

T.C.
YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

AMYOTROFİK LATERAL SKLEROZ (ALS) HASTALARINDA
MİTOKONDRIYAL FONKSİYON BOZUKLUĞU İLE İLGİLİ
GENLERİ HEDEF ALAN miRNA'LARIN *İN SİLİKO* VE *İN VİTRO*
YÖNTEMLERLE ARAŞTIRILMASI

Gülçin BAYKAL

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı
Moleküler Biyoloji ve Genetik Programı

Danışman

Dr. Öğretim Üyesi Şenay VURAL KORKUT

Haziran, 2023

T.C.
YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

AMYOTROFİK LATERAL SKLEROZ (ALS) HASTALARINDA
MİTOKONDRIYAL FONKSİYON BOZUKLUĞU İLE İLGİLİ GENLERİ
HEDEF ALAN miRNA'LARIN *İN SİLİKO* VE *İN VİTRO*
YÖNTEMLERLE ARAŞTIRILMASI

Gülçin BAYKAL tarafından hazırlanan tez çalışması 21.02.2023 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, Moleküler Biyoloji ve Genetik Programı **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Dr. Öğretim Üyesi Şenay VURAL KORKUT
Yıldız Teknik Üniversitesi
Danışman

Jüri Üyeleri

Dr. Öğr. Üyesi Şenay VURAL KORKUT, Danışman
Yıldız Teknik Üniversitesi

Prof. Dr. Semiha ERİŞEN, Üye
Yıldız Teknik Üniversitesi

Prof. Dr. Aslıhan GÜNEL, Üye
Ahi Evran Üniversitesi

Danışmanım Dr. Öğr. Üyesi Şenay VURAL KORKUT sorumluluğunda tarafımca hazırlanan Amyotrofik Lateral Skleroz (ALS) Hastalarında Mitokondriyal Fonksiyon Bozukluğu ile ilgili Genleri Hedef Alan miRNA'ların *İn siliko* ve *İn vitro* Yöntemlerle Araştırılması başlıklı çalışmada veri toplama ve veri kullanımında gerekli yasal izinleri aldığımı, diğer kaynaklardan aldığım bilgileri ana metin ve referanslarda eksiksiz gösterdiğimi, araştırma verilerine ve sonuçlarına ilişkin çarpıtma ve/veya sahtecilik yapmadığımı, çalışmam süresince bilimsel araştırma ve etik ilkelerine uygun davrandığımı beyan ederim. Beyanımın aksinin ispatı halinde her türlü yasal sonucu kabul ederim.

Gülçin BAYKAL

İmza



Bu çalışma, Türkiye Sağlık Enstitüleri Başkanlığı'nın (TÜSEB) 22733 numaralı projesi ile desteklenmiştir.

Geleceğime sevgi ile...



TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim ve tez sürecim boyunca bilgileri ile beni aydınlatan ve desteklerini esirgemeyen değerli danışmanım Dr. Şenay VURAL KORKUT'a minnet ve teşekkürlerimi sunarım.

Erasmus+ staj bursu ile misafir lisansüstü araştırma asistanı olarak 2022 yılı yaz aylarını geçirdiğim University of East Anglia, Birleşik Krallık'ta beni laboratuvarına kabul edip, araştırma grubunda misafir araştırma asistanı olarak bulunma fırsatı veren Dr. Alper AKAY'a ve misafir olduğum sürede benden yardımlarını esirgemeyen başta Katarzyna HENCEL'e ve diğer grup arkadaşlarım Aduragbemi ADESINA'ya, Tim PEARSON'a, Roberta SKUKAN'a ve Aykut SHEN'e teşekkürlerimi sunarım.

TÜSEB projesinde beraber yol aldığımız, bilgisi ile destek sağlayan ve yardımcı olan değerli hocalarım Dr. Tuğba KUL KÖPRÜLÜ'ye, Prof. Dr. Halil Atilla İDRİSOĞLU'na, Uzm. Dr. Dilara MERMİ DİBEK'e, Prof. Dr. Aslıhan GÜNEL'e ve Makel Teknoloji ile tanışmamı sağlayan, Prof. Dr. Şaban TEKİN hocama teşekkürlerimi sunarım.

Yüksek lisans sürecimin en başından sonuna kadar beraber olduğum, her zaman beni destekleyen, tecrübelerini paylaşmaktan geri durmayan, sevgili arkadaşım MSc. Burçin ERKAL'a her şey için çok teşekkür ederim.

Üniversitenin ilk yıllarından itibaren birlikte olduğumuz, yıllarca aynı evi paylaştığım ve iyi ki hayatımda var dediğim insanlardan olan arkadaşım Şeyda ŞİMŞEK'e ve birlikte "Reyiz ve Dadaşlar" olduğumuz, geçirdiğimiz sayısız güzel günler için, yanımda oldukları için, uzaklardaki ailem oldukları için, iyi ki var olan Şeyda ŞİMŞEK'e, Reyhan KARAHAN'a, Zehra Tuğçe KAYAHAN'a, Sümeyra Selin CESUR'a ve Büşra DEĞİRMENCİ'ye teşekkür ederim. Hayatımın uzun bir döneminde izi bulunan, beraber geçirdiğimiz iyi, güzel günlerin adına Hatice KILIN'a ve Elif BİLİM'e teşekkür ederim. Çok uzaklarda yakınım olan, Friends Road'ın güzide kızları Sarab SERMPETİ'ye, Lina MAAROUF'a ve Canan YÜKSEL'e ayrıca teşekkür ederim. Hayatımdaki önemli anlarda izi bulunan ve birlikte olmaktan mutlu olduğum, Sude Nur TURAN'a, Roghaieh HOLGHOOİMİ'ye ve Seher Nur ATMACA'ya teşekkür ederim.

Beni bu yaşı kadar fedakarlıklar ile büyüten, maddi ve manevi destekleri ile her zaman yanımda olan annem Gülden BAYKAL'a ve babam İsmail BAYKAL'a, kardeşlerim Yusuf BAYKAL, Dilanur BAYKAL ve Ahmet Emin BAYKAL'a ve beni dualarından eksik etmeyen aile büyüklerime teşekkürü borç bilirim. Burada ismi yazılmamış ve üzerimde emeği olan hayatımdaki güzel insanların hepsine çok teşekkürler.

Son olarak, bu çalışmayı A Grubu Acil AR-GE çağrısı ile destekleyen TÜSEB'e teşekkürlerimi sunarım.

Gülçin BAYKAL



İÇİNDEKİLER

SİMGE LİSTESİ	ix
KISALTMA LİSTESİ	x
ŞEKİL LİSTESİ	xii
TABLO LİSTESİ	xiii
ÖZET	xiv
ABSTRACT	xvi
1 GİRİŞ.....	1
1.1 Literatür Özeti.....	1
1.2 Tezin Amacı.....	2
1.3 Hipotez	3
2 GENEL BİLGİLER	4
2.1 Amyotrofik Lateral Skleroz'da Genel Görünüm.....	4
2.1.1 Epidemiyoloji.....	5
2.1.2 Genetik Nedenler	6
2.2 Mitokondri.....	14
2.2.1 Mitokondriyal Fonksiyon Bozukluğu ve ALS.....	16
2.3 Kodlanmayan RNA'lar (ncRNA).....	18
2.3.1 mikroRNA (miRNA) ve Biyogenezi.....	18
2.4 Biyobelirteçler.....	22
2.4.1 miRNA ve Biyobelirteçler	22
2.4.2 miRNA-9	23
2.4.3 miRNA-141	25
2.5 Periferik Kan Mononükleer Hücreleri (PBMC).....	26
3 MATERYAL VE METOT.....	27
3.1 Materyal	27
3.1.1 Genel Laboratuvar Malzemeleri.....	27
3.1.2 Kullanılan Cihazlar	28
3.1.3 Kullanılan Bilgisayar Programları.....	28
3.1.4 Etik Kurul	28
3.2 Metot.....	29
3.2.1 İn Siliko Çalışmalar	29
3.2.2 İn Vitro Çalışmalar	30
4 SONUÇ VE ÖNERİLER.....	34
4.1 Sonuçlar	34
4.1.1 Genlerin Seçimi	34
4.1.2 Belirlenen Genlerin Yol Zenginleştirme Analizleri	34
4.1.3 miRNA'ların Tanımlanması ve Set Analizleri.....	36

4.2	Öneriler.....	45
KAYNAKÇA		48
A ÖZGEÇMİŞ		65
TEZDEN ÜRETİLMİŞ YAYINLAR		68



SİMGE LİSTESİ

dk.	Dakika
κ	Kappa
L	Litre
μL	Mikro litre
μg	Mikrogram
ml	Mililitre
ng	Nanogram
s	Saniye
°C	Santigrat derece



KISALTMA LİSTESİ

ABD	Amerika Birleşik Devletleri
ADP	Adenozin difosfat
ALS	Amyotrofik Lateral Skleroz
ATP	Adenozin trifosfat
BCL2	B hücresi lenfoma 2
cDNA	Komplementer/Tamamlayıcı DNA
CHCHD10	Sarılmış-bobin-heliks-sarılmış-bobin-heliks bölgesi 10
CSF	Serebrospinal (beyin omurilik) Sıvı
C9orf72	Kromozom 9 açık okuma çerçevesi 72
DGCR8	DiGeorge Sendromu kritik bölge 8 proteini
DPR	Tekrar dipeptid proteini
ER	Endoplazmik retikulum
ETS	Elektron taşıma sistemi
fALS	Ailesel ALS
FTD	Frontotemporal demans
FUS	RNA bağlayıcı protein FUS
GR	Glisin arjinin
KEGG	Kyoto
lncRNA	Uzun Kodlanmayan RNA
miRNA	Mikro RNA
MRI	Manyetik rezonans görüntüleme
mRNA	Mesajcı RNA
mtDNA	Mitokondriyal DNA
ncRNA	Kodlanmayan RNA
nDNA	Nükleer DNA
NDH	Nörodejeneratif hastalıklar
ND3	NADH dehidrojenaz 3
ND6	NADH dehidrojenaz 6
NF-κB	Nükleer faktör kappa B
NK	Doğal öldürücü hücreler
NMJ	Nöromusküler kavşak

OPTN	Optinörin
OXPHOS	Oksidatif fosforilasyon
pH	Hidrojen potansiyeli
PBMC	Periferik kan mononükleer hücreleri
PBS	Fosfat tamponlanmış tuz
Pri-miRNA	Primer miRNA
Pre-miRNA	Öncü miRNA
RISC	RNA-indüklenmiş susturma kompleksi
RNase	Ribonükleaz
ROS	Reaktif oksijen türleri
sALS	Sporadik ALS
SOD1	Süperoksit dismutaz 1
TARDBP	TAR-DNA bağlayıcı protein
TBK1	TANK-bağlanma kinaz 1
TCA	Trikarboksilik asit
TDP-43	TAR-DNA bağlayıcı protein 43
UTR	Çevrilmemiş Bölge
VCP	Valosin içeren protein
qPZR	Kantitatif polimeraz zincir reaksiyonu
WT	Yabanıl tip

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 2.1 ALS motor korteksten beyin sapı ve omurilikteki sinapslara uzanan kortikospinal motor nöronları (üst motor nöronlar) ve iskelet kaslarına uzanan bulbar veya spinal motor nöronları (alt motor nöronlar) etkiler (Taylor vd., 2016)	4
Şekil 2.2 ALS mekanizması (Turner vd., 2013).....	6
Şekil 2.3 1993 – 2016 yılları arasındaki ALS genetik manzarası (Chia vd., 2018).....	7
Şekil 2.4 Sarı işaretli düğümler, ALS'de mitokondriyal işlev bozukluğu ile ilgili genleri temsil eder. KEGG Amyotrofik Lateral Skleroz Yolağı, Map05014.....	9
Şekil 2.5 Mitokondriyal solunum zinciri (Keogh & Chinnery, 2015)	16
Şekil 2.6 RNA dünyası.....	19
Şekil 3.1 İş Akışı	30
Şekil 4.1 Pathway Enrichment Analyses with tools. A) Pathway enrichment analysis for using g: Profiler tool. B) Detailed pathway enrichment analysis with the genes	36
Şekil 4.2 CROssBAR aracı ile yol zenginleştirme analizi	37
Şekil 4.3 Tanımlanan genler için dört farklı veri tabanı kullanılarak elde edilen ortak miRNA'ları ortaya çıkarmak için kullanılan Venn diyagramı görüntüleri. Tüm veri tabanlarında ortak olan BCL2 için 6 miRNA vardır. TARDBP için dört veri tabanında ortak olan 1 miRNA vardır. Dört veri tabanında da CHCHD10 için 2 ortak miRNA vardır. Kalan SOD1, FUS, C9ORF72, TBK1, OPTN, VCP genleri için en fazla 3 veri tabanında ortak miRNA'lar bulunmaktadır. Dört veri tabanında bu 6 gen için ortak miRNA'lar yoktur. A: SOD1, B: FUS, C: TARDBP, D: C9ORF72, E: OPTN, F: VCP, G: CHCHD10, H: TBK1, I: BCL2	38

TABLO LİSTESİ

Tablo 3.1 Laboratuvar Genel Malzemeleri	27
Tablo 3.2 Total RNA İzolasyon (miRNeasy Mini Kit) Kit İçeriği	27
Tablo 3.3 cDNA Çevirme (miRCURY LNA RT Kit) Kit İçeriği	27
Tablo 3.4 RT-qPCR (miRCURY LNA SYBR Yeşil PZR Kit) Kit İçeriği	28
Tablo 3.5 Laboratuvarda Kullanılan Cihazlar	28
Tablo 3.6 Ölçüm ve hesaplamalarda kullanılan yazılımsal gereçler	28
Tablo 3.7 ALS Grubu Demografik Bilgileri	31
Tablo 3.8 Nörolojik Kontrol Grubu Demografik Bilgileri	31
Tablo 3.9 Sağlıklı Kontrol Grubu Demografik Bilgileri	31
Tablo 3.10 RT-qPCR için kullanılan primerler	33
Tablo 3.11 RT-qPCR Koşulları	33
Tablo 4.1 Literatüre dayanılarak ortaya koyulan ALS’de mitokondriyal disfonksiyona bağlı genler	34
Tablo 4.2 Enrichr aracı kullanılarak yol zenginleştirme analizi KEGG 2021 için	35
Tablo 4.3 Mitokondriyal Fonksiyon bozukluğu ile ilgili genleri hedef alan miRNA tahminleri	39
Tablo 4.4 miRNet ve TAM set analizleri	41

Amyotrofik Lateral Skleroz (ALS) Hastalarında Mitokondriyal Fonksiyon Bozukluğu ile ilgili Genleri Hedef Alan miRNA'ların *İn siliko* ve *İn vitro* Yöntemlerle Araştırılması

Gülçin BAYKAL

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Yüksek Lisans Tezi

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Şenay VURAL KORKUT

Amyotrofik Lateral Skleroz, motor nöronların dejenerasyonu ve iskelet kaslarının atrofisi ile karakterize ilerleyici, ölümcül bir hastalıktır. İnsidansı yılda 2,1/100.000 ve prevalansı yılda 5,4/100.000'dir. Genellikle fokal olarak başlar ve solunum sistemi felci nedeniyle ölümcüldür. Güncel olarak 100'den fazla gende ALS'ye neden olan mutasyonlar tanımlanmıştır. Bunlar, hastalık patofizyolojisinin farklı mekanizmalarına etki eder. MikroRNA'lar olarak bilinen kodlama yapmayan, tek sarmallı RNA molekülleri, transkripsiyondan sonra mRNA bozulması yoluyla gen ekspresyonunu düzenlerler. miRNA'lar, Amyotrofik Lateral Skleroz gibi nörodejeneratif hastalıklar için biyobelirteç olarak kullanılabilir. Nöronal hücreler mitokondriye oldukça bağımlıdır ve mitokondriyal disfonksiyon nörodejeneratif hastalıklarla bağlantılıdır. Literatür taramasıyla, mitokondriyal disfonksiyona neden olan ve ALS patogeneğinde rol oynayan *SOD1*, *FUS*, *TARDBP*, *C9orf72*, *CHCHD10*, *OPTN*, *VCP*, *TBK1* ve *BCL2* genleri belirlendi. Enrichr, g: Profiler ve CROssBAR araçlarını kullanılarak yapılan yolak zenginleştirme analizlerinde, tanımlanan genlerin ALS, mitokondriyal işlev bozukluğu ve nöron farklılaşması ile önemli bağlantılara sahip olduğu doğrulandı. *In siliko* miRNA tahminleri miRWalk, miRTargetLink, TargetScan ve miRNet veri tabanları

kullanılarak yapıldı. Ortak miRNA'ları seçmek için bir Venn diyagramı aracı kullanıldı ve 28 miRNA keşfedildi. Belirlenen 28 miRNA miRNet ve TAM araçları kullanılarak fonksiyonel ve zenginleştirme analizleri için set analizine tabi tutuldu. Her iki veri tabanında, iki ortak miRNA'nın, hsa-miR-9-5p ve hsa-miR-141-3p'nin ALS ile bağlantılı olduğu bulundu. İn vitro kısmın da ise, ALS hastalığının teşhis, izlem ve tedavisinde biyobelirteç olarak kullanılma potansiyeline sahip miRNA'ları belirlemek için in siliko analizinden elde edilen verilerimizin biyolojik örnekler üzerinde doğrulanmasıdır. Bu çalışmada yeni tanı almış, herhangi bir ilaç kullanmaya başlamamış ve ilaç tedavisi gören ALS hastalarından kan örnekleri alınmıştır. Herhangi bir nörolojik hastalığı olmayan sağlıklı bireylerden ve ALS dışında nörolojik hastalığa sahip nörolojik kontrollerden kan örnekleri elde edilmiştir. Tüm örneklerden periferik kan mononükleer hücreleri ve bunlardan miRNA izolasyonu yapılmıştır. hsa-miR-9-5p ve hsa-miR-141-3p'nin ekspresyon seviyeleri, gerçek zamanlı qPCR kullanılarak incelenmiştir.

Anahtar Kelimeler: ALS, miRNA, mitokondri, in siliko, in vitro

In silico and In vitro Analysis of miRNAs that Target Genes Associated with Mitochondrial Dysfunction in Patients with Amyotrophic Lateral Sclerosis (ALS).

Gülçin BAYKAL

Department of Molecular Biology and Genetics

Master Thesis

Supervisor: Assist. Prof. Dr. Şenay VURAL KORKUT

Amyotrophic Lateral Sclerosis is a progressive, fatal disease characterized by degeneration of motor neurons and atrophy of skeletal muscles. Its incidence is 2.1/100,000 per year and its prevalence is 5.4/100,000 per year. Non-coding, single-stranded RNA molecules known as microRNAs regulate gene expression via mRNA degradation after transcription. miRNAs can be utilized as biomarkers for neurodegenerative diseases such as Amyotrophic Lateral Sclerosis. Neuronal cells are highly dependent on mitochondria, and mitochondrial dysfunction has been linked to neurodegenerative diseases. A literature search revealed the genes *SOD1*, *FUS*, *TARDBP*, *C9orf72*, *CHCHD10*, *OPTN*, *VCP*, *TBK1*, and *BCL2* that cause mitochondrial dysfunction and are involved in the pathogenesis of ALS. Pathway enrichment analyses using Enrichr, g: Profiler, and CROssBAR tools confirmed that the identified genes have significant associations with ALS, mitochondrial dysfunction, and neuron differentiation. In silico miRNA predictions have been made using miRWalk, miRTargetLink, TargetScan, and miRNet tools. A Venn diagram tool was used to select common miRNAs, and finally, 28 miRNAs were discovered. A set of 28 miRNAs were subjected to set analysis using the miRNet and TAM tools for functional and enrichment analyses, respectively. In both

databases, two common miRNAs, hsa-miR-9-5p and hsa-miR-141-3p, were found to be linked to ALS. The principal aim of the study is further analysis of our data obtained from in silico analysis to identify miRNAs that have the potential to be used as biomarkers for the diagnosis, prognosis, and treatment of ALS disease. In this study, blood samples taken from newly diagnosed ALS patients who have not started to use any medication, and from ALS patients on medication. Blood samples also obtained from healthy individuals without any neurological disease and from neurological controls. Peripheral blood mononuclear cell and miRNA isolation made from all samples. Expression levels of hsa-miR-9-5p and hsa-miR-141-3p examine using real-time qPCR.

Keywords: ALS, miRNA, mitochondria, in silico, in vitro

1.1 Literatür Özeti

Merkezi sinir sisteminin işlevinin ve yapısının ilerleyici dejenerasyonu ile karakterize edilen, ilgili nöronal sistemlerin seçici kaybı ile karakterize edilen nörodejeneratif hastalıklar (NDH) heterojen hastalık grubudur. Nörodejenerasyon, sinir hücrelerinin ilerleyici ölümü ve beyin dokusu kaybı için kullanılan genelleyici bir şemsiye terimdir. Nörodejeneratif hastalıkların patogenezi, yaş, kalıtım ve çevre gibi birçok etki söz konusudur (Barnham vd., 2004; Golpich vd., 2017; X. Li vd., 2021; M. T. Lin & Beal, 2006). Amyotrofik lateral skleroz (ALS), nörodejeneratif bir hastalıktır. Üst (korteksten beyin sapına ve omuriliğe uzanan nöronlar) ve alt (beyin sapından ya da omurilikten kaslara uzanan nöronlar) motor nöronlarda dejenerasyona ve kayıplara sebep olur (Brown & Al-Chalabi, 2017; Hardiman vd., 2017). Bu kayıplar nöronların aşırı apoptotik ölümü nedeniyle gelişir (Štetkárová & Ehler, 2021). Hastalık belirli bir bölgede başlar ve daha sonra tüm vücuda yayılır (Brown & Al-Chalabi, 2017; Hardiman vd., 2017; van Es vd., 2017). ALS kalıtsallık açısından ailesel (fALS) ve sporadik (sALS) olarak 2 grupta incelenir (Hardiman vd., 2017; van Es vd., 2017). Birçok ülkede yapılan epidemiyoloji çalışmalarına göre; ALS hastalığı insidans değeri her 100.000 kişi için 0,6-3,8 arasında yeni vaka, prevalans değerleri ise her 100.000 kişide 4,1-8,4 arasında toplam vaka görüldüğü ortaya koyulmuştur (Benjaminsen vd., 2018; Jun vd., 2019; Leighton vd., 2019; Longinetti vd., 2018; Palese vd., 2019; Rose vd., 2019; S. Zhou vd., 2018). Türkiye’de yapılan ALS epidemiyoloji çalışmalarında insidans değerleri her 100.000 kişide 1,2-1,9 yeni vaka, prevalans değerleri ise her 100.000 kişide 3,7-7,3 toplam vaka kaydedilmiştir (Turgut vd., 2019; Uysal vd., 2021). ALS’nin insidansı ve prevalansı da artan yaş ile paralel olarak artmaktadır (Brown & Al-Chalabi, 2017). Motor korteks ve omurilikteki motor nöronların ölümü ALS patogenezinin temelini oluşturur (Brown & Al-Chalabi, 2017; van Es vd., 2017). Hastalığın isminde karşımıza çıkan amyotrofi; motor nöronların ölmesine bağlı olarak omurilikte

bulunan ventral köklerin zayıflaması ve kasların sinirsizleşmesi (denervation) ile oluşan atrofiyi tanımlar. Karşımıza çıkan bir diğer kavram ise sklerozdur; bu kortikospinal aksonların dejenere olmasına bağlı olarak omurilikte lateral olarak meydana gelen incelme ve sertleşmeyi tanımlar (Brown & Al-Chalabi, 2017; Hardiman vd., 2017). Nöronlar, yüksek enerji ve oksijen ihtiyaçları, aksonal taşıma ve nörotransmisyona dahil olması nedeniyle, çok sayıda mitokondri bulunduran ve dolayısıyla oksidatif hasar riski daha yüksek olan hücrelerdir (Bordoni & Gabbianelli, 2020; Gómez-Suaga vd., 2019; Hirabayashi vd., 2017; Lezi & Swerdlow, 2012; Markovinovic vd., 2022). Bu nedenle oksidatif hasardan kolayca etkilenebilirler. Nöronlarda sinir iletimi ATP bağımlıdır. Dolayısıyla mitokondriler daha çok iletimin olduğu yerlere yerleşmişlerdir. Mitokondride meydana gelen fonksiyon bozukluğu kanser, kardiyovasküler hastalıklar, diyabet ve nörodejeneratif hastalıklar gibi birçok patolojik durum ile ilişkilidir ve farklı nörodejeneratif hastalıkların oluşum mekanizması için önemlidir (Morgan & Orrell, 2016; Peoples vd., 2019; Wallace, 2012). Bu fonksiyon bozuklukları sadece mitokondriyal enerji mekanizmasını bozmakla kalmayıp aynı zamanda mitofaji, endoplazmik retikulum (ER) stresi, kalsiyum sinyalleşmesi gibi birçok noktada sıkıntıya sebep olmaktadır (Jaiswal, 2017; Morgan & Orrell, 2016; Tadic vd., 2014). miRNA olarak adlandırılan bu küçük RNA'lar hücrel farklılaşma (Naguibneva vd., 2006), gelişim (Hornstein vd., 2005), immün tepkisi (Xiao vd., 2007) gibi birçok biyolojik süreçte görev alırlar. miRNA'ların etkilerine bakıldığında 1000'den fazla molekülün birincil, ikincil ve üçüncül yapılarıyla etkileşime girerek birçok biyokimyasal yolağın düzenlenmesinde görev aldığı bilinmektedir. Memeli transkriptinin %60'ından fazlası miRNA'ların kontrolü altındadır. Bu sebeple, günümüzde birçok hastalığın tanısında, prognozunda ve tedavisinde miRNA'ların biyobelirteç olarak kullanımıyla ilgili çalışmalar yapılmaktadır (Friedman vd., 2009; Güzelgül & Aksoy, 2015).

1.2 Tezin Amacı

Bu çalışmanın amacı, ALS hastalığının tanı koyma süresini kısaltmak ve bu süreci kolaylaştırmaktır. İlk olarak biyoenformatik araçlar ile belirlenen bazı miRNA'ların biyobelirteç olarak kullanılabilirliğini anlamlı şekilde ortaya koymak. Daha

sonrasında ise ıslak laboratuvar çalışmaları ile bu verilerin hasta ve kontrollerden elde edilen kan örnekleri ile doğrulamasını yapmaktır.

Belirlenen bu amaç doğrultusunda; biyoenformatik tabanlı araştırmalar ile belirli sayıda miRNA tahmini elde etmek, ALS tanısı koyulmuş hastalardan, sağlıklı kontrol bireyleri ve nörolojik kontrol bireylerinden verileri karşılaştırmak için kan örnekleri elde etmek ve kan örneklerinden izole edilen toplam RNA'lardan, oluşturulan cDNA ile miRNA'ların ayrılması ve RT-qPCR ile miRNA validasyonlarının sağlamaktır. Çalışmaya başlanırken sağlıklı kontroller ile nörolojik kontrollerden elde ettiğimiz ekspresyon değerlerinin ALS hastalarından elde ettiğimiz değerler ile karşılaştırılması, istatistiksel analizler sağlanması ve anlamlı sonuçlar ortaya konulması hedeflenmiştir.

1.3 Hipotez

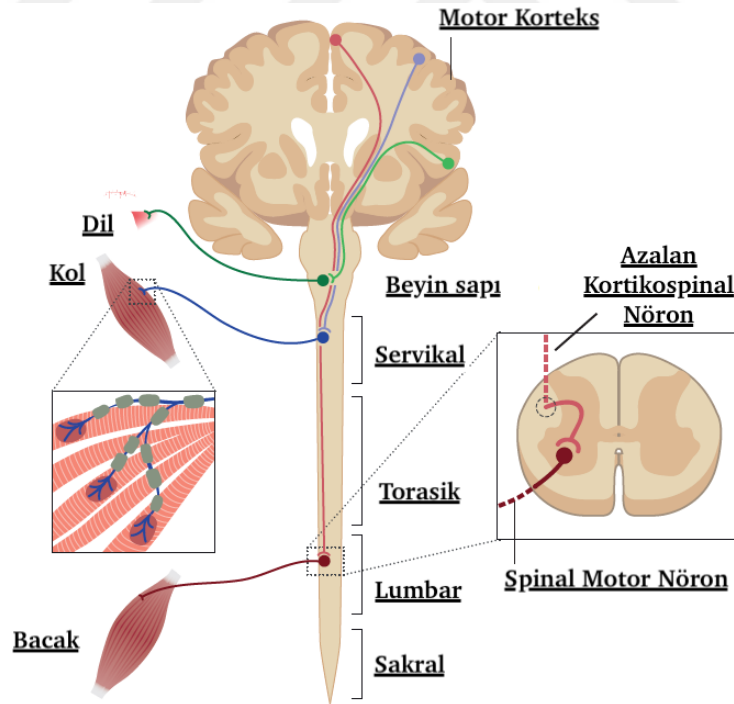
ALS hastalığı patogenezinde etkili olan genleri hedef alan belirli miRNA'lar tanı koyma sürecinde potansiyel biyobelirteç olarak kullanılabilir mi sorusu üzerinden çalışma hipotezini geliştirdik.

Mitokondriyal fonksiyon bozukluğuna etki eden genetik mekanizmanın gen düzeyinde, biyoenformatik araçlar ile araştırılması ve tüm bu gen ürünlerini hedefleyen, belirli miRNA'ların da birlikte araştırıldığı ve bir çalışmada toplandığı başka benzer bir çalışma literatürde yer almamaktadır. Tüm bu genleri ve onları hedefleyen belirli miRNA'ların araştırıldığı bu çalışma literatürde yapılan diğer çalışmalardan ayrışmaktadır. ALS patogenezinde bulunan mitokondriyal fonksiyon bozukluğu önemli olmasına rağmen dahil olduğu genetik mekanizma ve onu hedef alan miRNA'lar bütüncül anlamda ortaya koyulmamıştır. Bu alışma ile söz konusu gen ve bu genleri hedefleyen belirli miRNA'lardan elde edilen verilerin literatürdeki boşluğun bir kısmını doldurması beklenmektedir.

Söz konusu araştırılması yapılan miRNA'ların nöronal süreçlerde hangi rolleri üstlendiklerini yapılan çalışmalar ile özetlenmiştir. Bu miRNA'ların yaşanan nörodejenerasyonda ekspresyon seviyelerinde anlamlı farklılık göstermeleri beklenmektedir. Ortaya koyulan anlamlı sonuçlar neticesinde hastalığın tanı sürecini kısaltacak miRNA'ların belirlenmesi hedeflenmektedir.

2.1 Amyotrofik Lateral Skleroz'da Genel Görünüm

Alzheimer, Parkinson ve Amyotrofik Lateral Skleroz gibi hastalıklar nörodejeneratif hastalıklar (NDH) olarak isimlendirilir. Merkezi sinir sisteminin işlevinin ve yapısının ilerleyici dejenerasyonu ile karakterize edilen, ilgili nöronal sistemlerin seçici kaybı ile karakterize edilen heterojen hastalık grubudur. Farklı seviyelerde hafıza, muhakeme, duyuşal ve motor yeteneklerde bozulma ile seyreden kronik ilerleyici hastalıklardır. Nörodejenerasyon, sinir hücrelerinin ilerleyici ölümü ve beyin dokusu kaybı için kullanılan genelleyici bir şemsiye terimdir. Nörodejeneratif hastalıkların patogenezi, yaş, kalıtım ve çevre gibi birçok etki söz konusudur (Barnham vd., 2004; Golpich vd., 2017; X. Li vd., 2021; M. T. Lin & Beal, 2006).



Şekil 2.1 ALS motor korteksten beyin sapı ve omurilikteki sinapslara uzanan kortikospinal motor nöronları (üst motor nöronlar) ve iskelet kaslarına uzanan bulbar veya spinal motor nöronları (alt motor nöronlar) etkiler (Taylor vd., 2016)

Amyotrofik lateral skleroz (ALS), nörodejeneratif bir hastalıktır. Üst (korteksten beyin sapına ve omuriliğe uzanan nöronlar) ve alt (beyin sapından ya da omurilikten kaslara uzanan nöronlar) motor nöronlarda dejenerasyona ve kayıplara sebep olur (Brown & Al-Chalabi, 2017; Hardiman vd., 2017). Bu kayıplar nöronların aşırı apoptotik ölümü nedeniyle gelişir (Štetkárová & Ehler, 2021). Hastalık belirli bir bölgede başlar ve daha sonra tüm vücuda yayılır (Brown & Al-Chalabi, 2017; Hardiman vd., 2017; van Es vd., 2017). ALS kalıtsallık açısından ailesel (fALS) ve sporadik (sALS) olarak 2 grupta incelenir (Hardiman vd., 2017; van Es vd., 2017). Merkezi sinir sisteminin kortikal, beyin sapı ve omurilik motor nöronlarını etkiler ve motor nöron hastalıkları içerisinde yer alır (Aktekin & Uysal, 2020; Štetkárová & Ehler, 2021). Hastaların yaklaşık %50'sinde bilişsel veya davranışsal problemler görülür ve yaklaşık %13'ünde ise Frontotemporal Demans (FTD) ile ilişkili olduğu belirtilmektedir (Hardiman vd., 2017; van Es vd., 2017). Genellikle orta veya geç yaşta ortaya çıkan bu hastalık, ilerleyici bir kas atrofisi (küçülme, körelme) ile kendini gösterir. Ani kas seğirmeleriyle başlar ve nöronlar hedefteki kaslar ile sinaptik bağlantılarını kaybederler ve bu da atrofiye neden olur (Brown & Al-Chalabi, 2017; Mejzini vd., 2019). ALS birçok sistemi etkilediği için çoklu sistem hastalığıdır. Klinik, genetik ve nöropatolojik düzeylerde heterojenlik gösterir (Štetkárová & Ehler, 2021; van Es vd., 2017). Güncel tedavi yöntemlerine baktığımızda Riluzole ve Edaravone onay almış ilaçlardır. Bunlara ek olarak Nuedexta psödobulbar etkiyi tedavi etmek için Amerika Birleşik Devletleri'nde (ABD) kullanılır (Brown & Al-Chalabi, 2017; Mejzini vd., 2019; van Es vd., 2017).

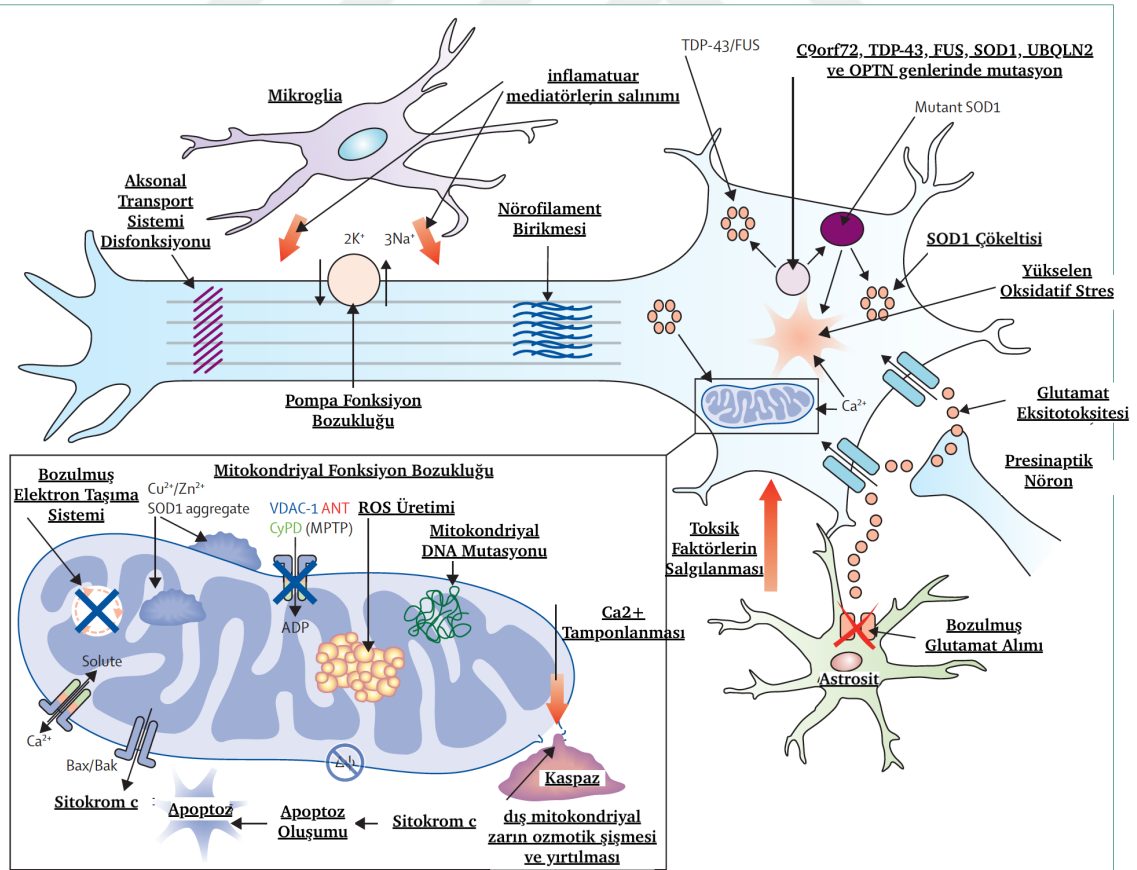
2.1.1 Epidemiyoloji

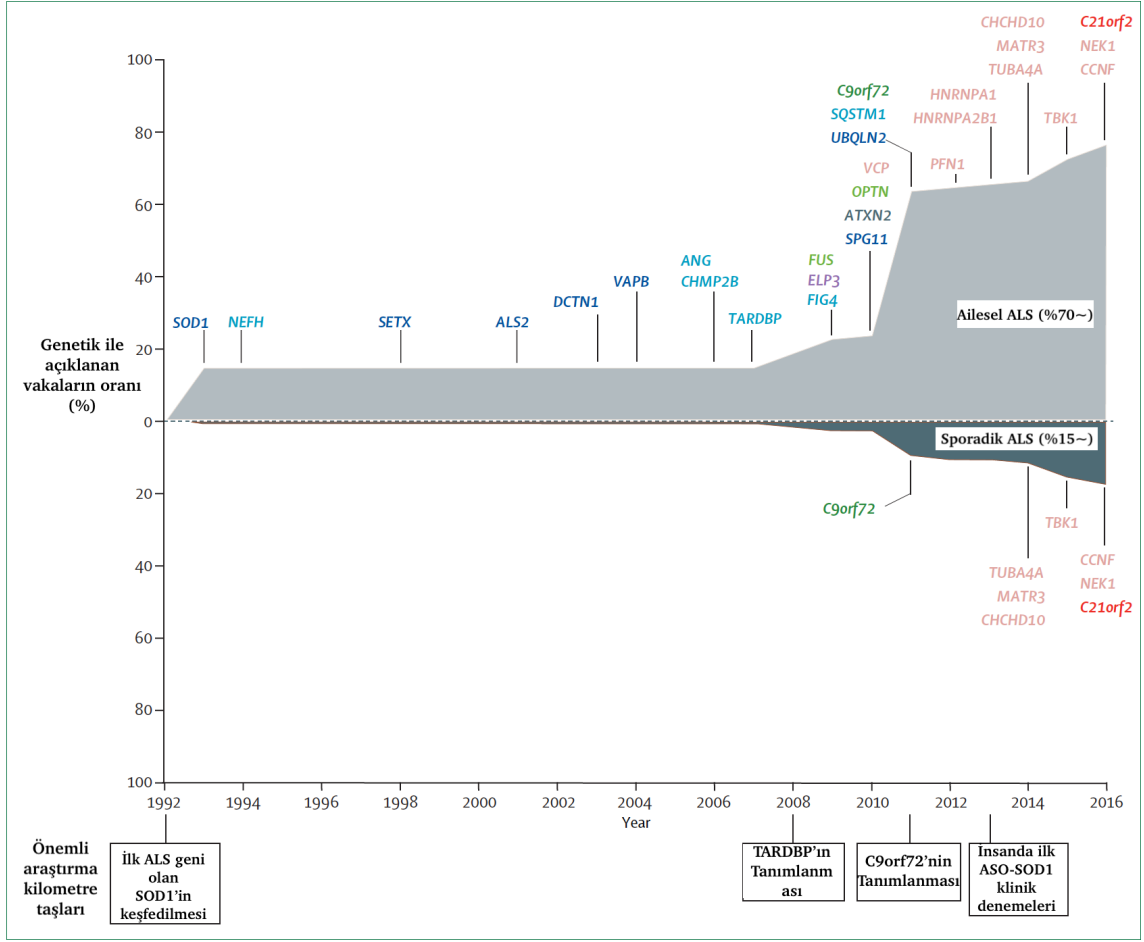
Birçok ülkede yapılan epidemiyoloji çalışmalarına göre; ALS hastalığı insidans değeri her 100.000 kişi için 0,6-3,8 arasında yeni vaka, prevalans değerleri ise her 100.000 kişide 4,1-8,4 arasında toplam vaka görüldüğü ortaya koyulmuştur (Benjaminsen vd., 2018; Jun vd., 2019; Leighton vd., 2019; Longinetti vd., 2018; Palese vd., 2019; Rose vd., 2019; S. Zhou vd., 2018). Türkiye'de yapılan ALS epidemiyoloji çalışmalarında insidans değerleri her 100.000 kişide 1,2-1,9 yeni vaka, prevalans değerleri ise her 100.000 kişide 3,7-7,3 toplam vaka

kaydedilmiştir (Turgut vd., 2019; Uysal vd., 2021). ALS'nin insidansı ve prevalansı da artan yaş ile paralel olarak artmaktadır (Brown & Al-Chalabi, 2017).

2.1.2 Genetik Nedenler

Motor korteks ve omurilikteki motor nöronların ölümü ALS patogenezinin temelini oluşturur (Brown & Al-Chalabi, 2017; van Es vd., 2017). Hastalığın isminde karşımıza çıkan amiotrofi; motor nöronların ölmesine bağlı olarak omurilikte bulunan ventral köklerin zayıflaması ve kasların sinirsizleşmesi ile oluşan atrofiyi tanımlar. Karşımıza çıkan bir diğer kavram ise sklerozdur; bu kortikospinal aksonların dejenere olmasına bağlı olarak omurilikte lateral olarak meydana gelen incelleme ve sertleşmeyi tanımlar (Brown & Al-Chalabi, 2017; Hardiman vd., 2017). Mitokondriyal fonksiyon bozuklukları, aksonal transport, toksik protein yığılması, glutamat eksitotoksitesisi, bozulan protein degradasyonu, protein homeostazı, oksidatif stres, inflamasyon, RNA metabolizma hasarları gibi birçok hücresel ve moleküler süreç ALS patofizyolojine dahil olmuştur (Hardiman vd., 2017; van Es vd., 2017).





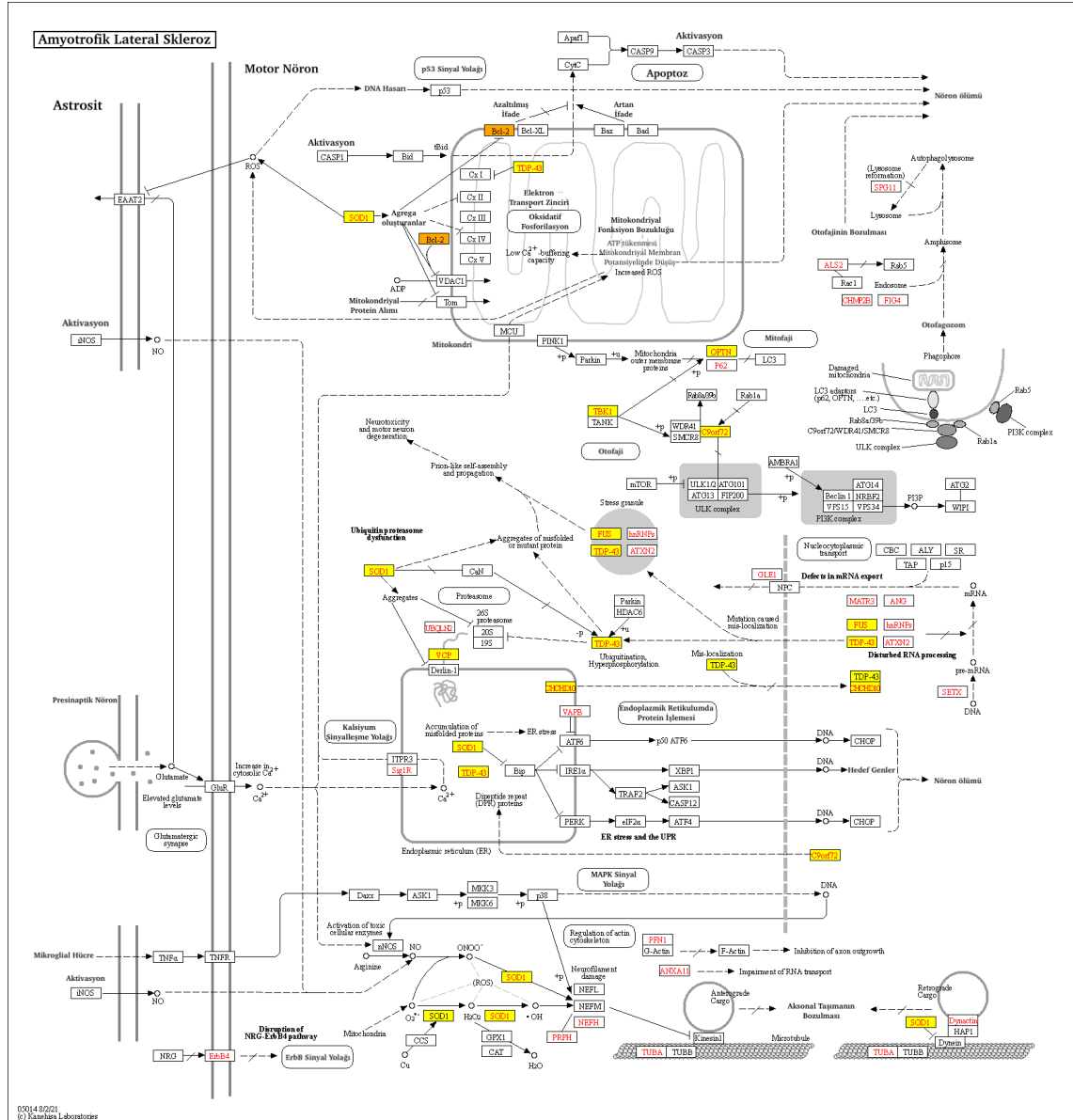
Şekil 2.3 1993 – 2016 yılları arasındaki ALS genetik manzarası (Chia vd., 2018)

1969 yılında ilk olarak tanımlanan SOD1 (süperoksit dismutaz 1) proteini, 1993 yılında ALS patogenezinde rol aldığı ortaya koyulmuştur. *SOD1* gen mutasyonu, ALS’de tanımlanan ilk mutasyondur (McCord & Fridovich, 1969; Rosen vd., 1993). Bu gen bölgesinde 200’den fazla mutasyon olduğu ve fALS vakalarının yaklaşık %20’sinin bu gende gerçekleşen mutasyonlara dayandığı bildirilmiştir (Shaw vd., 1998; ALS online database. “SOD1 Gen Özeti”. <https://alsod.ac.uk/output/gene.php/SOD1#variants>). Kong ve Xu’nun 1998 yılında, G93A mutant SOD1 eksprese eden transgenik fareler ile yaptıkları çalışmada, motor nöronlarda bulunan mitokondri hasarının mutant SOD1 toksisitesine aracılık ettiği, oluşan bu hasarların motor nöron fonksiyonlarını azalttığı ve ALS’nin klinik başlangıcını tetiklediği ortaya koyulmuştur (Kong & Xu, 1998). Fakat SOD1 proteinin hücredeki net lokalizasyonu bilinmediğinden dolayı mitokondri ile ilişkisi de tam olarak anlaşılamamıştır. Bu sebeple, 2002’de yapılan çalışmada, G93A SOD1 transgenik fare modelinde hücre içerisindeki mutant

SOD1 lokalizasyonu tayin edilmiştir. Omurilik motor nöron mitokondrilerinde ve sitozolde yabanıl tip (WT) ve mutant SOD1 konsantrasyonlarının yakın olduğu tespit edilmiştir. Sonuç olarak, SOD1'in sadece sitozolik bir enzim olmadığı ve mitokondri içerisinde de lokalize olduğu gösterilmiştir (Higgins vd., 2002). Yapılan daha sonraki çalışmalar ile mutant SOD1'in mitokondri dışı zarında ve zarlar arası boşlukta bulunduğu ortaya koyulmuştur (J. Liu vd., 2004; Sturtz vd., 2001). SOD1'in zarlar arası boşluk ve dış zara ek olarak mitokondri matriksinde de lokalize olduğu ortaya koyulmuştur. Transgenik fareler ile yapılan çalışmada, mutant ve yabanıl tip SOD1'lerin transgenik farelerin beyin hücrelerindeki mitokondrilerde biriktiği bildirilmiştir. Mutant SOD1'in beyin mitokondrilerinde yanlış katlandığını ve nöronal dejenerasyona sebep olabilecek çökelti oluşumuna eğilimli olduğu belirtilmiştir (Vijayvergiya vd., 2005). Mutant SOD1 mitokondride sadece çökelti oluşturmakla kalmayıp, morfolojisini de etkiler. 2011'de yapılan çalışmada, yanlış katlanmış SOD1 motor nöron aksonlarında bulunan mitokondrilerin morfolojisini ve dağılımını etkilediği, mitokondriyal homeostazı bozduğu ortaya koyulmuştur. Nöron gövdesindeki mitokondrilerin daha kısa ve küresel şekil aldığı, silindirik şeklini kaybettiği belirtilmiştir (vande Velde vd., 2011). Yabanıl tip SOD1 ve Bcl-2 anti apoptotik proteinlerdir. Mutant SOD1 ise apoptozu teşvik eder. Pasinelli ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, omurilik nöronlarındaki mitokondrilerde mutant SOD1'in anti apoptotik protein olan Bcl-2'ye bağlandığı ve çökelti oluşturdukları bildirilmiştir. Böylece, mutant SOD1 ve apoptotik yolak arasındaki bağlantı ortaya koyulmuştur (Pasinelli vd., 2004). Tüm bunları düşündüğümüzde mutant SOD1'in mitokondride çökelti oluşturması, birikmesi, mitokondrinin şeklini ve dağılımını etkilemesi mitokondride meydana gelen işlemlerin gerçekleşmesine engel olacaktır. Buna bağlı olarak mitokondri fonksiyon bozukluğu ve ALS tetiklenmesi yaşanacaktır. Bu kanıtlar dahilinde SOD1'in mitokondri fonksiyon bozukluğu ile bağlantılı olarak ALS hastalığı ve motor nöron dejenerasyonunda önemli rol aldığı anlaşılmaktadır.

TAR DNA-bağlanma protein 43 (TDP-43) proteini *TARDBP* geni tarafından kodlanır ve DNA/RNA bağlanma proteinidir. *TARDBP* geni, altı ekzon bölgesinden

oluşur ve 1. kromozomda yer alır (Kabashi vd., 2008). 2016 yılında yapılan çalışmada, ALS ve FTD hastalarının omurilik nöronlarındaki mitokondrilerde çökelmiş TDP-43 proteini tespit edilmiştir. ALS ile ilişkili G298S ve A382T mutasyonları TDP-43'ün mitokondrideki lokalizasyonunu arttırdığı belirtilmiştir. Yabancı tip ve mutant TDP-43'ün ETS'de bulunan Kompleks I alt ünitelerinden ND3 ve ND6 mRNA'larını baskıladığı ve Kompleks I bozukluğuna neden olduğu bildirilmiştir.



Şekil 2.4 Sarı işaretli düğümler, ALS'de mitokondriyal işlev bozukluğu ile ilgili genleri temsil eder. KEGG Amyotrofik Lateral Skleroz Yolağı, Map05014

TDP-43'ün mitokondrideki lokalizasyonu baskılandığında, yabanıl tip ve mutant TDP-43 mitokondride lokalize olmadığı ve mitokondride fonksiyon bozukluğunun da gerçekleşmediği ortaya koyulmuştur. Bu çalışma ile ALS'de gerçekleşen TDP-43 toksisitesi doğrudan mitokondri ile ilişkilendirilir (W. Wang vd., 2016). Bir diğer çalışmada ise mitokondride lokalize olan mutant TDP-43'ün yanı sıra sitozolde lokalize olan mutant TDP-43'ün de nöronlarda toksisiteye bağlı olarak ALS'ye sebep olabildiği ortaya koyulmuştur (Barmada vd., 2010). ALS'de oksidatif stres ve TDP-43 çökmesinin araştırıldığı bu çalışmada, mitokondriyal dengesizliğin sebep olduğu oksidatif stresin TDP-43 çökmesini indüklediği ortaya koyulmuştur. İnsan ve fare nöronal hücrelerinden elde edilen hücre hatlarında TDP-43 çökmesinin, nöronal hücreleri oksidatif strese karşı hassaslaştırdığı raporlanmıştır. Nükleer genomda kodlanan mitokondriyal proteinlerin bir kısmı ile bazı miRNA'ların düzenlenmesinde çökelmiş TDP-43'ün rol aldığı bildirilmiş. Bu durum mitokondriyal dengesizliğe neden olduğu ve oksidatif stresi arttırdığı belirtilmiştir (Zuo vd., 2021).

C9ORF72 geninde meydana gelen GGGGCC (G4C2) tekrar genişlemesi ALS'de meydana gelen yaygın genetik sebeplerdendir. Bu gen 9. kromozomda yer alır (DeJesus-Hernandez vd., 2011; Renton vd., 2011). AUG başlama kodonuna ihtiyaç duymadan RAN translasyonu gerçekleşir ve sonuç olarak çeşitli ürünler sentezlenir. Bu ürünlerden olan DPR (Dipeptid Repeat Protein-Tekrar Dipeptid Proteini) proteinleri oluşur. Oluşan bu proteinlerinden biri de glisin-arjinindir (GR). Poli-GR proteinleri toksik özellik gösterir (Wen vd., 2017; D. Yang vd., 2015). ALS ile ilişkili *C9ORF72* mutasyonlu hücre hatlarında yapılan çalışmada, (GR)80'nin mitokondriyal ribozomal proteinlere bağlandığı ve mitokondriyal fonksiyon bozukluğuna neden olduğu bildirilmiştir. *C9ORF72* mutasyonlu nöronlardaki poli (GR) proteinleri kısmen oksidatif stresi arttırarak DNA hasarına neden olur. Analizler neticesinde mitokondri membran potansiyelinin de kontrollere oranla yüksek çıktığı bildirilmiştir (Lopez-Gonzalez vd., 2016). *C9ORF72* heksanükletotid genişlemesi taşıyan ALS hastalarından elde edilen hücre hattında, antiapoptotik protein olan Bcl-2 seviyesinde ve mitokondriyal membran potansiyelinde azalma ortaya koyulmuştur. Ayrıca mitokondrilerin morfolojik olarak değişime uğradığı ve krista yapısında anormallikler olduğu

bildirilmiştir (Dafinca vd., 2016). Yine aynı grubun yaptığı bir diğer çalışmada, ALS/FTD hastalarından elde edilen hücre kültüründe C9orf72 ve TARDBP mutasyonlarının mitokondriyal kalsiyum alımında yaşanan sıkıntı ile ilişkili olduğunu ortaya koymuşlardır. Yani, mitokondriyal fonksiyon bozukluğu ile C9orf72 ve TARDBP mutasyonlarının ilişkisini hücre kültürü ortamında ortaya koymuşlardır (Dafinca vd., 2020).

FUS geni DNA-RNA bağlanma proteinidir. Genellikle çekirdekte lokalizedir. Mutant *FUS* sitozolde birikir ve toksik hale gelir, mitokondriyal şaperon proteinleri ile etkileşime girer ve mitokondri parçalanmasını indükler, serbest oksijen türlerinin (ROS) üretimini artırır (le Gall vd., 2020). R521C ve P525L transgenik farelerin beyin ve omurilik dokularında yapılan çalışmada, NMJ'de gerçekleşen erken, yapısal ve fonksiyonel anormallikler motor nöron dejenerasyonunu ortaya koyuyor. P525L *FUS* NMJ'de değişikliklere sebep oluyor ve mitokondri sayısı yabancıl tipe göre önemli miktarda azalıyor. Kalan mitokondriler ise, genişlemiş, kofullaşmış ve yanlış düzenlenmiş krista ve zar yapısına sahip oluyorlar. NMJ'de gerçekleşen bu anormal mitokondriler kasların sinirsizleşmesi ve uyarılamaması ile ilişkilidir. Endojen *FUS*'un mutant *FUS* tarafından indüklenen ALS fenotipinin başlangıcına katkıda bulunmadığı da ortaya koyulmuştur (Sharma vd., 2016).

Optineurin (*OPTN*) proteini ve onu kodlayan *OPTN* geni ALS patolojisi ile ilişkilidir (Bury vd., 2016; Maruyama vd., 2010; Osawa vd., 2011; Wong & Holzbaur, 2014). *OPTN*, Parkin-aracılı mitofajide otofaji reseptörü olarak görev alır. Hasar görmüş mitokondrinin ortadan kaldırılmasında, *OPTN* mitokondri dış yüzeyinde toplanır ve otofagozomu indükler. *OPTN*'nin mutasyona uğraması ile fonksiyonel olmayan mitokondrilerin zamanla nöronlarda birikmesine ve bu nöronların ölümüne sebep olur. E478G *OPTN* mutant hücre kültüründe yapılan çalışmada bu gende gerçekleşen mutasyonun mitofaji sürecini hasara uğrattığı, hasarlı mitokondrilerin biriktiği, nörodejenerasyona sebep olduğu ve ALS ile ilişkili olduğu ortaya koyulmuştur (Wong & Holzbaur, 2014). Moore ve Holzbaur'un yaptığı çalışmada, ROS ya da depolarizasyon kaynaklı mitokondri haraplanmasında *OPTN* ve *TBK1*'in de dahil olduğu bazı ilişkili proteinlerin mitokondri etrafında birlikte toplandığı ortaya koyulmuştur. *OPTN* veya *TBK1* 'in

mutasyona uğraması sonucunda otofagozom ve mitofaji zarar görmektedir (Moore & Holzbaur, 2016). OPTN'nin NF- κ B'yi baskıladığını bildirilen bir çalışmaya ek olarak hayvan modelinde ve hücre kültüründe yürütülen bir diğer çalışmada, E478G mutant ALS ile ilişkili hücrelerde NF- κ B aktivitesi normale kıyasla fazla çıkmıştır. Mutant OPTN'nin NF- κ B'yi baskılayamadığı, pro-inflamatuvar sitokinlerin salınmasında ve nöronal hücre ölümünde belirgin artış olduğu belirtilmiştir (Akizuki vd., 2013; Z. Liu vd., 2018).

TANK bağlanma Kinaz 1 (TBK1) IKK-kinaz ailesi üyesidir. Doğal bağışıklık sinyal yolağı içerisinde görev alır. TBK1 tip-1 interferonu indükler, otofaji ve mitofajide önemli role sahiptir. Otofajide görev alan bir başka gen ise *OPTN*'dir ve birlikte çalışırlar. TBK1'de gerçekleşen mutasyonlar otofaji için eksiklikler oluşturacak ve ALS patolojisini de etkileyen protein çökeltileri meydana gelecektir. TBK1 ve OPTN mitofaji için de temeldir. TBK1'in fonksiyonunu kaybetmesi demek hatalı mitofaji ve hatalı mitokondrilerin birikmesi demektir (Oakes vd., 2017). 90'dan fazla tanımlanan TBK1 mutasyonları ve ALS arasındaki ilişki yapılan birçok çalışma ile ortaya koyulmuştur (Cirulli vd., 2015; Freischmidt vd., 2015; Williams vd., 2015). TBK1 normalde sitoplazmada eksprese olur ve tüm hücrelerde bulunur. Serebral korteks, hipokampus ve lateral ventrikül nöronlarında yüksek seviyede bulunur. Nöronlarda yüksek seviyelerde bulunan TBK1, ALS hastalığı sırasında ekspresyon miktarı azalır (Uhlén vd., 2015). Yapılan çalışmada, TBK1'de bulunan ALS'ye neden olan mutasyonların mitofajiye olan etkileri araştırılmıştır. Hücre kültüründe primer nöronlarda mutant TBK1 bazal koşullar altında mitokondriyal strese neden olur, mitokondriyal hasar daha fazla stresin oluşmasına neden olur. TBK1'in ALS'ye bağlı bazı mutasyonları mitokondriyal stresi indükleyerek veya mitofajik süreci inhibe ederek hastalık patogenezinin katkıda bulunduğu gösterilir (Harding vd., 2021).

Mutant *CHCHD10* (Sarılımış-bobin-heliks-sarılımış-bobin-heliks bölgesi 10) ALS hastalarında tanımlanmıştır. *CHCHD10* gen bölgesindeki mutasyonlar (R15L, S59L, P34S, G66V) hem sALS hem de fALS ile ilişkilidir (Bannwarth vd., 2014; Chaussenot vd., 2014; Johnson vd., 2014; Müller vd., 2014). *CHCHD10* gen ürünü zarlar arası boşlukta ve krista eklemelerinde bulunan mitokondriyal bir proteindir

(Bannwarth vd., 2014). İlk olarak Bannwarth ve arkadaşları 2014 yılında, ALS ve FTD'li hastalardan alınan kas biyopsilerinde *CHCHD10* geninde S59L mutasyonunu tanımlamışlardır. Yaptıkları hücre kültürü çalışmasında ise mutasyonlu genin fazla eksprese olması durumunu da incelemişler ve mitokondriyal ağın parçalandığını, kristanın yanlış düzenlendiğini ve farklı abnormalitelerin ortaya çıktığını göstermişlerdir (Bannwarth vd., 2014). Genin ve arkadaşlarının S59L *CHCHD10* mutant farelerde yaptıkları çalışmada, oluşan mitokondriyal hasarın ALS'yi tetikleyebileceğini ve *CHCHD10* genindeki S59L varyantının fazla ekspresyonunun, motor nöronları oluşacak strese bağlı ölüme duyarlı hale getirdiğini doğrulamışlardır (Genin vd., 2019).

Mutant Valosin-içeren protein (*VCP*) geni ALS ve mitokondri fonksiyon bozukluğu ile ilişkili olduğu bulunmuştur (Bartolome vd., 2013; Johnson vd., 2010; Kim vd., 2013). 2010'da yapılan kohort çalışmasında, *VCP* geninde bazı mutasyonlar saptanmış. Bu çalışma ile fALS vakalarının %1-2'sinde *VCP* mutasyonu olduğu ve motor nöron dejenerasyonu ubikuitin/protein yolağındaki kusurları içeren kanıtlar ortaya koyulmuştur (Johnson vd., 2010). Kim ve arkadaşlarının transgenik *Drosophila* ile yaptığı çalışmada, *VCP*'nin PINK1/Parkin aracılı mitofaji için önemli olduğu ve *VCP*'de gerçekleşecek mutasyonların PINK1/Parkin aracılı mitofajide fonksiyon bozuklukları oluşturacağı ortaya koyulmuştur (Kim vd., 2013). Bartolome ve arkadaşlarının çalışmasında, mutant *VCP*'nin mitokondriyal membran potansiyelinin azalmasına, mitokondri oksijen tüketiminin artmasına sebep olduğu gösterilmiştir. Bunların sonucunda ise ATP seviyesinin azaldığı dolayısıyla hücrenin enerji kapasitesinin düştüğü böylelikle bu hücrelerin iskemi gibi yüksek enerji gerektiren işlemlere karşı savunmasız kaldığı görülmüştür (Bartolome vd., 2013)

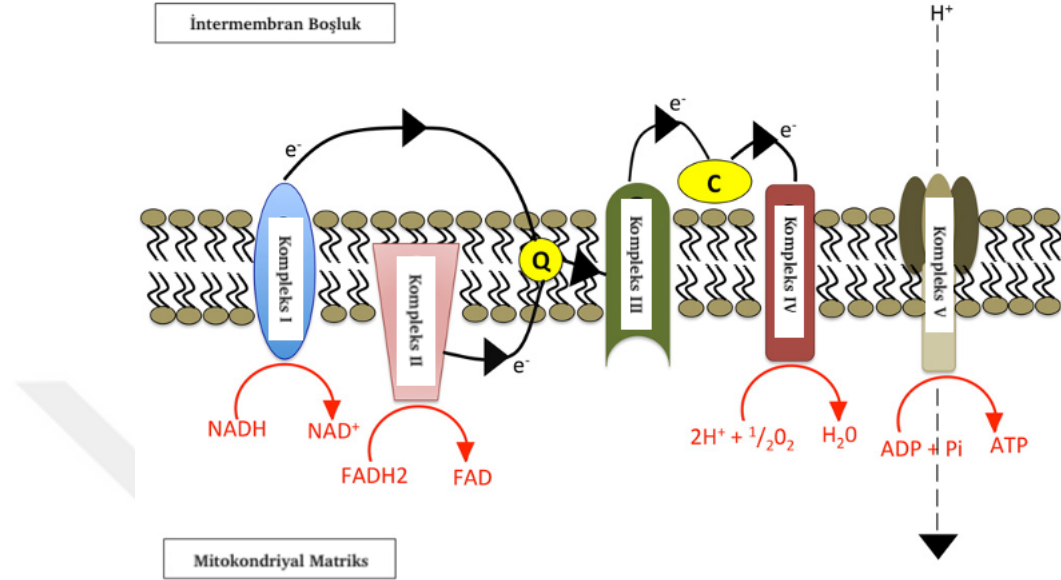
Bcl-2 (B hücresi lenfoma) proteini Bcl-2 protein ailesine mensup, otofaji, apoptoz ve mitokondriyal fonksiyon dinamiğinde yer alan anahtar düzenleyicidir (Akhtar vd., 2004; L. Zhou vd., 2015). Bcl-2 ailesi mitokondri dış zar geçirgenliğini ve apoptozu düzenlemede önemli role sahiptir. Mitokondri, zarlar arası boşluktan sitozole doğru sitokrom c salınımı yapar ve böylece kaspaz aktivasyonunu başlatır. Bcl-2 ise başlamış olan bu aktivasyonu ve mitokondri dış zar geçirgenliğini

organize etmektedir. Bcl-2 tarafından düzenlenen kaspazlar da apoptozu düzenlemektedir. Böylece Bcl-2, mitokondri, kaspazlar ve apoptoz ile iç içe geçmiş karmaşık bir etkileşim görülmektedir (Akhtar vd., 2004; Mérino & Bouillet, 2009). Bcl-2 ve motor nöron ilişkisine bakıldığında, Bcl-2 nakavt edilmiş transgenik farelerde embriyonik sinir sistemi neredeyse normaldir ve nöron ölümlerinde artış görülmemiştir. Ancak ilerleyen zamanlarda derin motor nöron kayıpları tespit edilmiştir. Bcl-2'nin, prenatal (doğum öncesi) nöronal sağ kalımı etkilemese de erken post-natal dönemde spesifik nöron popülasyonlarının korunması için önemli olduğu ortaya koyulmuştur (Michaelidis vd., 1996). Yapılan bir çalışmada ALS hastalarının omurilik motor nöronlarında *BCL2* ve *BAX* genlerinin ekspresyon seviyelerindeki değişiklikler tespit edilmiş ve kontrollerle karşılaştırıldığında, *BCL2* ifadesi daha düşük çıkmış. Ayrıca Bcl-2 düzeylerindeki değişikliklerin ALS hastalığının prognozu hakkında bilgi sağladığı yani potansiyel biyobelirteç olabileceği de öne sürülmüştür (Mu vd., 1996). Öte yandan Pasinelli grubunun yaptığı iki çalışmaya baktığımızda, ALS hastalığına bağlı olarak omurilik mitokondrilerinde mutant SOD1 ve Bcl-2 arasında anormal bir etkileşim tanımlanmış, mutant SOD1'in Bcl-2 ile bağlanıp mitokondride çökelti oluşturduğu belirtilmiş ve bu etkileşimin mitokondrilere dolaylı olarak da nöronlara zarar verdiği tespit edilmiştir (Pasinelli vd., 2004; Pedrini vd., 2010). Tan ve arkadaşları, mutant SOD1'in, Bcl-2 ile birleşerek toksik kompleks haline geldiği, mitokondride agregasyon oluşturduğu ve mitokondrinin ADP geçirgenliğini azalttığı ortaya koyulmuştur (Tan vd., 2013). 2018 yılında yapılan başka bir çalışmada Parkinson modeli hücre hattında Bcl-2 mRNA seviyesinin anlamlı şekilde down-regüle olduğunu ve bununla ilişkili olarak miR-9 ve miR-141'in de anlamlı şekilde ekspresyon seviyelerinde farklılıklar olduğu ortaya koyulmuştur (Rostamian Delavar vd., 2018). Sonuç olarak baktığımızda, yaptığımız bu çalışma ile mitokondriyal fonksiyon bozukluğuna etki eden genler tek bir başlık altında toplanmıştır. Tüm bu gen ürünlerini hedeflediğini belirlediğimiz miRNA'lar bu çalışmada bir arada bulunmuştur. Bu noktalar ile bu çalışma literatürde var olan diğer çalışmalardan ayrılmaktadır.

2.2 Mitokondri

Mitokondri, OXPHOS aracılığı ile enerji taşıyan moleküllerin ADP'den ATP'ye dönüştürülmesinde sorumlu olan hücre içi organeldir (Lambris, 2019). Hücresel enerjinin yaklaşık %90'nından fazlasını karşılarken bu enerji üretimine ek olarak, Ca^{+2} homeostazi, apoptozis, ROS üretimi, hücresel metabolizmanın düzenlenmesi, steroid sentezi, heme sentezi gibi süreçlerden de sorumludur (Chinnery & Hudson, 2013; Lambris, 2019; Turnbull vd., 2010). Mitokondriyal genom veya mitokondriyal DNA (mtDNA) olarak isimlendirilen kendine ait halkasal yapıda, çift zincirli genetik materyali ve kendine ait bağımsız ribozomu vardır (Keogh & Chinnery, 2015; Turnbull vd., 2010). Bu özelliği ile diğer hayvan hücrelerinde bulunan organellerden ayrışır (Lambris, 2019). Mitokondriyal fonksiyonlar iyi ya da kötü olması sahip olduğu çift katlı membran yapısının durumu ile yakından ilişkilidir (Turnbull vd., 2010). Dış zarı incelediğimizde mitokondriyi çevrelediğini ve gözenekli olduğunu ve düşük ağırlığa sahip moleküllerin geçişine izin verdiğini biliyoruz (Turnbull vd., 2010). Oldukça çok katlanmış olan iç zara baktığımızda ise solunum zincirindeki enzimlerin var olduğunu görüyoruz. Ayrıca, iç zar matriksin zarlar arası boşluktan da ayırmış bulunuyor (Turnbull vd., 2010). Matriks bölgesine yani iç zar içerisinde kalan bölgeye baktığımızda, mitokondrinin genetik malzemesi bu bölgede yer alırken TCA ve yağ asidi oksidasyon enzimlerini de görebiliyoruz. Krista -parmak benzeri çıkıntılar- matriste biyokimyasal substratlar ve solunum zinciri enzimleri arasında maksimum yüzey alanı sağlar. Ayrıca, iç zar sadece su, oksijen ve karbondioksit moleküllerini geçirir (Turnbull vd., 2010). Mitokondrinin temel ve ilk görevi ADP'den ATP üretimi yoluyla hücresel enerji ihtiyacını karşılamaktır (Turnbull vd., 2010). Bu işlem oksidatif fosforilasyon aracılığı ile çok alt üniteli 5 intermembran kompleks ve iki mobil elektron taşıyıcısı (koenzim Q10 ve sitokrom c) yardımıyla gerçekleşir (McFarland vd., 2010; Turnbull vd., 2010). Bu komplekslerden kompleks II tamamıyla nükleer DNA tarafından kodlanırken diğer tüm kompleksler hem mtDNA hem de nDNA tarafından kodlanırlar (Turnbull vd., 2010). Sitrik asit döngüsü, glikoliz ve anaerobik metabolizmadan elde edilen elektron donörleri tarafından alınan elektronlar ile oksidatif fosforilasyon başlar (Keogh & Chinnery, 2015). Oksiredüksiyon reaksiyonları aracılığı ile elektronlar solunum zinciri boyunca moleküler oksijene doğru taşınır. Ve bu taşınım

hareketiyle birlikte elektrokimyasal gradiyent oluşturur(Turnbull vd., 2010). Bu gradiyentle birlikte ATP sentaz (kompleks V) ile ADP'ye P_i (inorganik fosfat) eklenmesi ile ATP üretimi gerçekleşir(Keogh & Chinnery, 2015; Turnbull vd., 2010).



Şekil 2.5 Mitokondriyal solunum zinciri (Keogh & Chinnery, 2015)

Mitokondriyal solunum zinciri fonksiyonunun beyin de dahil olmak üzere birçok dokuda bozulmasıyla yaşlanmanın birbirlerine paralel gittiği yapılan çalışmalar ile de ortaya koyulmuştur (Keogh & Chinnery, 2015). Buna ek olarak mitokondri ve mtDNA birçok nörodejeneratif hastalığın gelişiminde önemli bir konumda durmaktadır (Keogh & Chinnery, 2015). Literatürdeki tüm bilgilerimizi bir araya getirdiğimizde yaşlanma ve nörodejenerasyon konularının mitokondri ve onun genetik materyali etrafında ilişkilendiğini fark ediyoruz (Keogh & Chinnery, 2015).

2.2.1 Mitokondriyal Fonksiyon Bozukluğu ve ALS

Nöronlar, yüksek enerji ve oksijen ihtiyaçları, aksonal taşıma ve nörotransmisyonu dahil olması nedeniyle, çok sayıda mitokondri bulunduran ve dolayısıyla oksidatif hasar riski daha yüksek olan hücrelerdir (Bordoni & Gabbianelli, 2020; Gómez-Suaga vd., 2019; Hirabayashi vd., 2017; Lezi & Swerdlow, 2012; Markovinovic vd., 2022). Bu nedenle oksidatif hasardan kolayca etkilenebilirler. Nöronlarda sinir iletimi ATP bağımlıdır dolayısıyla mitokondriler daha çok iletimin olduğu

yerlere yerleşmişlerdir. Mitokondride meydana gelen fonksiyon bozukluğu kanser, kardiyovasküler hastalıklar, diyabet ve nörodejeneratif hastalıklar gibi birçok patolojik durum ile ilişkilidir ve farklı nörodejeneratif hastalıkların oluşum mekanizması için önemlidir (Morgan & Orrell, 2016; Peoples vd., 2019; Wallace, 2012). Bu fonksiyon bozuklukları sadece mitokondriyal enerji mekanizmasını bozmakla kalmayıp aynı zamanda mitofaji, endoplazmik retikulum (ER) stresi, kalsiyum sinyalleşmesi gibi birçok noktada sıkıntıya sebep olmaktadır (Jaiswal, 2017; Morgan & Orrell, 2016; Tadic vd., 2014).

İlk olarak 1981 yılında ve sonraki yıllarda yapılan çalışmalarda ALS hastalarının motor nöronlarında boyutları ve şekilleri bozulmuş ve çökelmiş mitokondriler tespit edilmiştir (Atsumi, 1981; Sasaki & Iwata, 1996, 2007). 1993 yılında ise ALS hastalarından postmortem olarak elde edilen beyin dokularında mitokondriyal elektron taşıma sistemine (ETS) ait kompleks I aktivitesinin arttığı bulunmuştur. Bowling ve arkadaşlarının yapmış oldukları bu çalışma, ALS hastalarında ETS fonksiyon bozukluğunu ortaya koyan ilk çalışmadır (Bowling vd., 1993). Sonraki yıllarda başka gruplar tarafından da ALS hastalarında ETS'ye ait komplekslerin aktiviteleri araştırılmıştır (Browne vd., 1998; Swerdlow vd., 1998). Bunlardan bir diğeri de Jung ve arkadaşlarının çalışması, burada G93A mutant SOD1 transgenik fareler ile ETS'ye ait kompleks I aktivitesinin azaldığı bulunmuştur. Ek olarak, mitokondriyal fonksiyon bozukluğunun hastalığın başlangıcından önce başladığı da ortaya konulmuştur (Jung vd., 2002).

Lin ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, ALS hastalarından alınan kan örnekleri incelenmiş, kontrol grubuna kıyasla hastalarda oksidatif fosforilasyona ait enzim/protein seviyelerinde azalmalar sonucu, ETS fonksiyon bozuklukları tespit edilmiştir. Ayrıca, sonuçların kan örneklerinden elde edildiği ilk çalışma olmuştur (J. Lin vd., 2009). Magrane ve arkadaşlarının SOD1 ve TDP43 mutasyonlu transgenik fareler ile yaptıkları çalışmada ise, motor nöronlarında mitokondriyal morfoloji anomalileri ve bu anomalilere bağlı olarak akson boyunca mitokondriyal transport bozuklukları ortaya koyulmuştur (Magrané vd., 2014). Motor nöron ölümünün nerede başladığını araştıran araştırmacılar mitokondriyal fonksiyon bozukluğu ile karşılaşmışlar ve yapılan çalışmalar neticesinde, mitokondrilerin aksonal transportunda problem yaşandığı, anomali gösteren mitokondrilerin

nöromüsküler kavşakta (NMJ) biriktiği ve bunlarla ilişkili olarak motor nöron dejenerasyonunun ilk olarak NMJ'den başladığı bildirilmiştir (Fischer vd., 2004; Magrané vd., 2012; A. M. Schaefer vd., 2005). Mitokondride meydana gelen fonksiyon bozukluklarının ALS patofizyolojisindeki rolü ve önemi yapılan çalışmalar ile ortaya koyulmuştur. ALS ve mitokondri ilişkisi çözülmeye çalışılırken, araştırmacılar bu konu üzerinde hangi genlerin nasıl etki gösterdiğini araştırmışlardır. ALS ile ilişkili mutasyona sahip genlerin aynı zamanda mitokondriyal fonksiyon bozukluğu ile de ilişkili olduğu belirlenmiştir. Bu genler arasında *SOD1*, *TARDBP*, *FUS*, *C9ORF72*, *CHCHD10*, *OPTN*, *TBK1*, *VCP* ve *BCL2* sayılabilir.

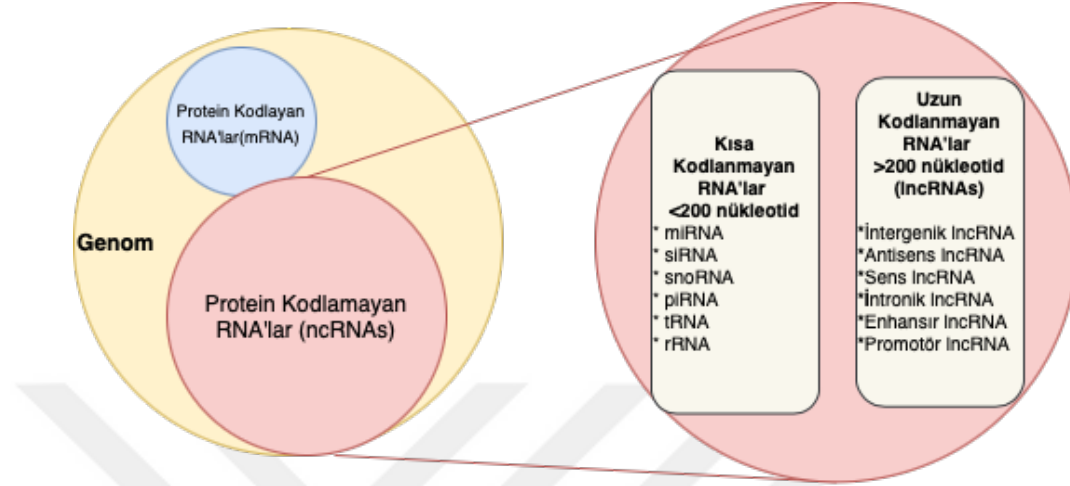
2.3 Kodlanmayan RNA'lar (ncRNA)

İnsan genomunu %1-2'si protein kodlamaktadır. Genomik DNA'nın yaklaşık üçte ikisinin yaygın olarak kopyalandığını ortaya koyan çalışmalara göre bu durum nihai olarak proteinlere çevrilen %1-2 oranı ile keskin bir tezatlık oluşturur (Djebali vd., 2012; Dunham vd., 2012). RNA dünyasını iki ana başlık altında incelersek bunlar kodlanabilen, proteine dönüşebilen, RNA'lar; kodlanmayan RNA'lardır (ncRNA, non-codingRNA). Geçmişte, kodlanmayan RNA'lar çöp (junk) DNA olarak anılırdı. Günümüzde yeni nesil dizileme teknolojilerinin yardımı ile artık bu tür RNA'lar dizilenip ortaya konulmaktadır. ncRNA'lar uzunluklarına göre iki başlık altında incelenir. 200 nükleotidden daha uzun olanlar uzun kodlanmayan RNA'lar (lncRNA); 200 nükleotidden kısa olanlar ise kısa kodlanmayan RNA'lardır. Kısa kodlanmayan RNA'lar; miRNA, siRNA, snoRNA, piRNA vs. Uzun kodlanmayan RNA'lar ise intergenik lncRNA, intronik lncRNA, antisens lncRNA, enhansır lncRNA olarak sıralayabiliriz (Beermann vd., 2016).

2.3.1 mikroRNA (miRNA) ve Biyogenezi

1993 yılında Ambros laboratuvarında ve 2000 yılında Ruvkun laboratuvarında yapılan çalışmalarda *C. elegans* larva gelişiminin zamanlamasını kontrol eden *lin-4* ve daha sonra *let-7* genleri karakterize edilmiş ve bunların iki küçük düzenleyici RNA'yı kodladığı ortaya koyulmuştur (R. C. Lee vd., 1993; Reinhart vd., 2000). Günümüzde mikro RNA (miRNA) olarak adlandırılan kodlanmayan, tek zincirli

RNA molekülleri, gen anlatımını post-transkripsiyonel olarak düzenleyen regülatörler olarak bilinmektedir. Tek bir miRNA birçok hedef mRNA'yı düzenleyebilir ve bir mRNA transkripti ise birçok miRNA tarafından düzenlenebilir (Bartel, 2004; Peter, 2010; Wu vd., 2010).



Şekil 2.6 RNA dünyası

miRNA'lar hedef mRNA'ya tam veya kısmi uyumluluk (komplementerlik) göstererek, 3' okunmamış bölgesine (UTR-untranslated region) bağlanırlar. miRNA'ların 2-8 nükleotid uzunluğundaki çekirdek dizisi (seed sequence) hedef mRNA'ya komplementerliği önemlidir. miRNA'da bulunan çekirdek dizisi mRNA ile komplementerliğine bağlı olarak 4 farklı bağlanma gerçekleştirir. Bunlardan 6 mer, miRNA üzerindeki çekirdek dizisinde 6 nükleotidlik eşleşme gerçekleşmesidir. 7merA1 ise çekirdek dizisinde 6 nükleotid eşleşmesinin yanında miRNA'nın birinci nükleotidin karşısında A nükleotidinin bulunmasıdır. 7mer-m8, çekirdek dizisi 6 nükleotid eşleşmesine ek olarak miRNA'nın sekizinci nükleotidinde de eşleşme sağlanmasıdır. 8mer ise 6 nükleotid eşleşmesine ek olarak miRNA'nın sekizinci nükleotidinde eşleşme ve 1. Nükleotidinin karşısında A nükleotidinin olmasıdır (Bartel, 2009; Grimson vd., 2007). mRNA-miRNA tam komplementerlik gösterirse mRNA yıkımı ile, az komplementerlik gösterirse translasyonel inhibisyon denilen mRNA'nın baskılanmasıyla sonuçlanır (Görür & Tamer, 2011; KARAGÜN vd., 2014).

miRNA biyogenezi kanonik (tipik) ve kanonik olmayan (atipik) yollar ile gerçekleşir. Genellikle miRNA oluşumunda kanonik yolak devrede olur. miRNA'lar nükleer genomdan RNA Polimeraz II (bazen de RNA Pol III) ile transkripte olurlar

ve uzun primer miRNA transkripti (pri-miRNA) ortaya çıkar (Borchert vd., 2006; Y. Lee vd., 2004). Pri-miRNA 5' ucunda 7 metilguanozin başlığı ve 3' ucunda ise poli A kuyruğu ile yaklaşık 1000 nükleotid uzunluğa sahiptir. Bir Ribonükleaz III enzimi olan Drosha ile RNA bağlanma proteini olan DGCR8 birleşerek mikroişlemci kompleksini oluştururlar ve pri-miRNA'yı keserek yaklaşık 60-70 nükleotid uzunluğunda öncü miRNA'lar (pre-miRNA'lar) ortaya koyulur. Halâ çekirdekte bulunan pre-miRNA'lar, ekspotin 5 ile sitoplazmaya geçiş yaparlar. Sitoplazmada bulunan Dicer enzimi, pre-miRNA'ları keser ve ~22 nükleotid çift zincirli olgun miRNA molekülleri oluşur. Bunun ardından, çift ipliğin birine Ago-2 proteinine bağlı RISC (RNA-indüklenmiş susturma kompleksi) enzim kompleksi bağlanarak hedefine yönelir. Ago ve RISC bağlanmamış diğer zincir ise tamamlayıcı zincirdir ve * işareti ile gösterilir. Kanonik olmayan yolaklar ise alternatif yolaklardır ve bunlar Drosha bağımsız yolaklar ve Dicer bağımsız yolaklar olmak üzere ikiye ayrılırlar (Goodall vd., 2013). Bu küçük RNA'lar hücrel farklılaşma (Naguibneva vd., 2006), gelişim (Hornstein vd., 2005), immün tepkisi (Xiao vd., 2007) gibi birçok biyolojik süreçte görev alırlar. 2005'te Hornstein ve arkadaşlarının yaptığı çalışmaya baktığımızda, farelerde uzuv gelişiminde rol alan *Hoxb8* ve *Shh* genlerinin ekspresyonunda rol aldığı düşünülen miR-196'nın in vitro olarak incelenmesiyle, bu genlerin ekspresyonunda akış yukarısında (upstream) hareket ettiği gözlemlenmiştir. Böylece miRNA'ların hücrel gelişimde rol aldığı, gen regülasyonunda etkili olduğu ortaya koyulmuştur (Hornstein vd., 2005). miRNA'lar ile biyogenezde yer alan RISC de en az miRNA'lar kadar önemli rol oynar. 2007'de yapılan çalışmaya baktığımızda, farelerde yaptıkları çalışmada, RISC proteinlerinden olan Ago2'yi kodlayan gen nakavt ediliyor ve fareler gelişmeden embriyonik ölüm gerçekleşiyor (Morita vd., 2007). Bir diğer çalışmada ise, fare embriyonik kök hücrelerinde bir RNA bağlanma proteini olan DGCR8'i kodlayan gen nakavt ediliyor ve miRNA biyogenezinin tam olarak devam edemediği ve embriyonik kök hücre kolonilerinin oluşumunda tutukluk yaşandığı belirtiliyor (Y. Wang vd., 2007). Bazı miRNA'lar nörogenezde (Åkerblom vd., 2012), nöronal farklılaşmada (Conaco vd., 2006) görev alırlar. Görevli olan bu miRNA'larda fonksiyon bozukluğu yaşandığı zaman nörodejenerasyona sebep oldukları yapılan çalışmalar ile ortaya koyulmuştur.

Yapılan çalışmalardan birinde, gelişmekte olan sıçan ve maymun beyinlerindeki miRNA ekspresyon profili DNA mikroçip yöntemi ile incelenmiş, 138 tane miRNA tespit edilmiş ve bunlardan 66 tanesinin gelişim sırasında ekspresyon seviyelerinin değiştiği kaydedilmiştir. Memeli beyin gelişiminde miRNA önemini ortaya koyan ilk çalışma olarak literatürde yerini almıştır (Miska vd., 2004). Bir diğer alışma Schaefer ve arkadaşlarının, Dicer enzimi olan ve olmayan iki grup fare ile yaptıkları çalışmada, Purkinje hücrelerinde miRNA'ların post-mitotik nöronlardaki rolünü incelemişlerdir. Dicer'ın inaktif olmasıyla Purkinje hücrelerinde eksprese edilen miRNA'lar yok olmaya başlamış ve Purkinje hücrelerinin dejenerasyonuna yol açmıştır. Dicer eksikliğinde ilerleyen nörodejenerasyon, miRNA'ların nörodejeneratif bozukluklara dahil olma olasılığını arttırır. Bu alışma ile miRNA'ların nöron gelişimi, nöron yaşamı için temel olduğu ve yokluğunda bu hücrelerin dejenerasyonuna sebep olabileceği ortaya koyulmuştur (A. Schaefer vd., 2007). Bir diğer çalışmada ise, 14 sALS hastası ve 14 sağlıklı kontrolden elde edilen lökositlerden izole edilen miRNA'ların ekspresyon profilleri ortaya koyulmuş. Kontrollere kıyasla 8 tane miRNA ALS hastalarında farklı seviyelerde gözlemlenmiş, miR-338-3p yüksek seviyede, diğer 7 miRNA ise düşük seviyede çıkmıştır. Bu alışma sALS'nin erken aşamasında hastaların kan örneklerinden elde edilen miRNA'ların hastalık ile ilişkili spesifik değişikliklerini tespit eden ilk çalışma olmuştur. Ayrıca miRNA'ların motor nöronlardan ziyade kan örneklerinden elde edilmesi de bu çalışmayı özelleştiren bir diğer noktadır (de Felice vd., 2012). G93A SOD1 transgenik farelerin kullanıldığı bu çalışmada, omurilik ve beyin kökü doku örneklerinde değişen miRNA ekspresyon seviyeleri ve bu değişimin ALS ile ilişkisi araştırılmıştır. miR-200a, miR-124 gibi 10 miRNA'nın ekspresyon seviyesinde değişiklik tespit edilmiştir. Bunlar arasında, miR-124'n aşağı doğru düzenlendiği ve bu miRNA'nın nöral kök hücrelerin astrositik farklılaşmaya etki ettiği ortaya koyulmuştur. Sox2 ve Sox9 transkripsiyon faktörlerinin miktarlarında ve miR-124 arasında zıtlık ortaya koyulmuştur (F. Zhou & Zhang, 2018). Yapılan alışmalar neticesinde, miRNA'ların nöronal süreçlerde ve nörodejenerasyonda rol aldığı ortaya koyulmuştur.

2.4 Biyobelirteçler

Biyobelirteç, normal biyolojik süreçlerin, patojenik süreçlerin veya terapötik müdahaleye verilen farmakolojik yanıtların bir göstergesi olarak nesnel ölçülen bir özelliktir (Vu & Bowser, 2017). Biyobelirteçlerde ideal olan, hastalık süresince sabit olması, erişilebilir dokularda saptanabilir olması ve aynı zamanda kolaylıkla ölçülebilir olmasıdır (Magen vd., 2021). Biyobelirteçler birçok sebeple kullanılabilir. Hastalığı tanımlamak, hastalığın seyrini takip etmek, terapötik görüntülemek olarak sıralanabilir. Biyobelirteçleri kaynağına göre; kan temelli biyobelirteçler, CSF temelli biyobelirteçler, MRI biyobelirteçler, nörofizyolojik biyobelirteçler olarak çeşitlendirebiliriz (Turner vd., 2009). ALS hastalığında kan ve CSF sıvıları başta olmak üzere birçok biyobelirteç bu zamana kadar yapılan çalışmalar ile ortaya koyulmuştur (Benatar vd., 2018; S. Li vd., 2016; Magen vd., 2021; Verde vd., 2019).

2.4.1 miRNA ve Biyobelirteçler

Bugüne kadar binden fazla miRNA tanımlanmıştır ve bunların çeşitli vücut sıvılarında (plazma, serum, idrar...) bulunmaları ve dikkate değer kararlılıkları, onları çeşitli insan hastalıklarının işlem veya müdahale gerektirmeyen (invaziv olmayan) biyobelirteçleri için mükemmel adaylar haline getirmektedir (Etheridge vd., 2011; Monleau vd., 2014). miRNA'ların etkilerine bakıldığında birçok molekülün birincil, ikincil ve üçüncül yapılarıyla etkileşime girerek birçok biyokimyasal yolağın düzenlenmesinde görev aldığı bilinmektedir. Memeli transkriptinin %60'ından fazlası miRNA'ların kontrolü altındadır. Bu sebeple, günümüzde birçok hastalığın tanısında, prognozunda ve tedavisinde miRNA'ların biyobelirteç olarak kullanımıyla ilgili çalışmalar yapılmaktadır (Friedman vd., 2009; Güzelgöl & Aksoy, 2015). Biyobelirteç olarak kullanılması planlanan miRNA'ların ilk kez serumdaki varlığı Lawrie ve arkadaşları tarafından 2008 yılında gösterilmiştir (Lawrie vd., 2008). miRNA'ların tüm hücrelerde genlerin transkripsiyon sonrası kontrolleri ile ilişkili olduğu düşünüldüğünde bu moleküllerin çok sayıda hastalıkla olan ilişkisi şaşırtıcı değildir. ALS hastalığına tedavi ve tanı yönünden baktığımızda, tam olarak tedavisi olmayan bir hastalıktır. ALS için tek ve saf bir tanı testi yoktur (Waller vd., 2017). Tedavinin ilk basamağı

olan tanı, uzun bir süreç olarak karşımıza çıkar ve ortalama 12 aydır (Brown & Al-Chalabi, 2017). Bu durumla ilişkili olarak, ALS çalışmalarında biyobelirteç araştırmaları önceliğe sahiptir (Bowser vd., 2011; van Es vd., 2017). Böylece tanısal süreci ve gecikmeyi azaltmak amaçlanır. İşte tam bu noktada, bu çalışmanın hastalığın tanı süresini kısaltmasını ve kolaylaştırmasını sağlayacak şekilde literatüre katkı yapması beklenmektedir. Üzerinde durduğumuz miRNA'ların ALS hastalarının kan örneklerinde biyobelirteç olarak kullanılma ihtimali araştırılmıştır. Biyobelirteç çalışmaları tedavinin hızlı ve erken şekilde başlamasını sağlamak amacıyla yürütülür (van Es vd., 2017). Biyobelirteç konusu oldukça çeşitli ve geniş bir konudur. Kan, vücudumuzdaki her doku ile etkileşimde olan bir biyobelirteç kaynağıdır (Waller vd., 2017). Daha öncelerden beri, kandaki mRNA ve protein değişiklikleri nörodejeneratif hastalıklardaki patolojik değişiklikleri yansıtmaları için kullanılmıştır (Borovecki & Habek, 2010; Sharp vd., 2006; Waller vd., 2017). Birçok çalışma ile periferik kan hücresi genlerinin ve miRNA ekspresyonlarının nörolojik hastalıklarda belirteç olarak kullanılabileceğine dair kanıtlar ortaya koyulmuştur (Borovecki & Habek, 2010; Maes vd., 2007; Nishimura vd., 2007). Kanda bulunan miRNA'lar, ilginç şekilde stabil durumdadır yani, RNase degradasyonuna karşı daha dirençli, farklı saklama sıcaklıklarına, yüksek ya da düşük pH seviyelerine göre oldukça stabil ve dayanıklıdır. Böylece, kanda bulunan miRNA'ları uygun şekilde biyobelirteç olarak çalışması kolaylaşır (Waller vd., 2017).

2.4.2 miRNA-9

miRNA-9 (miR-9), ilk olarak Lagos-Quintana ve arkadaşlarının Drosophila' da yaptıkları çalışma ile literatüre girmiştir (Lagos-Quintana vd., 2001). Memelilerde miR-9, farklı kromozomlarda bulunan üç farklı genden kodlanmış üç farklı öncü (miR-9-1, miR-9-2 ve miR-9-3) miRNA'dan işlenir (Shibata vd., 2008). miR-9, beyin bölgesinde oldukça fazla bulunur ve beyin-spesifiktir, bölgeye özgüdür. Yapılan birçok çalışma neticesinde oldukça fazla miktarda eksprese olduğu ve beyin bölgesine özgü olduğu ortaya koyulmuştur. Özellikle beyin gelişiminde embriyonik dönemde erişkin dönemlere kıyasla daha yüksek seviyede olduğu da bildirilmiştir (Landgraf vd., 2007; Miska vd., 2004; Sempere vd., 2004). miR-9'un

beyindeki varlığıyla birlikte burada ne yaptığını hangi işlem ve süreçlerde rol aldığını araştıran araştırmacılar, nörogenezde ve nöronal farklılaşmada rol aldığını ortaya koymuşlardır. Zebra balıkları ile yapılan çalışmada, geç embriyonik dönemde miR-9 ekspresyonun başladığı ve devamında orta-arka beyin bölgesindeki nörogenezi teşvik ettiği ve Fgf sinyal yolağındaki bileşenleri hedef aldığı ortaya koyulmuştur (Leucht vd., 2008). miR-9, nöronal kök hücrelerin kendini yenileyebilmesini ve farklılaşmasını sağlar. TLX bir nükleer reseptör ve nöral kök hücre yenilenmesi ve düzenlenmesi için temeldir. TLX ve miR-9 arasındaki ilişkinin araştırıldığı çalışmada, miR-9 TLX reseptörünü negatif olarak düzenleyerek nöral kök hücrelerdeki farklılaşma sürecinde rol oynamaktadır. Bu da miR-9'un nöronal farklılaşmadaki rolünü ve önemini ortaya koyar (Zhao vd., 2009). miR-9 ve nöronal farklılaşmadaki rolünü, nöral progenitör hücrelerin proliferasyonu nasıl regüle ettiğini ortaya koyan daha pek çok çalışma mevcuttur (Shibata vd., 2008, 2011). Nöron gelişiminde, farklılaşmasında önemli olan bu miRNA'da yaşanacak değişiklikler nörodejenerasyona da sebep olabileceğini düşünen araştırmacılar, miR-9 ve nörodejenerasyon arasındaki bağlantıyı araştırmışlardır. Lukiw'in yaptığı çalışmada, postmortem Alzheimer'lı beyin hücrelerinde miR-9 seviyesi yüksek çıkmış. Bunun sonucunda ise, miR-9'un nörodejenerasyonda rol alabileceği ortaya koyulmuştur (Lukiw, 2007). miR-9 ve motor nöron özelinde konuya baktığımızda ise, in vivo olarak Dicer mutant farelerde yapılan çalışmada, miRNA aktivitesinin postmitotik spinal motor nöronlarda temel olduğu ortaya koyulmuştur. Ağır nörofilament alt biriminin miR-9 hedefi olduğu bildirilmiştir. miR-9'un olgun nöronlarda ve nörodejenerasyonda potansiyel düzenleyici olduğu ileri sürülmüştür (Haramati vd., 2010). ALS'nin miR-9 ile ilişkisine bakıldığında, Zhou ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada G93A SOD1 transgenik fare modelinde mikroçip ile miR-9 seviyelerine bakılmıştır. Farelerin omuriliklerinde miR-9'un yukarı doğru düzenlendiği tespit edilmiş, yapılan in situ hibridizasyon çalışması sonucunda miR-9'un yabanıl tip ve transgenik farelerde farklı zamanlarda, nörodejenerasyonun başladığı bölge olan, omurilik ön ve arka boz maddelerindeki hücrelerin sitoplazmasında lokalize olduğu tespit edilmiştir. Bu durum nörodejenerasyon ile bağlantılı bulunmuştur (F. Zhou vd., 2013). A90V TARDBP

ve M337V TARDBP mutasyonlu FTD/ALS hücre kültürlerinde yapılan bir diğer çalışmada iki farklı hücre kültüründe miR-9'un aşağı doğru düzenlendiği bildirilmiştir (Zhang vd., 2013). G93A SOD1 transgenik farelerin kullanıldığı çalışmada, miR-9'un primer motor kortekste beyin kökü ve beyin sapı motor çekirdeği bölgelerinde yukarı doğru düzenlendiği, subventriküler bölge ve hipokampus bölgelerinde ise aşağı doğru düzenlendiğini ortaya koymuşlardır (Marcuzzo vd., 2015). miR-9 ile ilgili konu dahilinde yapılan çalışmalardan önemli olanları ortaya koyduk. miR-9'un yapacağımız projede yer almasının nedenleri nörogenezde, nöronal farklılaşmada yer almasıdır. Bu süreçlerde rol alan miR-9'un yaşanan nörodejenerasyondan etkilenecek ekspresyon seviyesinde anlamlı değişiklik kaydetmeyi beklemekteyiz. 2018'de yapılan bir çalışmada ALS hastalarından elde edilen beyin omurilik sıvısı (CSF) örneklerinde kontrollere kıyasla miR-9-5p ve bazı diğer miRNA'ların ekspresyon seviyeleri farklı çıkmıştır. Bu çalışmada miR-9-5p ALS hastalarında up-regüle olduğu ve ekspresyon seviyesinin hasta CSF'lerinde yüksek çıktığı ortaya koyulmuştur (Waller vd., 2018). Aynı yıl, başka bir grup tarafından yapılan sporadik ALS hastalarının dahil olduğu çalışmada kan örnekleri üzerinden miR-9-5p ve bazı miRNA ekspresyon düzeyleri incelenmiştir. Hasta ve kontrollerin ekspresyon seviyelerine bakıldığında, miR-9-5p hasta örneklerinde daha yüksek seviyede çıkmış yani up-regüle olmuştur (Vrabec vd., 2018). Genel olarak literatüre baktığımızda, miR-9'un beyindeki varlığı ve nöronal farklılaşmada rol oynadığı görülmektedir. Ayrıca, daha önce yapılan çalışmalarda bir grup ALS hastalarının CSF'lerinde ve sporadik ALS hasta grubunun da kan örneklerinde miR-9 kontrollere kıyasla farklı seviyelerde ortaya koyulmuştur.

2.4.3 miRNA-141

miR-141'in üyesi olduğu miRNA-200 ailesi, beş üyesi (miR-200a, miR-200b, miR-200c, miR-429 ve miR-141) ile iki farklı genomik bölgede bulunur (Huang vd., 2014). miR-141'in apoptozu modüle ettiği gösterilmiştir ve fibroblastlar oksidatif strese maruz kaldıktan sonra miR-141'in ekspresyonu artar (Mateescu vd., 2011). ROS (reaktif oksijen türleri), hücre aerobik solunumunun yan ürünleridir. Mitokondri ise, enerji sağlamak için aerobik solunumun ana yeridir ve hücrelerdeki temel ROS kaynağıdır. 2008 yılında yapılan bir çalışmada, ROS ile

indüklenen bir miRNA olan miR-141'in Alzheimer hastalarının beyinlerinde aşırı eksprese edildiği bulunmuştur (Cogswell vd., 2008). Bir çalışma, miR-141 ve miR-9 ekspresyonunun Parkinson hastalığında oksidatif strese yanıt olarak önemli ölçüde arttığını doğrulamıştır (Rostamian Delavar vd., 2018). Ayrıca başka bir çalışmada, akut pankreatit hastalarının serum verilerinde miR-9 ve miR-141'in potansiyel biyobelirteç olabileceği keşfedilmiştir (Lu vd., 2017).

2.5 Periferik Kan Mononükleer Hücreleri (PBMC)

Periferik kan mononükleer hücreleri (PBMC), kan dolaşımında bulunan, lenfositler (T hücreleri, B hücreleri), doğal öldürücü (NK) hücreler, monositler ve dendritik hücreler gibi tek yuvarlak çekirdeğe sahip lökositlerden oluşur (Y. Wang vd., 2015). Periferik kan, kolay elde edildiğinden temel ve klinik araştırmalar için ideal bir dokudur (Fan vd., 2015). ALS hastalığının başlangıcı ve ilerlemesi üzerinde aktif glial hücreler ve bağışıklık hücreleri arasındaki karmaşık bir etkileşimden oluşan nöroinflamatuvar reaksiyonun etkisi olduğu görülmektedir (Beers & Appel, 2019). Bu sebeple, içerisinde bağışıklık hücrelerini içeren PBMC bu amaç için erişilebilir ve uygulanabilir bir insan hücresi kaynağıdır (Luotti vd., 2020). Monleau ve arkadaşlarının üç ayrı kit ile denedikleri çalışmada serum ve PBMC karşılaştırılması yapıldığında PBMC'den daha fazla miRNA elde edilmiştir (Monleau vd., 2014). Ayrıca kanıtlar, PBMC'lerin beyinle ortak bir miRNA ifade modelini paylaşabileceğini düşündürmektedir (Fan vd., 2015; Liang vd., 2007). PBMC'nin kullanım potansiyeli olduğu ortaya koyulan bir çalışmada, plazma ve PBMC karşılaştırılması yapıldığında bazı miRNA'ların plazmada çok az yoğunlukta kaldığını ve neredeyse hiç ölçülemediğini, PBMC'de ise daha fazla ölçüldüğünü bildirmişlerdir (Schwienbacher vd., 2017). ALS mutant fare modeli üzerinde doğal bağışıklığın etkilerinin araştırıldığı çalışmada, inflamatuvar monositlerin aktive edildiği ve hastalık ilerleyişi ile korele olduğu ve bu sebeple, hastalığın evresi veya ilerleyişi için biyobelirteç olarak görev alabileceği ortaya koyulmuştur (Butovsky vd., 2012). Tüm bu bilgiler ışığında, ALS hastalığı ve bağışıklık hücrelerinin bağlantısı doğrultusunda bu çalışmada miRNA kaynağı olarak PBMC kullanılması uygun bulunmuştur.

MATERYAL VE METOT

3.1 Materyal

3.1.1 Genel Laboratuvar Malzemeleri

Tablo 3.1 Laboratuvar Genel Malzemeleri

Malzeme	Adet/Miktar	Üretici Firma
Mikro pipetler	3 adet/10, 100, 100 μ l	Eppendorf
Pipet Uçları	10 kutu/10, 100, 100 μ l	M. Plastic
Falkon Tüpleri	100 adet/15 ml	Sarstedt
Falkon Tüpleri	100 adet/50 ml	Sarstedt
Lenfosit Ayırıcı Medya (Ficoll)	1 adet/500 ml	Biosera
PBS	2 adet/500 ml	Multicell
Nitril Eldiven	100 adet	MyGlove
Santrifüj Tüpü	500 adet/1,5 ml	M. Plastic
PZR Tüpleri	1000 adet/0,2 ml	M. Plastic
PZR Tüpleri	500 adet/0,5 ml	M. Plastic
PZR Tüp Standı	6 adet	M. Plastic
Nükleaz İçermeyen Su	1 adet/25 ml	NEB
EDTA'lı Tüpler	40 adet/10 ml	BD Vacutainer
Kloroform	1 adet/2,5 L	Sigma-Aldrich
Etil Alkol (%96)	1 adet/5 L	Necm Kimya
Etil Alkol (%100)	1 adet/2,5 L	Millipore Corporation
miRCURY LNA miRNA PZR Primerleri	3 adet	Qiagen

Tablo 3.2 Total RNA İzolasyon (miRNeasy Mini Kit) Kit İçeriği

Malzemeler	Adet/Miktar	Üretici Firma
QIAzol Liziz Reaktifi	1 adet/50 mL	Qiagen
RNeasy Mini Spin Kolon	50 adet	Qiagen
RWT Tamponu	1 adet/45 mL	Qiagen
RPE Tamponu	1 adet/55 mL	Qiagen
Nükleaz İçermeyen Su	1 adet/10 mL	Qiagen
Toplama Tüpleri	50 adet/1,5 mL	Qiagen
Toplama Tüpleri	50 adet/2 mL	Qiagen

Tablo 3.3 cDNA Çevirme (miRCURY LNA RT Kit) Kit İçeriği

Malzemeler	Adet/Miktar	Üretici Firma
SYBR Reaksiyon Tamponu (Mg ²⁺ , Primerler ve dNTP'leri içerir)	1 adet/128 μ L	Qiagen
Prob reaksiyon Tamponu (Mg ²⁺ , Prob RT primerleri ve dNTP'leri içerir)	1 adet/128 μ L	Qiagen
miRCURY RT Enzim Karışımı	1 adet/64 μ L	Qiagen
Nükleaz İçermeyen Su	1 adet/1,5 mL	Qiagen

Tablo 3.4 RT-qPCR (miRCURY LNA SYBR Yeşil PZR Kit) Kit İçeriği

Malzemeler	Adet/Miktar	Üretici Firma
PZR Master Karışımı (SYBR Green PZR tamponu, dNTP'ler, Polimeraz, Antikor)	3 adet/1 mL	Qiagen
ROX Referans Boyası	1 adet/1 mL	Qiagen
Nükleaz İçermeyen Su	2 adet/1,5 mL	Qiagen

3.1.2 Kullanılan Cihazlar

Tablo 3.5 Laboratuvarda Kullanılan Cihazlar

Ekipman	Üretici Firma
Ultra Derin Dondurucu Dolap (-80° C)	Thermo Fisher Scientific
Derin Dondurucu Dolap (+4° C)	Arçelik
Masaüstü Santrifüj	Hettich Universal 32 R
Masaüstü Santrifüj	Beckman Coulter Allegra X-30R
RT-qPCR Termal Isı Döngüleyici	Roche
Termal Isı Döngüleyici T100	Bio-Rad
Vorteks	Velp
Bilgisayar	Apple
Nanodrop	Thermo Fisher Scientific
Çeker Ocak	Hedlab

3.1.3 Kullanılan Bilgisayar Programları

Tablo 3.6 Ölçüm ve hesaplamalarda kullanılan yazılımsal gereçler

Program	Üretici Firma
Excel Çalışma Sayfası	Microsoft Co.
Word Çalışma Sayfası	Microsoft Co.
SPSS	IBM
EnrichR	Maayan Lab.
g:Profiler	Elixir Infrastructure
CROssBAR	METU-Hacettepe-EMBL-EBI
miRWalk	Heidelberg University
miRTarget Link 2.0	Saarland University
miRNet 2.0	McGill University
TargetScan	Whitehead Institute
Venn Diagram Tool	Ghent University
TAM 2.0	Hebei University of Technology
Diagrams.net	JGraph
G*Power 3.1	Heinrich-Heine University

3.1.4 Etik Kurul

Bu çalışma için İstanbul Çam ve Sakura Şehir Hastanesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'nun 07/07/2022 tarihinde 2022.07.227 sayılı kararına göre etik kurul onayı verildi. Hasta grupları için onam formları gönüllülere imzalatıldı.

3.2 Metot

3.2.1 İn Siliko Çalışmalar

3.2.1.1 Veri Toplama ve Araştırma Stratejisi

2022 yılına kadar yayınlanmış uygun çalışmalar için PubMed ve Science Direct veri tabanlarında elektronik aramalar yoluyla ALS hastalığında mitokondri fonksiyon bozukluğu ve ilişkili olan genler üzerine literatür taraması yapılmıştır. Araştırma konusu ile ilgili olduğu düşünülen makaleler manuel olarak gözden geçirilmiştir. ALS, mikroRNA'lar ve mitokondri olan MeSH terimleri kullanılmıştır.

3.2.1.2 Belirlenen Genlerin Yol Zenginleştirme Analizleri

Literatür taramasından belirlenen genler, Enrichr (<https://maayanlab.cloud/Enrichr/>) gen seti zenginleştirme analiz aracı ile analiz edildi. Tanımlanan genler üzerinde KEGG 2021 Human'da yol analizi yapıldı. Belirlenen genler ayrıca g:Profiler (<https://biit.cs.ut.ee/gprofiler/gost>) aracında çalıştırıldı. Biyolojik yol analizleri, g:Gost fonksiyonel profillemde KEGG ve WikiPathway kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Son olarak genler CROssBAR (<https://crossbar.kansil.org>) aracı ile çalıştırıldı.

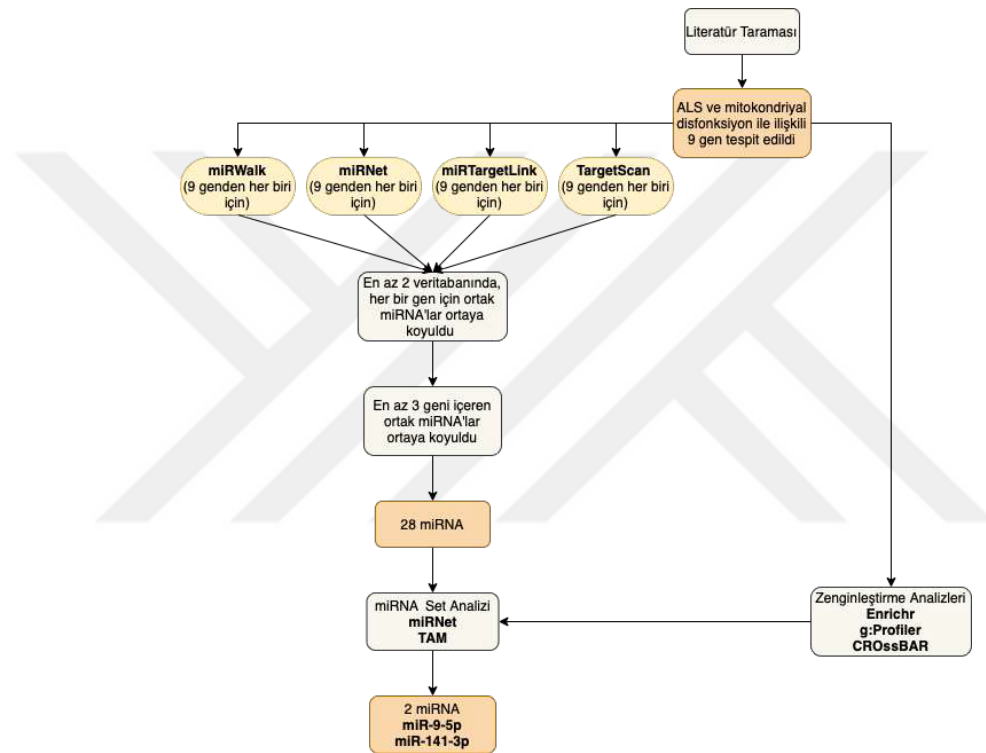
3.2.1.3 miRNA Tahmini ve Uygunluk Kriterleri

Daha spesifik sonuçlar elde etmek için dört farklı veri tabanı, miRWalk (<http://mirwalk.umm.uni-heidelberg.de>), miRTargetLink 2.0 (<https://ccbcompute.cs.uni-saarland.de/mirtargetlink2>), miRNet 2.0 (<https://www.mirnet.ca>) ve TargetScan (http://www.targetscan.org/vert_80/), belirlenen genleri hedefleyen miRNA'ları tanımlamak için kullanıldı. Tüm veri tabanlarında organizma olarak *homo sapiens* arandı. Tanımlanan her gen, ayrı ayrı dört veri tabanında analiz edildi. Her gen için bir Venn diyagramı aracı (<https://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/Venn/>), dört ayrı veri tabanından elde edilen miRNA'lar kullanılarak karşılık gelen genle ilgili ortak miRNA'ları görselleştirmek için kullanıldı. Bu araştırma belirli dahil etme kriterleri dahilinde gerçekleştirilmiştir: i) her gen için en az iki veri tabanında bulunan miRNA'lar tek bir listede toplanmıştır, ii) ortak listeden en az üç geni hedef alan miRNA'lar tek

bir listede birleştirilmiştir. Tüm işlemler için $p < 0,05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

3.2.1.4 miRNA Set Analizi

Ortak listenin oluşturulmasının ardından, miRNet 2.0 (<https://www.mirnet.ca>) ve TAM 2.0 (<http://www.lirned.com/tam2/>) araçları ile miRNA'lar kullanılarak set analizi yapıldı. Ortak miRNA'ları göstermek için her iki veri tabanı ve bir venn şeması kullanıldı.



Şekil 3.1 İş Akışı

3.2.2 İn Vitro Çalışmalar

3.2.2.1 Klinik Örnekler

Tüm ALS hastaları klinik ve nöropatolojik olarak El Escorial Kriterlerine göre tanı alan hastalar dahil edilmiştir (Brooks vd., 2000). Sağlıklı kontroller kontrol edilmiş ve herhangi bir ALS veya nörodejeneratif hastalık tanısı yoktur. Nörolojik kontroller ise Esansiyel Tremor ve Parkinson hastalarından seçilmiştir (Prof. Dr. Halil Atilla İdrisoğlu ve Uzm. Dr. Dilara Mermi Dibek, İstanbul Başakşehir Çam ve Sakura Şehir Hastanesi, İstanbul). Çalışmaya dahil olan hasta ve kontrollerin 18 yaş ve üzerinde olması, kadın veya erkek olması öngörülmüştür. Hasta ve kontrol

sayıları istatistiksel analizler sonucunda belirlenmiştir. Bu araştırmanın %80 kadar güç (power) için tahmini örneklem büyüklüğü alt sınırı 36'dır. 4 sağlıklı kontrol + 20 ilaç tedavisi almış hasta + 11 ilaç tedavisi almamış hasta + 7 nörolojik kontrol grubu olacak şekilde toplamda 42'dir. Bu istatistiksel analiz için G*Power 3.1 programı kullanıldı. İstatistiksel veriler Waller vd., 2018'deki miRNA araştırma sonuçları baz alınarak oluşturuldu (Waller vd., 2018). Güç analizine göre; etki büyüklüğü (d) = 0,962963, I. tip hata ($\alpha=0,05$), $1-b = 0,80$, Standart sapma ($s = 0,54$), Gruplar arası oran 1, Çift yönlü analiz (two-tailed), t testi, Ortalama: 2 bağımsız grup arasındaki fark (Means: Differences between two independent means two groups). Güç analizine göre testin gücü %80 (0,8013).

Tablo 3.7 ALS Grubu Hasta Demografik Bilgileri

	Sayı
ALS ilaçlı	20
ALS ilaçsız	11
Kadın	5
Erkek	26
<30	1
30-39	1
40-49	3
50-59	9
>60	17

Tablo 3.8 Nörolojik Kontrol Grubu Hasta Demografik Bilgileri

	Sayı
Parkinson	2
Esansiyel Tremor	5
Kadın	4
Erkek	3
<30	0
30-39	0
40-49	0
50-60	1
>60	6

Tablo 3.9 Sağlıklı Kontrol Grubu Demografik Bilgileri

	Sayı
Sağlıklı Kontrol	4
Kadın	1
Erkek	3
<30	1
30-39	1
40-49	0

Tablo 3.9 Sağlıklı Kontrol Grubu Demografik Bilgileri (devamı)

50-60	1
>60	1

3.2.2.2 PBMC Hazırlığı

PBMC (Periferik kan mononükleer hücreler) hazırlığı için 7 ml venöz kan alınarak EDTA'lı tüplere koyulmuştur. Alınan kan örnekleri PBS ile 1:1 oranında seyreltilmiştir. Kan ve PBS karışımı Ficoll (Lenfosit ayırıcı medya) üzerine eklenmiştir. Standart Ficoll, yoğunluk gradyan santrifüj yöntemi ile izole edilmiştir (400 x g'de 20 dk., 20° C). Santrifüj sonrası olası kontaminasyonu engellemek için izole edilmiş PBMC hücrelerine PBS eklenip, 2 kez 400 x g'de 20° C'de 10 dakika santrifüj edilerek saflaştırma sağlanmıştır. Elde edilen bulutsu katmandan aynı gün içerisinde total RNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir (de Felice vd., 2012, 2014).

3.2.2.3 Total RNA İzolasyonu ve cDNA Sentezi

ALS hastalarından ve kontrollerden elde edilen kan örneklerinden PBMC hazırlandıktan sonra miRNeasy Mini Kit kullanılarak total RNA izolasyonu elde edilmiştir. RNA'ların miktarı ve kalitesi, Nanodrop Spektrofotometre kullanılarak ölçülmüştür. RNA miktarı 66 – 567 ng arasında olanlar, A260/A280 oranı 1,90 – 2,1 ve A260/A230 oranı 0,27 – 2,0 arasında olanlar çalışmaya dahil edilmiştir. RNA'lar kullanılan kitin protokolüne göre cDNA'ya çevrilmiştir.

3.2.2.4 Kantitatif Gerçek Zamanlı PZR (RT-qPCR) ile miRNA Validasyonu

RT-qPZR ile miR-9 ve miR-141'in ekspresyon analizi Sağlık Bilimleri Üniversitesi, Validebağ Deneysel Tıp ve Araştırma Merkezi'nde, Dr. Tuğba KUL KÖPRÜLÜ rehberliğinde gerçekleştirilmiştir. Primerlerin alındığı firma tarafından hedef miRNA'lar miR-9, miR-141 ve House-keeping Gen U6 için uygun primerler tasarlanmıştır. Periferik kandan elde edilen lökositlerden total RNA izolasyonu yapıldı. miRNA düzeylerinin belirlenebilmesi için Real-Time qPZR Sistem kullanılmıştır. Kantitatif PZR, eş zamanlı takibi sağlayan miRCURY LNA SYBR Yeşil PZR Kit ile Roche qPZR cihazında önerilen protokole uygun bir şekilde gerçekleştirildi. Her bir örnek 3 kere tekrarlanmıştır (de Felice vd., 2014; Gagliardi vd., 2018; Kuźma-Kozakiewicz vd., 2016; Schipper vd., 2007).

Tablo 3.10 RT-qPZR için kullanılan primerler

Primer Adı	Primer Sekansı
Housekeeping gen U6	GUGCUCGCUUCGGCAGCACAUUACUAAAAUUGG AACGAUACAGAGAAGAUUAGCAUGGCCCCUGCGC AAGGAUGACACGCAAAUUCGUGAAGCGUCCAUA UUUU
miR-9	5'UCUUUGGUUAUCUAGCUGUAUGA
miR-141	5'UAAACACUGUCUGGUAAGAUGG

Tablo 3.11 RT-qPZR Koşulları

Aşama	Sıcaklık	Süre
PZR başlangıç sıcaklığı	95 °C	2 dk
Denatürasyon	95 °C	10 s
Birleştirilmiş Annelig/Uzatma	56 °C	1 dk
Döngü sayısı		45 döngü
Erime Eğri Analizi	60-95 °C	

3.2.2.5 İstatiksel Analiz

Örnek grupları arasında miRNA seviyeleri değişim katsayısı (fold change) 2 Ortalama Delta Delta Ct (2-DDCt-Cycle Threshold) yöntemi ile belirlenmiş ve QIAGEN GeneGlobe platform üzerinden hesaplamaları yapılmıştır (Gagliardi vd., 2018; Livak & Schmittgen, 2001). Böylelikle ilgili genlerin ekspresyon miktarlarının kaç kat arttığı belirlenmiştir. Farklı grupların karşılaştırılmalı olarak değerlendirilmesi aynı platform üzerinde bulunan Student's t testi ile yapılmıştır. Kat değişim sayısı (Fold change) FC < 1,50 ve p değeri p <0,05 istatiksel olarak anlamlı olarak değerlendirilmiştir.

SONUÇ VE ÖNERİLER

4.1 Sonuçlar

4.1.1 Genlerin Seçimi

ALS'de mitokondriyal disfonksiyonla ilişkili genler üzerinde bir literatür araştırması yapıldı. Bu çalışmalar sonucunda *SOD1*, *FUS*, *TARDBP*, *C9orf72*, *OPTN*, *TBK1*, *CHCHD10*, *VCP* ve *BCL2* genleri ortaya çıkarıldı ve araştırmalara bu genler ile devam edildi. (Tablo 4.1). Tanımlanan genler, KEGG Yolakları diyagramında sarı ile etiketlendi (Şekil 2.4).

Tablo 4.1 Literatüre dayanılarak ortaya koyulan ALS'de mitokondriyal disfonksiyona bağlı genler

Lokus	Gen (Protein)	Referanslar
ALS1	<i>SOD1</i> (Süperoksit dismutaz 1)	(Kong & Xu, 1998; vande Velde vd., 2011)
ALS6	<i>FUS</i> (RNA bağlanma proteini FUS)	(Sharma vd., 2016)
ALS10	<i>TARDBP</i> (TAR DNA bağlanma proteini 43)	(W. Wang vd., 2016; Zuo vd., 2021)
ALS12	<i>OPTN</i> (Optinörin)	(Z. Liu vd., 2018; Wong & Holzbaur, 2014)
FTD/ALS6	<i>VCP</i> (Valosin içeren protein)	(Johnson vd., 2010; Kim vd., 2013)
FTD/ALS1	<i>C9orf72</i> (Kromozom 9 açık okuma çerçevesi 72)	(Dafinca vd., 2016)
FTD/ALS2	<i>CHCHD10</i> (Sarılmış-bobin-heliks-sarılmış-bobin-heliks bölgesi 10)	(Bannwarth vd., 2014; Genin vd., 2019)
FTD/ALS4	<i>TBK1</i> (TANK bağlanma kinaz 1)	(Harding vd., 2021)
18q21.33	<i>BCL2</i> (B-hücre Lenfoma 2)	(Mu vd., 1996; Pedrini vd., 2010)

4.1.2 Belirlenen Genlerin Yol Zenginleştirme Analizleri

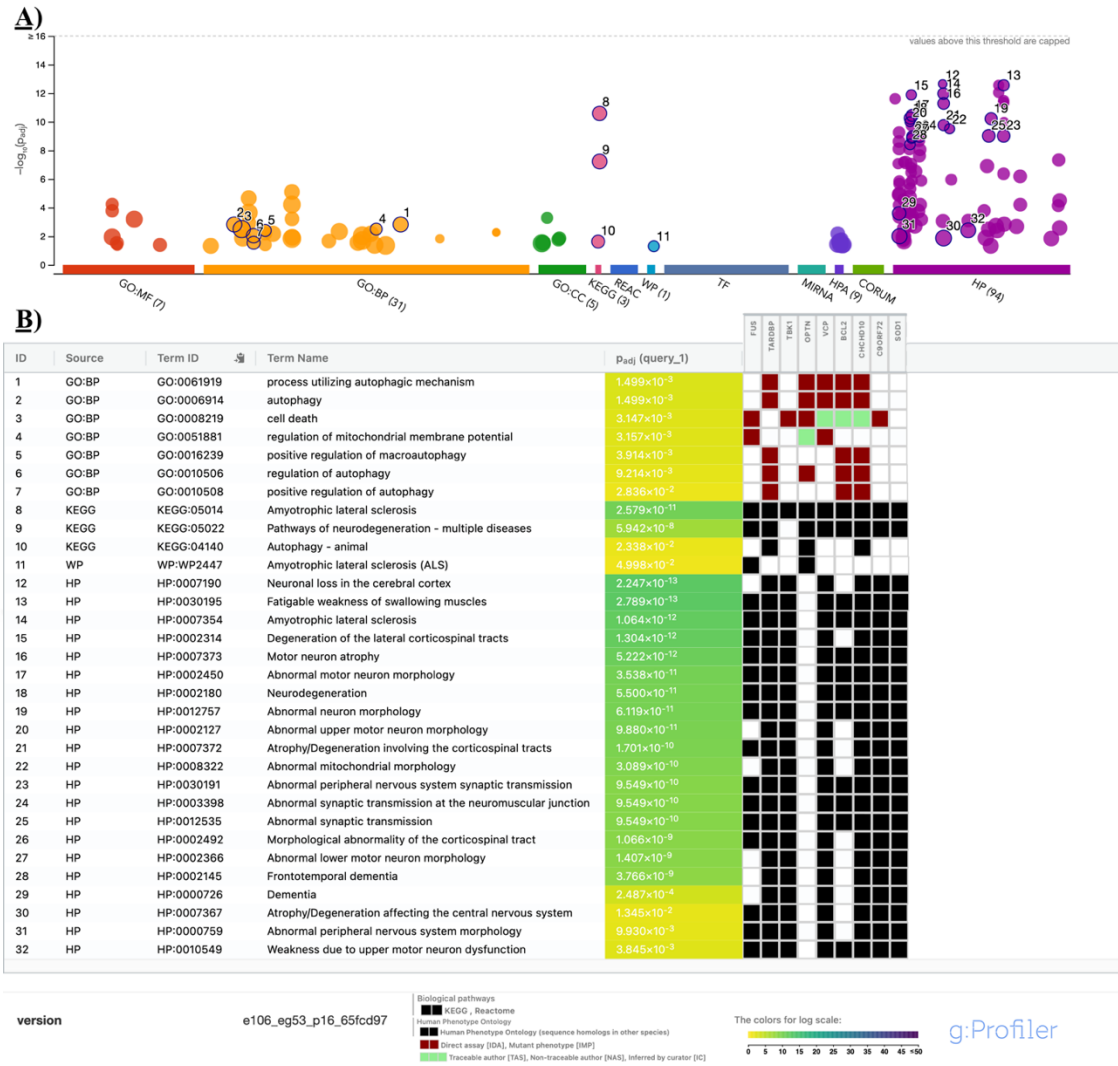
Belirlenen genler Enrichr veri tabanında KEGG analizi ile gerçekleştirilmiştir. Sekiz genin ALS ile önemli ölçüde ilişkili olduğu bulundu. Yedi genin nörodejenerasyon ile güçlü bir şekilde bağlantılı olduğu bulundu. *TBK1* ve *OPTN*

genlerinin mitofaji ile önemli ölçüde ilişkili olduğu bulunurken, *TBK1* ve *BCL2*'nin otofaji ile önemli ölçüde ilişkili olduğu bulundu (Tablo 4.2).

Tablo 4.2 Enrichr aracı kullanılarak yol zenginleştirme analizi KEGG 2021 için

Terim	p değeri	q değeri	Çakışan genler
Amyotrofik Lateral Skleroz	9,877965e-14	6,025558e-12	[VCP, TBK1, FUS, BCL2, CHCHD10, TARDBP, OPTN, SOD1]
Nörodejenerasyon Yolakları	1,409405e-10	4,298684e-09	[VCP, TBK1, FUS, BCL2, TARDBP, OPTN, SOD1]
Mitofaji	4,037790e-04	8,210173e-03	[TBK1, OPTN]
mRNA izleme yolu	8,365989e-04	1,275813e-02	[FUS, TARDBP]
Otofaji	1,624891e-03	1,699943e-02	[TBK1, BCL2]
Kızamık	1,672075e-03	1,699943e-02	[TBK1, BCL2]
Hepatit B Endoplazmik retikulumda protein işleme	2,261359e-03	1,809705e-02	[TBK1, BCL2]
NOD benzeri Reseptör Sinyal Yolu	2,515130e-03	1,809705e-02	[VCP, BCL2]
RNA Transport	2,812236e-03	1,809705e-02	[TBK1, BCL2]
	2,966730e-03	1,809705e-02	[FUS, TARDBP]

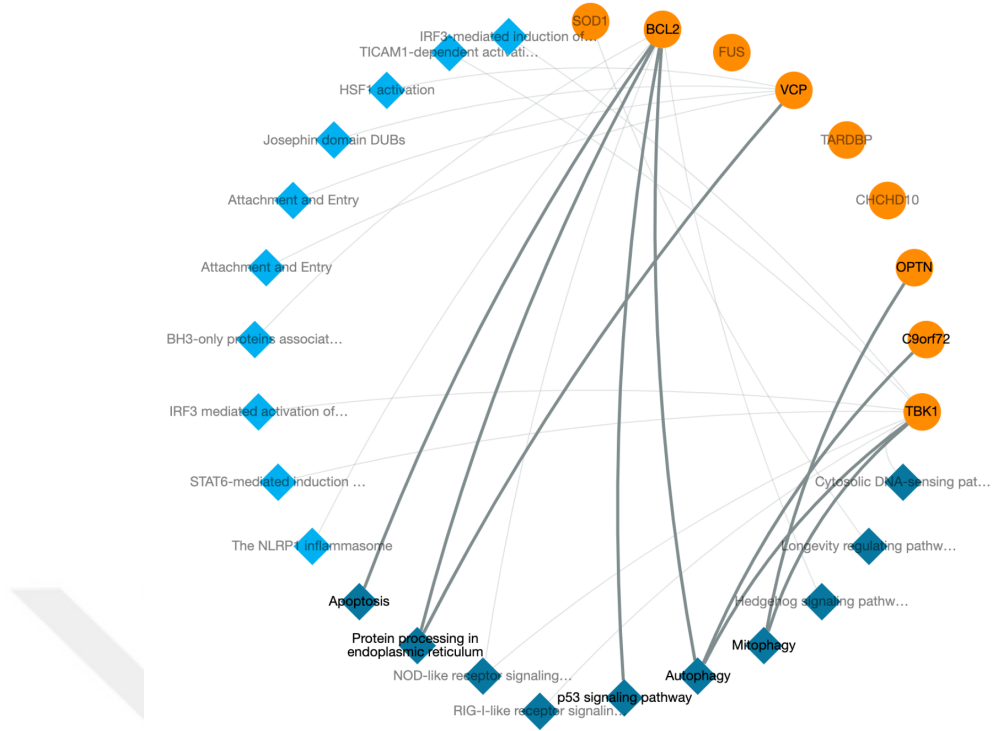
KEGG yolu analizi, g:Profiler aracıyla dokuz gen üzerinde yapıldı. Dokuz genin ALS ile önemli ölçüde ilişkili olduğu ortaya çıktı. Sekiz genin nörodejenerasyon ile güçlü bir şekilde bağlantılı olduğu bulundu. *TARDBP*, *TBK1*, *VCP*, *CHCHD10*, *C9ORF72* ve *SOD1* genlerinin mitokondriyal morfolojideki anormallikle önemli ölçüde bağlantılı olduğu görüldü. Bu veri tabanı analizi sonucunda otofaji, nöron atrofisi ve morfolojik anormalliklerin düzenlenmesi ile ilişkili birçok genin olduğu ortaya çıktı (Şekil 4.1). Ayrıca bu genler için CROssBAR aracı kullanıldı. Sonuç olarak, *TBK1* ve *OPTN* genleri, mitofaji ile ilgili yolda belirgindi. Aynı zamanda otofajiye bağlı yolda *TBK1*, *BCL2* ve *C9orf72* genleri bulundu. Ayrıca, *BCL2* geni ayrıca p53 sinyal yolu ve apoptoza da bağlandı. *BCL2* ve *VCP* genleri birlikte değerlendirildiğinde bu genler endoplazmik retikulumda protein işlemede de bulunmuştur (Şekil 4.2). Şekil 2.4'teki KEGG yolu, p53 sinyal yolunu ve endoplazmik retikulumda protein işlemeyi ayrıntılı olarak göstermektedir.



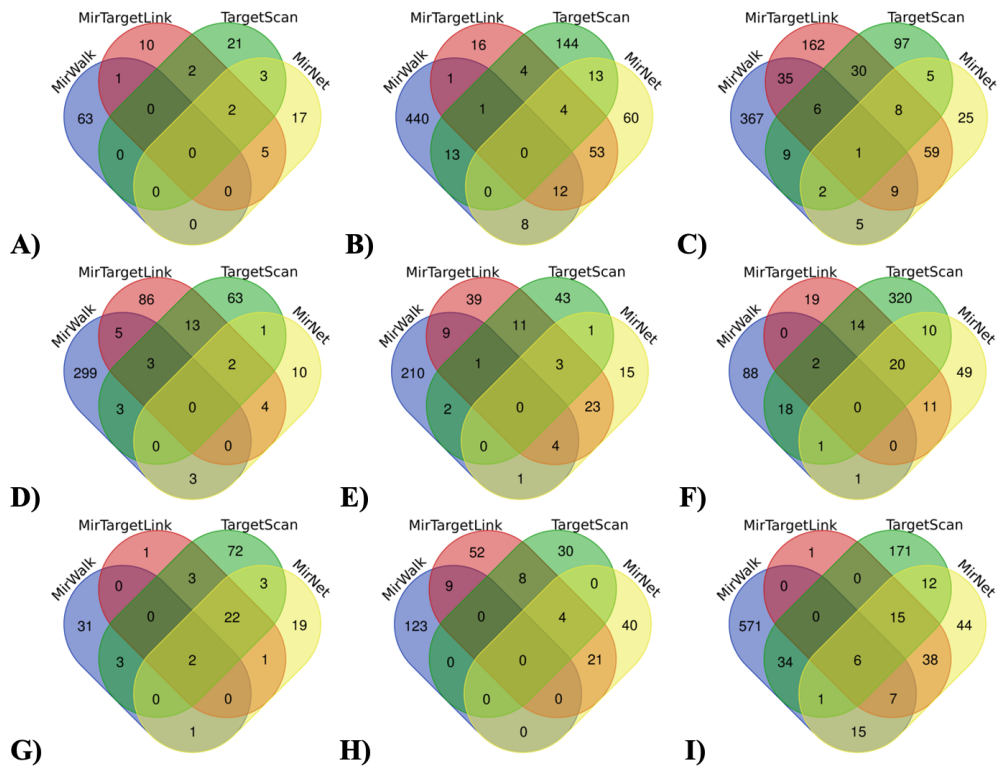
Şekil 4.1 Belirlenen genlerin zenginleştirme sonuçlarının g:Profiler Manhattan grafiği ile görselleştirilmesi **A)** g:Profiler zenginleştirme sonuçlarının Manhattan Grafiği **B)** Gen listesi ayrıntılı yol zenginleştirme analizi.

4.1.3 miRNA'ların Tanımlanması ve Set Analizleri

Başlangıçta tek bir veri tabanı yerine daha spesifik sonuçlar elde etmek için dört farklı veri tabanı kullanıldı. Veriler, her bir gen için ayrı ayrı dört veri tabanından elde edildi. Her gen için, en az iki veri tabanında bulunan miRNA'ları bulmak için ayrı ayrı bir Venn diyagramı kullanıldı (Şekil 4.3). Her bir gen için en az iki veri tabanında bulunan ortak miRNA'lar arasında en az üç geni hedefleyen ilgili tüm miRNA'lar Venn şeması kullanılarak listelenmiş ve analizler sonucunda 28 miRNA ortaya çıkarılmıştır (Tablo 4.3). Bu miRNA'lar ayrıca miRNA set analizi için miRNet 2.0 ve TAM 2.0 araçları kullanılarak değerlendirildi (Tablo 4.4).



Şekil 4.2 CROssBAR aracı ile yol zenginleştirme analizi



Şekil 4.3 Tanımlanan genler için dört farklı veri tabanı kullanılarak elde edilen ortak miRNA'ları ortaya çıkarmak için kullanılan Venn diyagramı görüntüleri. Tüm veri tabanlarında ortak olan BCL2 için 6 miRNA vardır. TARDBP için dört veri tabanında ortak olan 1 miRNA vardır. Dört veri tabanında da CHCHD10 için 2 ortak miRNA vardır. Kalan SOD1, FUS, C9ORF72, TBK1, OPTN, VCP genleri için en fazla 3 veri tabanında ortak miRNA'lar bulunmaktadır. Dört veri tabanında bu 6 gen için ortak miRNA'lar yoktur. A: SOD1, B: FUS, C: TARDBP, D: C9ORF72, E: OPTN, F: VCP, G: CHCHD10, H: TBK1, I: BCL2

Bu aşamada, yol zenginleştirme analizlerinden elde edilen veriler kullanılarak miRNA'lar elimine edildi. Belirlenen dokuz gen ile ilişkili yolakları ve 28 miRNA ile ilişkili yolakları karşılaştırdığımızda Tablo 4.4'teki verileri elde ettik. Tabloda bulunan verilere baktığımızda miR-9 ve miR-141'in olduğunu belirledik. Sonuç olarak, 2 miRNA elde ettik. İki yaygın miRNA'nın, hsa-miR-9-5p ve hsa-miR-141-3p'nin her iki veri tabanında da ALS ile önemli ölçüde bağlantılı olduğu bulundu.

4.1.4 Kantitatif PZR (RT-qPCR) miRNA Validasyon Sonuçları

Kantitatif gerçek zamanlı PZR ile hsa-miR-9-5p ve hsa-miR-141-3p'nin hasta ve kontrol kan örneklerinde ekspresyon analizlerini yaparak validasyonlarını sağlamış olduk. Sonuçlar neticesinde kat değişim (Fold Change) değerleri ve P değerleri Tablo 4.6'te gösterilmektedir. Ayrıca, bu verilerin ısı haritası ve clustergram görseli Şekil 4.4'te gösterilmektedir (Şekil 4.4 ve Tablo 4.6). Nörolojik kontrol, ilaçlı ve ilaçsız ALS hasta grupları sağlıklı kontrollere göre kıyaslandığında aralarında belirli farklar oluşmuştur. Özellikle miR-141 ALS ilaçsız grupta istatistiksel olarak anlamlı şekilde up-regüle olduğu ortaya koyulmuştur. ALS ilaçlı ve ALS ilaçsız hasta grupları, nörolojik kontrol grubuna göre kıyaslandığında ise miR-141 ALS ilaçsız grupta istatistiksel olarak anlamlı şekilde up regüle olduğu ortaya koyulmuştur (Tablo 4.6).

Tablo 4.3 Mitokondriyal Fonksiyon bozukluğu ile ilgili genleri hedef alan miRNA tahminleri

miRNA	Hedef Genler	Veri Tabanları	miRNA	Hedef Genler	Veri Tabanları
hsa-miR-103a-3p	BCL2	MirTargetLink, MirNet	hsa-miR-125b-5p	BCL2	MirTargetLink, MirWalk, MirNet
	TARDBP	MirTargetLink, MirNet		FUS	MirTargetLink, MirNet
	VCP	MirTargetLink, MirNet, TargetScan		TARDBP	MirTargetLink, MirNet
hsa-miR-136-5p	BCL2	MirTargetLink, MirNet, TargetScan	hsa-miR-139-5p	BCL2	MirTargetLink, MirWalk, MirNet, TargetScan
	C9ORF72	MirTargetLink, TargetScan		C9ORF72	MirTargetLink, MirWalk, TargetScan
	VCP	MirTargetLink, TargetScan		SOD1	MirTargetLink, MirNet, TargetScan
hsa-miR-141-3p	C9ORF72	MirTargetLink, MirWalk	hsa-miR-155-5p	BCL2	MirNet, TargetScan
	FUS	MirTargetLink, MirNet		FUS	MirNet, TargetScan
	TARDBP	MirTargetLink, MirNet		TBK1	MirTargetLink, mirNet, TargetScan
	OPTN	MirTargetLink, MirWalk	hsa-miR-182-5p	BCL2	MirTargetLink, MirWalk, MirNet, TargetScan
hsa-miR-181b-5p	BCL2	MirTargetLink, MirNet		C9ORF72	MirTargetLink, MirNet, TargetScan
	FUS	MirTargetLink, MirNet		TARDBP	MirNet, TargetScan
	TARDBP	MirTargetLink, MirNet		OPTN	MirTargetLink, TargetScan
hsa-miR-186-5p	C9ORF72	MirNet, TargetScan	hsa-miR-200c-3p	BCL2	MirTargetLink, MirNet
	TARDBP	MirTargetLink, MirNet, TargetScan		TARDBP	MirTargetLink, MirNet
	TBK1	MirTargetLink, MirNet, TargetScan		TBK1	MirTargetLink, MirNet
hsa-miR-20a-5p	BCL2	MirTargetLink, MirNet	hsa-miR-212-3p	FUS	MirTargetLink, MirNet
	OPTN	MirTargetLink, MirWalk		TARDBP	MirWalk, MirNet
	TARDBP	MirTargetLink, MirNet		TBK1	MirTargetLink, MirWalk
hsa-miR-23b-3p	SOD1	MirTargetLink, MirNet	hsa-miR-330-3p	FUS	MirNet, TargetScan
	TARDBP	MirTargetLink, MirNet		OPTN	MirTargetLink, MirWalk
	VCP	MirTargetLink, MirNet, TargetScan		TARDBP	MirTargetLink, TargetScan

Tablo 4.3 Mitokondriyal Fonksiyon bozukluğu ile ilgili genleri hedef alan miRNA tahminleri (devamı)

hsa-miR-331-3p	FUS	MirTargetLink, MirNet	hsa-miR-361-3p	BCL2	MirWalk, TargetScan
	TARDBP	MirWalk, MirNet, TargetScan		TARDBP	MirTargetLink, MirWalk, MirNet, TargetScan
	VCP	MirTargetLink, TargetScan		VCP	MirTargetLink, MirNet, TargetScan
hsa-miR-361-5p	OPTN	MirTargetLink, TargetScan	hsa-miR-376c-3p	BCL2	MirTargetLink, MirNet
	SOD1	MirNet, TargetScan		C9ORF72	MirTargetLink, MirNet, TargetScan
	VCP	MirTargetLink, MirNet		FUS	MirTargetLink, TargetScan
hsa-miR-410-3p	C9ORF72	MirTargetLink, TargetScan	hsa-miR-429	BCL2	MirTargetLink, MirNet
	OPTN	MirTargetLink, TargetScan		TARDBP	MirTargetLink, MirNet
	VCP	MirTargetLink, TargetScan		TBK1	MirTargetLink, MirNet
hsa-miR-432-5p	BCL2	MirWalk, TargetScan	hsa-miR-513a-5p	SOD1	MirTargetLink, TargetScan
	OPTN	MirTargetLink, TargetScan		TARDBP	MirTargetLink, MirNet, TargetScan
	TARDBP	MirWalk, TargetScan		TBK1	MirTargetLink, TargetScan
hsa-miR-545-3p	C9ORF72	MirTargetLink, TargetScan	hsa-miR-552-3p	SOD1	MirTargetLink, TargetScan
	OPTN	MirTargetLink, TargetScan		TARDBP	MirTargetLink, TargetScan
	TARDBP	MirTargetLink, TargetScan		TBK1	MirTargetLink, MirWalk
hsa-miR-582-5p	BCL2	MirNet, TargetScan	hsa-miR-7-5p	BCL2	MirTargetLink, MirWalk, MirNet, TargetScan
	C9ORF72	MirTargetLink, TargetScan		FUS	MirNet, TargetScan
	FUS	MirNet, TargetScan		VCP	MirTargetLink, MirNet
	SOD1	MirNet, TargetScan	let-7b-5p	BCL2	MirNet, MirWalk
hsa-miR-9-5p	BCL2	MirTargetLink, MirWalk, MirNet		C9ORF72	MirNet, MirWalk
	OPTN	MirTargetLink, MirNet, TargetScan		FUS	MirNet, MirWalk
	TARDBP	MirTargetLink, TargetScan			

Tablo 4.4 miRNet ve TAM set analizleri

miRNA Fonksiyonu	miRNA'lar	P Değeri (miRNet)	P Değeri (TAM)
Yaşlanma	hsa-let-7b-5p hsa-miR-7-5p hsa-miR-181b-5p hsa-miR-141-3p hsa-miR-9-5p hsa-miR-200c-3p hsa-miR-155-5p hsa-let-7b-3p	0,111	5,98e-10
Nöron Farklılaşması	hsa-miR-182-5p hsa-miR-9-5p hsa-miR-376c-3p	0,0617	3,89e-6
Beyin Gelişimi	hsa-miR-20a-5p hsa-miR-103a-3p hsa-miR-9-5p hsa-miR-155-5p	0,201	3,41e-6
Oksidatif Stres	hsa-miR-141-3p	0,462	0,1808
Nöron Gelişimi	hsa-miR-141-3p	0,488	0,1808
Apoptoz	hsa-miR-7-5p hsa-miR-182-5p hsa-miR-9-5p hsa-miR-155-5p	0,623	1,95e-5
miRNA Hastalıklar			
Amyotrofik Lateral Skleroz	hsa-miR-125b-5p hsa-miR-141-3p hsa-miR-9-5p	0,00733	1,48e-5
miRNA Doku			
Beyin	hsa-let-7b-5p hsa-miR-139-5p hsa-miR-7-5p hsa-miR-181b-5p hsa-miR-212-3p hsa-miR-23b-3p hsa-miR-125b-5p hsa-miR-141-3p hsa-miR-9-5p hsa-miR-186-5p hsa-miR-155-5p hsa-miR-361-5p hsa-miR-330-3p hsa-miR-429	1,27e-8	4,89e-4

*Koyu olarak yazılan değerler istatistiksel olarak anlamlıdır, $p < 0,05$

Tablo 4.5 İn siliko yöntemler ile bulunan miRNA'ların literatür özeti

miRNA'lar	Açıklama	Örnek	Grup Genişliği	Yayınlar
miR-103a-3p	sALS hastalarında anlamlı şekilde down-regüle olduğu ortaya koyulmuştur	Periferal kan	56 sALS, 20 SK	Liguori et al., 2018
miR-125b	Astroglisis ile ilişkili olarak glia hücrelerini düzenlediği bilmektedir			Smirnova et al., 2005; Pogue et al., 2010
	G93A ALS mutant farelerde mikrogliya hücrelerinde up-regüle olduğu tespit edilmiş ve ALS'deki nöroinflamasyon mekanizmasında rol oynadığını ortaya koymuşlardır	Beyin dokusu	G93A Mutant Fare	Parisi et al., 2013
	G93A ALS mutant fare beyinlerinde miR-124 ve miR-9 ile ALS'de kortikobulbar yol dejenerasyonu ile ilişkili olduğu bulunmuştur	Beyin dokusu	G93A Mutant Fare	Marcuzzo et al., 2015
	Alzheimer mutant farelerde miR-9 ile birlikte dolaşımında down-regüle olduğu ve muhtemel biyobelirteç olabileceği ortaya koyulmuştur	Beyin dokusu	Alzheimer Mutant Fare	Hong et al., 2017
	G93A ALS mutant fare beyin dokularında mikrogliya aktivasyonunu ve ALS'de motor nöron ölümünü düzenlediği bildirilmiştir	Beyin dokusu	G93A Mutant Fare	Parisi et al., 2016
miR-139-5p	ALS hastalarında Alzheimer ve MS hastalarına kıyasla down-regüle olarak bulunmuştur	Serum	20 sALS, 2 fALS, 30 Alzheimer, 73 MS, 30 SK	Raheja et al., 2018
miR-141	miR-9 ile oksidatif strese karşı anlamlı şekilde up-regüle olduğu bildirilmiştir	Hücre kültürü	PC12 hücre hattı	Delavar et al., 2018
	Oksidatif strese maruz kalan fibroblast hücreleri miR-141 ekspresyonunu uyandırıyor	Fibroblast hücreleri	Yumurtalık kanser mutant fare	Mateescu et al., 2011
	ROS ile indüklenen miR-141, Alzheimer hasta beyin dokularında up-regüle olmuştur	Hücre Kültürü	Alzheimer Beyin hücreleri	Kinoshita et al., 2015
miR-155-5p	G93A ALS mutant farelerde miR-125b mikrogliya hücrelerinde up-regüle olduğu tespit edilmiş	Beyin dokusu	G93A Mutant Fare	Parisi et al., 2013
	miR-155'in pre-septomatik ve septomatik aşamalarda potansiyel ALS biyobelirteci olabileceğini ortaya koymuşlardır	Omurilik	G93A Mutant Fare	Cunha et al., 2018
	Plazmada anlamlı şekilde up-regüle olduğu ortaya koyulmuştur	Plazma	12 sALS, 6 NK	Sobus et al., 2018
	ALS mutasyonlu farelerde up-regüle olduğu bulunmuş ve inflamasyona sebep olan miRNA'lardan biri olduğu belirtilmiştir		G93A Mutant Fare	Butovsky et al., 2012

Tablo 4.5 İn siliko yöntemler ile bulunan miRNA'ların literatür özeti (devam)

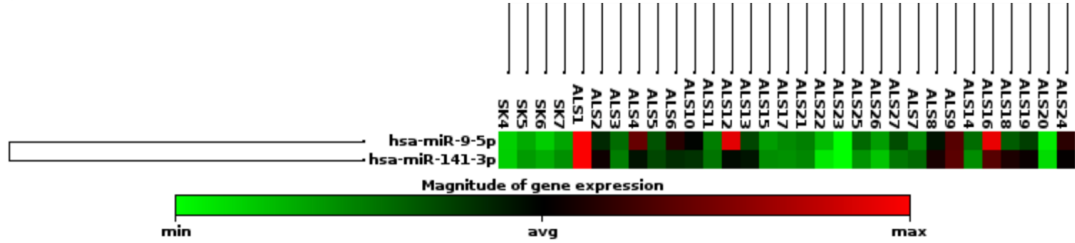
miR-181	miR-181'in nöronlarda yüksek seviyede bulunduğunu ve Nörofilament hafif zincir ile miRNA+protein kompleksi oluşturarak prognostik biyobelirteç olabileceğini ortaya koymuşlardır	Plazma	252 ALS, 103 SK	Magen et al., 2021
miR-182-5p	ALS ve MS hastalarında down-regüle olduğu bulunmuştur	Periferal kan	56 sALS, 20 SK	D'erchia et al., 2017; Liguori et al., 2018
miR-186-5p	sALS hastalarında anlamlı şekilde down-regüle olduğu ortaya koyulmuştur Alzheimer hastalarında down-regüle olduğu ortaya koyulmuştur	Periferal kan	56 sALS, 20 SK	Liguori et al., 2018 Satoh et al., 2015
miR-23b-3p	sALS hastalarının BOS örneklerinde up-regüle olarak bulunmuştur	Beyin-omurilik sıvısı (BOS)	32 sALS, 6 NK, 10 SK	Waller et al., 2018
	Beyinde oldukça fazla bulunan miRNA			Meza-Sosa et al., 2014
	Mutant ALS beyin hücrelerinde miR-124 ve miR-125 ile bağlantılı olarak nöral aktiviteyi artırdığı bulunmuştur	Beyin dokusu	G93A Mutant Fare	Marcuzzo et al., 2015
	Sağlıklı kontrollere kıyasla miR-9 down-regüle olduğu ortaya koyulmuştur	Post-mortem motor nöron	12 sALS, 12 SK	Emde et al., 2015
	SMA hastalarında up-regüle olarak bulunmuştur	Serum	10 SMA, 7 SK	Catapano et al., 2016
miR-9-5p	miR-9 ve miR-125b down-regüle olduğu bulunmuş		Alzheimer Mutant Fare	Hong et al., 2017
	sALS hastalarının omurilik örneklerinde anlamlı şekilde down-regüle olduğu ortaya koyulmuştur	Omurilik	sALS	Campos-melo et al., 2018
	sALS hastalarında up-regüle olarak bulunmuştur	Beyin-omurilik sıvısı (BOS)	32 sALS, 6 NK, 10 SK	Waller et al., 2018
	ALS hasta omurilik örneklerinde bu ve başka diğer 2 miRNA down-regüle olmuşlar. Ve miR-9 ve NEFL ilişkisini ortaya koymuşlardır	Omurilik	8 ALS, 5 SK	Hawley et al., 2019

Tablo 4.6 Hedeflenen miRNA'ların Kat değişim (Fold Change, FC) ve P değerleri

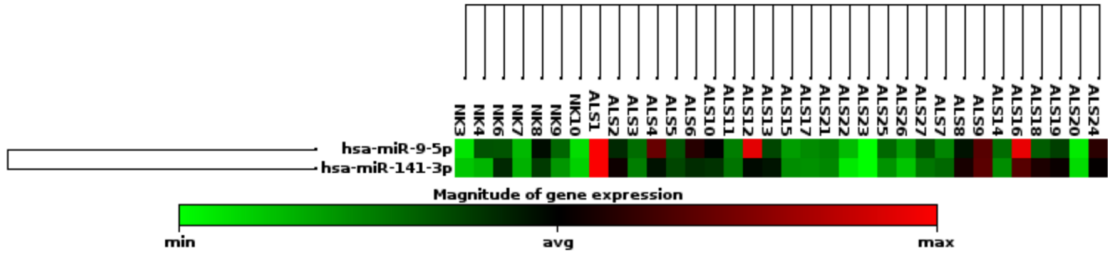
	Sağlıklı Kontrollere Kıyasla						Nörolojik Kontrollere Kıyasla			
miRNA'lar	Nörolojik Kontrol		ALS ilaçlı		ALS ilaçsız		ALS ilaçlı		ALS ilaçsız	
	Kat Değişim Değeri	P Değeri	Kat Değişim Değeri	P Değeri	Kat Değişim Değeri	P Değeri	Kat Değişim Değeri	P Değeri	Kat Değişim Değeri	P Değeri
hsa-miR-9-5p	1,33	0,220	1,82	0,073	2,01	0,050	1,37	0,188	1,52	0,114
hsa-miR-141-3p	1,1	0,517	1,38	0,169	1,77	0,023	1,25	0,218	1,61	0,021
U6 snRNA	1,00	-	1,00	-	1,00	-	1,00	-	1,00	-

* Koyu olarak yazılan değerler istatistiksel olarak anlamlıdır, $p < 0,05$ ve $FC > 1,50$.

A)



B)



Şekil 4.4 Hasta grubundan elde edilen verilerin kontroller ile kıyaslanması ile oluşan Clustergram. **A)** İlaçlı ve ilaçsız ALS hastalarından elde edilen verilerin sağlıklı kontrollerden elde edilen veriler ile kıyaslandığında ortaya çıkan clustergram. **B)** İlaçlı ve ilaçsız ALS hastalarından elde edilen verilerin nörolojik kontrollerden elde edilen veriler ile kıyaslandığında ortaya çıkan clustergram.

4.2 Öneriler

Amyotrofik lateral skleroz (ALS), nörodejeneratif bir hastalıktır. Motor nöronların dejenerasyonu ve iskelet kaslarının atrofisi ile karakterize ilerleyici, ölümcül bir hastalıktır. İnsidansı yılda 2,1/100.000 ve prevalansı yılda 5,4/100.000'dir. Genellikle fokal olarak başlar ve solunum sistemi felci nedeniyle ölümcüldür. MiRNA'ların birçok hastalığın tanısını kısaltmak ve kolaylaştırmak için biyobelirteç olarak kullanılmasına ilişkin araştırmaların yapıldığı bilinmektedir. Biyobelirteç çalışmaları ALS teşhisi için çok önemlidir ve teşhis için gereken süreyi kısaltır. ALS hastalığının ortalama tanı süresi 12 aydır. Bu durumla ilgili olarak ALS çalışmalarında biyobelirteç araştırmalarına öncelik verilmektedir (Joilin vd., 2020; Takahashi vd., 2015; Toivonen vd., 2014). Biz bu çalışmada in siliko ve in vitro yöntemler ile ALS patolojisinde yer alan mitokondriyal fonksiyon bozukluğu ile ilgili genleri hedef alan miRNA'ların potansiyel biyobelirteç olmalarını araştırdık. Literatürden ALS ve mitokondriyal disfonksiyon ile ilgili dokuz hedef gen belirlendi. Tanımlanan genler için dört farklı veri tabanından elde edilen ortak miRNA'ları ortaya çıkarmak için bir Venn diyagramı kullanıldı (Şekil 4.3). Bunun sonucunda 28 miRNA listelendi. Belirlenen genler ile Enrichr, g:Profiler ve CROssBAR araçları ile yolak analizleri yapıldı. 28 miRNA set analizlerine tabi tutuldu ve elde edilen yolak analizlerinin de yardımıyla hastalık patogenezi ile ilgili olarak 2 miRNA ön plana çıktı. Öne çıkan hsa-miR-9-5p ve hsa-miR-141-3p miRNA'larına, ALS hastalarından elde edilen kan örneklerinde RT-qPCR ile ekspresyon seviyelerine bakıldı. Sonuç olarak, miR-141 ilaç tedavisi görmemiş, yeni tanı almış ALS hastalarında istatistiksel olarak anlamlı şekilde up-regüle olduğu, ekspresyon seviyesinin kontrollere göre hastalarda fazla olduğu ortaya koyulmuştur (FC=1,77, $p<0,05$; FC=1,61, $p<0,05$, Tablo 4.6). Tablo 4.6'da verilen verilere baktığımızda nörolojik kontrol grubunun sağlıklı kontrol grubu ile kıyasladığımızda miR-9 için FC=1,33, miR-141 için FC=1,10. İstatistiksel olarak anlamlı olduğunu söyleyemeyiz hem kat değişim değerleri açısından hem de p değerleri açısından. ALS grubu değerlerine baktığımızda ise, sağlıklı kontroller ile kıyaslandığında ilaç tedavisi görmekte olan ALS grubunun kat değişim değerleri ilaç tedavisi görmemiş ALS grubu hastalarına göre daha düşük ve p değerleri ise

daha yüksek yani anlamlı değil yorumunu her iki miRNA için de yapabiliriz. İlaç tedavisi görmemiş grup ise kat değişim değeri daha yüksek ve p değerleri diğer gruba göre daha anlamlı (Tablo 4.6). Nörolojik kontrolleri baz aldığımızda ise miR-141 ilaçsız grupta yine anlamlı şekilde up-regüle olduğunu görebiliyoruz. Nörolojik kontrollere göre kıyasladığımızda veriler sağlıklı kontroller ile kıyasladığımızdaki benzerlikleri ortaya koyuyor (Tablo 4.6).

Literatürde bulunan üç ayrı çalışma miR-141'in oksidatif stres ve ROS ile indüklendiğini ve bu indüklenme ile up-regüle olduğunu ortaya koyuyorlar (Delavar vd., 2018; Mateescu vd., 2011; Kinoshita vd., 2015). Elde ettiğimiz verileri literatürdeki diğer çalışmalar ile kıyasladığımızda birbirlerini destekledikleri anlaşılmaktadır. miR-141 literatürde daha önce ALS hasta gruplarında hiçbir örnekte bakılmamış ve araştırılmamıştır. Bu sebeple bu çalışma ilk olma niteliği taşımaktadır. miR-9, yapılan iki ayrı çalışmada omurilik örneklerinde down-regüle olmuştur (Campos-melo vd., 2018; Hawley vd., 2019). Yapılan bir diğer çalışmada ise hasta BOS örneklerinde up-regüle olduğu ortaya koyulmuştur (Waller vd., 2018). miR-9 için farklı dokularda farklı ekspresyon seviyelerini görmekteyiz. Literatürde ALS hastalarında miR-9 için kan örneğinde veya dolaşımında daha önce bakılmamıştır. Bu sebeple yaptığımız çalışma literatürde yapılan ilk çalışmadır. Bu çalışma paralelinde, genişletilmiş kohortlar halinde çalışmanın ilerletilmesi ve sonuçların karşılaştırılması açısından önem taşımaktadır. Dikkat edilmesi gereken bir diğer nokta ise burada miRNA izolasyonu PBMC örneklerinden elde edilmiştir. Çalışma bu yönüyle de literatürdeki diğer çalışmalardan ayrılmaktadır. Genel bilgiler kısmında da bahsettiğimiz gibi PBMC serum ve plazmadan oldukça farklı ve daha yoğun miRNA içerir. Monleau ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada PBMC ve serum karşılaştırmasında PBMC örneklerinde daha fazla miRNA olduğu tespit edilmiştir (Monleau vd., 2014). Yapılan bir diğer çalışmada ise PBMC ve plazma karşılaştırılmasında bazı miRNA'lar çok az veya hiç plazmada eksprese olmazken PBMC'de daha fazla bulundukları ortaya koyulmuştur. Genel olarak, literatüre dayanarak ALS'de mitokondriyal disfonksiyona dahil olan genlerin olduğunu gösterdik. Burada, belirlenen genleri hedefleyen miR-9 ve miR-141'in ALS üzerindeki tahmini etkilerini in silico yöntemlerle gösterdik. Biyobelirteçler olarak

klirik kullanım için tanımlanmış miRNA'ları ve bunların hedef genlerini araştırmak ve doğrulamak için hastalardan elde edilen kan örneklerinde bu miR'lerin ekspresyon seviyelerine baktık ve elde ettiğimiz değerleri ortaya koyduk.



- Åkerblom, M., Sachdeva, R., Barde, I., Verp, S., Gentner, B., Trono, D., & Jakobsson, J. (2012). MicroRNA-124 is a subventricular zone neuronal fate determinant. *Journal of Neuroscience*, 32(26), 8879-8889. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0558-12.2012>
- Akhtar, R. S., Ness, J. M., & Roth, K. A. (2004). Bcl-2 family regulation of neuronal development and neurodegeneration. İçinde *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research* (C. 1644, Issues 2-3, ss. 189-203). <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2003.10.013>
- Akizuki, M., Yamashita, H., Uemura, K., Maruyama, H., Kawakami, H., Ito, H., & Takahashi, R. (2013). Optineurin suppression causes neuronal cell death via NF-κB pathway. *Journal of Neurochemistry*, 126(6), 699-704. <https://doi.org/10.1111/jnc.12326>
- Aktekin, M. R., & Uysal, H. (2020). Epidemiology of amyotrophic lateral sclerosis. *Türk Noroloji Dergisi*, 26(3), 187-196. <https://doi.org/10.4274/tnd.2020.45549>
- Al-Chalabi, A., & Hardiman, O. (2013). The epidemiology of ALS: a conspiracy of genes, environment and time. *Nature Reviews Neurology*, 9(11), 617-628. <https://doi.org/10.1038/nrneurol.2013.203>
- Atsumi, T. (1981). The ultrastructure of intramuscular nerves in amyotrophic lateral sclerosis. *Acta Neuropathologica*, 55(3), 193-198. <https://doi.org/10.1007/BF00691318>
- Bannwarth, S., Ait-El-Mkadem, S., Chausse, A., Genin, E. C., Lacas-Gervais, S., Fragaki, K., Berg-Alonso, L., Kageyama, Y., Serre, V., Moore, D. G., Verschueren, A., Rouzier, C., le Ber, I., Augé, G., Cochaud, C., Lespinasse, F., N'guyen, K., de Septenville, A., Brice, A., ... Paquis-Flucklinger, V. (2014). A mitochondrial origin for frontotemporal dementia and amyotrophic lateral sclerosis through CHCHD10 involvement. *Brain*, 137(8), 2329-2345. <https://doi.org/10.1093/brain/awu138>
- Barmada, S. J., Skibinski, G., Korb, E., Rao, E. J., Wu, J. Y., & Finkbeiner, S. (2010). Cytoplasmic mislocalization of TDP-43 is toxic to neurons and enhanced by a mutation associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Journal of Neuroscience*, 30(2), 639-649. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4988-09.2010>
- Barnham, K. J., Masters, C. L., & Bush, A. I. (2004). Neurodegenerative diseases and oxidative stress. *Nature Reviews Drug Discovery*, 3(3), 205-214. <https://doi.org/10.1038/nrd1330>
- Bartel, D. P. (2004). Review MicroRNAs: Genomics, Biogenesis, Mechanism, and Function ulation of hematopoietic lineage differentiation in mammals (Chen et al., 2004), and control of leaf and flower development in plants (Aukerman and Sakai, 2003. İçinde *Cell* (C. 116).
- Bartel, D. P. (2009). MicroRNAs: Target Recognition and Regulatory Functions. *Cell*, 136(2), 215-233. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.01.002>
- Bartolome, F., Wu, H. C., Burchell, V. S., Preza, E., Wray, S., Mahoney, C. J., Fox, N. C., Calvo, A., Canosa, A., Moglia, C., Mandrioli, J., Chiò, A., Orrell, R. W., Houlden, H., Hardy, J., Abramov, A. Y., & Plun-Favreau, H. (2013).

- Pathogenic VCP Mutations Induce Mitochondrial Uncoupling and Reduced ATP Levels. *Neuron*, 78(1), 57-64.
<https://doi.org/10.1016/j.neuron.2013.02.028>
- Beermann, J., Piccoli, M.-T., Viereck, J., & Thum, T. (2016). Non-coding RNAs in Development and Disease: Background, Mechanisms, and Therapeutic Approaches. *Physiol Rev*, 96, 1297-1325.
<https://doi.org/10.1152/physrev.00041.2015.-Ad>
- Beers, D. R., & Appel, S. H. (2019). Immune dysregulation in amyotrophic lateral sclerosis: mechanisms and emerging therapies. İçinde *The Lancet Neurology* (C. 18, Issue 2, ss. 211-220). Lancet Publishing Group.
[https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(18\)30394-6](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(18)30394-6)
- Benatar, M., Wu, J., Andersen, P. M., Lombardi, V., & Malaspina, A. (2018). Neurofilament light: A candidate biomarker of presymptomatic amyotrophic lateral sclerosis and phenocopy. *Annals of Neurology*, 84(1), 130-139.
<https://doi.org/10.1002/ana.25276>
- Benjamin, E., Alstadhaug, K. B., Gulsvik, M., Baloch, F. K., & Odeh, F. (2018). Amyotrophic lateral sclerosis in Nordland county, Norway, 2000–2015: prevalence, incidence, and clinical features. *Amyotrophic Lateral Sclerosis and Frontotemporal Degeneration*, 19(7-8), 522-527.
<https://doi.org/10.1080/21678421.2018.1513534>
- Borchert, G. M., Lanier, W., & Davidson, B. L. (2006). RNA polymerase III transcribes human microRNAs. *Nature Structural and Molecular Biology*, 13(12), 1097-1101. <https://doi.org/10.1038/nsmb1167>
- Bordoni, L., & Gabbianelli, R. (2020). Mitochondrial dna and neurodegeneration: Any role for dietary antioxidants? İçinde *Antioxidants* (C. 9, Issue 8, ss. 1-24). MDPI. <https://doi.org/10.3390/antiox9080764>
- Borovecki, F., & Habek, M. (2010). Development of novel genomic blood biomarkers for neurodegenerative diseases. *CNS & Neurological Disorders Drug Targets*, 9(6), 669-678.
<https://doi.org/10.2174/187152710793237476>
- Bowling, A. C., Schulz, J. B., Brown, R. H., & Beal, M. F. (1993). Superoxide Dismutase Activity, Oxidative Damage, and Mitochondrial Energy Metabolism in Familial and Sporadic Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Journal of Neurochemistry*, 61(6), 2322-2325. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.1993.tb07478.x>
- Bowser, R., Turner, M. R., & Shefner, J. (2011). Biomarkers in amyotrophic lateral sclerosis: Opportunities and limitations. İçinde *Nature Reviews Neurology* (C. 7, Issue 11, ss. 631-638).
<https://doi.org/10.1038/nrneurol.2011.151>
- Brooks, B. R., Miller, R. G., Swash, M., & Munsat, T. L. (2000). El Escorial revisited: Revised criteria for the diagnosis of amyotrophic lateral sclerosis. *Amyotrophic Lateral Sclerosis and Other Motor Neuron Disorders*, 1(5), 293-299. <https://doi.org/10.1080/146608200300079536>
- Brown, R. H., & Al-Chalabi, A. (2017). Amyotrophic Lateral Sclerosis. *New England Journal of Medicine*, 377(2), 162-172.
<https://doi.org/10.1056/NEJMra1603471>
- Browne, S. E., Bowling, A. C., Baik, M. J., Gurney, M., Brown, R. H., & Beal, M. F. (1998). Metabolic dysfunction in familial, but not sporadic, amyotrophic

- lateral sclerosis. *Journal of Neurochemistry*, 71(1), 281-287.
<https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.1998.71010281.x>
- Bury, J. J., Highley, J. R., Cooper-Knock, J., Goodall, E. F., Higginbottom, A., McDermott, C. J., Ince, P. G., Shaw, P. J., & Kirby, J. (2016). Oligogenic inheritance of optineurin (OPTN) and C9ORF72 mutations in ALS highlights localisation of OPTN in the TDP-43-negative inclusions of C9ORF72-ALS. *Neuropathology*, 36(2), 125-134. <https://doi.org/10.1111/neup.12240>
- Butovsky, O., Siddiqui, S., Gabriely, G., Lanser, A. J., Dake, B., Murugaiyan, G., Doykan, C. E., Wu, P. M., Gali, R. R., Iyer, L. K., Lawson, R., Berry, J., Krichevsky, A. M., Cudkowicz, M. E., & Weiner, H. L. (2012). Modulating inflammatory monocytes with a unique microRNA gene signature ameliorates murine ALS. *Journal of Clinical Investigation*, 122(9), 3063-3087. <https://doi.org/10.1172/JCI62636>
- Chaussonnot, A., le Ber, I., Ait-El-Mkadem, S., Camuzat, A., de Septenville, A., Bannwarth, S., Genin, E. C., Serre, V., Augé, G., Brice, A., Pouget, J., & Paquis-Flucklinger, V. (2014). Screening of CHCHD10 in a French cohort confirms the involvement of this gene in frontotemporal dementia with amyotrophic lateral sclerosis patients. *Neurobiology of Aging*, 35(12), 2884.e1-2884.e4. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2014.07.022>
- Chia, R., Chiò, A., & Traynor, B. J. (2018). Novel genes associated with amyotrophic lateral sclerosis: diagnostic and clinical implications. İçinde *The Lancet Neurology* (C. 17, Issue 1, ss. 94-102). Lancet Publishing Group. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(17\)30401-5](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(17)30401-5)
- Chinnery, P. F., & Hudson, G. (2013). Mitochondrial genetics. İçinde *British Medical Bulletin* (C. 106, Issue 1, ss. 135-159). <https://doi.org/10.1093/bmb/ldt017>
- Cirulli, E. T., Lasseigne, B. N., Petrovski, S., Sapp, P. C., Dion, P. A., Leblond, C. S., Couthouis, J., Lu, Y.-F., Wang, Q., Krueger, B. J., Ren, Z., Keebler, J., Han, Y., Levy, S. E., Boone, B. E., Wimbish, J. R., Waite, L. L., Jones, A. L., Carulli, J. P., ... Goldstein, D. B. (2015). Exome sequencing in amyotrophic lateral sclerosis identifies risk genes and pathways. *Science*, 347(6229), 1436-1441. <https://doi.org/10.1126/science.aaa3650>
- Cogswell, J. P., Ward, J., Taylor, I. A., Waters, M., Shi, Y., Cannon, B., Kelnar, K., Kemppainen, J., Brown, D., Chen, C., Prinjha, R. K., Richardson, J. C., Saunders, A. M., Roses, A. D., & Richards, C. A. (2008). Identification of miRNA Changes in Alzheimer's Disease Brain and CSF Yields Putative Biomarkers and Insights into Disease Pathways. *Journal of Alzheimer's Disease*, 14(1), 27-41. <https://doi.org/10.3233/JAD-2008-14103>
- Conaco, C., Otto, S., Han, J.-J., & Mandel, G. (2006). *Reciprocal actions of REST and a microRNA promote neuronal identity*. www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0511041103
- Dafinca, R., Barbagallo, P., Farrimond, L., Candalija, A., Scaber, J., Ababneh, N. A., Sathyaprakash, C., Vowles, J., Cowley, S. A., & Talbot, K. (2020). Impairment of Mitochondrial Calcium Buffering Links Mutations in C9ORF72 and TARDBP in iPSC-Derived Motor Neurons from Patients with ALS/FTD. *Stem Cell Reports*, 14(5), 892-908. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2020.03.023>

- Dafinca, R., Scaber, J., Ababneh, N., Lalic, T., Weir, G., Christian, H., Vowles, J., Douglas, A. G. L., Fletcher-Jones, A., Browne, C., Nakanishi, M., Turner, M. R., Wade-Martins, R., Cowley, S. A., & Talbot, K. (2016). C9orf72 Hexanucleotide Expansions Are Associated with Altered Endoplasmic Reticulum Calcium Homeostasis and Stress Granule Formation in Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Neurons from Patients with Amyotrophic Lateral Sclerosis and Frontotemporal Dementia. *Stem Cells*, 34(8), 2063-2078. <https://doi.org/10.1002/stem.2388>
- de Felice, B., Annunziata, A., Fiorentino, G., Borra, M., Biffali, E., Coppola, C., Cotrufo, R., Brettschneider, J., Giordana, M. L., Dalmay, T., Wheeler, G., & D'Alessandro, R. (2014). miR-338-3p is over-expressed in blood, CFS, serum and spinal cord from sporadic amyotrophic lateral sclerosis patients. *Neurogenetics*, 15(4), 243-253. <https://doi.org/10.1007/s10048-014-0420-2>
- de Felice, B., Guida, M., Guida, M., Coppola, C., de Mieri, G., & Cotrufo, R. (2012). A miRNA signature in leukocytes from sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Gene*, 508(1), 35-40. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2012.07.058>
- DeJesus-Hernandez, M., Mackenzie, I. R., Boeve, B. F., Boxer, A. L., Baker, M., Rutherford, N. J., Nicholson, A. M., Finch, N. C. A., Flynn, H., Adamson, J., Kouri, N., Wojtas, A., Sengdy, P., Hsiung, G. Y. R., Karydas, A., Seeley, W. W., Josephs, K. A., Coppola, G., Geschwind, D. H., ... Rademakers, R. (2011). Expanded GGGGCC Hexanucleotide Repeat in Noncoding Region of C9ORF72 Causes Chromosome 9p-Linked FTD and ALS. *Neuron*, 72(2), 245-256. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2011.09.011>
- Djebali, S., Davis, C. A., Merkel, A., Dobin, A., Lassmann, T., Mortazavi, A., Tanzer, A., Lagarde, J., Lin, W., Schlesinger, F., Xue, C., Marinov, G. K., Khatun, J., Williams, B. A., Zaleski, C., Rozowsky, J., Röder, M., Kokocinski, F., Abdelhamid, R. F., ... Gingeras, T. R. (2012). Landscape of transcription in human cells. *Nature*, 489(7414), 101-108. <https://doi.org/10.1038/nature11233>
- Dunham, I., Kundaje, A., Aldred, S. F., Collins, P. J., Davis, C. A., Doyle, F., Epstein, C. B., Frietze, S., Harrow, J., Kaul, R., Khatun, J., Lajoie, B. R., Landt, S. G., Lee, B. K., Pauli, F., Rosenbloom, K. R., Sabo, P., Safi, A., Sanyal, A., ... Lochovsky, L. (2012). An integrated encyclopedia of DNA elements in the human genome. *Nature*, 489(7414), 57-74. <https://doi.org/10.1038/nature11247>
- Etheridge, A., Lee, I., Hood, L., Galas, D., & Wang, K. (2011). Extracellular microRNA: A new source of biomarkers. *İçinde Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* (C. 717, Issues 1-2, ss. 85-90). <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2011.03.004>
- Fan, H. min, Sun, X. yang, Niu, W., Zhao, L., Zhang, Q. L., Li, W. shuai, Zhong, A. fang, Zhang, L. yi, & Lu, J. (2015). Altered microRNA Expression in Peripheral Blood Mononuclear Cells from Young Patients with Schizophrenia. *Journal of Molecular Neuroscience*, 56(3), 562-571. <https://doi.org/10.1007/s12031-015-0503-z>
- Fischer, L. R., Culver, D. G., Tennant, P., Davis, A. A., Wang, M., Castellano-Sanchez, A., Khan, J., Polak, M. A., & Glass, J. D. (2004). Amyotrophic lateral sclerosis is a distal axonopathy: Evidence in mice and man.

- Experimental Neurology*, 185(2), 232-240.
<https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2003.10.004>
- Freischmidt, A., Müller, K., Zondler, L., Weydt, P., Mayer, B., von Arnim, C. A. F., Hübers, A., Dorst, J., Otto, M., Holzmann, K., Ludolph, A. C., Danzer, K. M., & Weishaupt, J. H. (2015). Serum microRNAs in sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Neurobiology of Aging*, 36(9), 2660.e15-2660.e20.
<https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2015.06.003>
- Friedman, R. C., Farh, K. K. H., Burge, C. B., & Bartel, D. P. (2009). Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome Research*, 19(1), 92-105. <https://doi.org/10.1101/gr.082701.108>
- Gagliardi, S., Zucca, S., Pandini, C., Diamanti, L., Bordoni, M., Sproviero, D., Arigoni, M., Olivero, M., Pansarasa, O., Ceroni, M., Calogero, R., & Cereda, C. (2018). Long non-coding and coding RNAs characterization in Peripheral Blood Mononuclear Cells and Spinal Cord from Amyotrophic Lateral Sclerosis patients. *Scientific Reports*, 8(1), 2378.
<https://doi.org/10.1038/s41598-018-20679-5>
- Genin, E. C., Madji Hounoum, B., Bannwarth, S., Fragaki, K., Lacas-Gervais, S., Mauri-Crouzet, A., Lespinasse, F., Neveu, J., Ropert, B., Augé, G., Cochaud, C., Lefebvre-Omar, C., Bigou, S., Chiot, A., Mochel, F., Boillée, S., Lobsiger, C. S., Bohl, D., Ricci, J. E., & Paquis-Flucklinger, V. (2019). Mitochondrial defect in muscle precedes neuromuscular junction degeneration and motor neuron death in CHCHD10 S59L/+ mouse. *Acta Neuropathologica*.
<https://doi.org/10.1007/s00401-019-01988-z>
- Golpich, M., Amini, E., Mohamed, Z., Azman Ali, R., Mohamed Ibrahim, N., & Ahmadiani, A. (2017). Mitochondrial Dysfunction and Biogenesis in Neurodegenerative diseases: Pathogenesis and Treatment. *CNS Neuroscience & Therapeutics*, 23(1), 5-22. <https://doi.org/10.1111/cns.12655>
- Gómez-Suaga, P., Pérez-Nievas, B. G., Glennon, E. B., Lau, D. H. W., Paillusson, S., Mórotz, G. M., Calì, T., Pizzo, P., Noble, W., & Miller, C. C. J. (2019). The VAPB-PTPIP51 endoplasmic reticulum-mitochondria tethering proteins are present in neuronal synapses and regulate synaptic activity. *Acta Neuropathologica Communications*, 7(1), 35.
<https://doi.org/10.1186/s40478-019-0688-4>
- Goodall, E. F., Heath, P. R., Bandmann, O., Kirby, J., & Shaw, P. J. (2013). Neuronal dark matter: The emerging role of microRNAs in neurodegeneration. *Çinde Frontiers in Cellular Neuroscience* (Issue OCT).
<https://doi.org/10.3389/fncel.2013.00178>
- Görür, A., & Tamer, L. (2011). MikroRNA'ların Terapötik Kullanımı. *Mersin Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi*, 4(2).
<https://dergipark.org.tr/tr/pub/mersinsbd/207939>
- Grimson, A., Farh, K. K. H., Johnston, W. K., Garrett-Engele, P., Lim, L. P., & Bartel, D. P. (2007). MicroRNA Targeting Specificity in Mammals: Determinants beyond Seed Pairing. *Molecular Cell*, 27(1), 91-105.
<https://doi.org/10.1016/j.molcel.2007.06.017>
- Güzelgöl, F., & Aksoy, K. (2015). Bir Gen İfade Düzenleyicisi miRNA. *Arşiv Kaynak Tarama Dergisi*, 24(4), 472. <https://doi.org/10.17827/aktd.95263>
- Haramati, S., Chapnik, E., Sztainberg, Y., Eilam, R., Zwang, R., Gershoni, N., McGlinn, E., Heiser, P. W., Wills, A. M., Wirguin, I., Rubin, L. L., Misawa,

- H., Tabin, C. J., Brown, R., Chen, A., & Hornstein, E. (2010). miRNA malfunction causes spinal motor neuron disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(29), 13111-13116. <https://doi.org/10.1073/pnas.1006151107>
- Hardiman, O., Al-Chalabi, A., Chio, A., Corr, E. M., Logroscino, G., Robberecht, W., Shaw, P. J., Simmons, Z., & van den Berg, L. H. (2017). Amyotrophic lateral sclerosis. *Nature Reviews Disease Primers*, 3(1), 17071. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2017.71>
- Harding, O., Evans, C. S., Ye, J., Cheung, J., Maniatis, T., & Holzbaur, E. L. F. (2021). ALS- and FTD-associated missense mutations in TBK1 differentially disrupt mitophagy. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 118(24), e2025053118. <https://doi.org/10.1073/pnas.2025053118>
- Higgins, C. M. J., Jung, C., Ding, H., & Xu, Z. (2002). *Mutant Cu, Zn Superoxide Dismutase that Causes Motoneuron Degeneration Is Present in Mitochondria in the CNS*. www.jneurosci.org
- Hirabayashi, Y., Kwon, S.-K., Paek, H., Pernice, W. M., Paul, M. A., Lee, J., Erfani, P., Raczkowski, A., Petrey, D. S., Pon, L. A., & Polleux, F. (2017). ER-mitochondria tethering by PDZD8 regulates Ca^{2+} dynamics in mammalian neurons. *Science*, 358(6363), 623-630. <https://doi.org/10.1126/science.aan6009>
- Hornstein, E., Mansfield, J. H., Yekta, S., Hu, J. K. H., Harfe, B. D., McManus, M. T., Baskerville, S., Bartel, D. P., & Tabin, C. J. (2005). The microRNA miR-196 acts upstream of Hoxb8 and Shh in limb development. *Nature*, 438(7068), 671-674. <https://doi.org/10.1038/nature04138>
- Huang, H. N., Chen, S. Y., Hwang, S. M., Yu, C. C., Su, M. W., Mai, W., Wang, H. W., Cheng, W. C., Schuyler, S. C., Ma, N., Lu, F. L., & Lu, J. (2014). MiR-200c and GATA binding protein 4 regulate human embryonic stem cell renewal and differentiation. *Stem Cell Research*, 12(2), 338-353. <https://doi.org/10.1016/j.scr.2013.11.009>
- Jaiswal, M. K. (2017). Riluzole But Not Melatonin Ameliorates Acute Motor Neuron Degeneration and Moderately Inhibits SOD1-Mediated Excitotoxicity Induced Disrupted Mitochondrial Ca^{2+} Signaling in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 10. <https://doi.org/10.3389/fncel.2016.00295>
- Johnson, J. O., Glynn, S. M., Raphael Gibbs, J., Nalls, M. A., Sabatelli, M., Restagno, G., Drory, V. E., Chiò, A., Rogaeva, E., & Traynor, B. J. (2014). Mutations in the CHCHD10 gene are a common cause of familial amyotrophic lateral sclerosis. *Brain* (C. 137, Issue 12, s. e311). Oxford University Press. <https://doi.org/10.1093/brain/awu265>
- Johnson, J. O., Mandrioli, J., Benatar, M., Abramzon, Y., van Deerlin, V. M., Trojanowski, J. Q., Gibbs, J. R., Brunetti, M., Gronka, S., Wu, J., Ding, J., McCluskey, L., Martinez-Lage, M., Falcone, D., Hernandez, D. G., Arepalli, S., Chong, S., Schymick, J. C., Rothstein, J., ... Traynor, B. J. (2010). Exome Sequencing Reveals VCP Mutations as a Cause of Familial ALS. *Neuron*, 68(5), 857-864. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2010.11.036>
- Joilin, G., Gray, E., Thompson, A. G., Bobeva, Y., Talbot, K., Weishaupt, J., Ludolph, A., Malaspina, A., Leigh, P. N., Newbury, S. F., Turner, M. R., & Hafezparast, M. (2020). Identification of a potential non-coding RNA

- biomarker signature for amyotrophic lateral sclerosis. *Brain Communications*, 2(1). <https://doi.org/10.1093/braincomms/fcaa053>
- Jun, K. Y., Park, J., Oh, K.-W., Kim, E. M., Bae, J. S., Kim, I., & Kim, S. H. (2019). Epidemiology of ALS in Korea using nationwide big data. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*, 90(4), 395-403. <https://doi.org/10.1136/jnnp-2018-318974>
- Jung, C., Higgins, C. M. J., & Xu, Z. (2002). Mitochondrial electron transport chain complex dysfunction in a transgenic mouse model for amyotrophic lateral sclerosis. *Journal of Neurochemistry*, 83(3), 535-545. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2002.01112.x>
- Kabashi, E., Valdmanis, P. N., Dion, P., Spiegelman, D., McConkey, B. J., Velde, C. vande, Bouchard, J. P., Lacomblez, L., Pochigaeva, K., Salachas, F., Pradat, P. F., Camu, W., Meininger, V., Dupre, N., & Rouleau, G. A. (2008). TARDBP mutations in individuals with sporadic and familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nature Genetics*, 40(5), 572-574. <https://doi.org/10.1038/ng.132>
- KARAGÜN, B. Ş., ANTMEN, B., ŞAŞMAZ, H. ilgen, & KILINÇ, Y. (2014). Mikro RNA ve Kanser. *Türk Klinik Biyokimya Dergisi*, 12(1), 45-56. <https://app.trdizin.gov.tr/makale/TVRjM016TTFOU09/mikro-rna-ve-kanser>
- Keogh, M. J., & Chinnery, P. F. (2015). Mitochondrial DNA mutations in neurodegeneration. İçinde *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics* (C. 1847, Issue 11, ss. 1401-1411). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.bbabbio.2015.05.015>
- Kim, N. C., Tresse, E., Kolaitis, R. M., Molliex, A., Thomas, R. E., Alami, N. H., Wang, B., Joshi, A., Smith, R. B., Ritson, G. P., Winborn, B. J., Moore, J., Lee, J. Y., Yao, T. P., Pallanck, L., Kundu, M., & Taylor, J. P. (2013). VCP Is Essential for Mitochondrial Quality Control by PINK1/Parkin and this Function Is Impaired by VCP Mutations. *Neuron*, 78(1), 65-80. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2013.02.029>
- Kong, J., & Xu, Z. (1998). *Massive Mitochondrial Degeneration in Motor Neurons Triggers the Onset of Amyotrophic Lateral Sclerosis in Mice Expressing a Mutant SOD1*.
- Kuźma-Kozakiewicz, M., Kaźmierczak, B., Chudy, A., Gajewska, B., & Barańczyk-Kuźma, A. (2016). Alteration of Motor Protein Expression Involved in Bidirectional Transport in Peripheral Blood Mononuclear Cells of Patients with Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Neurodegenerative Diseases*, 16(3-4), 235-244. <https://doi.org/10.1159/000443664>
- Lagos-Quintana, M., Rauhut, R., Lendeckel, W., & Tuschl, T. (2001). Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. *Science*, 294(5543), 853-858. <https://doi.org/10.1126/science.1064921>
- Lambris, J. D. (2019). *Mitochondria in Health and in Sickness* (A. Urbani & M. Babu, Ed.; C. 1158). Springer Singapore. <https://doi.org/10.1007/978-981-13-8367-0>
- Landgraf, P., Rusu, M., Sheridan, R., Sewer, A., Iovino, N., Aravin, A., Pfeffer, S., Rice, A., Kamphorst, A. O., Landthaler, M., Lin, C., Socci, N. D., Hermida, L., Fulci, V., Chiaretti, S., Foà, R., Schliwka, J., Fuchs, U., Novosel, A., ... Tuschl, T. (2007). A Mammalian microRNA Expression Atlas Based on

- Small RNA Library Sequencing. *Cell*, 129(7), 1401-1414.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.04.040>
- Lawrie, C. H., Gal, S., Dunlop, H. M., Pushkaran, B., Liggins, A. P., Pulford, K., Banham, A. H., Pezzella, F., Boultonwood, J., Wainscoat, J. S., Hatton, C. S. R., & Harris, A. L. (2008). Detection of elevated levels of tumour-associated microRNAs in serum of patients with diffuse large B-cell lymphoma. *British Journal of Haematology*, 141(5), 672-675. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.2008.07077.x>
- le Gall, L., Anakor, E., Connolly, O., Vijayakumar, U. G., Duddy, W. J., & Duguez, S. (2020). Molecular and cellular mechanisms affected in als. *Içinde Journal of Personalized Medicine* (C. 10, Issue 3, ss. 1-34). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/jpm10030101>
- Lee, R. C., Feinbaum, R. L., & Ambrost, V. (1993). The C. elegans Heterochronic Gene lin-4 Encodes Small RNAs with Antisense Complementarity to &II-14. *Içinde Cell* (C. 75).
- Lee, Y., Kim, M., Han, J., Yeom, K. H., Lee, S., Baek, S. H., & Kim, V. N. (2004). MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *EMBO Journal*, 23(20), 4051-4060. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600385>
- Leighton, D. J., Newton, J., Stephenson, L. J., Colville, S., Davenport, R., Gorrie, G., Morrison, I., Swingler, R., Chandran, S., & Pal, S. (2019). Changing epidemiology of motor neurone disease in Scotland. *Journal of Neurology*, 266(4), 817-825. <https://doi.org/10.1007/s00415-019-09190-7>
- Leucht, C., Stigloher, C., Wizenmann, A., Klafke, R., Folchert, A., & Bally-Cuif, L. (2008). MicroRNA-9 directs late organizer activity of the midbrain-hindbrain boundary. *Nature Neuroscience*, 11(6), 641-648. <https://doi.org/10.1038/nn.2115>
- Lezi, E., & Swerdlow, R. H. (2012). Mitochondria in neurodegeneration. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 942, 269-286. https://doi.org/10.1007/978-94-007-2869-1_12
- Li, S., Ren, Y., Zhu, W., Yang, F., Zhang, X., & Huang, X. (2016). Phosphorylated neurofilament heavy chain levels in paired plasma and CSF of amyotrophic lateral sclerosis. *Journal of the Neurological Sciences*, 367, 269-274. <https://doi.org/10.1016/j.jns.2016.05.062>
- Li, X., Huang, L., Lan, J., Feng, X., Li, P., Wu, L., & Peng, Y. (2021). Molecular mechanisms of mitophagy and its roles in neurodegenerative diseases. *Pharmacological Research*, 163, 105240. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2020.105240>
- Liang, Y., Ridzon, D., Wong, L., & Chen, C. (2007). Characterization of microRNA expression profiles in normal human tissues. *BMC Genomics*, 8. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-8-166>
- Lin, J., Diamanduros, A., Chowdhury, S. A., Scelsa, S., Latov, N., & Sadiq, S. A. (2009). Specific electron transport chain abnormalities in amyotrophic lateral sclerosis. *Journal of Neurology*, 256(5), 774-782. <https://doi.org/10.1007/s00415-009-5015-8>
- Lin, M. T., & Beal, M. F. (2006). Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Nature*, 443(7113), 787-795. <https://doi.org/10.1038/nature05292>

- Liu, J., Lillo, C., Jonsson, P. A., Velde, C. vande, Ward, C. M., Miller, T. M., Subramaniam, J. R., Rothstein, J. D., Marklund, S., Andersen, P. M., Brännström, T., Gredal, O., Wong, P. C., Williams, D. S., & Cleveland, D. W. (2004). Toxicity of familial ALS-linked SOD1 mutants from selective recruitment to spinal mitochondria. *Neuron*, 43(1), 5-17. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2004.06.016>
- Liu, Z., Li, H., Hong, C., Chen, M., Yue, T., Chen, C., Wang, Z., You, Q., Li, C., Weng, Q., Xie, H., & Hu, R. (2018). ALS-associated E478G mutation in human OPTN (optineurin) promotes inflammation and induces neuronal cell death. *Frontiers in Immunology*, 9(NOV). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02647>
- Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. *Methods*, 25(4), 402-408. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>
- Longinetti, E., Regodón Wallin, A., Samuelsson, K., Press, R., Zachau, A., Ronnevi, L.-O., Kierkegaard, M., Andersen, P. M., Hillert, J., Fang, F., & Ingre, C. (2018). The Swedish motor neuron disease quality registry. *Amyotrophic Lateral Sclerosis and Frontotemporal Degeneration*, 19(7-8), 528-537. <https://doi.org/10.1080/21678421.2018.1497065>
- Lopez-Gonzalez, R., Lu, Y., Gendron, T. F., Karydas, A., Tran, H., Yang, D., Petrucelli, L., Miller, B. L., Almeida, S., & Gao, F. B. (2016). Poly(GR) in C9ORF72-Related ALS/FTD Compromises Mitochondrial Function and Increases Oxidative Stress and DNA Damage in iPSC-Derived Motor Neurons. *Neuron*, 92(2), 383-391. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2016.09.015>
- Lu, P., Wang, F., Wu, J., Wang, C., Yan, J., Li, Z., Song, J., & Wang, J. (2017). Elevated Serum miR-7, miR-9, miR-122, and miR-141 Are Noninvasive Biomarkers of Acute Pancreatitis. *Disease Markers*, 2017, 1-8. <https://doi.org/10.1155/2017/7293459>
- Lukiw, W. J. (2007). Micro-RNA speciation in fetal, adult and Alzheimer's disease hippocampus. *NeuroReport*, 18(3), 297-300. <https://doi.org/10.1097/WNR.0b013e3280148e8b>
- Luotti, S., Pasetto, L., Porcu, L., Torri, V., Elezgarai, S. R., Pantalone, S., Filareti, M., Corbo, M., Lunetta, C., Mora, G., & Bonetto, V. (2020). Diagnostic and prognostic values of PBMC proteins in amyotrophic lateral sclerosis. *Neurobiology of Disease*, 139. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2020.104815>
- Maes, O. C., Xu, S., Yu, B., Chertkow, H. M., Wang, E., & Schipper, H. M. (2007). Transcriptional profiling of Alzheimer blood mononuclear cells by microarray. *Neurobiology of Aging*, 28(12), 1795-1809. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2006.08.004>
- Magen, I., Yacovzada, N. S., Yanowski, E., Coenen-Stass, A., Grosskreutz, J., Lu, C. H., Greensmith, L., Malaspina, A., Fratta, P., & Hornstein, E. (2021). Circulating miR-181 is a prognostic biomarker for amyotrophic lateral sclerosis. *Nature Neuroscience*, 24(11), 1534-1541. <https://doi.org/10.1038/s41593-021-00936-z>
- Magrané, J., Cortez, C., Gan, W. B., & Manfredi, G. (2014). Abnormal mitochondrial transport and morphology are common pathological

- denominators in SOD1 and TDP43 ALS mouse models. *Human Molecular Genetics*, 23(6), 1413-1424. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddt528>
- Magrané, J., Sahawneh, M. A., Przedborski, S., Estévez, Á. G., & Manfredi, G. (2012). Mitochondrial dynamics and bioenergetic dysfunction is associated with synaptic alterations in mutant sod1 motor neurons. *Journal of Neuroscience*, 32(1), 229-242. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1233-11.2012>
- Marcuzzo, S., Bonanno, S., Kapetis, D., Barzago, C., Cavalcante, P., D'Alessandro, S., Mantegazza, R., & Bernasconi, P. (2015). Up-regulation of neural and cell cycle-related microRNAs in brain of amyotrophic lateral sclerosis mice at late disease stage. *Molecular Brain*, 8(1). <https://doi.org/10.1186/s13041-015-0095-0>
- Markovinovic, A., Greig, J., Martín-Guerrero, S. M., Salam, S., & Paillusson, S. (2022). Endoplasmic reticulum-mitochondria signaling in neurons and neurodegenerative diseases. İçinde *Journal of Cell Science* (C. 135, Issue 3). Company of Biologists Ltd. <https://doi.org/10.1242/jcs.248534>
- Maruyama, H., Morino, H., Ito, H., Izumi, Y., Kato, H., Watanabe, Y., Kinoshita, Y., Kamada, M., Nodera, H., Suzuki, H., Komure, O., Matsuura, S., Kobatake, K., Morimoto, N., Abe, K., Suzuki, N., Aoki, M., Kawata, A., Hirai, T., ... Kawakami, H. (2010). Mutations of optineurin in amyotrophic lateral sclerosis. *Nature*, 465(7295), 223-226. <https://doi.org/10.1038/nature08971>
- Mateescu, B., Batista, L., Cardon, M., Gruosso, T., de Feraudy, Y., Mariani, O., Nicolas, A., Meyniel, J.-P., Cottu, P., Sastre-Garau, X., & Mechta-Grigoriou, F. (2011). miR-141 and miR-200a act on ovarian tumorigenesis by controlling oxidative stress response. *Nature Medicine*, 17(12), 1627-1635. <https://doi.org/10.1038/nm.2512>
- McCord, J. M., & Fridovich, I. (1969). Superoxide Dismutase. *Journal of Biological Chemistry*, 244(22), 6049-6055. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)63504-5](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)63504-5)
- McFarland, R., Taylor, R. W., & Turnbull, D. M. (2010). A neurological perspective on mitochondrial disease. İçinde *The Lancet Neurology* (C. 9, Issue 8, ss. 829-840). Lancet Publishing Group. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(10\)70116-2](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(10)70116-2)
- Mejzini, R., Flynn, L. L., Pitout, I. L., Fletcher, S., Wilton, S. D., & Akkari, P. A. (2019). ALS Genetics, Mechanisms, and Therapeutics: Where Are We Now? *Frontiers in Neuroscience*, 13. <https://doi.org/10.3389/fnins.2019.01310>
- Mérino, D., & Bouillet, P. (2009). The Bcl-2 family in autoimmune and degenerative disorders. İçinde *Apoptosis* (C. 14, Issue 4, ss. 570-583). <https://doi.org/10.1007/s10495-008-0308-4>
- Michaelidis, T. M., Sendtner, M., & Cooper, J. D. (1996). Inactivation of bcl-2 Results in Progressive Degeneration of Motoneurons, Sympathetic and Sensory Neurons during Early Postnatal Development. İçinde *Neuron* (C. 17).
- Miska, E. A., Alvarez-Saavedra, E., Townsend, M., Yoshii, A., Šestan, N., Rakic, P., Constantine-Paton, M., & Horvitz, R. (2004). *Open Access Microarray analysis of microRNA expression in the developing mammalian brain*. <https://doi.org/10.1186/gb-2004-5-9-r68>

- Monleau, M., Bonnel, S., Gostan, T., Blanchard, D., Courgnaud, V., & Lecellier, C.-H. (2014). *Comparison of different extraction techniques to profile microRNAs from human sera and peripheral blood mononuclear cells*. <http://www.biomedcentral.com/1471-2164/15/395>
- Moore, A. S., & Holzbaur, E. L. F. (2016). Dynamic recruitment and activation of ALS-associated TBK1 with its target optineurin are required for efficient mitophagy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 113(24), E3349-E3358. <https://doi.org/10.1073/pnas.1523810113>
- Morgan, S., & Orrell, R. W. (2016). Pathogenesis of amyotrophic lateral sclerosis. *British Medical Bulletin*, 119(1), 87-98. <https://doi.org/10.1093/bmb/ldw026>
- Morita, S., Horii, T., Kimura, M., Goto, Y., Ochiya, T., & Hatada, I. (2007). One Argonaute family member, Eif2c2 (Ago2), is essential for development and appears not to be involved in DNA methylation. *Genomics*, 89(6), 687-696. <https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2007.01.004>
- Mu, X., He, J., Anderson, D. W., Trojanowski, J. Q., & Springer, J. E. (1996). Altered expression of bcl-2 and bax mRNA in amyotrophic lateral sclerosis spinal cord motor neurons. *Annals of Neurology*, 40(3), 379-386. <https://doi.org/10.1002/ana.410400307>
- Müller, K., Andersen, P. M., Hübers, A., Marroquin, N., Volk, A. E., Danzer, K. M., Meitinger, T., Ludolph, A. C., Strom, T. M., & Weishaupt, J. H. (2014). Two novel mutations in conserved codons indicate that CHCHD10 is a gene associated with motor neuron disease. *Brain*, 137(12), e309-e309. <https://doi.org/10.1093/brain/awu227>
- Naguibneva, I., Ameyar-Zazoua, M., Polesskaya, A., Ait-Si-Ali, S., Groisman, R., Souidi, M., Cuvellier, S., & Harel-Bellan, A. (2006). The microRNA miR-181 targets the homeobox protein Hox-A11 during mammalian myoblast differentiation. *Nature Cell Biology*, 8(3), 278-284. <https://doi.org/10.1038/ncb1373>
- Nguyen, H. P., van Broeckhoven, C., & van der Zee, J. (2018). ALS Genes in the Genomic Era and their Implications for FTD. İçinde *Trends in Genetics* (C. 34, Issue 6, ss. 404-423). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2018.03.001>
- Nishimura, Y., Martin, C. L., Vazquez-Lopez, A., Spence, S. J., Alvarez-Retuerto, A. I., Sigman, M., Steindler, C., Pellegrini, S., Schanen, N. C., Warren, S. T., & Geschwind, D. H. (2007). Genome-wide expression profiling of lymphoblastoid cell lines distinguishes different forms of autism and reveals shared pathways †. *Human Molecular Genetics*, 16(14), 1682-1698. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddm116>
- Oakes, J. A., Davies, M. C., & Collins, M. O. (2017). TBK1: a new player in ALS linking autophagy and neuroinflammation. *Molecular Brain*, 10(1), 1-10. <https://doi.org/10.1186/s13041-017-0287-x>
- Ola, M. S., Nawaz, M., & Ahsan, H. (2011). Role of Bcl-2 family proteins and caspases in the regulation of apoptosis. İçinde *Molecular and Cellular Biochemistry* (C. 351, Issues 1-2, ss. 41-58). <https://doi.org/10.1007/s11010-010-0709-x>

- Osawa, T., Mizuno, Y., Fujita, Y., Takatama, M., Nakazato, Y., & Okamoto, K. (2011). Optineurin in neurodegenerative diseases. *Neuropathology*, 31(6), 569-574. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1789.2011.01199.x>
- Palese, F., Sartori, A., Verriello, L., Ros, S., Passadore, P., Manganotti, P., Barbone, F., & Pisa, F. E. (2019). Epidemiology of amyotrophic lateral sclerosis in Friuli-Venezia Giulia, North-Eastern Italy, 2002–2014: a retrospective population-based study. *Amyotrophic Lateral Sclerosis and Frontotemporal Degeneration*, 20(1-2), 90-99. <https://doi.org/10.1080/21678421.2018.1511732>
- Pasinelli, P., Belford, M. E., Lennon, N., Bacsikai, B. J., Hyman, B. T., Trotti, D., & Brown, R. H. (2004). Amyotrophic lateral sclerosis-associated SOD1 mutant proteins bind and aggregate with Bcl-2 in spinal cord mitochondria. *Neuron*, 43(1), 19-30. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2004.06.021>
- Pedrini, S., Sau, D., Guareschi, S., Bogush, M., Brown, R. H., Nanche, N., Kia, A., Trotti, D., & Pasinelli, P. (2010). ALS-linked mutant SOD1 damages mitochondria by promoting conformational changes in Bcl-2. *Human Molecular Genetics*, 19(15), 2974-2986. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddq202>
- Peoples, J. N., Saraf, A., Ghazal, N., Pham, T. T., & Kwong, J. Q. (2019). Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in heart disease. *Experimental & Molecular Medicine*, 51(12), 1-13. <https://doi.org/10.1038/s12276-019-0355-7>
- Peter, M. E. (2010). Targeting of mRNAs by multiple miRNAs: the next step. *Oncogene*, 29(15), 2161-2164. <https://doi.org/10.1038/onc.2010.59>
- Reinhart, B. J., Slack, F. J., Basson, M., Pasquinelli, A. E., Bettinger, J. C., Rougvie, A. E., Horvitz, H. R., & Ruvkun, G. (2000). The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 403(6772), 901-906. <https://doi.org/10.1038/35002607>
- Renton, A. E., Majounie, E., Waite, A., Simón-Sánchez, J., Rollinson, S., Gibbs, J. R., Schymick, J. C., Laaksovirta, H., van Swieten, J. C., Myllykangas, L., Kalimo, H., Paetau, A., Abramzon, Y., Remes, A. M., Kaganovich, A., Scholz, S. W., Duckworth, J., Ding, J., Harmer, D. W., ... Traynor, B. J. (2011). A Hexanucleotide Repeat Expansion in C9ORF72 Is the Cause of Chromosome 9p21-Linked ALS-FTD. *Neuron*, 72(2), 257-268. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2011.09.010>
- Rose, L., McKim, D., Leasa, D., Nonoyama, M., Tandon, A., Bai, Y. Q., Amin, R., Katz, S., Goldstein, R., & Gershon, A. (2019). Trends in incidence, prevalence, and mortality of neuromuscular disease in Ontario, Canada: A population-based retrospective cohort study (2003-2014). *PLOS ONE*, 14(3), e0210574. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0210574>
- Rosen, D. R., Siddique, T., Patterson, D., Figlewicz, D. A., Sapp, P., Hentati, A., Donaldson, D., Goto, J., O'Regan, J. P., Deng, H.-X., Rahmani, Z., Krizus, A., McKenna-Yasek, D., Cayabyab, A., Gaston, S. M., Berger, R., Tanzi, R. E., Halperin, J. J., Herzfeldt, B., ... Brown, R. H. (1993). Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nature*, 362(6415), 59-62. <https://doi.org/10.1038/362059a0>
- Rostamian Delavar, M., Baghi, M., Safaeinejad, Z., Kiani-Esfahani, A., Ghaedi, K., & Nasr-Esfahani, M. H. (2018). Differential expression of miR-34a, miR-

- 141, and miR-9 in MPP+-treated differentiated PC12 cells as a model of Parkinson's disease. *Gene*, 662, 54-65.
<https://doi.org/10.1016/j.gene.2018.04.010>
- Sasaki, S., & Iwata, M. (1996). Ultrastructural study of synapses in the anterior horn neurons of patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Neuroscience Letters*, 204(1-2), 53-56. [https://doi.org/10.1016/0304-3940\(96\)12314-4](https://doi.org/10.1016/0304-3940(96)12314-4)
- Sasaki, S., & Iwata, M. (2007). Mitochondrial Alterations in the Spinal Cord of Patients With Sporadic Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, 66(1), 10-16.
<https://doi.org/10.1097/nen.0b013e31802c396b>
- Sathasivam, S., Ince, P. G., & Shaw, P. J. (2001). Apoptosis in amyotrophic lateral sclerosis: A review of the evidence. *İçinde Neuropathology and Applied Neurobiology* (C. 27, Issue 4, ss. 257-274).
<https://doi.org/10.1046/j.0305-1846.2001.00332.x>
- Schaefer, A. M., Sanes, J. R., & Lichtman, J. W. (2005). A compensatory subpopulation of motor neurons in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *The Journal of Comparative Neurology*, 490(3), 209-219.
<https://doi.org/10.1002/cne.20620>
- Schaefer, A., O'Carroll, D., Chan, L. T., Hillman, D., Sugimori, M., Llinas, R., & Greengard, P. (2007). Cerebellar neurodegeneration in the absence of microRNAs. *Journal of Experimental Medicine*, 204(7), 1553-1558.
<https://doi.org/10.1084/jem.20070823>
- Schipper, H. M., Maes, O. C., Chertkow, H. M., & Wang, E. (2007). MicroRNA Expression in Alzheimer Blood Mononuclear Cells. *Gene Regulation and Systems Biology*, 1, GRSB.S361. <https://doi.org/10.4137/GRSB.S361>
- Schwienbacher, C., Foco, L., Picard, A., Corradi, E., Serafin, A., Panzer, J., Zanigni, S., Blankenburg, H., Facheris, M. F., Giannini, G., Falla, M., Cortelli, P., Pramstaller, P. P., & Hicks, A. A. (2017). Plasma and White Blood Cells Show Different miRNA Expression Profiles in Parkinson's Disease. *Journal of Molecular Neuroscience*, 62(2), 244-254.
<https://doi.org/10.1007/s12031-017-0926-9>
- Sempere, L. F., Freemantle, S., Pitha-Rowe, I., Moss, E., Dmitrovsky, E., & Ambros, V. (2004). Expression profiling of mammalian microRNAs uncovers a subset of brain-expressed microRNAs with possible roles in murine and human neuronal differentiation. *İçinde Sempere et al* (C. 5, Issue 3).
<https://doi.org/10.1186/gb-2004-5-3-r13>
- Sharma, A., Lyashchenko, A. K., Lu, L., Nasrabady, S. E., Elmaleh, M., Mendelsohn, M., Nemes, A., Tapia, J. C., Mentis, G. Z., & Shneider, N. A. (2016). ALS-associated mutant FUS induces selective motor neuron degeneration through toxic gain of function. *Nature Communications*, 7.
<https://doi.org/10.1038/ncomms10465>
- Sharp, F. R., Lit, L., Xu, H., Apperson, M., Walker, W., Wong, B., Gilbert, D. L., Hershey, A., & Glauser, T. A. (2006). Genomics of brain and blood: Progress and pitfalls. *İçinde Epilepsia* (C. 47, Issue 10, ss. 1603-1607).
<https://doi.org/10.1111/j.1528-1167.2006.00809.x>
- Shaw, C. E., Enayat, Z. E., Chioza, B. A., Al-Chalabi, A., Radunovic, A., Powell, J. F., & Leigh, P. N. (1998). Mutations in all five exons of SOD-1 may cause

- ALS. *Annals of Neurology*, 43(3), 390-394.
<https://doi.org/10.1002/ana.410430319>
- Shibata, M., Kurokawa, D., Nakao, H., Ohmura, T., & Aizawa, S. (2008). MicroRNA-9 modulates Cajal-Retzius cell differentiation by suppressing Foxg1 expression in mouse medial pallium. *Journal of Neuroscience*, 28(41), 10415-10421. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3219-08.2008>
- Shibata, M., Nakao, H., Kiyonari, H., Abe, T., & Aizawa, S. (2011). MicroRNA-9 regulates neurogenesis in mouse telencephalon by targeting multiple transcription factors. *Journal of Neuroscience*, 31(9), 3407-3422.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5085-10.2011>
- Štetkářová, I., & Ehler, E. (2021). Diagnostics of Amyotrophic Lateral Sclerosis: Up to Date. *Diagnostics*, 11(2).
<https://doi.org/10.3390/diagnostics11020231>
- Sturtz, L. A., Diekert, K., Jensen, L. T., Lill, R., & Culotta, V. C. (2001). A Fraction of Yeast Cu,Zn-Superoxide Dismutase and Its Metallochaperone, CCS, Localize to the Intermembrane Space of Mitochondria. *Journal of Biological Chemistry*, 276(41), 38084-38089.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M105296200>
- Swerdlow, R. H., Parks, J. K., Cassarino, D. S., Trimmer, P. A., Miller, S. W., Maguire, D. J., Sheehan, J. P., Maguire, R. S., Pattee, G., Juel, V. C., Phillips, L. H., Tuttle, J. B., Bennett, J. P., Davis, R. E., & Davis Parker, W. (1998). *Mitochondria in Sporadic Amyotrophic Lateral Sclerosis*.
- Tadic, V., Prell, T., Lautenschlaeger, J., & Grosskreutz, J. (2014). The ER mitochondria calcium cycle and ER stress response as therapeutic targets in amyotrophic lateral sclerosis. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 8(MAY).
<https://doi.org/10.3389/fncel.2014.00147>
- Takahashi, I., Hama, Y., Matsushima, M., Hirotani, M., Kano, T., Hohzen, H., Yabe, I., Utsumi, J., & Sasaki, H. (2015). Identification of plasma microRNAs as a biomarker of sporadic Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Molecular Brain*, 8(1), 67. <https://doi.org/10.1186/s13041-015-0161-7>
- Tan, W., Naniche, N., Bogush, A., Pedrini, S., Trotti, D., & Pasinelli, P. (2013). Small peptides against the mutant SOD1/Bcl-2 toxic mitochondrial complex restore mitochondrial function and cell viability in mutant SOD1-mediated ALS. *Journal of Neuroscience*, 33(28), 11588-11598.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5385-12.2013>
- Taylor, J. P., Brown, R. H., & Cleveland, D. W. (2016). Decoding ALS: From genes to mechanism. *Inside Nature* (C. 539, Issue 7628, ss. 197-206). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nature20413>
- Toivonen, J. M., Manzano, R., Oliván, S., Zaragoza, P., García-Redondo, A., & Osta, R. (2014). MicroRNA-206: A Potential Circulating Biomarker Candidate for Amyotrophic Lateral Sclerosis. *PLoS ONE*, 9(2), e89065.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0089065>
- Troost, D., Aten, J., Morsink, F., & de Jong, J. M. B. V. (1995). Apoptosis in amyotrophic lateral sclerosis is not restricted to motor neurons. Bcl-2 expression is increased in unaffected post-central gyrus. *Neuropathology and Applied Neurobiology*, 21(6), 498-504. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2990.1995.tb01096.x>

- Turgut, N., Varol SaraÇoglu, G., Kat, S., Balci, K., Güldiken, B., Birgili, O., & Kabayel, L. (2019). An epidemiologic investigation of amyotrophic lateral sclerosis in Thrace, Turkey, 2006–2010*. *Amyotrophic Lateral Sclerosis and Frontotemporal Degeneration*, 20(1-2), 100-106. <https://doi.org/10.1080/21678421.2018.1525403>
- Turnbull, H. E., Lax, N. Z., Diodato, D., Ansorge, O., & Turnbull, D. M. (2010). The mitochondrial brain: From mitochondrial genome to neurodegeneration. İçinde *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease* (C. 1802, Issue 1, ss. 111-121). <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2009.07.010>
- Turner, M. R., Hardiman, O., Benatar, M., Brooks, B. R., Chio, A., de Carvalho, M., Ince, P. G., Lin, C., Miller, R. G., Mitsumoto, H., Nicholson, G., Ravits, J., Shaw, P. J., Swash, M., Talbot, K., Traynor, B. J., van den Berg, L. H., Veldink, J. H., Vucic, S., & Kiernan, M. C. (2013). Controversies and priorities in amyotrophic lateral sclerosis. İçinde *The Lancet Neurology* (C. 12, Issue 3, ss. 310-322). [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(13\)70036-X](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(13)70036-X)
- Turner, M. R., Kiernan, M. C., Leigh, P. N., & Talbot, K. (2009). Biomarkers in amyotrophic lateral sclerosis. *The Lancet Neurology*, 8(1), 94-109. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(08\)70293-X](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(08)70293-X)
- Uhlén, M., Fagerberg, L., Hallström, B. M., Lindskog, C., Oksvold, P., Mardinoglu, A., Sivertsson, Å., Kampf, C., Sjöstedt, E., Asplund, A., Olsson, I. M., Edlund, K., Lundberg, E., Navani, S., Szigartyo, C. A. K., Odeberg, J., Djureinovic, D., Takanen, J. O., Hober, S., ... Pontén, F. (2015). Tissue-based map of the human proteome. *Science*, 347(6220). <https://doi.org/10.1126/science.1260419>
- Uysal, H., Taghiyeva, P., Türkay, M., Köse, F., & Aktekin, M. (2021). Amyotrophic lateral sclerosis in Antalya, Turkey. A prospective study, 2016–2018. *Amyotrophic Lateral Sclerosis and Frontotemporal Degeneration*, 22(1-2), 101-107. <https://doi.org/10.1080/21678421.2020.1817089>
- van Es, M. A., Hardiman, O., Chio, A., Al-Chalabi, A., Pasterkamp, R. J., Veldink, J. H., & van den Berg, L. H. (2017). Amyotrophic lateral sclerosis. *The Lancet*, 390(10107), 2084-2098. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(17\)31287-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(17)31287-4)
- vande Velde, C., McDonald, K. K., Boukhedimi, Y., McAlonis-Downes, M., Lobsiger, C. S., Hadj, S. B., Zandona, A., Julien, J. P., Shah, S. B., & Cleveland, D. W. (2011). Misfolded SOD1 associated with motor neuron mitochondria alters mitochondrial shape and distribution prior to clinical onset. *PLoS ONE*, 6(7). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0022031>
- Verde, F., Steinacker, P., Weishaupt, J. H., Kassubek, J., Oeckl, P., Halbgebauer, S., Tumani, H., von Arnim, C. A. F., Dorst, J., Feneberg, E., Mayer, B., Müller, H.-P., Gorges, M., Rosenbohm, A., Volk, A. E., Silani, V., Ludolph, A. C., & Otto, M. (2019). Neurofilament light chain in serum for the diagnosis of amyotrophic lateral sclerosis. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*, 90(2), 157-164. <https://doi.org/10.1136/jnnp-2018-318704>
- Vijayvergiya, C., Beal, M. F., Buck, J., & Manfredi, G. (2005). Mutant superoxide dismutase 1 forms aggregates in the brain mitochondrial matrix of amyotrophic lateral sclerosis mice. *Journal of Neuroscience*, 25(10), 2463-2470. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4385-04.2005>

- Vrabec, K., Boštjančič, E., Koritnik, B., Leonardis, L., Dolenc Grošelj, L., Zidar, J., Rogelj, B., Glavač, D., & Ravnik-Glavač, M. (2018). Differential expression of several miRNAs and the host genes AATK and DNM2 in leukocytes of sporadic ALS patients. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 11. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2018.00106>
- Vu, L. T., & Bowser, R. (2017). Fluid-Based Biomarkers for Amyotrophic Lateral Sclerosis. In *Neurotherapeutics* (C. 14, Issue 1, ss. 119-134). Springer New York LLC. <https://doi.org/10.1007/s13311-016-0503-x>
- Wallace, D. C. (2012). Mitochondria and cancer. *Nature Reviews Cancer*, 12(10), 685-698. <https://doi.org/10.1038/nrc3365>
- Waller, R., Goodall, E. F., Milo, M., Cooper-Knock, J., da Costa, M., Hobson, E., Kazoka, M., Wollff, H., Heath, P. R., Shaw, P. J., & Kirby, J. (2017). Serum miRNAs miR-206, 143-3p and 374b-5p as potential biomarkers for amyotrophic lateral sclerosis (ALS). *Neurobiology of Aging*, 55, 123-131. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2017.03.027>
- Waller, R., Wyles, M., Heath, P. R., Kazoka, M., Wollff, H., Shaw, P. J., & Kirby, J. (2018). Small RNA sequencing of sporadic amyotrophic lateral sclerosis cerebrospinal fluid reveals differentially expressed miRNAs related to neural and glial activity. *Frontiers in Neuroscience*, 11(JAN). <https://doi.org/10.3389/fnins.2017.00731>
- Wang, W., Wang, L., Lu, J., Siedlak, S. L., Fujioka, H., Liang, J., Jiang, S., Ma, X., Jiang, Z., da Rocha, E. L., Sheng, M., Choi, H., Lerou, P. H., Li, H., & Wang, X. (2016). The inhibition of TDP-43 mitochondrial localization blocks its neuronal toxicity. *Nature Medicine*, 22(8), 869-878. <https://doi.org/10.1038/nm.4130>
- Wang, Y., Medvid, R., Melton, C., Jaenisch, R., & Blelloch, R. (2007). DGCR8 is essential for microRNA biogenesis and silencing of embryonic stem cell self-renewal. *Nature Genetics*, 39(3), 380-385. <https://doi.org/10.1038/ng1969>
- Wang, Y., Wang, K., Liang, J., Yang, H., Dang, N., Yang, X., & Kong, Y. (2015). Differential expression analysis of miRNA in peripheral blood mononuclear cells of patients with non-segmental vitiligo. *Journal of Dermatology*, 42(2), 193-197. <https://doi.org/10.1111/1346-8138.12725>
- Wen, X., Westergaard, T., Pasinelli, P., & Trotti, D. (2017). Pathogenic determinants and mechanisms of ALS/FTD linked to hexanucleotide repeat expansions in the C9orf72 gene. *Neuroscience Letters*, 636, 16-26. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2016.09.007>
- Williams, K. L., McCann, E. P., Fifita, J. A., Zhang, K., Duncan, E. L., Leo, P. J., Marshall, M., Rowe, D. B., Nicholson, G. A., & Blair, I. P. (2015). Novel TBK1 truncating mutation in a familial amyotrophic lateral sclerosis patient of Chinese origin. *Neurobiology of Aging*, 36(12), 3334.e1-3334.e5. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2015.08.013>
- Wong, Y. C., & Holzbaur, E. L. F. (2014). Optineurin is an autophagy receptor for damaged mitochondria in parkin-mediated mitophagy that is disrupted by an ALS-linked mutation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(42), E4439-E4448. <https://doi.org/10.1073/pnas.1405752111>
- Wu, S., Huang, S., Ding, J., Zhao, Y., Liang, L., Liu, T., Zhan, R., & He, X. (2010). Multiple microRNAs modulate p21Cip1/Waf1 expression by directly

- targeting its 3' untranslated region. *Oncogene*, 29(15), 2302-2308.
<https://doi.org/10.1038/onc.2010.34>
- Xiao, C., Calado, D. P., Galler, G., Thai, T. H., Patterson, H. C., Wang, J., Rajewsky, N., Bender, T. P., & Rajewsky, K. (2007). MiR-150 Controls B Cell Differentiation by Targeting the Transcription Factor c-Myb. *Cell*, 131(1), 146-159. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.07.021>
- Yang, D., Abdallah, A., Li, Z., Lu, Y., Almeida, S., & Gao, F. B. (2015). FTD/ALS-associated poly(GR) protein impairs the Notch pathway and is recruited by poly(GA) into cytoplasmic inclusions. *Acta Neuropathologica*, 130(4), 525-535. <https://doi.org/10.1007/s00401-015-1448-6>
- Yang, X., Ji, Y., Wang, W., Zhang, L., Chen, Z., Yu, M., Shen, Y., Ding, F., Gu, X., & Sun, H. (2021). Amyotrophic lateral sclerosis: Molecular mechanisms, biomarkers, and therapeutic strategies. *Çinde Antioxidants* (C. 10, Issue 7). MDPI. <https://doi.org/10.3390/antiox10071012>
- Zhang, Z., Almeida, S., Lu, Y., Nishimura, A. L., Peng, L., Sun, D., Wu, B., Karydas, A. M., Tartaglia, M. C., Fong, J. C., Miller, B. L., Farese, R. v., Moore, M. J., Shaw, C. E., & Gao, F. B. (2013). Downregulation of MicroRNA-9 in iPSC-Derived Neurons of FTD/ALS Patients with TDP-43 Mutations. *PLoS ONE*, 8(10).
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0076055>
- Zhao, C., Sun, G., Li, S., & Shi, Y. (2009). A feedback regulatory loop involving microRNA-9 and nuclear receptor TLX in neural stem cell fate determination. *Nature Structural & Molecular Biology*, 16(4), 365-371.
<https://doi.org/10.1038/nsmb.1576>
- Zhou, F., Guan, Y., Chen, Y., Zhang, C., Yu, L., Gao, H., Du, H., Liu, B., & Wang, X. (2013). miRNA-9 expression is upregulated in the spinal cord of G93A-SOD1 transgenic mice. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*, 6(9), 1826-1838.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24040447>
- Zhou, F., & Zhang, C. (2018). Screening the expression caharacteristics of several miRNAs in G93A-SOD1 transgenic mouse. *Journal of Neurochemistry*, 145(1). <https://doi.org/10.1111/jnc.14171>
- Zhou, L., Wang, H., Ren, H., Hu, Q., Ying, Z., & Wang, G. (2015). Bcl-2 Decreases the Affinity of SQSTM1/p62 to Poly-Ubiquitin Chains and Suppresses the Aggregation of Misfolded Protein in Neurodegenerative Disease. *Molecular Neurobiology*, 52(3), 1180-1189.
<https://doi.org/10.1007/s12035-014-8908-1>
- Zhou, S., Zhou, Y., Qian, S., Chang, W., Wang, L., & Fan, D. (2018). Amyotrophic lateral sclerosis in Beijing: Epidemiologic features and prognosis from 2010 to 2015. *Brain and Behavior*, 8(11), e01131.
<https://doi.org/10.1002/brb3.1131>
- Zuo, X., Zhou, J., Li, Y., Wu, K., Chen, Z., Luo, Z., Zhang, X., Liang, Y., Esteban, M. A., Zhou, Y., & Fu, X. D. (2021). TDP-43 aggregation induced by oxidative stress causes global mitochondrial imbalance in ALS. *Nature Structural and Molecular Biology*, 28(2), 132-142.
<https://doi.org/10.1038/s41594-020-00537-7>

KİŞİSEL BİLGİLER / İLETİŞİM

İsim Soyisim: Gülçin BAYKAL

Cinsiyet Kadın | **Ülke** Türkiye

LinkedIn: [linkedin.com/in/gulcin-baykal-786a0918b](https://www.linkedin.com/in/gulcin-baykal-786a0918b)

EĞİTİM VE ARAŞTIRMA TECRÜBELERİ

Yüksek Lisans, Moleküler Biyoloji ve Genetik

Ocak 2020 – Haziran 2023

Yıldız Teknik Üniversitesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik, İstanbul, Türkiye

AGNO: 3,64/4,00

Proje Başlığı: “Amyotrofik Lateral Skleroz (ALS) hastalarında mitokondriyal fonksiyon bozukluğu ile ilgili genleri hedef alan miRNA’ların *in siliko* ve *in vitro* yöntemlerle araştırılması”

Misafir Lisansüstü Araştırma Asistanı

Haziran 2022 – Eylül 2022

RNA (epi)genetik Lab, University of East Anglia, Norwich, UK

Proje Başlığı: “*C. elegans*’ta B12 vitamini eksikliğini incelemek için *Comamonas Aquatica* diyet sisteminin test edilmesi”

Süpervizör: Dr. Alper Akay, Biomedical Research Centre, School of Biological Sciences, UEA, UK

Araştırma Projesi

Ağustos 2022 – Şu an

Yıldız Teknik Üniversitesi, İstanbul, Türkiye

Proje başlığı: “Amyotrofik Lateral Skleroz (ALS) hastalarında mitokondriyal fonksiyon bozukluğu ile ilgili genleri hedef alan miRNA’ların *in siliko* ve *in vitro* yöntemlerle araştırılması”

Destekleyen Kuruluş: TÜSEB (Türkiye Sağlık Enstitüleri Başkanlığı)

Proje Numarası: 22733

Süpervizör: Dr. Senay Vural Korkut, Moleküler Biyoloji ve Genetik, Yıldız Teknik Üniversitesi, İstanbul, Türkiye

Lisans, Biyoloji

Eylül 2014 - Haziran 2018

Abant İzzet Baysal Üniversitesi, Biyoloji (%100 İngilizce), Bolu, Türkiye

AGNO: 2,65/4,00

Proje başlığı: “Çiğ süt ve peynirden izole edilen *Pseudomonas spp.* türlerinin bazı fenotipik özellikleri”

Misafir Lisans Düzeyi Araştırma Asistanı:

Eylül 2018 - Aralık 2018

İmmünoloji, İnflamasyon ve Kanser Araştırma Laboratuvarı, Universidad de Murcia, Murcia, İspanya

Proje başlığı: “Zebra balığı model organizmalarında sedef hastalığının farmasötik tedavisi”

Süpervizör: Prof. Francisco Victoriano Mulero Mendez, Department of Cellular Biology and Histology, Universidad de Murcia, Murcia, Spain

Lisans Düzeyi Araştırma Asistanı:

Ekim 2017 - Ocak 2018

Uygulamalı ve Araştırma Gıda Mikrobiyolojisi Laboratuvarı, Abant İzzet Baysal Üniversitesi, Bolu, Türkiye

Proje başlığı: “Çiğ süt ve peynirden izole edilen Pseudomonas spp.'nin bazı fenotipik özellikleri”

Süpervizör: Prof. Seza Arslan, Biyoloji Departmanı, Abant İzzet Baysal Üniversitesi, Bolu, Türkiye

İngilizce Hazırlık Okulu

Eylül 2013 - Haziran 2014

Abant İzzet Baysal Üniversitesi, Yabancı Diller Okulu, Bolu, Türkiye

ÇALIŞMA TECRÜBELERİ

Proje Araştırmacısı

Aralık 2022 – Şu an

Savunma sistemleri, yardımcı güç üniteleri ve Kimyasal-Biyolojik-Radyolojik-Nükleer (KBRN) gibi bileşenleri üreten firmanın araştırma projesinde araştırma görevlisi olarak çalıştım.

MDH-MAKEL Teknoloji, İstanbul, Türkiye

Laboratuvar Yöneticisi

Nisan 2020-Haziran 2021

Mantar yetiştiricileri için mantar miseli üreten bir üretim tesisinde laboratuvar yöneticisi olarak çalıştım.

Mikolab Miselcilik, İstanbul, Türkiye

ARAŞTIRMA / LAB BECERİLERİ

- Rekombinant DNA Teknolojisi,
- *İn siliko* araçları ve veri tabanlarını kullanabilme,
- *C elegans* ve zebra balıkları model organizmaları ile çalışabilme,
- Yumurta seviyesinde mikroenjeksiyon kullanabilme,
- Florasan mikroskop kullanabilme,
- Veri toparlamak, işlemek ve analiz etmek,

- Karışık bilimsel konsept ile iletişim ve sunum yetenekleri.

ONURLAR VE BAŞARILAR

2022: TÜSEB A Grubu Acil AR-GE Proje Çağrısı, Lisans üstü öğrenci bursu

2021: Erasmus+ Staj Burs Programı, Avrupa Birliği Erasmus Ofisi

2018: Erasmus+ Staj Burs Programı, Avrupa Birliği Erasmus Ofisi

YAYINLAR

Ön baskı Yayını

1. Baykal G., Erkal B., Vural Korkut S. (2022) *In silico* identification of miRNAs related to mitochondrial dysfunction in amyotrophic lateral sclerosis, bioRxiv 2022.09.05.506596; <https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2022.09.05.506596v1>

SÖZLÜ SUNUM

Mart 2022

1. 5. Uluslararası Sağlık Bilimleri ve Yaşam Kongresi, Burdur, TURKEY, Başlık: “Nörodejeneratif hastalıklarla ilgili miRNA’ların in silico tanımlaması: Örnek olarak Amyotrofik Lateral Skleroz”

TEZDEN ÜRETİLMİŞ YAYINLAR

Makaleler

Pre-Print (Ön Baskı)

1. Baykal G., Erkal B., Vural Korkut S. (2022) In silico identification of miRNAs related to mitochondrial dysfunction in amyotrophic lateral sclerosis, bioRxiv 2022.09.05.506596;
<https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2022.09.05.506596v1>

Konferans Bildirileri

1. 5. Uluslararası Sağlık Bilimleri ve Yaşam Kongresi, 10-12 Mart, 2022, Burdur/Türkiye

Projeler

1. TÜSEB Projesi, Bursiyer, 22733 Numaralı, A Grubu ACİL AR-GE Çağrısı, 4. Dönem