

T.C.
HALIÇ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK PROGRAMI

ALZHEİMER HASTALIĞI TANISINDA APP İLİŞKİLİ
GEN VE miRNA SEVİYELERİNİN BİYOLOJİK
BELİRTEÇ OLARAK KULLANIMININ SH-SY5Y
İNSAN NÖROBLASTOMA HÜCRELERİNDE
İNCELENMESİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Hazırlayan
Ezgi KESKE

Danışman
Dr. Öğretim Üyesi Özlem SAĞLAM UÇAR

İstanbul - 2018

**T.C.
HALIÇ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK PROGRAMI**

**ALZHEİMER HASTALIĞI TANISINDA APP İLİŞKİLİ
GEN VE miRNA SEVİYELERİNİN BİYOLOJİK
BELİRTEÇ OLARAK KULLANIMININ SH-SY5Y
İNSAN NÖROBLASTOMA HÜCRELERİNDE
İNCELENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**Hazırlayan
Ezgi KESKE**

**Danışman ve Tez Jürisi
Dr. Öğretim Üyesi Özlem SAĞLAM UÇAR (Danışman)
Dr. Öğretim Üyesi Ayyub EBRAHİMİ (Üye)
Dr. Öğretim Üyesi Zehra Seda ÜNAL HALBUTOĞULLARI (Üye)**

İstanbul - 2018

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜNE

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı Yüksek Lisans Programı Öğrencisi Ezgi KESKE tarafından hazırlanan **Alzheimer Hastalığı Tanısında APP İlişkili Gen ve miRNA Seviyelerinin Biyolojik Belirteç Olarak Kullanımının SH-SY5Y İnsan Nöroblastoma Hücrelerinde İncelenmesi** adlı tez çalışma jürimizce Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 11.06.2018

Jüri Üyesinin Unvanı, Adı, Soyadı ve Kurumu

İmzası

Jüri Üyesi : Dr. Öğr. Üy. Özlem SAĞLAM UÇAR
: Danışman, Haliç Üniv.

Özlem Uçar

Jüri Üyesi : Dr. Öğr. Üy. Ayyub EBRAHİMİ
: Asıl Üye, Haliç Üniv.

Ayyub Ebrahimi

Jüri Üyesi : Dr. Öğr. Üy. Zehra Seda ÜNAL HALBUTOĞULLARI
: Asıl Üye, Kocaeli Üniv.

Zehra Seda Ünal

Bu tez Enstitü Yönetim Kurulu tarafından belirlenen jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulunun kararıyla kabul edilmiştir.

Temel Savaşkan

Prof. Dr Temel SAVAŞKAN
Fen Bilimleri Enstitüsü
Vekil Müdür

Tez projesi

ORJİNALLIK RAPORU

%6

BENZERLİK ENDEKSİ

%4

İNTERNET
KAYNAKLARI

%2

YAYINLAR

%3

ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

- | | | |
|---|--|-----|
| 1 | Submitted to The Scientific & Technological Research Council of Turkey (TUBITAK)
Öğrenci Ödevi | %1 |
| 2 | www.halic.edu.tr
İnternet Kaynağı | <%1 |
| 3 | Hai-Yan Wang, Yi-Lun Ying, Yang Li, Heinz-Bernhard Kraatz, Yi-Tao Long. "Nanopore Analysis of β -Amyloid Peptide Aggregation Transition Induced by Small Molecules", Analytical Chemistry, 2011
Yayın | <%1 |
| 4 | Submitted to Alanya Alaaddin Keykubat Üniversitesi
Öğrenci Ödevi | <%1 |
| 5 | www.sigmaaldrich.com
İnternet Kaynağı | <%1 |
| 6 | Submitted to Kahramanmaraş Sütçü İmam University
Öğrenci Ödevi | <%1 |

Dr. Öğretim Üyesi Özlem SAÇLAM Üstü
İstetler

ÖNSÖZ

Bu çalışma T.C Haliç Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü'nün bilimsel araştırma ve uygulama çalışmalarına verdiği destekle hazırlanmıştır.

Tez çalışmam boyunca büyük özveriyle çalışmamı takip eden, gösterdiği sabır ve hoşgörüsüyle benden desteğini hiçbir zaman esirgemeyen danışmanım Dr. Öğretim Üyesi Özlem SAĞLAM UÇAR'a çok teşekkür ederim.

Yüksek lisans ve lisans eğitimi süresince bana yaptıkları büyük katkılardan dolayı Doç. Dr. Nagehan ERSOY TUNALI, Yrd. Doç. Dr. Baki YOKEŞ ve Doç. Dr. Burcu IRMAK YAZICIOĞLU'na ve ayrıca tez çalışmam sırasında benden yardımlarını esirgemeyen Dr. Öğretim Üyesi Ayyub EBRAHİMİ, Dr. Öğretim Üyesi Ayşe Feyza TUFAN ve Arş. Gör. Anıl CEBECİ'ye teşekkür ederim.

Çalışmalarım sırasında paylaştığım zamanı eğlenceli kılan ve bana yardımcı olan laboratuvar arkadaşlarım Özge BARIM, Gizem SÜMER'e; en stresli anlarımda bana destek olan ve en mutlu anlarımı benimle paylaşarak mutluluğumu arttıran Hatice RECAİOĞLU, Burçin SELÇUK ve özellikle beni hiçbir zaman yalnız bırakmayan Pınar AYDINDAĞ'a teşekkür ederim.

Maddi manevi her zaman yanımda olan; desteklerini her anımda hissettiren annem Aynur KESKE, babam Bülent KESKE ve abim Volkan KESKE'ye sonsuz teşekkür ederim.

İstanbul, 2018

Ezgi KESKE

İÇİNDEKİLER

	Sayfa No.
KISALTMALAR	IV
TABLolar	VI
ŞEKİLLER	VII
GENEL BİLGİLER	VIII
ÖZET	VIII
ABSTRACT	IX
1. GİRİŞ	1
1.1. Alzheimer Hastalığı	1
1.1.1. Alzheimer Hastalığı Patogenezi Ve Genetik Etkiler.....	2
1.1.1.1. Amiloid Prekürsör Protein	3
Amiloid Prekürsör Proteinin Proteolitik İşlenmesi	4
Amiloid Kaskad Hipotezi.....	5
Amiloid Beta 1-42'nin Nörotoksik Etkileri	6
1.1.1.2. İlişkili Diğer Genler	6
BACE1	7
Presenilin1	7
GSAP	8
BDNF	9
1.2. miRNA	9
1.2.1. miRNA Biyogenezi Ve Regülasyonu	10
1.3. Alzheimer Hastalığı'nda Biyolojik Belirteç Olarak miRNA	12
2. AMAÇ	14
3. MATERYAL	15
3.1. Araştırmada Kullanılan Örnekler	15
3.2. Kimyasallar	15
3.3. Cihazlar	16
3.4. Sarf Malzemeler	17
3.5. Kitler	18
3.6. Hücre Hatları Büyüme Ortamları	19
3.7. Primerler.....	19
3.8. miRNA'lar	20
4. YÖNTEM	21
4.1. Hücre Hatlarının Kültürü	21
4.2. Kongo Kırmızısı İle Boyama	22
4.3. MTT Analizi.....	23
4.4. A β 42 Proteinin Hazırlanması.....	24
4.5. A β 42 Proteinin Uygulanması.....	24
4.6. ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay).....	25
4.7. Total RNA İzolasyonu Ve cDNA Sentezi	26
4.8. miRNA İzolasyonu Ve cDNA Sentezi.....	28

4.9. Gerçek-Zamanlı PZR ile Gen Ekspresyon Seviyelerinin Belirlenmesi	30
4.10. Gerçek-Zamanlı PZR ile Mirna Ekspresyon Seviyelerinin Belirlenmesi	31
4.11. İstatistiksel Analiz	32
5.SONUÇLAR	33
5.1. SH-SY5Y ve dH1f Hücre Hatlarının Görüntüleri.....	33
5.1.1. SH-SY5Y ve dH1f Hücre Hatlarının A β 42 Uygulaması Sonrası Görüntüleri	34
5.2. Kongo Kırmızısı ile Boyama	34
5.3. MTT Analizinin Değerlendirilmesi.....	36
5.4. ELISA Sonuçlarının Değerlendirilmesi	38
5.5. Gen Ve miRNA Ekspresyon Sonuçlarının Değerlendirilmesi.....	40
5.5.1. Gerçek-Zamanlı PZR ile Genlerin Anlatımının İncelenmesi.....	40
5.5.2. Gerçek-Zamanlı PZR ile miRNA'ların Anlatımının İncelenmesi	42
6. TARTIŞMA	44
7.KAYNAKLAR	50
8.ÖZGEÇMİŞ	55



KISALTMALAR

AH	: Alzheimer Hastalığı
APP	: Amiloid öncü protein
AICD	: Amiloid öncü protein intraselüler domain
APP-CTF	: Amiloid öncü protein C uç fragmenti
Aβ	: Amiloid-beta
BDNF	: Beyin aracılı nörotrofik faktör
BACE1	: Beta-sekretaz 1
cDNA	: Komplementer DNA
CSF	: Serebrospinal sıvı
DMSO	: Dimetil sülfoksit
ELISA	: Enzim bağılı immünolojik analiz
FBS	: Fetal sığır serumu
GSAP	: Gama sekretaz aktive edici protein
g/Rcf	: G-kuvveti/Bağıl merkezkaç kuvveti
g	: Gram
l	: Litre
miRNA	: Mikro RNA
mg	: Miligram
ml	: Mililitre
mM	: Milimolar
mRNA	: Mesajcı RNA
MR	: Manyetik Rezonans
MTT	: 3-(4,5-dimetiltiyazol2-yl)-2,5-difenil tetrazolyum bromürün
NEAA	: Temel olmayan amino asit

NFY	: Nörofibriller yumaklar
ng	: Nanogram
PBS	: Fosfat salin tamponu
PET	: Pozitron Emisyon Taraması
pM	: Pikomolar
PSEN1	: Presenilin 1
PSEN2	: Presenilin 2
PZR	: Polimeraz zincir reaksiyonu
Rpm	: Dakikadaki devir sayısı
β	: Beta
γ	: Gama
μl	: Mikrolitre
μg	: Mikrogram

TABLULAR

Tablo 3.1. Kimyasallar	15
Tablo 3.2. Cihazlar	16
Tablo 3.3. Sarf Malzemeler	17
Tablo 3.4. Kullanılan Kitler.....	18
Tablo 3.5. Gerçek-zamanlı PZR’da kullanılan genlerin sembolleri ve baz dizileri ..	19
Tablo 3.6 Gerçek-zamanlı PZR’da kullanılan miRNA’lar ve primer dizileri.....	20
Tablo 4.1 Besiyeri hazırlanırken DMEM üzerine eklenen tamamlayıcı bileşenler ..	21
Tablo 4.2. Dondurma için hazırlanan besiyeri bileşenleri.....	22
Tablo 4.3 A β 42 proteinin amino asit sekansı	24
Tablo 4.4. İzolasyondan elde edilen Total RNA’nın cDNA çevriminde kullanılan bileşenler ve miktarları.....	27
Tablo 4.5. miRNA izolasyonunda kullanılan lizis karışımının içeriği	29
Tablo 4.6. İzolasyondan elde edilen küçük RNA’nın cDNA çevriminde kullanılan reaktifler ve miktarları.....	29
Tablo 4.7: Gen ekspresyon seviyelerinin belirlenmesi için yapılan Gerçek-Zamanlı PZR için kullanılan reaktifler	30
Tablo 4.8: Gen ekspresyon seviyesinin belirlenmesi için uygulanan Gerçek-Zamanlı PZR koşulları.	30
Tablo 4.9: miRNA ekspresyon seviyesinin belirlenmesi için yapılan Gerçek-Zamanlı PZR için kullanılan reaktifler.....	31
Tablo 4.10: miRNA ekspresyon seviyesinin belirlenmesi için uygulanan Gerçek-Zamanlı PZR koşulları	31
Tablo 5.1: 2,5 μ M A β 42 proteini uygulaması sonrasında toplanan süpernatantlarla yapılan ELISA sonuçları doğrultusunda hesaplanan örneklerdeki A β 42 proteini konsantrasyonları	39
Tablo 5.2: 2,5 μ M A β 42 proteini uygulaması sonrasında toplanan süpernatantlarla yapılan ELISA sonuçları doğrultusunda hesaplanan örneklerdeki A β 42 proteini konsantrasyonları	40

ŞEKİLLER

Şekil 1.1 APP'nin enzimatik kesimi	5
Şekil 1.2 BACE1'in AH patogenezindeki rolü.....	7
Şekil 1.3 AH ilişkili genlerin hücre içerisindeki, yoğunluğa bağlı, gösterimi(0:Hiç 5:En yoğun).....	9
Şekil 1.4 miRNA'nın görevleri ve işleyişi.....	10
Şekil 1.5 miRNA biyogenezi	11
Şekil 4.1 A β 42 proteininin SH-SY5Y ve dH1f hücrelerine uygulanması.....	25
Şekil 4.2 Referans almak amacıyla seyreltme standartlarının hazırlanması.....	26
Şekil 5.1 SH-SY5Y ve dH1f hücrelerinin morfolojik görüntüleri.....	33
Şekil 5.2 A β 42 proteini uygulanmış SH-SY5Y hücrelerinin görüntüleri.....	34
Şekil 5.3 Kongo kırmızısıyla boyanan dH1f hücrelerinin A β 42 uygulaması sonrası görüntüleri	35
Şekil 5.4 Kongo kırmızısıyla boyanan SH-SY5Y hücrelerinin A β 42 uygulaması sonrası görüntüleri.....	35
Şekil 5.5 Kongo kırmızısıyla boyanan, A β 42 uygulaması sonrası 3 pasaj ilerletilen SH-SY5Y hücrelerinin görüntüleri.....	36
Şekil 5.6 MTT analizi ile SH-SY5Y ve dH1f hücrelerinin çoğalma kapasitelerinin 24. ve 72. saatlerde ölçümleri sonucu ortaya çıkan değişim oranları	37
Şekil 5.7 SH-SY5Y ve dH1f hücrelerinin A β 42 uygulaması yapılan ve yapılmayan hücrelerinin MTT analizi (48 saat sonrası)	37
Şekil 5.8 SH-SY5Y ve dH1f hücrelerinin A β 42 uygulaması yapılan ve yapılmayan hücrelerinin MTT analizi (48 saat sonrası)	38
Şekil 5.9 A β 42 (2,5 μ M) uygulaması sonrası, ELISA yöntemi ile süpernatanta salınan A β 42 seviyelerinin gösterilmesi	39
Şekil 5.10 A β 42 (5 μ M) uygulaması sonrası, ELISA yöntemi ile süpernatanta salınan A β 42 seviyelerinin gösterilmesi	40
Şekil 5.11 dH1f hücrelerinde ilişkili genlerin Gerçek-Zamanlı PZR analizi.....	41
Şekil 5.12 SH-SY5Y hücrelerinde hastalıkla ilişkili genlerin Gerçek-Zamanlı PZR analizi sonuçları	41
Şekil 5.13 dH1f hücrelerinde hastalıkla ilişkili miRNA'ların Gerçek-Zamanlı PZR analiz sonuçları.....	42
Şekil 5.14 SH-SY5Y hücrelerinde mir-200a ve miR-98'in Gerçek-Zamanlı PZR analiz sonuçları.....	43

GENEL BİLGİLER

Adı ve Soyadı : Ezgi KESKE
Anabilim Dalı : Moleküler Biyoloji ve Genetik
Programı : Moleküler Biyoloji ve Genetik
Tez Danışmanı : Dr. Öğretim Üyesi Özlem SAĞLAM UÇAR
Tez Türü ve Tarihi : Yüksek Lisans – Haziran 2018

ÖZET

ALZHEİMER HASTALIĞI TANISINDA APP İLİŞKİLİ GEN VE miRNA SEVİYELERİNİN BİYOLOJİK BELİRTEÇ OLARAK KULLANIMININ SH-SY5Y İNSAN NÖROBLASTOMA HÜCRELERİNDE İNCELENMESİ

Alzheimer Hastalığı (AH) geri dönüşümü olmayan, progresif nörodejeneratif bir hastalıktır. Hastalığın patogenezinin temelinde amiloid-beta ($A\beta$) monomerlerinin toksik oligomerlere dönüşerek plaklar oluşturması yatmaktadır. MikroRNA (miRNA)'lar hayatta kalma ve nöronal fonksiyonlar için esastır. Birçok miRNA'nın, Alzheimer hastalığı nöropatolojisinde de önemli olduğu gösterilmiştir.

Bu bağlamda gerçekleştirilen çalışmada SH-SY5Y insan nöroblastoma hücrelerinde yeterli $A\beta$ 42 ekspresyonu ile Alzheimer modeli oluşturularak APP ve β -sekretaz genlerinin hedefi olduğu düşünülen miRNA'ların, bu genlerin anlatım seviyeleri üzerindeki olası rollerinin araştırılması amaçlanmıştır.

Bu amaçla SH-SY5Y ve kontrol olarak insan fibroblast hücreleri uygun koşullarda kültüre edilerek; $A\beta$ 42 protein uygulaması yapıldı. Hücrelerdeki amiloid üretiminin kalitatif ve kantitatif ölçümleri, ELISA ve MTT analizleri ve kongo kırmızısı boyama yöntemi ile gerçekleştirildi. Hastalıkla ilişkilendirilen miRNA'lar ve bu miRNA'larla ilişkilendirilen genlerin ifade seviyeleri Gerçek-Zamanlı PZR ile kantitatif olarak belirlendi.

Sonuç olarak, hastalık modellenmesi sonrasında miRNA'lar ve onlarla ilişkilendirilen genlerin hastalığın nöropatolojisi üzerine olası rolleri gösterilmeye çalışılmış ve hastalıkla ilişkili bazı miRNA ve genlerin ifade seviyelerinde $A\beta$ 42 uygulaması sonrasında istatistiksel olarak anlamlı değişimler saptanmıştır.

Anahtar Kelimeler: Alzheimer hastalığı, Amiloid prekürsör protein, miRNA, SH-SY5Y hücre hattı

GENERAL INFORMATION

Name and Surname : Ezgi KESKE
Field : Molecular Biology and Genetics
Program : Molecular Biology and Genetics
Supervisor : Assist. Prof. Dr. Özlem SAĞLAM UÇAR
Degree Awarded and Date : Master of Science – June 2018

ABSTRACT

ANALYSIS OF THE USE OF APP RELATED GENE AND miRNA LEVELS AS BIOMARKERS IN SH-SY5Y NEUROBLASTOMA CELLS IN THE DIAGNOSIS OF ALZHEIMER'S DISEASE

Alzheimer's Disease (AD) is a non-reversible, progressive neurodegenerative disease. In the pathogenesis of the disease, amyloid-beta ($A\beta$) monomers are converted into toxic oligomers and then creates plaques. MicroRNAs (miRNAs) are essential for survival and neuronal function. Many miRNAs have been shown to be important in AD neuropathology.

In this context, we are aimed to investigate the possible roles of miRNAs thought to be the targets of APP and β -secretase genes on expression levels of these genes by forming Alzheimer's model with sufficient $A\beta_{42}$ expression in SH-SY5Y human neuroblastoma cells.

For this purpose, SH-SY5Y and human fibroblasts cells which is negative control, are cultured under optimum conditions; $A\beta_{42}$ protein treatment was applied. Qualitative and quantitative measurements of amyloid production in cells were performed by ELISA and MTT analyzes and congo red staining. Expression levels of the miRNAs associated with the disease and the genes associated with these miRNAs were quantitatively determined by Real-Time PCR.

In conclusion, after disease modeling, miRNAs and genes associated with them were tried to be shown on the neuropathology of the disease and statistically significant changes were observed after application of $A\beta_{42}$ expression levels of some miRNAs and genes related to the disease.

Keywords: Alzheimer Disease, amyloid precursor protein, miRNA, SH-SY5Y cell line

1. GİRİŞ

1.1. Alzheimer Hastalığı

Yaşlanma sürecinde meydana gelen oksidatif stres ve mitokondriyel bozulmalar, telomerlerin kısalması, somatik ve germ hücrelerinde DNA'nın değişmesi, epigenetik değişimler, inflamasyon gibi hücrel değişiklikler; bu süreci hızlandırarak, hücrel senesense neden olabilirler. Yaşlanmaya bağlı gelişen hücrel değişiklikler Alzheimer, Parkinson, multipl skleroz, amniyotrofik lateral skleroz gibi pek çok hastalığa öncülük edebilirler (Reddy ve diğ., 2017).

Alzheimer hastalığı (AH) genellikle beynin hipokampus bölgesinden başlayarak yayılan, bilişsel bozukluklarla kendini göstermeye başlayan; progresif ilerleyen ve proteinlerin birikimi nedeniyle merkezi sinir sisteminde nöral kayıplarla beyinde atrofiye neden olan nörodejeneratif bir hastalıktır (Castellani ve diğ., 2011; Kim ve diğ., 2016). Muhakeme gücünde zayıflama, dil bozukluğu, ajitasyon ve halüsinasyon AH'nin önemli ve yaygın klinik semptomlarından (Wang ve Ding 2008). Hastalığın artan görülme sıklığının getirdiği maddi yükün azımsanamayacak boyutlarda olmasından dolayı tanı ve tedavi çalışmalarının önemi her geçen gün artmaktadır.

Alois Alzheimer, 1901 yılında hastası Auguste D.'nin tedavisi sırasında; diğer demans hastalarından farklı semptomatik özellikler gösterdiğini fark etmiştir. Daha sonra hastası üzerinde yaptığı postmortem incelemelerde, Bielschowsky gümüş tekniği kullanılarak sinir hücrelerinde alışılagelmişin dışında yoğun fibril demetler ve serebral kortekste daha sonra literatüre senil/amiloid plaklar olarak adlandırılacak lezyonlar fark etmiştir (Allsop 1907; Hippus ve Neundörfer 2003). Amiloid birikimler keşfin başlarında yoğun protein agregatları olarak yorumlanmamış fakat sonra yapılan incelemelerle farklı protein ve peptit yapılarının çeşitliliğinde olduğu gösterilmiştir. Böylelikle amiloid peptit birikimlerinin ve fibriler yumakların AH

tanısı için gerekli ve ayrılmaz moleküller olduğu anlaşılmıştır (Allsop 1907). İlerleyen yıllarda bunların yanı sıra nöral ve dendritik kayıplar, nörofil iplikleri, distrofik nöritler, Hirano cisimcikleri ve serebrovasküler amiloid plaklarda Alzheimer hastalığı patolojisiyle ilişkilendirilmiştir (Castellani ve diğ., 2011).

AH, demans vakalarının önemli bir yüzdelik dilimini kaplamaktadır. Başlangıç yaşına bağlı olarak; 65 yaşından önce kendini göstermesi durumunda erken başlangıçlı AH ve 65 yaşından sonra kendini göstermesi durumunda geç başlangıçlı AH adı altında ikiye ayrılmaktadır. Her iki durumda da 65 yaşın üzerinde hızla artan bir prevalans göstermektedir (Castellani ve diğ., 2011).

Hastalığın tanısı büyük oranda klinik belirtilerin incelenmesiyle konulmaktadır (Wang ve Ding 2008; Mayeux ve diğ., 1998). Bilişsel testlerle birlikte şimdiye kadar risk faktörü olarak belirlenmiş genlerin taramasının yapılması, beyin biyopsisi, PET (Pozitron Emisyon Taraması) ve MR (Manyetik Rezonans) görüntülemesi ve bazı biyolojik belirteçlerin kullanılmasıyla birlikte hastalığın tanısı konulmaktadır (Özkay ve diğ., 2011; Castellani ve diğ., 2011). Fakat ne yazık ki bu tanı teknikleri hastalığın erken aşamasında teşhis koyabilmek için yeterli değildir.

Yaşlanma ve genetik faktörlerin haricinde kafa travması, vasküler hastalık geçmişi veya çevresel etkenlerin getirisi gibi fizyolojik ve eğitim seviyesi gibi sosyolojik olarak sınıflandırabileceğimiz risk faktörleri de mevcuttur (Castellani ve diğ., 2011).

1.1.1. Alzheimer Hastalığı Patogenezi ve Genetik Etkiler

AH multifaktöryel bir hastalık olması nedeniyle patolojisi tam olarak çözülememiştir (Zhao ve diğ., 2018). Patolojik olarak; hastalık, sinir hücrelerine toksik olan anormal proteinin birikiminden kaynaklanmaktadır ve bu protein birikimine neden olan iki temel yapı vardır (Wang ve Ding 2008). Bu yapılar Alzheimer hastalarının beyinlerinde karakterize edilmiş olan senil plaklar ve nörofibriller yumaklar (NFY); Alois Alzheimer'in 1907'de yapmış olduğu tanımlamadan beri değişmemiştir ve hastalığın patolojisi için esas kabul edilmektedir. Dolayısıyla ekstraselüler amiloid plaklar ve intraselüler NFY, AH'nın tanımlanan ilk histopatolojik özelliğidir. Bu iki temel özellikte birlikte sinaptik dejenerasyon ve hipokampal nöral kayıplar hastalığa özgü histopatolojik özelliklere

dahil edilmektedir. Bu patolojik özelliklerin yanı sıra Hirano cisimciği, granulovakuolar dejenerasyon gibi özellikler ise hastalık için daha az spesifik kabul edilen patolojik durumlarda mevcuttur. Ayrıca hastaların beyinleri incelendiğinde giruslarda daralma ve bunun sonucu olarak beyinde atrofi gözlemlenmektedir (Castellani ve diğ., 2011; Swerdlow 2007; Özkay ve diğ., 2011).

AH patolojisi, Down sendromlu bireylerde erken yaşlarda görülebilmektedir. Hastalığın nedenlerinden biri olan Amiloid-beta ($A\beta$) protein prekürsörü kromozom 21'de bulunmaktadır. 1984 yılında Glenner ve arkadaşları trizomi 21 görülen Down sendromlu bireylerle AH arasında anlamlı bir ilişki kurmuşlardır. Üzerine daha sonra yapılan çalışmalarla birlikte sendromlu bireylerde var olan fazladan kopya sebebiyle AH patolojisinin erken görüldüğü düşünülmektedir. Bu durum da amiloid kaskad hipotezini destekler niteliktedir (George ve Caine 1984; Castellani ve diğ., 2011)

Erken başlangıçlı ailesel AH, sporadik AH ile patolojik olarak birbirlerine çok benzemelerine rağmen erken başlangıçlı AH ile ilişkilendirilen Presenilin1 geninin ekzon 9 bölgesinde meydana gelen mutasyonun sebep olduğu düşünülen beyaz madde lezyonları ve pamuk-yün plaklarını da içeren daha yoğun lezyonlar gözlemlenmiştir. Klasik AH patolojisine ek olarak, Lewy cisimcikleri de erken başlangıçlı AH patolojisi içerisinde tanımlanmıştır (Castellani ve diğ., 2011).

1.1.1.1. Amiloid Prekürsör Protein

Amiloid prekürsör protein (APP), Tip1 membran protein ailesine ait, büyük ekstraselüler domaine ve kısa sitoplazmik bölgeye sahip bir proteindir (Mohandas ve diğ., 2017). Amiloid prekürsör protein (APP), yaklaşık 695 aminoasitlik büyük bir transmembran proteindir ve proteaz inhibisyonu sağlama, membran reseptörü veya hücre adhezyon molekülü olma, nöritlerin büyümesinde regülatör olma, hücrede hayatta kalmayı teşvik etme, nörotoksik etkilere karşı koruma, sinaptik plastisiteyi modüle etme gibi pek çok potansiyel rolü olduğu düşünülmektedir (Allsop 1907).

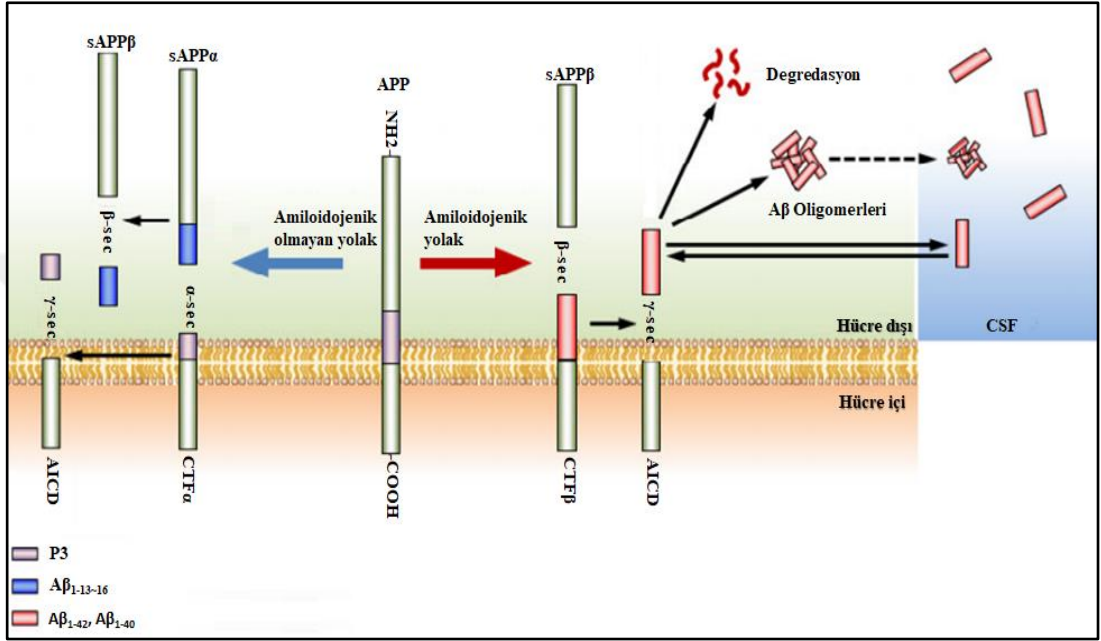
APP'nin proteolitik kesiminden sorumlu üç adet sekretaz bulunmaktadır; α -, β - ve γ - sekretaz (Macleod ve Cameron 2015). Bu enzimlerden β - ve γ sekretaz ile kesilmesi sonucunda oluşan peptidlerden biri olan nörotoksik $A\beta$; mitokondriyel ve sinaptik hasarının yanı sıra Tau proteininin hiperfosforilasyonuna neden olarak NFY oluşumunda da rol oynamaktadır (Özkay ve diğ., 2011; De Strooper 2010). α -

sekretaz, A β oluşumunu engeller (Idda ve diğ., 2018). γ -sekretaz; presenilinler, presenilin enhancer-2, anterior pharynx-defective 1 (Aph-1) ve nikastrin olmak üzere 4 farklı membran proteininden oluşan bir enzim kompleksidir (Duggan ve McCarthy 2016; De Strooper 2010; Wolfe 2012). β -sekretaz, BACE1 geni tarafından kodlanır ve APP'yi keserek 40-42 aminoasit uzunluğunda A β peptidlerinin oluşmasına neden olur (Liu ve diğ., 2014). Hastalığın en büyük etkenlerinden biri olan senil plakların ana bileşeni olan A β proteinin ekstraselüler matrikste birikmesi APP'nin proteolitik sürecinin sekteye uğraması sonucunda oluşur (Özkay ve diğ., 2011; Castellani ve diğ., 2011).

Amiloid Prekürsör Proteinin Proteolitik İşlenmesi

APP'nin işlenmesi iki yolla gerçekleşir (Şekil 1.1.); amiloidojenik yolak ve amiloidojenik olmayan yolak. Amiloidojenik olmayan yolakta, APP'nin kesimi p3 peptidi tarafından üretilen α -sekretaz tarafından kesilmesiyle gerçekleşir ve çözülebilir fragmentler oluşur (Idda ve diğ., 2018). Amiloidojenik yolakta ise APP, β -sekretaz ve γ -sekretaz tarafından kesime uğrar ve bu yolakta oluşan çözünemeyen peptidlerin birikimiyle nörodejeneratif hastalıklar meydana gelir. β -sekretaz ektodomainden APPs β salınımına neden olur. Daha sonra kalan APP karboksi terminal fragman (APP-CFT), γ -sekretaz tarafından kesilerek A β peptidleri ve APP intraselüler domain (AICD) serbest kalırlar. APPs β , A β ve AICD'nin biyolojik fonksiyonları tam olarak anlaşılacakla birlikte; A β salınımı sinaptik aktivite ve nöronlarda uyarıcı sinaptik iletimin baskılanması ile ilişkilendirilmiştir. Yeni yapılan bir araştırmada APP'lerin bilinmeyen bir proteaz tarafından işlenerek DR6 ölüm reseptörü için ligand görevi gören bir amino terminal domain fragmenti üretiminde rol aldığı düşünülmektedir. Bunun yanı sıra AICD'nin bir nükleer sinyal molekülü olduğu düşünülse de bu hala tartışılmaktadır. Nicelik ve fonksiyonel olarak APP'de en önemli kesilme α -sekretaz tarafından gerçekleşmektedir ve bu kesilmeyle APPs α ektodomeini salınır. Sonuç olarak karboksi terminal APP-CTF α , γ -sekretaz tarafından işlenir ve küçük p3 denilen bir fragment ile birlikte AICD üretilir. APPs α 'nın nöroprotektif ve sinaps oluşumunu teşvik edici bir etkisi olduğu düşünülmekle birlikte henüz mekanizması tam olarak çözülememiş ve herhangi bir tanımlama yapılmamıştır (De Strooper 2010; Van Dooren ve diğ., 2005). A β toksisitesinde morfolojik değişimler göze çarpmaktadır. A β 'nin hücre kültüründe ve in vivo beyin çalışmalarında nöronları öldürdüğü gösterilmiştir. Membran bağımlı aspartil proteazlardan olan BACE1

bilinen β -sekretazlardan biridir. Birçok dokuda bulunmakla birlikte özellikle beyin ve nöronal hücrelerde yoğun olarak bulunmaktadır. Genellikle hücre kültürlerinde ve vücut sıvılarında tespit edilen $A\beta$ peptidinin özel bir β -sekretaz olan BACE1 tarafından kesildiği düşünülmektedir. BACE1'in yapısına baktığımızda sinyal domeini, katalitik domein, transmembran domein ve sitoplazmik domeinler olduğu görülmektedir (De Strooper 2010).



Şekil 1.1. APP'nin enzimatik kesimi (Kang ve diğ., 2014)

Dolayısıyla $A\beta$ monomerlerinin toksik oligomere dönüşerek plaklar oluşturması (Kim ve diğ., 2015) nedeniyle; beyinde $A\beta$ 'nin anormal birikimi AH için anahtar niteliğinde patolojik belirteçtir (Kim ve diğ., 2016).

Amiloid Kaskad Hipotezi

Beyinde anormal $A\beta$ peptid birikiminin patolojik kaskadı tetikleyerek AH'na öncülük ettiğine dair amiloid kaskad hipotezi ortaya atılmıştır (Reddy ve diğ., 2017). Hastalığın açıklanması için başvurulan hipotezlerden biri olan amiloid hipotezine göre hastalığın tetikleyici nedeni olarak görülen amiloid-beta, 40-42 amino asit uzunluğunda bir peptittir ve amiloid prekürsör proteinin (APP) proteolitik kesilmesiyle oluşmaktadır (Söderberg ve diğ., 2005; De Strooper 2010)

Amiloid kaskat hipotezi başlangıçta, beyindeki amiloid plaklarının hastalığın güçlendirici faktörleri olduğunu savunurken, yapılan çalışmalar ışığında bu hipotezin daha güncel versiyonu ise $A\beta$ peptidlerinin küçük çözünemeyen agregatlarının

hastalığın ilerlemesinde temel neden olduğunu savunmaktadır. A β 'nin amino ve karboksil uçlarındaki heterojeniteden kaynaklı çeşitli varyantları toksisiteye neden olmaktadır. Özellikle A β (1-42) patojenik bir etki göstermektedir. Bu varyant aynı zamanda sporadik ve ailesel Alzheimer amiloid plakların yapısında bolca bulunur ve amiloid oluşumunun kaynağı olarak gösterilmektedir. Amiloid hipotezinin sonucunda yumak oluşumu ve nörodejenerasyon, anormal A β metabolizması sonucunda ortaya çıkmaktadır (De Strooper 2010; Idda ve diğ., 2018; Van Dooren ve diğ., 2005). Dolayısıyla trizomi 21 görülen Down sendromlu bireylerde var olan fazladan kopya sebebiyle AH patolojisinin erken görüldüğü düşünülmektedir. Bu durum da amiloid kaskad hipotezini destekler niteliktedir (Castellani ve diğ., 2011).

Amiloid Beta 1-42'nin Nörotoksik Etkileri

A β 42; APP'nin β - ve γ -sekretaz tarafından kesimiyle oluşur. 42 amino asit uzunluğundaki çözünemeyen bu peptit beyinde birikerek hücreler üzerinde toksik özellik gösterir (Idda ve diğ., 2018). 1989-1990 yıllarında yapılan in vitro çalışmalar ışığında A β agregatlarının bir ölçüye kadar nörotrofik etki gösterdiği rapor edilmiştir. Fakat 1990 yılında, Yanker ve arkadaşları, A β agregatlarının anormal artışının nörotoksik olabileceğini de göstermişlerdir. Amiloid-beta birikimi sinaptik bozulmalar ve nöron kaybına neden olabilecek reaktif oksijen türlerinin aşırı üretimine neden olarak; kalsiyum hemaostasını bozup oksidatif stresi arttırmaktadır. Ayrıca hücrelerde A β konsantrasyonuna bağlı olarak apoptoz veya nekroz da tetiklenmektedir (Zhao ve diğ., 2018; Allsop 1907).

Çözünemeyen A β türlerinin sinaptik kayba neden olduğu anlaşıldığından beri sinaps kaybı Alzheimer için en spesifik patolojik özellik olarak kabul edilmektedir. Bu nedenle beyindeki A β birikimini azaltmaya yönelik stratejiler hastalık terapileri için izlenmesi gereken strateji olarak kabul edilebilir (Castellani ve diğ., 2011; Kim ve diğ., 2016).

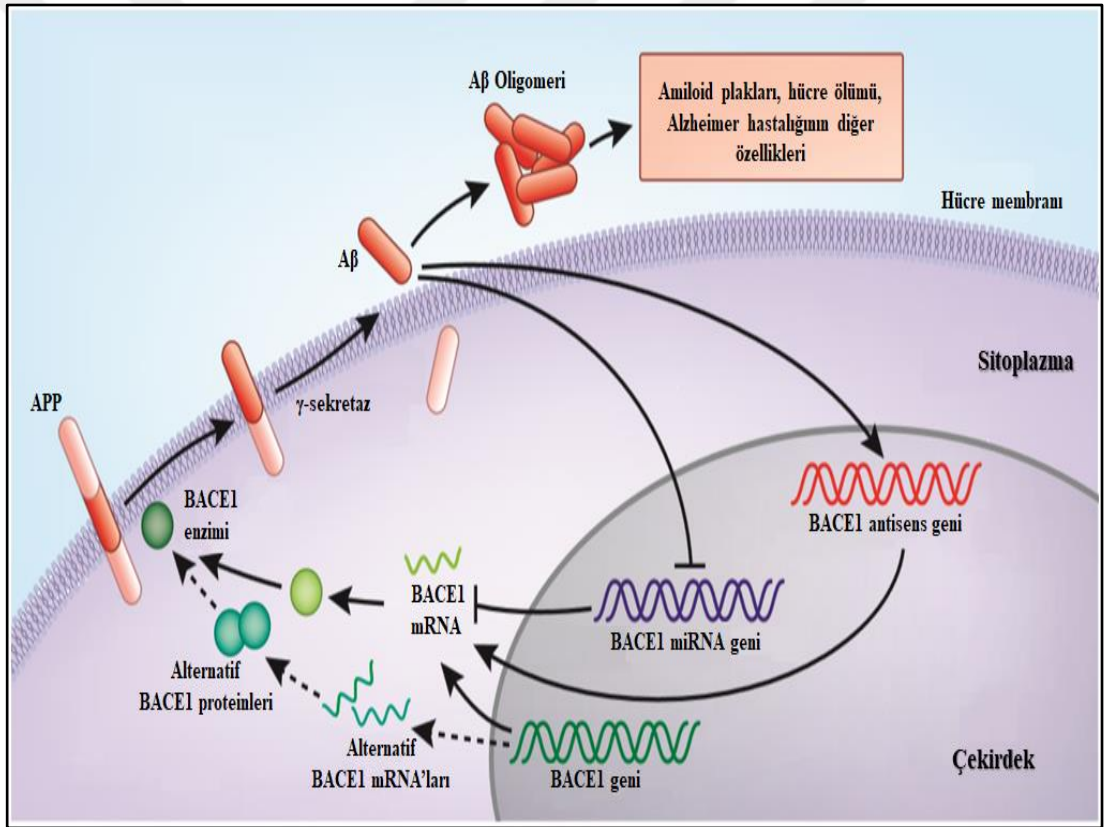
1.1.1.2. İlişkili Diğer Genler

Hastalıkla birçok gen ilişkilendirilmesine karşın bazı genlerin özellikle ön planda olduklarını ve göze çarptıklarını söyleyebiliriz. Bu genlerin hücrede belli kompartimanlarda ifade yoğunlukları değişir (Şekil 1.3.).

BACE1

BACE1 nöronlarda yüksek oranda eksprese edilir ve fizyolojik olarak birçok önemli substratın kesimini gerçekleştirir. APP'de meydana gelen ilk kesilme β -sekretaz BACE1 tarafından gerçekleştirilir (Şekil 1.2). BACE1'in inhibe edildiği çalışmalara bakıldığında APP'nin alternatif işlenmesine neden olarak sinaptik aktif peptidlerin üretildiği gözlenmiştir (Scheltens ve diğ., 2016).

Yaşlanma sürecinde miR-186'nın down-regüle edilmesi BACE1 ekspresyonunu indüklemiş ve A β birikimini arttırmıştır. Bunun gibi BACE1 ifadesinde düzenleyici olarak görev yapan miRNA'lar tanımlanmıştır (Kim ve diğ., 2016)



Şekil 1.2. BACE1'in AH patogenezindeki rolü (George-Hyslop ve Haass 2008).

A β üretimindeki rolü göz önüne alındığında BACE1, Alzheimer hastalığında önemli bir teröpatik hedef haline gelmiştir. Fare modellerinde BACE1'in RNAi aracılı knock-down edilmesi veya genetik delesyona uğratılması sonucunda A β -ilişkili patolojinin ve kognitif defektin iyileştiği görülmüştür (Kim ve diğ., 2016).

Presenilin1

Alzheimer hastalığı anlaşılması zor bir patogeneze sahip olmasına rağmen beyinde anormal A β peptid birikiminin patojenik kaskadları tetiklediği düşünülmektedir (Kim ve diğ., 2016). Bu proteinlerin çökmesi durumunda hipokampüste başlayan nöral kayıp tüm kortekse yayılır (Jia ve Liu 2016). Ailesel Alzheimer hastalığında A β oluşumuyla ilgili en güçlü kanıtlar APP, PSEN1 ve PSEN2 mutasyonlarıyla ilişkilendirilmiştir. APP, A β peptidinin öncü molekülüdür. APP'de gerçekleşen mutasyonlar A β 'nın kesimini ve birikmesini etkilemektedir. PSEN1 APP'nin kesiminde rol oynayan gama sekretazın katalitik alt ünitelerinden biridir (Idda ve diğ., 2018). A β 42 üzerinde yapılan çalışmalar, PSEN mutasyonlarının APP'nin etkisini azaltarak uzun ve daha hidrofobik A β peptidlerinin üretilmesine neden olduğunu göstermiştir. Ayrıca yapılan araştırmalar sonucunda Presenilin1 mutasyonun A β 42 miktarını arttırdığı bulunmuştur (Castellani ve diğ., 2011). Amiloid kaskad hipotezi doğrultusunda A β peptidinin hastalığı tetiklediği ya da prosesi güçlendirdiği düşünülmektedir. APP, PSEN1 ve PSEN2'deki mutasyonların A β birikimini arttırdığı gözlenmiştir. A β oligomerleri çeşitli membran reseptörlerine bağlanmaktadır. Fakat bu farklı etkileşimlerin hastalık sürecine etkisi tam olarak açıklanamamıştır. A β 'nın Alzheimer hastalığında önemli bir rolü olduğundan dolayı, hastalığı tedavi etmek ya da önlemek için A β üretiminde etkili proteazları bloke etmek üzerine çalışmalar yapmak daha makul olacaktır.

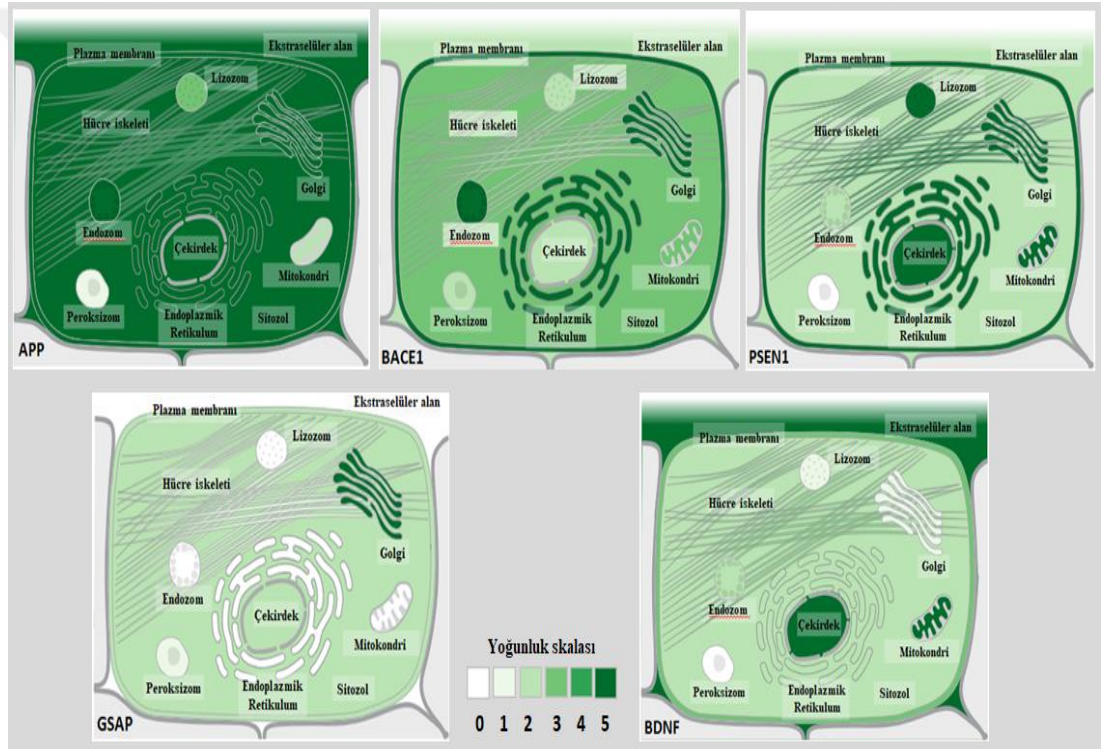
PSEN1 geninde meydana gelen mutasyonlar sonucunda doğrudan ya da dolaylı olarak APP'nin proteolitik sürecinde hatalı bir işleme uğrayarak toksik A β proteinlerinin üretimine neden olduğu bilinmektedir (Kim ve diğ., 2015).

GSAP

GSAP, γ -sekretaz aktive edici proteindir ve karbon terminal yarılmayı modüle etmektedir. PION olarak da adlandırılan GSAP, yaklaşık 16 kDa büyüklüğünde bir proteindir (Fang ve diğ., 2012; George-Hyslop ve Fraser 2012). GSAP'in ifadesinin azaltıldığı kemirgen modellerinde A β plaklarında azalma olduğu gözlenmiştir (Satoh ve diğ., 2012). Alzheimer hastalarında, kontrollere oranla beyin farklı bölgelerinde bulunan GSAP, yüksek oranda immünoreaktivite göstermiştir (Deatherage ve diğ., 2010).

BDNF

BDNF, nörotrofin büyüme faktörleri ailesinin bir üyesidir ve reseptör trozin kinaz B ile etkileşime girerek nörit gelişimini ve sinaptik plastisiteyi artırır. Bir dizi çalışma, beyinde bulunan nörotrofik faktör (BDNF) gibi trofik faktörlerin sentezinin ve salınımının beyin üzerinde pozitif etkileri olduğunu göstermiştir (MacPherson, 2017). Alzheimer hastaları ve sağlıklı kontrol grubu üzerinde yapılan bir çalışma sonucunda BDNF'nin Alzheimer hastalarında, kontrol gruplarına göre anlamlı derecede düşük olduğu rapor edilmiştir (Laske ve diğ., 2007). Bunun gibi birbirini takip eden çalışmalar sonucunda BDNF seviyesinin düşmesi ve AH patolojisinin birbiriyle ilişkili olduğu sonucuna varılmıştır (Fumagalli ve diğ., 2006).

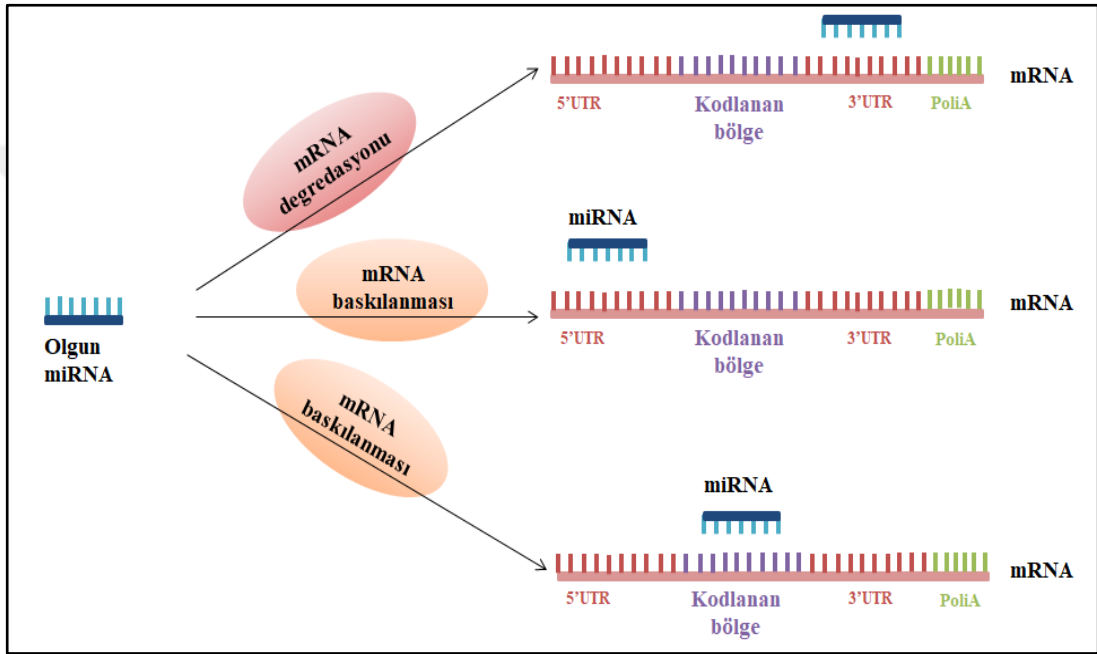


Şekil 1.3. AH ilişkili genlerin hücre içerisindeki, yoğunluğa bağlı gösterimi (0: Hiç 5:En yoğun) (www.genecards.org).

1.2. miRNA

MikroRNA (miRNA)'lar hayatta kalma ve nöronal fonksiyonlar için esastır. Kodlama yapmayan, kısa, endojen RNA'lardır. Hedef mRNA'lara bağlanarak transkripsiyon sonrası regülasyonda görev alırlar (Zhao ve diğ., 2018). Olgun miRNA yaklaşık 20-25 nükleotidlik, tek zincir RNA molekülüdür. Birçok miRNA'nın, AH ilişkili proteinlere etki ederek, nöropatolojide önemli olduğu

gösterilmiştir (Liu ve diğ., 2014). Günümüzde 2000'in üzerinde tanımlanmış miRNA vardır. miRNA ile ilgili yapılan yeni araştırmalarda, insan dahil birçok türde, genetik regülasyonda gerçekten ön plana çıkacak kadar önemli rol oynadığı gözlemlenmiştir. Spesifik genlerin mesajcı RNA'larının (mRNA) 3' UTR bölgelerindeki spesifik gen dizilerine bağlanarak bu genlerin translasyonunu engelleme prensibine dayalı bir çalışma mekanizmaları vardır. Gen ifadesini susturmada oynadıkları önemli rol sayesinde hücresel süreçlerin regülasyonu için umut verici bir hedef sağlarlar (Reddy ve diğ., 2017) (Şekil 1.4.).



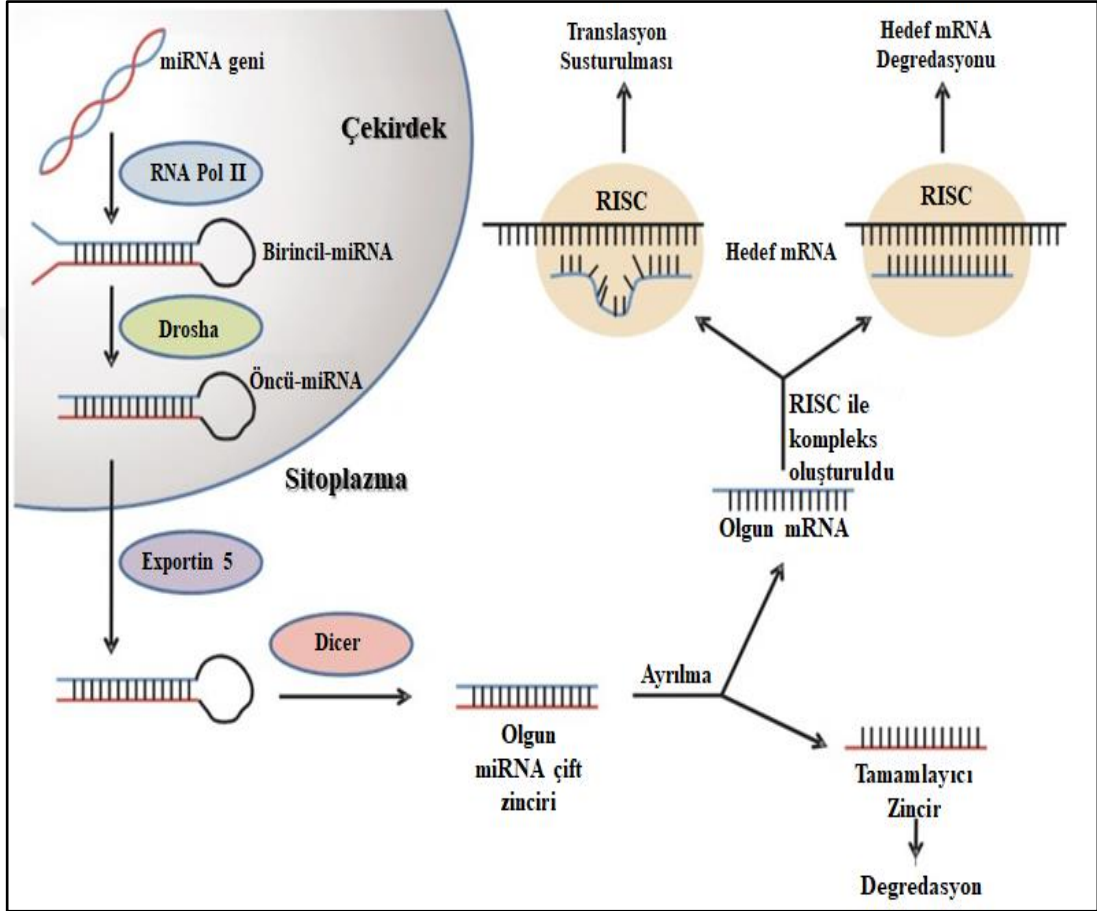
Şekil 1.4. miRNA'nın görevleri ve işleyişi

Yapılan çalışmalar incelendiğinde; hipokampal nöronlarda oksidatif stresin tetiklenmesiyle, bu nöronlarda ifade edilen miR-329, miR-193b, miR-20a gibi bazı miRNA'larda artış gözlemlenirken (Zhang ve diğ., 2014), 2012 yılında Alexandrov ve arkadaşları miR-9 miktarının AH'da azaldığını gözlemlemiştir (Alexandrov ve diğ., 2012). Başka bir çalışmada frontal korteks nöronlarında Dicer'in susturulduğu farelerin nörodejenerasyon gösterdiği saptanmıştır (Cheng ve diğ., 2014).

1.2.1. miRNA Biyogenezi ve Regülasyonu

miRNA biyogenezi, çekirdekte miRNA kodlayan genlerden birincil miRNA (pri-miRNA) transkriptinin transkribe edilmesiyle başlar. Birincil miRNA Drosha ve DGCR8 proteininin enzimatik kesimiyle öncü miRNA (pre-miRNA) oluşur. Bu aşamanın sonunda Exportin-5, Ran-GTP proteinleri yardımıyla

sitoplazmayataşınarak sitoplazmik proteinler olan Dicer ve TRBP ile kesilerek miRNA dubleksleri oluşur. Bu dubleks yapısı helikaz tarafından açılarak olgun miRNA'ları oluştururlar. Olgun miRNA'lar Ago2 proteini ile RISC kompleksini oluştururlar ve böylelikle mRNA'nın 3' UTR'sini hedefleyerek translasyonunu baskırlar (Şekil 1.5.) (Reddy ve diğ., 2017).



Şekil 1.5. miRNA biyogenezi (Li ve diğ., 2011)

miRNA'lar post-transkripsiyonel regülatör proteinlerin kodlanmasında anahtar role sahiptir. mRNA'ya bağlanıp translasyonel aşamada repress ve/veya degrade ederek, gen ekspresyonunu regüle ederler. miRNA'lardaki düzensizlik; hastalıkla ilişkili genlerin ifadelerinde değişikliğe neden olduğu ve böylelikle çeşitli hastalıkların başlangıcına ve/veya bu hastalıkların ilerlemesine neden olduğu artan kanıtlarla desteklenmektedir (Kim ve diğ., 2016).

miRNA'lar nöral farklılaşma, sinaptogenez ve plastisitede oynadıkları anahtar roller göz önüne alındığında; beyinde yüksek oranda ifade edilirler (Maoz ve diğ., 2017).

1.3. Alzheimer Hastalığı'nda Biyolojik Belirteç Olarak miRNA

Alzheimer hastalığı için genişletilmiş araştırmalar yapılmasına rağmen hastalığın sürecini geciktirecek ya da hastalığı önleyecek ilaçlara sahip değiliz. Ayrıca bunların yanı sıra erken aşamada Alzheimer tanısı konulmasını sağlayacak biyolojik belirteçlere de sahip değiliz (Reddy ve diğ., 2017). Bu nedenle araştırmacılar miRNA gibi invaziv olmayan tanı testlerinin bulunmasına yönelik çalışmalara yoğunlaşmışlardır (Kumar ve diğ., 2017).

Alzheimer hastalarının beyinlerinde oluşan patolojik değişimler, klinik semptomların gözlenmesinden çok önce oluşmaya başlamaktadır. Etkili bir tedavi yöntemi yoktur. Günümüzde yalnızca semptomatik tedaviler uygulanmaktadır. Spesifik biyolojik belirteçlerin olmaması, hastalığın erken teşhis edilememesindeki en büyük etkenlerden biridir. Bu nedenle Alzheimer hastalığının erken teşhisinde biyolojik belirteçlerin önemi büyüktür. İdeal biyolojik belirteç, kognitif bilinç zayıflamaya başlamadan nörodejeneratif süreci tanımlayıcı nitelikte, spesifik ve ölçülmesi kolay olmalıdır (Wu ve diğ., 2016; Scheltens ve diğ., 2016). Amiloid β 42 ve Tau proteinleri serebrospinal biyolojik belirteçler olarak belirlenmişlerdir. Amiloid β oligomerleri de sinaptik belirteç olma yönünde adaydır (Scheltens ve diğ., 2016).

Genom çapında yapılan ekspresyon profili çalışmaları, yaşlanmadan etkilenen birçok gen ve biyolojik yolak tanımlanmasına rağmen miRNA'nın yaşlanan beyinde rol oynadığını gösteren ve Alzheimer patogenezi ile ilişki arayan çalışmaların tarihi çok da eskiye dayanmamaktadır (Kim ve diğ., 2016).

miRNA'nın nöronal gelişim, farklılaşma ve nöronların sinaptik plastisitesinde rol aldığı düşünülmektedir. Bunların yanı sıra miRNA'larda meydana gelen sorunların merkezi sinir sistemi hastalıkları, Alzheimer hastalığı, Huntington hastalığı gibi hastalıklara neden olabileceği düşünülmektedir. Konu ile ilgili yapılan çalışmalar incelendiğinde Alzheimer hastalığında bazı miRNA'ların disregülasyonu tespit edildiğinden dolayı bu anomalinin hastalığının patolojisinde rol oynayabileceği dolayısıyla miRNA'ların invaziv olmayan ve hassas biyolojik belirteçler olabilecekleri düşünülmektedir (Jia ve Liu 2016).

miRNA'lar protein kodlayan genlerin post-transkripsiyonel regülatörleridir. miRNA'lar hedef mRNA'lara bağlanıp onları baskılayarak ve/veya degrade ederek gen ekspresyonunu düzenler. miRNA'lar sıklıkla hastalığa özgün patern gösterirler. AH patolojisini incelediğimizde A β akümülyasyonunun klinik semptomların başlamasından 10 ile 20 yıl öncesinden oluşmaya başladığına dair hipotezler mevcuttur. Dolayısıyla A β 'ya özgü belirteçlerin çalışılması hastalığın erken tanısında yararlı olacaktır (Kim ve diğ., 2016).



2. AMAÇ

Alzheimer en sık rastlanan demans tipi olmakla birlikte, artan prevalans göstermektedir. Henüz sadece semptomatik tedavisi gerçekleştirilebilmektedir. Erken tanıyı mümkün kılan testlerin sayısı ya yetersiz ya da testlerin kesinlik durumu şüphelidir.

miRNA'ların, Alzheimer hastalığını etkileyen genler üzerinde etkili bir rol oynadığı bilinmektedir. Ayrıca, potansiyel olarak biyolojik belirteç ilan edilmeleri nedeniyle hastalık mekanizmasındaki işleyişlerinin ayrıntılı olarak anlaşılması önemlidir. Alzheimer hastalığı üzerinde etkili olan genlerle ilişkilendirilmiş miRNA'ların seviyelerini karşılaştırmalı olarak inceleyerek; olası biyolojik belirteçlerin saptanması ve böylece öncelikle tanı ve sonrasında tedavi sürecine katkıda bulunulması amaçlanmıştır.

3. MATERYAL

3.1. Araştırmada Kullanılan Örnekler

Araştırmada kullanılan nöroblastoma hücre hattı olan SH-SY5Y hücreleri İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'ndan temin edilmiş olup, fibroblast hücre hattı olan dH1f hücreleri ise bölümümüz stoklarından kullanılmıştır. Deney sırasında gerçekleştirilen hücre kültürü çalışmalarının tamamında tek kullanımlık, steril malzemeler kullanılmış; işlemler laminar akışlı steril kabin içerisinde gerçekleştirilmiştir.

3.2. Kimyasallar

Araştırma sırasında kullanılan kimyasallar Tablo 3.1.'de gösterilmiştir.

Tablo 3.1. Kimyasallar

Kimyasallar	Firma	İşlem
DMEM	Thermo Fisher	Hücre kültürü
Penicilin Streptomycin	Thermo Fisher	Hücre kültürü
Fetal Bovine Serum (FBS)	Thermo Fisher	Hücre kültürü
Fosfat Tampon Salin (PBS)	GIBCO	Hücre kültürü
Tripsin	Thermo Fisher	Hücre kültürü
DMSO (Dimethyl Sulfoxide)	Sigma-Aldrich	Hücre kültürü
Aβ42 proteini	Sigma-Aldrich	Hücre kültürü

Tablo 3.1'in Devamı		
CongoRed boyama kiti	Atom Scientific	Hücre kültürü
2-Merkaptoethanol	Sigma-Aldrich	RNA izolasyonu
Hank's Buffer Solution	Thermo Fisher	RNA izolasyonu
Molecular Biology Grade Ethanol ≥99,8	Sigma-Aldrich	RNA izolasyonu
Gen primerleri	Sigma-Aldrich	Gerçek-Zamanlı PZR
miRNA	Sigma-Aldrich	Gerçek-Zamanlı PZR
MTT	BIOMATİK	Canlılık Testi
Absolute Ethanol	Sigma-Aldrich	Genel

3.3. Cihazlar

Araştırma sırasında kullanılan cihazlar Tablo 3.2'de gösterilmiştir.

Tablo 3.2 Cihazlar

Cihazlar	Firma	İşlem
Laminar Akış Kabini	Faster SafeFast Classic	Hücre Kültürü
Finnpipette™ F2 Variable Volume Single-Channel Pipettes	Thermo Fisher	Hücre Kültürü
S1 Pipet Filler	Thermo Fisher	Hücre Kültürü
SafeVac Vacuum Aspirator	SCIOLOGEX	Hücre Kültürü
İnkübaktör INCO2	Memmert	Hücre Kültürü
Su banyosu WNB 14	Memmert	Hücre Kültürü
AXIO invert Vert.A1 mikroskop	Zeiss	Hücre Kültürü
CK40 ışık mikroskobu	Olimpus	Hücre Kültürü
Azot Tankı	Thermo Fisher	Hücre Kültürü
-80°C Buzdolabı	Haier-Biomedikal	Genel

Tablo 3.2'nin Devamı		
Distile Su Cihazı Barnstead™ Smart2Pure™	Thermo Fisher	Genel
Universal 320 R Santrifüj Cihazı	Hettich	Genel
Mini Spin Plus Mikrosantrifüj	Eppendorf	Genel
CFX Connect™ Real-Time PCR System	BioRad	PCR reaksiyonları
Minisipin	Four E'S Scientific	RNA izolasyonu
Vorteks	Heidolph Reax top	RNA izolasyonu
MultiSkan™ GO µDrop	Thermo Fisher	RNA izolasyonu, ELISA ve MTT
AF 80 Buz Cihazı	Scotsman	RNA izolasyonu
Dik Tip Otoklav	BES	Sterilizasyon

3.4. Sarf Malzemeler

Araştırma sırasında kullanılan sarf malzemeler Tablo 3.3'te gösterilmiştir.

Tablo 3.3. Sarf Malzemeler

Sarf Malzemeler	Firma	Kullanım Alanı
Kültür kabı (25cm²,75cm²)	Sigma-Aldrich	Hücre Kültürü
Corning Dish (150cm²)	Sigma-Aldrich	Hücre Kültürü
6 kuyucuklu hücre kültür plakaları	Sigma-Aldrich	Hücre Kültürü
96 kuyucuklu hücre kültür plakaları	Sigma-Aldrich	Hücre Kültürü
Kriyotüp (2ml)	Greiner Bio-one	Hücre Kültürü
Cam pastör pipet	Marienfeld	Hücre Kültürü
Sereljik pipet(5ml-10ml-25ml-50ml)	Sigma-Aldrich	Hücre Kültürü
Corning® 150ml Vakum Filtre	Sigma-Aldrich	Hücre Kültürü
Thoma lamı	Marienfeld	Hücre Kültürü
Platemax® UltraClear Sealing Film	Axygen	PZR Reaksiyonları
PCR ® Microplate	Axygen	PZR Reaksiyonları

Tablo 3.3'ün Devamı		
PCR ® Stripe Tubes	Axygen	PZR Reaksiyonları
Filtreli uç (10µl, 20µl, 200µl, 1000µl)	İsolab	Hücre Kültürü
Pipet ucu (10µl, 200µl, 1000µl)	İsolab	Hücre Kültürü
Eppendorf (1,0ml, 1,5ml, 2,0ml)	Axygen	Hücre Kültürü
Filtre (0,20 µm, 0,45µm)	Sigma-Aldrich	Genel
PCR tüpü (0.2ml)	Axygen	Genel
Falcon (15ml, 50ml)	İsolab	Genel
Beher	Isolab	Genel
Mezür (50ml, 500ml, 1000ml)	Isolab	Genel
Rack	İsolab	Genel
Parafilm	BEMIS	Genel
Eldiven	Beybi	Genel

3.5. Kitler

Araştırma sırasında kullanılan kitler Tablo 3.4.'te gösterilmiştir.

Tablo 3.4. Kullanılan Kitler

Kitler	Firma	İşlem
NucleoSpin® RNA	Machery-Nagel	Total RNA izolasyonu
mirPremier® micro RNA Isolation Kit	Sigma-Aldrich	miRNA izolasyonu
cDNA Synthesis Mix		cDNA sentezi
MystiCq™ microRNA cDNA Synthesis Mix	Sigma-Aldrich	cDNA sentezi
SensiFAST SYBR® No-ROX Kit	Bioline	Gerçek-Zamanlı PZR
MystiCq™ microRNA SYBR® Green qPCR ReadyMix™	Sigma-Aldrich	Gerçek-Zamanlı PZR
ELISA	Thermo Fisher	Protein ölçümü

3.6. Hücre Hatları Büyüme Ortamları

Nöroblastoma hücre hattı SH-SY5Y ve fibroblast hücre hattı dH1f hücreleri %10 FBS, %1 penisilin-streptomisin ve %1 NEAA içeren besiyerinde(DMEM) gerçekleştirildi.

3.7. Primerler

Gerçek-Zamanlı PZR ile ekspresyon seviyelerinin karşılaştırmalı ölçümlerini incelemek için kullanılan ilgili genlerin primer dizileri Tablo 3.5'te verilmiştir.

Tablo 3.5. Gerçek-Zamanlı PZR'da kullanılan genlerin sembolleri ve baz dizileri

Genin Sembolü	BazDizisi (5' -3')
APP	İleri Primer: GGC CCT GGA GAA CTA CAT CA Geri Primer: AAT CAC ACG GAG GTG TGT CA
BACE1	İleri Primer: TTG TCA CCT TGG ACA TGG AA Geri Primer: CAG GGA GAT GTC ATC AGC AA
PSEN1	İleri Primer: GGT AAA GCC TCA GCA ACA GC Geri Primer: GAA AAC AAG CCC AAA GGT GA
GSAP	İleri Primer: ACC TCT GCC TCC TGG TTT TC Geri Primer: GGA AGC CGC ACA ATG ATA CT
BDNF	İleri Primer: GAC GGT CAC AGT CCT TGA A Geri Primer: GCC AGC CAA TTC TCT TTT TG
B-Actin (Referans gen)	İleri Primer:TGAAGTGTGACGTGGACATC Geri Primer:GGAGGAGCAATGATCTTGAT

3.8. miRNA'lar

Gerçek-Zamanlı PZR ile ifade seviyelerini belirlediğimiz genleri ile ilişkilendirilmiş miRNA'lar ve primer dizileri Tablo 3.6'da verilmiştir.

Tablo 3.6. Gerçek-Zamanlı PZR'da kullanılan miRNA'lar ve primer dizileri

miRNA Primerleri	Primer Dizileri (5'-3')
miR 9-3p	AUAAAGCUAGAUAACCGAAAGU
miR 9-5p	UCUUUGGUUAUCUAGCUGUAUGA
miR 98	UGAGGUAGUAAGUUGUAUUGUU
miR 223-5p	CGUGUAUUUGACAAGCUGAGUU
miR 29a-3p	UAGCACCAUCUGAAAUCGGUUA
miR 200a-3p	UAACACUGUCUGGUAACGAUGU
miR 16-5p	UAGCAGCACGUAAAUAUUGGCG
miR RNU6-1	GUGCUCGCUUCGGCAGCACAUUACUAAAAUUGGAA CGAUACAGAGAAGAUUAGCAUGGCCCCUGCGCAAGG AUGACACGCA AAUUCGUGAAGCGUUC CAUAUUUU

4. YÖNTEM

4.1. Hücre Hatlarının Kültürü

SH-SY5Y insan nöroblastoma hücre hattı ve H1 insan embriyonik kök hücrelerinden farklılaştırılmış fibroblast (dH1f) hücre hattı hücreleri daha önceden belirlenmiş olan hücrelerin iyi çoğalm gösterdiği, tamamlanmış besiyeri (DMEM) içerisinde; 37°C'de, %5 CO₂'li ve nemli ortamda kültüre edildi. Hücre çözme, dondurma ve pasajlama gibi işlemlerin hepsi laminar akış kabini içinde, steril bir şekilde gerçekleştirildi.

Hücrelerin büyümeleri için gerekli bileşenleri barındıran ve Tablo 4.1.'de belirtilen oranlarda hazırlanan tamamlanmış besiyeri 0,22µm'lik filtreden geçirildikten sonra hücrelerin kültüre edilmesinde kullanıldı.

Tablo 4.1. Besiyeri hazırlanırken DMEM üzerine eklenen tamamlayıcı bileşenler

FBS	%10
Pen-Strp	%1
NEAA	%1

-196°C' sıvı azot içerisinde SH-SY5Y hücreleri tanktan çıkarılarak 37°C'deki su banyosunda 1-2 dakikalık dairesel hareketlerle çözüldü. Çözünen hücreler hızlı bir şekilde önceden hazırlanmış, 37°C'ye ısıtılmış tamamlanmış besiyeri içerisine aktarıldı. 1500rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Pelete zarar vermeden süpernatant atıldı ve pelet üzerine bir miktar taze tamamlanmış besiyeri konuldu. Thoma Lamı yardımıyla sayılan hücrelerin kültür kaplarının yüzey alanlarına uygun miktarda ekimi gerçekleştirildi.

Hücre sayımı Thoma Lamı ve tripan mavisi yardımıyla gerçekleştirildi. Santrifüj işlemiyle çöktürülen hücreler taze hazırlanmış besiyerinde çözüldükten sonra, hücre süspansiyonu ve tripan mavisinden 1:1 oranında karıştırılarak 10µl'si

Thoma Lamı üzerine konularak ışık mikroskopunda sayım yapıldı. Sayım sırasında çeper yapısı bozulan, ölmüş hücreler içlerine tripan mavisini aldıkları için sayıma dahil edilmedi. Gerekli formül uygulanarak ml'deki hücre sayısı bulunmuş oldu.

$$\frac{(\text{Hücre sayısı})}{ml} \cong (\text{Sayılan canlı hücre}) \times (\text{Dilüsyon faktörü}) \times 10^4 \times 2$$

Hücrelerin en fazla 3 günde 1 besiyerleri tazelandı. Kültür kabının tabanı hücreler tarafından yaklaşık %70-80 doluluk oranına ulaştığında pasaj işlemi gerçekleştirildi. Bunun için önce PBS ile yıkanan hücrelerden besiyeri uzaklaştırıldı. Kültür kabı boyutuna göre yeterli tripsin eklenip yaklaşık 3 dakika inkübatörde bekletilerek hücrelerin kalkması sağlandı. İçerisinde bulunan FBS, tripsin aktivitesini inhibe ettiğinden dolayı kalkan hücrelerin üzerine tamamlanmış besiyeri eklendi. Kültür kabı yıkanmasıyla toplanan hücreler 1500rpm'de 5 dakika santrifüj ettirilerek çökmeleri sağlandı. Pelete zarar vermeden süpernatant atıldı ve pelet bir miktar tamamlanmış besiyeri içerisinde çözülerek Thoma Lamında sayıldı. Hücreler kullanılan kültür kaplarının yüzey alanlarına uygun miktarlarda ekilerek yüzeye yayılmaları sağlandı. Böylelikle pasaj işlemi tamamlanmış olan hücreler 37°C %5 CO₂'li ortam sağlayan inkübatöre kaldırıldı.

Pasajlama işlemi ile hücrelerin bir kısmının kültürü devam ettirilirken bir kısmının kültürü devam ettirilirken bir kısmı da sonraki çalışmalarda kullanılmak üzere donduruldu. Bu işlem için tamamlanmış besiyeri uzaklaştırılan hücrelerin üzerine daha önceden Tablo 4.2'de gösterildiği şekilde hazırlanan dondurma besiyeri eklenerek kriyo tüpe alındılar. Hücreler öncelikle -80°C'de 1 gece bekletildikten sonra -196°C'deki sıvı azot tankına uzun süreli bekleme için kaldırıldılar.

Tablo 4.2. Dondurma için hazırlanan besiyeri bileşenleri

FBS	%40
DMEM	%50
DMSO	%10

4.2. Kongo Kırmızısı ile Boyama

Kongo kırmızısı organik bir sodyum tuzudur ve A β 42 proteinin tespiti için kullanılır. A β 42 proteini uygulanarak üç pasaj ilerletilen ve protein uygulaması

yapılan P0 (A β 42 proteini uygulandığı k \ddot{u} lt \ddot{u} r P0 olarak adlandırıldı)'daki uygulama ve kontrol h \ddot{u} creleri, karşılaştırmalı incelenmek amacıyla kit protokol \ddot{u} ne uygun bir Şekilde Kongo kırmızısı ile boyandı.

6 ve 12 kuyucuklu h \ddot{u} cre plakalarındaki SH-SY5Y ve dH1f h \ddot{u} creleri absol \ddot{u} t etanol ile plakalara sabitlendi. Sabitlenen h \ddot{u} creler \ddot{u} zerine Kongo kırmızı boya sol \ddot{u} syonu eklenerek 5-6 dakika beklendi. Daha sonra \ddot{u} zerine potasyum hidrosit eklenerek 15-20 saniye beklendi. Kuyucuklar yıkandı ve \ddot{u} zerlerine Haemalum Mayer sol \ddot{u} syonu eklenip 5-6 dakika beklendi. Kuyucuklar yıkandı, absol \ddot{u} t alkol ile su uzaklaştırdıktan sonra kurumaya bırakıldı ve sonrasında mikroskopta incelendi.

4.3. MTT Analizi

K \ddot{u} lt \ddot{u} r \mathcal{C} alışması sırasında SH-SY5Y ve dH1f h \ddot{u} crelerin kendilerini iki katına \mathcal{C} ıkarma zamanlarının (doubling time) \ddot{u} l \ddot{u} lmesi adına MTT analizi ger \mathcal{C} ekleştirildi. Analiz canlı h \ddot{u} crelerin MTT (3-(4,5-dimetiltiyazol2-yl-2,5-difenil tetrazolyum brom \ddot{u} r) ile reaksiyon vererek mavi formazan kristallerine d \ddot{u} n \ddot{u} ř \ddot{u} m \ddot{u} sağlayan mitokondriyel aktivitenin \ddot{u} l \ddot{u} lmesi temeline dayanmaktadır.

Pasaj sırasında uygun miktarda h \ddot{u} crenin 96 kuyucuklu h \ddot{u} cre k \ddot{u} lt \ddot{u} r plakalarına ekimi ger \mathcal{C} ekleştirildi ve 1 g \ddot{u} n h \ddot{u} crelerin oturması beklendi. Ekim ger \mathcal{C} ekleştirilen kuyuların \ddot{u} zerine hacmin %10'u oranında MTT konuldu. 3-3,5 saat mavi formazan kristallerinin oluşumu g \ddot{u} zlenene kadar ink \ddot{u} be edildi. Kristallerin g \ddot{u} zlenmesinin ardından kuyular PBS ile yıkandı ve \ddot{u} zerlerine 100 μ l DMSO eklendi. DMSO'nun eklenmesiyle kuyularda mor renk g \ddot{u} zlemlendi. Dairesel hareketlerle karışması sağlandıktan sonra MultiSkanTM GO μ Drop cihazında; 490nm, 570nm ve 595nm'de \ddot{u} l \ddot{u} mleri ger \mathcal{C} ekleştirildi. \ddot{u} l \ddot{u} mler 24 ve 72 saatlik periyotlarda ger \mathcal{C} ekleştirildi.

Uygulanan proteinin h \ddot{u} crelerin yaşabilirliğine olan etkisini \ddot{u} l \ddot{u} mek adına MTT analizi yapıldı. Bunun i \mathcal{C} in SH-SY5Y ve dH1f h \ddot{u} creleri 2 adet 96 kuyucuklu h \ddot{u} cre plakalarına 3 tekrarlı olacak Şekilde ekildi. H \ddot{u} crelerin oturması sağlandıktan sonra A β 42 proteini uygulandı. İlk \ddot{u} l \ddot{u} m prosed \ddot{u} re uygun olacak Şekilde, uygulama yapılan ve kontrol olarak bırakılan h \ddot{u} crelerden, 48 saat sonra alındı. İkinci 96 kuyucuklu h \ddot{u} cre plağının ise besiyeri tazelendi; \ddot{u} l \ddot{u} m yine prosed \ddot{u} re uygun olacak

şekilde, uygulama yapılan ve kontrol olarak bırakılan hücrelerden, toplamda 96 (48+48) saat sonra alındı.

4.4. A β 42 Proteinin Hazırlanması

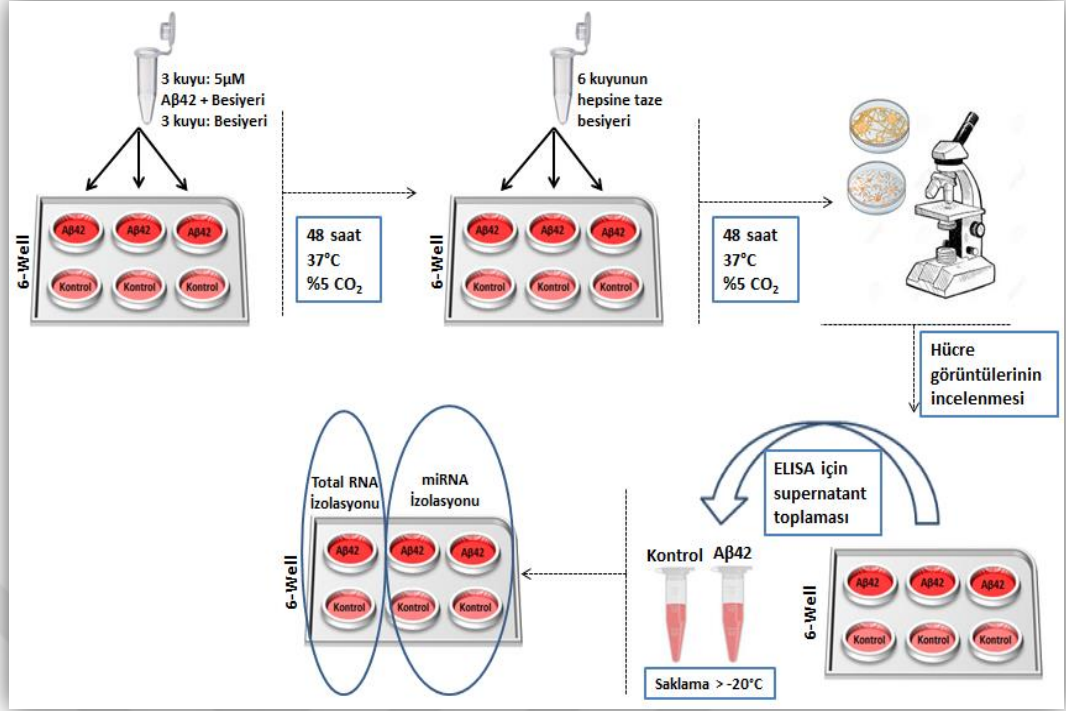
Stok 1mg olarak gelen A β (1-42) Protein Fragmenti (Sigma-Aldrich) son konsantrasyonu 2,5mM olacak şekilde ayarlandı. Bunun için amino asit sekansı Tablo 4.3.'da gösterilen ve moleküler ağırlığı 4514,04gr/mol olan ürünün firma tarafından sağlanan ürün, bilgi kağıdında belirtildiği üzere DMSO içerisinde çözüldü. Hazırlanan A β 42 protein solüsyonu tüplerde 10 μ l olacak şekilde alikuotlandı.

Tablo 4.3. A β 42 proteinin amino asit sekansı

Aβ42 amino asit sekansı	NH₂-Asp-Ala-Glu-Phe-Arg-His-Asp-Ser-Gly-Tyr- Glu-Val-His-His-Gln-Lys-Leu-Val-Phe-Phe-Ala- Glu-Asp-Val-Gly-Ser-Asn-Lys-Gly-Ala-Ile-Ile-Gly- Leu-Met-Val-Gly-Gly-Val-Val-Ile-Ala-COOH
---	---

4.5. A β 42 Proteinin Uygulanması

6 kuyucuklu hücre kültür plakalarına pasajlanan SH-SY5Y ve dH1f hücrelerini oturmaları sağlandıktan 2 gün sonra Şekil 4.1'de gösterildiği düzende A β 42 proteini uygulandı. Öncelikle hücrelerin besiyerleri değiştirildi; A β 42 uygulanacak 3'er kuyuya, daha önceden konsantrasyonu 5 μ M'a ayarlanarak hazırlanmış ve içerisinde A β 42 proteini bulunan tamamlanmış besiyeri; kontrol olarak ayarlanan 3'er kuyuya da içerisinde A β 42 proteini bulunmayan tamamlanmış besiyeri konuldu. Hücreler 48 saat inkübasyona bırakıldı. 48 saat sonunda besiyeri içerisinde A β 42 bulunan uygulama grubunun ve besiyeri içerisinde A β 42 bulunmayan kontrol grubunun besiyerleri çekilerek taze tamamlanmış besiyeri konuldu. Taze besiyerinde 2 gün daha bekletilen hücrelerin besiyerleri daha sonra ELISA testi yapmak üzere toplanırken hücreler de RNA izolasyonu yapılmak üzere toplandı.



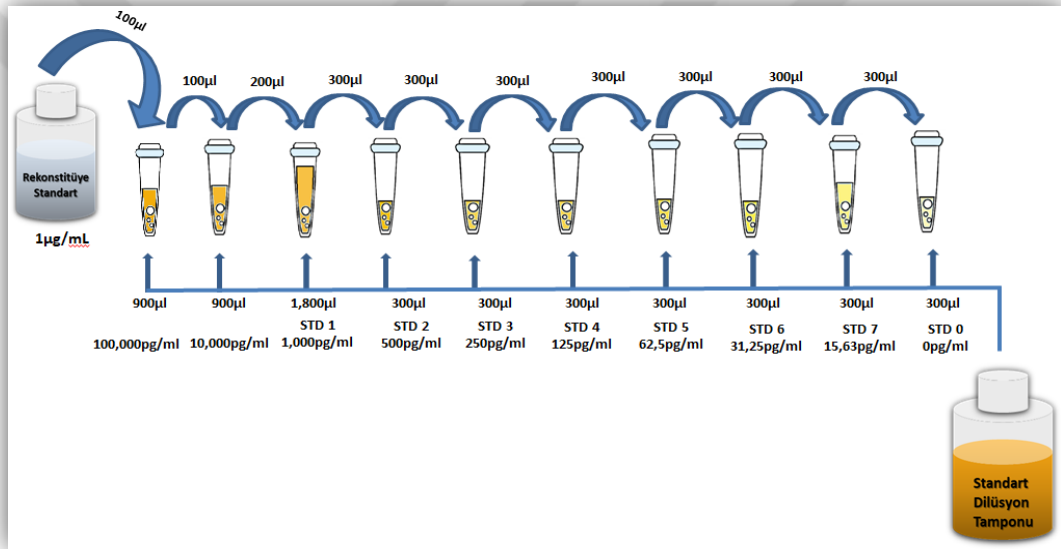
Şekil 4.1. Aβ42 proteininin SH-SY5Y ve dH1f hücrelerine uygulanması

4.6. ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay)

Kültür sonrası ortama (süpernatanta) salınan Aβ42 proteinin seviyesi, Invitrogen™ tarafından sağlanan Human Aβ42 ELISA Kit içerisindeki ürün bilgi kağıdında bulunan prosedür takip edilerek, MultiSkan™ GO μDrop cihazı ile ölçüldü.

Aβ42 uygulaması sonrasında; Aβ42 proteini uygulanan ve uygulanmayan SH-SY5Y ve dH1f hücrelerinden toplanarak -20°C’de saklanan süpernatantlar ve kit içerisinde kullanılması gereken kimyasallar oda sıcaklığına getirildi. Öncelikle Şekil 4.2.’de gösterildiği gibi seyreltme standartları hazırlandı. Hazırlanan standartlar, blank dahil olmak üzere, ve örnekler 50’şer μl kuyulara yüklendi. Bu sırada tek kuyu kromojen blank için boş bırakıldı. Kromojen blank için ayrılan kuyu dışındaki kuyuların hepsine 50μl Human Aβ42 Detection Antibody solüsyonu eklendi. ELISA plağının kenarına hafifçe vurularak karıştırıldı ve oda sıcaklığında tezgah üstü orbital çalkalayıcı cihazında 3 saat inkübasyona bırakıldı. 3 saatin sonunda ELISA plağı hızlı bir şekilde ters çevrilmek suretiyle lavaboya dökülerek Wash Buffer ile 4 kere

yıkandı. Daha önceden prosedür kağıdında belirtildiği şekilde hazırlanan Anti-Rabbit IgG HRP solüsyonu, kromojen blank hariç tüm kuyucuklara 100'er µl eklendi ve 30dk oda sıcaklığında beklemeye bırakıldı. Yarım saatin sonunda ELISA plağı tekrar hızlı bir şekilde ters çevrilmek suretiyle lavaboya dökülerek Wash Buffer ile 4 kere yıkandı. Yıkama işleminin ardından karanlık ortam sağlanarak, kromojen blank kuyusu dahil, bütün kuyulara 100µl Stabilized Chromogen eklenerek (substrat solüsyonun maviye dönmesi beklendi) 30 dakika oda sıcaklığında ve karanlıkta inkübasyona bırakıldı. 30 dakikanın sonunda yine her kuyuya 100µl Stop Solution eklendi (solüsyonun maviden sarıya dönmesi beklendi) ve ELISA plağı kenarlarına hafifçe vurularak karıştırıldı.



Şekil 4.2. Referans almak amacıyla seyreltme standartlarının hazırlanması

Durdurma solüsyonu eklendikten en fazla 30 dk içerisinde kittede belirtildiği üzere 450nm'de absorpsiyon değerleri MultiSkan™ GO µDrop cihazında okutuldu.

4.7. Total RNA İzolasyonu ve cDNA Sentezi

Hücrelerden Total RNA izolasyonu Machery-Nagel NucleoSpin® RNA kiti ile üretici firmanın protokolüne uygun olarak gerçekleştirildi.

Hücreler tripsinizasyon işlemi ile kaldırıldı ve toplanan hücreler santrifüj yardımıyla çöktürüldü. Süpernatant, pelete zarar vermeden atıldı. Hücrelerin üzerine 350µl RA1 (lisis tamponu) ve 3,5µl β-ME eklenerek vortekslendi ve karıştırıldı.

Karışım kitin içerisinde bulunan özel filtreli toplama tüpüne alınarak 1 dakika 11000g'de santrifüj edildi. Filtre atılarak süpernatant içerisine 350µl %70 EtOH eklenip pipet yardımıyla karıştırıldı. Karışım yeni bir filtreye geçirilerek 30 saniye 11000g'de santrifüj edildi. Süpernatant atıldı ve yeni bir toplama tüpüne aktarılan filtre üzerine 350µl MDB (membran tuzdan arındırma tamponu) solüsyonu eklenip 1 dakika 11000g'de santrifüj edildi. Daha sonra filtre üzerine önceden hazırlanmış rDNase reaksiyon karışımından 95µl eklenerek 15 dakika oda ısısında bekletildi. Bekleme sonunda filtre üzerine 200µl RAW2 (yıkama tamponu) eklendi ve 30 saniye 11000g'de santrifüj edildi. Yeni bir tüpe geçirilen filtre üzerine 600µl RA3 (yıkama tamponu) eklendi ve 30 saniye 11000g'de santrifüj edildi. Süpernatant atıldı ve son yıkama işlemi için filtre üzerine 250µl RA3 eklenerek 2 dakika 11000g'de santrifüj edildi. Filtre kuruluşundan emin olunduktan sonra yeni bir tüpe geçirildi. Üzerine uygun görülen miktarda RNase-free H₂O eklendi ve 30 saniye 11000g'de santrifüj edildi. Filtre atıldı ve süpernatant içerisinde mevcut total RNA'nın konsantrasyonu ölçülmek üzere MultiSkan™ GO µDrop cihazı kullanıldı.

İzole edilen RNA'nın saflığı ve konsantrasyonu MultiSkan™ GO µDrop cihazında ölçüldü. RNA konsantrasyonu $A_{260} \times 40 \times \frac{10}{0,52}$ formülü ile; RNA'nın saflığı ise A_{260}/A_{280} oranı ile hesaplanmaktadır. RNA'nın saf kabul edilebilmesi için bu oranın 1,8-2,1 arasında olması en ideal durumdur.

Total RNA'dan cDNA sentezi ProtoScript® First Strand cDNA Synthesis Kit kullanılarak gerçekleştirildi. Çıkan konsantrasyon değerlerine göre örnekler 1000ng veya 300ng'a sabitlendi. RNA'yı içeren karışım RNase-free tüp içerisinde Tablo 4.4'te belirtilen oranlar dahilinde hazırlandı.

Tablo 4.4. İzolasyondan elde edilen Total RNA'nın cDNA çevriminde kullanılan bileşenler ve miktarları

Bileşenler	Hacim
Total RNA	1-6µl (10pg-1µg)
d(T) ₂₃ VN (50µM)	2µl
Nuclease-free H ₂ O	Değişken
Toplam Hacim	8µl

İkinci Kısım Komponentler

M-MuLV Reaction Mix	10µl
M-MuLV Enzyme Mix	2µl
Toplam Hacim	20µl

Karışım hazırlandıktan sonra RNA denatüre edilmek üzere 70°C’de 5 dakika inkübe edildi. İnkübasyon sonunda Tablo 4.4’te gösterilen ikinci kısım komponentler eklendi ve toplam 20µl cDNA sentez reaksiyonu 42°C’de 1 saat inkübe edildi. 80°C’de 5 dakika bekletilerek enzim inaktive edildi. Sentezlenen cDNA daha sonra kullanılmak üzere -20°C’de saklandı.

4.8. miRNA İzolasyonu ve cDNA Sentezi

Hücrelerden miRNA izolasyonu Sigma-Aldrich mirPremier® microRNA Isolation Kit protokolüne uygun olarak gerçekleştirildi.

Kitte bulunan komponentlere ek olarak β-ME ile birlikte Tablo 4.5.’te görüldüğü oranlarda lizis karışımı hazırlandı. İzolasyon yapılacak kültür kapları Hank’s Balanced Salt Solution ile yıkandı. Lizis karışımından kitte belirtilen ve Tablo 4.5.’te gösterilen miktarda kültür kabına konuldu ve enzime mekanik destek sağlamak amacıyla kabın kenarlarına vurularak yaklaşık 5 dakika beklendi. Oluşan lizat, içinde filtre bulunan 2 ml’lik bir tüpte toplanarak 15000g’de 5 dakika santrifüj edildi. Filtre atıldı. Elde kalan süpernatant üzerine 1:1,1 oranında %100 EtOH eklendi, karıştırılıp vortekslendi. İçinde filtre bulunan bir toplama tüpüne aktarılarak 30 saniye 15000g’de santrifüj edildi. Süpernatant atıldı; filtre üzerine 700µl %100EtOH eklenerek 30 saniye 15000g’de santrifüj edildi. Süpernatant atıldı; filtre üzerine 500µl Ethanol-Diluted Solution 2 eklendi ve 30 saniye 15000g’de santrifüj edildi. Süpernatant atılarak kuruması için filtre bir kere de bir şey eklenmeden santrifüj edildi. Daha sonra filtre üzerine uygun miktarda Elution Solution eklendi 1 dakika oda sıcaklığında beklendikten sonra 1 dakika 15000g’de santrifüj edildi. Bu işlem 1 kere daha tekrarlandı. Filtre atıldı ve elde edilen miRNA’nın konsantrasyonu ölçülmek üzere MultiSkan™ GO µDrop cihazı kullanıldı.

Tablo 4.5. miRNA izolasyonunda kullanılan lizis karışımının içeriği

Lizis Karışımı	
microRNA Lysis Buffer	700µl
Binding Solition	300µl
B-ME	10µl

miRNA'dan cDNA sentezi Sigma-Aldrich, MtstiCq™ microRNA cDNA Synthesis Mix Kit kullanılarak gerçekleştirildi. Çıkan konsantrasyon değerlerine göre örnekler yaklaşık 100ng, 80ng veya 30ng'a sabitlendi. RNA'yı içeren karışım 0,2ml'lik RNase-free tüp içerisinde Tablo 4.6'da belirtilen oranlar dahilinde hazırlandı. Karışım hafifçe vortekslendi. Daha sonra 37°C'de 1 saat ve 70°C'de 5 dakika inkübe edildi.

Tablo 4.6. İzolasyondan elde edilen küçük RNA'nın cDNA çevriminde kullanılan reaktifler ve miktarları

Reaktif	Hacim
Poly(A) Tailing Buffer (5X)	2µl
RNA	En fazla 7µl
Nuclease-free H ₂ O	Değişken
Poly(A) Polymerase	1µl
Toplam Hacim	10µl
İkinci Kısım Komponentler	
Poy(A) Tailing Reaction	Hazırlanan 10µl'lik karışım
MtstiCq™ microRNA cDNA reaction mix	9µl
ReadyScript Reverse Transcriptase	1µl
Toplam Hacim	20µl

Elimizdeki kuyruk reaksiyonu (10µl) üzerine Tablo 4.6'da ikinci kısımda belirtilen komponentler eklenerek toplam hacim 20µl'ye tamamlandıktan sonra 42°C'de 20 dakika ve 85°C'de 5 dakika inkübe edildi. Sentezlenen cDNA daha sonra kullanılmak üzere -20°C'de saklandı.

4.9. Gerçek-Zamanlı PZR ile Gen Ekspresyon Seviyelerinin Belirlenmesi

Alzheimer'ın hücrelerde modellenmesinin gösterilmesi amacıyla, özellikle A β 42'nin prokürsörü olmasından dolayı seçilen APP dahil olmak üzere hastalıkla ilişkilendirilen diğer bazı genlerin A β 42 uygulaması sonrası kontrol grubuyla ekspresyon seviyelerinin kıyaslanması amacıyla Gerçek-Zamanlı PZR uygulandı.

Gerçek-Zamanlı PZR reaksiyonları SensiFAST™ SYBR® No-ROX Kit protokolüne uygun gerçekleştirildi. Gerçek-Zamanlı PZR eşit miktarda cDNA kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Hedef genlerin ifade seviyeleri, referans gen ile karşılaştırmalı olarak belirlenmiştir. Primerler üretici firmanın önerdiği şekilde önceden standardize edilmiştir. Hedef genler ve referans gen primerler reaksiyon karışımı olarak, Tablo 4.7.'de gösterildiği şekilde 96 kuyucuklu PZR reaksiyon plakalarına aktarıldı. Gerçek-Zamanlı PZR koşulları Tablo 4.8.'de gösterildiği şekilde uygulanarak kantitatif sonuçlar alındı.

Tablo 4.7. Gen ekspresyon seviyesinin belirlenmesi için yapılan Gerçek-Zamanlı PZR için kullanılan reaktifler

Reaktif	Hacim	Son konsantrasyon
2X SensiFast™ SYBR® No-ROX Mix	10 μ l	1X
10 μ M İleri Primer	0,8 μ l	400nM
10 μ M Geri Primer	0,8 μ l	400nM
ÖRNEK	En fazla 8,4 μ l	
H ₂ O	Gereken miktarda	
Son Hacim	20 μ l	

Tablo 4.8. Gen ekspresyon seviyesinin belirlenmesi için uygulanan Gerçek-Zamanlı PZR koşulları

Döngü	Sıcaklık	Süre	Not
1	95°C	2 dakika	Polimeraz aktivasyonu
40	95°C	5 saniye	Denatürasyon
	60°C	10 saniye	Bağlanma
	72°C	20 saniye	Uzama
Melt Temperature			

4.10. Gerçek-Zamanlı PZR ile miRNA Ekspresyon Seviyelerinin Belirlenmesi

miRNA'lerden sentezlenen cDNA'ların eşit miktarlarda kullanılmasıyla, Aβ42 uygulaması sonrası kontrol grubuyla ekspresyon seviyelerinin kıyaslanması amacıyla, hastalıkla ilgili olan genlerle ilişkilendirilmiş miRNA'ların kantitatif ölçümleri Gerçek-Zamanlı PZR ile gerçekleştirildi.

Gerçek-Zamanlı PZR sırasında kullanılan reaktifler Tablo 4.9.'da, Gerçek-Zamanlı PZR koşulları Tablo 4.10.'da gösterilmiştir.

Tablo 4.9. miRNA ekspresyon seviyesinin belirlenmesi için yapılan Gerçek-Zamanlı PZR için kullanılan reaktifler

Reaktif	Hacim	Son Konsantrasyon
MystiCq™ microRNA SYBR® Green qPCR ReadyMix™ (2X)	12,5µl	1X
MystiCq microRNA qPCR Assay Primer (10µM)	0,5µl	400nM
MystiCq Universal PCR Primer (10µM)	0,5µl	400nM
microRNA cDNA (0,1-10ng)	Gereken miktarda	
Nuclease-free H ₂ O	Gereken miktarda	
Toplam Hacim	25µl	

Tablo 4.10. miRNA ekspresyon seviyesinin belirlenmesi için uygulanan Gerçek-Zamanlı PZR koşulları

Döngü	Sıcaklık	Süre	Not
1	95°C	2 dakika	Polimeraz aktivasyonu
40	95°C	5 saniye	Denatürasyon
	63°C	15 saniye	Bağlanma
	70°C	15 saniye	Uzama
Melt Temperature			

4.11. İstatistiksel Analiz

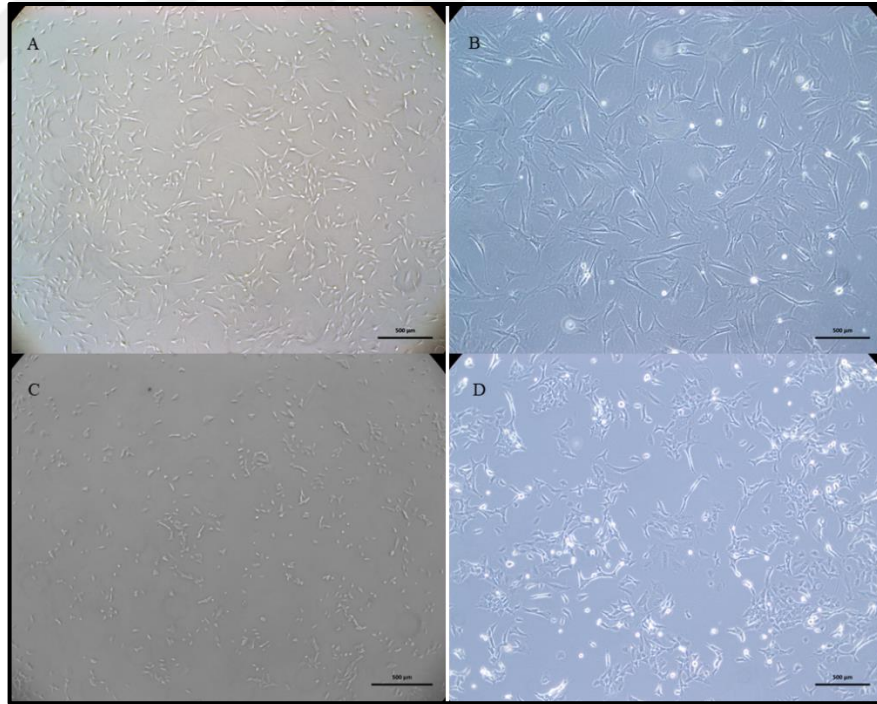
Her deney için en az 3 adet tekrar yapıldı. Çalışmaların verileri, standart sapma (\pm SD) göz önünde bulundurularak rapor edildi. Elde edilen tüm veriler ANOVA ve T Testi (iki kuyruklu, iki örnekli eşit varyans) ile değerlendirildi. Gen ve miRNA'ların ifade seviyelerini belirlemek amacıyla uygulanan Gerçek-Zamanlı PZR sonucunda elde edilen veriler BIO-RAD CFX Connect™ Real-Time PCR cihazının analiz programında değerlendirilmiş ve bu programdan elde edilen anlamlılık değerleri kullanılmıştır. Deney ve kontrol grupları arasındaki farklar için, $p < 0.05$ değeri istatistiksel anlamlılık sınırı olarak kabul edildi.



5. SONUÇLAR

5.1. SH-SY5Y ve dH1f Hücre Hatlarının Görüntüleri

Kültür kabının yüzeyine yapışabilen (adherent) hücreler olan SH-SY5Y ve dH1f hücreleri uygun şartlarda kültüre edildi ve morfolojik takipleri faz kontrast mikroskopi ile yapıldı. SH-SY5Y hücrelerinin kültür ortamında morfolojik açıdan nöronal hücre tipleriyle yüksek oranda benzerlik gösterdiği, yıldızimsı yuvarlağa yakın gibi görünen bu hücrelerin bölünmeleri sırasında kümelenme oluşturma eğiliminde oldukları gözlemlendi. dH1f hücreleri ise H1 insan embriyonik kök hücrelerinden farklılaşmış fibroblast hücreleri olup, ince ve uzun, iğ benzeri fibril yapıda oldukları görüldü (Şekil 5.1.).

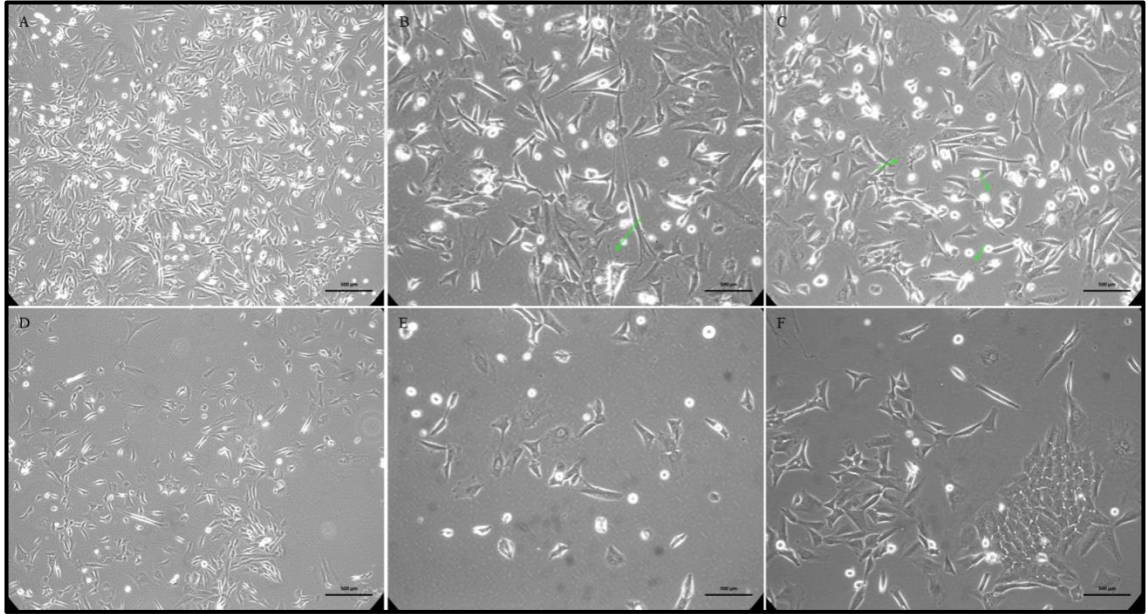


Şekil 5.1. SH-SY5Y ve dH1f hücrelerinin morfolojik görüntüleri. dH1f hücrelerinin 5X (A) ve 10X (B) görüntüsü; SH-SY5Y hücrelerinin 5X (C) ve 10X (D) görüntüsü

5.1.1. SH-SY5Y ve dH1f Hücre Hatlarının A β 42 Uygulaması Sonrası Görüntüleri

Uygun koşullarda kültüre edilen hücrelerde, A β 42 proteini uygulanmasının ardından hücrelerde bazı morfolojik değişimler gözlemlendi. A β 42 proteini uygulaması sonrasında SH-SY5Y hücrelerinin morfolojik değişimleri eş zamanlı olarak protein uygulaması yapılmamış kontrol gruplarıyla birlikte faz kontrast mikroskopta incelenmiş ve Şekil 5.2’de gösterilmiştir.

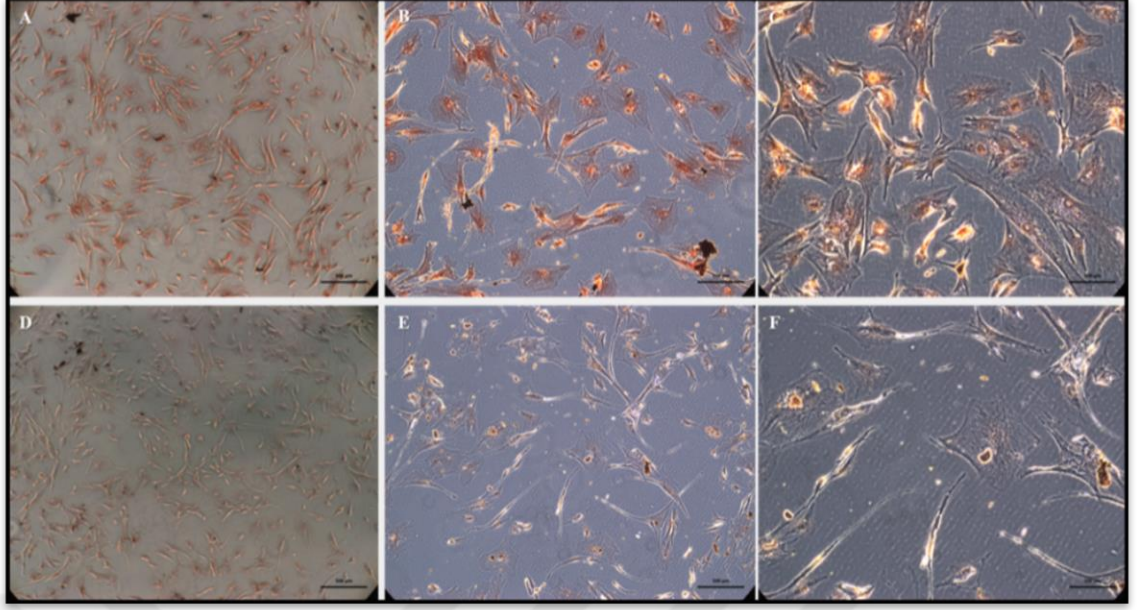
A β 42 proteini uygulanmamış hücreler, uygulanmış olanlara kıyasla daha yoğun olduğu gözlemlenmiştir. Bunun yanı sıra protein uygulanmamış hücrelerin birbirlerine uzattıkları dendrit benzeri yapıların, protein uygulamasına maruz bırakılan hücrelerden çok daha fazla ve çok daha belirgin olduğu gözlemlendi.



Şekil 5.2.A β 42 proteini uygulanmış SH-SY5Y hücrelerinin görüntüleri. (A), (B) ve (C)’de A β 42 proteini uygulanmamış; (D), (E) ve (F)’de ise A β 42 proteini uygulanmış SH-SY5Y hücreleri gösterilmiştir.

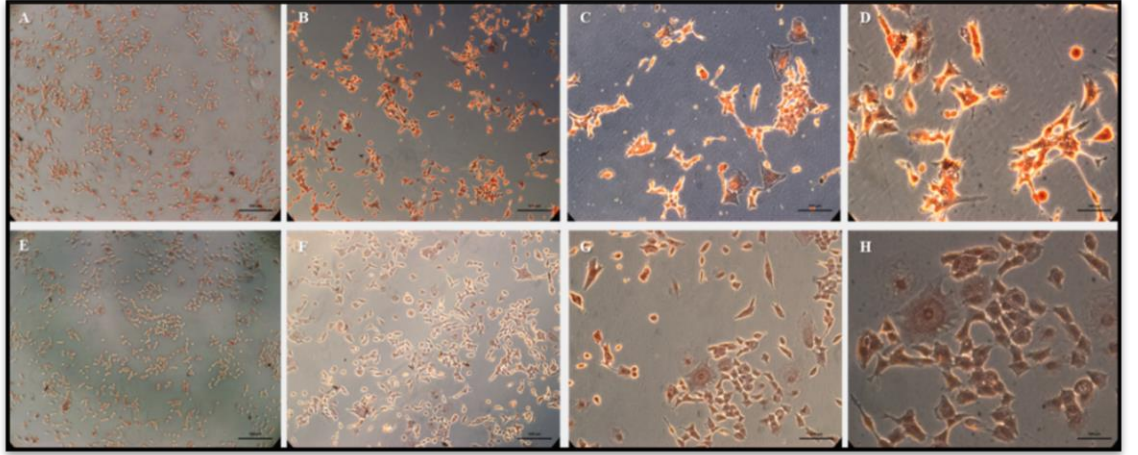
5.2. Kongo Kırmızısı ile Boyama

SH-SY5Y (Şekil 5.3.) ve dH1f (Şekil 5.4) hücrelerinde A β 42 uygulaması yapılmamış olan kontrol grubu ile karşılaştırmalı olarak A β 42 uygulaması sonrasında kongo kırmızı boyaması ile amiloid birikiminin varlığı gösterilmiştir.



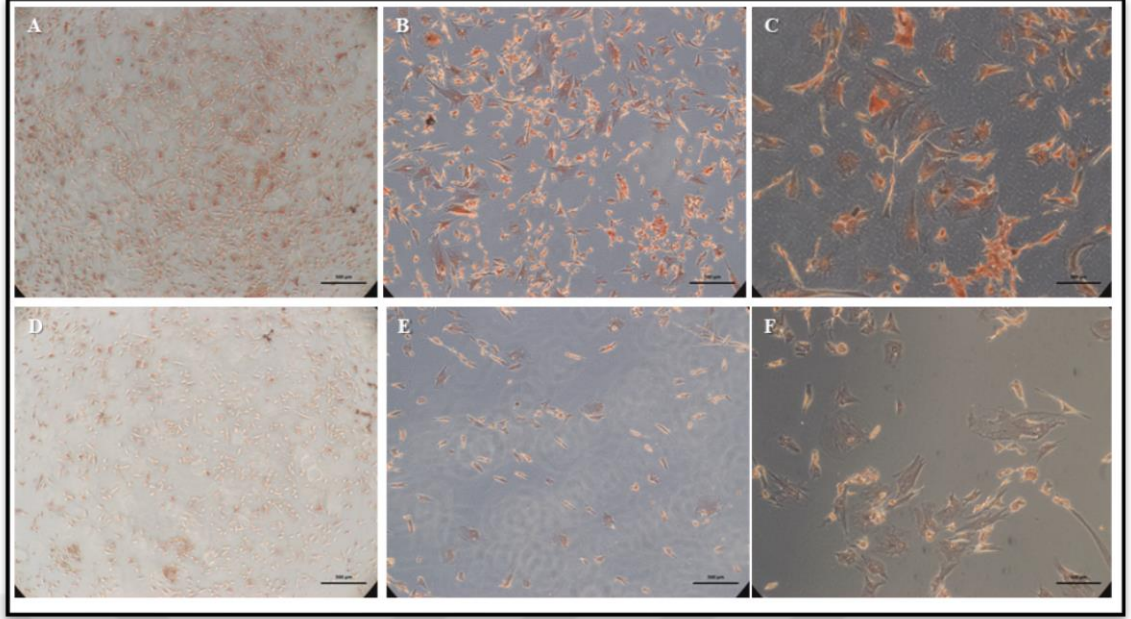
Şekil 5.3. Kongo kırmızısıyla boyanan dH1f hücrelerinin Aβ42 uygulaması sonrası görüntüleri. Aβ42 uygulanmış hücrelerin 5X (A), 10X (B) ve 20X (C) görüntüleri; Aβ42 uygulanmamış hücrelerin 5X (D), 10X (E) ve 20X (F) görüntüleri.

dH1f hücrelerinin uygulamadan hemen sonraki boyamaları incelendiğinde, Aβ42 uygulanan hücrelerin uygulanmayanlara kıyasla daha çok boyandığı; uygulama yapılmamış hücrelerin neredeyse boyanmadığı görüldü.



Şekil 5.4. Kongo kırmızısıyla boyanan SH-SY5Y hücrelerinin Aβ42 uygulaması sonrası görüntüleri. (A) Aβ42 uygulanmış hücrelerin 5X (A), 10X (B), 20X (C) ve 40X (D) görüntüleri; Aβ42 uygulanmamış kontrol hücrelerinin 5X (E), 10X (F), 20X (G) ve 40X (H) görüntüleri.

SH-SY5Y hücrelerinin uygulamadan hemen sonraki boyamaları; Aβ42 uygulanan hücrelerin uygulanmayanlara kıyasla çok yoğun bir şekilde boyandığını göstermektedir (Şekil 5.5.).



Şekil 5.5. Kongo kırmızısıyla boyanan, Aβ42 uygulaması sonrası 3 pasaj ilerletilen SH-SY5Y hücrelerinin görüntüleri. Aβ42 uygulanmış hücrelerin 5X (A), 10X (B) ve 20X (C) görüntüleri; Aβ42 uygulanmamış kontrol hücrelerinin 5X (D), 10X (E) ve 20X (F) görüntüleri.

SH-SY5Y hücrelerinin Aβ42 protein uygulaması sonrasında 3 pasaj ilerletildikten sonra kongo kırmızısı ile boyamaları sonucunda; Aβ42 uygulanan hücrelerin uygulanmayanlara kıyasla daha fazla boyandığı görüldü.

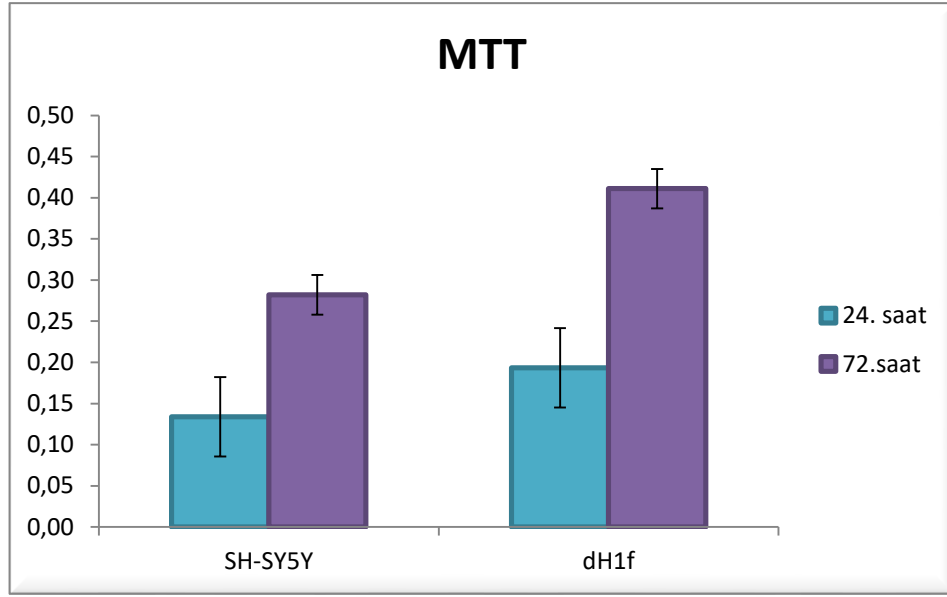
5.3. MTT Analizinin Değerlendirilmesi

SH-SY5Y ve dH1f hücrelerinin ekildikleri sayıyı 2 katına çıkarma sürelerinin (doubling time) ölçülmesi için MTT analizi gerçekleştirildi. Bu analiz sayesinde hücrelere uygulayacağımız Aβ42 proteinin uygulama süresini optimize etmemize yardımcı oldu (Şekil 5.6).

Kendini ikiye katlama zamanı

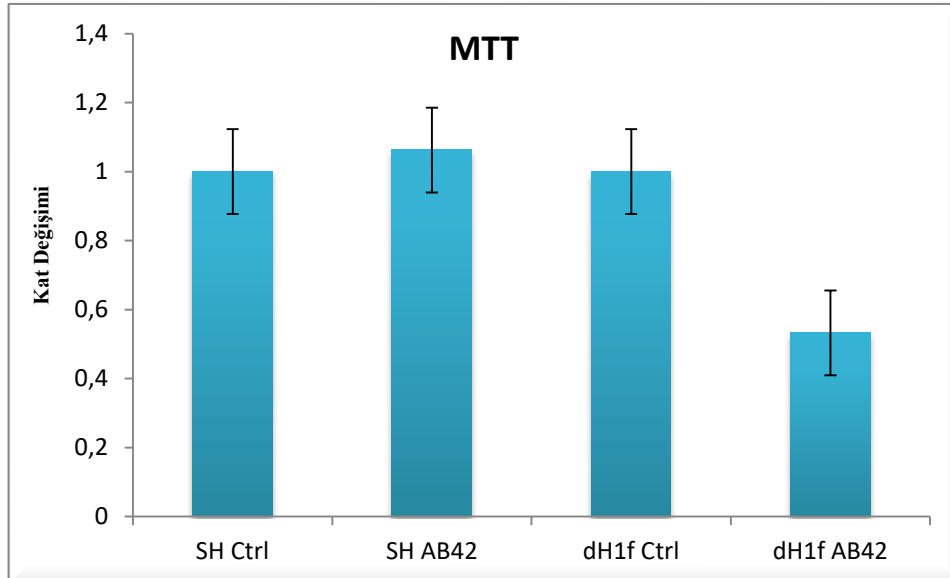
$$= \frac{\text{Devam süresi} \times \log 2}{\log(\text{Son Konsantrasyon}) - \log(\text{Başlangıç Konsantrasyonu})}$$

MTT analizi sonucu elde edilen değerler doğrultusunda formül uygulandığında yaklaşık; SH-SY5Y ve dH1f hücrelerinin 44 saatte miktarlarını ikiye katladıkları bulgusu elde edildi (Şekil 5.6.).



Şekil 5.6. MTT analizi ile SH-SY5Y ve dH1f hücrelerinin çoğalma kapasitelerinin 24. ve 72. saatlerde ölçümleri sonucu ortaya çıkan değişim oranları

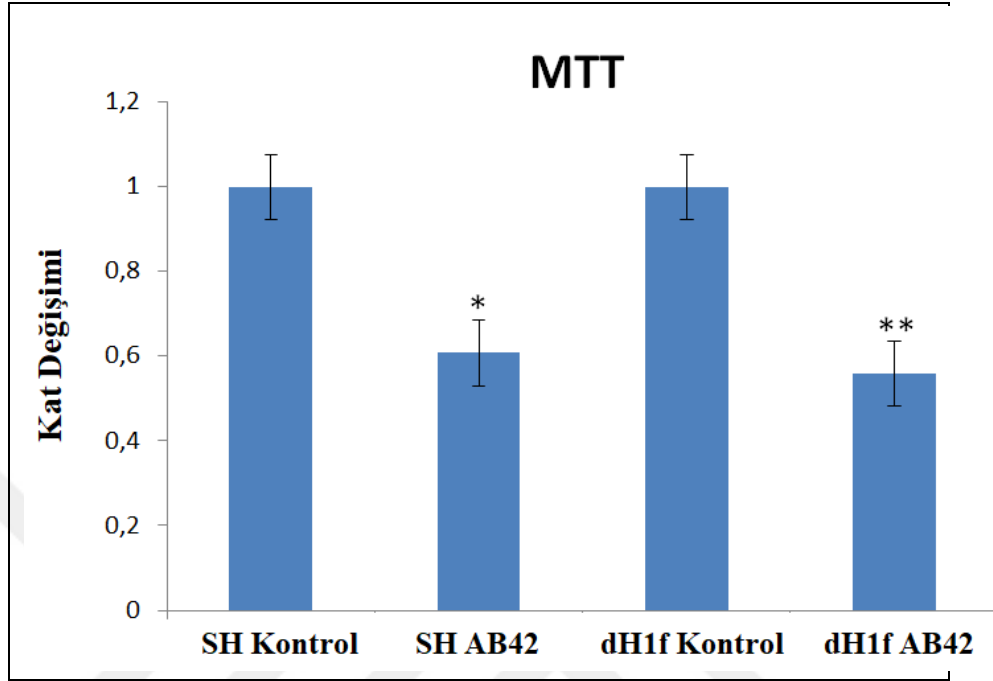
A β 42 proteini uygulaması sonrasında SH-SY5Y ve dH1f hücrelerinin, hücre canlılığını ölçmek adına MTT analizi yapıldı. Protein uygulamasından 48 saat sonra gerçekleştirilen ölçümde A β 42 uygulanmış SH-SY5Y hücrelerinin canlılığını, uygulanmayanlara oranladığımızda yaklaşık 1,06 oranında artış gözlemlenirken; dH1f hücrelerinde protein uygulaması yapılan hücreler uygulama yapılanlarla karşılaştırıldığında yaklaşık 0,5 oranında azalma olduğu gözlemlendi (Şekil 5.7.).



Şekil 5.7. SH-SY5Y ve dH1f hücrelerinin A β 42 uygulaması yapılan ve yapılmayan hücrelerinin MTT analiz sonuçları (48 saat sonrası)

Protein uygulamasından 48 saat sonra besiyeri tazelenerek 48 saat beklemeye bırakılan hücrelerin MTT ile belirlenen canlılık analizi sonucu; A β 42 uygulaması

yapılan hücreleri uygulama yapılmayanlara oranladığımızda SH-SY5Y hücrelerinde yaklaşık 0,6 oranında; dH1f hücrelerinde ise 0,5 oranında azalma olduğu gözlemdi (Şekil 5.8.).



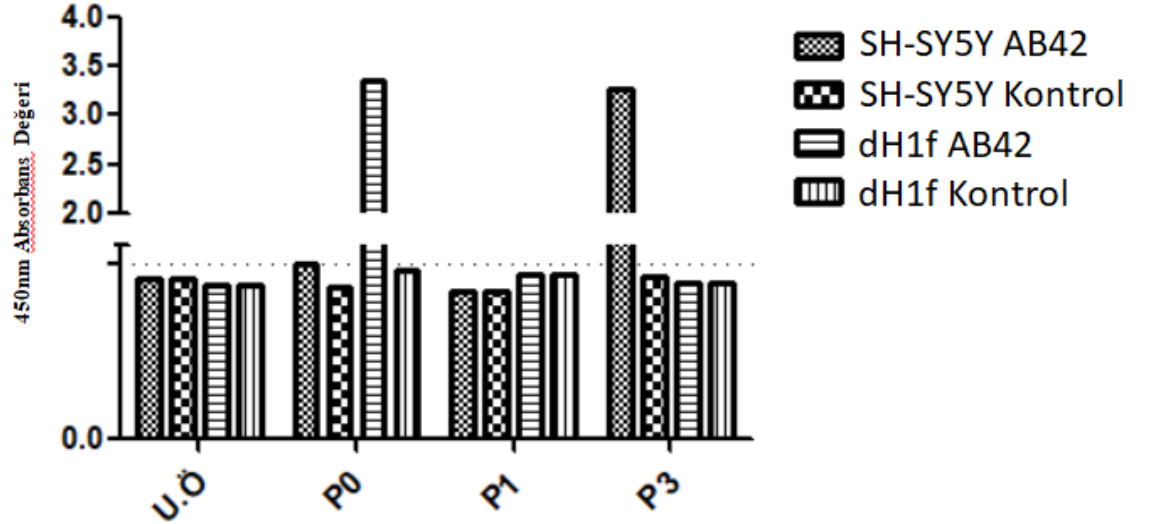
Şekil 5.8.SH-SY5Y ve dH1f hücrelerinin uygulama yapılan ve yapılmayan hücrelerinin MTT analiz sonuçları (48+48 saat sonrası) (*:p≤0,05;**p≤0,001)

5.4. ELISA Sonuçlarının Değerlendirilmesi

Pasajlanarak 6 kuyucuklu kültür plaklarına yüzey alanına uygun miktarda ekilen hücelere Aβ42 uygulaması yapıldı. Hücreler, içerisinde Aβ42 bulunan besiyerinde 48 saat inkübe edildikten sonra içerisinde Aβ42 bulunan besiyeri toplandı ve hücelere taze besiyeri verildi. 48 saat sonra verilen bu taze besiyeri ELISA yapılmak üzere toplandı. Böylelikle ELISA ile Aβ42 proteini içeren besi yerine maruz bırakılan hücrelerle kontrol grubu olan, Aβ42 proteini bulundurmeyen besiyeri ile muamele edilen hücreler arasındaki Aβ42 proteininin miktarı karşılaştırmalı bir şekilde ölçüldü. Hazırlanıp ölçülen standartlarla bir standart eğri çizildi ve bu şekilde protein miktarları hesaplandı.

Hücelere son konsantrasyon 2,5 µM olacak şekilde Aβ42 proteini uygulanarak; hücreler 3 pasaj ilerletildi. İlerleyen her pasajla birlikte süpernatantlar toplanarak ELISA ölçümü yapıldı. Yapılan bu ölçüm sonucunda SH-SY5Y

hücrelerinde uygulama öncesi ve ilk iki pasajda A β 42 protein miktarı aynı iken 3. pasajda A β 42 proteini uygulanmış hücrelerde protein miktarında yüksek oranda artış görülmüştür. dH1f hücrelerinde ise uygulama öncesi SH-SY5Y hücrelerinden daha az miktarda A β 42 proteini saptanırken; kendi arasında kıyaslandığında uygulamanın hemen sonrasında P0'da yüksek oranda A β 42 proteini saptanırken, ilerleyen pasajlarda bu oranın düştüğü görüldü (Şekil 5.9. ve Tablo 5.1.).

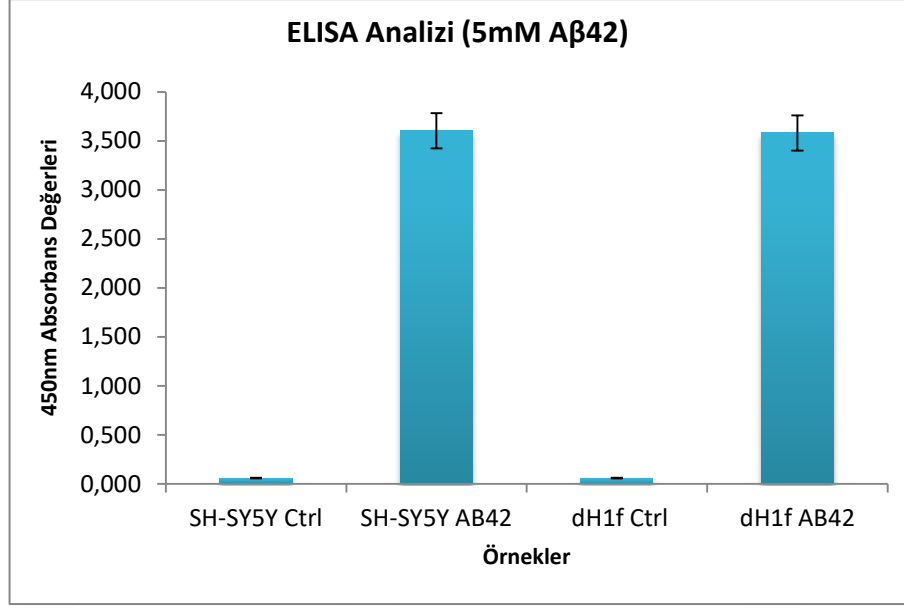


Şekil 5.9. A β 42 (2,5 μ M) uygulaması sonrası, ELISA yöntemi ile süpernatanta salınan A β 42 seviyelerinin gösterilmesi. SH-SY5Y ve dH1f hücrelerinden A β 42 (2,5 μ m) uygulama öncesinde (U.Ö), uygulama sonrası pasajlama öncesinde (P0), ilk (P1) ve üçüncü (P3) pasajlarında toplanan süpernatantlar üzerinden gerçekleştirilmiş olan ölçüm sonuçları

Tablo 5.1. 2,5 μ M A β 42 proteini uygulaması sonrasında toplanan süpernatantlarla yapılan ELISA sonuçları doğrultusunda hesaplanan örneklerdeki A β 42 proteini konsantrasyonları

Konsantrasyon (pm/ml)	SH-SY5Y Kontrol	SH-SY5Y (+A β 42)	dH1f Kontrol	dH1f (+A β 42)
U.Ö	1,97	1,97	1,96	1,96
P0	1,96	1,99	1,98	11,16
P1	1,96	1,95	1,97	1,97
P3	1,97	10,93	1,96	1,96

Hücelere son konsantrasyon 5 μ M olacak şekilde A β 42 proteini uygulaması sonrasında hücreler pasajlanmadan toplanan süpernatantlarda ELISA ölçümü yapıldı. Bu ölçüm sonucunda her iki hücre hattında da uygulama yapılan hücrelerin kontrol hücrelerine oranla çok daha fazla A β 42 proteini barındırdığı belirlendi (Şekil 5.10. ve Tablo 5.2.).



Şekil 5.10.Aβ42 (5 µM) uygulaması sonrası, ELISA yöntemi ile süpernatanta salınan Aβ42 seviyelerinin gösterilmesi. 48 saat Aβ42 (5µM) uygulaması sonrasında pasajlama yapılmadan kontrol gruplarıyla karşılaştırmalı olarak elde edilen değerler.

Tablo 5.2. 5µM Aβ42 proteini uygulaması sonrasında toplanan süpernatantlarla yapılan ELISA sonuçları doğrultusunda hesaplanan örneklerdeki Aβ42 proteini konsantrasyonları

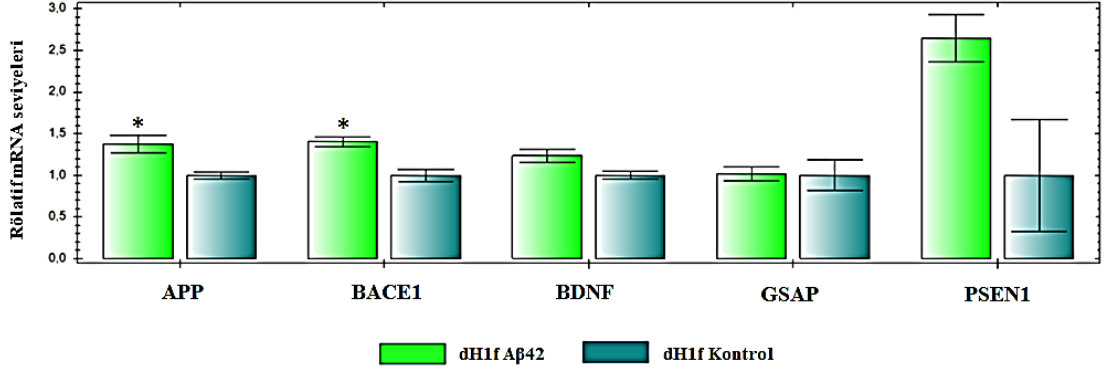
	SH-SY5Y Kontrol	SH-SY5Y (+Aβ42)	dH1f Kontrol	dH1f (+Aβ42)
Konsantrasyon (pm/ml)	0,67	4,68	0,67	4,65

5.5. Gen ve miRNA Ekspresyon Sonuçlarının Değerlendirilmesi

Nöroblastoma hücre hattı olan SH-SY5Y ve fibroblast hücre hattı olan dH1f hücrelerinin Aβ42 proteini ile muamele edilmesi sonrasında, Alzheimer ile ilişkili genlerin (APP, BACE1, PSEN1, GSAP, BDNF) ve ayrıca bu genlerle ilişkilendirilen miRNA'ların (miR-9-3p, miR-9-5p, miR-98, miR-223-5p, miR-29a-3p, miR-200a-3p, miR-16-5p) ifade seviyeleri tüm deney gruplarında Gerçek-Zamanlı PZR ile kantitatif olarak belirlendi.

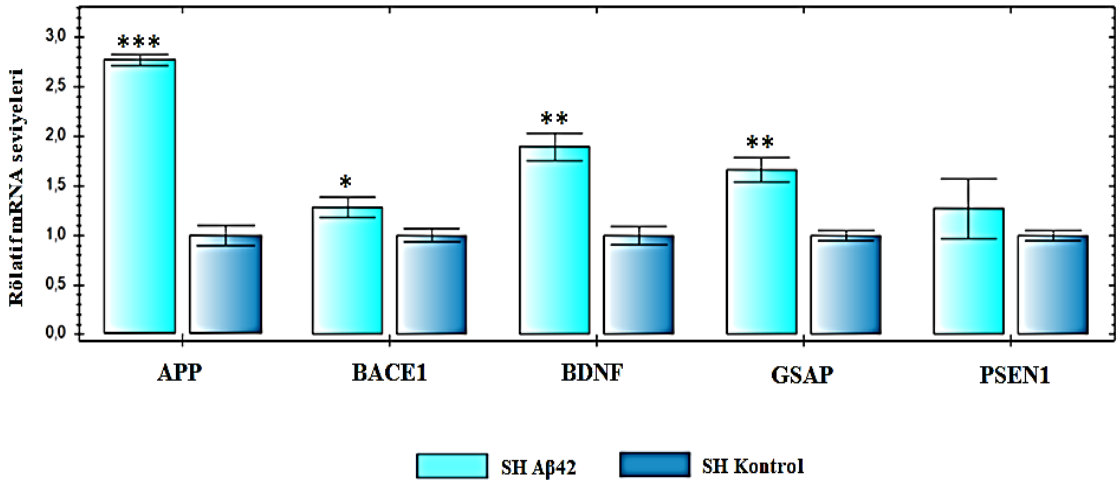
5.5.1. Gerçek-Zamanlı PZR ile Genlerin anlatımının incelenmesi

Gerçek-zamanlı PZR sonucunda dH1f ve SH-SY5Y hücrelerinde Aβ42 proteini uygulaması sonucunda genlerin ifade seviyeleri uygulama yapılmayan kontrol grupları ile karşılaştırmalı olarak belirlendi.



Şekil 5.11. dH1f hücrelerinde ilişkili genlerin Gerçek-Zamanlı PZR analizi sonuçları (*:p≤0,05)

Aβ42 proteini uygulaması sonrasında toplanarak RNA izolasyonu ve ardından cDNA sentezi gerçekleştirilen dH1f hücrelerinde Gerçek-Zamanlı PZR ile Alzheimer ile ilişkili genlerin anlatımına bakılmıştır (Şekil 5.11.). Yapılan bu kantitatif analiz sonucunda Aβ42 proteini uygulanmış dH1f hücrelerinde genel anlamda bütün genlerin ifadesinde artış gözlenirken; APP ve BACE1 genlerindeki artış anlamlı bulunmuştur (p≤0,05).



Şekil 5.12. SH-SY5Y hücrelerinde hastalıkla ilişkili genlerin Gerçek-Zamanlı PZR analizi sonuçları (*:p≤0,05; **:p≤0,01; ***:p≤0,001)

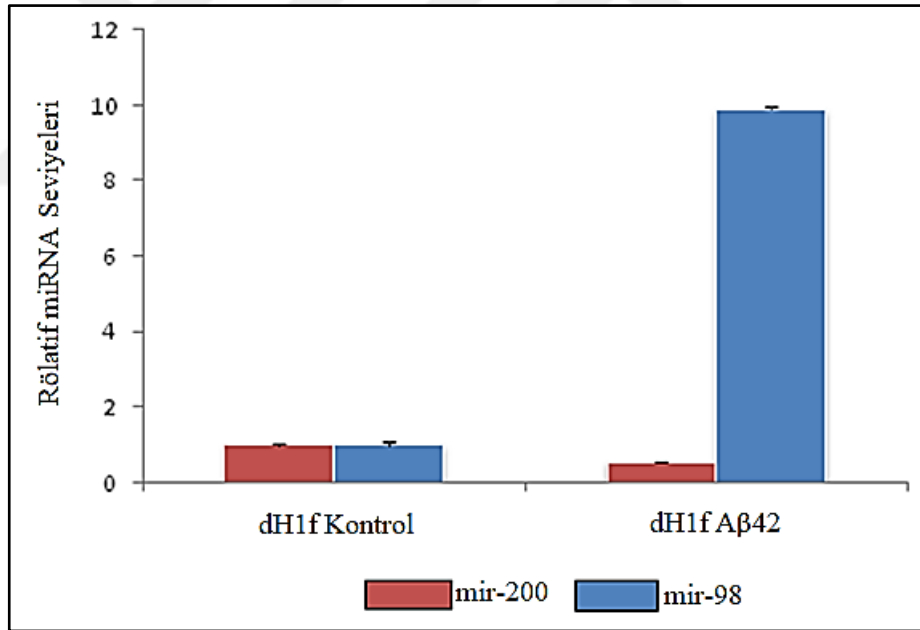
Aβ42 proteini uygulaması sonrasında toplanarak RNA izolasyonu ve ardından cDNA sentezi gerçekleştirilen SH-SY5Y hücrelerinde Gerçek-Zamanlı PZR ile Alzheimer ile ilişkili genlerin anlatımına bakılmıştır (Şekil 5.12.). Yapılan bu kantitatif analiz sonucunda Aβ42 proteini uygulanmış SH-SY5Y hücrelerinde genel anlamda bütün genlerin ifadesinde artış gözlenirken; APP genindeki artış istatistiksel olarak çok yüksek düzeyde anlamlı (p≤0,001);GSAP ve BDNF

genlerindeki artışlar yüksek düzeyde anlamlı bulunurken ($p \leq 0,01$); BACE1 genindeki artış anlamlı bulunmuştur ($p \leq 0,05$).

5.5.2. Gerçek-Zamanlı PZR ile miRNA'ların anlatımının incelenmesi

Gerçekleştirilen Gerçek-Zamanlı PZR sonucunda dH1f ve SH-SY5Y hücrelerinde A β 42 proteini uygulaması sonrası genlerle ilişkili olan miRNA'ların anlatımı incelendi.

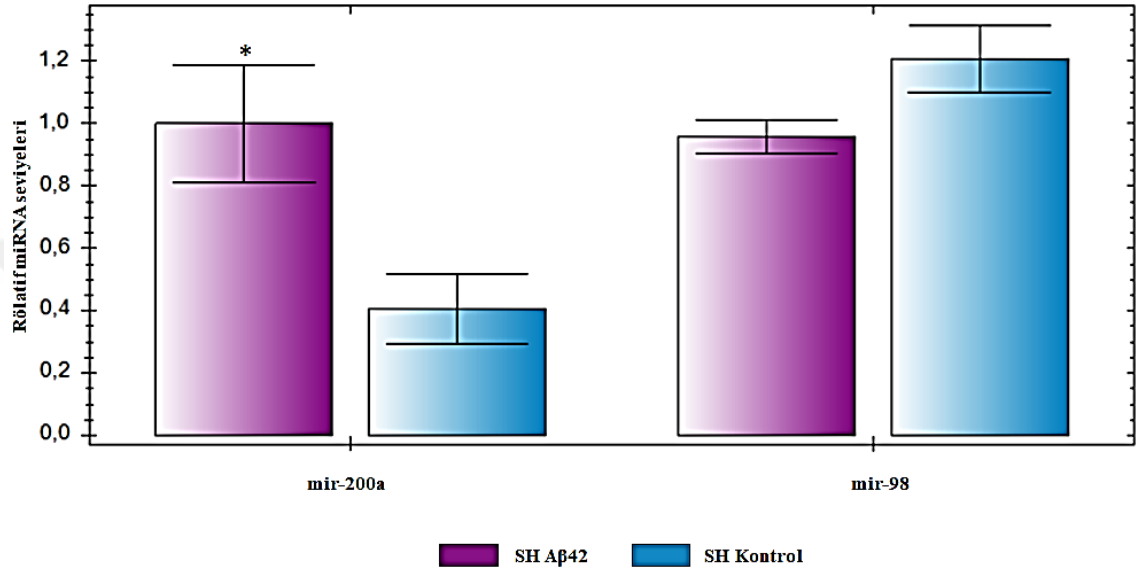
Yapılan ön çalışmada gerçekleştirilen kantitatif analizler sonucunda A β 42 proteini uygulanmış dH1f ve SH-SY5Y hücrelerinde genel anlamda miR-16, miR-223, miR-98, miR-9-3p ve miR-9-5p, miR-29a ve miR-200a ekspresyon seviyelerinde artma ve azalmalar görüldü. Ön çalışmadan elde edilen bu sonuçlar neticesinde çalışmanın miR-200a ve miR-98 üzerinden devam ettirilmesi uygun görüldü.



Şekil 5.13. dH1f hücrelerinde hastalıkla ilişkili miRNA'ların Gerçek-Zamanlı PZR analiz sonuçları

A β 42 proteini uygulaması sonrasında toplanarak miRNA izolasyonu ve ardından cDNA sentezi gerçekleştirilen dH1f hücrelerinde Gerçek-Zamanlı PZR ile genlerle ilişkili miRNA'ların anlatımına bakılmıştır (Şekil 5.13.). Yapılan bu kantitatif analiz sonucunda A β 42 proteini uygulanmış dH1f hücrelerinde genel anlamda miR-200a'de azalma; miR-98'de artış görüldü.

A β 42 proteini uygulaması sonrasında toplanarak miRNA izolasyonu ve ardından cDNA sentezi gerçekleştirilen SH-SY5Y hücrelerinde Gerçek-Zamanlı PZR ile genlerle ilişkili miRNA'ların anlatımına bakılmıştır (Şekil 5.14.). Yapılan bu kantitatif analiz sonucunda A β 42 proteini uygulanmış SH-SY5Y hücrelerinde miR-200a'da istatistiksel olarak anlamlı bir artış gözlenirken ($p \leq 0,05$); miR-98'de görülen azalma istatistiksel düzlemde sınırda bir anlamlılık göstermiştir ($0,05 \leq p < 0,1$).



Şekil 5.14. SH-SY5Y hücrelerinde miR-200a ve miR-98'in Gerçek-Zamanlı PZR analiz sonuçları

6. TARTIŞMA

Alzheimer hastalığı dünya çapında en sık rastlanan demans tipidir (Mohandas ve diğ., 2017). Hastalığın en temel nedenlerinden biri olan amiloid-beta plaklarının birikimi (Alves ve diğ., 2016) konusunda yapılan çalışmalar sayesinde mekanizmanın bir düğümü daha çözülsede hala çözülmesi gereken pek çok düğüm mevcuttur. Bu düğümler dolayısıyla hastalığın tanı ve tedavi aşamalarında istenildiği gibi yol kat edilememiştir (Kumar ve diğ., 2017). Özellikle erken tanı için invaziv olmayan bir biyolojik belirtecin tespiti hastalığın prognozu ve takibinde oldukça önemlidir. Bu bağlamda yapılan çalışmada kendisi de belli bir miktar amiloid üretebilen ve nöral kökenli olan SH-SY5Y insan nöroblastoma hücrelerinde AH'nı mimikleyerek ilişkili gen ve miRNA seviyelerini incelemek ve olası biyolojik belirteçleri saptamak amaçlandı.

Amiloid hipotezi, APP'nin proteolitik kesimi sonucunda oluşan A β peptit agregatlarıyla oluşan amiloid plaklarının AH patolojisinin merkezinde olduğunu savunmaktadır (Mohandas ve diğ., 2017). Bizde bu hipotezden yola çıkarak çalışmamızda A β 42 uygulamasıyla; hücrelerdeki amiloid üretiminin arttırılmasını hedefledik.

Amiloid, β -tabaka yapısı bakımında zengin, çözünmez, yanlış katlanmış protein agregatlarından oluşur ve AH'nin temel nedenlerinden olan A β proteini amiloidlerin birincil örneğidir. Yapılan bir çalışmada, kendiliğinden amiloid prekürsör protein üretebilen, nöroblastoma hücresi olan SH-SY5Y hücrelerinin, yaşlanmış bireylerin beyinde bulunan ve AH gibi nörodejeneratif hastalıktan etkilenmiş, tamamen farklılaşmış hücreleri bazı yönlerden taklit ettiği bildirilmiştir (Stockburger ve diğ., 2014). Kongo kırmızısı amiloid agregatları ve fibrillerin boyanmasında en sık kullanılan boyadır. Yapısal düzeyde, amiloid agregatlarının β -tabakasına paralel ve β -tabakasına paralel olmayan iki bağlanma bölgesinden bağlanarak boyamayı gerçekleştirir (Jameson ve diğ., 2012). A β 42 uygulaması yapılan ve kontrol olan SH-SY5Y hücrelerinin, uygulama sonrasında kongo kırmızısı

ile boyanarak gerçekleştirilen mikroskop incelemesinde A β 42 protein uygulaması yapılan hücrelerin uygulamaya tabi tutulmayan kontrol hücrelerine oranla çok daha yoğun bir şekilde kiremit kırmızısına boyandığı görüldü. A β 42 uygulaması sonrasında üç pasaj ilerletilen ve daha sonra kongo kırmızısıyla boyanan hücrelerde uygulama yapılan hücreler ve kontrol hücreleri arasında açık olarak bir fark görüldü. Ayrıca A β 42 protein uygulamasından sonra üç pasaj ilerletilip boyanan SH-SY5Y hücreleri, A β 42'ye maruz bırakıldıktan hemen sonra boyanan SH-SY5Y hücrelerine oranla daha az yoğun; fakat kendi kontrol ve dH1f hücrelerine kıyasla daha yoğun boyandığı görüldü. Bu durumda hücrelerin amiloid plak üretimini devam ettirdiği düşünülmüştür. dH1f hücrelerinin uygulamanın sonrasında yapılan boyamasında kendi kontrol hücreleriyle kıyaslandığında bir fark olduğu fakat uygulama sonrası 3 pasaj ilerletildikten sonra yapılan boyamada bu farkın azaldığı dH1f hücrelerinin amiloid üretimi için gerekli feedback'i sağlayamadığını düşündürmüştür.

A β 42 proteini uygulaması sonrası yapılan mikroskop incelemeleri ve hücre canlılığını test etmek amacıyla yapılan MTT analizi, A β 42 proteininin SH-SY5Y hücrelerinde hemen uygulama sonrasında proliferasyonunu arttırdığı gösterdi. Üç pasaj devam ettirilen hücrelerde ise, hücreler arası etkileşimin ve dolayısıyla gösterdiği proliferatif artışın zamanla azaldığı görüldü. Amiloid birikiminin belli bir seviyeye kadar hücreler için korucu özellik gösterdiği düşünüldüğünde (Jameson ve diğ., 2012); başta görülen proliferatif artış bu bilgiye paraleldir. A β 42 proteini hücreler için toksik özelliğindedir; dolayısıyla artması ve hücreler arası boşlukta birikmesiyle, başta hücreler arası sinaptik ilişkiyi bozma, nöral hücre kayıpları gibi pek çok olumsuzluğa neden olurlar (Crump ve diğ., 2013). A β 42 proteini uygulaması sonrası SH-SY5Y hücrelerinin morfolojik değişimleri incelendiğinde; A β 42 proteinine maruz bırakılan hücrelerde, protein uygulaması yapılmayan hücrelere oranla dendrit benzeri yapıların çok daha az olduğu ve yuvarlak yıldızimsı morfolojilerinin değişmeye başladığı görülmektedir. dH1f hücrelerinde ise gerek mikroskop incelemeleri ile görülen azalma gerek yapılan 48 ve 96. saatlerde MTT analizi sonucunda bu azalmaların istatistiksel olarak yüksek oranda anlamlı olması; A β 42 proteininin hücreler için toksik olduğunu gösterdi.

SH-SY5Y hücreleri nöral kökenli nöroblastoma hücreleri olmaları sebebiyle belli bir miktar amiloid üretebilmektedirler (Zhang ve diğ., 2015; Rajadas ve diğ., 2013). A β 42 protein miktarının kantitatif ölçümünü gerçekleştirmek amacıyla

yapılan ELISA analizi yapıldı. A β 42'ye maruz bırakılan SH-SY5Y hücrelerinde; uygulamadan hemen sonra toplanan ve üç pasaj ilerletildikten sonra toplanan süpernatantlar üzerinden yapılan ELISA analizinde, kontrol hücrelerine oranla daha yüksek konsantrasyonda A β 42 proteini tespit edildi. dH1f hücrelerinde ise özellikle üç pasaj ilerledikten sonra yapılan ölçümde A β 42 konsantrasyonu SH-SY5Y hücrelerinden önemli ölçüde daha az olduğu hesaplandı. Bu durum SH-SY5Y hücrelerinin amiloid birikimi açısından kendilerini feedback'e soktuklarına dair bir kanıt olduğu düşünüldü.

Yapılan mikroskop incelemeleri, kongo kırmızısı boyaması, MTT ve ELISA analizleri birbirlerine paralel doğrultuda SH-SY5Y hücrelerinde; kendi kontrolleri ve dH1f hücrelerine oranla, amiloid birikiminin arttırıldığını ve amiloid birikimi için feedback mekanizmasının tetiklendiğini kanıtlar nitelikte olduğu görüldü.

Alzheimer hastalığı ile bağlantısı kesin ve dolaylı olmak üzere pek çok gen ilişkilendirilmiştir. Hastalıkla ilişkisi kesin olan genlerden APP ve PSEN1'in hastalık için otozomal dominant bir etki gösterdiği ve A β 42 proteinin artışına doğrudan etkileri olduğu bilinmektedir (Cai ve diğ., 2015). APP geç başlangıçlı AH için (Rocchi ve diğ., 2003), PSEN1 ise erken başlangıçlı AH için kesin nedenlerden biri olarak kabul edilmektedir (Rocchi ve diğ., 2003). Yapılan Gerçek-Zamanlı PZR analizinde dH1F hücrelerinde kontrollerine oranla APP ve PSEN1 genlerinin ifadelerinde artış görüldü. SH-SY5Y hücrelerinde ise kontrol hücrelerine oranla APP miktarı yüksek oranda arttığı görüldü. Bunun yanında PSEN1'in artışı istatistiksel düzlemde anlamlı bir sonuç vermedi. SH-SY5Y hücrelerindeki APP artışı hücrelerde hastalığı mimiklediğimizi ve amiloid birikimi için bir feedback yarattığımızı destekler niteliktedir.

Endopeptidaz ailesinden olan BACE1, APP'nin kesiminde kilit rol oynamaktadır (Yokeş, 2007). Alzheimer hastalarında BACE1 ekspresyonunda artış olduğu rapor edilmiştir (Lei ve diğ., 2015). Gerçek-Zamanlı PZR ile BACE1 ifade seviyesi incelendi. dH1f hücrelerinde kontrollerine göre arttığı; SH-SY5Y hücrelerinde BACE1 geninin ifadesinde bir artış görüldü. Bu durumda A β 42 uygulamasının hücrelerde BACE1 üzerinde belli bir etkisi olduğu fakat ifade seviyeleri incelendiğinde APP üzerinde olduğu kadar etkili olmadığı görüldü.

BDNF, hücreler için nörotrofik etki gösteren proteini kodlayan gendir (Iyer ve diğ., 2017). Alzheimer hastalarının ölüm sonrası analizler sonucunda BDNF miktarlarının mRNA seviyesinde öğrenme ve hafızadan sorumlu olan hipokampus ve kortekste önemli oranda azaldığı görülmüştür (Laske ve diğ., 2007). Yaptığımız Gerçek-Zamanlı PZR analizi sonucu SH-SY5Y ve dH1f hücrelerinde BDNF ifadesinin arttığı görüldü. Bu artış bize, BDNF'nin hayatta kalmayı sağlayan bir faktör olmasından dolayı; hücrelerin toksik A β 42'ye karşı gösterdikleri ilk tepki olduğu düşündürdü.

GSAP, APP'nin kesiminden sorumlu γ -sekretaz aktive edici proteini kodlayan gendir (De Strooper ve diğ., 2012). Hücre hatlarında, GSAP ifadesindeki azalma A β seviyelerini azaltmaktadır (He ve diğ., 2010). Yapılan Gerçek-Zamanlı PZR analizi sonucu her iki hücre tipinde de A β 42'ye maruz bırakılmış hücrelerde kontrollerine oranla GSAP seviyesinin arttığı görüldü. Dolayısıyla bu artışın amiloid seviyelerinin hücrelerde arttığına dair kanıt niteliğinde olduğu düşünülebilir.

miRNA'lar biyolojik prosesler için düzenleyici moleküllerdir (Jia ve Liu 2016). Hedef mRNA'yı keserek ya da baskılayarak post-transkripsiyonel regülasyonda görev alırlar (Quinlan ve diğ., 2018). miRNA'lar bu regülasyon sırasında hedef mRNA'ya birden çok kez bağlanabilmelerinin yanı sıra her mRNA birden fazla miRNA tarafından da kontrol edilebilir (Shaik ve diğ., 2018). Deneysel araştırmalar göstermiştir ki; miRNA'nın 5' bölgesi, aktivitenin başladığı, hedefe spesifik bağlanmanın olduğu bölgelerdir (Cai ve diğ., 2009). miRNA'nın nöronal gelişim, farklılaşma ve nöronların sinaptik plastisitesinde önemli rolleri olduğu ve miRNA'larda meydana gelen sorunların merkezi sinir sistemi hastalıkları, Alzheimer hastalığı, Huntington hastalığı gibi hastalıklara neden olabileceği düşünülmektedir. Konu ile ilgili yapılan çalışmalar incelendiğinde Alzheimer hastalığında bazı miRNA'ların disregülasyonu tespit edildiğinden dolayı bu anomalinin hastalığın patolojisinde rol oynayabileceği dolayısıyla miRNA'ların noninvaziv ve hassas biyolojik belirteçler olabilecekleri düşünülmektedir (Denk ve diğ., 2015; Jia ve Liu, 2016; Zhu ve diğ., 2015). Bu bağlamla hastalıkla ilişkili genlerle ilişkilendirdiğimiz bazı miRNA'ların (miR-9-3p, miR-9-5p, miR-98, miR-223-5p, miR-29a-3p, miR-200a-3p, miR-16-5p) Gerçek-Zamanlı PZR ile ifade seviyelerini inceledik.

Alzheimer hastalarında miR-9 seviyesinin düşük olduğu rapor edilmiştir. Özellikle BACE1 ile aralarındaki ilişkiye dair güçlü kanıtlar bulunmaktadır. (Hebert ve diğ., 2008). dH1f hücrelerinde yapılan Gerçek-Zamanlı PZR analizinde miR-9-5p ifadesinin kontrole oranla yüksek oranda arttığı görülürken; SH-SY5Y hücrelerinde ise miR-9-5p ve miR-9-3p ifadelerinin azaldığı fakat yine bu azalmaların istatistiksel olarak anlamlı olmadığı görüldü.

miR-29a, APP'nin enzimatik kesiminde rol alan β -sekretazın moleküler yolağında görevli BACE1'i baskıladığı görülmüştür (Hebert ve diğ., 2008). miR-29a'un BDNF ifadesini düzenleyerek nöral proliferasyona katkıda bulunan DNA metil transferaz'ın ekspresyonuna negatif bir etkisi olduğu gözlemlenmiştir (Yang ve diğ., 2015). Yapılan Gerçek-Zamanlı PZR analizinde SH-SHY5Y hücrelerinde miR-29a ifade seviyesinin arttığı fakat istatistiksel olarak anlamlı olmadığı tespit edildi.

miR-16; APP ve BACE1 için potansiyel inhibitör olarak tanımlanmış ve A β peptit üretiminde etkili olduğu görülmüştür. (Parsi ve diğ., 2015). Alzheimer hastalarında yanlış katlanmış amiloid ile miR-16 arasında bir ilişki bulunmuştur (Selbach ve diğ., 2008). Bunun yanında miR-16 seviyesinin arttırıldığı SH-SY5Y hücreleri üzerinde yapılan çalışmada BDNF ifadesinin belirgin bir şekilde azaldığı görülmüştür (Li ve diğ., 2015). Çalışmamızda yaptığımız ifade seviyelerinin Gerçek-Zamanlı PZR ile incelenmesi sonucunda SH-SY5Y hücrelerinde miR-16 seviyesinde azalma görüldü fakat yine istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı.

AH'da miR-98'de düzensizlik olduğu; A β birikimini etkilediği görülmüştür. miR-98 seviyesindeki azalma, SH-SY5Y hücrelerinde A β ile indüklenen canlılık inhibisyonunu ve apoptozu azalttığı rapor edilmiştir (Li ve diğ., 2016). Yaptığımız Gerçek-Zamanlı PZR sonucunda dH1f hücrelerinde kontrole oranla miR-98 seviyesinde artış görülürken; SH-SY5Y hücrelerinde ise literatür bilgisine paralel olmayan bir şekilde, kontrol hücrelerine oranla istatistiksel olarak sınırda anlamlılık gösteren bir azalma görüldü.

Alzheimer hastaları ve sağlıklı kontroller üzerinde yapılan inceleme sonucunda miR-200a seviyesinde artış olduğu rapor edilmiştir (Yu ve diğ., 2012). Bunun yanı sıra yazılı literatür bilgisi yeterli değildir. Yaptığımız çalışmada Gerçek-Zamanlı PZR analizi incelemesinde dH1f hücrelerinde miR-200a seviyesinde kontrole oranla azalma görülürken; bu azalma istatistiksel olarak anlamlı

bulunmamıştır. Fakat SH-SY5Y hücrelerinde miR-200a seviyesinde artış olduğu görüldü.

Genel olarak özetlemek gerekirse; SH-SY5Y hücreleri kendileri de az miktarda da olsa amiloid-beta üretebilen hücreler olarak AH araştırmalarında yeni dönemde kullanılmaya başlanmıştır. Hücrelerde AH'ı mimikleyebilmek amacıyla SH-SY5Y ve dH1f hücrelerinin bir kısmı A β 42 proteini ile muamele edilirken, bir kısmı kontrol olarak bırakıldı ve eş zamanlı olarak bütün hücreler aynı sürece maruz bırakıldı. A β 42 proteinin SH hücrelerinde bir feedback yaratarak kendi üretimini tetiklediği ELISA analizi ve boyama yöntemiyle tespit edildi. Hastalığın modellenmesi üzerine, hastalıkla ilişkilendirilmiş olan genlere ve bunlarla ilişkili miRNA'ların ifadelerine Gerçek-Zamanlı PZR ile bakılması sonucu anlamlı ilişkiler bulundu.

Litaratür taramasında miR-98, pek çok kaynak tarafından potansiyel biyolojik belirteç ilan edildiği rapor edilmesine rağmen miR-200a için fazla literatür bilgisine rastlanmamıştır. miR-98 ve miR-200a ifadelerinin SH-SY5Y hücrelerinde kontrol grubuna oranla; istatistiksel olarak yüksek düzeyde bir anlamlılıkla yüksek oranda artış göstermesi AH için biyolojik belirteç olma potansiyeli taşıdıklarını göstermektedir.

Son yıllarda yapılan çalışmalar ışığında, miRNA'ların hücrenin moleküler mekanizmasında oynadıkları aktif roller düşünüldüğü zaman özellikle biyolojik belirteç olarak tanımlanmalarının arttığı görülmektedir. Çalışmada miRNA'ların; A β metabolizması üzerinde doğrudan ya da dolaylı olarak etkili olan genler üzerinde, düzenleyici oldukları görülmektedir. Ayrıca elde edilen sonuçlar ışığında amiloid kaskad hipotezi bir kez daha desteklenmiş ve böylelikle amiloid metabolizmasının kendi üretimini tetiklediği ve artan miktarının Alzheimer hastalığında önemli olduğu bir kez daha gösterilmiş oldu. Sonuç olarak çalışmamız Alzheimer hastalığı mekanizmasının aydınlatılmasına ve tanı aşamasına katkıda bulunmaktadır. Bu vesileyle klinik semptomların ortaya çıkmasından önceki aşamalarda hastalığın tanısının konulmasıyla, semptomatik tedavinin erken aşamada başlanması ya da gelişmeler ışığında gerekli önlemlerin alınması mümkün olacaktır.

7. KAYNAKLAR

- Alexandrov P, Dua P, Hill J, Bhattacharjee S, Zhao Y, Lukiw W(2012). MicroRNA (miRNA) speciation in Alzheimer ' s disease (AD) cerebrospinal fluid (CSF) and extracellular fluid (ECF). *Biochem Mol Biol.* 3(4):365–373.
- Allsop D (1907). Introduction to Alzheimer's Disease. 32(6):1–21.
- Alves S, Fol R, Cartier N(2016). Gene Therapy Strategies for Alzheimer's Disease: An Overview. *Human Gene Therapy.* 27(2):100–107.
- Cai Y, Yu X, Hu S, Yu J (2009). A Brief Review on the Mechanisms of miRNA Regulation. *Genomics, Proteomics and Bioinformatics.* 7(4):147–154.
- Cai Y, An S, Kim S(2015). Mutations in presenilin 2 and its implications in Alzheimer's disease and other dementia-associated disorders. *Clinical Interventions in Aging.* 10:1163–1172.
- Castellani RJ, Rolston R, Smith M(2011). Alzheimer Disease. *Disease a Month.* 56(9):1–60.
- Cheng, S, Zhang C, Xu C, Wang L, Zou X, Chen G (2014). Age-dependent neuron loss is associated with impaired adult neurogenesis in forebrain neuron-specific Dicer conditional knockout mice. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology.* 57:186–196.
- Crump C, Johnson D, Li Y (2013) Development and mechanism of γ -secretase modulators for Alzheimer's disease. *Biochemistry* 52(19):3197–3216.
- De Strooper B (2010). Proteases and proteolysis in Alzheimer disease: a multifactorial view on the disease process. *Physiological reviews.* 90(2):465–94.
- De Strooper B, Iwatsubo T, Wolfe M (2012). Presenilins and γ -secretase: structure, function, and role in Alzheimer Disease. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine.* 2(1):1–19.
- Deatherage C, Hadziselimovic A, Sanders C(2010). Purification and characterization of the Human gamma-secretase activating protein. *Biochemistry.* 14(4):384–399.
- Denk J, Boelmans K, Siegismund, Lassner D, Arlt S, Jahn H(2015). MicroRNA profiling of CSF reveals potential biomarkers to detect Alzheimer's disease. *PLoS ONE.* 10(5):1–18.
- Duggan S, McCarthy J (2016). Beyond γ -secretase activity: The multifunctional nature of presenilins in cell signalling pathways. *Cellular Signalling.* 28(1):1–11.

- Fang M, Wang J, Zhang X, Geng Y, Hu Z, Rudd J, Ling S, Chen W, Han S (2012). The miR-124 regulates the expression of BACE1/ β -secretase correlated with cell death in Alzheimer's disease. *Toxicology Letters*. 209(1):94–105.
- Fumagalli F, Racagni G, Riva MA (2006). The expanding role of BDNF: A therapeutic target for Alzheimer's disease? *Pharmacogenomics Journal*. 6(1):8–15.
- George-Hyslop PS, Fraser PE (2012). Assembly of the presenilin γ -/ ϵ -secretase complex. *Journal of Neurochemistry*. 120(1):84–88.
- George-Hyslop PS, Haass C (2008). Regulatory RNA goes awry in Alzheimer's disease. *Nature Medicine*. 14(7):711–712.
- George GG, Caine WW (1984). Alzheimer's Disease and Down's Syndrome Sharing of a Unique Cerebrovascular Amyloid Fibril Protein. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 122(3):1131–1135.
- He G, Luo W, Li P, Remmers C, Netzer W, Hendrick J, Bettayeb K, Flajolet M, Gorelick F, Wennogle LP, Greengard P (2010). Gamma-secretase activating protein, a therapeutic target for Alzheimer's disease. *Nature*, 467(7311), pp.95–98.
- Hebert SS, Horre K, Nicolai L, Papadopoulou AS, Madenmakers W, Silahatoglu AN, Kauppinen S, Deşacourte A, De Strooper B (2008). Loss of microRNA cluster miR-29a/b-1 in sporadic Alzheimer's disease correlates with increased BACE1/ β -secretase expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(17):6415–6420.
- Hippius H, Neundörfer G (2003). The discovery of Alzheimer's disease. *Dialogues in Clinical Neuroscience*. 5(1):101–108.
- Idda ML, Munk R, Abdemohsen K, Gorospe M (2018). Noncoding RNAs in Alzheimer's disease. *Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA*, 9(2):1–13.
- Iyer NR, Wilems TS, Sakiyama-Elbert SE (2017). Stem cells for spinal cord injury; Strategies to inform differentiation and transplantation. , 155(1), pp.3–12.
- Jameson LP, Smith NW, Dzyuba SV (2012). Dye-binding assays for evaluation of the effects of small molecule inhibitors on amyloid (A β) self-assembly. *ACS Chemical Neuroscience*. 3(11):807–819.
- Jia LH, Liu YN (2016). Downregulated serum miR-223 serves as biomarker in Alzheimer's disease. *Cell Biochemistry and Function*. 34(4):233–237.
- Kang JH, Ryoo NY, Shin D, Trojanowski J, Shaw LM (2014). Role of cerebrospinal fluid biomarkers in clinical trials for Alzheimer's disease modifying therapies. *The Korean journal of physiology & pharmacology: official journal of the Korean Physiological Society and the Korean Society of Pharmacology*, 18(6):447–56.
- Kim HY, Kim HV, Jo S, Lee J, Choi Y, Kim DJ, Kim Y (2015). EPPS rescues hippocampus-dependent cognitive deficits in APP/PS1 mice by disaggregation of amyloid- β ; oligomers and plaques. *Nature Communications*, 6, pp.1–12.

Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/ncomms9997>.

- Kim, J. et al., 2015. microRNA-33 Regulates ApoE Lipidation and Amyloid-Metabolism in the Brain. *Journal of Neuroscience*, 35(44), pp.14717–14726. Available at: <http://www.jneurosci.org/cgi/doi/10.1523/JNEUROSCI.2053-15.2015>.
- Kim, J. et al., 2016. MIR-186 is decreased in aged brain and suppresses BACE1 expression. *Journal of Neurochemistry*, 137(3), pp.436–445.
- Kumar S, Vijayan M, Reddy PH (2017). MicroRNA-455-3p as a potential peripheral biomarker for Alzheimer's disease. *Human Molecular Genetics*. 26(19):3808–3822.
- Laske C, Stransky E, Leyhe T, Eschweiler GW, Maetzler W, Wittorf A, Soekadar S, Richartz E, Koehler N, Bartels M, Buchkremer, Schott K(2007). BDNF serum and CSF concentrations in Alzheimer's disease, normal pressure hydrocephalus and healthy controls. *Journal of Psychiatric Research*. 41(5):387–394.
- Lei X, Lei L, Zhang Z, Zhang Z, Cheng Y(2015). Downregulated miR-29c correlates with increased BACE1 expression in sporadic Alzheimer's disease. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*. 8(2):1565–1574.
- Li F, Wei G, Bai Y, Li Y, Huang F, Lin J, Hou Qiuke, Deng R, Zhou J, Zhang SX, Chen DF (2015). MicroRNA-574 is involved in cognitive impairment in 5-month-old APP/PS1 mice through regulation of neuritin. *Brain Research*. 1627:177–188.
- Li Q, Li X, Wang L, Zhang Y, Chen L(2016). miR-98-5p Acts as a Target for Alzheimer's Disease by Regulating A β Production Through Modulating SNX6 Expression. *Journal of Molecular Neuroscience*. 60(4):413–420.
- Li W, LeBrun DG, Li M (2011). The expression and functions of microRNAs in pancreatic adenocarcinoma and hepatocellular carcinoma. *Chinese Journal of Cancer*. 30(8):540–550.
- Liu C, Wang JL, Li L, Wang PC(2014). MicroRNA-384 regulates both amyloid precursor protein and β -secretase expression and is a potential biomarker for Alzheimer's disease. *Internatonal Journal of Molecular Biology*. 34:160–166.
- Macleod R, Hillert EK, Cameron R, Baillie G(2015). The role and therapeutic targeting of α -, β - and γ -secretase in Alzheimer's disease. *Future Science OA*. 1(3).
- MacPherson RE (2017). Filling the void: a role for exercise induced BDNF and brain amyloid precursor protein processing. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*. <http://ajpregu.physiology.org/lookup/doi/10.1152/ajpregu.00255.2017>.
- Maoz R, Garfinkel BP, Soreq H (2017). Alzheimer's Disease and ncRNAs. *Neuroepigenomics in Aging and Disease*. 978:338–360.
- Mayeux, R., Saunders, A.M. & Shea, S., 1998. Utility of the Apolipoprotein E Genotype in the Diagnosis of. *The New England Journal of Medicine*, 338.

- Mohandas E, Rajmohan V, Raghunath B (2017). Neurobiology of Alzheimer's disease. *Indian Journal Psychiatry*. 51(1):55–61.
- Özkay ÜD, Öztürk Y, Can ÖD(2011). Yaşlanan dünyanın hastalığı: Alzheimer hastalığı. *SDÜ Tıp Fakültesi Dergisi*, 18(1):35–42.
- Parsi S, Smith PY, Goupil C, Dorval V, Hebert SS(2015). Preclinical evaluation of miR-15/107 family members as multifactorial drug targets for Alzheimer's disease. *Molecular Therapy - Nucleic Acids*. 4:1–11.
- Quinlan S, Kenny A, Medina M, Engel T, Jimenez-Mateos EM(2018). *MicroRNAs in Neurodegenerative Diseases* 1st ed. Elsevier Inc. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/bs.ircmb.2017.04.002>.
- Rajadas J, Sun W, Li H, Inayathullah M, Cereghetti D, Tan A, Mello Coelho V, Chrest F, Kusiak JW, Smith WW, Dennis T, Wu JC, Rifkind JM(2013). Enhanced A β 1-40 Production in Endothelial Cells Stimulated with Fibrillar A β 1-42. *PLoS ONE*, 8(3):1–8.
- Reddy PH, Williams J, Smith F, Bhatti JS, Kumar S, Vijayan M, Kandimalla R, Kuruva CS, Wang R, Manczak M, Yin X, Reddy AP(2017). MicroRNAs, Aging, Cellular Senescence, and Alzheimer's Disease. *Molecular Biology and Translational Science*. 146:127-171.
- Rocchi A, Pellegrini S, Siciliano G, Murri L(2003). Causative and susceptibility genes for Alzheimer's disease: A review. *Brain Research Bulletin*. 61(1):1–24.
- Satoh J, Tabunoki H, Ishida T, Saito Y, Arima K(2012). Immunohistochemical characterization of γ -secretase activating protein expression in Alzheimer's disease brains. *Neuropathology and Applied Neurobiology*. 38(2):132–141.
- Scheltens P, Blennow K, Breteler M, De Strooper B, Frisoni G, Saşşoway S, Van Der Flier M(2016). Alzheimer's disease. *The Lancet*. 388(10043):505–517.
- Shaik MM, Tamargo IA, Abubakar M, Kamal M, Greig N, Gan SH(2018). The role of microRNAs in Alzheimer's disease and their therapeutic potentials. *Genes*. 9(4):1-36.
- Söderberg L, Dahlqvist C, Kakuyama H, Thyberg J, Ito A, Winblad B, Naslind J, Tjernberg L(2005). Collagenous Alzheimer amyloid plaque component assembles amyloid fibrils into protease resistant aggregates. *FEBS Journal*, 272(9):2231–2236.
- Stockburger C, Gold V, Pallas T, Kolesova N, Miano D, Leuner K, Müller W(2014). A Cell Model for the Initial Phase of Sporadic Alzheimer's Disease. *Journal of Alzheimer's disease : JAD*, 42:1–17.
- Swerdlow RH (2007). Pathogenesis of Alzheimer's disease. *Clinical interventions in aging*, 2(3):347–359.
- Wang XP, Ding HL (2008). Alzheimer's disease: epidemiology, genetics, and beyond. *Neuroscience Bulletin*, 24(2):105–109.
- Wolfe MS (2012). Gamma-Secretase as a Target for Alzheimer's Disease. *Elsevier*

*Inc.*64:127-153.

- Wu HZY, Leung Ong K, Seeher K, Armstrong N, Thalamuthu A, Brodaty H, Sachdev P, Mather K (2016). Circulating microRNAs as biomarkers of Alzheimer's disease: A systematic review. *Journal of Alzheimer's Disease*. 49(3):755–766.
- Van Dooren T, Dewachter I, Borghgraef P, Van Leuven F (2005). Transgenic mouse models for APP processing and Alzheimer's disease: early and late defects. *Sub-Cellular Biochemistry*. 38(2):45–63.
- Yang G, Song Y, Zhou X, Deng Y, Liu T, Weng G, Yu D, Pan S (2015). DNA methyltransferase 3, a target of microRNA-29c, contributes to neuronal proliferation by regulating the expression of brain-derived neurotrophic factor. *Molecular Medicine Reports*. 12(1):1435–1442.
- Yokeş MB (2007). Molecular genetics of Alzheimer disease. *Journal of Cell and Molecular Biology*. 6(2):73–97.
- Yu D, Mi T, Jianfeng L, Yanyao D, Wei L, Xialu F, Deren H (2012). Expression profile of miRNAs in APP swe/PSΔE9 transgenic mice. *Journal of Southern Medical University*. 32(9):1280–1283.
- Zhang M, Hou, D, Cai Z, Shao G, Wang H, Zhao Z, Yang Z (2015). The Effect of Schizandrol A-Induced DNA Methylation on SH-SY5YAB(1-40) Altered Neuronal Cell Line: A Potential Use in Alzheimer's Disease. *Journal of Toxicology and Environmental Health*. 78(10):1321–1327.
- Zhang R, Zhang Q, Niu J, Lu K, Xie B, Cui D, Xu S (2014). Screening of microRNAs associated with Alzheimer's disease using oxidative stress cell model and different strains of senescence accelerated mice. *Journal of the Neurological Sciences*. 8:6–13.
- Zhao Y, Zhao R, Wu J, Wang Q, Pang K, Shi Q, Gao Q, Hu Y, Dong X, Zhang J, Sun J (2018). Melatonin protects against Aβ-induced neurotoxicity in primary neurons via miR-132/PTEN/AKT/FOXO3a pathway. *BioFactors*. 10:1–10.
- Zhu Y, Li C, Sun A, Wang Y, Zhou S (2015). Quantification of microRNA-210 in the cerebrospinal fluid and serum: Implications for Alzheimer's disease. *Experimental and Therapeutic Medicine*. 9(3):1013–1017.

8. ÖZGEÇMİŞ

1993 yılında İskenderun'da doğdu. 2010 yılında İbn-i Sina Anadolu Lisesi'nde lise öğretimini tamamladı. 2011 ve 2015 yılları arasında Haliç Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü'nde lisans eğitimini tamamladı. Aynı yıl Haliç Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü'nde Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı'nda yüksek lisans eğitimine başladı.

