD) ve ekstrasellüler alana salınan ~3 kDa'lık peptid (p3) olmak üzere iki ürün oluşur (44, 47).

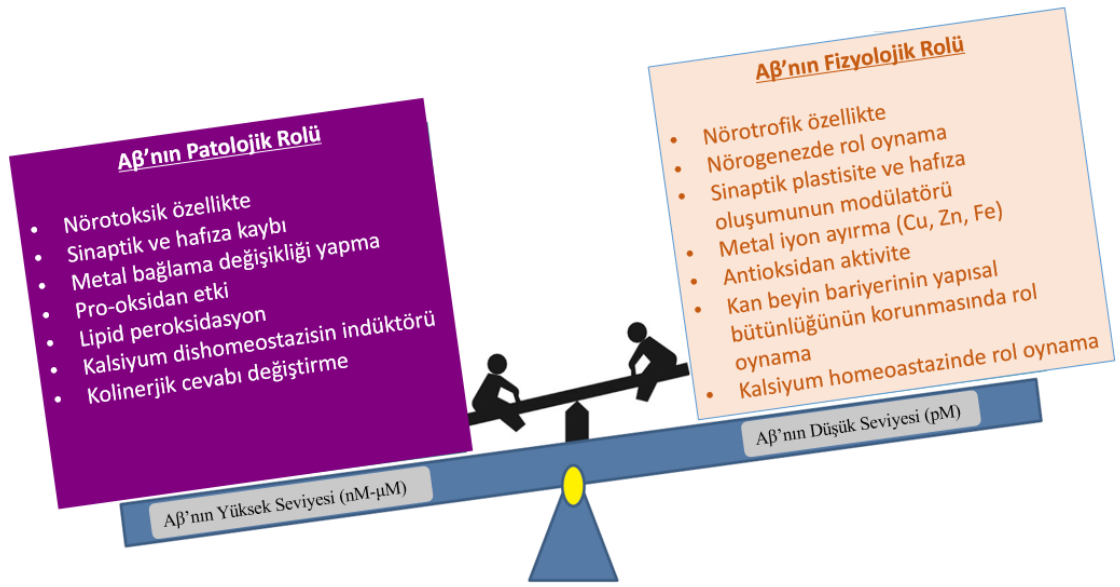
Amiloidojenik yolda, APP'nin ekstrasellüler domain kısmı  $\beta$ -sekretazlarla (BACE1) kesilir. Ekstrasellüler alana salınan solübl ürün (sA $\beta$ PP) ve CT99 veya CT89 olmak üzere iki ürün oluşur. Daha sonra CT99,  $\gamma$ -sekretazla kesilerek nörotoksik fragment A $\beta$  ve sitoplazma içinde daha çok AICD meydana gelir.  $\gamma$ -sekretaz kompleksi plazma membranı içinde, Nicastrin, Anterior Pharynx defective 1, Presenilin enhancer 2, Presenilin 1 ve/veya Presenilin 2'den oluşmaktadır (Şekil2.5) (44, 47).



Şekil 2.5. APP'nin işlenmesi (44).

Amiloid kaskad hipotezi, A $\beta$ 'nin A $\beta$  monomerler, oligomerler, insolübl fibriller ve plakların artan miktarlarıyla sonuçlanan, A $\beta$  ürünü ve klirensi arasındaki dengesizlikteki nedenden dolayı geliştiğini ileri sürmektedir (48). A $\beta$  peptidleri büyüklüklerinde çeşitlilik gösterebilmektedir. Normal fizyolojik koşullar altında beyin A $\beta_{42}$ :A $\beta_{40}$  oranı ~1:9'dur. Bu oranın, ailesel AH'li hastaların beyinlerinde yüksek yüzdeli

olarak değiştiği gözlenmektedir ve bu durumun artmış sinaptotoksisiteye yol açabileceği gösterilmiştir (49). A $\beta$ 40 ve A $\beta$ 42/43 anatoksik izoformlardır. A $\beta$ 42 güçlü hidrofobik, toksiktir ve A $\beta$ 40 göre oligomerler, fibriller ve amiloid plak oluşturmaya daha yatkındır (48). AH'li hastalardaki işaretlenmiş A $\beta$ 42 ve A $\beta$ 40'lı kinetik alışmalar, A $\beta$  ürün oranlarının kognitif olarak normal kontrol ve AH grupları arasında fark olmadığı gösterilmiştir. Ancak, A $\beta$ 'nin ortalama klirens oranı kontrollere göre Alzheimer'lı hastalarda daha azaldığı saptanmıştır. GBAH'de, A $\beta$ 42 ve A $\beta$ 40'ın ikisinde klirensinin %30 azalmasıyla ilişkili olduğu gösterilmiştir (şekil 2.6) (49, 50).



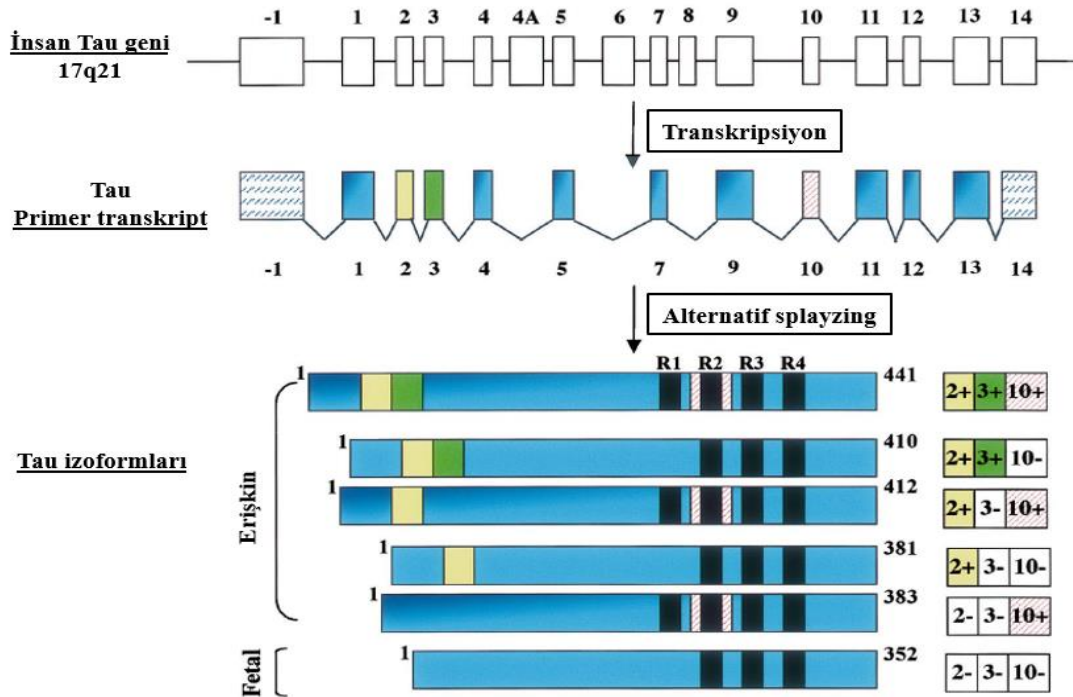
**şekil 2.6.** A $\beta$ 'nin seviyesi çevresel faktörler ya da genetik arkaplan nedeniyle değişimi. Normal sağlıklı koşullarda, A $\beta$  düşük konsantrasyondadır (pM) ve A $\beta$ 'nin fizyolojik koşullarını kullanır, ancak hastalık koşullarında A $\beta$ 'nin seviyesi yükselir (nM- $\mu$ M) ve tahterevallı patolojik etkiler tarafına kayar (44).

### 2.1.6.2. Nörofibriler Yumaklar ve Tau

Nörofibriler yumaklar, nörotik plaklara göre daha basit olmasına karşın, henüz daha anlaşılmış değildir. Nörotik plaklardan farklı olarak, AH hastalarının beyinlerindeki nörotik yumaklarının yoğunluğu demans şiddetiyle sıkı ilişkilidir. Özellikle nörofibriler dejenerasyon, AH patolojisinin klinik belirtisi için bir önşarttır. Buna karşın, nörofibriler yumakların yokluğunda amiloid birikimi, AH patolojisini göstermez (44). Mikroskopik düzeyde Alzheimer hastalığı tanısı, hücre dışı lezyon olan nörotik plakların ve hücre içi lezyon olan nörofibriler yumakların saptanması ile konulmaktadır (15).

Nörofibriler yumakların temel bileşeni hiperfosforile olmuş tau proteindir. Kromozom 17 tarafından kodlanan tau proteini mikrotübül asosiyasyon proteinleri (MAP) ailesinin bir üyesidir. Mikrotübüllerin stabilizasyonu, aksonal transport ve hücre iskelet bütünlüğünde önemli rol oynamaktadır (51).

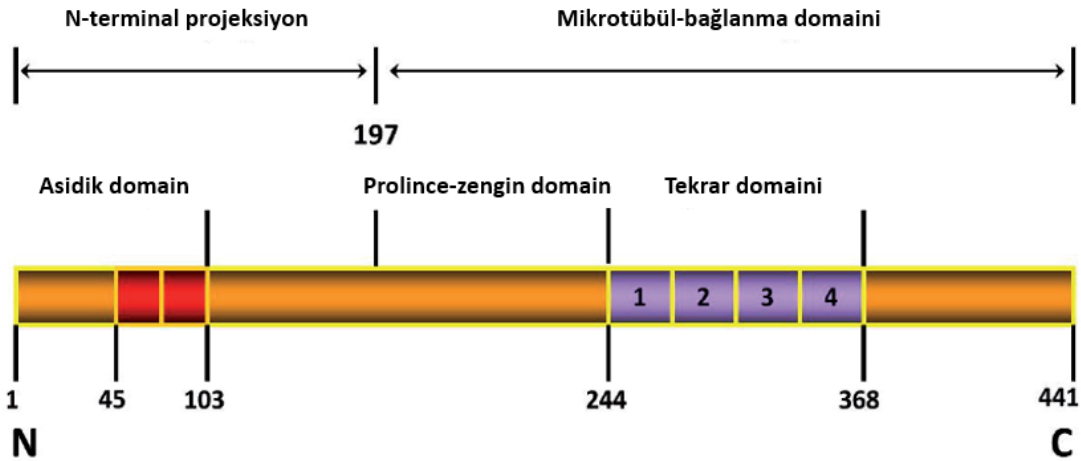
İnsan tau geni, 17. kromozomun uzun kolunun 17q21 pozisyonunda lokalizedir. 100 kb'nin üzerindedir ve 16 ekzon içerir. Biri promoter bölgesine bağlı diğeri ise ekzon 9'da bulunan iki CpG adası içerir. Tau promoter bölgesinde kabul edilen CpG adası, daha önceden tanımlanmış nöron spesifik promoterlara benzemektedir. Farelerdeki Alu-benzer sekansa homolog iki bölge mevcuttur. Bu promoter bölgesinin sekansı aynı zamanda, tipik hizmetçi genler gibi olası multipl başlangıç bölgelerinin varlığıyla ilişkili bir TATA-eksik sekansı içerir (52). Ekzon -1 promoterın bir kısmıdır ve transkribe olur ancak transle edilmez. Ekzon 1, 4, 5, 7, 9, 11, 12 ve 13 yapısal ekzonlardır. Ekzon 2, 3 ve 10 alternatif splayz edilir ve erişkin beyinde açıkça kendini gösterir (Şekil 2.7) (52, 53).



**Şekil 2.7.** İnsan tau geni, tau primer transkripti ve altı adet santral sinir sistemi tau izoformlarının şematik gösterimi. İnsan tau geni kromozom 17'nin 17q21 pozisyonunda 100 kb'nin üzerindeki büyüklüğüyle lokalize olmuştur. Promoterın bir parçası olan ekzon 1 ile birlikte 16 ekzon içerir (Üst panel). Tau primer transkripti, insanda ekzon 4A, 6 ve 8'in transkribe edilmediği için 13 ekzon içerir (Orta panel). Ekzon -1 ve 14 transkribe edilir ancak transle edilmez. Ekzon 1, 4, 5, 7, 9, 11, 12, 13 yapısaldır ve ekzon 2, 3 ve 10 alternatif splayz edilir. Bundan dolayı altı farklı mRNA'ya sebep olur ve altı farklı SSS tau izoformları transle edilir. (Alt panel). (52).

Tau proteini çoğunlukla santral ve periferel sinir sisteminde eksprese edilir, ancak aynı zamanda böbrek, akciğer ve testiste de bulunur. Tau hidrofilitik özelliktir ve protein normalde doğası gereği katlanmamıştır. Tau molekülü, asidik N-terminal kısım, proline zengin bölge ve temel C-terminal domaini olmak üzere üç majör domain içerir. Bundan dolayı tau proteini, zıt yüke sahip iki domainiyle dipoldur. Yüklerin bu asimetrisi tau ve mikrotübüller arasındaki interaksyonlar için önemlidir (54).

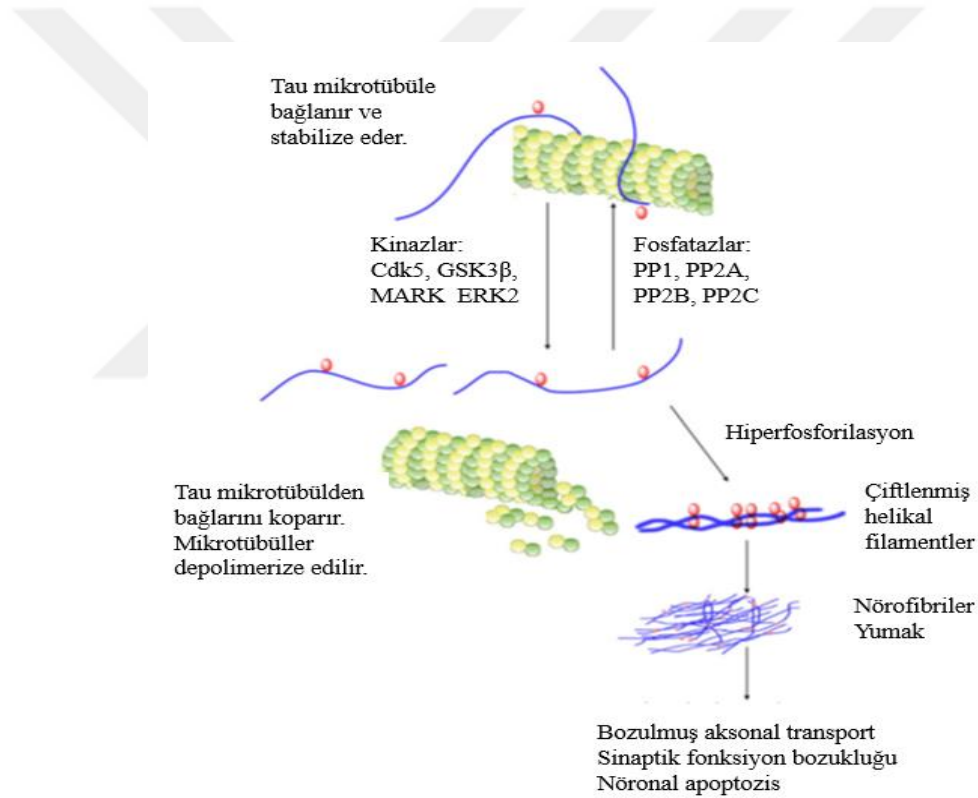
C-terminal domain mikrotübüllere bağlanır ve mikrotübülleri bir araya getirmeyi sağlar. Mikrotübüllere bağlanma, ekzon 9-12 tarafından kodlanan tekrar domainleri (R1-R4) aracılığıyla meydana gelir. 150-240 tau rezidülerinin orta bölgesi çok sayıda proline içerir. Bu bölge, birkaç proline-direkt kinazların ve SH3 domainli proteinler için bağlanma bölgelerinin hedefleridir. Tau'nun asidik N-terminal kısmı mikrotübüllere bağlanmaz. Bu domain, diğer sitoskeletal elementler, mitokondri veya nöronal plazma membranla etkileşebilmektedir (Şekil 2.8) (54).



Şekil 2.8. 441 amino asitlik en uzun tau izoformunun fonksiyonel domainlerinin şematik gösterimi (55).

Multifonksiyonel bir protein olan tau'nun en önemli fonksiyonu, tübülün polimerizasyonundaki rolüdür. Tübülüne tau'nun bağlanması post-translasyonel modifikasyonlarla, özellikle fosforilasyonla düzenlenir. Fosforilasyon pozitif yükü nötralize edebilmekte, konformasyonu değiştirebilmekte ve mikrotübüllerden tau'yu ayırabilmektedir (54). Tau'nun mikrotübüllere bağlanması, tau'nun fosforilasyon seviyesiyle regüle edilmektedir. Kinazlarla (Cdk5, GSK3 $\beta$ , MARK ve ERK2) tau fosforilasyonu, mikrotübüllerden tau'nun ayrılmasına neden olabilmektedir ve böylelikle

mikrotübül depolimerizasyonuna yol açmaktadır. Aksine, fosfataz (PP1, PP2A, PP2B ve PP2C) tau'nun fosforilasyon seviyesini azaltmaktadır ve mikrotübüllere tau'nun bağlanma yeteneğini yeniden canlandırmaktadır. Kinazlar ve fosfatazların rolleri arasındaki bu denge patolojik durumlarda bozulmaktadır ve kinaz aktivitesindeki artış ve fosfataz aktivitesindeki azalış tau hiperfosforilasyonuna yol açmaktadır. Hiperfosforile tau protein yanlış katlanmıştır ve  $\beta$  tabaka içerikli yapı olan çiftlenmiş helikal filamentleri oluşturmaktadır. Bu yapı transisyonları daha çok organize olmuş agregatları meydana getirecek ve sonunda nöronların içinde nörofibriler yumakları geliştirecektir. Nörofibriler yumaklar normal aksonal transportu bozacak, sinaptik plastisiteyi aksatacak ve sonuçta hücre kaybını uyacaktır (Şekil 2.9) (56).



Şekil 2.9. Tau-aracılı nörodejenerasyon (56).

## 2.2. MikroRNA'lar

MikroRNA'lar, hedef mRNA'ların 3'UTR, kodlanan dizilere veya 5'kodlanmayan bölgeye (5'untranslated regions; 5'UTR) yarı-komplementer bağlanmasıyla posttranskripsiyonel gen ekspresyonunda önemli rol oynayan, translasyonun inhibisyonuna ya da mRNA degradasyonuna yol açan yaklaşık 20 nükleotid (nt) uzunluğunda, endojen, küçük çift zincirli kodlanmayan RNA'lardır (6, 57-59). Memelilerde, miRNA'ların tüm protein kodlayan genlerin yaklaşık %50'nin aktivitesini kontrol ettiği tahmin edilmektedir (60). Şu anda, 1.881 prekürsör ve 2.588 olgun insan miRNA'sı, Haziran 2014 miRBase sürüm 21'de kaydedilmiştir. Tüm insan miRNom'u, protein-kodlayan genlerin %60'ından fazlasını regüle etmektedir (58). Yapılan çalışmalar, miRNA'ların hemen hemen her hücresel prosesin regülasyonuna katıldığını ve ekspresyonlarının çeşitli insan patolojilerine bağlı olarak değiştiğini göstermiştir (60). miRNA'ların regülasyonundaki bozuklukların, sıklıkla kanser ve nörogelişimsel hastalıklar dahil birçok insan hastalıklarıyla ilişkili olduğu yapılan çalışmalarla ortaya konulmuştur (61).

### 2.2.1. MikroRNA'ların Keşfi

MikroRNA'ların hikayesi, 1993 yılında Victor Ambros ve arkadaşlarının *Caenorhabditis elegans*'in gelişimsel zamanlama kontrolündeki hasarları araştırması için gerçekleştirdiği genetik taramasıyla başladı (62). *Caenorhabditis elegans* nematodunda, heterokronik genler tüm larval aşamaların gelişimsel sürecini kontrol etmektedir. 1987'de, Ferguson ve ark., Horvitz laboratuvarında yaptıkları çalışmada, heterokronik genlerden biri olan *lin-4*'ün, bir diğer heterokronik gen olan *lin-14*'ü negatif olarak düzenlediğini, yani baskıladığını göstermiştir. Bu sebepten *lin-4* geninin kodladığı yeni proteinin düzenleyici bir görevi olduğu düşünülmüştür. Bunun üzerine, Ambros ve arkadaşları *lin-4* genini klonladılar ve konvensiyonel başlangıç ve bitiş kodonlarının bulunmadığını tespit ettiler. Varsayılan açık okuma çerçevesinde mutasyonlar uyguladılar da, *lin-4* fonksiyonunda herhangi bir değişikliğin olmadığını saptadılar. Bundan dolayı Ambros, *lin-4*'ün bir protein kodlamadığı sonucuna vardı. Buna ek olarak, Ambros ve arkadaşları, 61 nt ve 22 nt uzunluğunda çok küçük iki *lin-4* transkriptlerini

buldular. Bunun yanı sıra, Ruvkun ve arkadaşları, *lin-14*'ün posttranskripsiyonel seviyede düşük düzeyde eksprese edildiğini ve *lin-14*'ün 3'UTR bölgesinin, gelişimsel süreçteki zamanlamayı düzenleyici nitelikte olduğunu buldular. İki grup çalışma verilerini paylaştı ve Haziran 1992'de Ambros ve Ruvkun bağımsız olarak aynı sonuca vardılar. Ambros ve Ruvkun birbirlerinden bağımsız olarak, Kasım 1993'te *Cell* dergisinin aynı sayısında, *lin-4* transkriptleri ile *lin-14* geninin 3'UTR bölgesinde tekrarlı dizileri arasında bir komplementerliğin olduğunu ve *lin-4*'ün, *lin-14*'ü 3'UTR bölgesi vasıtasıyla regüle ettiğini rapor ettiler (57).

*Lin-4*'e benzer şekilde, *let-7* de *C.elegans*'in heterokronik genlerinden biridir ve ilk miRNA'nın bulunmasından 7 yıl sonra, 2000 yılında keşfedilen ikinci miRNA'dır. Ruvkun laboratuvarında, *let-7*'nin larval gelişimsel zamanlamayı kontrol eden 21 nt'lik bir RNA olduğunu rapor edildi. Ruvkun ve arkadaşları, *let-7*'nin, gelişimsel zamanlamayı kontrol eden başka bir gen olan *lin-41*'in 3'UTR bölgesindeki iki korunmuş bölgeye hemen hemen komplementer olduğunu ve *lin-41* 3'UTR bölgesinin delesyonunun ve *let-7* mutasyonlarının *lin-41*'in düşük düzeydeki ekspresyonunu durdurduğunu yaptıkları çalışmalarla göstermişlerdir. *Let-7* RNA daha sonra arthropodlardan insana kadar birçok hayvan türünde bulunmuştur. Bugünlerde ise, binlerce miRNA insanlarda ve diğer canlılarda tanımlanmış olmakla birlikte, miRbase, miRDataBase gibi miRNA online dizi havuzları da oluşturulmuştur. Buna ek olarak, miRNA hedef tahmini için geliştirilmiş yazılımlar ve güncel araçlar miRNA fonksiyonel ağ çalışmalarına olanak sağlamaktadır (57).

### 2.2.2. MikroRNA'ların İsimlendirilmesi

İsimlendirme kuralları bugünlerde miRBase 21 tarafından tanımlanmaktadır (63). miRBase veritabanı, geniş kapsamlı mikroRNA dizi verisine, ek açıklamalarına ve tahmini gen hedeflerine entegre arabirimler sağlamayı amaçlar (64). MiRNA isimlendirilmesi önce miRNA Kurumu tarafından yapılmıştır, daha sonra isimlendirme miRBase tarafından yürütülmeye başlanmıştır (65, 66).

miRNA isimlendirilmesinde ilk başta miRNA'nın kaynağı olan türün kısaltması yer alır. Örneğin; insan (*Homo sapiens*) kaynaklı miRNA'lar için "hsa", fare (*Mus musculus*) için "mmu", sıçan (*Rattus norvegicus*) için "rno" ön eki kullanılır. Tür

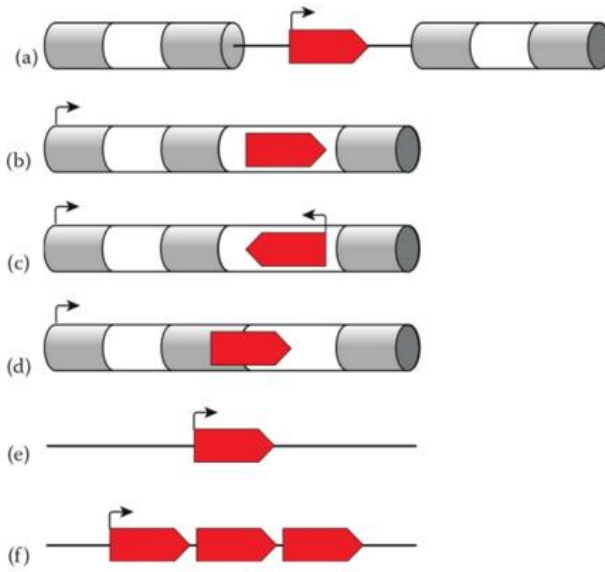


kısaltmasından sonra mir/miR kısaltması yazılır. “mir” kısaltması pre-miRNA’yı, “miR” kısaltması ise olgun miRNA’yı temsil eder. miR’den sonra ise rakam yer alır. Rakamlar bulunuş sırasına göre sıralanır. Örneğin; fare mir-352’den sonra yayımlanan miRNA, mir-353 sayısını alır. Farklı DNA bölgesine yerleşmiş, gen duplikasyonu sonucu paralog dizilerden kodlanan miRNA’lar, rakamdan sonra bir harf ile adlandırılırlar. Bir ya da iki nükleotid dışında neredeyse aynı diziye sahiptirler. Örneğin; hsa-miR-121a ve hsa-miR-121b nispeten birbirleriyle yakın ilişkilidir. Genomda farklı yerlerden kodlanan ancak aynı diziye sahip miRNA’lar aynıdır ama farklı pre-miRNA’lardan üretilir. İsimlendirilirken ekstra çizgi (-) ve numara verilir. Örneğin; miR-123-1 ve miR-123-2. Aynı pre-miRNA saç tokasının 3’ veya 5’ ucundan köken alan miRNA’lar, “-3p” ya da “-5p” son eklerini alırlar. Örneğin; miR-142-5p (5’ kolundan) ve miR-142-3p (3’ kolundan). MiRNA çiftinden diğer uçtakine göre daha düşük seviyede anlatımı olan miRNA’lar inaktif olarak kabul edilir ve numaradan sonra “\*” işareti konulur. Örneğin; aynı pre-miRNA’dan oluşan miR-123\*’a göre miR-123 (yıldız işareti bulunmayan), hücrede nispeten daha fazla bulunmaktadır (66, 67).

### **2.2.3. MikroRNA’ların Genomik Lokasyonu**

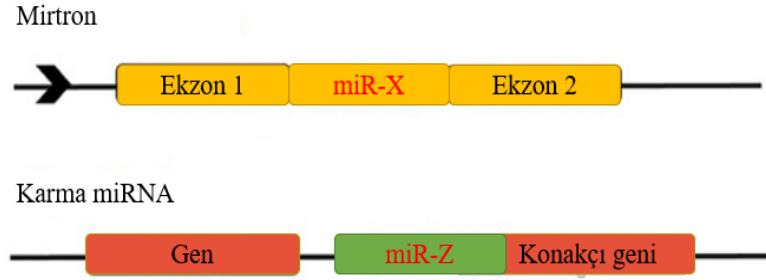
MikroRNA’lar, insan kromozomlarının üzerinde tek başlarına veya kümelenmiş olarak yer alırlar (66). Bazı kromozomlar, tüm türlerle karşılaştırıldığında aşırı derecede fazla sayıda miRNA genlerinin bulunduğu gözlenir. Örneğin, tüm türlerde X kromozomunda fazla sayıda miRNA genleri mevcut iken, Y kromozomunda ise hiç veya çok az sayıda mevcuttur (68). miRNA’lar genomik lokasyon ve yapısına bağlı olarak, intergenik, intronik ve ekzonik olmak üzere üç tipe karakterize edilmektedir. İntergenik miRNA genleri, promoter, transkript sekansı ve terminatör birimleri içeren transkripsiyon birimlerinden ayrıdır. İnsanlarda, çoğu intergenik miRNA genleri, bir transkripsiyon başlangıç bölgesine ve poliadenilasyon bölgesine sahiptir (69). Bu miRNA’lar kendi promoterlarıyla birlikte monosistronik olabildiği gibi, primer transkriptleri bir grup şeklinde transkribe edilerek polisistronikte olabilmektedirler (70, 71). Bununla birlikte, intronik miRNA’lar, protein-kodlayan ve kodlamayan genlerin intronlarında yerleşiktirler. İntronik miRNA’ların yönü, konakçı genin anlamlı (kodlayıcı) zincir ya da anlamsız zincir (anlamlı zincire komplementer) ile aynı olabilmektedir. Anlamlı intronik

miRNA'lar konakçı genler gibi aynı promoterdan transkribe edilirler. Anlamsız intronik miRNA'lar ise, kendi promoterlarından transkribe edilirler (69). Bu miRNA'lar da tek veya kümelenmiş şekilde bulunabilmektedirler (71). Ekzonik miRNA'lar, ökaryotik genomlarda nadir olarak bulunmaktadır ve artık transkribe edilmeyen ya da kodlanmayan bir gen olan psödogenin ekzon ve intronuyla çakışan genomik bölgelerde yerleşiklerdir. Bu miRNA'lar ise konakçı genin promoterından transkribe edilirler (Şekil 2.10) (69-71).



**Şekil 2.10.** MikroRNA'ların genomik lokasyonu ve yapısı. (a) İntergenik miRNA geni, (b) anlamlı intronik miRNA geni, (c) anlamsız intronik miRNA geni, (d) ekzonik miRNA geni, (e) monosistronik miRNA geni ve (f) polisistronik miRNA genleri. Ekzonlar (gri), intronlar (beyaz) ve miRNA genleri (kırmızı) (69).

Bazı miRNA'lar hem intergenik hem de intragenik bölgelerinde lokalizedir ve karma miRNA'lar olarak adlandırılır. Bunlara ek olarak özel bir durum daha vardır. Mirtronlar olarak belirtilen bu yapı, konakçı genin intronunun her iki splayz bölgeleri de dahil olmak üzere pre-miRNA'nın tam sekansından meydana gelmektedir. Bunlar, klasik miRNA biyogenez yolağından değil, Drosha yerine RNA splayzing aracılığıyla alternatif bir yoldan oluşurlar (Şekil 2.11) (70, 72).



Şekil 2.11. Mirtron ve karma miRNA'nın genomik lokalizasyonu (70).

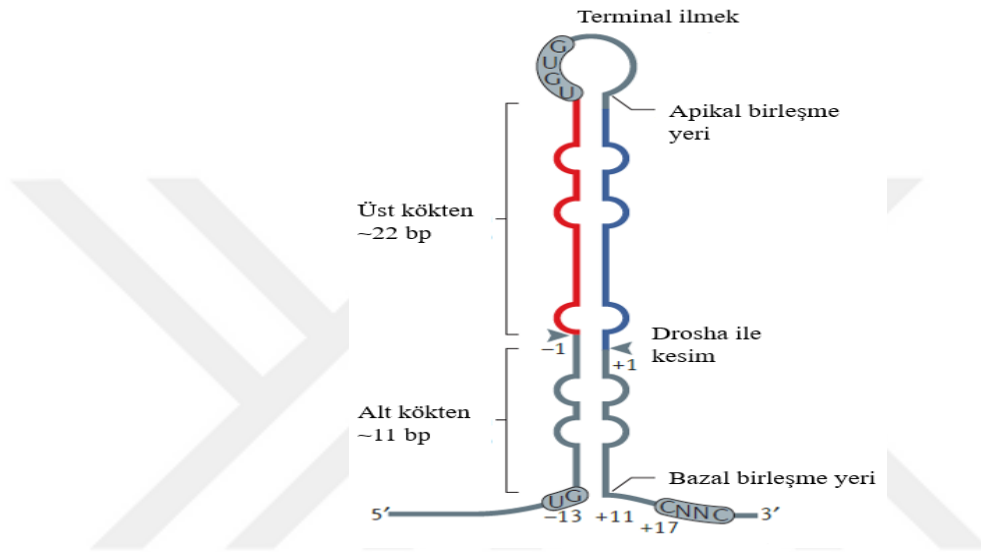
## 2.2.4. MikroRNA'ların Biyogenezi

### 2.2.4.1. Klasik miRNA Biyogenezi

MikroRNA dizileri çeşitli genomik ortamlarda lokalizediler. İnsanlarda çoğu klasik miRNA'lar, kodlanmayan ya da kodlanan transkriptlerin intronları tarafından kodlanırlar, ancak bazıları ise ekzonik bölgelerden kodlanırlar (61). Transkripsiyon, miRNA biyogenezinin düzenlenmesinde önemli bir noktadır (73). Otonom olarak eksprese edilen miRNA genlerinin promoter bölgeleri, çoğunlukla protein kodlayan genlerinkiyle benzerdirler. CpG adalarının, TATA kutu dizilerinin, başlangıç elementlerinin ve bazı histon modifikasyonlarının varlığı, miRNA genlerinin promoterları, protein kodlayan genlere benzer transkripsiyon faktörleri (TF'ler), enhancerlar, susturucu elementler ve kromatin modifikasyonları tarafından kontrol edildiğini göstermektedir (60). Çoğu miRNA genleri, RNA polimeraz II (RNA PolII) ile transkribe edilir (74). Bununla birlikte, Alu tekrarı içeren bazı insan miRNA'ları ise RNA PolIII yerine RNA polimeraz III (RNA PolIII) ile transkribe edilir (9). Her iki RNA polimerazda farklı şekilde regüle edildiği ve spesifik promoteri ve terminatör elementleri tanıdığı için, çok geniş düzenleyici opsiyonlara olanak sağlarlar (73).

Transkripsiyonu takiben oluşan birincil miRNA (primary miRNA, pri-miRNA) transkriptleri, olgun miRNA'nın oluşması için, miRNA olgunlaşması süresince mRNA'lara benzer şekilde splayz edilir, başlık eklenir ve poliadenillenirler (9, 75). Tipik bir pri-miRNA 33-35 bp'lik bir kökten, terminal bir ilmekten ve 5' ve 3' tarafları olan tek-zincir RNA segmentlerinden oluşmaktadır. Pri-miRNA daha sonra, bir RNaz III enzimi olan Drosha ve onun önemli kofaktörü DiGeorge sendrom kritik bölge gen 8'in

(DGCR8) protein-protein interaksyonu sonucu oluşan mikroişlemci kompleks tarafından kırılarak, yaklaşık 65 nt uzunluğunda küçük saç tokası yapısında prekürsör-miRNA'ya dönüşür. Mikroişlemci kompleksindeki DGCR8 tek ve zincirli RNA yapısını tanıırken, katalitik birim olarak işlev gören Drosha ise pri-miRNA'yı yaklaşık 11 bp'lik kısmılık bazal birleşme yerinden, yaklaşık 22 bp'lik kısmılık apikal birleşme yerinden kesmektedir (Şekil 2.12) (61).



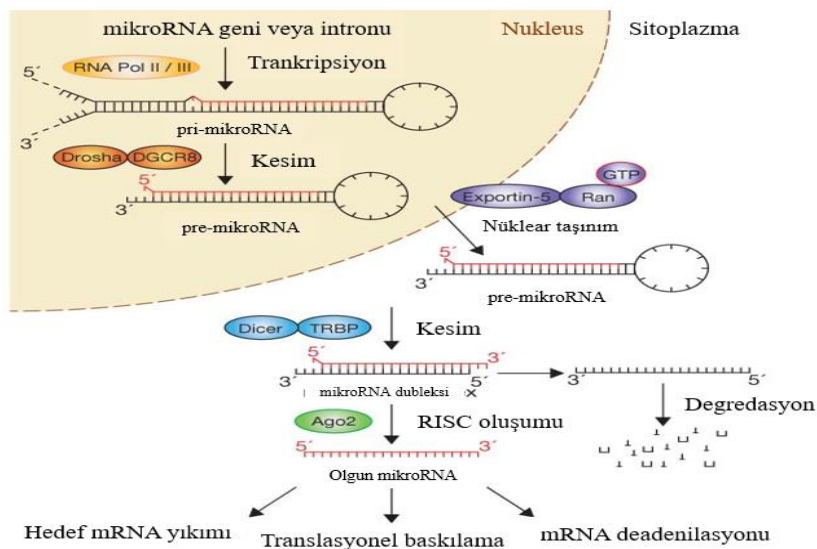
**Şekil 2.12.** Mikroişlemci kompleksinin, pri-miRNA'nın tek zincirli RNA kuyruklarını, ~35 bp'lik kökü ve terminal ilmeği tanıması (61).

Drosha tarafından gerçekleştirilen nükleer prosesin hemen akabinde, pre-miRNA'lar, bir kofaktör olan Ran guanozin trifosfat-bağımlı formda olan Exportin-5 tarafından sitoplazmaya taşınırlar. Exportin-5 pre-miRNA'yı yalnız dizisinden değil, karakteristik saç tokası kökü ve 3' çıkıntısından da tanıır. Bu tanıma gereksinimi işlenmiş pre-miRNA'ların doğru bir şekilde taşınmasına izin verir. Exportin-5'in pre-miRNA'ya olan yüksek afinitede bağlanması, Drosha ile işlenir işlenmez korunmasını sağlar (10). Yapılan bir çalışmaya göre, exportin-5 yoksun hale geldiğinde sitoplazmada miRNA seviyesinin azaldığı, bununla birlikte nükleusta ise pre-miRNA'ların birikmediği rapor edilmiştir. Bu durum, pre-miRNA'nın exportin-5 ile interaksyonu boyunca stabil kaldığını göstermektedir (76, 77).

Sitoplazmaya geçen pre-miRNA, bir diğer RNaz III enzimi olan Dicer tarafından olgun miRNA'ya dönüştürülür (66). Dicer; bir helikaz domain, DUF283 domain, Piwi-Argonaute-Zwille (PAZ) domain, iki ardışık RNaz III domainleri (RIIIda ve RIIIdb

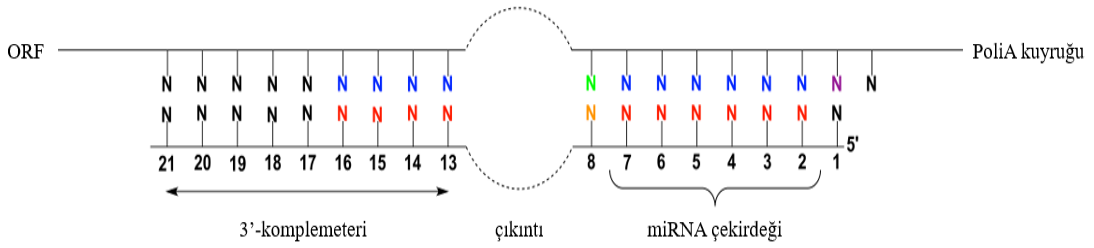
olmak üzere) ve bir dsRNA-bağlayıcı domainden (dsRNABD) oluşur. Dicer'in C-terminal ardışık RNaz III domainleri, katalitik bir merkez yaratmak için intramoleküler dimer oluşturur. N-terminal helikaz domain, terminal ilmekle etkileşerek pre-miRNA tanınmasına olanak sağlar. PAZ domaini ise, pre-miRNA'nın ucuna bağlanır (78). Dicer tarafından kesime uğrayan pre-miRNA dubleksini açılır ve bir iplik ~22 nt uzunluğunda olgun miRNA ya da kılavuz iplik, diğeri ise yine ~22 nt uzunluğunda "tamamlayıcı" ya da "yolcu" iplik adını alır (61). Olgun miRNA oluşumu sürecinde, Dicer ile birleşen transaktivasyon-yanıt RNA-bağlayıcı protein (TRBP) ve PKR'nin Protein Aktivatörü (PACT)'den oluşan bir üçlü kompleks rapor edilmiştir. TRBP, Dicer'ı stabilize etmede rol oynar. TRBP ve PACT'ın, Dicer ile RNA'nın bağlanmasını artırmakta, ayrıca TRBP Dicer'a Argonate (Ago) proteinlerinin bağlanmasını sağlamaktadır (11, 61, 66).

İpliklerin seçim mekanizmasının hala açıklığa kavuşturulamamasına rağmen, RNA-indüklenmiş susturucu kompleksi (RISC) tarafından belirlendiği tahmin edilmektedir (10). İpliklerin termodinamik özelliklerine göre kılavuz veya yolcu ipliğine bağlanır (66). RISC; Dicer, RNA bağlanmasına yarayan TRBP ve katalitik aktiviteye yarayan Ago2'den oluşur. Ago2 yolcu iplikte bir endonükleaz kesim yaparak komplementer iplikleri ortadan kaldırmayla ilgilidir. Yolcu zincirin degradasyonu, RISC'in aktivasyonuna ve kılavuz ipliğine yüklenmesine olanak tanır (10). Oluşan miRISC kompleksi, spesifik bir mRNA sekansına bağlanarak translasyonun baskılanmasını indükler (Şekil 2.13) (62).



Şekil 2.13. Klasik yol miRNA biyogenezi (79).

İnsanlarda dört Ago aile üyesi (Ago1-4) tanımlanmıştır. Ago proteinleri RNA'nın 3'-ucunu tanıyan PAZ bölgesi, 5'-fosfata bağlanan Mid bölgesi ve PIWI gibi karakteristik bölgeler içerir (66). Ago, olgun miRNA'ya direkt bağlanır ve miRNA'ya komplementer hedef mRNA'ları araştırır. Özellikle, çekirdek bölge olarak tanımlanan miRNA'nın 2-7 nükleotidleri, hedef bağlantı için önemlidir. miRNA'nın 3' ucu da hedef tanımaya katkı sağlar. Komplementerlik miRNA'nın merkezi bölgesinde (9-11 nükleotid) olursa, o halde mRNA hedefi, Ago2'nin endonükleaz aktivitesi yoluyla parçalanabilir. Bununla birlikte, insanlarda çoğu miRNA hedefleri bu merkezi dizi eşleşmesinden yoksundur ve Ago2 tarafından direkt olarak parçalanamazlar. Daha çok Ago, sitoplazmik P cisimcikleri bünyesindeki GW182'yi içeren bir kompleksle etkileşir ve translasyonel represyon meydana gelir. İlaveten, CCR4-NOT deadenilaz kompleksi de, RISC'le birleşir ve hedef mRNA'nın poly(A) kuyruğunun yıkılmasına ve sonunda hedef mRNA'nın degradasyona neden olur (75).



Şekil 2.14. miRNA-mRNA interaksiyonu (80).

#### 2.2.4.2. Klasik Olmayan miRNA Biyogenezi

MikroRNA üretiminde klasik yoldan ayrı olarak çeşitli yollar tanımlanmıştır. Bu yollardan ilki olan mirtron yolağında, mRNA kodlayan genlerin çok kısa saçtokası yapısındaki intronlarının splayzingi ve uçlarının kesilmesi ile Dicer tarafından direkt taşınan ve işlenen, Drosha/DGCR8 prosesinden bağımsız, pre-miRNA'lar üretilir. Mirtron'lara ek olarak, pre-miRNA'ların bir başka kaynağı bazı taşıyıcı RNA (tRNA) ve küçük nükleolar RNA (snoRNA)'lardır. miRNA'lara işlenmesi süreçleri Dicer'a bağımlı, Drosha/DGCR8'ye bağımsız şekilde gerçekleşip, RISC kompleksine geçerler (74).

Son zamanlarda miRNA üretiminde Drosha bağımlı Dicer bağımsız klasik olmayan yeni bir yolak keşfedilmiştir. Drosha tarafından pre-miRNA üretilir ve Dicer

basamağı atlanarak Ago2'ye yüklenir. Bu zamana kadar, bu mekanizmayı sadece normal eritropoietik gelişim/homeostaz için gerekli olan miR-451'in kullandığı gösterilmiştir (74, 81).

### 2.2.5. MikroRNA'lar Tarafından Gen Regülasyonu

Biyoinformatik tahminler, memeli miRNA'ların protein-kodlayan tüm genlerin ~%30'unu regüle edebildiğini belirtmektedir (82). miRNA'lar tarafından gen regülasyonu, hedef mRNA ile miRNA arasındaki komplementerliğin derecesine ve mekanizmasına bağlıdır. miRNA ve hedef mRNA arasındaki tam komplementerlik, mRNA'ları yıkıma ve Ago2-aracılı endonükleotik parçalanmaya yöneltecektir. Bu mekanizma hayvanlarda çok nadir işlemektedir. Hayvan miRNA'ları genellikle merkezi bölgede miRNA/mRNA çiftinin yanlış eşleşmesiyle kısmi komplementerlik gösterir. Bu yanlış eşleşme veya çıkıntı mRNA'nın Ago2-bağımlı yıkımını önlemektedir. miRNA sekansının ilk bazları mRNA hedeflerini tanımada önemli rol oynamaktadır. miRNA çekirdeği olarak bilinen 2-7 arasındaki bazlar, hedefe spesifik tanımadan sorumludurlar (74). 2-6 arası bazların Watson-Crick uçları, mRNA hedefiyle interaksiyona girme, çekirdekleştirme için konumlandırılmıştır (83). Çoğu miRNA-bağlanma bölgeleri hedef mRNA'nın 3'UTR'sinde lokalizedirler. Her 3'UTR'ye çoklu miRNA'ların, aynı veya farklı miRNA'ların bağlanması, daima mRNA baskılanmasının seviyesini ve etkinliğini artıracaktır. İlk hipotezlerin, fonksiyonel miRNA/RISC-bağlanma bölgelerinin 3'UTR ile sınırlandırıldığı olmasına karşın, son verilerin yapay ve doğal miRNA'ların 5'UTR ya da kodlanan mRNA bölgesinde bulunan fonksiyonel bölgelere de bağlandığı gösterilmiştir (74).

Translasyonel baskılamamanın yanısıra genelde mRNA destabilizasyonu ve degradasyonunu içeren hedef mRNA'lara miRNA/RISC bağlanmasının çeşitli sonuçları bulunmaktadır. İlginç bir şekilde, 3' veya 5'UTR'yle miRNA'nın etkileşmesi baskılamadan ziyade hedef mRNA translasyonel aktivasyona neden olduğu bazı örnekler de mevcuttur (74). Ökaryotlarda mRNA stabilitesi iki yolla düzenlenir. İlki 3' poli(A) kuyruklarının yıkımına bağlı olarak 3'→5' yönünde ekzonükleotik parçalanma, diğeri ise 5' şapkanın çıkarılmasıyla 5'→3' yönünde ekzonükleotik parçalanmadır (84). mRNA degradasyonu, P cisimcikleri (ya da GW cisimcikleri) olarak bilinen, mRNA

moleküllerinin depolandığı, yıkıma uğratıldığı, translasyonel olarak baskı altında tutulduğu sitoplazmik oluşumlardır. P cisimciklerinin yapısında bulunan GW182 proteinin GW domainiyle Ago2'nin direkt interaksiyonu, miRNA-aracılı susturma için kilit önem taşımaktadır. GW182'ye hedef genin miRNA-bağlı 3'UTR bölgesindeki Ago'ya bağlanarak deadenilaz kompleksini aktifleştirir ya da CCR4-NOT deadenilaz kompleksine direkt bağlanarak hedef mRNA'nın deadenilasyona ve destabilizasyonuna neden olur. Buna ek olarak, GW182 poli-A bağlayıcı protein (PABP) ile direkt etkileşerek translasyonel inisiasyonun baskılanmasına katkı sağlar (74).

miRNA'ların translasyonu başlama aşamasında mı yoksa uzama aşamasında mı baskıladığı bir tartışma konusu olsa da yapılan deneysel ve biyoinformatik analizlerle miRNA'ların translasyonu 4 farklı mekanizma ile baskılayabileceği tahmin edilmektedir:

1. Protein sentezinin başlamasının baskılanması,
2. Ribozomların erken mRNA'dan ayrılması,
3. Protein sentezinin uzama aşamasında yavaşlatılması,
4. Protein sentezine paralel olarak proteinin parçalanması, şeklindedir (66).

Son çalışmalar, çeşitli gen-susturma mekanizmalarının rölatif katkısına değinmişlerdir. miRNA dozajı artmış ya da azalmış hücrelerdeki hedef protein seviyelerinin ve mRNA stabilizasyon/destabilizasyonunun derecelerinin karşılaştırılması aracılığıyla elde edilen sonuç, miRNA-hedef genin protein seviyelerinde gözlenmiş değişimin derecesinin direkt olarak hedef mRNA değişimindeki dereceye orantılı olduğunu ortaya koymuştur (74).

### **2.2.6. Alzheimer Hastalığında MikroRNA'ların Önemi**

Son yıllarda yapılan çalışmalar, AH'de miRNA'ların ekspresyon paternlerinin değiştiğini göstermiştir (17). İnsan veya fare modellerindeki son miRNA profilleme araştırmaları, miRNA'ların AH beyninde anormal olarak eksprese edildiğini ortaya koymakla beraber, kan ve beyin omirilik sıvısında (BOS) da bazı miRNA türlerinin AH'de değişiklikler gösterdiğini belirtmektedir (85).

Yapılan son araştırmalar, bazı miRNA'ların AH beyninde spesifik olarak değiştiğini ortaya koymuştur. Bu AH-spesifik miRNA'lar; miR-9, miR-15, miR-29, miR-101, miR-106, miR-107, miR146 ve miR-181'dir. mir-9'un ekspresyonu, AH'de farklı



hastalık evreleri boyunca beyin farklı bölgelerinde artış veya azalış gösterebilmektedir (85, 86). miR-15 ailesi, miR-15a, miR-15b, miR-16, miR-195, miR-424, miR-497, miR-503 ve miR-646'dan oluşmaktadır. miR-15 AH'de protein seviyesi artan Bcl-2'yi hedefler ve AH'de ekspresyon seviyesi azalır. Ayrıca, bir tau kinaz olan ekstrasellüler sinyal-düzenleyici kinaz 1 (ERK1)'i hedefler ve AH'de azalmış mir-15 seviyesinin nöronal Tau hiperfosforilasyonunda görev aldığı belirtilmektedir (86). miR-29 ailesinin azalmış ekspresyonu ile AH arasında doğrulanmış bir ilişki vardır. mir-29 seviyesi, anormal derece yüksek BACE1 protein seviyesi gösteren AH hastalarında önemli derecede azalmaktadır (87). Buna ek olarak, mir-29, mitokondriden sitokrom c'nin salınmasını indükleyen, BIM, BMF, HRK, Puma dahil pro-apoptotik regülatörlerin bir ailesini hedefler ve AH'de seviyeleri azalmıştır. miR-101'in azalmış ekspresyonu, APP ekspresyon artışını, Tau fosforilasyonunun artışı vasıtasıyla NFY oluşumunun ilerlemesini, siklooksijenaz-2 (COX2)'nin artmış ekspresyonu kanalıyla inflamasyona katkı sağlayarak AH patogenezinde önemli derecede payı olduğu düşünülmektedir (86). miR-106 ailesi, APP mRNA'sına direkt bağlanır ve AH hastalarının anterior temporal korteksinde düşük düzeyde eksprese edilir (88). miR-107 ailesinin de sıklıkla AH'de düşük düzeyde eksprese edildiği gözlenmektedir. AH'de bulunan çubuk benzeri yapıların bir komponenti olan cofilin ve BACE1 gibi hastalıkla ilişkili genleri direkt hedefler (86). miR-107'nin azalmış ekspresyonu AH'nin erken evresinde başlamaktadır. miR-107 ile AH hastalarının temporal korteksindeki nöritik plakların ve NFT'lerin miktarları arasında negatif bir korelasyon vardır (89). miR-146 ailesi, AH'de inflamasyonda yer alan genleri hedefler ve fazla/düşük düzeyde eksprese edilmektedir. miR-181 ailesinin, AH korteksinde ve BOS'ta düşük düzeyde eksprese edildiği rapor edilmiştir (86). Buna ek olarak, miR-520c, miR-20, miR-16, miR-153, miR-124, miR-137'ninde APP'yi, miR-132'nin PTEN (Phosphatase and tensin homolog), FOXO3a (Forkhead Box O3a), Tau, EP300 (E1A Binding Protein P300), SIRT1 (Sirtuin 1) ve FOXO1a (Forkhead Box O1a)'i, miR-103'ün cofilin'i hedeflediği ve AH'de düşük düzeyde eksprese edildiği, buna karşın miR-26b'nin RB1'i, miR34c'nin SIRT1'i, miR-206'nın BDNF (Brain Derived Neurotrophic Factor)'yi hedeflediği ve AH'de aşırı eksprese edildiği rapor edilmiştir. Daha birçok miRNA AH patogenezinde yer almakta ve yapılan çalışmalarla sayıları artmaktadır (7).

### 2.2.7. Alzheimer Hastalığı ve Dolaşımdaki MikroRNA'ların Olası Biyobelirteçler Olarak Kullanılması

AH'nin kesin tanısı postmortem olarak yapılabilmektedir (19). Bu sebeple, hastalığın tanısında ve tedavisinin izlenmesi için geliştirilebilecek biyobelirteçler son derece önemlidir (90). AH'deki güvenilir biyobelirteçlere yönelik yapılan araştırmalarda en büyük ilgi, nörogörüntüleme teknikleri, manyetik rezonans görüntüleme (MRI)'de amiloid birikimi ve hipokampal büyüklük ölçümleriyle birlikte, BOS ve kandaki A $\beta$  ve tau ölçümüne odaklanmıştır. Ancak, bu araçların hiçbiri tanıda tek başına yardımcı değildir ve bugünlerde çokluelirteç yaklaşımı önerilmektedir (91).

Biyobelirteçler, hastalığın erken evrelerinde uygulanan terapötik stratejilerin geliştirilmesi için temel araçlardır. Yaşamın belirli bir evresinde veya normal ve/veya patolojik koşuldaki bir hücre, doku ya da sıvıdan eksprese edilmiş biyokimyasal veya moleküler elementler tarafından oluşturulurlar. Dahası, hastalığın erken evresindeki spesifik biyobelirteçlerin tanımlanması, hastalara erken tedavi uygulama şansını vererek hastalığın ilerlemesine mani olur (92).

İleri tetkikler, miRNA'ların dokulara ek olarak, kan, idrar, feçes, tükürük, amniyon sıvısı ve süt gibi farklı vücut sıvılarında da stabil olarak bulunduğunu göstermiştir. Dolaşımdaki miRNA'lar iki farklı yolla salınabilmektedir. Birincisi, patolojik koşullardaki (doku hasarı, metastaz veya inflamasyon) hücre lizisi ya da apoptoz sonucu olarak pasif sızıntı ile meydana gelir. İkincisi ise, ekstrasellüler veziküllerdeki aktif salınımı veya bazı durumlarda çeşitli multiprotein (Ago2 gibi) ya da lipoprotein komplekslerine (çoğunlukla yüksek yoğunluklu lipoprotein; HDL) bağlı olarak oluşabilir. Buna bağlı olarak, Schipper ve ark. 2007 yılında yaptıkları AH'de olası biyobelirteç bulma hedefli ilk miRNA çalışmasında, mikroarray analizi yapılan Alzheimer'lı periferik mononükleer hücrelerde ilk kez artmış miRNA ekspresyonu tanımlanmıştır (92-94). Kan hücrelerinde yapılan daha sonraki çalışmada ise, Alzheimer hastası ve sağlıklı bireyler arasındaki miRNA ekspresyon farklılığına yeni nesil sekanslama ile bakılmıştır ve sonuçta %93 doğruluk, %95 spesifite ve %92 sensitivite ile 12 miRNA'nın yeniden düzenlendiği bulunmuştur. Böylelikle, bu veri sayesinde kanda yeniden düzenlenmiş miRNA'ların, AH ya da diğer nörolojik hastalıkların tanısında biyobelirteç olarak kullanılabilceği gösterilmiştir (95). Plazma ve BOS'ta yürütülen miRNA profillemeye

çalışmalarında ise, plazmada %95 doğrulukla 7 miRNA'nın hastalığa özgün olduğu rapor edilmesine karşın, Alzheimer'lı beyinlere benzer ekspresyon profili gösteren BOS'ta da, daha özgün bazı AH-spesifik miRNA'lar tanımlanmaktadır (92). Serumdan yapılan son bir çalışmada ise, miR-31, miR-93, miR-143 ve miR-146a ekspresyonlarının AH'de önemli derecede azaldığı, bunun yanında, miR-93 ve miR-146a'nın hafif kognitif bozuklukta önemli derecede arttığı gösterilmiş, ilaveten vasküler demanstan AH'nin ayrımı için miR-31, miR-93 ve miR-146a'nın kullanılabilceği fikri öne sürülmüştür. Sonuçta dört serum miRNA panelinin AH tanısı için yeni bir non-invaziv biyobelirteç olarak kullanılabilceği sonucuna varılmıştır (96).

Sonuç olarak, son dönemlerde dolaşımdaki miRNA'ların analizindeki ilerlemeler sayesinde, nörodejeneratif hastalıklara yönelik biyobelirteçler olarak miRNA'ların kullanılması yönünde daha çok çaba harcanmakta ve daha az invaziv testlerle erken tanı kolaylığı ve yeni terapötik hedeflerin tanımlanması hedeflenmektedir (93).

## 3. GEREÇ ve YÖNTEM

### 3.1. Çalışma Grubu

Bu araştırma, T.C. Mersin Üniversitesi Rektörlüğü Klinik Araştırmalar Etik Kurulu tarafından değerlendirilmiş ve 13/11/2014 tarihinde 2014/246 sayılı kararla uygun bulunmuştur. Çalışmaya katılmak isteyen gönüllü hasta ve sağlıklı bireylere, etik kurulda belirtilen yönergelere uygun olarak hazırlanmış bilgilendirilmiş onam formu okutulup imzalatıldı.

Bu çalışmaya, Mersin Üniversitesi Sağlık Araştırma ve Uygulama Hastanesi Nöroloji Anabilim Dalı'na başvuran ve DSM-IV-TR kriterlerine göre AH tanısı alan, 60 yaş ve üstü 84 hasta birey ile yine aynı kliniğe başvuran, ailesinde AH tanısına sahip bireylerin bulunmadığı ve herhangi bir nöropsikiyatrik hastalık tanısı almamış 60 yaş ve üstü 67 sağlıklı birey dahil edildi.

Çalışma grubundaki bireylerden, 10 ml venöz kan örneği etilendiamintetraasetik asit (EDTA)'li tüpe alındı. Moleküler analizler, Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Moleküler Genetik Laboratuvarı'nda gerçekleştirildi.

### 3.2. Gereçler

#### 3.2.1. Cihazlar

- ✓ Buzdolabı (Hotpoint Ariston)
- ✓ Derin Dondurucu (Arçelik)
- ✓ Etüv (Nüve EN-500)
- ✓ Hassas Terazi (ACJ 120-4M, Kern)
- ✓ Mikropipet Seti (Thermo Electron Corporation)
- ✓ Otoklav (OT 40 L, Nüve StreamArt)
- ✓ PCR (Veriti, Applied Biosystems)
- ✓ Real-Time PCR (ABI 7500, Applied Biosystems)
- ✓ Santrifüj (NF-400, Nüve)
- ✓ Vorteks (VELP Scientifica)

### 3.2.2. Sarf ve Kimyasal Malzemeler

- ✓ 5 X Hot Firepol® Probe QPCR Mix Plus (ROX) (08-14-00020, Solis Biodyne)
- ✓ 5x Reaksiyon tamponu RT-PCR
- ✓ dNTPs Mix 10mM (100 ul) (SNP010-10, SNP Biyoteknoloji)
- ✓ Etanol (1009712500, Merck Millipore Corporation)
- ✓ İzopropanol (I9516, Sigma)
- ✓ Kloroform:İzoamilalkol (24:1) (X205, Amresco)
- ✓ Microamp Real Time PCR Plate kaplama Filmi (100'lük) (Applied Biosystems)
- ✓ Microamp Real Time PCR Plate tutucu (Applied Biosystem)
- ✓ Mikrosantrifüj tüpü 1,5 ml'lik (Axygen)
- ✓ PCR tüpü 0,2 ml'lik (Axygen)
- ✓ Pipet ucu 0,5-10 µl'lik (T-300, Axxygen)
- ✓ Pipet ucu 1-200 µl'lik (T-200-Y, Axxygen)
- ✓ Pipet ucu 1-1000 µl'lik (T-1000-B, Axxygen)
- ✓ Polipropilen Real Time PCR Plate (96'lük) (Applied Biosystems)
- ✓ RevertAid Reverse Transcriptase, 5x Reaksiyon tamponu RT-PCR ile birlikte (200U/µl) (EP0442, Thermo Scientific)
- ✓ Ribolock RNase Inhibitor (40 U/µl)(EO0382, Thermo Scientific)
- ✓ Ribozol (N580, Amresco)
- ✓ Steril Distile Su (Polifarma)

### 3.3. Periferik kandan RNA İzolasyonu

1. 500 µl EDTA'lı kan örneği 1,5 ml'lik mikrosantrifüj tüpüne transfer edildi. Üzerine 500 µl ribozol eklendi ve hemen vortekslenerek buz içinde 15 dakika inkübe edildi.
2. +4°C'de soğutulmuş 200 µl kloroform:izoamilalkol (24:1) eklendi ve hemen vorteklendi.
3. Mikrosantrifüj tüpleri +4°C'de 10 dk 14.000 rpm'de santrifüj edildi.
4. Santrifüjden sonra örnek üç faza ayrıldı. Üstteki açık sıvı fazda RNA, orta beyaz bulutumsu fazda DNA, alttaki kırmızı fenol fazda protein olmak üzere üç faz oluştu.

5. RNA içerikli üst açık sıvı faz, etiketli tüplere transfer edildi.
6. Sıvı fazın üzerine 500 µl hacimde izopropanol eklendi ve RNA'yı çöktürmek için 10 dakika oda ısısında inkübe edildi.
7. Tüpler +4°C'de 10 dk 14.000 rpm'de santrifüj edildi.
8. Süpernatant, pelletin altüst olmamasına dikkat edilerek pipetle atıldı.
9. Pellet üzerine 1 ml hacimde %80'lik soğuk etanol ilave edilerek RNA yıkanması sağlandı. Daha sonra, tüpler +4°C'de 10 dk 14.000 rpm'de santrifüj edildi.
10. Pipetle yine pellete dikkat edilerek süpernatant atıldı ve kuruma için 10-15 dk inkübe edildi. Etanolün kalmamasına dikkat edildi.
11. RNA pelletinin çözünmesi için üzerine 50 µl distile su ilave edildi. 15 sn kadar vorteks yapıldı ve oda sıcaklığında 10 dk bekletildikten sonra tüpler -20°C'de saklandı.

### 3.4. miRNA'ların Biyoinformatik Araçlarla Hedef Gen Analizleri

Yapılan analizde, AH gelişimiyle ilişkili miRNA hedef genleri, miRBase Release 21 (97), miRDataBase (98), TargetScan Release 7.0 (99), PicTar (100) ve FerroLab (101) biyoinformatik veritabanı araçları ile bazı hedef genler yeni tanımlandığı için referans makaleler kullanılarak belirlenmiştir.

**Çizelge 3.1.** AH'de öngörülen miRNA'lar, hedef genler ve eşleşme skorları

miRNA	Hedef Genler
hsa-miR-132-3p	MAPT (%71), EP300 (%86), FOXO3 (%66), SIRT1 (%54)
hsa-miR-186-5p	NCSTN (%73), BACE1 (102, 103)
hsa-miR-195-5p	BACE1 (%63), APP (104)
hsa-miR-219a-5p	MAPT (105)
hsa-miR-3163	SORL1 (%78)
hsa-miR-3613-3p	Creb1(%96)







tanımayı artırır ve hızlandırır, sensitiviteyi artırır, yüksek spesifite sağlar, kısa problemler için  $T_m$ 'yi artırır ve uzun problemler için ise soğurmayı artırır. Katyonik spermin ünitelerinin sayısına göre ZNA'lar, ZNA1 ve ZNA5 arasında sayıları değişmektedir. Bu sayılara göre  $T_m$  derecesi değişmektedir (107, 108).



Çizelge 3.2. miRNA RT-PCR ve Real-Time PCR primer-prob dizileri.

miRNA İsmi	*miRNA Gen No	**miRNA Nükleotit Dizi No	Primer ve Prob Dizileri
hsa-miR-26b-5p	407017	NR_029500.1	5'-RT-GTCGTATGCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGCATACGACACCTAT-3'
			5'-F-GCCGCTTCAAGTAATTCAGG-3'
			5'-PR-FAM-TG(pdC)ATA(pdC)GA(pdC)A(pdC)CTATCC-ZNA4-BHQ-1-3'
hsa-miR-132-3p	406921	NR_029674.1	5'-RT-GTCGTATGCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGCATACGACCGACCA-3'
			5'-F-GCCGCTAACAGTCTACAGCCA-3'
			5'-FAM-TG(pdC)ATA(pdC)GACCGACCA-ZNA4-BHQ-1-3'
hsa-miR-186-5p	406962	NR_029707.1	5'-RT-GTCGTATGCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGCATACGACAGCCCA-3'
			5'-F-GCCGCCAAAGAATTCTCCTT-3'
			5'-FAM-TG(pdC)ATA(pdC)GACAGCCCA-ZNA4-BHQ-1-3'
hsa-miR-195-5p	406971	NR_029712.1	5'-RT-GTCGTATGCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGCATACGACGCCAAT-3'
			5'-F-GCCGCTAGCAGCACAGAAAT-3'
			5'-FAM-TG(pdC)ATA(pdC)GACGCCAAT-ZNA4-BHQ-1-3'
hsa-miR-219a-5p	407002	NR_029633.1	5'-RT-GTCGTATGCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGCATACGACAGAATT-3'
			5'-F-GCCGCTGATTGTCCAAACG-3'
			5'-FAM-TG(pdC)ATA(pdC)GA(pdC)AGAATTGC-ZNA4-BHQ-1-3'
hsa-miR-3163	100423029	NR_036121.1	5'-RT-GTCGTATGCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGCATACGACGTCTTA-3'
			5'-F-GCCGCTATAAAAATGAGGGCAG-3'
			5'-FAM-TG(pdC)ATA(pdC)GA(pdC)GT(pdC)TTA-ZNA4-BHQ-1-3'
hsa-miR-3613-3p	100500908	NR_037407.1	5'-RT-GTCGTATGCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGCATACGACGAAGGG-3'
			5'-F-GCCGCACAAAAAAGCC-3'
			5'-FAM-TG(pdC)ATA(pdC)GACGAAGGGT-ZNA4-BHQ-1-3'
miR-Universal			5'-R-GTGCAGGGTCCGAGGTAT-3'

\*www.ncbi.nlm.nih.gov/gene, \*\*http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP, kısaltmalar: F: Forward, R: Reverse, PR: Prob, RT: Revers transkriptaz

### **3.6. Real-Time PCR ile Ekspresyon Analizi**

Real-time PCR, hedeflenen cDNA ya da DNA dizisini çoğaltarak miktarını miktarını tayin etmek amacıyla kullanılır. Real-time PCR'ı klasik PCR'dan ayıran nokta, her bir tür çoğaltma sonrası çoğaltılan DNA miktarı gerçek zamanlı olarak tayin edilerek logaritmik çoğalma hızına göre başlangıçtaki DNA miktarının güvenilir bir şekilde tespit edilmesidir (66). Real-time PCR ile miRNA ekspresyonunun saptaması; cDNA sentezlenmesi, PCR ürünlerinin saptanması ve veri analizi olmak üzere üç aşamadan meydana gelmektedir.

#### **3.6.1. cDNA Eldesi**

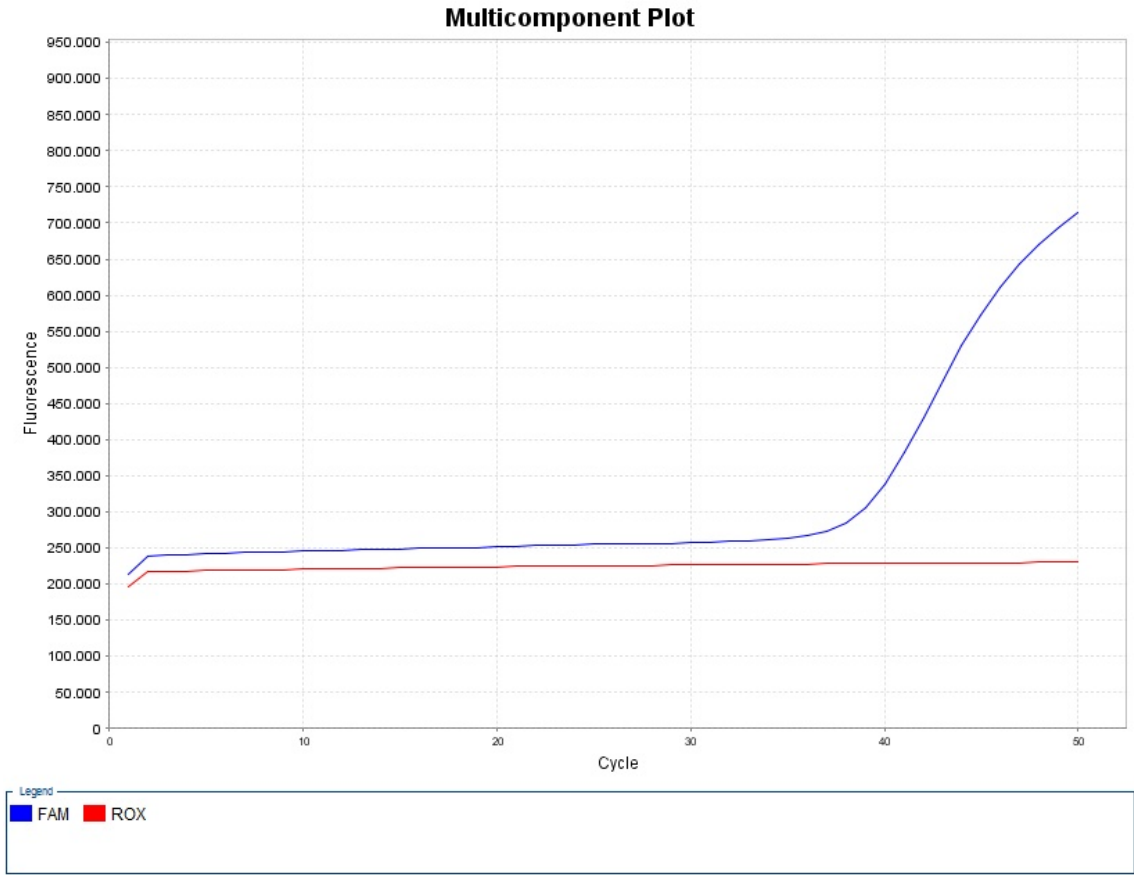
Ekspresyon analizi için, endojen kontrol olarak seçilen hsa-miR-26b-5p'den, ekspresyon düzeyleri belirlenecek altı miRNA'dan ve sağlıklı bireylerin RNA'larından oluşturulan havuzdan elde edilen referans kontrolünden cDNA'lar oluşturuldu. Revers-transkriptaz polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR) için her bir miRNA'ya özgü 50 nM kök-halka RT primer, 5xRT tamponu, 10 mM dNTP, 200 U/μL RevertAid Revers Transkriptaz, 40 U/μL RiboLock RNase Inhibitor ve distile su karışımı toplam 10 μl olacak şekilde hazırlandı. RNA izolasyonu sonucu elde edilen total RNA örneğinden 5 μl karışıma eklendi. 16°C'de 30 dk, 42°C'de 30 dk, 85°C'de 5 dk PCR koşullarında miRNA'lar özgül olarak cDNA'ya dönüştürüldü ve örnekler -20°C'de saklandı.

#### **3.6.2. PCR Ürünlerinin Saptanması**

İkinci aşamada, oluşturulan PCR ürünlerinin gerçek zamanlı ölçülmesi gerçekleştirilir. miRNA saptamasında floresan saptama boyası olarak Taqman prob kullanıldı. 96 kuyucuklu plakanın her bir kuyucuğuna, Master Mix, Universal R ve Forward primerleri, miRNA'lara özgül problar ve distile su karışımından 20 μl konuldu ve 5 μl özgül cDNA ilgili karışımlara uygulandı. Daha sonra plakanın üzeri film ile hava kabarcığı kalmayacak şekilde kaplanarak ısı bloğuna yerleştirildi. Başlama evresinde 50°C'de 2 dk, 95°C'de 10 dk ve döngü evresinde 50 döngü 95°C'de 15 sn, 60°C'de 90 sn olacak şekilde Real-time PCR analizi gerçekleştirildi.

### 3.6.3. Veri Analizi

Son aşamada, iki farklı örnekte bulunan (endojen kontrol ve hedef miRNA) miRNA miktarlarının pozitif kontrol örnekleriyle beraber karşılaştırılarak miRNA miktarında meydana gelen değişiklikler tespit edildi. miRNA ekspresyon düzeyindeki bu değişimler, SDS 2.0.6 yazılımı ile  $\Delta\Delta C_T$  değerleri kullanılarak belirlendi (Şekil 3.2). Daha sonra,  $2^{-\Delta\Delta C_T}$  değeri hesaplanarak veri normalizasyonu sağlandı (109).



**Şekil 3.2.** Endojen kontrol hsa-miR-26b-5p ekspresyon eğrisi. Mavi renkli FAM eğrisi ekspresyon düzeyini, kırmızı renkli yatay çizgi ise ROX (6-Karboksi-X-Rhodamin) pasif referans boyasını göstermektedir.

### 3.7. İstatistiksel Analiz

Bu çalışma ile ilgili istatistiksel testler, Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyoistatistik ve Tıbbi Bilişim Anabilim Dalı tarafından yapılmıştır.

Verilerin İstatistiksel analizi SPSS 11.5 paket programı ile yapılmıştır (110). Kategorik değişkenlerden cinsiyet ve grup için tanımlayıcı istatistik olarak, sayı (N) ve yüzde (%) değerleri verilmiştir. Sürekli değişken olan yaş için tanımlayıcı istatistik olarak, ortalama  $\pm$  standart sapma, minimum ve maksimum değerler verilmiştir. Cinsiyet ve hasta grubu arasındaki ilişki Ki-kare analizi ile incelenmiştir. Hasta ve kontrol gruplarında yaş dağılımının homojen olarak dağılması amacıyla Propensity skor eşleştirmesi yapılmıştır. Normal Dağılıma uygunluk kontrolü Shapiro Wilk testi ile sınıanmıştır. Cinsiyet grubunda yaş ortalamalarının ve hasta ve kontrol gruplarında yaş ortalamalarının karşılaştırmaları iki bağımsız grup ortalamaların karşılaştırılması için kullanılan parametrik testlerden Student t testi ile yapılmıştır. Normal dağılım göstermeyen miRNA ekspresyon düzeyleri için tanımlayıcı istatistik olarak, medyan, minimum –maksimum, 1. (Q1) ve 3.(Q3) çeyreklik değerleri verilmiştir. Hasta ve kontrol grupları arasındaki miRNA ekspresyon düzeylerine ait medyan (ortanca) karşılaştırması parametrik olmayan testlerden Mann Whitney U testi ile yapılmıştır. Mann Whitney U testi ile elde edilen p değerlerine Benjamini Hochberg düzeltilmesi yapılmış ve hasta ve kontrol grubu karşılaştırmalarında düzeltilen p değerleri kullanılmıştır. Tüm karşılaştırmalar için istatistiksel önem seviyesi (p) 0,05 alınmıştır.

## 4. BULGULAR

### 4.1. Kontrol ve Hasta Gruplarının Yaş ve Cinsiyet Bakımından Değerlendirilmesi

Bu çalışmada hasta grubunda 84 birey ve kontrol grubunda da 67 birey olmak üzere toplam 151 birey bulunmaktadır. Çalışma grubunun 66'sını (%43,7) erkek bireyler ve 85'ini ise (%56,3) kadın bireyler oluşturmaktadır. Çalışmaya alınan bireylerin yaş ortalamaları  $71,23 \pm 5,107$  olarak hesaplandı. Cinsiyet açısından değerlendirildiğinde, kontrol ve hasta gruplarında bulunan kadınların yaş ortalamaları  $71,94 \pm 4,794$ , erkeklerin ise  $70,32 \pm 5,384$  olarak hesaplandı. Sonuçta, erkek ve kadın bireylerin yaş ortalamaları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmedi ( $p > 0,05$ ) (Çizelge 4.1).

Çizelge 4.1. Kontrol ve hasta gruplarındaki kadın ve erkeklerin yaş ortalaması (N=birey sayısı).

	Cinsiyet	N	Yaş Ortalaması	p
Kontrol ve Hasta Grubu	Erkek	66	$70,32 \pm 5,384$	0,052
	Kadın	85	$71,94 \pm 4,794$	

#### 4.1.1. Hasta Grubu

Bu çalışmaya, 48'i (%57,1) kadın, 36'sı (%42,9) erkek olmak üzere toplam 84 hasta birey dahil edildi. Çalışmaya dahil edilen hastaların toplam yaş ortalamaları  $71,94 \pm 4,865$  olarak hesaplandı. Hasta bireylerin yaş ortalaması ile kontrol grubu bireylerin yaş ortalaması arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık gözlenmedi ( $p > 0,05$ ) (Çizelge 4.2). Bununla beraber, yaş ortalamaları cinsiyet açısından değerlendirildiğinde, kadın bireylerin yaş ortalaması  $72,31 \pm 4,572$  iken, erkek bireylerin yaş ortalaması  $71,44 \pm 5,256$  olarak hesaplandı. Hasta grubundaki erkek ve kadın bireylerin yaş ortalamaları arasındaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı bulundu.

( $p>0,05$ ) (Çizelge 4.3). Gruplar cinsiyetler bakımından değerlendirildiğinde ise, kontrol ve hasta grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunmadı ( $p>0,05$ ) (Çizelge 4.4).

#### 4.1.2. Kontrol Grubu

Bu çalışmaya, 37'si (%55,2) kadın, 30'u (%44,8) erkek olmak üzere toplam 67 kontrol birey dahil edildi. Çalışmaya dahil edilen kontrollerin toplam yaş ortalamaları  $70,34\pm 5,299$  olarak hesaplandı. Kontrol bireylerin yaş ortalaması ile hasta grubu bireylerin yaş ortalaması arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık gözlenmedi ( $p>0,05$ ) (Çizelge 4.2). Bununla beraber, yaş ortalamaları cinsiyet açısından değerlendirildiğinde, kadın bireylerin yaş ortalaması  $71,46\pm 5,091$  iken, erkek bireylerin yaş ortalaması  $68,97\pm 5,308$  olarak hesaplandı. Kontrol grubundaki erkek ve kadın bireylerin yaş ortalamaları arasındaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı bulundu ( $p>0,05$ ) (Çizelge 4.3). Gruplar cinsiyetler bakımından değerlendirildiğinde ise, kontrol ve hasta grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunmadı ( $p>0,05$ ) (Çizelge 4.4).

Çizelge 4.2. Kontrol ve hasta gruplarına ait yaş ortalamalarının değerlendirilmesi (N=birey sayısı).

Grup	N	Yaş Ortalaması	p
Kontrol	67	$70,34 \pm 5,299$	0,056
Hasta	84	$71,94 \pm 4,865$	

Çizelge 4.3. Kontrol ve hasta gruplarına ait yaş ortalamalarının cinsiyet açısından değerlendirilmesi (N=birey sayısı).

Grup	Cinsiyet	N	Yaş Ortalaması	p
Kontrol	Erkek	30	$68,97\pm 5,308$	0,055
	Kadın	37	$71,46\pm 5,091$	
Hasta	Erkek	36	$71,44\pm 5,256$	0,422
	Kadın	48	$72,31\pm 4,572$	

**Çizelge 4.4.** Kontrol ve hasta gruplarının cinsiyet bakımından değerlendirilmesi (N=birey sayısı).

Cinsiyet	Grup				Toplam		p
	Kontrol		Hasta		N	%	
	N	%	N	%			
<b>Erkek</b>	30	44,8	36	42,9	66	43,7	0,813
<b>Kadın</b>	37	55,2	48	57,1	85	56,3	
<b>Toplam</b>	67	100,0	84	100,0	151	100,0	

#### 4.2. Ekspresyon Ölçümlerinin Veri Analizi

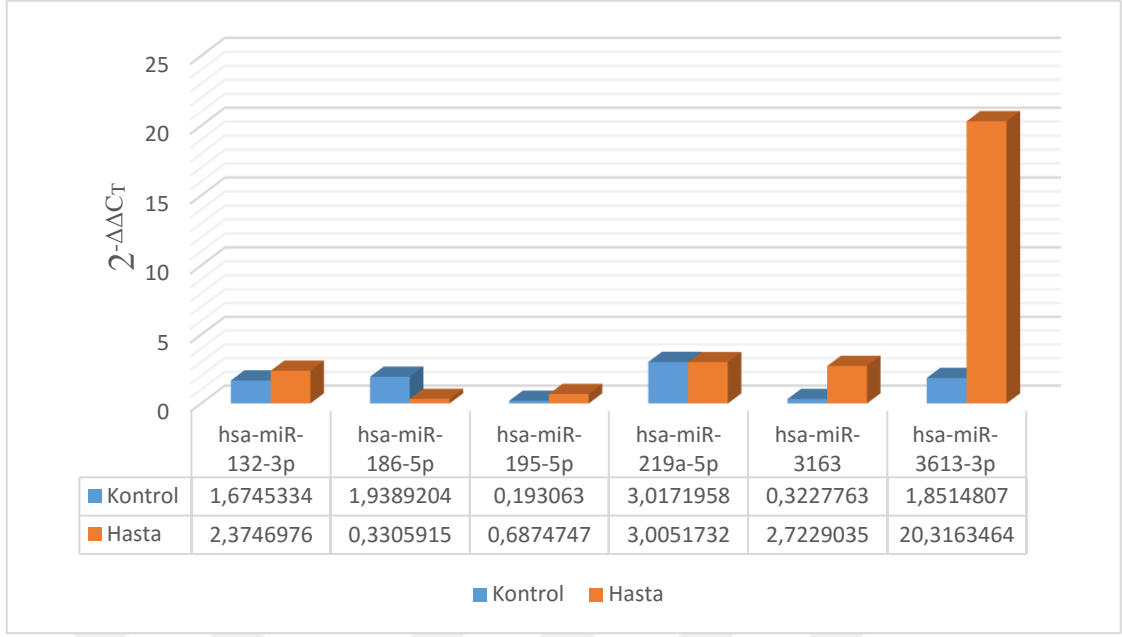
Alzheimer hastalığına neden olduğu bilinen genleri hedef alan altı miRNA'nın ekspresyon düzeyleri kontrol ve hasta gruplarına göre değerlendirilerek p değerleri hesaplandı. Sonuç olarak, kontrol ve hasta grupları arasında hsa-miR-132-3p, , hsa-miR-195-5p ve hsa-miR-219a-5p ekspresyon düzeylerinde istatistiksel olarak bir fark gözlenmezken ( $p>0,05$ ), hsa-miR-186-5p hsa-miR-3163 ve hsa-miR-3613-3p'nin ekspresyon düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğu gözlemlendi ( $p<0,05$ ) (Çizelge 4.5) (Şekil 4.1).



**Çizelge 4.5.** Kontrol ve hasta gruplarına göre ilgili miRNA'ların ekspresyon düzeyleri ( $2^{-\Delta\Delta CT}$ ), minimum, maksimum ve p değerleri.  $Q_1$ =%25,  $Q_3$ =%75.

miRNA	Grup	Ekspresyon Düzeyleri	(Min- Max)	[ $Q_1$ - $Q_3$ ]	p
<b>hsa-miR-132-3p</b>	Kontrol	1,6745334	0,03210-233,26555	0,2085813-7,7578558	0,0645
	Hasta	2,3746976	0,02317-512,91463	0,9709058-10,9371141	
<b>hsa-miR-186-5p</b>	Kontrol	1,9389204	0,00910-54,76683	0,7376930-3,6149538	<b>0,000</b>
	Hasta	0,3305915	0,00387-89,50038	0,0981128-1,0938013	
<b>hsa-miR-195-5p</b>	Hasta	0,6874747	0,00036-503,63356	0,0567609-8,4334001	0,277
	Kontrol	0,1930630	0,01095-669,46979	0,0697578-3,4025511	
<b>hsa-miR-219a-5p</b>	Kontrol	3,0171958	0,00000-136,51706	0,1210679-14,3731322	0,192
	Hasta	3,0051732	0,00819-1608,52606	0,2816752-48,6895772	
<b>hsa-miR-3163</b>	Kontrol	0,3227763	0,00004-387,18877	0,0257098-0,9264946	<b>0,000</b>
	Hasta	2,7229035	0,01357-327,71123	0,7943478-10,1667967	
<b>hsa-miR-3613-3p</b>	Kontrol	1,8514807	0,00217-3774,41703	0,1014570-49,8967158	<b>0,024</b>
	Hasta	20,3163464	0,00014-9411,68470	2,1054946-100,8296065	

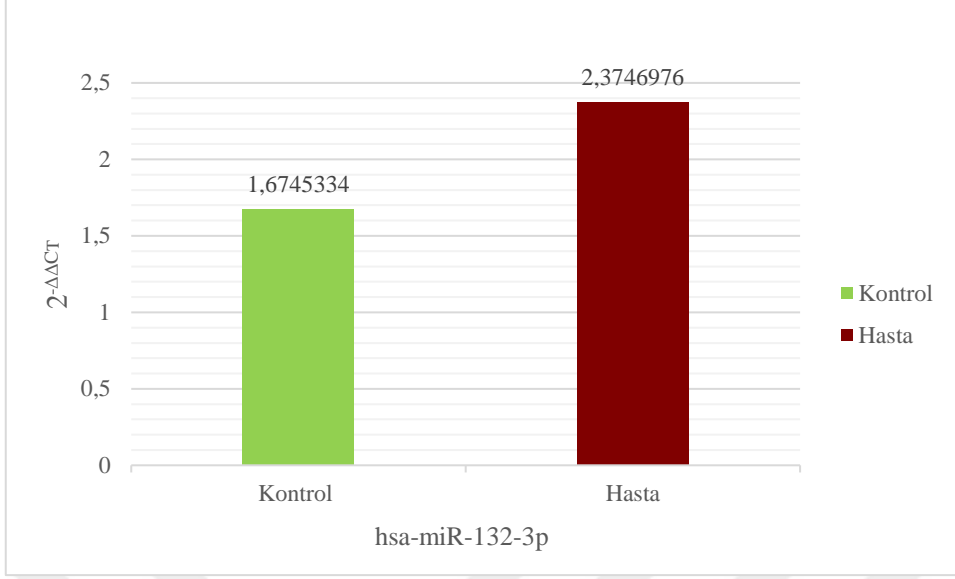
Mann-Whitney U testi uygulanmıştır ( $p < 0,05$ ).



**Şekil 4.1.** Kontrol ve hasta gruplarına ait hsa-miR-132-3p, hsa-miR-186-5p, hsa-miR-195-5p, hsa-miR-219a-5p, hsa-miR-3163 ve hsa-miR-3613-3p'nin ekspresyon düzeylerinin veri grafikleri.

#### 4.2.1. hsa-miR-132-3p Ekspresyonunun Değerlendirilmesi

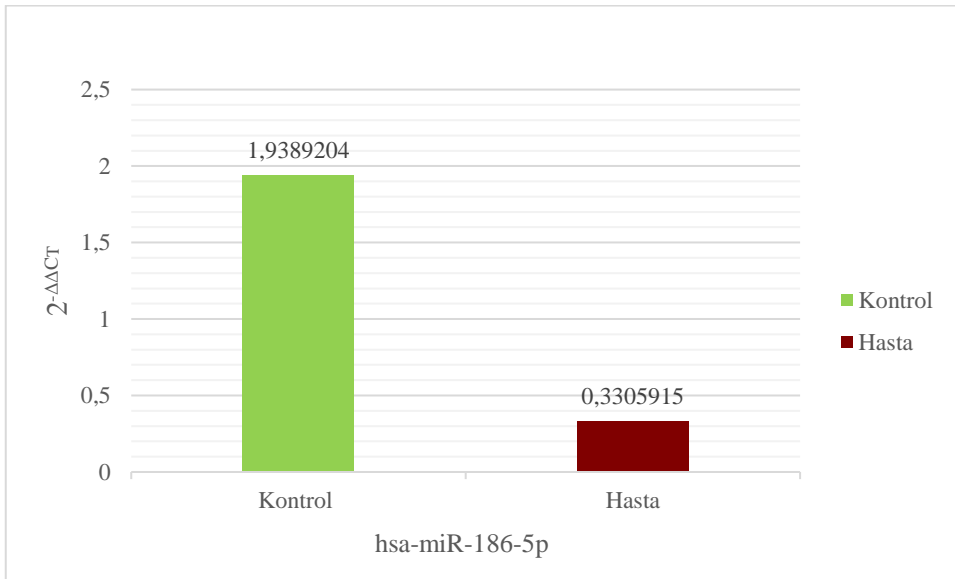
Kontrol grubunda ekspresyon düzeyinin 1,6745334, hasta grubunda ise 2,3746976 olduğu gözlemlendi. Hasta grubunun kontrol grubuna göre ekspresyon düzeylerinde yaklaşık 1,4 kat bir artış olduğu bulundu (Şekil 4.2). Bu artışa karşın, kontrol ve hasta grubunda hsa-miR-132-3p'ye ait ekspresyon düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmedi ( $p>0,05$ ).



Şekil 4.2. Kontrol ve hasta grubunda hsa-miR-132-3p'ye ait ekspresyon düzey grafiği.

#### 4.2.2. hsa-miR-186-5p Ekspresyonunun Değerlendirilmesi

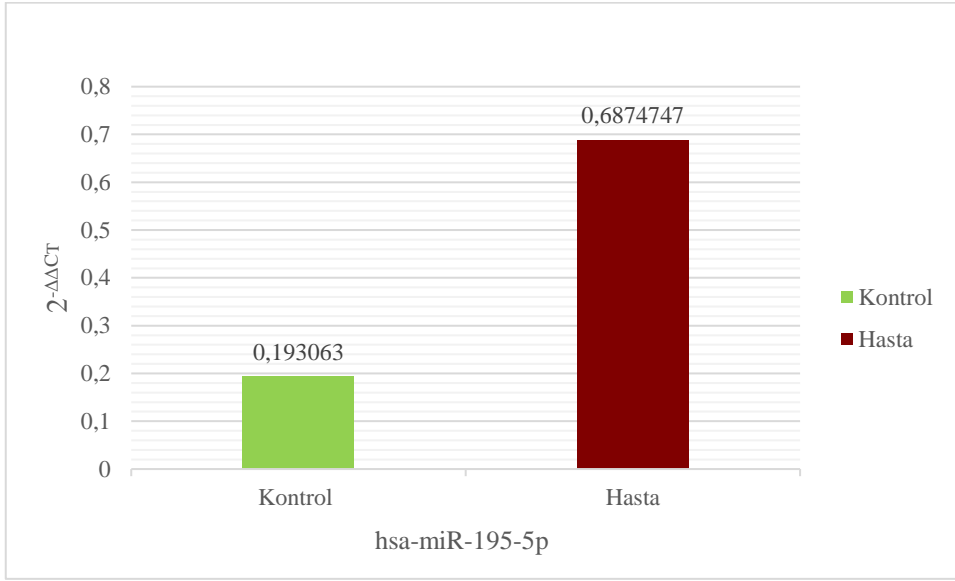
Kontrol grubunda ekspresyon düzeyinin 1,9389204, hasta grubunda ise 0,3305915 olduğu gözlemlendi. Hasta grubunun kontrol grubuna göre ekspresyon düzeylerinde yaklaşık 6 kat bir azalma olduğu bulundu (Şekil 4.3). Bu azalma değerlendirildiğinde, kontrol ve hasta grubunda hsa-miR-186-5p'ye ait ekspresyon düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulundu ( $p < 0,05$ ).



Şekil 4.3. Kontrol ve hasta grubunda hsa-miR-186-5p'ye ait ekspresyon düzey grafiği.

### 4.2.3. hsa-miR-195-5p Ekspresyonunun Değerlendirilmesi

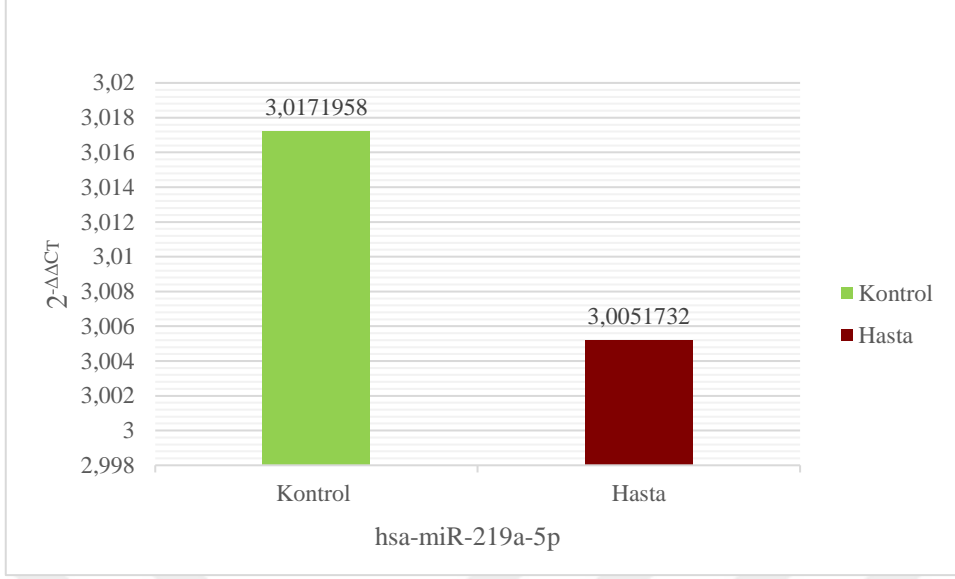
Kontrol grubunda ekspresyon düzeyinin 0,193063, hasta grubunda ise 0,6874747 olduğu gözlemlendi. Hasta grubunun kontrol grubuna göre ekspresyon düzeylerinde yaklaşık 3,6 kat bir artış olduğu bulundu (Şekil 4.4). Ancak, kontrol ve hasta grubunda hsa-miR-195-5p'ye ait ekspresyon düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlemlenmedi ( $p>0,05$ ).



Şekil 4.4. Kontrol ve hasta grubunda hsa-miR-195-5p'ye ait ekspresyon düzey grafiği.

### 4.2.4. hsa-miR-219a-5p Ekspresyonunun Değerlendirilmesi

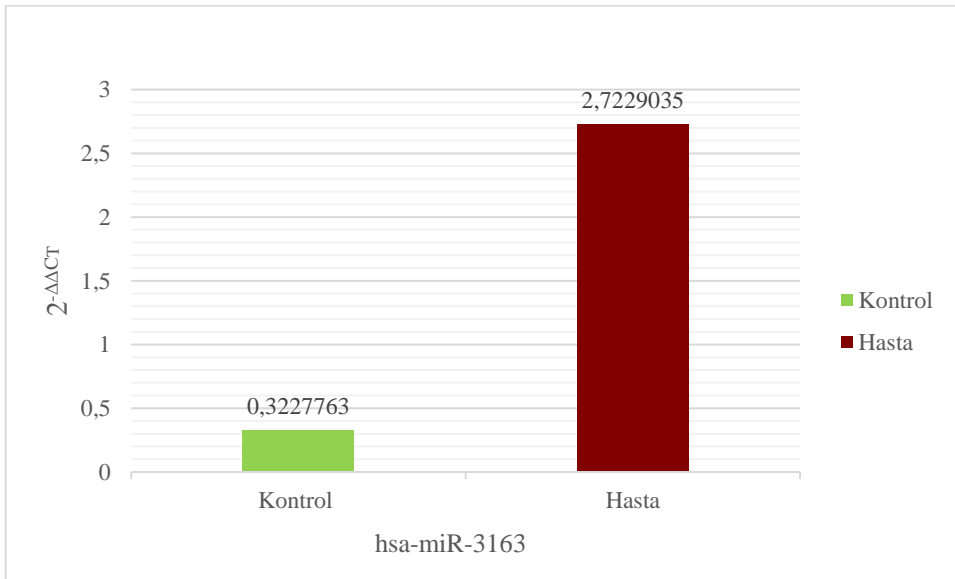
Kontrol grubunda ekspresyon düzeyinin 3,0171958, hasta grubunda ise 3,0051732 olduğu gözlemlendi. Hasta grubunun kontrol grubuna göre ekspresyon düzeylerinde çok az bir azalma olduğu bulundu (Şekil 4.5). Buna karşın, kontrol ve hasta grubunda hsa-miR-219a-5p'ye ait ekspresyon düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlemlenmedi ( $p>0,05$ ).



Şekil 4.5. Kontrol ve hasta grubunda hsa-miR-219a-5p'ye ait ekspresyon düzey grafiği.

#### 4.2.5. hsa-miR-3163 Ekspresyonunun Değerlendirilmesi

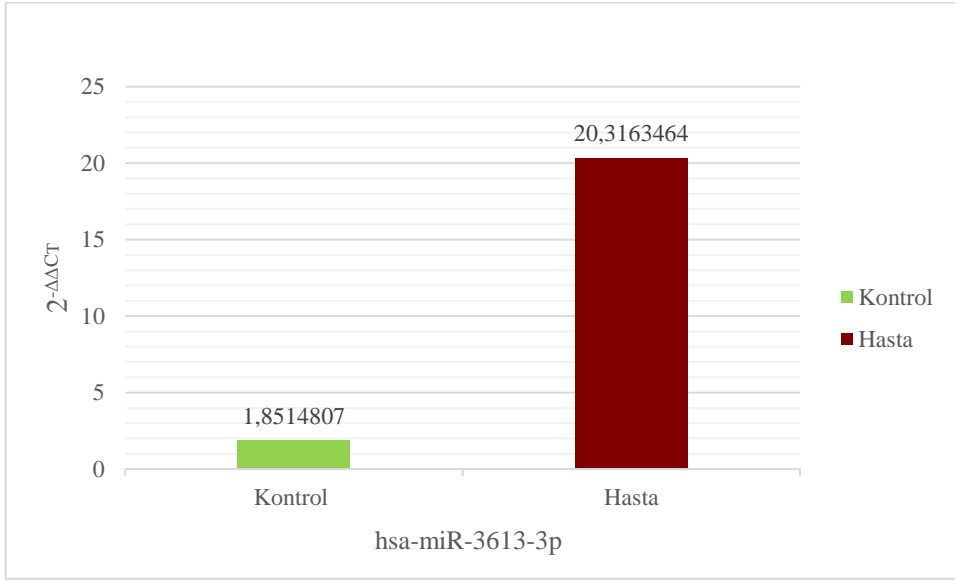
Kontrol grubunda ekspresyon düzeyinin 0,3227763, hasta grubunda ise 2,7229035 olduğu gözlemlendi. Hasta grubunun kontrol grubuna göre ekspresyon düzeylerinde yaklaşık 8,4 kat bir artış olduğu bulundu (Şekil 4.6). Bu artış değerlendirildiğinde, kontrol ve hasta grubunda hsa-miR-3163'ye ait ekspresyon düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulundu ( $p < 0,05$ ).



Şekil 4.6. Kontrol ve hasta grubunda hsa-miR-3163'e ait ekspresyon düzey grafiği.

#### 4.2.6. hsa-miR-3613-3p Ekspresyonunun Değerlendirilmesi

Kontrol grubunda ekspresyon düzeyinin 1,8514807, hasta grubunda ise 20,3163464 olduğu gözlemlendi. Hasta grubunun kontrol grubuna göre ekspresyon düzeylerinde yaklaşık 11 kat bir artış olduğu bulundu (Şekil 4.7). Bu artış değerlendirildiğinde, kontrol ve hasta grubunda hsa-miR-3613-3p'ye ait ekspresyon düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulundu ( $p < 0,05$ ).



Şekil 4.7. Kontrol ve hasta grubunda hsa-miR-3613-3p'e ait ekspresyon düzey grafiği.

## 5. TARTIŞMA

MikroRNA'ların düzensiz ekspresyonları, geniş bir hastalık grubunu oluşturur ve bu düzensiz ekspresyonlar sıklıkla hastalığın başlangıcı ve/veya progresyonuyla ilişkili büyük patolojik etkilerin nedenini açıklayabilmektedir. Bununla birlikte, bugüne kadar AH nöronlarında miRNA'ların düzensizlikleri tümüyle tanımlanabilmiş değildir. Bundan dolayı, bu çalışmada AH gelişiminde katkı sağladığı bilinen genleri hedefleyen hsa-miR-132-3p, hsa-miR-186-5p, hsa-miR-195-5p, hsa-miR-219a-5p, hsa-miR-3163 ve hsa-miR-3613-3p'nin ekspresyon analizi, periferik kan örneğinden gerçekleştirildi. Sonuç olarak, kontrollerle karşılaştırıldığında Alzheimer hastası bireylerde hsa-miR-132-3p, hsa-miR-195-5p ve hsa-miR-219a-5p'nin ekspresyon düzeylerinde istatistiksel olarak bir fark bulunamazken ( $p>0,05$ ), hsa-miR-186-5p'nin ekspresyon düzeyinin anlamlı derecede azaldığı ( $p<0,05$ ), hsa-miR-3163 ve hsa-miR-3613-3p'nin ekspresyon düzeylerinin ise önemli derecede arttığı bulundu ( $p<0,05$ ). Böylelikle, hsa-miR-186-5p, hsa-miR-3163 ve hsa-miR-3613-3p'nin AH ile ilişkili olabileceği gözlemlendi.

İnsanlarda miR-132, kromozom 17p13.3'te lokalizedir (111). miR-132'nin merkezi sinir sistemindeki rolü tamamen anlaşılmasına rağmen, nörit gelişiminde, dendritik büyüme ve dallanmasında, sinaptik iletimde ve plastisitede, öğrenme ve hafıza oluşumunda, apoptoziste ve nörolojik korumada önemli fonksiyon gösterir (112). Bu kapsamda, miR-132'nin AH'deki rolünü gösteren farklı deneysel çalışmalar bulunmaktadır. Örneğin, *Smith ve ark. (2015)* 3xTg-AD transgenik farelerde miR-132/212 yoksunluğunun, artmış tau ekspresyonuna, fosforilasyonuna ve agregasyonuna neden olabileceğini rapor etmişlerdir (112). Farelerde ve insanlarda miR-132/212, TargetScan algoritması kullanılarak biyoinformatik olarak analiz edildiğinde, tau protein geni olan MAPT (Microtubule-Associated Protein Tau)'nin 3'UTR bölgesini hedeflediği ve bu hedefin mirdatabase veritabanına göre insanlarda %71, farelerde ise %75 oranında eşleştiği gösterilmiştir (98, 99). Ayrıca yine *Smith ve ark. (2015)* çalışmasında, bu farelere miR-132 mimikleri uygulandığında, azalmış tau fosforilasyonu ile beraber önemli derecede uzun dönem hafıza kaybının iyileştiği gösterilmiştir. Ancak, miR-132'nin uzun dönem hafızayı nasıl düzenlediği hala belli değildir. Bunun yanısıra, fosforile olmuş tau'nun azalmış ekspresyonunun, mikrotübül stabilesini ve aksonal iletimini artırarak hafızada görev aldığı da bildirilmiştir. Bu çalışmanın bir diğer ayağında ise, kontrol, hafif

kognitif bozukluk ve Alzheimer hastası bireylerin temporal korteks, prefrontal korteks ve hipokampus dokularından miR-132 ekspresyon seviyeleri incelenmiştir. Sonuçta, bu üç bölgede miR-132/212 seviyesinin azaldığı, miR-132 seviyesinin insolübl tau ve hafif kognitif bozukluk arasında önemli bir korelasyonun olduğu ortaya konulmuştur (112). Benzer bir çalışmada ise, *Lau ve ark. (2013)* ileri yaş Alzheimer hastalarında dondurulmuş beyin örneklerinde bazı miRNA'ların ekspresyon profillerini incelemiştir. Bu incelemede, miR-132-3p ekspresyon seviyesinin, ileri yaş Alzheimer hastalarında hipokampus, prefrontal korteks ve temporal girusta azaldığı gözlenmiştir. Majör nöronal kayıp oluşmadan önce prefrontal kortekste, Braak I ve II evreleri arasında miR-132-3p'nin aşırı miktarda eksprese edildiği ve daha sonra Braak II ve VI arasında düşük düzeyde eksprese edildiği rapor edilmiştir. Buna ek olarak, *in situ* hibridizasyon kullanılarak prefrontal kortekste mir-132-3p ve tau hiperfosforilasyonu arasında negatif bir korelasyonun olduğu gösterilmiştir. Ayrıca, lusiferaz deneyi ile Alzheimer'lı beyinlerin prefrontal korteksinde miR-132'nin hedeflerinin, EP300, SIRT1, MAPT ve FOXO1a'nın yeniden düzenlendiği bildirilmiştir (113). Bununla birlikte, aynı yıl yapılan başka bir bağımsız çalışmada *Wong ve ark. (2013)* dondurulmuş insan post-mortem beyin örneklerinin temporal korteks ve hipokampus CA1 bölgesindeki nöronlarda miR-132 ekspresyon seviyelerinin anlamlı derecede azaldığı ve Braak VI evresinde, Braak III evresine göre nöronal kayba bağlı olarak azalmanın daha da arttığı rapor edilmiştir. Bu sonuçtan, miR-132'nin nöronal sağkalımda direkt fonksiyonu olduğunu ve azalmış ekspresyonlarının nöron ölümüne neden olabileceğini düşünen Wong ve ekibi, sekans spesifik antisens oligonükleotit inhibitörlerle primer hipokampal ve kortikal nöronlarda miR-132 ve/veya 212'nin inhibisyonunu sağlamışlardır. Bu deney sonucunda, önemli derecede apoptotik hücre ölümünün arttığını gözlemişlerdir. Ayrıca yaptıkları hücre kültür çalışmalarında, miR-132/212'nin PTEN ve FOXO3a'yı direkt hedeflediğini deneysel olarak doğrulayıp, tanımlamışlardır. Buna ek olarak, Braak VI evresindeki Alzheimer beyinlerinde, azalmış miR-132/212 seviyesinin, artmış PTEN, P300 ve FOXO3a ekspresyon düzeyi arasında anlamlı bir korelasyonun olduğu gösterilmiştir. Böylelikle, bu çalışma ile miR132/212, PTEN, FOXO3a sinyal yolağının AH nörodejenerasyonuna katkı sağladığı gösterilmiştir (114). Bu tez çalışmasında, miR-132 ekspresyon seviyesinin, kontrollerle karşılaştırıldığında Alzheimer hastalarında yaklaşık olarak 1,4 kat bir artış olmasına karşın, bu artış istatistiksel olarak anlamlı değildir.



Bahsedilen çalışmalara zıt olarak bu tez çalışmada bulunan miR-132'deki artışın, hasta grubundan kaynaklı patolojik bulgu farklılıklardan dolayı olabileceği tahmin edilmektedir.

hsa-miR-186, kromozom 1p31.1'de lokalizedir (115). hsa-miR-186'nın yeniden düzenlenmesinin AH gelişimine katkı sağladığı çeşitli çalışmalarla gösterilmiştir. Bunlardan ilki, *Goo ve ark. (2013)* tarafından yapılan fareler üzerindeki çalışmadır. Bu çalışmada, NCSTN (Nicastrin)'nin artmış ekspresyonunun AH patolojisine neden olduğunu rapor etmesinden yola çıkarak (116), *Delay ve ark. (2014)* yapmış olduğu araştırmada, nicastrin represyonun düşük A $\beta$  sekresyonuna neden olabildiği ve nicastrin proteininin endojen regülatörleri olarak miR-24, miR-186 ve miR-455'i tanımladıklarını bildirmişlerdir. Ayrıca, nicastrin 3'UTR bölgesindeki polimorfizmlerin, miR-186 ve miR-455-aracılı represyonu azalttığı rapor edilmiştir (117). AH'de dolaşımdaki miRNA biyobelirteçlerini tanımlamaya yönelik yapılan bir çalışmada ise *Satoh ve ark. (2015)*, 48 Alzheimer hastası ve 22 sağlıklı bireylerden alınan kan örneklerinden miRNA ekspresyon analizini gerçekleştirmiştir. Analiz sonucunda, gruplar arasında 27 miRNA'nın farklı düzeyde eksprese edildiği tanımlanmış ve bunlardan miR-186-5p'nin ekspresyon düzeyinin arttığı rapor edilmiştir (58). *Kim ve ark. (2016)* yaptıkları çalışmada, miR-186'nın fare ve insan BACE1 geninin 3'UTR bölgesini hedeflediğini, fare beyin korteksinde miR-186 seviyesinin yaşlanma sürecinde kademeli olarak azaldığını, nöronal hücrelerde miR-186 aşırı ekspresyonunun BACE1 mRNA seviyesini ve A $\beta$  seviyesini önemli derecede azalttığını göstermiştir. Böylelikle, miR-186 ekspresyonunun olası negatif bir regülatör olduğunu ve beyin yaşlanması ve yaşlanma boyunca AH'nin artmış riski arasında moleküler ilişkilerden biri olabileceğini düşünmüşlerdir (102). Yapılan bu tez çalışmasında Alzheimer hastalarında hsa-miR-186-5p'nin, kontrollerle karşılaştırıldığında yaklaşık 6 kat azaldığı ve bu azalışın istatistiksel olarak anlamlı olduğu bulunmuştur. *Satoh ve ark. (2015)* periferik kanda yapmış oldukları çalışmaya zıt olarak, yapılan bu çalışmada periferik kanda miR-186'nın ekspresyon seviyesinin azaldığı tespit edilmiştir. Ancak, *Kim ve ark. (2016)* yapmış oldukları doku ve hücre kültür çalışmasındaki bulgularla, kan örneğinden yapılan bu çalışmadaki bulgular karşılaştırıldığında benzer sonuçlar elde etmesi bakımından miR-186'nın ekspresyon seviyesinin AH'de azaldığını söylemenin daha doğru olabileceği düşünülebilir. Böylelikle, miR-186'nin azalmış ekspresyonunun BACE1 indüksiyonunu sağlayarak A $\beta$

birikimine yol açabildiğinden (103), miR-186'nın azalmış ekspresyonunun, AH'nin tanısına ve patogeneze yardımcı olmasına yönelik yeni bir olası diagnostik biyobelirteç adayı olabileceği düşünülebilir.

hsa-miR-195, kromozom 17p13.1'de lokalizedir (118). miR-195, insan, rat ve fare APP geninin 3'UTR bölgesini ve BACE1 geninin 3'UTR bölgesini de iki pozisyonda hedeflemektedir (104). *Zhu ve ark. (2012)* miR-195 seviyesinin SAMP8 (Senescence-accelerated mice) farelerdeki BACE1 protein seviyesiyle negatif olarak ilişkili olduğunu bulmuşlardır. Buna ek olarak, Neuro-2a hücrelerinde miR-195'in aşırı ekspresyonunun BACE1 protein seviyesini ve A $\beta$  miktarını azalttığı, miR-195'in inhibisyonunun BACE1 protein seviyesini ve A $\beta$  miktarını artırdığı rapor edilmiştir. Bu sayede, miR-195'in BACE1'in translayonunun inhibisyonuyla A $\beta$  seviyesini azaltabileceği ve AH'ye yönelik terapötik bir strateji sağlanabileceği sonucuna varılmıştır (119). *Ai ve ark. (2013)* da aynı şekilde miR-195'in artmış ekspresyonunun APP ve BACE1 seviyesini azalttığını, miR-195'in inhibisyonuyla düzeylerinin arttığını ve APP ve BACE1'in miR-195 için iki olası hedef olduğunu kronik beyin hipoperfüzyon (KBH)'la indüklenmiş ratların hipokampus ve korteksinde göstermişlerdir. KBH, AH ve vasküler demansın yaygın bir klinik özelliğidir ve A $\beta$  birikimiyle kognitif bozukluk indüklenebilmektedir ancak, mekanizması hala tam anlamıyla anlaşılmış değildir. Ayrıca, miR-195 mimikleri uygulanmış ratlarda, artmış miR-195 ekspresyon seviyesi ile bunamanın azaldığını, böylelikle ratlarda KBH ile indüklenmiş bunamaya karşı miR-195'in koruyucu bir etki gösterdiğini bulmuşlar ve miR-195'in eksojen komplementinin olasılıkla bunamaya karşı paha biçilmez bir yaklaşım olabileceği fikrini öne sürmüşlerdir (104). miR-195'in APP ve BACE1'i hedeflediğini gösteren bir başka çalışma da *Sun ve ark. (2015)* tarafından ortaya konulmuştur. Ratlardaki KBH'nin, APP ve BACE1 ekspresyonunun artışı aracılığıyla, miR-195'in azalmış ekspresyonu tarafından kontrol edilen Cdk/p35'den Cdk/p25'e calpalin aracılı çevrimin aktivasyonu yoluyla tau hiperfosforilasyonunu artırarak indüklenebildiğini göstermişlerdir (120). Yapılan bu tez çalışmasından elde edilen verilere göre, Alzheimer hastası bireylerde kontrollerle kıyaslandığında hsa-miR-195'in fazla eksprese edildiği ve hemen hemen 3,6 katlık bir artışın gerçekleştiği tespit edildi. Bu artışın, istatistiksel olarak anlamlı olmadığı bulundu. Aslında, miR-195, APP ve BACE1'i hedeflediği için AH'de ekspresyon düzeyinde bir azalma beklenmektedir. Bu belirsizliğin aydınlığa kavuşturulması için daha ileri çalışmaların yapılması

gerekmektedir. Bu sayede, miR-195'in hastalığıdaki rolünün ve kandan ekspresyon seviyesinin ölçülmesinin uygun olup olamayacağına daha iyi anlaşılacağı düşünülmektedir.

hsa-miR-219, kromozom 6p21.32'de lokalizedir (121). miR-219'un AH'deki etkisini ilk *Lukiw (2007)* incelemiş ve fetal, erişkin ve Alzheimer beyinlerinin hipokampal CA1 bölgelerinde önemli bir değişiklik saptamamıştır (122). Buna karşın son zamanlarda yapılan çalışmalar, hsa-miR-219a-5p'nin azalmış ekspresyonunun AH gelişiminde etkili olduğunu ve MAPT'yi hedeflediğini göstermiştir. Örneğin, *Santa-Maria ve ark. (2015)* otopsi sonucu elde edilen Alzheimer ve PART (Primary Age Related Tauopathy) hastalarındaki postmortem beyin dokularında miR-219-5p'nin, kontrollerle karşılaştırıldığında düşük düzeyde eksprese edildiğini belirlemişlerdir. Bir sonraki deneylerinde ise, insan tau proteini üreten *Drosophila* modelinde, miR-219-5p ekspresyonunun azalmasının tau toksisitesini artırdığını, ekspresyonun artmasının ise tau toksisitesinin etkisini kısmen azalttığını göstermişlerdir. miR-219-5p'nin çekirdek bölgesindeki 7 nükleotiti, *H. sapiens*, *M. musculus*, *R. norvegicus* ve *D. melanogaster* MAPT geninin 3'UTR'sini hedefler. miR-219-5p'nin tau'yu in vivo olarak düzenlediği gösterildikten sonra, memeli hücre modellerinde miR-219-5p'nin tau mRNA'sının 3'UTR'sine direkt olarak bağlandığını ve post-transkripsiyonel seviyede tau sentezini repress ettiğini bulmuşlardır (105). miR-219'un düşük düzeyde eksprese edildiğini gösteren bir başka çalışmada da, *Denk ve ark (2015)* BOS örneğinde miR-219'un MAPT'yi hedeflediğini ve düşük düzeyde eksprese edildiğini, sonuçta miR-219'un önemli bir informatif biyobelirteç olabileceğini rapor etmişlerdir (123). AH'de miR-219-5p düşük düzeyde eksprese olduğunu gösteren çalışmalara benzer şekilde, bu tez çalışmasında Alzheimer hastası bireylerde miR-219-5p'nin ekspresyon düzeyinde kontrollerle karşılaştırıldığında çok az bir azalmanın olduğu ve bu azalışın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı bulundu. miR-219-5p, MAPT mRNA'sını hedeflediğinden bu durum hasta grubundaki A $\beta$  ve özellikle NFY miktarlarındaki farklılıklardan kaynaklanabileceğini düşündürmektedir.

hsa-miR-3163, kromozom 11q13.2'de lokalizedir (124). hsa-miR-3163, SorLA veya SorL1 (sorting protein-related receptor with A-type repeats) genini %78 hedefler (98). SorLA, VPS10p (vacuolar protein sorting 10 protein) ailesinin bir üyesidir. SorLA çoğunlukla memeli merkezi sinir sisteminde, bilhassa serebral ve entorhinal korteks,

hipokampus, serebellum ve beyin kökünde, bunun yanında over, testis, karaciğer, adrenal bez ve lenf nodlarında da eksprese edilmektedir. SorLA proteini çoğunlukla golgi cisimciklerinde, trans golgi ağında, erken endozomlarda ve hücrenin plazma membranında lokalizedirler (125). Yapılan çalışmalar ve derlemeler, SorLA'daki tek nükleotid polimorfizmlerin ileri yaş AH ile ilişkili olduğunu ve SorLA ekspresyonunun AH'ye yatkın beyin bölgelerinde azaldığını rapor etmişlerdir (126, 127, 128). Bununla birlikte, SorLA'nın AH progresyonundaki rolünü anlamaya yönelik çok sayıda çalışma olmasına rağmen, hala rolü tam anlaşılmış değildir (125). SorLA, intrasellüler kompartımanlar ve plazma membranı arasındaki APP trafiğini regüle eder ve APP'nin A $\beta$ 'ye proteolitik yıkım miktarını azaltır (129). SorLA, APP transportu için bir belirleyicidir, trans golgi ağından APP'lerin çıkışını yavaşlatır ve bu sayede amiloidojenik ve non-amiloidojenik yıkımlardan APP'yi korur (130). SorLA proteininin ileri yaş Alzheimer'lı bireylerin beyin dokularında, özellikle korteks ve hipokampüste önemli derecede azalır, buna karşın BOS'ta seviyeleri azalır veya artar (127). Bu tez çalışmasında, SorLA ile ilişkili olduğu düşünülen hsa-miR-3163'ün ekspresyon seviyesi, kontrollerle karşılaştırıldığında Alzheimer'lı hastalarda yaklaşık 8,4 kat artmış olduğu ve bu farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu bulundu. Bu artış ile SorLA'nın düzeyinin azaldığı, bundan dolayı APP proteolitik yıkımın artarak A $\beta$  miktarında bir artış gerçekleştiği varsayılabilir. Bu varsayımı daha da aydınlatmak için beyin dokularında, BOS'ta olduğu gibi çeşitli vücut sıvılarında miR-3163'ün miktarının ölçülmesi ve validasyon için hücre kültür uygulamalarının gerçekleştirilmesine yönelik birçok çalışmaların yapılması gereklidir. Yine de, daha önceden hsa-miR-3163 ile AH arasındaki ilişkiyi açıklayan çalışmaların olmaması ve bu çalışmanın bir ilk olmasından dolayı, bu bulgu sayesinde hsa-miR-3163'in olası bir aday biyobelirteç sınıfına dahil olabileceği düşünülebilir.

hsa-miR-3613, kromozom 13q14.2 lokalizedir (131). hsa-miR-3613'ün AH ile ilişkisini açıklayan ilk çalışma, *Lugli ve ark. (2015)* tarafından yapılmıştır. Plazmadaki miR-3613-3p seviyesinin kontrole göre, Alzheimer hastalarında yaklaşık olarak 2,5 kat arttığı rapor edilmiştir (132). AH gelişiminde hsa-miR-3613'ün tam olarak hedeflediği genler henüz bilinemese de, öğrenme ve hafıza oluşumunda önemli rol oynayan CREB veya CREB1 (cAMP responsive element binding protein 1) genini %96 skorunda hedeflemektedir (98, 133). CREB'in fosforilasyonla aktive olduğu ve BDNF

transkripsiyonunu başlattığı bilinmektedir (134). *Rosa ve ark. (2015)* yaptıkları çalışmada, A $\beta$  uygulanmış hücrelerin sitoplazma ve nukleusunda, fosforlanmış ve total CREB protein seviyelerinin azaldığını, ayrıca hücre uyarımı olmadığında, A $\beta$ 'nın, A $\beta$ -uyarımlı CREB transkripsiyonel ifadenin azalışı aracılığıyla temel BDNF seviyesini azalttığını ortaya koymuşlardır (134). Bir diğer çalışma da ise, *Chen ve ark. (2012)*, BACE1'in artmış ekspresyonunu, CREB fosforilasyonunu, PKA (protein kinase A) aktivitesini ve cAMP (Siklik adenozin monofosfat) seviyesini azalttığını, buna karşın BACE1'in azalmış ekspresyonunun zıt etki yaptığını rapor etmişlerdir (135). Bu tez çalışmasında, Alzheimer'lı bireylerde hsa-miR-3613-3p'nin ekspresyon düzeyinin kontrollere göre yaklaşık 11 kat arttığı ve bu artışın istatistiksel olarak anlamlı olduğu bulundu. Yapılan çalışmalar ışığında, bu artışın AH'de CREB genini düşük düzeyde eksprese edebileceği ve böylelikle BDNF seviyelerindeki azalma ile öğrenme ve hafıza gelişim bozukluğuna yol açarak AH gelişimine katkı sağlayabileceği fikri öne sürülebilir. Sonuç olarak, hsa-miR-3613-3p ve CREB arasındaki ilişkinin AH patogenezinin olan olası katkısının gelecekte daha ileri düzey deneylerle araştırılması gerekli olduğu düşünülmektedir.

Sonuç olarak, son yıllarda yapılan çalışmalar, miRNA'ların Alzheimer'lı beyin dokularında hatta beynin spesifik bölgelerinde yeniden düzenlendiğini göstermektedir. Ayrıca, ileri analiz teknikleri sayesinde Alzheimer hastalarının kan, BOS, tükürük gibi değişik vücut sıvılarındaki bazı miRNA ekspresyon düzeylerinin, beyin dokusuyla karşılaştırıldığında daha az değişiklik göstermesi sonucuyla bu moleküllerin prognostik biyobelirteç olarak kullanımını gündeme getirmektedir. Çok sayıda miRNA ekspresyon profillerinin belirlenmesi sayesinde, AH'nin patogenezinin daha iyi anlaşılması sağlanabilecek, böylelikle gelecekte AH'ye spesifik biyobelirteçlerin bir ölçüt olarak kullanılması, anti-miR terapötik yöntemlerinin geliştirilmesi gibi farklı klinik uygulamalara yönelik yeni bir kapı açılacaktır.

## 6. SONUÇLAR ve ÖNERİLER

1. Bu çalışma sonucunda, kontrollerle karşılaştırıldığında Alzheimer hastası bireylerde hsa-miR-132-3p, hsa-miR-195-5p ve hsa-miR-219a-5p'nin ekspresyonlarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamazken ( $p>0,05$ ), hsa-miR-186-5p'nin ekspresyonunun anlamlı derecede azaldığı ( $p<0,05$ ), hsa-miR-3163 ve hsa-miR-3613-3p'nin ekspresyonlarının ise önemli derecede arttığı bulundu ( $p<0,05$ ).
2. Bu çalışma sonucundan elde edilen bilgiler, AH'nin ilerleyişinin yavaşlatılması ya da durdurulmasını sağlayan moleküler mekanizmaların aydınlatılmasına, olası biyobelirteçlerin sayısının artırılmasına, erken tanı ve etkin tedavi yöntemlerinin geliştirilmesine yönelik katkı sağlayacak çalışmaların geliştirilmesine olanak sağlayabilecektir.
3. Yapılan çalışmalar, miRNA ekspresyonunun, yaşa, AH evresine, A $\beta$  ve NFY yoğunluğu gibi özelliklere bağlı olarak değiştiğini göstermiştir. Bundan dolayı, bu özelliklere göre miRNA ekspresyon profillerinin belirlenmesinin AH'nin patogenezi daha iyi açıklığa kavuşturabilecek ve böylelikle erken tanıda bir ölçüt olarak kullanılabilmesi için gerekli daha sağlam adımların atılmasına olanak sağlayabilecektir.
4. AH patogenezinin daha iyi aydınlatılması için post-mortem beyin dokularına ihtiyaç duyulmaktadır. Bu ihtiyacın karşılanamaması durumunda her ne kadar hayvan modelleri kullanılsa da, farklı sebeplerden dolayı Alzheimer'lı insan beyni ile tam homoloji gösterememektedir. Kanada, İngiltere, Hollanda gibi ülkelerde Alzheimer'lı post-mortem beyin dokuların bulunduğu enstitülerin olduğu bilinmektedir. Ülkemizde de bir Alzheimer beyin bankasının kurulması, bunun sonucunda beyin bağışlarının artırılması önerilebilir. Bu sayede, hastalığın gizeminin çözülmesine yönelik yeni adımların atılması sağlanabilecektir.
5. Doku örneklerine ulaşma zorluğundan dolayı kan örneğinden gerçekleştirilen bu çalışma sonucu bulunan ekspresyonları yeniden düzenlenmiş miRNA'ların, AH'de efektif bir biyobelirteç olup olmadığının doğrulanması için, post-mortem beyin dokusu, BOS, farklı vücut sıvıları ile deney hayvan modellerinden elde edilecek beyin dokusu, çeşitli vücut sıvıları ve hücre kültür uygulamalarında da ekspresyon ölçümlerinin yapılması önerilmektedir.

6. Seçilen miRNA'ların ilgili genleri hedeflediğini miRBase, miRDataBase, TargetScan, PciTar ve FerroLab biyoinformatik veritabanı araçları kullanılarak gösterilmiştir. Bu hedefler, algoritmik olarak tahmini olduğundan dolayı doğrulama deneylerinin yapılması önerilir.
7. Son olarak, seçilen miRNA'ların polimorfizmleri, hedeflediği gen bölgelerindeki polimorfizmler, hedef gen ekspresyon düzeyleri hatta protein ürün seviyeleri ile protein modifikasyonları incelenerek AH ile ilgili moleküler yolların aydınlatılması ve bu sayede yeni moleküler yolların da bulunabilmesi ile patogenezin daha iyi anlaşılabilmesi sağlanabilecektir.



## 7. KAYNAKLAR

1. **Dickson DW, Weller RO.** *Neurodegeneration: The Molecular Pathology of Dementia and Movement Disorders*. Second Edition, UK: Wiley-Blackwell, **2011**: 1-6.
2. **Brady ST, Siegel GJ, Albers RW, Price DL,** *Basic Neurochemistry Principles of Molecular, Cellular and Medical Neurobiology*. Eighth Edition, USA: Academic Press, **2012**: 721.
3. **Xue-shan Z, Juan P, Qi W, Zhong R, Li-hong P, Zhi-han T, Zhi-sheng J, Gui-xue W, Lu-shan L.** Imbalanced cholesterol metabolism in Alzheimer's disease. *Clinica Chimica Acta*, **2016**; 456:107-114.
4. **Anand R, Gill KD, Mahdi AA.** Therapeutics of Alzheimer's disease: Past, present and future. *Neuropharmacology*, **2014**; 76: 27-50.
5. **Zhao S, Zhao J, Zhang T, Guo C.** Increased apoptosis in the platelets of patients with Alzheimer's disease and amnesic mild cognitive impairment. *Clinical Neurology and Neurosurgery*, **2016**; 143:46-50.
6. **Zhao Y, Bhattacharjee S, Dua P, Alexandrov PN, Lukiw WJ.** MicroRNA-based biomarkers and the diagnosis of Alzheimer's disease. *Frontiers in Neurology*, **2015**; 6(162):1-5.
7. **Cogoni C, Ruberti F, Barbato C.** MicroRNA Landscape in Alzheimer's Disease. *CNS & Neurological Disorders - Drug Targets*, **2015**; 14(2):168-175.
8. **Dong H, Lei J, Ding L, Wen Y, Ju H, Zhang X.** MicroRNA: Function, Detection, and Bioanalysis. *Chemical Reviews*, **2013**; 113:6207-6233.
9. **Li J, Zhang Z.** miRNA regulatory variation in human evolution. *Trends in Genetics*, **2013**; 29(2):116-124.
10. **Yang W, Lee DY, Ben-david Y.** The roles of microRNAs in tumorigenesis and angiogenesis. *International Journal of Physiology, Pathophysiology and Pharmacology*, **2011**; 3(2):140-155.
11. **Ardekani AM, Naeini MM.** The role of microRNAs in human diseases. *Avicenna Journal of Medical Biotechnology*, **2010**; 2(4):161-179.
12. **Li Y, Kowdley KV.** MicroRNAs in common human diseases. *Genomics Proteomics Bioinformatics*, **2012**; 10:246-253.
13. **Hanağası HA.** Demans havramı ve hastaya yaklaşım. *Klinik Gelişim*, **2001**; 23(1):44-47.
14. **Gürvit İH.** Demans sendromu, Alzheimer hastalığı ve Alzheimer dışı demanslar, Erişim: <http://www.itfnoroloji.org/demans/demans.htm>. Erişim tarihi: 17.09.2015.



15. **Kumar V, Abbas AK, Aster JC.** Robbins Temel Patoloji. Ed: Tuzlalı S, Güllüoğlu M, Çevikbaş U. *Nobel Tıp Kitabevleri*, Dokuzuncu Baskı, İstanbul, **2014**: 837-38.
16. **Özkay ÜD, Öztürk Y, Can ÖD.** Yaşlanan dünyanın hastalığı: Alzheimer hastalığı. *SDÜ Tıp Fakültesi Dergisi*, **2011**; 18(8):35-42.
17. **Sorensen SS, Nygaard AB, Christensen T.** miRNA expression profiles in cerebrospinal fluid and blood of patients with Alzheimer's disease and other types of dementia – an exploratory study. *Translational Neurodegeneration*, **2016**; 5(6):1-12.
18. **Peters DG, Connor JR, Meadowcroft MD.** The relationship between iron dyshomeostasis and amyloidogenesis in Alzheimer's disease: Two sides of the same coin. *Neurobiology of Disease*, **2015**; 81:49-65.
19. **Terry RD, Katzman R, Bick KL, Sisodia SS.** Alzheimer Hastalığı. Ed: Gürvit İH. *Yelkovan Yayıncılık*, İkinci Baskı, İstanbul, **2001**: 1-9.
20. **Alzheimer's Disease International.** Alois Alzheimer, Erişim: <http://www.alz.co.uk/alois-alzheimer>. Erişim tarihi: 18.09.2015.
21. **Selekler K.** Alois Alzheimer ve Alzheimer hastalığı. *Türk Geriatri Dergisi*, **2010**; 13(3):9-14.
22. **Maurer K, Volk S, Gerbaldo H.** Auguste D and Alzheimer's disease. *Lancet*, **1997**; 349(9064):1546-1549.
23. **Golde TE, Petrucelli L, Lewis J.** Targeting A $\beta$  and tau in Alzheimer's disease, an early interim report. *Experimental Neurology*, **2010**; 223(2):252-266.
24. **Vilatela A, Marisol L, Yescas-g P.** Genetics of Alzheimer's Disease. *Archives of Medical Research*, **2012**; 43:622-631.
25. **Reitz C, Mayeux R.** Alzheimer disease: Epidemiology, diagnostic criteria, risk factors and biomarkers. *Biochemical Pharmacology*, **2014**; 88(4):640-651.
26. **Cummings J.** Alzheimer's disease diagnostic criteria: Practical applications. *Alzheimer's Research & Therapy*, **2012**; 4(4):35.
27. **Prince M, Wimo A, Guerchet M, Gemma-Claire A, Wu Y-T, Prina M.** World Alzheimer report 2015: The global impact of dementia - An analysis of prevalence, incidence, cost and trends. *Alzheimer's Disease International (ADI)*, London, **2015**; 1-84.
28. **Association A.** 2016 Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimer's & Dementia*, **2016**; 12:459-509.

29. Köprülü, S. Türkiye’de 450 Bin Alzheimer Hastası Var. Erişim: <http://www.yenimeram.com.tr/turkiyede-450-bin-alzheimer-hastasi-var-90251.htm>. Erişim tarihi: 30.09.2015.
30. T.C. Sağlık Bakanlığı Türkiye Kamu Hastaneleri Kurumu, Dünya Alzheimer Farkındalık Günü 21 Eylül 2015 Rapor Bülteni, Erişim: <http://www.tkhk.gov.tr/Dosyalar/4b30930a266d4833adf9223afa9926ce.pdf>. Erişim tarihi: 01.10.2015.
31. Türkiye İstatistik Kurumu (TÜİK), İstatistiklerle Yaşlılar 2014, Erişim: <http://www.tuik.gov.tr/PreHaberBultenleri.do?id=18620>. Erişim tarihi: 01.10.2015.
32. **İmtiaz B, Tolppanen A, Kivipelto M, Soininen H.** Future directions in Alzheimer’s disease from risk factors to prevention. *Biochemical Pharmacology*, **2014**; 88(4):661-670.
33. **Farris W, Mansourian S, Chang Y, Lindsley L, Eckman EA, Frosch MP, Eckman CB, Tanzi RE, Selkoe DJ, Guenette S.** Insulin-degrading enzyme regulates the levels of insulin, amyloid  $\beta$ -protein, and the  $\beta$ -amyloid precursor protein intracellular domain in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **2003**; 100(7):4162-4167.
34. Alzheimer Society of Canada, Risk factors, Erişim: <http://www.alzheimer.ca/en/About-dementia/Alzheimer-s-disease/Risk-factors>. Erişim tarihi: 08.10.2015.
35. Alzheimer’s Association, Risk Factors, Erişim: [http://www.alz.org/alzheimers\\_disease\\_causes\\_risk\\_factors.asp](http://www.alz.org/alzheimers_disease_causes_risk_factors.asp). Erişim tarihi: 08.10.2015.
36. **Association A.** 2014 Alzheimer’s disease facts and figures. *Alzheimer’s & Dementia*, **2014**; 10(2):47-92.
37. **Gao S, Hendrie HC, Hall KS, Hui S.** The relationships between age, sex, and the incidence of dementia and Alzheimer disease: a meta-analysis. *Archives of General Psychiatry*, **1998**; 55(9):809-815.
38. **Mielke MM, Vemuri P, Rocca WA.** Clinical epidemiology of Alzheimer’s disease: Assessing sex and gender differences. *Clinical Epidemiology*, **2014**; 6:37-48.
39. **Viña J, Lloret A.** Why women have more Alzheimer’s disease than men: gender and mitochondrial toxicity of amyloid-beta peptide. *Journal of Alzheimer's Disease*, **2010**; 20:527-533.
40. **Zhang C, Browne A, Kim DY, Tanzi RE.** Familial Alzheimer’s disease mutations in presenilin 1 do not alter levels of the secreted amyloid- $\beta$  protein precursor generated by  $\beta$ -secretase cleavage. *Current Alzheimer Research*, **2010**; 7(1):21-26.
41. **Alagiakrishnan K, Gill SS, Fagarasanu A.** Genetics and epigenetics of Alzheimer’s disease. *Postgraduate Medical Journal*, **2012**; 88(1043):522-529.

42. **Van Cauwenberghe C, Van Broeckhoven C, Sleegers K.** The genetic landscape of Alzheimer disease: clinical implications and perspectives. *Genetics in Medicine*, **2016**; 18(5):421-430.
43. **Öztürk Ş.** Apolipoprotein E ve Alzheimer hastalığı. *Demans Dizisi*, **1999**; 1:62-67.
44. **Heinbockel T.** *Neurochemistry*, InTech, US, **2014**, 257-374.
45. **Dawkins E, Small DH.** Insights into the physiological function of the  $\beta$ -amyloid precursor protein: beyond Alzheimer's disease. *Journal of Neurochemistry*, **2014**; 129:756-769.
46. Genetics Home Reference - National Institutes of Health, APP, Erişim: <http://ghr.nlm.nih.gov/gene/APP>. Erişim tarihi: 08.11.2015.
47. **Suh YH, Checler F.** Amyloid precursor protein, presenilins, and  $\alpha$ -synuclein: Molecular pathogenesis and pharmacological applications in Alzheimer's disease. *Pharmacological Reviews*, **2002**; 54:469-525.
48. **Raskin J, Cummings J, Hardy J, Schuh K, Dean RA.** Neurobiology of Alzheimer's disease: Integrated molecular, physiological, anatomical, biomarker, and cognitive dimensions. *Current Alzheimer Research*, **2015**; 12:712-722.
49. **Pauwels K, Williams TL, Morris KL, Jonckheere W, Vandersteen A, Kelly G, Schymkowitz J, Rousseau F, Pastore A, Serpell LC, Broersen K.** Structural basis for increased toxicity of pathological A $\beta$ 42:A $\beta$ 40 ratios in Alzheimer disease. *The Journal of Biological Chemistry*, **2012**; 287(8):5650-5660.
50. **Mawuenyega KG, Sigurdson W, Ovod V, Munsell L, Kasten T, Morris JC, Yarasheski KE, Bateman RJ.** Decreased clearance of CNS-Amyloid in Alzheimer's disease. *Science*, **2010**; 330(6012):1774-1774.
51. **Öztürk GB, Karan MA.** Alzheimer hastalığının fizyopatolojisi. *Klinik Gelişim*, **2009**; 22(3):36-44.
52. **Buée L, Bussi ere T, Bu e-Scherrer V, Delacourte A, Hof PR.** Tau protein isoforms, phosphorylation and role in neurodegenerative disorders. *Brain Research Reviews*, **2000**; 33(1):95-130.
53. **Kolarova M, García-Sierra F, Bartos A, Ricny J, Ripova D.** Structure and pathology of tau protein in Alzheimer disease. *International Journal of Alzheimer's Disease*, **2012**; 2012:1-13.
54. **Mietelska-Porowska A, Wasik U, Goras M, Filipek A, Niewiadomska G.** Tau protein modifications and interactions: Their role in function and dysfunction. *International Journal of Molecular Sciences*, **2014**; 15(3):4671-4713.
55. **Zerr I.** Understanding Alzheimer's disease. *InTech*, Croatia, **2013**, 89-100.

56. **Duan Y, Dong S, Gu F, Hu Y, Zhao Z.** Advances in the pathogenesis of Alzheimer's disease: Focusing on tau-mediated neurodegeneration. *Translational Neurodegeneration*, **2012**; 1(24):1-7.
57. **Almeida MI, Reis RM, Calin GA.** MicroRNA history: Discovery, recent applications, and next frontiers. *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, **2011**; 717(1-2):1-8.
58. **Satoh JI, Kino Y, Niida S.** MicroRNA-seq data analysis pipeline to identify blood biomarkers for Alzheimer's disease from public data. *Biomarker Insights*, **2015**; 10:21-31.
59. **Prendecki M, Dorszewska J.** The role of microRNA in the pathogenesis and diagnosis of neurodegenerative diseases. *Austin Alzheimer's and Parkinson's Disease*, **2014**;1(3):1-10.
60. **Krol J, Loedige I, Filipowicz W.** The widespread regulation of microRNA biogenesis, function and decay. *Nature Reviews Genetics*, **2010**; 11:597-610.
61. **Ha M, Kim VN.** Regulation of microRNA biogenesis. *Nature reviews Molecular cell biology*, **2014**; 15(8):509-524.
62. **Tétreault N, De Guire V.** miRNAs: Their discovery, biogenesis and mechanism of action. *Clinical Biochemistry*, **2013**; 46:842-845.
63. **Mari-Alexandre J, Sánchez-Izquierdo D, Gilabert-Estellés J, Barceló-Molina M, Braza-Boils A, Sandoval J.** miRNAs regulation and its role as biomarkers in endometriosis. *International Journal of Molecular Sciences*, **2016**; 17(1):1-16.
64. **Griffiths-Jones S, Grocock RJ, van Dongen S, Bateman A, Enright AJ.** miRBase: MicroRNA sequences, targets and gene nomenclature. *Nucleic acids research*, **2006**; 34(Database issue):140-144.
65. **Kozomara A, Griffiths-Jones S.** miRBase: Annotating high confidence microRNAs using deep sequencing data. *Nucleic acids research*, **2014**; 42(D1):68-73.
66. **Genç Ş.** *MikroRNA ve Sinir Sistemi*. Ankara: TÜBA, **2011**: 11-14.
67. miRBase, Nomenclature. Erişim: <http://www.mirbase.org/help/nomenclature.shtml>. Erişim tarihi: 23.02.2016.
68. **Ghorai A, Ghosh U.** miRNA gene counts in chromosomes vary widely in a species and biogenesis of miRNA largely depends on transcription or post-transcriptional processing of coding genes. *Frontiers in Genetics*, **2014**; 5(100):1-11.
69. **Li R.** *Forensic Biology*, 2nd. Ed., New York: CRC Press, **2015**: 85.

70. **Jiu S, Zhu X, Wang J, Zhang C, Mu Q, Wang C, Fang J.** Genome-wide mapping and analysis of grapevine microRNAs and their potential target genes. *Plant Genome*, **2015**; 8(2):1-16.
71. **Olena AF, Patton JG.** Genomic organization of microRNAs. *Journal of Cellular Physiology*, **2010**; 222(3):540-545.
72. **Güzelgöl F, Aksoy K.** Bir gen ifade düzenleyicisi miRNA. *Arşiv Kaynak Tarama Dergisi*, **2015**; 24(4):472-493.
73. **Melo CA, Melo SA.** Biogenesis and Physiology of MicroRNAs. In: Fabbri M. Eds. *Non-coding RNAs and Cancer*, 1st Ed., New York: Springer, **2014**:5-23.
74. **O'Carroll D, Schaefer A.** General principals of miRNA biogenesis and regulation in the brain. *Neuropsychopharmacology*, **2013**; 38(1):39-54.
75. **Hammond SM.** An overview of microRNAs. *Advanced Drug Delivery Reviews*. **2015**; 87:3-14.
76. **Kim VN.** MicroRNA biogenesis: Coordinated cropping and dicing. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, **2005**; 6(5):376-385.
77. **Yi R, Qin Y, Macara IG, Cullen BR.** Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs. *Genes and Development*, **2003**; 17(24):3011-3016.
78. **He L, Hannon GJ, Harbor CS.** MicroRNAs: Small RNAs with a big role in gene regulation. *Nature Reviews Genetics*, **2004**; 5(July):522-534.
79. **Winter J, Jung S, Keller S, Gregory RI, Diederichs S.** Many roads to maturity: microRNA biogenesis pathways and their regulation. *Nature Cell Biology*, **2009**; 11(3):228-234.
80. **Rouzer CA.** How MicroRNAs Modulate Gene Expression. Erişim: [http://www.vanderbilt.edu/vicb/DiscoveriesArchives/microRNAs\\_gene\\_expression.html](http://www.vanderbilt.edu/vicb/DiscoveriesArchives/microRNAs_gene_expression.html). Erişim tarihi: 04.03.2016.
81. **Cheloufi S, Dos Santos CO, Chong MMW, Hannon GJ.** A Dicer-independent miRNA biogenesis pathway that requires Ago catalysis. *Nature*, **2010**; 465(7298):584-589.
82. **Filipowicz W, Bhattacharyya SN, Sonenberg N.** Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: Are the answers in sight? *Nature reviews Genetics*, **2008**; 9(2):102-114.
83. **Hausser J, Zavolan M.** Identification and consequences of miRNA-target interactions - beyond repression of gene expression. *Nature reviews Genetics*, **2014**; 15(9):599-612.
84. **Gürkök T, Boztepe G, Koyuncu M, Parmaksız İ.** P Cisimcikleri ve mRNA döngüsü. *Gaziosmanpaşa Bilimsel Araştırma Dergisi*. **2013**; 5:54-60.

85. **Tan L, Yu J, Hu N, Tan L.** Non-coding RNAs in Alzheimer's disease. *Molecular Neurobiology*, **2013**; 47:382-393.
86. **Delay C, Mandemakers W, Hébert SS.** MicroRNAs in Alzheimer's disease. *Neurobiology of Disease*, **2012**; 46(2):285-290.
87. **Maciotta S, Meregalli M, Torrente Y.** The involvement of microRNAs in neurodegenerative diseases. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, **2013**; 7(265):1-17.
88. **Goodall EF, Heath PR, Bandmann O, Kirby J, Shaw PJ.** Neuronal dark matter: the emerging role of microRNAs in neurodegeneration. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, **2013**; 7(178):1-16.
89. **Satoh JI.** Molecular network of microRNA targets in Alzheimer's disease brains. *Experimental Neurology*. **2012**; 235(2):436-446.
90. **Öner MG.** Alzheimer hastalığında yeni biyomarkır geliştirilmesi: Serumdan mikroRNA analizi. Yüksek Lisans Tezi, Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İzmir, **2012**.
91. **Femminella GD, Ferrara N, Rengo G.** The emerging role of microRNAs in Alzheimer's disease. *Frontiers in Physiology Clinical and Translational Physiology*, **2015**; 6(40):1-5.
92. **Grasso M, Piscopo P, Confaloni A, Denti M.** Circulating miRNAs as biomarkers for neurodegenerative disorders. *Molecules*, 2014; 19(5):6891-6910.
93. **Nagy Z, Igaz P.** Introduction to microRNAs: Biogenesis, Action, Relevance of Tissue microRNAs in Disease Pathogenesis, Diagnosis and Therapy—The Concept of Circulating microRNAs. In: Igaz P. Eds. *Circulating microRNAs in Disease Diagnostics and their Potential Biological Relevance*, 1st ed., Switzerland: Springer Basel, **2015**: 23
94. **Schipper HM, Maes OC, Chertkow HM, Wang E.** MicroRNA expression in Alzheimer blood mononuclear cells. *Gene regulation and systems biology*, **2007**; 1:263-274.
95. **Leidinger P, Backes C, Deutscher S, Schmitt K, Mueller SC, Frese K, Haas J, Ruprecht K, Paul F, Stähler C, Lang CJ, Meder B, Bartfai T, Meese E, Keller A.** A blood based 12-miRNA signature of Alzheimer disease patients. *Genome Biology*, **2013**; 14(7):1-16.
96. **Dong H, Li J, Li J, Huang L, Chen X, Li D, Wang T, Hu C, Xu J, Zhang C, Zen K, Xiao S, Yan Q, Wang C, Zhang CY.** Serum microRNA profiles serve as novel biomarkers for the diagnosis of Alzheimer's disease. *Disease Markers*, **2015**; 2015:1-11.
97. miRBase Release 21. Erişim: <http://www.mirbase.org>. Erişim tarihi: 25.04.2016.
98. miRDataBase. Erişim: <http://mirdb.org/miRDB>. Erişim tarihi: 09.05.2016.

99. TargetScan Release 7.0, Prediction of microRNA targets, Erişim: <http://www.targetscan.org>. Erişim tarihi: 09.05.2016.
100. PicTar. Erişim: <http://pictar.mdc-berlin.de>. Erişim tarihi: 09.05.2016.
101. Ferrolab. Erişim: <http://ferrolab.dmi.unict.it/miro>. Erişim tarihi: 09.05.2016.
102. **Kim J, Yoon H, Chung D-E, Brown JL, Belmonte KC, Kim J.** miR-186 is decreased in aged brain and suppresses BACE1 expression. *Journal of Neurochemistry*, **2016**; 137:436-445.
103. **Halima SB, Siegel G, Rajendran L.** miR-186 in Alzheimer's disease: A big hope for a small RNA? *Journal of Neurochemistry*, **2016**; 137:308-311.
104. **Ai J, Sun LH, Che H, Zhang R, Zhang TZ, Wu WC, Su XL, Chen X, Yang G, Li K, Wang N, Ban T, Bao YN, Guo F, Niu HF, Zhu YL, Zhu XY, Zhao SG, Yang BF.** MicroRNA-195 protects against dementia induced by chronic brain hypoperfusion via its anti-amyloidogenic effect in rats. *Journal of Neuroscience*, **2013**; 33(9):3989-4001.
105. **Santa-Maria I, Alaniz ME, Renwick N, Cela C, Fulga TA, Vactor DV, Tuschl T, Clark LN, Shelanski M, McCabe BD, Crary JF.** Dysregulation of microRNA-219 promotes neurodegeneration through post-transcriptional regulation of tau. *Journal of Clinical Investigation*, **2015**; 125(2):681-686.
106. Metabion International AG, Reporter/Quencher combinations, Erişim: [http://www.metabion.com/products/zna\\_prices.php](http://www.metabion.com/products/zna_prices.php). Erişim tarihi: 03.05.2016.
107. Metabion International AG, ZNA®-Oligonucleotides Introduction, Erişim: <http://www.metabion.com/products/zna.php>. Erişim tarihi: 03.05.2016.
108. Glen Research, Spermine Phosphoramidite: A potent modification with many applications, Erişim: <http://www.glenresearch.com/GlenReports/GR24-11.html>. Erişim: 03.05.2016.
109. **Schmittgen TD, Livak KJ.** Analyzing real-time PCR data by the comparative C<sub>T</sub> method. *Nature Protocols*, **2008**; 3(6):1101-1108.
110. SPSS Inc. SPSS for windows. Version 11.5, Chicago: SPSS Inc., **2002**.
111. National Center for Biotechnology Information, hsa-miR-132, Erişim: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/406921>. Erişim Tarihi: 09.05.2016.
112. **Smith PY, Hernandez-Rapp J, Jolivette F, Lecours C, Bisht K, Goupil C, Dorval V, Parsi S, Morin F, Planel E, Bennett DA, Fernandez-Gomez FJ, Sergeant N, Buee L, Tremblay ME, Calon F, Hebert SS.** miR-132/212 deficiency impairs tau metabolism and promotes pathological aggregation in vivo. *Human Molecular Genetics*, **2015**; 24(23):6721-6735.

113. **Lau P, Bossers K, Janky R, Salta E, Frigerio CS, Barbash S, Rothman R, Sierksma ASR, Thathiah A, Greenberg D, Papadopoulou AS, Achsel T, Ayoubi T, Soreq H, Verhaagen J, Swaab DF, Aerts S, Strooper BD.** Alteration of the microRNA network during the progression of Alzheimer's disease. *EMBO Molecular Medicine*, **2013**; 5(10):1613-1634.
114. **Wong HKA, Veremeyko T, Patel N, Lemere CA, Walsh DM, Esau C, Vanderburg C, Krichevsky AM.** De-repression of FOXO3a death axis by microRNA-132 and -212 causes neuronal apoptosis in Alzheimer's disease. *Human Molecular Genetics*, **2013**; 22(15):3077-3092.
115. National Center for Biotechnology Information, hsa-miR-186, Erişim: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/?term=hsa-mir-186>. Erişim Tarihi: 09.05.2016.
116. **Goo JS, Kim YB, Shim SB, Jee SW, Lee SH, Kim JE, Hwang IS, Lee YJ, Kwak MH, Lim CJ, Hong JT, Hwang DY.** Nicastrin overexpression in transgenic mice induces aberrant behavior and APP processing. *Molecular Neurobiology*, **2013**; 48:232-243.
117. **Delay C, Dorval V, Fok A, Grenier-Boley B, Lambert JC, Hsiung GY, Hébert SS.** MicroRNAs targeting Nicastrin regulate A $\beta$  production and are affected by target site polymorphisms. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, **2014**; 7(67):1-7.
118. National Center for Biotechnology Information, hsa-miR-195, Erişim: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/?term=hsa-mir-195>. Erişim Tarihi: 09.05.2016.
119. **Zhu HC, Wang LM, Wang M, Song B, Tan S, Teng JF, Duan DX.** MicroRNA-195 downregulates Alzheimer's disease amyloid-beta production by targeting BACE1. *Brain Research Bulletin*, **2012**; 88(6):596-601.
120. **Sun LH, Ban T, Liu CD, Chen QX, Wang X, Yan ML, Hu XL, Su XL, Bao YN, Sun LL, Zhao LJ, Pei SC, Jiang XM, Zong DK, Ai J.** Activation of Cdk5/p25 and tau phosphorylation following chronic brain hypoperfusion in rats involves microRNA-195 down-regulation. *Journal of Neurochemistry*. **2015**; 134(6):1139-1151.
121. National Center for Biotechnology Information, hsa-miR-219a-5p, Erişim: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/?term=hsa-miR-219a-5p>. Erişim Tarihi: 09.05.2016.
122. **Lukiw WJ.** Micro-RNA speciation in fetal, adult and Alzheimer's disease hippocampus. *NeuroReport*, **2007**; 18(3):297-300.
123. **Denk J, Boelmans K, Siegismund C, Lassner D, Arlt S, Jahn H.** MicroRNA profiling of CSF reveals potential biomarkers to detect Alzheimer's disease. *PLoS One*, **2015**; 10(5):1-18.
124. National Center for Biotechnology Information, hsa-miR-3163, Erişim: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/?term=hsa-miR-3163>. Erişim Tarihi: 09.05.2016.
125. **Thakurta IG, Andersen OM.** Associations of SorLA/SORL1 with Alzheimer's disease. *Receptors & Clinical Investigation*, **2015**; 2:1-15.



126. **Rogaeva E, Meng Y, Lee JH, Gu Y, Kawarai T, Zou F, Katayama T, Baldwin CT, Cheng R, Hasegawa H, Chen F, Shibata N, Lunetta KL, Pardossi-Piquard R, Bohm C, Wakutani Y, Cupples LA, Cuenco KT, Green RC, Pinessi L, Rainero I, Sorbi S, Bruni A, Duara R, Friedland RP, Inzelberg R, Hampe W, Bujo H, Song YQ, Andersen OM, Willnow TE, Graff-Radford N, Petersen RC, Dickson D, Der SD, Eraser PE, Schmitt-Ulms G, Younkin S, Mayeux R, Farrer L, George-Hyslop PS.** The neuronal sortilin-related receptor SORL1 is genetically associated with Alzheimer's Disease. *Nature Genetics*, **2007**; 39(2):168-177.
127. **Yin RH, Yu JT, Tan L.** The role of SORL1 in Alzheimer's disease. *Molecular Neurobiology*, **2014**; 51:909-918.
128. **Fjorback AW, Seaman M, Gustafsen C, Mehmedbasic A, Gokool S, Wu C, Militz D, Schmidt V, Madsen P, Nyengaard JR, Willnow TE, Christensen EI, Mobley WB, Nykjaer A, Andersen OM.** Retromer binds the FANSHY sorting motif in SorLA to regulate amyloid precursor protein sorting and processing. *The Journal of Neuroscience*, **2012**; 32(4):1467-1480.
129. **Capsoni S, Carlo AS, Vignone D, Amato G, Criscuolo C, Willnow TE, Cattaneo A.** SorLA deficiency dissects amyloid pathology from tau and cholinergic neurodegeneration in a mouse model of Alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer's Disease*, **2013**; 33(2):357-371.
130. **Fjorback AW, Andersen OM.** SorLA is a molecular link for retromer-dependent sorting of the Amyloid precursor protein. *Communicative & Integrative Biology*, **2012**; 5(6):616-619.
131. National Center for Biotechnology Information, hsa-miR-3613-3p, Erişim: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/?term=hsa-miR-3613>. Erişim Tarihi: 09.05.2016.
132. **Lugli G, Cohen AM, Bennett DA, Shah RC, Fields J, Hernandez AG, Smalheiser NR.** Plasma exosomal miRNAs in persons with and without Alzheimer disease: Altered expression and prospects for biomarkers. *Plos One*, **2015**; 1-18.
133. **Hernandez-Rapp J, Smith PY, Filali M, Goupil C, Planel E, Magill ST, Goodman RH, Hébert SS.** Memory formation and retention are affected in adult miR-132/212 knockout mice. *Behavioural Brain Research*, **2015**; 287:15-26.
134. **Rosa E, Fahnestock M.** CREB expression mediates amyloid  $\beta$ -induced basal BDNF downregulation. *Neurobiology of Aging*, **2015**; 36(8):2406-2413.
135. **Chen Y, Huang X, Zhang Y, Rockenstein E, Bu G, Golde TE, Masliah E, Xu H.** Alzheimer's  $\beta$ -Secretase (BACE1) regulates the cAMP/PKA/CREB pathway independently of  $\beta$ -Amyloid. *The Journal of Neuroscience*, **2012**; 32(33):11390-11395.

## 8. ÖZGEÇMİŞ

03.08.1989 tarihinde Ankara-Çankaya’da doğdu. 2011 yılında Gazi Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü’nden mezun oldu. 2011 yılında Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı (Moleküler Biyoloji ve Genetik)’nda yüksek lisans eğitimine başladı ve 2016 yılında mezun oldu. 2013 yılında Gazi Üniversitesi Formasyon eğitimini tamamladı. Gazi Üniversitesi eğitimlerini Türk Eğitim Vakfı (TEV) Başarı Bursu’yla tamamladı. Lisans eğitiminde TEV’den burslu yabancı dil eğitimi ve onur öğrenci ödülünü, yüksek lisans eğitiminde yüksek onur öğrenci ödülünü aldı. 2016 yılında Anadolu Üniversitesi İktisat Fakültesi Uluslararası İlişkiler Bölümü’nden mezun oldu. 2013 yılında Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji AD’ye ÖYP araştırma görevlisi olarak göreve başladı. 2013 yılında Mersin Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyoloji AD’de yüksek lisans eğitimine başladı ve halen devam etmektedir.