



**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ**

**ALZHEIMER HASTALIĞINDA NÖRON KÖKENLİ
EKSOZOMLARDA miR-373 ve miR-204 DÜZEYLERİNİN
BELİRLENMESİ**

Dr. Elifcan TAŞDELEN

**TIBBİ GENETİK ANABİLİM DALI
TIPTA UZMANLIK TEZİ**

**DANIŞMAN
Dr. Öğr. Üyesi Nüket YÜRÜR KUTLAY**

ANKARA

2020



**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ**

**ALZHEIMER HASTALIĞINDA NÖRON KÖKENLİ
EKSOZOMLARDA miR-373 ve miR-204 DÜZEYLERİNİN
BELİRLENMESİ**

Dr. Elifcan TAŞDELEN

**TIBBİ GENETİK ANABİLİM DALI
TIPTA UZMANLIK TEZİ**

DANIŞMAN

Dr. Öğr. Üyesi Nüket YÜRÜR KUTLAY

Bu tez, TÜBİTAK tarafından 318S044 proje numarası ile desteklenmiştir.

ANKARA

2020

Düzenleme tarihi: 24/12/2014


ANKARA ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
TEZ SINAVI TUTANAĞI


I. UZMANLIK ÖĞRENCİSİNİN	
Adı, Soyadı : Dr.Elifcan Taşdelen	Sınav tarihi: 17.03.2020
Anabilim/Bilim Dalı : Tıbbi Genetik Anabilim Dalı	
Tez Danışmanı : Dr.Öğr.Üyesi Nüket Yürür Kutlay	

II. TEZ İLE İLGİLİ BİLGİLER	
Tezin Başlığı: ALZHEIMER HASTALIĞINDA NÖRON KÖKENLİ EKSOZOMLARDA miR-373 ve miR-204 DÜZEYLERİNİN BELİRLENMESİ	
Tezin Niteliği: <input checked="" type="checkbox"/> Ana Dal Uzmanlık Tezi <input type="checkbox"/> Yan Dal Uzmanlık Tezi	
Kaçıncı tez sınavı olduğu: <input checked="" type="checkbox"/> 1 <input type="checkbox"/> 2 <input type="checkbox"/> 3	

III. KARAR	
Yapılan tez sınavı sonucunda yukarıda belirtilen tezin "Tıpta Uzmanlık Tezi" olarak	
<input checked="" type="checkbox"/> Kabulüne	
<input type="checkbox"/> Reddine	
<input type="checkbox"/> Düzeltmeler yapıldıktan sonra tekrar değerlendirilmesine	
<input checked="" type="checkbox"/> Oy birliği <input type="checkbox"/> Oy çokluğu	ile karar verilmiştir.

IV. AÇIKLAMALAR	


Jüri Başkanı
Prof.Dr.Hatice Ilgın Ruhi
AÜTF Tıbbi Genetik Anabilim Dalı


Jüri Üyesi
Dr.Öğr.Üyesi Nüket Yürür Kutlay
AÜTF Tıbbi Genetik Anabilim Dalı


Jüri Üyesi
Prof.Dr. Feride İffet Şahin
Başkent Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik
Anabilim Dalı

ÖNSÖZ

Alzheimer hastalığı için henüz non-invaziv bir biyobelirteç bulunmaması ve tedavisinin olmaması nedeniyle hastalığın altında yatan patogenezi aydınlatıcı çalışmalara gereksinim duyulmaktadır. Bu nedenle çalışmamızda bir ön bilgi oluşturmak adına erken/orta düzey Alzheimer hastalarından ve sağlıklı gönüllülerden elde edilecek nöron kökenli serum eksozomlarında miR-373 ve miR-204'ün ekspresyon düzeyleri incelenmiştir. Bu çalışmadaki elde edilen sonuçlar Alzheimer hastalığının etyopatogenezinde yer alan nöroinflamatuvar hipoteze katkı sağlayacaktır.

Tıbbi genetik uzmanlık eğitimimi Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı'nda tamamlamış olmaktan mutluluk duyuyorum. Uzmanlık eğitimime katkıda bulunan saygıdeğer Prof. Dr. Hatice Ilgın Ruhi, Dr. Öğr. Üyesi Timur Tuncalı, Dr.Öğr. Üyesi Halil Gürhan Karabulut, Dr.Öğr. Üyesi Nüket Yürür Kutlay hocalarıma sonsuz teşekkür ve saygılarımı sunuyorum. Tez çalışmamda desteğini esirgemeyen değerli hocam Dr.Öğr. Üyesi Nüket Yürür Kutlay'a çok teşekkür ediyorum. Uzmanlık eğitimim boyunca desteğini hep hissettiğim Uzm. Dr. Arzu Vicdan'a, birlikte çalışmaktan mutluluk duyduğum asistan arkadaşlarıma, burada geçirdiğim süre boyunca yardımlarını esirgemeyen tüm Tıbbi Genetik Anabilim Dalı çalışanlarına teşekkür ediyorum.

Hasta örneklerinin toplanmasındaki yardımlarından dolayı Prof. Dr. Erguvan Tuğba Özel Kızıl'a çok teşekkür ediyorum.

Bu tez, TÜBİTAK tarafından 318S044 proje numarası ile desteklenmiştir. TÜBİTAK çalışanlarına teşekkür ediyorum.

Bana hayatımın her döneminde çalışkanlığı aşılayan ve bugünlere gelmemde büyük emekleri olan sevgili annem, babam, dedem ve babaanneme,

Önümüzdeki zamanlarda birlikte güzel işler başaracağımızı bildiğim, her zaman destekçim olan meslektaşım, canım kardeşim Dr. Selin Karakaya'ya,

Hayatımın her alanında olduğu gibi tez çalışmam süresince de yardımlarını esirgemeyen sevgili eşim Harun Taşdelen'e sonsuz teşekkür ederim.

Dr. Elifcan TAŞDELEN

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ	ii
İÇİNDEKİLER	iii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	v
ŞEKİLLER DİZİNİ	ix
TABLolar DİZİNİ	xi
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Alzheimer Hastalığı	3
2.1.1. Epidemiyoloji	3
2.1.2. Genetik Değişiklikler	4
2.1.3. Patofizyoloji	8
2.2. Eksozomlar	13
2.3. Kodlamayan RNA 'lar	15
2.3.1. mikroRNA'lar	15
2.4. Araştırmanın amacı ve hipotezleri	19
2.4.1. miR-373	19
2.4.2. miR-204	20
3. GEREÇ VE YÖNTEM	23
3.1. Araştırmaya dahil olma ve olmama ölçütleri:	24
3.1.1. Hasta grubu için ölçütler:	24
3.1.2. Kontrol grubu için ölçütler:	24
3.2. Yöntem Basamakları	25
3.2.1. Serum Eldesi	25
3.2.2. Serumdan Eksozom İzolasyonu	25
3.2.3. Nöronal eksozom zenginleştirme	26
3.2.4. Nöronal Eksozomlardan miRNA izolasyonu	27
3.2.5. cDNA Sentezi	28
3.2.6. Preamplifikasyon	29
3.2.7. Real time PCR	30
3.2.8. Sonuçların hesaplanması ve İstatistiksel Analiz	31

4. BULGULAR	32
4.1. Hasta grubu	32
4.2. Kontrol grubu	34
4.3. U6 snRNA ekspresyon çalışması	36
4.4. miR-204 ekspresyon çalışması	39
4.5. miR-373 ekspresyon çalışması	42
4.6. Ekspresyon değerlerinin gruplar arasında karşılaştırılması	44
5. TARTIŞMA	47
6. SONUÇLAR	51
ÖZET	52
SUMMARY	53
KAYNAKLAR	54

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

ABCA7	: <i>ATP-Binding Casette, Subfamily A, member 7</i>
ADAM 10	: <i>A disintegrin and metallopeptidase domain 10</i>
ADAM 17	: <i>A disintegrin and metallopeptidase domain 17</i>
ADAM 19	: <i>A disintegrin and metallopeptidase domain 19</i>
AICD	: <i>APP Intracellular Domain</i>
APH-1	: <i>aph-1 homolog A, gamma-secretase subunit</i>
APP	: <i>Amyloid precursor protein (Amiloid prekürsör protein)</i>
Aβ1-42	: <i>Amyloid β 1-42 (Amiloid β 1-42)</i>
Aβ1-40	: <i>Amyloid β 1-40 (Amiloid β 1-40)</i>
AKAP9	: <i>A-kinase anchoring protein 9</i>
Akt	: <i>AKT Serine/Threonine Kinase 1</i>
AMPK	: <i>AMP-activated protein kinase</i>
ASC	: <i>Apoptosis-associated speck-like protein containing CARD</i>
BACE-1	: <i>b-site APP- cleaving enzyme 1</i>
BIN1	: <i>Bridging integrator 1</i>
BT	: <i>Bilgisayarlı tomografi</i>
CARD	: <i>Caspase recruitment domain</i>
CASS4	: <i>Cas scaffold protein family member 4</i>
cDNA	: <i>Complementary DNA (tamamlayıcı DNA)</i>
CD2AP	: <i>CD2 Associated protein</i>
CD33	: <i>Cluster Differentiation 33</i>
CDKN2A	: <i>Cyclin dependent kinase inhibitör 2A (siklin bağımlı kinaz inhibitör 2A)</i>
CELF1	: <i>CUGBP Elav-like family member 1</i>
CR1	: <i>Complement component receptor 1</i>
CLU	: <i>Clusterin</i>
Ct	: <i>cycle thresold</i>
C9orf72	: <i>Chromosome 9 open reading frame 72</i>
DAMP	: <i>damage associated molecular pattern</i>
DM	: <i>Diabetes mellitus</i>

DRB5/HLA-DRB1	: <i>Major histocompatibility complex, class II, DR beta 1</i>
DSG2	: <i>Desmoglein 2</i>
dsRNA	: <i>double-strand RNA</i>
DUSP6	: <i>Dual specificity phosphatase 6</i>
EPHA1	: <i>EPH Receptor A1</i>
ERK	: <i>Extracellular regulated MAP kinase</i>
FS	: <i>Fazekas skoru</i>
FERMT2	: <i>fermitin family member 2</i>
FOXO3a	: <i>Forkhead Box O3A</i>
FTD	: <i>Frontotemporal demans</i>
GLUT-1	: <i>glucose transporter-1</i>
GLP-1	: <i>glukagon-like peptide 1</i>
GLP-1R	: <i>glukagon-like peptide 1 reseptörü</i>
GRN	: <i>Granulin</i>
HAS	: <i>Hipokampal atrofi skoru</i>
HRK	: <i>HARAKIRI</i>
hp-Tau	: <i>Hiperfosforile Tau</i>
IGAP	: <i>International Genomics of Alzheimer's Project</i>
IL-1β	: <i>interleukin 1 beta</i>
IL-18	: <i>interleukin 18</i>
ILV	: <i>İntraluminal vezikül</i>
KDS	: <i>Klinik demans skoru</i>
INPP5D	: <i>inositol polyphosphate-5-phosphatase D</i>
LRR	: <i>leucine-rich repeat</i>
MAPK	: <i>Mitogen activated kinase-like protein</i>
MAPT	: <i>Microtubule-associated protein tau</i>
MEF2C	: <i>myocyte enhancer factor 2C</i>
MMDD	: <i>Mini Mental Durum Değerlendirme</i>
MMS	: <i>Minimental skor</i>
miRNA	: <i>Mikro RNA</i>
miR-373	: <i>mikroRNA-373</i>
miR-204	: <i>mikroRNA-204</i>

miRISC	: <i>miRNA-induced silencing complex</i>
mRNA	: <i>Messenger RNA</i>
MR	: <i>Manyetik rezonans</i>
MS4A	: <i>Membrane-spanning 4-domains subfamily A</i>
mTOR	: <i>mammalian target of rapamycin</i>
NCSTN	: <i>Nicastrin</i>
ncRNA	: <i>noncoding RNA</i>
NF-κB	: <i>nuclear factor kappa B subunit 1</i>
NINCDS-ARDRA	: <i>National Institute of Neurological and Communicative Disorders and Stroke/Alzheimer's Disease and Related Disorders Association</i>
NLR	: <i>nucleotide-binding oligomerization domain-like receptor</i>
NLRP3	: <i>NLR family pyrin domain containing 3</i>
NME8	: <i>NME/NM23 family member 8</i>
NOS1	: <i>Nitric oxide synthase 1</i>
OKB	: <i>Obsesif kompulsif bozukluk</i>
OMIM	: <i>Online Mendelian Inheritance in Men (İnsanda Mendelien kalıtım gösteren hastalık ve genler için online veritabanı)</i>
PAMP	: <i>pathogen associated molecular pattern</i>
PET	: <i>Pozitron emisyon tomografisi</i>
PICALM	: <i>Phosphatidylinositol binding clathrin assembly protein</i>
piRNA	: <i>Piwi-interacting RNA</i>
PLD3	: <i>phospholipase D family member 3</i>
pri-miRNA	: <i>primer miRNA</i>
PSEN1	: <i>Presenilin 1</i>
PSEN2	: <i>Presenilin 2</i>
PTEN	: <i>phosphatase and tensin homologue</i>
PTK2B	: <i>protein tyrosine kinase 2 beta</i>
P2X7R	: <i>purinergic receptor P2X7</i>
RNA	: <i>Ribonükleik asit</i>
siRNA	: <i>small interfering RNA</i>
SNP	: <i>Single nucleotide polymorphism</i>

SORL1	: <i>Sortilin Related Receptor 1</i>
ssRNA	: <i>single-strand RNA</i>
TREM2	: <i>Triggering receptor expressed on myeloid cells 2</i>
TRX	: <i>Thioredoxin</i>
TTC3	: <i>tetratricopeptide repeat domain 3</i>
TXNIP	: <i>Thioredoxin (TRX)-interacting protein</i>
UNC5C	: <i>unc-5 netrin receptor C</i>
UTR	: <i>Untranslated region</i>
VAMP2	: <i>Vesicle-associated membrane protein 2</i>
ZCWPW1	: <i>zinc finger CW-type and PWWP domain containing 1</i>



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil	Sayfa
1.1. Alzheimer hastalığı için cinsiyete göre yaşam boyu risk. Hebert ve arkadaşları, 2013'ten uyarlanmıştır	4
2.1. Plazma membranında amiloid prekürsör proteinin (APP)'nin işlenmesi. Sanabria-Castro ve arkadaşları, 2017'den uyarlanmıştır	10
2.2. NLRP3 inflamazomunun aktivasyonu ve regülatörleri. Jo ve arkadaşları, 2016'dan uyarlanmıştır	13
2.3. Nöral hücredeki ekzozom biyogenezi. Janas ve arkadaşları, 2016'dan uyarlanmıştır	14
2.4. Gen ekspresyonunu düzenleyerek farklı biyolojik fonksiyonlarda önemli rol oynayan kodlamayan RNA'ların sınıflandırılması. Dahariya ve arkadaşları, 2019'dan uyarlanmıştır	15
2.5. miRNA işlenmesinin şematik gösterimi. Winter ve arkadaşları, 2009'dan uyarlanmıştır	16
2.6. Aβ hipotezinde yer alan miRNA'lar. Wang ve arkadaşları, 2019'dan uyarlanmıştır	18
2.7. Tau hipotezinde yer alan miRNA'lar. Wang ve arkadaşları, 2019'dan uyarlanmıştır	19
2.8. Araştırma hipotezinin şematik gösterimi Jo ve arkadaşları, 2016'dan uyarlanmıştır (101)	22
4.1. E1, E2, E3, E4, E5, E6, E7, E8, E9, E10, E11 hastalarındaki U6 snRNA amplifikasyon eğrileri	36
4.2. E12, E13, E14, O1, O2, O3, O4, O5, O6, O8, O9 hastalarındaki U6 snRNA amplifikasyon eğrileri	36
4.3. O10, O11, O12, O13, O14, O15, O16 hastaları ve K1, K2, K3, K4 kontrol bireylerindeki U6 snRNA amplifikasyon eğrileri	37
4.4. K5, K6, K7, K8, K9, K10, K11 kontrol bireyleri ve E15, O7, O17, O18 hastalarındaki U6 snRNA amplifikasyon eğrileri	37
4.5. K12, K13, K14, K15, K16, K17, K18, K19, K20, K21 kontrol bireylerindeki U6 snRNA amplifikasyon eğrileri	37

4.6.	E12, E13, E14, O1, O2, O3, O4, O5, O6, O8, O9 hastalarındaki U6 snRNA melting curve görüntüleri	38
4.7.	E1, E2, E3, E4, E5, E6, E7, E8, E9, E10, E11 hastalarındaki miR-204 amplifikasyon eğrileri	39
4.8.	E12, E13, E14, O1, O2, O3, O4, O5, O6, O8, O9 hastalarındaki miR-204 amplifikasyon eğrileri	39
4.9.	O10, O11, O12, O13, O14, O15, O16 hastaları ve K1, K2, K3, K4 kontrol bireylerindeki miR-204 amplifikasyon eğrileri	40
4.10.	K5, K6, K7, K8, K9, K10, K11 kontrol bireyleri ve E15, O7, O17, O18 hastalarındaki miR-204 amplifikasyon eğrileri	40
4.11.	K12, K13, K14, K15, K16, K17, K18, K19, K20, K21 kontrol bireylerindeki miR-204 amplifikasyon eğrileri	40
4.12.	E1, E2, E3, E4, E5, E6, E7, E8, E9, E10, E11 hastalarındaki miR-204 melting curve görüntüleri	41
4.13.	E1, E2, E3, E4, E5, E6, E7, E8, E9, E10, E11 hastalarındaki miR-373 amplifikasyon eğrileri	42
4.14.	E12, E13, E14, O1, O2, O3, O4, O5, O6, O8, O9 hastalarındaki miR-373 amplifikasyon eğrileri	42
4.15.	O10, O11, O12, O13, O14, O15, O16 hastaları ve K1, K2, K3, K4 kontrol bireylerindeki miR-373 amplifikasyon eğrileri	43
4.16.	K5, K6, K7, K8, K9, K10, K11 kontrol bireyleri ve E15, O7, O17, O18 hastalarındaki miR-373 amplifikasyon eğrileri	43
4.17.	K12, K13, K14, K15, K16, K17, K18, K19, K20, K21 kontrol bireylerindeki miR-373 amplifikasyon eğrileri	43
4.19.	miR-204 ve miR-373 için erken ve orta evre AH grubunda kontrol grubuna kıyasla ‘Kat değişimi’ değerlerinin grafik gösterimleri	46

TABLolar DİZİNİ

Tablo	Sayfa
3.1. Eksozom serum/plazma kit içeriği	26
3.2. miRNA izolasyon kit içeriği	27
3.3. Revers-transkriptaz PCR kit içeriği	29
3.4. Reverse transkripsiyon reaksiyonu hazırlanması	29
3.5. Preamplifikasyon reaksiyonu hazırlanması	30
3.6. Preamplifikasyon termal döngü koşulları	30
3.7. Real-time PCR hazırlanması	30
3.8. Real time PCR termal döngü koşulları	31
4.1. Erken evre hasta grubunun demografik bilgileri, klinik ve radyolojik değeriendirmesi. HAS: Hipokampal atrofi skoru MMS: Minimental skor KDS: Klinik demans skoru FS: Fazekas skoru OKB: Obsesif kompulsif bozukluk HT: Hipertansiyon -: Veriye ulaşamadı	33
4.2. Orta evre hasta grubunun demografik bilgileri, klinik ve radyolojik değeriendirmesi HAS: Hipokampal atrofi skoru MMS: Minimental skor KDS: Klinik demans skoru FS: Fazekas skoru OKB: Obsesif kompulsif bozukluk HT: Hipertansiyon -: Veriye ulaşamadı	34
4.3. Kontrol bireylerin yaş ve minimental skorları. MMS: Minimental skor	35
4.4. Hasta ve kontrol grubunun U6 snRNA için Ct değeri	38
4.5. Hasta ve kontrol grubunun miR-204 için Ct değeri	41
4.6. Hasta ve kontrol grubunun miR-373 için Ct değeri	44
4.7. U6 snRNA, miR-204 ve miR-373 için ortalama Ct değeri	45
4.8. U6 snRNA, miR-204 ve miR-373 için ortalama Delta Ct değeri	45
4.9. miR-204 ve miR-373 için kontrol grubuna kıyasla 'Kat değerişimi($2^{-\Delta\Delta Ct}$)', değeri	45
4.10. miR-204 ve miR-373 ekspresyon düzeylerinin erken ve orta evre AH grubunda kontrol grubuna kıyasla p değeri	46

1. GİRİŞ

Geç başlangıçlı Alzheimer hastalığının etyolojisi multifaktöriyel olup erken başlangıçlı olandan farklı olarak altında yatan genetik sebepler tam olarak bilinmemektedir. İn vivo ve in vitro çalışmalar, amiloid β peptid ve tau proteininin Alzheimer hastalığının patogenezi oluşturana ana unsurlar olduğunu göstermektedir. Bunların dışında nöroinflamatuvar değişikliklerin de hastalığın etyolojisi ve progresyonunda yer aldığına dair kanıtlar literatürde bulunmaktadır.

Protein kodlamalarına rağmen gen ekspresyonunun posttranskripsiyonel düzenlenmesinde önemli etkileri olan miRNA'lar, hastalıkların tanı, izlem ve tedavisinde biyobelirteç potansiyeli taşıyor olmaları nedeniyle ilgi odağı haline gelmişlerdir. Alzheimer hastalığı dahil bir çok hastalıkta gözlenen miRNA ekspresyon değişiklikleri hastalıkların patogenezi ile ilişkilendirilmiştir.

Eksozomlar hücreler arası sinyal iletimi ve moleküllerin taşınmasında önemli görevleri bulunan ekstrasellüler veziküllerdir. Eksozomların taşıdıkları içeriklerin (mRNA ve miRNA) değerlendirilmesi, hastalıkların tanısında ve izleminde kullanılabilme potansiyelini gündeme getirmiştir. Özellikle kesin tanısı invaziv işlemler gerektiren Alzheimer hastalığı gibi nörodejeneratif hastalıklar için büyük avantaj sağlayabileceği öngörülmektedir.

Literatürde NLRP3 (NLR family pyrin domain containing 3) inflamazomu ile ilişkili olarak P2X7R (purinergic receptor P2X7) üzerinden miR-373, TXNIP (Thioredoxin (TRX)-interacting protein) üzerinden de miR-204'ün düzenleyici etkilerinin olduğu gözlenmiştir. Alzheimer hastalığında ise NLRP3 inflamazomunun aktive olduğu bilinmektedir. Ayrıca miR-204'ün, Alzheimer hastalığı ve Tip 2 Diabetes mellitus ilişkisinde tanımlanmış GLP-1 (glukagon-like peptide 1) molekülü üzerinde de düzenlemeler yaptığı gösterilmiştir.

Bu bilgilere dayanarak çalışmamızda erken/orta düzey Alzheimer hastalarından ve sağlıklı gönüllülerden elde edilen nöron kökenli serum eksozomlarında miR-373 ve miR-204'ün ekspresyon düzeyleri ölçüldü. Hastalık patogenezi ile ilişkili olarak daha doğru bilgi vereceği düşünülerek, nöral kökenli eksozomlarda çalışmanın yapılması planlandı.

Bu çalışmada;

Alzheimer hastalığı ile ilişkilendirilecek ve invaziv olmayan bir girişimle belirlenebilecek biyobelirteç bulunması amaçlanmıştır. İncelenecek miRNA'ların ekspresyonlarının Alzheimer hastalarında kontrol grubuna kıyasla aşağıdaki gibi sonuçlanması beklenmiştir:

- miR-373 ekspresyon düzeyinde azalma
- miR-204 ekspresyon düzeyinde artma

Bu çalışma ile;

- Alzheimer hastalığı patogenezinin katkı sağlanması,
- Alzheimer hastalığı ve diğer nörodejeneratif hastalıkların tanısı, evrelendirmesi ve izlemi için periferik kandan elde edilen nöron kökenli eksozomların kullanılabilirliğinin gösterilmesi ve
- İleriye yönelik olası tedavi hedefleri için ön bilgi oluşturulması amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Alzheimer Hastalığı

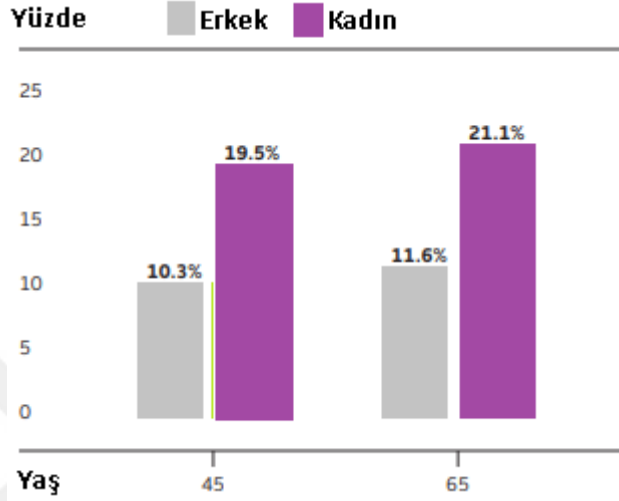
Yaşla ilişkili bunamaların dünya genelinde en yaygın nedeni, bir nörodejeneratif bozukluk olan Alzheimer hastalığıdır (AH) (1). İlk olarak 1906 yılında, Alois Alzheimer bilişsel kapasitede bozulma ve davranışsal problemlerle seyreden bir hastasında postmortem beyin incelemesi yaparak hastalığın klinik ve patolojik bulgularını tanımlamıştır.

Alzheimer hastalığı, bilişsel kapasitede bozulma ile karakterize; hafıza, düşünme, anlama, oryantasyon, dil ve akıl yürütmenin etkilendiği kronik ve ilerleyici bir durumdur (2). Bazen hastalarda nöbet, artmış kas tonusu, myoklonus, inkontinans ve mutizm gözlenebilmektedir (3). AH'de belirtiler bir asemptomatik patojenik süreçten sonra görülmektedir (4). Bu evre bazı hastalarda hafif kognitif bozukluk ile birlikte seyredebilmektedir (5, 6). Sonrasında hastalar şiddetli, geç evreye doğru progresyon göstermektedir. Hastalığın tipik klinik süresi 8-10 yıldır (3). AH vakalarına tanı %85-90 oranla klinik olarak konmaktadır. Ancak; depresyon, anksiyete ve psikozun dahil olduğu psikiyatrik komorbiditelerin varlığı, vasküler demans gibi birçok faktörün dışlanması gerekmektedir (7-13). Bilgisayarlı tomografi (BT) ve manyetik rezonans (MR) görüntülemeye serebral kortikal atrofi gözlenmesi; Pozitron emisyon tomografisi (PET) görüntülemesinde diffüz serebral hipometabolizma saptanması tanıyı desteklemektedir (3). Kesin tanı, beyin dokusunun postmortem histopatolojik incelemesi ile konmaktadır (14). Mikroskopik amiloid plaklar, intranöronal nörofibriler yumaklar (tau proteinini içeren), amiloid anjiyopati histopatolojik görüntülemeye saptanan bulgulardır. Plaklar β amiloid antikorlarıyla pozitif boyanırlar. Lewy cisimcikleri şeklinde alfa-sinüklein agregasyonu da amigdaladaki nöronlarda bulunabilmektedir (3, 15).

2.1.1. Epidemiyoloji

Alzheimer hastalığının prevalansı yaşla birlikte artmaktadır. 60 yaşında % 0.3-0.5 iken, 80 yaşında % 11-15'dir. 70 yaşın üzerindeki kişilerin yaklaşık % 10'unda kayda değer hafıza kaybı vardır. Bu kişilerin yarısından fazlası AH tanısına sahiptir

(3, 16-18). Dünyada 65 yaş üstü 10 kişiden 1'i AH ile yaşamaktadır (19). 45 yaşında AH gelişimi için erkeklerde yaşam boyu risk % 10 iken, kadınlarda % 20'dir (Şekil 1.1) (20). AH'den etkilenen insanların yaklaşık üçte ikisi kadın, üçte biri ise erkektir. Prevalansın 2050 yılına kadar neredeyse üç kat artması beklenmektedir (21).



Şekil 1.1. Alzheimer hastalığı için cinsiyete göre yaşam boyu risk. Hebert ve arkadaşları, 2013'ten uyarlanmıştır (20)

2.1.2. Genetik Değişiklikler

Tüm Alzheimer hastalarının yaklaşık % 25'i ailesel olup; bunların yaklaşık % 95'i geç başlangıçlı (yaş > 60-65), % 5'i ise erken başlangıçlıdır (yaş < 60-65 yaş) (3). Yapılan çalışmalar AH'nın gelişiminde genetik etkenler olduğunu göstermektedir. (22-25). İkiz çalışmalarında AH'nın konkordansı monozigotik ikizlerde (% 22-83) dizigotik ikizlere (% 0-50) göre daha yüksek saptanmıştır (26-28). AH'nın erken başlangıçlı formu klasik Mendeliyen otozomal dominant patern, geç başlangıçlı formu ise genetik ve genetik olmayan faktörleri içeren multifaktöriyel kalıtım kalıbı sergilemektedir (29-31).

Erken başlangıçlı, otozomal dominant geçişli, ailesel AH (EBAAH)'de bu zamana kadar üç farklı gende mutasyon tanımlanmıştır: *APP* (Amiloid prekürsör protein), *PSENI* (Presenilin 1), *PSEN2* (Presenilin 2). Bu genlerdeki patojenik mutasyonların artmış Amiloid β 1-42 ($A\beta$ 1-42) birikimi ve artmış $A\beta$ 1-42/ $A\beta$ 1-40 oranı ile ilişkisi bulunmaktadır. Bu genlerde tanımlanan mutasyonlar erken

başlangıçlı Alzheimer hastalarının sadece %10 kadarını açıklamaktadır (32). *APP* geni 21. kromozomda lokalize (OMIM: 190685) olup, *APP*'yi kodlar. A β , β -sekretaz ve γ -sekretaz adlı iki enzimin *APP*'yi ardışık olarak kesmesi sonucu oluşmaktadır (33). Fonksiyonel çalışmalar, bu gendeki mutasyonların, *APP*'nin proteolitik bölünmesinde amiloidojenik yollara doğru kaymalara yol açtığını ve ortak izoform A β 1-40'dan daha az çözünen ve nörotoksik olan A β 1-42 izoformunun birikmesine yol açtığını ortaya koymaktadır (34, 35). EBAAH'a neden olan diğer bir gen 14. kromozomda lokalize olan *PSENI* genidir. *PSENI* geninde tanımlanan AH'ye neden olan mutasyonlar A β 1-42'nin aşırı birikimiyle birlikte hastalığın agresif formuna neden olmaktadır (36, 37). EBAAH'a neden olan üçüncü gen ise *PSENI* geniyle yüksek homoloji gösteren *PSEN2* genidir (38). *PSEN2* genindeki mutasyonlar oldukça nadirdir (3). *PSEN2* mutasyonlarına sahip bireylerde hastalık başlangıç yaşı oldukça değişkenlik göstermektedir (39). AH'de *PSEN2* mutasyonlarının spesifik rolü hala net değildir (40).

Geç başlangıçlı Alzheimer hastalığı (GBAH) Alzheimer hastalarının çoğunluğunu (% 90-95 veya daha fazla) oluşturmaktadır. Etiyolojisinde, çevresel faktörlerin yanı sıra çoklu genetik risk faktörlerinin varlığı öngörülmektedir. EBAAH için birkaç gende yüksek penetran mutasyon tanımlıyken, GBAH düşük penetranslı varyantlardan kaynaklanmaktadır (41). GBAH için ilk konfirme edilen yatkınlık geni 19q13.2'de yerleşik, lipidlerin taşınması, depolanması ve metabolizmasında rol oynayan, astrositler tarafından sentezlenen bir serum proteini olan apolipoprotein E'yi (ApoE) kodlayan *APOE* genidir (42). Bu genin bilinen sık alelleri ϵ 2, ϵ 3, ve ϵ 4 dür. Hastalık riski, tek ϵ 4 aleli taşıyan kişilerde iki-dört kat, iki ϵ 4 aleli taşıyanlarda ise ortalama oniki kat artmaktadır. En sık gözlenen ϵ 3 aleli olup, ϵ 2 aleli ise GBAH için koruyucu bir faktör olarak tanımlanmıştır (43, 44). Ayrıca, ϵ 4 alelinin GBAH riski üzerindeki etkisi yaşa bağlıdır. ϵ 4 aleli, 60 ile 79 yaş arasındaki bireylerde ortaya çıkacak GBAH riski üzerinde en büyük etkiye sahiptir, bu etki bireyin 80 yaşın üzerindeki yaşlara ulaşmasıyla kademeli olarak azalmaktadır (45). *APOE*, aynı zamanda, hastalığın nöropatolojik özellikleri ile de ilişkilidir. Birkaç çalışma, iki *APOE* ϵ 4 aleli taşıyan bireylerin; bir *APOE* ϵ 4 aleli taşıyan ya da *APOE* ϵ 4 aleli taşımayan bireylerden daha fazla amiloid plak yoğunluğuna sahip olduklarını bildirmektedir (46, 47). *APOE* geni AH için bir risk oluştururken; Alzheimer

olgularının üçte birinden fazlası $\epsilon 4$ aleli taşımamaktadır (28). Genom çapında ilişkilendirme çalışmalarında (GWAS) AH gelişme riski ile ilişkilendirilen çok sayıda yeni genetik lokus tanımlanmıştır. Bu saptanan genetik lokuslar AH'nın ortaya çıkmasına yol açan fizyopatolojik temelleri açıklamaya katkıda bulunmaktadır.

2.1.2.1. Tanımlanmış lokuslar

2.1.2.1.1. İmmün cevap ile ilişkili lokuslar

İnflamasyon ve immün yanıtta işlev bozukluğunun AH patogenezinde rol oynadığı gösterilmiştir. İmmün yanıtta rolü tanımlanmış olan *CLU* (Clusterin), *ABCA7* (ATP-Binding Cassette, Subfamily A, member 7), *CRI* (Complement component receptor 1), *CD33* (Cluster Differentiation 33), *EPHA1* (ephrin type-A receptor 1) genlerinde ve *MS4A* (Membrane-spanning 4-domains subfamily A) gen kümesinde olan bazı varyasyonların AH ile ilişkisi gösterilmiştir (48). AH patogenezinde 8q21'de yerleşmiş olan *CLU* geninin kodladığı clusterin proteininin nöroprotektif rolünü gösteren önemli kanıtlar vardır. Clusterin proteininin A β 'nin klirensinde önemli görevi bulunmaktadır (49). Bununla birlikte, Alzheimer hastalarında, frontal korteks, hipokampus ve beyin omurilik sıvısında clusterin mRNA ve protein düzeylerinin arttığı bildirilmiştir (50, 51). Bu durum, nöroprotektif etkiyi sürdürmek için nörodejenerasyona yanıt olarak clusterinin yükseldiği hipoteziyle açıklanmaya çalışılmıştır (52). 19p13.3'te yerleşmiş *ABCA7* geninin kodladığı *ABCA7* proteininin fizyolojik olarak beyinde fazla miktarda ekspresyonu görülmektedir (48). *ABCA7* geninde rs3764650, rs3752246 ve rs115550680 SNP (Single nucleotide polymorphism)'lerinin bulunması AH için risk faktörü olarak tanımlanmış olsa da, eksprese edilen proteinin AH'ye katkısının hangi mekanizmayla olduğu anlaşılamamıştır (48, 53, 54). 1q32'de yerleşmiş olan *CRI* geninde saptanan rs3818361 ve rs6656401 SNP'lerin AH gelişme riski ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (50). Ancak, *CRI* varyantlarının AH oluşumuna nasıl katkıda bulunduğu ile ilgili mekanizmalar da hala tam olarak bilinmemektedir (48). 19q13.33'de yerleşmiş olan *CD33* geninde saptanan rs3865444 G>T SNP'i geç başlangıçlı Alzheimer hastalığı gelişimi ile ilişkili bulunmuştur (55). 11q12-13'de yerleşmiş olan *MS4A* gen kümesi

çeşitli hücre membran proteinlerini eksprese etmektedir. Bu gen kümesindeki *MS4A1* ve *MS4A2*'nin hücre içi serbest kalsiyum konsantrasyonunun düzenlenmesinde rol aldığı gösterilmiştir (56, 57). Hücre içi kalsiyum konsantrasyonunun düzensizliğinin de AH patogenezinde yer aldığı bildirilmiştir. Bununla birlikte, AH fizyopatolojisi ile MS4A proteinlerinin ilişkisini anlamak için daha fazla araştırmaya gereksinim vardır (48, 58).

7q34'de yerleşmiş *EPHA1* geni aksonal transportta rol oynayan EPHA1 proteinini kodlamaktadır. Bu gende saptanan rs11767557 ve rs11771145 SNP'leri ile AH gelişme riskinin azalması arasında bir korelasyon gösterilmiştir (55, 59).

2.1.2.1.2. Lipid metabolizmasıyla ilişkili lokuslar

SORL1 (Sortilin related receptor 1), BIN1 (Bridging integrator 1), CD2AP (CD2 Associated protein) ve PICALM (Phosphatidylinositol binding clathrin assembly protein) proteinlerinin lipid metabolizmasında rol oynadığı kanıtlanmıştır (48). *SORL1* geni santral sinir sisteminde fizyolojik olarak yüksek ekspresyon göstermektedir. *SORL1*'de tanımlanan rs661057, rs11218304, rs668387 ve rs641120 SNP'leri ile sporadik AH arasında anlamlı derecede ilişki olduğu gösterilmiştir (60). SORL1 proteini A β 'nin endozomal inklüzyonu ve lizozomal degradasyonu için çözünebilir A β 'ya bağlanmaktadır. Azalmış SORL1 fonksiyonu sonucu ise AH patofizyolojisinin altında yatan hatalı APP işlenmesi ve bozulmuş A β degradasyonu ortaya çıkmaktadır (61, 62). Alzheimer hastalarında 2q14.3'de yerleşmiş olan *BIN1* geninin ekspresyon düzeyinin azaldığı ve arttığını gösteren çalışmalar mevcuttur. Alzheimer hastalarının beyin dokularındaki artmış BIN1 düzeyinin tau nörotoksisitesini arttırdığı görülmüştür (63). Öte yandan BIN1 düzeyinin azalması sonucu BACE-1 (β -site-APP-cleaving enzyme) enziminin lizozomal degradasyonunun azaldığı, bunun da artan A β üretimi ile sonuçlandığı raporlanmıştır (64). 6q12'de yerleşmiş olan *CD2AP* geninde saptanan rs9296559 ve rs9349407 SNP'lerinin de AH gelişimi ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (65). Ayrıca, insanlarda yapılan bir çalışmada *CD2AP* genindeki rs9349407 varyantının yüksek plak yükü ile ilişkili olduğu sonucuna varmıştır (66). 11q14'te yerleşmiş olan *PICALM* geni, AH patogenezinde rol oynadığı muhtemel olan intrasellüler transportun yanısıra klatrin-aracılı endositoza da katılan bir proteini kodlamaktadır. Bu gende saptanan

rs3851179 ve rs541458 SNP'leri AH gelişme riski ile ilişkilendirilmiştir (67). Aynı zamanda çalışmalar, PICALM'in AH patogenezinde APP metabolizması ve tauopati sürecine katılabileceğini göstermektedir (48).

2.1.2.1.3. Diğer lokuslar

International Genomics of Alzheimer's Project (IGAP) gerçekleştirdiği bir metaanalizde 10 genetik lokus tanımlamıştır: *CASS4* (Cas scaffold protein family member 4), *CELF1* (CUGBP Elav-like family member 1), *DSG2* (Desmoglein 2), *FERMT2* (fermitin family member 2), *DRB5/HLA-DRB1* (Major histocompatibility complex, class II, DR beta 1), *INPP5D* (inositol polyphosphate-5-phosphatase D), *MEF2C* (myocyte enhancer factor 2C), *NME8* (NME/NM23 family member 8), *PTK2B* (protein tyrosine kinase 2 beta) ve *ZCWPW1* (zinc finger CW-type and PWWP domain containing 1). Ancak bu bahsedilen lokusların AH ile olan işlevsel ilişkisi tam olarak anlaşılamamıştır (68).

Son yıllarda tüm ekzom dizileme (WES) ve tüm genom dizileme (WGS) gibi tekniklerin daha yaygın olarak kullanılmasıyla AH ile ilişkilendirilen bazı genlerde düşük frekanslı ve nadir varyantlar tanımlanmıştır: *TREM2* (Triggering receptor expressed on myeloid cells 2), *PLD3* (phospholipase D family member 3), *TTC3* (tetratricopeptide repeat domain 3), *UNC5C* (unc-5 netrin receptor C), *AKAP9* (A-kinase anchoring protein 9), *SORL1*, *CLU*, *APP* (48).

2.1.3. Patofizyoloji

AH'de tanımlanan nörobiyolojik değişiklikler, hastalığın patolojisinin anlaşılmasına önemli katkıda bulunmuştur. Tanımlanmış en önemli mekanizmalar: glutamaterjik nörotransmisyon değişiklikleri içeren kolinerjik hipotez, amiloid hipotezi, tau proteininin rolü, oksidatif stres ve kalsiyum homeostazisidir (2). Son zamanlarda nöroinflamasyonun da hastalık patogenezinde rol oynadığı bildirilmiştir.

2.1.3.1. Kolinerjik Hipotez

Alzheimer hastalarında nikotinik reseptörlerin sayısı ve dansitesinde, korteks ve hipokampustaki $\alpha 3$, $\alpha 4$ ve $\alpha 7$ subunitlerinin ekspresyonunda azalma gözlenmiştir

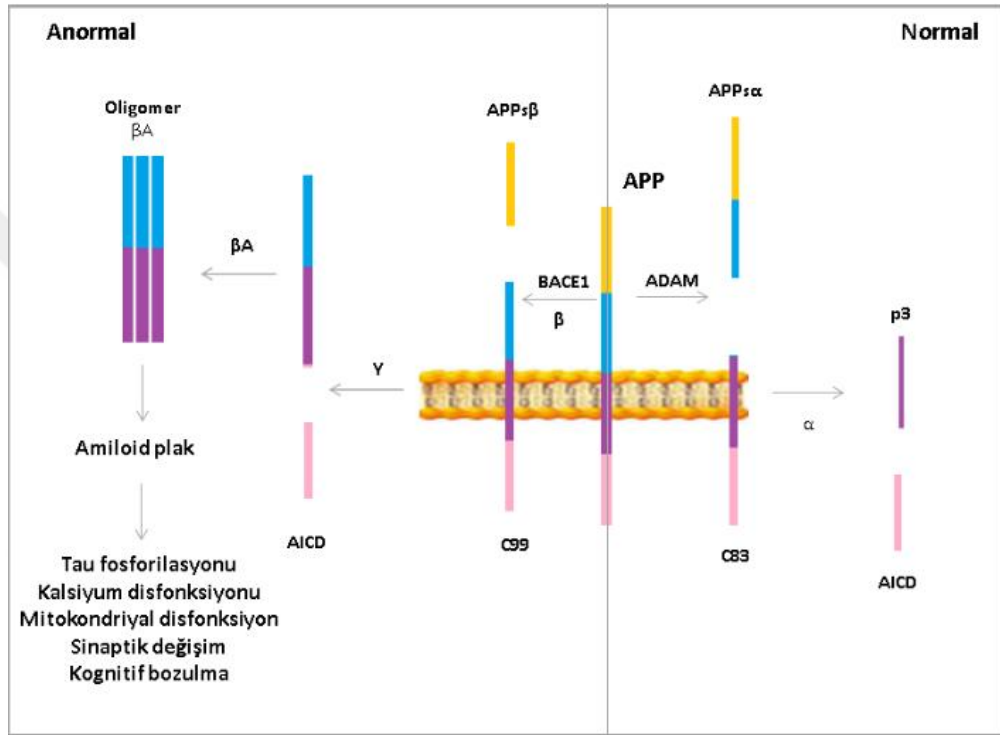
(69). Bu hipotezin gelişimine zemin hazırlayan kolinerjik nöronlardaki ana değişiklikler şunlardır: bozulmuş asetilkolin salınımı, nikotinik ve muskarinik reseptörlerin ekspresyonundaki yetersizlikler, disfonksiyonel nörotrofin desteği ve aksonal transporttaki eksiklikler (70-72). Son çalışmalar amiloid β 'nin kolinerjik reseptörlerle etkileşime girerek onların fonksiyonlarını bozduğunu göstermiştir (73). Bilişsel bozulma ile beyin içindeki azalmış kolinerjik iletim arasında gözlenen bu ilişkinin AH'de önemli rol oynadığı konusunda görüş birliği vardır. Bununla birlikte tek başına hastalığın nedeni olmadığı düşünülmektedir (2).

2.1.3.2. Amiloid Hipotez

Bu hipotez, amiloidin üretimi ve temizlenmesi arasındaki dengesizliğe dayanmaktadır (74). Amiloid β proteolitik degradasyona karşı yüksek direnç gösteren bir peptiddir. İzofomlar içinde en hidrofobik olan β 1-42 amiloid peptidinin daha yüksek toksisiteye sahip olduğu düşünülmektedir. Fiziksel özelliklerinden dolayı amiloid nöritik plakların ana bileşeni olan β plak konfigürasyonu oluşturmaya eğilimlidir (75-77). Plazma membranında amiloid prekürsör proteinin (APP)'nin işlenmesi, amiloid peptidin kökenini oluşturmaktadır (**Şekil 2.1**) (2). APP işlenmesi, ADAM10 (A disintegrin and metallopeptidase domain 10), ADAM17 (A disintegrin and metallopeptidase domain 17) ve ADAM19 (A disintegrin and metallopeptidase domain 19), disintegrin ve metaloproteaz ailesine ait enzimler ile bir dizi kopma şeklinde gerçekleştirilmektedir. α sekretaz aktivasyonu sonucu APPs α adı verilen amino terminal kısım ve karboksi terminal kısım birbirinden ayrılmaktadır (C83). Belirli koşullar altında çözünebilir olan APPs α Alzheimer hastalarında düşük miktarda bulunmaktadır (78-80).

Alzheimer hastalarında ise APP bir β sekretaz aktivitesi olan BACE-1 tarafından daha kısa çözünebilir amino terminal kısım (APPs β) ve daha uzun karboksi terminal fragmana (C99) parçalanmaktadır (81, 82). Presenilinler (PSEN1 ve PSEN2), NCSTN (Nicastrin) ve APH-1 (aph-1 homolog A, gamma-secretase subunit) şeklinde dört alt birimden oluşan γ -sekretaz aktivitesinden sonra ise AICD (APP Intracellular Domain) olarak adlandırılan APP intrasellüler domain ve düşük çözünürlüğü nedeniyle ekstrasellüler alanda biriken amiloid β peptid oluşmaktadır (2, 83, 84).

Amiloid β peptid konsantrasyonları, üretim ve klirens arasındaki denge ile belirlenmektedir. AH'deki klirens anormalliği beyinde amiloid β birikmesine yol açmaktadır (85). Amiloid hipotezi yüksek kabul oranına sahiptir ancak son çalışmalar yalnızca amiloidin değil, C83 veya AICD gibi APP'nin işlenmesinden sonra ortaya çıkan diğer yapıların da, AH'nın patogeneziye katkıda bulunduğunu göstermektedir (86).



Şekil 2.1. Plazma membranında amiloid prekürsör proteininin (APP)'nin işlenmesi.

Sanabria-Castro ve arkadaşları, 2017'den uyarlanmıştır (2)

2.1.3.3. Tau (τ) Protein Hipotezi

Bu hipotez, τ proteininin nörodejenerasyona neden olan ikincil bir patojenik olay olarak ortaya çıkmasına dayanır (87, 88). Yapılan in vitro çalışmalar amiloidin τ -değişikliklerini indüklediğini göstermiştir (89). τ proteini, normal koşullar altında aksonal transport ve nöronal büyümede rol oynayan mikrotübüllerin fonksiyonlarıyla ilişkili, oldukça çözünür bir proteindir. AH'de fosforilasyon sürecindeki bozukluklar, τ proteininin hiperfosforilasyonuna neden olmaktadır (2). Hiperfosforile τ proteini

hücre iskelet proteinleri ile anormal agregasyon göstermektedir. Sonuç olarak nörofibriller yumaklar oluşmakta ve aksonal transport bozulmaktadır (90).

2.1.3.4. Oksidatif Stres

Senil plakların ve nörofibriller yumakların patolojisine ek olarak, oksidatif stresin varlığı Alzheimer beyinlerinin bir özelliğidir. Serbest radikal hasarı birikimi, süperoksit dismutaz ve katalaz gibi antioksidan enzimlerin aktivitelerindeki veya ekspresyonundaki değişiklikler de Alzheimer hastalarında gösterilmiştir. AH patogenezinde oksidatif stres önemli bir faktör olmasına rağmen, redoks denge değişikliğinin mekanizmaları ve serbest radikallerin kaynakları tam olarak bilinmemektedir (2, 91).

2.1.3.5. Kalsiyum Homeostazisi

Hücre içi kalsiyum homeostazının düzenlenmesi karmaşık bir mekanizmadır. Bu düzenlenmede iki ana organel rol oynamaktadır: endoplazmik retikulum ve mitokondri. Kalsiyum sitoplazma ve endoplazmik retikulum lümeni arasında devamlı geçiş göstermektedir. İntrasellüler kalsiyumun aşırı birikmesi transport sistemini bloke etmekte, bazı proteinlerin parçalanmasına neden olmakta, amiloid β ve τ proteinlerinin üretilmesini indüklemektedir (2, 92). AH'de, nöronların kalsiyum iç akışı, dış akışı ve subsellüler bölümlenmesini düzenleme yeteneği bozulmaktadır (93).

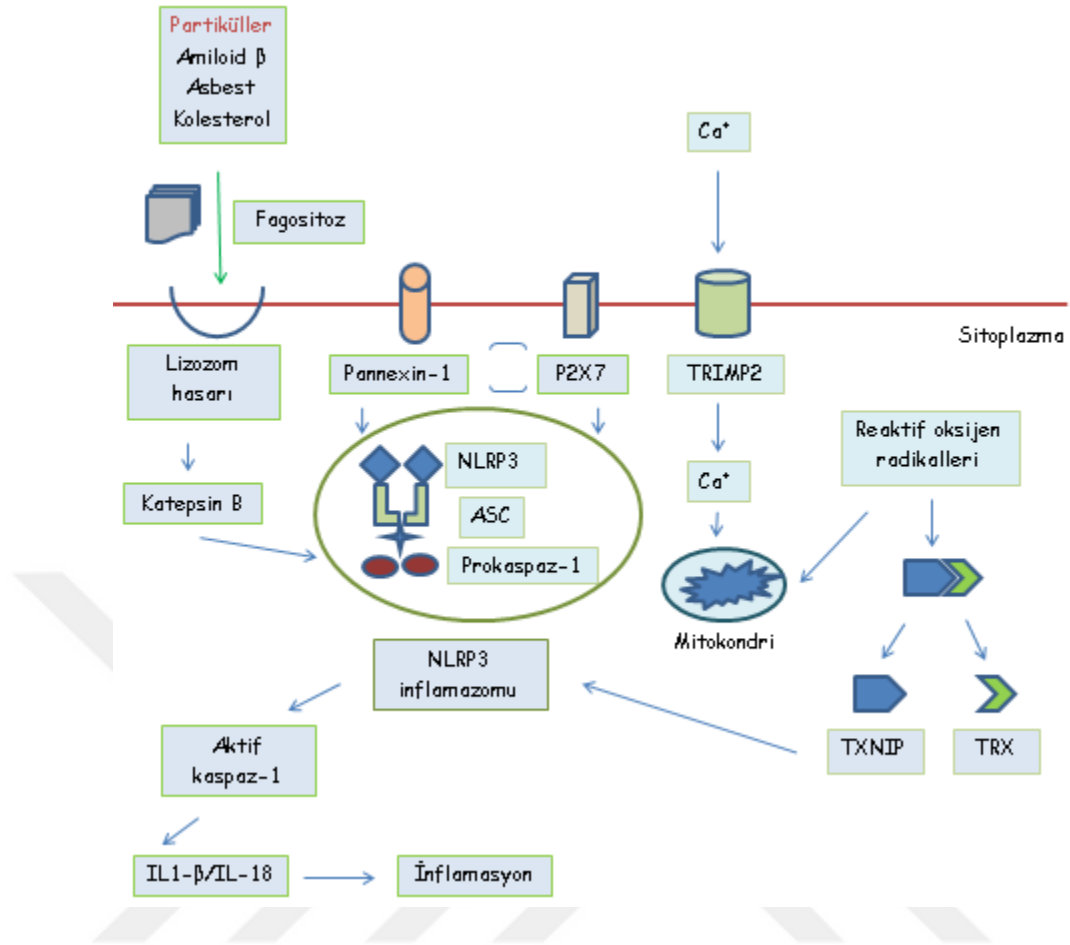
2.1.3.6. Nöroinflamasyon

Bu hipoteze göre inflamatuvar strese doğal nöronal yanıt, tau'nun hiperfosforilasyonunu (hp-Tau), hp-Tau'nun somatodendritik kompartmana doğru hatalı lokalizasyonu ve artmış APP sentezini içermektedir. Fizyolojik koşullar altında, ortaya çıkan APP agregatları nöroprotektif mikroglia ile temizlenmektedir. Ancak patolojik yaşlanmada, mikroglialar hem artmış proinflamatuvar sitokin salınımına neden olmakta hem de disfonksiyonel fagositoz yapmaktadır. Bu durum nöronların nörotoksik proinflamatuvar mikroçevreye maruziyeti ile sonuçlanmaktadır. Aksonal transportun bozulmasına yol açan aksonal hücre

iskeletinın parçalanması ve hiperreaktif mikrogliya ile giderilemeyen distrofik nörit yapıları nöronal hasarı oluşturmaktadır. Bu nöronal dejenerasyona ikincil olarak intrasellüler APP agregatlarından A β plakları ortaya çıkmaktadır. Bu plaklar, nörotoksik inflamatuvar yanıtın kısır döngüsüne yol açan proinflamatuvar moleküllerin daha fazla salınımını tetiklemektedir (94).

2.1.3.6.1. NLRP3 inflamazomu

NLRP3 inflamazomunun A β ile aktivasyonu AH patogenezinde kritik rol oynamakta olup, IL-1 β olgunlaşması ve sonrasında gelişen inflamatuvar olaylar için temel oluşturmaktadır (95). NLR (nucleotide-binding oligomerization domain-like receptor) inflamazom kompleksleri arasında en iyi tanımlanmış olanı NLRP3 inflamazomudur. NLRP3 inflamazom aktivasyonunun hem posttranskripsiyonel hem de posttranslasyonel olarak düzenlendiği düşünülmektedir (96). NLRP3 LRR (leucine-rich repeat) bölgesi aracılığıyla tehlike sinyallerini algıladıktan sonra, NLRP3 monomerleri oligomerizasyonu indüklemekte ve homofilik etkileşimler yoluyla bir adaptör protein olan ASC (Apoptosis-associated speck-like protein containing CARD)'nin pirin bölgesi (PYD) ile etkileşime girmektedir. ASC adaptör proteini daha sonra bir kaspaz etkileşim bölgesi (CARD) aracılığıyla pro-kaspaz-1'i ortama çağırılmaktadır (97). Sonuç olarak kaspaz-1'in aktivasyonu IL-1 β ve IL-18 gibi proinflamatuvar sitokinlerin maturasyon ve sekresyonuna yol açmaktadır. Bu durum da programlanmış inflamatuvar hücre ölümünün bir formu olan piroptozisi indüklemektedir (98-100). NLRP3 inflamazomu çeşitli patojen orijinli PAMP (pathogen associated molecular pattern) ve DAMP (damage associated molecular pattern) yapıları, çok sayıda por oluşturan toksin, adenosin trifosfat, partikül şeklinde kristal ve agregatlar tarafından aktive edilebilmektedir (**Şekil 2.2.**) (96).

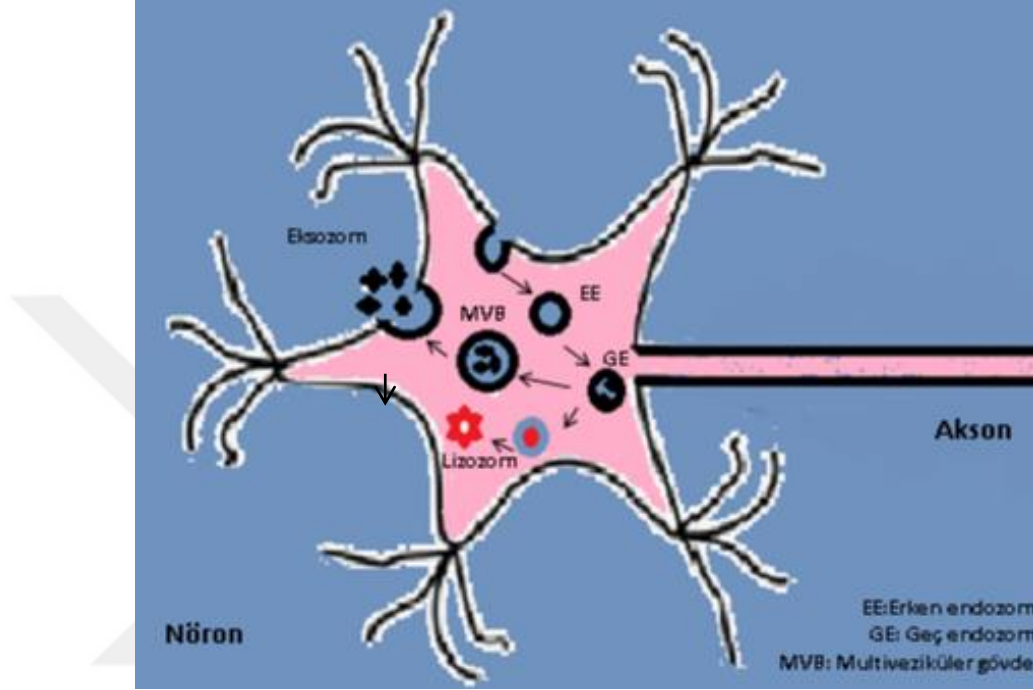


Şekil 2.2. NLRP3 inflamazomunun aktivasyonu ve regülatörleri. Jo ve arkadaşları, 2016'dan uyarlanmıştır (101)

2.2. Eksozomlar

Eksozomlar, nöronal hücreler dahil olmak üzere hemen hemen tüm hücre tipleri tarafından salınabilen hücre dışı keseciklerdir (genellikle 50-100 nm çap) (102). Eksozomların moleküler içerikleri protein, lipit ve genetik materyalden oluşmaktadır (103). Eksozomlar, endositik yollarla üretilen küçük zar kesecikleridir (104). Plazma zarının içe doğru tomurcuklanması, küçük veziküller oluşturur. Daha sonra bu küçük veziküller birleşerek erken endozom adı verilen yapıyı oluşturur. İntرالuminal veziküller (ILV'ler), erken endozomun olgunlaşma süreci sırasında oluşmaya başlar. ILV'ler oluştuğundan sonra, proteinler, lipitler ve RNA'lar gibi sitoplazmik moleküller lümen içine kapsüllenir ve geç endozom içinde biriktirilir, böylece multiveziküler gövdeler (MVB'ler) oluşturulur. MVB'ler sonrasında iki farklı yol izler: Bazıları degradasyon için lizozomlara taşınırken, diğerleri plazma

membranyyla birleşerek ILV'lerin ekstrasellüler bölgeye eksozom olarak serbest bırakılmasıyla sonuçlanır (Şekil 2.3.) (105). Sekrete edilmiş eksozomlar hedef hücrelerle yüzey markırları aracılığıyla etkileşebilir. Ayrıca eksozomlar hedef hücre tarafından endositotik yollarla içeri alınıp endozom yapılarına katılabilir (106, 107).

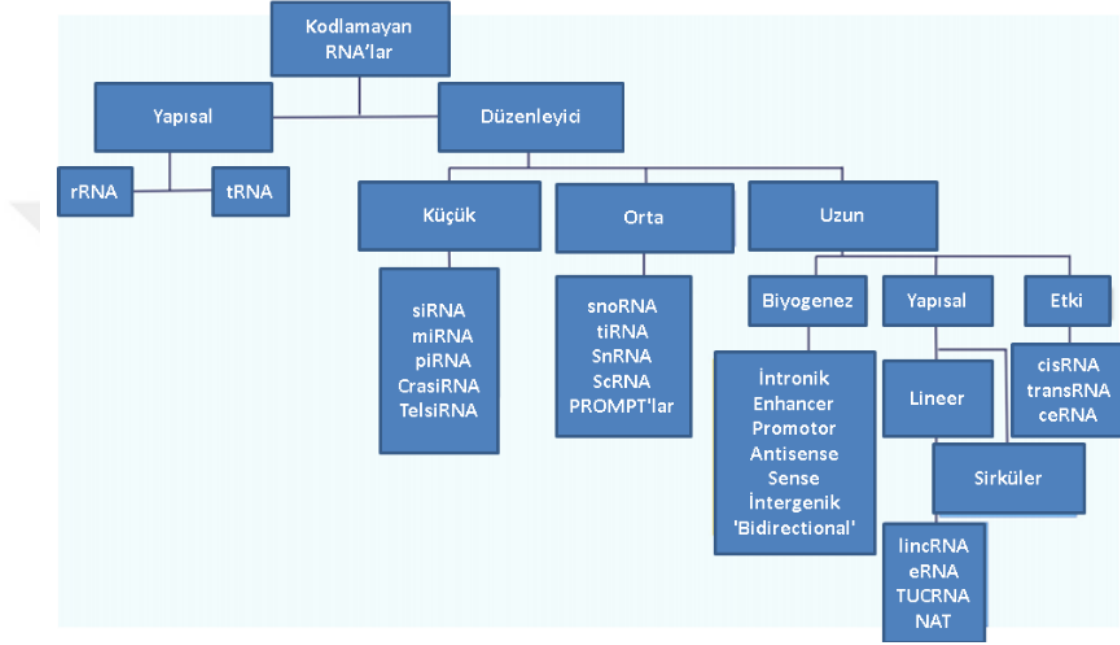


Şekil 2.3. Nöral hücredeki eksozom biyogenezi. Janas ve arkadaşları, 2016'dan uyarlanmıştır (105)

Eksozomlar nöronlar, astrositler, oligodendrositler ve mikroglialar gibi santral sinir sistemi (SSS)'deki çoğu hücre tipi tarafından oluşturulup nöronal gelişim, rejenerasyon ve sinaptik fonksiyonların regülasyonuna katılırlar (108-110). Ayrıca nörodejeneratif hastalıkların progresyonu, bu tür hastalıklarda görülen patojenlerin yayılımı ve transferi gibi olaylarda da görev alırlar (111). Eksozomların kan beyin bariyerini geçebilmeleri, plazma ya da serum gibi yapılardan kolaylıkla elde edilebilmeleri, yarı ömürlerinin uzun olması, non-immünojenik ve non-toksik olmaları, stabilitelerinin yüksek olması dolayısıyla laboratuvar şartlarına uygun olmaları, periferik kanda nörolojik hastalıkların tanı ve tedavisine yönelik yapılacak araştırmalarda oldukça avantaj sağlamaktadır (112).

2.3. Kodlamayan RNA 'lar

Protein kodlamayan RNA (ncRNA)'lar, DNA'dan kopyalanan ancak proteinlere dönüştürülmeyen RNA'lardır. Çoğu mRNA, tRNA ve rRNA gibi diğer RNA'ların işlenmesi ve düzenlenmesinde rol oynar. ncRNA'lar, Şekil 2.4' te gösterildiği gibi sınıflandırılır (113).



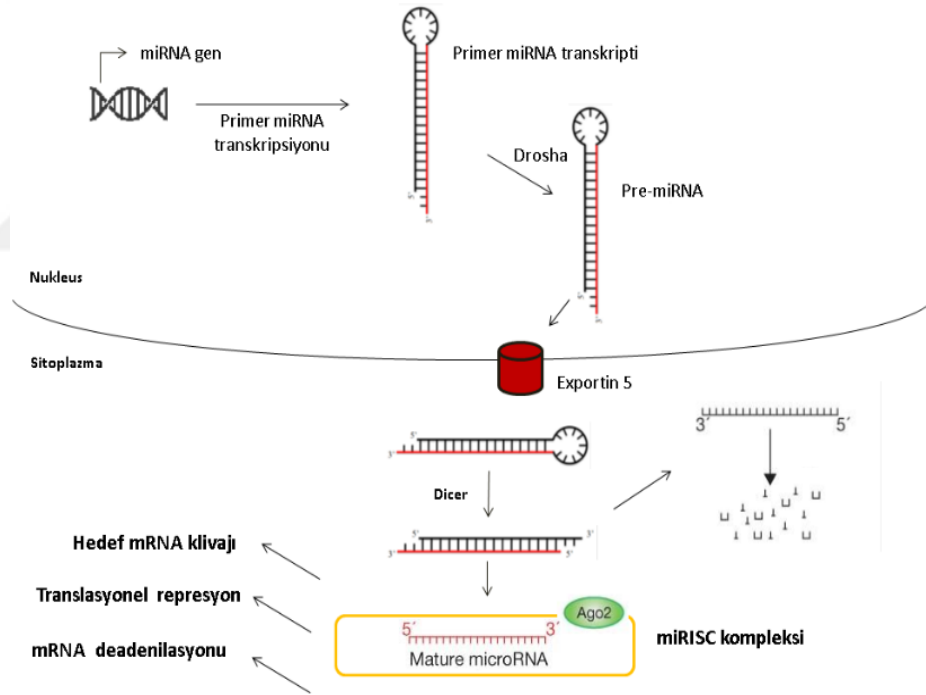
Şekil 2.4. Gen ekspresyonunu düzenleyerek farklı biyolojik fonksiyonlarda önemli rol oynayan kodlamayan RNA'ların sınıflandırılması. Dahariya ve arkadaşları, 2019'dan uyarlanmıştır (113)

Küçük RNA'lar, çift sarmallı RNA'lar (dsRNA'lar)'dan türemiş 19-28 nt uzunluğunda düzenleyici, kodlayıcı olmayan RNA'lardır. Bu RNA'lar özgün baz eşleşmesi yoluyla gen susturulmasını tetikler.

2.3.1. mikroRNA'lar

miRNA'lar 20-25 nükleotidden oluşan tek zincirli kodlamayan RNA'lardır. Hedef mRNA'nın 3'UTR (untranslated region)'sine bağlanarak gen ekspresyonunun posttranskripsiyonel regülasyonunu yapmaktadırlar. Gelişim, apoptoz, metabolizma ve sinyal yolları dahil olmak üzere birçok biyolojik fonksiyonda yer alırlar (114).

miRNA'lar başlangıçta, çift sarmallı RNA moleküllerini (dsRNA'lar) oluşturmak için, transkripsiyon veya splicing yoluyla üretilen ve ilmek yapısı oluşturan tek sarmallı RNA'lar (ssRNA'lar)'dır (115). RNA polimeraz II veya RNA polimeraz III birincil miRNA'ları (pri-miRNA) transkribe eder. Birincil miRNA transkriptleri nukleusta Drosha ile işlenerek ~ 70-nt saç tokası prekürsör miRNA'ları (pre-miRNA'ları) oluşturur. Sonrasında pre-miRNA'lar Exportin 5 ile sitoplazmaya taşınır. Başka bir RNaz III enzimi olan endoribonükleaz Dicer tarafından kesilir ve kısa miRNA duplesi meydana gelir. Dupleksin daha az stabil olan tek ipliği olgun miRNA, Argonaute proteini ve diğer kofaktörleri içeren miRISC (miRNA-induced silencing complex) olarak toplanır. Diğer iplik yıkılır. miRNA'lar ve hedef diziler arasındaki baz eşleşmeleri yoluyla miRISC'ler hedef mRNA'lara bağlanarak mRNA yıkımını ya da translasyonel susturmayı tetikler (**Şekil 2.5**) (114, 116).



Şekil 2.5. miRNA işlenmesinin şematik gösterimi. Winter ve arkadaşları, 2009'dan uyarlanmıştır (116)

Normal nöronal fonksiyon ve sağkalım için miRNA'ların gerekli olduğu bildirilmiştir (117, 118). Son çalışmalar, fonksiyonel proteinlere ek olarak, eksozomların mRNA ve miRNA'ları da taşıdığını göstermiştir (119). Eksozomların

işlevsel olarak hücreler arası iletişimin yeni bir mekanizmasını temsil ettiği düşünülmektedir.

2.3.1.1. Alzheimer hastalığı ve mikroRNA

AH için non-invaziv biyobelirteç arayışı son yıllarda yapılan araştırmalarda önemli bir yer tutmaktadır. Literatüre bakıldığında miRNA'larla ilgili AH dahil olmak üzere nörodejeneratif hastalıklarda birçok çalışma mevcuttur. Saptanan miRNA'lardaki ekspresyon değişikliklerinin AH patogenezinin farklı açılardan katkıda bulunduğu bilinmektedir.

AH patogenezinde önemli yer tutan A β ve Tau hipotezlerinin adımlarında yer alan miRNA'lar **Şekil 2.6. ve 2.7.**'de şematik olarak özetlenmiştir (120).

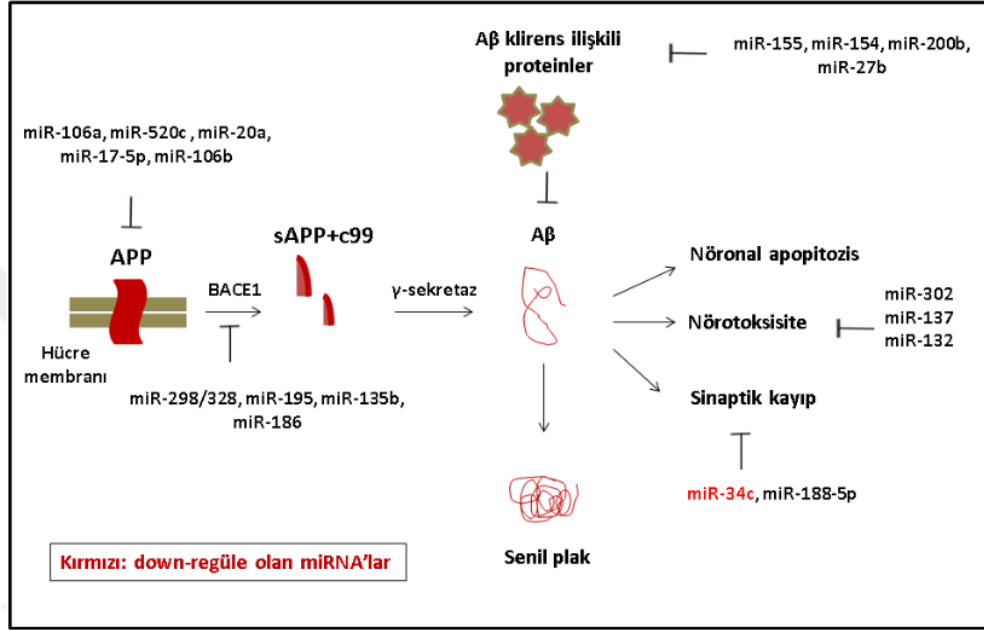
Birçok miRNA'nın APP regülasyonu sürecinde katkılarının olduğu gözlenmiştir. Örneğin; miR-20a, miR-17-5p, miR-106b, miR-106a ve miR-520c'nin APP'nin 3'UTR'sine bağlanarak ekspresyonunu azalttığı gösterilmiştir (121, 122). Başka bir çalışmada sporadik AH'li bireylerde düşük miR-153 seviyesinin A β birikimine katkıda bulunduğu görülmüştür (123).

Alzheimer hasta beyinlerinde BACE1 ekspresyonu yüksek bulunmuştur (124). miR-186, miR-195, miR-298/328, miR-135b; BACE1'in 3'UTR'sine bağlanarak negatif regülasyon yapmaktadır (125-128).

A β plaklar, amiloid peptitlerinin üretilmesi ve yıkılması arasındaki dengesizlikten kaynaklanır. Sporadik Alzheimer hastalarında artmış seviyedeki miR-128 lizozomal enzimleri hedefleyerek A β klirensini bozmaktadır (129). Alzheimer hastalarında artan miR-34a ise *TREM2* ekspresyonunu baskılayarak klirensi engeller (130). Ayrıca miR-155, miR-154, miR-200b, miR-27b gibi immün ilişkili miRNA'ların da A β klirensinde rol oynadığı bildirilmiştir (131).

A β plaklarının oluşumu son evrede nörotoksititeyi tetiklemektedir. Alzheimer hastalarının nöronlarında miR-302, A β 'nin indüklediği nörotoksititeyi Akt (AKT Serine/Threonine Kinase 1) yolağını aktive ederek baskılamaktadır (132). Son zamanlarda miR-132'nin kültüre edilmiş Alzheimer'lı kortikal nöronlarda miR132/PTEN/AKT/FOXO3a aksını kullanarak nörotoksititeyi önlediği görülmüştür (133). miR-137 ise NF- κ B yolağını baskılayarak A β ile indüklenen nörotoksititeyi azaltmaktadır (134).

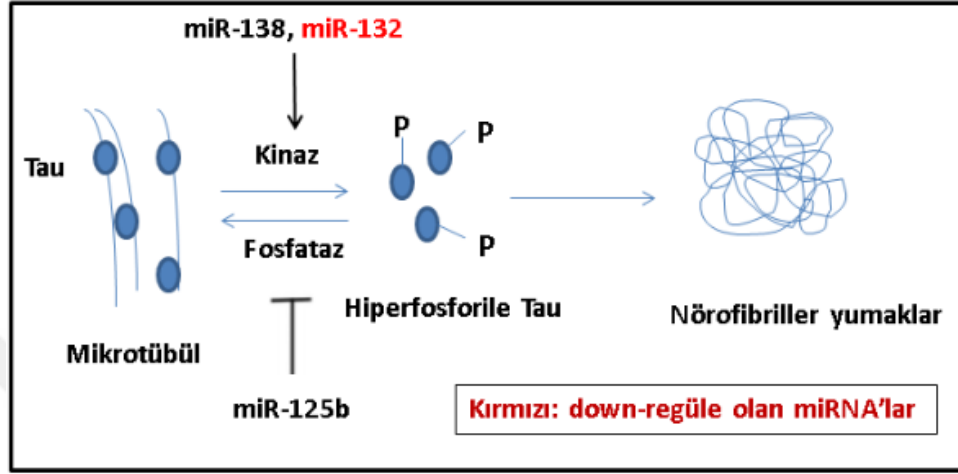
Bazı miRNA'lar A β tarafından tetiklenen sinaptik kayıpta rol almaktadır. miR-34c'nin inhibisyonunun VAMP2 (Vesicle-associated membrane protein 2) artışına neden olarak sinaptik işlev bozukluğunu ve hafıza kaybını azalttığı gösterilmiştir (135). Ayrıca primer hipokampal nöronlarda miR-188-5p artışının sinaptik ve kognitif kayıpları azalttığı gözlenmiştir (136).



Şekil 2.6. A β hipotezinde yer alan miRNA'lar. Wang ve arkadaşları, 2019'dan uyarlanmıştır (120)

AH'de kinaz ve fosforilaz aktivitelerindeki düzensizliklere bağlı Tau fosforilasyonu ve defosforilasyonu arasındaki dengesizlik sonucu hiperfosforile Tau yapısı oluşmaktadır (137). Bugüne kadar fosforilasyon/defosforilasyon süreçlerine katılan birçok miRNA tanımlanmıştır. Alzheimer hastalarında aşırı ifade bulan miR-125b, DUSP6 (Dual specificity phosphatase 6) ve PPP1CA fosfatazlarını hedefleyerek Tau hiperfosforilasyonuna neden olmaktadır (138). miR-132'nin azalmış ekspresyonunun da primer insan nöronlarında NOS1 (Nitric oxide synthase 1) yolağı üzerinden Tau metabolizması dengesizliği oluşturduğu gözlenmiştir (139). Alzheimer hastalarında artmış ekspresyonu gözlenen miR-138'in de GSK-3 β (glycogen synthase kinase-3b) aktivitesini baskılayarak Tau hiperfosforilasyonunu indüklemektedir (140).

Ayrıca nöroinflamatuvar etyopatogenez ile ilgili olarak A β 'nin proinflamatuvar sitokin olan NF- κ B'yi aktive etmesi sonucu miR-9, miR34a, miR-125b, miR-7, miR-146a ve miR-155'in artmış ekspresyonlarının nöropatolojik olaylara katkıda buldukları gösterilmiştir (141).



Şekil 2.7. Tau hipotezinde yer alan miRNA'lar. Wang ve arkadaşları, 2019'dan uyarlanmıştır (120)

2.4. Araştırmanın amacı ve hipotezleri

2.4.1. miR-373

NLRP3 inflamazomunun aktivasyonunda yer alan P2X7R (purinergic receptor P2X7) bir P2 reseptörüdür. ATP (Adenozin trifosfat) kapılı iyon kanalları olan P2X ionotropik reseptör ailesine aittir. Ekstrasellüler ATP'ye cevap olarak iyon kanalı gibi görev yapmaktadır. Ca²⁺, K⁺ ve Na⁺'a geçirgendir (142, 143). P2X7R'nin aktivasyonu p44/42 ERK (Extracellular regulated MAP kinase), p38 MAPK (Mitogen activated kinase-like protein), c-JUN N terminal kinaz, AMPK (AMP-activated protein kinase), mTOR (mammalian target of rapamycin), NF- κ B (nuclear factor kappa B subunit 1) gibi AH patogenezinde de rol alan birçok intrasellüler yolağın aktivasyonuna neden olmaktadır (144-149). Son zamanlarda yapılan post-mortem beyin çalışmalarında AH bulunan beyin dokularında P2X7R'nin ekspresyonunun ve fonksiyonunun arttığı gözlemlenmiştir. Yüksek APP ekspresyonu gösteren transgenik farelerde P2X7R'nin amiloid plak çevresinde ekspresyonunun

arttığı görülmüştür (146). Nörodejeneratif hastalıklarda P2X7R upregülasyon mekanizması net değildir, ancak bu tür hastalıkların progresyonu sırasında mikroglialının karmaşık rolü ile ilişkili olabileceği söylenmektedir. P2X7R baskın olarak mikroglialarda ekspresyon gösterse de nöron, astrosit, oligodendrosit gibi diğer hücre tiplerinde de saptanmıştır. Fizyolojik koşullar altında mikroglia sinaptik geçirgenlik ve astrosit fonksiyonlarının regülasyonu yoluyla nöronlar üzerinde koruyucu etki göstermektedir. Ancak patolojik koşullar altında P2X7R'nin mikroglia, nöron ve astrositlerdeki ekspresyonu yükselmekte, aşırı aktive mikroglialar artmış inflamasyon, nörodejenerasyon ve nöronal hücre ölümüne neden olmaktadır (150). APP mutant transgenik fare modellerinde P2X7R'nin *in vivo* inhibisyonu sonucunda hipokampal amiloid plak sayısında önemli derecede azalma görülmüştür (151). Zhang ve arkadaşları yaptıkları bir çalışmada osteoartritli hastalarda miR-373'ün P2X7R'nin 3'UTR'sine bağlanarak ekspresyonunu azalttığı ve bu hastalardaki inflamasyonu ve kondrosit proliferasyonunu baskıladığını göstermiştir (152). miR-373'ün P2X7R üzerindeki bu etkisi göz önüne alınarak, çalışmamızda Alzheimer hastalarına ait nöron kökenli eksozomlarda **miR-373**'ün ekspresyon düzeyi incelenmiştir.

2.4.2. miR-204

Şekil-2.8'de görülen, sellüler antioksidan tioredoksin sisteminin endojen inhibitörü olan ve hemen hemen tüm normal dokularda ekspresyonu görülen TXNIP (Thioredoxin (TRX)-interacting protein) dinlenme halinde TRX'e bağlı halde bulunmaktadır (153, 154). Reaktif oksijen radikalleri intrasellüler ortama geldiğinde TXNIP TRX'ten ayrılmakta ve bu yolla NLRP3 inflamazomunu aktive etmektedir (96). Önceki çalışmalar, TXNIP'in NLRP3'e bağlanmasının inflamazom aktivasyonu ve insülin rezistansı için gerekli olduğunu göstermiştir. TXNIP ile NLRP3 inflamazomu aktivasyonunun arasındaki ilişkinin Tip2 Diabetes mellitus (DM) patogenezinde de önemli olduğu düşünülmektedir (155).

Son zamanlardaki çalışmaların büyük çoğunluğu TXNIP'in farmakolojik inhibisyonunun ya da genetik delesyonunun nöroprotektif olduğunu göstermiştir (153). AH dahil birçok nörodejeneratif hastalıkta da TXNIP ekspresyon düzeyinin yükseldiği gösterilmiştir (156). D-galaktoz ile indüklenmiş Alzheimer fare

modelinde TXNIP ekspresyon düzeylerinde yükselme gözlenirken, TRX ekspresyon düzeylerinde azalma gözlenmiştir. Yine bu çalışmada farelerin bir herbal fenilpropanoid olan salidroside ile terapisi TRX düzeyinde artma ve TXNIP düzeyinde azalma sağlayarak kognitif fonksiyonlarda düzelme ile sonuçlanmıştır (157). Başka bir çalışmada ise TXNIP ve NLRP3 inflamazomunun inhibisyonu sonucu tau fosforilasyonunda azalma ve endoplazmik retikulum stresinde supresyon izlenmiştir (158).

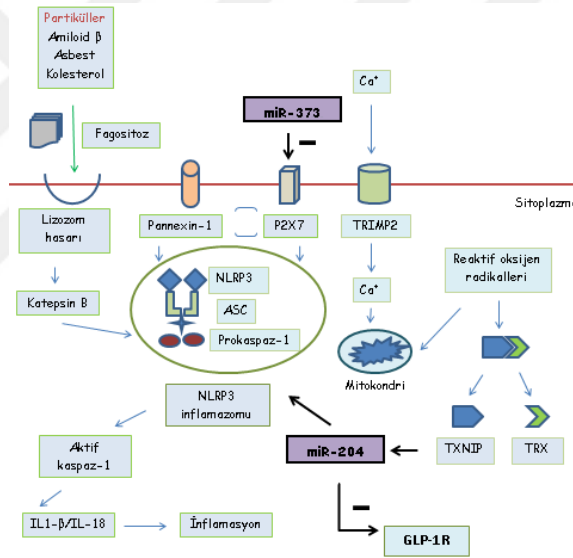
Ayrıca TXNIP'in, GLUT-1 (glucose transporter-1) fonksiyonunu azalttığı gösterilmiştir. GLUT-1 ekspresyon düzeylerindeki azalma AH'deki amiloid β patolojisini hızlandırmakta, amiloid β klirensini azaltmakta, ilerleyici nöron kaybı ve nörodejenerasyon oluşturmaktadır (159).

Jo ve arkadaşları TXNIP'ı, miR-204'ün upstream regülatörü olarak tanımlamışlardır. TXNIP'a cevap olarak miR-204 düzeyi artmaktadır. Beta hücre spesifik TXNIP knockout farelerde miR-204'ün daha düşük saptandığı görülmüştür (160).

Öte yandan Tip 2 DM varlığı AH riskini artırmaktadır (161). Bu ilişkinin altında yatan mekanizma insülin ve GLP-1 (glukagon-like peptide 1) sinyalindeki eksikliklerdir (162). GLP-1, eksitotoksik hücre ölümüne ve A β 1-42'nin oluşturduğu toksik etkilere karşı büyük nöronların soma ve dendritlerinden eksprese olarak nöroprotektif etki göstermektedir. Hipokampus ve hipotalamus hücrelerinin yüksek oranda GLP-1R (glukagon-like peptide 1 reseptörü) eksprese ettiği bilinmektedir (163). Farelerde intraventriküler GLP-1 terapisinin denendiği bir çalışmada nöronal hücre hasarında azalma, öğrenme ve hafıza fonksiyonlarında düzelme gözlenmiştir (164). Literatürde GLP-1 mimetiklerin, nörodejeneratif hastalıklara karşı nöroprotektif etkili oldukları bildirilmiştir (165). APP/PS1 mutant transgenik farelerine GLP-1 analogu liraglutid uygulanması sonucu plak oluşumunda azalma, nöroeneziste artış ve öğrenme fonksiyonlarında artış saptanmıştır (166). Jo ve arkadaşları yaptıkları bir çalışmada miR-204'ün GLP-1R'nin 3'UTR'sini hedefleyerek primer fare ve insan pankreas adacıklarında GLP-1R ekspresyonunu baskıladıklarını göstermiştir. Ayrıca miR-204'ün *in vivo* delesyonunun GLP-1R ekspresyonunu ve insülin sekresyonunu artırdığı dolayısıyla diyabete karşı protektif etkilerinin olduğu keşfedilmiştir (160). Literatürdeki miR-204 ile ilgili bu bilgilere

dayanarak çalışmamızda Alzheimer hastalarından elde edilen nöron kökenli eksozomlardan **miR-204** ekspresyonu incelenmiştir.

Bu çalışma ile AH patogenezine katkı sağlamak amaçlanmıştır. Ayrıca eksozomların kullanılması ile, hastaların tanısında ve izleminde periferik kan kullanımının rutin uygulamalarda kolaylık sağlayacağı düşünülmektedir. Bunun dışında, miRNA'ların saptanan ekspresyon değişikliklerine göre modifiye edilip eksozomlar aracılığıyla hedefe yönelik gönderilmesi terapötik bir potansiyel taşımaktadır. Sonuç olarak, bu çalışmamızda yukarıda belirtilen bu iki miRNA'nın (miR-373, miR-204) erken ve orta düzey Alzheimer hastalarından ve sağlıklı gönüllülerden elde edilecek nöron kökenli serum eksozomlarında (167) ekspresyonları incelenmiştir (**Şekil 2.8.**).



Şekil 2.8. Araştırma hipotezinin şematik gösterimi Jo ve arkadaşları, 2016'dan uyarlanmıştır (101)

Çalışmamızda AH ile ilişkilendirilecek biyobelirteç bulunması amaçlanmış olup incelenecek miRNA'ların ekspresyonlarının, literatürdeki verilere dayanarak Alzheimer hastalarında kontrol grubuna kıyasla aşağıdaki gibi sonuçlanması beklenmektedir.

- miR-373 ekspresyon düzeyinde azalma
- miR-204 ekspresyon düzeyinde artma

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmaya dahil edilecek hastalar, Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Nöroloji Anabilim Dalı ve Ankara Tıp Fakültesi Psikiyatri Anabilim Dalı polikliniğinde takip edilen veya polikliniğe ilk kez başvuran, NINCDS-ARDRA (National Institute of Neurological and Communicative Disorders and Stroke-Alzheimer's Disease and Related Disorders Association) tanı kriterlerine (168) göre olası AH tanısı almış olan hastalar içinde Klinik Demans Skoru (KDS) (169) hafif ve orta evre ile uyumlu olanlar arasından gönüllülük esasına dayalı olarak seçilmiştir. Hafif evre AH olan 15, orta evre AH olan 18 ve hastalarla yaş ve cinsiyet açısından uyumlu, Alzheimer hastalığı ile ilişkilendirilebilecek herhangi bir motor, nöropsikiyatrik ve kognitif bulgusu olmayan, hasta yakınının akrabası olmayan 21 kontrol grubu katılımcısı çalışmaya dahil edilmiştir.

Hastalarda biyobelirteç olarak medial temporal atrofinin (hipokampal atrofi-HA) değerlendirilmesinde Scheltens medial temporal atrofi skoru kullanılmıştır (170). Ayrıca hastaların vasküler demansının olması bulguların yorumlanmasını zorlaştıracağından, hastaların MR görüntülerindeki beyaz cevher lezyonları, Fazekas (171) skorlamasına göre yalnızca 0 (hiç beyaz cevher lezyonu olmayan) ve 1 (1-2 adet birleşme eğilimi olmayan beyaz cevher lezyonu mevcut olan) puan alan hastalar dahil edilmiştir.

Tüm katılımcılara Mini Mental Durum Değerlendirme (MMDD) testi uygulanmış ve puanları kaydedilmiştir. MMDD testi Folstein ve arkadaşları tarafından 1975 yılında oluşturulmuştur (172). Bu testin Türkçe geçerlilik ve güvenilirlik çalışması, Standardize (5 yıldan fazla eğitilmişler için) versiyonu için Güngen ve arkadaşları (173) tarafından, 5 yıl ve altında eğitilmişler-hiç eğitimsizlere uygulanan versiyonu için Yıldız ve arkadaşları tarafından yapılmıştır (174). MMDD testinden yüksek puan almak, daha iyi bir performans ile ilişkilidir.

Hasta grubundaki gönüllülerin yeterlilikleri nöroloji ve psikiyatri hekimi tarafından değerlendirilmiştir. Yeterliliği olmadığı belirlenen hastalar için onam hastanın yasal temsilcisinden alınmıştır. Ama her durumda hastalar olabildiğince bilgilendirilmeye çalışılmıştır.

Çalışma için etik kurul onayı, 8 Ekim 2018 tarihinde Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'ndan alınmıştır.

3.1. Araştırmaya dahil olma ve olmama ölçütleri:

3.1.1. Hasta grubu için ölçütler:

Çalışmaya dahil edilme ölçütleri:

1. 60 yaş ve üzerinde olmak
2. NINCDS-ARDRA tanı kriterlerine göre olası Alzheimer hastası olmak
3. Klinik Demans Skoru 1 ya da 2 olmak (hafif ve orta evre AH)
4. Fazekas MR beyaz cevher lezyonlarını derecelendirme skoru 0 ve ya 1 olmak

Çalışmadan dışlama ölçütleri:

1. Kognitif değerlendirmeyi bozabilecek başka bir nörolojik hastalığı olmak (İskemik ya da hemorajik serebrovasküler olay, mental retardasyon, epilepsi, Parkinson hastalığı, Alzheimer dışı demans tipleri, motor nöron hastalığı, alkol ve madde bağımlılığı vb.)
2. İleri evre Alzheimer hastası olmak (Klinik Demans Skoru = 3)
3. Diyabetes mellitus tanısı varlığı
4. Fazekas MR beyaz cevher lezyonlarını derecelendirme skoru >1 olmak

3.1.2. Kontrol grubu için ölçütler:

Çalışmaya dahil edilme ölçütleri:

1. Çalışmaya katılmayı kabul etmiş AH hastalarıyla yaş ve cinsiyet açısından birebir uyumlu özelliklere sahip olmak
2. NINCDS-ARDRA (National Institute of Neurological and Communicative Disorders and Stroke-Alzheimer Disease and Related Disorders Association) tanı kriterlerine göre Alzheimer hastası olmamak

3. Klinik Demans Skoru 0 olmak
4. Subjektif de olsa, herhangi bir kognitif yakınması olmamak

Çalışmadan dışlama ölçütleri:

1. Kognitif değerlendirmeyi bozabilecek bir nörolojik hastalığı olmak (İskemik ya da hemorajik serebrovasküler olay, mental retardasyon, epilepsi, Parkinson hastalığı, Alzheimer dışı demans tipleri, alkol ve madde bağımlılığı vb.)

2. Herhangi bir evre AD hastası olmak
3. Subjektif de olsa, herhangi bir kognitif yakınması olmak
4. Diyabetes mellitus tanısı varlığı

3.2. Yöntem Basamakları

3.2.1. Serum Eldesi

1. Her katılımcıdan 20 ml steril enjektör ile 20 ml periferik kan alındı.
2. Alınan kan, serum ayırıcı tüplere aktarıldı.
3. Oda sıcaklığında 30-45 dk pıhtılaşmasına izin verildi.
4. Pıhtılaşma sonrası 500 g'de 10 dk santrifüj edildi.
5. Süpernatant kısmından 5 ml serum pastör pipeti ile alındı.
6. Alınan serum 1,5 ml'lik tüplere bölünerek -80°C'de kullanılana kadar saklandı (175).

3.2.2. Serumdan Eksozom İzolasyonu

MiRCURY Exosome Serum/Plasma Kiti kullanılarak total eksozom elde edildi.

Tablo 3.1. Eksozom serum/plazma kit içeriği

MiRCURY Exosome Serum/Plasma Kit içeriği	
Katalog no:76603	
Precipitation Buffer A	10 ml
Resuspension Buffer	10 ml

Kit dahilinde olmayan gerekli malzeme ve cihazlar:

Pipet ve RNase içermeyen pipet uçları

Kullanılan numune hacmine bağlı olarak 1,5 ml veya 2,2 ml mikrosantrifüj tüpleri

20 °C'de 2 ml tüpler için rotorlu mikrosantrifüj

Tek kullanımlık eldivenler

Vorteks cihazı veya çok tüplü vorteks çalkalayıcı

Protokol:

1. 0.5 ml serum örneği stoktan çıkarılıp buz üzerinde veya 4° C'de çözdürüldü.
2. 2 ml santrifüj tüpüne 0,5 ml aktarıldı.
3. 200 µl 'Precipitation Buffer A' solüsyonundan serumun üstüne konularak homojenize edildi. Tüp kapatıldı ve 5 sn vortekslendi.
4. 2-8 °C'de 60 dakika inkübe edildi.
5. 20 °C'de 30 dakika boyunca 1500g'de santrifüj edildi.
6. Süpernatant tamamen alınıp -80°C 'de ayrı analiz için saklandı.
7. Pellet kısa süre tekrar santrifüj edildi ve kalan süpernatant atıldı.
8. Pellet içeren tüpe 270 µl 'Resuspension Buffer' eklendi ve vorteksle resüspanse edildi. ~ 300 µl'lik bir nihai hacim elde edildi.

3.2.3. Nöronal eksozom zenginleştirme

1. Eksozom izolasyonu ile elde edilen eksozomların 250 µl süspansiyonunun üzerine 2 µg (4 µl) Mouse anti-human CD171 (L1CAM) biotinize antikor (Thermo Fisher), 100 µl %3 Blocker BSA ile birlikte eklendi (167).

2. 4 °C’de 60 dk rotator mikser üzerinde inkübe edildi.
3. İnkübasyon sonrası üzerine 15 µl Streptavidin UltraLink Resin reçinesi (Thermo Fisher), 40 µl %3 Blocker BSA ile birlikte eklendi (Reçine BSA’ya konuldu sonrasında eksozomla karıştırıldı).
4. 30 dk boyunca 20 °C’de inkübe edildi.
5. İnkübasyon sonrası 3000 g’de 10dk boyunca 4°C sıcaklıkta santrifüj edildi.
6. Süpernatant kısmı atıldı. Pellette reçine içinde hapsolmuş nöronal eksozomlar bulunmaktadır.
7. Eksozomların reçineden ayrılması için pellet üzerine 200 µl 0.1M Glisin-HCl (pH:3) eklendi ve 30 saniye hızlı vorteksle karıştırıldı.
8. 4500 g’de 10 dk boyunca 4°C sıcaklıkta santrifüj edildi.
9. Süpernatant kısmı alındı ve 15 µl 1M TRIS-HCl (pH:8) eklenerek nötralize edildi.
10. Bu aşamada nöronal eksozomlar intakt ve ileri testler için kullanıma hazırdır.
11. Elde edilen süspansiyon 300 µl hacime gelene kadar üzerine PBS eklendi.

3.2.4. Nöronal Eksozomlardan miRNA izolasyonu

Nöronal eksozomlardan miRNA izolasyonu için miRNeasy Serum/Plasma Kit kullanıldı.

Tablo 3.2. miRNA izolasyon kit içeriği

miRNeasy Serum/Plasma Kit	
Katalog no: 217184	
RNeasy® MinElute® Spin Columns (2 ml)	50 adet
Collection Tubes (1.5 ml)	50 adet
Collection Tubes (2 ml)	50 adet
QIAzol® Lysis Reagent*	50 ml
Buffer RWT* (Alkol eklendi) (96–100%)	15 ml
Buffer RPE‡ (Alkol eklendi) (96–100%)	11 ml
Ce_miR-39_1 miScript® Primer Assay	(100)
RNase-Free Water	10 ml

1. 300 µl numune üzerine 5ml QIAzol Lysis Reagent eklendi. Vorteksleyerek veya yukarı ve aşağı pipetleyerek karıştırıldı. 20 µl 'carrier RNA' solüsyonundan eklendi.
2. 5 dakika boyunca oda sıcaklığında (15–25 ° C) inkübe edildi.
3. 1 ml kloroform eklendi ve tüp sıkıca kapatıldı ve kuvvetlice vortekslendi.
4. Oda sıcaklığında 2–3 dakika inkübe edildi.
5. 1500 g'de 15 dakika boyunca santrifüj edildi.
6. Üst aköz faz yeni bir toplama tüpüne aktarıldı. Hacmin 1,5 katı kadar % 100 etanol eklendi (örneğin, 600 µl sulu faz için, 900 µl etanol). Pipetleyerek iyice karıştırıldı.
7. 700 µl örnek pipetle çekildi ve 2 ml'lik toplama tüpüne konulan 'RNeasy MinElute spin column'un içine eklendi. Kapağı kapatıldı ve oda sıcaklığında ≥ 8000 g 15sn santrifüj edildi.
8. Numunenin geri kalanını kullanarak 8. adım örnek bitene kadar tekrarlandı.
9. 'RNeasy MinElute spin column'a 700 µl Buffer RWT eklendi. Kapağı kapatıldı ve 8000 g'de 25 saniye santrifüjlendi. Altta geçen kısım atıldı.
10. 'RNeasy MinElute spin column'a 500 µl Tampon RPE eklendi. Kapağı kapatıldı ve 8000 g'de 25 saniye santrifüjlendi. Altta geçen kısım atıldı.
11. 'RNeasy MinElute spin column'a 500 µl % 80 etanol eklendi. Kapağı kapatıldı ve ≥ 8000 g'de 2 dk 15 sn santrifüj edildi. Altta geçen kısım ve toplayıcı tüpler atıldı.
12. Yeni bir 2 ml'lik toplama tüpü (ürünle verilir) içine RNeasy MinElute spin sütun yerleştirildi. Spin kolonun kapağı açılarak, membranı kurutmak için 5 dakika boyunca tam hızda santrifüj edildi. Altta geçen kısım ve toplayıcı tüpler atıldı.
13. Yeni bir 1.5 ml'lik toplama tüpüne (ürünle verilir) RNeasy MinElute spin sütun yerleştirildi. Spin kolon membranının merkezine doğrudan 14 ul RNaz içermeyen su eklendi. Yavaşça kapağı kapatıldı ve miRNA elde etmek için tam hızda 1 dk 15 sn santrifüj edildi.

3.2.5. cDNA Sentezi

Elde edilen miRNA'lardan miRCURY LNA RT Kit ile cDNA sentezi yapıldı.

Tablo 3.3. Revers-transkriptaz PCR kit içeriği

miRCURY LNA RT Kit	
Katalog no: 339340	
5x miRCURY RT Reaction Buffer	128 µl
10x miRCURY RT Enzyme Mix, including Mg ²⁺ , RT primers and dNTPs	64 µl
UniSp6 RNA Spike-in Template	12 fmol, dried down
Nuclease-free water	1.5 ml

Tablo 3.4'de gösterilen miktarlarda buz üzerinde reverse transkripsiyon reaksiyonları hazırlandı. Aşağıdaki koşullarda termal döngü cihazına konuldu:

1. 42°C'de 60dk inkübasyon
2. Reverse transkriptazın inaktivasyonu için 95°C'de 5 dakika inkübasyon
3. Hemen 4°C'ye soğutma

Tablo 3.4. Reverse transkripsiyon reaksiyonu hazırlanması

Komponent	miRCURY LNA miRNA PCR Assay
5× miRCURY RT Reaction Buffer	2 µl
RNase-free water	5 µl
10x miRCURY RT Enzyme Mix	1 µl
Template RNA (5 ng/µl)	2 µl
Total volüm	10 µl

3.2.6. Preamplifikasyon

Bu aşama düşük RNA miktarları içeren örnekler için gereken bir ön amplifikasyondur. Real time PCR'da ekspresyon tayini için yeteri kadar hedef miRNA'nın bulunmasını sağlar.

Tablo 3.5' e göre bir reaksiyon karışımı hazırlandı.

Tablo 3.5. Preamplifikasyon reaksiyonu hazırlanması

5x miScript PreAMP Buffer	5 µl
HotStarTaq DNA Polymerase	2 µl
miScript PreAMP Primer mix	5 µl
RNAase free water	7 µl
miScript PreAMP Universal Primer	1 µl
cDNA	5 µl
Toplam	25 µl

Preamplifikasyon **Tablo 3.6'**daki koşullara göre çalıştırıldı.

Tablo 3.6. Preamplifikasyon termal döngü koşulları

Basamak	Zaman	Sıcaklık
PCR başlangıç aktivasyonu	15 dk	95°C
2. basamak siklusu		
Denatürasyon	30 sn	94°C
Annealing/ extension	3 dk	60°C
Siklus sayısı	12 siklus	

3.2.7. Real time PCR

Tablo 3.7.' ye göre bir reaksiyon karışımı hazırlandı.

Tablo 3.7. Real-time PCR hazırlanması

Komponent	Volüm
2x miRCURY SYBR Green Master Mix	5 µl
PCR primer mix (220 µl nükleaz içermeyen su ile sulandırıldı)	1 µl
cDNA template	3 µl
RNase-free water	1 µl
Total volüm	10 µl

Real time PCR **Tablo 3.8.'**deki koşullara göre Rotor-Gene® Software cihazında çalıştırıldı.

Tablo 3.8. Real time PCR termal döngü koşulları

Basamak	Zaman	Sıcaklık	Ramp rate
PCR initial heat activation	2 dk	95°C	Maximum/hızlı mod
2. basamak döngü:			
Denatürasyon	10 sn	95°C	Maximum/hızlı mod
Combined annealing/ extension	60 sn	56°C	Maximum/hızlı mod
Siklus sayısı	40		
Melting curve analysis	60-95°C		

3.2.8. Sonuçların hesaplanması ve İstatistiksel Analiz

Her bir olgu ve kontrolde negatif (no-template control) kontrole karşı hem hedef miRNA (miR-204 ve miR-373) hem endojen kontrol (U6 snRNA) için reaksiyonlar yapılmıştır. U6 snRNA normalizasyon için referans olarak kullanılmıştır.

Rotor-Gene® Software ile her bir vakanın ve kontrolün miR-204, miR-373 ve U6 snRNA Ct (cycle threshold) değerleri kendilerine ait iki reaksiyondan çıkan Ct değerlerinin ortalaması alınarak belirlenmiştir.

Elde edilen veriler kullanılarak miRNA ekspresyon değişiklikleri aşağıdaki gibi $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak) yöntemiyle hesaplanmıştır(176):

$$\text{Hasta grubu } \Delta Ct = Ct (\text{hedef miRNA}) - Ct (\text{Referans})$$

$$\text{Kontrol grubu } \Delta Ct = Ct (\text{hedef miRNA}) - Ct (\text{Referans})$$

$$\Delta\Delta Ct = \text{Hasta grubu } \Delta Ct - \text{Kontrol grubu } \Delta Ct$$

Çıkan verinin $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 'si alınmıştır.

Çalışma kapsamında veriler tanımlayıcı istatistikler kullanılarak özetlenmiştir. Bu amaçla miR-204 ve miR-373 düzeyleri için ortalama \pm standart sapma [ortanca (minimum-maksimum)] hesaplanmıştır. İstatistiksel anlamlılık için Student t testi kullanılmıştır. $p < 0.05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

4. BULGULAR

4.1. Hasta grubu

Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Psikiyatri ve Nöroloji Anabilim Dallarına Haziran 2019-Mart 2020 tarihleri arasında ilk kez başvuran veya takibi süren, NINCDS-ARDRA (National Institute of Neurological and Communicative Disorders and Stroke-Alzheimer's Disease and Related Disorders Association) tanı kriterlerine göre olası AH tanısı almış olan ve vasküler demansın dışlandığı hastalar içinde Klinik Demans Skoru (KDS) hafif ve orta evre ile uyumlu olan 33 kişiden kan örneği toplandı. Çalışmaya alınan hastaların 15'i klinik demans skorlamasına göre erken evre, 18'i orta evre olarak değerlendirilmiştir. Erken evre olan 15 hastanın 6'sı erkek 9'u kadındır. Orta evre olan 18 hastanın 4'ü erkek 14'ü kadındır. Erken evre hasta yaş grubunun ortalaması 71.4'tür. Orta evre hasta yaş grubunun ortalaması ise 76.9'dur. Erken evre erkek ve kadın hastaların yaş ortalamaları sırasıyla 72 ve 71, orta evre erkek ve kadın hastaların yaş ortalamaları sırasıyla 80.25 ve 76'dır. Erken evre hasta grubunun eğitim yılı ortalaması 8.2, orta evre hasta grubunun eğitim yılı ortalaması 6.8'dir. Erken evre hasta grubunun minimal skor ortalaması 23.7 iken orta evre hasta grubunun minimal skor ortalaması 18.3'tür. Erken ve orta evre olarak değerlendirilen hastaların yaş, cinsiyet, eğitim yılı, minimal skorları (MMS), klinik demans skorları (KDS), Fazekas skorları (FS), hipokampal atrofi skorları (HAS), var ise ek hastalıkları ve beyin MR/ PET görüntüleme sonuçları Tablo 4.1 ve Tablo 4.2'de verilmiştir.

Tablo 4.1. Erken evre hasta grubunun demografik bilgileri, klinik ve radyolojik değerlendirmesi. HAS: Hipokampal atrofi skoru, MMS: Minimental skor, KDS: Klinik demans skoru, FS: Fazekas skoru, OKB: Obsesif kompulsif bozukluk, HT: Hipertansiyon, -: Veriye ulaşamadı

Hasta no	Yaş	Cinsiyet	Eğitim yılı	MMS	KDS	FS	HAS	Ek hastalık	Beyin MR/PET
E1	75	K	0	18	1	1	-	X	-/ Tetkik yok
E2	83	E	5	23	1	1	-	X	-/ Tetkik yok
E3	84	E	15	25	1	0	2	X	Serebral ve serebellar atrofi/ Tetkik yok
E4	74	K	5	24	1	1	0	X	Serebral atrofi/ Tetkik yok
E5	77	E	18	25	1	1	2	HT	-/ Tetkik yok
E6	69	K	5	18	1	0	2	X	Serebral ve serebellar atrofi/ Tetkik yok
E7	69	K	5	27	1	1	2	X	-/ Tetkik yok
E8	70	K	11	23	1	0	2	X	-/ Tetkik yok
E9	65	E	6	27	1	1	1	OKB	Normal/ Tetkik yok
E10	74	K	3	24	1	1	3	HT	-/ Tetkik yok
E11	67	K	15	24	1	1	1	X	-/ Tetkik yok
E12	61	E	15	28	1	1	1	X	Serebral ve serebellar atrofi/ Parietotemporal bölgede hipometabolik alanlar
E13	62	E	5	25	1	1	1	X	-/ Tetkik yok
E14	81	K	5	22	1	1	2	HT	-/ Tetkik yok
E15	60	K	11	23	1	0	2-3	X	-/ Tetkik yok

Tablo 4.2. Orta evre hasta grubunun demografik bilgileri, klinik ve radyolojik değerlendirmesi. HAS: Hipokampal atrofi skoru, MMS: Minimental skor, KDS: Klinik demans skoru, FS: Fazekas skoru, OKB: Obsesif kompulsif bozukluk, HT: Hipertansiyon, -: Veriye ulaşamadı

Hasta no	Yaş	Cinsiyet	Eğitim yılı	MMS	KDS	FS	HAS	Ek hastalık	Beyin MR /PET
O1	77	K	8	14	2	1	-	X	Serebral ve serebellar atrofi/ Tetkik yok
O2	76	K	8	21	2	0	2	X	Bilateral yaygın temporoparietal atrofi/ Tetkik yok
O3	64	K	5	14	2	1	1	X	Serebellar atrofi/ Bilateral posterior parietelde hipometabolizma
O4	84	K	0	16	2	-	-	HT, Aritmi	-/Tetkik yok
O5	63	K	0	17	2	0	1	X	Normal/Normal
O6	60	K	15	26	2	0	1	X	Serebral ve serebellar atrofi/ Bilateral prefrontal ve temporal bölgede hipometabolizma
O7	79	K	11	26	2	1	1	HT	-/ Tetkik yok
O8	69	E	13	19	2	1	2	HT, Gut	Serebral atrofi
O9	75	E	5	12	2	2	1	İnkontinans	-/ Tetkik yok
O10	84	E	15	14	2	0	1	X	Serebral ve serebellar atrofi/ Tetkik yok
O11	75	K	0	13	2	1	2	X	Serebral atrofi/ Tetkik yok
O12	93	E	4	14	2	1	2	KOAH	-/ Tetkik yok
O13	89	K	3	16	2	1	2	X	-/ Tetkik yok
O14	76	K	0	22	2	0	1	X	Serebellar folya derin
O15	74	K	15	26	2	0	2	X	Sol frontotemporalde belirgin bilateral atrofi/ Sol frontotemporalde hipometabolizma
O16	76	K	3	20	2	0	1	X	-/ Tetkik yok
O17	89	K	8	21	2	1	2	Osteoporoz	-/ Tetkik yok
O18	82	K	11	19	2	1	1	X	-/ Tetkik yok

4.2. Kontrol grubu

Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Psikiyatri Anabilim Dalına Haziran 2019-Mart 2020 tarihleri arasında başvuran NINCDS-ARDRA (National Institute of

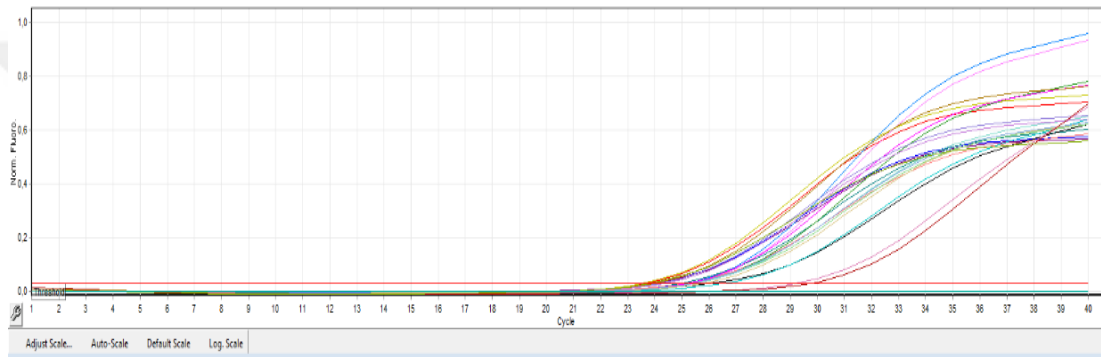
Neurological and Communicative Disorders and Stroke-Alzheimer Disease and Related Disorders Association) tanı kriterlerine göre Alzheimer hastası olmayan, Klinik Demans Skoru 0 olan ve subjektif de olsa herhangi bir kognitif yakınması bulunmayan 21 gönüllü bireyden kan örneği toplandı. Kontrol bireylerinin yaş ortalaması 66.3'tür. Kontrol grubu hasta gruplarıyla karşılaştırıldığında birebir yaş eşleşmesi sağlamıyormuş gibi görünmekle birlikte, hasta grupları arasında da evrelendirmeye bağlı olarak ortalama yaş farkı bulunduğundan kontrol grubu oluşturulurken geç evre AH için 60-65 yaş sınırı temel alınmıştır. Kontrol bireylerinin minimal skorlarının ortalaması 28.3'tür. **Tablo 4.3.**'te kontrol bireylerinin yaş, cinsiyet ve minimal skorları verilmiştir.

Tablo 4.3. Kontrol bireylerin yaş ve minimal skorları. MMS: Minimal skor

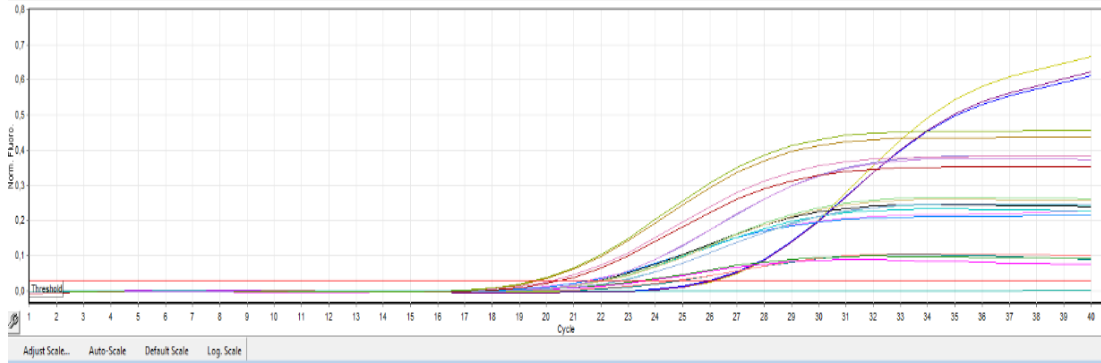
Kontrol no	Cinsiyet	Yaş	MMS
K1	E	61	28
K2	E	65	28
K3	K	61	29
K4	K	62	28
K5	E	70	28
K6	E	70	30
K7	K	65	30
K8	K	63	30
K9	K	66	30
K10	E	75	28
K11	K	60	28
K12	K	77	26
K13	E	60	29
K14	E	61	28
K15	K	69	26
K16	K	62	30
K17	E	77	28
K18	E	64	27
K19	E	63	30
K20	E	79	27
K21	E	64	27

4.3. U6 snRNA ekspresyon çalışması

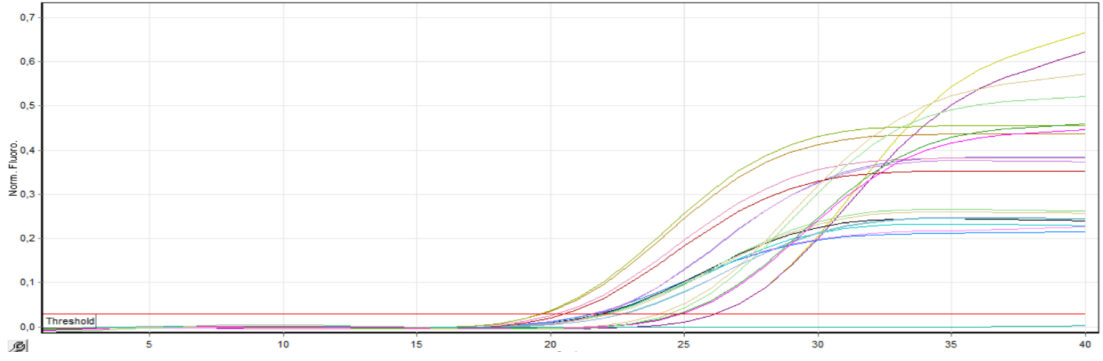
Çalışmaya dahil edilen örneklerin her birinde normalizasyon için kullanılmak üzere 15 erken evre hasta, 18 orta evre hasta ve 21 sağlıklı kontrol grubunda U6 snRNA ekspresyon çalışması yapılmıştır. Yapılan çalışmalara ait amplifikasyon eğrileri Şekil 4.1., Şekil 4.2., Şekil 4.3., Şekil 4.4. ve Şekil 4.5.'te gösterilmiştir. Her örnek iki kez çalışılmıştır. Bu çalışmalardan elde edilen Ct ve ortalama Ct değerleri **Tablo 4.4.**'te gösterilmiştir. Ayrıca E12-O9 hasta grubu için melting curve görüntüleri Şekil 4.6.'da verilmiştir.



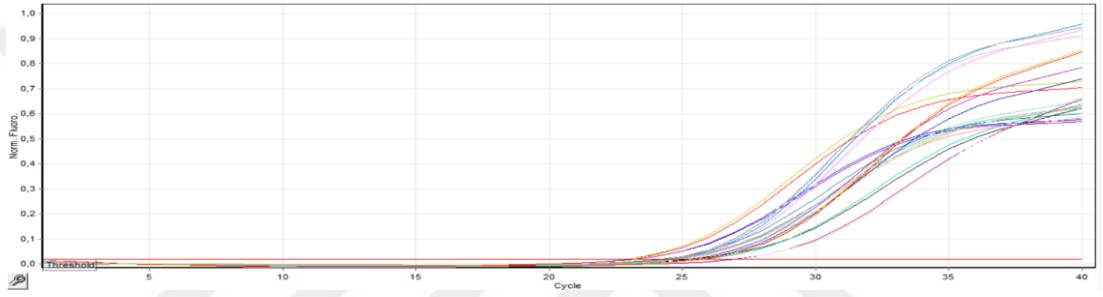
Şekil 4.1. E1, E2, E3, E4, E5, E6, E7, E8, E9, E10, E11 hastalarındaki U6 snRNA amplifikasyon eğrileri



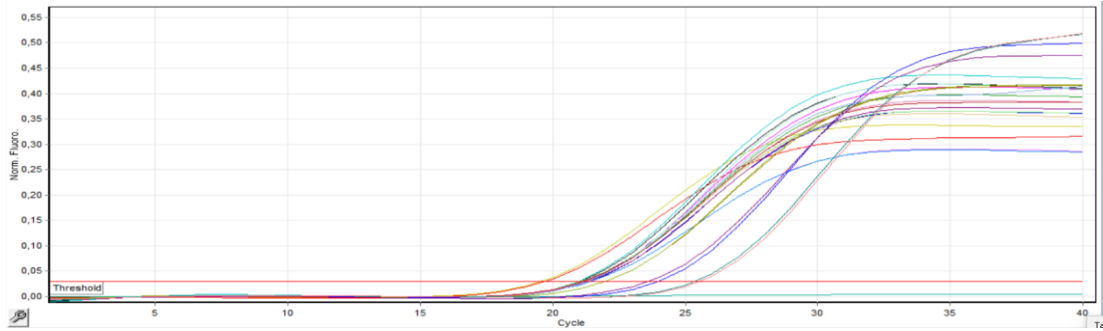
Şekil 4.2. E12, E13, E14, O1, O2, O3, O4, O5, O6, O8, O9 hastalarındaki U6 snRNA amplifikasyon eğrileri



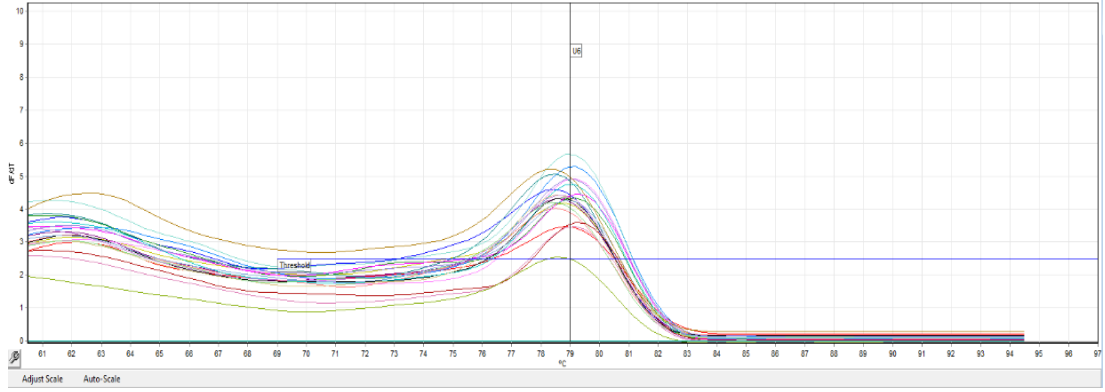
Şekil 4.3. O10, O11, O12, O13, O14, O15, O16 hastaları ve K1, K2, K3, K4 kontrol bireylerindeki U6 snRNA amplifikasyon eğrileri



Şekil 4.4. K5, K6, K7, K8, K9, K10, K11 kontrol bireyleri ve E15, O7, O17, O18 hastalarındaki U6 snRNA amplifikasyon eğrileri



Şekil 4.5. K12, K13, K14, K15, K16, K17, K18, K19, K20, K21 kontrol bireylerindeki U6 snRNA amplifikasyon eğrileri



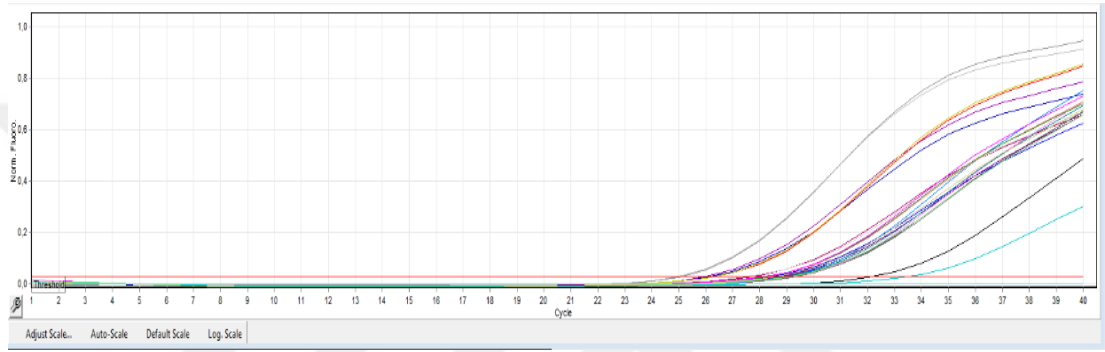
Şekil 4.6. E12, E13, E14, O1, O2, O3, O4, O5, O6, O8, O9 hastalarındaki U6 snRNA melting curve görüntüleri

Tablo 4.4. Hasta ve kontrol grubunun U6 snRNA için Ct değerleri

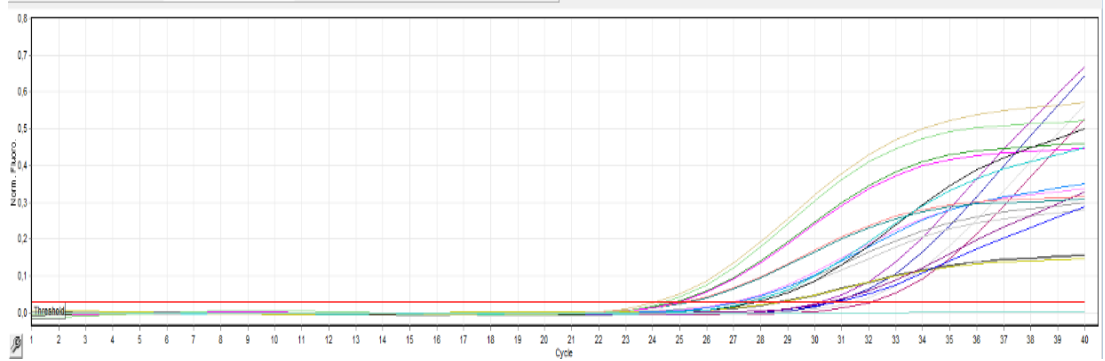
	Ct 1	Ct 2	Ortalama Ct		Ct 1	Ct 2	Ortalama Ct		Ct 1	Ct 2	Ortalama Ct
K1	21.32	21.33	21.32	E1	23.66	23.54	23.60	O1	24.96	24.86	24.91
K2	23.90	23.94	23.92	E2	23.99	24.02	24.00	O2	23.59	23.81	23.70
K3	21.24	21.21	21.22	E3	25.42	25.28	25.35	O3	21.93	22.05	21.99
K4	22.04	22.04	22.04	E4	24.91	25.17	25.04	O4	22.27	22.10	22.10
K5	21.41	21.49	21.45	E5	25.48	25.17	25.32	O5	22.71	22.77	22.74
K6	22.52	22.67	22.59	E6	26.11	26.56	26.33	O6	21.86	21.82	21.84
K7	19.82	19.69	19.70	E7	25.74	25.41	25.57	O7	18.94	19.53	19.23
K8	19.77	19.77	19.77	E8	25.41	25.37	25.39	O8	20.29	20.56	20.42
K9	23.57	24.50	24.03	E9	24.11	24.30	24.20	O9	19.77	19.65	19.71
K10	19.91	20.04	19.90	E10	24.24	24.74	24.49	O10	19.73	19.61	19.67
K11	20.97	21.01	20.99	E11	23.99	23.84	23.91	O11	21.40	21.39	21.39
K12	20.80	21.18	20.99	E12	26.29	26.25	26.27	O12	21.42	21.45	21.43
K13	20.50	21.26	21.20	E13	26.05	26.20	26.12	O13	23.10	22.83	22.96
K14	18.95	18.78	18.80	E14	25.55	25.64	25.50	O14	21.27	21.21	21.24
K15	20.75	21.42	20.80	E15	20.11	19.82	19.90	O15	21.06	20.98	21.02
K16	18.24	18.54	18.39					O16	21.25	21.10	21.17
K17	18.17	17.70	17.90					O17	24.07	21.82	22.94
K18	20.73	20.80	21.44					O18	18.24	18.45	18.34
K19	20.53	21.20	21.29								
K20	20.97	21.01	20.99								
K21	19.49	19.53	19.51								

4.4. miR-204 ekspresyon çalışması

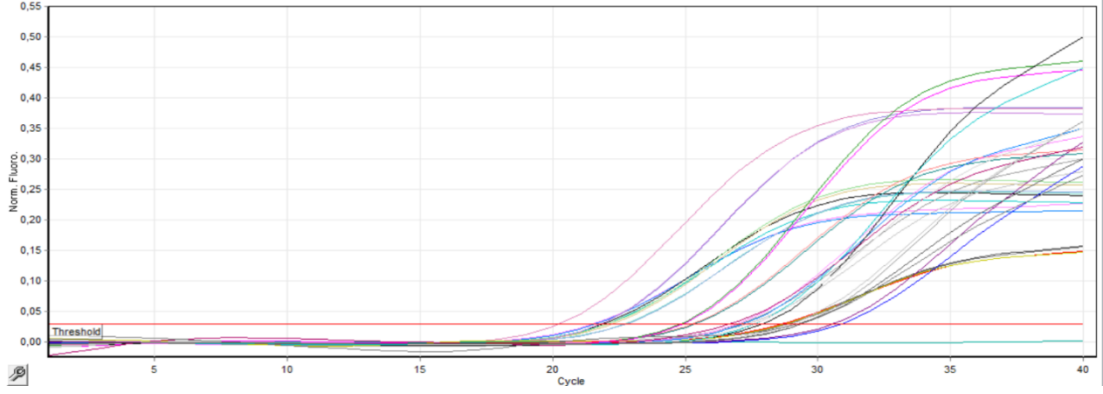
15 erken evre hasta, 18 orta evre hasta ve 21 sağlıklı kontrol grubunda miR-204 ekspresyon çalışması yapılmıştır. Yapılan çalışmalara ait amplifikasyon eğrileri Şekil 4.7., Şekil 4.8., Şekil 4.9., Şekil 4.10. ve Şekil 4.11.'de gösterilmiştir. Her örnek iki kez çalışılmıştır. Bu çalışmalardan elde edilen Ct ve ortalama Ct değerleri Tablo 4.5.'te gösterilmiştir. Ayrıca E1-11 hasta grubu için melting curve görüntüleri Şekil 4.12.'de verilmiştir.



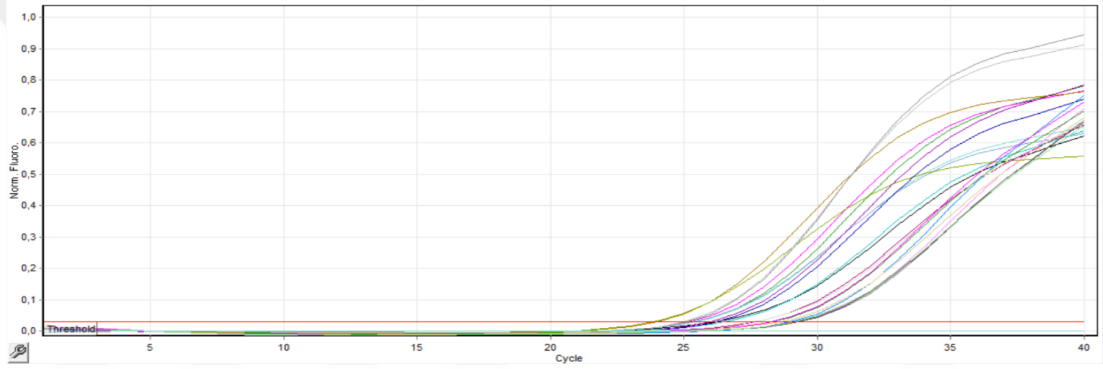
Şekil 4.7. E1, E2, E3, E4, E5, E6, E7, E8, E9, E10, E11 hastalarındaki miR-204 amplifikasyon eğrileri



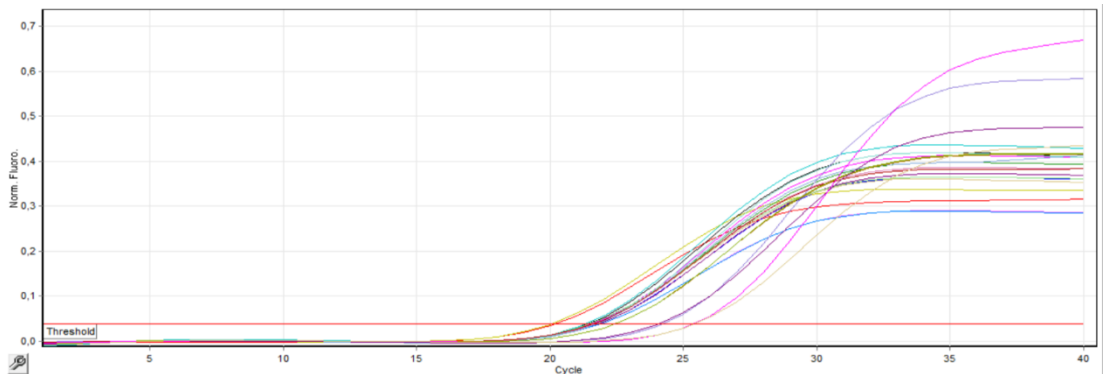
Şekil 4.8. E12, E13, E14, O1, O2, O3, O4, O5, O6, O8, O9 hastalarındaki miR-204 amplifikasyon eğrileri



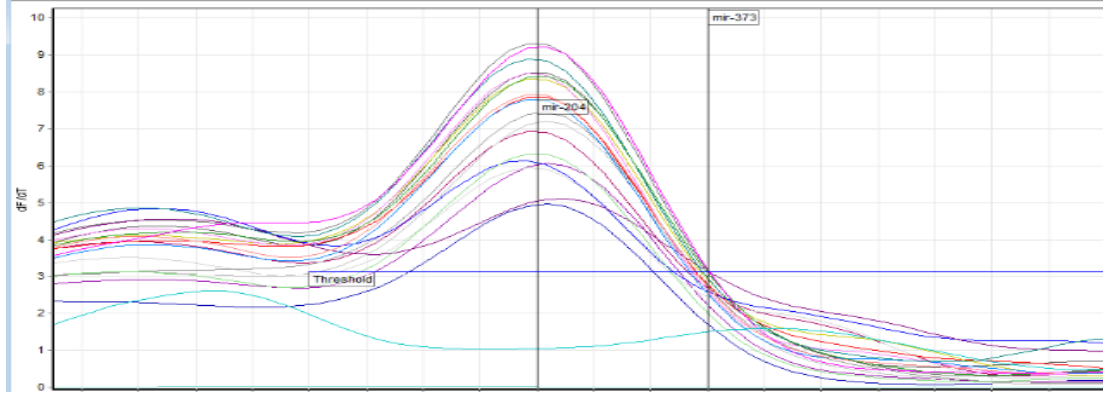
Şekil 4.9. O10, O11, O12, O13, O14, O15, O16 hastaları ve K1, K2, K3, K4 kontrol bireylerindeki miR-204 amplifikasyon eğrileri



Şekil 4.10. K5, K6, K7, K8, K9, K10, K11 kontrol bireyleri ve E15, O7, O17, O18 hastalarındaki miR-204 amplifikasyon eğrileri



Şekil 4.11. K12, K13, K14, K15, K16, K17, K18, K19, K20, K21 kontrol bireylerindeki miR-204 amplifikasyon eğrileri



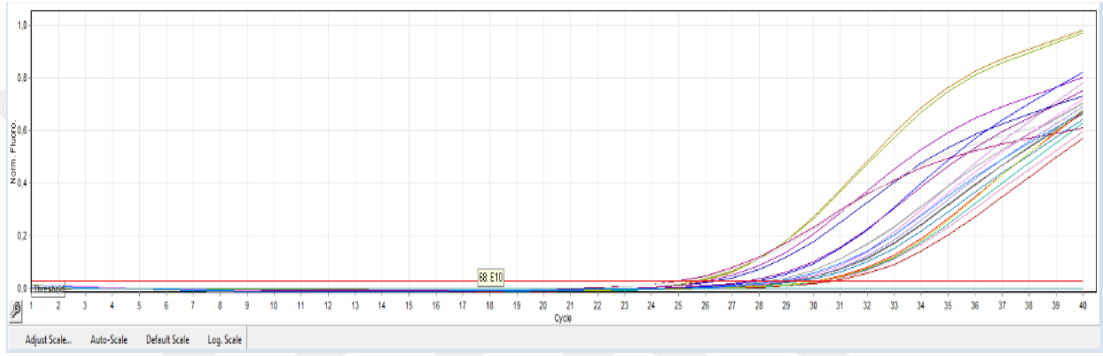
Şekil 4.12. E1, E2, E3, E4, E5, E6, E7, E8, E9, E10, E11 hastalarındaki miR-204 melting curve görüntüleri

Tablo 4.5. Hasta ve kontrol grubunun miR-204 için Ct değerleri

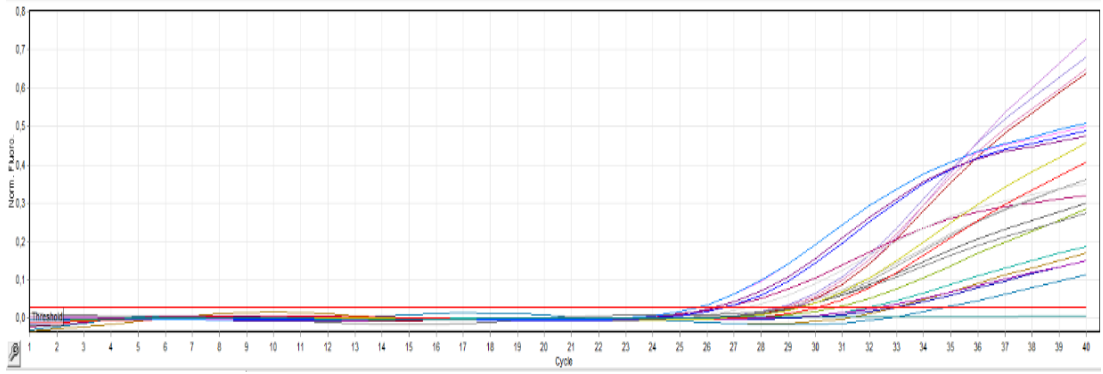
	Ct 1	Ct 2	Ortalama Ct		Ct 1	Ct 2	Ortalama Ct		Ct 1	Ct 2	Ortalama Ct
K1	25.39	25.55	25.47	E1	26.20	26.00	26.10	O1	28.86	28.68	28.77
K2	25.24	25.06	25.15	E2	27.75	27.64	27.60	O2	28.63	28.77	28.70
K3	25.69	25.70	25.69	E3	25.03	25.12	25.07	O3	30.87	30.59	30.73
K4	25.04	24.94	24.99	E4	29.35	29.22	29.28	O4	26.99	27.21	27.10
K5	23.83	23.31	23.57	E5	26.36	26.34	26.35	O5	25.36	25.26	25.31
K6	24.77	24.55	24.66	E6	28.48	28.79	28.63	O6	24.83	24.94	24.88
K7	20.67	20.66	20.60	E7	29.19	28.99	29.09	O7	25.92	25.85	25.88
K8	20.82	20.01	20.90	E8	29.02	28.31	28.66	O8	27.93	27.66	27.79
K9	20.65	20.37	20.51	E9	28.35	28.23	28.29	O9	24.16	24.52	24.34
K10	20.14	20.12	20.13	E10	32.25	33.60	32.92	O10	24.84	24.92	24.88
K11	20.01	20.04	20.07	E11	28.62	29.10	28.86	O11	29.44	30.01	29.73
K12	20.14	20.04	19.96	E12	30.74	30.30	30.52	O12	26.92	26.59	26.75
K13	20.04	19.04	21.06	E13	32.12	31.47	31.79	O13	29.81	30.46	30.13
K14	19.93	19.98	19.90	E14	27.34	27.07	27.20	O14	27.41	27.33	27.37
K15	21.02	19.53	19.57	E15	24.11	24.00	24.00	O15	24.03	23.63	23.83
K16	19.88	19.90	19.89					O16	26.98	26.98	26.98
K17	19.94	20.30	20.12					O17	26.29	25.38	25.83
K18	21.04	19.53	19.59					O18	25.13	25.12	25.12
K19	20.04	19.04	21.06								
K20	20.01	20.04	20.07								
K21	20.23	20.21	20.22								

4.5. miR-373 ekspresyon çalışması

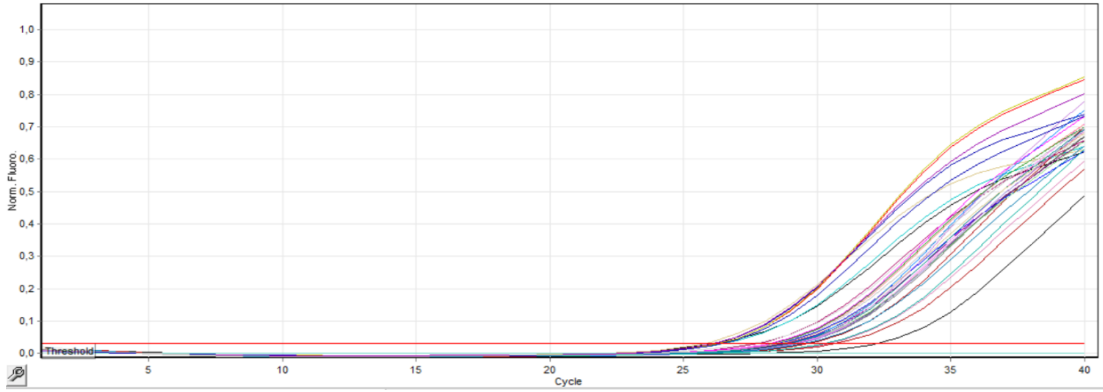
15 erken evre hasta, 18 orta evre hasta ve 21 sağlıklı kontrol grubunda miR-373 ekspresyon çalışması yapılmıştır. Yapılan çalışmalara ait amplifikasyon eğrileri **Şekil 4.13.**, **Şekil 4.14.**, **Şekil 4.15.**, **Şekil 4.16.** ve **Şekil 4.17.**'de gösterilmiştir. Her örnek iki kez çalışılmıştır. Bu çalışmalardan elde edilen Ct ve ortalama Ct değerleri **Tablo 4.6.**'da gösterilmiştir. Ayrıca O10-K4 hasta grubu için melting curve görüntüleri **Şekil 4.18.**'de verilmiştir.



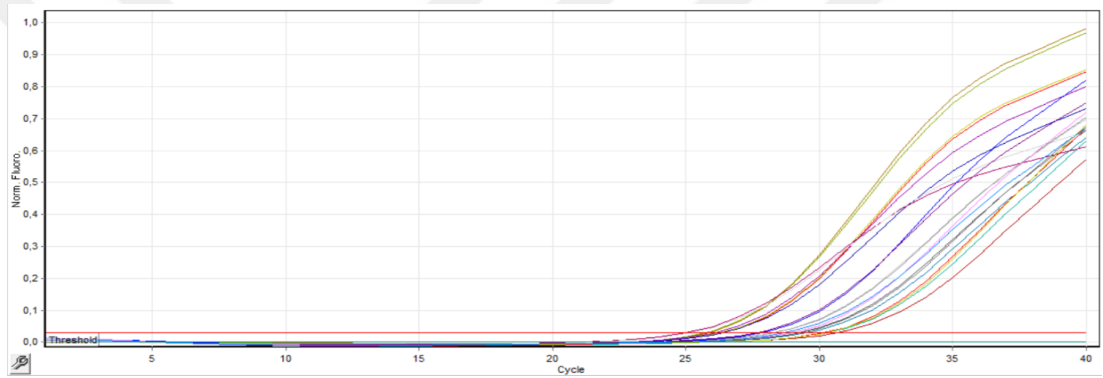
Şekil 4.13. E1, E2, E3, E4, E5, E6, E7, E8, E9, E10, E11 hastalarındaki miR-373 amplifikasyon eğrileri



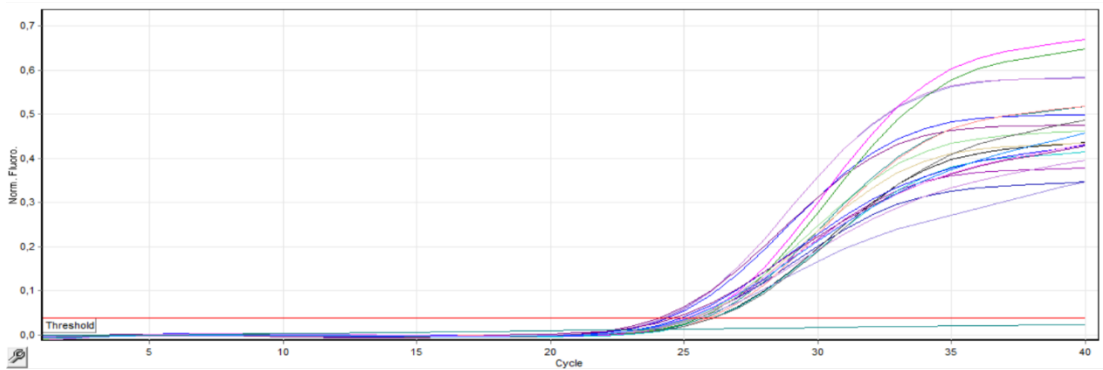
Şekil 4.14. E12, E13, E14, O1, O2, O3, O4, O5, O6, O8, O9 hastalarındaki miR-373 amplifikasyon eğrileri



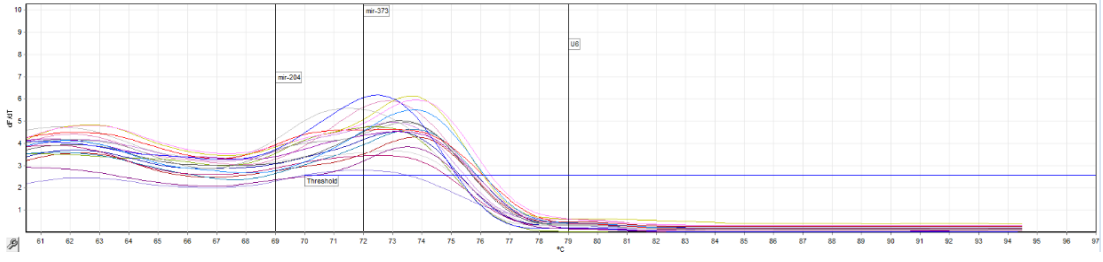
Şekil 4.15. O10, O11, O12, O13, O14, O15, O16 hastaları ve K1, K2, K3, K4 kontrol bireylerindeki miR-373 amplifikasyon eğrileri



Şekil 4.16. K5, K6, K7, K8, K9, K10, K11 kontrol bireyleri ve E15, O7, O17, O18 hastalarındaki miR-373 amplifikasyon eğrileri



Şekil 4.17. K12, K13, K14, K15, K16, K17, K18, K19, K20, K21 kontrol bireylerindeki miR-373 amplifikasyon eğrileri



Şekil 4.18. O10, O11, O12, O13, O14, O15, O16 hastaları ve K1, K2, K3, K4 kontrol bireylerindeki miR-373 melting curve görüntüleri

Tablo 4.6. Hasta ve kontrol grubunun miR-373 için Ct değerleri

	Ct 1	Ct 2	Ortalama Ct		Ct 1	Ct 2	Ortalama Ct		Ct 1	Ct 2	Ortalama Ct
K1	26.21	25.69	25.95	E1	29.34	29.13	29.23	O1	32.07	32.89	32.48
K2	26.96	26.81	26.88	E2	30.40	30.70	30.55	O2	32.04	32.45	32.74
K3	24.51	24.19	24.35	E3	31.89	31.74	31.81	O3	26.72	27.55	27.10
K4	24.68	24.71	24.69	E4	30.32	30.56	30.94	O4	29.04	29.37	29.20
K5	27.81	27.32	27.56	E5	31.41	31.13	31.27	O5	29.26	29.41	29.33
K6	27.37	26.66	27.01	E6	32.05	32.21	32.13	O6	30.13	29.52	29.82
K7	24.76	24.78	24.77	E7	31.39	31.38	31.38	O7	27.61	27.65	27.63
K8	24.99	24.99	24.90	E8	31.26	31.26	31.26	O8	26.75	26.42	26.58
K9	23.98	23.10	23.54	E9	30.23	30.27	30.25	O9	25.73	25.71	25.72
K10	23.96	24.22	24.09	E10	33.89	33.66	33.77	O10	25.04	24.84	24.94
K11	24.96	24.99	24.02	E11	29.03	28.77	28.90	O11	28.51	28.50	28.51
K12	24.90	24.08	24.99	E12	31.70	31.30	31.50	O12	29.20	29.92	29.56
K13	24.88	24.99	24.10	E13	31.92	31.18	31.05	O13	31.38	30.46	30.92
K14	23.58	23.53	23.50	E14	30.10	30.84	30.90	O14	26.70	26.44	26.57
K15	24.00	24.90	24.07	E15	25.14	25.05	25.00	O15	27.45	26.94	27.19
K16	24.49	24.20	24.30					O16	27.42	27.50	27.46
K17	24.57	24.50	24.50					O17	27.67	27.63	27.65
K18	24.00	24.92	24.14					O18	23.19	23.36	23.27
K19	24.91	24.99	24.13								
K20	24.96	24.99	24.02								
K21	23.57	23.68	23.60								

4.6. Ekspresyon değerlerinin gruplar arasında karşılaştırılması

Yapılan ekspresyon çalışmaları sonucunda hasta ve kontrol gruplarının U6 snRNA, miR-204 ve miR-373 için ortalama Ct değerleri ve standart sapma değerleri

Tablo 4.7.'de verilmiştir. Sonrasında ortalama Ct değerlerinden **Tablo 4.8.**'de verilen ortalama delta Ct değerleri hesaplanmıştır.

Tablo 4.7. U6 snRNA, miR-204 ve miR-373 için ortalama Ct değerleri

	Ortalama Ct değerleri			Standard Sapma		
	Kontrol Grup	Erken evre	Orta evre	Kontrol Grup	Erken evre	Orta evre
U6 snRNA	20.84	24.74	21.49	1.542940	1.554326	1.634782
hsa-miR-204	21.52	28.30	26.90	2.238471	2.336613	2.036743
hsa-miR-373	24.85	30.65	28.13	1.118668	1.896381	2.386306

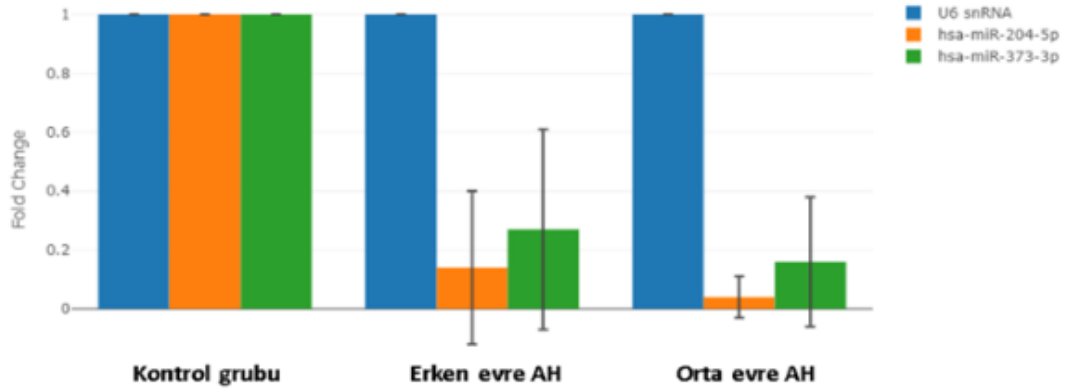
Tablo 4.8. U6 snRNA, miR-204 ve miR-373 için ortalama Delta Ct değerleri

	Ortalama Delta(Ct) (Ct(Hasta grup) - Ct(Kontrol grubu))			Standart sapma		
	Kontrol Grup	Erken evre	Orta evre	Kontrol Grup	Erken evre	Orta evre
U6 snRNA	0.00	0.00	0.00	0.000000	0.000000	0.000000
hsa-miR-204	0.68	3.56	5.40	1.959049	2.018526	1.867945
hsa-miR-373	4.01	5.91	6.64	1.504755	1.043574	1.289807

Gen ekspresyonlarının 'Kat değişimi', gereç ve yöntem kısmında anlatıldığı gibi $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak) yöntemiyle bulunan sonuçları göstermektedir. Ekspresyon düzeyleri Tablo 4.9.'da verildiği gibi hsa-miR-204 için erken evre AH grubunda kontrol grubuna kıyasla 0.14 kat, orta evre AH grubunda ise 0.04 kat olarak gözlenmiştir. hsa-miR-373 için ise erken evre AH grubunda kontrol grubuna kıyasla 0.27 kat, orta evre AH grubunda 0.16 kat olarak gözlenmiştir. Şekil 4.19.'da miR-204 ve miR-373 için erken ve orta evre AH grubunda kontrol grubuna kıyasla 'Kat değişimi' değerleri grafiksel olarak gösterilmiştir.

Tablo 4.9. miR-204 ve miR-373 için kontrol grubuna kıyasla 'Kat değişimi($2^{-\Delta\Delta Ct}$)' değerleri

	'Kat değişimi' ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) (Kontrol grubuyla kıyaslandığında)	
	Erken evre AH	Orta evre AH
U6 snRNA	1.00	1.00
hsa-miR-204	0.14	0.04
hsa-miR-373	0.27	0.16



Şekil 4.19. miR-204 ve miR-373 için erken ve orta evre AH grubunda kontrol grubuna kıyasla ‘Kat değişimi’ değerlerinin grafik gösterimleri

p değerleri, hasta ve kontrol gruplarındaki her bir miRNA’nın $2^{-\Delta\Delta Ct}$ değerlerine Student t testi uygulanarak bulunmuştur. $p < 0.05$ olan ölçümler istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir. Tablo 4.10.’da p değerleri verilmiştir.

Tablo 4.10. miR-204 ve miR-373 ekspresyon düzeylerinin erken ve orta evre AH grubunda kontrol grubuna kıyasla p değerleri

	p-değerleri (Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında)	
	Erken evre	Orta evre
U6 snRNA	N/A	N/A
hsa-miR-204	0.000914	0.000077
hsa-miR-373	0.015349	0.006930

Her iki miRNA için orta evre grupta erken evre gruba göre ekspresyonların daha da azaldığı görülmüştür. Bu azalma miR-204 için erken evre ve orta evre grubu kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bulunurken (Sırasıyla p: 0.000914, p: 0.000077) erken ve orta evre arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (p değeri:0.131). miR-373 için erken evre ve orta evre hasta grubu kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bulunurken (Sırasıyla p: 0.015349, p: 0.006930), erken ve orta evre hasta grubu arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (p değeri: 0.546).

5. TARTIŞMA

Bugüne kadar yapılan çalışmalar santral sinir sistemindeki mRNA, kodlamayan RNA ve DNA taşıyan eksozomların hücreler arası iletişim, sinaptik plastisite, antijen sunumu, nöronların trofik desteği gibi birçok önemli görevde yer aldığını göstermiştir (177, 178). SSS'deki fizyolojik rolleriyle tutarlı olarak eksozomların nörodejeneratif hastalıkların patogenezinde de katkıda bulunduğu gözlenmiştir. Taşıdıkları nükleik asit ve proteinler ile hücre içini diğer vücut sıvılarına göre daha iyi yansıttıkları düşünüldüğünden son zamanlarda nörodejeneratif hastalıkların patomekanizmasını aydınlatmak için araştırmalarda sık kullanılır hale gelmiştir. Ayrıca yapılan çalışmalar içeriklerindeki RNA miktarından kaynaklı eksozomların 'cell free' RNA çalışmalarına göre daha avantajlı olduğunu göstermiştir (179). SSS hastalıklarını daha spesifik olarak yansıtmak adına yüzey belirteci olarak CD171 eksprese eden nöron kökenli eksozomlar kullanılarak yapılan bazı biyobelirteç çalışmaları mevcuttur. Kanda nöron kökenli eksozomlarda bakılan otolizozomal protein seviyelerinin Alzheimer hastalarında kontrol gruba göre yüksek olduğu ve klinik başlangıçtan önce AH patomekanizmasını yansıttığı gösterilmiştir (180). Walsh ve arkadaşları da nöral derive plazma eksozomlarında ölçtükleri miR-212-3p seviyelerini Alzheimer hastalarında kontrol grubuna göre daha düşük saptamıştır (181).

Bu tez çalışmasında 15 erken ve 18 orta evre olarak değerlendirilen Alzheimer hastası ve 21 kognitif yakınması olmayan kontrol bireyden alınan serum örneklerinden öncelikle total eksozom izole edildi. Daha sonra CD171 yüzey antijenine yönelik anti-CD171 (L1CAM) antikoru kullanılarak nöron derive eksozomlar ayıklandı. Nöron kökenli eksozomlardan miRNA elde edilerek hasta ve kontrol gruplarında miR-204 ve miR-373 ekspresyonları incelendi. Her iki miRNA'nın ekspresyonunun erken ve orta evre hasta grubunda kontrollere göre düşük olduğu görüldü. t-testi istatistiğine göre hasta ve kontrol gruplarındaki bu farkın anlamlı olduğu saptandı. Ancak, erken ve orta evre hasta grubu arasındaki fark miR-204 ve miR-373 için istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı.

NLRP3 inflamazomunun aktivasyonunda yer alan P2X7R'nin postmortem Alzheimer beyin dokularında ekspresyonunun ve fonksiyonunun arttığı

gösterilmiştir(146). Osteoartritli hastalarda miR-373'ün P2X7R'nin 3'UTR'sine bağlanarak ekspresyonunu suprese ettiği ve bu hastalardaki inflamasyonu ve kondrosit proliferasyonunu baskıladığı gösterilmiştir(152). Sorensen ve arkadaşlarının Alzheimer'lı hastaların serebrospinal sıvılarından yaptığı miRNA profil çalışmasında miR-373 ekspresyonlarında kontrol grubuna kıyasla anlamlı bir değişiklik saptanmamıştır(182). Şimdiye kadar miR-373'ün AH ile ilişkilendirildiği bir çalışma bulunmamaktadır. Çalışmamızda hipotezimizle tutarlı olarak erken ve orta evre AH grubunda kontrol grubuna kıyasla miR-373 ekspresyon düzeyleri düşük bulundu. Alzheimer hastalarındaki düşük miR-373 düzeyi nedeniyle P2X7R'yi baskılayamamış ve NLRP3 inflamazomunu aktive ederek nöroinflamasyona yol açmış ya da katkı sağlamış olabilir. İleride yapılacak çalışmalarla P2X7R ekspresyonunun aynı hasta ve kontrol gruplarında incelenmesi ve miR-373 verileri ile karşılaştırılması bu mekanizmayı daha net olarak ortaya koyabilir.

Bugüne kadar yapılan diyabet çalışmalarında miR-204'ün TXNIP'a cevap olarak artması, GLP-1R'nin 3'UTR'sini hedefleyerek downregüle etmesi gibi literatürdeki yayınlar yorumlandığında Alzheimer hastalarında kontrol grubuna kıyasla miR-204'ün ekspresyonunda artış beklenmektedir. Literatürde bu konuyla ilgili çok az çalışma bulunmaktadır. Yukarıda bahsedilen Solensen ve arkadaşlarının çalışmasında miR-204 ekspresyonlarında da kontrol grubuna kıyasla anlamlı bir değişiklik saptanmamıştır(182). Ancak bizim sonuçlarımızda her iki hasta grubunda da kontrol grubuna kıyasla düşük miR-204 ekspresyonu gözlemlendi. Bu durum miRNA'ların çok sayıda tanımlanmamış hedef geninin olması ve kendi ekspresyonlarını kontrol eden faktörlerin de henüz tam olarak belirlenememiş olması ile açıklanabilir. Bununla birlikte bulduğumuz sonucu destekler nitelikte *C9orf72* (Chromosome 9 open reading frame 72), *GRN* (*Granulin*), *MAPT* (Microtubule-associated protein tau) genlerinden birinde mutasyon taşıyan semptomatik frontotemporal demans (FTD) hasta grubunda yapılan bir çalışmada, serebrospinal sıvıdan ayrıştırılan eksozomlarda mutasyon taşımayan ve presemptomatik mutasyon taşıyan gruba kıyasla miR-204 ekspresyon seviyelerinin düşük olduğu gösterilmiştir. Aynı çalışmada yaptıkları in silico analizde apoptozis aktivatörü HAKAKIRI'yi kodlayan (183) *HRK* (HAKAKIRI)'nin miR-204'ün hedef geni olduğu saptanmıştır. FTD ve AH'deki ortak nörodejenerasyon mekanizmaları göz önüne alındığında bu

çalışmada AH grubundaki düşük miR-204 düzeyleri HRK'yı aktive ederek apoptozis ve nörodejenerasyona yol açmış olabilir. Bu bulgumuzu destekleyen son zamanlarda yayınlanan başka bir çalışmada, APP/PS1 mutant Alzheimer fare modellerinin hipokampuslarında miR-204 ekspresyon düzeyleri düşük bulunmuştur. Aynı farelere yapılan miR-204'ü aşırı eksprese eden lentivirüs infüzyonu sonrası, farelerdeki amiloid plak yükünün azaldığı ve hafıza kayıplarının hafiflediği gösterilmiştir (184). Sonuçlarımızın yukarıda bahsedilen çalışmalarla uyumluluk göstermesi, nörodejeneratif hastalıkların erken tanı ve tedavisi için biyobelirteç belirlenmesinde yöntemsel olarak nöron kökenli eksozomların kullanımının etkinliğini göstermektedir.

miR-204 ve miR-373 ekspresyon düzeylerinin orta evre AH grubunda erken evre AH grubuna göre daha düşük saptanması istatistiksel olarak anlamlı bulunmamasıyla birlikte, bu durum hastalarda nörodejenerasyonun ilerlediği şeklinde yorumlanabilir. Ancak bu çıkarımın yapılabilmesi için daha büyük örnekleme çalışılması gereklidir.

Literatüre bakıldığında son iki yıl içinde çıkan transkriptom ya da miRNA profillemeye çalışmalarında genellikle bir grup miRNA çalışılmış olup, çalışmamızın konusu olan miR-204 ve miR-373 ekspresyon değişiklikleri Alzheimer hastalığı ile ilişkilendirilmemiştir. Çalışmamız seçici olarak miR-204 ve miR-373 ekspresyon düzeylerinin nöron kökenli serum eksozomlarında araştırıldığı ve düzeylerinin kontrol grubuna göre Alzheimer hastalarında farklı bulunduğu ilk çalışma olması açısından önem taşımaktadır. Nöron kökenli eksozomların kullanılmasının AH gibi santral sinir sistemi hastalıklarının patofizyolojisini anlamada özgünlüğü öngörülse de, elde edilen verilerin serumdan alınmış total eksozomlardan izole edilen miRNA'ların ekspresyon ölçümleriyle karşılaştırılması sonucunda bu özgünlük netlik kazanacaktır.

Çalışmanın transkriptom analizi düzeyinde yapılması ve miRNA'ların ekspresyon profilinin, farklı evrelerdeki Alzheimer hastaları ve farklı yaş gruplarındaki sağlıklı gönüllülerde incelenmesi ideal olmakla birlikte maliyeti çok artırmaktadır. Bu nedenle bu çalışma bir ön çalışma gibi tasarlanmıştır. Daha sonra yapılacak çalışmalarda, öncelikle örneklem büyüklüğünün genişletilmesi sonrasında

ise bu miRNA'ların hedef genlerini belirlemeye yönelik geniş çaplı araştırmaların yapılması tarafımızca planlanmaktadır.

AH için bugün özgün bir tedavi yoktur. Biyobelirteç bulmaya yönelik benzer çalışmalar, toplumda prevalansı gün geçtikçe artan hastalık için hem erken tanı konabilmesi, hem de ileriye yönelik olarak tedavi hedeflerinin belirlenmesi için yeni umutlar sağlayacaktır.



6. SONUÇLAR

1. Erken ve orta evre Alzheimer hasta gruplarındaki miR-204 ve miR-373 ortalama ekspresyon düzeyleri kontrol grup ile kıyaslanığında düşük bulunmuştur. Ekspresyon düzeyleri miR-204 için, erken evre AH grubunda kontrol grubuna kıyasla 0.14 kat, orta evre AH grubunda ise 0.04 kat olarak gözlenirken, miR-373 için ise, erken evre AH grubunda kontrol grubuna kıyasla 0.27 kat, orta evre AH grubunda 0.16 kat olarak gözlenmiştir. t-testi istatistiği ile kontrol grubuna kıyasla erken ve orta evre AH grubunda gözlenen bu değerler istatistik olarak anlamlı bulunmuştur.

2. İstatiksel olarak anlamlılığı bu örneklem büyüklüğünde gösterilememekle birlikte, miR-204 ve miR-373 ekspresyonlarının orta evre hasta grubunda erken evre hasta grubuna göre daha düşük bulunması, nöroinflamasyonun şiddetlenerek nörodejenerasyona yol açmış olabileceği şeklinde yorumlanabilir.

3. Çalışmamızda hipotezimizle tutarlı olarak miR-373 ekspresyon düzeyi AH grubunda düşük bulunmuştur. Bu çalışma miR-373'ün AH ile ilişkilendirildiği ilk çalışma olarak önem taşımaktadır. Bu çalışmanın devamında miR-373'ün hedef moleküllerinin çalışılmasının patofizyolojiyi açıklamaya katkı sağlayacağı öngörülebilir.

4. miR-204'ün NLRP3 inflamazomundaki TXNIP tarafından indüklenmesi ve GLP-1R üzerindeki baskılayıcı etkileri düşünüldüğünde; sonuçlarımızda her iki hasta grubunda da düşük miR-204 ekspresyonunun gözlenmesi hipotezimizle uyumsuzdur. Bu durum, miR-204 ekspresyonunu düzenleyen ve miR-204'ün düzenlediği faktörlerin henüz tam olarak anlaşılmasına bağlanmıştır.

5. Çalışmamız miR-204 ve miR-373 ekspresyonlarının nöron kökenli serum eksozomlarında bakıldığı bir çalışmadır. İleride AH ile ilgili erken tanı ve potansiyel tedavi hedefleri için biyobelirteç belirlenmesinde bu miRNA'ların ekspresyonlarındaki düşüklüğün bir ön bilgi oluşturacağı düşünülmektedir.

6. Periferik kandan elde edilen nöron kökenli eksozomların, AH gibi SSS hastalıklarının tanı ve tedavisi için ileriye yönelik olarak kullanılabilme potansiyelinin olduğu gösterildi.

ÖZET

ALZHEIMER HASTALIĞINDA NÖRON KÖKENLİ EKSOZOMLARDA miR-373 ve miR-204 DÜZEYLERİNİN BELİRLENMESİ

Alzheimer hastalığı (AH) bilişsel kapasitede bozulma ile karakterize; hafıza, oryantasyon, dil ve akıl yürütmenin etkilendiği kronik ve ilerleyici bir durumdur. AH'nin etyopatogenezinde amiloid hipotez, kolinerjik hipotez, tau fosforilasyonu, oksidatif stres ve kalsiyum homeostazisi gibi nörobiyolojik mekanizmalar yer almaktadır. Ayrıca literatürde NLRP3 inflamazomundaki değişikliklerin de, AH'nin etyolojisinde ve progresyonunda rol oynadığı gösterilmiştir.

AH'li beyin dokularında ekspresyonunun arttığı gözlenen ve NLRP3 inflamazomunun aktivasyonunda rol oynayan P2X7R'nin osteoartritli hastalarda miR-373 tarafından baskılandığı gösterilmiştir. Öte yandan AH'de yüksek ekspresyonu gözlenen başka bir NLRP3 inflamazom indükleyicisi olan TXNIP'a cevap olarak miR-204 düzeyinin arttığı görülmüştür. Primer insan adacıklarında ise miR-204, GLP-1R'nin ekspresyonunu azaltmaktadır. miR-204'ün *in vivo* delesyonunun GLP-1R ve insülin sekresyonunu artırarak diyabete karşı koruyucu olduğu keşfedilmiştir. AH ve diyabet arasındaki ortak patofizyolojik mekanizmalar ve NLRP3 inflamazomu ile ilişkili bildirilen bu değişikliklere dayanarak çalışmamızda 15 erken evre, 18 orta evre Alzheimer hastası ve kognitif yakınması bulunmayan 21 gönüllü bireyde elde edilen nöron kökenli serum eksozomlarında miR-373 ve miR-204'ün ekspresyon düzeyleri incelenmiştir.

Araştırma sonucunda erken ve orta evre AH grubunda kontrol gruba kıyasla miR-204 ve miR-373 ekspresyonunun azalmış olduğu görülmüştür. Bu sonuçlar istatistiksel olarak anlamlıdır. Daha geniş çaplı çalışmalarla desteklenmesi ve hedeflerinin net olarak belirlenmesi sonrasında, miRNA'lardaki bu ekspresyon değişiklikleri AH için biyobelirteç olma potansiyeli taşımaktadır.

Anahtar kelimeler: Alzheimer hastalığı, nöron kökenli eksozom, miR-204, miR-373, NLRP3 inflamazomu

SUMMARY

DETERMINATION OF miR-373 and miR-204 LEVELS IN NEURONAL EXOSOMES IN ALZHEIMER'S DISEASE

Alzheimer's disease (AD) is a chronic, progressive condition characterized by impaired cognitive functions such as memory, language, orientation, discernment. Neurobiological mechanisms such as amyloid hypothesis, cholinergic hypothesis, tau phosphorylation, oxidative stress and calcium homeostasis are included in the etiopathogenesis of AD. In addition, it has been shown that changes in NLRP3 inflammasome play a role in the etiology and progression of AD in the literature.

It has been shown that *P2X7R* whose expression is increased in brain tissues with AD and plays a role in the activation of NLRP3 inflammasome is suppressed by miR-373 in patients with osteoarthritis. On the other hand, it was observed that the miR-204 level increased in response to *TXNIP*, another NLRP3 inflammasome inducer with high expression in AD. In primary human islets, miR-204 reduces the expression of GLP-1R. It has been discovered that in vivo deletion of miR-204 is protective against diabetes by increasing GLP-1R and insulin secretion. Based on the common pathophysiological mechanisms between AD and diabetes and the reported changes related to NLRP3 inflammasome, we thought that miR-373 and miR-204 might be altered in patients with AD. Accordingly, expression levels of miR-373 and miR-204 were investigated in neuron-derived serum exosomes obtained in 15 early-stage, 18 middle-stage Alzheimer's patients and 21 volunteer individuals without cognitive findings in this study.

We showed that miR-204 and miR-373 expression were significantly decreased in the early and middle stage AD group compared to the control group. These results were statistically significant. We suggest that miR-204 and miR-373 are potential biomarkers for AD. However large scale studies supporting these findings and defining the targets of these miRNAs are needed.

Key words: Alzheimer disease, neuron derived exosome, miR-204, miR-373, NLRP3 inflammasome

KAYNAKLAR

1. Prince M, Wimo A, Guerchet M, Ali G, Wu Y, Prina M. World Alzheimer Report 2015—The Global Impact of Dementia: An analysis of prevalence, incidence, cost and trends. 2015. London, Alzheimer's Disease International (ADI). 2017.
2. Sanabria-Castro A, Alvarado-Echeverría I, Monge-Bonilla C. Molecular pathogenesis of Alzheimer's disease: an update. *Annals of neurosciences*. 2017;24(1):46-54.
3. Bird TD. Alzheimer disease overview. 2015.
4. Jack Jr CR, Knopman DS, Jagust WJ, Petersen RC, Weiner MW, Aisen PS, et al. Tracking pathophysiological processes in Alzheimer's disease: an updated hypothetical model of dynamic biomarkers. *The Lancet Neurology*. 2013;12(2):207-16.
5. Gelosa G, Brooks DJ. The prognostic value of amyloid imaging. *European journal of nuclear medicine and molecular imaging*. 2012;39(7):1207-19.
6. Devanand DP, Liu X, Tabert MH, Pradhaban G, Cuasay K, Bell K, et al. Combining early markers strongly predicts conversion from mild cognitive impairment to Alzheimer's disease. *Biological psychiatry*. 2008;64(10):871-9.
7. Olin JT, Schneider LS, Katz IR, Meyers BS, Alexopoulos GS, Breitner JC, et al. Provisional diagnostic criteria for depression of Alzheimer disease. *The American journal of geriatric psychiatry*. 2002;10(2):125-8.
8. Lee HB, Lyketsos CG. Depression in Alzheimer's disease: heterogeneity and related issues. *Biological psychiatry*. 2003;54(3):353-62.
9. Teri L, Ferretti LE, Gibbons LE, Logsdon RG, McCurry SM, Kukull WA, et al. Anxiety in Alzheimer's disease: Prevalence and comorbidity. *Journals of Gerontology Series A: Biomedical Sciences and Medical Sciences*. 1999;54(7):M348-M52.
10. Porter VR, Buxton WG, Fairbanks LA, Strickland T, O'Connor SM, Rosenberg-Thompson S, et al. Frequency and characteristics of anxiety among patients with Alzheimer's disease and related dementias. *The Journal of neuropsychiatry and clinical neurosciences*. 2003;15(2):180-6.
11. Ropacki SA, Jeste DV. Epidemiology of and risk factors for psychosis of Alzheimer's disease: a review of 55 studies published from 1990 to 2003. *American Journal of Psychiatry*. 2005;162(11):2022-30.
12. Fernando MS, Ince PG. Vascular pathologies and cognition in a population-based cohort of elderly people. *Journal of the neurological sciences*. 2004;226(1):13-7.
13. Schneider JA, Arvanitakis Z, Bang W, Bennett DA. Mixed brain pathologies account for most dementia cases in community-dwelling older persons. *Neurology*. 2007;69(24):2197-204.
14. Mayeux R, Saunders AM, Shea S, Mirra S, Evans D, Roses AD, et al. Utility of the apolipoprotein E genotype in the diagnosis of Alzheimer's disease. *New England Journal of Medicine*. 1998;338(8):506-11.
15. Popescu A, Lippa CF, Lee VM-Y, Trojanowski JQ. Lewy bodies in the amygdala: increase of α -synuclein aggregates in neurodegenerative diseases with tau-based inclusions. *Archives of neurology*. 2004;61(12):1915-9.

16. Rocca WA, Hofman A, Brayne C, Breteler M, Clarke M, Copeland JR, et al. Frequency and distribution of Alzheimer's disease in Europe: a collaborative study of 1980–1990 prevalence findings. *Annals of neurology*. 1991;30(3):381-90.
17. Bachman D, Wolf PA, Linn R, Knoefel J, Cobb S J, Belanger A, et al. Prevalence of dementia and probable senile dementia of the Alzheimer type in the Framingham Study. *Neurology*. 1992;42(1):115-.
18. Prencipe M, Casini A, Ferretti C, Lattanzio M, Fiorelli M, Culasso F. Prevalence of dementia in an elderly rural population: effects of age, sex, and education. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*. 1996;60(6):628-33.
19. Mandrekar-Colucci S, Landreth GE. Microglia and inflammation in Alzheimer's disease. *CNS & Neurological Disorders-Drug Targets (Formerly Current Drug Targets-CNS & Neurological Disorders)*. 2010;9(2):156-67.
20. Chêne G, Beiser A, Au R, Preis SR, Wolf PA, Dufouil C, et al. Gender and incidence of dementia in the Framingham Heart Study from mid-adult life. *Alzheimer's & Dementia*. 2015;11(3):310-20.
21. Hebert LE, Weuve J, Scherr PA, Evans DA. Alzheimer disease in the United States (2010–2050) estimated using the 2010 census. *Neurology*. 2013;80(19):1778-83.
22. Sjogren T. " Morbus Alzheimer and Morbus Pick" A genetic, clinical and pathoanatomical study. *Acta Psychiatr Scand*. 1952;82:67-112.
23. Heyman A, E WE, Hurwitz BJ, Schmechel D, Sigmon AH, Weinberg T, et al. Alzheimer's disease: genetic aspects and associated clinical disorders. *Annals of Neurology: Official Journal of the American Neurological Association and the Child Neurology Society*. 1983;14(5):507-15.
24. Farrer LA, Bowirrat A, Friedland RP, Waraska K, Korczyn AD, Baldwin CT. Identification of multiple loci for Alzheimer disease in a consanguineous Israeli–Arab community. *Human molecular genetics*. 2003;12(4):415-22.
25. Nee LE, Polinsky RJ, Eldridge R, Weingartner H, Smallberg S, Ebert M. A family with histologically confirmed Alzheimer's disease. *Archives of neurology*. 1983;40(4):203-8.
26. Breitner J, Gatz M, Bergem A, Christian J, Mortimer J, McClearn G, et al. Use of twin cohorts for research in Alzheimer's disease. *Neurology*. 1993;43(2):261-.
27. Breitner JC, Welsh KA, Gau BA, McDonald WM, Steffens DC, Saunders AM, et al. Alzheimer's Disease in the National Academy of Sciences—National Research Council Registry of Aging Twin Veterans: III. Detection of cases, longitudinal results, and observations on twin concordance. *Archives of Neurology*. 1995;52(8):763-71.
28. Bergem AM, Engedal K, Kringlen E. The role of heredity in late-onset Alzheimer disease and vascular dementia: a twin study. *Archives of General Psychiatry*. 1997;54(3):264-70.
29. Farrer L, Myers R, Connor L, Cupples L, Growdon J. Segregation analysis reveals evidence of a major gene for Alzheimer disease. *American journal of human genetics*. 1991;48(6):1026.
30. Van Duijn C, Farrer L, Cupples L, Hofman A. Genetic transmission of Alzheimer's disease among families in a Dutch population based study. *Journal of medical genetics*. 1993;30(8):640-6.

31. Rao VS, Van Duijn C, Connor-Lacke L, Cupples LA, Growdon JH, Farrer LA. Multiple etiologies for Alzheimer disease are revealed by segregation analysis. *American journal of human genetics*. 1994;55(5):991.
32. Cacace R, Sleegers K, Van Broeckhoven C. Molecular genetics of early-onset Alzheimer's disease revisited. *Alzheimer's & dementia: the journal of the Alzheimer's Association*. 2016;12(6):733-48.
33. Nicolas G, Charbonnier C, Campion D. From common to rare variants: the genetic component of Alzheimer disease. *Human heredity*. 2016;81(3):129-41.
34. Suzuki N, Cheung TT, Cai X-D, Odaka A, Otvos L, Eckman C, et al. An increased percentage of long amyloid beta protein secreted by familial amyloid beta protein precursor (beta APP717) mutants. *Science*. 1994;264(5163):1336-40.
35. Hilbich C, Kisters-Woike B, Reed J, Masters CL, Beyreuther K. Human and rodent sequence analogs of Alzheimer's amyloid β A4 share similar properties and can be solubilized in buffers of pH 7.4. *The FEBS Journal*. 1991;201(1):61-9.
36. Selkoe DJ. Presenilin, Notch, and the genesis and treatment of Alzheimer's disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2001;98(20):11039-41.
37. Lemere C, Blusztajn J, Yamaguchi H, Wisniewski T, Saido T, Selkoe D. Sequence of deposition of heterogeneous amyloid β -peptides and APO E in Down syndrome: implications for initial events in amyloid plaque formation. *Neurobiology of disease*. 1996;3(1):16-32.
38. Levy-Lahad E, Wasco W, Poorkaj P, Romano DM, Oshima J, Pettingell WH, et al. Candidate gene for the chromosome 1 familial Alzheimer's disease locus. *Science*. 1995;269(5226):973-7.
39. De Strooper B. Loss-of-function presenilin mutations in Alzheimer disease: Talking Point on the role of presenilin mutations in Alzheimer disease. *EMBO reports*. 2007;8(2):141-6.
40. Kovacs DM, Fausett HJ, Page KJ, Kim T-W, Moir RD, Merriam DE, et al. Alzheimer-associated presenilins 1 and 2: neuronal expression in brain and localization to intracellular membranes in mammalian cells. *Nature medicine*. 1996;2(2):224.
41. Naj AC, Schellenberg GD, Consortium AsDG. Genomic variants, genes, and pathways of Alzheimer's disease: an overview. *American Journal of Medical Genetics Part B: Neuropsychiatric Genetics*. 2017;174(1):5-26.
42. Mahley RW. Apolipoprotein E: cholesterol transport protein with expanding role in cell biology. *Science*. 1988;240(4852):622-30.
43. Martins RN, Clarnette R, Fisher C, Broe GA, Brooks WS, Montgomery P, et al. ApoE genotypes in Australia: roles in early and late onset Alzheimer's disease and Down's syndrome. *Neuroreport*. 1995;6(11):1513-6.
44. Corder EH, Saunders AM, Strittmatter WJ, Schmechel DE, Gaskell PC, Small G, et al. Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families. *Science*. 1993;261(5123):921-3.
45. Lautenschlager N, Kurz A, Müller U. Inheritable causes and risk factors of Alzheimer's disease. *Der Nervenarzt*. 1999;70(3):195-205.

46. Hyman BT, Hedley-Whyte ET, Rebeck GW, Vonsattel J-P, West HL, Growdon JH. Apolipoprotein E ϵ 4/4 in a Neuropathologically Normal Very Elderly Individual. *Archives of neurology*. 1996;53(3):215-.
47. Oyama F, Shimada H, Oyama R, Ihara Y. Apolipoprotein E genotype, Alzheimer's pathologies and related gene expression in the aged population. *Molecular brain research*. 1995;29(1):92-8.
48. Shao W, Peng D, Wang X. Genetics of Alzheimer's disease: From pathogenesis to clinical usage. *Journal of Clinical Neuroscience*. 2017;45:1-8.
49. Wu Z-C, Yu J-T, Li Y, Tan L. Clusterin in Alzheimer's disease. *Advances in clinical chemistry*. 2012;56:155.
50. Harold D, Abraham R, Hollingworth P, Sims R, Gerrish A, Hamshere ML, et al. Genome-wide association study identifies variants at CLU and PICALM associated with Alzheimer's disease. *Nature genetics*. 2009;41(10):1088.
51. Xing Y-Y, Yu J-T, Cui W-Z, Zhong X-L, Wu Z-C, Zhang Q, et al. Blood clusterin levels, rs9331888 polymorphism, and the risk of Alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer's Disease*. 2012;29(3):515-9.
52. Yerbury JJ, Poon S, Meehan S, Thompson B, Kumita JR, Dobson CM, et al. The extracellular chaperone clusterin influences amyloid formation and toxicity by interacting with prefibrillar structures. *The FASEB Journal*. 2007;21(10):2312-22.
53. Naj AC, Jun G, Beecham GW, Wang L-S, Vardarajan BN, Buross J, et al. Common variants at MS4A4/MS4A6E, CD2AP, CD33 and EPHA1 are associated with late-onset Alzheimer's disease. *Nature genetics*. 2011;43(5):436-41.
54. Nussbaum RL. Genome-wide association studies, Alzheimer disease, and understudied populations. *Jama*. 2013;309(14):1527-8.
55. Naj AC, Jun G, Beecham GW, Wang L-S, Vardarajan BN, Buross J, et al. Common variants at MS4A4/MS4A6E, CD2AP, CD33 and EPHA1 are associated with late-onset Alzheimer's disease. *Nature genetics*. 2011;43(5):436.
56. Parolini D, Cassinelli L, Razini P, Sitzia C, Tonna N, Erratico S, et al. Expression of CD20 reveals a new store-operated calcium entry modulator in skeletal muscle. *The international journal of biochemistry & cell biology*. 2012;44(12):2095-105.
57. Li H, Ayer LM, Lytton J, Deans JP. Store-operated cation entry mediated by CD20 in membrane rafts. *Journal of Biological Chemistry*. 2003;278(43):42427-34.
58. Yu J-T, Chang RC-C, Tan L. Calcium dysregulation in Alzheimer's disease: from mechanisms to therapeutic opportunities. *Progress in neurobiology*. 2009;89(3):240-55.
59. Yamazaki T, Masuda J, Omori T, Usui R, Akiyama H, Maru Y. EphA1 interacts with integrin-linked kinase and regulates cell morphology and motility. *Journal of cell science*. 2009;122(2):243-55.
60. Jin C, Liu X, Zhang F, Wu Y, Yuan J, Zhu J, et al. An updated meta-analysis of the association between SORL1 variants and the risk for sporadic Alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer's Disease*. 2013;37(2):429-37.
61. Caglayan S, Takagi-Niidome S, Liao F, Carlo A-S, Schmidt V, Burgert T, et al. Lysosomal sorting of amyloid- β by the SORLA receptor is impaired by a familial Alzheimer's disease mutation. *Science translational medicine*. 2014;6(223):223ra20-ra20.

62. Andersen OM, Reiche J, Schmidt V, Gotthardt M, Spoelgen R, Behlke J, et al. Neuronal sorting protein-related receptor sorLA/LR11 regulates processing of the amyloid precursor protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2005;102(38):13461-6.
63. Tan M-S, Yu J-T, Tan L. Bridging integrator 1 (BIN1): form, function, and Alzheimer's disease. *Trends in molecular medicine*. 2013;19(10):594-603.
64. Miyagawa T, Ebinuma I, Morohashi Y, Hori Y, Young Chang M, Hattori H, et al. BIN1 regulates BACE1 intracellular trafficking and amyloid- β production. *Human molecular genetics*. 2016;25(14):2948-58.
65. Chen H, Wu G, Jiang Y, Feng R, Liao M, Zhang L, et al. Analyzing 54,936 samples supports the association between CD2AP rs9349407 polymorphism and Alzheimer's disease susceptibility. *Molecular neurobiology*. 2015;52(1):1-7.
66. Shulman JM, Chen K, Keenan BT, Chibnik LB, Fleisher A, Thiyyagura P, et al. Genetic susceptibility for Alzheimer disease neuritic plaque pathology. *JAMA neurology*. 2013;70(9):1150-7.
67. Wang Z, Lei H, Zheng M, Li Y, Cui Y, Hao F. Meta-analysis of the association between Alzheimer disease and variants in GAB2, PICALM, and SORL1. *Molecular neurobiology*. 2016;53(9):6501-10.
68. Lambert J-C, Ibrahim-Verbaas CA, Harold D, Naj AC, Sims R, Bellenguez C, et al. Meta-analysis of 74,046 individuals identifies 11 new susceptibility loci for Alzheimer's disease. *Nature genetics*. 2013;45(12):1452.
69. Ellis JR, Ellis KA, Bartholomeusz CF, Harrison BJ, Wesnes KA, Erskine FF, et al. Muscarinic and nicotinic receptors synergistically modulate working memory and attention in humans. *International Journal of Neuropsychopharmacology*. 2006;9(2):175-89.
70. Wenk GL. Neuropathologic changes in Alzheimer's disease: potential targets for treatment. *Journal of Clinical Psychiatry*. 2006;67:3.
71. Mesulam M. The cholinergic lesion of Alzheimer's disease: pivotal factor or side show? *Learning & Memory*. 2004;11(1):43-9.
72. Shen J, Wu J. Nicotinic cholinergic mechanisms in Alzheimer's disease. *International review of neurobiology*. 124: Elsevier; 2015. p. 275-92.
73. Ni R, Marutle A, Nordberg A. Modulation of $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor and fibrillar amyloid- β interactions in Alzheimer's disease brain. *Journal of Alzheimer's Disease*. 2013;33(3):841-51.
74. Cummings JL, Doody R, Clark C. Disease-modifying therapies for Alzheimer disease Challenges to early intervention. *Neurology*. 2007;69(16):1622-34.
75. Mohandas E, Rajmohan V, Raghunath B. Neurobiology of Alzheimer's disease. *Indian journal of psychiatry*. 2009;51(1):55.
76. Bertram L, Tanzi RE. Thirty years of Alzheimer's disease genetics: the implications of systematic meta-analyses. *Nature Reviews Neuroscience*. 2008;9(10):768.
77. Leão RN, Colom LV, Borgius L, Kiehn O, Fisahn A. Medial septal dysfunction by A β -induced KCNQ channel-block in glutamatergic neurons. *Neurobiology of aging*. 2012;33(9):2046-61.
78. Tanzi RE, Bertram L. Twenty years of the Alzheimer's disease amyloid hypothesis: a genetic perspective. *Cell*. 2005;120(4):545-55.

79. Lichtenthaler SF, Haass C. Amyloid at the cutting edge: activation of α -secretase prevents amyloidogenesis in an Alzheimer disease mouse model. *The Journal of clinical investigation*. 2004;113(10):1384-7.
80. Sennvik K, Fastbom J, Blomberg M, Wahlund L-O, Winblad B, Benedikz E. Levels of α - and β -secretase cleaved amyloid precursor protein in the cerebrospinal fluid of Alzheimer's disease patients. *Neuroscience letters*. 2000;278(3):169-72.
81. Velliquette RA, O'Connor T, Vassar R. Energy inhibition elevates β -secretase levels and activity and is potentially amyloidogenic in APP transgenic mice: possible early events in Alzheimer's disease pathogenesis. *Journal of Neuroscience*. 2005;25(47):10874-83.
82. Siegel GJ, Chauhan N, Karczma AG. Links between Amyloid and Tau Biology in Alzheimer's Disease and their Cholinergic Aspects. *Exploring the Vertebrate Central Cholinergic Nervous System*: Springer; 2007. p. 597-656.
83. De Strooper B. Aph-1, Pen-2, and nicastrin with presenilin generate an active γ -secretase complex. *Neuron*. 2003;38(1):9-12.
84. Goedert M, Spillantini MG. A century of Alzheimer's disease. *science*. 2006;314(5800):777-81.
85. Wang D-S, Dickson DW, Malter JS. β -Amyloid degradation and Alzheimer's disease. *BioMed Research International*. 2006;2006.
86. Simón AM, Frechilla D, del Río J. Perspectivas sobre la hipótesis de la cascada del amiloide en la enfermedad de Alzheimer. *Rev neurol*. 2010;667-75.
87. Fuentes P, Slachevsky Ch A. Enfermedad de Alzheimer: Actualización en terapia farmacológica. *Revista médica de Chile*. 2005;133(2):224-30.
88. Roberson ED, Scearce-Levie K, Palop JJ, Yan F, Cheng IH, Wu T, et al. Reducing endogenous tau ameliorates amyloid β -induced deficits in an Alzheimer's disease mouse model. *Science*. 2007;316(5825):750-4.
89. Wang H-Y, Li W, Benedetti NJ, Lee DH. $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptors mediate β -amyloid peptide-induced tau protein phosphorylation. *Journal of Biological Chemistry*. 2003;278(34):31547-53.
90. Kuret J, Congdon EE, Li G, Yin H, Yu X, Zhong Q. Evaluating triggers and enhancers of tau fibrillization. *Microscopy research and technique*. 2005;67(3-4):141-55.
91. Praticò D. Oxidative stress hypothesis in Alzheimer's disease: a reappraisal. *Trends in pharmacological sciences*. 2008;29(12):609-15.
92. Stutzmann GE, Caccamo A, LaFerla FM, Parker I. Dysregulated IP3 signaling in cortical neurons of knock-in mice expressing an Alzheimer's-linked mutation in presenilin1 results in exaggerated Ca²⁺ signals and altered membrane excitability. *Journal of Neuroscience*. 2004;24(2):508-13.
93. Wang J, Sun C. Calcium and neurogenesis in Alzheimer's disease. *Frontiers in neuroscience*. 2010;4:194.
94. Krstic D, Knuesel I. Deciphering the mechanism underlying late-onset Alzheimer disease. *Nature Reviews Neurology*. 2013;9(1):25.
95. Halle A, Hornung V, Petzold GC, Stewart CR, Monks BG, Reinheckel T, et al. The NALP3 inflammasome is involved in the innate immune response to amyloid- β . *Nature immunology*. 2008;9(8):857.

96. Jo E-K, Kim JK, Shin D-M, Sasakawa C. Molecular mechanisms regulating NLRP3 inflammasome activation. *Cellular & molecular immunology*. 2016;13(2):148.
97. Martinon F, Burns K, Tschopp J. The inflammasome: a molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL- β . *Molecular cell*. 2002;10(2):417-26.
98. Thornberry NA, Bull HG, Calaycay JR, Chapman KT, Howard AD, Kostura MJ, et al. A novel heterodimeric cysteine protease is required for interleukin-1 β processing in monocytes. *Nature*. 1992;356(6372):768-74.
99. Gu Y, Kuida K, Tsutsui H, Ku G, Hsiao K, Fleming MA, et al. Activation of interferon- γ inducing factor mediated by interleukin-1 β converting enzyme. *Science*. 1997;275(5297):206-9.
100. Vanaja SK, Rathinam VA, Fitzgerald KA. Mechanisms of inflammasome activation: recent advances and novel insights. *Trends in cell biology*. 2015;25(5):308-15.
101. Jo E-K, Kim JK, Shin D-M, Sasakawa C. Molecular mechanisms regulating NLRP3 inflammasome activation. *Cellular & molecular immunology*. 2016;13(2):148-59.
102. Pan B-T, Teng K, Wu C, Adam M, Johnstone RM. Electron microscopic evidence for externalization of the transferrin receptor in vesicular form in sheep reticulocytes. *The Journal of cell biology*. 1985;101(3):942-8.
103. Takahashi RH, Milner TA, Li F, Nam EE, Edgar MA, Yamaguchi H, et al. Intraneuronal Alzheimer A β 42 accumulates in multivesicular bodies and is associated with synaptic pathology. *The American journal of pathology*. 2002;161(5):1869-79.
104. Abels ER, Breakefield XO. Introduction to extracellular vesicles: biogenesis, RNA cargo selection, content, release, and uptake. Springer; 2016.
105. Janas AM, Sapoń K, Janas T, Stowell MH, Janas T. Exosomes and other extracellular vesicles in neural cells and neurodegenerative diseases. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*. 2016;1858(6):1139-51.
106. Cocucci E, Meldolesi J. Ectosomes and exosomes: shedding the confusion between extracellular vesicles. *Trends in cell biology*. 2015;25(6):364-72.
107. Zhang J, Li S, Li L, Li M, Guo C, Yao J, et al. Exosome and exosomal microRNA: trafficking, sorting, and function. *Genomics, proteomics & bioinformatics*. 2015;13(1):17-24.
108. Guitart K, Loers G, Buck F, Bork U, Schachner M, Kleene R. Improvement of neuronal cell survival by astrocyte-derived exosomes under hypoxic and ischemic conditions depends on prion protein. *Glia*. 2016;64(6):896-910.
109. Fröhlich D, Kuo WP, Frühbeis C, Sun J-J, Zehendner CM, Luhmann HJ, et al. Multifaceted effects of oligodendroglial exosomes on neurons: impact on neuronal firing rate, signal transduction and gene regulation. *Phil Trans R Soc B*. 2014;369(1652):20130510.
110. Asai H, Ikezu S, Tsunoda S, Medalla M, Luebke J, Haydar T, et al. Depletion of microglia and inhibition of exosome synthesis halt tau propagation. *Nature neuroscience*. 2015;18(11):1584.
111. Levy E. Exosomes in the diseased brain: first insights from in vivo studies. *Frontiers in neuroscience*. 2017;11:142.

112. Kanninen KM, Bister N, Koistinaho J, Malm T. Exosomes as new diagnostic tools in CNS diseases. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*. 2016;1862(3):403-10.
113. Dahariya S, Paddibhatla I, Kumar S, Raghuwanshi S, Pallepati A, Gutti RK. Long non-coding RNA: Classification, biogenesis and functions in blood cells. *Molecular immunology*. 2019;112:82-92.
114. Kim VN. Small RNAs: classification, biogenesis, and function. *Molecules & Cells (Springer Science & Business Media BV)*. 2005;19(1).
115. Collins LJ, Schönfeld B, Chen XS. The epigenetics of non-coding RNA. *Handbook of Epigenetics: Elsevier*; 2011. p. 49-61.
116. Winter J, Jung S, Keller S, Gregory RI, Diederichs S. Many roads to maturity: microRNA biogenesis pathways and their regulation. *Nature cell biology*. 2009;11(3):228-34.
117. Peng KA, Masliah E. Lentivirus-expressed siRNA vectors against Alzheimer disease. *Lentivirus Gene Engineering Protocols: Springer*; 2010. p. 215-24.
118. Tan L, Yu J-T, Hu N, Tan L. Non-coding RNAs in Alzheimer's disease. *Molecular neurobiology*. 2013;47(1):382-93.
119. Pant S, Hilton H, Burczynski ME. The multifaceted exosome: biogenesis, role in normal and aberrant cellular function, and frontiers for pharmacological and biomarker opportunities. *Biochemical pharmacology*. 2012;83(11):1484-94.
120. Wang M, Qin L, Tang B. MicroRNAs in Alzheimer's disease. *Frontiers in genetics*. 2019;10:153.
121. Patel N, Hoang D, Miller N, Ansaloni S, Huang Q, Rogers JT, et al. MicroRNAs can regulate human APP levels. *Molecular neurodegeneration*. 2008;3(1):10.
122. Meyer L, Venard C, Schaeffer V, Patte-Mensah C, Mensah-Nyagan AG. The biological activity of 3 α -hydroxysteroid oxido-reductase in the spinal cord regulates thermal and mechanical pain thresholds after sciatic nerve injury. *Neurobiology of disease*. 2008;30(1):30-41.
123. Liang C, Zhu H, Xu Y, Huang L, Ma C, Deng W, et al. MicroRNA-153 negatively regulates the expression of amyloid precursor protein and amyloid precursor-like protein 2. *Brain research*. 2012;1455:103-13.
124. Yang L-B, Lindholm K, Yan R, Citron M, Xia W, Yang X-L, et al. Elevated β -secretase expression and enzymatic activity detected in sporadic Alzheimer disease. *Nature medicine*. 2003;9(1):3-4.
125. Boissonneault V, Plante I, Rivest S, Provost P. MicroRNA-298 and microRNA-328 regulate expression of mouse β -amyloid precursor protein-converting enzyme 1. *Journal of Biological Chemistry*. 2009;284(4):1971-81.
126. Zhu H-C, Wang L-M, Wang M, Song B, Tan S, Teng J-F, et al. MicroRNA-195 downregulates Alzheimer's disease amyloid- β production by targeting BACE1. *Brain research bulletin*. 2012;88(6):596-601.
127. Zhang Y, Xing H, Guo S, Zheng Z, Wang H, Xu D. MicroRNA-135b has a neuroprotective role via targeting of β -site APP-cleaving enzyme 1. *Experimental and therapeutic medicine*. 2016;12(2):809-14.

128. Kim J, Yoon H, Chung De, Brown JL, Belmonte KC, Kim J. miR-186 is decreased in aged brain and suppresses BACE 1 expression. *Journal of neurochemistry*. 2016;137(3):436-45.
129. Tiribuzi R, Crispoltoni L, Porcellati S, Di Lullo M, Florenzano F, Pirro M, et al. miR128 up-regulation correlates with impaired amyloid β (1-42) degradation in monocytes from patients with sporadic Alzheimer's disease. *Neurobiology of aging*. 2014;35(2):345-56.
130. Zhao Y, Jaber V, Lukiw WJ. Over-expressed pathogenic miRNAs in Alzheimer's disease (AD) and prion disease (PrD) drive deficits in TREM2-mediated A β 42 peptide clearance. *Frontiers in aging neuroscience*. 2016;8:140.
131. Guedes JR, Santana I, Cunha C, Duro D, Almeida MR, Cardoso AM, et al. MicroRNA deregulation and chemotaxis and phagocytosis impairment in Alzheimer's disease. *Alzheimer's & Dementia: Diagnosis, Assessment & Disease Monitoring*. 2016;3:7-17.
132. Li H-H, Lin S-L, Huang C-N, Lu F-J, Chiu P-Y, Huang W-N, et al. MIR-302 attenuates amyloid- β -induced neurotoxicity through activation of Akt signaling. *Journal of Alzheimer's Disease*. 2016;50(4):1083-98.
133. Zhao Y, Zhao R, Wu J, Wang Q, Pang K, Shi Q, et al. Melatonin protects against A β -induced neurotoxicity in primary neurons via miR-132/PTEN/AKT/FOXO3a pathway. *Biofactors*. 2018;44(6):609-18.
134. He D, Tan J, Zhang J. miR-137 attenuates A β -induced neurotoxicity through inactivation of NF- κ B pathway by targeting TNFAIP1 in Neuro2a cells. *Biochemical and biophysical research communications*. 2017;490(3):941-7.
135. Hu S, Wang H, Chen K, Cheng P, Gao S, Liu J, et al. MicroRNA-34c downregulation ameliorates amyloid- β -induced synaptic failure and memory deficits by targeting VAMP2. *Journal of Alzheimer's Disease*. 2015;48(3):673-86.
136. Lee K, Kim H, An K, Kwon O-B, Park S, Cha JH, et al. Replenishment of microRNA-188-5p restores the synaptic and cognitive deficits in 5XFAD Mouse Model of Alzheimer's Disease. *Scientific reports*. 2016;6(1):1-14.
137. Ballatore C, Lee VM-Y, Trojanowski JQ. Tau-mediated neurodegeneration in Alzheimer's disease and related disorders. *Nature Reviews Neuroscience*. 2007;8(9):663-72.
138. Banzhaf-Strathmann J, Benito E, May S, Arzberger T, Tahirovic S, Kretschmar H, et al. MicroRNA-125b induces tau hyperphosphorylation and cognitive deficits in Alzheimer's disease. *The EMBO journal*. 2014;33(15):1667-80.
139. Wang Y, Veremeyko T, Wong AH-K, El Fatimy R, Wei Z, Cai W, et al. Downregulation of miR-132/212 impairs S-nitrosylation balance and induces tau phosphorylation in Alzheimer's disease. *Neurobiology of aging*. 2017;51:156-66.
140. Wang X, Tan L, Lu Y, Peng J, Zhu Y, Zhang Y, et al. MicroRNA-138 promotes tau phosphorylation by targeting retinoic acid receptor alpha. *FEBS letters*. 2015;589(6):726-9.
141. Zhao Y, Pogue AI, Lukiw WJ. MicroRNA (miRNA) signaling in the human CNS in sporadic Alzheimer's disease (AD)-novel and unique pathological features. *International journal of molecular sciences*. 2015;16(12):30105-16.
142. Abbracchio MP, Burnstock G, Boeynaems J-M, Barnard EA, Boyer JL, Kennedy C, et al. International Union of Pharmacology LVIII: update on the P2Y G protein-

- coupled nucleotide receptors: from molecular mechanisms and pathophysiology to therapy. *Pharmacological reviews*. 2006;58(3):281-341.
143. North RA. Molecular physiology of P2X receptors. *Physiological reviews*. 2002;82(4):1013-67.
 144. Ferrari D, Wesselborg S, Bauer MK, Schulze-Osthoff K. Extracellular ATP activates transcription factor NF- κ B through the P2Z purinoreceptor by selectively targeting NF- κ B p65 (RelA). *The Journal of cell biology*. 1997;139(7):1635-43.
 145. Kataoka A, Tozaki-Saitoh H, Koga Y, Tsuda M, Inoue K. Activation of P2X7 receptors induces CCL3 production in microglial cells through transcription factor NFAT. *Journal of neurochemistry*. 2009;108(1):115-25.
 146. Parvathenani LK, Tertyshnikova S, Greco CR, Roberts SB, Robertson B, Posmantur R. P2X7 mediates superoxide production in primary microglia and is up-regulated in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Journal of Biological Chemistry*. 2003;278(15):13309-17.
 147. Suzuki T, Hide I, Ido K, Kohsaka S, Inoue K, Nakata Y. Production and release of neuroprotective tumor necrosis factor by P2X7 receptor-activated microglia. *Journal of Neuroscience*. 2004;24(1):1-7.
 148. Takenouchi T, Sato M, Kitani H. Lysophosphatidylcholine potentiates Ca²⁺ influx, pore formation and p44/42 MAP kinase phosphorylation mediated by P2X7 receptor activation in mouse microglial cells. *Journal of neurochemistry*. 2007;102(5):1518-32.
 149. Takenouchi T, Nakai M, Iwamaru Y, Sugama S, Tsukimoto M, Fujita M, et al. The activation of P2X7 receptor impairs lysosomal functions and stimulates the release of autophagolysosomes in microglial cells. *The Journal of Immunology*. 2009;182(4):2051-62.
 150. Garden GA, Möller T. Microglia biology in health and disease. *Journal of Neuroimmune Pharmacology*. 2006;1(2):127-37.
 151. Diaz-Hernandez JI, Gomez-Villafuertes R, León-Otegui M, Hontecillas-Prieto L, del Puerto A, Trejo JL, et al. In vivo P2X7 inhibition reduces amyloid plaques in Alzheimer's disease through GSK3 β and secretases. *Neurobiology of aging*. 2012;33(8):1816-28.
 152. Zhang W, Zhong B, Zhang C, Luo C, Zhan Y. miR-373 regulates inflammatory cytokine-mediated chondrocyte proliferation in osteoarthritis by targeting the P2X7 receptor. *FEBS open bio*. 2018;8(3):325-31.
 153. Nasoohi S, Ismael S, Ishrat T. Thioredoxin-Interacting Protein (TXNIP) in Cerebrovascular and Neurodegenerative Diseases: Regulation and Implication. *Molecular neurobiology*. 2018:1-21.
 154. Bodnar JS, Chatterjee A, Castellani LW, Ross DA, Ohmen J, Cavalcoli J, et al. Positional cloning of the combined hyperlipidemia gene *Hyplip1*. *Nature genetics*. 2002;30(1):110.
 155. Liu W, Gu J, Qi J, Zeng XN, Ji J, Chen ZZ, et al. Lentinan exerts synergistic apoptotic effects with paclitaxel in A549 cells via activating ROS-TXNIP-NLRP 3 inflammasome. *Journal of cellular and molecular medicine*. 2015;19(8):1949-55.
 156. Gouget T, Djelloul M, Boucraut J, Weinhard L, Baranger K, Rivera S, et al. TXNIP, the major player in insulin resistance, is early over-expressed in the brain of the 5XFAD Alzheimer's mice model and is induced by A β in vitro: emerging role of

- TXNIP and inflammation in Alzheimer's Disease progression. *Alzheimer's & Dementia: The Journal of the Alzheimer's Association*. 2011;7(4):S684.
157. Gao J, He H, Jiang W, Chang X, Zhu L, Luo F, et al. Salidroside ameliorates cognitive impairment in a d-galactose-induced rat model of Alzheimer's disease. *Behavioural brain research*. 2015;293:27-33.
 158. Yamaguchi F, Takata M, Kamitori K, Nonaka M, Dong Y, Sui L, et al. Rare sugar D-allose induces specific up-regulation of TXNIP and subsequent G1 cell cycle arrest in hepatocellular carcinoma cells by stabilization of p27kip1. *International journal of oncology*. 2008;32(2):377-85.
 159. Winkler EA, Nishida Y, Sagare AP, Rege SV, Bell RD, Perlmutter D, et al. GLUT1 reductions exacerbate Alzheimer's disease vasculo-neuronal dysfunction and degeneration. *Nature neuroscience*. 2015;18(4):521.
 160. Jo S, Chen J, Xu G, Grayson TB, Thielen LA, Shalev A. miR-204 controls Glucagon-like Peptide 1 Receptor expression and agonist function. *Diabetes*. 2017:db170506.
 161. Xu W, von Strauss E, Qiu C, Winblad B, Fratiglioni L. Uncontrolled diabetes increases the risk of Alzheimer's disease: a population-based cohort study. *Diabetologia*. 2009;52(6):1031.
 162. Femminella GD, Edison P. Evaluation of neuroprotective effect of glucagon-like peptide 1 analogs using neuroimaging. *Alzheimer's & Dementia*. 2014;10(1):S55-S61.
 163. Perry T, Greig NH. Enhancing central nervous system endogenous GLP-1 receptor pathways for intervention in Alzheimer's disease. *Current Alzheimer Research*. 2005;2(3):377-85.
 164. During MJ, Cao L, Zuzga DS, Francis JS, Fitzsimons HL, Jiao X, et al. Glucagon-like peptide-1 receptor is involved in learning and neuroprotection. *Nature medicine*. 2003;9(9):1173.
 165. Hölscher C. New drug treatments show neuroprotective effects in Alzheimer's and Parkinson's diseases. *Neural regeneration research*. 2014;9(21):1870.
 166. McClean PL, Parthasarathy V, Faivre E, Hölscher C. The diabetes drug liraglutide prevents degenerative processes in a mouse model of Alzheimer's disease. *Journal of Neuroscience*. 2011;31(17):6587-94.
 167. Mustapic M, Eitan E, Werner Jr JK, Berkowitz ST, Lazaropoulos MP, Tran J, et al. Plasma extracellular vesicles enriched for neuronal origin: a potential window into brain pathologic processes. *Frontiers in neuroscience*. 2017;11:278.
 168. McKhann GM, Knopman DS, Chertkow H, Hyman BT, Jack Jr CR, Kawas CH, et al. 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. *Alzheimer's & dementia*. 2011;7(3):263-9.
 169. Morris JC. Clinical dementia rating: a reliable and valid diagnostic and staging measure for dementia of the Alzheimer type. *International psychogeriatrics*. 1997;9(S1):173-6.
 170. Scheltens P, Launer LJ, Barkhof F, Weinstein HC, van Gool WA. Visual assessment of medial temporal lobe atrophy on magnetic resonance imaging: interobserver reliability. *Journal of neurology*. 1995;242(9):557-60.

171. Scheltens P, Erkinjuntti T, Leys D, Wahlund L-O, Inzitari D, del Ser T, et al. White matter changes on CT and MRI: an overview of visual rating scales. *European neurology*. 1998;39(2):80-9.
172. Burns A, Brayne C, Folstein M. Mini-Mental State: A practical method for grading the cognitive state of patients for the clinician. M. Folstein, S. Folstein and P. McHugh, *Journal of Psychiatric Research* (1975) 12, 189-198. *International Journal of Geriatric Psychiatry*. 1998;13(5):285-94.
173. Güngen C, Ertan T, Eker E, Yaşar R, Engin F. Standardize mini mental test'in Türk toplumunda hafif demans tanısında geçerlik ve güvenilirliği. *Türk Psikiyatri Dergisi*. 2002;13:273-81.
174. Babacan-Yıldız G, Emel U, Kolukısa M, Işık At, Gürsoy E, Kocaman G, et al. Eğitimsizler İçin Modifiye Edilen Mini Mental Testin (MMSE-E) Türk Toplumunda Alzheimer Hastalığı Tanısında Geçerlik ve Güvenilirlik Çalışması.
175. Li M, Rai AJ, DeCastro GJ, Zeringer E, Barta T, Magdaleno S, et al. An optimized procedure for exosome isolation and analysis using serum samples: application to cancer biomarker discovery. *Methods*. 2015;87:26-30.
176. Livak K, Schmittgen T. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-Delta Delta C} (T) Method *Methods*. 2001; 25: 402–8. PMID; 2001.
177. Lee Y, Morrison BM, Li Y, Lengacher S, Farah MH, Hoffman PN, et al. Oligodendroglia metabolically support axons and contribute to neurodegeneration. *Nature*. 2012;487(7408):443-8.
178. Krämer-Albers EM, Bretz N, Tenzer S, Winterstein C, Möbius W, Berger H, et al. Oligodendrocytes secrete exosomes containing major myelin and stress-protective proteins: Trophic support for axons? *PROTEOMICS–Clinical Applications*. 2007;1(11):1446-61.
179. Jain G, Stundl A, Rao P, Berulava T, Centeno TP, Kaurani L, et al. A combined miRNA–piRNA signature to detect Alzheimer's disease. *Translational psychiatry*. 2019;9(1):1-12.
180. Goetzl EJ, Boxer A, Schwartz JB, Abner EL, Petersen RC, Miller BL, et al. Altered lysosomal proteins in neural-derived plasma exosomes in preclinical Alzheimer disease. *Neurology*. 2015;85(1):40-7.
181. Walsh DM, Cha DJ, Mengel D, Mustapic M, Liu W, Selkoe DJ, et al. miR-212 and miR-132 are down-regulated in neurally-derived plasma exosomes of Alzheimer's patients. *Frontiers in Neuroscience*. 2019;13:1208.
182. Sørensen SS, Nygaard A-B, Christensen T. miRNA expression profiles in cerebrospinal fluid and blood of patients with Alzheimer's disease and other types of dementia—an exploratory study. *Translational neurodegeneration*. 2016;5(1):6.
183. Inohara N, Ding L, Chen S, Núñez G. harakiri, a novel regulator of cell death, encodes a protein that activates apoptosis and interacts selectively with survival-promoting proteins Bcl-2 and Bcl-XL. *The EMBO journal*. 1997;16(7):1686-94.
184. Zhu X, Yu L, Tao W, Jin J, Xu Y. O3-01-05: miR-204 attenuates memory deficits in a mouse model of Alzheimer's Disease. *Alzheimer's & Dementia*. 2019;15:P876-P7.