

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

**ALZHEİMER HASTALARINDA BAZI MİKRORNA'LARIN  
İFADELERİ VE OLUŞUM YOLAĞINDA ROL OYNAYAN  
GENLERİN POLİMORFİZMLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Şenay GÖRÜCÜ YILMAZ

DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN

Prof. Dr. M. Emin ERDAL

MERSİN – 2013

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

**ALZHEİMER HASTALARINDA BAZI MİKRORNA'LARIN  
İFADELERİ VE OLUŞUM YOLAĞINDA ROL OYNAYAN  
GENLERİN POLİMORFİZMLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

**Şenay GÖRÜCÜ YILMAZ**

**DOKTORA TEZİ**

**DANIŞMAN**

**Prof. Dr. M. Emin ERDAL**

**Bu tez, Mersin Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından  
BAP-SBE TB (ŞGY) 2010-4 nolu proje olarak desteklenmiştir.**

**Tez No: 35**

**MERSİN – 2013**

## Mersin Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı Doktora Programı Çerçevesinde yürütülmüş olan “Alzheimer Hastalarında Bazı mikroRNA’ların İfadeleri ve Oluşum Yoluğında Rol Oynayan Genlerin Polimorfizmlerinin Araştırılması” adlı çalışma, jürimiz tarafından Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 17 /05/2013

Prof. Dr. Mehmet Emin ERDAL  
Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi  
Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı  
Jüri Başkanı

Prof. Dr. Ümit LÜLEYAP  
Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi  
Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı  
Jüri Üyesi

Doç. Dr. İ. Ömer BARLAS  
Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi  
Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı  
Jüri Üyesi

Yrd. Doç. Dr. M. Ertan AY  
Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi  
Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı  
Jüri Üyesi

Yrd. Doç. Dr. Özlem İZCİ AY  
Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi  
Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı  
Jüri Üyesi

Bu tez, Enstitü Yönetim Kurulunun 23..105.2013 tarih ve 2013/104 sayılı kararı ile kabul edilmiştir.

Enstitü Müdürü

Doç. Dr. S. Necat YILMAZ



## TEŞEKKÜR

Akademisyenlik mesleğinin öğrenilmesinde ara kademelerden biri olan doktora eğitimimin sonuna gelmiş bulunuyorum. Mesleğimin ayrıntılarını öğrenmek ve çalıştığım yolda faydalı olmak için önümde aşmam gereken birçok engel olduğunun farkında olarak;

Doktora eğitimim süresince ilminden faydalandığım, insani ve ahlaki değerleri ile de örnek edindiğim, yanında çalışmaktan onur duyduğum danışman hocam, Sn. Prof. Dr. M. Emin ERDAL'a tecrübelerinden yararlanırken göstermiş olduğu hoşgörü ve sabırdan dolayı teşekkür ediyorum.

Anabilim dalımızın değerli hocaları; Doç. Dr. İ. Ömer BARLAS'a, Yrd. Doç. Dr. Özlem İZCİ AY'a, Yrd. Doç. Dr. M. Ertan AY'a ve Farmakoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Yrd. Doç. Dr. İsmail Ün'e doktora eğitimim boyunca yaptıkları bilimsel ve akademik katkılarından dolayı teşekkür ederim.

Alzheimer tanısı almış bireylerden kan örneklerinin toplanmasını organize eden ve çalışmamıza destek veren Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Nöroloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Sayın Prof. Dr. Aynur AVCI ÖZGE'ye ve nöroloji kliniği çalışanlarına teşekkür ediyorum.

İstatistiksel analizlerin yapılmasında Biyoistatistik ve Tıbbi Bilişim Ana Bilim Dalı'ndan Arş. Gör. M. Ali SUNGUR'a ve her türlü desteklerini benden esirgemeyen çalışma arkadaşlarıma teşekkür ediyorum.

Bu günlere gelmemde büyük emeği olan, beni hiçbir zaman yalnız bırakmayan, gölgesinde huzur bulduğum canım babama ve kardeşime, hayatımın her noktasında beni destekleyen, iki çocuğumu sabırla yetiştiren ve hiçbir zaman yorulmayan anneme ödenmesi mümkün olmayan emekleri için teşekkür ediyorum.

Hayatımı birleştirmekten onur duyduğum, her şartta gösterdiği sevgi ve sabır için sevgili eşime, yaşama sevincim olan oğullarıma teşekkür ediyorum.

# İÇİNDEKİLER

	Sayfa
<b>KABUL ve ONAY</b> .....	<b>i</b>
<b>TEŞEKKÜR</b> .....	<b>ii</b>
<b>İÇİNDEKİLER</b> .....	<b>iii</b>
<b>ŞEKİLLER DİZİNİ</b> .....	<b>vi</b>
<b>ÇİZELGELER DİZİNİ</b> .....	<b>viii</b>
<b>SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ</b> .....	<b>ix</b>
<b>ÖZET</b> .....	<b>xi</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>xii</b>
<b>1. GİRİŞ</b> .....	<b>1</b>
<b>2. GENEL BİLGİLER</b> .....	<b>4</b>
2.1. Alzheimer Hastalığı (AH).....	4
2.1.1. Alzheimer Hastalığının Evrelendirilmesi .....	5
2.1.2. Alzheimer Hastalığının Klinik ve Genetik Tanısı .....	6
2.1.3. Alzheimer Hastalığında Etkili Genetik Mekanizmalar .....	9
2.2. miRNA.....	12
2.2.1. miRNA'ların Sınıflandırılması ve Adlandırılması .....	13
2.2.2. miRNA Oluşum Yolağı .....	15
2.2.2.1. Klasik miRNA Oluşum Yolağı ve Bu Yolakta Yer Alan Bileşenler.....	15
2.2.2.2. Klasik Olmayan miRNA Oluşum Yolağı.....	24
2.2.3. miRNA Oluşum Yolağı ile İlişkili Polimorfizmler .....	25
2.2.4. miRNA ile Hedef mRNA Arasındaki Etkileşim.....	26
2.2.5. miRNA: Translasyonel Gen İfadesini Düzenler .....	30
2.2.6. miRNA Uygulamaları .....	32
<b>3. GEREÇ ve YÖNTEM</b> .....	<b>34</b>
3.1. Kullanılan Araç-Gereçler, Kimyasallar ve Sarf Malzemeleri .....	34
3.1.1. Kullanılan Araçlar-Gereçler .....	34
3.1.2. Kullanılan Kimyasallar ve Sarf Malzemeleri .....	34
3.2. Kontrol-Hasta Gruplarının Oluşturulması .....	35
3.3. Periferik Kandan RNA ve DNA Elde Edilmesi.....	36

3.3.1. RNA İzolasyonu .....	36
3.3.1.1. RNA İzolasyonunda Kullanılan Tampon ve Çözeltiler.....	36
3.3.1.2. Periferik Kandan RNA Eldesi Protokolü.....	37
3.3.2. DNA Eldesi.....	38
3.3.2.1. DNA Eldesi için Kullanılan Tampon ve Çözeltiler.....	38
3.3.2.2. Periferik Kandan DNA Eldesi Protokolü.....	39
3.4. Ekspresyon Analizi Yapılacak AH ile İlişkili miRNA'ların Seçilmesi.....	39
3.5. Genotipleme Yapılacak AH ile İlişkili miRNA SNP'lerinin Seçilmesi .....	41
3.6. Ekspresyonlar için Real-Time PCR Primer ve Prob Dizilerinin Sentezlenmesi .	43
3.7. SNP'ler için Real-Time PCR Primer ve Prob Dizilerinin Sentezlenmesi .....	47
3.8. Real-Time PCR ile Ekspresyon Analizi Yöntemi .....	52
3.9. miRNA Genlerine ait Ekspresyonların Tespit Edilmesi.....	54
3.10. Real-Time PCR Yöntemi ile Genotip Analizi .....	55
3.11. miRNA Oluşum Yolağı Genlerine ait SNP'lerin Tayin Edilmesi.....	56
3.12. İstatistiksel Analiz.....	60
<b>4. BULGULAR.....</b>	<b>61</b>
4.1. Hasta ve Kontrol Gruplarının Yaş ve Cinsiyet Bakımından Değerlendirilmesi..	61
4.1.1. Hasta grubu .....	61
4.1.2. Kontrol grubu.....	62
4.2. Grupların Ekspresyon Ölçümlerinin Değerlendirilmesi .....	63
4.2.1. <i>hsa-miR-9-5p</i> Genine Ait Ekspresyonların Değerlendirilmesi.....	66
4.2.2. <i>hsa-miR-29a-3p</i> Genine Ait Ekspresyonların Değerlendirilmesi.....	67
4.2.3. <i>hsa-miR-106a-5p</i> Genine Ait Ekspresyonların Değerlendirilmesi.....	68
4.2.4. <i>hsa-miR-106b-5p</i> Genine Ait Ekspresyonların Değerlendirilmesi.....	69
4.2.5. <i>hsa-miR-107</i> Genine Ait Ekspresyonların Değerlendirilmesi .....	70
4.2.6. <i>hsa-miR-125a-3p</i> Genine Ait Ekspresyonların Değerlendirilmesi.....	71
4.2.7. <i>hsa-miR-125b-5p</i> Genine Ait Ekspresyonların Değerlendirilmesi.....	72
4.3. Grupların Genotip Dağılımının Değerlendirilmesi.....	72
4.3.1. <i>RNASEN(DROSHA)-rs10719</i> Polimorfizmine Ait Genotiplerin Değerlendirilmesi.....	75
4.3.2. <i>DGCR8-rs1640299</i> Polimorfizmine Ait Genotiplerin Değerlendirilmesi....	75
4.3.3. <i>XPO5-rs11077</i> Polimorfizmine Ait Genotiplerin Değerlendirilmesi.....	75

4.3.4. <i>RAN-rs14035</i> Polimorfizmine Ait Genotiplerin Değerlendirilmesi .....	76
4.3.5. <i>DICER1-rs3742330</i> Polimorfizmine Ait Genotiplerin Değerlendirilmesi... 76	76
4.3.6. <i>DICER1-rs13078</i> Polimorfizmine Ait Genotiplerin Değerlendirilmesi..... 76	76
4.3.7. <i>TARBP2-rs784567</i> Polimorfizmine Ait Genotiplerin Değerlendirilmesi..... 77	77
4.3.8. <i>AGO1(EIF2C1)-rs595961</i> Polimorfizmine Ait Genotiplerin Değerlendirilmesi..... 77	77
4.3.9. <i>AGO2(EIF2C2)-rs4961280</i> Polimorfizmine Ait Genotiplerin Değerlendirilmesi..... 77	77
4.3.10. <i>GEMIN3(DDX20)-rs197388</i> Polimorfizmine Ait Genotiplerin Değerlendirilmesi..... 78	78
4.3.11. <i>GEMIN4-rs910924</i> Polimorfizmine Ait Genotiplerin Değerlendirilmesi .. 78	78
4.4. Grupların Allel Dağılımının Değerlendirilmesi..... 78	78
4.4.1. <i>RNASEN(DROSHA)-rs10719</i> Polimorfizmine Ait Allellerin Değerlendirilmesi..... 82	82
4.4.2. <i>DGCR8-rs1640299</i> Polimorfizmine Ait Allellerin Değerlendirilmesi..... 82	82
4.4.3. <i>XPO5-rs11077</i> Polimorfizmine Ait Allellerin Değerlendirilmesi..... 82	82
4.4.4. <i>RAN-rs14035</i> Polimorfizmine Ait Allellerin Değerlendirilmesi .....	83
4.4.5. <i>DICER1-rs3742330</i> Polimorfizmine Ait Allellerin Değerlendirilmesi..... 83	83
4.4.6. <i>DICER1-rs13078</i> Polimorfizmine Ait Allellerin Değerlendirilmesi..... 83	83
4.4.7. <i>TARBP2-rs784567</i> Polimorfizmine Ait Allellerin Değerlendirilmesi..... 84	84
4.4.8. <i>AGO1(EIF2C1)-rs595961</i> Polimorfizmine Ait Allellerin Değerlendirilmesi .....	84
4.4.9. <i>AGO2(EIF2C2)-rs4961280</i> Polimorfizmine Ait Allellerin Değerlendirilmesi..... 84	84
4.4.10. <i>GEMIN3(DDX20)-rs197388</i> Polimorfizmine Ait Allellerin Değerlendirilmesi..... 85	85
4.4.11. <i>GEMIN4-rs910924</i> Polimorfizmine Ait Allellerin Değerlendirilmesi .....	85
<b>5. TARTIŞMA.....</b>	<b>86</b>
<b>6. SONUÇLAR ve ÖNERİLER.....</b>	<b>103</b>
<b>7. KAYNAKLAR .....</b>	<b>105</b>
<b>ÖZGEÇMİŞ .....</b>	<b>116</b>

## ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa
Şekil 2.1. Alzheimer Hastalığı'nın oluşumuna katılan bazı miRNA'lar.....	11
Şekil 2.2. Genomik yerleşimlerine göre miRNA'ların sınıflandırılması.....	14
Şekil 2.3. Öncül (prekürsör) miRNA yapısı.....	17
Şekil 2.4. miRNA olgunlaşma mekanizması.....	18
Şekil 2.5. Ran-GTP pompası.....	21
Şekil 2.6. miRNA ile hedef mRNA eşleşmesi.....	27
Şekil 2.7. miRNA etki mekanizması.....	28
Şekil 3.1. Kök-halka (Stem-loop) yapısındaki pri-miRNA dizileri üzerinde yerleşik olgun miRNA dizileri .....	44
Şekil 3.2. <i>RNASEN (DROSHA)</i> geni <i>rs10719</i> , C>T polimorfizmi.....	47
Şekil 3.3. <i>DGCR8</i> geni <i>rs1640299</i> , G>T polimorfizmi. ....	47
Şekil 3.4. <i>XPO5</i> geni <i>rs11077</i> , A>C polimorfizmi. ....	48
Şekil 3.5. <i>RAN</i> geni <i>rs14035</i> , C>T polimorfizmi.....	48
Şekil 3.6. <i>DICER1</i> geni <i>rs3742330</i> A>G polimorfizmi.....	48
Şekil 3.7. <i>DICER1</i> geni <i>rs13078</i> , A>T polimorfizmi. ....	49
Şekil 3.8. <i>TARBP2</i> geni <i>rs784567</i> , C>T polimorfizmi.....	49
Şekil 3.9. <i>AGO1</i> geni <i>rs595961</i> , A>G polimorfizmi.....	49
Şekil 3.10. <i>AGO2</i> geni <i>rs4961280</i> , C>A polimorfizmi.....	50
Şekil 3.11. <i>GEMIN3</i> geni <i>rs197388</i> , T>A polimorfizmi.....	50
Şekil 3.12. <i>GEMIN4</i> geni <i>rs910924</i> , C>T polimorfizmi.....	50
Şekil 3.13. TaqMan miRNA analiz şeması. ....	53
Şekil 3.14. Standart ekspresyon eğrisi.....	55
Şekil 3.15. <i>GEMIN3(DDX20)</i> <i>rs197388</i> polimorfizmi için multikomponent grafiğinde homozigot T/T genotipi).....	57
Şekil 3.16. <i>GEMIN3(DDX20)</i> <i>rs197388</i> polimorfizmi için multikomponent grafiğinde heterozigot T/A genotipi.....	58
Şekil 3.17. <i>GEMIN3</i> <i>rs197388</i> polimorfizmi için multikomponent grafiğinde homozigot A/A genotipi .....	59



<b>Şekil 3.18.</b> <i>RNASEN(DROSHA)</i> <i>rs10719</i> C>T polimorfizmi için allelik diskriminasyon grafiği.....	60
<b>Şekil 4.1.</b> Kontrol ve Alzheimer hasta grubunda <i>hsa-miR-9-5p</i> , <i>29a-3p</i> , <i>106a-5p</i> , <i>106b-5p</i> , <i>107</i> , <i>125a-3p</i> ve <i>125b-5p</i> genlerine ait miRNA ekspresyon verileri grafiği.....	65
<b>Şekil 4.2.</b> Kontrol ve Alzheimer hasta grubunda <i>hsa-miR-9-5p</i> geni için ekspresyon grafiği.....	66
<b>Şekil 4.3.</b> Kontrol ve Alzheimer hasta grubunda <i>hsa-miR-29a-3p</i> geni için ekspresyon grafiği.....	67
<b>Şekil 4.4.</b> Kontrol ve Alzheimer hasta grubunda <i>hsa-miR-106a-5p</i> geni için ekspresyon grafiği.....	68
<b>Şekil 4.5.</b> Kontrol ve Alzheimer hasta grubunda <i>hsa-miR-106b-5p</i> geni için ekspresyon grafiği.....	69
<b>Şekil 4.6.</b> Kontrol ve Alzheimer hasta grubunda <i>hsa-miR-107</i> geni için ekspresyon grafiği.....	70
<b>Şekil 4.7.</b> Kontrol ve Alzheimer hasta grubunda <i>hsa-miR-125a-3p</i> geni için ekspresyon grafiği.....	71
<b>Şekil 4.8.</b> Kontrol ve Alzheimer hasta grubunda <i>hsa-miR-125b-5p</i> geni için ekspresyon grafiği.....	72
<b>Şekil 4.9.</b> miRNA biyogenezinde görevli bazı genler için SNP frekans verileri grafiği... ..	74
<b>Şekil 4.10.</b> Kontrol ve Alzheimer hasta bireyelerine ait allel dağılımı verileri grafiği.....	80

## ÇİZELGELER DİZİNİ

### Sayfa

<b>Çizelge 3.1.</b> miRNA'lar, Alzheimer Hastalığında etkili hedef aldıkları genler ve eşleşme skorları .....	41
<b>Çizelge 3.2.</b> miRNA biyogenezinde görevli genler ve genlere ait SNP'ler .....	42
<b>Çizelge 3.3.</b> miRNA RT-PCR (Reverse Transcription PCR) ve Real-Time PCR primer-prob dizileri.....	46
<b>Çizelge 3.4.</b> miRNA oluşum yolağında görevli genlere ait primer ve prob dizileri.....	51
<b>Çizelge 4.1.</b> Kontrol ve hasta gruplarındaki kadın ve erkek bireylerin yaş ortalaması ..	61
<b>Çizelge 4.2.</b> Kontrol ve hasta gruplarına ait yaş ortalamalarının cinsiyet bakımından değerlendirilmesi.....	62
<b>Çizelge 4.3.</b> Hasta ve kontrol gruplarının cinsiyet bakımından değerlendirilmesi.....	62
<b>Çizelge 4.4.</b> Kontrol ve Alzheimer hasta gruplarında <i>hsa-miR-9-5p</i> , 29a-3p, 106a-5p, 106b-5p, 107, 125a-3p ve 125b-5p genlerine ait ekspresyon ( $2^{-\Delta\Delta CT}$ ), minimum, maksimum ve p değerleri.....	64
<b>Çizelge 4.5.</b> miRNA biyogenezinde görevli bazı genlerin kontrol ve hasta grubundaki allel dağılımının yüzde, ki-kare ve p değerleri .....	73
<b>Çizelge 4.6.</b> miRNA biyogenezinde görevli bazı genlerin kontrol ve hasta grubundaki allel dağılımının allel sayısı, yüzde ve p değerleri .....	78
<b>Çizelge 4.7.</b> miRNA oluşum yolağında görevli bazı genlere ait SNP'lerin Hardy-Weinberg dengesi p değerleri .....	81

## SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

<b>3'-UTR</b>	: 3'-Untranslated Region (Translasyonu Yapılmayan 3' Bölge )
<b>AGO 1</b>	: Argonat Protein 1
<b>AGO 2</b>	: Argonat Protein 2
<b>APP</b>	: Amyloid Precursor Protein
<b><math>\alpha</math></b>	: Alfa
<b>BACE1</b>	: $\beta$ -site APP-cleaving enzyme 1
<b>bp</b>	: Base Pair (Baz Çifti)
<b><math>\beta</math></b>	: Beta
<b>BHQ</b>	: Black Hole Quencher
<b>CNS</b>	: Central Nervous System (Merkezi Sinir Sistemi)
<b>DGCR8</b>	: Di George Syndrome Critical Region Gene 8
<b>DICER1</b>	: Dcr1 Homoloğu
<b>DNA</b>	: Deoksiribonükleik Asit
<b>DSM-IV-TR</b>	: Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders-Fourth Edition-Text Revision (Ruhsal Hastalıklar için Tanısal ve İstatistiksel El Kitabı)
<b>EDTA</b>	: Etilendiamin Tetraasetik Asit
<b>EtOH</b>	: Etil Alkol
<b>GEMIN 3</b>	: Dead Box Polypeptide 20 (DDX20)
<b>GEMIN 4</b>	: Gem-Associated Protein 4
<b>gr</b>	: Gram
<b>GDP</b>	: Guanozin di-fosfat
<b>GTP</b>	: Guanozin tri-fosfat
<b><math>\chi^2</math></b>	: Ki-kare
<b>lt</b>	: Litre
<b><math>\mu</math>l</b>	: Mikrolitre
<b>M</b>	: Molar
<b>miRNA</b>	: mikro Ribonükleik Asit
<b>mRNA</b>	: Messenger RNA

<b>ml</b>	: Mililitre
<b>NCBI</b>	: National Center for Biotechnology Information (Amerika Birleşik Devletleri Ulusal Biyoteknoloji Merkezi)
<b>OMIM</b>	: Online Mendelian Inheritance In Man
<b>pre-esiRNA</b>	: Precursor Endoribonuclease-prepared siRNAs
<b>PSEN 1</b>	: Presenilin 1
<b>PSEN 2</b>	: Presenilin 2
<b>RAN</b>	: Ras-Related Nuclear Protein
<b>RFLP</b>	: Restriction Fragment Length Polymorphism
<b>RNA</b>	: Ribonucleic Acid
<b>ROX</b>	: 6-carboxy-x-rhodamine
<b>rpm</b>	: Revolutions Per Minute (Dakikadaki devir sayısı)
<b>rs</b>	: Referans SNP numarası
<b>SDS</b>	: Sodium Dodecyl Sulphate
<b>shRNA</b>	: Small Hairpin RNA
<b>SNP</b>	: Single Nucleotid Polymorphism (Tek Nükleotid Polimorfizmi)
<b>snRNA</b>	: Small Nuclear RNA (Küçük nüklear RNA)
<b>TARBP2</b>	: Trans Activation Responsive RNA Binding Protein 2
<b>TE</b>	: Tris-Ethylenetetraaceticacid
<b>Tm</b>	: Melting Temperature (Erime Sıcaklığı)
<b>Tris-HCl</b>	: Tris-Hydrochloride
<b>tRNA</b>	: Transfer RNA
<b>XPO5</b>	: Exportin 5

## ÖZET

### Alzheimer Hastalarında Bazı mikroRNA'ların İfadeleri ve Oluşum Yolağında Rol Oynayan Genlerin Polimorfizmlerinin Araştırılması

Alzheimer hastalığı çevresel ve genetik faktörlerin birlikte rol aldığı karmaşık kalıtsal bir nöropsikiyatrik hastalıktır. Protein kodlamayan transkriptlerden işlenerek oluşturulan ve küçük RNA molekülleri ailesinde yer alan miRNA'lar, nöropsikiyatrik hastalıklarda gen ekspresyonunun düzenlenmesinden sorumlu tutulan faktörlerden biri olarak kabul edilir. Bu tezde, miRNA oluşum yolağında yer alan genlere ait polimorfizmlerin ve Alzheimer hastalığının genetik temelinden sorumlu *APP*, *BACE1*, *PSENI* ve *PSEN2* genlerini hedef alan miRNA'ların ekspresyon düzeylerindeki değişimlerin, hastalık riski ile ilişkisi araştırıldı. Çalışmaya Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Nöroloji Anabilim Dalı'nda DSM-IV-TR tanı ölçütlerine göre Alzheimer tanısı konmuş 172 hasta ile kendisinde ve ailesinde Alzheimer ya da herhangi bir psikiyatrik hastalık tanısı konmamış, 109 yaşlı ve sağlıklı birey dahil edildi. Hasta ve kontrol grubuna ait kan örneklerinden RNA ve DNA izolasyonu yapılarak her bireyin; *hsa-miR-9-5p*, *hsa-miR-29a-3p*, *hsa-miR-106a-5p*, *hsa-miR-106b-5p*, *hsa-miR-107*, *hsa-miR-125a-3p*, *hsa-miR-125b-5p* genlerine ait ekspresyonları; *RNASEN*, *DGCR8*, *XPO5*, *RAN*, *DICER1*, *GEMIN3*, *GEMIN4*, *TARBP2*, *AGO1* ve *AGO2* genlerine ait sırasıyla rs10719, rs1640299, rs11077, rs14035, rs3742330 ve rs13078, rs197388, rs910924, rs784567, rs595961, rs4961280 polimorfizmlerinin moleküler analizi Real-Time PCR yöntemi ile gerçekleştirildi. Ekspresyon ve genotiplendirme sonucu elde edilen veriler, SPSS (v.11.5) paket programı ile istatistiksel olarak değerlendirildi. *hsa-miR-29a-3p*, *hsa-miR-125a-3p* ve *hsa-miR-125b-5p* ekspresyon düzeyleri ile hasta ve kontrol grupları arasında anlamlı bir farklılık olmadığı saptandı ( $p>0,05$ ). *hsa-miR-9-5p*, *hsa-miR-106a-5p*, *hsa-miR-106b-5p* ve *hsa-miR-107* genlerine ait ekspresyon düzeyleri ile Alzheimer hastalığı olma riski arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulundu ( $p<0,05$ ). rs10719, rs1640299, rs11077, rs14035, 3742330 ve rs13078, rs197388, rs910924, rs595961, rs4961280 polimorfizmlerinin genotip ve allel dağılımları ile Alzheimer hastalığı olma riski arasında anlamlı bir ilişki bulunamadı ( $p>0,05$ ). *TARBP2* geni rs784567 polimorfizmi için genotip dağılımı ve Alzheimer hastalığı olma riski arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulundu ( $p<0,05$ ). Bu çalışma, Alzheimer hastalığının genetik temelinde etkili genleri hedef alan miRNA genlerinin ekspresyon düzeyindeki değişimlerinin ve miRNA oluşum yolağında görevli olan genlerin polimorfizmlerinin Alzheimer hastalığı ile olan olası ilişkisini değerlendiren ilk hasta-kontrol çalışmasıdır.

**Anahtar Kelimeler:** Alzheimer Hastalığı, miRNA, SNP, Ekspresyon.

## ABSTRACT

### Expressions of some miRNAs in Alzheimer Patients and Investigation of Polymorphisms in genes involved in the miRNA formation pathway

Alzheimer disease, on which the environmental and genetic factors play a role in together, is a complex and inherited neuropsychiatric disorder. miRNA, a member of small RNA molecules family and derived from non-protein-coding transcripts, is one of the factors responsible for regulation of gene expression to neuropsychiatric disorders. In that thesis, the relationship of polymorphisms in the miRNA biogenesis pathway genes and the changes in the levels of expression of miRNAs targeting APP, BACE1, PSEN1, and PSEN2 genes responsible for the genetic basis of Alzheimer's disease with the risk of the disease are investigated. The study group consisted of 172 patients with probable Alzheimer disease diagnosed according to DSM-IV-TR criteria in Neurology Department at Medical Faculty of Mersin University and 109 elderly healthy control subjects. Molecular analyses of expressions that belong to *hsa-miR-9-5p*, *hsa-miR-29a-3p*, *hsa-miR-106a-5p*, *hsa-miR-106b-5p*, *hsa-miR-107*, *hsa-miR-125a-3p*, *hsa-miR-125b-5p* genes, and rs10719, rs1640299, rs11077, rs14035, rs3742330 and rs13078, rs910924, rs784567, rs595961, rs4961280, rs197388 polymorphisms that respectively belong to *RNASEN*, *DGCR8*, *XPO5*, *RAN*, *DICER1*, *GEMIN3*, *GEMIN4*, *TARBP2*, *AGO1* and *AGO2* genes are performed for each subject using the method of Real-Time PCR, whereafter both RNA and DNA are isolated from blood samples of the patients and control subjects. The data obtained as a result of the expression and genotyping statistically evaluated by using the SPSS (version 11.5) statistics software package. Expression levels of *hsa-miR-29a-3p*, *hsa-miR-125a-3p* and *hsa-miR-125b-5p* were not significantly different between patient and control groups ( $p>0.05$ ). A statistically significant relationship between the expression levels of *hsa-miR-9-5p*, *hsa-miR-106a-5p*, *hsa-miR-106b-5p* and *hsa-miR-107* genes and the risk of Alzheimer's disease was found ( $p<0.05$ ). No significant relationship in genotype and allele distributions of rs10719, rs1640299, rs11077, rs14035, 3742330 and rs13078, rs910924, rs595961, rs4961280 polymorphisms was found with the risk of Alzheimer's disease ( $p>0.05$ ). A statistically significant relationship between genotype distribution of rs784567 polymorphism in *TARBP2* gene and the risk of Alzheimer's disease was found ( $p<0.05$ ). This study, that is the first patient-control study to evaluate the possible association of Alzheimer's disease with the changes in the level of expression of miRNA genes targeting effective genes on the genetic basis of Alzheimer's disease and polymorphisms in the genes responsible for the formation of miRNA pathway. This thesis will be a guiding for research to be done to reveal the role of miRNA in Alzheimer's disease.

**Keywords:** Alzheimer's Disease, miRNA, SNP, Expression.

# 1. GİRİŞ

Bunama ya da demans olarak bilinen Alzheimer hastalığı (OMIM #104300) (AH), günlük yaşamın her zamanki gibi sürdürülmesini engelleyen ilerleyici kronik bir beyin hastalığıdır ve hastalıkla ilgili en önemli risk faktörü yaştır. Merkezi sinir sistemini etkileyen bir hastalık olmakla birlikte konuşma dilinde bozulma (aphasia), insanları veya nesnelere tanıma hataları (agnosia), motor hareketlerde yetersizlik (apraxia) gibi bilişsel fonksiyonlarda hasar sonucu oluşan, nöropsikiyatrik belirtilerin eşlik ettiği nörodejeneratif bir düzensizliktir (1). Nöropatolojik olarak beynin en çok etkilenen alanlarına korteks ve subkortikal yapılardan sonra hipokampus eşlik eder. Nörodejenerasyon, sinaps ve hücrel kayıplar, amiloid  $\beta$  ( $A\beta$ ) plaklar ve nörofibriller lezyonlar ile meydana gelir. Plakların temel elemanı, Amiloid Öncül Proteininin (APP) proteolitik olarak işlenmesi ile oluşan Amiloid Beta ( $A\beta$ ) peptiddir. Nörotoksik bir peptiddir ve parçalanması bir endopeptidaz olan BACE1 (beta-site amyloid precursor protein-cleaving enzyme 1) tarafından gerçekleştirilir (1, 2). AH'nın sebepleri ile ilgili hipotezler arasında gen mutasyonları önemli yer tutar. Hastalığın belirtilerinin erken yaşlarda görüldüğü (< 60-65 yaş) erken başlangıçlı formunda; Amiloid Öncül Protein (APP), *Presenilin 1* (PSEN1), *Presenilin 2* (PSEN2) genlerindeki mutasyonların  $A\beta$ 'nin aşırı üretimine yol açarak kısmen sorumlu oldukları bulunmuştur. Bu genlere yönelik belirleyici ve tanı koyucu testler yapmak mümkündür. Belirtilerin geç yaşlarda görüldüğü geç başlangıçlı formunda ise riski ApoE (Apolipoprotein E) geni oluşturur. Fakat bu genlerdeki değişimleri tespit etmek ya da etmemek hastalığın kesin tanısına yardımcı olmamaktadır (1, 3). AH tedavisine yönelik çalışmaların yönü düzensizlik oluştuktan sonra yapılan ilaç ve diyet merkezli tedavilerden, genetik mekanizmaların tespit edilmesi ve bu mekanizmalara müdahale edilerek hastalık oluşumunun engellenmesi şeklinde değişmiştir. Bu konuda son zamanlarda oldukça dikkat çeken moleküller, gen ifadesinin (ekspresyon) düzenlenmesinde rol oynayan miRNA (micro ribonucleic acid) gen aileleridir.

miRNA'lar, mRNA'ların translasyonunun düzenlenmesinden sorumlu ve çoğu kodlamayan RNA molekülleridir (4, 5). Bugüne kadar keşfedilen miRNA sayısı tüm türler için 21,264 'dür (6) ve her geçen gün yenileri eklenmektedir. Hedef aldıkları genin 3'-UTR (3'-Untranslated Region-UTR) veya 5'-UTR bölgesine bağlanarak

posttranskripsiyonel olarak gen ekspresyonunu baskırlar. 19-23 nükleotid uzunluğundaki olgun miRNA'lar uzun öncül (prekürsör) RNA'ların çeşitli enzimlerle işlemlenmesiyle oluşurlar (7).

Bilinen tüm miRNA'ların bir kısmı dokuya özel olmalarının yanında bir kısmı da tüm hücrel bölümlerde eksprese edilebilir. Bir miRNA birden fazla dokuda eksprese edilirken ekspresyon düzeyleri buldukları doku tipine bağlıdır. Örneğin; miR-122 karaciğerde (8), miR-1 ve miR-133 kas dokusunda eksprese edilirken let-7 oldukça fazla dokuda eksprese edilir (9). Bugüne kadar keşfedilen miRNA'ların yarısından fazlası beyin dokusunda sentezlenir. miR-9 (10), miR-128 gibi belirli miRNA'lar ise beyine özgüdür (11). Bu miRNA'ların yapısında ve hedefledikleri mRNA'da meydana gelebilecek tekli nükleotid değişimlerinin (SNP-Single Nucleotid Polymorphism) miRNA'larda veya hedefindeki mRNA'larda bulunması özgün miRNA-mRNA eşleşmesini engeller. Bunun yanında dokuya özgü miRNA'ların olgunlaşma evreleri sırasında prekürsörlerindeki veya olgun formlarındaki değişimler de hedefledikleri genlerin düzenlenmesini etkileyecektir (11-14).

Alzheimer hastalığı, hafıza kaybı ve davranışsal değişimlerle başlayan yaşa bağlı bir bunama hastalığıdır. Hastalığı erken dönemde tanımlamak oldukça zordur. Bu nedenle doğal biyolojik tanımlayıcıların geliştirilmesine ve tedavi edici doğal ajanların test edilmesine ihtiyaç vardır. miRNA'lar çoğunlukla hedef genlerin 3'-UTR bölgesini hedef alır. Her bir genin ifadesi 3'-UTR bölgesine pek çok miRNA'nın bağlanması ile düzenlenebileceği gibi bir miRNA birden fazla genin 3'-UTR bölgesine de bağlanabilir. Bu nedenle miRNA-mRNA eşleşmesinde hedef oldukça önem taşımaktadır. miRNA'ların keşfi ile Alzheimer hastalığındaki genetik analizler, bu düzensizliğe sebep olan genlerin genellikle 3'-UTR'lerini hedef alan bazı miRNA'ların tek nükleotid polimorfizmlerinin araştırılmasının yanında, bu mekanizmada yer alan genlerin ve miRNA genlerinin ekspresyonlarındaki farklılıkların ve hedefledikleri genlerdeki polimorfizmlerin araştırılması yönünde ilerlemektedir (15).

Büyük kısmı beyin dokusunda ifade edilen miRNA'ların hipokampustaki ekspresyon düzeylerinde meydana gelen değişimler, miRNA SNP'leri ve hedef mRNA'daki SNP'ler bazı proteinlerin anormal derecede artmasına veya azalmasına



neden olmaktadır. Tüm bu hatalar amiloid sentezi, nörogenezis, insülin direnci ve edinsel bağışıklık gibi moleküler yolların düzensizliklerine neden olur.

Bu çalışmada miRNA olgunlaşma yolağında görevli bazı genlerden *DROSHA* (*RNASEN*), *DGCR8*, *XPO5*, *DICER1*, *RAN*, *TARBP2*, *GEMIN3*(*DDX20*), *GEMIN4*, *AGO1* ve *AGO2* genlerinin; 3'-UTR, 5'-UTR, intron ve promotör bölgelerinde yerleşik SNP'ler incelenmiştir. Aynı zamanda, AH'ında etkili *APP*, *BACE1*, *PSEN-1* ve *PSEN-2* gen bölgelerini hedef alan miRNA'lardan; *hsa-miR-9-5p* (16), *hsa-miR-29a-3p* (17), *hsa-miR-107* (17, 18), *hsa-miR-125a-3p*, *miR-125b-5p* (19), *hsa-miR-106a-5p*, *miR-106b-5p*'nin (20) ekspresyon düzeyleri de ölçülerek hastalığın oluşumuna katkıları incelenmiştir. miRNA'lardaki dizi ve ekspresyon değişimleri mRNA regülasyonunun bozulması ile ilişkilidir. Bu tür bir ilişkinin tespit edilmesi düzensizliğin gen susturulması gibi gen tedavisi yaklaşımlarına ışık tutmasını sağlayacaktır. Literatürde, miRNA oluşum yolağında görevli genlerden *DROSHA* (*RNASEN*), *DGCR8*, *XPO5*, *DICER1*, *RAN*, *TARBP2*, *GEMIN3*, *GEMIN4*, *AGO1* ve *AGO2* polimorfizmlerinin ve AH'dan oluşumundan sorumlu olduğu bilinen genlerin ekspresyonlarının düzenlenmesinde görev alan miRNA'lardan *hsa-miR-9-5p*, *hsa-miR-29a-3p*, *hsa-miR-106a-5p*, *hsa-miR-106b-5p*, *hsa-miR-107*, *hsa-miR-125a-3p* ve *hsa-miR-125b-5p*'nin *hsa-miR-26b-5p* endojen kontrolü eşliğinde ekspresyonlarının AH ile ilişkisini ortaya koyan bir araştırma bulunmamaktadır. Çalışmamız bu alanda yapılan ilk hasta kontrol çalışması olma özelliğini taşımaktadır.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Alzheimer Hastalığı (AH)

Demans (de mentes) zihinsel becerilerde giderek artan bozulmaya bağlı olarak, kişinin günlük yaşamını bağımsız olarak yürütmede güçlükler yaşaması halidir. En sık görülen belirtiler bellek kaybı, öğrenme güçlüğü, dile ilişkin sorunlar, akıl yürütme ve yargılamada problemlerdir. Halk arasında kullanılan “bunama” sözcüğü taşıdığı olumsuz tınıya rağmen demans sözcüğünün karşılığı kabul edilebilir (21).

Bunama (demans), yaşlılığın bir sonucu değildir. Bunama her zaman patolojik bir durumdur ve mutlaka altında yatan bir neden vardır. AH tüm demans vakalarının yarısından fazlasını oluşturmaktadır (22). Demansın diğer bir türü olan vasküler (damarsal) demans ise beyni besleyen kan miktarının azalmasına neden olan, büyük veya çok sayıda küçük inmeler sonucunda gelişen bir hastalıktır. Bu inmeler kişinin düşünme, sağduyu, hatırlama ve iletişim kurma gibi özelliklerinde sorunlar ortaya çıkarır (23). Demansın diğer nedenleri arasında; AIDS, metabolik hastalıklar, Creutzfeldt-Jacob hastalığı, Lewy cisimcikli demans, Down sendromu, Huntington hastalığı, Parkinson hastalığı, frontotemporal demans gibi nörodejeneratif hastalıklar, travma ve normal basınçlı hidrosefali gibi yapısal nedenler sayılabilir. Depresyon da bazen demansı taklit edebilir (23).

Demansa yol açabilecek çok sayıda değişik hastalıklar ve patolojik süreçler vardır. Alzheimer hastalığı demans sebeplerinden sadece birisidir. Ama ileri yaş grubunda görülen demans sendromlarının en sık görülen biçimi olduğu için birçokları tarafından yanlış da olsa demans = Alzheimer hastalığı gibi algılanmaktadır. AH insan beynini etkileyen, ilerleyici ve maalesef tedavisi olmayan bir hastalıktır. Temel olarak bir bellek bozukluğu ile başlar ve ilerlediği zaman tüm zihinsel işlevleri ve bağımsız yaşamı etkiler (23).

Alzheimer hastalığının oluşum şekline göre 2 farklı formu bulunmaktadır: Bunlardan birincisi; olguların büyük bir kısmını oluşturan sporadik form, ikincisi ise; olguların daha az kısmını oluşturan ailesel formdur. Hastalığın başlangıç yaşına göre ise

erken başlangıçlı ve geç başlangıçlı olarak sınıflandırılabilir. Geç başlangıçlı AH özellikle ailesel olgularda ve 60 yaşından sonra gözlenirken, erken başlangıçlı formu 60 yaşından önce gözlenir ve nadir görülür. AH'nın erken başlangıçlı formu spesifik gen mutasyonları (APP geni gibi) sonucunda oluşurken geç başlangıçlı sporadik AH'da çeşitli çevresel etkenler (baş travması gibi) ve genetik faktörlerin (ApoE ε4 alleli gibi) etkisi söz konusudur (23).

### **2.1.1. Alzheimer Hastalığının Evrelendirilmesi**

Alzheimer hastalığının klinik şiddetini değerlendirmek için yaygın olarak iki ölçek kullanılmaktadır: Global Bozulma Ölçeği (Global Deterioration Scale-GDS) ve Klinik Demans Derecelendirme (Clinical-Dementia Rating-CDR) ölçeğidir. GDS, içeriği nedeniyle diğer demanslardan ziyade AH için kullanışlıdır. Normal yaşlılık ve prelinik demans dönemini de içermek kaydıyla tüm süreci 1 ile 7 puan arasında derecelendirir. Bu sınıflandırmaya göre AH Erken, Orta ve Geç olmak üzere 3 genel evreye ayrılabilir (23).

Erken evrede, hasta yakın geçmişe ait olayları anımsayamaz ve yeni bir bilgi öğrenme kapasitesi çarpıcı şekilde azalır. Günlük yaşam aktivitelerinde, kişisel bağımsızlık halen korunuyor olsa bile, belirgin performans kaybı dikkat çekicidir. Konuşulanların tekrar konuşulması, kişisel eşyaların yerlerinin karıştırılması ya da kaybı, alış-veriş listesinin unutulması, isim unutkanlıkları ya da isimlerin karıştırılması, kelime bulma güçlüğünden doğan konuşma kusuru, yemek yaparken tencerenin ocakta unutulması, yemek tadının değişmesi, gazete kitap okunurken sık sık başa dönülerek yeniden okuma bu döneme özgü belirtilerdir. Bu evrede ciddi bir psikiyatrik belirti yoktur ancak bazı hastalarda, hastalık öncesi işlevselliği ve eğitim düzeyi ile de ilgili olarak kapasite kaybının farkında olunması depresyona yol açabilir. AH'nin %20 oranında depresyon belirtileri ile başladığı da unutulmamalıdır (23).

Orta evrede, erken evre belirtilerinin derinleşmesi ve hastanın günlük yaşam aktivitelerini yürütürken başkasının yardımına iyiden iyiye gereksinim duyması bu evrenin en belirgin özelliğidir. Yeni bir bilgi öğrenimi tamamen durmuştur. Hobiler, öz bakım yitirilmiştir. Tek başlarına dışarı çıktıklarında kaybolma olasılığı yüksektir.

Gece-gündüz ritmi tersine dönebilir. Bu evrenin en önemli özelliği davranışsal ve psikiyatrik belirtilerin ortaya çıkmaya başlamasıdır (23).

Geç evrede, tüm zihinsel işlevler ileri derecede bozulur ve hasta günlük yaşam aktivitelerini sürdürebilmek için bir başkasının yardımına mutlak ihtiyaç duyar. Bellek ile ilgili sadece parçacıklar kalmıştır. Bazı hastalar eşlerini, çocuklarını, hatta aynada kendilerini dahi tanıyamayabilir (23).

Alzheimer hastalığının seyrini etkileyen pekçok faktör bulunur. Hastalığın başlangıç yaşı, hastanın eğitim düzeyi, cinsiyeti, genetik özellikler, tanı konulduğunda beyin görüntülemesinde saptanan bulgular, başlangıç belirtilerinin özellikleri başlıca parametrelerdir. Erken başlangıçlı (60 yaş öncesi) AH ile geç başlangıçlı (60 yaş sonrası) AH'nın klinik gidişi arasında fark tespit edilmemiştir. Ayrıca klinik seyir üzerinde cinsiyet farklılığının etkisi yoktur. Hastalığın ortaya çıkış riskini azaltan yüksek eğitim düzeyinin hastalık seyri ile ilişkisi olduğunu ileri süren çalışmalar da vardır (24).

Aynı şekilde hastalığın erken ya da geç başlamasında etkili olduğu saptanan mutasyonların hastalığın seyrini de etkilediği bilinmektedir. Tüm araştırmalar birbirini desteklemese de tanı konulduğunda ağır beyin atrofi, frontal hipometabolizma, erken dönemde sanrılar (halüsinasyon), yanılgılar (delüzyon) gibi psikiyatrik belirtileri olan hastalarda hastalığın hızlı ve kötü seyredeceğini ileri süren araştırmalar bulunmaktadır (24).

### **2.1.2. Alzheimer Hastalığının Klinik ve Genetik Tanısı**

Alzheimer hastalığının tanısında en önemli basamak klinik değerlendirmedir. Kesin Alzheimer teşhisi ancak beyinden alınan bir parçanın mikroskop altında incelenmesi ile mümkündür. Bu da hastalar hayatta iken çok nadir başvurulabilecek bir yoldur. Biyopsi ya da otopsi öncesinde kesin tanı koymak mümkün değildir. Hastalarda, kan tahlilleri ve beyin filmleri ya başka demans nedenlerini dışlamak ya tamamlayıcı olarak ya da araştırma amacıyla kullanılmaktadır (24). Demans tanısında sadece muayene ile %95'lere varan oranda doğru teşhis konulabilmektedir. Ayrıntılı bir öykü

demansiyel sürecin başlangıcı ve gelişimi konusunda bilgi sağlayacaktır. Detaylı bir mental muayene/nöropsikolojik değerlendirme ile belirlenecek profil hem hastanın o günkü durumunun belirlenmesini hem de izlenmesini sağlayacaktır. Nörolojik muayene diğer olası demans nedenlerinin belirlenmesinin yanında Alzheimer hastalığına eşlik edebilecek bulguların kaydedilmesi ve takibi açısından da önemlidir. Alzheimer hastalığına sıklıkla eşlik eden duygu-durum ve davranış değişikliklerinin saptanması ve takibi için psikiyatrik bir değerlendirme de gereklidir (25).

Alzheimer hastalığında tanı koydurucu bir laboratuvar testi olmamakla birlikte demansiyel sendromlara yol açabilecek metabolik ve yapısal nedenlerin dışlanması için bazı testlerin yapılması gereklidir. Bu testlerden rutin olarak yapılanlar tam kan sayımı ve biyokimyasal testler, vitamin B12 düzeyi, tiroid fonksiyon testleri, sifiliz serolojisi, beyin tomografisi veya kraniyal MRI (Magnetic Resonance Imaging)'dir (26).

Alzheimer hastalığı konusunda araştırma yapan merkezlerin önemli sorunlarından birisi AH için tek bir inceleme veya tahlil ile kesin teşhis konulması yönteminin bulunup bulunmayacağıdır. Etkili bir yöntem bulunduğu takdirde erken teşhis ile önleyici ve koruyucu bir tedavi yöntemi geliştirilerek, hastalığın gelişmesi önlenilecek ya da tedavi edilebilecektir.

Demansiyel hastalıkların tanısı için geliştirilmiş tarama testleri, evrelendirme ölçekleri, günlük yaşam aktivitesi değerlendirme gereçleri ve davranışsal ölçekler vardır. En sık kullanılan tarama testi, Mini Mental Durum Değerlendirme (Mini Mental Status Examination) testidir. Eğitim düzeyine ve dile dayalı bir test olması nedeniyle çok eleştirilse de en yaygın kullanılan tarama testi olmaya devam etmektedir. Ancak, bu testin tek başına kullanıldığında tanı koymada hiçbir değeri bulunmamakla birlikte asıl yararının tarama ve izleme döneminde görülebileceğinin akılda tutulması gerekmektedir (27).

Demans tanısında yararlı olacak bir mental muayene testinin mutlaka bellek, dikkat, dil, görsel ve yürütücü işlevler, mekânsal beceriler ya da frontal işlevler diyebileceğimiz görevlerin yerine getirilip getirilmediğini değerlendirmesi gerekir. Dikkatin değerlendirilmesi özellikle önem taşır. Bunun bir nedeni dikkat bozukluğunun tek başına tüm bilişsel işlevlere ilişkin testleri bozabilecek olması, bir diğer nedeni de

Alzheimer hastalığında da erken dönemde belli oranda bir dikkat bozukluğu görülmektedir. Alzheimer hastalığının en erken ve en belirgin bulgusu bellek bozukluğu olduğu için bellek testi içermeyen bir test ile değerlendirilmesi düşünülemez. Dil, görsel ve mekânsal işlevlerdeki bozukluk değişken olabilir. Bu değişim günlük yaşam aktivitelerini belirgin bir biçimde etkiler. Yaşa bağlı olarak geliştirilmiş nöropsikolojik testler; bilişteki çöküşün anlamlılığını, bilişsel işlev bozukluğunun profilini, bozulma hızını ve ilaç tedavi girişimlerinin etkisini belirlemede yararlı olacaktır. Bu testlerin bir kısmı dilimize çevrilmiş olup standardizasyon ve geçerlilik çalışmaları yapılmıştır (28). Günlük yaşam aktivitelerinde bozulma demans tanısı için vazgeçilmezdir. Bu bozukluğun derecesinin ve hangi aktivitelerde olduğunun belirlenmesi hem hastanın takibi hem de bakımının yönlendirilmesi açısından önemlidir (29). AH yaşlı popülasyonda demansın en sık nedenidir. Hastalığın kesin tanısını koymak patolojik incelemeyi gerektirir. Otopsi ve klinik verilerin karşılaştırılmasıyla doğru tanıya ulaşılabilir. Hasta yaşarken doğru tanı için muhtemel sıkıntıları göze alıp biyopsi uygulamasına gidilmesi önerilmemektedir. Bu nedenle klinik belirtilerin ve seyir özelliklerinin iyi bilinmesi AH tanısı ve izlemi için vazgeçilmezdir (30).

1907'de senil plaklar ve nörofibriler yumakların Alois Alzheimer tarafından AH'nın temel patolojik elemanları olarak tanımlanmasından sonra bu hastalığın patogenezi için çok az katkı sağlandı. Senil plakların ana bileşeni  $\beta$  amiloid, nörofibriler yumaklarınki ise tau proteindir. AH'na yol açan proteinler ile bunlarla ilişkili diğer proteinlerin saptanması ve temel patolojinin ortaya konması için,  $\beta$  amiloidin ve tau proteinlerinin klinik çizelgenin ortaya çıkmasında nasıl bir katkıları olduğu araştırılmaya başlandı (29).

Alzheimer hastalığını diğer demanslardan ayıran en önemli özelliği sinsi başlaması ve yavaş seyretmesidir. Örneğin; vasküler demansın başlaması ile ilgili yakınları az çok net bir tarih verebilmelerine karşın bu AH için söz konusu değildir. AH'nın kendine özgü başlangıç ve seyir tarzı zihinsel bozuklukların hastaların aktif yaşamdan uzaklaştıkları döneme rastlamasından dolayı uzun süre hissedilir olmaması ve yaşlılıkta unutkanlığın normal olarak algılanması gibi tutumlarla birleşince tanıda gecikmelere bile yol açabilmektedir (30).

Alzheimer hastasının beyin dokusundaki en önemli histopatolojik işaretler, nöritik plaklar ve nörofibriler ipliklerdir. Nöritik plaklar; hücre dışında beta amiloid (A $\beta$ ) birikimi ile oluşurken nörofibriller iplikler; tau proteinlerinin hiperfosforile ve hiperglikolize olması sonucu anormal filamentlerin hücreler arasında birikimi ile meydana gelir ve nöronlarda yıkım gerçekleşir (31).

Bugün için kabul görmüş ve birinci histopatolojik işaret olan A $\beta$ , “beta amiloid teorisi”nin anahtar proteindir. A $\beta$ , APP’nin proteolitik olarak kesilmesi sonucu oluşan membran geçişli bir proteindir. APP’nin kesilmesinde görevli 2 enzim vardır; birincisi  $\beta$ -sekretaz (BACE1,  $\beta$ -site cleaving enzyme), ikincisi  $\gamma$ -sekretazdır.  $\gamma$ -sekretazın katalitik alt üniteleri ise Presenilin 1 (PSEN1) ve Presenilin 2 (PSEN2) proteinleridir (22, 32). AH’da ikinci önemli histopatolojik işaret nörofibriler ipliklerin oluşmasıdır. Bu ipliklerin birikimi sonucu aksonal taşıma inhibe edilir (33).

Alzheimer hastalığı tanısı belirli bir prelinik dönemin ardından bilişsel bozukluğun hastanın günlük yaşam aktivitelerini olumsuz etkilediği aşamada konulur. Tanının konulmasından ölüme kadar geçen süre istisnalar olsa da 15-20 yıl sürebilir (33).

### **2.1.3. Alzheimer Hastalığında Etkili Genetik Mekanizmalar**

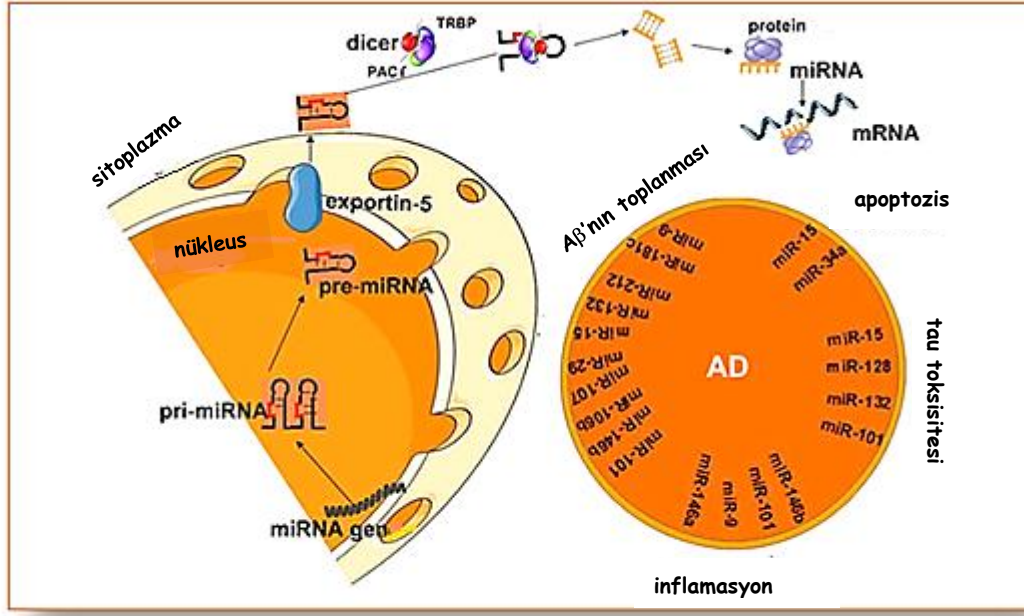
Alzheimer hastalığının oluşumunda, genetik mekanizmaların rolü olduğu ve ilerleyen yaşla birlikte hastalığın kliniğinin değiştiği bilinmektedir. AH’nin yaşa bağlı olarak gelişen erken ve geç olmak üzere 2 temel evresi vardır. Erken başlangıçlı AH ortalama olarak 30-60 yaşları arasında meydana gelir. Tüm Alzheimer olguları arasında yaklaşık %5’den daha az görülür ve genellikle aileseldir. Ailesel formundan kromozom 4, 14 ve 21 üzerindeki farklı tek gen mutasyonlarından herhangi birisinin varlığı sorumludur. Bu mutasyonların her biri anormal protein oluşumu ile sonuçlanır. 21 numaralı kromozom üzerindeki mutasyonlar anormal amiloid prekürsör protein (APP) oluşumuna, kromozom 14 üzerindeki mutasyonlar anormal presenilin 1 yapımına ve 1 numaralı kromozom üzerindeki mutasyonlar ise anormal presenilin 2 yapımına neden olur. (34). Bu genler üzerindeki mutasyonların her biri APP’nin yıkımında rol oynarlar. APP proteininin kesin fonksiyonu henüz bilinmemektedir. Fakat yıkımı sonucu

hastalığın oluşumunda önemli bir etken olan zararlı amiloid plak birikimi gerçekleşmektedir. (34).

Alzheimer hastalarının büyük çoğunluğu geç başlangıçlı tiptedir. Hastalık 60 yaşından sonra gelişir. Sebebi tam olarak anlaşılmamakla birlikte genetik, çevre ve yaşam biçimi hastalığın gelişmesinde kişisel riski etkilemektedir (34). Erken başlangıçlı tipte rastlanan tek gen mutasyonları bu tip için söz konusu değildir. Hastalıktan sorumlu özgün bir gen bulunamamıştır (34). Bununla birlikte kromozom 14 üzerinde bulunan apolipoprotein E (APOE)'nin  $\epsilon 4$  alleli risk faktörüdür. APOE $\epsilon 4$ 'ün kalıtımı ile ilgili olarak net bir bilgi yoktur. Bazı bireyler bir veya iki APOE $\epsilon 4$  alleleline sahip olup asla hasta olmazken herhangi bir APOE $\epsilon 4$  allelini taşımayan bireylerde AH gelişebilmektedir (34). Genom boyu ilişkilendirme çalışmaları ile geç başlangıçlı Alzheimer hastalığı için risk oluşturan APOE $\epsilon 4$  alleleline ek olarak BIN (Bridging Integrator 1), CLU (Clusterin), PICALM (phosphatidylinositol binding clathrin assembly protein) ve CR1'in de kişisel risk oluşturduğu bulunmuştur (35).

Alzheimer hastalığı, bütün dünyada demansın en yaygın sebepleri arasındadır. Yaşlı popülasyonu etkiler ve amiloid- $\beta$  (A $\beta$ )'nin birikimi, nörofibriller ipliklerin oluşumu, beyinde geniş nöronal bozulma gibi belirgin ayırıcı özelliklere sahiptir. A $\beta$ , APP'nin BACE1 enzimi ve  $\gamma$ -sekretaz bileşkesi tarafından ardışık olarak kesilmesi sonucu oluşur. Bu enzimin aşırı ekspresyonu APP'nin birikimine neden olmaktadır. AH oluşumunda patolojik mekanizmalar kesin olarak bilinmediği halde çalışmalardan elde edilen bilgiler sonucunda miRNA'lara bağlı gen ifadesinin normalden sapması; A $\beta$  üretimi, nörofibriller ipliklerin oluşumu ve nörodejenerasyondan sorumlu moleküler olaylarla ilişkili olduğu düşünülmektedir (36, 37) (Şekil 2.1) (38).





**Şekil 2.1.** Alzheimer Hastalığı'nın oluşumuna katılan bazı miRNA'lar (38 nolu kaynaktan modifiye edilerek kullanılmıştır).

Alzheimer hastalığının etiolojisinde amiloid betanın merkezi rolü vardır ve çalışmalar amiloid beta üretiminde gerekli APP geninin mRNA'sının ekspresyonu üzerinde yoğunlaşmıştır. APP geninin promotör yapısı komplekstir, proksimal ve distal elementlerden oluşur. APP geninin 5'-UTR bölgesindeki regülatör elementler transkripsiyon sonrası düzenlemeye aracılık eder. APP geninin 3'-UTR bölgesi ise sabit çeşitli kontrol elementlerini içerir ve bu elementler APP mRNA'nın kararlılığını düzenler. Bu kararlılıkta miRNA'ların katkısı olduğu düşünülmektedir (39).

miRNA ağı, gen ekspresyonunda temel düzenleyicilerden birisi olarak bilinmesine rağmen sporadik AH'daki katkısı henüz açık değildir. Bu nedenle AH gelişiminde miRNA'ların rolüne ışık tutmak amacıyla sporadik AH ve uygun kontroller kullanılarak yapılan microarray çalışmalarında çeşitli miRNA'ların AH'da önemli değişikliğe uğradıkları tespit edilmiştir (39). Çalışılan bu set içinde *APP* ve *BACE1* ekspresyonunun düzenlenmesinde görevli *hsa-miR-9-5p*, *hsa-miR-29a-3p*, *hsa-miR106a-5p*, *hsa-miR-106b-5p*, *hsa-miR-107*, *hsa-miR-125a-3p* ve *hsa-miR-125b-5p* gibi miRNA'ların ifadesinin AH'lı bireylerin beyin dokusunda azaldığı gözlenmiştir (39).

Örneğin; A $\beta$ 'nin üretimi 2 proteolitik kesim sonucu oluşur. Birinci adımda, BACE1 APP'i parçalayarak C99 adı verilen terminal parça oluşturur. İkinci adımda; C99  $\gamma$ -sekretaz kesimi için bir substrat olarak kullanılır ve A $\beta$  oluşturulur. *BACE1* geninin defektif olması veya bu geni hedefleyen miRNA'ların ekspresyonundaki değişimler enzimin aktivitesini kontrol edemeyerek aşırı sentezlenmesine ve daha fazla APP'nin parçalanarak A $\beta$  plakların birikmesine neden olur (39).

## 2.2. miRNA

Yaşamın başlangıcından ölüme kadar, insan vücudu genetik materyalin aktivitesine ihtiyaç duyar. Bu aktivitenin doğru ve zamanlı olarak yerine getirilebilmesinde en büyük pay, gen regülasyonuna aittir. Gen regülasyonu, bir genin fonksiyonel olarak üretimine başlaması (ekspresyon) için zamanlamanın yapılması ve üretilecek ürün miktarının ayarlanması için gerçekleştirilen hücrel bir yönetimdir. Hücrenin yapısı ve fonksiyonu üzerinde kontrol imkânı tanır, hücrel gelişim, farklılaşma, apoptozis için temeldir ve bitki veya insan olsun bir organizmanın uyum yeteneğine katkıda bulunur. Gen ekspresyon mekanizmasının, RNA'nın transkripsiyonundan proteinlerin translasyon sonrası değişikliklerine kadar herhangi bir adımı ayarlanabilir (40).

Yakın bir zamana kadar gen regülasyonu temel olarak DNA metilasyonu, histonlar veya transkripsiyon faktörlerini içermekteydi. Son dönemde gen ekspresyonunun regülasyonunda miRNA'ların rolü üzerinde çalışılmaktadır. miRNA'lar, translasyon ve transkripsiyon sonrası gen düzenlemesinde gerekli olan küçük, kodlanmayan, tek zincir RNA'lardır. Hücre içinde ve serum, plazma, idrar, süt gibi diğer vücut sıvılarında da bulunur (41). Bu kaynaklar kullanılarak günümüze kadar en çok çalışılan kodlanmayan RNA grubu miRNA'lardır. (42). Bir genin miRNA olarak sınıflandırılabilmesi için belirli kriterleri taşıması gerekir. İlk kriter; ekspresyonunun olması, ikinci kriter; yapısal özellikleri, üçüncü kriter ise; dizi korunumudur (43). miRNA'lar spesifik miRNA genleri tarafından transkribe edilirler ve tüm genomda dağınık olarak bulunurlar (42). İnsan genomunun yaklaşık %1'i miRNA'lara ayrılmıştır ve tahminen insan hücrelerindeki tüm RNA'ların üçte birinin çalışmasını düzenlerler.

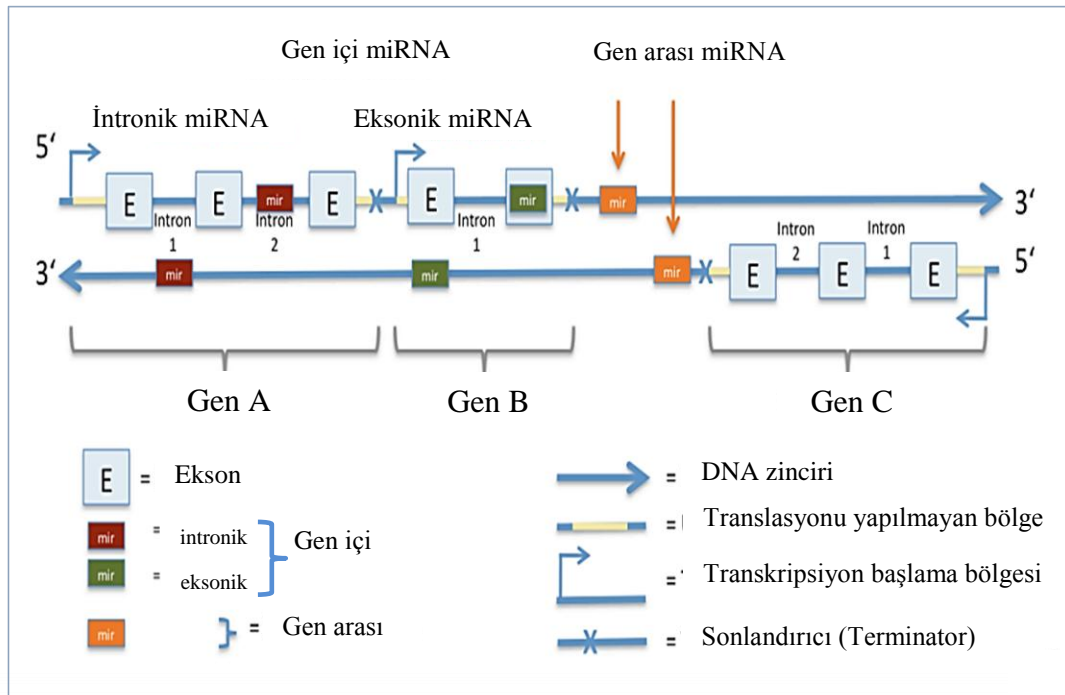
En önemli özellikleri, viruslar dışında, evrim süresince korunmuş olmalarıdır. Yerleşimleri de canlılar arasında farklıdır. Genomik pozisyonları ile ilgili yapılan çalışmalar bir kısmının gen arası (intergenik) bir kısmının ise işlevsel bir protein oluşturmak üzere kodlanan genlerin intronlarında (intragenik) yerleşmiş olduklarını göstermiştir. Bu yerleşim genin 5' veya 3' pozisyonunda olabilir (44).

miRNA'ların ilk keşifleri Ambros ve arkadaşlarının yaptığı gelişimsel olayların karmaşık gen yolağı araştırmaları sırasında *lin-4* geninin ürünü olan ~22 nt uzunluğunda küçük RNA'ları bulmaları ile başlamıştır. Arkasından Ruvkun laboratuvarı tarafından ikinci ~22 nt uzunluğunda küçük RNA *let-7* keşfedilmiştir (44). miRNA'ların keşfinden sonra sayılarının gün geçtikçe artması üzerine bir sınıflandırma ve adlandırma sistemine ihtiyaç duyulmuştur.

### 2.2.1.miRNA'ların Sınıflandırılması ve Adlandırılması

miRNA adlandırma sisteminde “mir” ön ekinden sonra ilgili türe ait kısaltma ve sayısal bir kodlama bulunmaktadır. Büyük harfle yazılmayan “mir-” pre-miRNA formunu, büyük harfle yazılan “miR-” olgun miRNA formunu temsil etmektedir. Yaklaşık olarak eş dizilere sahip miRNA'ları adlandırmak için miR adından sonra son ek kullanılır. Örn: miR-123a dizisi miR-123b dizileri benzer oldukları için a ve b şeklinde ayrılmışlardır. Normal şartlarda pre-miRNA'lar olgun miRNA'lar ile %100 aynıdır. Fakat genomda farklı bölgelerde yerleşime sahiptir. Bu yerleşimi belirtmek için ayrıca bir ön ek ve sayısal adlandırmaya ihtiyaç vardır. Örneğin; hsa-mir-194-1 ve hsa-mir-194-2 pre-miRNA'ları aynı olgun miRNA ile sonuçlandıkları halde genomun farklı bölgelerinde yerleşmişlerdir. Türlerin kökenine göre ise hsa-miR-123 (hsa: Homo sapiens) şeklinde üçlü ön eklerle adlandırılırlar. İki olgun miRNA aynı pre-miRNA'nın karşılıklı kollarından köken alırsa ilgili dizinin ucuna göre -3p veya -5p son eki alır. Zincirlerin göreceli ekspresyon düzeyleri biliniyorsa, saç tokasının (hairpin) karşı kolunda miRNA'a göre düşük düzeyde eksprese edilen miRNA'a işaret etmek için arkasına yıldız işareti konulur. Örn; miR-123 ve miR-123\* bir pre-miRNA saç tokasını paylaşırlar fakat ekspresyon farklılığından dolayı miR-123 hücrelerde daha fazla bulunur (45-47).

miRNA'ların en büyük özelliklerinden birisi, bir öncül (prekürsör) diziden köken almaları ve bu öncül dizinin saç tokası içermesidir. miRNA'ların aktif formları yaklaşık 22 nükleotid uzunluğundaki tek zincir RNA molekülleridir. Yerleşimleri ile ilgili yapılan son çalışmalar transkripsiyon birimlerinde yerleşik olduklarını göstermektedir. Genomik yerleşimlerine göre miRNA'lar gen içi (intergenik) ve gen arası (intragenik) olmak üzere 2 sınıfa ayrılabilir. Gen arası miRNA'lar; intronik, eksonik, 3'-UTR miRNA'lar ve 5'-UTR miRNA'lar olmak üzere sınıflandırılabilir (43). Gen içi miRNA genleri buldukları genin aynı zinciri üzerinde yerleşirken bir kısmı da karşı zincirde yerleşir (Şekil 2.2) (48).



Şekil 2.2. Genomik yerleşimlerine göre miRNA'ların sınıflandırılması (48).

Normal şartlar altında memeli türlerindeki miRNA'ların ekspresyonu genetik olarak programlanmıştır. Bazı miRNA'lar hücre, doku ve organlarda sınırlı olmak üzere eksprese edilirken, diğerleri her zaman eksprese edilir. Diğer bir deyişle miRNA'ların ekspresyonu dinamiktir (49). Bir miRNA geninin genomik dağılımı ve kromozomal yerleşimi onun ekspresyonunu belirleyen bir faktör olması bakımından önemlidir. miRNA genlerinin yaklaşık %60'ı transkripsiyon birimlerinin intronlarında yerleşmiştir

ve ekspresyonu ev sahibi genlerin ekspresyon profili ile bağlantılıdır (49). Pek çok miRNA genleri kümeler halinde dağılmıştır ve sıklıkla fragil bölgelerde, heterozigotluğun kaybolduğu bölgelerde, amplifikasyon bölgelerinde yerleşiktir. Bu yerleşim, kromozomal düzensizliklerin bulunduğu bölgelerdeki miRNA genlerinin ekspresyonunun direkt etkilenebilmesi bakımından önemlidir (49).

### **2.2.2.miRNA Oluşum Yolağı**

miRNA'ların biyogenezi nükleusta başlar ve sonrasında sitoplazmada adım adım devam eder. Hedef genler üzerinde düzenleme etkisine sahip olan miRNA'ların işlevsel formu, olgun miRNA'lardır. miRNA biyogenezi dediğimiz bu süreç miRNA'ların, yaklaşık 80 nt uzunluğunda pri-miRNA olarak uzun, çift zincir, 5' şapka (cap) ve 3' poli A kuyruğuna sahip moleküller olarak ilgili oldukları gen bölgesinden sentezlenmeleri ile başlar. miRNA biyogenezi 2 alternatif mekanizma üzerinden gerçekleşir: 1- Klasik miRNA oluşum yolağı, 2- Klasik olmayan miRNA oluşum yolağı (50).

#### **2.2.2.1. Klasik miRNA Oluşum Yolağı ve Bu Yolakta Yer Alan Bileşenler**

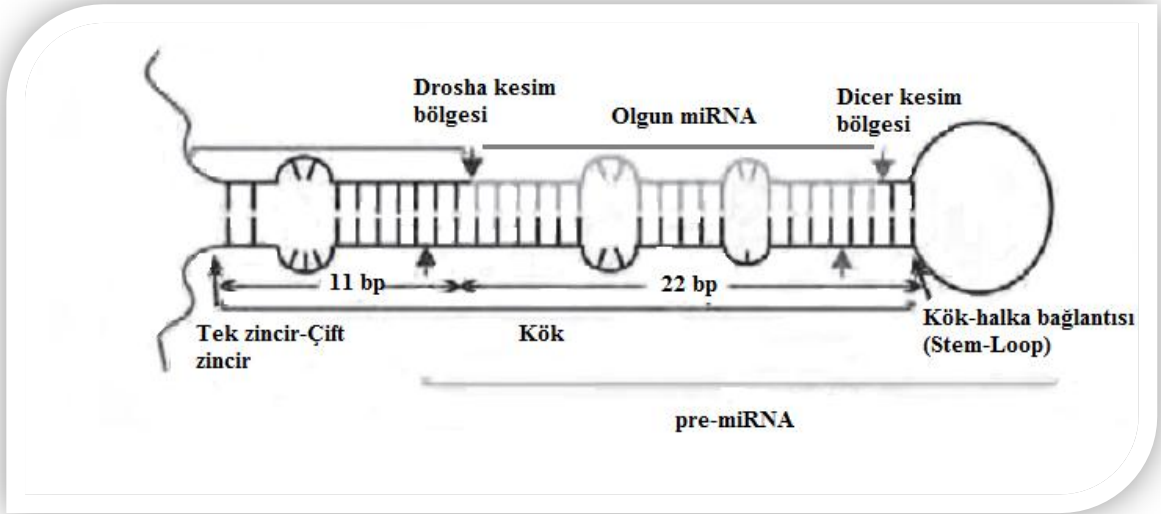
pri-miRNA 5'cap yapısına sahiptir, splicing işlemi gerçekleşmiştir, poliadeniledir ve iki veya daha fazla saç tokası formunda bulunabilir. Bu şekilde her biri ayrı bir olgun miRNA türünü oluşturabilir. Sitoplazmadaki olgun miRNA'nın hedefi ile eşleşmesi sırasında gerekli olan baz komplementerliği "termodinamik asimetri" kuralına göre 5' sonda daha düşük stabiliteye sahiptir. Olgunlaşma sırasında hangi zincirin olgun miRNA'ı oluşturacağı RISC kompleksinin merkezindeki Ago proteinleri ile belirlenir. Olgun miRNA zincirindeki 5' son ucun görevi hedef genin 3'-UTR'i ile bağlanarak translasyonu baskılamasıyla son bulur (50).

Standart miRNA oluşum yolağını tercih eden miRNA dizisi, çift zincir kök-halka yapısının bir kolunda gömülü olarak bulunur. pri-miRNA adını alan ilk transkript 7-metilguanozin cap ve poli-A kuyruğu içerir. Bu aşamadan sonra çeşitli enzim kompleksleri ve protein yapısında taşıyıcı moleküller ile miRNA'nın olgunlaşma

yolculuğu başlar. Bu yolda önemli moleküllerden birisi nükleus yerleşimli olan DROSHA enzimidir (50).

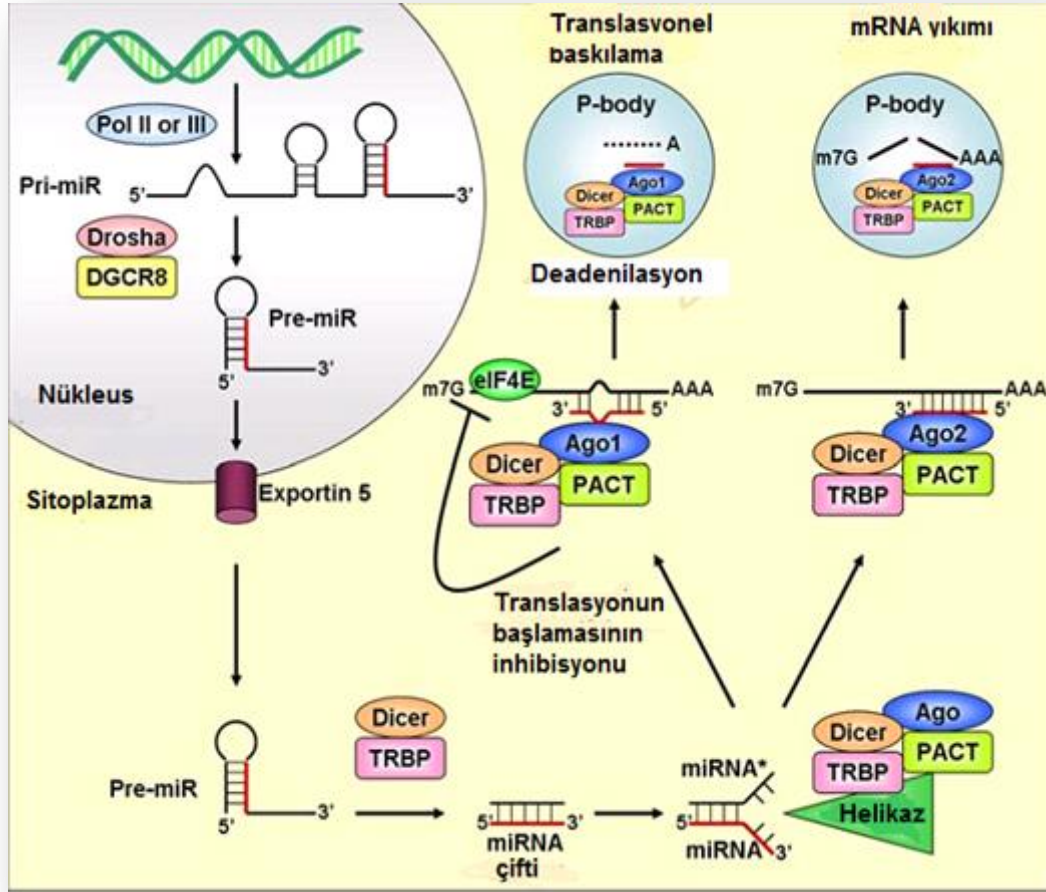
miRNA'lar RNA pol II tarafından nükleusta pri-miRNA olarak sentezlenir. Bu öncül molekül pol III'ün aracılık ettiği transkripsiyon için oldukça uzundur ve pri-miRNA dizilerinde 4 adet urasilden fazlası pol III'ün katıldığı transkripsiyon işleminin durmasına neden olmaktadır. Bu nedenle sistem pol II'i tercih etmektedir (51). İnsan pri-miRNA'ları birden fazla saç tokası içerir. Saç tokalarının yapısal özellikleri pri-miRNA'a özgüdür. Böylece nükleusta bulunan kök-halka benzeri (stem-loop) yapıdaki diğer RNA türlerinden ayrımlanabilir. pri-miRNA'nın saç tokası, mükemmel olmayan bir kök yapısı içerir. Bu yapı bir ribonükleaz (RNaz III) olan DROSHA, RNA bağlayan bir protein olan DGCR8 (DiGeorge Syndrome Critical Region Gene 8) ve diğer bazı proteinlerin de katıldığı mikroişlemci kompleks (microprocessor) tarafından kesilir. Kesme işlemi DGCR8'in pri-miRNA kök yapısındaki tek zincir-çift zincir (ssRNA-dsRNA) RNA eşleşmesinden yaklaşık 11 bp uzaklıktaki saç tokasını özgün olarak tanımasıyla başlar (52).

Bazı miRNA'ların prekürsörleri aynı veya farklı kromozomlarda 2 veya daha fazla kopya halinde bulunurlar (53). pri-miRNA'ların nükleusta bulunan ve bir RNaz III enzimi olan DROSHA tarafından enzimatik olarak kesilmesi ile yaklaşık 80 nükleotid uzunluğunda pre-miRNA'lar oluşur (Şekil 2.3) (54).



**Şekil 2.3.** Öncül (prekürsör) miRNA yapısı (54).

miRNA biyogenezi, miRNA'ların nükleusta transkripsiyonları sonrasında sitoplazmaya taşınımlarını ve sitoplazmada olgun miRNA oluşumu için işlenmelerini içerir (Şekil 2.4) (55).



Şekil 2.4. miRNA olgunlaşma mekanizması (55).

miRNA ve mRNA transkripsiyon için aynı promotörü paylaşarak birlikte evrim geçirirler. Pawlicki ve Steitz intronlardan transkribe edilen pri-miRNA'ların düzeylerinin intronları saran eksonların varlığı ile arttığını bildirmişlerdir (56). İntronik miRNA'ların işlenmesi intronun bulunduğu fiziksel şartların yüksek olmasıyla ve muhtemelen ev sahibi genin intronların kesilip çıkarılması işlemi (splicing) ile artar. miRNA-mRNA çifti üzerinde yapılan transkripsiyonel çalışmalarda paylaşılan promotörlerin eksonlar tarafından sarıldığı zaman miRNA biyogenezini kolaylaştırdığı gösterilmiştir (57).

miRNA ve mRNA'nın her ikisinin de aynı DNA lokusundan nasıl meydana geldiği konusunda 2 model öne sürülmüştür. Birinci model olarak, tek bir miRNA veya mRNA'nın aynı RNA öncülünden (precursor) meydana geldiği düşünülmektedir. İkinci modelde ise bir miRNA ve mRNA ürünü 2 farklı RNA transkriptinden oluştuğu



düşünülmektedir. Eğer ikinci model doğru ise mikroişleme ve splicing birbirinden bağımsız olarak gerçekleşir. Sonuç olarak, ya mikroişlemci ve RNA-protein alt birimlerinden oluşan dinamik bir kompleksin (spliceosome) aktiviteleri arasında fonksiyonel olmayan bir engelleme muhtemeldir ya da pre-mRNA substratları elde etmek için bir yarışma mevcut olabilir. Her iki RNA ürünü aynı öncülden köken aldığı takdirde iki işlemin birbirini izlemesi makul bir mantıktır. Bu yollardan birisinin seçimi diğerinin olması için ön koşuldur. Alternatif olarak miRNA işlenmesi ve mRNA kesme-çıkarma işlemi birlikte çalışır. Yani mikroişlemci ve spliceosome birbiriyle etkileşimdedir fakat bu etkileşim en az düzeydedir. miRNA ve mRNA ürünlerinin miktarlarını veya regülasyonun düzeyini etkilemez (57).

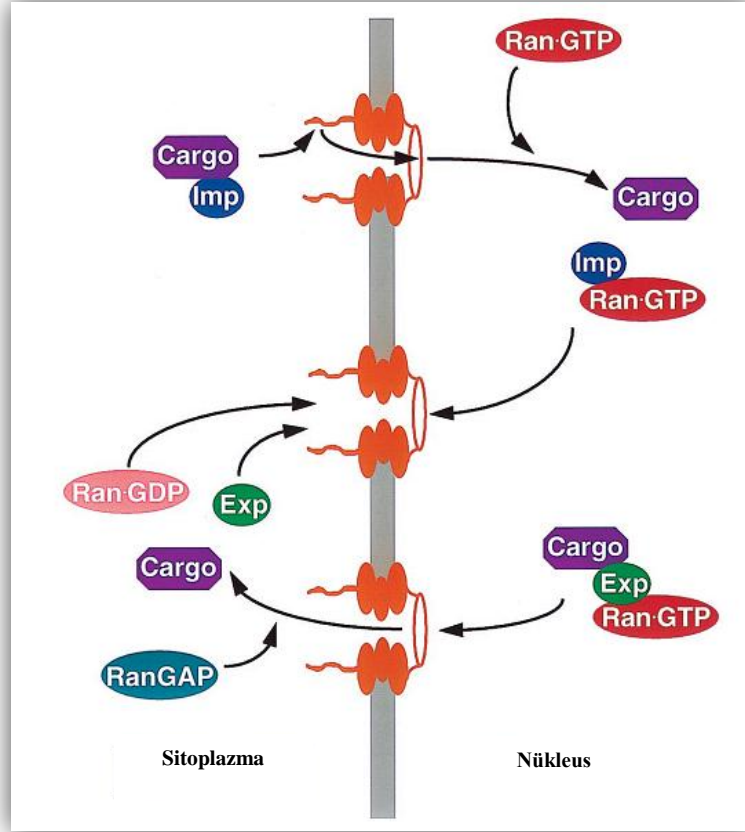
Sonuç olarak pek çok soru halen cevapsız kalmaktadır. Bu süreç cis düzenleyici diziler veya trans hareket eden faktörler tarafından mı düzenlenmektedir? Bir süreç diğerine baskın mıdır? Mekanizma ne kadar yaygındır ve tüm intronik miRNA'lar tarafından mı yönetilir? Bu sorulara cevap olarak çapraz spliceosome teorisi düşünülmüştür (57).

Bu teoriye göre mikroişlemci ve spliceosome arasındaki bağlantı için 4 model vardır. Bunlardan ilk ikilide mikroişlemci, spliceosome'u aktive veya inaktive edebilir. Sonraki ikilide ise spliceosome, mikroişlemciyi aktive veya inaktive edebilir. Mikroişlemci intronik miRNA'lara splicing faktörlerinin toplanması ile spliceosomu aktive ederken aynı zamanda spliceosome mikroişlemeyi inhibe edebilir. Bu bir kural değildir. Bununla birlikte bu bağlantı mikroişlemci kompleksteki özel RNA işleme proteinlerinin varlığına dayanan geniş bir kompleksle olur (57).

İnsanlarda pri-miRNA'dan (primer-miRNA) pre-miRNA (precursor miRNA)'nın oluşumu nükleusta gerçekleşir. Bu işlem için bir RNaz III enzimi olan DROSHA (RNASEN) ve kofaktörü olarak çalışan aynı zamanda çift zincir RNA'a bağlanan bir protein olan DGCR8 birlikte çalışır. Bu mikroişlemci kompleks pri-miRNA'nın kırılması işlemine katılır ve yaklaşık 80 nt'lik bir ürün ve bu ürünün 3' ucunda 2nt'lik çıkıntıya sahip pre-miRNA oluşur. Biyogenezleri mRNA'nın splicing'i ile benzerdir. Aynı zamanda her iki RNA (miRNA ve mRNA) türünün de meydana gelmesine izin veren mRNA işlenmesinden hemen önce DROSHA etkisiyle introndan pre-miRNA serbest bırakılır. DROSHA-DGCR8 kesimi miRNA olgunlaşmasında

oldukça önemlidir. DROSHA'nın kesim pozisyonundaki tek nükleotidlik bir kayma sitoplazmadaki işlevi sırasında DICER enziminin kesim pozisyonunu etkiler ve bu kayma olgun miRNA'da farklı 3' sonların oluşmasına yol açar. Oligonükleotidlerin bu şekilde kayması miRNA zincirinin ve karşı zincirin (olgun miRNA olarak kullanılmayacak zincir) 5' sonunun göreceli sabitliğini tersine çevirebilir. Bu sabitlik değişmeden kalsa ve doğru zincir RISC (RNA Induced Silencing Complex) kompleksine yüklense bile daha sonra miRNA'nın 5' ucundaki kaymadan dolayı miRNA'nın hedefindeki mRNA'ya spesifik bağlanmasını sağlayan 2-8 nt'lik çekirdek dizinin pozisyonunda değişime neden olur ve sonuç olarak hedeflediği spesifik mRNA'lar değişir veya özgün bir miRNA'ı hedefleyemeyebilir. DICER enzimi ile kesilerek oluşturulan pre-miRNA sitoplazmadan nükleusa taşınır. Taşıma nükleusta konumlanan ve bir karyoferin protein ailesi üyesi olan Exportin-5 (Exp-5) taşıyıcı proteini ile gerçekleştirilir (58).

Exp-5'in görevi hücre nükleusunda kendi taşıma substratına özgün bağlanmak için RAN (Ras-related nuclear protein) kofaktörünün GTP bağlı formuna bağlanmaktır. Bu işlem sitoplazmik RAN GTPaz aktive edici protein tarafından GTP'nin GDP'e hidrolizi ile gerçekleşir. Nükleositoplazmik taşıma üzerinde yapılan çalışmalarda Exp-5 hücrede tüketildiği takdirde olgun miRNA'ların düzeyinin azaldığı fakat buna rağmen pre-miRNA'nın nükleusta birikmediği gözlenmiştir. pre-miRNA nükleusta birikmiyorsa yapının kararlı olmamasından kaynaklandığı düşünülebilir. Kararlılığı sağlayan ise pre-miRNA'nın Exp-5 ile yaptığı eşleşmedir. Exp-5, pre-miRNA'nın 3' ucunda oluşan 2 nt'lik çıkıntıyı tanıyarak taşıma görevine başlar (58). Nükleustan sitoplazmaya taşıma işleminde reseptörlerin en önemli özellikleri anahtar bir kofaktöre ihtiyaç duymalarıdır. Taşıyıcı görev üstlenen protein ailelerinden birisi G protein ailesidir ve miRNA biyogenezinde görevli RAN proteini bu ailenin önemli bir üyesidir. RAN, GTP ile bağlı çalışan bir proteindir. Hücrede GDP ve GTP'ye bağlı olmak üzere iki formda bulunur. Bütün hücrelerde dağılmıştır fakat RAN-GTP ve RAN-GDP'nin konsantrasyonu lokal olarak farklıdır. Nükleusta RAN-GTP oranı yüksektir, nükleus dışında ise düşüktür. Bu farklılık konsantrasyon gradienti oluşturur ve oluşan bu gradient diğer hücresel işlemler için sinyal görevi görür (Şekil 2.5) (59).



Şekil 2.5. Ran-GTP pompası (59).

Bu pompanın çalışabilmesi için yardımcı moleküllere ihtiyaç vardır. Bunlardan birisi RAN spesifik GTPaz aktive edici protein (RANGAP)'dir ve hücre sitoplazmasında yerleşiktir. Diğer yardımcı molekül olan RAN spesifik guanin nükleotid değişim faktörü (RANGEF) ise nükleusta yerleşiktir. Sonuç olarak; sitoplazmik RAN, GDP bağlı formda bulunurken nükleer RAN büyük oranda GTP'e bağlı formda bulunur. RAN-GTP'nin hücre içine taşıma (import) faktörüne bağlanması, konformasyonel değişime sebep olur ve bu da taşıyıcıdan kargonun serbest bırakılmasıyla sonuçlanır. Taşıyıcının RAN-GTP bağlı formu daha sonra sitoplazmaya döner. RAN-GTP burada RANGAP'ın etkisiyle RAN-GDP'e hidrolize olur. Bu şekilde taşıyıcı proteinin serbest bırakılması sağlanır. Hücre dışına taşıyıcı faktör ve RAN-GDP daha sonra tekrar nükleusa döner. Burada RANGEF tarafından RAN-GTP'e çevrilir. Nükleer giriş ve çıkış işlemine Importin  $\beta$  ailesi üyeleri aracılık eder. Bu işlem de RAN-

GDP gradienti sonucunda gerçekleşir (59). Exp-5 ve RANGDP aracılığıyla sitoplazmaya taşınan kök-halka yapısındaki pre-miRNA, 5'cap ve 3' poli A kuyruğuna sahiptir ve sitoplazmik DICER1 enzimi tarafından kesilerek, olgun miRNA oluşturma yolunda bir adım daha atılır (60).

DICER1, ATP bağımlı RNaz III enzim ailesi üyesidir. pre-miRNA'lar sitoplazmada DICER1 tarafından kesildikten sonra yaklaşık 22 nt uzunluğunda miRNA: miRNA\* çifti oluşur. Çeşitli türlerde DICER, farklı görevleri olan farklı homologlara sahiptir. *Drosophila*'da, DICER1 ve DICER2 olmak üzere 2 homolog tanımlanmıştır (60). *C. Elegans*'da ise DICER1 hem çift zincirin hem de pre-miRNA'ların her ikisinin de işlenmesinde gereklidir. İnsanlarda ise bu işlemi DICER1 yerine getirir. pre-miRNA'nın DICER1 tarafından kesilmesi sonucu, kök-halka yapısının bir zincirinde gömülü olgun miRNA'nın bulunduğu RNA çifti serbest kalır. pre-miRNA'nın kök-halka yapısının her iki kolu mükemmel olmayan bir eşleşmeye sahiptir. Watson-Crick eşleşmesine uymayan G:U çiftini ve tek nükleotid eklentilerini içerir. Böylece miRNA'nın 5' ucunda daha az kararlı bir zincire sahip RNA çifti oluşur. DICER miRNA'yı bir kez kestiği zaman miRNA çiftinin (miRNA: miRNA\*) 5' ucunda düşük termodinamik kararlılığa sahip miRNA zinciri olgun miRNA'ı oluşturacak kılavuz zincirdir (guide strand) ve sadece bir zincir programlanmış RISC formunda bulunan kompleksteki Ago üzerine yüklenir ve miRISC adını alır. Çiftteki diğer zincir (miRNA\*) yolcu zincir (passenger strand) adını alır ve mekanizmada kullanılmadan parçalanır. Bu şekilde miRNA zincir seçiminde, miRNA çiftinin sonundaki termodinamik stabilitenin rol oynadığı düşünülmektedir (58). miRNA sonları ve uzunluğundaki heterojenite önemli fonksiyonel sonuçları getirir. miRNA'nın 5' ucundaki farklı nükleotidler miRNA: miRNA\* çiftinin sonlarındaki termodinamik stabiliteyi değiştirebilir ve farklı bir zincir tarafından RISC aktivasyonu tercih edilir. miRNA'ların 5' uçlarındaki kayma farklı kaynak diziye sahip olmalarına bu da farklı hedefe yönelmelerine neden olur (60). Zincir seçimine katkıda bulunan diğer bir faktör, miRNA-miRNA\* çiftinin yapısal özellikleridir (uyumsuz bazların pozisyonu). Diğer taraftan miRNA'ların her iki zincirinin de eşit miktarda geni hedef alabileceği raporlanmıştır. Bu çalışma miRNA'nın her iki zincirinin hedef genlerin ekspresyonunu baskılayabilmesi için kanıt niteliğindedir (60).

Olgunlaşma sürecinde, hangi zincirin yer alacağı belirlendikten sonra çeşitli RNA-protein ve protein-protein etkileşimlerine ihtiyaç duyulur. RISC yükleme kompleksi (RLC), RISC'in oluşumunu başlatan bir RNA-protein kompleksidir. RLC, RISC'in doğru yönelimini sağlamanın yanında kesme, dilimleme, kılavuz zincir seçimi ve argonat 2 (*AGO2*) yüklemesinde de görevlidir. *DICER*, dsRNA'a bağlanan, HIV-1 karşı harekete geçirici cevap RNA bağlayıcı protein (*TARBP2*) ile çalışır. *DICER* pre-miRNA'nın 3' ucundaki 2 nt'lik çıkıntıya yüksek afinite ile bağlanır ve bu şekilde miRNA çiftinin tekrar katlanmasını engeller. *DICER* görevini yerine getirirken yalnız değildir. Diğer bazı proteinlerle birlikte RLC kompleksi de eşlik eder (58).

*TARBP2* yaklaşık 45 kDa büyüklüğünde, 3 ilmek (dsRBD-double strand RNA Binding Protein) içeren bir proteindir. Yapısındaki üçüncü ilmek *DICER*'in amino sonundaki helikaz ilmeği ile etkileşimde olması nedeni ile önemlidir. miRNA biyogenezinde *TARBP2*'nin rolü henüz anlaşılmış değildir. Bu proteinin miRNA/siRNA üretimini kolaylaştıran *DICER* ile ortaklaşa çalıştığı düşünülmektedir. RLC kompleksinin elektron mikroskobu verileri ve biyokimyasal çalışmalar *TARBP2*'nin RISC'e uygun miRNA zincirinin yüklenmesi için sensör olarak çalıştığını göstermektedir. Böylece yanlış zincirin yüklenmesini düzeltme özelliğini de kazanmaktadır. İnsan kanserlerinde gözlenen *TARBP2* mutasyonları miRNA biyogenezinde defektlere neden olmaktadır (60). *DICER* ve *TARBP2* etkisi ile olgunlaşan miRNA'lar; mirgonat veya miRISC olarak da bilinen komplekse bağlanır. RISC tarafından hedefin tanınması olgun miRNA ve mRNA arasındaki eşleşmeye dayanır. RISC kompleksinin toplanma işleminde önemli bir bileşen *AGO* proteinleridir (58).

*AGO* proteinleri miRNA yolağında pek çok işlevde görev alır. mRNA'nın parçalanmasına, dengesizleşmesine veya translasyonel inhibisyonuna aracılık ederler. Buna ek olarak *AGO* proteinleri transkripsiyon sonrası miRNA'nın oluşma miktarını da düzenler. *AGO2*'nin hücredeki kaybı olgun miRNA'nın aktivitesini ve ekspresyonunu azaltır. *AGO* proteinlerinin RISC kompleksindeki temel görevi, *GEMIN3* ve *GEMIN4* ile birlikte olgun miRNA molekülüne bağlanarak bu kısa molekülleri sabitlemektir (61).

Farklı *AGO* proteinleri farklı görevler üstlenir. Yapılan çalışmalarda, *AGO* proteinlerinin (*AGO1-AGO4*) RISC kompleksinin toplanma işleminde gerekli olduğunu

ortaya koymuştur. Fakat bunlardan sadece AGO2'nin RISC kompleksi ile ilişkili olduğu ve hedef miRNA'nın kesilmesinde görev aldığı bildirilmiştir (62). Bu nedenle AGO2 dilimleyici argonat olarak isimlendirilir. Dilimleme özelliğinin tespiti mutagenез çalışmalarına dayanır ve AGO proteinlerinin PIWI ilmeği ile sağlanır. PIWI ilmeği AGO2'nin özgün aminoasit parçalarını dilimleme aktivitesi için esastır (62). AGO2'nin etkisi ile miRNA ilmeği seçilir ve görev sırasını RISC tarafından oluşumu uyarılan sitoplazmik işlemci cisim (processing body P-body) adı verilen yapılar alır.

mRNA'nın programlanmış parçalanması özelleşmiş sitoplazmik işlemci cisimlerde gerçekleşir. İşlemci cisimler mayalarda translyasyon için çok uzun olmayan ve ayrı odaklarda biriken yapıların bulunması ile keşfedilmiştir (63). Bu yapılara işlemci cisim adı verilmiştir. Bu çalışmada işlemci cisimlerin, RNA'nın parçalanması ve ayrıştırılması için gerekli enzimleri içerdiğini ve aynı zamanda translyasyonu yapılmayan mRNA'ların toplandığı yerler olduğunu kanıtlamışlardır. Üstelik bu odaklar dinamik bir yapıya sahiptir. mRNA devrinin (turnover-mRNA'nın üretim miktarının azalması ve translyasyonu arasındaki dengenin sağlanması) toplamına bağlı olarak büyüklüğünde artma veya azalma olabilmektedir (62).

İşlemci cisimlerle ilgili diğer önemli bir konu miRNA'larla etkileşimli işlemci cisimlerin akıbetinin ne olduğudur. İşlemci cisimlerden serbest bırakılan bu mesajların translyasyonu yapılır veya bu RNA'lar, mRNA sentez oranını aşmayacak şekilde belirli bir oranda işlemci cisimlerde yavaşça parçalanır (63).

Böylece miRNA'ların nükleusta öncül bir transkriptten sentezlenerek işlevsel olmaları için başladıkları yolculukları sitoplazmada işlemci cisimlerde son bulur. Olgunlaşma yolağında görevli proteinlerin tek tek öneminin yanında yapılarında oluşabilecek muhtemel SNP'lerin de miRNA dinamiğinde önemli yeri ve sonuçları vardır (64).

#### **2.2.2.2. Klasik Olmayan miRNA Oluşum Yolağı**

Geleneksel miRNA oluşum yolağının dışında gerçekleşen miRNA oluşumunu DROSHA bağımlı ve DICER bağımlı olarak 2'e ayırabiliriz. DROSHA bağımlı

biyogenezde mirtronlar, sno-RNA'lar, tRNA, shRNA, pre-esiRNA yer alır. DICER bağımlı biyogenezde ise AGO yer alır (50).

Mirtronlar kısa intronların bir sınıfıdır. İşlenmeleri sırasında dizi kesme-çıkarma adı verilen işlem ile DICER kesimi için uygun hale gelir ve mikroişlemci kompleksi atlatır, DICER kesiminden sonra pre-miRNA oluşur ve klasik yolda olduğu gibi işlenmesine devam edilir (50).

Diğer bir grup sno-RNA (small nucleolar RNAs)'lardır ve pre-miRNA'lar için kaynak oluşturur. Bu grup da mikroişlemci kompleksten bağımsız çalışır. Yapılan çalışmalar Ago1 ve Ago2'nin özel snoRNA'lardan köken aldığını göstermiştir. snoRNA'ların işlenmesi sırasında DROSHA aktivitesi gerekli değildir fakat DICER aktivitesine ihtiyaç vardır (50).

### **2.2.3. miRNA Oluşum Yolağı ile İlişkili Polimorfizmler**

Tek nükleotid polimorfizmlerinin keşfinden bugüne kadar yapılan çalışmalar; yapılarını, oluşum mekanizmalarını, genomda buldukları yerdeki muhtemel etkilerini, hastalıklarla ilişkilerini içermektedir. SNP'lerin çeşitliliği insan genomunda oldukça yüksektir. Genom boyunca hemen hemen her 100 baz çiftinde bir meydana gelir (64). Yapılan çalışmalar genellikle hastalıklarla ilgili aday genlerin belirlenmesini içermektedir. Başlangıçta araştırmacılar SNP'lerin etkilediği hastalıkları araştırırken özellikle belirli genler ve genlerin kaynakları üzerinde durmuşlar fakat çalışmalar sınırlı kalmıştır. Genomdaki SNP'lerin pek çoğu translasyonu yapılmayan intronik veya eksonik bölgelerde bulunur. Bu SNP'ler buldukları yere göre gen ekspresyonunu etkileyebilir ve çeşitli hastalıklardan sorumlu olabilir (63).

Gen ekspresyonunu etkileyen SNP'ler, kompleks gen regülasyonu mekanizmalarının tam olarak ortaya konulamaması nedeniyle kolay tanımlanamaz. Bununla birlikte RNA-RNA bağlanmasındaki termodinamik kurallar gereği miRNA'ların hedef mRNA ile etkileşiminde temel göreve sahiplerdir. miRNA'ların bağlanma bölgelerinde olabilecek bir SNP, miRNA'nın hedeflediği genin ekspresyonunu etkiler. Bu etkinin derecesi miRNA-hedef ilişkisinin derecesine bağlıdır.

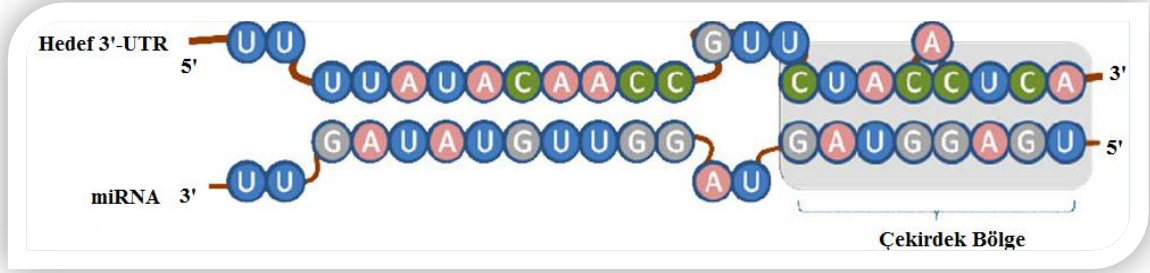
miRNA'nın hedefle eşleşmesinde 5' ucundaki 2-8 nt'lik merkez dizi esas olduğu için hem miRNA'nın kendi dizisinde hem de hedefindeki dizide olabilecek SNP'ler, miRNA-hedef mRNA arasındaki eşleşmenin gerçekleşmemesine ve hedefteki genin regülasyonunun yapılamamasına neden olur. Aynı şekilde miRNA olgunlaşma yolağından sorumlu genlerdeki SNP'ler de ciddi sonuçlar ortaya çıkarabilir. Bu sorunlar miRNA'nın ilk sentezlendiği aşamadan itibaren görülebilir. Örn: Pri-miRNA'dan pre-miRNA oluşumunda görevli DROSHA-DGCR8 kompleksinin bağlandığı dizilerde veya bu genlerin kendisinde oluşabilecek SNP'ler pri-pre miRNA dönüşümünün yapılamamasına neden olabilir (63).

Sonraki adımda pre-miRNA'ların sitoplazmaya taşınımını sağlayan Exportin-5'de olabilecek SNP'ler ise miRNA'ları sitoplazmaya taşıma görevini yerine getirmesine engel olabilir. Bu durumda miRNA'ların hücre içerisinde birikmesi beklenir fakat hücrede birikemeyecek kadar kısa ömürlü olmalarından dolayı parçalanarak kaybolurlar. miRNA olgunlaşma mekanizmasındaki diğer genlerden *DICER*, *RAN-GTP*, *AGO1*, *AGO2*, *GEMIN3*, *GEMIN4*, *TARBP2*, *XPO5* genlerinde veya hedef aldıkları miRNA üzerinde olabilecek SNP'ler de miRNA olgunlaşma mekanizmasının çalışma düzenini bozabilir. Yapılan çalışmalarda miRNA'ların kendi dizilerindeki SNP'lerin sıklığının oldukça az olduğu bulunmuştur. Bu nedenle hedef aldıkları gendeki SNP'lerin önemi artmaktadır (64).

#### **2.2.4.miRNA ile Hedef mRNA Arasındaki Etkileşim**

miRNA tarafından mRNA'nın tanınması miRNA'nın mRNA ile etkin eşleşmesine dayanır. miRNA üzerinde 2-8 nt'lik merkez bölge bulunur ve miRNA davranışı için kritiktir. miRNA hedef etkileşiminde miRNA'nın hedef transkriptin 3'-UTR bölgesindeki mükemmel olmayan bölgeye bağlanması gerekir. Hedef mRNA'nın 3'-UTR'ni hedef alan miRNA geninin 5' sonu 7-8 nt uzunluğunda hedef mRNA'a komplementer bölge içerir. miRNA-hedef eşleşmesinde Watson-Crick eşleşmesine ek olarak G:U baz eşleşmesinin de olması gerekir (Şekil 2.6) (65).





**Şekil 2.6.** miRNA ile hedef mRNA eşleşmesi (65).

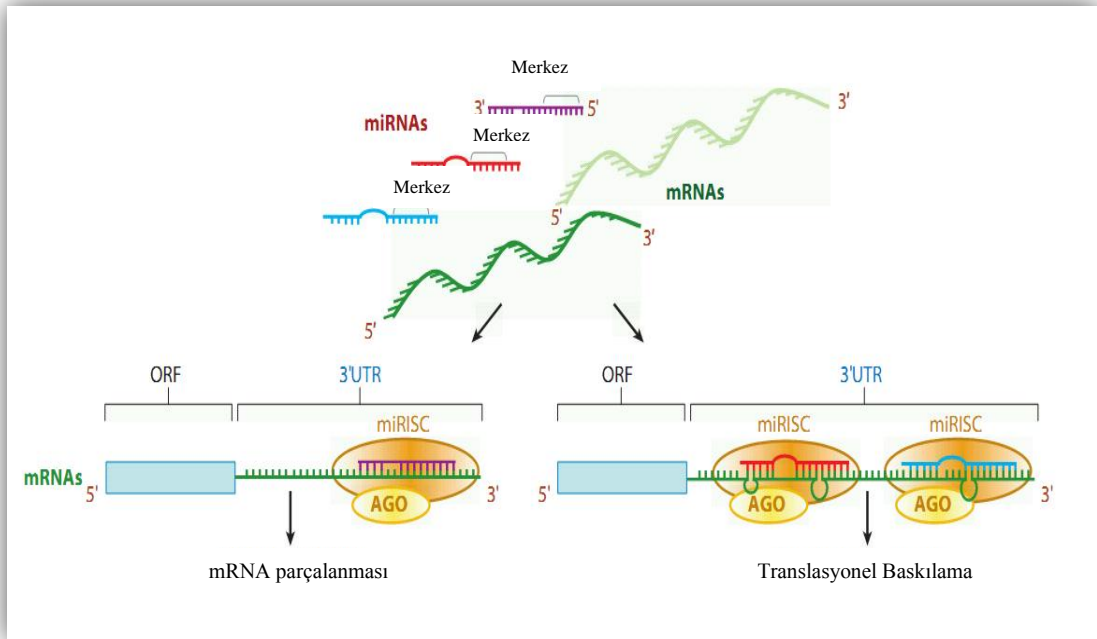
Özgün olarak hedefle eşleşen miRNA'lar çeşitli aşamalarda gen ifadesini azaltır. Genellikle translasyonun durdurulması, mRNA deadenilasyonu ve degradasyonu veya daha az sıklıkla olmak üzere mRNA parçalanması ile başarılıdır (62).

miRNA'lar düzenleyici element olmaları nedeniyle kanser ve nörolojik hastalıklar gibi çeşitli hastalıklarda merkezi rol oynarlar. Çeşitli dokularda farklı miktarlarda eksprese edilmelerine rağmen hastalıklarda ekspresyonları değişmektedir. Değişen bu miRNA ekspresyon düzeylerinin önemi Şizofreni, Alzheimer ve Parkinson gibi hastalıklarda da tespit edilmiştir (65). Bu hastalıklardaki etki mekanizmaları içerisinde hedef aldıkları genin transkripsiyonunu baskılamak yer alır ve hedeflerindeki genleri tanımlamak üzere halen etkin bir yöntem bulunmamaktadır. Bu nedenle miRNA hedef etkileşimini ortaya koymak için sayısal metodlar geliştirilmiştir. En yaygın kullanılan sayısal metodlar: TargetScan, PITA, RNA22, MirTarget2, PicTar, TarBase, Miranda, mirna, mirdatabase'dir (65).

Memelilerde 3'-UTR üzerine miRNA/RISC'in bağlanması sonucu potansiyel olarak mRNA'nın degradasyonu ile deadenilasyonun artması, translasyonun başlamasının inhibe edilmesi veya her ikisinin meydana gelmesi ile protein üretimi etkilenir. Bu mekanizmaların oluşmasında etkili olabilecek faktörler 3'e ayrılabilir:

- 1- Bağlanma bölgesi komplementerliğinin derecesi,
- 2- miRNA'nın 5' ucunda 2-8 nt olan tanıma motifinin sayısı,
- 3- Bağlanma bölgesinin kabul edilmesi,

Bağlanma bölgesinde kısıtlamanın kaybolması 3' UTR'deki çeşitli bölgelere birden fazla miRNA bağlanmasına izin verir. Mükemmel komplementer hedefler (tam miRNA:mRNA etkileşimi) etkin olarak bazı argonat proteinlerinin endonükleolitik kesme aktivitesi ile sessizleştirilir. Bazı miRNA'lar sadece merkez bölge için komplementerliğe sahiptir ve bu etkileşim 2 seçenekli gerçekleşebilir: miRNA'nın 3' UTR bölgesi ile mükemmel olmayan eşleşme hedefindeki genin translasyonunun baskılanmasına neden olur, mükemmel olan eşleşme ise mRNA'nın parçalanması ile son bulur (Şekil 2.7) (66).



**Şekil 2.7. miRNA etki mekanizması.** miRNA'nın 5' ucundan itibaren 2. nt'le başlayan 7 nt'lik çekirdek (seed) bölge miRNA-mRNA eşleşmesi için mutlak gereklidir. miRNA-mRNA eşleşmesi genellikle hedef mRNA'nın ORF (open reading frame-proteine çevrimi yapılan kodlanan diziler) bölgesinin 3'→5' akış yönünde yerleşik olan 3'-UTR'i ile gerçekleşir. Balonlar ve uygun olmayan eşleşmeler miRNA-mRNA çiftinin ortalarında bulunabilir. Şekilde solda oval halka içinde gösterilen ve genellikle bitkilerde rastlanan mükemmel eşleşme miRISC'in aracılık ettiği endonükleolitik kesim ve sonrasında mRNA'nın parçalanması ile sonuçlanır. Sağda oval halka içinde gösterilen ve hayvanlarda rastlanan mükemmel olmayan eşleşme translasyonel baskılama ile sonuçlanır. Sıklıkla birden çok miRNA (kırmızı ve mavi) aynı 3'-UTR'i hedef alabilir. Tam tersi olarak hayvan hücrelerinde tek bir miRNA aynı 3'-UTR'de birden çok bölgeye bağlanabilir (66).

miRNA'lar memeli merkezi sinir sisteminde (CNS-central nervous system)'de bol miktarda eksprese edilir. Nörogenezis, nöronal düzenin oluşması ve sinaptik

plastisite (esneklik) gibi aktivitelerde yaşamsal öneme sahiptir. Özellikle sinir sisteminde zaman ve enerjinin etkin şekilde kullanılabilmesi ve hücrel dengein sürekliliği için devamlı sinyallere, gen ürünlerinin tampon görevini doğru bir biçimde yerine getirmesine ve sinyallerin uzak sinaptik bağlantılara iletilmesine ihtiyaç vardır (67).

İnsan genomunda tanımlanan miRNA'lar teorik olarak birkaç yüz mRNA'a bağlanabilir. Bu özellikleri işlenmeleri sırasındaki bütün etkileşimlerin doğru olarak yapılıp yapılmadığı sorusunu akla getirmektedir. Bunun yanında özel bir miRNA'nın, özgün bir mRNA'ı etkilediğini gösteren çalışmalar bulunmaktadır (67).

miRNA'lar gelişim ve farklılaşmada önemli role sahiptir. Tek bir miRNA çok sayıda transkripti etkileyebilir ve tek bir transkript miRNA'ların bir grubu tarafından hedeflenebilir. miRNA'ların ifadesinin kaybı model organizmalarda ve kültüre edilen hücrelerde gösterilmiştir ve erken dönemde gelişimsel defektlere neden olduğu yönünde sonuçlar elde edilmiştir (65). miRNA'lar dokuya özgün bir ekspresyon düzeni gösterirler. Buldukları dokunun farklılaşması ve fonksiyonu üzerinde önemli role sahiplerdir. İnsanlarda çeşitli miRNA'ların nöronal hücrelerde ekspresyonlarının yüksek olduğu bulunmuştur (65).

CNS'de miRNA'ların biyolojik önemini ortaya koymak amacıyla yapılan çalışmalarda, miRNA işlenmesinde birinci basamakta yer alan DICER enzimi genetik olarak delesyona uğratılmıştır. Bu enzim pre-miRNA'nın olgunlaşma sürecinde yer alan hassas bir proteindir. Farelerde; Purkinje hücrelerinde orta beyin dopaminerjik ve kortikal veya hipokampal nöronlarında DICER enziminin tamamen delesyonu hücrelerin nörodejenerasyonuna yol açarak embriyonik dönemde ölümle sonuçlanmıştır. İzleyen çalışmalar ise hangi miRNA'nın bu nörodejeneratif fenotipte özgün olarak etkili olduğunun araştırılması yönündedir. miRNA'lardaki değişimler alzheimer, parkinson, huntington ve prion gibi hastalıkların oluşum mekanizmalarında ortaya çıkarılmıştır (67). Kurulan hipotez ise nörodejeneratif hastalıkların oluşumunda sorumluluk üstlenen miRNA'lardaki değişimlerin hastalığın oluşumunda ya sebep olarak ya da pozitif geri besleme halkasının bir parçası olarak temel hazırlaması yönündedir. Hastalar üzerinde yapılan çalışmalardan elde edilen veriler ise bu hastalıkların oluşumunda ipuçları verir ancak miRNA'ların hastalığın ilerlemesine katkılarını göstermez (67). Bu nedenle daha açık belirteçlere ihtiyaç vardır.

### 2.2.5. miRNA: Translasyonel Gen İfadesini Düzenler

miRNA'lar, hedef mRNA'ların 3'-UTR'ne bağlanmak suretiyle eşleşmenin derecesine göre protein kodlayan genlerin transkripsiyon sonrası düzenlenmesine aracılık eder ve protein üretimini azaltıcı yönde gen düzenlemesine katkıda bulunur (68). Bu düzenlemede önemli bir adım olan translasyonun baskılanma biçimi miRNA kılavuz zinciri ve hedef mRNA arasındaki dizi eşleşmesinin derecesine bağlıdır. Bir miRNA'nın 2-8 nükleotidlik çekirdek dizisi, eğer translasyonun baskılanması için hedef aldığı mRNA söz konusu ise hemen her zaman mükemmel eşleşir. Kılavuz zincir ve mRNA arasındaki eşleşme ne kadar mükemmel olursa mRNA'nın enzimatik kesimi de kolaylaşır. Enzimatik kesim sadece AGO2'i yapısında bulunduran RISC kompleksi ile gerçekleşir. AGO2 kesme işlevini kılavuz zincirin ilk bazına göre 10 ve 11. bazları arasından hedef zincirin fosfodiester omurgasını keserek gerçekleştirir (69).

Hedef aldığı mRNA ile mükemmel eşleşen miRNA, genellikle hedef mRNA'nın parçalanmasına neden olacak farklı mekanizmalarla translasyonu baskılar. Hücrel mRNA: miRNA parçalanma bölgesi olarak ise sitoplazma yerleşimli işlemci cisim, multiveziküler cisim, eksozomlar gibi aynı zamanda baskılanan mRNA'ların da toplandıkları yerler gösterilmektedir. İşlemci cisimler cap yapısını kaldıran enzimler olarak bilinen DCP1 (decapping 1) ve DCP2 (decapping 2), RNA helikazlar (RCK/p54), deadenilazlar (Ccr4:Not1 kompleks), ve RNazlar (Xrn1) içerirler. İşlemci cisimler, miRNA'nın katıldığı translasyonel baskılamanın son noktasıdır (69).

miRNA'nın translasyonel baskılamayı nasıl başardığını açıklamak için çeşitli mekanizmalar vardır. Translasyonel baskılama; translasyonun başlangıç ve uzama adımlarında olabileceği gibi transkripsiyon sonrası polipeptid parçalanmasının kolaylaştırılması ve bunların geçici veya devamlı olarak çalışması ile de oluşur (69).

Yapılan *in vitro* çalışmalarda miRNA let-7'nin mRNA'nın 5'cap yapısının tanınmasını inhibe ederek translasyonun başlamasını engellendiği bulunmuştur (70). 5'cap yapısının tanınmasındaki hata mRNA'nın parçalanması ile sonuçlanmaktadır. Diğer bir çalışmada ise başlama kodonuna toplanacak olan 60S'lik ribozom alt biriminin inhibe edilmesi (ribozom dropp out) ve uygun ribozom toplanmasına izin verilmeyerek miRNA'nın uyardığı miRISC oluşumunun engellendiği gösterilmiştir.

Örneğin; mRNA transkriptlerinin poli A kuyruğu NIH3T3 (fare embriyonik fibroblast hücreleri) ve HeLa ( hücrelerinde miRNA'nın baskılaması için gereklidir. Bu çalışmalar poli A kuyruğunun miRNA'nın aracılık ettiği ve poli A kuyruğu ile 5'm7G cap'e bağlanan proteinlerin etkileşimi ile gerçekleşen gen susturulmasında önemli role sahip olduğu bulunmuştur (71). Bunun yanında başka bir çalışmada ise miRNA'nın katıldığı gen susturulmasında poli-A kuyruğuna ihtiyaç olmadığı gösterilmiştir (72). Deneysel olarak gerçekleştirilen translasyonel baskılama mekanizmasında 2 olasılık vardır. Birinci olasılık, translasyonu sonlandıran kodon çıkarıldığı zaman kodlanan bölgenin sonunun okunmadan geçilmesine izin verilir ve miRNA'nın aracılık ettiği translasyonel baskılama gerçekleşmez. İkinci olasılık; miRNA'lar, zamanından önce olgunlaşmaya başlayan polipeptidin işlenmesine katılan uzama ve yeni nükleotidlerin eklenmesi gibi olayları inhibe eder (72).

Tek bir miRNA pek çok mRNA'ı hedef alarak bağlanma özelliğine ve proteinlerin yüzlercesinin üretimini azaltacak etkiye sahiptir. Öyle ki bir tek mRNA'nın 3'-UTR'i pek çok farklı miRNA tarafından hedef alınabilir. Sonuç olarak tüm miRNA sistemi (microRNAome); hücre gelişim, farklılaşma, apoptozis ve metabolizma için gerekli protein kodlayan genlerin % 60'dan fazlasını düzenler. Beyinde zengin olarak bulunan miRNA'ların görevini yerine getirememesi veya normal olmayan ifadeleri Alzheimer hastalığı ve Parkinson hastalığı gibi nörodejeneratif bozukluklara neden olabilmektedir (36).

miRNA'ların gen düzenlemesi dışında gelişimsel zamanlamadan apoptozise kadar farklı fizyolojik fonksiyonları da vardır. Ekspresyon profillerinin ortaya konulmasında karmaşık tekniklerin yanında basit teknikler de vardır. Bu tekniklerden bazıları; küçük RNA klonlama, dizi analizi, miRNA microarray'leri ve Real-Time PCR'dır. Real-Time PCR yaygın kullanılan bir tekniktir. Kök-halka yapısında primerler kullanılarak geleneksel primerlere göre daha özgün sonuçlar elde edilen bir yöntemdir. İdeal miRNA metodu için çeşitli şartların yerine getirilmesi gerekmektedir (73):

- 1- Başlama materyali küçük miktarlarda olsa bile miRNA profilini tanımlamak için yeterli duyarlılıkta olmalıdır,
- 2- miRNA'lar arasındaki 2 nt'lik farkı tanımlayabilecek güçte olmalıdır,
- 3- miRNA düzeylerinin kantitatif analizine izin vermelidir,

- 4- Çok sayıda örnek birarada çalışılabilir, çalışılmalıdır,
- 5- Hazırlaması kolay olmalı ve standart moleküler biyoloji laboratuvarlarında kolaylıkla bulunabilecek ekipman ve kimyasallarla çalışılabilir, çalışılmalıdır.

miRNA'ların tespiti için pek çok geliştirilmiş kimyasal yöntem vardır. Bu yöntemlerden en yaygın olarak kullanılanı floresans etiketleme yöntemi olarak adlandırılan TaqMan Real-Time PCR yöntemidir (73).

### 2.2.6. miRNA Uygulamaları

Biyolojik sistemlerde miRNA'nın rolü onları tedavi edici yaklaşımlar için müdahale edilebilir hale getirir. Tedavi yaklaşımlarında en yaygın olarak sentetik antisens oligonükleotid teknolojisi kullanılır. Modifiye sentetik antisens oligonükleotidler miRNA'ların potansiyel inhibitörleri olarak hareket ederler. miRNA'lara karşı üretilen antisens oligonükleotidler hedeflendikleri miRNA ile eşleşirler. miRNA'ların bağlanma bölgelerini işgal ederek hedeflerinden ayrılmasını sağlarlar. Antisens oligonükleotidler, özgün miRNA'ların inhibisyonu için kullanışlı bir yöntemdir. Herhangi bir özgün mRNA'nın normal olmayan baskılanması ile anormal fenotip görülebilir. Böyle bir durumda antisens oligonükleotidler ya olgun miRNA'a eş ya da onun öncül molekülüne (pre-miRNA) eş üretilebilir ve bu şekilde mRNA üzerindeki baskılayıcı etkisi uzaklaştırılabilir. *Drosophila* embriyosunda yapılan çalışmada mikroenjeksiyon ile miRNA'a karşı antisens oligonükleotidler kullanılarak miRNA'nın inhibe edilebilirliği kanıtlanmıştır (74).

Antisens RNA'ların dokulara ve hücrelere dağıtımında başarılı girişimler olmasına rağmen beyne küçük RNA'ların iletilmesinde büyük problemler vardır. Kan-beyin bariyeri nörolojik hastalıkların tedavisinde büyük bir engeldir. Bu bariyer periferik sirkülasyondan beyne tedavi edici moleküllerin pasif girişini engellediği için moleküller giriş yapmadan inhibe olurlar (58).

Merkezi sinir sisteminin dengesi kan beyin bariyeri sayesinde korunur. Beyin sistemik kandan bu şekilde ayrılır. Beyin kapilleri oldukça organize ve bu organizasyon sayesinde kan kaynaklı bileşiklerden korunur. Nöronal çevrenin dengesi

ve dengede kalması optimum beyin fonksiyonları için esastır. Bununla birlikte çeşitli nörolojik hastalıklar söz konusu olduğunda kan-beyin bariyeri değişebilir (75).

Kan-Beyin bariyeri endotel hücreler, astroglia, perisitler, perivasküler makrofajlar ve bazal laminadan meydana gelir. Tüm endojen bileşiklerin ve besin maddelerinin kan-beyin bariyerini geçişi sınırlıdır. Bu sınırı aşmak için pasif taşıma veya enerji gerektiren aktif taşıma gibi özel sistemlere ihtiyaç vardır. Kan-beyin bariyerinin endotel hücrelerinin plazma membranını geçen bileşiklerin difüzyonu bu bileşiklerin yağda çözünebilirliği, moleküler ağırlığı, elektriksel yükü gibi fizikokimyasal özelliklerine bağlıdır (75).

Sağlıklı şartlarda kan-beyin bariyeri, beyine giren ilaçların ve endojen bileşiklerin düzenlenmesini yönetir. Hipertansiyon veya nöbetler, multiple skleroz gibi serebral inflammasyon veya serebral infeksiyon gibi çeşitli merkezi sinir sistemi hastalıklarında kan-beyin bariyerinin işlevi değişir (75). Kan-beyin bariyerinin bu özelliğinden yararlanılarak AH gibi hasta yaşarken tanı konulmasında güçlük çekilen ve kesin tedavisi mümkün olmayan hastalıklarda; yaşam süresinin uzatılması, yaşam kalitesinin artırılması, hasta yakınlarının ve sağlık kuruluşlarının üzerindeki tedavi masraflarının getirdiği maddi külfetin azaltılması bakımından tanıya yönelik daha kolay kriterlerin tespit edilmesi önemlidir. Fakat bugün için miRNA'ların etki mekanizmaları halen açık olmadığı gibi AH tanısında kullanımında da bir kesinlik yoktur. Tanı için postmortem doku örneklerinin patolojik incelenmesi ve serebrospinal sıvıdaki işaretçilerin (markır) kullanılması dışında kaynak bulunmamaktadır. Yapılan araştırmalar; periferik kan, serum, plazma gibi daha kolay elde edilebilecek vücut sıvılarındaki miRNA'ların ekspresyonlarındaki değişimlerin tanıya ışık tutması yönündedir (76).

## 3. GEREÇ ve YÖNTEM

### 3.1. Kullanılan Araçlar-Gereçler, Kimyasallar ve Sarf Malzemeleri

#### 3.1.1. Kullanılan Araçlar-Gereçler

- Santrifüj (Nüve NF-800)
- Hassas Terazî (AND)
- Manyetik Karıştırıcı (Nüve MK-418)
- Derin Dondurucu (Arçelik 2031D)
- Real-Time PCR (ABI 7500, Applied Biosystems)
- PCR (Techne Flexigene)
- Etüv (Nüve EN-500)
- Otoklav (Nüve OT 4060 V, OT 40 L)
- Vorteks (VELP)
- Mikropipet Seti (Eppendorf)
- Elektromanyetik Karıştırıcı (Nüve MK-418)
- Buzdolabı (Arçelik 8188 NF)

#### 3.1.2. Kullanılan Kimyasallar ve Sarf Malzemeleri

- 2 xTaqMan® Universal PCR Master Mix (5ml) (Applied Biosystem-4304437)
- 2 xTaqMan® Gene Expression Master Mix (5 ml) (Applied Biosystem-4369016)
- Tris-Hidroklorid (Tris-HCL) (Sigma T-7149)
- Steril Apirojen Distile Su (Mustafa Nevzat)
- RevertAid™ Reverse Transkriptase (200U/μl) (Fermentas, #EP0442)
- Ribolock™ RNase Inhibitor (40 U/μl)(Fermentas, #EO0382)
- dNTPs (10mM) (1ml) (BioBasic, D0056)
- 5x Reaksiyon tamponu RT-PCR (Fermentas, 00085671)
- Dietilpirokarbonat (DEPC, C<sub>6</sub>H<sub>10</sub>O<sub>5</sub>) (SERVA, 18835.02)
- Fenol/Kloroform/İzoamilalkol 1 Faz (Amresco, K169-100ml)
- Guanidintiyosiyanat (GSCN) (Amresco, 0380-500G9)
- Proteinaz K (Amresco, 0706-100MG)



- Amonyum Asetat (Amresco, 0103)
- Sodyum Dodesil Sülfat (SERVA, 20760)
- Na<sub>2</sub>EDTA (Sigma E-5134)
- Etanol (Riedel-de Haen 32221)
- Polipropilen Real Time PCR Plate (96'lık) (Applied Biosystems)
- Microamp Real Time PCR Plate kaplama Filmi (100'lük) (Applied Biosystems)
- Microamp Real Time PCR Plate tutucu (Applied Biosystem)
- Pipet ucu 200µl'lik (Starlab, S1111-0006)
- Pipet ucu 10µl'lik (Starlab, S1110-3000)
- Pipet ucu 1000 µl'lik (Starlab, S1605-0001)
- Mikrosantrifüj tüpü 1.5 µl'lik (Starlab, S1605-5500)
- Mikrosantrifüj tüpü 0.5 µl'lik (Starlab, S1605-0000)
- Santrifüj tüpü 15 ml'lik (Beckton Dickinson, 352097)
- Transfer Pipeti 3 ml'lik (CITOTEST, 31027003US)

### **3.2. Kontrol-Hasta Gruplarının Oluşturulması**

Mersin Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından BAP-SBE TB (ŞGY) 2010-4 nolu proje olarak desteklenen araştırmamız için Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulundan onay alındı. Hasta grubu Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Nöroloji Ana Bilim Dalı'na başvuran ve takibi yapılan, DSM-IV-TR kriterlerine göre AH tanısı alan bireylerden oluşturuldu. Sağlıklı kontrol grubu ise yine aynı kliniğe başvuran ailesinde AH dahil herhangi bir nöropsikiyatrik hastalık tanısı almamış bireylerin seçilmesiyle oluşturuldu. Hem hasta hem de kontrol grubundaki bireylerden çalışmaya dahil olmayı kabul ettiklerine dair etik kurulda belirtilen yönergelere uygun bir biçimde hazırlanmış bilgilendirilmiş onam formu alındı. Bu çalışmaya, hasta grubu olarak Alzheimer hastası 172 bireyden, kontrol grubu olarak 109 sağlıklı bireyden olmak üzere izole edilen toplam 281 bireye ait RNA ve DNA örneği dahil edildi. Her bireyden 10 ml periferik kan örneği alınarak, % 2'lik etilendiamintetraasetik asit (EDTA) içeren 15 ml'lik santrifüj tüplerine aktarıldı. Hasta ve kontrol örneklerine ait moleküler analizler Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı Laboratuvarlarında gerçekleştirildi.

### **3.3. Periferik Kandan RNA ve DNA Elde Edilmesi**

Periferik kandan RNA eldesi için asit guanidinyum – fenol kloroform (AGPC) yöntemi (77), DNA eldesi için ise tuz ile çöktürme yöntemi kullanıldı (78). Kontrol ve hasta gruplarına ait kan örnekleri, RNA ve DNA elde edilene kadar -20 °C'de saklandı. Örnekler oda ısısına getirildikten sonra RNA ve DNA eldesi için 5'er ml'lik ayrı ayrı tüplere bölündü.

#### **3.3.1. RNA İzolasyonu**

##### **3.3.1.1. RNA İzolasyonunda Kullanılan Tampon ve Çözeltiler**

###### **Dietilpirokarbonatlı Su (DEPC-H<sub>2</sub>O)**

1000 µl deiyonize su içine 1 ml DEPC konularak iyice çalkalandı. Alüminyum folyo ile sarılarak 1 gece oda ısısında bekletildi. 60°C'de 2 saat kapağı hafifçe gevşetilerek tutuldu ve ardından otoklavlanarak +4 °C'de saklandı.

###### **Sodyum Sitrat (0,75 M)**

Sodyum sitrat 5,5 H<sub>2</sub>O.....15,78 g

DEPC'li su ile 1000 ml'e tamamlanarak (pH=7.0) otoklavlandı.

###### **Sarkozil (% 10)**

Sarkozil.....1 g

DEPC'li su ile 10 ml'e tamamlandı.

### **Guanidinyum Tiyosiyanat (GSCN) (4M)**

Guanidinyum tiyosiyanat (4M)..... 25 g

Sodyum sitrat (0,75M).....5 ml

Sarkozil (% 10).....2,5 ml

DEPC'li su ile 50 ml'e tamamlandı.

### **Denatürasyon Çözeltisi (Solüsyon D)**

GSCN (4M) çözeltisi.....9,9 ml

2-merkaptoetanol (14M).....0,1 ml

İki solüsyon birleştirilerek kullanıldı.

#### **3.3.1.2. Periferik Kandan RNA Eldesi Protokolü**

1- İçinde EDTA'lı 5 ml kan bulunan 15 ml'lik santrifüj tüpü üzerine soğuk steril distile su ilave edilerek yaklaşık 13 ml'e tamamlandı.

2- Karışım 2-3 dakika hızlı olarak aşağı-yukarı karıştırıldı.

3- 10 dakika 2000 rpm'de oda ısısında santrifüj edildi.

4- Süpernatant atıldıktan sonra peletin üzerine soğuk steril distile su ilave edilerek yaklaşık 13 ml'e tamamlandı.

5- 10 dakika 2000 rpm'de santrifüj edildi ve süpernatant atıldı.

6- 4 ve 5. adımlar yaklaşık 4-5 kez tekrarlandı.

7- Oluşan peletin üzerine 500 µl denatürasyon solüsyonu eklenerek 2 ml'lik eppendorf tüpe alındı ve birkaç saniye vortekslenerek buz içinde 15 dakika bekletildi.

9- Karışımların üzerine 700 µl fenol-kloroform-izoamil alkol (25:24:1) eklenip buz içinde 15 dakika daha bekletildi.

10- Tüpler 4 dakika 10.000 rpm'de santrifüj edildi.

11- Üst faz alınıp yeni bir 1,5 ml'lik steril eppendorf tüpe aktarıldı.

12- Yeni tüplere 700 µl kloroform-izoamil alkol (24:1) eklenip 2 dakika 10.000 rpm'de santrifüj edildi.

13- Üst faz yeni bir 1,5 ml'lik steril eppendorf tüpüne aktarılıp alınan bu üst faza 1 ml soğuk absolü etanol eklendi ve -20°C'de bir gece bırakıldı.

14- Tüpler -20°C'den alınıp 15 dakika 12.500 rpm'de santrifüj edildi.

15- Tüplerdeki etanol dökülüp 500 µl % 70'lik etanol eklendi ve birkaç saniye vortekslendi. Daha sonra 5 dakika 12.500 rpm'de santrifüj edildi.

16- Süpernatant dökülüp tüplerin dibinde kalan etanol pipetle alındı.

17- Tüplerin ağzı açık olarak en az 10 dakika bekletilip pelet üzerine 50 µl DEPC'li su eklenerek -20°C'de saklandı.

### **3.3.2. DNA Eldesi**

#### **3.3.2.1. DNA Eldesi için Kullanılan Tampon ve Çözeltiler**

##### **Nüklei Lizis Tampon Çözeltisi**

10 mM Tris-HCl.....1,576 gr (pH 8)

400 mM NaCl.....23,4 gr

2 mM Na<sub>2</sub>EDTA.....0,7 gr (pH 7,4)

1 lt distile suda çözüldü.

### **%10 Sodyum Dodesil Sülfat (SDS)**

SDS.....10 gr

100 ml distile suda çözüldü (pH 7,2).

### **TE Tampon Çözeltisi**

10 mM Tris-HCl.....0,394 gr (pH 8)

1 mM Na<sub>2</sub>EDTA.....0,093 gr

250 ml distile suda çözüldü.

### **6 M Amonyum Asetat (C<sub>2</sub>H<sub>7</sub>NO<sub>2</sub>) Tampon Çözelti**

C<sub>2</sub>H<sub>7</sub>NO<sub>2</sub>.....148 gr

200 ml distile suda çözüldü.

### **6 M Tuz (NaCl) Çözeltisi**

NaCl.....35,5 gr

100 distile suda çözüldü.

#### **3.3.2.2. Periferik Kandan DNA Eldesi Protokolü**

1.İçerisinde 5 ml kan bulunan 15 ml'lik polipropilen tüpler içine 13 ml'ye tamamlanacak şekilde soğuk steril distile su eklendi ve 2-3 dk süreyle tüpler hızlıca çalkalandı.

2. Daha sonra tüpler oda sıcaklığında 10 dk 2000 rpm`de santrifüj edildi.

4. Çökelti üstündeki sıvı faz (süpernatant) atıldıktan sonra tekrar 13 ml`ye tamamlamak için soğuk steril distile su ilave edildi.
5. Oda sıcaklığında 10 dk 2000 rpm`de tüp santrifüj edildi ve tekrar süpernatant atıldı.
6. 4 ve 5. Basamaklar 3 defa tekrarlandı.
7. Süpernatant atıldıktan sonra çökelti üzerine 3 ml nuklei lizis tampon çözeltisi eklendi.
8. 150 µl (10mg/µl) Proteinaz K ve 200 µl %10 SDS köpürtmeden yavaş yavaş eklendi.
9. Proteinaz K'nin optimum düzeyde işlevini yapabilmesi için tüp alt üst edilerek 37°C`de ebir gece inkübe edildi.
10. İnkübasyon sonrası Proteinaz K'nin inaktivasyonu için örnekler 55°C'de 1 saat bekletildi.
11. 2 ml 6 M Amonyum Asetat veya 6M NaCl ilave edilip hızlıca yaklaşık 20 defa alt üst edildi.
12. Oda sıcaklığında 10 dk bekletildi ve 15 dk 3500 rpm`de santrifüj edildi.
13. Süpernatant başka bir tüpe alındı ve üzerine 2 katı kadar (oda sıcaklığında) saf etanol eklendi.
14. Elde edilen DNA yumağının miktarına göre Tris-EDTA (TE-pH=8) tampon çözeltisi eklendi.
15. Ardından tüpler oda sıcaklığında bir gece bekletildikten sonra Real-Time PCR`da SNP analizleri yapılmak üzere +4 °C'de saklandı.

### **3.4. Ekspresyon Analizi Yapılacak AH ile İlişkili miRNA'ların Seçilmesi**

miRNA'ların seçiminde; Alzheimer hastalığı oluşumunda etkisi gösterilmiş genlerden *APP*, *BACE1*, *PSENI* ve *PSEN2* genlerini hedef alan miRNA'lar; MicroCosm Targets, TargetScan, miRNAMap, microInspector, PicTar, miRWalk, mirbase, mirdb, Patrocles, Diana lab ve Human MiRNAs & Diseases veri tabanları kullanılarak tespit edildi. Daha sonra ferrolab (79) ve miracle (80) veri tabanları ile kan dokusunda eksprese oldukları onaylanarak çalışmaya alındı. Son olarak seçilen miRNA'ların hedefledikleri genlerle eşleşme etkinliğini ortaya koyan değerler için

*microrna* (81) veri tabanı kullanıldı. Analiz sonuçlarına göre; *hsa-miR-9-5p*'nin hedefi olan *BACE1* geni ile eşleşme skoru %89, *hsa-miR-29a-3p*'nin hedefi olan *BACE1* geni ile eşleşme skoru %97, *hsa-miR-106a-5p*'nin hedefi olan *APP* geni ile eşleşme skoru %54, *hsa-miR-107*'nin hedefi olan *PSEN1* geni ile eşleşme skoru %85, *hsa-miR-125a-3p*'nin hedefi olan *PSEN2* geni ile eşleşme skoru %75, *hsa-miR-125b-5p*'nin hedefi olan *PSEN1* geni ile eşleşme skoru %68 olarak bulunmuştur (Çizelge 3.1).

**Çizelge 3.1.** miRNA'lar, Alzheimer Hastalığı'nda etkili hedef aldıkları genler ve eşleşme skorları (79-81).

miRNA	Hedef Gen	Hedef Eşleşme Skoru (%)*
<i>hsa-miR-9-5p</i>	<i>BACE1</i>	89
<i>hsa-miR-29a-3p</i>	<i>BACE1</i>	97
<i>hsa-miR-106a-5p</i>	<i>APP</i>	79
<i>hsa-miR-106b-5p</i>	<i>APP</i>	54
<i>hsa-miR-107</i>	<i>PSEN1</i>	85
<i>hsa-miR-125a-3p</i>	<i>PSEN2</i>	75
<i>hsa-miR-125b-5p</i>	<i>PSEN1</i>	68

\*<http://www.microrna.org> (81).

### 3.5. Genotipleme Yapılacak AH ile İlişkili miRNA SNP'lerinin Seçilmesi

miRNA'lar sağlıklı tüm doku ve hücrelerde değişik ekspresyon düzeyine sahiptir. Biyogenezde görevli genler ve miRNA genlerinin ekspresyonundaki değişiklikler çeşitli düzensizliklere sebep olabilir. Bu düzensizliklerden birisi olan mesane kanseri üzerine yapılmış bir hasta kontrol çalışmasında yer alan miRNA oluşum yolağı genleri seçildi. *RNASEN (DROSHA)*, *DGCR8*, *XPO5*, *RAN*, *DICER1*, *TARBP2*, *AGO1(EIF2C1)*, *AGO2(EIF2C2)*, *GEMIN3(DDX20)*, *GEMIN4* genleri üzerindeki *rs10719*, *rs1640299*, *rs11077*, *rs14035*, *rs3742330* ve *rs13078*, *rs784567*, *rs595961*, *rs4961280*, *rs197388*, *rs910924* polimorfizmlerinin (82) miRNA'nın olgunlaşmasında hatalara yol açarak AH'da da aynı sonuçları gösterebileceği düşünüldü. Polimorfizmler için beyaz ırkta Minör Allel Frekansı (MAF) 0.01'den büyük olanlar ve özellikle gen işlevinde ve ekspresyonunda yeri olan tutan 3'-UTR, promotör ve 5'-UTR bölgelerinde

yer alan SNP'ler tercih edildi (Çizelge 3.2). Bu bölgeler, ilgili polimorfik diziyeye özgü primer ve probalar kullanılarak analiz edildi.

**Çizelge 3. 2.** miRNA biyogenezinde görevli genler ve genlere ait SNP'ler (82).

<b>Gen</b>	<b>Gen ID*</b>	<b>Kromozomal Yerleşim*</b>	<b>Referans SNP No</b>	<b>Pozisyon</b>	<b>Varyant (M&gt;m)</b>
<i>RNASEN (DROSHA)</i>	29102	chr5:31401447	rs10719	3'-UTR	<b>C&gt;T</b>
<i>DGCR8</i>	54487	chr22:20098359	rs1640299	3'-UTR	<b>G&gt;T</b>
<i>XPO5</i>	57510	chr6:43490947	rs11077	3'-UTR	<b>A&gt;C</b>
<i>RAN</i>	5901	chr12:131361241	rs14035	3'-UTR	<b>C&gt;T</b>
<i>DICER1</i>	23405	chr14:95553362	rs3742330	3'-UTR	<b>A&gt;G</b>
<i>DICER1</i>	23405	chr14:95556747	rs13078	3'-UTR	<b>A&gt;T</b>
<i>TARBP2</i>	6895	chr12:53894465	rs784567	5'-UTR	<b>C&gt;T</b>
<i>AGO1 (EIF2C1)</i>	26523	chr1:36367780	rs595961	intron 10	<b>A&gt;G</b>
<i>AGO2 (EIF2C2)</i>	27161	chr8:141647414	rs4961280	promotör	<b>C&gt;A</b>
<i>GEMIN3 (DDX20)</i>	11218	chr1:112297482	rs197388	promotör	<b>T&gt;A</b>
<i>GEMIN4</i>	50628	chr17:655920	rs910924	promotör	<b>C&gt;T</b>
<p><b>Kısaltmalar: M&gt;m, majör&gt;minör allel; chr, chromosome (kromozom)</b>  * <a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP</a></p>					



### 3.6. Ekspresyonlar için Real-Time PCR Primer ve Prob Dizilerinin Sentezlenmesi

Ulusal Biyoteknoloji Bilgi Enstitüsü veri tabanı (NCBI; National Institute of Biotechnology Information) (83) kullanılarak mRNA dizileri elde edilen *hsa-miR-9-5p*, *hsa-miR-29a-3p*, *hsa-miR-106a-5p*, *hsa-miR-106b-5p*, *hsa-miR-107*, *hsa-miR-125a-3p*, *hsa-miR-125b-5p* ve endojen kontrol olarak seçilen *hsa-miR-26b-5p* genlerine ait ekspresyonları ölçmek üzere bu miRNA'lara özgün kök-halka yapısındaki primer ve prob dizileri Primer Express 3.0 (Applied Biosystems) programı kullanılarak tasarlandı<sup>1</sup>. Şekil 3.1'de (84) kök-halka yapısındaki referans pri-miRNA dizileri gösterilmiş ve bir kol üzerindeki olgun miRNA dizileri kırmızı ile işaretlenmiştir.

#### A) *hsa-miR-9-5p*

```
c      guug  uc          g      u  ug
gggguug  uua  uuugguuaucuagcu  uaugag  gg  u
|||||||  |||  |||||||||||||||  |||||  ||  g
ccccaau  aau  aagccaauagaucga  auacuu  cu  g
a      -aaa  ga          a      -  ga
```

#### B) *hsa-miR-29a-3p*

```
          uuu      c      ucaa
augacugauuuc  ugguguu  agag  u
|||||||||||  |||||||  ||||  a
uauuggcuaaag  accacga  ucuu  u
          ucu      -      uuaa
```

#### C) *hsa-miR-106a-5p*

```
u  cc      -          g      g      c  u
cc  ugg  auguaa  aagugcuuaca  ugcag  uag  uu  u
||  |||  |||||||  |||||||||||  |||||  |||  ||  u
gg  acc  uacauu  uucacgaaugu  acguc  auc  ag  g
u  au      c          a      -  u  a
```

(Bir sonraki sayfada devam ediyor)

<sup>1</sup> Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji AD Başkanı Prof. Dr. M. Emin ERDAL tarafından tasarlanmıştır.

(Bir önceki sayfada devam ediyor)

D) *hsa-miR-106b-5p*

```
      c   -ua   g   a a   -- uc
ccugc ggggc  aagugcu acagugc g uagu gg c
||||| |||||  ||||| ||||| | |||| ||
ggacg ccucg  uucaugg ugucacg c aucg cc u
      a   ucg   g   c -   ug uc
```

E) *hsa-miR-107*

```
      c c   --c   u u   c   u a
ucu ugcuuu  agcu cu uacaguguugc uug ggc u
||| |||||  ||| || ||||| ||||| ||| ||| g
aga acgaaa  ucgg ga auguuacgacg aac uug g
- c   cua   - c   - - a
```

F) *hsa-miR-125a-3p*

```
      u   u u   uc ug   c   ua   ---- a
gccag c cuagg  cc aga ccuu accuguga  gg c
||||| | ||||| || ||| |||| | ||||| ||
cgguc g ggucc  gg ucu ggag  uggacacu  cc a
      c   u c   ga gu   u   --   ggga u
```

G) *hsa-miR-125b-5p*

```
      u   uc   u   uc ug   c   au   c
g'gcg cuc cag  cc aga ccuaacuugug  guuuu c
|||| | ||| || | ||| ||||| ||||| ||||| g
cgug gag guc  gg ucu ggauugggcac  uaaau u
      u   cu   c   ga gu   c   -c   u
```

H) *hsa-miR-26b-5p*

```
      ga -   u   uc   u ug
ccgg ccc agu caaguaau  aggauagguug g c
|||| ||| ||| ||||| ||||| ||||| |
ggcc ggg ucg guucauuu  ucuuguccgac c u
      ag   c   -   cc   - ug
```

Şekil 3.1. Kök-halka yapısındaki pri-miRNA dizileri üzerinde yerleşik olgun miRNA dizileri: A) *hsa-miR-9-5p*, B) *hsa-miR-29a-3p*, C) *hsa-miR-106a-5p*, D) *hsa-miR-106b-5p*, E) *hsa-miR-107*, F) *hsa-miR-125a-3p*, G) *hsa-miR-125b-5p*, H) *hsa-miR-26b-5p* (84).

Total RNA'dan ilgili miRNA'ları elde etmek için cDNA oluşturmak üzere RT (reverse transcriptase) primer dizileri ve miRNA'ların özgün ekspresyonlarını analiz etmek için primer ve prob dizileri "Metabion International AG, D-82152 Martinsried/Deutschland" tarafından sentezlendi. Ekspresyon için RT primerleri kök-halka yapısında tasarlandı. Her prob 5' ucunda FAM ile işaretlenmiş floresan ışığa yayabilen boya ve 3' ucunda ise bu ışımının gerçekleştiği dalga boyuna sahip ışığın yayılmasını engelleyen Black Hole Quencher™ (BHQ) adındaki "quencher" (soğurucu) kovalent bağ ile bağlanmıştır. Ayrıca sitozin nükleotid yerine sitozin analogu olan C-5 propinil-deoksiribo Sitozin (pdC) ilavesiyle prob tasarlanması sırasında floresan boya ile işaretli oligonükleotidin erime sıcaklığı (T<sub>m</sub>) arttırılarak hedefe özgüllük korunmaya çalışılmıştır. Prob dizileri tasarlanırken ilgili miRNA'nın özgün olarak elde edilmesi ve ekspresyonunun ölçülebilmesi için sıkıştırılmış nükleik asit teknolojilerinden (*Zip nucleic acids-ZNA*) yararlanılmıştır (Çizelge 3.3). ZNA probolar oligonükleotidler ile yapısındaki spermin ünitesi aracılığıyla bağlantı kurar ve hedefe ilgileri artırılır. Böylece ZNA'ların erime ısı (T<sub>m</sub>- *Melting Temperature*) önemli derecede artar ve hedefe özgüllük de artırılmış olur (85).

**Çizelge 3.3.** miRNA RT-PCR (Reverse Transcription PCR) ve Real-Time PCR primer-prob dizileri.

miRNA Adı	*miRNA Gen No	**miRNA Nükleotid Dizi No	Primer ve Prob Dizileri
<i>hsa-miR-26b-5p</i>	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-BHQ1-3'
<i>hsa-miR-9-5p</i>	407046	NR_029691.1	5'-RT-GTCGTATGCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGCATACGACTCATAAC-3'
			5'-F-GCCGCTCTTTGGTTATCTAGCT-3'
			5'-PR-FAM-TG(pdC)ATA(pdC)GA(pdC)T(pdC)ATA(pdC)AG-ZNA4-BHQ1-3'
<i>hsa-miR-29a-3p</i>	407021	NR_029503.1	5'-RT-GTCGTATGCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGCATACGACTAACCG-3'
			5'-F-GCCGCTAGCACCATCTGAAAT-3'
			5'-PR-FAM-TG(pdC)ATA(pdC)GA(pdC)TAA(pdC)CGAT-ZNA4-BHQ1-3'
<i>hsa-miR-106a-5p</i>	406899	NR_029523.1	5'-RT-GTCGTATGCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGCATACGACCTACCT-3'
			5'-F-GCCGCAAAAGTGCTTACAGTGC-3'
			5'-PR-FAM-TG(pdC)ATA(pdC)GA(pdC)CTACCTGC-ZNA4-BHQ1-3'
<i>hsa-miR-106b-5p</i>	406900	NR_029831.1	5'-RT-GTCGTATGCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGCATACGACATCTGC-3'
			5'-F-GCCGCTAAAGTGCTGACAGT-3'
			5'-PR-FAM-TG(pdC)ATA(pdC)GA(pdC)ATCTGCAC-ZNA4-BHQ1-3'
<i>hsa-miR-107</i>	406901	NR_029524.1	5'-RT-GTCGTATGCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGCATACGACTGATAG-3'
			5'-F-GCCGCAGCAGCATTGTACAGGG-3'
			5'-PR-FAM-TG(pdC)ATA(pdC)GA(pdC)TGATAG(pdC)C-ZNA4-BHQ1-3'
<i>hsa-miR-125a-3p</i>	406910	NR_029693.1	5'-RT-GTCGTATGCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGCATACGACGGCTCC-3'
			5'-F-GCCGCACAGGTGAGGTTCTTG-3'
			5'-PR-FAM-TGCATACGACGGCTCCCA-ZNA4-BHQ1-3'
<i>hsa-miR-125b5p</i>	406911	NR_029671.1	5'-RT-GTCGTATGCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGCATACGACTCACAA-3'
			5'-F-GCCGCTCCCTGAGACCCTAAC-3'
			5'-PR-FAM-TG(pdC)ATA(pdC)GA(pdC)T(pdC)A(pdC)AAGT-ZNA4-BHQ1-3'
<b>miR-Universal</b>			5'-R-GTGCAGGGTCCGAGGTAT-3'

\*www.ncbi.nlm.nih.gov/gene, \*\*http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP, (F: Forward, PR: Prob)

### 3.7. SNP'ler için Real-Time PCR Primer ve Prob Dizilerinin Sentezlenmesi

Araştırmamıza konu olan genlere ait diziler Ulusal Biyoteknoloji Bilgi Enstitüsü veri tabanı (*NCBI; National Institute of Biotechnology Information*) (83) kullanılarak elde edildi. Şekil 3.2-3.12'de referans genom dizileri üstte belirtilmiş olup primer eşleşme bölgeleri sarı ile işaretlenmiştir. Yeşille işaretlenen bölgeler ise prob eşleşme bölgesidir. Kırmızı renkle işaretlenen nükleotid polimorfik allelin yerini işaret etmektedir. Her bir primer ve prob dizisinin üstünde NCBI numaraları ile insan referans genom dizileri belirtilmiştir. *DROSHA (RNASEN)*, *DGCR8*, *RAN*, *TARBP2*, *DICER1*, *XPO5*, *AGO1*, *AGO2*, *GEMIN3* ve *GEMIN4* genlerine ait polimorfizmlere özgü primer ve prob dizileri Primer Express 3.0 (Applied Biosystems) programı kullanılarak tasarlanmıştır<sup>2</sup> (Çizelge 3.4) .

```
NM_001100412.1
AAATAAAAGGAAGTAATGCACATTCACCAAAGTCAAGTTTTCCGTTAAATAGAAGAAAAATCTAATACTT
TGTAATAAAGACCATCCAGCTAAAAACAGATCATTAAAAACAACAATAGCGATTTGACTCTGTATTTTATT
TCAATGAGCACACTTCATTCATTGTCTGCAGGAAAC TAGGCTAGGTCTCAATAGACAACAGTCA CAGTT
ACTGAGCAAGTAAATACTCCACACTTGCATGCCCTCCTTTATTTCTTGATGTCTTCAGTCTC
```

Şekil 3.2. *RNASEN (DROSHA)* geni *rs10719*, C>T polimorfizmi (83).

```
NG_022931.1
AACCATCAAGGTGGTCCCTCTCCAGTCTGGACACGATGCCAGCAAGGATGACGTCCTGCCACCTCCTGGGA
GTTACCC TGGCCTCCTAGGGTCCCTTTTCTGATGAAGTCTTAATCCCTAAAAGCGCCTCTTTGGACAC
TGAGGCCCTCTCTGCCTTTCCTGGCCTCCGGCAACAGTTTTTTACAAAAGATTTTTTGCAGTCGAGTCCAT
ATGTCCACCCATTGATTTTTAAAGCTTTTGTGATATTTTAGCATTTTGAAAGACTTTCACAGTGAGAGTA
GAAGGTAGATTTGGAATCATGCATTTTAGCAAGTGGACTTGTTGAAACAGGAAGCAAGGGCCTTCAGTGT
```

Şekil 3.3. *DGCR8* geni *rs1640299*, G>T polimorfizmi (83).

<sup>2</sup> Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji AD Başkanı M. Emin ERDAL tarafından tasarlanmıştır.

NM\_020750.2

TGTCATGTGACACTATCTAGGGTACTGTGGCTCTTGTGCCTGAGTGGACCTTGAGGCTGGGGAGGCCAGA  
CTGAGGGGTCATTCATGGAAGGGCAAGATGTGTGAAGTCTAAAGGGGATGTTAGCACTAAAGACTTCCCA  
GCCCTGGTCCTTGAGGACTATACTTGATACTGTGCCAAGTTTAGCAGTAGCCTGTACCATGGATCCCA  
TCAGGTGACCAGATTCTTGCCCAAAGCAAAGTTGAGAGAACTGACCAAGTTCTTTCAGCACTTAGCACC  
TAACCCAGACATGCCCTTAGGGAGTGGGGAAAGTTTCCTGCCAGCCAGCAGCAAAAGGGCTCAGTGGG

Şekil 3.4. *XPO5* geni *rs11077*, A>C polimorfizmi (83).

NT\_009755.19

AGGAGTACCTGAAAACGTGGGTAAACATGGACCATTTTCCTTGCGTATCAACTTCACACTAAGCATCTA  
ACATTCAAACAAAAAGTGCAAAATTTGTAATTATTTTAAACAGCAAGAATTCCCAACCTCCTGCCATCC  
ACTGATGTTCCATCCTGTTTGA GTTCTACATTAAAAACA TGATTACTTTTGCCATAAAAGAAAATATTAC  
CCTTAAAATATCTATTTGATATGTACAACCACATTTTATTCTGACAGGTCACAGATTTTGAGCAAGTG  
CTTCCCTAGGTGACCCTACCTAGCCAATATGAAGGTGGAGCAAACACTGCTTTAGCTTAACTGCACATAAT  
ATTTACACCATGTAACCCTTCTAAC

Şekil 3.5. *RAN* geni *rs14035*, C>T polimorfizmi (83).

NG\_016311.1

TTATTCAAATGTAATTAACAACCATATAGGTAATAAACATGACATGAGTTTCTCTTCTGCAGATAATG  
CAAATGGGTAAAGACTCTTAACATAATTTAGATGCAGTTAAAAAAGGTAACAAGGTCAGTTTGGT  
GGCTTCAATCTTGTGTAAGGGATTAG CACCCTAACAGAGCAAGATCCAATATTTTAAATCAACGGGGC  
CTTGTGCATGAACTGCGCTCGATCTGGATTCCAGTGATCCTCTGCAGTGCCACCTGCCTCCAGGGAGCG  
ACTGAAGAAGCCGACTGCCG

Şekil 3.6. *DICER1* geni *rs3742330*, A>G polimorfizmi (83).

NG\_016311.1

```
CGCAAAAACTAAAACTACAATTAGTTCCAAAATTTTATACATATGTTAAATGTTTTATTCTGTTATCTA
TCCTGTTATCAACCAAACCTTTAAATTCTGCCTTCAATTCATTCCACTCACTA CAACTTTAAGTCTTCCT
TTCGGATTTAAATAATTTTCCCCTTAATTTTTTTTTGTTTTGTTTCTTGTTTTGAATTTTAAAAAGCGGTT
TCAGCTATTGGGAACCTGAGGTTGATTAGCTTTGAGGCTTCGGAGGGCTCTTCTTGCTGCTGCAGATTG
GCAATCCTGTAACCTTCGACC
```

Şekil 3.7. *DICER1* geni *rs13078*, A>T polimorfizmi (83).

NT\_029419.12

```
AAAGGTTTCACAAAAGAAGCAACACCTGAAGGGAGGTGAAGGACGACCTAGGAAAAGGAAGCAAGTCTG
TGTCACGGAGGCCCAAGGGCAAGGGGCTTAGGCTGTGGGTTGAGGGGACTGTCTGAGACGGACTTAAACC
TGCACCAGCTCCAGAGCCCTGCGGA AACAGAGATCGTCCCCCTCCGGCGTCTAGGTAAGGCCACCCTCC
CAGACCCGCAAAGAGCCAGGATCCGACGGCAGCCTCTCCGGACCAATCACAACTTCCTTCATCAAGGAGG
CGGGGTCGGGGGGGGCTGAC
```

Şekil 3.8. *TARBP2* geni *rs784567*, C>T (G>A) polimorfizmi (83).

NT\_032977.9

```
GTGCGAAGCAGGCGATGGCCCAGACTTTGATCTCAATCCCATTGTAGAACTGTTTCCCCCGCATGTCCCA
GACACCCTGATTGGGTGTGGCAATGGCCCGGTTCTGGGGATAGGTAGAGGGGGCGCC AGGTGAGCCTCA
GTAGAGTCAGGTGGGTAGGGGAGCAAAAGCCCCTGGCTATAACAACCAACCACCCCATATGCCCCGAGA
TGTTGTCTGGCCCTGACCCTGCTCACCCGGCCGCGTACTGCAAGATGGGCGCCGGCAGCACTCGCCCTG
TCACCTCCGTCATGTCATCC
```

Şekil 3.9. *AGO1* geni *rs595961*, A>G polimorfizmi (83).

NW\_001839140.1

```
ACGAAATCCTTGCAACAAAGTTCCCAACACAGCGCTCAAAGGAGCTGAAGGCGGGCTGAGGGCAGCCAG
TGATGACAGAGCCTTCTGGGCCTTTGCTGAGGCGTGCAGTCGCTGACAGCAGGGCAGTTGGGCCTCAGGG
ATTCGGGCCAAAACGAGTTTTGGGATATGTGAAGGAGACAGGGGCAGAGAGAGAGGGTGGGCATCTGC
GAACTGGGAAGATTGATGAGGTTGCATGGTTCATAAATAGGAAAGTGGTAACATTCATGATTATTTAAAA
ATTCCTTGAAATACTACAG
```

Şekil 3.10. *AGO2* geni *rs4961280*, C>A polimorfizmi (83).

NT\_010718.16

```
GGTGGAGAGTTGGAGTGGCTGTTACTACTCGATCTCAGGGGGAGGAGACAGGCACGCGATGTTTGTGTTT
TGTC AAGCACAGATTGCAAGCTCGGGGTCCAGCGTAAACCC CACCATGTTTGGGCTCACACGGCGCATTT
TCTGGGGAGGAC CAGCCGTCAAAAAGCGTCTAGGATCGGAACGCTGCTGTCTGGAGGGGGCGGCGGGC
AGGAGCGCGTTGAGGGACTGTATGTGGCGCGAGCTGGGCGGGTGGGAGTGAAGCCTCGCGTGGTGGCGGC
CGCGCTGGGTGGTGGGCGTC
```

Şekil 3.11. *GEMIN3* geni *rs197388*, T>A polimorfizmi (83).

NT\_032977.9

```
TCTCTGCCACTTTTCCTTGCTGTGGTCTTCTGCTCAAATATCAGCTTTTCAAAGAGGTCTTGAACACCCT
AAGACAGCTCTGTCATCCTCTCTGCTGCCTGGCCTTTCCAGCACTCTCTTGTGTTTGTCTTATTTTTTCT
TTATGATACTTATACCTACCTGAAATTATATGTCTCTGCCTGTCTCCACACTCTATGAGGACAAGAAC
CTATTCTGTCTTGTTCCTCTGCATCCCTAGTGGAAAAACAATCTGACACATAGGAAATGTTCAATAT
TTATCAAATGATTGAGCTCC
```

Şekil 3.12. *GEMIN4* geni *rs910924*, C>T polimorfizmi (83).



**Çizelge 3.4.** miRNA oluşum yolağında görevli genlere ait primer ve prob dizileri.

Gen Adı	*Gen No	**SNP No	Primer Dizileri	Prob Dizileri
<i>AGO1</i>	26523	rs595961	F:5'-CAATGGCCCCGGTTCTGG-3' R:5'-AGGGGCTTTTGCTCCCCTA-3'	PRC(G):5'-FAM-G(pdC)CCAGGTGAG(pdC)CT(pdC)AGTA-BHQ-1-3' PRT(A):5'-YakimaYellow <sup>TM</sup> -G(pdC)CTAGGTGAG(pdC)CT(pdC)AGTAGAGTC-BHQ-1-3'
<i>AGO2</i>	27161	rs4961280	F:5'-CCTCTCTCTGCCCCCTGTCT-3' R:5'-CAGTTGGGCCTCAGGGATTT-3'	PRC:5'-FAM-TT(pdC)ACATAT(pdC)CCCAAAA(pdC)TCGT-BHQ-1-3' PRA:5'-YakimaYellow <sup>TM</sup> -T(pdC)A(pdC)ATAT(pdC)CACAAA(pdC)T(pdC)GT-BHO-1-3'
<i>DICER1</i>	23405	rs13078	1F:5'-TTAAATCTGCCTCAACTCATCC-3' 1R:5'-CCCAATAGCTGAAACCGCTT-3'	PRA:5'-FAM-CT(pdC)A(pdC)TAACA(pdC)TTTAAGT(pdC)TT(pdC)CTT-BHO-1-3' PRT:5'-YakimaYellow <sup>TM</sup> -CT(pdC)A(pdC)TAICAA(pdC)TTTAAGT(pdC)TT(pdC)CTT-BHQ-1-3'
<i>DICER1</i>	23405	rs3742330	1F:5'-TCAAGGTCTCAGTTTGGTGGCT-3' 1R:5'-CGAGCGCAGTTCATGCAC-3'	PRG:5'-FAM-AAGGGATTAGGCA(pdC)C(pdC)TAA(pdC)AGA-BHQ-1-3' PRA:5'-YakimaYellow <sup>TM</sup> -AAGGGATTAGACA(pdC)C(pdC)TAA(pdC)AGAGC-BHQ-1-3'
<i>RNASEN</i> ( <i>DROSHA</i> )	29102	rs10719	F:5'-CATCCAGCTAAAAACAGATCATTAACAC-3' R:5'-TGACTGTTGTCTATTGAGACCTAGCCT-3'	PRG:5'-FAM-CTTCGTT(pdC)ATTGT(pdC)TG(pdC)AGGABHQ-1-3' PRA:5'-YakimaYellow <sup>TM</sup> -CTT(pdC)ATT(pdC)ATTGT(pdC)TG(pdC)AGGA-BHQ-1-3'
<i>GEMIN3</i> ( <i>DDX20</i> )	11218	rs197388	F:5'-CCCAGCACTCTTGTGTTTGC-3' R:5'-AGACAGAATAGGTTCTGTCCCTCATAGAGT-3'	PRT:5'-FAM-TATATGT(pdC)TTI(pdC)TGC(pdC)TGT(pdC)T(pdC)C-BHQ-1-3' PRA:5'-YakimaYellow <sup>TM</sup> -ATTATATGT(pdC)TA(pdC)TGC(pdC)TGT(pdC)T(pdC)C-BHQ-1-3'
<i>GEMIN4</i>	50628	rs910924	F:5'-CACCATGTTTGGGCTCACAC-3' R:5'-CGCCACATACAGTCCCTCAA-3'	PRT:5'-FAM-CCGTCAAAAAGTGTCTAGGATCCGGA-BHQ-1-3' PRC:5'-YakimaYellow <sup>TM</sup> -CAGCCGTCAAAAAGCGTCTAGGATC-BHQ-1-3'
<i>RAN</i>	5901	rs14035	F:5'-TGCCATCCACTGATGTTCCA-3' R:5'-TGACCTGTCAGAATAAAAATGTGGTT-3'	PRA:5'-FAM-C(pdC)TGTTTGAAGTT(pdC)TA(pdC)ATTAAAA(pdC)AT-BHQ-1-3' PRG:5'-YakimaYellow <sup>TM</sup> -C(pdC)TGTTTGAAGTT(pdC)TA(pdC)ATTAAAA(pdC)A-BHQ-1-3'
<i>XPO5</i>	57510	rs11077	F:5'-TCATGGAAGGGCAAGATGTGT-3' R:5'-CCATGGTACAGGCTACTGCTAAACT-3'	PRT:5'-FAM-A(pdC)TAAAGA(pdC)TTCC(pdC)AG(pdC)C(pdC)T-BHQ-1-3' PRG:5'-YakimaYellow <sup>TM</sup> -A(pdC)TAAAGA(pdC)TGCC(pdC)AG(pdC)CCT-BHQ-1-3'
<i>TARBP2</i>	6895	rs784567	F:5'-AACCTGCACCAGCTCCAGA-3' R:5'-TGGGAGGGTGGGCCTTA-3'	PRA(T):5'-FAM-AAA(pdC)AGAGATCAGT(pdC)C(pdC)CT(pdC)C-BHQ-1-3' PRG(C):5'-YakimaYellow <sup>TM</sup> -AA(pdC)AGAGATCAGT(pdC)C(pdC)CTCC-BHQ-1-3'
<i>DGCR8</i>	54487	rs1640299	F:5'-TGGCCTCCTAGGGTCCCTT-3' R:5'-AAGGCAGAGAGGGCCTCAGT-3'	PRG:5'-FAM-TCTTAATGC(pdC)CTAAAAG(pdC)GCC-BHQ-1-3' PRT:5'-YakimaYellow <sup>TM</sup> -T(pdC)TAATTC(pdC)CTAAAAG(pdC)GCCT-BHQ-1-3'

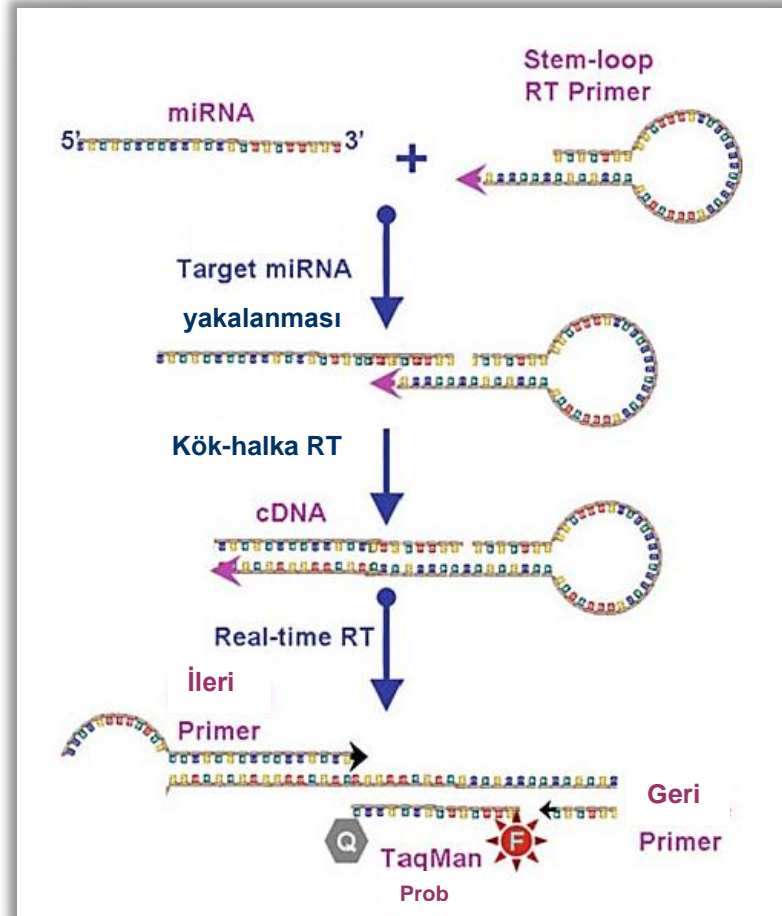
\* www.ncbi.nlm.nih.gov/gene, \*\* http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP

Primer ve prob oligonükleotid dizileri “*Metabion International AG, D-82152 Martinsried/Deutschland*” tarafından sentezlendi. Her prob 5' ucunda Yakima Yellow veya FAM ile işaretlenmiş floresan ışımaya yapabilen boya ve 3' ucunda ise bu ışımının gerçekleştiği dalga boyuna sahip ışığın yayılmasını engelleyen Black Hole Quencher™ (BHQ) adındaki “*quencher*” (soğurucu) kovalent bağ ile bağlanmıştır. Ayrıca sitozin nükleotid yerine sitozin analogu olan C-5 propinil-deoksiribo Sitozin (pdC) ilavesiyle prob tasarlanması sırasında floresan boya ile işaretli oligonükleotidin erime sıcaklığı (Melting Temperature-T<sub>m</sub>) artırılarak hedefe özgüllük artırılmaya çalışılmıştır. pdC yeni bir baz analogudur. Her bir pdC eklenmesiyle T<sub>m</sub> yaklaşık 2.8°C yükselmektedir (80). Prob dizilerinde altı çizili nükleotid polimorfik alleli belirtmektedir. Yakima Yellow VIC'e alternatif olarak özel geliştirilmiş bir boyadır. 530,5 nm maksimum absorpsiyon ve maksimum emisyon 549 nm ile FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer; Floresan Rezonans Enerji Transferi) teknolojisini kullanan florofor ışımaya algılayıcılarının tamamıyla uyumludur. Eclipse® Dark Quencher (EDQ) ve Black Hole Quencher™ (BHQ) ile en iyi sonuç elde edilebilir (86).

### **3.8. Real-Time PCR ile Ekspresyon Analizi Yöntemi**

Real-Time PCR gen ekspresyon miktarının ölçülmesi için altın standarttır. Yöntem; duyarlı olması, doğruluğu ve pratik kullanımı bakımından tercih edilmiş ve ekspresyon analizinde Applied Biosystems (ABI) Prism 7500 Real-Time PCR cihazı kullanılmıştır. Periferik kan örneklerinden RNA izolasyonu gerçekleştirildikten sonra hem hasta hem de kontrol grubunda Alzheimer hastalığında etkili *APP*, *PSENI*, *PSEN2*, ve *BACE1* genlerini hedef alan olgun miRNA'lara ait ekspresyon miktarlarının ölçümü gerçekleştirildi. Ölçümler, total RNA'dan PCR ile komplementer (cDNA) DNA eldesi sonrasında oluşan örnekler ve miRNA'ların olgun dizilerine özgü kök-halka yapısındaki primerler ve proplar kullanılarak Kantitatif Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (*Quantitative Real Time Polymerase Chain Reaction; qRT-PCR*) yöntemi ile tespit edildi. Olgun miRNA'ların tanımlanmasını sağlayan sistem; kantitatif kök-halka RT-PCR (*qRT-PCR*) ve TaqMan analiz ikilisinden oluşmaktadır. Tekniğin amacı; stem-loop primerler ile miRNA molekülünü hibridize ederek tersine transkriptaz ile ekspresyonlarını izlemektir. Yöntemde kök-halka RT primerlerin 5' sonu ile miRNA

moleküllerinin 3' sonu bağlanır ve tersine transkriptaz enzimi ile tersine transkribe edilir. Daha sonra RT ürünleri miRNA'ya özgü ileri-geri primerler ve floresan işaretli TaqMan problemleri ile analiz edilir. Primerler kuyruklanarak (kök-halka yapısına özgün primerler ile) miRNA moleküllerinin dizi kompozisyonuna bağlı olarak Tm'i artırılır (Şekil 3.13) (73). Bu da hedef miRNA'lar için daha özgün tanıma sağlar (87).



Şekil 3.13. TaqMan miRNA analiz şeması (73).

qRT-PCR yönteminde amaç endojen bir kontrol ve pozitif bir kontrol eşliğinde analiz edilecek örneklerin karşılaştırmalı olarak ifadesinin tespit edilmesidir. miRNA ekspresyon düzeylerinin ölçülmesi hücresel süreçlerdeki rollerinin (proliferasyon, farklılaşma ve hücre ölümü) iyi anlaşılması ve hastalıklar için potansiyel biyoişaret

olarak tanımlanmalarında esastır. İdeal bir endojen kontrolün ekspresyon motifi göreceli biçimde sabittir. Düzeyleri doku ve hücre tiplerinde oldukça fazladır (88). Endojen kontroller PCR karışımına yüklenen cDNA örneklerinde ekspresyon miktarlarındaki farklılıkları hedef genlerin ekspresyon düzeyleri ile normalize etmek için kullanılır. En iyi sonuç test edilen örneklerde ekspresyonu bilinen bir kontrolle alınır. Endojen kontrol ekspresyonu tüm çalışmada homojen dağılım göstermelidir (73).

Çalışmamızda ekspresyon için *hsa-miR-26b* endojen kontrolü seçildi ve sağlıklı bireylere ait RNA havuzundan oluşturulmuş pozitif kontrol eşliğinde 7 miRNA genine ait ekspresyon düzeylerini belirlemek üzere ilk olarak her bir miRNA'a özgü (Reverse Transcription PCR (RT) primerler ile cDNA kütüphanesi oluşturuldu. cDNA, tersine RT-PCR ile gen spesifik primerler kullanılarak total RNA'dan sentezlendi. 10µl'lik RT-PCR reaksiyon karışımında 10 ng RNA örneği, 50 nM kök-halka RT primer, 5 X RT tamponu, 10 mM dNTP, 0,25 mM MultiScribe Reverse Transkriptaz ve 0,1 mM RNaz inhibitörü olacak şekilde hazırlandı. 5 µl izole edilen RNA örneği eklenerek elde edilen 15 µl'lik karışım Techne Flexigene PCR cihazında 16 °C'de 30 dak., 42 °C'de 30 dak., 85 °C'de 5 dak. inkübe edilerek süre bitiminde -20 °C'e alındı.

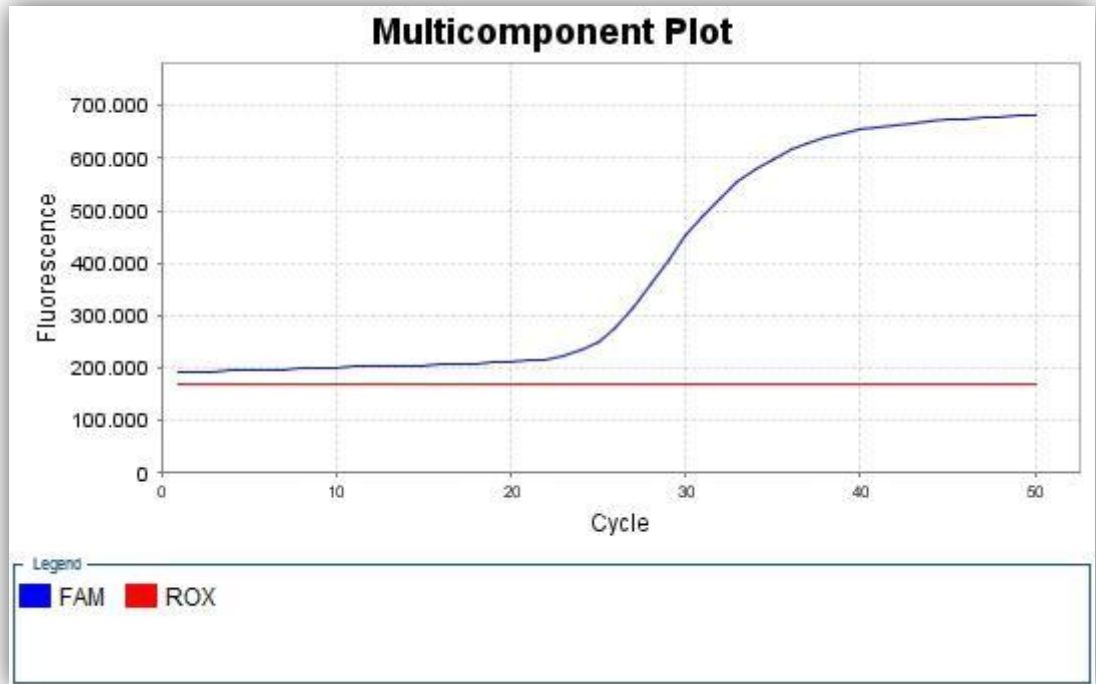
Oluşan cDNA kütüphanesinden her bir miRNA'a ait ekspresyon profillerinin elde edilmesi için Applied Biosystem 7500 Real-Time PCR sistemi kullanıldı. 25 µl'lik PCR ürünü 5 µl cDNA, 2 X TaqMan Universal PCR Master Mix, primerler 900 nM, probalar 200 nM olacak şekilde hazırlandı. 25 µl'lik reaksiyon karışımı 96 kuyucuklu optik propilen tabağın her bir kuyusuna uygulandı. Real Time PCR Film (Applied Biosystems) ile kaplandı. Isı bloğuna yerleştirilen plate 50°C'de 2 dak. 1 döngü, 95 °C'de 10 dak. 1 döngü, 95 °C'de 15 san. 50 döngü ve 60 °C'de 1,5 dak. 1 döngü olacak şekilde hazırlanan yürütme metodu ile analize başlatıldı.

### **3.9. miRNA Genlerine Ait Ekspresyonların Tespit Edilmesi**

Yöntem; hedef ve endojen kontrol ile pozitif RNA örneğine (TaqMan Human Control Total RNA-4307281) göre ekspresyon düzeylerindeki farklılıkları hesaplama şeklinde çalışmaktadır. Yaklaşık iki saat süren analizin ardından programın hesaplamış olduğu  $\Delta\Delta C_T$  değerleri kullanılarak karşılaştırmalı eşik devri adı verilen (comparative  $C_T$ )

yöntem ile  $2^{-\Delta\Delta C_T}$  değerleri hesaplandı. Göreceli gen ekspresyonu analizi de denilen bu yöntemde bir referans RNA ve bir endojen kontrole (*hsa-miR-26b*) göre araştırılan miRNA'ların verileri alındı (89).

SDS 2.0.3 yazılımı ile logaritmik çizelgede gerçek zamanlı çoğalım eğrilerinin analizi yapıldı ve  $\Delta\Delta C_T$  değerleri kullanılarak ekspresyon düzeyleri belirlendi. Şekil 3.14'de mavi renkli eğri ekspresyon düzeyini (FAM), kırmızı renkli yatay çizgi ise ROX (6-Karboksi-X-Rhodamin) pasif referans boyasını temsil etmektedir.



Şekil 3.14. Standart ekspresyon eğrisi.

### 3.10. Real-Time PCR Yöntemi ile Genotip Analizi

Real Time PCR Genotipleme analizi Applied Biosystems (ABI) Prism 7500 Real-Time PCR cihazı kullanılarak gerçekleştirildi. Allele özgün tasarlanan hibridizasyon problemlerinin her bir reaksiyon döngüsündeki floresan ışınması ölçülerek farklı allelleri taşıyan oligonükleotidlerin amplifikasyon miktarları belirlendi. Özgün prob çifti hedef bölgede yer alan polimorfik allele hibridize olabilen iki farklı oligonükleotitten oluşmaktadır. Hedef DNA bölgesine hibridize olan probun 3' ucunda quencher 5' ucunda floresan ışınma yapan boya bulunmaktadır. Prob serbest haldeyken

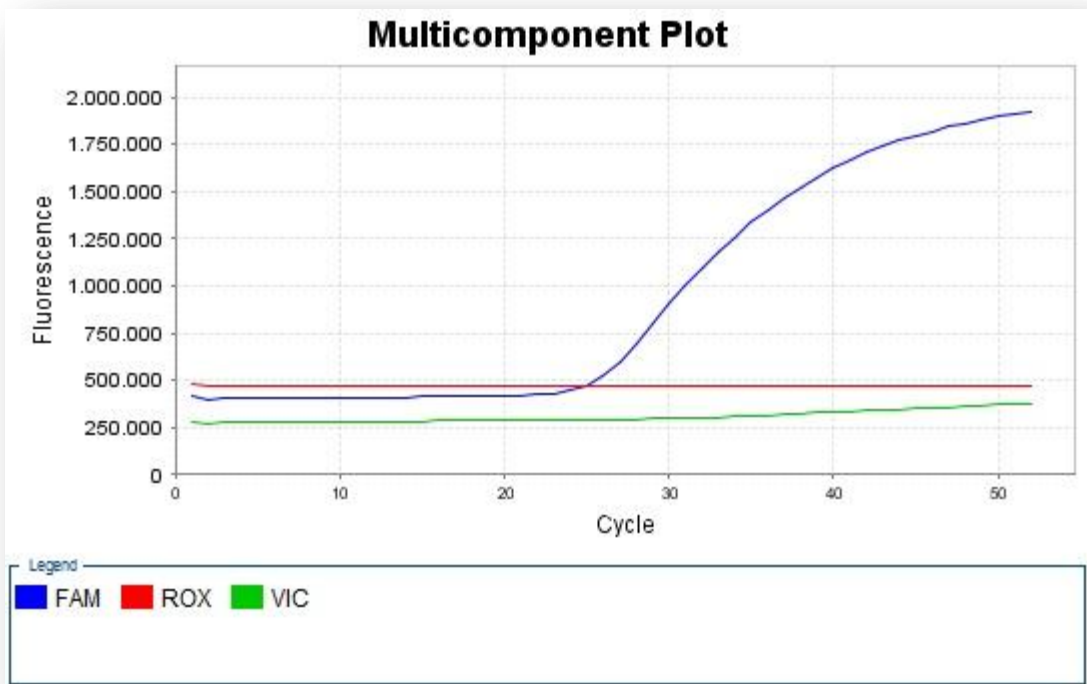
floresan ışığa quencher tarafından söğürüleceğinden emisyon bir bakıma engellenmiş olur. Bu iki molekül birbirlerine çok yakın hibridize olduklarında Real-Time PCR sisteminin ışık kaynağı donör boyayı uyarır ve uzun dalga boyunda floresan ışığa gerçekleşir.

Reaksiyon karışımı her bir DNA örneği 10 ng, 2 X TaqMan Universal PCR Master Mix, primerler 900 nM, problemler 200 nM olacak şekilde hazırlanan 25 µl'lik karışımın kontamine olup olmadığını belirlemek üzere her bir reaksiyon plate'i için örnek DNA içermeyen negatif kontrol kuyucuğu kullanıldı. Kalan 95 kuyucuğa hasta ve kontrol bireylerine ait DNA örnekleri eklenerek 96 kuyucuklu plate'in üzeri Microamp® Real Time PCR Film (Applied Biosystems) ile kaplandı. Isı bloğuna yerleştirilen plate 60°C'de 1 dak. 1 döngü, 95 °C'de 10 dak. 1 döngü, 95 °C'de 15 san. 40 döngü, 60°C'de (*DICER1* rs3742330 ve *AGO1* rs595961 için 65°C, *DICER1* rs13078 için 64°C, *GEMIN3* rs197388 için 66°C, *GEMIN4* rs910924 için 67°C, *AGO2* için rs4961280 68°C) 1 dak. (*DGCR8* rs1640299, *DROSHA (RNASEN)* rs10719, *XPO5* rs11077, *RAN* rs14035, *TARBP2* rs784567 için 1,5 dak.) 40 döngü, 60 °C'de 1 dak. 40 döngü olacak şekilde analize başlatıldı. Yaklaşık iki buçuk saat süren analizin ardından çoklu eleman grafikleri üzerinden genotip tayini yapıldı.

### **3.11. miRNA Oluşum Yolağı Genlerine Ait SNP'lerin Tayin Edilmesi**

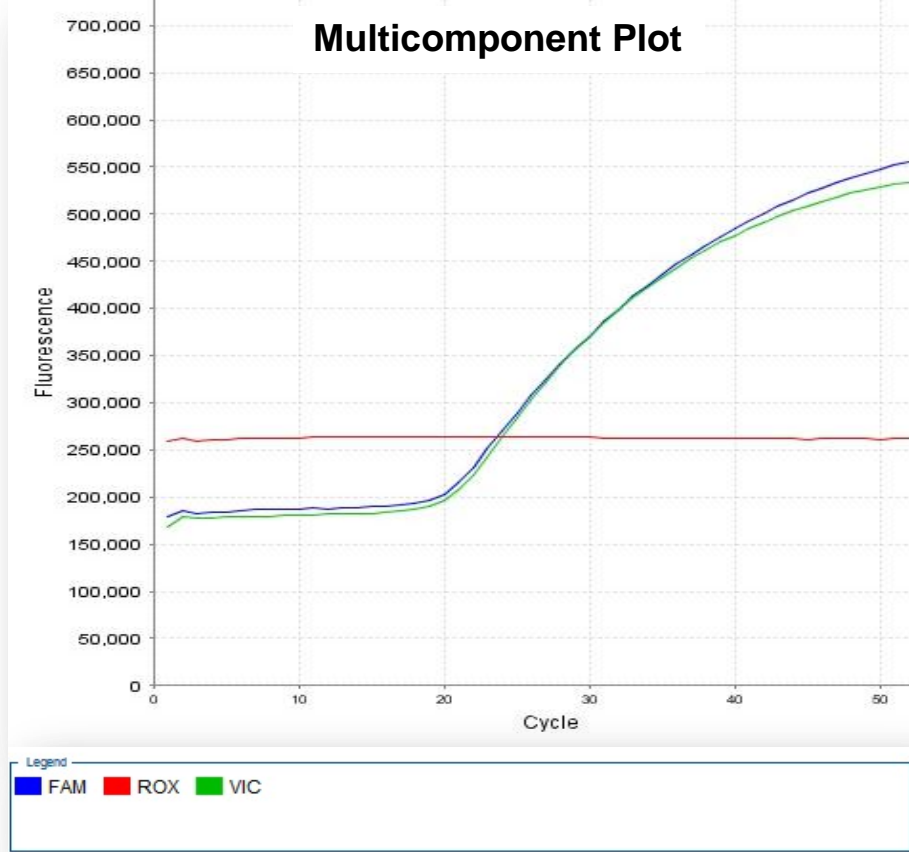
SDS 2.0.3 yazılımı ile logaritmik çizelgede gerçek zamanlı çoğalım eğrilerinin analizi yapılarak genotipler belirlendi. Real-Time PCR cihazı ile elde edilen amplifikasyon eğrileri kullanılarak örneklerin genotipi tayin edildi. Polimorfik allelleri taşıyan ve 5' ucunda prob bağlı DNA oligonükleotidinin floresan ışığa miktarının birim PCR termal döngüsüne göre artış eğrisinin sigmoidal olması beklenir. Çünkü DNA çift zincirli moleküler yapıya sahip olduğundan her bir döngü sonunda DNA miktarı iki katına çıkar ve bunun sonucu olarak üssel bir fonksiyon grafiği elde edilmesi gerekir. Ancak reaksiyon sonunda ortamdaki PCR bileşenleri tükeneceğinden eğri plato evresine girer ve yatay seyrederek.

Şekil 3.15’de mavi renkli eğri T (FAM) allelini, yeşil renkli eğri A (Yakıma Yellow™) allelini kırmızı renkli yatay çizgi ise ROX (6-Karboksi-X-Rhodamin) pasif referans boyasını temsil etmektedir. ROX, analiz sırasında floresan ışımının normalize edilebilmesi için gerekli referans ışımayı yapar. ROX ışımına bağlı olarak da her deneysel plan kendine otomatik bir bazal seviye belirler. Buna göre *GEMIN3* (*DDX20*) için verilen örnekte T alleli FAM (5-Karboksifloresin) ile A alleli ise Yakıma Yellow™ ile işaretlenerek genotip homozigot T/T olarak değerlendirildi.



Şekil 3.15. *GEMIN3*(*DDX20*) *rs197388* polimorfizmi için multikomponent grafiğinde homozigot T/T genotipi.

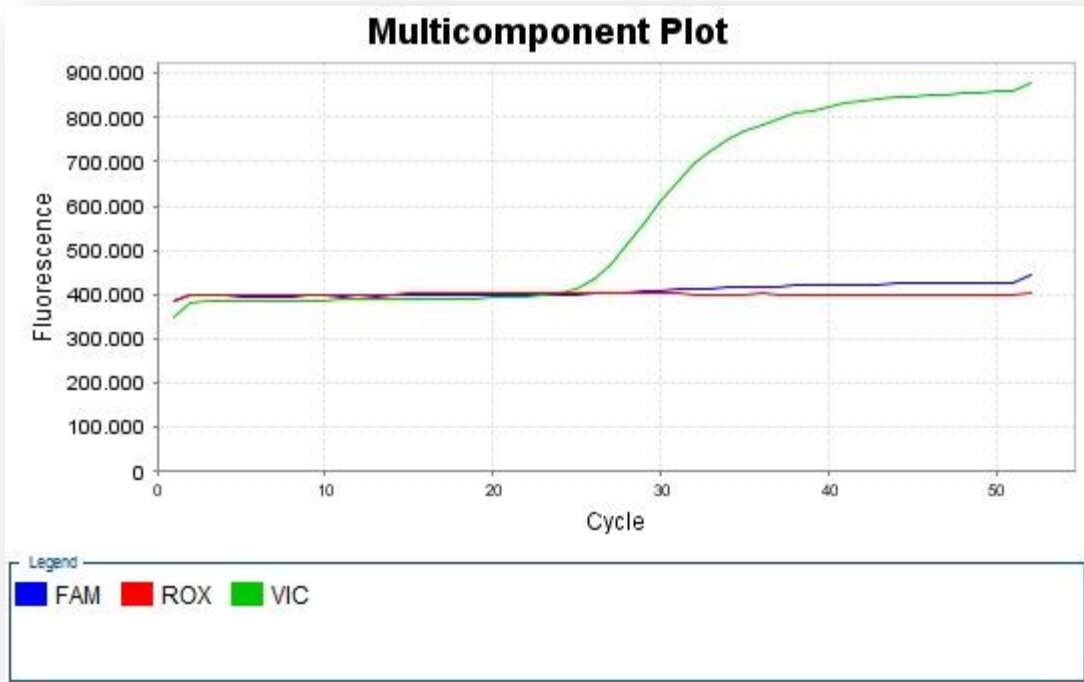
Şekil 3.16' daki mavi renkli eğri T allelini taşıyan DNA fragmanını, yeşil renkli eğri ise A allelini temsil etmektedir. T alleli FAM ile işaretlenirken A allelini taşıyan prob ise Yakima Yellow™'la işaretlendi. Bu durumda genotip heterozigot T/A olarak değerlendirildi (Şekil 3.16).



Şekil 3.16. *GEMIN3(DDX20)* *rs197388* polimorfizmi için multikomponent grafiğinde heterozigot T/A genotipi.



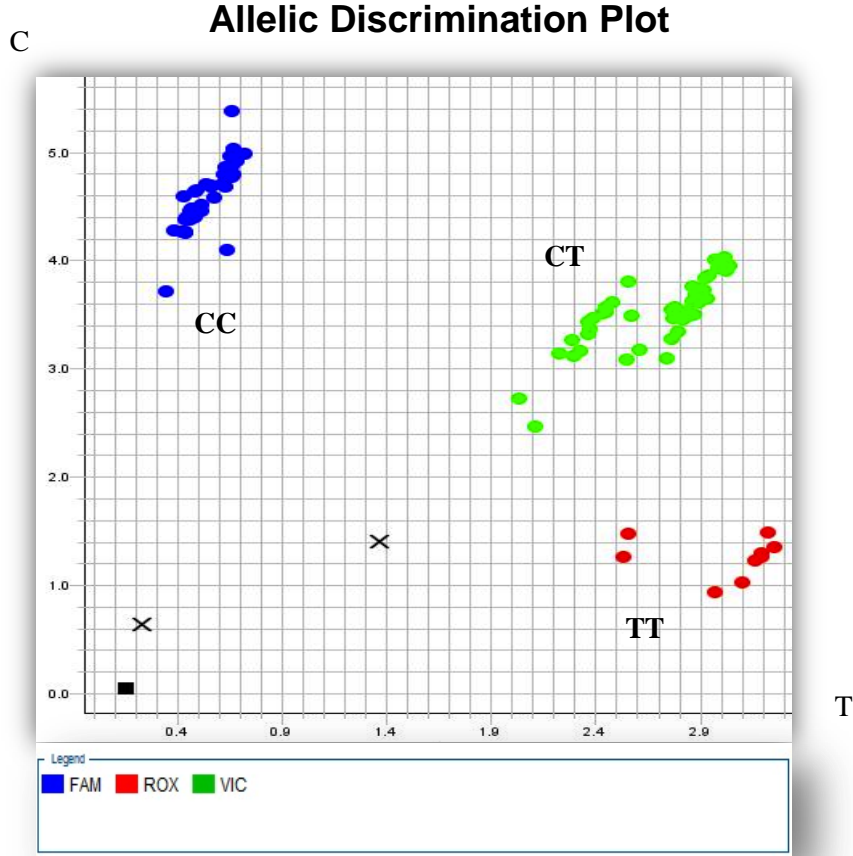
*GEMIN3* (*DDX20*) rs197388 polimorfizmi için genotipleme deneyi sonunda elde edilen yarı logaritmik floresan ışımaya ve Real Time PCR döngü sayısı multicomponent grafiği Şekil 3.17'deki gibi elde edilmiştir. A allelini taşıyan prob **Yakima Yellow<sup>TM</sup>**'la işaretlenmiş olup T alleli ise **FAM** ile işaretlenmiştir. Atasal allel olan T için eşik değeri geçebilecek oranda ışımaya ölçülemediğinden grafikte sadece A allelinin amplifikasyon eğrisini görmekteyiz. Bu durumda *rs197388* için genotip homozigot **A/A** olarak değerlendirildi (Şekil 3.17).



Şekil 3.17. *GEMIN3* rs197388 polimorfizmi için multikomponent grafiğinde homozigot **A/A** genotipi.

Yine bu yazılım ile allelleri tanımlamada allelik diskriminasyon grafiği kullanılmıştır. Şekil 3.18'de 96 kuyucuklu reaksiyon tabağındaki allel tayini yapılamayan kuyucuklar çarpı işareti (X) ile temsil edilmektedir. Grafiğin sol alt köşesindeki siyah kare negatif kontrol kuyucuğunu temsil etmektedir. Allelik diskriminasyon grafiğinde mavi işaretliler (**FAM**) homozigot C/C genotipi, kırmızı renkli olanlar ise homozigot T/T genotipi olarak değerlendirilmiştir. Yatay eksen T allelini ve dikey eksen C allelini temsil etmektedir. Ortada bulunan yeşil renkli (**Yakima Yellow<sup>TM</sup>**) grup ise homozigot C/T genotipini temsil etmektedir. Allelik diskriminasyon grafiğinde köşegeninin sağ üstüne doğru yer alan çarpılar Real-Time PCR cihazının

SNP programında bulunan Amplification plot menüsü kullanılarak heterozigot C/T olarak değerlendirildi. (Şekil 3.18).



Şekil 3.18. *RNASEN (DROSHA) rs10719 C>T* polimorfizmi için allelik diskriminasyon grafiği.

### 3.12. İstatistiksel Analiz

Gruplar arasında yaş bakımından bir farklılık olup olmadığının incelenmesi amacıyla “Independent Samples t test”, ekspresyon düzeyleri bakımından hastalarla kontrol gruplarının karşılaştırmalarında ise “Mann-Whitney U test” kullanıldı. Hastalık ile genotiplerin ve allellerin ilişkileri “Chi-square” veya “Likelihood ratio” testleri ile incelendi. Genotipler bakımından hasta ve kontrol gruplarının Hardy-Weinberg dengeleri kontrol edildi. Sürekli değişkenler için tanımlayıcı istatistikler ortalama ve standart sapma cinsinden, kategorik değişkenler için ise frekans ve yüzde cinsinden çizelge halinde verildi. İstatistik analizler SPSS v.11.5 paket programı ile yapıldı. İstatistik analizlerde  $p \leq 0,05$  ise sonuçlar anlamlı kabul edildi.

## 4. BULGULAR

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

Bu çalışmada hasta grubunda 172 birey bulunurken, kontrol grubunda 109 birey bulunmaktadır (*Örneklerden DNA elde edilememesi nedeniyle hasta ve kontrol sayıları her gen için farklıdır*). Çalışmamıza 167 kadın (%59.4), 114 erkek (40.6) olmak üzere toplam 281 birey alındı. Çalışmaya alınan bireylerin yaş ortalamaları  $71.56 \pm 7.2$  olarak hesaplandı. Cinsiyetler bakımından değerlendirildiğinde hasta ve kontrol gruplarında bulunan kadınların yaş ortalamaları  $72.97 \pm 7.3$  olup erkeklerin ise  $71.00 \pm 7.0$  olarak hesaplandı. Cinsiyetler bakımından yaş ortalamaları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık gözlenmedi ( $p > 0.05$ ) (Çizelge 4.1 ).

**Çizelge 4.1.** Kontrol ve Hasta gruplarındaki kadın ve erkek bireylerin yaş ortalaması (N=birey sayısı).

	Cinsiyet	N	Yaş Ortalaması	p
Kontrol ve Hasta Grubu	Kadın	167	$72.97 \pm 7.3$	0.455
	Erkek	114	$71.00 \pm 7.0$	

#### 4.1.1. Hasta Grubu

Çalışmamıza 111'i (% 66,5) kadın, 61'i (% 53,5) erkek olmak üzere toplam 172 hasta dahil edildi. Çalışmaya dahil edilen hastaların yaş ortalamaları  $73.92 \pm 1.09$  olarak hesaplandı. Cinsiyetler bakımından değerlendirildiğinde ise kadın bireylerin yaş ortalaması  $74.61 \pm 1.06$  iken erkek bireylerin yaş ortalamaları  $72.65 \pm 1.07$  olarak hesaplandı (Çizelge 4.2). Cinsiyetler bakımından değerlendirildiğinde ise istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmedi ( $p > 0.05$ ) (Çizelge 4.3).

#### 4.1.2. Kontrol Grubu

Çalışmamıza 56 (% 33,5) kadın, 53 (% 46,5) erkek olmak üzere toplam 109 kontrol dahil edildi. Çalışmaya dahil edilen kontrol bireylerin yaş ortalaması  $69.73 \pm 1.16$  olarak hesaplandı. Cinsiyetler bakımından değerlendirildiğinde ise kadın bireylerin yaş ortalaması  $69.73 \pm 1.14$ , erkek bireylerin yaş ortalamaları ise  $69.09 \pm 1.07$  olarak hesaplandı (Çizelge 4.2). Cinsiyetler bakımından değerlendirildiğinde istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık gözlenmedi ( $p > 0.05$ ) (Çizelge 4.3).

**Çizelge 4.2.** Kontrol ve hasta gruplarına ait yaş ortalamalarının cinsiyet bakımından değerlendirilmesi (N=Birey sayısı).

<i>Cinsiyet</i>	<i>Kontrol</i>		<i>Hasta</i>		<i>p</i>
	<i>N</i>	<i>Yaş Ortalaması</i>	<i>N</i>	<i>Yaş Ortalaması</i>	
<i>Kadın</i>	56	$69.73 \pm 1.14$	111	$74.61 \pm 1.06$	0.803
<i>Erkek</i>	53	$69.09 \pm 1.07$	61	$72.65 \pm 1.07$	0.205

**Çizelge 4.3.** Kontrol ve hasta gruplarının cinsiyet bakımından değerlendirilmesi (N=birey sayısı).

<i>Cinsiyet</i>	<i>Kontrol</i>		<i>Hasta</i>		$\chi^2$	<i>p</i>
	<i>N</i>	<i>%</i>	<i>N</i>	<i>%</i>		
<i>Kadın</i>	56	33.5	111	66.5	0.157	0.451
<i>Erkek</i>	53	46.5	61	53.5		

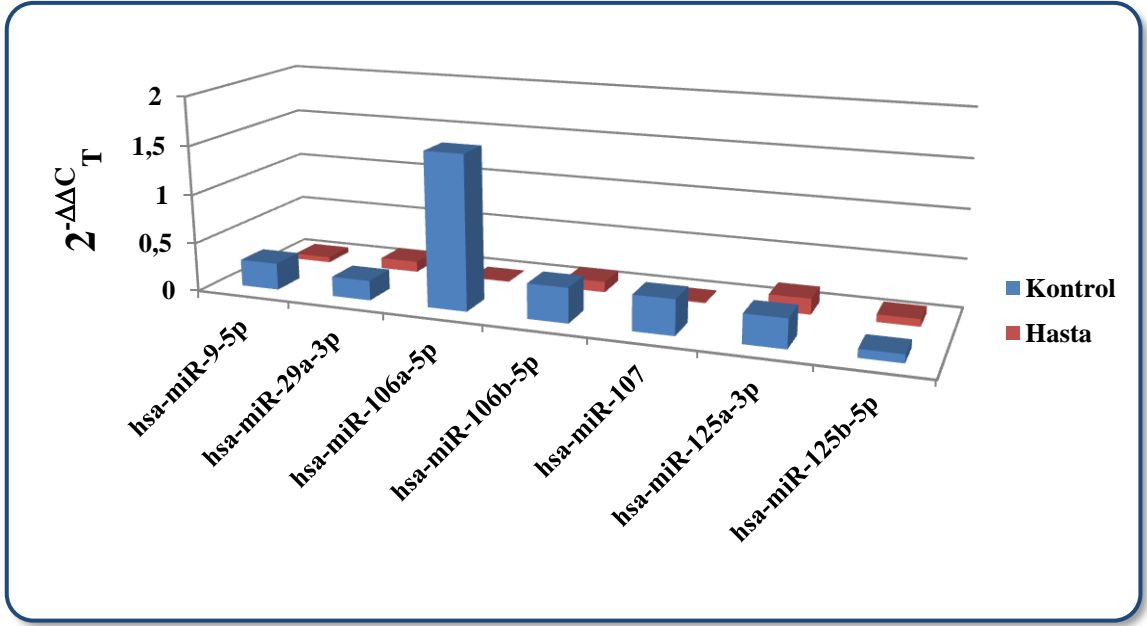
## 4.2. Grupların Ekspresyon Ölçümlerinin Değerlendirilmesi

Alzheimer hastalığının genetik etiyolojisinde yer alan APP, BACE1, PSEN1 ve PSEN2 genlerinin 3'-UTR ve 5'-UTR'lerini hedef alan 7 miRNA'nın ekspresyon düzeylerinin kontrol ve hasta gruplarındaki dağılımları incelenerek bunlara ait p değerleri ve tanımlayıcı istatistikler hesaplandı (*Teknik nedenlerden dolayı hsa-miR-9-5p geni için kontrol grubunda 94 birey hasta grubunda 165 birey, hsa-miR-29a-3p geni için kontrol grubunda 95 birey hasta grubunda 161 birey, hsa-miR-106a-5p geni için kontrol grubunda 84 birey hasta grubunda 148 birey, hsa-miR-106b-5p geni için kontrol grubunda 85 birey hasta grubunda 162 birey, hsa-miR-107 geni için kontrol grubunda 85 birey hasta grubunda 165 birey, hsa-miR-125a-3p geni için kontrol grubunda 85 birey hasta grubunda 158 birey, hsa-miR-125b-5p geni için kontrol grubunda 80 birey hasta grubunda 155 birey değerlendirmeye alınmıştır*) (Çizelge 4.4) (Şekil 4.1). Çizelge 4.4 incelendiğinde ***hsa-miR-9-5p***, ***hsa-miR-106a-5p***, ***hsa-miR-106b-5p*** ve ***hsa-miR-107*** ekspresyon düzeyleri bakımından kontrol ve hasta grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğu gözlemlendi ( $p < 0.05$ ).

**Çizelge 4.4.** Kontrol ve Alzheimer hasta gruplarında *hsa-miR-9-5p*, *29a-3p*, *106a-5p*, *106b-5p*, *107*, *125a-3p* ve *125b-5p* genlerine ait ekspresyon ( $2^{-\Delta\Delta C_T}$ ), minimum, maksimum ve p değerleri.

miRNA	Grup	N	Ekspresyon değeri $2^{-\Delta\Delta C_T}$	%25	%75	p değeri
<i>hsa-miR-9-5p</i>	Kontrol	94	0,2746	0,0311	1,1623	<b>0,001*</b>
	Hasta	165	0,0556	0,0032	0,3064	
<i>hsa-miR-29a-3p</i>	Kontrol	95	0,2025	0,0253	1,0583	0,470
	Hasta	161	0,1096	0,0133	0,9599	
<i>hsa-miR-106a-5p</i>	Kontrol	84	1,5704	0,2565	10,2542	<b>0,001*</b>
	Hasta	148	0,0041	0,0004	0,5763	
<i>hsa-miR-106b-5p</i>	Kontrol	85	0,3557	0,1092	1,1317	<b>0,001*</b>
	Hasta	162	0,1086	0,0182	0,7135	
<i>hsa-miR-107</i>	Kontrol	85	0,3590	0,0173	1,3872	<b>0,001*</b>
	Hasta	165	0,0078	0,0005	0,3019	
<i>hsa-miR-125a-3p</i>	Kontrol	85	0,2951	0,0287	1,0873	0,549
	Hasta	158	0,1611	0,0168	1,5207	
<i>hsa-miR-125b-5p</i>	Kontrol	80	0,0847	0,0072	0,5696	0,697
	Hasta	155	0,0760	0,0087	0,4437	

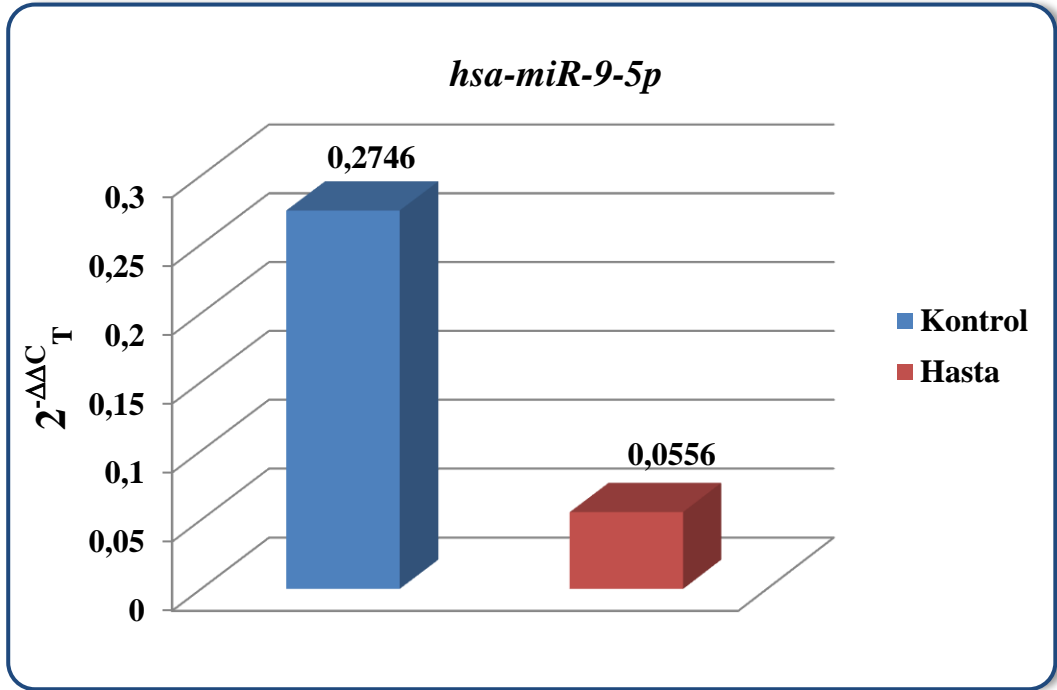
Mann-Whitney U testi uygulanmıştır (p<0,05).



Şekil 4.1. Kontrol ve Alzheimer hasta gruplarında *hsa-miR-9-5p*, *29a-3p*, *106a-5p*, *106b-5p*, *107*, *125a-3p* ve *125b-5p* genlerine ait miRNA ekspresyon verileri grafiği.

#### 4.2.1. *hsa-miR-9-5p* Genine Ait Ekspresyonların Değerlendirilmesi

Kontrol grubunda 94 birey, hasta grubunda ise 165 birey değerlendirilmeye alındı. Kontrol grubunda ekspresyon düzeyinin  $2^{-\Delta\Delta C_T} = 0,2746$ , hasta grubunda  $2^{-\Delta\Delta C_T} = 0,0556$  olduğu gözlenirken; ekspresyon düzeyleri bakımından hasta grubunda kontrol grubuna göre 4.93 kat azalma olduğu bulundu (Çizelge 4.4) (Şekil 4.2). **Kontrol ve hasta grubunda *hsa-miR-9-5p* genine ait ekspresyon düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulundu ( $p < 0.05$ ).**

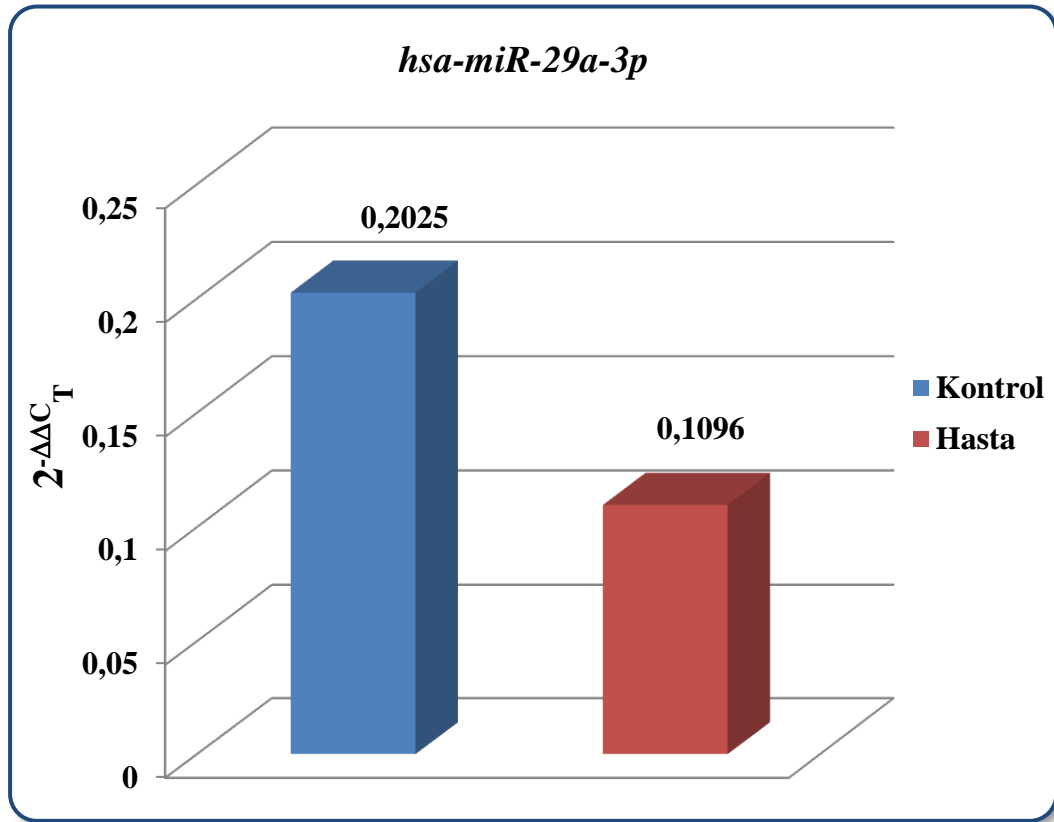


Şekil 4.2. Kontrol ve Alzheimer hasta grubunda *hsa-miR-9-5p* geni için ekspresyon grafiği.



#### 4.2.2. *hsa-miR-29a-3p* Genine Ait Ekspresyonların Değerlendirilmesi

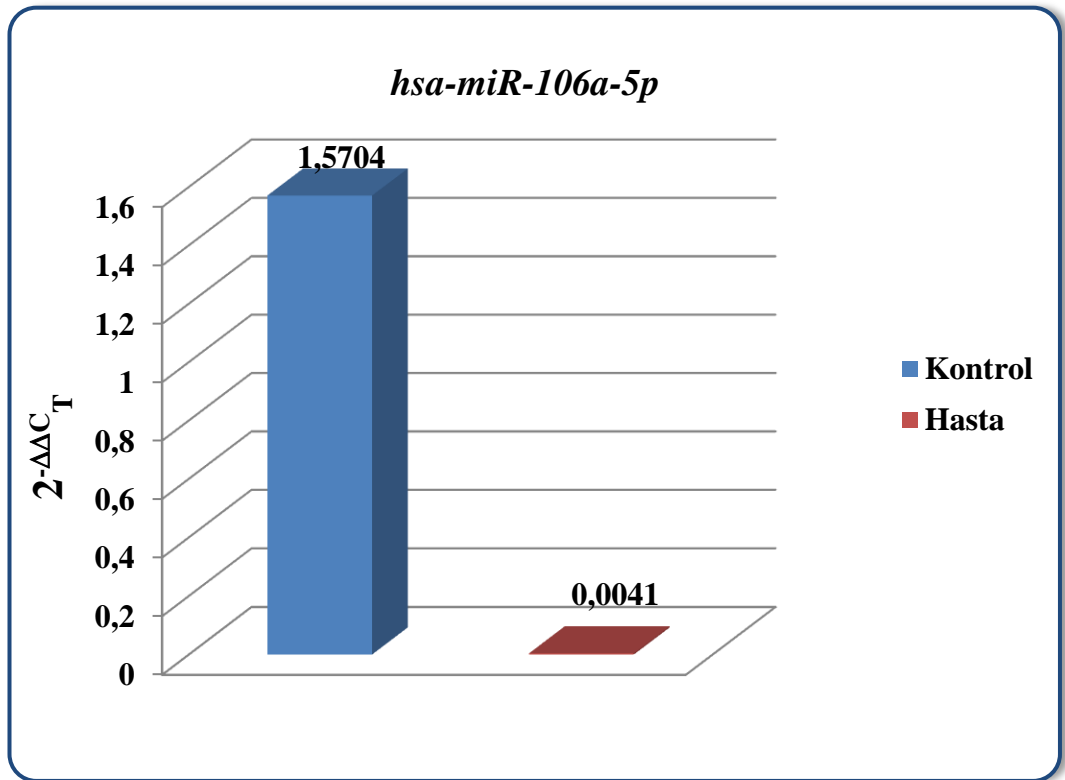
Kontrol grubunda 95 birey, hasta grubunda ise 161 birey değerlendirilmeye alındı. Kontrol grubunda ekspresyon düzeyinin  $2^{-\Delta\Delta C_T} = 0,2025$ , hasta grubunda  $2^{-\Delta\Delta C_T} = 0,1096$  olduğu gözlenirken; ekspresyon düzeyleri bakımından hasta grubunda kontrol grubuna göre 1.8 kat azalma olduğu bulundu (Çizelge 4.4) (Şekil 4.3). Kontrol ve hasta grubunda *hsa-miR-29a-3p* genine ait ekspresyon düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamadı ( $p > 0.05$ ).



Şekil 4.3. Kontrol ve Alzheimer hasta grubunda *hsa-miR-29a-3p* geni için ekspresyon grafiği.

#### 4.2.3. *hsa-miR-106a-5p* Genine Ait Ekspresyonların Değerlendirilmesi

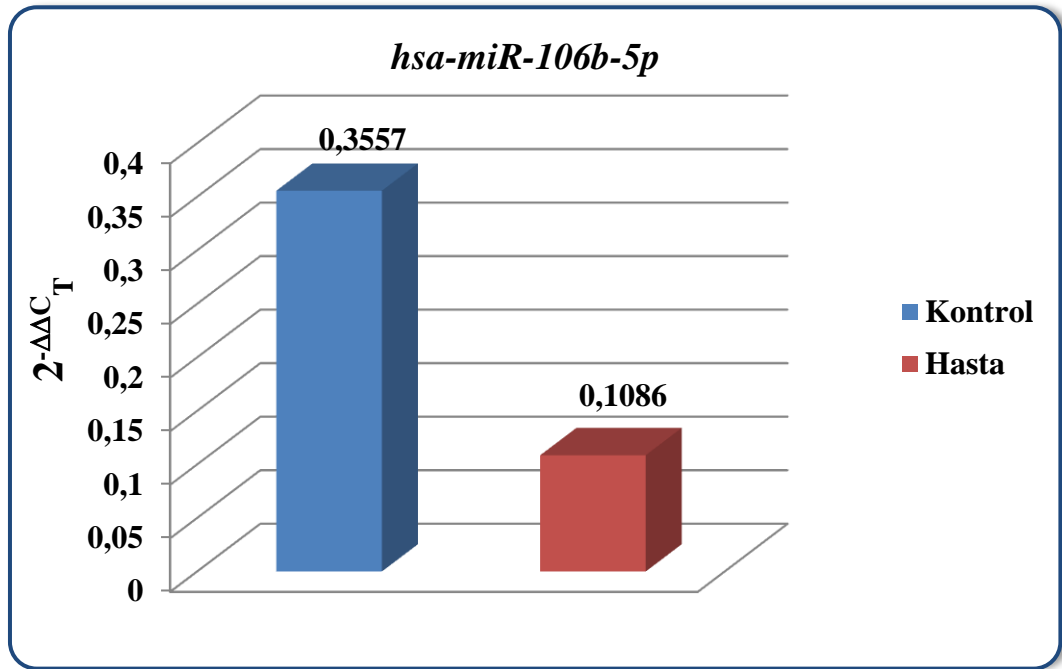
Kontrol grubunda 84 birey, hasta grubunda ise 148 birey değerlendirilmeye alındı. Kontrol grubunda ekspresyon düzeyinin  $2^{-\Delta\Delta C_T} = 1.5704$ , hasta grubunda  $2^{-\Delta\Delta C_T} = 0.0041$  olduğu gözlenirken; ekspresyon düzeyleri bakımından hasta grubunda kontrol grubuna göre 383.02 kat azalma olduğu bulundu (Çizelge 4.4) (Şekil 4.4). Kontrol ve hasta grubunda *hsa-miR-106a-5p* genine ait ekspresyon düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulundu ( $p < 0.05$ ).



Şekil 4.4. Kontrol ve Alzheimer hasta grubunda *hsa-miR-106a-5p* geni için ekspresyon grafiği.

#### 4.2.4. *hsa-miR-106b-5p* Genine Ait Ekspresyonların Değerlendirilmesi

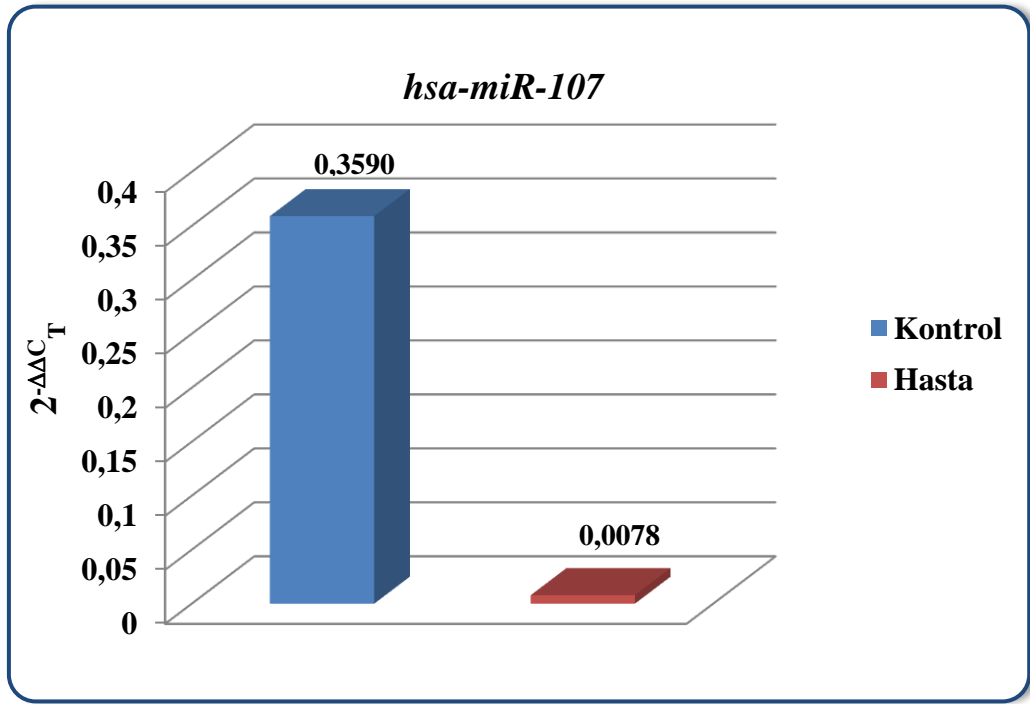
Kontrol grubunda 85 birey, hasta grubunda ise 162 birey değerlendirilmeye alındı. Kontrol grubunda ekspresyon düzeyinin  $2^{-\Delta\Delta C_T} = 0.3557$ , hasta grubunda  $2^{-\Delta\Delta C_T} = 0.1086$  olduğu gözlenirken; ekspresyon düzeyleri bakımından hasta grubunda kontrol grubuna göre 3.27 kat azalma olduğu bulundu (Çizelge 4.4) (Şekil 4.5). **Kontrol ve hasta grubunda *hsa-miR-106b-5p* genine ait ekspresyon düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulundu ( $p < 0.05$ ).**



Şekil 4.5. Kontrol ve Alzheimer hasta grubunda *hsa-miR-106b-5p* geni için ekspresyon grafiği.

#### 4.2.5. *hsa-miR-107* Genine Ait Ekspresyonların Değerlendirilmesi

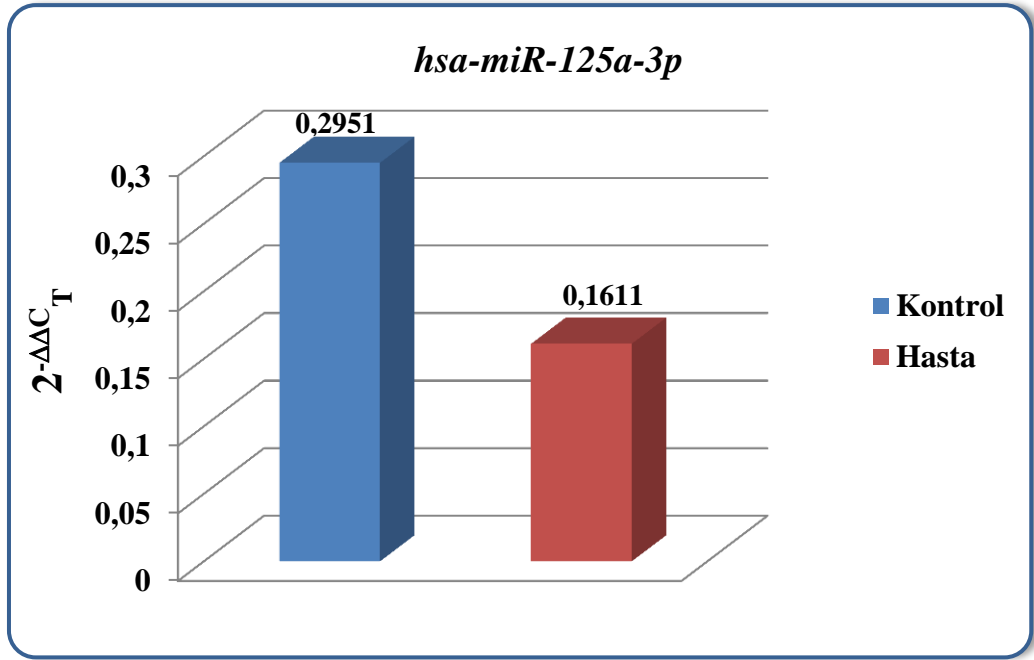
Kontrol grubunda 85 birey, hasta grubunda ise 165 birey değerlendirilmeye alındı. Kontrol grubunda ekspresyon düzeyinin  $2^{-\Delta\Delta C_T} = 0.3590$ , hasta grubunda  $2^{-\Delta\Delta C_T} = 0.0078$  olduğu gözlenirken; ekspresyon düzeyleri bakımından hasta grubunda kontrol grubuna göre 46.02 kat azalma olduğu bulundu (Çizelge 4.4) (Şekil 4.6). **Kontrol ve hasta grubunda *hsa-miR-107* genine ait ekspresyon düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulundu ( $p < 0.05$ ).**



Şekil 4.6. Kontrol ve Alzheimer hasta grubunda *hsa-miR-107* geni için ekspresyon grafiği.

#### 4.2.6. *hsa-miR-125a-3p* Genine Ait Ekspresyonların Değerlendirilmesi

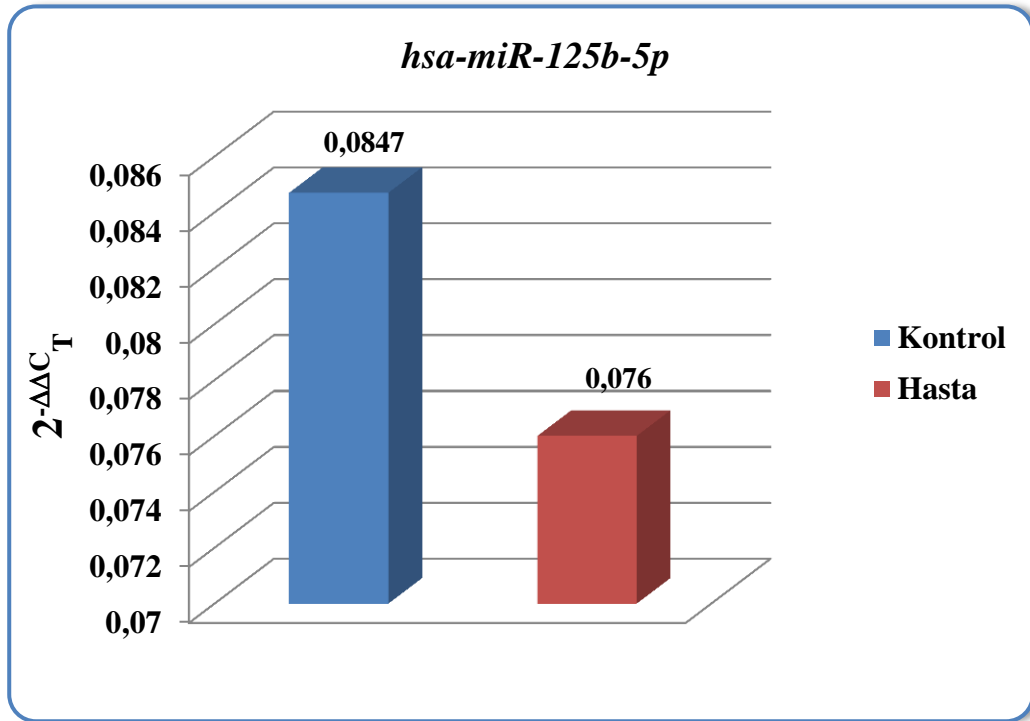
Kontrol grubunda 85 birey, hasta grubunda ise 158 birey değerlendirilmeye alındı. Kontrol grubunda ekspresyon düzeyinin  $2^{-\Delta\Delta C_T} = 0.2951$ , hasta grubunda  $2^{-\Delta\Delta C_T} = 0.1611$  olduğu gözlenirken; ekspresyon düzeyleri bakımından hasta grubunda kontrol grubuna göre 1.83 kat azalma olduğu görülmesine rağmen kontrol ve hasta grubunda *hsa-miR-125a-3p* genine ait ekspresyon düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamadı ( $p > 0.05$ ) (Çizelge 4.4) (Şekil 4.7).



Şekil 4.7. Kontrol ve Alzheimer hasta grubunda *hsa-miR-125a-3p* geni için ekspresyon grafiği.

#### 4.2.7. *hsa-miR-125b-5p* Genine Ait Ekspresyonların Değerlendirilmesi

Kontrol grubunda 80 birey, hasta grubunda ise 155 birey değerlendirilmeye alındı. Kontrol grubunda ekspresyon düzeyinin  $2^{-\Delta\Delta C_T} = 0.0847$ , hasta grubunda  $2^{-\Delta\Delta C_T} = 0.0760$  olduğu gözlemlendi. Ekspresyon düzeyleri bakımından hasta grubunda kontrol grubuna göre 1.11 kat azalma olduğu görülmesine rağmen (Çizelge 4.4) (Şekil 4.8) kontrol ve hasta grubunda *hsa-miR-125b-5p* genine ait ekspresyon düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamadı ( $p > 0.05$ ).



Şekil 4.8. Kontrol ve Alzheimer hasta grubunda *hsa-miR-125b-5p* geni için ekspresyon grafiği.

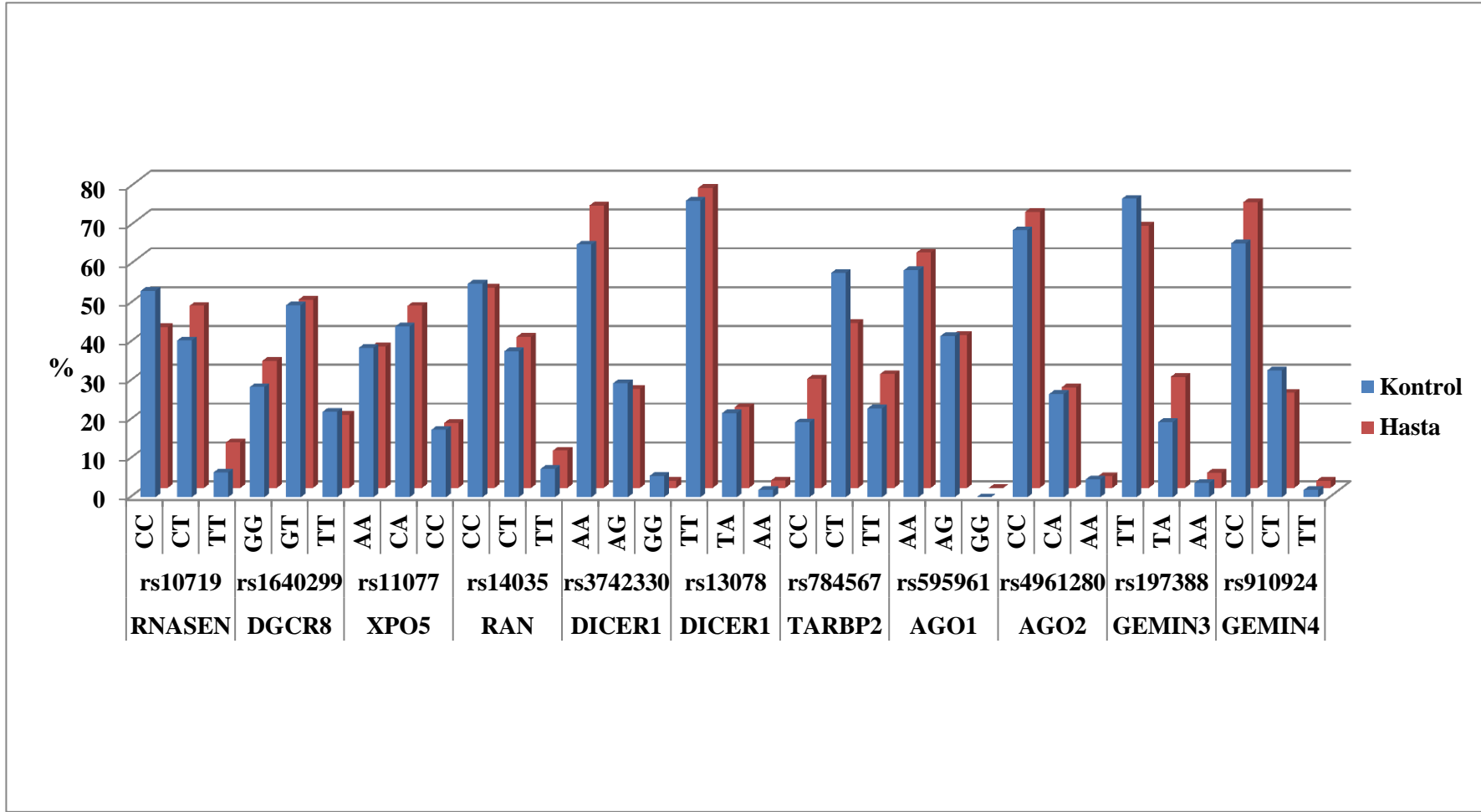
#### 4.3. Grupların Genotip Dağılımının Değerlendirilmesi

miRNA oluşum yolağında yer alan bazı genlere ait polimorfizmlerin hasta ve kontrol gruplarındaki dağılımları incelenerek bunlara ait p değerleri ve tanımlayıcı istatistikler hesaplandı (Çizelge 4.5) (Şekil 4.9). Çizelge 4.5 incelendiğinde bu polimorfizmler arasında sadece *TARBP2* geni üzerinde 5'-UTR bölgesinde yerleşik rs784567 polimorfizmi için istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık gözlemlendi ( $p < 0.05$ ).

**Çizelge 4.5.** miRNA biyogenezinde görevli bazı genlerin kontrol ve hasta grubundaki allel dağılımının sayı, yüzde, ki-kare ve p değerleri.

Gen Adı	Majör>Minör Allel	Genotip	Kontrol* N (%)	Hasta* N (%)	$\chi^2$ *	p değeri*
<i>RNASEN (DROSHA)</i> <i>rs10719</i>	C>T	CC	58 (53.2)	67 (41.4)	4,528	0,104
		CT	44 (40.4)	76 (46.9)		
			N=109	N=162		
<i>DGCR8</i> <i>rs1640299</i>	G>T	GG	31 (28.4)	54 (32.7)	0,745	0,689
		GT	54 (49.5)	80 (48.5)		
			N=109	N=165		
<i>XPO5</i> <i>rs11077</i>	A>C	AA	42 (38.5)	59 (36.4)	0,218	0,897
		AC	48 (44.0)	76 (46.9)		
			N=109	N=162		
<i>RAN</i> <i>rs14035</i>	C>T	CC	60 (55.0)	81 (51.6)	0,535	0,765
		CT	41 (37.6)	61 (38.9)		
			N=109	N=157		
<i>DICER1</i> <i>rs3742330</i>	A>G	AA	71 (65.1)	120 (72.7)	3,628	0,163
		AG	32 (29.4)	42 (25.5)		
			N=109	N=165		
<i>DICER1</i> <i>rs13078</i>	T>A	TT	81 (76.4)	119 (77.3)	0,032	0,984
		TA	23 (21.7)	32 (20.8)		
			N=106	N=154		
<b><i>TARBP2</i></b> <b><i>rs784567</i></b>	C>T	CC	<b>21 (19.3)</b>	<b>47 (28.2)</b>	<b>6,292</b>	<b>0,043</b>
		CT	<b>63 (57.8)</b>	<b>71 (42.5)</b>		
			<b>N=109</b>	<b>N=167</b>		
<i>AGO1 (EIF2C1)</i> <i>rs595961</i>	A>G	AA	62 (58.5)	97 (60.6)	0,121	0,728
		AG	44 (41.5)	63 (39.4)		
			N=106	N=160		
<i>AGO2 (EIF2C2)</i> <i>rs4961280</i>	C>A	CC	75 (68.8)	118 (71.1)	0,510	0,775
		CA	29 (26.6)	43 (25.9)		
			N=109	N=166		
<i>GEMIN3 (DDX20)</i> <i>rs197388</i>	T>A	TT	83 (76.9)	104 (67.5)	2,910	0,233
		TA	21 (19.4)	44 (28.6)		
			N=108	N=154		
<i>GEMIN4</i> <i>rs910924</i>	C>T	CC	70 (65.4)	120 (73.7)	2,170	0,338
		CT	35 (32.7)	40 (24.5)		
			N=107	N=163		

\* Chi-square, Likelihood ratio testleri ve frekans analizi kullanılmıştır (p≤0,05).



Şekil 4.9. miRNA biyogenezinde görevli bazı genler için SNP frekans verileri grafiği.



#### **4.3.1. *RNASEN (DROSHA)-rs10719* Polimorfizmine Ait Genotiplerin Değerlendirilmesi**

Kontrol grubunda 109 birey, hasta grubunda ise 162 birey değerlendirilmeye alındı. Kontrol grubumuzda C/C genotip sıklığı T/T genotip sıklığından 8.31 kat daha fazla görüldü. Aynı şekilde C/T genotip sıklığı T/T genotip sıklığından 6.31 kat daha fazla bulundu. Hasta grubumuzda ise C/C genotip sıklığı T/T genotip sıklığından 3.54 kat daha fazla görülürken, C/T genotip sıklığı T/T genotip sıklığından 4.00 kat daha fazla bulundu (Çizelge 4.5). Hasta ve kontrol grubu arasında genotip dağılımı bakımından istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamadı ( $p>0.05$ ).

#### **4.3.2. *DGCR8-rs1640299* Polimorfizmine Ait Genotiplerin Değerlendirilmesi**

Kontrol grubunda 109 birey, hasta grubunda ise 165 birey değerlendirilmeye alındı. Kontrol grubumuzda G/G genotip sıklığı T/T genotip sıklığından 1.29 kat daha fazla görüldü. Aynı şekilde G/T genotip sıklığı T/T genotip sıklığından 2.25 kat daha fazla bulundu. Hasta grubumuzda ise G/G genotip sıklığı T/T genotip sıklığından 1.74 kat daha fazla görülürken, G/T genotip sıklığı T/T genotip sıklığından 2.58 kat daha fazla bulundu (Çizelge 4.5). Hasta ve kontrol grubu arasında genotip dağılımı bakımından istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamadı ( $p>0.05$ ).

#### **4.3.3. *XPO5-rs11077* Polimorfizmine Ait Genotiplerin Değerlendirilmesi**

Kontrol grubunda 109 birey, hasta grubunda ise 162 birey değerlendirilmeye alındı. Kontrol grubumuzda A/A genotip sıklığı C/C genotip sıklığından 2.21 kat daha fazla görüldü. Aynı şekilde A/C genotip sıklığı C/C genotip sıklığından 2.52 kat daha fazla bulundu. Hasta grubumuzda ise A/A genotip sıklığı C/C genotip sıklığından 2.18 kat daha fazla görülürken, A/C genotip sıklığı C/C genotip sıklığından 2.81 kat daha fazla bulundu (Çizelge 4.5). Hasta ve kontrol grubu arasında genotip dağılımı bakımından istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamadı ( $p>0.05$ ).

#### **4.3.4. *RAN-rs14035* Polimorfizmine Ait Genotiplerin Değerlendirilmesi**

Kontrol grubunda 109 birey, hasta grubunda ise 157 birey değerlendirilmeye alındı. Kontrol grubumuzda C/C genotip sıklığı T/T genotip sıklığından 7.43 kat daha fazla görüldü. Aynı şekilde C/T genotip sıklığı T/T genotip sıklığından 5.08 kat daha fazla bulundu. Hasta grubumuzda ise C/C genotip sıklığı T/T genotip sıklığından 5.43 kat daha fazla görülürken, C/T genotip sıklığı T/T genotip sıklığından 4.09 kat daha fazla bulundu (Çizelge 4.5). Hasta ve kontrol grubu arasında genotip dağılımı bakımından istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamadı ( $p>0.05$ ).

#### **4.3.5. *DICER1-rs3742330* Polimorfizmine Ait Genotiplerin Değerlendirilmesi**

Kontrol grubunda 109 birey, hasta grubunda ise 165 birey değerlendirilmeye alındı. Kontrol grubumuzda A/A genotip sıklığı G/G genotip sıklığından 11.83 kat daha fazla görüldü. Aynı şekilde A/G genotip sıklığı G/G genotip sıklığından 5.33 kat daha fazla bulundu. Hasta grubumuzda ise A/A genotip sıklığı A/G genotip sıklığından 40.38 kat daha fazla görülürken, A/G genotip sıklığı G/G genotip sıklığından 14.16 kat daha fazla bulundu (Çizelge 4.5). Hasta ve kontrol grubu arasında genotip dağılımı bakımından istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamadı ( $p>0.05$ ).

#### **4.3.6. *DICER1-rs13078* Polimorfizmine Ait Genotiplerin Değerlendirilmesi**

Kontrol grubunda 106 birey, hasta grubunda ise 154 birey değerlendirilmeye alındı. Kontrol grubumuzda T/T genotip sıklığı A/A genotip sıklığından 40.21 kat daha fazla görüldü. Aynı şekilde T/A genotip sıklığı A/A genotip sıklığından 11.42 kat daha fazla bulundu. Hasta grubumuzda ise T/T genotip sıklığı A/A genotip sıklığından 40.68 kat daha fazla görülürken, T/A genotip sıklığı A/A genotip sıklığından 10.94 kat daha fazla bulundu (Çizelge 4.5). Hasta ve kontrol grubu arasında genotip dağılımı bakımından istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamadı ( $p>0.05$ ).

#### **4.3.7. *TARBP2-rs784567* Polimorfizmine Ait Genotiplerin Değerlendirilmesi**

Kontrol grubunda 109 birey, hasta grubunda ise 167 birey değerlendirilmeye alındı. Kontrol grubumuzda C/C genotip sıklığının T/T genotip sıklığı ile benzer oranlarda olduğu görüldü. Kontrol grubumuzda C/T genotip sıklığı T/T genotip sıklığından 2.52 kat daha fazla bulundu. Hasta grubumuzda ise C/C genotip sıklığı T/T genotip sıklığına benzer oranda görülürken, C/T genotip sıklığı T/T genotip sıklığından 1.45 kat daha fazla bulundu (Çizelge 4.5). **Hasta ve kontrol grubu arasında genotip dağılımı bakımından istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulundu ( $p < 0.05$ ).**

#### **4.3.8. *AGO1(EIF2C1)-rs595961* Polimorfizmine Ait Genotiplerin Değerlendirilmesi**

Kontrol grubunda 106 birey, hasta grubunda ise 160 birey değerlendirilmeye alındı. Kontrol grubumuzda A/A genotip sıklığı A/G genotip sıklığından 1.4 kat daha fazla bulundu. Kontrol grubumuzda G/G genotipine rastlanmadı. Hasta grubumuzda ise A/A genotip sıklığı A/G genotip sıklığından 1.5 kat daha fazla görüldü. Kontrol grubunda olduğu gibi hasta grubunda da G/G genotipine rastlanmadı (Çizelge 4.5). Hasta ve kontrol grubu arasında genotip dağılımı bakımından istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamadı ( $p > 0.05$ ).

#### **4.3.9. *AGO2 (EIF2C2)-rs4961280* Polimorfizmine Ait Genotiplerin Değerlendirilmesi**

Kontrol grubunda 109 birey, hasta grubunda ise 166 birey değerlendirilmeye alındı. Kontrol grubumuzda C/C genotip sıklığı A/A genotip sıklığından 15 kat daha fazla görüldü. Aynı şekilde C/A genotip sıklığı A/A genotip sıklığından 5.8 kat daha fazla bulundu. Hasta grubumuzda ise C/C genotip sıklığı A/A genotip sıklığından 23.70 kat daha fazla görülürken, C/A genotip sıklığı A/A genotip sıklığından 8.6 kat daha fazla bulundu (Çizelge 4.5). Hasta ve kontrol grubu arasında genotip dağılımı bakımından istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamadı ( $p > 0.05$ ).

#### **4.3.10. *GEMIN3(DDX20)-rs197388* Polimorfizmine Ait Genotiplerin Değerlendirilmesi**

Kontrol grubunda 108 birey, hasta grubunda ise 154 birey değerlendirilmeye alındı. Kontrol grubumuzda T/T genotip sıklığı A/A genotip sıklığından 20.78 kat daha fazla görüldü. Aynı şekilde T/A genotip sıklığı A/A genotip sıklığından 5.24 kat daha fazla bulundu. Hasta grubumuzda ise T/T genotip sıklığı A/A genotip sıklığından 17.30 kat daha fazla görülürken, T/A genotip sıklığı A/A genotip sıklığından 7.33 kat daha fazla bulundu (Çizelge 4.5). Hasta ve kontrol grubu arasında genotip dağılımı bakımından istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamadı ( $p>0.05$ ).

#### **4.3.11. *GEMIN4-rs910924* Polimorfizmine Ait Genotiplerin Değerlendirilmesi**

Kontrol grubunda 107 birey, hasta grubunda ise 163 birey değerlendirilmeye alındı. Kontrol grubumuzda C/C genotip sıklığı T/T genotip sıklığından 34.42 kat daha fazla görüldü. Aynı şekilde C/T genotip sıklığı T/T genotip sıklığından 17.21 kat daha fazla bulundu. Hasta grubumuzda ise C/C genotip sıklığı T/T genotip sıklığından 40.94 kat daha fazla görülürken, C/T genotip sıklığı T/T genotip sıklığından 13.61 kat daha fazla bulundu (Çizelge 4.5). Hasta ve kontrol grubu arasında genotip dağılımı bakımından istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamadı ( $p>0.05$ ).

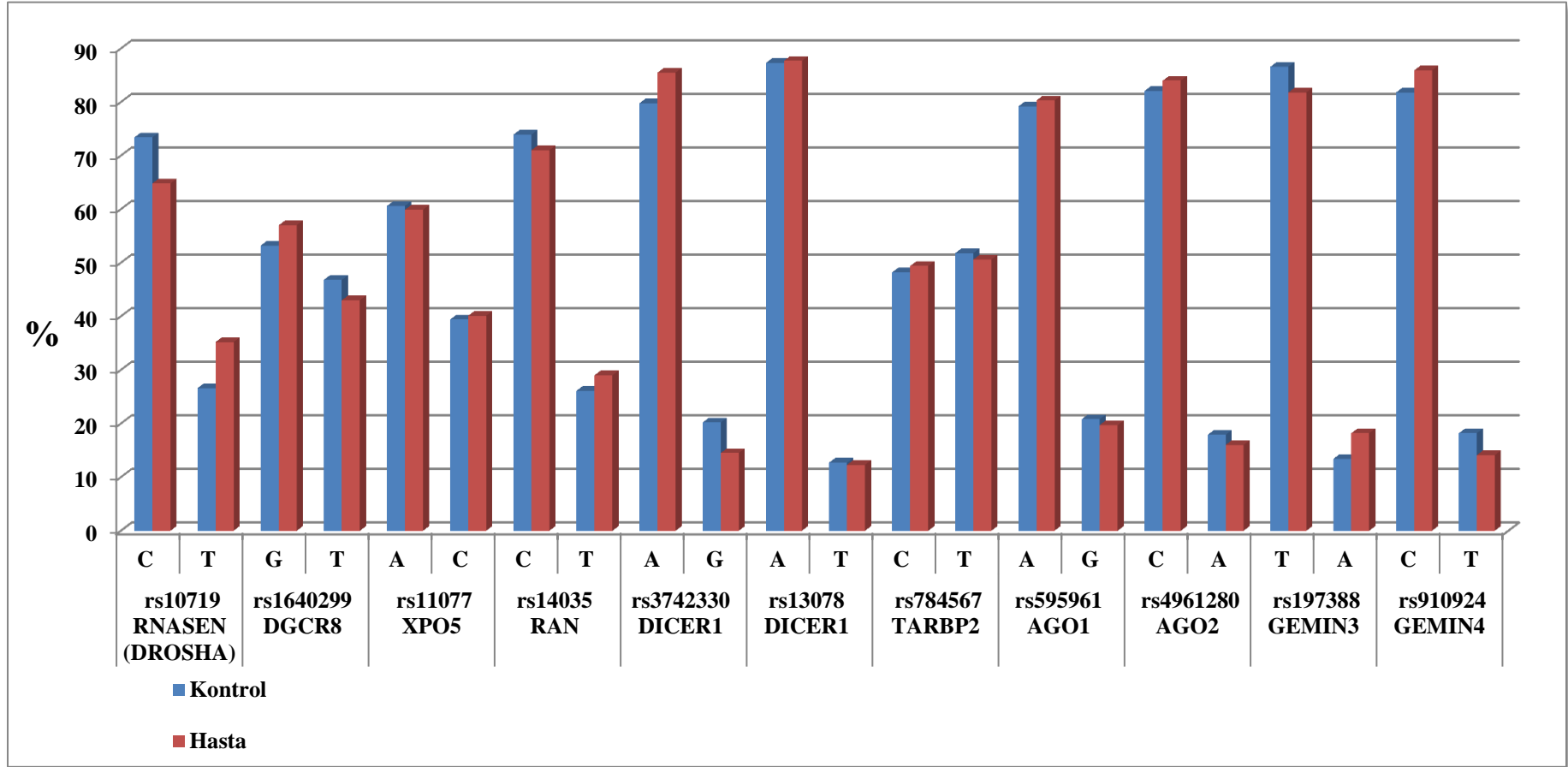
#### **4.4. Grupların Allel Dağılımının Değerlendirilmesi**

miRNA biyogenezinde görevli bazı genlere ait 11 polimorfizmin hasta ve kontrol grubundaki allel sayılarının istatistikleri (sayı ve yüzde) Çizelge 4.6 ve Şekil 4.10'da, Hardy-Wienberg dengesine ait p değerleri Çizelge 4.7'de verilmiştir. **Çizelge 4.7'e göre sadece *AGO1 (EIF2C1)* geninde intron 10'da yerleşik rs595961 polimorfizmi için hem kontrol ( $p=0,007$ ) hem de hasta grubunun ( $p=0,002$ ) Hardy-Weinberg dengesinde olmadığı görüldü.**

**Çizelge 4.6.** miRNA biyogenezinde görevli bazı genlerin kontrol ve hasta grubundaki allel dağılımının allel sayısı, yüzde ve p değerleri.

<b>Gen Adı</b>	<b>Kontrol Majör&gt;Minör allel N (%)</b>	<b>Hasta Majör&gt;Minör allel N (%)</b>	<b>p</b>
<i>RNASEN (DROSHA)</i>	C>T 160 / 58 (73.4/26.6)	C>T 210 / 114 (64.8/35.2)	0,350
<i>DGCR8</i>	G>T 116 / 102 (53.2/46.8)	G>T 188 / 142 (57.0/43.0)	0,386
<i>XPO5</i>	A>C 132 / 86 (60.6/39.4)	A>C 194 / 130 (59.9/40.1)	0,875
<i>RAN</i>	C>T 161 / 57 (73.9/26.1)	C>T 223 / 91 (71.0/29.0)	0,473
<i>DICER1</i>	A>G 174 / 44 (79.8/20.2)	A>G 282 / 48 (85.5/14.5)	0,084
<i>DICER1</i>	A>T 185 / 27 (87.3/12.7)	A>T 270 / 38 (87.7/12.3)	0,893
<i>TARBP2</i>	C>T 105 / 113 (48.2/51.8)	C>T 165 / 169 (49.4/50.6)	0,776
<i>AGO1(EIF2C1)</i>	A>G 168 / 44 (79.2/20.8)	A>G 257 / 63 (80.3/19.7)	0,764
<i>AGO2 (EIF2C2)</i>	C>A 179 / 39 (82.1/17.9)	C>A 279 / 53 (84.0/16.0)	0,554
<i>GEMIN3(DDX20)</i>	T>A 187 / 29 (86.6/13.4)	T>A 252 / 56 (81.8/18.2)	0,146
<i>GEMIN4</i>	C>T 175 / 39 (81.8/18.2)	C>T 280 / 46 (85.9/14.1)	0,199

\*SPSS v.11.5 frekans ve Likelihood ratio testi kullanılmıştır (p<0,05)



Şekil 4.10. Alzheimer hasta-kontrol bireyelerine ait allel dağılımı verileri grafiği.

**Çizelge 4.7.** miRNA oluşum yolağında görevli bazı genlere ait SNP'lerin Hardy-Weinberg dengesi p değerleri.

Gen Adı	Kontrol p	Hasta p
<i>RNASEN (DROSHA) (rs10719)</i>	0,726	0,716
<i>DGCR8 ( rs1640299)</i>	0,958	0,887
<i>XPO5 (rs11077)</i>	0,414	0,764
<i>RAN (rs14035)</i>	0,786	0,482
<i>DICER1 (rs3742330)</i>	0,354	0,758
<i>DICER1 (rs13078)</i>	0,806	0,625
<i>TARBP2 (rs784567)</i>	0,100	0,053
<i>AGO1(EIF2C1) (rs595961)</i>	<b>0,007*</b>	<b>0,002*</b>
<i>AGO2 (EIF2C2) (rs4961280)</i>	0,324	0,656
<i>GEMIN3(DDX20) (rs197388)</i>	0,089	0,622
<i>GEMIN4 (rs910924)</i>	0,314	0,874
*Hardy-Weinberg dengesinde değildir (p<0,05).		

#### **4.4.1. RNASEN (DROSHA)-rs10719 Polimorfizmine Ait Allellerin Değerlendirilmesi**

Kontrol grubunda 109 birey, hasta grubunda ise 162 birey değerlendirilmeye alındı. Kontrol grubu içerisinde 'C' alleli %73.4 ve 'T' alleli %26.6 olarak belirlendi. Hasta grubu içerisinde 'C' alleli %64.8 ve 'T' alleli %35.2 olarak belirlendi. Kontrol ve hasta grubu içerisinde 'C' ve 'T' allellerinin yüzdesel ve allelik dağılımları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamadı ( $p>0.05$ ) (Çizelge 4.6). Kontrol ve hasta grupları arasında allelik dağılım açısından da istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamadı ( $p>0.05$ ) (Şekil 4.10).

#### **4.4.2. DGCR8-rs1640299 Polimorfizmine Ait Allellerin Değerlendirilmesi**

Kontrol grubunda 109 birey, hasta grubunda ise 165 birey değerlendirilmeye alındı. Kontrol grubu içerisinde 'G' alleli %53.2 ve 'T' alleli %46.8 olarak belirlendi. Hasta grubu içerisinde 'G' alleli %57.0 ve 'T' alleli % 43.0 olarak belirlendi. Kontrol ve hasta grubu içerisinde 'G' ve 'T' allellerinin yüzdesel dağılımları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamadı ( $p>0.05$ ) (Çizelge 4.6). Kontrol ve hasta grupları arasında allelik dağılım açısından da istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamadı ( $p>0.05$ ) (Şekil 4.10).

#### **4.4.3. XPO5-rs11077 Polimorfizmine Ait Allellerin Değerlendirilmesi**

Kontrol grubunda 109 birey, hasta grubunda ise 162 birey değerlendirilmeye alındı. Kontrol grubu içerisinde 'A' alleli %60.6 ve 'C' alleli %39.4 olarak belirlendi. Hasta grubu içerisinde 'A' alleli %59.9 ve 'C' alleli %40.1 olarak belirlendi. Kontrol ve hasta grubu içerisinde 'A' ve 'C' allellerinin yüzdesel dağılımları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamadı ( $p>0.05$ ) (Çizelge 4.6). Kontrol ve hasta grupları arasında allelik dağılım açısından da istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamadı ( $p>0.05$ ) (Şekil 4.10).



#### **4.4.4. *RAN-rs14035* Polimorfizmine Ait Allellerin Değerlendirilmesi**

Kontrol grubunda 109 birey, hasta grubunda ise 157 birey değerlendirilmeye alındı. Kontrol grubu içerisinde ‘C’ alleli %73.9 ve ‘T’ alleli %26.1 olarak belirlendi. Hasta grubu içerisinde ‘C’ alleli %71.0 ve ‘T’ alleli %29.0 olarak belirlendi. Kontrol ve hasta grubu içerisinde ‘C’ ve ‘T’ allellerinin yüzdesel dağılımları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamadı ( $p>0.05$ ) (Çizelge 4.6). Kontrol ve hasta grupları arasında allelik dağılım açısından da istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamadı ( $p>0.05$ ) (Şekil 4.10).

#### **4.4.5. *DICER1-rs3742330* Polimorfizmine Ait Allellerin Değerlendirilmesi**

Kontrol grubunda 109 birey, hasta grubunda ise 165 birey değerlendirilmeye alındı. Kontrol grubu içerisinde ‘A’ alleli %73.9 ve ‘G’ alleli %26.1 olarak belirlendi. Hasta grubu içerisinde ‘A’ alleli %71.0 ve ‘G’ alleli %29.0 olarak belirlendi. Kontrol ve hasta grubu içerisinde ‘A’ ve ‘G’ allellerinin yüzdesel dağılımları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamadı ( $p>0.05$ ) (Çizelge 4.6). Kontrol ve hasta grupları arasında allelik dağılım açısından da istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamadı ( $p>0.05$ ) (Şekil 4.10).

#### **4.4.6. *DICER1-rs13078* Polimorfizmine Ait Allellerin Değerlendirilmesi**

Kontrol grubunda 106 birey, hasta grubunda ise 154 birey değerlendirilmeye alındı. Kontrol grubu içerisinde ‘A’ alleli % 87.3 ve ‘T’ alleli %12.7 olarak belirlendi. Hasta grubu içerisinde ‘A’ alleli % 87.7 ve ‘T’ alleli % 12.3 olarak belirlendi. Kontrol ve hasta grubu içerisinde ‘A’ ve ‘T’ allellerinin yüzdesel dağılımları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamadı ( $p>0.05$ ) (Çizelge 4.6). Kontrol ve hasta grupları arasında allelik dağılım açısından da istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamadı ( $p>0.05$ ) (Şekil 4.10).

#### **4.4.7. *TARBP2-rs784567* Polimorfizmine Ait Allellerin Değerlendirilmesi**

Kontrol grubunda 109 birey, hasta grubunda ise 167 birey değerlendirilmeye alındı. Kontrol grubu içerisinde ‘C’ alleli %48.2 ve ‘T’ alleli %51.8 olarak belirlendi. Hasta grubu içerisinde ‘C’ alleli %49.4 ve ‘T’ alleli %50.6 olarak belirlendi. Kontrol ve hasta grubu içerisinde ‘C’ ve ‘T’ allellerinin yüzdesel dağılımları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamadı ( $p>0.05$ ) (Çizelge 4.6). Kontrol ve hasta grupları arasında allelik dağılım açısından da istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamadı ( $p>0.05$ ) (Şekil 4.10).

#### **4.4.8. *AGO1(EIF2C1)-rs595961* polimorfizmine ait allellerin değerlendirilmesi**

Kontrol grubunda 106 birey, hasta grubunda ise 160 birey değerlendirilmeye alındı. Kontrol grubu içerisinde ‘A’(T) alleli %79.2 ve ‘G’(C) alleli %20.8 olarak belirlendi. Hasta grubu içerisinde ‘A’(T) alleli %80.3 ve ‘G’(C) alleli %19.7 olarak belirlendi. Kontrol ve hasta grubu içerisinde ‘A’(T) ve ‘G’(C) allellerinin yüzdesel dağılımları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamadı ( $p>0.05$ ) (Çizelge 4.6). Kontrol ve hasta grupları arasında allelik dağılım açısından da istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamadı ( $p>0.05$ ) (Şekil 4.10).

#### **4.4.9. *AGO2(EIF2C2)-rs4961280* Polimorfizmine Ait Allellerin Değerlendirilmesi**

Kontrol grubunda 109 birey, hasta grubunda ise 166 birey değerlendirilmeye alındı. Kontrol grubu içerisinde ‘C’ alleli %82.1 ve ‘A’ alleli %17.9 olarak belirlendi. Hasta grubu içerisinde ‘C’ alleli %84.0 ve ‘A’ alleli %16.0 olarak belirlendi. Kontrol ve hasta grubu içerisinde ‘C’ ve ‘A’ allellerinin yüzdesel dağılımları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamadı ( $p>0.05$ ) (Çizelge 4.6). Kontrol ve hasta grupları arasında allelik dağılım açısından da istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamadı ( $p>0.05$ ) (Şekil 4.10).

#### **4.4.10. *GEMIN3(DDX20)-rs197388* Polimorfizmine Ait Allellerin Değerlendirilmesi**

Kontrol grubunda 108 birey, hasta grubunda ise 154 birey değerlendirilmeye alındı. Kontrol grubu içerisinde ‘T’ alleli %86.6 ve ‘A’ alleli %13.4 olarak belirlendi. Hasta grubu içerisinde ‘T’ alleli %81.8 ve ‘A’ alleli %18.2 olarak belirlendi. Kontrol ve hasta grubu içerisinde ‘T’ ve ‘A’ allellerinin yüzdesel dağılımları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamadı ( $p>0.05$ ) (Çizelge 4.6). Kontrol ve hasta grupları arasında allelik dağılım açısından da istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamadı ( $p>0.05$ ) (Şekil 4.10).

#### **4.4.11. *GEMIN4-rs910924* Polimorfizmine Ait Allellerin Değerlendirilmesi**

Kontrol grubunda 107 birey, hasta grubunda ise 163 birey değerlendirilmeye alındı. Kontrol grubu içerisinde ‘C’ alleli %81.8 ve ‘T’ alleli %18.2 olarak belirlendi. Hasta grubu içerisinde ‘C’ alleli %85.9 ve ‘T’ alleli %14.1 olarak belirlendi. Kontrol ve hasta grubu içerisinde ‘C’ ve ‘T’ allellerinin yüzdesel dağılımları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamadı ( $p>0.05$ ) (Çizelge 4.6). Kontrol ve hasta grupları arasında allelik dağılım açısından da istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamadı ( $p>0.05$ ) (Şekil 4.10).

## 5. TARTIŞMA

Alzheimer hastalığı, hafıza kaybı ve davranışsal değişimlerle karakterize yaşa bağlı bir hastalıktır. Hastalığı erken dönemde tanımlamak oldukça zordur. Bu nedenle doğal biyolojik tanımlayıcıların geliştirilmesine ihtiyaç vardır. Elde edilecek bu verilerle birlikte tedaviye yönelik yeni hedef ve yaklaşımların geliştirilmesi de mümkün olabilecektir.

miRNA'lar 5' sonları ile hedef genlerin 3'-UTR'ine bağlanan küçük düzenleyici elementlerdir. Hedef aldıkları genin ifadesini ya mükemmel olmayan eşleşme ile translasyonu inhibe ederek ya da mükemmel eşleşme ile mRNA'nın yıkılmasını sağlayarak baskırlarlar. Her bir gen 3'-UTR bölgesine pek çok miRNA'nın bağlanması ile düzenlenebileceği gibi bir miRNA birden fazla genin 3'-UTR bölgesine de bağlanabilir (63). Bu nedenle miRNA-mRNA eşleşmesinde hedef oldukça önem taşımaktadır. miRNA'ların keşfi ile Alzheimer hastalığındaki genetik analizler, hastalığa sebep olan genlerin 3'-UTR'lerini hedef alan bazı miRNA'ların tek nükleotid polimorfizmleri, hedefledikleri genlerdeki polimorfizmleri, miRNA'ların ve hedef genlerin ekspresyon varlığı-yokluğu veya düzeylerinin araştırılması yönünde gelişmektedir. AH'da hipokampustaki miRNA'ların ekspresyonundaki değişimler, miRNA SNP'leri ve hedef mRNA'daki SNP'ler bazı proteinlerin anormal derecede artmasına veya azalmasına sebep olur. Bu hatalar amiloid sentezi, nörogenezis, insülin direnci ve edinsel bağışıklık gibi moleküler yolların düzensizlikleriyle sonuçlanır (40).

Literatür taraması sonunda şu ana kadar olgun miRNA oluşum yolağında yer alan genlerin polimorfizmleri ve miRNA genlerinin ekspresyon düzeylerindeki değişimler ile AH riski arasındaki ilişkiyi araştıran bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu tezde; *APP*, *BACE1*, *PSEN1* ve *PSEN2* genlerini hedef alan miRNA genlerinden AH ile ilişkili olduğu düşünülen; *hsa-miR-9-5p*, *hsa-miR-29a-3p*, *hsa-miR-106a-5p*, *hsa-miR-106b-5p*, *hsa-miR-107*, *hsa-miR-125a-3p*, *hsa-miR-125b-5p* genlerinin ekspresyon değişimleri araştırıldı ve miRNA oluşum yolağında görevli *DROSHA (RNASEN)*,

*DICER1, DGCR8, XPO5, RAN, TARBP2, GEMIN3, GEMIN4, AGO1* ve *AGO2* genleri üzerindeki bazı SNP'ler incelendi.

Çalışmamızın birinci kısmını oluşturan miRNA'ların periferik kandaki ekspresyon düzeylerinin ölçülmesi ile hedefledikleri genin translasyonunu baskılayarak veya hedef genin ürünü olan proteini parçalayarak AH sebebi amiloid plakların ve tau proteinlerinin oluşumunda etkileri olup olmadığı ortaya konulabilecektir.

Alzheimer hastalığı kortikal atropi, nöronal hücre ölümü, nöroinflamasyon, sinaps kaybı, nörofibriler iplikler ve senil plakların birikimi ile başlayan bir hastalıktır. Nörofibriler iplikler ve hiperfosforile tau proteinleri nöronlar arasında birikir. Senil plaklar ise 38-43 aminoasitlik geniş amiloid- $\beta$  ( $A\beta$ ) peptidden meydana gelir. AH patogenezinde anahtar tetikleyici olduğu düşünülmektedir (90).  $A\beta$ , *APP*'nin  $\beta$  ve  $\gamma$  sekretaz tarafından kademeli olarak parçalanması sonucu oluşur. Daha sonra ise hücre dışı boşluğa salınır ve burada monomerlerine ayrılmazsa plaklar halinde birikir. Amiloid oluşumunun AH'a neden olduğunu destekler nitelikte çeşitli hipotezler vardır (90). Bunlardan birincisi; kromozom 21 üzerinde yerleşik *APP*'dir. Down sendromu hastaları kromozom 21 için trizomiye sahiptir ve bu hastalarda düzeyleri değişmekle birlikte AH geliştiği bilinmektedir. Bir kromozomu 21q için kırık olan trizomili bireylerde ise *APP* geni diploiddir. Bu bireylerde klinik veya nöropatolojik AH gelişmediği gözlenmiştir (90). Diğer taraftan *APP* lokusunu içeren kromozom 21q'nun küçük bir parçasının dublikasyonlarında *APP*'nin ekstra bir kopyası bulunacağı için plak birikimine bağlı olarak Alzheimer benzeri bunama geliştiği gözlenmiştir. İkinci hipotez; nadir olan ailesel erken başlangıçlı AH ile ilişkili mutasyonların  $A\beta$  üretimini veya  $A\beta_{42}$ - $A\beta_{40}$  oranını artırarak  $A\beta$  toplanma ihtimalini artırdığı şeklindedir. Ailesel forma neden olan mutasyonlar da yine kromozom 21q üzerindeki *APP*, kromozom 14q üzerindeki *PSEN1* ve kromozom 1q üzerindeki *PSEN2* genindedir. Presenilinler, *APP*'nin kesilerek  $A\beta$  formuna ulaşmasını sağlayan  $\gamma$ -sekretazın katalitik bölgeleridir (90). Bu genlerdeki mutasyonlar  $A\beta$  metabolizmasını ve üretimini etkilemektedir. Üçüncü hipotez;  $A\beta$ 'nın in vitro ve in vivo çalışmalar sonucunda nöronlar için toksik olduğu yönündedir. Sentetik ve doğal olarak salgılanan  $A\beta$ 'nın, çeşitli konsantrasyonlarda hazırlanarak rodentlerin beynine enjekte edilmesi sonucu davranışsal defektler ve tau hiperfosforilasyonunun arttığı gözlenmiştir. Dördüncü

hipotez; *APP* geninde mutasyonları taşıdığı bilinen erken ailesel formunun bulunduğu AH'lı bireylerde *APP*'nin aşırı ekspresyonunun gerçekleşmesidir (90). Yine *APP* proteininin aşırı eksprese edilmesi ile ilgili oluşturulan transgenik farelerde, amiloid plak birikimi ve sinaps kaybı gibi AH'da gözlenen bazı morfolojik değişimler olduğu gözlenmiştir (90). Tüm bu bulgular A $\beta$ 'nin AH patogenezinde temel element olduğunu göstermektedir. Bu nedenle A $\beta$ 'nin AH'da sinaptik fonksiyon kaybına nasıl yol açtığını öğrenmek oldukça önemlidir. A $\beta$ 'nin aracılık ettiği sinaps fonksiyonunun kaybının altında yatan mekanizmalar oldukça karmaşıktır. Epidemiyolojik çalışmalar Alzheimer hastalığının tek bir faktöre bağlı olmadığına işaret etmektedir (91). Hastalığın oluşmasında yaşlanmaya bağlı olarak nöronal ve merkezi vasküler bozukluklar çok önemli bir role sahiptir. Bunun yanında kafa travmaları, virüs enfeksiyonları da Alzheimer hastalığı riskini artırmaktadır (92).

Alzheimer hastalığında düzenli çalışmayan miRNA'larla ilgili yapılan araştırmaların birçoğunun *APP* ve *BACE1* transkriptlerini hedef aldığı gösterilmiştir. Özellikle hastalığın erken aşamalarında beyin dokusunda *hsa-miR-107*'nin ekspresyon miktarının azaldığı raporlanmıştır ve ayrıca miR-107'nin direkt olarak *BACE1* mRNA'sının 3'-UTR bölgesini hedef aldığı bulunmuştur. 5 sporadik olguya ait anterior temporal korteksin miRNA ekspresyon profilini örnekleyen bu çalışmada; miR-9 ve miR-29b'nin de aralarında bulunduğu 13 miRNA'nın ekspresyonunda azalma (down-regulation) olduğu bulunmuştur (93). Kültüre insan hücrelerinde yapılan lusiferaz deneylerinde ise miR-29a, miR-29b-1 ve *BACE1* geni 3'-UTR'i arasında direkt bir etkileşim olduğu onaylanmıştır (94). AH'lı bireylerin post-mortem beyin dokusu analizlerinde *BACE1* enzim düzeylerinin artmış olmasına rağmen mRNA düzeylerinin değişmediği gözlenmiştir. Bu durum patolojik şartlar altında proteinin posttranskripsiyonel olarak düzenlendiğini göstermektedir (94). miR29a/b-1 ve miR-107'nin ekspresyonundaki çarpıcı azalma *BACE1* enziminin konsantrasyonunda artmaya sebep olarak AH'nın ilerlemesinde miRNA'lar ve proteazlar arasındaki bağlantının direkt etkili olduğunu göstermektedir (94). Çeşitli nöronal miRNA'lar, amiloid- $\beta$  peptide maruz kaldıktan sonra farklı düzenlenir. Normal olmayan miRNA işlevinin AH'da zor tespit edilen amiloid- $\beta$ 'nin toksik etkisinde pay sahibi olduğu düşünülmektedir (93).

Alzheimer hastalığında, miRNA'ların gen ifadesini düzenleme görevleri post-mortem beyin dokusu örnekleri kullanılarak ortaya konulmuştur. AH tanısı için kullanılan diğer biyolojik kaynak serebrospinal sıvıdır (CSF). CSF'den fosforile tau ve total tau miktarının artmasının tespit edilmesi, A $\beta$ 42 peptidinin azalmasının ölçümü için yararlanılmaktadır. Nörodejeneratif hastalıklarda CSF'deki miRNA profilinin çıkarılması, miRNA işaretleyicilerinin tanımlanmasını sağlar. Son zamanlarda yapılan çalışmalar miRNA'ların regülasyonunun sadece merkezi sinir sisteminde değil aynı zamanda Alzheimer hastalarının CSF'lerinde de düzensiz olduğunu göstermektedir. Yapılan bir çalışmada, etkilenen beyin bölgelerine göre yapılan Braak sınıflandırmasına göre 5. ve 6. adımda olan hastalarda miR-9'un cerebellum, hipokampus ve medial frontal gyrus'da ekspresyonunun az olduğunu göstermişlerdir (95).

miRNA'ların pek çok hastalıkta olduğu gibi AH'da da etkileri tartışılmaktadır. Bu nedenle sporadik AH'na ait periferik kan örneklerinde miRNA ekspresyonunun araştırılması gerekmektedir. Yapılan çalışmalarda; serum, plazma, kan mikrovezikülleri (8) ve mononükleer hücrelerde (96) ayrı ayrı gerçekleştirilen ekspresyon ölçümlerinde çeşitli miRNA düzeylerinin aynı olması nedeniyle (97, 98) bizim çalışmamızda da tüm kandan elde edilen total RNA havuzundan seçilmiş bazı miRNA'ların ekspresyonları ölçüldü.

Hasta ve kontrol grupları arasında ekspresyon düzeyleri bakımından kıyaslama yapılarak genetik olarak hastalık riski taşıyan bireylerin yanı sıra hastalığın tanısına yönelik biyolojik işaret olarak periferik kandaki ölçümleri ile hastalık riski arasındaki ilişki olup olmadığı araştırıldı. Öncelikle aday bir miRNA grubu seçildi, ardından gruptaki genlere ait ekspresyon düzeyleri ile hasta-kontrol grupları arasında yine cinsiyet ve tip bakımından bir farklılık olup olmadığı araştırıldı.

Araştırmanın sonuçlarına göre *hsa-miR-9-5p*, *106a-5p*, *106b-5p* ve *107*'nin ekspresyon düzeyleri ile AH arasında anlamlı bir ilişki bulunurken, *hsa-miR-29a-3p*, *125a-3p*, *125b-5p*'nin ekspresyon düzeyleri ve AH arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunamadı.

*hsa-miR-9-5p*, *BACE1* genini hedef alır. Normal yetişkin insan beyin bölgelerinden korteks (%12,76) ve hipokampusta (%7,3) (79) bol miktarda eksprese edilir. Hedef eşleşme skoru % 75'dir. Eşleşme skoru %100 olan genlere göre düşük

olmasına rağmen eksprese edilme oranı istatistiksel olarak anlamlı bulundu ( $p < 0,05$ ). AH'nın periferik kanından elde edilen ölçümlerde hastalarda ( $2^{-\Delta\Delta C_T} = 0,0556$ ) kontrollere ( $2^{-\Delta\Delta C_T} = 0,2746$ ) göre *hsa-miR-9-5p* geninin ekspresyonunun azaldığı tespit edildi. AH'nın beyin dokusunda yapılan ölçümlerde de *hsa-miR-9*'ün ekspresyonunun düşük olduğu bulunmuştur (99). Lukiw'in yaptığı bir çalışmada ise Alzheimer hastalarının beyin dokusunda miR-9 ekspresyonunun arttığı bulunurken (100) diğer çalışmalarda *hsa-miR-9*, *hsa-miR-29a* ve *hsa-miR-107*'nin sporadik Alzheimer hastalarında ekspresyonunun azaldığı (down-regulation) (94, 101) bulunmuştur. Beyin dokusunda yapılan çalışmalarda *hsa-miR-9* için ekspresyon düzeyleri farklılık göstermektedir ve merkezi sinir sistemi, orta beyin oluşumu veya oksidatif strese cevapta anahtar bir miRNA'dır. miR-9 beyin fonksiyonları için de gereklidir. Farelerde yapılan çalışmalarda miR-9'un ekspresyonu olmadığında ciddi beyin defektleri bulunmuştur. Bu anahtar miRNA'nın ekspresyonunun azalması nörodejeneratif hastalıklara yatkınlığı artırmaktadır. Çalışmamızın sonuçlarına göre miR-9-5p'nin ekspresyonunun azalması bu bulguları destekler niteliktedir. Nitekim insan serebrospinal sıvısında yapılan qRT-PCR multi-plex analizlerde yine *hsa-miR-9*'ün korteks ve hipokampusta ekspresyonunun azaldığı bulunmuştur (102). *hsa-miR-9*'ün hedefindeki *BACE1* geni ile eşleşerek *APP*'i parçalayan ve bir  $\beta$ -sekretaz olan BACE1 enziminin bu aktivitesini düzenlemesi gerekir. Buna göre *hsa-miR-9-5p*'nin yeterli düzeyde eksprese edilememesi halinde hedefindeki BACE1 genini baskılayamadığı için daha fazla BACE1 enzimi sentezlenmesine, APP proteininin daha fazla parçalanmasına ve amiloid plakların birikimine sebep olabileceği düşünülebilir.

*hsa-miR-29a-3p*'nin hedefindeki gen *BACE1*'dir ve hedef eşleşme skoru % 97'dir. Normal yetişkin insan beyin bölgelerinden cerebellum (% 0,11-2), frontal korteks (% 1,5-27) ve hipokampusta (% 0,89-16) ekspresyon düzeyleri değişmekle birlikte oransal olarak düşüktür (79). Çalışmamızda, hasta ve kontroller arasında ekspresyon düzeyleri bakımından istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamadı ( $p \geq 0,005$ ). *hsa-miR-29a* için ekspresyon düzeyi hastalarda ( $2^{-\Delta\Delta C_T} = 0,1096$ ) kontrollere ( $2^{-\Delta\Delta C_T} = 0,2025$ ) göre düşük olduğu tespit edildi. *APP* ve proteolitik ürünü olan A $\beta$ , gama sekretaz ve beta sekretaz enzimleri tarafından meydana getirilir. *APP* geni AH'nın tüm ailesel ve sporadik formları ile ilişkilidir. miR-29'un ekspresyonu sporadik



Alzheimer hastalarının beyin dokularında anormal derecede azalmıştır (93). hsa-miR-29a'nın ekspresyonunun azalması negatif geri besleme mekanizması ile AH'nın beyin dokusunda *APP* ve *BACE1*'in artışına sebep olur ve A $\beta$  birikimine yol açar (99). Hebert ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada da miRNA'ların *BACE1* geni ile etkileşimde olduğu raporlanmıştır (93). *BACE1*, A $\beta$  üretiminde sınırlı olması gereken bir adımdır ve Alzheimer hastalarının beyin dokusunda ekspresyonunun arttığı raporlanmıştır. Yine aynı grup in vitro koşullarda miR-29a ve miR-9'un *BACE1* ekspresyonunu düzenleyebildiğini göstermiştir. Alzheimer hastalığında miR-29a kümesinin ekspresyonunda önemli miktarda azalma tespit edilmiş ve buna bağlı olarak Alzheimer hastalarında yüksek *BACE1* protein ve A $\beta$  düzeylerinin anormal birikimine sebep olduğu tespit edilmiştir (104). Bunun yanında *APP* ve *BACE1*'in 3'UTR bölgelerinde yapılan çalışmalarda yaygın SNP'lerin hiçbiri AH ile ilişkili bulunmamıştır. Aynı zamanda *BACE1* genini hedef alan miR-29a'nın AH oluşumunda etkili olmadığı bulunmuştur (103). Buna karşılık hücre kültürü modellerinde *BACE1* ve A $\beta$  üretimi ile *hsa-miR-29a*'nın düşük ekspresyon düzeyi arasında olası bir bağlantıdan söz edilmektedir (104). Çalışmamızın sonuçlarına göre *hsa-miR-29a-3p*'nin ekspresyon düzeyi hastalarda kontrollere oranla 1,84 kat azalmıştır. Bu azalma istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Fakat yapılan çalışmalarda da gösterildiği gibi ifadesinin azalması *BACE1* mRNA'nın 3'-UTR'ne bağlanamayacağı için geni transkripsiyonel olarak baskılayamamasına neden olur (93). Böylece buradan sentezlenen *BACE1* enziminin aktivitesi artar, daha fazla *APP* parçalanır, A $\beta$  hücre içinde birikerek; sinaptik ve nöronal kayıplar, nörodejenerasyon ve hafızanın ilerleyici kaybı gerçekleşir. *hsa-miR-29a-3p* geninin bu mekanizmada temel rol oynayarak Alzheimer hastalığı gelişme riski ile ilişkili olduğu düşünülebilir.

*hsa-miR-106a-5p*'nin hedefindeki gen *APP*'dir ve hedef eşleşme skoru % 79'dur. Normal insan yetişkin beyin dokusunda ekspresyon düzeyi düşüktür (% 0,5) (79). Neha ve arkadaşları hücre hatlarında haberci (reporter) gen ekspresyon analizi ile miR-106a'nın *APP* geninin çalışmasını negatif yönde düzenlediğini ve bu miRNA'nın aşırı eksprese edilmesi sonucu *APP* mRNA'sının translasyonel olarak baskılanarak *APP*'nin protein düzeylerinde önemli derecede azalmaya sebep olduğunu göstermişlerdir (18). Sağlıklı bireylerde yapılan diğer bir çalışmada ise beynin temporal korteksinde miR-106a ekspresyonunun azaldığı bulunmuştur (105). Sağlıklı bireylere

ait serebrospinal sıvı örneklerinde de aynı şekilde miR-106a için yapılan ölçümlerde ekspresyon düzeyinin düşük olduğu bulunmuştur. Yine miRNA'ların ekspresyon verileri kullanılarak AH tanısına katkıda bulunacağını düşündüğümüz çalışmamız sonucunda da hasta ve kontroller arasında ekspresyon düzeyleri bakımından istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulundu ( $p<0,05$ ). *hsa-miR-106a-5p*'nin düzeyi için ekspresyon düzeyi hastalarda ( $2^{-\Delta\Delta C_T}=0,0041$ ) kontrollere ( $2^{-\Delta\Delta C_T}=1,5704$ ) göre azalmıştır. miR-106a'nın ekspresyon düzeyinin düşmesi sonucu APP'nin baskılanamayarak aşırı üretimi ile birikimine sebep olur ve böylece Alzheimer hastalığı gelişmesinde bir risk oluşturabilir.

*hsa-miR-106b-5p*'nin hedefindeki gen APP'dir ve hedef eşleşme skoru % 54'dür. Normal insan yetişkin beyin bölgelerinden frontal kortekste (% 0,14-1) ve hipokampusta (% 0,28-2) ekspresyon düzeyi düşüktür (79). Sağlıklı yaşlı bireylerde yapılan bir çalışmada beyin temporal korteksinde miR-106b ekspresyonunun azaldığı bulunmuştur (105). Serebrospinal sıvı örneklerinde de aynı şekilde miR-106b için yapılan ölçümlerde ekspresyon düzeyinin düşük olduğu bulunmuştur. Bizim çalışmamızda da hasta ve kontroller arasında ekspresyon düzeyleri bakımından istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulundu ( $p=0,001$ ). *hsa-miR-106b-5p* için ekspresyon düzeylerinin hastalarda ( $2^{-\Delta\Delta C_T}=0,1086$ ) kontrollere ( $2^{-\Delta\Delta C_T}=0,3557$ ) göre düşük olduğu gözlemlendi. Ayrıca nöral hücre hatlarında yapılan aynı çalışmada APP ekspresyonunu düzenlemesinin yanında beyin gelişimi ve nöronların farklılaşmasında da görevli olabileceği bildirilmiştir (106). miR-106b'nin düzeyindeki bu azalma APP'nin translasyonunun baskılanamamasına ve amiloid plakların birikerek AH'nın etiyopatogenezinde önemli genetik kaynaklardan biri haline gelmesine neden olabilir.

*hsa-miR-107*, BACE1 geninin hedefi olmasının yanı sıra PSEN1 genini de hedeflemektedir ve hedef eşleşme skoru % 85'dir. Normal yetişkin insan beyin bölgelerinden frontal korteks (% 2-7,14), hipokampus (% 1-3,57) ve orta beyinde (% 0,5-1,79) ekspresyon düzeyleri değişmekle birlikte düşüktür (79). Çalışmamızda hasta ve kontroller arasında ekspresyon düzeyleri bakımından istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulundu ( $p<0,05$ ). *hsa-miR-107* için ekspresyon düzeylerinin hasta bireylerde ( $2^{-\Delta\Delta C_T}=0,0078$ ) kontrol bireylerinden ( $2^{-\Delta\Delta C_T}=0,3590$ ) oldukça düşük olduğu gözlemlendi. Yapılan çalışmalarda da hastaların beyin dokusundaki miR-107 düzeyinin AH

patolojisinin ilerlemesi sürecinde çarpıcı olarak azaldığı bulunmuştur (101, 107, 108). Diğer bir çalışmada ise miR-107 ile APP ve BACE1 genlerinin ekspresyonları ile bu genlere ait miRNA'ların ekspresyonları arasında bir bağlantı kurulamamıştır (104). Çalışmamızda, miR-107 ekspresyon düzeyinin düşmesi sonucunda bir gama sekretaz olan PSEN1 geninin ekspresyonu baskılanamayarak aşırı sentezine ve APP'nin aşırı üretimi ile A $\beta$  birikimine sebep olur ve böylece Alzheimer hastalığı gelişmesinde bir risk oluşturabilir.

*hsa-miR-125a-3p*'nin hedefindeki gen PSEN2'dir ve hedef eşleşme skoru % 75'dir. Normal insan yetişkin beyin bölgelerinden frontal kortekste (% 2,92-7), serebellumda (% 2,08-5) ve orta beyinde (% 5,42-13) ekspresyon düzeyi oldukça yüksektir (79). Normal ve yaşlı bireylerde yapılan bir çalışmada ise beyin temporal korteksinde miR-125a ekspresyonunun azaldığı bulunmuştur (105). Serebrospinal sıvı örneklerinde miR-125a için yapılan ölçümlerde ekspresyon düzeyinin yüksek olduğu bulunmuştur (102). miR-125a hedef genin ekspresyonunu düzenlemede görevlidir. Olgun formdaki miR-125a'nın 8 nükleotidlik merkez dizisindeki bir SNP sonucu (miR-125a-U) pri-miRNA'dan pre-miRNA oluşumunu blokladığı ve miRNA'nın aracılık ettiği translasyonu baskıladığı bulunmuştur. Bu SNP etkisini RNA'nın sekonder yapısını değiştirerek göstermektedir (109). Bizim çalışmamızda ise hasta ve kontroller arasında ekspresyon düzeyleri bakımından istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamadı ( $p < 0,05$ ). Fakat *hsa-miR-125a-3p* için ekspresyon düzeyinin hastalarda ( $2^{-\Delta\Delta C_T} = 0,1611$ ) kontrollere ( $2^{-\Delta\Delta C_T} = 0,2951$ ) göre düşük olduğu gözlemlendi. miR-125a'nın hedefinde yer alan PSEN2 presenilin grubu bir proteindir. Birçok işleve sahip membran proteinleridir ve görevleri APP'nin parçalanmasını sağlayan  $\gamma$ -sekretaz kompleksinin merkezini oluşturmaktır (110). miR-125a hedef aldığı *PSEN2* geninin ekspresyonunu baskılayabildiği için kararlı düzeyde APP sentezi gerçekleşir ve amiloid plak birikimi oluşmaz ve sonuç olarak AH'nın patolojisine katkı sağlamadığı düşünülebilir. Fakat miR-125a dizisindeki SNP'nin olup olmadığı araştırılmadığı için etkisi halen belirsizdir.

*hsa-miR-125b-5p*'nin hedefindeki gen *PSEN1*'dir ve hedef eşleşme skoru % 68'dir. Normal insan yetişkin beyin bölgelerinden frontal kortekste (% 7,67-101), cerebellumda (% 1,06-14), orta beyinde (% 6,38-84) ve hipokampusta (% 2,2-29) ekspresyon düzeyi oldukça yüksektir (79). Sağlıklı yaşlı bireylerde yapılan bir

çalışmada beynin temporal korteksinde miR-125b ekspresyonunun azaldığı bulunmuştur (105). Serebrospinal sıvı örneklerinde ise miR-125b için yapılan ölçümlerde ekspresyon düzeyinin yüksek olduğu bulunmuştur (103). Bizim çalışmamızda ise *hsa-miR-125b-5p* için ekspresyon düzeyi hastalarda ( $2^{-\Delta\Delta C_T}=0,0760$ ) kontrollere göre ( $2^{-\Delta\Delta C_T}=0,0847$ ) düşük olmasına rağmen ekspresyon düzeyleri bakımından istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamadı ( $p>0,05$ ). miR-125b ve AH ilişkisi için veri tabanlarında yapılan taramalarda ekspresyon düzeyinin yüksek olduğu (TargetScan Release 5.2 June 2011) ve bazı çalışmalarda da AH'nın etiyolojisinde katkısı olduğu bulunmuştur (100). Bizim çalışmamızda ise hastalar kontrollere göre düşük ekspresyon düzeyine sahiptir ve *hsa-miR-125b* miRNA geni AH ile ilişkilendirilememiştir.

miRNA'ların biyolojisi ve insan beyin fonksiyonlarındaki rolleri halen açık değildir. miRNA biyogenezinden sorumlu enzimatik mekanizmalar iyi korunur. miRNA'ları kodlayan genler kümeler halindedir ve ekspresyonları da birlikte gerçekleşir (100). Çalışmamızda yer alan miRNA'lar Alzheimer hastalığına sebep olan genler düşünülerek seçilmiştir. Bunun yanında aynı genleri hedef alan başka miRNA'ların da olduğu unutulmamalıdır. AH'ı ile bağlantılarının tam anlamıyla ortaya konulabilmesi için ilgili miRNA kümesindeki diğer genler de çalışılmalıdır. Çalışmaya başlamadan önce *hsa-miR-125a* dışında, olası etkilerinden dolayı miRNA'ların kendisindeki ve hedefindeki genler ile eşleşme bölgeleri içinde herhangi bir SNP bulunmadığı araştırılarak etkileri dışlandı. Fakat bu miRNA'ların pri- ve pre-formundaki çeşitli SNP'ler olduğu gibi hedefindeki genlerin 3'-UTR, intron ve ekson bölgelerinde de SNP'ler mevcuttur. Bu SNP'lerin miRNA'nın olgunlaşma sürecinde yaratacağı işleme hataları veya sekonder RNA'da meydana getireceği yapısal değişiklikler araştırılmadı.

Bugün için tartışmalı da olsa genel kanı AH'nın kadınlarda erkeklerden daha fazla ve ciddi geliştiği yönündedir. Çalışmamızda yaş aralığı genişliğinden dolayı yaş, AH ve AH tipleri arasındaki ilişki araştırılmadı. AH tiplendirilmesinde ilk tanı, klinik veriler ve mental durum muayeneleridir ve AH'nın ailesi tarafından fark edilerek kliniğe getirilmesi süreci erken dönemi atladığı için çok az hasta bu dönemde tanı alır. Dolayısıyla sayının az olması normaldir. Yine frekans analizlerinin sonuçlarına göre miRNA ekspresyon düzeyleri, bireylerin cinsiyeti ve hastalığın tipi arasında sabit bir

ilişki yoktur. Her ne kadar grubumuz hasta ve kontrol olarak ayrılrsa da kontrol bireylerinin alındığı dönemde AH olmamaları daha sonra olmayacakları anlamına gelmemektedir. AH çok faktörlü olup karmaşık bir genetik mekanizmaya sahip olmasının yanında çevrenin de etkisi altında geliştiği düşünülmektedir. AH'na neden olabilecek kriterler dışlanarak 60 yaş ve üzeri sağlıklı kontrol grubu oluşturmak buldukları yaş itibarıyla oldukça zordur. Bu nedenle hasta ve kontrol sayısı eşit değildir. Sayının artırılması ve grubun cinsiyet bakımından eşitlenmesi, elde edilen verileri desteklemesi bakımından önemlidir.

Alzheimer hastalığı ile ilişkili genlerin anormal ekspresyonlarının analizlerinin yapılması zordur. Hem SNP hem de ekspresyon analizleri için kullanılan doku örneklerinin hasta yaşarken temin edilmesi mümkün olmadığı ve postmortem dokuda RNA parçalanmasının yanı sıra protein modifikasyonları da olabileceği için diğer kaynaklara yönelme zorunluluğu doğmuştur. Gen düzenlemesinin ortaya konulmasında en kolay elde edilebilir biyolojik kaynak periferik kandır. Kandan elde edilen veriler hastalıkla ilgili bilgiye ulaşmak için yol göstericidir (111, 112). Sirküle kan kolay elde edilmesinin yanında beyin ve immün sistem arasında pek çok mekanizmalarla bağlantılı çalışır. Bu noktada önemli bir sorun vardır. Periferik kan beyinle direkt ilişkide değildir ve kan-beyin bariyerindeki değişimlerle bağlantı kurarak bu engeli aşması oldukça zordur. Bariyerin getirdiği zorluklara rağmen kan proteinleri ve kan temelli proteinlerdeki kayda değer değişimler hastalığın tespiti ve ilerlemesinin izlenmesinde biyoişaret olarak yardımcı olacaktır (113, 114).

Çalışmamızın ikinci kısmını oluşturan SNP'lerin seçiminde Hushan Yang'ın (82) mesane kanserli hastalarda yapmış olduğu çalışmada yer alan miRNA olgunlaşma mekanizmasında görevli genler ve hastalıkla ilişkili olduğu tespit edilen SNP'ler kullanılmıştır. Olgunlaşmaları sırasında meydana gelebilecek hatalar buldukları dokuda hedefledikleri geni baskılamalarına veya oluşan proteini parçalamalarına engel olacaktır. Yapılan araştırmalar bu hataların var olan hastalıkların etiyolojisi ve patolojisi üzerine etkisini araştırmak ya da hastalığın seyrine katkısını tespit ederek tedavi amaçlı yaklaşımlara yön göstermek gibi amaçlara hizmet etmektedir.

Kanser dışında diğer önemli bir grup ise nöropsikiyatrik hastalıklardır. Alzheimer hastalığı bu grupta yer alır. 100 yıllık bir geçmişe sahiptir ve bugüne kadar

hastalık sebebi mekanizmalar konusunda çarpıcı bir gelişme olmamıştır. Dünyada yaşlı popülasyonda 5,4 milyon bireyde bulunan bir hastalıktır. Ayrıca tanı, tedavi ve bakım maliyeti ise yıllık 183 milyon dolardır. Amerika’da her 8 bireyden birisi Alzheimer hastasıdır (115). Türkiye’de ise bu sayı Alzheimer Derneği verilerine göre 450 bindir. Türkiye İstatistik Kurumu (116) 2009 verilerine göre ise Alzheimer hastalığından ölen bireylerin sayısı: 1596’sı erkek, 2247’si kadın olmak üzere toplam 3870 kişidir. 2050 yılı itibariyle ise sadece Amerika’da Alzheimer’lı hasta sayısının 13,5 milyon bireye ulaşması beklenmektedir (117).

Bu nedenle yeni keşfedilen ve halen bazı mekanizmaları tam anlamıyla bilinmeyen miRNA’ların Alzheimer hastalığındaki yeri önem taşır. SNP’lerin ise miRNA’ların davranışında ve hastalıkların genetik temelinde önemi büyüktür (118). Özellikle ailesel Alzheimer hastalığında tanı amaçlı kullanılan *APP*, *PSEN1*, *PSEN2* ve *ApoE* gibi genlerin yanında hastalığın tüm tiplerinde tanıya götüreceği veya hastalığın seyrini belirleyecek yeni belirteçlere ihtiyaç vardır. miRNA olgunlaşma mekanizmasındaki genlerde yer alan SNP’lerin kanser (82), diyabet (119), arteroskleroz (120), parkinson ve şizofreni (37) gibi hastalıklarda önemli rolü olduğu bilinmektedir. Bu genlerin etkisinin araştırılmadığı fakat etkilerinin olabileceği diğer bir hastalık ise Alzheimer hastalığıdır.

Hasta ve kontrol grupları arasında genotip dağılımı ile allel frekansı kıyaslaması yapılarak genetik olarak hastalık riski taşıyan bireyler belirlenebilir. Bu çalışmada, miRNA oluşum yolağında görevli genlere ait polimorfizmlerin miRNA’nın olgunlaşma mekanizmasında hatalara yol açarak Alzheimer hastalığı olma riski ile ilişkisi araştırıldı. Aday gen grubu olarak *RNASEN(DROSHA)*, *DGCR8*, *XPO5*, *RAN*, *DICER1*, *AGO1*, *AGO2*, *GEMIN3(DDX20)*, *GEMIN4* ve *TARBP2* seçilerek bu genlere ait polimorfizmler üstünde hasta kontrol çalışması yapıldı.

Çalışmaya başlarken miRNA olgunlaşma yolağında görevli genleri hedef alan miRNA’lardaki ve bu genler üzerindeki miRNA’ların hedef aldığı dizilere ait SNP’ler AH mekanizmasında etkili olabileceği için dbSMR veri tabanı kullanılarak (14) bu SNP’ler araştırıldı. miRNA-hedef mRNA eşleşme kuralına göre SNP’ler merkez dizide olursa eşleşme sağlanamadığından gen düzenlemesi gerçekleşemeyebilir. Bu SNP’ler ilgili gen için hedefin 3’-UTR’i, miRNA’nın 5’-UTR’i veya kök halka yapısına yakın

dizilerde olursa hedef miRNA'ı işleme yeteneklerini kaybedeceklerinden dolayı olgun miRNA oluşamayabilir (72). Veri tabanı analizleri ile gerek olgunlaşma yolağı genlerinde gerek hedefindeki miRNA'ların eşleşme bölgesinde veya yakınında SNP'lere rastlanmamıştır. *hsa-miR-125a-3p* dışında bu genleri hedef alan miRNA'ların kendi dizilerindeki SNP'lerin çalışılması gerekmemiştir. miR-125-U polimorfizmi primRNA'dan pre-miRNA oluşumunda görevli olması nedeniyle araştırılması gerekmektedir.

Çalışmamızın sonuçlarına göre; *TARBP2* genindeki rs784567 polimorfizm için genotip ve allel dağılımları ile AH olma riski arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulundu ( $p < 0.05$ ). *RNASEN(DROSHA)*, *DGCR8*, *XPO5*, *RAN*, *DICER1*, *AGO1*, *AGO2*, *GEMIN3(DDX20)* ve *GEMIN4* polimorfizmlerinin genotip ve allel dağılımları ile Alzheimer hastalığı olma riski arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunamadı ( $p > 0.05$ ).

*DGCR8* rs1640299 polimorfizmi genin 3'-UTR bölgesinde yerleşiktir. 3'-UTR'ler genel olarak gen ekspresyonu için sonlandırma kodonu, poliadenilasyon sinyali ve sekonder yapı biçimlenmesi için sinyallerin alındığı dizilerin yerleştiğı önemli bölgelerdir. Bu bölgelerdeki SNP'ler konjenital kalp hastalığı, ventriküler kardiyomyopati ve displazi (121) gibi hastalıklara sebep olmaktadır. *DGCR8*, kofaktör olarak *RNASEN* ile birlikte çalışır. 3'-UTR bölgesindeki bu polimorfizm *DGCR8*'in sekonder yapısını değiştirerek *RNASEN* ile bağlanmasına engel olur ve miRNA kararlılığını değiştirebilir. *DGCR8* geninin ifadesi ile ilgili fareler üzerinde yapılan bir çalışmada, *DGCR8* geninin tek kopya bulunması halinde işlevinde yetersiz kaldığı ve görevli olduğu miRNA'nın ekspresyonunda azalmayla birlikte sinirsel ve davranışsal yetersizliklerin ortaya çıktığı gösterilmiştir (122). Nöropsikiyatrik hastalıklarda 22q11.2 özellikle ilişkilendirme çalışmalarında anlamlı sonuçlar elde edilmiş bir bölgedir. *DGCR8*'in komşuluğunda yer alan 22q11.21 bölgesindeki *HTF9C*'ye ait rs1633445 ile şizofreni hastalarında dikkatini uzun süre odaklayamama arasında anlamlı bir ilişki olduğu gösterilmiştir. Şizofreni hastalarıyla yapılan genom boyu ilişkilendirme çalışmasının sonuçlarına göre de şizofreni ile ilişkili olduğu bulunan sekiz büyük delesyon arasından dördünün 22q11.2 bölgesini kapsadığı gösterilmiştir (123). Diğer çalışmaların aksine çalışmamızda polimorfizme ait GT genotipi bakımından hasta ve kontrol bireyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmamasına rağmen her iki

grupta da diğer genotiplere (GG ve TT) göre yüksek bulundu. Bu polimorfizm *DGCR8* proteininin sekonder yapısını değiştirmeyeceği için katalizör olarak birlikte çalıştığı RNASEN (DROSHA) ile bağlanarak pri-miRNA'dan pre-miRNA oluşumunda yaklaşık 80 nt'lik çift zincir pri-miRNA'ı kesme işlevini yerine getirerek olgunlaşma mekanizması devam edebilir. Olgunlaşan miRNA hedef mRNA'na bağlanır ve kontrollü çalışmasını sağlar. Bu nedenle *DGCR8* genindeki bu 3'-UTR polimorfizminin Alzheimer hastalığı patogenezinde etkisi olmadığı söylenebilir.

*TARBP2* rs784567 polimorfizmi genin 5'-UTR bölgesinde yerleşiktir. Genel olarak gen ekspresyonu için düzenleyici elementlerden bazıları ile translasyonun başlamasına ve sonlanmasına karar veren okuma çerçevesi (Open reading frame-ORF) burada yer alır. ORF'lerin kontrol ettiği genlerden birisi de *BACE1*'dir. *BACE1* proteini merkezi sinir sisteminin temel  $\beta$  sekretazıdır. *BACE1* mRNA'ı 5' sonda yüksek oranda GC içeriğine sahiptir (%77) (115). Bu dizilerin var olması protein sentezini sınırlayarak sentezin düzenlenmesine yardımcı olur. Dizilerin aşırı miktarda bulunması ise translasyon bariyeri oluşturmasına ve *BACE1* mRNA'nın translasyonunun yapılamamasına neden olur. *TARBP2*'deki SNP (rs784567) *DICER* ile bağlanmasını engelleyerek *DICER* enziminin işlevini yerine getirememesine sebep olacak ve olgun miRNA oluşmadığı için *BACE1* gen ekspresyonu kontrol edilemeyecektir. *BACE1* ekspresyonunun artması daha fazla APP'nin parçalanmasına ve sonrasında hücrede miktarının kontrol edilemeyerek birikimine neden olacaktır. Bu SNP için heterozigot CT genotipi bakımından hasta ve kontroller arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulundu ( $p < 0.05$ ). CC ve TT genotipi bakımından ise istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamadı ( $p > 0.05$ ). Heterozigot CT genotipi hasta bireylerde % 42.5, kontrol bireylerinde % 57.8 oranında bulundu. Homozigot TT genotipi polimorfik allelin homozigotluğu olmasından dolayı hasta bireylerde istatistiksel olarak anlamlı bir sonuç elde edilseydi Alzheimer hastalığının patolojisinde etkisinden söz edilebilirdi. Ama aksine CT genotipine kontrollerde hasta bireylerden fazla rastlanması nedeniyle bu genotipin hastalarda koruyucu etkiye sahip olduğu söylenebilir. Bunu nasıl sağlayabilir? Bir özelliğin bir çift allel gen tarafından belirlendiği dikkate alındığında gen frekansı, bir allel genin o populasyonda o gen için var olan tüm alleller arasındaki yüzdesidir. Mutasyonlar ve doğal seleksiyon gen havuzundaki genlerin frekansını etkileyebilir. Özellikle doğal seleksiyonla oluşan, genin farklı allellerinin (heterozigot durum), farklı



çevrelerde, yaşam için üstünlük sağladığı düşünüldüğünde dengeli polimorfizm de diyebileceğimiz bu doğal seleksiyon tipi, özel bir hastalık nedeni olan allel genin popülasyonda kalmasını veya artmasını sağlamaktadır. Çünkü heterozigotlar; bir hastalıkla ilişkili gen allelini ve bir de normal gen allelini taşıyanlar olarak, iki alleli de normal olan homozigotlara göre, enfeksiyonlara veya çevresel koşullara daha dirençli olmaktadır. Bir bakıma kalıtsal hastalığın taşıyıcısı olmak, başka bir hastalığa karşı savunma sağlayabilmekte ya da bireyi belli koşullarda koruyabilmektedir. Dolayısıyla Alzheimer hastalarında da *TARBP2* genindeki CT (heterozigot) genotipine sahip bireylerin hastalık riskine karşı korundukları söylenebilir. Fakat bu genelleme için miRNA oluşum yolağında görevli tüm genlere ait haplotip analizlerinin yapılması ve diğer genlerin etkisinin dışlanması gerekmektedir. Ayrıca hasta ve kontrol grubu oluşturulurken 60 yaş ve üzeri bireyler seçilmiştir. Hasta ve kontrol bireyleri arasında tanısal farklılık olmaması için aynı kliniğe başvuran ve Alzheimer tanısı almamış, bunun yanında Alzheimer sebebi olabilecek herhangi bir hastalığı olmayan bireyler çalışmaya alındı. Sağlıklı bireyler Alzheimer hastaları gibi sürekli takip edilmediklerinden dolayı kliniğe başvurduğu dönemde aldıkları tanıya göre kontrol grubuna dahil edildi. Her ne kadar örneklerin alındığı dönemde bireyler sağlıklı olsalar da genetik alt yapılarının ileride Alzheimer hastası olmaları konusunda zemin hazırlayıp hazırlamadığı bilinmemektedir. Bu nedenle kontrol grubunun içinde de bu SNP için riskli bireyler bulunabilir. Hasta ve kontrol sayısının artırılmasının yanında kontrol sayısının da hastaya eşitlenmesi gerekir. 60 yaş ve üzeri AH'na sebep olabilecek; diyabet, vasküler demans, kardiyovasküler sendromlar, düşme, çarpma gibi beyin işlevlerini etkileyerek unutkanlık sebebi oluşturabilecek etkenlerden herhangi birine sahip olmayan sağlıklı birey bulma güçlüğünden dolayı kontrol grubu genişletilemedi. Sonuç olarak; rs784567 için genotip dağılımı ve Alzheimer hastalığı olma riski arasında bir ilişki bulunamadı. Polimorfik olmayan ve polimorfik olan allel, hastalarda ve kontrollerde benzer oranda bulunmasından dolayı Alzheimer hastalığı olma riski ile ilişkilendirilemedi.

Alzheimer hastalığının nedeni olarak; amiloid plakların ve tau proteinlerinin birikim mekanizmasından miRNA'nın hedef mRNA'lar üzerindeki denetleme mekanizmasındaki aksamalar sorumlu olabilir. Öte yandan miRNA olgunlaşma yolağındaki genlerin ekspresyonları da incelendiğinde bu miRNA'ların ifadesinin

hastalarda daha fazla azaldığı gözlenmiştir (124). Ekspresyon düzeyi bakımından farklılık gösteren miRNA'lar üzerinde online hedef bulma uygulamaları yardımıyla yapılan çalışmada ilgili miRNA'ların hedefinde ağırlıklı olarak nöronal plastisite süreçlerinde yer alan hücresel bileşenlerin olduğu bulunmuştur (125). Buna göre miRNA'ların düzenlenmesindeki hatalarla oluşabilen nöropsikiyatrik hastalıkların ortaya çıkmasında miRNA oluşum yolağında görevli genlerin polimorfizmlerinin de pay sahibi olabileceği düşünülmektedir.

Alzheimer hastalığı klinik açıdan heterojen bir yapıya sahiptir. Bu yüzden erken başlangıçlı ve geç başlangıçlı olmak üzere iki alt tipe ayrılmıştır. AH'da hastalar yakınları tarafından farkedilip kliniğe getirilmedikleri için erken dönemde tanı konulma güçlüğü vardır. Çalışmamızda da erken başlangıçlı tip için kadın ve erkek bireylerin sayısının az olmasından dolayı genotip ve allel dağılımları ile arasındaki ilişki değerlendirilemedi. Geç başlangıçlı tip için hasta yakınlarının vermiş olduğu başlama yaşı esas alındı fakat yaş aralığının geniş olması nedeniyle (55-99) allel dağılımı ve yaş arasındaki ilişki istatistiksel olarak değerlendirilemedi. Bunun yanında yapılan frekans hesaplamalarında geç başlangıçlı Alzheimer hasta sayısının kadın bireylerde (N=111) erkek bireylerden (N=61) fazla olduğu tespit edildi. Cinsiyetin AH riski açısından öneminin ne olduğu tartışmalı bir konudur. Kadınlarda AH olasılığının yüksek olduğunu ileri süren çalışmalarda bu farkın neden kaynaklandığı da yeterince ikna edici bulunmamaktadır (eğitim düzeyleri, kadınların uzun ömürlü olmaları, kardiyovasküler hastalıkların etkisi vs) (91, 126). Ayrıca AH'nın ilaç kullanma durumuyla ilgili elimizde bir veri olmadığı için hastaların ilaç tedavisine olan yanıtları veya hastalığın ciddiyeti gibi değişkenler ile polimorfizmler arasında bir ilişkinin varlığı araştırılmamıştır. Bu verilerin de teminiyle yapılacak istatistiksel analizler sonucunda AH alt tipleriyle bu polimorfizmler arasındaki ilişkiler ortaya konulabilir.

Çalışılan SNP'ler için genotip dağılımı ve allel sıklığı bakımından diğer popülasyonlarla karşılaştırıldığında avrupa popülasyonu ile benzerlik göstermektedir. Amerika Birleşik Devletlerinde AH'nın oranına yönelik etnik gruplar arasındaki farklılıkların araştırıldığı bir çalışmada, siyah ırkta hispanik ırka göre AH'nın daha sık olduğu, Amerikan kızılderililerinde ise beyaz ırka göre AH sıklığının daha düşük olduğu bulunmuştur (127). miRNA genlerinin ekspresyonları ile ilgili literatürde etnik bir çalışma bulunmamaktadır. Bununla birlikte miRNA oluşum yolağında görevli

genlere ait SNP'lerin NCBI veri tabanındaki kayıtlarına göre Avrupa popülasyonu için normal bireylerde bulunan allel frekansları ile çalışmamızda elde ettiğimiz hem hasta hem de kontrol gruplarına ait allel frekansları (*TARBP2* geni rs784567 polimorfizmi dışında) uyumludur. Sonuç olarak; bu genlere ait SNP'lerin popülasyon farketmeksizin dağılımları normal bireylerdeki ile benzerdir ve AH ile ilişkili olmadıkları düşünülmektedir.

SNP'ler için hasta ve kontroller arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmaması nedeniyle miRNA olgunlaşmasında görevli temel genlerin düzenli çalışarak yolda aksamaya neden olmayacağı düşünülebilir. Olgunlaşan miRNA'nın hedef mRNA'ya bağlanarak; BACE1 enzimi sentezinin kararlı miktarda olmasının kontrolü, A $\beta$  proteinine dönüşen APP'nin kontrolü ile kararlı miktarda A $\beta$  oluşumun sağlanması, aynı şekilde PSEN1 ve PSEN2 sekretazları ile A $\beta$ 'nin zararlı formunun zararlı olmayan formuna oranının dengelenerek A $\beta$  birikiminin engellenmesi sağlanabilir. Bununla birlikte miRNA oluşum yolağındaki genlere ait SNP'ler normal olmasına rağmen bazı miRNA'ların ekspresyon düzeyinde azalma gözlenmektedir. Böyle bir sonuç, ilgili miRNA genlerinin sentezi sırasında görevli başka kontrol mekanizmaları veya kontrol moleküllerinin çalışmaması veya yetersiz çalışması ile meydana gelebilir.

Hasta ve kontrol sayısının az olmasından dolayı genotip dağılımları ile hastalık durumu arasında anlamlı bulduğumuz ilişkilerin doğrulanması açısından bu araştırmadan tamamen bağımsız daha geniş bir grupla çalışılması gerekmektedir. Ayrıca genotipleme sonuçlarının tutarlı olduğunu göstermek açısından çalışma grubu üzerinde Real- Time PCR'dan farklı olarak dizi analizi veya RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) ile bu polimorfizmler için bir tekrar çalışması yapılabilir.

Aynı şekilde ekspresyon düzeyleri ve miRNA'lar ile hastalık durumu arasında anlamlı bulduğumuz ilişkilerin doğrulanması açısından bu araştırmadan tamamen bağımsız daha geniş bir grupta bulguların tekrarlanması gereklidir. Ekspresyon sonuçlarının tutarlı olduğunu gösterebilmek için çalışmanın devamında miRNA oluşum yolağında yer alan ve çalışmaya alınmayan diğer genler, bu genlerin ekspresyon düzeyleri ve genleri hedef alan % 100 eşleşmeye sahip miRNA'ların polimorfizm ve

ekspresyon düzeyleri de araştırılarak miRNA'ların AH'nın oluşumu ve seyrine etkileri daha ayrıntılı olarak ortaya konulabilir.

Bu araştırma Alzheimer hastalığında miRNA'ların etkisini ve düzensizliğin etiyolojisini açıklamada yol gösterici olacaktır. AH sadece genetik faktörlerin etkisiyle ortaya çıkan bir hastalık olmadığı için çevresel faktörlerin hasta grubunda ne oranda tetikleyici görevi olduğu bilinmemektedir. Genetik araştırmalar nöropsikiyatrik hastalıkların etiyolojisinde yer alan yolların keşfedilmesine yardımcı olacaktır. Bu sayede hastalıkların tanı ve tedavi süreçlerine de önemli katkı sağlayacaktır

## 6. SONUÇLAR ve ÖNERİLER

1. *hsa-miR-29a-3p*, *hsa-miR-125a-3p* ve *hsa-miR-125b-5p* miRNA genlerine ait ekspresyon düzeyleri hastalarda kontrollere göre azalmasına rağmen Alzheimer hastalığı olma riski ile istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunamadı ( $p>0,05$ ). *hsa-miR-9-5p*, *106a5p*, *106b-5p* ve *107* için azalan ekspresyon düzeylerinin, Alzheimer hastalığı olma riskini anlamlı oranda değiştirdiği bulundu ( $p<0,05$ ).

2. *RNASEN*, *DGCR8*, *XPO5*, *RAN*, *DICER1*, *GEMIN3*, *GEMIN4*, *AGO1* ve *AGO2* polimorfizmlerinin genotip ve allel dağılımları ile Alzheimer hastalığı olma riski arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunamadı ( $p>0,05$ ). *TARBP2* rs784567 CT genotipinin Alzheimer hastalığı olma riskini anlamlı oranda değiştirdiği bulunurken ( $p<0,05$ ) allel dağılımı bakımından Alzheimer hastalığı olma riski arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunamadı ( $p>0,05$ ).

3. Alzheimer hastalığı çok genli kalıtım gösterdiğinden tek bir genetik faktörden ziyade birden fazla lokus hastalığın etiyolojisinde yer aldığı için tüm genomu kapsayacak şekilde SNP'ler belirlenebilir ya da Alzheimer hastası bireylerin tüm genomunun dizi analizi ile taranması sonucu, Alzheimer hastalığı riski ile ilişkilendirilebilecek lokuslar ortaya çıkarılabilir.

4. Hastalığın etiyopatogenezinde yer alan miRNA'ların tespit edilerek ekspresyon profillerinin belirlenmesi ile Alzheimer hastalığının altında yatan genetik faktörlerin bulunması sağlanabilir aynı zamanda farklı ilaç hedefleri ve yeni tedavi yöntemleri geliştirilebilir.

5. miRNA oluşum yolağında Alzheimer hastalığı riski ile anlamlı bir ilişki bulunan lokuslar ile bu genleri hedef alan miRNA ekspresyon düzeyleri arasında anlamlı bir bağlantının olup olmadığı ve reporter gen analizleri ile miRNA davranışları transgenik hayvanlar üzerinde yapılacak araştırmalarla ortaya çıkarılabilir.

6. Kompleks hastalıkların altında yatan faktörlerin ortaya çıkarılması için sistem biyolojisinden yararlanılması son yıllarda büyük önem kazanmıştır. Sistem biyolojisinin geliştirdiği yeni analiz yöntemleriyle Alzheimer hastalığı gibi karmaşık hastalıkların

yazılımlar aracılığıyla (in siliko; in silico) modellenmesi yapılarak hücre içindeki farklı biyolojik olayların birbiriyle etkileşerek nasıl Alzheimer hastalığına neden olduğu açıklanmaya çalışılabilir.

7. miRNA ekspresyonlarının düşmesi, hedefledikleri genlerin ekspresyonlarının artması ile sonuçlanmaktadır. Bu genlerden kodlanan proteinlerin yanında proteomik, transkriptomik ve metilom çalışmaları ile miRNA'lar ve Alzheimer hastalığı arasındaki ilişki daha iyi ortaya konulabilir.

8. Alzheimer sebebi miRNA'ların gen ekspresyon profillerinin belirlenerek gen susturulması teknolojisi ile sorunlu genlerin susturulması sağlanabilir. Gelecekte kişilerin tüm genom sekans ve ekspresyon bilgilerinden yararlanarak Alzheimer hastalığı gibi karmaşık genetik hastalıklarda risk teşkil eden lokuslar ile gen dozajları belirlenebilirse kısa sürede tanı konması ve kişiye özel tedavilerin geliştirilmesi mümkün olacaktır.

## 7. KAYNAKLAR

1. **Yokeş MB.** Molecular genetics of Alzheimer Disease. *J. Cell Mol Bio.* **2007**;6(2):73-79.
2. **Bicker S, Schratt G.** microRNAs: tiny regulators of synapse function in development and disease. *J. Cell Mol. Med.* **2008**;12(5A):1466-1476.
3. **Barbato C, Ruberti F, Cogoni C.** Searching for MIND: microRNAs in neurodegenerative disease. *J. Biomed. Biotech.* **2009**;Vol. 2009;1-8.
4. **Kim VN, Nam JW.** Genomics of microRNA. *Trends Genet.* **2006**;22(3):165-173.
5. **Lee Y, Kim M, Han J, Yeom KH, Lee S, Baek SH, Kim VN.** MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *EMBO J.* **2004**;23:4051-4060.
6. Erişim: <http://miRNA.sanger.ac.uk>. Erişim Tarihi: 09.01.2012.
7. **Rogaev EI, Borinskaya SA, Islamgulov DV, Grigorenko AP.** Human microRNA in norm and pathology. *Mol. Bio.* **2008**;42(5):751-764.
8. **Hunter MP, Ismail N, Zhang X, Aguda BD, Lee EJ, Yu L, Xiao T, Schafer J, Ting Lee ML.** Detection of microRNA expression in human peripheral blood microvesicles. *Plos One.* **2008**;3(11):1-11.
9. **He L, Hannon GJ.** MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation. *Nat. Rev. Genet.* **2004**;5:522-531.
10. **Cogswell JP, Ward J, Taylor IA, Waters M.** Identification of miRNA changes in alzheimer's disease brain and CSF yields putative biomarkers and insights into disease pathways. *J. Alz. Dis.* **2008**;14:27-41.
11. **Martino S, Girolamo ID, Orlacchio A, Datti A, Orlacchio A.** MicroRNA implications across neurodevelopment and neuropathology. *J. Biomed. Biotech.* **2009**; Vol, 2009:1-13.
12. **Chuzhanova N, Cooper DN, Ferec C, Chen JM.** Searching for potential microRNA-binding site mutations amongst known disease-associated 3'-UTR variants. *Gen. Med.* **2007**;1:29-33.

13. **Iwai N, Naraba H.** Polymorphism in human pre-miRNAs. *Biochem. Biophys. Res. Com.* **2005**;331:1439-1444.
14. **Hariharan M, Scaria V, Brahmachari SK.** dbSMR: a novel resource of genome-wide SNPs affecting microRNA mediated regulation. *BMC Bioinform.* **2009**;10(108):1-6.
15. **Maziere P, Enright AJ.** Prediction of microRNA targets. *Drug Discovery Today.* **2007**; 12(11):452-458.
16. **Bazzoni F, Rossato M.** Induction and regulatory function of miR-9 in human monocytes and neutrophils exposed to proinflammatory signals. *PNAS.* **2009**;106(13): 5282-5287.
17. **Kocerha J, Kauppinen S, Wahlestedt C.** microRNAs in CNS disorders. *Neurol. Med.* **2009**;11(3):162-72.
18. **Patel N, Hoang D, Miller N, Ansaloni S, Huang Q, Rogers J, Lee JC, Saunders A.J.** MicroRNAs can regulate human APP levels. *Mol. Neurod.* **2008**;3(10):1-6.
19. **Borel C, Antonarakis SE.** Functional genetic variation of human miRNAs and phenotypic consequences. *Mamm Genome.* **2008**;19:503-509.
20. **Weinberg MS, Wood MJA.** Short non-coding RNA biology and neurodegenerative disorders: novel disease targets and therapeutics. *Hum. Mol. Genet.* **2009**;18(1):R27-R39.
21. **American Psychiatric Association.** Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders (DSM-IV) 4<sup>nd</sup> Ed. chapter 2. **2000.**
22. **Szymanski M, Wang R.** Neuroglobin and alzheimer's dementia: Genetic association and gene expression changes. *Neurobio. A.* **2010**;31(11):1835-42.
23. **Şahin H.** Alzheimer hastalığının klinik belirtileri ve seyri. Edt: Emre M, Hanağası HA, Gürvit İH. Alzheimer Hastalığı Özel Sayısı. *Tür. Klin. Nörol-Special Topics.* **2009**;2(1):31-35.
24. **Kulaksızoğlu IB.** Alzheimer'lı hastalarda görülen psikiyatrik ve davranışsal sorunlar. Edt: Emre M, Hanağası HA, Gürvit İH. Alzheimer Hastalığı Özel Sayısı. *Tür. Klin. Nörol-Special Topics.* **2009**;2(1):36-44.



25. **Öktem Ö.** Demans tanısında klinik nöropsikolojik değerlendirme. Edt: Emre M, Hanağası HA, Gürvit İH. Alzheimer Hastalığı Özel Sayısı. *Tür. Klin. Nörol-Special Topics*. **2009**;2(1);5-9.
26. **Leifer BP.** Early diagnosis of alzheimer's disease: Clinical and economic benefits. *JAGS*. **2003**;51(5);S281-S288.
27. **Folstein MF, Folstein SE, McHugh PR.** "Mini-mental state". A practical method for grading the cognitive state of patients for the clinician". *J. Psych. Res.* **1975**;12(3):189-98.
28. **Güngen C, Ertan T, Eker E, Yaşar R, Engin F.** Standardize Mini Mental Test'in Türk Toplumunda Hafif Demans Tanısında Geçerlik ve Güvenilirliği. *Türk Psik. Der.* **2002**;13(4):273-281.
29. **Zilka N, Novak M.** The tangled story of Alois Alzheimer. *Bratisl Lek Listy*. 2006;107 (9-10):343-345
30. **Selekler K.** Alzheimer hastalığının epidemiyolojisi, risk faktörleri ve koruyucu faktörleri. Edt: Emre M, Hanağası HA, Gürvit H. Alzheimer Hastalığı Özel Sayısı. *Tür. Klin. Nörol-Special Topics*. **2009**;2(1);10-13.
31. **Shoji M.** Biomarkers of the Dementia. *Inter. J. Alz. Dis.* **2011**;131:2218
32. **Brouwers N, Slegers K, Broeckhoven CV.** Molecular genetics of alzheimer's disease: An update. *Ann. Med.* **2008**;40:562-583.
33. **Eckart K.** Identification and functional characterization of genetic risk factors in alzheimer's disease. Doctoral Thesis. der Fakultät für Biologie der Ludwig-Maximilians-Universität München. **2009**.
34. **Strittmatter WJ, Saunders AM.** Apolipoprotein E: high-avidity binding to beta-amyloid and increased frequency of type 4 allele in late-onset familial alzheimer disease. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1993**;90(5):1977-81.
35. **Wilbert ML, Yeo GW.** Genome-wide approaches in the study of microRNA biology. *WIREs Syst. Biol. Med.* **2011**;3(5):491-512.
36. **Satoh J.** Molecular network of microRNA targets in Alzheimer's disease brains. *Exp. Neurol.* **2012**;235(2):436-446.

37. **Hebert SS, Strooper BD.** Alterations of the microRNA network cause neurodegenerative disease. *Trends in Neurosci.* **2008**;32(4):199-206.
38. **Tan L, Yu JT, Hu N.** Non-coding RNAs in Alzheimer's Disease. *Mol Neurobiol*, **2013**; 47(1): 382-93.
39. **Hebert SS.** Macro roles for microRNAs in the life and death of neurons. *Springer-Verlag Berlin Heidelberg*, Hardcover, **2010**; Chapter:10,91-96.
40. **Wang Y, Stricker HM, Gou D, Liu L.** MicroRNA: past and present. *Front. Biosc.* **2007**;12(6):2316-2329.
41. **Chen X, Liang H, Zhang J, Zen K, Zhang CY.** Horizontal transfer of microRNAs: Molecular mechanisms and clinical applications. *Protein Cell.* **2012**;3(1):28–37.
42. **Bandiera S, Hatem E, Lyonnet S, Henrion-Caude A.** microRNAs in diseases: From candidate to modifier genes. *Clin Genet.* **2010**;77:306–313.
43. **Kim VN.** MicroRNA Biogenesis: Coordinated Cropping and Dicing. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2005**;6(5):376-385.
44. **Nelson P, Kiriakidou M, Sharma A, Maniatakis E, Mourelatos Z.** The microRNA world: Small is mighty. *Trends Biochem. Sci.* **2003**;28(10):534-540.
45. **Ambros V, Bartel B, Burge CB.** A uniform system for microRNA annotation. *RNA.* **2003**;9:277–279.
46. **Jones SG, Grocock RJ, Dongen S, Bateman A, Enright AJ.** miRBase: MicroRNA sequences, targets and gene nomenclature. *Nucl. Acids. Res.* **2006**;34:D140–D144.
47. **Jones SG, Saini HK.** miRBase: tools for microRNA genomics. *Nucleic Acids Research*, **2008**; 36: D154–D158.
48. **Christian L, Hinske G.** Silencing the host-the role of intronic microRNAs. Doctoral thesis. Ludwig-Maximilians-Universität München, Master of Science In Biomedical Informatics at the Massachusetts Institute of Technology, Germany, February **2009**.
49. **Lagana A, Russo F, Sismeiro C, Giugno R, Pulvirenti A.** Variability in the incidence of miRNAs and genes in fragile sites and the role of repeats and CpG islands in the distribution of genetic material. *Plos One.* **2010**;5(6):e11166.

50. **Miyoshi K, Miyoshi T, Siomi H.** Many ways to generate microRNA-like small RNAs: non-canonical pathways for microRNA production. *Mol Genet Genom.* **2010**;284(2): 95-103.
51. **Lee Y, Kim M, Han J, Yeom KH.** MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *The EMBO J.* **2004**;23(20):4051-4060.
52. **Roslam JS, Koscianska E, Kozlowski P, Krzyzosiak WJ.** The role of the precursor structure in the biogenesis of microRNA. *Cell. Mol. Life Sci.* **2011**;68:2859–287.
53. **Guo L, Liang T.** Cross-Mapping Events in miRNAs reveal potential miRNA-mimics and evolutionary implications. *Plos One.* **2011**;6(5):e20517.
54. **Ying SY.** Current perspectives in microRNAs (miRNA). Springer Science. Hardcover, **2008**; Chapter:13,225-242.
55. **Marjorie PP, Provost P.** Protein interactions and complexes in human microRNA biogenesis and function. *Front. Biosc.* **2008**;13:2537-2547.
56. **Pawlicki JM, Steitz JA.** Nuclear networking fashions pre-messenger RNA and primary microRNA transcripts for function. *Trends Cell Biol.* **2010**; 20(1):52-61.
57. **Shomron N, Levy C.** MicroRNA-biogenesis and pre-mRNA splicing crosstalk. *J. Biomed. Biotech.* **2009**;Vol, 2009:594678.
58. **Singh SK, Bhadra MP, Girschick HJ, Bhadra U.** MicroRNAs—micro in size but macro in function. *FEBS J.* **2008**;275;20:4929-44.
59. **Cullen BR.** Nuclear RNA Export Pathways. *Mol. Cell. Bio.* **2000**;20(12);4181–4187.
60. **Lee I, Ajay SS.** New class of microRNA targets containing simultaneous 5'-UTR and 3'-UTR interaction sites. *Genome Res.* **2009**;19:1175–1183.
61. **Winter J, Jung S, Keller S, Gregory RI, Diederichs S.** Many roads to maturity: MicroRNA biogenesis pathways and their regulation. *Nat. Cell Bio.* **2009**;11(3):228-34.
62. **Rossi JJ.** RNAi and the p-body connection. *Nat. Cell Bio.* **2005**;7(7);643-645.

63. **Gong J, Tong Y.** Genome-wide identification of SNPs in microRNA genes and the SNP effects on microRNA target binding and biogenesis. *Hum. Mutat.* **2012**;33:254-263.
64. **Yu Z, Li Z, Jolicoeur N, Zhang L, Fortin Y, Wang E, Wu M, Shen SH.** Aberrant allele frequencies of the SNPs located in microRNA target sites are potentially associated with human cancers. *Nuc. Acids Res.* **2007**;35(13):4535-4541.
65. **Roshan R, Ghosh T, Scaria V, Pillai B.** MicroRNAs: Novel therapeutic targets in neurodegenerative diseases. *Drug Discovery Today.* **2009**;14(23-24):1123-9.
66. **Sun W, Li YSJ, Huang HD, Shyy JYJ, and Chien S.** microRNA: A master regulator of cellular processes for bioengineering systems. *Annu. Rev. Biomed. Eng.* **2010**;12:1-27.
67. **Salta E, Strooper BD.** Non-coding RNAs with essential roles in neurodegenerative disorders. *Lancet Neurol.* **2012**;11:189–200.
68. **Lee J, Li Z, Sinning RB, John B.** Regulatory circuit of human microRNA biogenesis. *Plos Comput. Biol.* **2007**;3(4):e67.
69. **Sanchez MAV, Liu J, Hannon GJ.** Control of translation and mRNA degradation by miRNAs and siRNAs. *Genes Dev.* **2006**;20:515-524.
70. **Mathonnet G.** MicroRNA inhibition of translation initiation in vitro by targeting the cap-binding complex eIF4F. *Science.* **2007**;317(5845):1764-1767.
71. **Cui Q, Yu Z, Purisima EO, Wang E.** Principles of microRNA regulation of a human cellular signaling network. *Mol. Sys. Biology.* **2006**;2(46);1-7.
72. **Snead NM, Rossi JJ.** Biogenesis and function of endogenous and exogenous siRNAs. *W. Interdiscip. Rev. RNA.* **2010**;1(1):117-31.
73. **Wang Z, Yang B.** MicroRNA expression detection methods. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. **2010**:Chapter 1,3-40.
74. **Hunsberger JG, Austin DR, Chen G, Manji HK.** MicroRNAs in mental health: From biological underpinnings to potential therapies. *Neuromol. Med.* **2009**;11(3):173–182.
75. **Vriese HD.** The Blood-Brain Barrier in Neuroinflammatory Disease. *Pharma. Rev.* **1997**;49(2):143-146.

76. **Gilad S, Meiri E, Yogev Y, Benjamin S.** Serum microRNAs are promising novel biomarkers. *Plos One*. **2008**;3(9):e3148.
77. **Chomczynski P, Sacchi N.** Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem*. **1987**;162(1):156-9.
78. **Miller SA, Dykes DD, Polesky HF.** A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nuc. Acids Res*. **1988**;16(3):1215.
79. Erişim: Ferrolab, <http://ferrolab.dmi.unict.it>. Erişim Tarihi: 21.12.2012.
80. Erişim: miracle, <http://miracle.igib.res.in>. Erişim Tarihi: 21.12.2012.
81. Erişim: microrna, <http://www.microrna.org>. Erişim Tarihi:12.08.2010.
82. **Yang H, Dinney CP, Ye Y, Zhu Y, Grossman HB, Wu X.** Evaluation of genetic variants in microRNA-related genes and risk of bladder cancer. *Cancer Res*. **2008**;68(7):2530–2537.
83. Erişim: National Center for Biotechnology Information, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>. Erişim Tarihi: 01.12.2012
84. Erişim: mirbase, <http://www.mirbase.org/index.shtml>, Erişim Tarihi: 21.12.2012.
85. Erişim:YakimaYellow, <http://secure.eurogentec.com>\_Erişim Tarihi: 24.12.2012.
86. **Zhang X, Wadkins RM.** DNA Hairpins Containing the Cytidine Analog Pyrrolo-dC: Structural, Thermodynamic, and Spectroscopic Studies. *Biophys. J*. **2009**;96:1884–1891.
87. **Liang Y, Wong L, Tan R, Chen C.** Real-time quantification of microRNAs by TaqMan<sup>®</sup> assays. Edt: Ambros VR, Altman S. *MicroRNAs From Basic Science to Disease Biology*. Cambridge University Press. **2008**:269-271.
88. **Wong L, Lee K, Russell I, Chen C.** Endogenous Controls for Real-Time Quantitation of miRNA Using TaqMan<sup>®</sup> MicroRNA Assays. *Applied Biosystems Application Note*, **2007**;11-01.

89. **Schmittgen TD.** Analyzing real-time PCR data by the comparative C<sub>T</sub> method. *Nat. Prot.* **2008**;3(6):1101-1108.
90. **Bettens C, Sleegers K, Broeckhoven CV.** Current status of alzheimer disease molecular genetics: from past, to present, to future. *Hum. Mol. Genet.* **2010**;19(1):R4-R11.
91. **Rocca WA, Hofman A, Brayne C.** The prevalence of vascular dementia in europe: facts and fragments from 1980-1990 studies. EURODEM-Prevalence Research Group. *Ann. Neurol.* **1990**;30(6):817-24.
92. **Morris MC, Evans DA, Bienias JL.** Dietary fats and the risk of incident alzheimer disease. *Arch. Neurol.* **2003**;60:194-200.
93. **Hebert SS, Horre K, Nicolai L, Papadopoulou AS, Mandemakers W, Silahtaroglu AN.** Loss of microRNA cluster miR-29a/b-1 in sporadic alzheimer's disease correlates with increased BACE1/beta-secretase expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2008**;105:6415-20.
94. **Boissonneault V, Plante I, Rivest S, Provost P.** MicroRNA-298 and microRNA-328 regulate expression of mouse beta-amyloid precursor protein-converting enzyme 1. *J. Biol. Chem.* **2009**;284:1971-81.
95. **Lau P, Strooper BD.** Dysregulated microRNAs in neurodegenerative disorders. *Cell Dev. Bio.* **2010**;21:768-773.
96. **Schipper HM, Maes OC, Chertkow HM, Wang E.** MicroRNA expression in alzheimer blood mononuclear cells. *Gene Reg. Sys. Bio.* **2007**;1:263-274.
97. **Chen X, Ba Y.** Characterization of microRNAs in serum: A novel class of biomarkers for diagnosis of cancer and other diseases. *Cell Res.* **2008**;18(10):997-1006.
98. **Harten AV, Mulders J, Çevik Ç, Kester M.** MicroRNA analysis in spinal fluid of Alzheimer patients: A methodological feasibility study. Edt: Peter B. Gahan. Circulating nucleic acids in plasma and serum. *Springer Sci. Business Media B.V.* **2011**. Chapter:37;275-282.
99. **Maes OC, Chertkow HM, Wang E, Schipper HM.** MicroRNA: Implications for alzheimer disease and other human CNS disorders. *Current Gen.* **2009**;10:154-168.

100. **Lukiw WJ.** Micro-RNA speciation in fetal, adult and alzheimer's disease hippocampus. *Mol. Neurosci.* **2007**;18(3):297-300.
101. **Wang WX, Rajeev BW.** The Expression of microRNA miR-107 decreases early in alzheimer's disease and may accelerate disease progression through regulation of  $\beta$ -site amyloid precursor protein- cleaving enzyme 1. *The J. Neurosci.* **2008**;28(5):1213–1223.
102. **Cogswell JP, Ward J, Taylor IA.** Identification of miRNA changes in alzheimer's disease brain and CSF yields putative biomarkers and insights into disease pathways. *J. Alz. Dis.* **2008**;14:S1–S11.
103. **Bettens K, Brouwers N.** APP and BACE1 miRNA genetic variability has no major role in Risk for alzheimer disease. *Hum. Mut.* **2009**;30(8):1207–1213.
104. **Bargaje R, Gupta S.** Identification of novel targets for miR-29a using miRNA proteomics. *Plos One.* **2012**;7(8):e43243.
105. **Wang WX, Huang Q.** Patterns of microRNA expression in normal and early Alzheimer's disease human temporal cortex: White matter versus gray matter. *Acta Neuropath.* **2011**;121(2):193–205.
106. **Hebert SS, Horr  K, Nicola L, Bergmans B, Papadopoulou AS, Delacourte A, De Strooper B.** MicroRNA regulation of alzheimer's amyloid precursor protein expression. *Neurobiol Dis.* **2009**;33(3):422-8.
107. **Nelson PT, Wang WX.** MiR-107 is reduced in alzheimer's disease brain neocortex: Validation study. *J Alz. Dis.* **2010**;21(1):75–79.
108. **Hyslop PG, Haass C.** Regulatory RNA goes awry in alzheimer's disease. *Nat. Med.* **2008**;14(7):711-712.
109. **Duan R, Pak CH, Jin P.** Single nucleotide polymorphism associated with mature miR-125a alters the processing of pri-miRNA. *Hum. Mol. Genet.* **2007**;16(9):1124-1131.

110. **Koo EH, Kopan R.** Potential role of presenilin-regulated signaling pathways in sporadic neurodegeneration. *Nat. Med.* **2004**;10:S26–S33.
111. **Haas C, Hanson E, Bar W, Banemann R.** mRNA profiling for the identification of blood—results of a collaborative EDNAP exercise. *Forensic Sci. Int. Genet.* **2011**; 5(1):21-6.
112. **Maes OC.** Methodology for Discovery of alzheimer’s disease. Blood-based biomarkers. *J Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.* **2009**;64A(6):636–645.
113. **Saykin AJ.** Alzheimer’s disease neuroimaging initiative biomarkers as quantitative phenotypes: Genetics core aims, progress, and plans. *Alzh. Dement.* **2010**;6:265–273.
114. **Patel S, Shah RJ, Coleman P, Sabbagh M.** Potential peripheral biomarkers for the diagnosis of alzheimer’s disease. *Int. J. Alz. Dis.* **2011**;1-9.
115. Alzheimer’s Association, 2012 Alzheimer’s Disease Facts and Figures. *Alz. Dementia.* **2012**;8(2):1-47.
116. Erişim: Türkiye İstatistik Kurumu, <http://www.tuik.gov.tr>. Erişim Tarihi: 21.12.2012.
117. **Mauskopf J, Mucha L.** A Review of the methods used to estimate the cost of alzheimer’s disease in the united states. *A. J. Alz. Dis. Dementias.* **2011**; 26(4):298-309.
118. **Sun G, Yan J, Noltner K.** SNPs in human miRNA genes affect biogenesis and function. *RNA*, **2009**;15(9):640-651.
119. **Guay C.** Diabetes mellitus, a microRNA-related disease? *Trans. Res.* **2011**;157(4): 253-264.
120. **Vickers KC, Remaley AT.** MicroRNAs in atherosclerosis and lipoprotein metabolism. *Curr. Opin. Endocrinol. Diabetes Obes.* **2010**;17(2):150–155.
121. **Chatterjee S, Pal JK.** Role of 5’- and 3’-untranslated regions of mRNAs in human diseases. *Biol. Cell.* **2009**;101:251–262.
122. **Stark KL.** Altered brain microRNA biogenesis contributes to phenotypic deficits in a 22q11-deletion mouse model. *Nat Genet.* **2008**;40(6):751-60.



123. **Need AC.** A genome-wide investigation of SNPs and CNVs in schizophrenia. *Plos Genet.* **2009**;5(2):e1000373.
124. **Han J, Pedersen JS.** Posttranscriptional crossregulation between DROSHA and DGCR8. *Cell.* **2009**;136(1):75–84.
125. **Olde LNF, Kos A, Martens GJM.** MicroRNA networks direct neuronal development and plasticity. *Cell. Mol. Life Sci.* **2012**;69(1):89–102.
126. **Gürvit H, Emre M, Tinaz S.** The prevalence of dementia in an urban Turkish population. *Am. J. Alz. Dis. Other Dementias.* **2008**;23(1):67-76.
127. **Manly JJ, Mayeux R.** Ethnic differences in dementia and alzheimer's disease. In: Anderson NB, Bulatao RA, Cohen B. Critical perspectives on racial and ethnic differences in health in late life, Washington, D.C: The National Academies in Press, **2004**;95-97.

## ÖZGEÇMİŞ

5 Mart 1975 yılında Ankara'da doğdu. İlköğretimi, Demirlibahçe İlköğretim Okulu'nda, ortaöğrenimini Demirlibahçe ortaokulunda ve lise öğrenimini Başkent Lisesi'nde tamamladı.

1998 yılında Mersin Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü'nden mezun oldu. 1999 yılında Gaziantep Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı'nda yüksek lisansa başladı. 2001 yılında Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'na araştırma görevlisi olarak atandı. 2003 yılında Gaziantep Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'nda yüksek lisans eğitimini tamamladı. 2007 yılında Mersin Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı'nda doktora eğitimine başladı. Halen Mersin Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı'nda doktora eğitimine devam etmektedir.