

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**ALZHEİMER HASTALIĞINDA YENİ
BİYOMARKIR GELİŞTİRİLMESİ: SERUMDAN
MİKRORNA ANALİZİ**

MERYEM GÜLFEM ÖNER

**TEMEL SİNİRBİLİMLER
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

İZMİR-2012

TEZ KODU: DEU.HSI.Msc-2010970083

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**ALZHEİMER HASTALIĞINDA YENİ
BİYOMARKIR GELİŞTİRİLMESİ: SERUMDAN
MİKRORNA ANALİZİ**

**TEMEL SİNİRBİLİMLER
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

MERYEM GÜLFEM ÖNER

Danışman Öğretim Üyesi: Doç. Dr. Şermin Genç

Bu araştırma TÜBİTAK tarafından 110S146 proje numarasıyla desteklenmiştir.

TEZ KODU: DEU.HSI.Msc-201097083

Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Sinirbilimler Anabilim Dalı, Temel Sinirbilimler Yüksek Lisans programı öğrencisi Meryem Gülfem ÖNER “ Alzheimer Hastalığında Yeni Biyomarkır Geliştirilmesi: Serumdan mikroRNA Analizi ” konulu Yüksek Lisans tezini 05/01/2012 tarihinde başarılı olarak tamamlamıştır.



BAŞKAN

Doç. Dr. Şermin Genç

Dokuz Eylül Üniversitesi
Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Sinirbilimler Anabilim Dalı



ÜYE

Prof. Dr. Görsev YENER

Dokuz Eylül Üniversitesi
Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Sinirbilimler Anabilim Dalı



ÜYE

Yrd. Doç. Dr. Zahide ÇAVDAR

Dokuz Eylül Üniversitesi
Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Moleküler Tıp Anabilim Dalı

İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
İÇİNDEKİLER.....	i
TABLolar DİZİNİ.....	iii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	iv
KISALTMALAR.....	v
TEŞEKKÜR.....	vii
ÖZET.....	1
ABSTRACT.....	3
1. GİRİŞ VE AMAÇ	5
2. GENEL BİLGİLER	7
2.1. Alzheimer hastalığı	7
2.1.1. Klinik.....	7
2.1.2. Patogenez.....	8
2.1.3. Tanı.....	11
2.2. MikroRNA	13
2.2.1. MikroRNA Biyogenezi.....	14
2.2.2. MikroRNA'ların Regülasyonu.....	17
2.2.3. MikroRNA Deteksiyon Yöntemleri.....	18
2.2.4. Alzheimer Hastalığında Ekspresyonu değişen miRNA'lar.....	20
2.3. Dolaşımdaki MikroRNA'lar	25
2.4. Alzheimer Hastalığında Biyomarkır olarak MikroRNA	26
2.4.1. Alzheimer Hastalığında Biyomarkırlar.....	26
2.4.2. Biyomarkır Olarak Dolaşımdaki miRNA'lar.....	28
3. GEREÇ VE YÖNTEM	30
3.1. Araştırmanın Tipi.....	30
3.2. Araştırmanın Yeri ve Zamanı.....	30
3.3. Araştırmanın Evreni ve Örneklem.....	30
3.4. Çalışma Materyali.....	30
3.5. Çalışmanın Değişkenleri.....	30
3.6. Veri Toplama Araçları.....	31
3.6.1. Demografik Veri Toplama.....	31
3.6.2. Nöropsikolojik Veri Toplama.....	31
3.6.3. Kan Örneklerinden RNA izolasyonu.....	31

3.6.4. Mikroarray Analizi.....	32
3.6.5. MikroRNA Hedef Genleri Analizi.....	32
3.7. Araştırma Planı.....	33
3.8. Verilerin Değerlendirilmesi.....	33
3.9. Araştırmanın Sınırlılıkları.....	33
3.10. Etik Kurul Onayı.....	33
4. BULGULAR.....	34
4.1. Demografik Veriler.....	34
4.2. Alzheimer Hastalığında Ekspresyonu Değişen MikroRNA'ların Mikroarray Yöntemiyle Belirlenmesi.....	35
4.3. Ekspresyon Değişimi Saptanan MikroRNA'ların Biyoinformatik Araçlarla Hedef Analizleri.....	38
5. TARTIŞMA.....	39
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	41
7. KAYNAKLAR.....	42
8. EKLER.....	61
EK-1 Etik Kurul Onayı.....	61

TABLULAR DİZİNİ

Sayfa No

Tablo 1: Farklı AH çalışmalarında miRNA ekspresyon değişimleri.....	23
Tablo 2: AH hayvan modellerinde miRNA ekspresyon değişimleri.....	24
Tablo 3: AH'de dolaşımdaki miRNA ekspresyon değişimleri.....	24
Tablo 4: Kontrol ve Hastaların Demografik Verileri.....	34
Tablo 5: RNA izolasyonu sonucu örneklerin konsantrasyonları.....	35
Tablo 6: Mikroarray sonucuna göre ekspresyonu değişen miRNA'lar	35
Tablo 7: AH'de Olası Hedef genler.....	38

ŞEKİLLER DİZİNİ

	<u>Sayfa No</u>
Şekil 1: APP'nin iki farklı yolak ile kesilimi.....	9
Şekil 2: miRNA Biyogenezi.....	15
Şekil 3: Karşılıklı Bilgi Analizi.....	36

KISALTMALAR

A β : Amiloid- β

AchEls: Asetilkolinesteraz inhibitörleri

ADAM10: Disintegrin ve metalloproteinaz domaini içeren protein 10 (A Disintegrin and metalloproteinase domain-containing protein 10)

Ago2: Argonaute-2

AH: Alzheimer hastalığı

APOE: Apolipoprotein E

APP: Amiloid Prekürsör Protein

BACE: β -APP parçalayıcı enzim

BOS: Beyin Omurilik Sıvısı

cDNA: Komplementer DNA (Complementary DNA)

CFH: Komplement faktör H

DNA: Deoksiribonükleik asit

DGCR8: DiGeorge sendrom kritik bölge gen 8

Exp-5: Ekspörtin-5 (Exportin-5)

FAH: Familyal Alzheimer Hastalığı

FMRP: Frajil X mental retardasyon proteini

GDNF: Glial hücre kaynaklı nörotrofik faktör (glial cell derived neurotrophic factor)

HKB: Hafif Kognitif Bozukluk

IL: İnterlökin

JNK: c-Jun-N-Terminal Kinaz

MAPT: Microtubule Associating Protein Tau

MI: Karşılıklı Bilgi (Mutual Information)

miRNA: MikroRNA

mRNA: Messenger RNA

MRI: Manyetik rezonans görüntüleme

NMDA: N-metil-D-aspartat

nt: Nükleotit

NFY: Nörofibriler Yumak

PACT: PKR aktive edici protein

PH: Parkinson hastalığı

pre-miRNA: Prekürsör miRNA

PSEN: Presenilin

pri-miRNA: Primer-miRNA

qPCR: Kantitatif PCR

RNA: Ribo nükleik asit

RISC: RNA ile indüklenen susturma kompleksi (RNA induced silencing complex)

rRNA: Ribozomal RNA

SAGE: Gen ekspresyonunun seri analizi (Serial analysis of gene expression)

SMMT: Standardize mini mental test

SMV: Destek Kuvvet Araçları (super vector machines)

snoRNA: Küçük nükleolar RNA'lar (Small nucleolar RNA)

snoRNP: Küçük nükleolar ribonükleoprotein (small nucleolar ribonucleoprotein)

TNF: Tümör Nekrozis Faktör

TRBP: Transactivation-responsive RNA-binding protein

UTR: Translasyon olmayan bölge (Untranslated region)

TEŞEKKÜR

Hayatta iyi ile kötüyü ayırt etmeyi öğreten hocam, Yrd. Doç. Dr. Ayten NALBANT'a,

Yüksek lisans eğitimim boyunca, tezin projelendirme, uygulama ve yazım aşamalarında yardımcı olan, laboratuvar çalışmalarının tümünde yol gösteren ve her konuda benden yardımlarını esirgemeyen bir danışmandan çok daha fazlası olan Doç. Dr. Şermin GENÇ'e,

Fikirleri ile bize yol gösteren, bilgi ve materyal açısından ekibimizi her zaman destekleyen hocam Prof. Dr. Kemal Kürşad GENÇ'e,

Oldukça yoğun olan programı arasında çalışma kaynağımı sağlayan, bana her daim yardımcı ve destek olan, bilimsel duruşunu hep örnek alığım, hocam; Prof. Dr. Görsev YENER'e,

Çalışmamızın istatistik ve veri kontrollerini yapan Doç. Dr. Pembe KESKİNOĞLU'na

Ekip arkadaşlarım Ufuk VURGUN, Serpen DURNAOĞLU, Kemal Uğur TÜFEKÇİ, Zeynep Filiz ZADEOĞLULARI ve arkadaşlarım Aslı ÇELİK, Duygu HARMANCI, Semih AKINCILAR'a,

İlk öğretmenim, annem Hatice Gülay YILDIZ'a ve sahip olduğum her şey için aileme,

Projeyi maddi yönden destekleyen TÜBİTAK'a teşekkürü borç bilirim.

Meryem Gülfem ÖNER

ALZHEİMER HASTALIĞINDA YENİ BİYOMARKIR GELİŞTİRİLMESİ: SERUMDAN MİKRORNA ANALİZİ

Meryem Gülfem Öner, Dokuz Eylül Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü,
Sinirbilimler Anabilim Dalı, 35340, İnciraltı, İzmir

ÖZET

Alzheimer Hastalığı (AH), ileri yaşta görülen demansların en sık formudur. Kognitif fonksiyonlarda ilerleyici bozulma ile karakterizedir. Klinikte, AH'nın kesin kriterlerine rağmen tanısı sekonder nedenlerin ve diğer demansif hastalıkların dışlanması ile konur. Tanıda altın standart klinik AH tanısı almış kişide beyinde tipik nöropatolojik değişikliklerin gözlenmesidir. Bu patolojik değişiklikler ilerleyici sinaptik bozulma ve nöron kaybının yanı sıra hücre dışı amiloid-beta plaklarının birikimi, hücre içinde ise hiperfosforillenmiş tau proteinini içeren nörofibriler yumakların oluşumudur. Çalışmalar klinik tanının kesinliğinin %65 ile %96 arasında değiştiğini ortaya koymuştur. Bu açıdan bakılınca AH için spesifik bir biyomarkır çok önemlidir. Beyin omurilik sıvısının (BOS) elde edilme zorluğu ve AH'de beyinde gözlenen değişikliklerin periferik kana yansıdığına gösterilmesi nedeniyle günümüzde AH'nın tanısına katkı sağlayacak biyomarkır arayışları daha çok periferik kan örneklerinde devam etmektedir.

Post-transkripsiyonel gen regülasyonunda önemli rolü olan mikroRNA'lar (miRNA), kodlanmayan küçük ribonükleik asitlerdir (RNA). Gen ekspresyonunu mesajcı RNA (mRNA) parçalanması ya da translasyonel baskılanma yoluyla düzenlemektedirler. miRNA'ların sinir sisteminde; gelişimde, plastisitede, nörodejenerasyonda rol oynadıkları düşünülmektedir. miRNA ekspresyon bozuklukları daha çok kanserde çalışılmış olmakla birlikte son dönemde pek çok hastalıkta da çalışılmaktadır. miRNA'ların immun hücre gelişiminde, inflamatuvar yanıtın oluşmasında anahtar bir rol üstlenebileceği ve nörodejeneratif hastalıkların patogeneğinde rol oynayabileceği öne sürülmüştür. Son bir kaç yılda ise, gerek dolaşımdaki stabiliteyi gerekse dokudaki profilleri ile gösterdikleri korrelasyon nedeni ile dolaşımdaki miRNA'ların çeşitli hastalıkların diagnozu ve prognozunda biyomarkır kullanılması önerilmiştir.

Çalışmamızda AH'lerin (n=10) ve kontrollerin (n=10) serum örneklerinde miRNA ekspresyon farklılıkları incelenmiştir. Bugüne kadar beyin dokularında yapılan çalışmaların farklı miRNA'ların AH patogeneğinde rol aldığı göstermesi ve bu miRNA'ların AH için diagnostik bir biyomarkır olabileceklerinin öne sürülmesinden yola çıkılarak, dolaşımdaki miRNA'ların bu hastalık için yeni biyomarkır olarak kullanılması araştırılmıştır. Yapılan mikroarray analizi ile en fazla ekspresyon değişimi gösteren 20 adet miRNA belirlenmiştir.

Anahtar sözcükler: Alzheimer hastalığı, mikroRNA, biyomarkır

DEVELOPMENT OF NEW BIOMARKERS IN ALZHEIMER'S DISEASE: MICRORNA ANALYSIS FROM SERUM

Meryem Gülfem Öner, Dokuz Eylül University, Institute of Health Sciences, Department of Neuroscience, 35340, Inciralti, İzmir

ABSTRACT

Alzheimer's disease (AD) is the most common form of dementia in elderly. It's characterized by progressive deterioration of cognitive functions. In clinic, current criteria for diagnosis of AD are still largely based on the exclusion of secondary causes and other dementive disorders. The golden standard of diagnosis is the identification of typical neuropathological changes in the brain of a patient who has suffered from clinical AD. These neuropathological changes are progressive synaptic and neuronal loss, presence of extracellular beta-amyloid plaques and intracellular neurofibrillary tangles containing hyperphosphorylated tau protein. Studies have shown that the accuracy of clinical diagnosis is between 65% and 96%. In view of this, the need for specific AD marker is great. Biomarker research for AD are doing in peripheral blood samples, because that obtaining cerebrospinal fluid (CSF) sample is difficult and brain alternations in Alzheimer's disease could be observed in peripheral blood.

MicroRNAs (miRNAs) are non-coding, small RNAs which are post-transcriptional regulator of gene regulation. miRNAs can regulate gene expression through messenger RNA (mRNA) degradation or translation repression. It's thought that miRNAs have a role in development, plasticity and neurodegeneration of the nervous system. Although dysregulation of miRNA expression has been characterized mostly in cancer, it has recently been studied in many other diseases. Specifically, miRNAs have been proposed as regulators of immune cell development, playing roles in the inflammatory response, and as key players in the pathogenesis of neurodegenerative diseases. Recent studies suggested circulating miRNAs as new diagnostic and prognostic biomarkers of diseases, because of their high stability in circulation and correlation compared to tissue profiles.

In this study, we searched for miRNA expression differences in serum samples of both AD (n=10) and controls (n=10). Up to date studies that focused on the expression changes of miRNAs from brain tissue of the AD showed that different miRNAs could play an important role in pathogenesis of AD and could be used as diagnostic markers for AD. In this study we searched the potential of circulating miRNAs as new class of biomarkers for AD. According to miRNA array analysis, 20 most significantly changed miRNAs are detected.

Key Words: Alzheimer's disease, microRNA, biomarker

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Alzheimer Hastalığı (AH) ilk kez 1907 yılında Alman psikiyatrist ve nöropatolog Dr. Alois Alzheimer tarafından tanımlanmıştır. İleri yaşta en sık karşımıza çıkan dejeneratif doğada nörolojik bir hastalıktır. Toplumdaki genel ölüm nedenleri sıralamasında dördüncü sırada yer almaktadır. Hastalık için tanımlanan en önemli risk faktörü ileri yaştır, altmış beş yaş sonrasında prevalansı her 5 yılda bir ikiye katlanmaktadır. Yapılan epidemiyolojik çalışmalara göre 2050 yılında hasta sayısının 100 milyonun üzerinde olması beklenmektedir [1]. Hastalık klinik olarak değer yargıları, karar verme ve oryantasyon da bozukluklar gibi kognitif fonksiyonlarda ilerleyici kayıp ile karakterize edilirken, hastalığın ileri safhalarda davranış ve konuşma bozuklukları da gözlenmektedir [2]. Hastalığın tanısı demansa neden olan diğer nedenlerin yokluğu ile “Olası AH” olarak yapılmaktadır. Kesin tanısı ise post-mortem dönemde beyin incelemesinde AH’na özgü olan amiloid plak ve senil plakların varlığı ile yapılmaktadır. Bu nedenle hastalık tanısına katkı sağlayacak biyomarkırlara ihtiyaç söz konusudur. AH’de incelenen biyomarkır, hastalığın tanısında, prognozun belirlenmesine katkı sağlayabileceği gibi hastalığa yatkınlığı da belirleyebilmeli, hatta hastalığı diğer demans türlerinden de ayırmalıdır [1].

MikroRNA (miRNA)’lar, gen ifadesini özellikle transkripsiyon sonrası aşamada düzenleyen 17-25 nükleotit (nt) uzunluğunda protein kodlamayan küçük RNA’lardır. miRNA’lar genomda RNA polimeraz II tarafından transkribe edilerek çeşitli işlemler sonrası olgun (matür) forma dönüşürler. Olgun miRNA’lar çeşitli proteinlerle kompleks oluşturarak hedef gen messenger RNA’sına (mRNA) bağlanarak, mRNA’nın yıkımına neden olur ya da translasyonunu baskırlar. Yapılan çalışmalar miRNA’ların fizyolojik ve patolojik tüm mekanizmalarda rol aldığını göstermektedir.

Bugüne kadar pekçok çalışmada gerek kanser gerek kanser dışı hastalıklarda miRNA ekspresyon değişimleri incelenmiş ve bunların biyomarkır olarak kullanımı ileri sürülmüştür. Ancak son yıllarda dolaşımdaki miRNA’ların gerek stabiliteleri [3], gerekse doku ile gösterdikleri korelasyon açısından biyomarkır olarak kullanılmasını öneren bir çok çalışma mevcuttur [4, 5, 6]. Buna rağmen Alzheimer hasta serumlarında miRNA ekspresyon değişikliklerini inceleyen bir çalışmaya rastlanmamıştır.

Bu çalışmadaki amaç, Alzheimer hastaları ve sağlıklı kontrollerden alınan serumlardaki miRNA ekspresiyonları incelenerek, belirlenen miRNAların AH için diagnostik bir markır olarak kullanılıp kullanılamayacağının araştırılmasıdır.

H1: Alzheimer hastalığında serumda ekspresyonu değişen miRNA'ların patogeneizde rolü vardır ve bunlar diagnostik biyomakır olarak kullanılabilir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Alzheimer Hastalığı

Dr. Alois Alzheimer, ilerleyici demansla dört buçuk yıl takip ettiği 55 yaşındaki kadın hastanın, otopsi materyalinde gümüş pozitif nörofibriler yumak, serebral kortikal nöron kaybı ve günümüzde senil plaklar olarak bilinen değişiklikleri ortaya koymuştur. [7]. AH ile ilgili modern çalışmalar 1960-1970'lerde serebral kortikal lezyonların yapısı, spesifik nörotransmitterlerde eksikliklerin anlaşılması ile başlamıştır. Özellikle 1980-1990'lardaki moleküler biyolojik ve genetik çalışmalar, AH'deki moleküler değişikliklere yeni bir bakış açısı kazandırmıştır. 1984'te Glanner ve Wong amiloid beta (A β) peptidini izole edip saflaştırmış, 1987'de ise Glanner ve Wong'un çalışmaları Kang ve ark. tarafından doğrulanmış, A β 'nin öncü proteini olan Amyloid Precursor Protein (APP) klonlanmıştır [8, 9]. Bu gelişmeler, hastalıktaki patogeneze yönelik mekanizmaları aydınlatmak için basamak oluşturmuştur.

AH, demansların en yaygın tipidir. Dünya çapında 26 milyon kişide görülmekte ve 2050 yılı itibari ile dört kat artış göstererek 100 milyona ulaşacağı öne sürülmektedir [7, 10]. Tanı konmasından sonraki dönemde hastalığın tedavisi, hastanın bakımı için yapılan harcamalar ve hastanın çevresinde yarattığı sosyal problemler nedeniyle toplum açısından da AH önemli bir yer tutmaktadır [11]. Bugüne kadar tedavisi olmasada astilkolinesteraz inhibitörleri (AChEIs) ve N-metil-D-aspartat (NMDA) reseptör antagonistleri kullanımı ile en azından hastalığın ilerlemesi önlenmeye çalışılmaktadır [11].

2.1.1. Klinik

AH ilerleyici bir hastalık olması nedeniyle, klinik bulgular hastalığın seyrine bağlı olarak sınıflandırılmaktadır. Hafif evre AH'de hasta sözlerini tekrarlar, kelimeleri bulmakta zorluk çeker, ev işlerini yapabilir ancak eski özenini gösteremez, yakından tanıdığı insanların isimlerini unutar, eşyalarının yerlerini hatırlayamaz, banka işlerinde hatalar yapar, ancak sosyal uygunluk korunmuştur. Bellekteki bozulma seçici olarak yakın geçmişteki olay ve deneyimleri kapsar, çocukluk ile ilgili uzak olaylar daha iyi hatırlanabilir. SMMT (standardize mini mental test) özellikle demanslı yaşlıların muayenesinde uygulaması kısa sürede uygulanan bilişsel bir değerlendirme aracıdır. Yönelim, kayıt hafızası, dikkat ve hesaplama, hatırlama ve lisan olarak beş ana başlık altında toplanmış 11 maddeden oluşmaktadır.

Toplam skor 30 üzerinden değerlendirilmektedir [12]. Hafif evre AH'de SMMT skoru 20-24 arasında olabilir [13, 14].

Hastalığın orta evresinde lisan, yargılama, mekan oryantasyonunda bozulmalar başlar ve günlük yaşam aktivitelerini yürütmek konusunda zorluklar artar. Unutkanlığın şiddeti artmaya devam eder, günlük ev işlerini yapmada bağımsızlık kademeli olarak bozulur. Uyku-uyanıklık döngüsünde bozulma, günün sonuna doğru belirtilerde kötüleşme, genel görünüm ve hijyende bozulma, hezeyanlar halüsinasyonlar, ajitasyon gibi psikiyatrik belirtiler ortaya çıkabilir. SMMT skoru 10-19 arasında değişir [13, 14].

Hastalığın son evresi aile bireylerini tanıyamama ve hareket etme ve beslenmede güçlük ile kendini belli eder. Primer duysal ve motor işlevler hastalığın seyrinde geç dönemlere kadar sağlam kalabilir. Ekstrapiramidal bulgular giderek daha sık hale gelir. SMMT skoru 0-9 arasındadır [13, 14].

2.1.2. Patogenezi

Hastalık histopatolojik ve morfolojik olarak hücre dışında A β plaklarının ve hücre içinde nörofibrillar yumakların (tau) birikimi ile karakterize edilmekte ve bu değişimlerin AH'deki nörodejenerasyonda aktif rol oynadığı düşünülmektedir [1, 15].

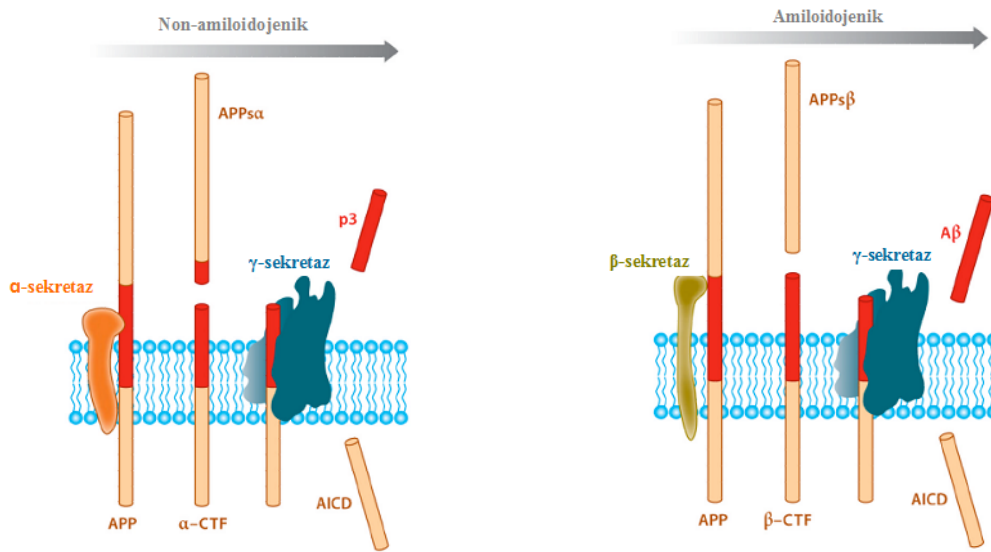
Amiloid Beta (A β)

J. Hardy tarafından öne sürülen “amiloid kaskadı hipotezine” göre beyindeki A β üretimi ve yıkımı arasındaki dengesizlik hastalığın önemli nedenlerindedir. [1, 16, 17].

Amiloid prekürsör protein (APP)'in metabolizma bozukluğunun AH'nin patogenezinde ana role sahip olduğu öne sürülmektedir. Bu hipotez, 21. kromozomda yerleşen APP genindeki mutasyonların erken yaş başlangıçlı FAH (Familyal Alzheimer Hastalığı)'na yol açtığının bulunmasıyla başlamıştır. Hipotezi destekleyen bir başka bulgu ise *Down Sendromu*'nda 21 kromozomun bulunması, dolayısıyla fazladan var olan APP geninin, gen dozaj etkisi ile AH gelişimine yol açtığı öne sürülmüştür. Bu hipotezin temeli fibriller yapıdaki amiloidin, hastalığın başlangıcında yer aldığı ve patogenezi başlattığıdır. Ancak bugün “amiloid kaskadı hipotezi”, hastalığın şiddeti ile amiloid plak sayısı arasında korelasyonun olamaması ya da kognitif bozukluğu olmayan hastalarda amiloid plakların gözlemlenmesi

gibi yeni bulguları açıklamada yetersiz kalmaktadır [11, 18, 19]. Yapılan son çalışmalar, çözünen oligomerik A β düzeyleri ile kognitif bozulma arasında daha iyi bir korelasyon olduğunu göstermiştir [18]. Ayrıca *in-vitro* çalışmalar oligomerik A β türlerinin, fibriller türlerden daha toksik olduğunu göstermiştir [20].

A β , APP'in α ve β sekretazlar tarafından kesilmesi ile oluşur. APP tek bir transmembran bölgesine sahiptir. APP, periferde daha çok α sekretaz aktivitesi ile parçalanır. Nöronal hücrelerde APP daha çok β sekretazlar ile parçalanır. Bunun sonucunda membrana bağlı ve intakt A β içeren membran-bağlı C-terminal fragment (CTF/C99) oluşur. Bu daha sonra γ sekretaz tarafından tekrar membran bölümünün ortasından parçalanır ve serbest amiloid fragmanları oluşur. β sekretaz aktivitesi gösteren en önemli enzim, membran bağlı aspartil proteaz β -APP parçalayıcı enzim (BACE)'dir. γ sekretazlar APP'nin birden fazla bölgeden kesilmesini sağlar. Presenilin 1 (PSEN1) ve presenilin 2 (PSEN2), γ sekretaz aktivitesi gösteren proteinlerdir (Şekil 1) [21, 7]. APP'nin bu yolla parçalanması amiloidojenik yol olarak adlandırılır ve buna daha çok nöronlarda rastlanır. Non-amiloidojenik yol ise daha çok periferde gözlenir ve α sekretaz aktivitesi ile gerçekleşir.



Şekil 1: APP'nin iki farklı yolak ile kesilimi [1].

Nörofibriler Yumaklar (NFY)

Tau proteini nöronlarda ağırlıklı olarak bulunmasına rağmen çekirdekli tüm hücrelerde görülmektedir. Bu proteinin fonksiyonu mikrotübüllere bağlanıp, mikrotübül oluşumunda rol oynar. Biyokimyasal çalışmalar, NFY'nin hiperfosforillenmiş tau proteinleri içerdiğini

göstermektedir [11]. Tau proteinini, Mikrotübül ilişkili Protein Tau (MAPT) geni kodlar ve bu gen 16 ekzondan oluşmaktadır. Yetişkin bir bireyin beyinde alternatif kesilim (*splicing*) sonucu tau proteininin altı adet izoformu oluşmaktadır [2, 22]. Nörodejenerasyon sırasında tau anormal fosforillenir. Bugüne kadar tau proteininin 39 farklı bölgeden fosforillenebildiği gözlemlenmiştir. Bu modifikasyonların tau'nun mikrotübüllere bağlanma ilgisinin azalmasında rolü olduğu ve sonucunda ise aksonal transportta bozulmalara yol açtığı düşünülmektedir. [1, 23, 24]. NFY'ler nöronal yıkımın en fazla olduğu beyin bölgelerinde görülür ve demansın şiddeti ile korelidir [11, 25, 26]. Birinci kromozomda yer alan tau gen mutasyonları “Frontotemporal Demans” adını alan bir klinik tabloya yol açar. Bu hastalıkta AH'de gözlenen NFY'ler saptanır. Nörodejenerasyonun frontal ve temporal bölgede sınırlı olduğu bu tabloda A β patolojisi gözlenmez. Tüm bu bulgular “amiloid hipotezinin” hastalığın başlangıcında yer aldığını, tau ile ilişkili patolojinin ise daha sonradan ortaya çıktığını desteklemektedir [27].

Genetik

Genel olarak AH'nin, erken başlangıçlı FAH ve geç başlangıçlı AH (sporadik) olmak üzere iki türü bulunmaktadır. AH'nin önemli bir kısmını sporadik olgular oluşturmakta ve %2 gibi az bir kısmında genetik özellik göstermektedir. APP'de 25'den fazla, PSEN1 geninde 150'den fazla ve PSEN2 geninde de 10'un üzerinde mutasyon saptanmıştır. PSEN1 gen ürünü presenilin1 ve PSEN2 gen ürünü presenilin2, APP parçalanmasında rol alan γ sekretaz ailesinin üyeleridir. Tüm mutasyonlar A β 42 üretiminde artışa yol açar [11]. Apolipoprotein E (ApoE) geni kolesterol metabolizmasında görevli olan Apolipoprotein E proteinini kodlamaktadır ve 19. kromozomda yer alır. ApoE geninin ϵ 2, ϵ 3 ve ϵ 4 olmak üzere 3 ana alleli vardır. Popülasyonda ϵ 3 en yaygın varyantıdır, ϵ 4 varyantının varlığı ise geç yaş başlangıçlı AH'na yatkınlıkta artış ile korelidir. Ancak bu allelin varlığı, AH'nin gelişeceğinin kesin göstergesi değildir [1, 28].

Genom genelinde yapılan çalışmalar (*genome wide association studies*, GWAS) ApoE'ye ek olarak farklı risk lokuslarını işaret etmektedir. Bunlar, *clusterin* (CLU), *phosphatidylinositol-binding-clathrin assembly protein* (PICALM) genleridir [1, 29]. CLU, A β agregasyonu ya da yıkılımından rol alırken aynı zamanda A β fibrilasyonuna da katılırken, PICALM kltrin aracılıklı endositozda rol almaktadır [31,32]. Alzheimer hastalığı genetik konsorsiyumu (ADGC) tarafından geç başlangıçlı AH'lerde yapılan GWAS'a göre geç

başlangıçlı AH'ye yatkınlık oluşturduğu düşünölen 10 gen bildirilmiştir; APOE, CR1, CLU, PICALM, BIN1, EPHA1, MS4A, CD33, CD2AP ve ABCA7 [32]. ADAM10, disintegrin ve metalloproteaz ailesinin bir üyesidir ve APP'nin anti-amiloidojenik proteolizini gerçekleştiren bir α -sekretazdır. Son bulgular, ADAM10 daki mutasyonların α -sekretaz aktivitesini azalttığını ve buna bağılı olarak A β düzeylerinde artışı göstermiştir [1,33].

İnflamasyon

Son bulgular AH'de giderek artan oranda glial hücrelerin inflamatuvar etkilerinin patogeneizde yer aldığını göstermektedir. Aktive mikroglia, AH'lerin beyinlerinde APP'lerin ve hayvan modellerinde amiloid birikimlerinin çevresinde gözlenmiştir [34]. Aktive mikroglia ile birlikte akut faz proteinleri, sitokinler ve diğere inflamatuvar aracılar gösterilmiştir. Pozitron emisyon tomografi (PET) çalışmalarında AH'de mikroglial aktivasyon varlığı, amiloid toksisitesinde mikroglialının önemli rolü olduğunu kanıtıdır [35]. Kültüre edilmiş mikroglial hücrelere ve makrofajlara A β uygulanması onların aktivasyonuna ve interlökin-1 β (İL-1 β), interlökin-6 (İL-6) ve tümör nekrozis faktör-alfa (TNF- α) gibi proinflamatuvar sitokinlerin üretimine yol açar. Epidemiyolojik verilerde inflamatuvar patogenezi desteklemektedir [34, 35]. Aynı sitokinlerin AH'ye sahip kişilerin beyinlerindeki ekspresyonlarında artış saptanmıştır [35]. Anti-inflamatuvar tedaviler hem insanda hem de hayvan modellerinde plak ile ilişkili patolojileri azaltmaktadır [34].

2.1.3. Tanı

Klinik Tanı

AH'nin tanı kriteri olarak günümüzde yaygın biçimde “National Institutes of Neurological and Communicative Disorders and Stroke” (NINCDS) ve “Alzheimer's Disease and Related Disorders Association” (ADRDA) tanı kriterleri kullanılır. NINCDS-ADRDA kriterleri bellek veya lisan gibi bilişsel işlevlerde bozulmayı gerektirir [36]. Kriterlerin gerçekleştiği tipik tabloya NINCDS-ADRDA ile ‘Muhtemel Alzheimer hastalığı’ denmektedir. Postmortem çalışmalara ve NINCDS-ADRDA tanı kriterine göre tanı doğruluğunun % 65– 96 arasında olduğu, diğere demans türlerinden ayırmada ise spesifitesinin % 23-88 arasında değiştiği görölmüştür [37].

Tanıda Laboratuvar

AH'nın tanısına gelişen laboratuvar testleri katkı sağlamaktadır. Bunlar: Medial temporal lob (MTL) atrofisinin varlığı, PET çalışmalarında spesifik görünüm (temporal parietal bölgede glukoz metabolizmasında azalma), Anormal BOS biyomarkırları (düşük amiloid β 1-42, artmış total ya da fosforile tau düzeyi, gelecekte bulunacak olası iyi biyomarkırlar), Otozomal dominant mutasyonun ailede gösterilmesidir.

Medial temporal lobun manyetik rezonans görüntüleme (MRI) ile incelenmesi: Bu görüntüleme tekniği erken dönemde tanıya katkı sağlar. MTL atrofisi, Alzheimer'da %71–96, ılımlı kognitif bozuklukta % 59–78 sıklıkta karşımıza çıkmaktadır. Normal yaşlılık sürecinde sıklığı daha azdır (%29). Ancak MTL atrofisi yapan diğer nedenlerin ekarte edilmesi gerekliliği akılda tutulmalıdır.

Ayrıca yüksek çözünürlüklü MRI ile beyindeki yapısal değişimler in-vivo olarak belirlenmektedir. Hipokampusdaki atrofisinin oluşumu hastalığın prelinik aşamalarında bile belirlenebilmekte ayrıca AH'na doğru geçiş ise %80 güvenilirlik ile tahmin edilmektedir. Erken teşhis için hipokampal hacim ölçümü bu güne kadar AH'nın yapısal değişimini en iyi yansıtan biyomarkırdır [38, 39, 40].

Spesifik metabolik incelemeler: PET ve single photon emission computed tomography (SPECT) in vivo nükleer radioisotopik kan akımını (99mTc-HMPAO, 133Xe), ya da glikoz metabolizmasının ölçen (18F-FDG PET) yöntemlerdir. Son dönemde amiloid ve tau protein agregatlarını da ölçmektedir. SPECT daha yaygın ve kullanılabilirliği yüksek olmakla birlikte sensitive ve spesifitesi oldukça düşüktür. PET çalışmalarında bilateral temporal pariyetal bölgede ve posterior singulate'da azalmış glukoz metabolizması en sık bildirilen bulgudur. Patolojik tanı altın standart kabul edildiğinde, sensitivitesi % 88–95, spesifitesi % 62–74'dür. PET Lewy body demansını AH'den kolayca ayırabilmektedir (sensitivitesi % 86–92, spesifitesi % 80–81). Ancak PET çalışmaları vasküler demansı, AH'dan ayırmada sınırlı kalmaktadır (sensitivitesi % 75–88, spesifitesi %18–53).

Anormal BOS biyomarkırları (düşük $A\beta$ 1-42, artmış total ya da f-tau düzeyi): Amiloid β 1–42 ($A\beta$ 42) AH ile birlikte Lewy body, frontotemporal lobar dejenerasyon ve vasküler demansta da düzeyi azalmaktadır. Spesifitesinin olmaması pek açıklanamamakla birlikte

komorbid AH varlığı bir olasılıktır. BOS tau düzeyi Alzheimer ile birlikte diğer demanslarda da artmaktadır. Ancak fosforile tau düzeyine bakılması özgülüğü daha da arttırmaktadır. Her iki biyolojik markırın tanıda kullanımı sensitiviteyi % 85- 94'e, spesifiteyi ise % 83-100'e çıkartmaktadır. BOS'daki biyomarkırlarla ilgili yapılan bir çalışma prodromal evrede olguları tespit edebilir. Spesifite % 90, sensitivite ise % 85'in üzerindedir. Bu çalışma BOS biyomarkırlarını oldukça faydalı olabileceğini göstermesi açısından önemlidir.

Otozomal dominant mutasyonun ailede gösterilmesi: AH'da üç otozomal dominant mutasyon tanımlanmıştır. Kromozom 21'de (APP), Kromozom 1'de (PSEN1) ve kromozom 1'de (PSEN2). Aile bireylerinin birinde bu mutasyonun gösterilmesi, diğer bireylerin tanısında destekleyici bir bulgudur.

2.2. MikroRNA

miRNA'lar ilk kez *Caenorhabditis elegans*'ta hücrelerin gelişiminin araştırıldığı çalışmalarda keşfedilmiştir. Ambros ve ark tarafından *C. elegans*'ta gelişimsel süreçte zamanlamayı kontrol eden heterokronik genler olan *lin-4* ve *lin-14*'ten *lin-4*'ün *lin-14*'ü baskıladığı gösterilmiştir [41-43]. Ambros ve ark. *lin-4* genini klonlarken bu genin 22 nükleotidlik kodlanmayan bir dizi olduğunu göstermişlerdir [43]. Daha sonra Ruvkun ve ark. *lin-14* geninin 3'-UTR (Untranslated region: translasyon olmayan bölge) bölgesinde korunmuş dizilerin bulunduğunu, bu dizilerin *lin-4* dizisine komplementer olduğunu bildirdiler [44]. Bunun yanında *lin-4*'ün, *lin-28*'i de regüle ettiği Ambros ekibi tarafından gösterildi [45].

2000 yılında yine *C. elegans*'ta Ruvkun ve ekibi tarafından gelişimsel zamanlamayı kontrol eden, 21 nükleotid uzunluğundaki *let-7* isimli RNA molekülü keşfedilmiştir. *Let-7*'nin gelişimsel zamanlamayı kontrol eden diğer bir gen olan *lin-41*'i regüle ettiği gösterilmiştir [46, 47]. Aynı yıl içinde yine Ruvkun ve grubu *let-7* genlerinin bir çok hayvanda korunduğunu göstermiştir [48]. Günümüze kadar farklı türlerde toplam yaklaşık 21643 adet miRNA keşfedilerek miRNA veritabanı olan miRBase'e kaydedilmiştir (miRBase Release 18, Kasım 2011) [49].

2.2.1. miRNA Biyogenezi

miRNA'lar nükleer genomda tek tek ya da polisistronik olarak yerleşmişlerdir. RNA polimeraz II enzimi tarafından transkribe edilirler. Transkripsiyon sonucunda öncü miRNA molekülü elde edilir. Bir dizi enzimatik olay sonucunda matür formuna geçerek fonksiyonel hale gelir. Fonksiyonel hale gelen miRNA, RNA ile indüklenen susturma (RNA induced silencing complex; RISC) kompleksine katılarak hedef genlerinin ekspresyonlarını baskılayarak veya degrade ederek regüle eder.

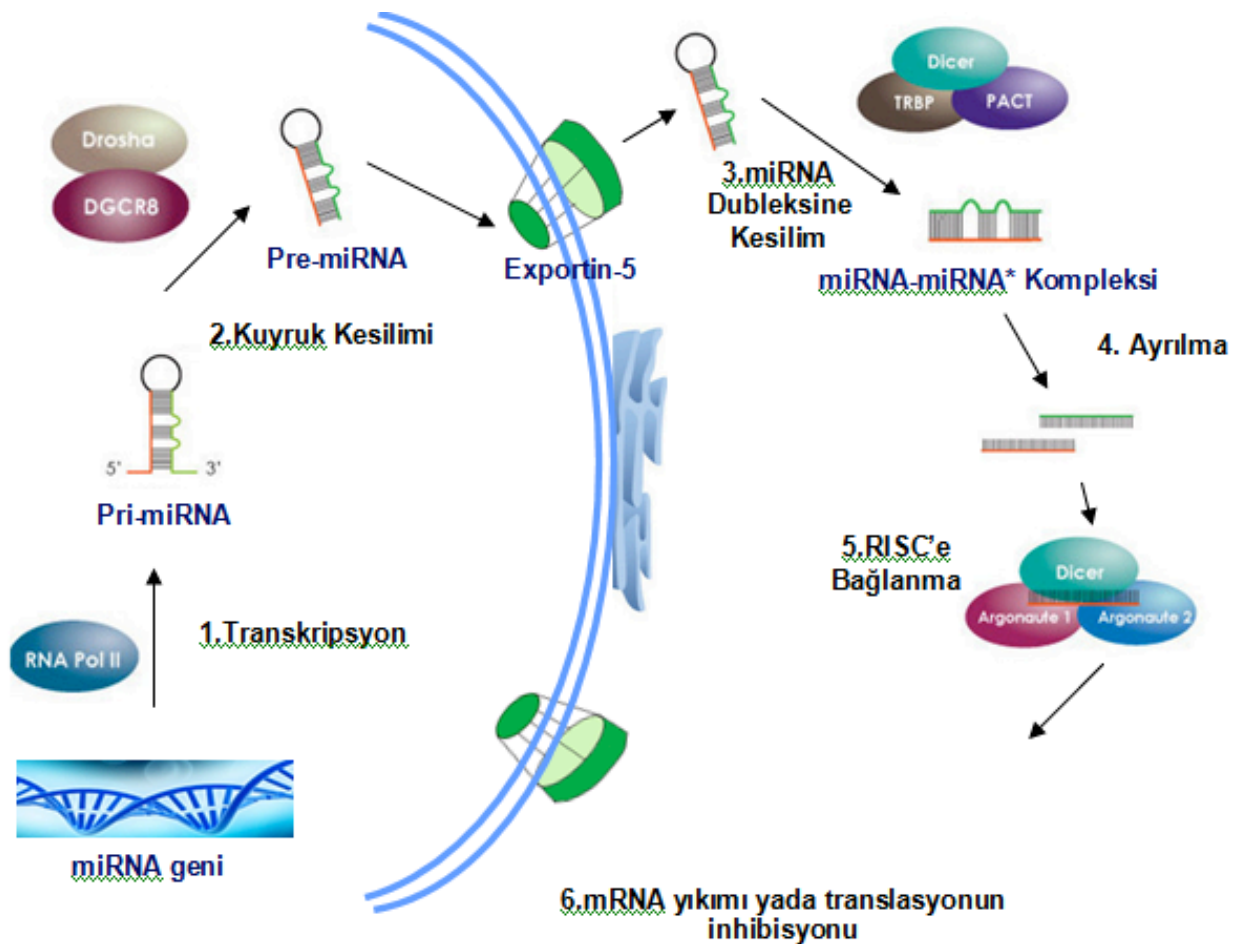
Klasik Yol

Nükleer genomda kodlanan miRNA genlerinden RNA polimeraz II enzimi aracılığıyla primer mikroRNA (pri-miRNA) formunda ilk molekül sentezlenmektedir [50]. Sentezlenen pri-miRNA 3-4 kilobaz boyutta ve 5' cap ve poli(A) içeren karmaşık sekonder yapıya sahiptir [50-53]. Elde edilen pri-miRNA bir sonraki basamakta yaklaşık 70 nükleotid boyutunda olan pre-miRNA (prekürsör miRNA) formuna mikroişlemci kompleks tarafından dönüştürülür. Bu kompleksin yapısında insanda Drosha ve DiGeorge sendrom kritik bölge gen 8 (DGCR8) proteinleri sineklerde ise Drosha ve Pasha (Partner of Drosha) proteinleri bulunmaktadır [53-59]. RNaz III ailesinin bir üyesi olan Drosha proteini mikroişlemci kompleksinde katalitik birim olarak iş görürken, DGCR RNA yapısını tanımaktadır. Pri-miRNA'nın mikroişlemci kompleksi tarafından kesilimi sırasında DGCR8'in tek ve çift iplikli RNA molekülünü tanımamasının ardından Drosha çift iplikli saçtokası yapıdaki molekülü keser ve 5' ucunda monofosfat, 3' ucunda 2 nükleotid hidroksil uzantısı bulunan pre-miRNA oluşmaktadır [60]. Oluşan pre-miRNA RAN-GTPaz ilişkili exportin-5 (Exp-5) aracılığıyla sitoplazmaya taşınır [60-64]. Exp-5'in pre-miRNA'ları taşıma görevinin yanında bağlandığı pre-miRNA'yı yıkımdan koruyucu etki gösterdiği öne sürülmüştür [65].

Sitoplazmaya gelen pre-miRNA diğer bir RNaz III enzimi olan Dicer ile işlem görek 22 nükleotidlik matür miRNA'ya dönüşür [65, 66]. Bu işlem sonrasında miRNA duplesi açılır ve RNA baskılanmasında görev alan kılavuz iplik ile miRNA* veya yolcu iplik olarak adlandırılan komplementer zincir açığa çıkar. Burada hangi ipliğin RISC kompleksine katılarak fonksiyonel olarak iş göreceği moleküllerin termodinamik özelliklerine bağlı olarak belirlenmektedir [67]. RISC kompleksi bir Ribonükleoprotein (RNP) kompleksidir, yapısında miRNA'nın yanında transactivation-responsive RNA-binding protein (TRBP), PKR aktive

edici protein (PACT) ve Argonaute-2 (Ago2) proteinleri bulunmaktadır. Bu kompleks; mRNA kesimi, translasyonel baskılama ve kromatin yapısının düzenlenmesi gibi fonksiyonları yönlendirmektedir [68-71]. Ago2 mutant organizmalarda yapılan çalışmalar RISC kesim aktivitesinde Ago2'nin doğrudan etkisinin olduğunu göstermiştir [72]. Ago proteinleri PAZ, mid ve PIWI gibi karakteristik bölgeler içermektedir ve bu bölgelerden PAZ bölgesi RNA'nın 3' ucunu tanıırken, Mid bölgesi 5' fosfata bağlanır.

miRNA/Ago RNP kompleksleri miRNA fonksiyonlarını yönlendiren efektör kompleksin ana bileşenidir [73]. Katalitik miRNA oluşumu sırasında kılavuz miRNA ipliğinin 5' ucunun Ago2 proteini ile bağlanması gerekmektedir [74]. Oluşan miRISC kompleksi hedef mRNA'nın 3'-UTR bölgesine bağlanarak genellikle ekspresyonu baskılar, ancak bazı durumlarda hedef genin aktivasyonunu sağladığı da görülmüştür [75].



Şekil 2: miRNA Biyogenezi

miRNA-RISC kompleksi oluşumunun ardından bu komplekslerin P- veya GW-cisimcikleri gibi yapılarda post-transkripsiyonel regülasyon fonksiyonlarını gösterdiği yönünde kanıtlar bulunmaktadır. P- cisimciklerinde hem mRNA yıkım olayı gerçekleşmekte hem de baskılanmış mRNA'lar depolanmaktadır [76-79]. P cisimciklerinin yapısında motor ve duyu polinöropati hastasının serumunda bulunan otoimmün antijen GW182 bulunmaktadır. Bu protein, P-cisimciklerine yerleşen Ago1 içeren susturucu komplekslerde bulunur [80, 81]. Bununla birlikte, P-cisimciklerinin sinapslarda keşfedilmesi ve nöronal farklılaşmada meydana gelen uyarılara verdikleri yanıtlar dolayısı ile nöronal farklılaşma, öğrenme ve bellek gibi mekanizmalarda rol alabilecekleri öne sürülmüştür [82, 83].

Drosha Bağımsız Yollar

Klasik miRNA biyogenez yoluna ek olarak Drosha bağımsız ve Dicer bağımsız yolların da miRNA biyogenezinde rol aldığı yapılan çalışmalarca gösterilmiştir.

Mirtronlar pre-miRNA'ların bir alt sınıfıdır ve biyogenezleri için RNA kesim işlemlerine bağımlı oldukları gösterilmiştir [84-86]. Mirtronlar saçtokası yapısı oluşturma potansiyeline sahip kısa intronik dizilerdir. Bu diziler mRNA'ların splicing aşamasında ortaya çıkarak pre-miRNA yapısını taklit eder. Bu yapısından dolayı Drosha ile işleme zorunluluğu ortadan kalkar, Exp-5 aracılığıyla sitoplazmaya taşınarak klasik miRNA biyogenez yolağına girer. Sonunda RISC kompleksine yüklenir [87]. Mirtronların keşfi pre-miRNA'ların özelliklerini taşıyan herhangi bir RNA'nın miRNA işleme mekanizması tarafından kullanılabilmesi ve işlevsel bir miRNA oluşabileceği konusunda fikir vermektedir [84-86].

Küçük nükleolar RNA'lar (Small nucleolar RNA; snoRNA) mikroşlemci kompleksten bağımsız olarak işlenebilen pre-miRNA'ların diğer bir kaynağıdır [88, 89]. Yaklaşık 70-200 nükleotid uzunlukta olan snoRNA'lar seçilmiş ribozomal RNA (rRNA) moleküllerinin enzimatik modifikasyonlarına rehberlik ederek küçük nükleolar ribonükleoprotein (small nucleolar ribonucleoprotein; snoRNP) kompleksleri olarak fonksiyon gösterir [90]. Ago1 ve Ago2 ile ilişkili küçük RNA'ların incelendiği çalışmada pre-miRNA'ya benzeyen yapılarda snoRNA'lar bulunmuştur. Bu çalışmanın sonucuna göre bu RNA'ların işlenmesi süreci

Dicer'a bağımlı ancak Drosha'dan bağımsız gerçekleşmektedir. Özetlemek gerekirse bazı snoRNA'lar kendi fonksiyonlarının dışında miRNA'lara kaynak olmaktadır [91].

Mürin γ -herpes virüsü 68 (MHV68) tarafından kodlanan miRNA'lar pol III tarafından transkribe edilerek tRNA ile bağımlı bir pre-miRNA yapısı oluştururlar [92-94]. Bu pre-miRNA'lar Drosha tarafından işlenmek yerine tRNA'yı 3' ucundan kesip, pre-miRNA hairpin yapısını serbest hale getiren tRNaz ile işlenirler. Daha sonra Dicer tarafından işlenip olgun viral miRNA'ları oluştururlar. Özetlemek gerekirse MHV68'in miRNA'ları Drosha bağımsız olup tRNaz ve Dicer'a bağımlıdır.

Dicer Bağımsız Yolaklar

miRNA biyogenezinin klasik yolunda rol alan Ago2 proteininin katalitik olarak görevi etkilenerek oluşturulan mutant farelerde küçük RNA bağlanması engellenerek RNA kesimi önlenmiştir [95]. Bu çalışmada, ayrıca, pre-miR-451'in Drosha tarafından üretildiği ve Dicer basamağı atlanarak doğrudan Ago2'ye yüklendiği bulunmuştur.

2.2.2. miRNA'ların Regülasyonu

Kodlanmayan RNA'lar genomda çok sayıda bulunmaktadır ve bu RNA'ların ekspresyonları internal ve eksternal olaylara bağımlı olarak sinyal yolları tarafından iyi kontrol edilmektedir [96]. Ökaryotik miRNA'lar genomda intergenik, intronik ve polisistronik olmak üzere 3 farklı şekilde kodlanmaktadır. miRNA'ların büyük bir kısmı kümelenmiş halde transkribe olmaktadır [97]. Kümelenmemiş miRNA'lar ise genomda ekzonik veya intronik olarak kodlanmaktadır [98].

Çoğu miRNA, sinyal yollarının en son aşamasında rol alan transkripsiyon faktörleri tarafından dokuya veya gelişimsel döneme özgü olarak eksprese edilir. Yapılan son çalışmalar miRNA'lar ve transkripsiyon faktörlerinin arasında regülatör bir bağ olduğunu göstermektedir. [96]. Bazı araştırmalar da miRNA ekspresyonlarının post-transkripsiyonel düzeyde de regüle edildiğini göstermektedir [99].

2.2.3. miRNA Deteksiyon Yöntemleri

miRNA ekspresyonları hücrelerin bulunduğu fizyolojik veya patolojik duruma göre değişiklikler sergilemektedir. Patolojik durumlar dolayısıyla, miRNA'ların biyomarkır olarak kullanımına yönelik çalışmalar günümüzde devam etmektedir. Bu sebeple hastalık patogenezinde rol alan miRNA'ların kesin olarak bilinmesi gerekmektedir. Ancak, miRNA deteksiyonu boyutlarının çok kısa oluşu ve guanin-sitozin (GC) içeriğinin çok değişken olması dolayısıyla teknik açıdan zorluklar yaratmaktadır.

miRNA ekspresyon düzeylerini belirlemeye yönelik çalışmalarda genellikle 200 nükleotitten küçük RNA'larca zenginleşmiş total RNA'lar kullanılmaktadır. Eğer belirli bir RNA ekspresyonu analiz edilecekse northern blot veya RNaz koruma testi (RNase protection assay; RPA) yöntemleri tercih edilir [100]. *In situ* hibridizasyon yöntemi de miRNA deteksiyonu amacıyla kullanılmaktadır [101]. Ancak, kullanılacak probun fazla olması ve elde edilen verinin az olması sebebiyle mikroarray ve kantitatif PCR (qPCR) yöntemleri daha sık kullanılmaktadır [102]. Bunların yanında gen ekspresyonunun seri analizi (Serial analysis of gene expression; SAGE) ve derin sekanslama teknikleri de global miRNA profillemeye çalışmalarında sıklıkla kullanılmaktadır.

Mikroarray

Mikroarray yöntemi genom çapında yapılan ekspresyon, mutasyon ve kromatin immün presipitasyonu gibi amaçlarla ortaya çıkan ucuz, hızlı ve güvenilir bir teknolojidir [103]. Yöntemdeki temel prensip analiz edilecek örnekte bulunan nükleik asitlerin çip üzerinde bulunan komplementer proplarla hibridizasyonudur. Hibridizasyon öncesinde analiz edilecek moleküller işaretlenir ve hibridizasyon sonrası işaretlenmiş moleküller mikroarray tarayıcı tarafından okunarak kantitasyon yapılır. Çip üzerinde binlerce dizi bulunduğu için aynı anda büyük bir miktarda transkript veya DNA molekülü analiz edilebilmektedir.

miRNA-mikroarray uygulamalarında izole edilen total RNA'da çoğunluk rRNA'lardan oluştuğundan dolayı 200 nükleotitten küçük RNA'larca zenginleştirme işlemi yapılmalıdır. Yapılan analizde yüksek kaliteli RNA kullanılması gerektiği için değişik yöntemlerle kalitenin belirlenmesi gerekmektedir [104]. Hibridizasyon aşamasının öncesinde

biyokimyasal reaksiyonlar yer almaktadır. Bu safhada analiz edilecek örnekler floresan işaretlenmiş nükleotidlerle çoğaltılır. Bu aşamada işaretleme 1-renk ve 2-renk olacak şekilde 2 yöntemle yapılmaktadır. 1-renk yönteminde tüm örnekler aynı renk ile işaretlenir ve her örnek ayrı çipe hibridize edilerek analiz gerçekleştirilir. Diğer yöntem olan 2-renk yönteminde ise kontrol ve kıyaslanacak örnek (ör: hasta, ilaç uygulanan vb.) farklı renklerle işaretlenir ve 2 örnek aynı çipe hibridize edilerek analiz yapılır. Hibridizasyon sonrası yıkama işlemleri gerçekleştirilir ve okumalar yapılır. Okuma işlemi lazer tarayıcılarla yapılarak analiz kısmında veri normalizasyonu, analizi ve istatistiksel analizler yapılmaktadır. Normalizasyon aşamasında çok farklı yöntemler kullanılmaktadır. Bunların en sık kullanılanları Quantile [105], Locally weighted regression and smoothing scatterplot (LOESS) [106], varyans stabilizasyonu [107] ve medyan normalizasyonlarıdır.

Kantitatif PCR

qPCR yöntemi miRNA ekspresyon analizlerinde genellikle doğrulama amacıyla yapılmaktadır. qPCR analizinde sırasıyla komplementer DNA (cDNA) sentezi, PCR yöntemiyle işaretli ürünlerin sentezi ve veri analizi olmak üzere 3 basamak vardır. İlk olarak cDNA sentezi aşamasında miRNA tamamen cDNA'ya çevrilmelidir. Ancak, miRNA'lar yaklaşık 22 nükleotidden oluştuğu için PCR ile amplifikasyonu çok zordur. Bu sebeple poli(A) polimeraz enzimi kullanılarak mRNA'nın 3' ucuna Poli(A) kuyruğu eklenmektedir. Bu basamaktan sonra universal primer bağlanma noktası içeren oligo d(T) sekanslarıyla cDNA sentezlenmektedir. cDNA sentez basamağının ardından PCR ile miRNA'ların çoğaltılması işlemi yapılır. Bu işlemde miRNA'nın 5' ucuna eşleşen primer ve universal primer kullanılır. İşaretleyerek çoğaltmak amacıyla da floresan ışığa yapan SYBR green I veya reaksiyon özgüllüğünü arttıran Taqman Probları içeren PCR karışımları kullanılmaktadır [108]. Reaksiyon sırasında her örneğin amplifikasyon eğrisi çizilmektedir. Bu eğride reaksiyonda oluşan ışığa miktarı gösterilmektedir. Oluşan ışığın PCR cihazında detekte edildiği eşik değerin okunduğu sıklusa Ct denmektedir. Gruplar arası ekspresyon miktarı kıyaslanırken reaksiyonda elde edilen Ct değerleri kullanılarak $\Delta\Delta Ct$ yöntemiyle analiz yapılmaktadır [109]. Analizde normalizasyon amacıyla bir housekeeping gen kullanılmaktadır. Bu sebeple, miRNA qPCR analizlerinde U6 gibi küçük RNA'lar kullanılmaktadır. Ancak birden fazla housekeeping genin kullanılması analizin özgüllüğünü arttırmaktadır [110, 111].

2.2.4. Alzheimer Hastalığında Ekspresyonu Değişen miRNA'lar

Giderek artan sayıda çalışma AH patogenezinin katılan proteinlerin ve yolların düzenlenmesine katılan çeşitli mikroRNA'ların varlığını ve mikroRNA ekspresyon değişikliklerini ortaya koymaktadır [112, 113]

Postmortem AH olgularının hastalıktan etkilenen hipokampus, temporal korteks ve medial frontal girus gibi beyin bölgelerinde ekspresyon değişikliği saptanmış olan miRNA'ların bir bölümü mir-146a gibi hastalık patogenezinin katılan inflamasyon ve oksidatif stres gibi süreçlerde rol oynamaktadır [114-117]. miR-146a beyinde inflamatuvar yanıtın önemli bir baskılayıcı molekül olan komplement faktör H'nin (CFH) translasyonunu baskılamaktadır. AH'de beyin miR-146a ekspresyonu artarken, CFH düzeyi azalmaktadır [117]. AH'de ekspresyon anormalliği gösteren miRNA'ların bir bölümü de nöral gelişim, nöronal farklılaşma ve sinaptik süreçlerde rol oynayan miRNA'lardır. Örneğin *axon guidance* sürecinde rol oynayan ve AH'de beyinde ekspresyonu artan *neuron navigator 3* AH'de beyin ekspresyonu azalan miR-29a'nın hedeflediği bir gen dir [118]. Bir başka örnek de beyinde yoğun bulunan ve sinir sisteminde işlev gördüğü düşünülen miR-9, miR-125b ve miR-138 mikroRNA'larının düzeyinin AH'da artışıdır [116, 119] (Tablo 1). AH'de miR-125b ekspresyon artışı astrogliozis ile ilişkili olabilir [120].

miR-138'in sıçan hipokampal nöronlarında dendritik spine büyüklüğünü negatif yönde düzenlediği bilinmektedir [121]. miR-29a'nın da aralarında bulunduğu ve AH'da beyin ekspresyon değişiklikleri bildirilen bir grup miRNA ise AH patogenezinin rol oynayan APP, BACE1 ve tau gibi genlerin translasyonunu baskılamaktadır. miR-29a'nın hedef genlerinden biri de BACE1'dir. Her ne kadar sporadik AH olgularında BACE1'e miR-29a'nın bağlanma bölgesinde varyantların hastalık riskini arttırmadığı saptanmışsa da [122], postmortem olarak AH'de miR-29a ekspresyonunun BACE1 ekspresyonunun artışıyla ters korele olarak azaldığı bildirilmiştir [123]. Hedefi yine BACE1 geni olan miR-107'nin beyin ekspresyonu da AH'de azalmaktadır [124, 125, 126]. miR-107'nin bir başka hedefi de, AH'de modifiye edici bir gen olarak rol oynadığı düşünülen granulindir [127]. Çift transgenik AH fare modelinde (APP^{sw}/PS1), beyinde BACE1 mRNA ve protein düzeyleri arasında korelasyonunun kaybolduğu saptanmıştır [128] (Tablo 1). Bu farelerin beyinlerinde ekspresyonu azalan miR-298 ve miR-328'in BACE1'i hedefleyen miRNA'lar olduğu belirlenmişti. Bu farklılıklar türler arası miRNA ekspresyon ve hedef gen profili farklılıklarının deneysel modellerde göz

önünde tutulması gerektiğini göstermektedir [112, 129].

Yeni bir çalışma da iki kodlamayan ve düzenleyici RNA grubunun (miRNA ve doğal antisense transkriptler) BACE1 ekspresyonunu düzenleme sürecinde etkileştiğini ortaya çıkarmıştır [130]. BACE1 antisense transkripti AH beyinlerinde artmakta ve BACE1'in miR-485-5p tarafından baskılanmasını önlemektedir.

AH olgularının beyinlerinde hedefi APP olan miRNA'ların ekspresyonlarında da değişiklik olduğunu postmortem yapılan çalışmalar göstermiştir. APP translasyonunu baskılayan miR-106'nın ekspresyonu sporadik AH olgularının beyinlerinde azalmaktadır [131]. APP'nin miR-106'nın hedef geni olduğu in vitro çalışmalarla doğrulanmıştır [132].

AH'nin çift transgenik (APP^{swe}/PSD^{DeltaE9}) fare modelinde ise beyin korteksinde miR-106 ekspresyonu 3. ve 6. aylarda artma gösterirken, 9. ayda azalmaktadır [133]. Bu farelerde miR-106'nın hedefi olan *transforming growth factor-beta* (TGF- β) ve *type II receptor* (T β R II) ekspresyon anormalliği de belirlenmiş ve miR-106 TGF- β sinyalleme yolunu da etkileyerek AH patogenezinde rol oynayabileceği düşünülmüştür. Özellikle yaşlanma sürecinin etkisini incelemek amacıyla kullanılacak bir başka AH modeli olan *senescence-accelerated mouse prone 8* (SAMP8) farelerin hipokampusunda APP düzeyi artmakta ve ekspresyon paterni kendisinin translasyonunu baskılayan miR-16 ekspresyonuyla ters korele olmaktadır [134]. Hedefi APP olan bir başka mikroRNA (miR-101) ise AH'de artmıştır [135, 136]. Öte yandan erişkin fare ön beyin nöronlarında dicer delesyonu anormal tau fosforilasyonuna ve nörodejenerasyona yol açmaktadır [137]. Tau fosforilasyonuna katılan enzimlerin transkriptom analizi bu sürece in vivo katılan kinazlardan birinin *extracellular regulated kinases 1* (ERK1) olabileceğini düşündürmektedir. miR-15 ailesinden mikroRNA moleküllerinin ERK1 translasyonunu baskılaması ve AH olgularının beyinlerinde miR-15 ekspresyonunun azalmış olması mikroRNA moleküllerinin tau fosforilasyonunu etkileyerek de nörodejenerasyonda rol oynayabileceğini düşündürmektedir [137]. AH'da tau protein degradasyonunda anormallikler de patogenezinde rol oynuyor olabilir. Tau degradasyonuna katılan *co-chaperone* BAG2 düzeyleri ise miR-128a tarafından düzenlenmektedir [138].

AH alanında miRNA çalışmalarının başlıca getirisi hastalığın patogenezinin daha iyi anlaşılabilmesini sağlamasıdır. AH'de miRNA ekspresyon değişikliklerinin mRNA değişikliklerine oranla farklı çalışmalar arasında daha az değişkenlik göstermesi bu

moleküllerin tanısal ve prognostik biyomarkır olarak kullanımını gündeme getirmektedir [139, 140]. Biyomarkır moleküllerin AH'de ayrıca tedavi yanıtlarını izlemede, olguları gruplandırmada ve tedavi yöntemlerinin seçiminde de kullanılabilmesi gereği vardır [141-143]. miRNA'ların biyomarkır olarak bu ölçütleri yerine getirip getirmeyeceği gelecekteki çalışmalarla belirlenecektir.

Tablo 1: Farklı AH çalışmalarında miRNA ekspresyon değişimleri

Referans	Örnek	miRNA Ekspresyon Değişimi
Lukiw 2007 [119]	5 AH, 5 kontrol, 5 fetal beyinin hipokampüsü	↑ miR-9, miR-128
Lukiw 2008 [117]	23 AH, 23 kontrolün hipokampus ve superior temporal lobu 6 AH, 6 IKB,	↑ miR-146a
Wang 2008 [126]	11 kontrolün temporal korteksi	↓ miR-107, miR-29a/b-1, miR-15a, miR-9, miR-19b
Hèbert 2008 [123]	5 AH, 5 kontrolün anterior temporal kompleksi	↓ let7i, miR-15a, miR-101, miR-106b, miR-22, miR-26b, miR-93, miR-181c, miR-210, miR-363 ↑ miR-197, miR-511, miR-320,
Schipper 2010 [113]	16 AH, 16 kontrolün alyuvarları	Çok sayıda
Hèbert 2009 [181]	19 AH, 11 kontrolün anterior temporal korteksi	↓ miR-106b
Sethi ve Lukiw 2009 [116]	6 AH, 13 kontrolün temporal lobu	↑ miR-9, miR-125b, miR-146a
Nomez-Iglesias 2010 [140]	5 AH, 5 kontrolün paritel lob korteksi	miR-629, miR-637, miR-657, miR-661, miR-09369, miR-15903, miR-44691
Shioya 2010 [118]	7 AH, 4 kontrolün frontal lobu	↓ miR-29a

Tablo 2: AH hayvan modellerinde miRNA ekspresyon değişimleri

Referans	Hayvan Modeli	miRNA Ekspresyon Değişimi
Wang 2010 [133]	Çift transgenik (APPswe ve PSΔE9)	↑ miR-106
Lui 2010 [134]	SAMP8 fare	↓ miR-16
Wang 2009 [158]	Çift transgenik (APPswe ve PSΔE9)	↑ miR-34a
Boissonneault 2009 [128]	Çift transgenik (Presenilin ve APP)	↓ miR-298, miR-328

Tablo 3: AH'de dolaşımdaki miRNA ekspresyon değişimleri

Referans	Örnek	miRNA Ekspresyon Değişimi
Schipper 2010 [113]	16 AH, 16 Kontrol Kan Hücreleri	↑ miR-34a, miR-181b, miR-579, miR-520h, miR-155, miR-517*, Let-7f, miR-200a, miR-371
Geekiyanage 2011 [182]	7 AH, 7 Kontrol Serum	↓ miR-137, miR-181c, miR-9, miR-29a, miR-29b
Oner, Genc 2011	10 AH, 10 Kontrol Serum	↑ miR-660, miR-15a, miR-1263, miR-20b, miR-324-3p, miR-92b, miR-30d, miR-3148, miR-126, miR-16 ↓ miR-1469, miR-663, miR-1915, miR-1825, miR-320c, miR-320b, miR-320a, miR-762, miR-1280, miR-129-3p

2.3. Dolaşımdaki miRNA'lar

miRNA'ların hücre içinde bulunduğunu gösteren çalışmalara ek olarak son dönemde yapılan çalışmalar önemli miktardaki miRNA'ların hücre dışında da bulunduğunu göstermiştir. Weber ve ark'larının yapmış olduğu çalışmada farklı vücut sıvılarında miRNA ekspresiyon profilleri gösterilmiştir [144]. Özellikle kanda DNA, mRNA ve diğer kodlamayan RNA'larla birlikte bulunan bu hücre dışı miRNA grubuna "dolaşımdaki miRNA'lar" (*circulating miRNAs*) adı verilmiştir [145].

Bir çok grup tarafından yapılan farklı çalışmalar bu miRNA grubunun kendine has özellikleri olduğunu göstermiştir. Bunların en başında dayanıklılık ve kararlılık gelmektedir. Dolaşımdaki RNazlar tarafından yıkıma uğramamakta, diğer kimyasal modifikasyonlara da direnç gösterebilmektedirler. Ayrıca pH değişikliklerine, dondurup-çözülmelere karşı da mRNA ve hücre içi miRNA'larına göre daha dayanıklıdırlar [3]. Tüm bu özelliklerinden dolayı dondurulmuş, parafine gömülmüş dokulardan, plazmadan, serumdan ve daha bir çok vücut sıvısından izole edilebilmektedirler [146, 147]. Bu kararlılık ve dayanıklılığın RNA bağlayan proteinlerle birlikte bulunmalarından ya da lipid ve lipoprotein birleşenlerinden oluşan mikroveziküller ya da ekzozomlar içinde taşınımından kaynaklandığı ileri sürülmektedir [3]. Bu tip veziküller içinde taşınarak hücreler arasında haberleşmeyi ve madde taşınımını sağladıkları da belirtilmiştir.

Ayrıca dolaşımdaki miRNA profilleri dokudaki profiller ile örtüşmekte ve bu tip miRNAların çeşitli hastalıkların tanısal biyomarkırı olarak kullanılabileceği fikrini akla getirmektedir. Yapılan çalışmalar kültüre edilmiş kanser hücrelerinde ve bunların ortamlarının süpernatantlarında; plazma/serum ve pek çok kansere ait tümör dokusunda ekspresyon profilleri korelasyon göstermektedir. Örneğin Chen ve ark. yaptığı çalışmada miR-17-92 sınıfı ve miR-17-5p'nin akciğer kanseri hastalarının hem serumunda hem de tümör dokularında artış gösterdiğini bulmuşlardır [148]. Başka bir çalışmada ise lenfoma hastalarında miR-155 seviyesi gerek dokuda gerekse hasta plazmalarında artış gözlenmiştir [149, 150, 151].

Tüm bu açılardan değerlendirilecek olduklarında dolaşımdaki miRNAların hücreler arası iletişim ve madde taşınımında rol oynamaları, dolaşımdaki kararlılıkları, dokunun

fizyolojik özellikleri ile örtüşecek şekilde profil göstermeleri bu moleküllerin hastalık tanısı ve seyrini yansıtabileceğini ve biyomarkır olarak kullanılacaklarını göstermektedir.

2.4. Alzheimerda Biyomarkır olarak MikroRNA

2.4.1. Alzheimer Hastalığında Biyomarkırlar

Biyomarkırlar (biyolojik göstergeler) biyolojik sistemlere yada olaylara ait göstergelerdir. Biyolojik sistemler; mutajenlere, karsinojenlere yada toksik etkenlere maruz kaldıklarında sistemde fizyolojik değişimler meydana gelmektedir. Biyomarkırlar sayesinde bu değişimler hücre, doku ve vücut sıvılarında ölçülebilmektedir.

Kesin tanısı ancak postmortem olarak yapılabilen AH'de, hastalığın tanısında ve tedavinin izlenmesi için geliştirilebilecek biyomarkırlar son derece önemlidir. AH'da biyomarkır erken dönemde tanının sağlanması, ayırıcı tanının yapılması, hastalığın seyrinin monitorize edilmesi ve tedaviye yanıtın değerlendirilmesi amacıyla kullanılabilir [152]. AH'da biyomarkır geliştirme konusunda yapılan çalışmalar artmış ve bu çalışmaların sonucu patent başvuruları da söz konusudur. Hatta 1998 yılında Amerika'da AH'da moleküler ve biyokimyasal markır geliştirilmesi konusunda bir grup oluşturulmuştur [153, 154]. Bu toplantıda ideal biyomarkır şöyle tanımlanmıştır:

1. AH'daki patoloji ile direkt ilgili olmalı
2. Markır hastalığa yakanlanma riskinden öte hastalığın göstergesi olmalı
3. Markır hastalığın erken evresinde hatta prelinik dönemde pozitif olmalı
4. Markır hastalığın şiddetini göstermeli
5. Diagnostik özelliği ile birlikte markır hastalığın tedaviye yanıtı konusunda bilgi vermeli
6. Nörolojik klinik bulgularla korele olmalı
7. Non-invaziv, ucuz ve tekrar örnek alımına izin vermelidir.

Bu özelliklerin tamamını karşılamasa da AH'da günümüze değin serum ve BOS'ta pek çok molekül biyomarkır olarak incelenmiştir. Biyomarkır araştırmalarını için BOS iyi bir başlangıç noktasıdır. BOS'da yapılan çalışmalarda artmış fosforile tau ve azalmış A β olası biyomarkırlardır. Her ikisinin birlikte kullanımı % 85 sensitivite ve spesifiteye sahiptir. Diğer demanslardan da ayırimda kullanılabilir [152].

2010 yılında Dubois tarafından AH'nın tanı kriterleri yeniden tanımlanmış ve BOS'taki artmış fosforile tau ve azalmış A β destekleyici bulgu olarak yerini almıştır [37]. BOS, AH'nın patolojisine uygun bir örnek gibi gözükse de elde edilme zorluğu söz konusudur. AH'da gözlenen değişikliklerin periferde yansıdığı gösterilmiştir [155]. Periferden elde edilen plazma, serum, lenfosit ve trombosit gibi örnekler AH'da biyomarkır geliştirme amacıyla kullanılmıştır. AH'da BOS'ta düzeyi incelenen pek çok molekülün düzeyine periferde de bakılmıştır [156, 157]. Pek çoğunun düzeyinde farklılıklar bulunmuştur. Örneğin, sporadik AH olgularında kan mononükleer hücrelerinde miRNA mikroarray analiziyle saptanan ve ardında qPCR ile doğrulanan anlamlı miRNA değişiklikleri miR-34a, 181b, 200a ve let-7f artışıdır [113] (Tablo 3). Her ne kadar periferik kan hücrelerinin miRNA ekspresyon değişiklikleri beyin ekspresyon değişikliklerini doğrudan yansıtmasa da, miR-34a artışı AH'nin çift transgenik (APP^{swe}/PS^{DeltaE9}) fare modelinde beyin korteksinde de saptanmıştır ve bcl-2 anti-apoptotik protein translasyonu miR-34a tarafından baskılanmaktadır [158]. Periferik kan hücrelerine oranla BOS nörodejeneratif hastalıklarda beyin miRNA ekspresyon değişikliklerinin daha doğrudan gösterebilir. AH'nın tanı kriterleri arasına giren A β 1-40 ve A β 1-42 düzeyi plazmada araştırılmış, ancak plazmada ölçümlerinin zor olduğu görülmüştür. Farklı grupların sonuçları arasında benzerlik bulunmamaktadır [157]. Moleküler biyolojide gözlenen gelişim AH'de biyomarkır araştırmalarına da yansımıştır. Pek çok genin ekspresyonunu aynı anda belirleyebilen mikroarray ve aynı anda pek çok proteinin ekspresyon değişiklikleri saptayabilen proteomiks yöntemleri AH'daki biyomarkır çalışmalarına yenilik katmıştır. AH'de yapılan mikroarray ve proteomiks çalışmalarında çok farklı gen ya da proteinin düzeyinde farklılık saptanmıştır. Bu nedenle bölgesel transkript analizleri daha olumlu sonuç verebileceği düşünülmüştür. Bu amaçla, senil plaklarda ve amiloid yumaklarda gen ekspresyon analiz çalışmaları yapılmıştır. Senil plaklardan yapılan analizlerde APP, tau, Bcl-2, bax, protein fosfataz, değişik iyonotropik glutamat reseptörlerinde ekspresyon artışı saptanırken, nörofilament alt birimleri ve glial fibrillar asidik protein (GFAP), interlökin-1 ve ileri glikasyon son ürün reseptörleri mRNA ekspresyonlarında azalma saptanmıştır. Nörofibriler yumaklardan yapılan analizlerde hücre iskelet elemanları, dopamin reseptörü ile ilişkili hastalıklarda pek çok transkriptin azaldığı gösterilmiştir. Fosfatazların ekspresyonundaki azalma AH'da gözlenen tau fosforilasyon artışından sorumludur [159].

AH'da mikroarray ve proteomiks çalışmalarında çok fazla gen ya da proteinde değişiklik saptanması biyomarkır çalışmaları açısından umutsuzluk yaratmıştır. Ancak Ray S. ve ark tarafından yapılan bir çalışmada hematopoez, immun sistem, apoptoz ve nöronal destekle görevli 18 proteinin plazma analizi ile erken evrede Alzheimer tanısına katkı sağlanabileceği öne sürülmüştür. Bu proteinlerden bazıları: Anjiopoetin2, C-C motifi taşıyan kemokinler, C-X-C motifi taşıyan kemokinler, G-CSF, GDNF, ICAM1, TNF- α , IL3, IL11, TRAIL R4 [160]. Hatta iki ayrı firma tarafından AH'nın tanısında kullanılmak üzere diagnostik kit piyasaya sürülmüş, ancak diğer araştırmacılar tarafından bu çalışma sonuçları tartışılır bulunmuştur. Sonuçta AH'da diagnostik biyomarkır ihtiyacı halan devam etmektedir.

2.4.2. Biyomarkır Olarak Dolaşımdaki miRNA'lar

Kan kaynaklı bir çok biyomarkır, genellikle dolaşımda bulunan patolojiye özgü proteinlerdir. Bugün bir çok kanser türü için karsinoembriyojenik antijen, prostat kanseri için prostata özgü antijen ve karaciğer fonksiyonları için ise aminotransferazlar biyomarkır olarak kullanılmaktadır. Kanın karmaşık protein içeriği, post-translasyonel modifikasyonların çeşitliliği, ilgilenilen proteinin düşük düzeyde bulunması, tür içi sekans farklılıkları, deteksiyonda kullanılacak ajanların geliştirilmesinin pahalı ve zaman alıcı olması protein yapıdaki biyomarkırların geliştirilmesindeki zorluklardan bazılarıdır [4].

Diğer yandan miRNA'ların pek çok vücut sıvısında bulunması, türler arası sekanslarının korunmuş olması, dokuya ya da biyolojik sürece paralel ekspresiyon sergilemeleri, polimeraz zincir reaksiyonu gibi bir çok basit yöntemler belirlenebilmeleri biyomarkır olabilmeleri için istenilen özelliklerdendir.

Bugüne kadar pekçok çalışma dolaşımdaki miRNA'ların biyomarkır olarak kullanılmasını araştırırken bir grup bilim adamı ise sağlıklı bireylerin dolaşımındaki miRNA profillerini incelemiştir. Bu bulgulara göre 5 farklı araştırma grubu dolaşımda 270 kadar miRNA ekspresiyonu gözlemlemiş bunlarda en anlamlı 20 tanesini şöyle sıralamıştır; let-7b, miR-16, miR-21, miR-223, miR-24, miR-25, miR-30d, miR-320, miR-106b, miR-142-3p, miR-15a, miR-183, miR-19b, miR-20a, miR-22, miR-26a, miR-451, miR-484, miR-92a [6, 148, 161, 162, 163, 164]. Çalışmalar sonucunda cinsiyetlerden kaynaklanan (gebelik hariç) bir profil farklılığı gözlemlenmemiştir [6, 148, 164].

Dolaşımdaki miRNA profilleri pek çok olgu çalışmasında ve hayvan modellerinde de incelenmiştir. Özellikle kanser tiplerinde miRNA ekspresyon profillerini inceleyen çalışmalar yapılmıştır. Bu kanser tipleri arasında kolorektal kanser [165, 166], akciğer kanseri [167, 168], karaciğer kanseri [169], over kanseri [170], prostat kanseri [171, 161], pankreas kanseri [172], lenfoma [173, 174] yer almaktadır.

Kanser dışı çalışmalar ise gebelikte [175, 176], miyokardial infarksiyonda [177], karaciğer hasarında [171, 178], sepsiste [179], romatoid artirte [180] miRNA değişimleri biyomarkır olarak incelenmiştir.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Araştırmanın Tipi:

Çalışma olgu-kontrol tipinde, deneysel bir çalışmadır.

3.2. Araştırmanın Yeri ve Zamanı:

Çalışmanın; katılımcılarla görüşme ve gönüllülerin nöropsikolojik olarak değerlendirilmesi kısmı Dokuz Eylül Üniversitesi, Nöroloji A.B.D. Demans polikliniğinde, alınan örneklerin analizi ise Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Öğrenme Kaynakları Merkezi Araştırma Laboratuvarı (ARLAB) da Ağustos 2011 - Kasım 2011 tarihleri arasında gerçekleştirilecektir.

3.3. Araştırmanın Evreni ve Örneklem

Dokuz Eylül Nöroloji A.B.D. Demans polikliniğinde izlenmekte olan NINCDS-ADRDA kriterlerine göre muhtemel Alzheimer tanısı almış hastalar (n=10) çalışmaya alınmıştır. Birinci derece akrabalı olmayan hasta yakınları ve çalışanların yakınları arasından gönüllü olan inme geçirmemiş ve diyabeti olmayan sağlıklı bireylerden (n=10) kontrol grubu oluşturulmuştur.

3.4. Çalışma Materyali:

Hasta ve kontrollerden alınan periferik kan örneklerinin serum kısmıdır.

3.5. Çalışmanın Değişkenleri:

- miRNA ekspresyon düzeyleri (bağımlı değişken)
- Alzheimer Hastalığı (bağımsız değişken)

- Yaş: Hasta ve/veya yakınlarına ve kontrollere yüz yüze görüşme sırasında sorularak elde edilmiştir.
- Cins: Kadın ve erkek olarak belirtilmiştir.
- Eğitim yılı: Hasta ve/veya yakınlarına ve kontrollere yüz yüze görüşme sırasında sorularak elde edilmiştir.
- Hastalık süresi: Hasta ve hasta yakınları ile yüz yüze görüşme sırasında ilk belirtilerin başladığı zaman sorularak elde edilmiştir.
- Bilişsel durum: Standardize mini mental test (SMMT) ile değerlendirilmiştir.

3.6. Veri toplama Araçları:

3.6.1. Demografik veri toplama

Çalışmaya Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik ve Laboratuvar Araştırmaları etik kurulu tarafından 11.11.2009 tarihinde 09-9/16 karar numarasıyla onay verilmiştir. Hastaların ve kontrollerin verileri 01.06.2011-31.08.2011 tarihleri arasında yüz yüze görüşme ile toplanarak nöropsikolojik değerlendirmeleri yapılmıştır.

3.6.2. Nöropsikolojik veri toplama

Hastalar ve kontroller yalnız bir defa görülmüştür. Bu görüşmeler sırasında hastaların klinik durumunu saptamak ve kontrollerin kognitif fonksiyonlarında yıkım olmadığını belirlemek amacıyla standart nöropsikolojik testler uygulanmıştır. Hafif kognitif bozulma (HKB) gözlenen olgular çalışmadan dışlanmıştır. Hasta ve kontrollere SMMT'i ile değerlendirilmiştir.

3.6.3. Kan Örneklerinden RNA İzolasyonu

Hasta ve kontrollerden alınan kan örnekleri (10cc) 4000g'de 10 dakika santrifüj edilerek serumlar ayrıldı, -80°C'de saklandı. Serumlardan total RNA mirVana PARIS izolasyon kiti ile üretici firmanın protokolüne göre izole edildi (Ambion, Amerika). 800 ul

hacmindeki örneğe eşit hacimde oda sıcaklığındaki 2x denature edici solüsyon eklendi. Daha sonra buz üzerinde 5 dakika inkübe edildi. Ekstraksiyon için toplam hacim kadar asit:fenol-kloroform eklendi. 45 saniye vortekslendi. 5 dakika oda sıcaklığında 11,000g'de karışımın organik fazının ayrılması için santrifüj edildi. Üst berrak faz yeni bir tüpe aktarıldı ve hacminin 1.25 katı kadar oda sıcaklığındaki 100% etanol eklenip iyice karıştırıldı. Daha sonra bu karışım (etanol/lizat) filtreden geçirildi. Filtre 700 µl “miRNA yıkama 1 solüsyonu” ile yıkandı. Bu işlem 2 kez “2/3 solüsyonu” ile tekrarlandı. Son basamakta ise RNA, 50µl RNaz içermeyen su ile filtreden toplandı. Elde edilen RNA'ların konsantrasyon ve kalite ölçümleri spektrofotometre (Agilent, ABD) ile yapıldı. Kalite kontrolü A_{260}/A_{280} oranı 1,8 ile 2,0 arasında olan örnekler kaliteli kabul edildi.

3.6.4. Mikroarray Analizi

Mikroarray analizi Aros (Danimarka) firması tarafından yapılmıştır. Mikroarray analizinde Affimetrix firmasınınca geliştirilen GeneChip miRNA 2.0 Array kullanılmıştır. Çip üzerinde bulunan proplar MirBase Release 15 (Nisan 2010)'da (<http://microrna.sanger.ac.uk/sequences/index.shtml>) bulunan tüm matür ve matür* dizilerin komplementer dizilerine göre dizayn edilmiş, toplam 131 organizmaya ait 15,644 prob setini içermektedir. Mikroarray analizine göre öncelikle RNA örnekleri çipe hibridize edildi ve problemlerin 5' uçlarında bulunan uzatma bölgeleri, hibridize olan RNA'ları primer olarak kullanarak, Klenow fragmanları ve biotinlenmiş nükleotidler kullanarak uzatıldı. Biotin görüntüleme işlemi ise Streptavidin-Phycoerythrin kullanılarak gerçekleştirildi.

3.6.5. miRNA Hedef Genleri Analizi

miRNA hedef genleri miRGen target veritabanı kullanılarak belirlenmiştir (<http://www.diana.pcbi.upenn.edu/cgi-bin/miRGen/v3/Targets.cgi>). Yapılan analizde AH ile ilişkili hedefler belirlenmiştir.

3.7. Araştırma Planı

Projelendirme	Ekim 2010
Örneklerin Toplanması	Ağustos 2011
Mikroarray Analizleri	Eylül-Ekim 2011
Biyoinformatik Analizler	Ekim-Kasım 2011
Tez yazımı	Kasım 2011

3.8. Verilerin Değerlendirilmesi

Araştırma sonuçlarının istatistik analizinde anlamlılık için student's t-test, her bir miRNA'nın diagnostik değerini belirlemek için mutual information (karşılıklı bilgi) analizi ve sınıflandırma kesinliğini artırmak için Destek Kuvvet Araçları (Super Vector Machines) kullanılarak miRNA motifleri (örüntüleri) ile örnekler sınıflandırılmıştır. Veriler ortalama \pm standart hata biçiminde verilmektedir. Tüm değerlendirmelerde $p < 0,05$ anlamlılık düzeyi olarak belirlenmiştir.

3.9. Araştırmanın sınırlılıkları

Çalışmanın örneklem grubunu genişleterek sonuçların tekrarlanabilirliği gösterilmelidir. Çalışmamızda saptadığımız anlamlı ekspresyon değişimi gösteren miRNAlar q-PCR ile doğrulanmalıdır. Bu şekilde çalışmanın güvenilirliği ve değeri artmış olacaktır. Tüm bunları desteklemek amacı ile AH fare modelinde de benzer analiz yapılabilir. Çalışma AH'ye yakalanma riski olan kişilere katkı sağlayacaktır. AH çok uzun yıllardır bilinen bir hastalık olmakla birlikte patogenezi yeni aydınlığa kavuşmaktadır. Patogenezi miRNA'ların rolü son yıllarda ortaya konmuştur. Bu çalışma ile AH'nin patogenezi yeni bir katkı sağlanmıştır.

3.10. Etik Kurul Onayı

Çalışmaya Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi İzmir 1 No'lu Klinik Araştırmalar etik kurulu tarafından 11.11.2009 tarihinde 09-9/16 karar numarasıyla onay verilmiştir.

4. BULGULAR

4.1. Demografik Veriler

Hasta grubuna ilişkin (n=10) veriler; SMMT skorları, yaş, hastalık başlangıç yaşı, cinsiyet ve tedavi amacı ile aldıkları ilaçların etken maddeleri Tablo 4’te verilmiştir.

Tablo 4: Hastaların (n=10) Demografik Verileri

Kod	SMMT	Yaş	Hastalık Başlangıç Yaşı	Cinsiyet	Tedavide Aldığı İlaç(lar) (Etken Madde)
Hasta 1	13	76	71	Kadın	Metoprolol Süksinat, Rivastigmin Hidrojen Tartarat, Memantin HCL
Hasta 2	28	76	75	Kadın	-
Hasta 3	19	89	84	Erkek	Sertralin,Donepezil HCL
Hasta 4	17	77	73	Kadın	Memantin, Essitalopram, Donepezil HCL
Hasta 5	20	78	65	Kadın	Memantin, Galantamin, Sertralin, Ketiapin
Hasta 6	17	73	70	Kadın	-
Hasta 7	22	85	77	Kadın	-
Hasta 8	0	73	69	Kadın	Donepezil HCL, Memantin, Essitalopram
Hasta 9	27	64	63	Erkek	Essitalopram, Klonazepam, Galantamin, Ketiapin
Hasta 10	11	78	75	Kadın	-

4.2. Alzheimer Hastalığında Ekspresyonu Değişen miRNA'ların Mikroarray Yöntemiyle Belirlenmesi

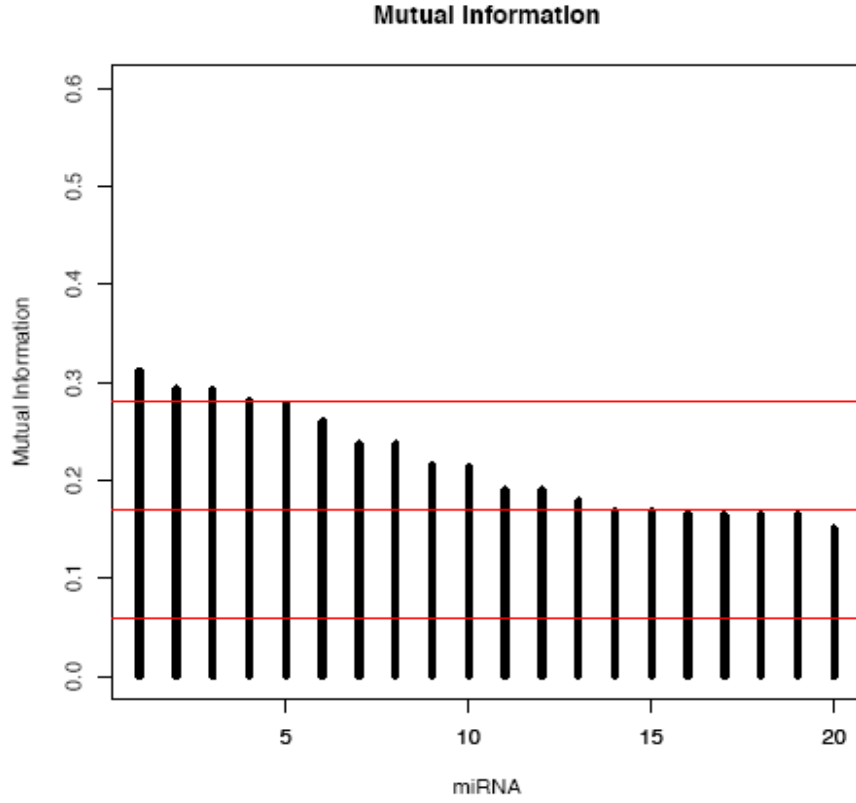
Alzheimer hasta ve kontrol serumlarından total RNA izole edilmiş ve konsantrasyonları Tablo 5'de gösterilmiştir. Bu örneklerden yapılan miRNA array sonucuna göre ekspresyonu en çok değişen 20 miRNA ise Tablo 6'de verilmiştir. Ekspresyonu değişen miRNA'ların 10 tanesinin ekspresyonu artarken, 10 tanesinin ise azalmış olduğu belirlenip, istatistiksel analize göre değişimlerde anlamlılık saptanmıştır.

Tablo 5: Total RNA izolasyonu sonucu örneklerin konsantrasyonları			
Örnek	A(260)*F Konsantrasyon ug/ml	Örnek	A(260)*F Konsantrasyon ug/ml
Kontrol 1	13,31	Hasta 1	11,87
Kontrol 2	11,02	Hasta 2	7,43
Kontrol 3	15,32	Hasta 3	12,33
Kontrol 4	12,92	Hasta 4	9,19
Kontrol 5	7,49	Hasta 5	11,49
Kontrol 6	8,04	Hasta 6	15,95
Kontrol 7	6,51	Hasta 7	23,90
Kontrol 8	6,90	Hasta 8	11,23
Kontrol 9	6,66	Hasta 9	9,98
Kontrol 10	6,42	Hasta 10	10,89

Tablo 6: Mikroarray sonucuna göre ekspresyonu değişen miRNA'lar

miRNA	p-Değeri	Kat Değişim
hsa-miR-1263	0,001	1,16
hsa-miR-663	0,002	0,44
hsa-miR-660	0,003	1,29
hsa-miR-1469	0,005	0,39
hsa-miR-20b	0,016	2,02
hsa-miR-1915	0,017	0,45
hsa-miR-1825	0,017	0,74
hsa-miR-320c	0,020	0,43
hsa-miR-320a	0,023	0,36
hsa-miR-324-3p	0,024	1,23
hsa-miR-92b	0,026	1,22
hsa-miR-762	0,031	0,46
hsa-miR-320b	0,034	0,43
hsa-miR-1280	0,034	0,72
hsa-miR-30d	0,037	1,35
hsa-miR-15a	0,039	1,56
hsa-miR-129-3p	0,043	0,90
hsa-miR-3148	0,044	1,21
hsa-miR-126	0,044	2,09
hsa-miR-16	0,046	6,16

“Mutual information (MI)” (karşılıklı bilgi), iki tane rasgele değişkenin karşılıklı bağlılığının ölçüsünü vermektedir diğer bir ifade ile bir bilinmeyenden diğerine doğru belirsizliği tanımlamaya çalışan yöntemdir. Bu analiz MATLAB, R PROJECT, SAS programlarında yapılabilmektedir. MI dönüşümü literatürde sıklıkla 2 tabanı kullanılarak işlem yapmaktadır. -1 değeri kontrol; 1 değeri ise hasta grubuna verilerek miRNA ekspresyonları belirli bir aralığa çekilmiş ve her bir miRNA için diagnostik biyomarkır olma olasılığı hesaplanmıştır. Bunun için 1000 miRNA seçilmiş ve her miRNA için sınıf etiketlerine göre örneklendirme yapılmıştır. Permutasyon testleri 0.06'lık bir ortalama MI değeri, 0.17 değerinde %95 lik bir dağılım ve 0.28 değerinde en yüksek rastgele MI değerini vermiştir. Başlangıçta t-testine göre anlamlı değişim gösteren 20 miRNA'dan 8'i yüksek MI değeri göstermiş ve Şekil 3'deki grafikte yüksek MI değerine sahip miRNA'lar gösterilmiştir.



Şekil 3. Bu çalışmada tüm miRNA ‘larından ikinci çizginin üzerindeki (0,17 olasılığının üzerindeki miRNA değerleri) değerlerin mutual information sonuçları gösterilmiştir. Var olan miRNA ölçümlerinden permütasyonla türetilen 1000 deneysel sonuç ile %95 üst sınır belirlenmiştir. Bu üst sınır değeri 0,17 ye karşılık gelmekte olup bu değer üstünde kalan 13 adet miRNA bulunmaktadır; miR-1826, miR-20a, miR-1263, miR-20b, miR-660, miR-3196, let-7b, miR-1469, miR-15a, miR-663, let-7i, miR-30d, miR-320c.

Daha sonra verilere Destek Kuvvet Araçları (Super Vector Machines) yöntemi uygulanmıştır. Bu yöntem verilerin sınıflandırılarak standardize edildiği, farklı ölçüm değerlerinden tek bir yorum çıkartmaya yönelik yapılan ileri analiz yöntemidir. Tüm miRNA'ların birlikte analiziyle sonuçta tek bir doğruluk ve geçerlilik değeri verir. Bizim çalışmamızda da miRNA'ların tahmin gücü istatistiksel yöntemlerle birleştirilerek sınıflandırma doğruluk oranı güçlendirilmeye çalışılmıştır. miRNA örnekleri 100 tekrar yapılarak SVM yöntemiyle sınıflandırılmıştır. Alt kümelerin seçimi t-testine dayanan bir yaklaşımla yapılmıştır. En anlamlı t değerlerine sahip olan miRNA'lar ile farklı denemeler yapılmıştır. 20 miRNA'dan 2'li, 3'lü, 4'lü, 5'li, 10'lu, 15'li, 20'li olarak alt kümelere SVM uygulanmıştır. 4 miRNA (miR-660, miR-663, miR-1263, miR-15a) içeren grupta bu hastalık açısından en iyi seçicilik 0.76, duyarlılık 0.83 değerleri saptanmıştır. Burdaki seçicilik sağlam bireyleri ayırt etme, duyarlılık ise hasta bireyleri ayırt etme özelliğidir.

4.3. Ekspresyon Değişimi Saptanan miRNA'ların Biyoinformatik Araçlarla Hedef Analizleri

Ekspresyonu anlamlı değişen miRNA'ların AH ile ilgili olan olası hedef genleri Tablo 7'de gösterilmiştir.

Tablo 7: AH'de Olası Hedef genler	
miRNA	Hedef Gen
miR-660	APP (Amiloid Prekürsör Protein)
miR-663	APOE (Apolipoprotein)
miR-20b	APP (Amiloid Prekürsör Protein)
miR-30d	PSEN2 (Presenilin 2) BACE2 (Beta Bölgesi APP Kesim Enzimi 2)
miR-15a	APP (Amiloid Prekürsör Protein) BACE1 (Beta Bölgesi APP Kesim Enzimi 1) BACE2 (Beta Bölgesi APP Kesim Enzimi 2)
miR-126	BACE1 (Beta Bölgesi APP Kesim Enzimi 1)
miR-16	APP (Amiloid Prekürsör Protein) BACE1 (Beta Bölgesi APP Kesim Enzimi 1) BACE2 (Beta Bölgesi APP Kesim Enzimi 2)

5. TARTIŞMA

Çalışmamızda Alzheimer hastalarının serumlarında ekspresyon düzeyleri değişen miRNA'lar mikroarray analizi ile belirlenmiş daha sonra ise biyoinformatik olarak SVM analizi ile biyomarkır olarak kullanılması mümkün olan miRNA'lar belirlenmiştir.

Mikroarray sonuçlarına göre 20 tane miRNA'nın ekspresyonunda anlamlı değişiklik saptanmıştır. Dört miRNA (miR-660, miR-663, miR-1263, miR-15a) bu hastalık açısından en iyi seçicilik 0.76, duyarlılık 0.83 değerlerine sahip miRNA'lardır. Bu dört miRNA literatürde tarandığında miR-15a'nın ekspresyon değişikliği gösterdiği farklı çalışmalara rastlanmıştır [123, 126].

Hèbert ve arkadaşları tarafından beş sporadik Alzheimer hastası ve beş kontrolün anterior temporal korteksinden yapılan çalışmada 328 miRNA'nın ekspresyon profili incelenmiştir. miR-15a'nın ekspresyonunun anlamlı azaldığı görülmüştür. Alzheimer ile bağlantılı hedef belirleme analizleri miRanda, Targetscan, Pictar ve miRbase veritabanları kullanılarak yapılmıştır. miR-15a'nın BACE1 ve APP'nin 3'UTR'sinde bağlanma bölgesinin olduğu belirlenmiştir [123]. miR-15a için aynı veri tabanlarını kullanarak yapmış olduğumuz hedef gen belirleme analizlerinde Hèbert'in çalışması ile paralel olarak bu miRNA'nın BACE1, BACE2 ve APP genlerini hedeflediğini gözlemlenmiştir.

Öte yandan miR-660, miR-663 ve miR-1263'ün Alzheimer'daki ekspresyon değişimlerine yönelik bir çalışmaya rastlanılmamıştır. Ancak miR-660'ın Mitchell ve ark. tarafından ksenogref prostat kanseri fare modelinde serumdaki hem miR-669 hem de miR-660 düzeyinin ksenogref fareleri kontrollerden 100% seçicilik ve 100% duyarlılıkla ayırdığını göstermişlerdir. Bu sonuç tümör dokusu ile de paralellik gösterdiği için, dolaşımdaki miRNAların kanseri teşhis için biyomarkır olabileceğini önesürmüşlerdir [161].

Karşılıklı bilgi (Mutual Information) analizine göre ise hasta ve kontrol grubu arasında değişim gösteren 13 miRNA belirlenmiştir; miR-1826, miR-20a, miR-1263, miR-20b, miR-660, miR-3196, let-7b, miR-1469, miR-15a, miR-663, let-7i, miR-30d, miR-320c. Bunlardan let-7i yine Hèbert'in aynı çalışmasında hastalarda anlamlı azalma göstermiştir ve hedef

belirleme analizlerine göre de APP'nin 3'UTR'sinde bağlanma bölgesinde bulunduğu belirlenmiştir [123].

Hèbert'in 2009 yılındaki 19 Alzheimer hastası ve 11 kontrolün anterior temporal korteksi ve serebellum örneklerini kullanarak yaptığı çalışmada ise miRNA'ların APP'nin gen ekspresyonuna katkısı incelenmiş ve miR-20a'nın APP ekspresyonunu regule ettiği gösterilmiştir [181].

Son olarak ise bizim çalışmamıza benzer şekilde serumdaki miRNA'ların Alzheimer hastalığı için biyomarkır olabileceğini ileri süren bir çalışma Geekiyanage tarafından yapılmıştır. Bu çalışmada yedi Alzheimer hastası ve yedi kontrolün serum örnekleri kullanılmıştır. Yapılan q-PCR analizi ile olası Alzheimer hastalarında miR-137, miR-181c, miR-9, miR-29a ve miR-29b'nin düzeylerinde anlamlı azalma gözlemlenmiştir. Aynı zamanda bu miRNA'ların hastalığın erken tanısı için kullanılabileceği önerilmiştir [182].

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışmamız kapsamında Alzheimer hastalarının serumlarında kontroller ile karşılaştırıldığında anlamlı olarak değişen 20 miRNA, miRNA mikroarray ile belirlenmiştir.

Daha sonra her bir miRNA'nın diagnostik biomarkır olma olasılığı karşılıklı bilgi analizi (MI) ile hesaplanmıştır. Fakat miRNA'lar tek tek kullanıldığında hasta ve kontrol grubunu ayırmada yeterli seçicilik ve duyarlılığı göstermediğinden SVM analizi kullanılarak miRNA'lar gruplandırılmış ve dört miRNA'yı içeren grup; miR-660, miR-663, miR-1263 ve miR-15a'nın bu hastalık açısından en iyi seçicilik 0.76, duyarlılık 0.83 değerlerini taşıdığı belirlenmiştir.

Ayrıca miRanda, Targetscan, Pictar ve miRbase veritabanları kullanılarak biyoinformatik olarak yapılan hedef gen analizlerine göre çalışmamızda kontrol grubuna göre anlamlı ekspresyon değişimi gösteren 20 miRNA'dan miR-660, miR-663, miR-15a, miR-16, miR-20b, miR-30d'nin AH ile ilişkili olası hedef genler olan APP, BACE1, BACE2, PSEN2'yi hedeflediği gösterilmiştir. Ancak bu hedefler öngörülen (Predicted) hedef olduğundan dolayı doğrulama deneyleri yapılmalıdır.

Bugüne kadar pek çok çalışma dolaşımdaki miRNA'ların özellikle kanser alanında biyomarkır olarak kullanılabileceğini göstermiş ancak Alzheimer hastalığında miRNA array analizi ile gösterilmesi ilk kez bu çalışma ile olmuştur.

Çalışmanın değerinin ve güvenilirliğinin artması amacı ile bu miRNA'lar için serumlardan q-PCR ile doğrulama deneyleri yapılmalıdır. Ayrıca örneklem grubunun genişletilmesi de sonuçların tekrarlanabilirliğini ölçmek amacı ile yararlı olabilir.

7. KAYNAKLAR

1. Davinelli S, Intrieri M, Russo C, Di Costanzo A, ve ark. The "Alzheimer's disease signature": potential perspectives for novel biomarkers. *Immun Ageing*. 2011 Sep 20;8:7.
2. Galimberti D, Scarpini E. Progress in Alzheimer's disease. *J Neurol*. 2011 Jun 25.
3. Duttagupta R, Jiang R, Gollub J, Getts RC, ve ark. Impact of cellular miRNAs on circulating miRNA biomarker signatures. *PLoS One*. 2011;6(6):e20769.
4. Etheridge A, Lee I, Hood L, Galas D, ve ark. Extracellular microRNA: A new source of biomarkers. *Mutat Res*. 2011 Dec 1;717(1-2):85-90.
5. Gilad S, Meiri E, Yogev Y, Benjamin S, ve ark. Serum microRNAs are promising novel biomarkers. *PLoS ONE* 2008, 3:e3148.
6. Reid G, Kirschner MB, van Zandwijk N. Circulating microRNAs: Association with disease and potential use as biomarkers. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2011 Nov;80(2):193-208.
7. O'Brien RJ, Wong PC. Amyloid precursor protein processing and Alzheimer's disease. *Annu Rev Neurosci*. 2011;34:185-204.
8. Glenner GG, Wong CW. Alzheimer's disease: initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein. *Biochem Biophys Res Commun*. 1984; 120:885–90.
9. Kang J, Lemaire HG, Unterbeck A, Salbaum JM, ve ark. The precursor of Alzheimer's disease amyloid A4 protein resembles a cell-surface receptor. *Nature*. 1987; 325:733–36.
10. Brookmeyer R, Johnson E, Ziegler-Graham K, Arrighi HM. Forecasting the global burden of Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement*. 2007; 3:186–91.

11. Bi X. Alzheimer disease: update on basic mechanisms. *J Am Osteopath Assoc.* 2010 Sep;110(9 Suppl 8):S3-9.
12. Güngen C, Ertan T, Eker E, Yaşar R, ve ark. Standardize Mini Mental Test'in Türk Toplumunda Hafif Demans Tanısında Geçerlik ve Güvenilirliği. *Türk Psikiyatri Dergisi.* 2002; 13(4):273-281.
13. Small GW, Rabins PV, Barry PP, Buckholtz NS, ve ark. Diagnosis and treatment of Alzheimer disease and related disorders. *JAMA.* 1997; 278,1363–1371.
14. McKhann G, Drachman D, Folstein M, Katzman R, ve ark. Clinical diagnosis of Alzheimer's disease report of the NINCDS-ADRDA Work Group under the auspices of Department of Health and Human Services Task Force on Alzheimer's Disease. *Neurology.* 1984; 34, 939–944.
15. Spires-Jones TL, Stoothoff WH, de Calignon A, Jones PB, ve ark. Tau pathophysiology in neurodegeneration: a tangled issue. *Trends Neurosci.* 2009, 32:150-9.
16. Hardy JA, Higgins GA. Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis. *Science.* 1992, 256:184-185.
17. Blennow K, de Leon MJ, Zetterberg H. Alzheimer's disease. *Lancet.* 2006, 368:387-403.
18. Pike KE, Savage G, Villemagne VL, ve ark. Betaamyloid imaging and memory in non-demented individuals: evidence for preclinical Alzheimer disease. *Brain.* 2007;130(pt 11):2837-2844
19. Aizenstein HJ, Nebes RD, Saxton JA, ve ark. Frequent amyloid deposition without significant cognitive impairment among the elderly. *Arch Neurol.* 2008;65(11):1509-1517.
20. Tomic JL, Pensalfini A, Head E, Glabe CG. Soluble fibrillar oligomer levels are elevated in Alzheimer disease brain and correlate with cognitive dysfunction. *Neurobiol Dis.* 2009;35(3):352- 358.

21. Evin G, Zhu A, Holsinger RM, Masters CL, ve ark. Proteolytic processing of the Alzheimer's disease amyloid precursor protein in brain and platelets. *J Neurosci Res.* 2003; 74(3),386-92.
22. Castellani RJ, Nunomura A, Lee H, Perry G, ve ark. Phosphorylated tau: toxic, protective, or none of the above. *J. Alzheimers Dis.* 14, 377-383 (2008).
23. Hernandez F, Avila J. Tauopathies. *Cell Mol Life Sci.* 2007, 64:2219-2233.
24. Hanger DP, Byers HL, Wray S, Leung KY, ve ark. Novel phosphorylation sites in tau from Alzheimer brain support a role for casein kinase 1 in disease pathogenesis. *J Biol Chem* 2007, 282:23645-23654.
25. Arriagada PV, Growdon JH, Hedley-Whyte ET, Hyman BT. Neurofibrillary tangles but not senile plaques parallel duration and severity of Alzheimer disease. *Neurology.* 1992;42(3 pt 1):631-639.
26. Gomez-Isla T, Hollister R, West H, ve ark. Neuronal loss correlates with but exceeds neurofibrillary tangles in Alzheimer disease. *Ann Neurol.* 1997;41(1):17-24.
27. Yates D. Mcloughlin D.M. The molecular pathology of Alzheimer's disease. *Psychiatry.* 2007; 7,1-5.
28. Wolk DA, Dickerson BC. Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative: Apolipoprotein E (APOE) genotype has dissociable effects on memory and attentional-executive network function in Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2010, 107:10256-10261.
29. Harold D, Abraham R, Hollingworth P, Sims R, ve ark. Genome-wide association study identifies variants at CLU and PICALM associated with Alzheimer's disease. *Nature Genet* 2009, 41:1088-93.
30. Harel A, Wu F, Mattson MP, Morris CM, ve ark. Evidence for CALM in directing VAMP2 trafficking. *Traffic.* 2008, 9:417-429.

31. Yao PJ, Petralia RS, Bushlin I, Wang Y, ve ark. Synaptic distribution of the endocytic accessory proteins AP180 and CALM. *J Comp Neurol*. 2005, 481:58-69.
32. Naj AC, Jun G, Beecham GW, Wang LS, ve ark. Common variants at MS4A4/MS4A6E, CD2AP, CD33 and EPHA1 are associated with late-onset Alzheimer's disease. *Nat Genet*. 2011, 43:436-41.
33. Kim M, Suh J, Romano D, Truong MH, ve ark. Potential late-onset Alzheimer's disease-associated mutations in the ADAM10 gene attenuate α -secretase activity. *Hum Mol Genet*. 2009;18 (20):3987-96.
34. Lee J, Chan SL, Mattson MP, Adverse effect of a presenilin-1 mutation in microglia results in enhanced nitric oxide and inflammatory cytokine responses to immune challenge in the brain. *Neuromolecular Med*. 2002; 2(1), 29-45.
35. Sala G, Galimberti G, Canevari C, Raggi ME, ve ark. Peripheral cytokine release in Alzheimer patients: correlation with disease severity, *Neurobiology of Aging*. 2003; 24, 909–914.
36. Kirk R, Daffner KR. Current Approaches to the Clinical Diagnosis of Alzheimer's Disease, ed: Early diagnosis of Alzheimer's disease. Humana Press, New York, 2000; Pp:29
37. Dubois B, Feldman HH, Jacova C, Cummings JL, ve ark. Revising the definition of Alzheimer's disease: a new lexicon. *Lancet Neurol*. 2010 Nov;9(11):1118-27.
38. Demarin V, Zavoreo I, Kes VB, Simundić AM. Biomarkers in Alzheimer's disease. *Clin Chem Lab. Med*. 2011 May;49(5):773-8.
39. Csernansky JG, Wang L, Swank J, Miller JP, ve ark. Preclinical detection of Alzheimer's disease: hippocampal shape and volume predict dementia onset in the elderly. *Neuroimage*. 2005;25:783–92.

40. Hsu YY, Schuff N, Du AT, Mark K, ve ark. Comparison of automated and manual MRI volumetry of hippocampus in normal aging and dementia. *J Magn Reson Imaging*. 2002;16:305–10.
41. Ambros V. A hierarchy of regulatory genes controls a larva-to-adult developmental switch in *C. elegans*. *Cell*. 1989;57(1):49-57.
42. Ruvkun G, Giusto J. The *Caenorhabditis elegans* heterochronic gene *lin-14* encodes a nuclear protein that forms a temporal developmental switch. *Nature*. 1989;338(6213):313-9.
43. Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*. 1993;75(5):843-54.
44. Wightman B, Bürglin TR, Gatto J, Arasu P ve ark. Negative regulatory sequences in the *lin-14* 3'-untranslated region are necessary to generate a temporal switch during *Caenorhabditis elegans* development. *Genes Dev*. 1991;5(10):1813-24.
45. Moss EG, Lee RC, Ambros V. The cold shock domain protein LIN-28 controls developmental timing in *C. elegans* and is regulated by the *lin-4* RNA. *Cell*. 1997;88(5):637-46.
46. Reinhart BJ, Slack FJ, Basson M, Pasquinelli AE ve ark. The 21-nucleotide *let-7* RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*. 2000;403(6772):901-6.
47. Slack FJ, Basson M, Liu Z, Ambros V ve ark. The *lin-41* RBCC gene acts in the *C. elegans* heterochronic pathway between the *let-7* regulatory RNA and the LIN-29 transcription factor. *Mol Cell*. 2000;5(4):659-69.
48. Pasquinelli AE, Reinhart BJ, Slack F, Martindale MQ ve ark. Conservation of the sequence and temporal expression of *let-7* heterochronic regulatory RNA. *Nature*. 2000;408(6808):86-9.

- 49.Griffiths-Jones S, Grocock RJ, van Dongen S, Bateman A, Enright AJ. miRBase: microRNA sequences, targets and gene nomenclature. *Nucleic Acids Res.* 2006;34(Database issue):D140.
50. Lee Y, Kim M, Han J, Yeom KH ve ark. MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *EMBO J.* 2004;23:4051-60.
- 51.Lee Y, Jeon K, Lee JT, Kim S ve ark. MicroRNA and maturation: stepwise processing and subcellular localization. *EMBO J.* 2002;21:4663-70.
- 52.Cai X, Hagedorn CH, Cullen BR. Human microRNAs are processed from capped, polyadenylated transcripts that can also function as mRNAs. *RNA* 2004;10:1957-1966.
- 53.Saini HK, Griffiths-Jones S, Enright AJ. Genomic analysis of human microRNA transcripts. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2007;104:17719-24.
- 54.Lee Y, Ahn C, Han J, Choi H ve ark. The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature.* 2003;425:415-9.
- 55.Denli AM, Tops BB, Plasterk RH, Ketting RF ve ark. Processing of primary microRNAs by the Microprocessor complex. *Nature.* 2004;432:231-5.
- 56.Gregory RI, Yan KP, Amuthan G, Chendrimada T ve ark. The microprocessor complex mediates the genesis of microRNAs. *Nature.* 2004;432:235-40.
- 57.Han J, Lee Y, Yeom KH, Kim YK ve ark. The Dorsha-DGCR8 complex in primary microRNA processing. *Genes Dev.* 2004;18:3016-27.
- 58.Landthaler M, Yalcin A, Tuschl T. The human DiGeorge syndrome critical region gene 8 and its *D. melanogaster* homolog are required for miRNA biogenesis. *Curr Biol.* 2004;14:2162-2167.
- 59.Zeng Y, Yi R, Cullen BR. Recognition and cleavage of primary microRNA precursors by the nuclear processing enzyme Drosha. *EMBO J.* 2005;24:138-148.

60. Han J, Lee Y, Yeom KH, Nam JW ve ark. Molecular basis for the recognition of primary microRNAs by the Drosha-DGCR8 complex. *Cell*. 2006;125:887-901.
61. Brownawell AM, Macara IG. Exportin-5, a novel karyopherin, mediates nuclear export of double-stranded RNA binding proteins. *J Cell Biol*. 2002;156:53-64.
62. Yi R, Qin Y, Macara IG, Cullen BR. Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs. *Genes Dev*. 2003;17:3011-6.
63. Bohnsack MT, Czaplinski K, Gorlich D. Exportin 5 is a RanGTP-dependent dsRNA binding protein that mediates nuclear export of pre-miRNAs. *RNA*. 2004;10:185-1.
64. Lund E, Güttinger S, Calado A, Dahlberg JE ve ark. Nuclear export of microRNA precursors. *Science*. 2004;303:95-8.
65. Hutvágner G, McLachlan J, Pasquinelli AE, Bálint E ve ark. A cellular function for the RNA-interference enzyme Dicer in the maturation of the let-7 small temporal RNA. *Science*. 2001;293(5531):834-8.
66. Ketting RF, Fischer SE, Bernstein E, Sijen T ve ark. Dicer functions in RNA interference and in synthesis of small RNA involved in developmental timing in *C. elegans*. *Genes Dev*. 2001;15(20):2654-9.
67. Khvorova A, Reynolds A, Jayasena SD. Functional siRNAs and miRNAs exhibit strand bias. *Cell*. 2003;115:209-16.
68. Chendrimada TP, Gregory RI, Kumaraswamy E, Norman J ve ark. TRBP recruits the Dicer complex to Ago2 for microRNA processing and gene silencing. *Nature*. 2005;436:740-
69. Diederichs S, Haber DA. Dual role for argonautes in microRNA processing and posttranscriptional regulation of microRNA expression. *Cell*. 2007;131:1097-108.

70. Hammond SM, Bernstein E, Beach D, Hannon GJ. An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells. *Nature*. 2000;404:293-6.
71. Lee Y, Hur I, Park SY, Kim YK ve ark. The role of PACT in the RNA silencing pathway. *EMBO J*. 2006;25:522-32.
72. Liu J, Carmell MA, Rivas FV, Marsden CG ve ark. Argonaute2 is the catalytic engine of mammalian RNAi. *Science*. 2004;305:1437-41.
73. Kirino Y, Mourelatos Z. Site-specific crosslinking of human microRNPs to RNA targets. *RNA*. 2008;14:2254-9.
74. Ma JB, Yuan YR, Meister G, Pei Y ve ark. Structural basis for 5'-end-specific recognition of guide RNA by the *A. fulgidus* Piwi protein. *Nature*. 2005;434(7033):666-70.
75. Cordes KR, Srivastava D. MicroRNA regulation of cardiovascular development. *Circ Res*. 2009;104(6):724-32.
76. Chan SP, Slack FJ. MicroRNA-mediated silencing inside P-bodies. *RNA Biol*. 2006;3:97-100.
77. Ding L, Han M. GW182 family proteins are crucial for microRNA-mediated gene silencing. *Trends Cell Biol*. 2007;17:411-6.
78. Liu J, Valencia-Sanchez MA, Hannon GJ, Parker R. MicroRNA-dependent localization of targeted mRNAs to mammalian P-bodies. *Nat Cell Biol*. 2005;7:719-723.
79. Liu J, Rivas FV, Wohlschlegel J, Yates JR, ve ark. A role for the P-body component GW182 in microRNA function. *Nat Cell Biol*. 2005;7:1261-1266.
80. Bhanji RA, Eystathioy T, Chan EK, Bloch DB, ve ark. Clinical and serological features of patients with autoantibodies to GW/P bodies. *Clin Immunol*. 2007;125:247-56.

81. Eystathioy T, Chan EK, Tenenbaum SA, Keene JD ve ark. A phosphorylated cytoplasmic autoantigen, GW182, associates with a unique population of human mRNAs within novel cytoplasmic speckles. *Mol Biol Cell*. 2002;13:1338-51.
82. Cougot N, Bhattacharyya SN, Tapia-Arancibia L, Bordonné R ve ark. Dendrites of mammalian neurons contain specialized P-body-like structures that respond to neuronal activation. *J Neurosci*. 2008;28(51):13793-804.
83. Hillebrand J, Barbee SA, Ramaswami M. P-body components, microRNA regulation, and synaptic plasticity. *Scientific World Journal*. 2007;7:178-90.
84. Berezikov E, Chung WJ, Willis J, Cuppen E ve ark. Mammalian mirtron genes. *Mol Cell*. 2007;28:328-36.
85. Okamura K, Hagen JW, Duan H, Tyler DM ve ark. The mirtron pathway generates microRNA-class regulatory RNAs in *Drosophila*. *Cell*. 2007;130:89-100.
86. Ruby JG, Jan CH, Bartel DP. Intronic microRNA precursors that bypass Drosha processing. *Nature*. 2007;448:83-6.
87. Miyoshi K, Miyoshi T, Siomi H. Many ways to generate microRNA-like small RNAs: non-canonical pathways for microRNA production. *Mol Genet Genomics*. 2010;284(2):95-103.
88. Ender C, Krek A, Friedländer MR, Beitzinger M ve ark. A human snoRNA with microRNA-like functions. *Mol Cell*. 2008;32:519-28.
89. Saraiya AA, Wang CC. snoRNA, novel precursor of microRNA in *Giardia lamblia*. *PLoS Pathog*. 2008; 4:e1000224.
90. Matera AG, Terns RM, Terns MP. Non-coding RNAs: lessons from the small nuclear and small nucleolar RNAs. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2007; 8:209–220.

91. Taft RJ, Glazov EA, Lassmann T, Hayashizaki Y ve ark. Small RNAs derived from snoRNAs. *RNA*. 2009;15:1233–1240.
92. Pfeffer S, Zavolan M, Grässer FA, Chien M ve ark. Identification of virus-encoded microRNAs. *Science*. 2004; 304:734–736.
93. Pfeffer S, Sewer A, Lagos-Quintana M, Sheridan R ve ark. Identification of microRNAs of the herpesvirus family. *Nat Methods*. 2005; 2:269–276.
94. Bogerd HP, Karnowski HW, Cai X, Shin J ve ark. A mammalian herpesvirus uses noncanonical expression and processing mechanisms to generate viral microRNAs. *Mol Cell*. 2010; 37:135–142.
95. Cheloufi S, Dos Santos CO, Chong MM, Hannon GJ. A dicer independent miRNA biogenesis pathway that requires Ago catalysis. *Nature*. 2010; 465:584–589.
96. Saj A, Lai EC. Control of microRNA biogenesis and transcription by cell signaling pathways, *Curr Opin Genet Dev*. 2011, doi:10.1016/j.gde.2011.04.01.
97. Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*. 2004;116(2):281-97.
98. Aboobaker AA, Tomancak P, Patel N, Rubin GM ve ark. Drosophila microRNAs exhibit diverse spatial expression patterns during embryonic development. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2005;102:18017–18022.
99. Garzon R, Pichiorri F, Palumbo T, Iuliano R ve ark. MicroRNA fingerprints during human megakaryocytopoiesis. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2006;103(13):5078-83.
100. Valoczi A, Hornyik C, Varga N, Burgyan J ve ark. Sensitive and specific detection of microRNAs by northern blot analysis using LNA-modified oligonucleotide probes. *Nucleic Acids Research*. 2004;32:e175.

101. Gupta A, Mo YY. Detection of microRNAs in cultured cells and paraffin-embedded tissue specimens by in situ hybridization. *Methods in Molecular Biology*. 2010;676:73-83.
102. Krichesky AM, King KS, Donaheue CP, Khrapko K ve ark. A microarray reveals extensive regulation of microRNA during brain development. *RNA*. 2003;9:1274-1281.
103. Shena M, Shalon D, Davis R, Brown PA. Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science*. 1995;270:467-470.
104. Ranade AR, Weiss GJ. Methods for microRNA microarray profiling. *Methods Mol Biol*. 2011;700:145-52.
105. Bolstad BM, Irizarry RA, Astrand M, Speed TP. A comparison of normalization methods for high density oligonucleotide array data based on variance and bias. *Bioinformatics*. 2003;19:185-193.
106. Steinhoff C, Vingron M. Normalization and quantification of differential expression in gene expression microarrays. *Brief Bioinformatics*. 2006;7:166-177.
107. Sarkar D, Parkin R, Wyman S, Bendoraite A ve ark. Quality assessment and data analysis for microRNA expression arrays. *Nucleic Acids Research*. 2009;37:e17.
108. Kutuyavin IV, Afonina IA, Hown W, Lukhtanoc EA ve ark. 3'-minor groove binder-DNA probes increase sequence specificity at PCR extension temperatures. *Nucleic Acids Research*. 2000;28:655-661.
109. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time PCR and the $2^{-\Delta\Delta C(T)}$ method. *Methods*. 2001;25:402-408.
110. Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B ve ark. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol*. 2002;3(7):RESEARCH0034.

111. Andersen CL, Jensen JL, Ørntoft TF. Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. *Cancer Res.* 2004;64(15):5245-50.
112. Provost P. MicroRNAs as a molecular basis for mental retardation, Alzheimer's and prion diseases. *Brain Res.* 2010;1338:58-66.
113. Schipper HM, Maes OC, Chertkow HM, Wang E. MicroRNA expression in Alzheimer blood mononuclear cells. *Gene Regul Syst Bio.* 2007;1:263-74.
114. Hill JM, Zhao Y, Clement C, Neumann DM, ve ark. HSV-1 infection of human brain cells induces miRNA-146a and Alzheimer-type inflammatory signaling. *Neuroreport.* 2009;20:1500-5.
115. Pogue AI, Li YY, Cui JG, Zhao Y, ve ark. Characterization of an NF-kappaB-regulated, miRNA-146a-mediated down-regulation of complement factor H (CFH) in metal-sulfate-stressed human brain cells. *J Inorg Biochem.* 2009;103(11):1591-5.
116. Sethi P, Lukiw WJ. Micro-RNA abundance and stability in human brain: specific alterations in Alzheimer's disease temporal lobe neocortex. *Neurosci Lett.* 2009;459(2):100-104.
117. Lukiw WJ, Zhao Y, Cui JG. An NF-kappaB-sensitive micro RNA-146a-mediated inflammatory circuit in Alzheimer disease and in stressed human brain cells. *J Biol Chem.* 2008;283(46):31315-31322.
118. Shioya M, Obayashi S, Tabunoki H, Arima K, ve ark. Aberrant microRNA expression in the brains of neurodegenerative diseases: miR-29a decreased in Alzheimer disease brains targets neurone navigator 3. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 2010;36:320-30.

119. Lukiw WJ. Micro-RNA speciation in fetal, adult and Alzheimer's disease hippocampus. *Neuroreport*. 2007;18:297-300.
120. Pogue AI, Cui JG, Li YY, Zhao Y, ve ark. MicroRNA-125b (miRNA-125b) function in astrogliosis and glial cell proliferation. *Neurosci Lett*. 2010;476:18-22.
121. Siegel G, Obernosterer G, Fiore R, Oehmen M, ve ark. A functional screen implicates microRNA-138-dependent regulation of the depalmitoylation enzyme APT1 in dendritic spine morphogenesis. *Nat Cell Biol*. 2009;11:705-16.
122. Bettens K, Brouwers N, Engelborghs S, Van Miegroet H, ve ark. APP and BACE1 miRNA genetic variability has no major role in risk for Alzheimer disease. *Hum Mutat*. 2009;30:1207-13.
123. Hébert SS, Horr  K, Nicolai L, Papadopoulou AS, ve ark. Loss of microRNA cluster miR-29a/b-1 in sporadic Alzheimer's disease correlates with increased BACE1/beta-secretase expression. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105:6415-20.
124. Nelson PT, Dimayuga J, Wilfred BR. MicroRNA in situ hybridization in the human entorhinal and transentorhinal cortex. *Front Hum Neurosci*. 2010;4:7.
125. Nelson PT, Wang WX. MiR-107 is reduced in Alzheimer's disease brain neocortex: validation study. *J Alzheimers Dis*. 2010;21(1):75-9.
126. Wang WX, Rajeev BW, Stromberg AJ, Ren N, ve ark. The expression of microRNA miR-107 decreases early in Alzheimer's disease and may accelerate disease progression through regulation of beta-site amyloid precursor protein-cleaving enzyme 1. *J Neurosci*. 2008;28(5):1213-1223.
127. Wang WX, Wilfred BR, Madathil SK, Tang G, ve ark. miR-107 regulates granulin/progranulin with implications for traumatic brain injury and neurodegenerative disease. *Am J Pathol*. 2010;177(1):334-345.

128. Boissonneault V, Plante I, Rivest S, Provost P. MicroRNA-298 and microRNA-328 regulate expression of mouse beta-amyloid precursor protein-converting enzyme 1. *J Biol Chem.* 2009;284:1971-81.
129. Ashe KH, Zahs KR. Probing the biology of Alzheimer's disease in mice. *Neuron.* 2010;66:631-45.
130. Faghihi MA, Zhang M, Huang J, Modarresi F, ve ark. Evidence for natural antisense transcript-mediated inhibition of microRNA function. *Genome Biol.* 2010;11:56.
131. Hébert SS, Horré K, Nicolaï L, Bergmans B, ve ark. MicroRNA regulation of Alzheimer's Amyloid precursor protein expression. *Neurobiol Dis.* 2009;33:422-8.
132. Patel N, Hoang D, Miller N, Ansaloni S, Huang Q, ve ark. MicroRNAs can regulate human APP levels. *Mol Neurodegener.* 2008;3:10.
133. Wang H, Liu J, Zong Y, Xu Y, ve ark. miR-106b aberrantly expressed in a double transgenic mouse model for Alzheimer's disease targets TGF- β type II receptor. *Brain Res.* 2010 Aug 13 [In Press] PubMed PMID: 20709030.
134. Liu W, Liu C, Zhu J, Shu P, ve ark. MicroRNA-16 targets amyloid precursor protein to potentially modulate Alzheimer's-associated pathogenesis in SAMP8 mice. *Neurobiol Aging* 2010 Jul 7 [In Press] PubMed PMID: 20619502.
135. Vilardo E, Barbato C, Ciotti M, Cogoni C, ve ark. MicroRNA-101 regulates amyloid precursor protein expression in hippocampal neurons. *J Biol Chem.* 2010;285:18344-51.
136. Persengiev S, Kondova I, Otting N, Koeppen AH, ve ark. Genome-wide analysis of miRNA expression reveals a potential role for miR-144 in brain aging and spinocerebellar ataxia pathogenesis. *Neurobiol Aging.* 2010 May 5. [In Press] PubMed PMID: 20451302.

137. Hébert SS, Papadopoulou AS, Smith P, Galas MC, ve ark. Genetic ablation of Dicer in adult forebrain neurons results in abnormal tau hyperphosphorylation and neurodegeneration. *Hum Mol Genet.* 2010 Aug 4.
138. Carrettiero DC, Hernandez I, Neveu P, Papagiannakopoulos T, ve ark. The cochaperone BAG2 sweeps paired helical filament- insoluble tau from the microtubule. *J Neurosci.* 2009;29:2151-61.
139. De Smaele E, Ferretti E, Gulino A. MicroRNAs as biomarkers for CNS cancer and other disorders. *Brain Res.* 2010;1338:100-11.
140. Numez-Iglesias J, Liu CC, Morgan TE, Finch CE, ve ark. Joint genome-wide profiling of miRNA and mRNA expression in Alzheimer's disease cortex reveals altered miRNA regulation. *PLoS One.* 2010;5:e8898.
141. Hampel H, Frank R, Broich K, Teipel SJ, ve ark. Biomarkers for Alzheimer's disease: academic, industry and regulatory perspectives. *Nat Rev Drug Discov.* 2010;9:560-74.
142. Thambisetty M, Lovestone S. Blood-based biomarkers of Alzheimer's disease: challenging but feasible. *Biomark Med.* 2010;4:65-79.
143. Blennow K, Hampel H, Weiner M, Zetterberg H. Cerebrospinal fluid and plasma biomarkers in Alzheimer disease. *Nat Rev Neurol.* 2010;6:131-44.
144. Weber JA, Baxter DH, Zhang S, Huang DY, ve ark. The microRNA spectrum in 12 body fluids. *Clin Chem.* 2010 Nov;56(11):1733-41.
145. Gahan PB, Swaminathan R. 'Circulating nucleic acids in plasma and serum. Recent Developments, *Annals of the New York Academy of Sciences.* 2008; vol. 1137, pp. 1-6.
146. Hasemeier B, Christgen M, Kreipe H, Lehmann U. Reliable microRNA profiling in routinely processed formalin-fixed paraffin-embedded breast cancer specimens using fluorescence labelled bead technology. *BMC Biotechnology.* 2008 vol. 8, p. 90.

147. Nelson PT, Baldwin DA, Kloosterman WP, Kauppinen S, ve ark. RAKE and LNA-ISH reveal microRNA expression and localization in archival human brain. *RNA*. 2006; vol. 12, no. 2, pp. 187-191.
148. Chen X, Ba Y, Ma L, Cai X, ve ark. Characterization of microRNAs in serum: a novel class of biomarkers for diagnosis of cancer and other diseases. *Cell Res*. 2008;18:997–1006.
149. Volinia S, Calin GA, Liu CG, Ambs S, ve ark. A microRNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2006;103:2257–2261.
150. Lu J, Getz G, Miska EA, Alvarez-Saavedra E, ve ark. MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature*. 2005;435:834–838.
151. Lowery AJ, Miller N, McNeill RE, Kerin MJ. MicroRNAs as prognostic indicators and therapeutic targets: potential effect on breast cancer management. *Clin Cancer Res* 2008;14: 360–365.
152. Vellas B, Andrieu S, Sampaio C, European Task Force group. Disease-modifying trials in Alzheimer's disease: a European task force consensus, *Lancet Neurol*. 2007; 6(1), 56-62.
153. Klunk WE. Biological markers of Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*. 1998; 19(2),145-7.
154. Wang JF, Yu ML, Yu G, ve ark. Serum miR-146a and miR-223 as potential new biomarkers for sepsis. *Biochem Biophys Res Commun*. 2010;394:184–8.
155. Blass JP, Zemcov A. Alzheimer's disease. A metabolic systems degeneration?, *Neurochem. Pathol*. 1984; 2,103-114.
156. Scott RB. Extraneuronal manifestations of Alzheimer's disease. *J Am Geriatr Soc*. 1993; 41, 268-276.

157. Kawarabayashi T, Shoji M. Plasma biomarkers of Alzheimer's disease. *Curr Opin Psychiatry*. 2008; 21(3), 260-7.
158. Wang X, Liu P, Zhu H, Xu Y, ve ark. miR-34a, a microRNA up-regulated in a double transgenic mouse model of Alzheimer's disease, inhibits bcl2 translation. *Brain Res Bull*. 2009;80:268-73.
159. Ginsberg SD, Che S, Counts SE, Mufson EJ. Single cell gene expression profiling in Alzheimer's disease. *NeuroRx*. 2006; 3(3),302-18.
160. Ray S, Britschgi M, Herbert C, Takeda-Uchimura Y, ve ark. Classification and prediction of clinical Alzheimer's diagnosis based on plasma signaling proteins. *Nat Med*. 2007; 13(11),1359-62.
161. Mitchell PS, Parkin RK, Kroh EM, ve ark. Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2008;105:10513–8.
162. Tanaka M, Oikawa K, Takanashi M, ve ark. Down-regulation of miR-92 in human plasma is a novel marker for acute leukemia patients. *PloS One*. 2009;4:e5532.
163. Wang K, Zhang S, Marzolf B, ve ark. Circulating microRNAs, potential biomarkers for drug-induced liver injury. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2009;106:4402–7.
164. Hunter MP, Ismail N, Zhang X, Aguda BD, ve ark. Detection of microRNA expression in human peripheral blood microvesicles. *PLoS ONE*. 2008, 3:e3694.
165. Kosaka N, Iguchi H, Ochiya T. Circulating microRNA in body fluid: a new potential biomarker for cancer diagnosis and prognosis. *Cancer Sci*. 2010 Oct;101(10):2087-92. doi: 10.1111/j.1349-7006.2010.01650.x.
166. Ng EK, Chong WW, Jin H ve ark. Differential expression of microRNAs in plasma of patients with colorectal cancer: a potential marker for colorectal cancer screening. *Gut*. 2009; 58:1375–81.

167. Hu Z, Chen X, Zhao Y, ve ark. Serum microRNA signatures identified in a genome-wide serum microRNA expression profiling predict survival of non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol.* 2010;28:1721–6.
168. Nasser MW, Datta J, Nuovo G, Kutay H, ve ark. Down-regulation of micro-RNA-1 (miR-1) in lung cancer. Suppression of tumorigenic property of lung cancer cells and their sensitization to doxorubicin-induced apoptosis by miR-1. *J Biol Chem.* 2008, 283:33394-33405.
169. Yamamoto Y, Kosaka N, Tanaka M ve ark. MicroRNA-500 as a potential diagnostic marker for hepatocellular carcinoma. *Biomarkers.* 2009; 14: 529–38.
170. Resnick KE, Alder H, Hagan JP, Richardson DL, ve ark. The detection of differentially expressed microRNAs from the serum of ovarian cancer patients using a novel real-time PCR platform. *Gynecol Oncol.* 2009; 112(1):55–9.
171. Brase JC, Wuttig D, Kuner R, Sültmann H. Serum microRNAs as non-invasive biomarkers for cancer. *Mol Cancer.* 2010 Nov 26;9:306.
172. Wang J, Chen J, Chang P, ve ark. MicroRNAs in plasma of pancreatic ductal adenocarcinoma patients as novel blood-based biomarkers of disease. *Cancer Prev Res. (Phila Pa)* 2009;2:807–13.
173. Schöler N, Langer C, Döhner H, Buske C, ve ark. Serum microRNAs as a novel class of biomarkers: a comprehensive review of the literature. *Exp Hematol.* 2010 Dec;38(12):1126-30.
174. Lawrie CH, Gal S, Dunlop HM, ve ark. Detection of elevated levels of tumour-associated microRNAs in serum of patients with diffuse large B-cell lymphoma. *Br J Haematol.* 2008;141:672–675.
175. Chim SS, Shing TK, Hung EC, ve ark. Detection and characterization of placental microRNAs in maternal plasma. *Clin Chem.* 2008;54:482 90.

176. Gilad S, Meiri E, Yegorov Y, Benjamin S, et al. Serum microRNAs are promising novel biomarkers. *PLoS ONE*. 2008, 3:e3148.
177. Wang GK, Zhu JQ, Zhang JT, Li Q, et al. Circulating microRNA: a novel potential biomarker for early diagnosis of acute myocardial infarction in humans. *Eur Heart J*. 2010, 31:659-666.
178. Wang K, Zhang S, Marzolf B, et al. Circulating microRNAs, potential biomarkers for drug-induced liver injury. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2009;106:4402-7.
179. Wang JF, Yu ML, Yu G, et al. Serum miR-146a and miR-223 as potential new biomarkers for sepsis. *Biochem Biophys Res Commun*. 2010;394:184-8.
180. Murata K, Yoshitomi H, Tanida S, Ishikawa M, et al. Plasma and synovial fluid microRNAs as potential biomarkers of rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *Arthritis Res Ther*. 2010, 12:R86.
181. Hébert SS, Horré K, Nicolai L, Bergmans B, et al. MicroRNA regulation of Alzheimer's Amyloid precursor protein expression. *Neurobiol Dis*. 2009 Mar;33(3):422-8. Epub 2008 Dec 9.
182. Geekiyanage H, Jicha GA, Nelson PT, Chan C. Blood serum miRNA: Non-invasive biomarkers for Alzheimer's disease. *Exp Neurol*. 2011 Dec 1. (Basım aşaması)

8. EKLER

EK-1 Etik Kurul Onayı

İZMİR 1 NO'LU KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU ARAŞTIRMA BAŞVURUSU ONAY BELGESİ

Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığı 2.Kat. Erzene Ankara Cad. 35100 Bornova/İZMİR
Tel:0 232 390 4219 - 373 78 81 Fax: 0232 390 21 34
e-mail: aetikk@mail.ege.edu.tr www.aek.ege.edu.tr

BAŞVURU BİLGİLERİ						
ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Alzheimer Hastalığında Yeni Biyomarkır Geliştirilmesi: Periferik Kandan MikroRNA Analizi.					
ARAŞTIRMA PROTOKOLÜNÜN KODU						
EUDRACT NUMARASI						
SORUMLU ARAŞTIRMACI ÜNVANI/ADI/SOYADI	Prof. Dr. Görsev YENER					
SORUMLU ARAŞTIRMACI UZMANLIK ALANI	Nöroloji					
KOORDİNATÖRÜN ÜNVANI/ADI/SOYADI						
KOORDİNATÖRÜN UZMANLIK ALANI						
ARAŞTIRMA MERKEZİ	Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Nöroloji Anabilim Dalı, Demans Polikliniği					
ARAŞTIRMA MERKEZİNİN AÇIK ADRESİ	Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Nöroloji Anabilim Dalı Narlıdere/ İZMİR					
BAŞVURULAN ETİK KURULUN ADI	İzmir 1 Nolu Etik Kurulu					
DESTEKLEYİCİ VE AÇIK ADRESİ	TÜBİTAK					
DESTEKLEYİCİNİN YASAL TEMSİLCİSİ VE ADRESİ						
UZMANLIK TEZİ / AKADEMİK AMAÇLI	UZMANLIK TEZİ <input type="checkbox"/>	AKADEMİK AMAÇLI <input type="checkbox"/>				
ARAŞTIRMANIN FAZİ VE TÜRÜ	İLAÇ DIŞI ARAŞTIRMA					
ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	TEK MERKEZ <input checked="" type="checkbox"/>	ÇOK MERKEZLİ <input type="checkbox"/>	ULUSAL <input type="checkbox"/>	ULUSLARARASI <input type="checkbox"/>		
DEĞERLENDİRİLEN BELGELER						
Belge Adı	Tarihi	Versiyon Numarası	Dili			
ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ	26.08.2009	Ver. No. 1	Türkçe <input checked="" type="checkbox"/>	İngilizce <input type="checkbox"/> Diğer <input type="checkbox"/>		
BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU	30.10.2009	Ver. No. 2	Türkçe <input checked="" type="checkbox"/>	İngilizce <input type="checkbox"/> Diğer <input type="checkbox"/>		
OLGU RAPOR FORMU	30.10.2009	Ver. No. 2	Türkçe <input checked="" type="checkbox"/>	İngilizce <input type="checkbox"/> Diğer <input type="checkbox"/>		
DEĞERLENDİRİLEN DİĞER BELGELER						
Belge Adı	Açıklama					
ARAŞTIRMA BÜTÇESİ						
KARAR BİLGİLERİ						
Karar No: 09-9/16		Tarih: 11.11.2009				
Yukarıda başvuru bilgileri verilen klinik araştırma başvuru dosyası ve ilgili belgeler araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş, gerçekleştirilmesinde etik sakınca bulunmadığına ve Kurulumuz kararının başvuru sahibi tarafından Sağlık Bakanlığı'na arzına toplantıya katılan etik kurul üyelerinin oy çokluğu ile karar verilmiştir.						
ETİK KURUL BİLGİLERİ						
ÇALIŞMA ESASI	İYİ KLİNİK UYGULAMALAR KILAVUZU					
ETİK KURUL ÜYELERİ						
Unvanı / Adı / Soyadı EK Üyeligi	Uzmanlık Dalı	Kurumu	Cinsiyeti	İlişki (*)	Katılım (**)	İmza
Prof. Dr. Kaan KAVAKLI Başkan	Çocuk Sağlığı Hst. ve Çocuk Kan Hst.	E.Ü.Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hst.AD.	E	<input type="checkbox"/> E <input checked="" type="checkbox"/> H	<input checked="" type="checkbox"/> E <input type="checkbox"/> H	<i>[İmza]</i>
Doç. Dr. Aytül ÖNAL Başkan Yardımcısı	Farmakoloji	E.Ü. Tıp Fakültesi Farmakoloji AD.	K	<input type="checkbox"/> E <input checked="" type="checkbox"/> H	<input checked="" type="checkbox"/> E <input type="checkbox"/> H	<i>[İmza]</i>
Prof. Dr. Özdemir YARARBAŞ Üye	Genel Cerrahi	Kent Hastanesi Cerrahi Departmanı Çiğli İzmir	E	<input type="checkbox"/> E <input checked="" type="checkbox"/> H	<input checked="" type="checkbox"/> E <input type="checkbox"/> H	<i>[İmza]</i>
Prof. Dr. Sabire KARAÇALI Üye	Genetik	E.Ü. Fen Fakültesi Moleküler Biyoloji Bölümü	K	<input type="checkbox"/> E <input checked="" type="checkbox"/> H	<input checked="" type="checkbox"/> E <input type="checkbox"/> H	<i>[İmza]</i>

Araştırma Başvurusu Onay Belgesi
29 Mayıs 2009, Versiyon No:2, İzmir 1 Nolu Etik Kurulu

ASLI BİRDİR
Etik Kurulu
Başkanı Y.



ÖZGEÇMİŞ MERYEM GÜLFEM ÖNER

TC Kimlik No / Pasaport No:	11978025834
Doğum Yılı:	1985
Yazışma Adresi :	İlica Mah. Köroğlu Sok. No:53 Mimoza Apt. Daire 18 NARLIDERE/İZMİR 35320 İzmir/Türkiye
Telefon :	02322394938
e-posta :	gulfemoner@gmail.com

EĞİTİM BİLGİLERİ

Ülke	Üniversite	Fakülte/Enstitü	Öğrenim Alanı	Derece	Mezuniyet Yılı
Türkiye	Ege Üniversitesi	FEN FAKÜLTESİ	Biyoloji	Lisans	2008

AKADEMİK/MESLEKTE DENEYİM

Kurum/Kuruluş	Ülke	Şehir	Bölüm/Birim	Görev Türü	Görev Dönemi

UZMANLIK ALANLARI

Uzmanlık Alanları
Nöroloji , İmmünoloji , Diğer , Tıbbi Mikrobiyoloji

DİĞER AKADEMİK FAALİYETLER

Son Bir Yılda Uluslararası İndekslere Kayıtlı Makale/Derleme İçin Yapılan Danışmanlık Sayısı		
Son Bir Yılda Projeler İçin Yapılan Danışmanlık Sayısı		
Yayınlara Alınan Toplam Atıf Sayısı		
Danışmanlık Yapılan Öğrenci Sayısı	Tamamlanan	Devam Eden
	Yüksek Lisans	
	Doktora	
	Uzmanlık	

Diğer Faaliyetler
(Eser/görev/faaliyet
/sorumluluk
/olay/üyelik vb.)

ÖDÜLLER

Ödülün Adı	Alındığı Kuruluş	Yılı
------------	------------------	------

YAYINLARI**SCI, SSCI, AHCI indekslerine giren dergilerde yayımlanan makaleler**

GENC S, ZADEOGLULARI Z, ONER MG, GENC K, DİGİCAYLIOGLU M, INTRANASAL ERYTHROPOİETİN THERAPY İN NERVOUS SYSTEM DİSORDERS, EXPERT OPİN DRUG DELIV. 2011 JAN8(1):19-32. EPUB 2010 DEC 13.

Kumral A, Tüzün F, Oner MG, Genç S, Duman N, Ozkan H, Erythropoietin in neonatal brain protection: The past, the present and the future, Brain Dev. 2010 Nov 23. [Epub ahead of print].

Diğer dergilerde yayımlanan makaleler

MicroRNAs and multiple sclerosis, Kemal Ugur Tufekci, Meryem Gulfem Oner, Sermin Genc, and Kursad Genc, Autoimmune Diseases, 2010

Hakemli konferans/sempozyumların bildiri kitaplarında yer alan yayınlar

Meryem Gülfem Öner, Şermin Genç, Effect of Erythropoietin on Mortalin Gene Expression, Xth National Neuroscience Congress, Istanbul, Turkey, 8-12 April 2011.

Muharrem Murat Yıldız, Tamer Çırak, Burcu Aslan, Serdar Demirtaş, Abuzer Acar, Ahmet Akın, Emir Baki Denkbaş, Gülfem Öner, The Establishing Of Rabbit Bladder Model For In Vivo Urinary Research 20nd National Urology Congress, Antalya, Turkey, 1-6 November 2008

Tamer Çırak, Muharrem Murat Yıldız, Burcu Aslan, Tayfun Vural, Ahmet Akın, Emir Baki Denkbaş, Gülfem Öner, Microbiologic Eva Fosfomycin Loaded Double-J Stents : Microbiological Study 20nd National Urology Congress, Antalya, Turkey, 1-6 November 2008

Tamer Çırak, Muharrem Murat Yıldız, Tayfun Vural, Burcu Aslan, Ahmet Akın, Emir Baki Denkbaş, Gülfem Öner, Preparation and Characterization of Fosfomycin Loaded Double-J Stents 20nd National Urology Congress, Antalya, Turkey, 1-6 November 2008

Diğer yayınlar

Akgül B, Aytun B, Has C, Erkan EP, Bayın E, Yener G, Allmer J, Genc KK, Gürsan AE, Tufekci KU, Kelleci MB, Coşacak MI, Oner MG, Durnaoglu S, Genc S, Yılmaz S, Zadeoglulari ZF, Erbayraktar Z. MicroRNAs and Nervous System. TUBA Ankara, Turkey. 2011 Nov ISBN: 978-9944-252-54-6.

Düzenleme Tarihi :13/01/2012