



T.C.  
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**ALZHEIMER HASTALIĞINDA *LONG NON-CODING*  
*RNA (lncRNA)* PROFİLLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

**Serap KURT**

**Temmuz 2018  
DENİZLİ**

T.C.  
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ALZHEIMER HASTALIĞINDA *LONG NON-CODING RNA*  
(*lncRNA*) PROFİLLERİNİN ARAŞTIRILMASI

TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI  
YÜKSEK LİSANS TEZİ

Serap KURT

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Ayşe Gaye TOMATIR

Denizli, 2018

## YÜKSEK LİSANS TEZİ ONAY FORMU

S. erap. Kurt... tarafından Doç. Dr. A. Gaye TOMATİE yönetiminde hazırlanan "Alzheimer Hastalığına İlaçlarla... Pratik Uygulanabilirliği" başlıklı tez tarafımızdan okunmuş, kapsamı ve niteliği açısından bir Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı:

Doç. Dr. A. Gaye TOMATİE  
Pamukkale Üniversitesi

Danışman:

Doç. Dr. A. Gaye TOMATİE  
Pamukkale Üniversitesi

Öye:

Doç. Dr. ...  
Pamukkale Üniversitesi

Öye:

Prof. Dr. ...  
İstanbul Üniversitesi

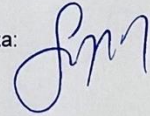
Pamukkale Üniversitesi Sağlık Bilimler Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 07.08.2018... tarih ve 2018/19.../sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Prof. Dr. Hakan AKÇA  
Müdür

Bu tezin tasarımı, yürütülmesi, araştırmalarının yapılması ve bulgularının analizinde bilimsel etiğe ve akademik kurallara özenle riayet edildiğini; bu çalışmanın doğrudan birincil ürünü olmayan bulguların, verilerin ve materyallerin bilimsel etiğe uygun olarak kaynak gösterildiğinin ve alıntı yapılan çalışmalara atfedildiğini beyan ederim.

Öđrenci Adı Soyadı : Serap KURT

İmza:



## ÖZET

### Alzheimer Hastalığında Long Non-Coding RNA (lncRNA) Profillerinin Araştırılması

Serap KURT

Yüksek Lisans Tezi, Tıbbi Biyoloji AD

Tez Yöneticisi: Doç. Dr. Ayşe Gaye TOMATIR

Temmuz 2018, 76 Sayfa

Alzheimer Hastalığı (AH), ileri yaşta en sık görülen, hücre dışında amiloid beta plak birikimi, hücre içinde nörofibriler yumaklar ve sinir sisteminde nöron kayıplarıyla karakterize nörodejeneratif bir hastalıktır. Uzun kodlamayan RNA' ların (*long non-coding RNA= lncRNAs*) gen ekspresyonunu transkripsiyonel, post-transkripsiyonel ve epigenetik düzeyde regüle edebildikleri bilinmektedir. Son araştırmalarda birçok lncRNA'nın AH' de sinir sisteminde amiloid beta ( $A\beta$ ) üretimini ve sinaptik kaybı regüle ettiği gösterilmiştir. Araştırmamızda AH' de ekspresyonları değişen ve hastalığın patogeneze katkısı olabileceğini düşündüğümüz lncRNA' ları belirlemeyi amaçladık. Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Nöroloji Anabilim Dalı'na başvuran hastalardan (23 kişi Alzheimer hastası; 33 kişi kontrol grubu) gönüllü onam formu ve etik kurul izni ile periferik kan örnekleri alındı. AH'de lncRNA' ların değişen ekspresyonlarını incelemek için, muhtemel AH teşhisi alan bireylerin (n=4) ve sağlıklı kontrol gruplarının (n=4) periferik kan-mononükleer hücrelerinden (*peripheral blood mononuclear cells=PBMC*) elde edilen total RNA'lar mikrodizin analizi ile değerlendirildi. Analiz sonucu kat değişimi en fazla olan ( $fc < 1.5$  /  $fc > 1.5$ ) lncRNA'lar belirlenerek, hasta ve kontrol gruplarında kantitatif eş zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (*qRT-PCR*) ile bazı lncRNA'ların ekspresyon değişimleri araştırıldı. Çalışmamızda Alzheimer hastalığı ile ilişkili olabilecek lncRNA'ların profilleri belirlendi. Mikrodizin analizi sonucunda toplamda 31 *downregüle* ve 41 *upregüle* lncRNA saptanmış olup bu lncRNA'lardan, lnc-AL445989.1-2, LINC01420, TTC39C-AS1, lnc-CSTB1 ve LOC728763' ün ekspresyonları *qRT-PCR* ile değerlendirildi ve doğrulandı. AH PBMC lncRNA profilleri KEGG analizi ile değerlendirildiğinde; lncRNA'ların bazı metabolik yollarla anlamlı ilişkisi belirlendi. Bunlar TNF sinyal yolağı, PI3K/AKT, Ras, MAPK yolları; glutamerjik, dopaminerjik, kolinerjik sinapslar; GABA ve nörotrofin sinyal yollarıdır. Araştırmamız, mRNA'lara göre daha doku-spesifik olan lncRNA'ların, AH PBMC' lerinde lncRNA profillerinin belirlenmesi açısından ilk olma özelliği taşımaktadır. Bu bulguların AH patogenezinde bilgi verici rolü olduğunu ve ileriki çalışmalarla desteklenebileceğini düşünmekteyiz.

**Anahtar Kelimeler:** Alzheimer, Long non-coding RNA, qRT-PCR, mikrodizin

**Bu çalışma, PAÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir (Proje No: 2016SBE010).**

**ABSTRACT****Investigation Of *Long Non-coding RNA (lncRNA)* Profiles in Alzheimer Disease**

KURT, Serap

MSc.Thesis in Medical Biology

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Ayse Gaye TOMATIR (PhD)

July 2018, 76 Pages

Alzheimer's Disease (AD) is a neurodegenerative disease characterized by accumulation of extracellular amyloid beta plaques, neurofibrillary tangles within the cell, and neuronal loss in the nervous system, the most common in elderly. Long non-coding RNAs (lncRNAs) are known to regulate gene expression at transcriptional, post-transcriptional, and epigenetic levels. Recent studies have shown that many lncRNAs regulate amyloid beta (A $\beta$ ) production and synaptic loss in the nervous system in AD. In our study, we aimed to determine the expression of lncRNAs in AD which may alter expression and contribute to the pathogenesis of the disease. Peripheral blood samples were obtained from patients admitted to the Neurology Department of Pamukkale University Medical Faculty (23 patients with Alzheimer's disease, 33 control group) with voluntary consent form and ethics committee. Total RNA obtained from peripheral blood mononuclear cells (PBMC) of subjects with probable AD (n = 4) and healthy control groups (n = 4) was examined to determine the altered expression of lncRNAs in AD were evaluated by microarray analysis. LncRNAs with the highest end-to-end fold change (fc <1.5 / fc > 1.5) were identified and quantified by quantitative real time polymerase chain reaction (qRT-PCR) in patient and control groups were confirmed. In this study, the profiles of lncRNAs that may be associated with Alzheimer's disease were determined. A total of 31 downregulated and 41 upregulated lncRNAs were detected as a result of microarray analysis. From these lncRNAs, expression of lnc-AL445989.1-2, LINC01420, TTC39C-AS1, lnc-CSTB1 and LOC728763 were confirmed by qRT-PCR. When assessed by KEGG analysis of AD PBMC lncRNA profiles; lncRNAs were significantly associated with some metabolic pathways. These include TNF signaling pathway, PI3K/AKT, Ras, MAPK pathways; glutamergic, dopaminergic, cholinergic synapses; GABA and neurotrophin signaling pathways. Our study is the first to identify lncRNA profiling in AD PBMCs of more tissue-specific lncRNAs compared to mRNAs. We think that these findings are informative in the pathogenesis of AD and can be supported by further studies.

**Keywords:** Alzheimer, long non-coding RNA, qRT-PCR, microarray

**This study was supported by Pamukkale University Scientific Research Projects Coordination Unit through project number 2016SBE010.**

## TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim ve tez sürecim boyunca bilimsel çalışmanın gereklerini üstün hoşgörü anlayışıyla bana öğreten, her koşulda desteğini hissettiğim ve bende bir danışmandan fazlası olarak yer edinen değerli tez danışman hocam Doç. Dr. Ayşe Gaye TOMATIR' a,

Tez çalışmamda kullandığım biyolojik materyallerin temin edilmesinde yardımlarını esirgemeyen Nöroloji anabilim dalı öğretim üyesi Prof. Dr. Çağatay Hilmi ÖNCEL' e ve asistan arkadaşım Araş. Gör. Dr. Ahmet Doğucem MARANGOZ'a,

Yüksek lisans öğrenimim süresince bilgilerinden yararlandığım, üzerimde emeği bulunan tüm Tıbbi Biyoloji Anabilim dalı hocalarıma,

Birlikte çalışmaktan büyük mutluluk duyduğum, bütün tez sürecimdeki katkılarından, güleryüzlülüğü ve sabrından dolayı Uzm. Bio. Pervin Elvan TOKGÜN' e; bilgi ve becerisiyle zor anlarımda sorunları çözmemde yardımcı olan, her konuda bana yol gösteren değerli arkadaşım Ege Rıza KARAGÜR'e,

Ve tüm hayatım boyunca her zaman yanımda oldukları için, sahip olduğum herşey için canım aileme teşekkür ederim.

## İÇİNDEKİLER

<b>ÖZET</b> .....	<b>v</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>vi</b>
<b>TEŞEKKÜR</b> .....	<b>vii</b>
<b>İÇİNDEKİLER</b> .....	<b>viii</b>
<b>ŞEKİLLER DİZİNİ</b> .....	<b>xi</b>
<b>TABLolar DİZİNİ</b> .....	<b>xii</b>
<b>SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ</b> .....	<b>xiii</b>
<b>1. GİRİŞ</b> .....	<b>1</b>
1.1 AMAÇ.....	3
<b>2. KURAMSAL BİLGİ VE LİTERATÜR TARAMASI</b> .....	<b>4</b>
2.1 Alzheimer Hastalığı .....	4
2.1.1 Epidemiyolojisi .....	4
2.1.2 AH Sınıflandırılması .....	5
2.1.3 Hastalığın Etiyolojisi ve Risk Faktörleri.....	6
2.1.3.1 İleri Yaş .....	6
2.1.3.2 Aile Öyküsü .....	6
2.1.3.3 Apolipoprotein E $\epsilon$ 4 Alleli Varlığı .....	6
2.1.3.4 Genetik.....	7
2.1.3.4.1 APP .....	7
2.1.3.4.2 PSEN1 .....	7
2.1.3.4.3 PSEN2.....	8
2.1.4 Klinik Tanısı .....	10



2.1.5 Nöropatolojisi .....	14
2.1.5.1 Amiloid Beta Plaklar .....	14
2.1.5.2 Tau Proteini ve Nörofibriler Yumaklar .....	15
2.1.5.3 Nöronal ve Sinaptik Kayıplar .....	16
2.1.5.4 Gliozis ve İnflamasyon.....	17
2.2 AH'de Periferik Kan-Mononükleer Hücreler (PBMC'ler) .....	18
2.3 Kodlamayan RNA'lar (lncRNA' lar).....	19
2.4 lncRNA'lar ve Biyogenezi .....	21
2.5 lncRNA'ların Hastalıklarla İlişkisi .....	26
2.6 AH'de lncRNA'lar .....	27
2.6.1 BACE1-AS .....	27
2.6.2 51A.....	28
2.6.3 BC200 .....	29
2.6.4 NDM29.....	29
2.6.5 EBF3-AS .....	30
2.6.6 17A.....	30
2.7 Hipotez ve Bilimsel Katkı .....	31
<b>3. GEREÇ VE YÖNTEMLER .....</b>	<b>32</b>
3.1 Gereçler .....	32
3.1.1 Cihazlar .....	32
3.1.2 Kimyasallar .....	33
3.1.3 Kitler .....	33
3.1.4 Kullanılan primer dizileri .....	34
3.2 Yöntemler.....	35
3.2.1 Periferik Kan Örneklerinden Mononükleer Hücre (PBMC) İzolasyonu .....	35
3.2.2 PBMC'lerden Total RNA İzolasyonu .....	36
3.2.3 RNA Miktar ve Safılık Tayini .....	36
3.2.4 Mikrodizin Analizi .....	37
3.2.5 cDNA sentezi .....	38

3.2.5.1 Total RNA'nın cDNA'ya çevrimi .....	38
3.2.6 LncRNA'ların Kantitatif Eş Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu ile Analizi	39
3.2.7. IncRNA hedeflerinin Gen Ontoloji (GO) ve Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) yolak analizleri .....	40
3.2.8 İstatistiksel Analiz .....	40
<b>4. BULGULAR .....</b>	<b>41</b>
4.1 PBMC'lerden izole edilen Total RNA Örneklerinin Kalitelerinin Değerlendirmesi	41
4.2 Mikrodizin Analizi Verilerinin Kalite Kontrolü .....	42
4.3 Mikrodizin Analizi.....	46
4.3 Ekspresyon Değişimi Saptanan IncRNA'ların qRT-PCR Yöntemi ile Validasyonu .....	50
4.4 Gen Ontoloji ve Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) Yolak Analizleri .....	53
<b>5.TARTIŞMA .....</b>	<b>57</b>
<b>6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....</b>	<b>63</b>
<b>8. ÖZGEÇMİŞ .....</b>	<b>75</b>
<b>9. EKLER .....</b>	<b>76</b>
Ek 1 Etik Kurul Onayı.....	77

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1 Erken ve Geç Başlangıçlı AH Sınıflandırması .....	5
Şekil 2 APP' den Amiloidojenik ve Amiloidojenik Olmayan Yollar ile Amiloid beta Plakların Oluşumu (Heppner vd 2015).....	15
Şekil 3 Hiperfosforile tau Proteinlerinin Mikrotübüllerdeki Etkisi (Brunden vd 2009). ...	16
Şekil 4 Oluşumları Bakımından PBMC' ler (Ramsey ve Gonda 2008).....	18
Şekil 5 RNA'ların sınıflandırılması.....	20
Şekil 6 Lokalizasyonlarına göre lncRNA' lar (Devaux vd 2015).....	22
Şekil 7 lncRNA Yolağı (Ayers 2013).....	23
Şekil 8 lncRNA'ların Nukleus ve Sitoplazmada Etki Mekanizmaları (Bär ve Thum 2016) .....	24
Şekil 9 lncRNA BACE1-AS'nin Etki Mekanizması .....	28
Şekil 10 Bazı lncRNA'ların AH ile ilişkisi (Luo ve Chen 2016). .....	30
Şekil 11 Ficoll-paque Plus Yardımı ile PBMC İzolasyonunda Fazların Oluşumu .....	35
Şekil 12 Mikrodizin Deney Yöntemi.....	38
Şekil 13 Agilent 2100 Biyoanalizör <i>RIN</i> Değerlendirme Sonuçları a) Kontrol Grubu Örneklerinden İzole Edilen RNA'ların <i>RIN</i> Analizi b) Hasta Grubu Örneklerinden İzole Edilen RNA'ların <i>RIN</i> Analizi .....	41
Şekil 14 Hasta ve Kontrol Grubu Örneklerinde Bağlanan Prob Sayıları .....	42
Şekil 15 Veri Kalitesinin Kontrolü a) <i>Density Plot</i> Görüntüsü b) <i>Scatter plot</i> ve <i>Level Plot</i> Analizi.....	43
Şekil 16 Hasta Grubu Örneklerinde 1,5 ve 2 Kat Ekspresyon Değişimi Saptanan Prob Sayıları .....	44
Şekil 17a) Hasta/Kontrol Grupları Arasındaki Ekspresyon Değişiminin <i>Scatter Plot</i> ile Gösterilmesi b) Hasta/Kontrol Gruplarının Kat Değişimlerinin <i>Volcano Plot</i> ile Gösterilmesi.....	44
Şekil 18 PBMClerde Farklı Olarak Eksprese Edilen lncRNA'ların Hiyerarşik Kümeleme ( <i>heat map</i> ) Analizi ile Gösterilmesi.....	45
Şekil 19 qRT-PCR ile belirlenen lnc-AL445989.1-2 ekspresyonu.....	50
Şekil 20 qRT-PCR ile belirlenen LINC01420 ekspresyonu.....	51
Şekil 21 qRT-PCR ile belirlenen TTC39C-AS1 ekspresyonu .....	51
Şekil 22 qRT-PCR ile belirlenen lnc-CSTB1 ekspresyonu.....	52
Şekil 23 qRT-PCR ile belirlenen LOC728763 ekspresyonu.....	52
Şekil 24 Gen Ontoloji Analizi Sonucu En Çok Anlamlılık Gösteren 10 Süreç ( $p < 0.05$ )	55
Şekil 25 KEGG Yolak Analizi Sonucunda Anlamlılık Gösteren Başlıca Yolaklar .....	56

## TABLOLAR DİZİNİ

Tablo 1. AH ile Muhtemel İlişkili Diğer Genler .....	9
Tablo 2. AH'de Risk Faktörleri ve Koruyucu Faktörler .....	10
Tablo 3. NINCDS/ARDRA Tanı Kriterleri .....	11
Tablo 4. DSM-IV Tanı Kriterleri (Cankurtaran vd 2013).....	13
Tablo 5. Bazı Hastalıklarla ilişkili Tanımlanmış lncRNA'lar .....	27
Tablo 6. Kullanılan cihazlar .....	32
Tablo 7. Kullanılan Kimyasallar .....	33
Tablo 8. Kullanılan Kitler .....	33
Tablo 9. Kullanılan lncRNA Primer Dizileri .....	34
Tablo 10. cDNA çevrimi reaksiyon koşulları 1.basamak.....	39
Tablo 11. cDNA çevrimi reaksiyon koşulları 2.basamak.....	39
Tablo 12. Kantitatif Eş Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu Koşulları.....	40
Tablo 13. Mikrodizin Analiz Sonucu Kontrollere Göre Hasta Gruplarında <i>downregüle</i> Bulunan lncRNA'lar.....	46
Tablo 14. Mikrodizin Analizi Sonucu Kontrollere Göre Hasta Gruplarında <i>upregüle</i> Bulunan lncRNA'lar.....	48

## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

a $\beta$	Amiloid Beta
AH	Alzheimer Hastalığı
ApoE	Apolipoprotein E
APP	Amiloid Prekürsör protein
ATP	Adenozin Trifosfat
BACE1	<i>Beta amiloid cleavage enzyme 1</i>
BC200	<i>Brain Cytoplasmic 200 RNA</i>
BT	Bilgisayarlı Tomografi
cDNA	Komplementer DNA
CNS	Merkezi sinir sistemi
CSF	Serebrospinal sıvı
DSM-IV	<i>Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders- IV</i>
EBF3-AS	<i>Early B-cell Factor-Antisense Transcript</i>
EOAD ( <i>Disease</i> )	Erken başlangıçlı Alzheimer hastalığı ( <i>Early Onset Alzheimer</i> )
GO	Gen Ontoloji
GPR51	<i>G-protein-coupled receptor 51</i>
HOTAIR	<i>Homeobox Antisense Intergenic RNA</i>
KEGG	<i>Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes</i>
lincRNA	uzun intergenik RNA ( <i>long intergenic RNA</i> )
lncRNA	uzun kodlamayan RNA ( <i>long non coding RNA</i> )
LOAD ( <i>Disease</i> )	Geç başlangıçlı Alzheimer hastalığı ( <i>Late Onset Alzheimer</i> )
MAPT	Microtubule-Association Protein tau
miRNA	mikro RNA
MMSE	Mini Mental Durum Testi
MR	Manyetik Rezonans
mRNA	Mesajcı RNA
ncRNA	Kodlamayan RNA
NDM29	<i>Neuroblastoma Differentiation Marker 29</i>
NINCDS/ARDRA	<i>National Institutes of Neurological and Communicative Disorders and Stroke/Alzheimer's Disease and Related Disorders Association</i>
NK	Doğal Öldürücü ( <i>Natural Killer</i> )
NFY	Nörofibriler Yumaklar
ORF	Açık okuma çerçevesi ( <i>open reading frame</i> )
PBMC	Periferik kandaki mononükleer hücreler
PCGEM1	<i>Prostat Specific transcript 1</i>
PINC	<i>Pregnancy Induced non-coding RNA</i>
piRNA	<i>Piwi-interacting RNA</i>
PSEN1	Presenilin 1
PSEN2	Presenilin 2
PZR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RNA	Ribonükleik asit
rRNA	Ribozomal RNA
scaRNA	<i>Small Cajal body-specific RNA</i>

siRNA	<i>Small interfering RNA</i>
snRNA	Küçük nükleer RNA
<i>SORL1</i>	Sortilin-İlişkili Reseptör 1
SPSS	Statistical Package for the Social Sciences
TNF	Tümör Nekrozis Faktör
TRAIL	<i>TNF Related Apoptosis-Inducing Ligand</i>
XIST	<i>X-inactivation specific transcript</i>



## 1. GİRİŞ

Alzheimer hastalığı (AH), en sık rastlanan nörodejeneratif hastalıktır ve tüm demans vakalarının %60-80'ini oluşturur (Ryan vd 2018). Histopatolojik olarak AH; amiloid beta (A $\beta$ ) peptidlerinden oluşan plaklar, hiperfosforile tau protein formlarının meydana getirdiği nörofibriler yumaklar ve ayrıca beynin spesifik bölgelerinde nöron kayıpları ile karakterizedir. Klinikte AH'nın kesin tanısı ancak bu patolojik değişimlerin postmortem dönemde beyinde gözlenmesi sonucu konulabilmektedir (Lashley vd 2018, Yang vd 2018). "Muhtemel" AH tanısı için ise günümüzde %81 sensitivite ve %70 spesifiteye sahip olan *Neurological and Communicative Disorders and Stroke and the Alzheimer's Disease and Related Disorders Association (NINCDS/ADRDA)* kriterleri kullanılmaktadır ve sadece muayene ile %85'e varan oranda doğru teşhis konulabilmektedir (McKhann vd 2011). Bu sebeple hastalığın özellikle erken dönemde tanımlanmasına olanak verebilecek biyobelirteçlere ihtiyaç vardır. AH teşhisinde rol alabilecek biyobelirteç arayışında kandaki serum, plazma ve mononükleer hücrelerin AH'daki inflamatuvar patogenezi yansıttığının keşfedilmesinden sonra çalışmalar periferik kan üzerinde yoğunlaşmıştır. Yapılan son çalışmalar, periferik kanda bulunan mononükleer hücrelerin (PBMC) serum ve plazma temelli biyobelirteçlere kıyasla AH'deki inflamatuvar ve apoptotik mekanizmaları daha özgün bir şekilde yansıttığını göstermiştir (Arosio vd 2014).

Yeni RNA'ların keşfi ve işlevlerinin tanımlanmaya başlamasıyla, RNA'ların hücrelerde önemli süreçlerde rol oynadıkları belirlenmiştir. Özellikle insan genomunun %98.8'ini kapsayan kodlamayan RNA (*non-coding RNA =ncRNA*)'ların hücresel savunmada, gelişimsel süreçlerde, farklılaşmada, DNA replikasyonunda, transkripsiyonda ve post-transkripsiyonel düzeyde gen ekspresyonunun susturumunda görev aldıkları gösterilmiştir (Tan vd 2013). ncRNA'larda meydana gelen bozukluklar birçok hastalığın patogenezinde rol oynamaktadır. Bu hastalıklardan bazıları kanserler, nörodejeneratif hastalıklar, mitokondriyal hastalıklar, immün yetmezlik hastalıkları ve kardiyovasküler hastalıklardır (Akkaya vd 2013; Perez vd 2014; Vencken vd 2015; Tao

vd 2015; Gomes vd 2018). Hastalık gelişimine katkıda bulunduğu düşünülen ncRNA'lar, yeni tedavi yaklaşımlarında hem hedef hem de araç olarak görülmektedirler. İnsan genomundaki tüm ncRNA'ların işlevlerinin aydınlatılmasıyla yeni tedavi yaklaşımlarının geliştirilebileceği gibi, hastalıkların erken tanısında belirteç olarak da kullanılabilirliği düşünülmektedir (Akkaya vd 2013).

Kodlanmayan RNA'lar boyutlarına göre iki sınıfta incelenir. Uzunluğu 18-25 nükleotid arasında olup birçok genin ekspresyonunu post transkripsiyonel seviyede kontrol edebilen, aralarında önemli bir sınıf olan mikro RNA (miRNA)'ların da bulunduğu non-coding RNA'lar kısa kodlamayan RNA; 200 nükleotidden fazla büyüklüğe sahip RNA'lar uzun kodlamayan RNA (*long non-coding RNA=IncRNA*) olarak adlandırılmaktadır (Güzelgül ve Aksoy 2009; Majidinia vd 2016).

Yapılan son çalışmalar birçok miRNA'yı AH'nin patogenezinde etkili olan biyobelirteçler olarak tanımlamaktadır. Örneğin Liu vd (2016), miR-106b'nin fyn genini hedef alarak Alzheimer hastalığının patogenezinde etkili olan tau protein fosforilasyonunu inhibe ettiğini saptamış, bir başka çalışmada ise miR-124 nöronlarda *downregüle* olarak tanımlanarak AH'de kilit rol oynayan BACE1 genini hedef aldığı gösterilmiştir (Reddy vd 2017). Başka bir çalışma da miR-135b 'nin yine AH patogenezinde öne çıkan amiloid prekürsör protein (APP) kesim enzimini hedef alarak nöroprotektif etki yarattığını ortaya koymuştur (Zhang vd 2016).

miRNA'larla yapılan çalışmalarda nörodejeneratif hastalıklara ilişkin birçok biyobelirteç tanımlanmış olmasına rağmen IncRNA'larla yapılan araştırmalar sınırlıdır. IncRNA'ların beyindeki genomik bölgelerde yoğun ekspresyon gösterdiğinin bulunması bu hastalıklarla doğrudan veya dolaylı olarak ilişkilendirilebileceklerini göstermektedir. Majör depresyon hastalığı, multiple sklerosis, amilotrofik sklerosis gibi birçok hastalıkta ve çeşitli kanserlerde birkaç IncRNA biyobelirteç olarak tanımlanmış olup hastalık tanısında kullanılabilirliği öne sürülmektedir (Santaro vd 2016; Huang vd 2016).

IncRNA'larla yapılan son çalışmalar bu RNA'ların özellikle santral sinir sisteminde (CNS) gen ekspresyonu üzerinde büyük etkileri olduğunu göstermektedir. CNS' de eksprese olan bazı IncRNA'lar kromatin yeniden düzenleme gibi süreçlerle nöronal hücre farklılaşması üzerinde etkili olmaktadır. Daha da önemlisi, bu IncRNA'lar nörodejeneratif hastalıklarla da ilişkili bulunmuş olup AH'de yüksek ekspresyon gösteren birkaç IncRNA tanımlanmıştır. Örneğin BACE1-AS olarak bilinen IncRNA'nın BACE1 mRNA'sının stabilizasyonuna etki ederek AH'de *up-regüle* olduğu ve hastalığa özgü amiloid beta 42 ( $\text{A}\beta\text{-42}$ ) protein oluşumuna katkıda bulunduğu gösterilmiştir (Akkaya ve Dinçer 2013). Literatür taramasında bazı araştırmalarda AH ile ilişkili az sayıda da olsa



lncRNA'ların tanımlandığı görülmüştür, ancak lncRNA'ların AH'de rolleri ile ilgili PBMC'lerde yapılan çalışmaya rastlanmadı.

## 1.1 AMAÇ

Bu çalışmada Alzheimer hastalığında PBMC'lerde farklı ekspresyona sahip lncRNA'ları belirlemeyi amaçladık.



## 2. KURAMSAL BİLGİ VE LİTERATÜR TARAMASI

### 2.1 Alzheimer Hastalığı

Alzheimer Hastalığı (AH), kognitif becerilerin ve hafızanın geri dönüşümsüz kaybı ile sonuçlanan progresif bir nörodejeneratif hastalıktır. İleri yaşta görülen demansın en sık nedenidir (Luo vd 2016). Hastalığın tanımı ilk kez 1906 yılında Alman psikiyatr ve nöropatolog Dr. Alois Alzheimer tarafından Güney-Batı Alman Akıl Hastalıkları Uzmanları Kongresi'nde "serebral korteksin tuhaf bir hastalığı" olarak yapılmış, ertesini yıl ise Genel Psikiyatri ve Adli Tıp Dergisi (*Allgemeine Zeitschrift für Psychiatrie und Psychisch-Gerichtliche Medizin*)'nde yer almıştır. Hastalığın karakteristik bulguları olan "senil plaklar ve nörofibriler yumaklar" ilk kez burada tanımlanmıştır (Selekler 2010).

AH, nöronlarda ilerleyici harabiyete neden olarak kognitif fonksiyonlarda gerilemeye neden olur. Hastalık süresince kişide mental ve bedensel davranış bozukluğu yaratır, günlük aktivitelerin sürdürülebilmesini zorlaştırır ve sosyal ilişkilerde bozulmaya yol açar (Jembrek vd 2018). Hafıza kaybı kognitif bozukluğun ilk ve en belirgin işaretidir, bunu afazi (edinilmiş dil bozukluğu), agnozi (tanımama), apraksi (konuşma bozukluğu) ve davranış bozuklukları takip eder. Günümüzde hastalığı tam olarak tersine çevirebilecek bir tedavi bulunmamaktadır.

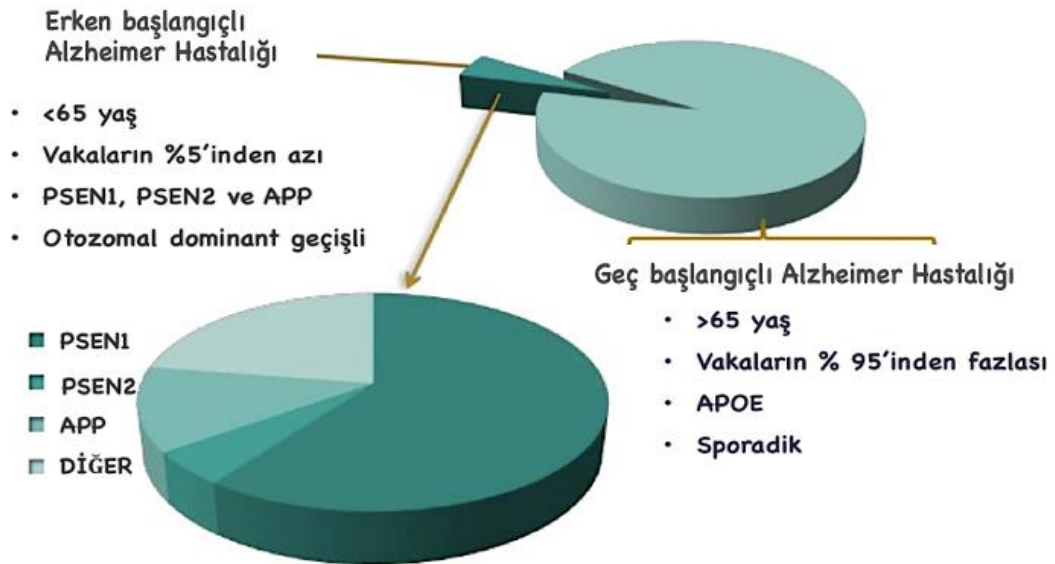
#### 2.1.1 Epidemiyolojisi

Alzheimer hastalığı nörodejeneratif hastalıklar arasında en yaygın görülen hastalıktır. Hastalığın prevalansı 65 yaş üzerinde %10 olmakla birlikte 85 yaş üzerinde bu oran %30' kadar yükselir (Ozansoy ve Başak 2007). 60 yaş üzeri popülasyonda her beş senede bir iki katına çıkmaktadır. Tamamı cinsiyete bağlı olmamakla birlikte özellikle 85 yaş üstü kadınlarda AH riskinin erkeklere oranla daha fazla olduğu belirtilmektedir (Wang ve Ding 2008).

AH dünya çapında 46 milyon kişide görülmektedir ve *Alzheimer's Association*' in son bildirimlerine göre 2050 yılı itibariyle yılda 9.9 milyonun üzerinde artış göstererek 131 milyona ulaşması beklenmektedir (Luo vd 2016, Ryan vd 2018). Logaritmik oranda artan bu yükseliş ile birlikte AH' nin gelecekte en ciddi sağlık sorunlarından biri olacağı tahmin edilmektedir.

### 2.1.2 AH Sınıflandırılması

Alzheimer hastalığı çoğunlukla sporadiktir, genellikle 60 yaş ve üzerinde görülür. Hastalığın bu formu geç başlangıçlı (*Late-Onset Alzheimer Disease = LOAD*) olarak adlandırılır. Erken başlangıçlı Alzheimer Hastalığı (*Early-Onset Alzheimer Disease= EOAD*) tanımı ise genellikle 60 yaşından önce gelişen AH olguları için kullanılır ve tüm AH vakalarının %5'ten azını oluşturur (Bassil ve Grossberg 2009) (Şekil 1). AH'de erken ve geç başlangıçlı formlarda farklı genetik risk faktörlerinin rol aldığı bilinmektedir (Garciduenas ve Duyckaerts 2018).



Şekil 1 Erken ve Geç Başlangıçlı AH Sınıflandırılması

### 2.1.3 Hastalığın Etiyolojisi ve Risk Faktörleri

Alzheimer hastalığı ile ilişkili belirlenen risk faktörleri tartışmalıdır. Yaş, aile öyküsü; LOAD'da apolipoprotein E (ApoE)  $\epsilon$ 4 allelinin varlığı kesin olarak kabul edilen risk faktörleridir (Selekler 2010).

#### 2.1.3.1 İleri Yaş

AH'nin 65 yaş sonrasında hastalığın görülme sıklığı her beş yılda bir iki katına çıktığı bildirilmiştir. Özellikle, 85 yaş üstü bireylerde AH'ye yakalanma riski %50 artmaktadır.

Alzheimer'ın prevalansına rağmen hastalık, yaşlanmanın normal bir parçası değildir. AH için yaşa özgü insidans oranlarının, eklenen her altı yaşta bir iki katına çıktığını göstermesi artan bir riske işaret eder (Singh vd 2016).

#### 2.1.3.2 Aile Öyküsü

Genetik ve çevresel faktörlerin de katkıları olmakla birlikte aile öyküsü AH gelişiminde bir diğer risk faktörüdür. Tüm AH vakalarının %5'inden EOAD formu sorumludur. Demans rahatsızlığı olan birinci derece hasta yakınları %10 ila %30 risk altındadır (Bassil ve Grossberg 2009).

#### 2.1.3.3 Apolipoprotein E $\epsilon$ 4 Alleli Varlığı

AH'de diğer bir risk faktörü apolipoprotein E (APOE)  $\epsilon$ 4 allelinin varlığıdır. APOE geni kromozom 19'da lokalizedir. Nöronal gelişimde, sinir rejenerasyonunda, sinaptik işlevlerin yerine getirilmesinde, immunoregülasyonda ve lipolitik enzimlerin aktivasyonunda rol alan APOE gen ürünü, kolesterol ve diğer lipidlerin de taşınmasından sorumlu bir glikoproteindir (Mahley vd 2009). APOE, tek bir gen lokusunda sırasıyla ApoE2, ApoE3 ve ApoE4'ü kodlayan  $\epsilon$ 2,  $\epsilon$ 3 ve  $\epsilon$ 4 olmak üzere üç allelik varyant taşır. Bunlardan  $\epsilon$ 4 allelinin LOAD için en güçlü risk faktörü olduğu bilinmektedir (Corder vd 1993). APOE  $\epsilon$ 4 allelinin bir kopyası AH riskini üç kat arttırırken iki kopyasının riski 12 kat arttırdığı saptanmıştır (Van Cauwenberghe vd 2016). Çalışmalar ApoE4'ün A $\beta$  oluşumunu engellemede ApoE3 ve APOE2'ye oranla daha az etkin olduğunu göstermektedir (Giri vd 2016). APOE  $\epsilon$ 4 alleli taşıyıcılarında senil plak şeklindeki A $\beta$  birikiminde bir hızlanma söz konusudur. Ancak ApoE  $\epsilon$ 4; sinaptik plastisite, kolesterol homeostazisi, nörovasküler işlev, nöroinflamasyon gibi A $\beta$ -bağımsız mekanizmalarla da AH patogenezi katkıda bulunur (Kok vd 2009).

### 2.1.3.4 Genetik

AH'de bir diğer önemli etken genetik yatkınlıktır. Hem EOAD hem de LOAD formlarında genetik faktörler ile AH arasında ilişki bulunmuştur. AH' de otozomal dominant kalıtılan ve EOAD ile ilişkilendirilen genler, kromozom 21'de lokalize olan *amiloid prekürsör protein (APP)* ve kromozom 14'te lokalize olan *presenilin-1 (PSEN1)* olarak saptanmışken; kromozom 1'de lokalize olan *presenilin-2 (PSEN2)* geni mutasyonlarının LOAD' da rol oynadığı belirlenmiştir. AH' nin yaklaşık %30 ila %70' inin PSEN1 geni mutasyonuna; %10 ila %20 'sinin PSEN2 geni mutasyonuna, %5' ten azının ise APP geni mutasyonuna bağlı olarak ortaya çıktığı bildirilmiştir (Bassil ve Grossberg 2009, Eisenstein 2011). Bu genlerde meydana gelen mutasyonların ayrı ayrı AH kaynaklı nörodejenerasyonun tetiklenmesine yol açtığı belirlenmiştir. Bunların dışında apolipoprotein E (APOE) geni ise AH'de yatkınlık geni olarak tanımlanmaktadır (Corder vd 1993).

#### 2.1.3.4.1 APP

Amiloid Prekürsör Proteini kodlayan APP geni kromozom 21' de yer alır. APP geni ekspresyonu birçok dokuda gerçekleşmekle beraber nöronların sinaps bölgelerinde yoğundur (Lynn vd 2010). APP' nin alternatif kesimi (*splicing*) sonucu APP751, APP770, APP695 olmak üzere 3 izoformu oluşur. Beyinde en fazla bulunan izoformu APP695' tir. APP mutasyonlarının çoğunluğu dominant kalıtılmakla birlikte EOAD ile ilişkilendirilen 2 resesif mutasyon (A673V ve E693Δ) saptanmıştır (Guerrero vd 2012). Yapılan çalışmalarda Down Sendromlu (Trizomi 21) hastaların normal bireylere kıyasla AH' yi daha erken geliştirdiklerinin gösterilmesi (Prasher vd 1998), AH patolojisinde APP'nin yüksek ekspresyonunun rolü olabileceğini düşündürmektedir.

#### 2.1.3.4.2 PSEN1

Kromozom 14'te lokalize olan PSEN1 geni APP' yi Aβ fragmentlerine ayıran γ-sekretaz kompleksinin önemli bir parçasıdır. PSEN1 ile ilişkili %70'i; 5, 6, 7 ve 8. Ekzonlarda olmak üzere 215 patojenik mutasyon saptanmıştır. Mutant γ-sekretaz Aβ-42 seviyesini arttırarak Aβ 40/42 oranının artışına yol açar. Çalışmalar Aβ-42' nin Aβ-40'a göre daha amiloidojenik olduğunu ve beyinde agregat oluşturmaya daha meyilli olduğunu göstermiştir (Tanzi ve Bertram 2005). Aβ-40 plaklarındaki PSEN1 mutasyonu kaynaklı morfolojik varyantlar pamukçuk görünümünü ile sonuçlanabilir (Giri vd 2016). PSEN1 geninde meydana gelen mutasyonlarının büyük bir çoğunluğu "missense" tip mutasyonlardır ancak insersiyon ve delesyonlar da saptanmıştır (Breyhan H vd 2009).

AH'de A $\beta$  peptidlerinin ve fibriler türlerin nöronlar arasındaki birikimlerine bağlı olarak beynin hipokampal CA1 bölgesinde %30 nöronal kayıp ve düşük sinaptik plastisite gözlenmektedir.  $\gamma$ -sekretaz aktivitesindeki rollerinin yanında PSEN1 geni mutasyonlarının nöronal işlevi, GSK-3 $\beta$  aktivitesini, kinesin 1- kaynaklı hücre motilitesini de etkileyerek nörodejenerasyona katkıda bulunduğu bildirilmiştir (Pigino vd 2003).

#### **2.1.3.4.3 PSEN2**

Kromozom 1'de lokalize olan PSEN2 geninin yapısı ve fonksiyonu PSEN1 ile oldukça benzerlik göstermekle birlikte PSEN2 mutasyonları sık görülmez (Cruts M vd 2012). PSEN2' de gözlenen mutasyonlar da tıpkı PSEN1 gibi  $\gamma$ -sekretaz aktivitesinde alterasyonlara yol açarak A $\beta$ -42/40 oranını artırır (Tanzi ve Bertram 2005). PSEN2 mutasyonu taşıyıcıları genelde daha ileri yaş grubundandır ve hastalığın görülme yaşı bu bireylerde 39 ila 75 yıl gibi geniş bir aralığa sahiptir. PSEN2 mutasyonu taşıyan bazı bireylerde nöropatolojik değişimler olarak nöronal plak oluşumu ve nörofibriler yumak birikimi gözlenebilir (Jayadev vd 2010). PSEN1 ile homoloji göstermesine rağmen PSEN2 geni tarafından üretilen amiloid peptid miktarının daha az olduğu bilinmektedir (Gatz vd 2006).

AH ile ilişkilendirilmiş olan fakat kesinleşmemiş ve ileri çalışmalara ihtiyaç duyulan genler de mevcuttur. Bunlardan bazıları tablo 1 de verilmiştir.

Tablo 1. AH ile Muhtemel İlişkili Diğer Genler

Gen ismi	Fonksiyon/tanımı
<b>CLU</b>	Sinaps turnoveri Şaperon protein görevi Kompleman sistemin aktivasyonu
<b>CR1</b>	Amiloid beta temizlenmesi Kompleman sistemin aktivasyonu
<b>PICALM</b>	Klatrin-aracılı endositoz
<b>BIN1</b>	Sinaptik veziküllerin endositozu Sitoiskelet dinamiğinin sağlanması
<b>ABCA7</b>	Fagositoz Lipid homeostazisi
<b>CD33</b>	Klatrin-aracılı endositoz Hücre sinyali
<b>MS4A6A</b>	Sinyal transdüksiyonu İmmun sistemin korunması
<b>SORL1</b>	Endositoz APOE geni için reseptör taşıma APP' nin kesimi
<b>ADAM10</b>	Hipokampüste nörogenez Hücre adezyonu
<b>EPHA1</b>	Sinaptik ve nöronal gelişim

AH'de rol oynayan kesinleşmiş risk faktörlerinin yanısıra ve muhtemel risk faktörleri ve belirlenen bazı koruyucu faktörler de rol oynamaktadır. Bunlar kısaca tablo 2'de verilmiştir.

Tablo 2. AH'de Risk Faktörleri ve Koruyucu Faktörler

Risk Faktörleri	Koruyucu Faktörler
Hipotroidi	Yüksek eğitim düzeyi
Cinsiyet	APOE- ε2 taşıyıcılığı
Ailede demans varlığı	Antioksidan kullanımı
Diyabet varlığı	Antiinflamatuvar kullanımı
Bilinç kaybını kapsayan travmalar	Östrojen kullanımı
Down sendromu varlığı	Statin kullanımı
Majör depresyon varlığı	Akdeniz diyeti
Plazma Homosistein Düzeyi	Rutin fiziksel ve zihinsel aktiviteler

#### 2.1.4 Klinik Tanısı

Alzheimer hastalığının erken dönemdeki en belirgin klinik belirtisi kısa veya uzun süreli hafıza kaybıdır. Hastalığın progresyonu ile konuşma, görüleni algılamayorurmlama, yürütücü işlevler, dikkat gibi kognitif fonksiyonlarda bozukluklar meydana gelir ve günlük yaşam aktivitelerindeki aksamalar klinik tabloya eklenir. Depresyon, halüsinasyonlar gibi davranışsal değişiklikler herhangi bir dönemde görülebilir (Selekler 2010).

AH'nin klinik tanısı için 2001 yılında Amerikan Nöroloji Akademisi tarafından yayınlanan bir kılavuz ile AH için standart tanı kriterleri ve değerlendirme metodları belirlenmiştir. Bu kılavuzda, tanı kriterleri olarak geliştirilen uluslararası NINCDS/ARDRA (*National Institutes of Neurological and Communicative Disorders and Stroke ve Alzheimer's Disease and Related Disorders Association*) ve DSM-IV (*Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders- IV*) kriterlerinin kullanımı güvenilir bulunarak önerilmektedir. Bu kriterler tablo 3 ve tablo 4'te verilmiştir. Bu kriterlere ek olarak klinikte fizik ve nöropsikiyatrik değerlendirme (Mini Mental Durum Testi= MMSE), görüntüleme yöntemleri (Bilgisayarlı Tomografi= BT ve Manyetik Rezonans= MR), laboratuvar testleri de yapılır. Bu testler ve değerlendirmeler öncülüğünde konulan tanı "muhtemel Alzheimer hastalığı" tanısıdır ve kesinliği %85 ila 90'dır.



Kesin Alzheimer tanısı ise, biyopsi veya otopside alınan dokunun histopatolojik incelemesi sonucu konulabilir.

**Tablo 3. NINCDS/ARDRA Tanı Kriterleri**

<p><b>Evre 1. Muhtemel AH klinik tanı kriterleri</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Klinik muayenede ve MMSE ile saptanmış, nöropsikiyatrik testlerle doğrulanmış demans tablosu vardır.</li> <li>• Hasta kognitif bozukluk semptomları göstermeye başlamıştır.</li> <li>• Başlangıç evresi olarak Kabul edilen bu evrede ciddi bilinç bozukluğu yoktur.</li> <li>• Genellikle yaş ileridir (&gt;40).</li> </ul>
<p><b>Evre 2. Muhtemel AH tanı destekleme şartları</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Afazi (dil alanlarında işlev kaybı bozukluğu), apraksi (beceri gerektiren hareketlerde işlev kaybı), agnozi (algılayamama) gibi rahatsızlıklarda ilerleme söz konusudur.</li> <li>• Davranış bozukluğu ve günlük aktivitelerde yetersizlik gözlenir.</li> <li>• Aile öyküsünde nöropatolojik bozukluk saptanmış ve doğrulanmıştır.</li> </ul>
<p><b>Evre 3. AH dışı demans nedenleri dışlandığında Muhtemel AH tanısı ile uyumlu diğer klinik özellikler</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Hastalığın progresyonunda platolar saptanmıştır.</li> <li>• Depresyon, insomnia, inkontinans, delüzyonlar, illüzyonlar, halüsinasyonlar; verbal, duygusal veya fiziksel duygu patlamaları, seksüel bozukluklar, kilo kaybı gibi eşlik eden semptomlar gözlenmektedir.</li> <li>• Bazı hastalarda özellikle hastalığın ilerleyen dönemlerinde artmış kas tonusu, miyoklonus veya yürüyüş bozuklukları gibi diğer nörolojik anomaliler görülebilmektedir.</li> <li>• İlerleyen dönemde epileptik nöbetler görülür.</li> </ul>
<p><b>Evre 4. Muhtemel AH tanısını şüpheli kılan ya da ekarte eden durumlar</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Ani, apoplektik (inme benzeri) başlangıç.</li> <li>• Hemiparezi (kaslarda kuvvet kaybı), duyu kaybı, görme kusuru ve inkoordinasyon gibi fokal nörolojik bulguların erken evrelerde görülmesi.</li> <li>• Başlangıçta veya hastalığın çok erken döneminde ortaya çıkan epileptik nöbetler veya yürüyüş bozuklukları.</li> </ul>
<p><b>Evre 5. Mümkün AH tanı kriterleri</b></p>

- 
- Demansı tanımlayıcı yeterlilikte diğer nörolojik, psikiyatrik veya sistemik bozukluklar olmaksızın; başlangıçta, presentasyonda ya da klinik gidişatta değişikliklerin bulunması durumunda konulabilir.
  - Demansa neden olabilecek, ancak demansın nedeni gibi görünmeyen ikinci bir sistemik ya da beyin hastalığının bulunması durumunda konulabilir.
  - Diğer belirlenebilir nedenlerinin dışlandığı, tek ve yavaş ilerleyici bir bilişsel bozukluğun bulunması durumunda, araştırma çalışması amaçlı olarak kullanılabilir.

---

**Evre 6. Kesin AH tanı kriterleri**

---

- Muhtemel Alzheimer Hastalığı klinik kriterleri
- Biyopsi ya da otopsiyle elde edilen histopatolojik kanıtlar var ise.

---

**Evre 7. Araştırma amacı ile hastalık özel görünümleri olan alt tiplere ayrıldığında AH sınıflandırılması**

---

- Ailede bulunma
  - 65 yaş öncesi başlangıç
  - Trizomi 21 varlığı
  - Parkinson hastalığı gibi diğer durumlarla birliktelik var ise.
-

Tablo 4. DSM-IV Tanı Kriterleri (Cankurtaran vd 2013).

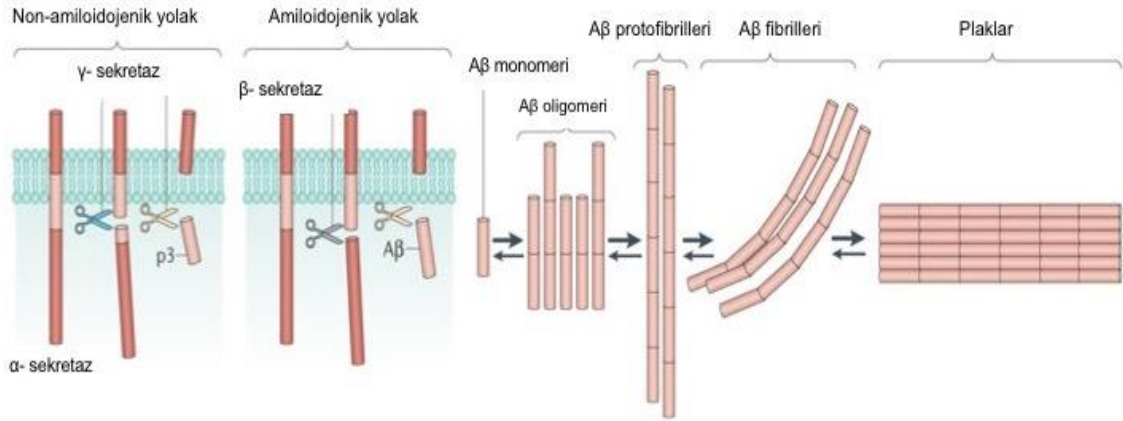
<p><b>1. Birden Fazla Kognitif Alanı İçeren Bozukluk Aşağıdaki Şekilde Ortaya Çıkması</b></p> <p>Hafıza bozukluğu</p> <p>Aşağıda sıralanan kognitif bozukluklardan en az biri</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Afazi</li> <li>• Apraksi</li> <li>• Agnozi</li> <li>• Yürütücü işlevlerde bozulma</li> </ul>
<p><b>2. Hafıza bozukluğu veya kognitif bozuklukların toplumsal ve mesleki işlevselliği ciddi şekilde bozması ve eski işlevsellik düzeyine göre anlamlı bir gerilemeyi temsil etmesi</b></p>
<p><b>3. Seyir, sinsi başlangıç ve yavaş ilerleyici kognitif yıkımın ortaya çıkması</b></p>
<p><b>4. 1.maddede tanımlanan kognitif bozuklukların aşağıdaki nedenlerden herhangi birine bağlı olmaması</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Hafıza ve diğer kognitif işlevlerde ilerleyici bozulmaya neden olabilecek merkezi sinir sistemine ait diğer olgular (örneğin serebrovasküler hastalık, Parkinson hastalığı, Huntington hastalığı, subdural hematoma, normal basınçlı hidrocefali, beyin tümörü gibi)</li> <li>• Demansa neden olabileceği bilinen sistematik durumlar (örneğin hipotiroidizm, B12 vitamini ya da folik asit eksikliği, niasin eksikliği, hiperkalsemi, HIV enfeksiyonu gibi)</li> <li>• İlaçlar ve madde kullanımı ile ilgili diğer durumlar</li> </ul>
<p><b>5. Bozuklukların delirium seyri dışında ortaya çıkması</b></p>

### 2.1.5 Nöropatolojisi

Alzheimer hastalığı patolojik olarak amiloid plaklar, nörofibriler yumaklar (NFY), sinapslara ek olarak nöron kayıpları ve beyinde ileri derecede atrofi ile karakterizedir (Katzman ve Saitoh 1991). Amyloid beta plakların oluşumu hastalığın en önemli histopatolojik işaretidir ve özellikle amigdala, hipokampus ve neokortekste görülür. NFY ve A $\beta$  plaklarının yanısıra AH nöropatolojisinde gliozis, inflamasyon, kolinerjik ve glutamerjik kayıplar ile diğer nörotransmitter sistemlerinde defektler de rol almaktadır (Probst vd 1991).

#### 2.1.5.1 Amiloid Beta Plaklar

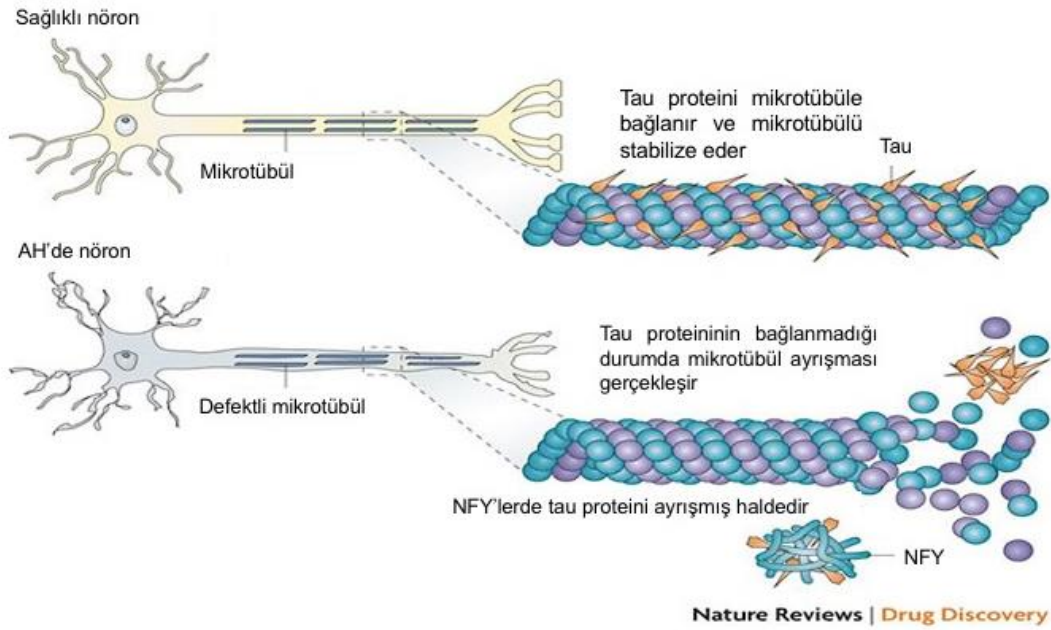
Amiloid Prekürsör Proteini (APP) bir integral transmembran proteini olup fonksiyonu tam olarak aydınlatılamamıştır. AH'de kilit rol oynayan A $\beta$  plakların ana bileşenleri olan A $\beta$  proteinleri APP' nin proteolitik yol ile kesimi sonucunda oluşmaktadır. APP' nin  $\alpha$ ,  $\beta$  ve  $\gamma$ -sekretaz enzimleri ile proteolitik olarak kesilmesiyle farklı tip peptidler üretilir. "Non-amiloidojenik" olarak adlandırılan yolda APP'nin proteolizini daha çok  $\alpha$ -sekretazlar sağlar.  $\alpha$ -sekretazlar APP'yi yaklaşık olarak ortasından keserek toksik olmayan ve sitozolde çözünebilir "sAPP  $\alpha$ -P3" adı verilen ekstraselüler proteini oluşturur. Bu molekülün nöronlar üzerine nörotrofik olumlu etkileri gösterilmiştir (Bird ve Miller 2005). Ancak özellikle nöronlarda görülen ve "amiloidojenik" olarak adlandırılan yolda APP;  $\beta$  ve  $\gamma$ - sekretazlar ile parçalanarak farklı boyutlarda A $\beta$  peptidlerinin üretimine neden olur (Şekil 2).  $\beta$ - sekretazlar APP'yi amino ucundan,  $\gamma$ -sekretazlar ise karboksi ucundan keserek ürün olarak çözünemeyen A $\beta$  formları meydana getirirler (Iwatsubo vd 1994). Oluşan A $\beta$ ' ler 40 veya 42 aminoasit uzunluğundadır ve sırasıyla A $\beta$ -40 ve A $\beta$ -42 olarak sembolize edilirler. AH'de beyindeki amiloid plaklarda baskın bir şekilde bulunan tür A $\beta$ -42 türüdür agregat oluşturmaya daha yatkındır (Van Cauwenberghe vd 2016). Kesimler sonucu hücre dışında biriken bu proteinler yoğun nöritik plaklara dönüşür (Cummings 2004).



**Şekil 2 APP' den Amiloidojenik ve Amiloidojenik Olmayan Yollar ile Amiloid beta Plakların Oluşumu (Heppner vd 2015).**

### 2.1.5.2 Tau Proteinini ve Nörofibriler Yumaklar

AH patogenezindeki bir başka etken interselüler nörofibriler yumak (NFY) oluşumlarıdır. NFY' lerin temel bileşenleri hiperfosforile olmuş "tau" proteinleridir. Tau proteinini 17. kromozomda bulunan MAPT (mikrotübül ilişkili protein tau) geni kodlar. Tau proteininin fonksiyonu, mikrotübüllerin stabilizasyonunu ve hücre iskeletinin bütünlüğünü sağlamak ayrıca aksonal transport gerçekleştirmektir (Jazvinščak Jembrek vd 2018). Nörodejenerasyon sürecinde anormal fosforillenen tau proteinlerinin, mikrotübüllere bağlanma yeteneğini bozarak aksonal transportta defektlere yol açtığı ve sonrasında da çözilemeyen çift sarmallı filamentlere polimerize olarak interselüler NFY'leri meydana getirdiği bilinmektedir (Poorkaj vd 1998) (Şekil 3).



**Şekil 3 Hiperfosforile tau Proteinlerinin Mikrotübüllerdeki Etkisi (Brunden vd 2009).**

### 2.1.5.3 Nöronal ve Sinaptik Kayıplar

AH'de nöronal kayıplar ilk olarak beynin entorhinal korteks bölgesinde görülür. Daha sonra sırasıyla limbik sistem ve superior temporal sulkusa ilerler. Nöron kaybı AH süreci ile körele olarak NFY'ler gibi yayılmaya başlar. Genel olarak NFY'ler ile nöron apopyozu arasında negatif bir ilişki vardır. Ancak NFY'ler tek başına nöron kayıpları üzerinde etkin değildir. Örneğin Alzheimer beyinlerinde subkortikal çekirdekler gibi NFY'lerin yaygın görüldüğü bölgelerde nöron kaybı gözlenmemektedir. Diğer yandan, NFY'lerin az sayıda olduğu ya da hiç görülmediği bölgelerde ciddi nöron tahribatı görülebilir. Amiloid nörotoksitesi ve sinaps dejenerasyonu, nöronal apoptoz sürecinde rol oynadığı düşünülen diğer faktörlerdir (Gürvit 2004).

Nöronal kayıpların yanısıra sinaptik dejenerasyon da AH patolojisi üzerinde etkili olmaktadır. Sinaptik plastisitenin korunması kognitif fonksiyonların sürdürülebilmesi açısından oldukça önemlidir. AH'de hipokampüsteki sinaptik hacmin azalması Alzheimer hastalarındaki kognitif bozukluk ile büyük ölçüde ilişkili bulunmuştur (Jazvinščak Jembrek vd 2018). Hatta sinaptik kayıpların AH'deki kognitif bozukluğu saptamada amiloid beta toksitesi ile tau birikimlerinden daha iyi bir hastalık belirleyicisi olduğu düşünülmektedir (Van Wijk N vd 2014). Yapılan post-mortem incelemelerde, klinikteki demans şiddetiyle ilişkilendirildiğinde sinaps kaybının nöronal kayıplardan daha yüksek korelasyon gösterdiği saptanmıştır. Ayrıca sinaptofizin gibi bazı sinaptik proteinlerin miktarlarının da aynı şekilde demans şiddeti ile ilişkili olduğu bulunmuştur (Gürvit 2004).

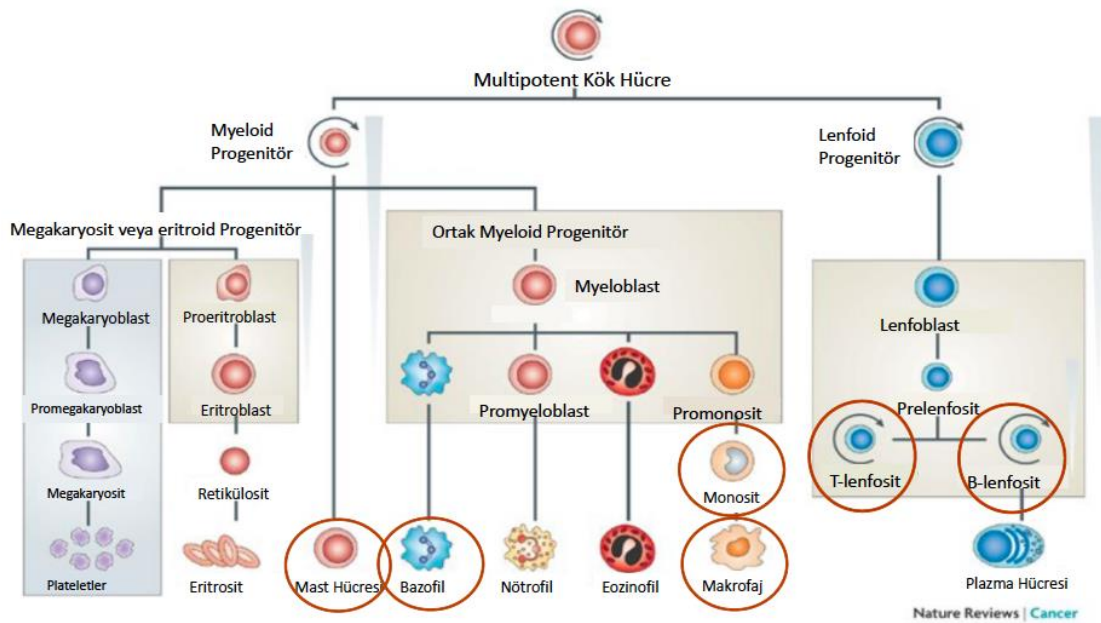
#### 2.1.5.4 Gliozis ve İnflamasyon

Gliozis, merkezi sinir sistemindeki herhangi bir hasara karşılık olarak ortaya çıkan ve glial hücrelerin aktivasyonunu ve proliferasyonunu içeren durumu tanımlar. AH'de gliozis, aktive edilmiş mikroglia ve amiloid plaklarının yakınındaki reaktif astrositlerdeki artışlarla karakterizedir (Frost ve Li 2017). Aβ birikimlerinin ve plak oluşumlarının, nöronal sistemin homeostazını sağlayan astroglial ve mikroglial hücreleri aktive ettiği ve bu hücrelerin de tau patolojisini yaymaya katkıda bulunduğu bilinmektedir (Leyns ve Holtzman 2017). NFY'lerin ve amiloid plakların yanında, astroglial ve mikroglial hücrelerin de aktivasyonu ile nöronlar arasında akut faz protein birikimleri, sitokinler, kompleman sistemi aktivasyonu gibi inflamasyonu yansıtan alterasyonların varlığı da gliozisin AH patogenezinde oldukça etkin olduğunu düşündürmektedir (Akiyama vd 2000, Benveniste vd 2001).

İnflamasyonun AH'de etkin olduğunu gösteren bir başka bulgu da mikroglial hücrelerin makrofajlar gibi davranarak yüzeylerinde eksprese ettikleri hücre ölüm reseptörü ligandları aracılığıyla hedef hücrelerin ölümünü tetiklemesidir. Tümör nekrozis faktör (TNF) ailesinden olan "*TNF Related Apoptosis-Inducing Ligand*" (TRAIL) bunlardan birisidir. Mikroglial hücrelerin aynı kökenden olduğu periferik mononükleer fagositer hücreler, immün yanıtta, inflamasyon koşullarında ekspresyonu artan TRAIL gibi hücre ölüm ligandları aracılığıyla katılmaktadır. Yapılan bir çalışmada astroglial interlökin-1 ve TNF- $\alpha$  ile indüksiyon sonucunda TRAIL mRNA ekspresyonunun (Choi vd 1999); ve mikroglial hücrelerde TRAIL ekspresyonunun arttığı gösterilmiştir (Genç vd 2002).

## 2.2 AH'de Periferik Kan-Mononükleer Hücreler (PBMC'ler)

Periferik kanda bulunan mononükleer hücreler (PBMC); T-lenfosit, B-lenfosit, doğal öldürücü (NK) hücreler gibi lenfositler, monositler, dendritik hücreler gibi yuvarlak nükleuslu hücrelerden oluşan immun sistem hücreleridir. Oluşumları bakımından hem myeloid hem de lenfoid kökenlidirler (şekil 4).



Şekil 4 Oluşumları Bakımından PBMC' ler (Ramsey ve Gonda 2008).

Bu hücreler periferik kandan direkt olarak izole edilir. Eritrositler ile granülositleri (nötrofil, bazofil, eozinofil) içeren hücre fraksiyonları yoğunluk-kademeli santrifügasyon yolu ile tüm kandan kolaylıkla ayrılabilir. 1.077 g/ml yoğunluğa sahip *medium* tüm kanı iki fraksiyona ayırır; PBMC'ler daha üst fazda kalan hücre popülasyonunu oluştururken eritrositler yüksek yoğunluktaki alt fazda kalır (Şekil 11).

Nörodejenerasyonun biyobelirteçleri olarak, periferik kan mononükleer hücreleri (PBMC) son zamanlarda oldukça ilgi görmektedir. PBMC'lerin nöronların nonsinaptik biyokimyasal ortamının çoğunu paylaştığı düşünülmektedir. Yapılan çalışmalar, AH'nin PBMC seviyesinde apoptoza olan hassasiyet de dahil olmak üzere çoklu disregülasyon ile karakterize olduğunu göstermektedir. Özellikle apoptozis, AH'de ortaya çıkan ana



nöronal ölüm tipi olabileceği için, apoptotik uyarılara yanıt olarak Alzheimer hastalarından alınan lenfositlerdeki apoptotik değişimlerin eş zamanlı saptandığı gösterilmiş (Eckert vd 2001), ve ayrıca kaspazların da AH patogeneziindeki önemli süreçleri yansıtabileceği konusunda çalışmalar yapılmıştır (Tacconi vd 2004, Cosentino vd 2009).

Alzheimer hastalarının PBMC'lerindeki diğer ana bulgular arasında; azalmış asetilkolinesteraz aktivitesi, azalmış muskarinik reseptör bağlanması, artmış oksidatif stres, Ca ++ konsantrasyonlarının düzensiz homeostazisi, sinir sistemindeki nöronlarda görülenlere benzeyen nörotransmitter reseptör ekspresyon değişimleri gösterilebilir (Cosentino vd 2009).

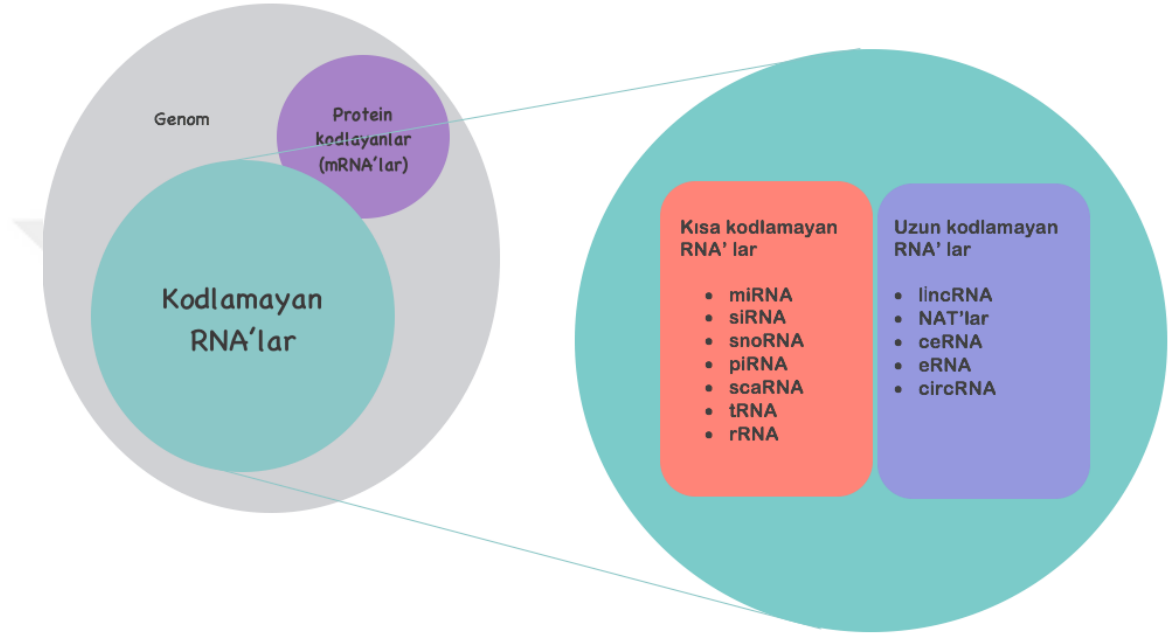
Yapılan çalışmalarda PBMC plateletlerinin kan plazmasındaki amiloid peptidlerinin ana kaynağı olduğu (~90%); salgılanan bu peptidlerin Alzheimer hastalarındaki amiloid plak bileşenleri ile benzer yapıda olduğu ve inflamasyonu yoğunlaştırarak AH progresyonunu arttırdığı belirtilmiştir (Kucheryavykh vd 2017, Pluta vd 2018). Plateletlerin yanısıra, PBMC lenfositlerinin de AH patogeneziini yansıttığı düşünülmektedir. Örneğin bozulmuş Ca<sup>2+</sup> homeostazisi ve endoplazmik retikulum stresi hem AH beyin dokusunda hem de lenfositlerinde sıklıkla görülen değişimlerdir (Wojsiat vd 2015). AH lenfositlerinde ayrıca artmış reaktif oksijen türü miktarı, antioksidan enzimlerin defektli aktiviteleri, mitokondri duyarlılığı, DNA hasarı ve apoptoz saptanmıştır (Wojda 2016). Bu da AH lenfositlerinin, AH beyinleri için tipik olan oksidatif stres reaksiyonunu yansıttığını göstermektedir.

### 2.3 Kodlamayan RNA'lar (lncRNA' lar)

İnsan genomunun yalnızca %2' sinden azının kodlayan transkriptler içerdiği ve %80' inden fazlasının da proteine çevrilmediği bilinmektedir. Yakın bir zamana kadar "çöp (*junk*)" veya "transkripsiyonel gürültü (*transcriptional noise*)" olarak tanımlanan kodlamayan RNA (ncRNA)'ların, sinyal yollarını kontrol etmede fonksiyonları olduğu artık kesin olarak bilinmektedir (Chew vd 2018). İnsan genomunda ncRNA genleri protein kodlamaksızın fonksiyonel RNA moleküllerini oluştururlar ve hücre içinde kilit rollere sahip olan düzenleyici süreçlerde regülatör olarak iş görürler.

RNA dünyası, büyük bir çoğunluğunu ribozomal RNA, transfer RNA, lncRNA, miRNA, sirküler RNA ve diğer küçük RNA moleküllerin oluşturduğu heterojen bir gruptur

(Şekil 5). ncRNA' ların sınıflandırılmasında yaygın olarak uzunluğa dayalı sınıflandırma kullanılır. İçlerinde mikroRNA (miRNA), *small interfering RNA* (siRNA), piwi-ilişkili RNA (piRNA)'ları da bulunduran 200 nükleotidden daha küçük RNA'lar kısa kodlamayan RNA'lar olarak adlandırılırken; daha uzun transkriptler uzun kodlamayan RNA (*long non-coding RNA*= *lncRNA*) olarak bilinirler (Akkaya ve Dinçer 2013; Viereck ve Thum 2016).



**Şekil 5 RNA'ların sınıflandırılması**

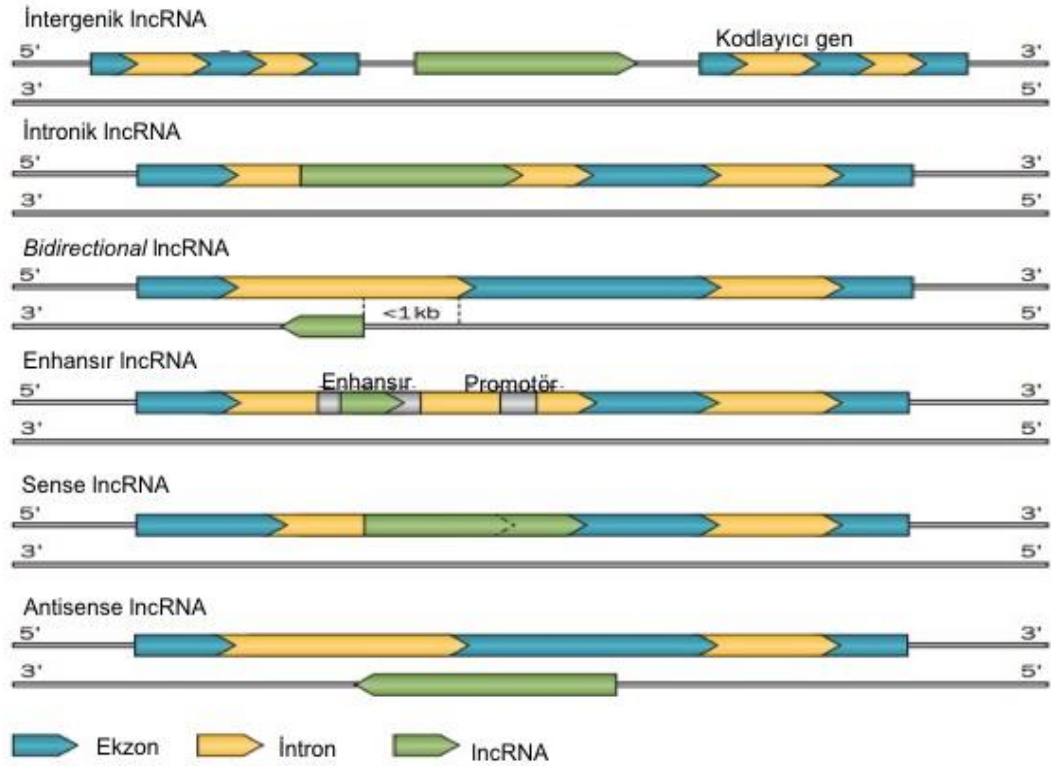
ncRNA'ların hücrel süreçlerde kritik işlevleri vardır, bu nedenle bu RNA'ların anormal regülasyonlarının çeşitli hastalıklarla doğrudan ilişkili olduğu bilinmektedir. Örneğin miRNA'ların karaciğer, ovarium, kolon, akciğer, meme, tiroid, mide, özafagus ve beyin kanserlerinde; şizofreni, multiple sklerozis, depresyon, amilotrofik lateral sklerozis, Parkinson ve Alzheimer hastalığı gibi merkezi sinir sistem hastalıklarında farklı ekspresyon profilleri gösterdikleri saptanmıştır (Visone ve Croce 2009; Jin vd 2013; Lei vd 2015).

## 2.4 LncRNA'lar ve Biyogenezi

LncRNA'ların gen ekspresyonunun regülasyonunda, gelişim ve farklılaşma gibi hücrel süreçlerde kritik işlevlerinin olduğu ve gen ekspresyonunu, transkripsiyonel, post-transkripsiyonel, epigenetik düzeyde regüle edebildikleri kanıtlanmıştır (Bayoğlu ve Cengiz 2017). Büyük çoğunluğunun işlevleri halen tam olarak bilinmemektedir, ancak sayısız biyolojik süreçte görevleri olduğu düşünülmektedir. LncRNA'lar çok düşük bir seviyede eksprese edilmeye eğilimlidirler. Büyük bir kısmı protein kodlama yeteneğinden yoksun olmakla birlikte, çok az sayıda lncRNA'nın da protein kodlama potansiyeline sahip olduğu bilinmektedir (Schmitz vd 2016).

Mevcut genom açıklama çalışmalarında, lncRNA genlerinin sayısı insan genomunda (GENCODE 24) 16,000 civarında ve fare genomunda (GENCODE M8) yaklaşık 9000 olacak şekilde tahmin edilmiştir ancak çalışmalar devam ettiği için, bu sayıların artması muhtemeldir. Ayrıca bir gen, bir lncRNA'nın birkaç farklı *splayz* varyantı için kalıp olabileceği için, lncRNA transkriptlerinin sayısı, genlerin sayısını aşmaktadır (Melissari ve Grote 2016).

LncRNA'ların kabul görmüş bir sınıflandırma sistemi lokasyonlarına dayalı bir sistemdir; intergenik, intronik, antisens zincirde ya da protein kodlayan genlerin *upstream* bölgesinde bulunmalarına göre adlandırılırlar (Akman ve Bensan 2014, Bär ve Thum 2016). *Sense* RNA'lar; aynı zincir üzerinde, bir intronun içindeki kodlayan gen ile örtüşen transkriptlerdir. *Sense* intronik RNA'lar; yine bir kodlayan genin intronu içinde lokalize olan fakat herhangi bir ekzon ile örtüşmeyen transkriptlerdir. *Antisens* RNA'lar; bir protein kodlayıcı lokusun ters şeridinde herhangi bir eksonu kesişen transkriptleri olan veya kodlayan bir genin regülasyonunu tersine gerçekleştirdiği kanıtlanmış olan RNA'lardır. *Bidirectional* RNA'lar; karşı zincirde yerleşmiş ancak sense zincir üzerindeki promotörün 1 kb' si içinde yerleşmiş transkriptlerdir. Bunlar, sense zincir üzerindeki promotörün karşı yönüne doğru transkribe edilir. (Şekil 6). *LincRNA* (*Long Intergenic RNA*)'lar; iki kodlayan gen arasında yer alan >200 transkriptlerdir.

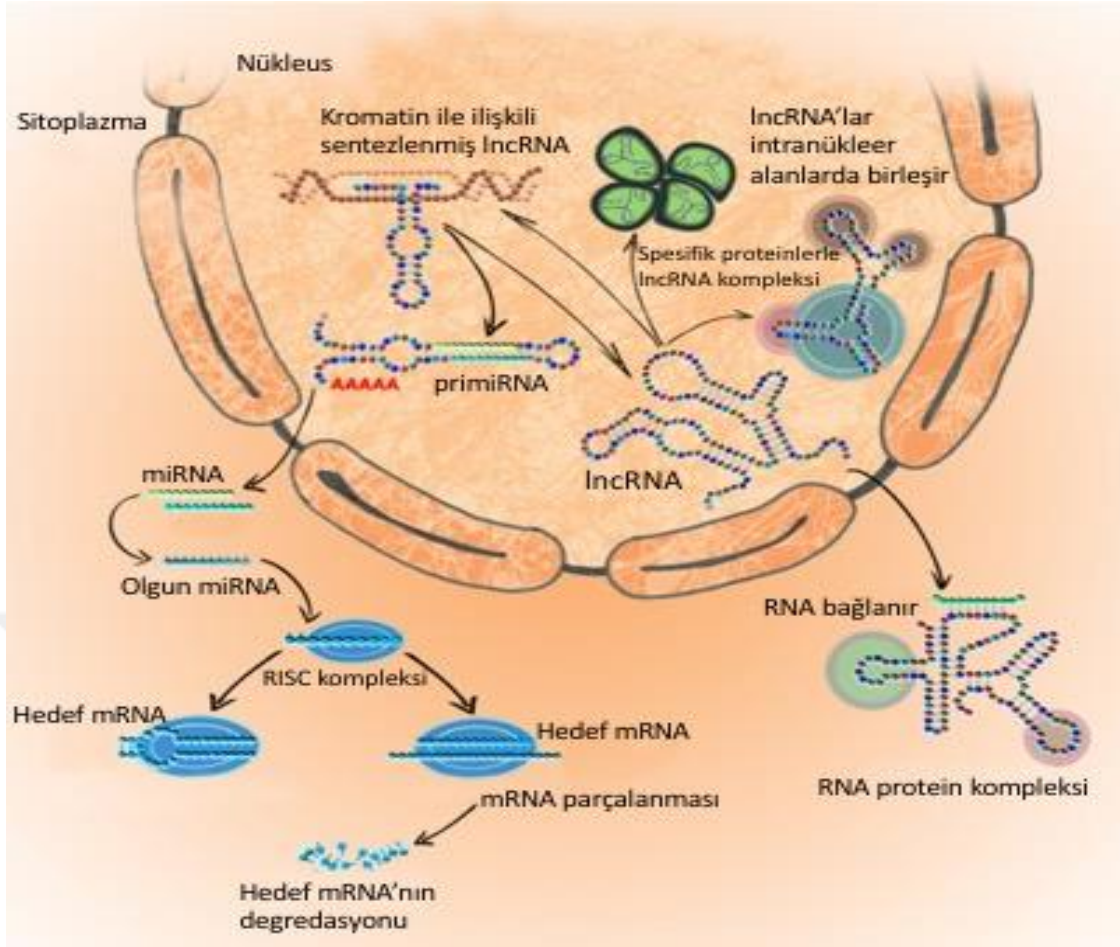


Şekil 6 Lokalizasyonlarına göre lncRNA' lar (Devaux vd 2015).

Bir açık okuma çerçevesi (*Open Reading Frame= ORF*) içermemeleri dışında lncRNA'ların mRNA' lardan biyokimyasal açıdan herhangi bir farkları yoktur. Ancak mRNA'lara göre daha kısa olmaları, *cis* etkili regülasyon gösterebilmeleri, daha az fakat daha uzun ekzonlara sahip olmaları, nispeten düşük seviyelerde eksprese edilmeleri ve primer sekansların korunmasında daha zayıf bir profil sergilemeleri, onların mRNA' lardan farklı olduklarını gösteren özellikleridir (Quinn ve Chang 2016).

lncRNA'lar nükleusta veya sitozolik fragmanlar içinde yer alabilirler, poliadenile olabilirler ya da olmayabilirler ve sıklıkla protein kodlayan bir lokus içerisindeki her iki iplikten de transkribe edilebilirler (Tan vd 2013). mRNA' lardan ortalama daha az sayıda ekzon içerirler ve farklı dokularda belirlenen ekspresyon seviyeleri daha düşüktür (Derrien vd 2012).

Polimeraz II tarafından transkribe edilen lncRNA'lar eğer takılacaksa 5'-*cap* eklenmesi; pre-lncRNA *splayzing* ve poliadenilasyon gibi transkripsiyonel düzenlemelerden geçtikten sonra olgunlaşma aşaması, lncRNA'nın kendine özgü fonksiyonel rollerini veren sabit bir ikincil (ve üçüncül) yapının oluşmasını içerir. (Ayers 2013) (Şekil 7).



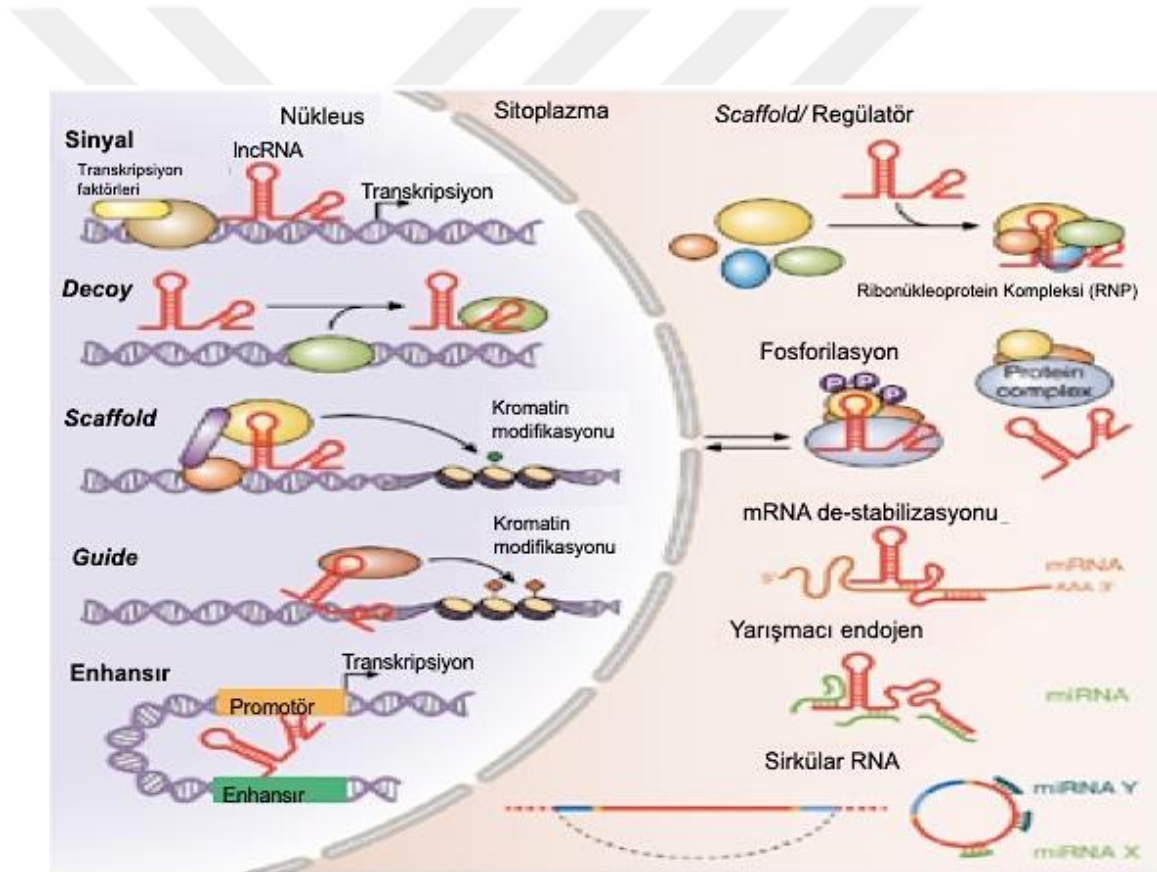
Şekil 7 IncRNA Yolağı (Ayers 2013).

5'-cap varlığı IncRNA stabilitesini pozitif bir şekilde etkiler. 5'-cap takılmayan intronik RNA'ların küçük bir kısmı (yaklaşık %15'i) muhtemelen hücrede intron laryatları oluşturdukları için daha az stabildir. Kodlama potansiyelinin olmamasına rağmen, intronik ve antisens IncRNA'ların çoğunluğu nükleus ve sitoplazmada yerleşir, bu da bu transkriptlerin sitoplazmik süreçlerin düzenlenmesinde ve düzenlenmesinde yeni rollerine işaret etmektedir (Ayupe vd 2015).

Bilinen IncRNA'ların %80'inden fazlası nükleusta lokalize olmaktadır (Kapranov vd 2007) ve IncRNA'lar için, nükleusta en iyi tanımlanmış fonksiyonları çeşitli seviyelerde gen ve genom aktivitesini düzenlemedeki rolleridir (Schmitz vd 2016). Kromatin yeniden düzenlemesi, histon modifikasyonları, alternatif kesim (*splicing*) ile genlerin modifikasyonu ve gen ekspresyonunun düzenlenmesi dahil olmak üzere birçok sürece katılırlar (Zhang vd 2017). Kromatin modifiye edici kompleksleri ve çeşitli transkripsiyon düzenleyiciler ile birlikte, DNA ile doğrudan etkileşime girerek nükleustaki genlerin

ekspresyonunu regüle ederler. Sitoplazmik kodlamayan lncRNA'lar, miRNA'lar gibi diğer transkriptler veya proteinler için *sponge* gibi davranabilir, küçük peptitlerin sentezi için kalıp olarak işlev görebilir, mRNA degradasyonunu sağlayabilir ya da translasyonunu düzenleyebilirler (Viereck ve Thum 2016).

Belli bir lncRNA'nın hücresel işlevi kesin olarak biliniyorsa, fonksiyonel işlevlerine göre sinyal molekülü, *decoy*, *guide*, enhansır, *scaffold*, moleküler *sponge* veya sirküler lncRNA'lar gibi kategorilere ayrılabilirler. Gen ekspresyonunu transkripsiyonel veya post-transkripsiyonel seviyelerde regüle edebilmelerine göre, nükleus veya sitoplazmada lokalize olabilirler. Genelde post-transkripsiyonel seviyede kontrol yapan lncRNA'lar, mRNA'ya bağlanmak için miRNA'larla rekabet içine girerek *miRNA sponge*'i olarak işlev gören lncRNA'lardır (Bär ve Thum 2016) (Şekil 8).



Şekil 8 lncRNA'ların Nükleus ve Sitoplazmada Etki Mekanizmaları (Bär ve Thum 2016)

LncRNA'lar ayrıca mRNA'ları bloke ederek, stabilize veya destabilize ederek protein translasyonuna da müdahale edebilirler. Nukleusta lokalize olan lncRNA'lar ise tam tersine “*cis* veya *trans*” şekilde, sırayla hedef genleri “yakından veya uzaktan” regüle ederek epigenetik ve transkripsiyonel seviyede gen ekspresyonunun modülatörleri olarak işlev görürler (Batista ve Chang 2013).

Sinyal lncRNA'lar, çeşitli uyarıları göndermek amacıyla sadece belirli bir yer ve zamanda eksprese edilenler lncRNA tipidir. Böyle eksprese edilen lncRNA'lar, kromatin modifiye edici enzimler (örneğin histon metiltransferazlar) ile etkileşebilir transkripsiyonel engelleme ile veya heterokromatin oluşturarak hedef genlerin susturumunu sağlayabilirler. *Decoy* lncRNA'lar, transkripsiyon faktörleri, kromatin remodeler ya da diğer RNA-binding proteinler gibi regülatör faktörlere bağlanarak dolaylı yoldan transkripsiyonu baskılar ve böylelikle bu faktörleri spesifik hedeflerinden ayırır. *ceRNA'lar* *decoy* lncRNA'lara örnek verilebilir.

LncRNA'lar, sadece multi ribonükleoprotein komplekslerinin birleşmesine yardımcı olmakla kalmayıp aynı zamanda kendileri bu komplekslerin fonksiyonel bileşenleri olarak da görev yapabilir. Bunlar moleküler iskeleler (*scaffold*) olarak iş görürler. *Guide* lncRNA'lar, regülatör proteinlere bağlanır ve hedef bölgelerine bir ribonükleoprotein kompleksi çekerler. Bu lncRNA'lar, “*cis* veya *trans*” etkili hareket edebilir ve yönlendirilmiş komplekslerin transkripsiyon faktörleri olup olmadığına bağlı olarak genlerin aktivasyonuna veya baskılanmasına aracılık edebilir. Enhansörler, hedef genlerin promotöründen veya transkripsiyonel başlangıç bölgesinden çok uzakta bulunan düzenleyici genomik elementlerdir. Bu lncRNA'lar, aktif enhansör elemanlardan üretilen *cis*-etkili moleküllerdir ve enhansör işlevlerinin yanısıra bitişindeki kodlayıcı genlerin ekspresyonunun aktivasyonu için gereklidirler (Bär ve Thum 2016).

LncRNA'ların, memelilerde X kromozomunun inaktivasyonu gibi fizyolojik süreçleri de regüle ettiği görülmüştür. *X-inactivation specific transcript (XIST)* olarak adlandırılan lncRNA'nın, transkripsiyonunu gerçekleştiren X kromozomunu susturmak için polikomb kompleksi oluşturduğu bilinmektedir. Buna karşın TSIX olarak adlandırılan bir başka lncRNA ise XIST'in karşı zincirinden transkribe olur ve X'in inaktivasyon süreci boyunca XIST seviyesini regüle eder.

## 2.5 lncRNA'ların Hastalıklarla İlişkisi

lncRNA'ların hastalıklarda farklı şekilde eksprese edilmesi veya yapılarındaki herhangi bir mutasyonun hücrel süreçleri doğrudan ya da dolaylı bir şekilde etkilemeleri, fonksiyonlarını ve etki mekanizmalarını anlama konusundaki ilgiyi arttırmıştır (Ulitsky 2018). Yapılan son çalışmalar lncRNA'ların tümörigenezde ve tümör progresyonunda rol aldığını, ayrıca çeşitli kanser koşullarında metastatik özellikler gösterdiğini ortaya koymuştur (Zhang vd 2013). Örneğin *Homeobox antisense intergenic RNA (HOTAIR)*'in önemli bir prognostik biyobelirteç olduğu ve gastrik adenokarsinom dokularında *upregüle* olarak tanımlandığı bilinmektedir. Artmış *HOTAIR* ekspresyonunun bu dokularda SUZ12 geninin yüksek ekspresyonu ile ilişkili olduğu ve bu ikilinin gastrik adenokarsinoma tümör dokularında epigenetik düzenlemeyi etkileyebileceği öne sürülmüştür (Ayers 2013). *HOTAIR*'in aynı zamanda kromatin modifiye edici protein komplekslerini bir araya getirerek moleküler *scaffold* yapısına *trans* olarak katıldığı (Akman ve Bensen 2014) bilinmekte olup meme, kolorektal, hepatoselüler, gastrointestinal ve pankreas kanserlerindeki overekspresyonları da bildirilmiştir (Beckedorff vd 2013).

lncRNA'lar arasında onkogen ve tümör-baskılayıcı olarak metastaz ve tümör progresyonunda rol alan ve bu süreçlerle ilişkili sinyal yollarını düzenleyenler vardır. *Pregnancy induced non coding RNA (PINC)* ve *prostate-specific transcript (PCGEM1)*, sırasıyla meme ve prostat kansinomlarında aşırı eksprese olduğu bulunan ilk onkojenik lncRNA'lardır (Karaarslan ve Serin 2016).

Bununla birlikte lncRNA'ların bazı kanserlerde olumlu etkileri de tespit edilmiştir. Hücrelerin tümör oluşumunu önlemek için kullanabileceği bir mekanizma onkojen-indüklü senesanstır (OIS). OIS'de merkezi rolü bulunan INK4B-ARF-INK4A lokusu, *Polycomb* grup proteinleri tarafından proliferasyon edilemeyen hücrelerde susturulur. Bu mekanizma, INK4B-ARF-INK4A lokusu içinde transkribe edilen ve cis etkili rol oynayan lncRNA ANRIL'e bağlıdır. Ayrıca, INK4B-ARF-INK4A lokusunun 400 kb yukarısında bulunan MIR31HG geninin, INK4A'nın regülasyonunda yer alan başka bir lncRNA'yı da kodladığı bilinmektedir (Schmitz vd 2016).

lncRNA'lar ayrıca tümör baskılayıcı p53 ve bununla bağlantılı sinyal yollarında da etkindir. p53, p21 ile birlikte gen ekspresyonunu düzenleyen linc -p21 gibi çok sayıda lncRNA'ya bağlanarak onları regüle ettiği bilinmektedir (Wu vd 2014).



Bunların dışında bazı hastalıklar ile ilişkilendirilmiş başlıca lncRNA'lara kısaca tablo 5'te değinildi.

**Tablo 5. Bazı Hastalıklarla ilişkili Tanımlanmış lncRNA'lar**

<b>Hastalık Türü</b>	<b>lncRNA'lar</b>
Meme Kanseri	<i>GAS5, SNHG2, H19, Kcnq1ot1</i>
Mide Kanseri	<i>GCAT1, H19, SUMO1P3, HOTAIR</i>
Karaciğer Kanseri	<i>HULC, HOTAIR, MALAT1</i>
Akciğer Kanseri	<i>MALAT1, TUG1, BANCR, GAS5</i>
Mesane Kanseri	<i>UCA1, H19, Linc-UBC1, MALAT1</i>
Melanoma	<i>BANCR</i>
Beyin tümörleri	<i>Anti-NOS2A, MEG3</i>
Alzheimer Hastalığı	<i>BACE1-AS</i>
Spinocerebellar Ataksia	<i>ATXN8OS</i>
Frajil X Sendromu	<i>FMRP</i>
Lenfoma	<i>RMRP</i>
Nöroblastoma	<i>MALAT1</i>

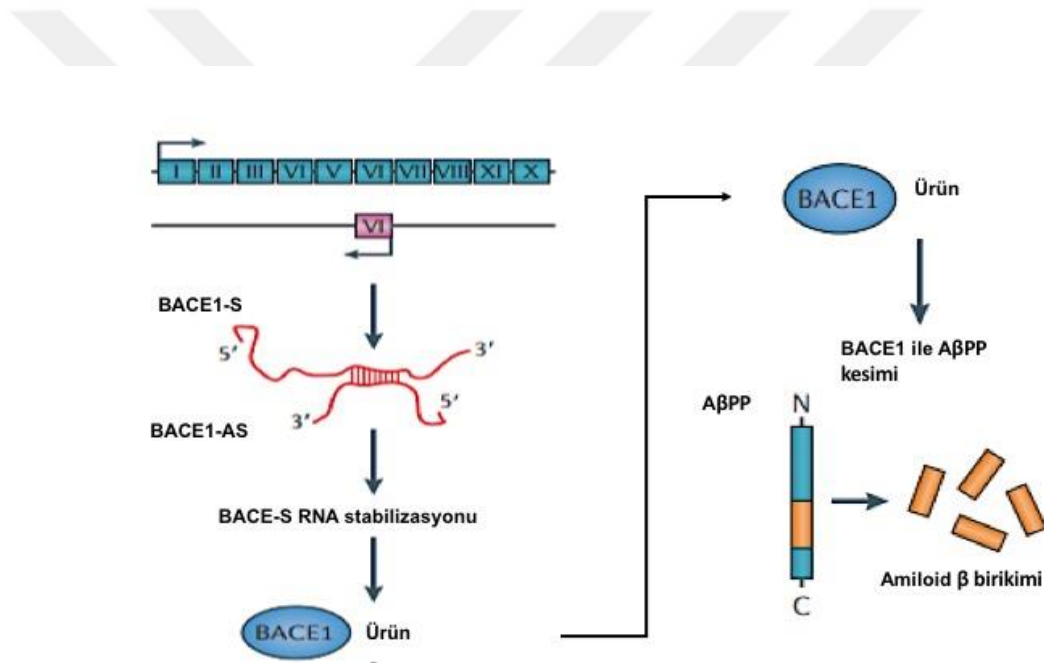
## 2.6 AH'de lncRNA'lar

lncRNA'ların çeşitli kanserler dışında epilepsi, şizofreni ve nörodejenerasyon sürecine katıldığı ve birçok nörolojik hastalıkta rol aldığı bilinmektedir (Gu vd 2018). Şekil 10'da bazı lncRNA'ların Alzheimer hastalığı ile ilişkisi kısaca şematize edilmiştir.

### 2.6.1 BACE1-AS

AH'li kişilerde ve APP transgenik farelerde yüksek ekspresyonu tespit edildiği için, lncRNA  *$\beta$ -site amyloid precursor protein cleaving enzyme-1 antisense transcript*

(*BACE1-AS*)' in AH ile kuvvetle ilişkili olduğu düşünülmektedir (Melissari ve Grote 2016). *BACE1-AS*, APP transgenik farelerde APP' yi parçalayan bir aspartil proteazı olan *BACE1*'in karşı zincirinden transkribe edilir. Hastalığın patogenezinde rol alan A $\beta$  nöropeptid birikiminin yanısıra artmış *BACE1* protein düzeyleri gösterilmiştir. *BACE1-AS*, post transkripsiyonel seviyede *BACE1*'in mRNA'sına doğrudan bağlanarak stabilizasyonunu regüle eder. *BACE1* mRNA'sının stabilizasyonu; *BACE1* protein seviyesinin artmasına, daha fazla APP bölünmesine ve hastalığın progresyonuna yol açan A $\beta$  plaklarının toksik birikmesine neden olur (Swerdlow 2007) (Şekil 9). *BACE1-AS*' nin, bir lncRNA'nın disregülasyonunun bir hastalığın patogenezinde nasıl önemli bir rol oynayabileceğinin iyi bir örneği olduğu belirtilmiştir (Luo ve Chen 2016).



Şekil 9 lncRNA *BACE1-AS*'nin Etki Mekanizması

## 2.6.2 51A

*Neuronal Sortilin-related Receptor 1 (SORL1)* geninin LOAD patogenezinde yatkınlık geni olduğu; merkezi ve periferel sinir sistemlerindeki nöronlarda eksprese olduğu bilinmektedir (Deng vd 2017, Lee vd 2008). Son çalışmalarda, *SORL1*'in

proteolitik sürecin etkilendiği yerler olan endozom ve trans-golgi ağında APP ile etkileşerek bir reseptör olarak rol aldığı gösterilmiştir (Ciarlo vd 2013).

51A, SORL1 geninin intron 1 bölgesine antisens olarak yerleşen ve alternatif splayzing ile oluşmuş SORL1 varyantlarının ekspresyonunu arttıran yeni bir ncRNA'dır. 51A' nın, in vitro modellerde ve Alzheimer beyinlerinde overeksprese olduğu belirtilmiştir (Ciarlo vd 2013). Postmortem ve in vitro çalışmalara ek olarak AH olan bireylerin plazma örneklerinde 51A ekspresyonu *upregüle* bulunmuştur (Deng vd 2017).

51A' nın AH yatkınlığını arttırabileceği olası bir mekanizmanın, alternatif splayzing ile SORL1'in bir varyantının *downregüle* edilmesi yoluyla amiloid beta peptidlerinin oluşumunun arttırılması olabileceği düşünülmektedir (Ma vd 2009).

### 2.6.3 BC200

*Brain Cytoplasmic 200 RNA (BC200)*, ökaryotik transkripsiyon başlatma faktörü 4A'yı hedefleyen ve böylece ATP hidrolizini RNA dupleksinden ayıran, postsinaptik dendritik mikro domainlerdeki bölgesel protein sentezini düzenleyen ve uzun süreli sinaptik plastisitenin korunmasına katkıda bulunan bir translasyon düzenleyicidir (Luo ve Chen 2016).

Yapılan postmortem bir çalışmada, kortikal alanlarda *BC200* RNA düzeyinin, 49 ve 86 yaşları arasında %60 oranında azaldığı gösterilmiş; yaşla uyumlu normal beyinlerle karşılaştırıldığında, *BC200*'ün Alzheimer beyninde anlamlı bir şekilde *upregüle* bulunmuştur (Mus ve Hof 2007). Ayrıca, Alzheimer patogenezi yansıtan beyin bölgelerinde artmış *BC200* seviyesi, hastalık progresyonu ile ilişkilendirilmiştir.

*BC200* seviyesi dendritlerde düşük, somata bölgesinde yüksek bulunmuştur. Bu farklı ekspresyon, mikrotübül bağımlı transportu etkilemekte ve AH'nin erken evrelerinde oluşabilen aksonal ve dendritik bloklamaya katkıda bulunabilmektedir. *BC200*'ün, bölge spesifik A $\beta$  oluşumuna ve bunu takiben beyinde amiloid plak birikimine katkıda bulunabileceği belirtilmiştir (Zhou ve Xu 2015).

### 2.6.4 NDM29

*Neuroblastoma differentiation marker 29 (NDM29)* RNA polimeraz III tarafından transkribe edilen bir ncRNA'dır ve sentezi doz bağımlı inflamatuvar stimülasyon ile uyarılır. NDM29'un *upregülasyonu* APP işleme sürecindeki alterasyonlarla ilişkili bulunmuştur. Ayrıca NDM29'un, BACE' in kesim aktivitesini uyardığı, ve sonuçta A $\beta$  oluşumunu ve A $\beta$ -42 / A $\beta$ -40 oranını arttırabilmek için  $\beta$ -sekretaz kompleksi tarafından daha fazla miktarda APP C-terminal fragmanı ürettiği bulunmuştur.

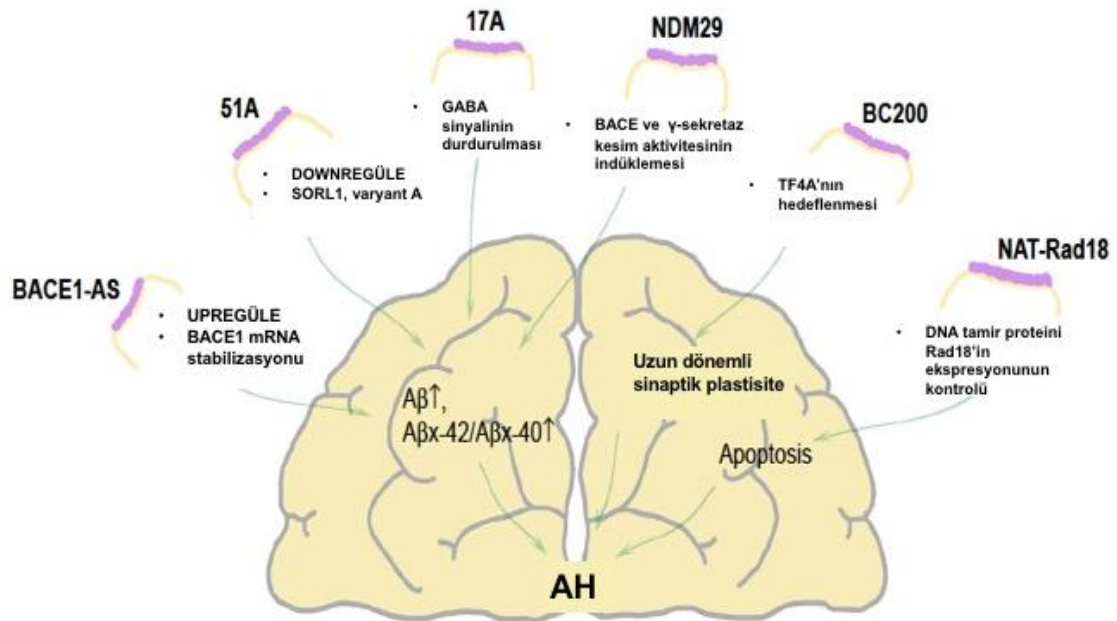
### 2.6.5 EBF3-AS

Beinde yüksek seviyede eksprese edilen *Early B-cell Factor-Antisense Transcript (EBF3-AS)* AH'de disregüle bulunmuştur. Gu vd (2018)' nin yaptığı bir çalışmada kontroller ile karşılaştırıldığında APP/PS1 transgenik farelerde hipokampusta EBF3-AS'nin anormal ekspresyonunu belirlenmiş ve EBF3-AS' nin Alzheimer nöronlarında apoptosis etkisi incelenmiştir. EBF3-AS'nin AH tanısı için bir biyobelirteç olabileceği veya yeni bir hedef olabileceği belirtilmiştir.

### 2.6.6 17A

17A, RNA polimeraz III tarafından transkribe edilen 159 nükleotid uzunluğunda bir lncRNA'dır ve *G-protein-coupled receptor 51 (GPR51)* geninin intron 3'ü ile eşleşip alternatif *splicing* ile GABA B2 reseptör izoformlarının sayısını arttırmaktadır. Gama aminobütrik asit (*Gamma-Aminobutyric Acid =GABA*) B'nin bir varyantı, hücre içi cAMP birikimini ve spesifik potasyum kanallarının aktivasyonunu düzenleyerek GABA B biyolojik işlevini etkiler. GABA B sinyalizasyonunun bozulması sonucu, A $\beta$  salınımının ve A $\beta$ -42/A $\beta$ -40 oranının arttığı bilinmektedir (Gavazzo vd 2013).

AH'de 17A, kontrol dokularla karşılaştırıldığında *upregüle* bulunmuştur. Bu da AH patolojisine doğrudan veya dolaylı olarak dahil olabileceğini düşündürmektedir (Massone vd 2011).



Şekil 10 Bazı lncRNA'ların AH ile ilişkisi (Luo ve Chen 2016).

## 2.7 Hipotez ve Bilimsel Katkı

H1: AH bazı lncRNA'ların ekspresyonlarının değişimi olasıdır.

H2: lncRNA'lar ileride AH tanısında biyobelirteç olarak kullanılabilir.

H3: lncRNA'lar AH tedavisine yönelik farklı araştırmalar için katkı sunabilir.



### 3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

Pamukkale Üniversitesi Nöroloji Anabilim Dalı polikliniğinde izlenmekte olan NINCDS/ADRDA tanı kriterlerine göre muhtemel Alzheimer tanısı almış, 65 yaş üzeri ve diyabet tanısı almamış hastalar (n=23) çalışmaya alındı. Polikliniğe başvuran diğer hastalar ve birinci derece akrabalığı olmayan hasta yakınlarının arasından gönüllü olan, inme geçirmemiş ve diyabeti olmayan bireylerden (n=33) kontrol grubu oluşturuldu. Hastalar ve kontrol grubuna ait bilgiler yüz yüze görüşme ile toplandı.

Bu çalışmaya Pamukkale Üniversitesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu tarafından 17.08.2016 tarihinde 60116787-020\50302 karar numarasıyla onay verilmiştir.

#### 3.1 Gereçler

##### 3.1.1 Cihazlar

Çalışmamızda kullanılan cihazlar tablo 6'da verilmiştir.

**Tablo 6. Kullanılan cihazlar**

<b>Cihaz</b>	<b>Marka</b>
Soğutmalı Santrifüj	WCR-P6 4K15C, Sigma
Vorteks	M16-500, Elektromag
Isı Bloğu	TDB-100, BioSan
Spektrofotometre	Maestrogen Nano, Maestrogen
PZR cihazı	Sensoquest
Eş zamanlı PZR cihazı	Step One Plus, Applied Biosystems

### 3.1.2 Kimyasallar

Çalışmamızda kullanılan kimyasallar tablo 7'de verilmiştir.

**Tablo 7. Kullanılan Kimyasallar**

<b>Kimyasal</b>	<b>Marka</b>
Ficoll-paque Plus	GE Healthcare, Sigma-Aldrich
Dengeli Tuz Solüsyonu	Sigma-Aldrich
Kloroform	Sigma-Aldrich
İsopropil Alkol	Sigma-Aldrich
Etanol (%70)	Merck
RNA içermeyen su	Thermo Scientific

### 3.1.3 Kitler

Çalışmamızda kullanılan kitler tablo 8'de verilmiştir.

**Tablo 8. Kullanılan Kitler**

<b>Kit</b>	<b>Firma</b>
cDNA sentez kiti	EasyScript Plus cDNA sentez kiti, ABM
2X Kilogreen Master Mix	ABM

### 3.1.4 Kullanılan primer dizileri

Çalışmamızda kullanılan primer dizileri tablo 9'da verilmiştir.

**Tablo 9. Kullanılan lncRNA Primer Dizileri**

<b>lncRNA</b>	<b>Dizi (5'-3')</b>
<b>Loc728763</b>	F: TGCAAGGAAAGGATGCTCTG R: TCCCAGTCACTTTGTAGCTG
<b>lnc-AL445989.1-2</b>	F: TATGGCTATGGCTATGGCTC R: ATCCACAGCCATAGCCAGTT
<b>TTC39C-AS1</b>	F: AATGGATGTTGAGGGTTATG R: CTCACAGTTCTGGAGGACTA
<b>Linc01420</b>	F: CACTCTACCCTCCGCACC R: AGGAAGTGAAATCGTGCTGA
<b>Lnc-CSTB-1</b>	F: GGAAGTGAACGCTGCATGAA R: CTGGGTGTTCTGCTATGGCC
<b>18S RNA</b>	F: ACCCGTTGAACCCCATTCGTGA R: GCCTCACTAAACCATCCAATCGG



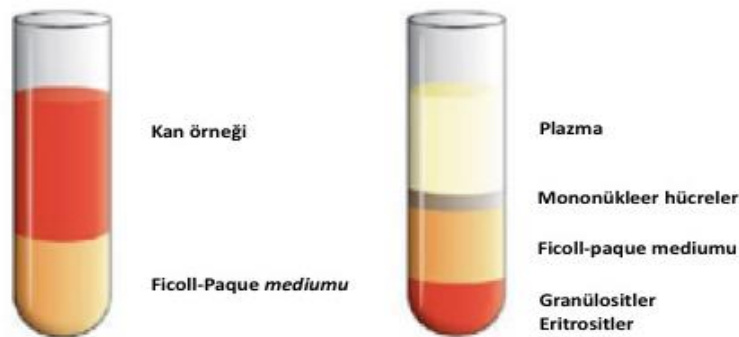
## 3.2 Yöntemler

### 3.2.1 Periferik Kan Örneklerinden Mononükleer Hücre (PBMC) İzolasyonu

Pamukkale Üniversitesi Hastanesi Nöroloji bölümünde, olgulardan K<sub>2</sub>EDTA antikoagülant tüpler kullanılarak gönüllü onam formu ile birlikte 10 ml periferik kan örneği alındı ve üç saat içinde yoğunluk-kademeli santrifügasyon ile mononükleer hücre izolasyonları yapıldı.

Öncelikle 3 ml *Ficoll-paque Plus* (GE Healthcare Bio-Sciences AB) bir santrifüj tüpüne eklendi, üzerine dengeli tuz solüsyonu ile seyreltilen 4 ml kan örneği *ficoll-paque* ile karışmayacak şekilde ilave edildi.

- Ardından örnek 400xg'de 20°C 'de 40 dakika santrifüj edildi, süpernatant ayrıldıktan sonra ara fazda kalan PBMC'ler steril pipet yardımıyla başka bir santrifüj tüpüne aktarıldı (Şekil 11).
- Transfer edilen PBMC hacminin yaklaşık 3 katı kadar (~6 ml) dengeli tuz solüsyonu eklendi ve nazikçe pipetaj yapılarak karıştırıldı.
- Daha sonra tekrar 400xg 'de 20°C 'de 10 dakika santrifüj edildi, süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra bu işlem yıkama amacıyla tekrarlandı.
- Elde edilen hücre pelleti üzerine 1 ml Trizol Reaktif (PeqGOLD, TriFast) eklenip kullanıma kadar -20°C 'de saklandı.
- Elde edilen mononükleer hücrelerden Trizol yardımıyla total RNA izolasyonu gerçekleştirildi.



Şekil 11 Ficoll-paque Plus Yardımı ile PBMC İzolasyonunda Fazların Oluşumu

### 3.2.2 PBMC'lerden Total RNA İzolasyonu

Alzheimer tanısı konmuş bireylerden alınan kanda kontrol grubu bireylerden farklı olarak eksprese edilen lncRNA'ları belirlemek amacıyla, elde edilen PBMC'lerden total RNA izolasyonu ile gerçekleştirildi.

İzolasyon protokolü aşağıda belirtilen şekilde uygulandı:

- 500 µl Trizol reaktifi içinde muhafaza edilen örnekler öncelikle oda sıcaklığına getirildi.
- Üzerlerine 200 µl kloroform eklendi, 15 saniye kuvvetli vorteks yapıldı.
- Örnekler 5 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi.
- Organik fazın ayrılması için 12.000 xg' de 10 dakika 4°C 'de santrifüj edildi.
- Santrifüj sonrası süpernatant kısmında toplanan RNA yeni bir tüpe aktarıldı ve 500 µl isopropil alkol eklenip pipetaj yapıldı.
- 10 dakika oda sıcaklığında inkübe edildikten sonra tekrar 12.000 xg' de 10 dakika santrifüj edildi.
- Süpernatant atılarak pellete 1 ml %75'lik soğuk etanol çözeltisi ilave edildi.
- 7.500 xg' de 5 dakika santrifüj edildikten sonra supernatant atıldı ve etanolün uzaklaştırılması amacıyla tüplerin kapakları açık bırakılarak RNA pelleti kurumaya bırakıldı.
- 60°C'de 10 dakika inkübasyona bırakıldı.
- Son basamakta ise pellet, miktarı ile orantılı şekilde RNaz içermeyen su ile çözüldü.

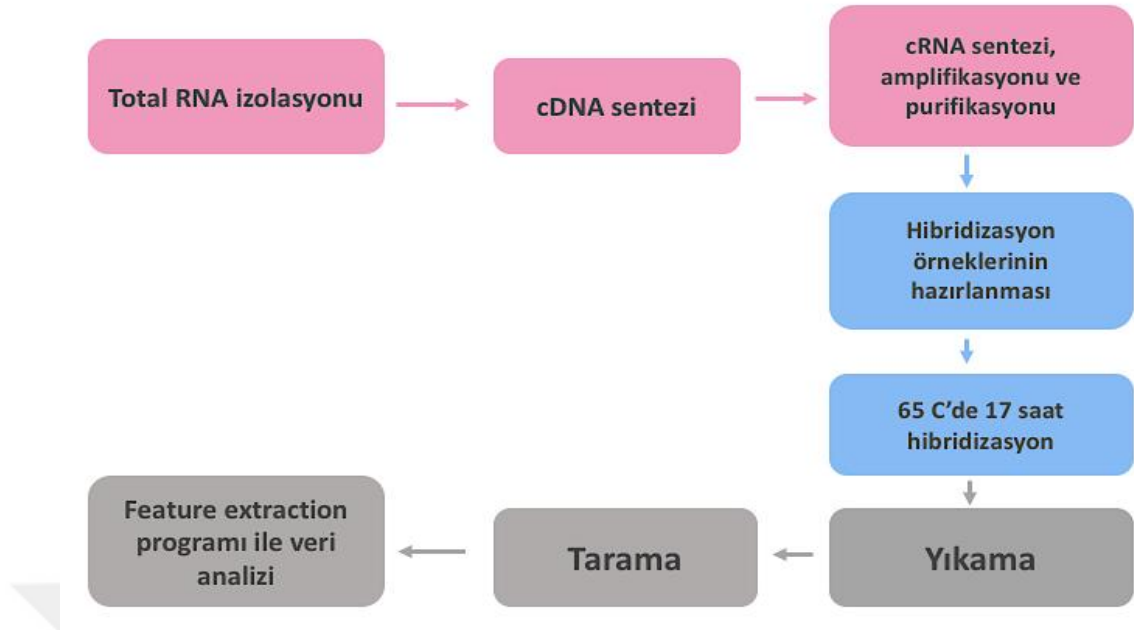
### 3.2.3 RNA Miktar ve Saflık Tayini

Elde edilen RNA'ların konsantrasyon ve saflık/kalite ölçümleri spektrofotometrik yöntem ile (Nanodrop Maestrogen) yapıldı. Her bir örneğe ait RNA örneğinden 2 µl alınarak cihazda okuma yapıldı, örneklere ait konsantrasyonlar ve A260/280 değerleri kaydedildi. Saflık oranı 1.8 ile 2.0 arasında olan örnekler kaliteli olarak kabul edildi ve çalışmada yer verildi.

### 3.2.4 Mikrodizin Analizi

Mikrodizin analizleri için MacroGen (Kore) firmasından hizmet alımı yapıldı. Analizde firma tarafından geliştirilen *Agilent SurePrint G3 Human 8x60k v3 Array* platformu kullanıldı. Bu platform toplamda 26,083 mRNA ve 30,606 lncRNA için prob içermektedir, prob dizileri RefSeq, Ensemble, Unigene, GenBank, LNCipedia Version 2.1 ve Broad Institute gibi veritabanlarından hastalığa özgü geliştirilen algoritmalar ve biyoinformatik analizlerle belirlenmiştir. Ayrıca platform long intergenic RNA (lincRNA), küçük nükleolar RNA (snoRNA), küçük nüklear RNA (snRNA), küçük *Cajal body-specific* RNA (scaRNA), ribozomal RNA (rRNA), telomeraz RNA, valin transfer RNA gibi diğer kodlanmayan RNA türlerine ait problemler de içermektedir.

Mikrodizin analizi için hasta (n=4) ve kontrol grubu (n=4) örneklerinden izole edilen RNA'ların saflık ve kalitesi spektrofotometrik yöntem (Maestrogen) ve *Agilent 2100 Bioanalyzer* (Agilent Technologies) cihazları ile ölçüldü. *SurePrint G3 Human 8x60k v3 Array* platformunda kullanılmak üzere, örnekler *Agilent One-Color Microarray-Based* gen ekspresyon analizi (Agilent, V 6.5, 2010) protokolüne göre işaretleme ve hibridizasyon işlemlerine tabi tutuldu (Şekil 12). Kısaca, her örnekten 100 ng total RNA Cy3-dCTP ile işaretlenerek amplifiye edildi. İşaretli cRNA'lar *RNAeasy Mini Kit* (Qiagen) kullanılarak purifiye edildi ve konsantrasyonları NanoDrop ND-1000 (NanoDrop, Wilmington, USA) yardımı ile ölçüldü (pmol Cy3/ $\mu$ g cRNA). Her bir örnekten 600 ng cRNA, 5  $\mu$ l bloklayıcı ajan ve 1  $\mu$ l fragman tamponu kullanılarak fragmente edildi ve 60°C 'de 30 dakika inkübe edildi, işaretli cRNA'ları dilue etmek üzere 25  $\mu$ l GE hibridizasyon tamponu eklendi. Daha sonra 40 $\mu$ l hibridizasyon solusyonu slaytlara (*Agilent SurePrint G3 Human GE 8X60K, V3 Microarrays*) yayıldı ve dağıtıldı. 17 saat 65°C'de inkübasyonun ardından oda sıcaklığında yıkandıktan sonra, hibridize olan dizinler yine firma tarafından geliştirilen floresan özellikli ve lazer-uyarılı Agilent Mikroarray Tarayıcısı D (Agilent Technologies, Inc.) ile tarandı. Ham veriler *Agilent Feature Extraction (v11.0.1.1)* yazılım programı ile çıkarıldıktan sonra *GeneSpring (Version 12.1)* yazılımı ile normalize edildi ve veriler analiz edildi.



Şekil 12 Mikrodizin Deney Yöntemi

Analiz sonucunda hasta ve kontrol grubu arasındaki ekspresyon farklılıkları filtreledikten sonra kat değişimleri incelendi. Kat değişimi alt ve üst sınırı '-1.5 ve 1.5' değerleri olarak kabul edildi. Filtreleme sonucu kontrol grubuna göre hasta grubunda en fazla kat değişimi gösteren lncRNA profilleri belirlendi. Ekspresyonu artan ve azalan lncRNA'ların muhtemel fonksiyonları ve tanımları *NCBI*, *Diana TOOLS*, *Lncipedia*, *LncTar*, *LCRNAbase* veritabanları kullanılarak belirlendi.

### 3.2.5 cDNA sentezi

#### 3.2.5.1 Total RNA'nın cDNA'ya çevrimi

Total RNA örnekleri EasyScript Plus cDNA Revers Transkripsiyon kiti (Applied Biological Materials) kullanılarak cDNA'ya dönüştürüldü. Reaksiyon koşulları tablo 10 ve tablo 11' de verildi.

Tablo 10. cDNA çevrimi reaksiyon koşulları 1.basamak

Bileşen	Miktar
Total RNA	1 µl
dNTP karışımı	1 µl
Random primer	1 µl
Nükleaz içermeyen su	11.5 µl
<i>Total hacim</i>	<i>14.5 µl</i>

Örnek kit protokolüne uygun şekilde 65°C'de 5 dakika inkübe edildi ve ardından hızlı bir şekilde buz üzerine alınıp 1 dakika bekletildi. İnkübasyon sonrası ayrı bir tüpte aşağıdaki karışım hazırlandı.

Tablo 11. cDNA çevrimi reaksiyon koşulları 2.basamak

Bileşen	Miktar
5x RT tampon	4 µl
Reverse Transkriptaz	1 µl
RNaz içermeyen ribonükleaz inhibitör	0.5 µl
<i>Total hacim</i>	<i>5.5 µl</i>

Reaksiyon karışımı PZR cihazında (Sensoquest) sırasıyla 25°C'de 10 dakika, 50°C'de 50 dakika ve 85°C'de 5 dakika olacak şekilde reaksiyona tabi tutuldu. Örnekler eş zamanlı polimeraz zincir reaksiyonunda kullanılabilece kadar -20°C'de saklandı.

### 3.2.6 LncRNA'ların Kantitatif Eş Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu ile Analizi

Çalışmada hazırlanan PBMC örneklerinden izole edilen total RNA'lardan mikrodizin analizi ile belirlenen lncRNA'ların primerleri tasarlandıktan sonra ilgili genlerin ekspresyon değişimleri ve lncRNA'ların ekspresyonları (Applied Biosystem) cihazında teyit/analiz edildi. Çalışma kapsamında AH ve kontrol gruplarından elde edilen cDNA örnekleri Kilogreen 2X (ABM) master mix kullanılarak ABI Step One Plus eş zamanlı PZR cihazında çoğaltıldı. Reaksiyon koşulları tablo 12' de verildi.

Tablo 12. Kantitatif Eş Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu Koşulları

Bileşen	Miktar
cDNA örneği	2 µl
KiloGreen 2X master mix	10 µl
İleri primer (Forward)	0.3 µl
Geri Primer (Reverse)	0.3 µl
RNaz içermeyen su	7.4 µl
<i>Total hacim</i>	<i>20 µl</i>

Reaksiyon döngüsü her örnek için 3 tekrarlı olacak şekilde, 95°C'de 10 dakika enzim aktivasyonu ve 40 döngü 95°C'de 15 saniye denatürasyon ve 60°C'de 60 saniye primer bağlanması ve uzaması basamaklarından oluşmaktadır.

### 3.2.7. lncRNA hedeflerinin Gen Ontoloji (GO) ve Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) yolak analizleri

Mikrodizin sonucu belirlenen lncRNA'ların fonksiyonlarını analiz etmek, hangi biyolojik süreç, moleküler işlev ve biyokimyasal yolda yer aldığını belirlemek için GO ve KEGG yolak analizleri gerçekleştirildi.

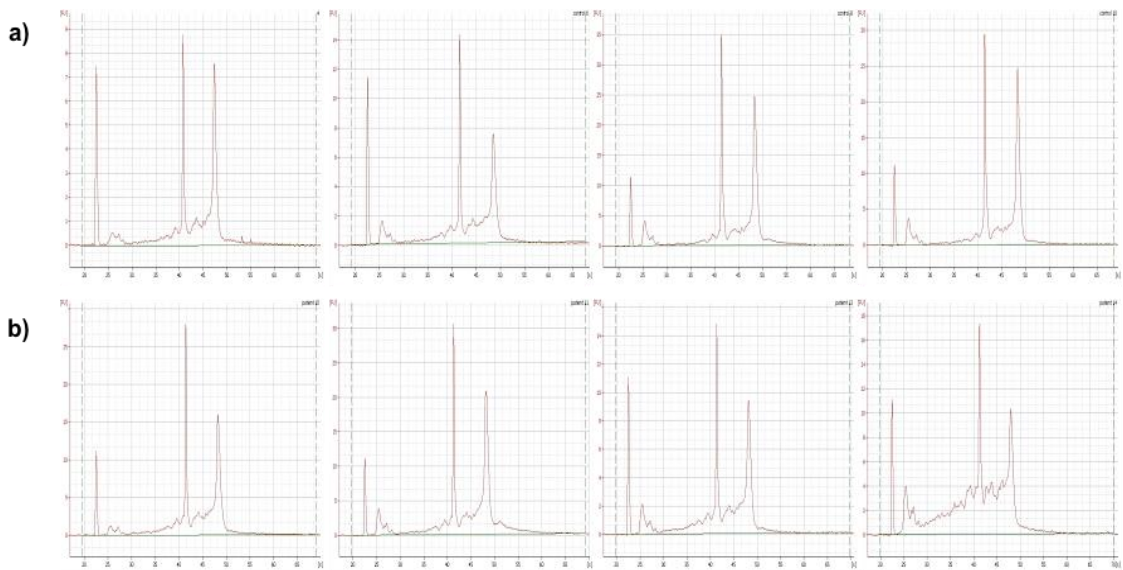
### 3.2.8 İstatistiksel Analiz

Gen ekspresyonlarının analizinde SPSS v 15.0 (Statistical Package for the Social Sciences) ve web tabanlı analiz programı olarak hizmet veren [www.sabiosciences.com](http://www.sabiosciences.com) web sitesi kullanıldı (<https://dataanalysis.sabiosciences.com/pcr/arrayanalysis.php>). Hasta ve kontrol gruplarındaki lncRNA qRT-PCR verilerinin ct değerlerinin karşılaştırılmasında; Ct istatistik yöntemi olan "2<sup>-ΔΔCt</sup>" analizi, korelasyon analizi ve student t testleri kullanıldı. Mikrodizin ve qRT-PCR sonuçlarının istatistiksel analizinde P<0,05 değeri anlamlılık seviyesi olarak kabul edildi.

## 4. BULGULAR

### 4.1 PBMC'lerden izole edilen Total RNA Örneklerinin Kalitelerinin Değerlendirmesi

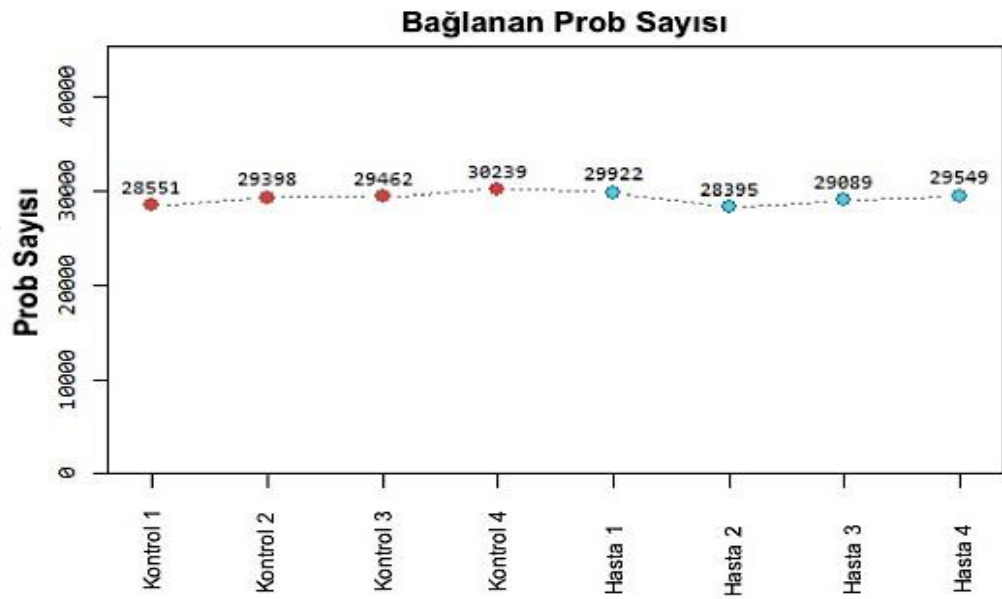
Çalışmaya dahil ettiğimiz 23 Alzheimer hastası ve 33 kontrol PBMC örneklerinden izole edilen total RNA'ların kalite ölçümleri spektrofotometrik yöntem ile Nanodrop (Maestrogen) cihazında gerçekleştirildikten sonra mikrodizin çalışması gerçekleştirildi. Ardından mikrodizin analizi uygulanacak olan 4 hasta ve 4 kontrol örneğinin total RNA kalitesi Macrogen firması tarafından "RNA Integrity Number (RIN)" değerleriyle belirlendi. Mikrodizin analizi öncesinde Agilent 2100 biyoanalizör cihazında Macrogen firması tarafından kontrol edildi (Şekil 13). RIN değeri 7'den büyük olan örnekler mikrodizin çalışması için uygun kabul edildi.



Şekil 13 Agilent 2100 Biyoanalizör RIN Değerlendirme Sonuçları a) Kontrol Grubu Örneklerinden İzole Edilen RNA'ların RIN Analizi b) Hasta Grubu Örneklerinden İzole Edilen RNA'ların RIN Analizi

#### 4.2 Mikrodizin Analizi Verilerinin Kalite Kontrolü

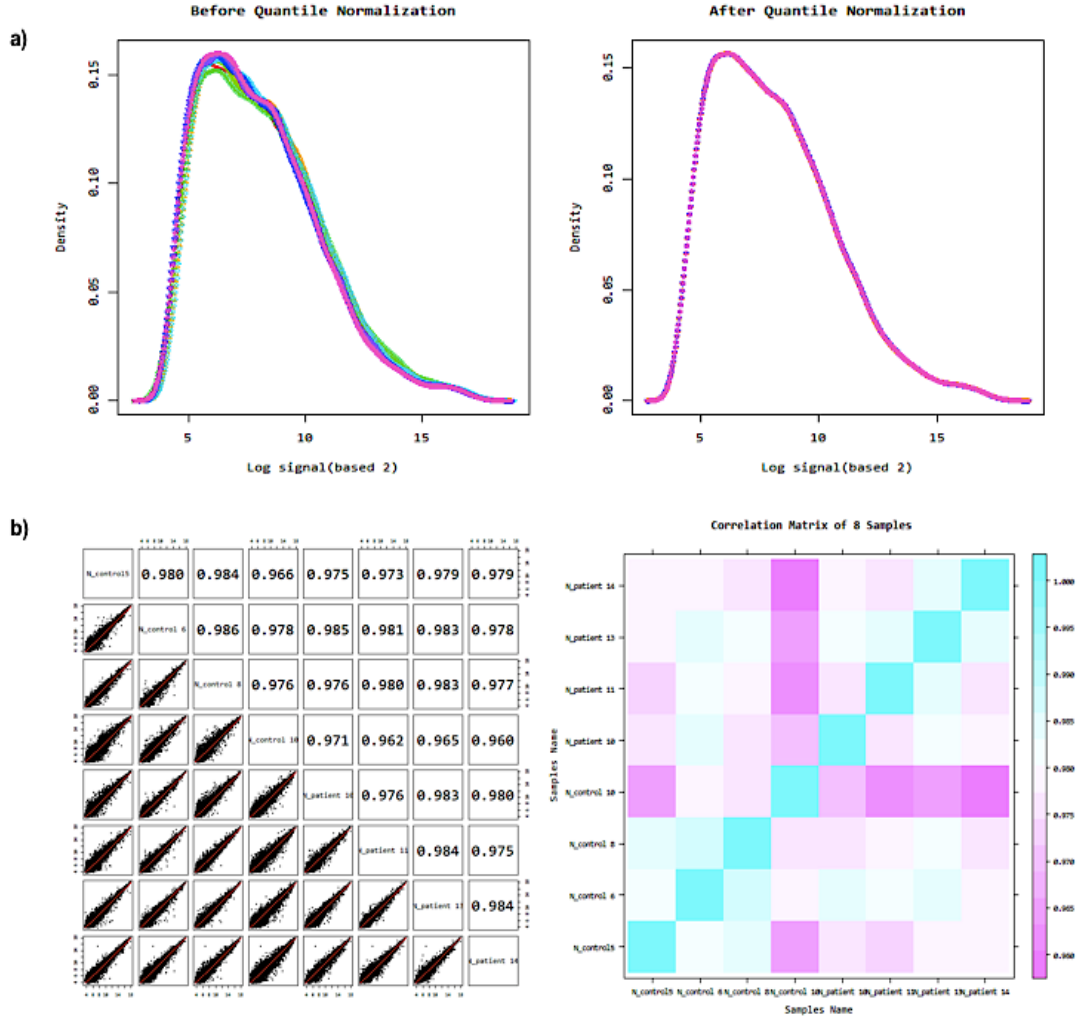
Alzheimer hasta ve kontrol grubu RNA örneklerinin analizi için kullanılan *Agilent SurePrint G3 Human 8x60k v3 Array* platformunda toplamda 26,083 adet mRNA ve 30,606 adet lncRNA spesifik prob bulunmaktadır. Çalışmada kullanılan örneklere bağlanan prob sayıları Şekil 14'te verildi.



Şekil 14 Hasta ve Kontrol Grubu Örneklerinde Bağlanan Prob Sayıları

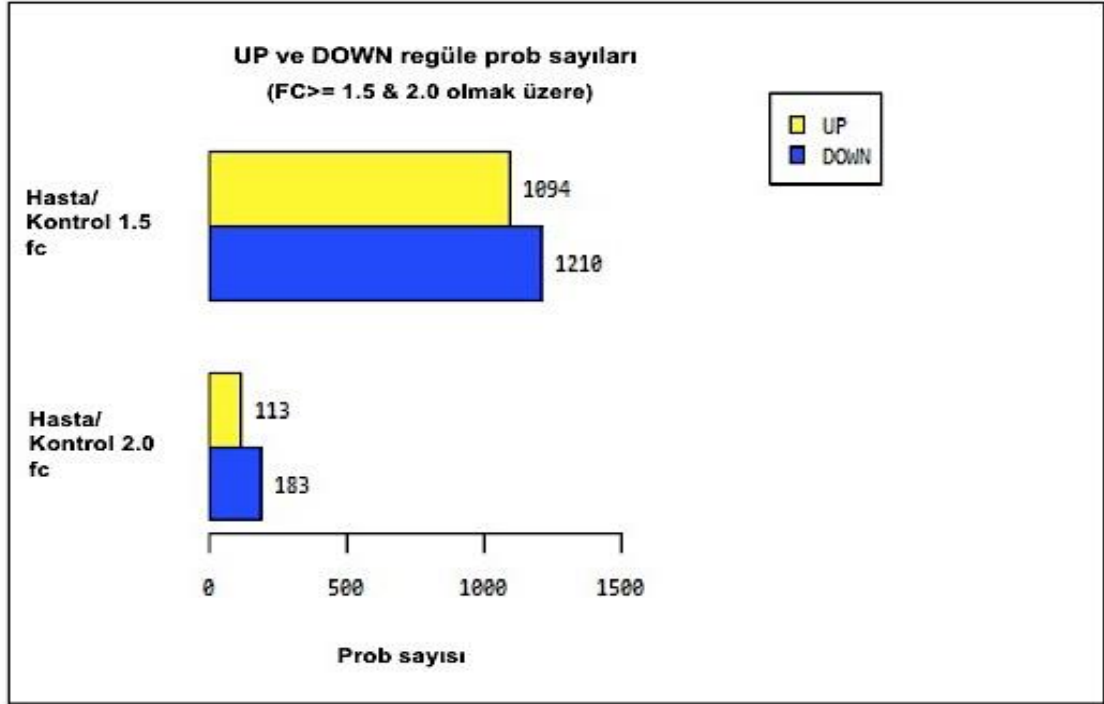
Normalize edilen problemlerin dağılımının karşılaştırılması için *density plot* analizi, Pearson korelasyon katsayısı kullanılarak örnekler arasındaki tekrarlanabilirliğin derecesini görmek için de *scatter plot* ve *level plot* analizleri gerçekleştirildi (Şekil 15a ve Şekil 15b).



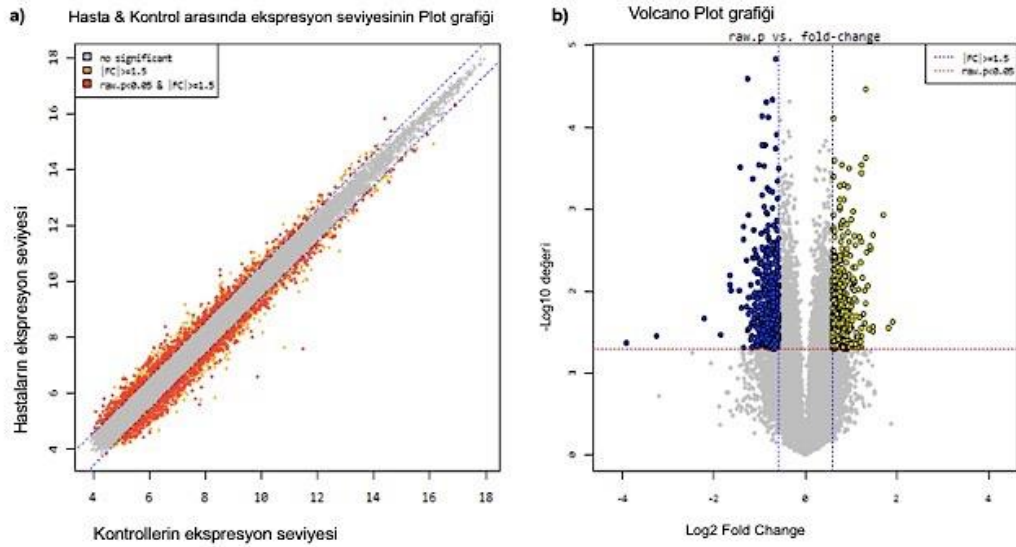


Şekil 15 Veri Kalitesinin Kontrolü a) *Density Plot* Görüntüsü b) *Scatter plot* ve *Level Plot* Analizi

Mikrodizin analizine göre kontrol grubu ile kıyaslandığında 1,5 kat ve 2 kat değişim gösteren prob sayıları Şekil 16' da gösterildi. Kat değişimi 1,5 ve üzeri kabul görmek üzere, hasta ve kontrol ekspresyon seviyeleri arasındaki ilişkinin analizi için *scatter plot* yapıldı (Şekil 17a). Kat değişimi ve  $p$  değerleri kullanılarak *volcano plot* analizi gerçekleştirildi (Şekil 17b).

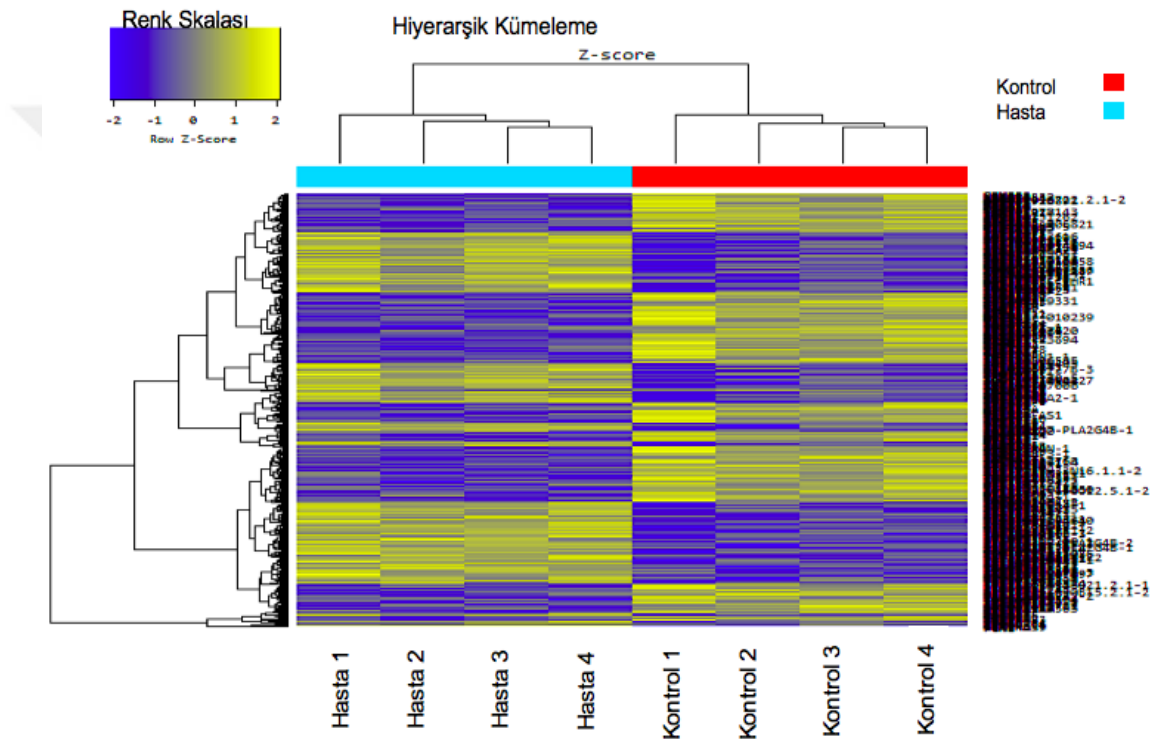


Şekil 16 Hasta Grubu Örneklerinde 1,5 ve 2 Kat Ekspresyon Değişimi Saptanan Prob Sayıları



Şekil 17a) Hasta/Kontrol Grupları Arasındaki Ekspresyon Değişiminin *Scatter Plot* ile Gösterilmesi  
b) Hasta/Kontrol Gruplarının Kat Değişimlerinin *Volcano Plot* ile Gösterilmesi

Agilent SurePrint G3 Human 8x60k v3 Array platformunda gerçekleştirilen dizi analizini takiben biyoinformatik analizi sonucu kontrol grubu örneklerine kıyasla Alzheimer hasta grubu örneklerindeki lncRNA'ların kat değişimleri hesaplandı. Örnekler arasındaki korelasyon kullanılarak, hasta ve kontrol örneklerindeki ekspresyon değişiklikleri hiyerarşik kümeleme (*heat-map*) analizi ile gösterildi (Şekil 18) (Satırlar farklı ekspresyona sahip lncRNA'ları, sütunlar hasta ve kontrol örneklerini temsil etmektedir. Renk skalası lncRNA ekspresyonunu gösterir; sarı renk *upregülasyonu* ve mavi renk *downregülasyonu* ifade etmektedir).



Şekil 18 PBMClerde Farklı Olarak Eksprese Edilen lncRNA'ların Hiyerarşik Kümeleme (*heat map*) Analizi ile Gösterilmesi

### 4.3 Mikrodizin Analizi

Çalışmamızda, mikrodizin analizi sonucunda lncRNA'ların artan ve azalan ekspresyon değişimlerini belirlemek için alt sınır -1,5 ve üst sınır 1,5 kat olarak belirlendi. Filtreleme aşamasında ekspresyon değişimleri belirlenirken, mikrodizin analizi gerçekleştirilen 4 hastanın her birinin en az bu alt ve üst sınır kat değerlerini karşılaması göz önünde bulunduruldu. Bu filtreleme kriterlerine uygun olarak Alzheimer hastalarında 31 downregüle ve 41 upregüle lncRNA saptandı. Bu lncRNA'lar ve kat değişimleri tablo 13 ve tablo 14 'te gösterildi.

**Tablo 13. Mikrodizin Analiz Sonucu Kontrollere Göre Hasta Gruplarında *downregüle* Bulunan lncRNA'lar**

<b><i>Downregüle</i> lncRNA'lar</b>	<b>Hasta 1</b>	<b>Hasta 2</b>	<b>Hasta 3</b>	<b>Hasta 4</b>
<b>LOC728763</b>	-4,124044	-1,706916	-2,648953	-1,713614
<b>lnc-CSTB-1</b>	-2,199816	-2,803456	-2,623407	-1,544451
<b>CYP1B1-AS1</b>	-1,648828	-4,310289	-1,654920	-1,607806
<b>LINC01503</b>	-2,133323	-1,752339	-1,604933	-1,614025
<b>LOC101928932</b>	-1,599950	-2,631527	-1,940211	-3,184056
<b>LINC00968</b>	-2,559330	-2,411954	-1,923300	-3,347504
<b>lnc-KDM4C-3</b>	-2,017872	-1,517820	-1,691459	-1,714362
<b>LOC100506159</b>	-7,535634	-6,028379	-10,958518	-1,856939
<b>lnc-DDX51-5</b>	-1,932987	-2,632823	-2,311075	-1,632773
<b>lnc-CD300C-2</b>	-1,519293	-2,178222	-1,943471	-1,664227
<b>lnc-ETS2-4</b>	-1,980361	-1,863993	-1,874066	-1,907603
<b>XLOC_I2_001496</b>	-1,700257	-1,859798	-1,763060	-1,610596
<b>XLOC_I2_010724</b>	-1,794043	-2,320527	-1,522560	-1,829467
<b>LOC100507639</b>	-1,547104	-1,630571	-1,808850	-5,670074
<b>LINC01504</b>	-1,877001	-2,214707	-1,771857	-1,883687
<b>LINC01272</b>	-1,648111	-1,955071	-2,604753	-1,881108

<b>LOC102724156</b>	-1,734757	-1,968293	-1,909193	-1,835638
<b>Inc-C17orf63-3</b>	-1,552261	-2,011806	-1,644822	-1,533907
<b>LOC100996425</b>	-1,995707	-2,069916	-2,293556	-1,727994
<b>Inc-LBR-1</b>	-1,993192	-1,624549	-1,572362	-1,876527
<b>Inc-PAPLN-1</b>	-1,563311	-1,523394	-1,615155	-1,577252
<b>LINC00877</b>	-1,681314	-1,833690	-2,857008	-2,055121
<b>LOC101929911</b>	-1,573140	-2,927420	-1,633190	-1,753980
<b>LOC102723894</b>	-1,651684	-4,447477	-1,840507	-1,533644
<b>Inc-RNF149-2</b>	-2,370857	-1,684194	-2,152664	-1,945090
<b>LOC101929756</b>	-1,918087	-2,605279	-1,984846	-3,061001
<b>Inc-FOX12-1</b>	-3,392823	-1,763558	-2,096741	-1,663189
<b>LOC400743</b>	-1,912760	-1,694373	-2,166438	-2,444045
<b>LOC644090</b>	-2,705299	-2,006360	-2,365269	-1,577683
<b>LOC100996405</b>	-2,861737	-2,351553	-2,096245	-1,520180
<b>LOC101927768</b>	-2,735709	-1,908118	-1,875548	-1,544190

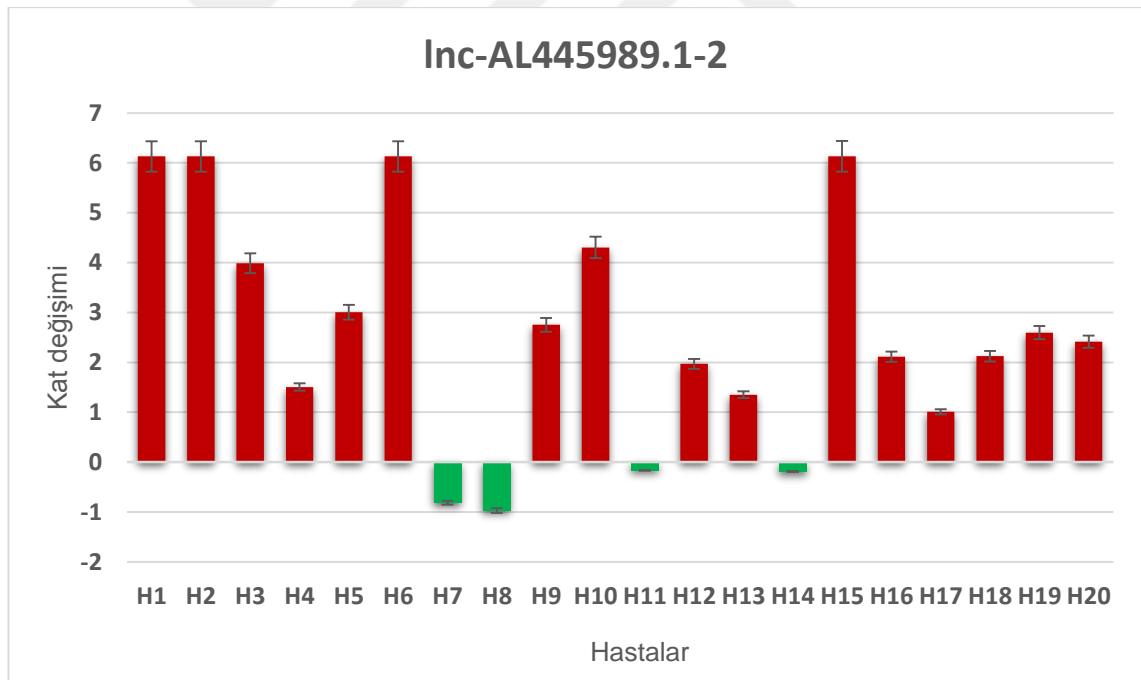
Tablo 14. Mikrodizin Analizi Sonucu Kontrollere Göre Hasta Gruplarında *upregüle* Bulunan lncRNA'lar

<i>Upregüle</i> lncRNA'lar	Hasta 1	Hasta 2	Hasta 3	Hasta 4
Inc-AL445989.1-2	1,899418	2,980903	2,966024	2,736300
LINC01420	2,106312	2,530561	2,830919	2,580135
TTC39C-AS1	4,020479	2,925936	3,232243	1,554500
LOC102725166	1,782349	1,751051	1,895494	1,763387
XLOC_I2_010558	1,698557	2,161129	1,714862	1,883672
Inc-SNURF-1	1,735363	1,640118	1,569597	1,915025
SNORD108	1,511523	2,254205	1,956978	2,863473
SNORD60	1,719888	2,163990	1,537654	2,106722
Inc-MTR-1	1,566835	1,873405	1,593019	3,887331
LOC101927156	1,780491	2,049043	1,899844	1,684023
Inc-CLVS1-1	1,765153	1,557479	1,996175	2,559009
Inc-RBM12B-2	1,969160	2,255140	1,725664	1,687938
LINC01049	1,607336	2,294057	1,581994	1,822581
LOC100506499	1,540731	1,582771	1,551501	1,616868
LOC102723354	1,671409	1,811790	1,625981	1,816384
Inc-ZNF793-1	1,911618	2,108661	2,627936	2,358020
LOC101928399	1,835564	2,533202	1,819268	1,644246
XLOC_I2_004640	1,669484	1,698467	2,017200	1,589584
LINC00342	1,733982	1,995401	1,869864	1,808917
LOC100507387	1,509215	1,663005	2,140356	4,662463
XLOC_I2_013056	2,730731	2,828431	1,602074	2,219941
Inc-TMEM18-12	1,909622	2,613329	2,010383	2,565591
LOC101928152	1,174264	2,005505	2,653685	1,677986
Inc-BID-2	1,949123	1,858211	2,046906	2,143737
Inc-C16orf13-3	1,658962	1,685956	1,631290	2,354010
HOXB-AS1	1,835078	2,425836	1,596882	1,671087

<b>Inc-CCDC68-2</b>	1,578280	2,176819	1,061341	1,797811
<b>LOC100996286</b>	3,201994	1,651166	1,591989	1,981482
<b>Inc-FLYWCH2-1</b>	1,696204	2,144776	1,887407	2,972147
<b>LINC00243</b>	1,961134	1,757680	2,099182	2,679422
<b>Inc-RASA1-3</b>	1,599820	1,536655	1,653864	3,050247
<b>Inc-RCL1-1</b>	2,057889	1,741359	1,581068	1,786605
<b>Inc-SLC36A4-1</b>	1,500812	1,591112	1,535415	2,176396
<b>LOC101929294</b>	1,955399	1,865970	1,680882	2,081096
<b>Inc-TC2N-1</b>	1,647061	1,676810	1,921979	1,614854
<b>LOC101927156</b>	1,805189	1,905664	1,986462	1,809370
<b>Inc-ZNF91-2</b>	2,762767	2,103664	2,556493	2,611204
<b>Inc-ZC3H12D-4</b>	1,526741	1,868128	1,514271	1,946948
<b>STX17-AS1</b>	1,787034	1,934072	1,515405	2,599613
<b>LOC642947</b>	1,765217	1,944902	1,534571	1,610167
<b>NPCDR1</b>	1,932223	1,586733	2,403640	7,046130

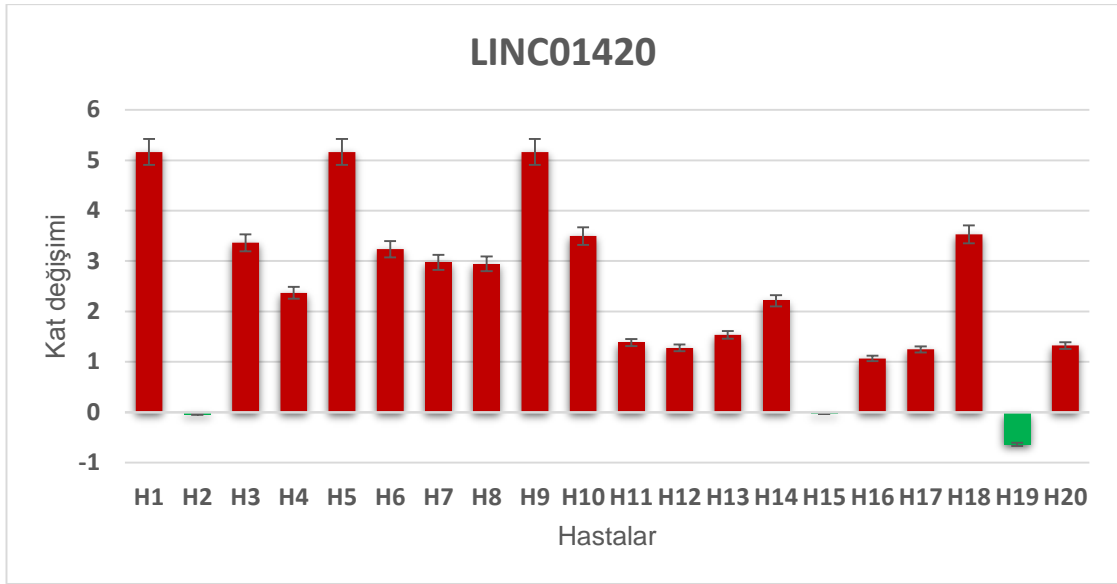
### 4.3 Ekspresyon Değişimi Saptanan lncRNA'ların qRT-PCR Yöntemi ile Validasyonu

Mikrodizin analizi sonucu ekspresyon değişimi saptanan lncRNA'lardan bazılarının validasyonu qRT-PCR yöntemi kullanılarak gerçekleştirildi. Bu aşamada artmış ekspresyon gösteren lnc-AL445989.1-2, LINC01420, TTC39C-AS1 ile azalmış ekspresyon gösteren lnc-CSTB1 ve LOC728763 lncRNA'larına özgün primerler tasarlanarak qRT-PCR yöntemi ile ekspresyon değişimleri kontrol edildi. Mikrodizin analizi ile uyumlu şekilde; hasta örneklerinde lnc-AL445989.1-2, TTC39C-AS1 ve LINC01420 lncRNA'larında artmış ekspresyon ve lnc-CSTB1 ve LOC728763'de azalmış ekspresyon saptandı. Ekspresyon değişimlerine ait grafikler şekil 19, şekil 20, şekil 21 şekil 22 ve şekil 23 'te verildi.

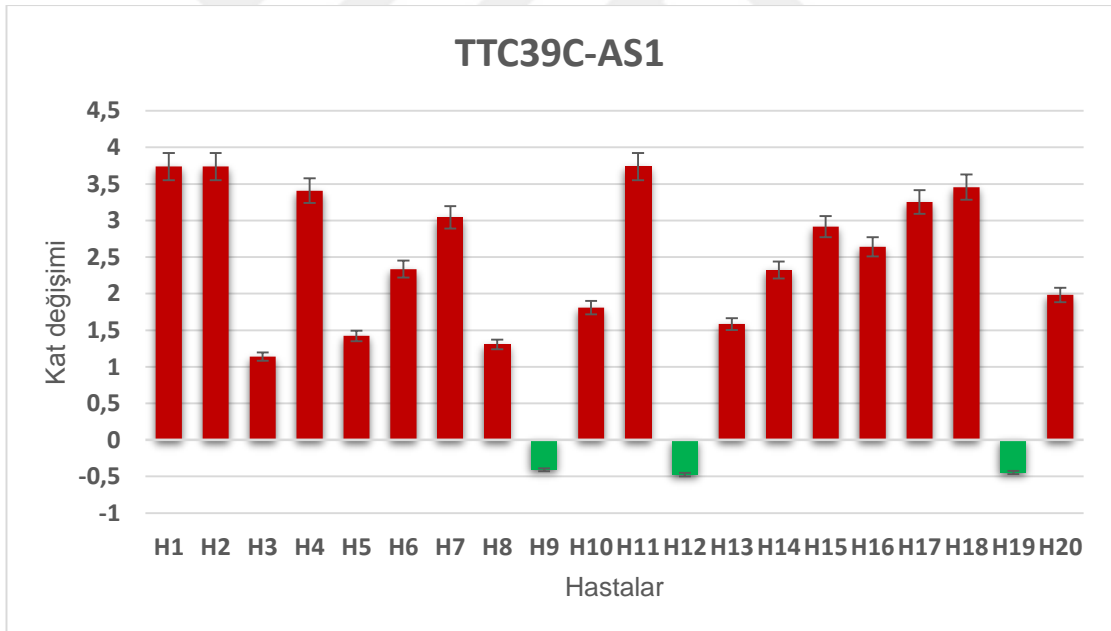


Şekil 19 qRT-PCR ile belirlenen lnc-AL445989.1-2 ekspresyonu

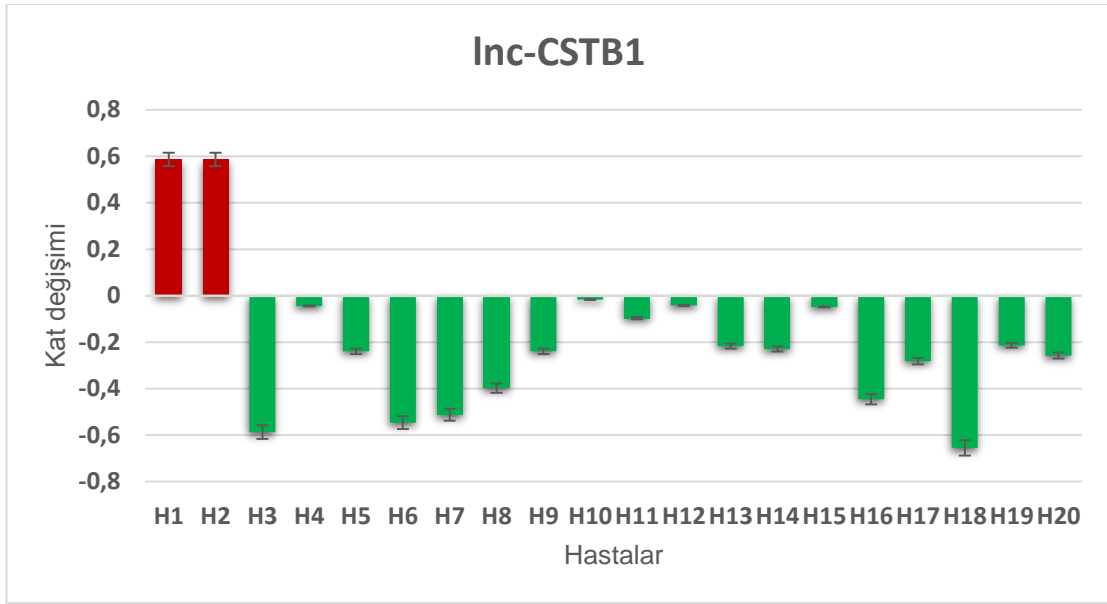




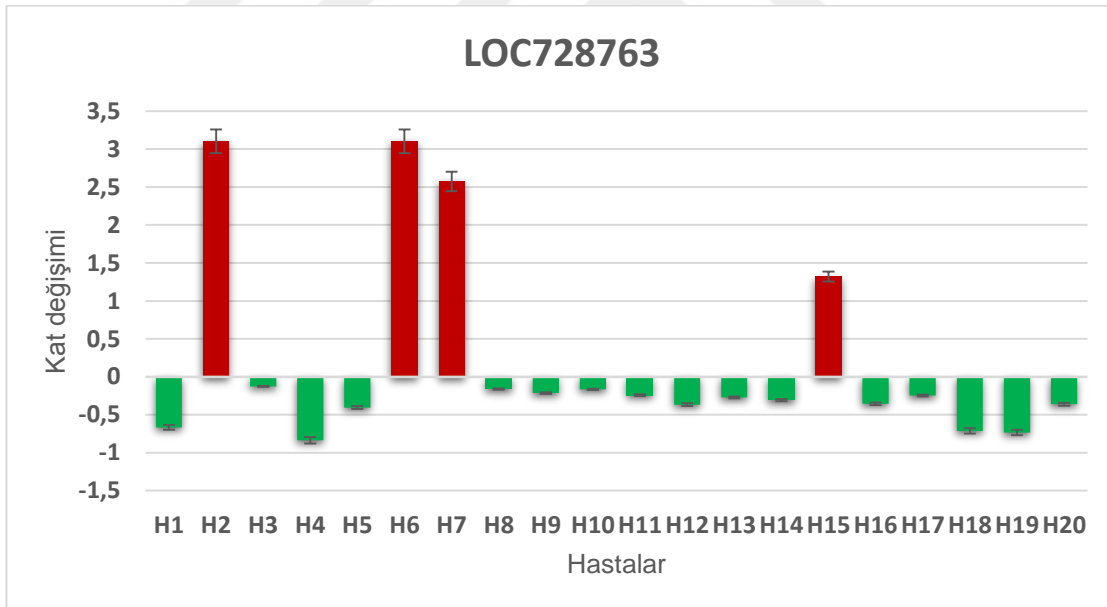
Şekil 20 qRT-PCR ile belirlenen LINC01420 ekspresyonu



Şekil 21 qRT-PCR ile belirlenen TTC39C-AS1 ekspresyonu



Şekil 22 qRT-PCR ile belirlenen Inc-CSTB1 ekspresyonu



Şekil 23 qRT-PCR ile belirlenen LOC728763 ekspresyonu

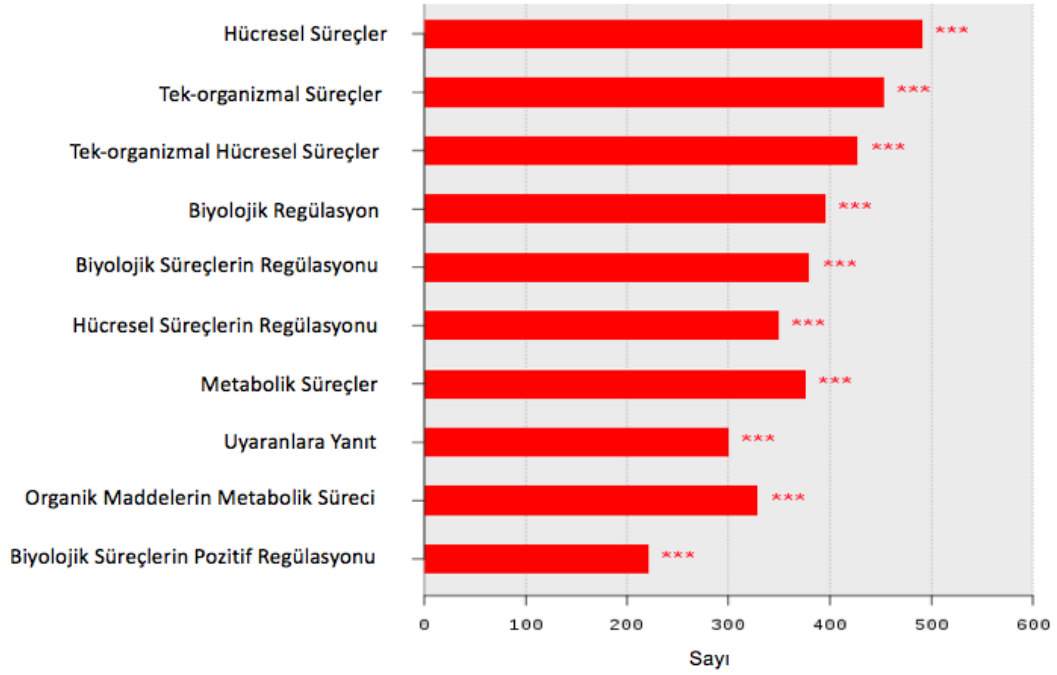
#### 4.4 Gen Ontoloji ve Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) Yolak Analizleri

Çalışmamızda farklı ekspresyon gösteren lncRNA'ların rol aldığı hücresel, biyolojik ve moleküler açıdan fonksiyonel süreçleri ortaya çıkarmak amacıyla MacroGen firması tarafından yapılan Gen Ontoloji (GO) analizi için <http://geneontology.org/> veritabanı kullanıldı. Herbir analiz için hasta ve kontrol grupları karşılaştırılarak en anlamlı farklılık gösteren 10 süreç belirlendi. Tüm analizlerde kümelerin hedeflerinin yüksek ilişkili olduğu süreçler  $p < 0.05$  değeri dikkate alınarak belirlendi.

Şekil 24'te gösterildiği üzere GO terimleri açısından değerlendirildiğinde biyolojik süreçlere göre yapılan sınıflandırmada hücresel ve metabolik; hücresel bileşenlere göre yapılan sınıflandırmada hücre, organel, hücreler arası, hücre membranı gibi bileşenler; ve moleküler fonksiyona göre yapılan sınıflandırmada ise protein, iyon, organik bileşen bağlanması, katalitik aktivite işlevleri gibi süreçler anlamlı bulundu.

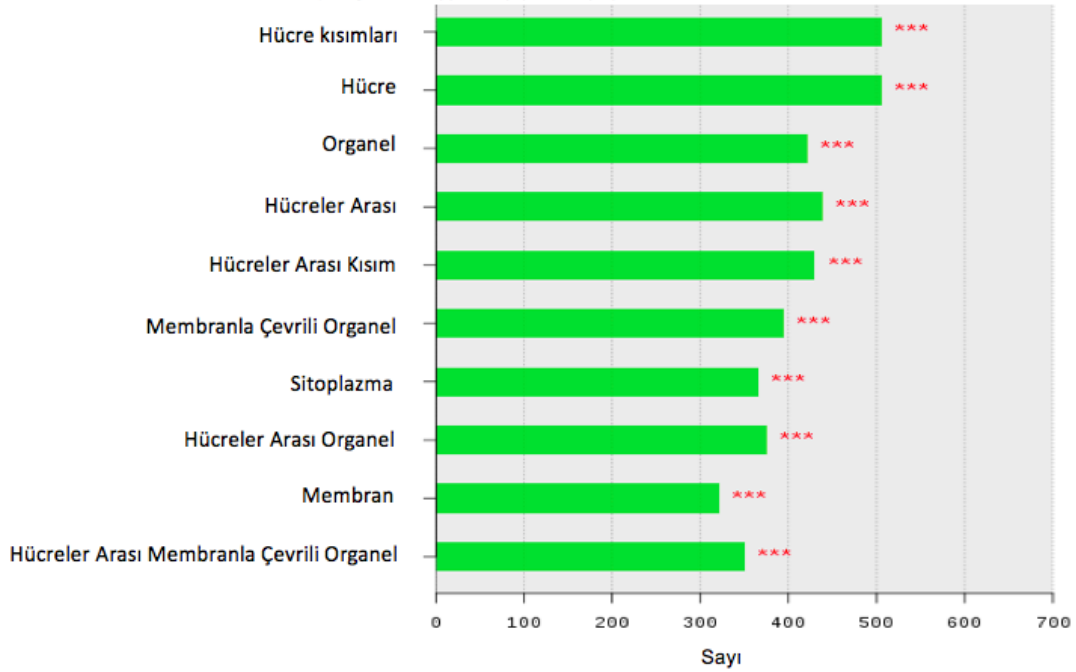
### Biyolojik Süreçler

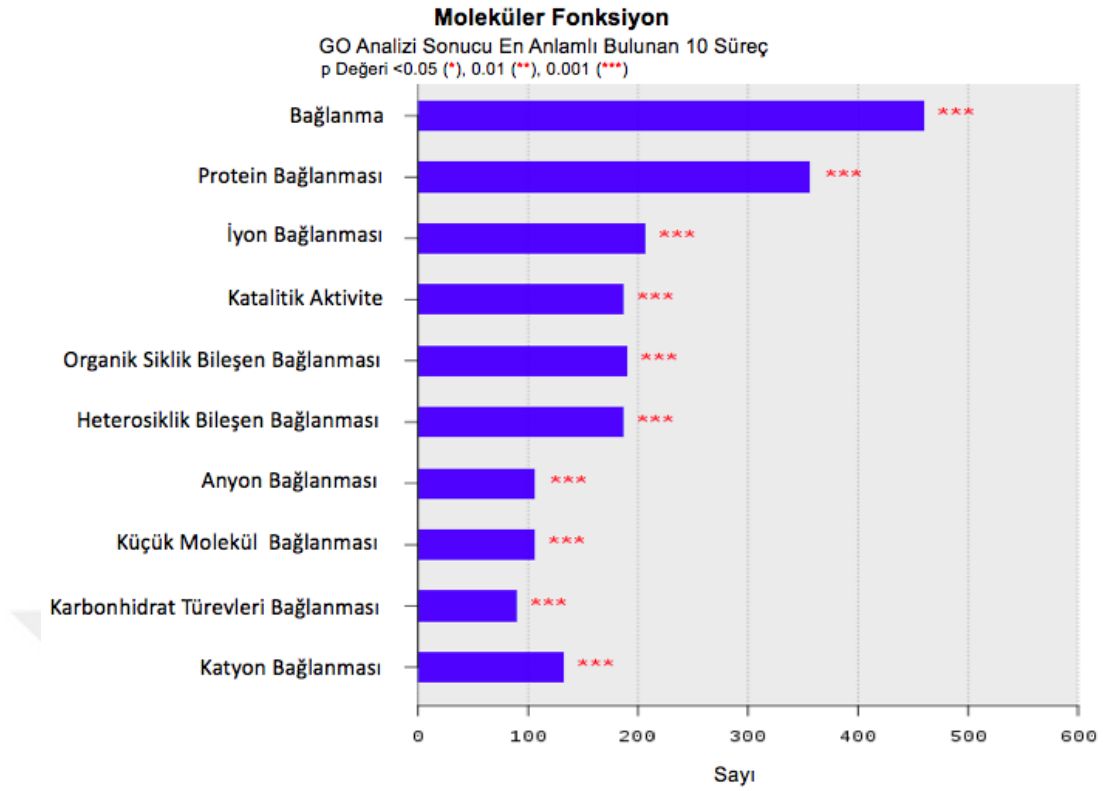
GO Analizi Sonucu En Anlamlı Bulunan 10 Süreç  
p Değeri <0.05 (\*), 0.01 (\*\*), 0.001 (\*\*\*)



### Hüresel Bileşenler

GO Analizi Sonucu En Anlamlı Bulunan 10 Süreç  
p Değeri <0.05 (\*), 0.01 (\*\*), 0.001 (\*\*\*)





**Şekil 24 Gen Ontoloji Analizi Sonucu En Çok Anlamlılık Gösteren 10 Süreç (p<0.05)**

Ekspresyon farklılığı gösteren lncRNA'ların birbirleri ile olan ilişki durumlarını incelemek üzere, <http://www.kegg.jp/kegg/pathway.html> veritabanı kullanılarak yapılan KEGG yolak analizinde ise her bir analiz için hasta ve kontrol gruplar karşılaştırıldı. Tüm analizlerin değerlendirilmesinde p<0.05 değeri anlamlı olarak kabul edildi.

KEGG analizi sonucuna göre metabolizma, hücresel ve çevresel süreçlerle insan hastalıkları ile ilişkili anlamlılık gösteren başlıca yolaklar Şekil 25'te verildi.



Şekil 25 KEGG Yolak Analizi Sonucunda Anlamlılık Gösteren Başlıca Yolaklar

## 5.TARTIŞMA

Alzheimer hastalığında lncRNA'ların tanımları, işlevleri ve etki mekanizmaları ile ilgili çalışmalar az sayıdadır. LncRNA'ların epigenetik, transkripsiyonel, post-transkripsiyonel ve gen ekspresyonunu düzenlemek gibi temel hücrel süreçlere dahil olmaları; onların hücre homeostazındaki merkezi rollerinin altını çizmiştir (Wu vd 2013). Periferik kandaki mononükleer hücrelerin bazı nörodejeneratif hastalıklardaki patogenezi yansıttığı ve LncRNA'ların doku spesifik ekspresyonları bilinmektedir. İnflamatuar sürecin yanısıra, metabolizma düzeyinde de nörodejeneratif hastalıklarda PBMC'lerin kullanımı önerilmiştir (Mandas vd 2012). Kullanılabilecek bir başka olası belirteç serebrospinal sıvı (CSF)'dir. Bu sıvının AH için özellikle A $\beta$  konsantrasyonunu ve tau proteinlerinin modifikasyonlarını saptamada duyarlı olduğu bulunmuştur. Son çalışmalar da AH beyinlerindeki patogenezi yüksek spesifikite ile yansıttığını göstermiştir. Ancak invaziv bir yöntem olan belden CSF alımı (*lumbar puncture*) ve korunması güçtür; oldukça pahalı bir yöntemdir ve rutin tanı için uygun değildir (Anoop vd 2010).

Literatür taramasında, Alzheimer hastalığında PBMC'lerde lncRNA'ları araştıran herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu çalışmada, PBMC'de profili belirlenen yeni 31 adet *downregüle*, 41 adet *upregüle* lncRNA'ların gelecekteki araştırmalara önemli katkı sağlayacağı kanısındayız. Zhou ve Xu (2015), farklı dokularda AH ile ilişkili lncRNA'ları mikrodizin analizi ile belirlemeyi amaçladıkları çalışmalarında postmortem beyin dokusuna spesifik ve çoğu intergenik olmak üzere 24 *upregüle* ve 84 *downregüle* lncRNA tespit etmişlerdir. Çalışmalarında çeşitli dokularda AH'de en çok downregüle bulunan lncRNA'ların diğer dokulara oranla beyinde daha yüksek oranda eksprese edildiğini belirtmişlerdir. Zhou ve Xu (2015) tarafından kullanılan dokular arasında PBMC bulunmaması ve belirlenen lncRNA'lardan herhangi birinin bu çalışmada anlamlı olmaması bakımından bulgularımız dikkat çekicidir.

Günümüzde, PBMC'lerde lncRNA'lar ilgili yapılan diğer çalışmalarda; kronik obstrüktif akciğer hastalığında birkaç yeni lncRNA tanımlanmış (Qu vd 2018); sistemik lupus eritematozda lncRNA MALAT'ın inflammatuar bir regülatör olabileceği öne sürülmüş (Yang vd 2017), *Dengue* hastalığında ise lncRNA NEAT1'in *downregüle* olduğu

saptanmıştır (Pandey vd 2017). Ayrıca Chen vd' nin 2016 yılında, şizofreni hastalarının PBMC'lerinde diferansiyel olarak ifade edilen lncRNA'ların sistematik olarak belirlenmesini kapsayan çalışmalarında lncRNA NONHSAT089447, NONHSAT021545 ve NONHSAT041499'un şizofrenide belirgin şekilde *downregüle* olduğunu ve NONHSAT089447 ve NONHSAT041499'un da *upregüle* olduğunu saptamışlardır.

AH ile ilgili gen ekspresyon çalışmalarında ise, Schipper vd (2007), ekspresyonu artan miRNA'ların, hem AH beyinlerinde hem de periferik dokularda spesifik mRNA türlerinin baskılanmasından sorumlu olabileceğini varsayarak yaptıkları çalışmada, hafif sporadik AH ve yaşla uyumlu sağlıklı kontrollerden elde edilen mononükleer hücrelerde, 462 insan miRNA'sını (let-7 ailesinden miR-663'e) taramışlar ve sonuç olarak sporadik AH'de mononükleer hücrelerin miRNA'larının deregülasyonlarının, AH patogeneze ışık tutabileceğini ve muhtemel tanılal /prognostik biyobelirteçleri olabileceğini öngörmüşlerdir. Bulgulara göre, Alzheimer hastalarının PBMC'lerinde değişen miRNA ekspresyon profillerinin, klinik fenotip ile ilişkilerinin ve hüresel patogenezdaki potansiyel rollerinin olduğu sonucu çıkmaktadır (Ren vd 2016). Başka bir çalışmada ise Alzheimer hastalığına sahip bireylerin PBMC'lerinde pCREB ekspresyonunun azaldığını ve ek olarak, PBMC' deki pCREB seviyelerinin AH' li kişilerin postmortem beyinlerindeki pCREB ekspresyonu ile pozitif ilişkili olduğunu göstermişlerdir. Bu sonuçlar, PBMC' deki pCREB ekspresyonunun aynı zamanda beyindeki ekspresyonunun da göstergesi olabileceğini ve dolayısıyla AH'de kognitif fonksiyon ve hastalık progresyonunun bir biyobelirteci olarak pCREB'in kullanılabilceğini işaret etmektedir (Bartolotti vd 2016).

Alzheimer hastalığında nörofibriler yumaklar ve amiloid plakların yanı sıra beyinde merkezi ve periferik sistemlerde inflamatuvar bir süreç söz konusudur. Periferik kan mononükleer hücreleri (PBMCs) normal bağışıklık sisteminin bir parçası olarak merkezi sinir sistemi (CNS)'e ulaşabilmektedir. Son gelişmeler, nörodejeneratif hastalıklarda CNS hasarının onarımında PBMC'lerin kullanılabilceğini göstermektedir (Togo vd 2002, Julian vd 2015). Pani vd (2009) ise, Alzheimer hastalarından ve birinci derece akrabalarından alınan plazma ve PBMC'lerde lipid metabolizmasını analiz etmişler; PBMC' lerde kolesterol ester metabolizmasının *ex vivo* olarak değerlendirmişler ve PBMC'leri kolay ve hızlı bir şekilde gerçekleştirilebilen güvenilir bir analiz ile AH teşhisine destek olabilecek faydalı bir biyokimyasal araç olarak tanımlamışlardır. Diğer araştırmalara bakıldığında; Alzheimer hastalarından elde edilen kültüre edilmiş üç boyutlu (3D) nöronların ve postmortem beyin dokularının proteomik analizi için oluşturdukları platformda indüklenmiş pluripotent kök hücre hatları oluşturabilmek için Periferik kan mononükleer hücreleri (PBMC) kullanılmıştır (Chen vd 2018). Julian vd



(2015)' nin, plazma ve periferik kan mononükleer hücrelerde (PBMC) periferik inflamatuvar parametre düzeylerinin, AH tanısı sırasında bilişsel durumla ilişkili olup olmadığını belirlemeyi amaçladıkları çalışmalarında, AH patogenezinde rol alan sitokinleri PBMC'lerde de saptamışlardır.

Şimdiye kadar AH'da postmortem beyin dokusu ile yapılan çalışmalarda ise kesin olmamakla birlikte hastalıkla ilişkili birkaç lncRNA tanımlanmıştır (Faghihi vd 2008, Airavaara vd 2011, Magistri vd 2015, Zhang vd 2017). Gu vd 'nin (2018) yaptığı bir çalışmada lncRNA EBF3-AS'nin, APP/PS1 transgenik fare modellerinde beyin hipokampus bölgesinde *upregüle* olduğu bulunmuş, SH-SY5Y nöroblastoma hücre hatları ile oluşturulan *in vitro* modelde ise bu lncRNA'nın *upregüle* olduğu doğrulanmış ve nöronal apoptozu indüklediği sonucuna varılmıştır. PBMC'lere ile ilgili literatür taramasında EBF3-AS ait bir çalışmaya rastlanmadı ve çalışmamızda EBF3-AS ile ilgili dramatik bir değişim de saptanmadı. Magistri vd (2015) tarafından EBF3-AS beyin farklı bölgelerde ekspresyonu değişen transkriptlerden biri olarak tanımlanarak qRT-PCR ile ekspresyonu doğrulanmış ve LOAD ile ilişkilendirilmiştir. Cosentino vd, 2009 yılında yaptıkları bir araştırmada sağlıklı bireylerden ve Alzheimer hastalarından PBMC' de bazı apoptotik proteinlerin (Bcl-2, Bax ve kaspaz-3) ekspresyonunu araştırmışlar, AH olan kişilerde apoptoza bağlı proteinlerin PBMC'lerdeki ekspresyonu açısından sağlıklı kontrollerden farklı olabileceği konusunda bir kanıt bulunamamıştır. Ancak yine de özellikle apoptoz yolaklarının AH nöronlarındaki gibi bir süreçte aktive olduklarını genellemek için daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır.

İlk kez Mandas vd (2012), Alzheimer hastalarından elde edilen PBMC'lerde kolesterol ve amiloidojenik yolak ile ilişkili genlerin değişen ekspresyon profillerini rapor etmiş ve ileri çalışmalar için PBMC'de kolesterol homeostazı ve APP süreci ile ilişkili genlerin ekspresyonlarını, AH riskini değerlendirmek için olası biyobelirteçler olarak önermişlerdir. Bu çalışmada, PBMC'lerden AH için incelediğimiz lncRNA profillerinin KEGG analizi ile değerlendirilmesi sonucu Mandas ve arkadaşlarının (2012) sonucuyla uyumlu olarak Alzheimer hastalarında metabolik yolaklarla anlamlı ilişkisini saptadık.

Homosistein, sülfür içeren bir amino asittir ve metionin yolunun bir metabolitidir. Metionin, purin ve timidilat döngüleri arasındaki ilişkiler; DNA, nörotransmitterler, fosfolipitler ve miyelin sentezinde kritik rol oynayan karbon metabolizmasını oluşturur. Alzheimer hastalığı ile yapılan deneysel modeller ile ilgili çalışmalarda, farelerde metiyonin takviyesinin, beyinde nörotoksisite, artmış tau fosforilasyon seviyeleri, çoğalmış amiloid- $\beta$  peptidleri ve hafıza kaybına neden olduğunu göstermiştir (Dayon vd 2017).

Çalışmamızda metabolik yollar arasında karbon metabolizması başta olmak üzere aminoasit biyosentezi, glukoz, mannoz, galaktoz degradasyonu ve sülfür metabolizmasına ilişkin yollar belirgin şekilde anlamlı bulundu. Bir çalışmada (Fuso ve Scarpa 2011) Alzheimer hastalığının multifaktöriyel olan geç başlangıçlı formlarında, toksik homosisteinin etkilediği olası yollar olarak, oksidatif stres ve nörotoksisite, kolesterol ve lipitlerdeki değişimler, metilasyon ile protein fonksiyonunun bozulması ve DNA metilasyonu ile gen ekspresyonunun deregülasyonu gibi mekanizmaların rol aldığı bildirilmiştir. Ayrıca LOAD stresi ve epigenetik arasındaki bağlantıların, karbon metabolizması değişikliğine bağlı olarak metilasyon homeostazının bozulmasında ana faktör olduğuna değinilmiştir. Bu bilgilerden yola çıkarak, çalışmamızda anlamlı bulunan karbon ve aminoasit metabolizması ile ilişkili yolların literatürü desteklediğini düşünmekteyiz.

Çalışmamızda anlamlı bulunan diğer yollar arasında Ras, Rap1, MAPK, GSK yolları bulunmaktadır. Kirouac vd'nin 2017'de yaptıkları bir çalışmada, APP ekspresyonunun ve oligomerik A $\beta$  -42'ye nöronal maruziyetin, Ras/ERK sinyalleşme kaskadı ile glikojen sintaz kinaz-3 (GSK-3) aktivasyonunu arttırdığını göstermektedir. Sitoplazmik alanda treonin aminoasidindeki APP fosforilasyonunun, Alzheimer hastalığında toksik yol olan  $\beta$ -sekretaz ile proteolizi arttırdığı gösterilmiştir. GSK-3, JNK, ERK, CDK5, CDK4 ve CDC2 gibi kinazların APP üzerindeki bu bölgeyi fosforile ettiğinin gösterilmesi çalışmamızı desteklemektedir. Mora vd (2013) yaptıkları bir araştırmada RTK/Ras/MAPK kaskadını, APP geninin transkripsiyon regülatörü olarak güçlü bir aday olarak belirtmişlerdir. Ancak, bu kaskadın Alzheimer hastalığı ile ilişkisi spekülatiftir. Alzheimer hastalığının patojenik kökeninin, oligomer agregatlarında  $\beta$ -amiloid birikimi ile oluşturulan nörotoksik bir ortam olduğu düşünülürse, bu yolağın APP genini etkilemesi oldukça önemlidir. Çalışmamızda anlamlı olan Ras/MAPK yolağını hedef alan lncRNA'ları belirleyecek ileri bir çalışmanın literatüre oldukça katkı sağlayabileceğini düşünmekteyiz.

Lizozomal sistem, beyin hastalarının postmortem örneklerinde yapılan önceki deneylerin de gösterdiği gibi Alzheimer hastalarının beyinde oldukça aktiftir. Emiliani vd'nin 2013 yılında yaptığı bir çalışmada, sporadik veya ailesel formlardan etkilenen Alzheimerli hastalardan alınan deri fibroblastlarında lizozomal glikozhidrolazların (a-D-mannosidaz,  $\beta$ -D-heksosaminidaz ve  $\beta$ -D-galaktosidaz) upregülasyonunun gerçekleştiğine dair kanıtlar sunulmaktadır. Çalışmada onkogen Ras'ın enzimatik aktivitenin düzenlenmesinde rol oynadığı ve AH fibroblastlarında MAPK aktivasyonunun artışı olmaksızın Ras transkriptlerinin ve Ras proteininin artışı saptanmıştır. Normal veya AH fibroblastlarında yapısal olarak aktif olan Ras formunun yüksek seviyelerinin,

glikohidrolazları upregülasyonuna neden olduğu belirtilmiştir. Ayrıca araştırmacılar glikozhidrolazların upregülasyonunun yanı sıra Ras upregülasyonunu, AH'nin erken belirteçleri olarak tanımlamışlar, periferik düzeyde tespit edilebildiği ve tanısal amaçlarla kullanılması için iyi adayların olduğu da belirtmişlerdir. Yapmış olduğumuz çalışmada Ras yolağının yanısıra katabolizma ile ilişkili yollarda lizozomal, fagozomal yollar anlamlı bulundu.

Çalışmamızda mikrodizin analizi sonucunda anlamlı şekilde *upregüle* bulunan Inc-SNURF1 ile ilgili literatür taradığımızda, bir çalışmada (Zhao vd 2015), tumor nekroz faktör (TNF) aracılı sinyal yolağını regüle ederek prostat kanserlerinde güçlü bir şekilde ilişkili olduğu saptanmıştır. Bu çalışmayla uyumlu olarak Inc-SNURF1 ile TNF sinyal yolağı arasındaki bağlantı, yapmış olduğumuz kat değişimi analizi ve KEGG analizimizde istatistiksel olarak anlamlı bulundu. Bu bakımdan, Inc-SNURF'in AH PBMC'lerinde de TNF yolağını etkileyerek patogeneze katılabileceğini düşünmekteyiz.

Bu çalışmada, LINC01503 *downregüle* ve PI3K/AKT yolağı da KEGG analizinde istatistiksel olarak anlamlı bulundu ( $p < 0.01$ ). Kıyaslama yapıldığında Alzheimer hastalığının; P53, östrojen, nörotrofinler ve TNF alfa, PI3K/AKT/MTOR yolları gibi birçok açıdan kanserler ile zıt bir ilişkiye sahiptir. PI3K/AKT/mTOR yolağının aşırı aktivasyonunun Alzheimer'de nöroprotektif aktiviteye sahipken birçok kanser türünde kötü prognoza neden olduğu bilinmektedir (Shafi 2016). Çalışmamızda mikrodizin analizinde anlamlı şekilde *downregüle* bulunan LINC01503'nin; Xie vd 'nin (2018) yaptığı bir çalışmada, skuamoz hücre karsinomlarında overekspresyon olarak kanser proliferasyonunda hayati önem taşıyan PI3K/AKT ve ERK yollarını regüle ettiği ve bu yolla kanser gelişimine katkıda bulunduğu gösterilmiştir. Tüm bu çalışmalar bulgularımızı doğrular niteliktedir. Ancak yeni araştırmalarla lncRNA LINC01503'in ekspresyonu doğrulanarak PI3K/AKT yolağında etkisinin olup olmadığı araştırılabilir.

Çalışmamızda TRAF3IP2-AS1 anlamlı bir şekilde *upregüle* bulundu. TRAF3IP2-AS1 (*tumor necrosis factor receptor-associated factor 3-interacting protein 2- antisense transcript 1*) TRAF3IP2 geninin bir komplementidir ve nükleer lokalizasyona sahiptir. Kokain bağımlıları ve kontrol örneklerinin postmortem orta beyin dokuları ile yapılan bir çalışmada (Bannon vd 2015), TRAF3IP2-AS1 transkriptinin TRAF3IP2 gen ekspresyonu üzerindeki epigenetik bir etkisi olduğu belirtilmiştir. Bu transkriptin bipolar bozukluk ve şizofreni gibi nöropsikiyatrik hastalıklar ile ilişkili genlerde regülatör işlevi olduğunun gösterilmesi (Morelli 2000, Fabbri ve Serretti 2016) ve bizim çalışmamızda KEGG analizi sonucu lncRNA'ların sinir sisteminde glutamerjik, dopaminerjik, kolinerjik sinapslar; GABA ve nörotrofin sinyal yolları ile belirgin şekilde ilişkili olduğunun saptanması, bu

lncRNA'nın tek başına daha ileri araştırmalar yapılarak AH'de yol gösterici olabileceğini dūřündürmektedir.



## 6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Alzheimer hastalığı hızla ve dramatik bir şekilde artmaktadır ve etkili bir tedavisi henüz yoktur. Günümüzde lncRNA'ların; epigenetik, transkripsiyonel, post-transkripsiyonel ve gen ekspresyonunun düzenlenmesi gibi temel hücresel süreçlerdeki önemi vurgulanmaktadır. Periferik kandaki mononükleer hücrelerde doku spesifik bazı lncRNA ekspresyonları nörodejeneratif hastalıklardaki patogenezi yansıtabilir, tedavi ve tanıya yardımcı olabilir.

Alzheimer hastalığında PBMC'lerinde lncRNA profillerini araştıran bu çalışmada;

- PBMC'de yeni 31 adet *downregüle*, 41 adet *upregüle* lncRNA'ların profili belirlendi.
- Mikrodizin analizinde belirlenen lnc-AL445989.1-2, LINC01420, TTC39C-AS1, lnc-CSTB1 ve LOC728763 gen ekspresyonları qRT-PCR ile doğrulandı.
- PBMC'lere ile ilgili literatür taramasında EBF3-AS ait bir çalışmaya rastlanmadı. Çalışmamızda EBF3-AS ile ilgili bir değişim de saptanmadı.
- AH PBMC lncRNA profilleri KEGG analizi ile değerlendirildiğinde; AH lncRNA profillerinin metabolik yollarla anlamlı ilişkisi belirlendi.
- lnc-SNURF1 ile TNF sinyal yolağı arasındaki bağlantı, yapmış olduğumuz kat değişimi analizi ve KEGG analizimizde istatistiksel olarak anlamlı bulundu. Bu bakımdan, lnc-SNURF'in AH PBMC'lerinde de TNF yolağını etkileyerek patogeneze katılabileceği düşünüldü.
- LINC01503 *downregüle* ve PI3K/AKT yolağı da KEGG analizinde istatistiksel olarak anlamlı bulundu. PI3K/AKT/mTOR yolağının aşırı aktivasyonunun Alzheimer'de nöroprotektif aktiviteye sahipken birçok kanser türünde kötü prognoza neden olduğu bilinmektedir. Yeni araştırmalarla lncRNA LINC01503'in ekspresyonu doğrulanarak; PI3K/AKT yolağında etkisinin olup olmadığının araştırılması önem taşımaktadır.
- TRAF3IP2-AS1 transkriptinin TRAF3IP2 gen ekspresyonu üzerindeki epigenetik bir etkisi olduğu bilinmektedir. Bu çalışmada, KEGG analizi sonucu lncRNA'ların sinir sisteminde glutamerjik, dopaminerjik, kolinerjik sinapslar; GABA ve

nörotrofin sinyal yolları ile belirgin şekilde ilişkili olduğu saptandı. Bu konuda TRAF3IP2-AS1 lncRNA ile yapılacak farklı araştırmaların AH'de yol gösterici olabileceği düşüncesindeyiz.

- Ayrıca AH özellikle apoptoz yolları ile ilgili süreçlerin de aktive olup olmadıklarını belirlemek için daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır.



## KAYNAKLAR

Airavaara M, Pletnikova O, Doyle ME, Zhang YE, Troncoso JC, Liu QR. Identification of novel GDNF isoforms and cis-antisense GDNFOS gene and their regulation in human middle temporal gyrus of Alzheimer disease. **J Biol Chem** 2011;286(52):45093-102.

Akiyama H, Barger S, Barnum S, Bradt B, Bauer J, Cole GM, Cooper NR, Eikelenboom P, Emmerling M, Fiebich BL, Finch CE, Frautschy S, Griffin WS, Hampel H, Hull M, Landreth G, Lue L, Mrak R, Mackenzie IR, McGeer PL, O'Banion MK, Pachter J, Pasinetti G, Plata-Salaman C, Rogers J, Rydel R, Shen Y, Streit W, Strommeyer R, Tooyoma I, Van Muiswinkel FL, Veerhuis R, Walker D, Webster S, Wegrzyniak B, Wenk G, Wyss-Coray T. Inflammation and Alzheimer's disease. **Neurobiol Aging** 2000;21(3):383-421.

Akkaya ZY, Dinçer P. Tedavi yaklaşımlarında yeni bir dönem: Kodlamayan RNA'lar ve hastalıklar. **MMJ** 2013; 26:5-10.

Akman HB, Bensan AE. Noncoding RNAs and cancer. **Turk J Biol** 2014;38(6):817-828.

Arosio B, D'Addario C, Gussago C, Casati M, Tedone E, Ferri E, Nicolini P, Rossi PD, Maccarrone M, Mari D. Peripheral blood mononuclear cells as a laboratory to study dementia in the elderly. **Biomed Res Int** 2014;169203.

Ayers D. Long Non-Coding RNAs: Novel Emergent Biomarkers for Cancer Diagnostics. **Journal of Cancer Research and Treatment** 2013;1(2):31-35

Ayupe AC, Tahira AC, Camargo L, Beckedorff FC, Verjovski-Almeida S, Reis EM. Global analysis of biogenesis, stability and sub-cellular localization of lncRNAs mapping to intragenic regions of the human genome. **RNA Biol** 2015;12(8):877-92.

Bannon MJ, Savonen CL, Jia H, Dachet F, Halter SD, Schmidt CJ, Lipovich L, Kapatos G. Identification of long noncoding RNAs dysregulated in the midbrain of human cocaine abusers. **J Neurochem** 2015;135(1):50-9.

Bär C, Chatterjee S, Thum T. Long Noncoding RNAs in Cardiovascular Pathology, Diagnosis, and Therapy. **Circulation** 2016;134(19):1484-1499.

Bassil N, Grossberg GT. Evidence-based Approaches to Preventing Alzheimer's Disease. **Primary Psychiatry** 2009;16(6):29-37.

Batista PJ, Chang HY. Long noncoding RNAs: cellular address codes in development and disease. **Cell** 2013; 152:1298–1307.

Bayoğlu B, Cengiz M. The Roles of the Long Non-Coding RNA Transcripts in Cardiovascular Diseases. **Bezm Science** 2017; 5:74-9.

Bayoumi AS, Aonuma T, Teoh JP, Tang YL, Kim IM. Circular noncoding RNAs as potential therapies and circulating biomarkers for cardiovascular diseases. **Acta Pharmacol Sin** 2018;1671-4083/18.

Beckedorff FC, Amaral MS, Deocesano-Pereira C, Verjovski-Almeida S. Long non-coding RNAs and their implications in cancer epigenetics. **Biosci Rep** 2013;33(4).

Benveniste EN, Nguyen VT, O'Kecfe GM. Immunological aspects of microglia: relevance to Alzheimer's disease. **Neurochem Int** 2001; 39:381-91.

Bird TD, Miller BL. Alzheimer's disease and other dementias. In: Kaspar DL **Harrison's Principles of Internal Medicine** 2005:2393-2406.

Kucheryavykh LY, Dávila-Rodríguez J, Rivera-Aponte DE, Zueva LV, Washington AV, Sanabria P, Inyushin MY. Platelets are responsible for the accumulation of  $\beta$ -amyloid in blood clots inside and around blood vessels in mouse brain after thrombosis. **Brain Res Bull** 2017; 128:98-105.

Breyhan H, Wirths O, Duan K, Marcello A, Rettig J, Bayer TA. APP/ PS1KI bigenic mice develop early synaptic deficits and hippocampus atrophy. **Acta Neuropathol** 2009;117(6):677–685.

Brunden KR, Trojanowski JQ, Lee VM. Advances in tau-focused drug discovery for Alzheimer's disease and related tauopathies. **Nat Rev Drug Discov** 2009;8(10):783-93.

Cankurtaran M, Yesil Y, Kuyumcu ME, Oztürk ZA, Yavuz BB, Halil M, Ulger Z, Cankurtaran ES, Arioğul S. Altered levels of homocysteine and serum natural antioxidants links oxidative damage to Alzheimer's disease. **Alzheimers Dis** 2013;33(4):1051-8.

Chen M, Lee HK, Moo L, Hanlon E, Stein T, Xia W. Common proteomic profiles of induced pluripotent stem cell-derived three-dimensional neurons and brain tissue from Alzheimer patients. **J Proteomics** 2018; 182:21-33.

Chen S, Sun X, Niu W, Kong L, He M, Li W, Zhong A, Lu J, Zhang L. Aberrant Expression of Long Non-Coding RNAs in Schizophrenia Patients. **Med Sci Monit** 2016; 22:3340-51.

Chew CL, Conos SA, Unal B, Tergaonkar V. Noncoding RNAs: Master Regulators of Inflammatory Signaling. **Trends Mol Med** 2018 Jan;24(1):66-84.

Ciarlo E, Massone S, Penna I, Nizzari M, Gigoni A, Dieci G, Russo C, Florio T, Cancedda R, Pagano A. An intronic ncRNA-dependent regulation of SORL1 expression affecting A $\beta$  formation is upregulated in post-mortem Alzheimer's disease brain samples. **Dis Model Mech** 2013;6(2):424–433.

Corder EH, Saunders AM, Strittmatter WJ. Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families. **Science** 1993;261(5123):921–923.

Cosentino M, Colombo C, Mauri M, Ferrari M, Corbetta S, Marino F, Bono G, Lecchini S. Expression of apoptosis-related proteins and of mRNA for dopaminergic receptors in peripheral blood mononuclear cells from patients with Alzheimer disease. **Alzheimer Dis Assoc Disord** 2009;23(1):88-90.



Cruts M, Theuns J, Van Broeckhoven C. Locus-specific mutation databases for neurodegenerative brain diseases. *Hum Mutat* 2012;33(9):1340–1344.

Cummings JL. Alzheimer's disease. *N Engl J Med* 2004; 351:56.

Eckert A, Oster M, Zerfass R, Hennerici M, Müller WE. Elevated levels of fragmented DNA nucleosomes in native and activated lymphocytes indicate an enhanced sensitivity to apoptosis in sporadic Alzheimer's disease. Specific differences to vascular dementia. *Dement Geriatr Cogn Disord* 2001;12(2):98-105.

Deng Y, Xiao L, Li W, Tian M, Feng X, Feng H, Hou D. Plasma long noncoding RNA 51A as a stable biomarker of Alzheimer's disease. *Int J Clin Exp Pathol* 2017;10(4):4694-4699.

Derrien T, Johnson R, Bussotti G, Tanzer A, Djebali S, Tilgner H, Guernec G, Martin D, Merkel A, Knowles DG, Lagarde J, Veeravalli L, Ruan X, Ruan Y, Lassmann T, Carninci P, Brown JB, Lipovich L, Gonzalez JM, Thomas M, Davis CA, Shiekhata R, Gingeras TR, Hubbard TJ, Notredame C, Harrow J, Guigó R. The GENCODE v7 catalog of human long noncoding RNAs: analysis of their gene structure, evolution, and expression. *Genome Res* 2012; 22:1775–1789.

Devaux Y, Zangrando J, Schroen B, Creemers EE, Pedrazzini T, Chang CP, Dorn GW, Thum T, Heymans S. Long noncoding RNAs in cardiac development and ageing. *Nat Rev Cardiol* 2015;12(7):415-25.

Eisenstein M. Genetics: Finding risk factors. *Nature* 2011;475: S20–S22.

Emiliani C, Urbanelli L, Racanicchi L, Orlacchio A, Pelicci G, Sorbi S, Bernardi G, Orlacchio A. Up-regulation of glycohydrolases in Alzheimer's Disease fibroblasts correlates with Ras activation. *J Biol Chem* 2003;278(40):38453-60.

Esteller M. Non-coding RNAs in human disease. *Nat Rev Genet* 2011; 18:12:861-74.

Fabbri C, Serretti A. Genetics of long-term treatment outcome in bipolar disorder. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2016; 65:17-24.

Faghihi MA, Modarresi F, Khalil AM, Wood DE, Sahagan BG, Morgan TE, Finch CE, St Laurent G, Kenny PJ, Wahlestedt C. Expression of a noncoding RNA is elevated in Alzheimer's disease and drives rapid feed-forward regulation of beta-secretase. *Nat Med* 2008;14(7):723-30.

Fan S, Zhang B, Luan P, Gu B, Wan Q, Huang X, Liao W, Liu J. PI3K/AKT/mTOR/p70S6K Pathway Is Involved in A $\beta$ 25-35-Induced Autophagy. *Biomed Res Int*. 2015;161020.

Fas ligand and fas are expressed constitutively in human astrocytes and the expression increases with IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$ , or IFN- $\gamma$ . *J Immunol* 1999;162:1889-1895.

Frost GR, Li YM. The role of astrocytes in amyloid production and Alzheimer's disease. *Open Biol* 2017;7(12)170228.

Fuso A, Scarpa S. One-carbon metabolism and Alzheimer's disease: is it all a methylation matter? *Neurobiol Aging* 2011;32(7):1192-5.

Garciduenas AL, Duyckaerts C. Alzheimer disease, *Handb Clin Neurol*, Paris 2017;145:325-337.

Gatz M, Reynolds CA, Fratiglioni L, et al. Role of genes and environments for explaining Alzheimer disease. *Arch Gen Psychiatry* 2006;63(2):168–174.

Gavazzo P, Vassalli M, Costa D, Pagano A. Novel ncRNAs transcribed by Pol III and elucidation of their functional relevance by biophysical approaches. *Front Cell Neurosci* 2013; 7:203.

Genç Ş, Kızıldağ S, Genç K. İnflamatuvar uyarınların mikrogliyal TRAIL ekspresyonu üzerine etkisi. *Geriatry* 2002; 5:44-48.

Giri M, Zhang M, Lü Y. Genes associated with Alzheimer's disease: an overview and current status. *Clin Interv Aging* 2016; 11:665–681.

Gomes CPC, de Gonzalo-Calvo D, Toro R, Fernandes T, Theisen D, Wang DZ, Devaux Y; Cardiolinc network. Non-coding RNAs and exercise: pathophysiological role and clinical application in the cardiovascular system. *Clin Sci (Lond)* 2018;132(9):925-942.

Gu C, Chen C, Wu R, Dong T, Hu X, Yao Y, Zhang Y. Long Noncoding RNA EBF3-AS Promotes Neuron Apoptosis in Alzheimer's Disease. *DNA Cell Biol* 2018;37(3):220-226.

Guerreiro RJ, Gustafson DR, Hardy J. The genetic architecture of Alzheimer's disease: beyond APP, PSENs and APOE. *Neurobiol Aging* 2012;33(3):437-456.

Gürvit H. Sinir Sisteminin Dejeneratif Hastalıkları. Demans Sendromu, Alzheimer Hastalığı ve Alzheimer dışı demanslar. In: Öge AE; eds. *Nöroloji*. İstanbul: Nobel Matbaacılık; 2004:367-415.

Heppner FL, Ransohoff RM, Becher B. Immune attack: the role of inflammation in Alzheimer disease. *Nat Rev Neurosci* 2015;16(6):358-72.

Huang X, Luo YL, Mao YS, Ji JL. The link between long noncoding RNAs and depression. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2017; 73:73-78.

Iwatsubo T, Odaka A, Suzuki N. Visualization of A beta 42(43) and A beta 40 in senile plaques with end-specific A beta monoclonals: evidence that an initially deposited species is A beta 42(43). *Neuron* 1994; 13:45-53.

Janika Viereck, Thomas Thum. Circulating Noncoding RNAs as Biomarkers of Cardiovascular Disease and Injury. *Circ Res* 2017; 120:381-399.

Jayadev S, Leverenz JB, Steinbart E, et al. Alzheimer's disease phenotypes and genotypes associated with mutations in presenilin 2. *Brain* 2010;133(4):1143–1154.

Jazvinščak JM, Slade N, Hof PR, Šimić G. The interactions of p53 with tau and Aβ as potential therapeutic targets for Alzheimer's disease. *Prog Neurobiol* 2018; S0301-0082(17)30188-0.

Jin XF, Wu N, Wang L, Li J. Circulating microRNAs: a novel class of potential biomarkers for diagnosing and prognosing central nervous system diseases. *Cell Mol Neurobiol* 2013;33(5):601-13.

Julian A, Dugast E, Ragot S, Krolak-Salmon P, Berrut G, Dantoine T, Hommet C, Hanon O, Page G, Paccalin M. There is no correlation between peripheral inflammation and cognitive status at diagnosis in Alzheimer's disease. *Aging Clin Exp Res* 2015;27(5):589-94.

Kapranov P, Cheng J, Dike S, Nix DA, Duttagupta R, Willingham AT, Stadler PF, Hertel J, Hackermüller J, Hofacker IL, Bell I, Cheung E, Drenkow J, Dumais E, Patel S, Helt G, Ganesh M, Ghosh S, Piccolboni A, Sementchenko V, Tammana H, Gingeras TR. RNA maps reveal new RNA classes and a possible function for pervasive transcription. *Science* 2007; 316: 1484–1488.

Karaarslan ZÖ, Serin MS. Hastalıkların tanı ve tedavi stratejilerinde miRNA ve diğer nonprotein-coding RNA'lar. *Mersin Univ Sağlık Bilim* 2016;(9)3.

Katzman R, Saitoh T. Advances in Alzheimer's disease. *FASEB J* 1991; 5:278-86.

Kazemzadeh M, Safaralizadeh R, Orang AV. LncRNAs: emerging players in gene regulation and disease pathogenesis. *J Genet* 2015;94(4):771-84.

Kirouac L, Rajic AJ, Cribbs DH2, Padmanabhan J. Activation of Ras-ERK Signaling and GSK-3 by Amyloid Precursor Protein and Amyloid Beta Facilitates Neurodegeneration in Alzheimer's Disease. *eNeuro* 2017;4(2).

Knoll M, Lodish HF, Sun L. Long non-coding RNAs as regulators of the endocrine system. *Nat Rev Endocrinol* 2015;11(3):151-60.

Kok E, Haikonen S, Luoto T, et al. Apolipoprotein E-dependent accumulation of Alzheimer disease-related lesions begins in middle age. *Ann Neurol* 2009;65(6):650–657.

Lashley T, Schott JM, Weston P, Murray CE, Wellington H, Keshavan A, Foti SC, Foiani M, Toombs J, Rohrer JD, Heslegrave A, Zetterberg H. Molecular biomarkers of Alzheimer's disease: progress and prospects. *Dis Model Mech* 2018;11(5).

Lee JH, Barral S, Reitz C. The neuronal sortilin-related receptor gene SORL1 and late-onset Alzheimer's disease. *Curr Neurol Neurosci Rep* 2008;8(5):384–391.

Lei X, Lei L, Zhang Z, Zhang Z, Cheng Y. Downregulated miR-29c correlates with increased BACE1 expression in sporadic Alzheimer's disease. *Int J Clin Exp Pathol* 2015;8(2):1565–1574.

Leyns CEG, Holtzman DM. Glial contributions to neurodegeneration in tauopathies. *Mol Neurodegener* 2017;12(1):50.

Liu W, Zhao J, Lu G. miR-106b inhibits tau phosphorylation at Tyr18 by targeting Fyn in a model of Alzheimer's disease. *Biochem Biophys Res Commun* 2016;478(2):852-7.

Luo Q, Chen Y. Long noncoding RNAs and Alzheimer's disease. *Clin Interv Aging* 2016; 11:867–872.

Lynn M, Bekris, Chang-En Yu, Thomas D. Bird, and Debby W. Tsuang. Genetics of Alzheimer Disease. *J Geriatr Psychiatry Neurol* 2010;23(4): 213–227.

Ma QL, Galasko DR, Ringman JM, Vinters HV, Edland SD, Pomakian J, Ubeda OJ, Rosario ER, Teter B, Frautschy SA, Cole GM. Reduction of SorLA/LR11, a sorting

protein limiting beta-amyloid production, in Alzheimer disease cerebrospinal fluid. **Arch Neurol** 2009;66(4):448-57.

Mahley RW, Weisgraber KH, Huang Y. Apolipoprotein E: structure determines function, from atherosclerosis to Alzheimer's disease to AIDS. **J Lipid Res** 2009;50(suppl): S183–S188.

Majidinia M, Mihanfar A, Rahbarghazi R, Nourazarian A, Bagca B, Avci ÇB. The roles of non-coding RNAs in Parkinson's disease. **Mol Biol Rep** 2016;43(11):1193-1204.

Mandas A, Abete C, Putzu PF, la Colla P, Dessì S, Pani A. Changes in cholesterol metabolism-related gene expression in peripheral blood mononuclear cells from Alzheimer patients. **Lipids Health Dis** 2012; 11:39.

Marín-Béjar O, Huarte M. Long noncoding RNAs: from identification to functions and mechanisms. **Advances in Genomics and Genetics** 2015;(5):257—274.

Massone S, Vassallo I, Fiorino G. 17A, a novel non-coding RNA, regulates GABA B alternative splicing and signaling in response to inflammatory stimuli and in Alzheimer disease. **Neurobiol Dis** 2011; 41(2):308–317.

Mattick JS, Rinn JL. Discovery and annotation of long noncoding RNAs. **Nat Struct Mol Biol** 2015;22(1):5-7.

McKhann GM, Knopman DS, Chertkow H, Hyman BT, Jack CR Jr, Kawas CH, Klunk WE, Koroshetz WJ, Manly JJ, Mayeux R, Mohs RC, Morris JC, Rossor MN, Scheltens P, Carrillo MC, Thies B, Weintraub S, Phelps CH. The diagnosis of dementia due to Alzheimer's disease: recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease. **Alzheimers Dement** 2011;7(3):263-269.

Melissari MT, Grote P. Roles for long non-coding RNAs in physiology and disease. **Pflugers Arch** 2016;468(6):945-58.

Mercer TR, Dinger ME, Mattick JS. Long non-coding RNAs: insights into functions. **Nat Rev Genet** 2009; 10(3):155-9.

Mora N, Santa Bárbara Ruiz P, Ferreira N, Serras F. Ras signal triggers  $\beta$ -amyloid precursor protein (APP) expression. **Small GTPases** 2013;4(3):171-3.

Morelli C, Magnanini, Mungall AJ, Negrini M, Barbanti-Brodano G. Cloning and characterization of two overlapping genes in a subregion at 6q21 involved in replicative senescence and schizophrenia. **Gene** 2000;252(1-2):217-25.

Mus E, Hof PR, Tiedge H. Dendritic BC200 RNA in aging and in Alzheimer's disease. **Proc Natl Acad Sci USA** 2007; 104(25):10679–10684.

Ozansoy M, Başak AN. Tauopathies: A Distinct Class of Neurodegenerative Disorders. **Turk J Neurol** 2007;13(1):1-29.

Pandey AD, Goswami S, Shukla S, Das S, Ghosal S, Pal M, Bandyopadhyay B, Ramachandran V, Basu N, Sood V, Pandey P, Chakrabarti J, Vрати S, Banerjee A. Correlation of altered expression of a long non-coding RNA, NEAT1, in peripheral blood mononuclear cells with dengue disease progression. **J Infect** 2017;75(6):541-554.

Perez P, Jang SI, Alevizos I. Emerging landscape of non-coding RNAs in oral health and disease. **Oral Dis** 2014;20(3):226-35.

Pigino G, Morfini G, Pelsman A, Mattson MP, Brady ST, Busciglio J. Alzheimer's presenilin 1 mutations impair kinesin-based axonal transport. **J Neurosci** 2003;23(11):4499–4508.

Pluta R, Ułamek-Kozioł M, Januszewski S, Czuczwar SJ. Platelets, lymphocytes and erythrocytes from Alzheimer's disease patients: the quest for blood cell-based biomarkers. **Folia Neuropathol** 2018;56(1):14-20.

Poorkaj P, Bird TD, Wijsman E, Nemens E, Garruto RM, Anderson L, Andreadis A, Wiederholt WC, Raskind M, Schellenberg GD. Tau is a candidate gene for chromosome 17 frontotemporal dementia. **Ann Neurol** 1998;43(6):815-25.

Prasher VP, Farrer MJ, Kessling AM, et al. Molecular mapping of Alzheimer-type dementia in Down's syndrome. **Ann Neurol** 1998;43(3):380–383.

Probst A, Langui D, Ipsen S, Robakis N, Ulrich J. Deposition of  $\beta$ /A4 protein along neuronal plasma membranes in diffuse senile plaques. **Acta Neuropathol** 1991; 83:21-29.

Qu X, Dang X, Wang W, Li Y, Xu D, Shang D, Chang Y. Long Noncoding RNAs and mRNA Regulation in Peripheral Blood Mononuclear Cells of Patients with Chronic Obstructive Pulmonary Disease. **Mediators Inflamm** 2018;7501851.

Quinn JJ, Chang HY. Unique features of long non-coding RNA biogenesis and function. **Nat Rev Genet** 2016;17(1):47-62.

Ramsay RG, Gonda TJ. MYB function in normal and cancer cells. **Nat Rev Cancer** 2008;8(7):523-34.

Reddy PH, Tonk, Kumar S, Vijayan M, Kandimalla R, Kuruva CS, Reddy AP. A critical evaluation of neuroprotective and neurodegenerative MicroRNAs in Alzheimer's disease. **Biochem Biophys Res Commun** 2017;483(4):1156-1165.

Ren RJ, Zhang YF, Dammer EB, Zhou Y, Wang LL, Liu XH, Feng BL, Jiang GX, Chen SD, Wang G, Cheng Q. Peripheral Blood MicroRNA Expression Profiles in Alzheimer's Disease: Screening, Validation, Association with Clinical Phenotype and Implications for Molecular Mechanism. **Mol Neurobiol** 2016;53(8):5772-81.

Rinn JL, Kertesz M, Wang JK, Squazzo SL, Xu X, Bruggmann SA, Goodnough LH, Helms JA, Farnham PJ, Segal E, Chang HY. Functional demarcation of active and silent chromatin domains in human HOX loci by noncoding RNAs. **Cell** 2007;129,1311–1323.

Ryan P, Patel B, Makwana V, Jadhav HR, Kiefel M, Davey A, Reekie TA, Rudrawar S, Kassiou M. Peptides, Peptidomimetics, and Carbohydrate-Peptide Conjugates as Amyloidogenic Aggregation Inhibitors for Alzheimer's Disease. **ACS Chem Neurosci** 2018;1023241.

Santoro M, Nociti V, Lucchini M, De Fino C, Losavio FA, Mirabella M. Expression Profile of Long Non-Coding RNAs in Serum of Patients with Multiple Sclerosis. **J Mol Neurosci** 2016;59(1):18-23.

Schipper HM, Maes OC, Howard M, Wang CE. MicroRNA Expression in Alzheimer Blood Mononuclear Cells. **Gene Regul Syst Bio** 2007; 1:263–274.

Schmitt AM, Chang HY. Long Noncoding RNAs in Cancer Pathways. **Cancer Cell** 2016;29(4):452-463.

Schmitz SU, Grote P, Herrmann BG. Mechanisms of long noncoding RNA function in development and disease. **Cell Mol Life Sci** 2016;73, 2491–2509.

Shafi O. Inverse relationship between Alzheimer's disease and cancer, and other factors contributing to Alzheimer's disease: a systematic review. **BMC Neurol** 2016;16(1):236.

Singh SK, Srivastav S, Yadav AK, Srikrishna S, Perry G. Overview of Alzheimer's Disease and Some Therapeutic Approaches Targeting A $\beta$  by Using Several Synthetic and Herbal Compounds. **Oxid Med Cell Longev** 2016;7361613.

Swerdlow RH. Pathogenesis of Alzheimer's disease. **Clin Interv Aging** 2007;2(3):347–359.

Tacconi S, Perri R, Balestrieri E, Grelli S, Bernardini S, Annichiarico R, Mastino A, Caltagirone C, Macchi B. Increased caspase activation in peripheral blood mononuclear cells of patients with Alzheimer's disease. **Exp Neurol** 2004;190(1):254-62.

Tan L, Yu JT, Hu N, Tan L. Non-coding RNAs in Alzheimer's disease. **Mol Neurobiol** 2013;47(1):382-93.

Tan L, Yu JT, Hu N, Tan L. Non-coding RNAs in Alzheimer's disease. **Mol Neurobiol** 2013;47(1):382-93.

Tanzi RE, Bertram L. Twenty years of the Alzheimer's disease amyloid hypothesis: a genetic perspective. **Cell** 2005;120(4):545–555.

Tao L, Bei Y, Zhou Y, Xiao J, Li X. Non-coding RNAs in cardiac regeneration. **Oncotarget** 2015; (40):42613-22.

Togo T, Akiyama H, Iseki E, Kondo H, Ikeda K, Kato M. Occurrence of T cells in the brain of Alzheimer's disease and other neurological diseases. **Journal of neuroimmunology** 2002;124(1–2):83–92.

Uliitsky I. Interactions between short and long noncoding RNAs. **FEBS Lett** 2018;1873-3468.

Van Cauwenberghe C, Van Broeckhoven C, Sleegers K. The genetic landscape of Alzheimer disease: clinical implications and perspectives. **Genet Med** 2016;18(5):421-30.

Van Wijk N, Broersen LM, de Wilde MC, Hageman RJ, Groenendijk M, Sijben JW, Kamphuis PJ. Targeting synaptic dysfunction in Alzheimer's disease by administering a specific nutrient combination. **J Alzheimers Dis** 2014;38(3):459-79.

Vencken SF, Greene CM, McKiernan PJ. Non-coding RNA as lung disease biomarkers. **Thorax** 2015; 0(5):501-3.

Visone R, Croce CM. MiRNAs and cancer. **Am J Pathol** 2009;174:1131–8.

Wang M, Sun X, Yang Y, Jiao W. Long non-coding RNA OIP5-AS1 promotes proliferation of lung cancer cells and leads to poor prognosis by targeting miR-378a-3p. **Thorac Cancer** 2018;1759-7714.

Wang XP, Ding HL. Alzheimer's disease: epidemiology, genetics, and beyond. **Neurosci Bull** 2008;24(2):105-9.

Wapinski O, Chang HY. Long noncoding RNAs and human disease. **Trends Cell Biol** 2011;21(6):354-61.

Wojda U. Alzheimer's disease lymphocytes: potential for biomarkers? **Biomark Med** 2016; 10:1-4.

Wojsiat J, Prandelli C, Laskowska-Kaszub K, Mart.n Requero A, Wojda U. Oxidative stress and aberrant cell cycle in Alzheimer's disease lymphocytes: diagnostic prospects. **J Alzheimer's Dis** 2015; 46:329-350.

Wu G, Cai J, Han Y I (). LincRNA-p21 regulates neointima formation, vascular smooth muscle cell proliferation, apoptosis, and atherosclerosis by enhancing p53 activity. **Circulation** 2014; 130:1452-1465.

Wu G, Cai J, Han Y I, Chen J, Huang ZP, Chen C, Cai Y, Huang H, Yang Y, Liu Y, Xu Z, He D, Zhang X, Hu X, Pinello L, Zhong D, He F, Yuan GC, Wang DZ, Zeng C. LincRNA-p21 regulates neointima formation, vascular smooth muscle cell proliferation, apoptosis, and atherosclerosis by enhancing p53 activity. **Circulation** 2014; 130:1452-1465.

Wu P, Zuo X, Deng H, Liu X, Liu L, Ji A. Roles of long noncoding RNAs in brain development, functional diversification and neurodegenerative diseases. **Brain Res Bull** 2013; 97:69-80.

Xie JJ, Jiang YY, Jiang Y, Li CQ, Lim MC, An O, Mayakonda A, Ding LW, Long L, Sun C, Lin LH, Chen L, Wu JY, Wu ZY, Cao Q, Fang WK, Yang W, Soukiasian H, Meltzer SJ, Yang H, Fullwood M, Xu LY, Li EM, Lin DC, Koeffler HP. Super-Enhancer-Driven Long Non-Coding RNA LINC01503, Regulated by TP63, Is Over-Expressed and Oncogenic in Squamous Cell Carcinoma. **Gastroenterology** 2018;154(8):2137-2151.

Yang H, Liang N, Wang M, Fei Y, Sun J, Li Z, Xu Y, Guo C, Cao Z, Li S, Jiao Y. Long noncoding RNA MALAT-1 is a novel inflammatory regulator in human systemic lupus erythematosus. **Oncotarget** 2017;8(44):77400-77406.

Yang TT, Liu CG, Gao SC, Zhang Y, Wang PC. The Serum Exosome Derived MicroRNA-135a, -193b, and -384 Were Potential Alzheimer's Disease Biomarkers. **Biomed Environ Sci** 2018;1(2): 87-96.

Zhang H, Chen Z, Wang X, Huang Z, He Z, Chen Y. Long non-coding RNA: a new player in cancer. **J Hematol Oncol J Hematol Oncol** 2013;6(1):37.

Zhang TN, Li D, Xia J, Wu QJ, Wen R, Yang N, Liu CF. Non-coding RNA: a potential biomarker and therapeutic target for sepsis. **Oncotarget** 2017;8(53):91765-91778.

Zhang XQ, Wang ZL, Poon MW, Yang JH. Spatial-temporal transcriptional dynamics of long non-coding RNAs in human brain. **Hum Mol Genet** 2017;26(16):3202-3211.

Zhang Y, Xing H, Guo S, Zheng Z, Wang H, Xu D. MicroRNA-135b has a neuroprotective role via targeting of  $\beta$ -site APP-cleaving enzyme 1. *Exp Ther Med* 2016;2(2):809-814.

Zhao T, Xu J, Liu L, Bai J, Xu C, Xiao Y, Li X, Zhang L. Identification of cancer-related lncRNAs through integrating genome, regulome and transcriptome features. *Mol Biosyst* 2015;11(1):126-36.

Zhou X ve Xu J. Identification of Alzheimer's disease-associated long noncoding RNAs. *Neurobiol Aging* 2015;36(11):2925-2931.

<http://geneontology.org/>

<http://www.kegg.jp/kegg/pathway.html>

<https://dataanalysis.sabiosciences.com/pcr/arrayanalysis.php>





## 8. ÖZGEÇMİŞ

Serap KURT, 1992 yılında Antalya'nın Manavgat ilçesinde doğdu. İlk ve ortaokulu Çolaklı Yahya Kurt İlköğretim okulunda, lise eğitimini ise Kemer Fatma Turgut Şen Anadolu Lisesinde tamamladı. 2010 yılında eğitime başladığı Ege Üniversitesi'nde bir yıl hazırlık eğitiminin ardından Moleküler Biyoloji ve Genetik ağırlıklı Biyoloji Bölümünü 2015 yılında tamamladı. Aynı yıl Pamukkale Üniversitesi Tıbbi Biyoloji AD'da yüksek lisans eğitimine başladı.

**9. EKLER**



## Ek 1 Etik Kurul Onayı



T.C.  
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ  
Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik  
Kurulu



Sayı :60116787-020/50302  
Konu :Başvurunuz hk.

17/08/2016

Sayın Doç. Dr. Ayşe Gaye TOMATIR

İlgi :10.08.2016 tarihli dilekçeniz.

İlgi dilekçe ile başvurmuş olduğunuz "**Alzheimer Hastalığında Long Non-coding RNA (lncRNA) Profillerinin Araştırılması**" konulu çalışmanız **16.08.2016 tarih ve 16 sayılı** kurul toplantımızda görüşülmüş olup,

Yapılan görüşmelerden sonra, söz konusu çalışmanın yapılmasında **ETİK AÇIDAN SAKINCA OLMADIĞINA**, altı ayda bir çalışma hakkında Kurulumuza bilgi verilmesine oy birliği ile karar verilmiştir.

Bilgilerinizi rica ederim.

Prof. Dr. Tahir TURAN  
Başkan