

**ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Özlem KARA

**AMYOTROPHİK LATERAL SKLEROSİS HASTALARINDA
MİKRO RNA GEN EKSPRESYON PROFİLİNİN
ARAŞTIRILMASI**

BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI

ADANA-2022

**ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**AMYOTROPHİK LATERAL SCLEROSİS HASTALARINDA MİKRO
RNA GEN EKSPRESYON PROFİLİNİN ARAŞTIRILMASI**

Özlem KARA

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI

Bu Tez 28/09/2022 Tarihinde Aşağıdaki Jüri Üyeleri Tarafından
Oybirliği/Oyçokluğu ile Kabul Edilmiştir.

.....
Prof. Dr. Şule MENZİLETOĞLU YILDIZ
DANIŞMAN

.....
Prof. Dr. Salih ÇETİNER
ÜYE

.....
Prof. Dr. Nizami DURAN
ÜYE

Bu Tez Enstitümüz Biyoteknoloji Anabilim Dalında hazırlanmıştır.
Kod No:

Prof. Dr. Sadık DİNÇER
Enstitü Müdürü

Bu Çalışma Ç.Ü.Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi Tarafından Desteklenmiştir.
Proje No: TYL-2021-13365

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaktan yapılan bildirişlerin, çizelge ve fotoğrafların kaynak gösterilmeden kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

ÖZ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

AMYOTROPHİK LATERAL SCLEROSİS HASTALARINDA MİKRO RNA GEN EKSPRESYON PROFİLİNİN ARAŞTIRILMASI

Özlem KARA

ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI

Danışman : Prof. Dr. Şule MENZİLETOĞLU YILDIZ
Yıl:2022, Sayfa: 51
Jüri : Prof. Dr. Şule MENZİLETOĞLU YILDIZ
: Prof. Dr. Salih ÇETİNER
: Prof. Dr. Nizami DURAN

Amyotrofik lateral skleroz hastalığı istemli kasların kontrolünden sorumlu nöronları etkileyen dünyadaki insidansı yıllık 2/100.000 olan nörodejeneratif bir hastalıktır. Son on yılda yapılan çalışmalarda, ALS hastalığının klinik ve genetik olarak heterojen dağılım gösterdiği rapor edilmiştir. MikroRNA (miRNA)'lar kodlanmayan RNA'lar sınıfındaki moleküllerden olup protein sentezinin transkripsiyon sonrası düzenleyicileri olarak tanımlanıp translasyonu susturma fonksiyonu yaparlar. miRNA genlerinin tanımlanması ile miRNA'ların biyobelirteç olarak kullanılması önem kazanmıştır. Reaktif oksijenler proteinlere, lipitlere ve DNA'ya oksidatif olarak hasarlara yol açabilir. Başta süperoksit dismutaz, katalaz ve glutatyon peroksidaz olmak üzere antioksidan mekanizmalar ile bu reaktif oksijen türleri hücrelerden temizlenir. ALS hastalarında SOD düzeyinin ölçüldüğü çalışmalar sonrası SOD gen mutasyonları ve ekspresyon düzeylerinin araştırılması ile ilgili çalışmalar artmıştır. Bu çalışmada Çukurova bölgesindeki ALS hastalarında ilk defa miRNA ekspresyon düzeyi ölçülerek biyobelirteç olarak kullanılabilirliği araştırılmıştır. Bu amaçla Çukurova bölgesindeki toplamda 20 ALS hastasından kan örnekleri alınarak RT-PCR yöntemi ile miRNA125b ekspresyon düzeyi belirlenmiştir. ALS hastalığının tanısında miRNA125b biyobelirtecinin kullanılmasının olası olduğu kanıtlanmıştır.

Anahtar Kelimeler: Amyotrofik lateral skleroz, Süperoksit Dismutaz, Reaktif Oksijen Türleri, miRNA125b

ABSTRACT

MSc THESIS

INVESTIGATION OF THE miRNA GENE EXPRESSION PROFILE IN PATIENTS WITH AMTOTROPHIC LATERAL SCLEROSIS

Özlem KARA

CUKUROVA UNIVERSITY
INSTITUTE OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES
DEPARTMENT OF BIOTECHNOLOGY

Supervisor : Prof. Dr. Şule Sultan MENZİLETOĞLU
Year: 2022, Pages: 51
Jury : Prof. Dr. Şule Sultan MENZİLETOĞLU
: Prof. Dr. Salih ÇETİNER
: Prof. Dr. Nizami DURAN

ALS disease affects the neurons responsible for the control of voluntary muscles. With an incidence of two per 100.000 and a prevalence of four per 100.000 person. The studies done past ten years proved that ALS disease is both clinically and genetically heterogenous. MicroRNAs (miRNAs) are molecules in the class of non-coding RNAs and they are defined as post-transcriptional regulators of protein synthesis and function to silence translation. With the identification of miRNA genes, the use of miRNAs as biomarkers become important. Reactive oxygens can cause oxidative damage to proteins, lipids and DNA. These reactive oxygen species are removed from the cells by antioxidant mechanisms, superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase. After studies related with measuring SOD levels in ALS patients, the study about SOD gene mutations and expression levels have increased. In this study, miRNA expression level was measured for the first time in ALS patients in Çukurova region and its usability as a biomarker was investigated. For this purpose, blood samples were taken from 20 ALS patients in Çukurova region and the expression level of miRNA125b was determined by RT-PCR method. It was proven that miRNA125b biomarker can be used in the diagnosis of ALS.

Key Words: Amyotrophik Lateral Sclerosis, Süperokside Dismutase, miRNA 125 -b

GENİŞLETİLMİŞ ÖZET

Tipik bir alt ve üst motor nöron hastalığı olan Amyotrophik Lateral Sklerosis (ALS) birinci ve ikinci motor nöronlarda bir değil, pek çok nedenle açıklanmaya çalışılan, ilerleyici ve dejeneratif süreç ile ölüme götüren bir hastalıktır. Okülomotor ve sfinkter fonksiyonu dahil olmak üzere bazı beyin fonksiyonları nispeten korunmuştur; ancak bazı hastalarda bu durumdan etkilenebilir. Vakaların %20-50'sinde kognitif işlev bozukluğu görülür ve %5-15'inde genellikle frontotemporal tip demans gelişir. Ölüm solunum yetmezliğine bağlı olup hastalığın başlangıcından 2-3 yıl sonra ortaya çıkar. Ancak hastaların ancak %5-10'u bir dekad veya daha uzun yaşar. Yaşam boyu ALS gelişme riski 1/350-500'dir. Erkeklerde, yaş ve genetik yatkınlık risk faktörleridir.

Son 15 yılda genomik biliminde çığır açan gelişme başlıca görevi translasyonu susturmak olan miRNA genlerinin tanımlanmasıdır. Post-transkripsiyonel gen susturulması, mRNA üzerinde bulunan protein sentezinin engellenmesiyle oluşur. Bu gen susturulma mekanizması RNA interferansı (RNAi) olarak tanımlanmaktadır. Gen susturulması dsRNA olarak adlandırılan çift zincirli RNA molekülü ile sağlanmaktadır. Çift zincirli RNA molekülü Dicer ve Drosha enzimleriyle işlenerek gen susturma ajanları olan siRNA(21-23 nükleotid uzunluğunda) ve miRNA (22 nükleotid uzunluğunda) (small interfering RNA ve microRNA) dönüştürülür. İnsan genomunda bilinen genlerin %1'ini kapsayan miR genleri genomda transkripsiyonu düzenleyen transkripsiyon faktörlerini kodlayan genler kadar yer tutarlar. Bu genlerin ürünleri (miRNA) hedef mRNA larda transkripsiyon sonrası susturma (post-transkriptional silencing) mekanizma ile translasyonun ince ayarına olanak sağlarlar.

Bu transkripsiyonel düzenlemenin neredeyse tüm biyolojik süreçlerde rol oynadığı düşünülmektedir. Son zamanlarda miRNA aracılı bu regülasyonun, ALS hastalarındaki ekspresyonun önemli olduğu düşünülmektedir.

Gerçekleştirilen bir seri genetik ve moleküler patolojik çalışmalarla ALS ile ilgili bilgiler artmış olmasına rağmen hala birçok ALS vakasının nedeni bilinmemektedir. Bir çok sistemin etkilendiği bir hastalık olarak tanımlanan ALS nin bir çok faktör etkisiyle oluştuğuna inanılmaktadır. ALS tanısı, prognostik sınıflaması ve hastalığın değerlendirilmesi için duyarlı biyolojik belirteçlerin bulunmasına ve kullanılmasına ihtiyaç vardır.

ALS hastalığının teşhisinde kullanılan biyobelirteçler oldukça çeşitlidir. Ancak şimdiye kadar yapılan birkaç çalışma miRNA-125b nin kullanılabileceğini göstermiştir.

ALS hastalarının büyük çoğunluğunda ALS'nin etiyolojisi belirsizdir. Bazı fALS hastalarının patojenitesi çok çeşitli gen mutasyonları ile ilişkili olmasına rağmen ilgili genler hala tam olarak aydınlatılamamıştır. ALS'nin birçok patolojik mekanizması araştırılmış olmasına rağmen halen ölümcül bir hastalıktır ve etkili bir tedavisi bulunmamaktadır. Yapılan çalışmalar, ALS'nin çok faktörlü ve çok sistemli bir hastalık olduğunu göstermektedir. 1993 yılında SOD1 mutasyonunun bulunmasından beri, ALS'nin genetik bileşenleri derinlemesine araştırılmıştır. Bu nedenle etkili tedavi bulmak için hastalık patojenini daha iyi anlamak gerekmektedir. ALS hastalığının tanısında ve teşhisinde çeşitli biyobelirteçler kullanılmaktadır.

Bu proje ile Çukurova bölgesinde ALS hastalarında miRNA 125-b ekspresyonu ölçülerek biyobelirteç olarak kullanılabilirliği araştırılmıştır.

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim ve tez çalışmam sürecinde bilgileri ile beni aydınlatan ve her konuda desteğini esirgemeyen değerli danışman hocam Prof. Dr. Şule MENZİLETOĞLU YILDIZ 'a saygı ve minnetimi sunarım. Nörodejeneratif hastalıklar ile yaptığımız bu çalışmada bilgisi ile destek sağlayan ve gerekli kaynakları edinmemize yardımcı olan değerli hocamız Prof. Dr. Ayşe Filiz Koç'a tez çalışmam sürecinde yardımlarıyla sürece katkı sağladığı için teşekkür ederim.

Eğitim hayatım boyunca sevgisi ve ilgisi ile her daim bana destek olan ve her zaman kendimi ileriye taşımam gerektiğini öğreten sevgili annem Bilnaz Kokangül, sevgili babam merhum Gazi Kokangül ve sevgili kardeşim Merve Kokangül'e çok teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

SAYFA

ÖZ	I
ABSTRACT.....	II
GENİŞLETİLMİŞ ÖZET	III
TEŞEKKÜR.....	V
İÇİNDEKİLER	VI
ŞEKİLLER LİSTESİ	VIII
ÇİZELGELER LİSTESİ.....	X
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	XII
1. GİRİŞ	1
1.1. Amiyotrofik Lateral Skleroz Hastalığı	1
1.2. En Yaygın ALS Genleri.....	3
1.3. Santral Dogma	7
1.4. RNA.....	8
1.5. ALS Etiyolojisi	14
1.5.1. Yaş	14
1.5.2. Cinsiyet	15
1.5.3. Sigara Kullanımı	17
1.5.4. Pestisit.....	17
1.6. ALS Mekanizmaları.....	17
1.7. Oksidatif Stres ve Nedenleri.....	20
1.7.1. Oksidatif Stresin Amyotrofik Lateral Skleroz Patojenindeki Rolü....	21
1.8. Vücuttaki Oksidatif Strese Karşı Antioksidan Mekanizmaları.....	22
1.9. Süperoksit Dismutaz (SOD)	24
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR	25
2.1. miRNA125b Biyobelirtecinin Kullanıldığı Hastalıklar	25
2.2. ALS Hastalığı ve miRNA125b	26
3. MATERYAL VE METOD	29

3.1. Hasta ve Kontrol Gruplarının Oluşturulması.....	29
3.2 Gereçler	29
3.2.1. Cihazlar	29
3.3 Kan Örneklerinden RNA İzolasyonu.....	30
3.3.1 Örnek Hazırlama	30
3.3.2. RNA İzolasyonu	31
3.3.3. cDNA Elde Etme Metodu.....	31
3.4. Ters Transkripsiton Protokül (Reverse Transkription).....	33
3.4.1. Ters Transkripsiyon	33
3.4.2. Eő Zamanlı qPCR Amplifikasyonu.....	33
3.5. İstatistiksel Analiz.....	34
4. BULGULAR VE TARTIşMA	35
4.1. Bulgular	35
4.1.1. ALS’de MİR 125-b ve U6 Housekeeping Gen Ekpresyon Sonuçları.....	35
4.1.2. İstatistiksel Sonuç	37
4.2. Tartışma	39
5. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	43
KAYNAKLAR	45
ÖZGEÇMİş	51

ŞEKİLLER LİSTESİ

SAYFA

Şekil 1.1. ALS hastalığının özeti.....	2
Şekil 1.2. DNA da kodlanmış bilgiden protein üretimi.....	8
Şekil 1.3. miRNA oluşum aşamaları	10
Şekil 1.4. Normal ve ALS hastası olan bireylerde miRNA’larda görülen yapısal farklılıklar	11
Şekil 1.5. ALS hastalık teşhisinde kullanılan Biyobelirteçler (a) Espresyonu artan miRNA biyobelirteçleri (b) Espresyonu azalan miRNA biyobelirteçleri (Taguchi et al.,2018).....	14
Şekil 1.6. ALS Hastalık Mekanizmaları.....	20
Şekil 1.7. H ₂ O ₂ ‘ nin hücrelerden uzaklaştırılma mekanizmaları	23
Şekil 2.1. Avrupa ve Asya’daki ALS mutasyon yüzdeleri.....	27
Şekil 2.2. Türkiye’deki şehirlere göre en yaygın ALS mutasyon genleri.....	28
Şekil 3.1. cDNA elde etme metodu.....	32
Şekil 4.1. ΔC_t vs $2^{-\Delta \Delta C_t}$ grafiği	37



ÇİZELGELER LİSTESİ

SAYFA

Çizelge 1.1. ALS hastalığındaki ana genler	5
Çizelge 1.2 ALS hastalığında kullanılan miRNA biyobelirteçler.....	12
Çizelge 1.3. ALS hastalığının ülkelere göre insidans oranları.....	15
Çizelge 1.4. ALS hastalığının cinsiyetlere göre dağılımı	16
Çizelge 2.1. miRNA125b biyobelirtecini kullandığı hastalıklar	25
Çizelge 3.1. RT için kullanılan reaktifler ve miktarları	33
Çizelge 3.2. qPCR reaksiyon düzeneği (her 1 reaksiyon için).....	34
Çizelge 3.3 Eş zamanlı qPCR sıcaklık döngüsü	34
Çizelge 4.1. Gen ekspresyon sonuçları	35
Çizelge 4.2. İstatistiksel analiz sonucu	38



SİMGELER VE KISALTMALAR

ALS	: Amyotrofik Lateralskleroz
CTG	: Sitozin timin guanin
DNA	: Deoksiribonükleik asit
kb	: Kilobaz
qPCR	: Kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RNA	: Ribonükleik Asit
ROT	: Reaktif Oksijen Türleri
SOD	: Süperoksit Dismutaz
MiRNA	: Mikro RNA
DNA	: Deoksiribo Nükleik Asit

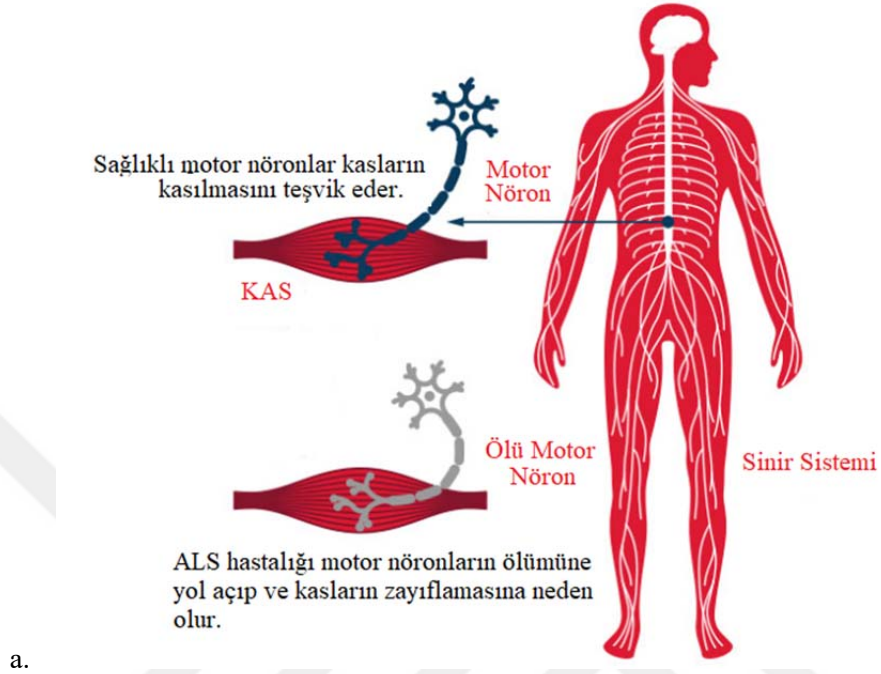


1. GİRİŞ

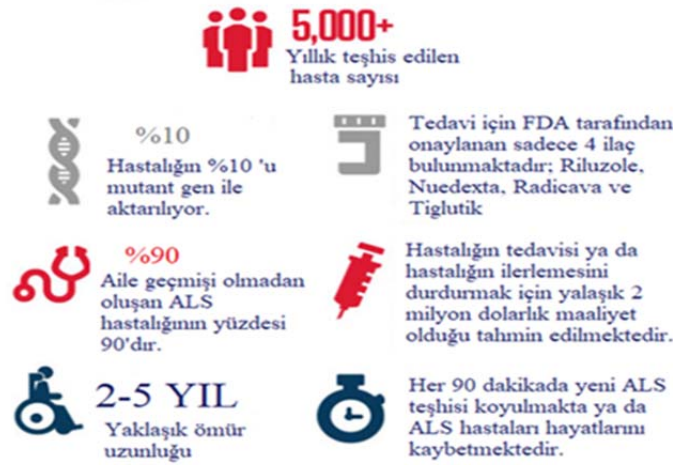
1.1. Amiyotrofik Lateral Skleroz Hastalığı

Amyotrofik Lateral Skleroz (ALS) hastalığı motor nöron hastalıklarından biridir. Motor nöronlar beyinden omuriliğe ve kaslara kadar uzanabilmektedir. Motor nöronlar dejenere olduğunda beyindeki sinyaller kas hücrelerine iletilmez ve buna bağlı olarak kasların durumu kötüleşmektedir.

ALS, beyindeki ve omurilikteki sinir hücrelerini etkileyen ilerleyici bir nöro dejeneratif hastalıktır. A-miyo-trofik kelimesi Yunancadan gelir. "A" hayır anlamına gelmektedir. "Myo" kas anlamına gelir ve "Trofik" beslenme anlamına gelir. Kısaca Amiyotrofik kelimesi, “Kas beslemesi yok” anlamına gelmektedir. Fransız nörologist Jean-Martin Charcot tarafından 1869 yılında keşfedildi. ALS hastalığı istemli kasların kontrolünden sorumlu nöronları etkilemektedir. Örneğin yürüme ya da konuşma kasları ALS hastalarında etkilenebilmektedir. Bununla birlikte hastalık gitgide artarak semptomlar daha ağırlaşır kötüleşmektedir. Genel olarak ALS tanısı koyulduktan üç ya da maksimum beş yıl sonra solunum sisteminde oluşan ve tedavi edilemeyen sorundan dolayı hastalar hayatlarını kaybetmektedir. ALS hastalığı sporadik ya da ailesel olabilmektedir. Sporadik ALS (sALS) hastalığı rasgele oluşup aile bireylerinden genetik olarak geçmemektedir. Bunun tam tersi olan ailesel ALS (fALS) hastalığı ise aileden hasta genin geçmesi sonucunda oluşabilmektedir (www.ALS.org) . ALS hastalığı kısaca Şekil 1.1’de özetlenmiştir.



a.



b.

Şekil 1.1. ALS hastalığının özeti (www.als.org)

ALS hastalığının teşhisi için birçok yöntem kullanılmaktadır. Bunlar elektromiyograf (EMG), sinir iletim çalışması (NCS), manyetik rezonans görüntüleme (MRI) ve biyoakışkan testleridir (idrar ve kan testleri ile kas

biyopsisi). ALS hastalığını tanımlamak ve ilerleme hızının analizi için biyobelirteçler kullanılabilmektedir. Biyobelirteçler kan ya da beyin omurilik sıvısında belirlenebilmektedir (Mayo Clinic, 2022).

ALS hastalığı en yaygın motor nöron hastalıklardan olup prevalansı 5.4/100.000 ve insidansı 2/100.000 olarak bilinmektedir (Chiò ve ark., 2013).

1.2. En Yaygın ALS Genleri

Yirmiden fazla ALS hastalığına neden olan gen bulunmuştur. ALS genleri hücrelerde farklı değişikliklere yol açtığı için hastalığın belirli bir ortak mekanizmasının bulunmasını da zorlaştırmaktadır. En yaygın ve sık karşılaşılan genler şunlardır: C9orf72 (Kromozom 9 açık çerçeve kayması 72), SOD1 (Cu/Zn Superoxide Dismutase 1), FUS (Fused in Sarcoma), TARDBP (TAR DNA Binding Protein) ve VAPB (Vesicle associated membrane protein-associated protein B) (Zou ve Ark., 2017)

C9orf72 geni kromozom 9 un kısa kolunda açık okuma çerçevesi 72 de bulunmaktadır. Beyin ve motor nöronlar protein içeriği açısından oldukça zengindir. C9orf72 geninde oluşan 6 nükleotidli (GGGGCC) tekrar eden mutasyon ALS hastalığı ve frontotemporal demans (FTD) ile ilişkilendirilmektedir (DeJesus-Hernandez ve Ark., 2011; Renton ve Ark., 2011; Majounie ve Ark., 2012). Sağlıklı bireylerde C9orf72 genindeki GGGGCC tekrar eden nükleotid sayısı ALS hastalarına göre oldukça azdır. C9orf72 genindeki mutasyon 50 yaşın üzerindeki bireylerde daha çok görülmektedir ve ALS hastalığının oluşma ihtimalinin %30'dan fazlası C9orf72 geni ile bağlantılıdır.

SOD1 geni kromozom 21q üzerinde lokalizedir ve reaktif oksijen türlerini hidrojen peroksite çevirir. SOD1 geninde mutasyon olması durumunda vücutta reaktif oksijen türleri birikir ve ALS ya da Alzheimer gibi hastalıklara yol açar. ALS hastalığının oluşma ihtimalinin %20'si SOD1 geni ile bağlantılıdır.

FUS geni kromozom 16' nın kısa kolunda lokalizedir. Sarkomda kaynaşmış ya da sarkomda yer değiştirmiş (FUS/TLS) RNA bağlayıcı protein, FUS

geni tarafından kodlanır ve normal fizyolojik koşullar altında çekirdekte bulunur. Yapılan araştırmalarda, FUS/TLS geninde oluşan mutasyonun ailesel ALS hastalığına yol açtığı tespit edilmiştir (Kwiatkowski ve Ark., 2009; Vance ve Ark., 2009). FUS geninde oluşan mutasyonlar ailesel ALS hastalığının oluşma ihtimalinin %5'ini oluşturmaktadır (Shang ve Huang, 2016). TARDBP ile aynı görevleri yapmakta olup DNA onarımında da görev almaktadır (Zou ve Ark., 2017).

TARDBP, kromozom 1'in kısa kolunu kodlayan TDP-43 üzerinde bulunan bir gendir. TDP-43 protein kodlayan gende oluşan mutasyon kronik travmatik ansefalopatiye (CTE) yol açmaktadır (McKee ve Ark., 2010). TDP-43 DNA/RNA bağlayıcı protein olup 414 amino asitten oluşmaktadır. Genellikle TDP-43 çekirdekte bulunmasına rağmen çekirdek ve sitoplazma arasında geçiş yapabilmektedir. ALS hastalığının oluşma ihtimalinin %4-5'i TDP-43 geninin glisin bölgesine oluşan yanlış anlam mutasyonlarından oluşturmaktadır. TDP-43 geninin homeostazisi normal hücrel fonksiyonlar için çok önemlidir (Zou ve Ark., 2017). TARDBP transkripsiyon, uç birleştirme ve mRNA' ların taşınmasında görev almaktadır.

VAPB proteini veziküler taşınımında görev alıp normal olmayan proteinlerin ayıklanması, lipid metabolizmasının korunması ve ER ile organeller arasında lipid transfer kontrolünü sağlamaktadır (Borgese ve ark., 2021). Bugüne kadar bulunan ALS hastalığına neden olan genlerin protein isimleri, işlevleri ve kromozomdaki yerleri Çizelge 1.1 de gösterilmiştir.

Çizelge 1.1. ALS hastalığındaki ana genler (<http://alsod.iop.kcl.ac.uk/>)

Sınıf	Gene	Kromozomdaki konum	Protein: Fonksiyonu
ALS1	SOD1	21q22.11	SOD1: Sitoplazma serbest radikalleri detoksifiye eder
ALS2	ALS2 Alsine	2q33.2	Alsine: Bilinen fonksiyonu yok
ALS3	ALS3		Bilinmiyor
ALS4	SETX	9q33.2	Senataksin
ALS5	SPG11	15q14	Spatacsin: Aksonların plastisitesindeki rolü sitoskeletalın korunması, sinaptik veziküler taşımanın düzenlenmesini sağlar
ALS6	FUS	16p11.2	FUS: Transkripsiyon, uç birleştirme düzenlenmesi, RNA biyojenez ve stres granülleri oluşması
ALS7	ALS7	20p13	Bilinmiyor
ALS8	VAPB	20q13.33	VAPB: Keseli taşıma, normal olmayan proteinlerin ayıklanması (PKU), lipit metabolizmasının korunması ve ER ile organeller arasında lipit transfer kontrolü
ALS9	ANG	14q11.1	Anjiyogenin: Motor nöronların anjiyogenez

Çizelge 1.1 devamı,

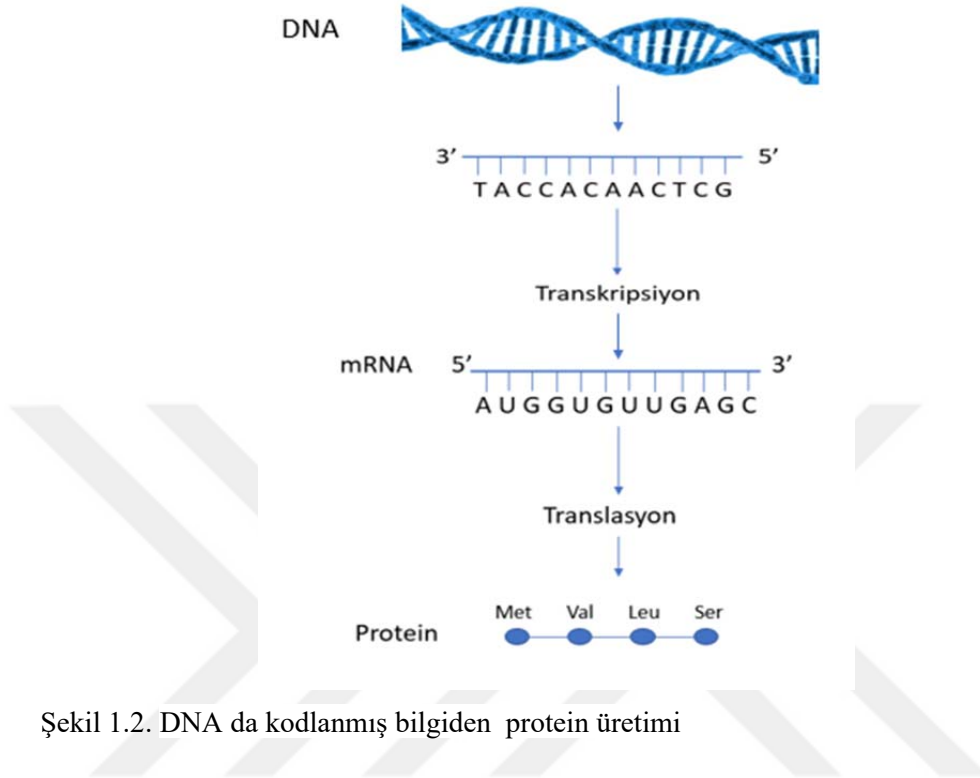
Sınıf	Gene	Kromozomdaki konum	Protein: Fonksiyonu
ALS10	TARDBP	1p36.22	TDP-43: Transkripsiyon, uç birleştirme ve mRNA' ların taşınması
ALS11	FIG4	6q21	Polifosfoinositid fosfataz: Endoplazmik veziküllerin golgiye geriye dönük taşınımını modüle eden PI hücre konsantrasyonunun düzenlenmesi
ALS12	OPTN	10p13	Optineurin: Hücre morfojenezi, transkripsiyonun aktivasyonu
ALS13	ATXN2	12q23-q24.1	Ataxine-2: TDP-43 ile etkileşim
ALS14	VCP	9p13	Valosin proteini (VCP): ATP' nin veziküler taşınması
ALS15	UBQLN2	Xp11.21	Ubiquiline-2: Protein bozunması
ALS16	SIGMAR1	9p13	SIGMAR1: Sinir koruyucu membran reseptör oluşması
ALS18	PFN1	17q13.3	Profilin 1: Monomerik aktin' in ipliksi aktin' e dönüşmesi
ALS19	ERBB4	2q33.3-q34	Reseptör tirozin kinaz erbB-4: Merkezi sinir sistemi gelişimi, transkripsiyon ve hücre çoğalması, farklılaşması, apoptoz
ALS20	HNRNPA1	12q13.1	Heterojen çekirdekssel ribonükleoprotein A1: mRNA' ların çekirdekten sitoplazmaya taşınması

Çizelge 1.1 devamı,

Sınıf	Gene	Kromozomdaki konum	Protein: Fonksiyonu
ALS21	MATR3	5q31.2	Matrin 3: Transkripsiyon, DNA virüslerinden kaynaklı aktifleşen doğal bağışıklık sisteminin düzenlenmesi
ALS+FTD1	C9ORF72	9p21	C9orf72: RNA bağlanması, otofaji düzenlenmesi
ALS	DCTN1	2p13	Dynaactin: Dinein proteini ile aksonal retrograd taşınımı düzenler
ALS	SQSTM1	5q35	Sequestosome 1/p62: Otofaji, sitoplazmik inklüzyonların bozunması
ALS	TAF15	17q11.1-q13.1	TATA bağlanan protein: Transkripsiyonun başlaması

1.3. Santral Dogma

Santral dogma nükleik asitte bulunan bilginin proteine aktarılmasını açıklamaktadır. İlk aşamada transkripsiyon ile DNA'nın şablon zincirinde bulunan bilgiyi RNA zincirine aktarır. Sentezlenen RNA, mesajcı RNA olarak adlandırılır ve kodlanmış bilgiyi çekirdek dışına taşır. Son olarak, mRNA ribozoma bağlanarak bilgi proteine dönüşür ve bu olaya translasyon adı verilir. Kısaca santral dogma transkripsiyon, DNA dan RNA sentezi, ve translasyondan, ribozomda protein sentezi, oluşmaktadır (Klug ve Ark., 2014). Santral dogma aşamaları Şekil 1.2' de gösterilmiştir.



Şekil 1.2. DNA da kodlanmış bilgidен protein üretimi

1.4. RNA

RNA'lar görevlerine göre dörde ayrılmaktadır. Bunlar mesajcı RNA (mRNA), ribozomal RNA (rRNA), transfer RNA (tRNA) ve mikroRNA (miRNA)'dır.

Mesajcı RNA (mRNA): Belirli koşullar altında hücresel gen ekspresyonunun anlık okunması için hizmet eden uzun protein kodlayan haberci RNA transkriptleri olarak tanımlanmaktadır.

Ribozomal RNA (rRNA): Ribozomların önemli bir bileşenidir ve protein sentezi için kritiktir.

Transfer RNA (tRNA): Protein sentezi için kritik bir bileşendir. Bu RNA molekülleri, sentezlenen proteine doğru amino asidin eklenmesini sağlamak için amino asitleri ribozoma ve baz çiftine mRNA ile taşımaktadır.

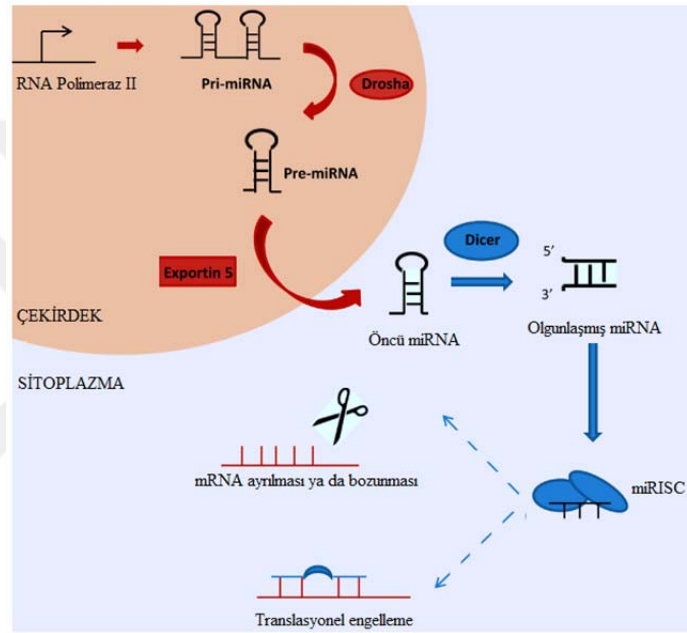
MikroRNA (miRNA): Birçoğu gen ekspresyonunun düzenlenmesi ve susturulmasında yer alan sayısız kodlayıcı olmayan RNA molekülü olarak tanımlanmaktadır.

Post-transkripsiyonel gen susturulması, mRNA üzerinde bulunan protein sentezinin engellenmesiyle oluşur. Bu gen susturulma mekanizması RNA interferansı (RNAi) olarak tanımlanmaktadır. Gen susturulması dsRNA olarak adlandırılan çift zincirli RNA molekülü ile sağlanmaktadır. Çift zincirli RNA molekülü Dicer ve Drosha enzimleriyle işlenerek gen susturma ajanları olan siRNA(21-23 nükleotid uzunluğunda) ve miRNA (22 nükleotid uzunluğunda) (small interfering RNA ve microRNA) dönüştürülür. siRNA'nın oluşumu, sitoplazmaya uzun dsRNA molekülünün ekzojen olarak gönderilmesinden sonra orada Rnaz III enzim ailesinin bir endonükleazı olan Dicer enzimi ile 21-23 nükleotidlik parçalara ayrılmasıyla gerçekleşir. siRNA hastalık tedavisinde yüksek potansiyele sahiptir. siRNA translasyonu etkileyip, transkripsiyonu etkilememektedir. siRNA'nın bu özelliği DNA üzerinde oluşan ve kalıcı hasara yol açan mutasyon oluşumunun engellenmesini sağlamaktadır. Ayrıca, ilaç tedavisi olarak siRNA kullanılabilir (de Fougères ve ark., 2007).

miRNA 1993 yılında iki bağımsız çalışmada eş zamanlı olarak *Caenorhabditis elegans*'ın gen ekspresyonunun postranskripsiyonel düzenleyicisi olarak bulunmuştur (Wightman ve Ark., 1993; Lee ve Ark., 1993). miRNA'lar firkete şeklinde öncülerden üretilmektedir, ve tek sarmallı yaklaşık 21-25 nükleotid uzunluğunda olarak tanımlanmaktadır. Genomda bulundukları yere göre miRNA'lar transkripsiyon birimi kodlayan intronik miRNA, transkripsiyon birimi kodlamayan intronik miRNA, transkripsiyon birimi kodlayan eksonik miRNA ve transkripsiyon birimi kodlamayan eksonik miRNA olarak dört sınıfa ayrılmaktadır.

Son zamanlarda miRNA'ların sentezinin hayvanlarda ve bitkilerde nasıl olduğu araştırılmaktadır. miRNA'lar için genler, birincil miRNA'ya (pri-miRNA) kopyalanır.

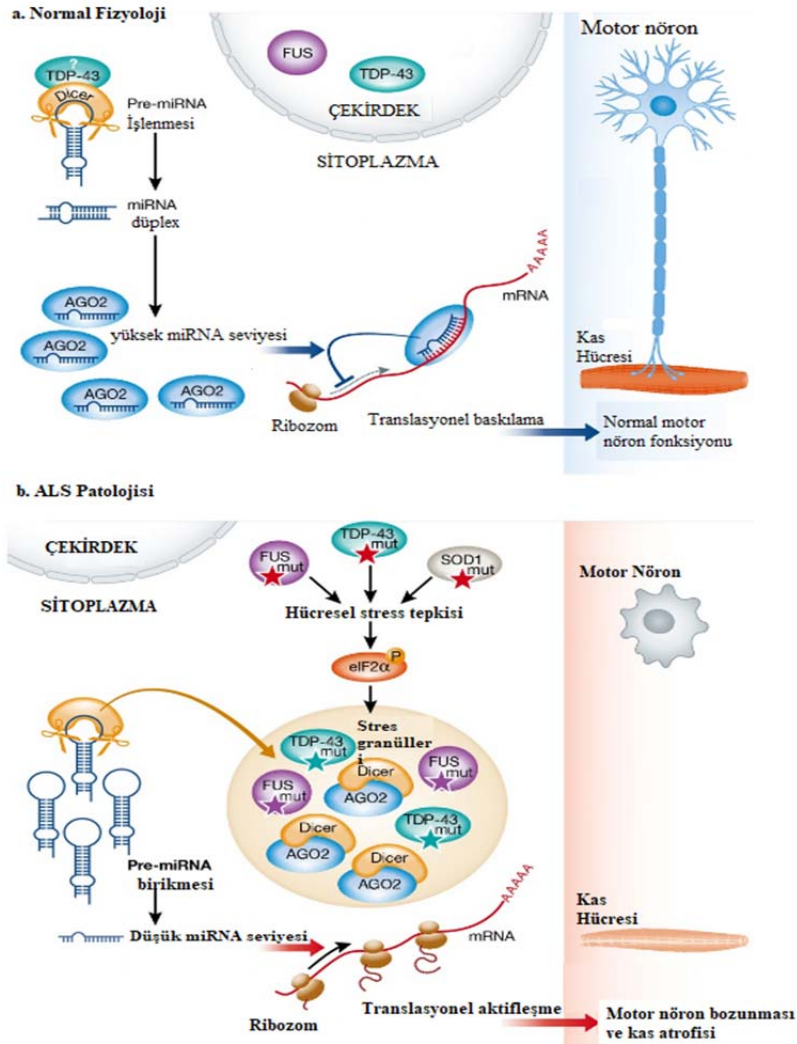
Pri-miRNA, çekirdek içinde RNase III enzimi olan Drosha tarafından öncü miRNA'ya (pre-miRNA) işlenir. Daha sonra, pre-miRNA'lar exportin-5 (EXP-5) aracılığıyla sitoplazmaya taşınır. Sitoplazmada bulunan öncü miRNA'ları olgun miRNA'ya dönüştürmek için RNase III tipi protein olan Dicer tarafından işlenir (Şekil 1.3).



Şekil 1.3. miRNA oluşum aşamaları (Bicker ve Schratt, 2015)

Normal fizyolojik koşullar altında, ön-miRNA'lar (pre-miRNA) varsayılan olarak sitoplazmadaki Dicer kompleksi tarafından işlenir. Oluşan olgun miRNA, spesifik hedef mRNA'lara bağlanır, böylece protein üretimini bloke eder. Dicer'in RBP'lerle (örneğin TDP-43) etkileşimleri miRNA biyogenezini artırabilir. (B) ALS hastalığına sahip olma durumunda, çoklu genlerde (TDP-43, FUS ve SOD1 dahil) oluşan mutasyonların eIF2a'nın fosforilasyonunu ve stres granüllerinin oluşumunu arttırdığı bulunmuştur. Dicer kompleksinin yeniden modellenmesi, miRNA öncesi işlemenin azalmasına ve bununla birlikte miRNA seviyesinde azalmasına yol

açmaktadır. Sonuç olarak, hedef mRNA'ların translasyonu, miRNA'ların inhibisyonu yüzünden anormal bir şekilde oluşur ve motor nöronların dejenerasyonuna neden olur (Şekil 1.4).



Şekil 1.4. Normal ve ALS hastası olan bireylerde miRNA’larda görülen yapısal farklılıklar (Bicker ve Schratt, 2015)

Santral dogmanın çok önemli bir parçası olan RNA, genetik bilgi ve hücrel durumları yansıtır bu yüzden RNA önemli bir biyobelirteçtir. Biyobelirteç olarak mRNA, miRNA ve lncRNA yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu RNA biyobelirteçlerinin düzensizliği nörodejeneratif hastalıkların tanısında çok önemli bir yere sahiptir (Xi et al.,2017; İslam ve Ark., 2017).

miRNAlar biyobelirteç olarak birçok hastalık teşhis ve tanısında kullanılmıştır. ALS için daha önceki yapılan çalışmalarda belirlenen miRNA biyobelirteçler Çizelge 1.2 ve Şekil 1.5'te gösterilmiştir.

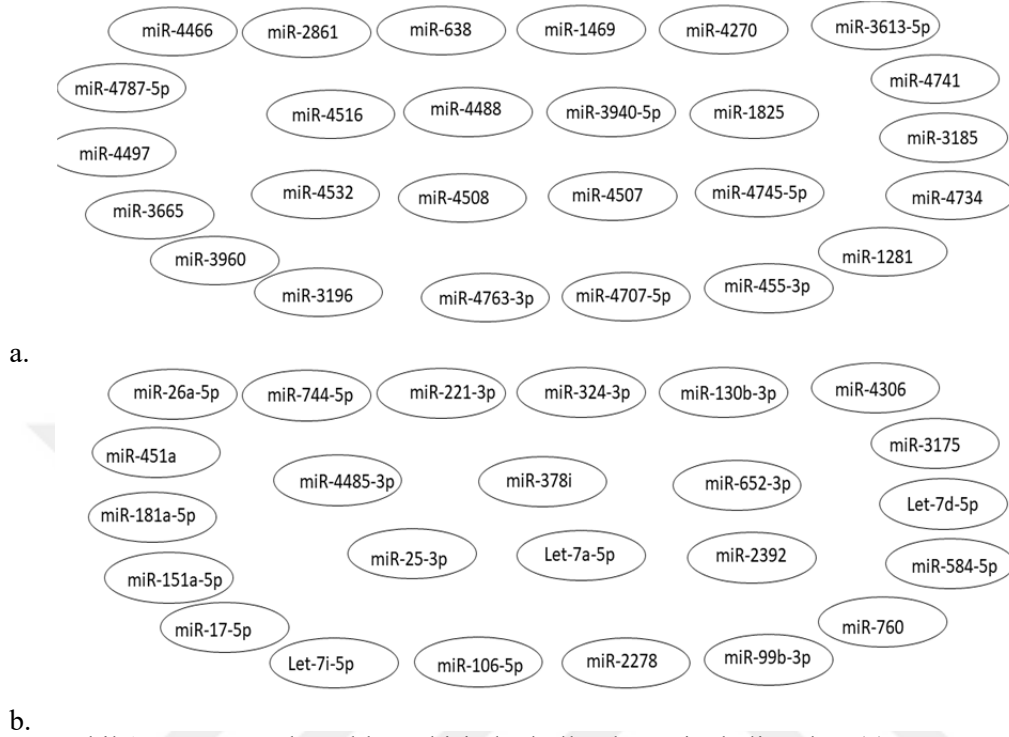
Çizelge 1.2 ALS hastalığında kullanılan miRNA biyobelirteçler (Joilin ve Ark. 2019)

Yazar	s/f	Değişim		RNA extraction	RT-qPCR validasyon	RT-qPCR Düzgüleme
		Artış	Azalış			
*Freischmidt ve Ark., 2013	s		MIR132-5p MIR132-3p MIR143-5p MIR143-3p	miRNeasy Mini	Ncode VILO EXPRESS SYBR GreenER	Spiked in cel-MIR39-3p
*De Felice ve Ark., 2014	s	MIR338-3p		Trizol	miScript RT- qPCR	LET7A
**** Freischmidt ve Ark., 2013	s	MIR143-5p MIR574-5p	MIR132-5p MIR132-3p MIR143-3p	miRNeasy Mini	Ncode VILO EXPRESS SYBR GreenER	Spiked in cel-MIR39-3p
Yazar	s/f	Değişim Artış	Azalış	RNA extraction	RT-qPCR validasyon	RT-qPCR Düzgüleme
* Freischmidt ve Ark., 2014	f		MIR1825 MIR1915-3p MIR3665 MIR4530 MIR4745-5p	QIAzol and miRNeasy Min	miScript RT- qPCR	Spiked in cel-MIR39-3p
* Toivonen ve Ark., 2014	-	MIR106B MIR206		Norgen Total RNA	TaqMan miRNA RT- qPCR	Spiked in cel-MIR39-3p
* Freischmidt ve Ark., 2015	s		MIR1234-3p MIR1825	QIAzol and miRNeasy Mini	miScript RT- qPCR	Spiked in cel-MIR39-3p

Çizelge 1.2. devamı

*Matamala ve Ark., 2018	s	MIR142-3p	MIR1249-3p	Trizol LS and miRNeasy Serum/ Plasma miRVana PARIS	TaqMan miRNA RT- qPCR	Spiked in cel-MIR39-3p
** de Andrade ve Ark., 2016	s	MIR424 MIR206			TaqMan miRNA RTqPCR	MIR16-5p
**** Benigni ve Ark., 2018	s	MIR181A-	MIR15b-5p MIR21-5p MIR195-5p MIR148A-3p	Human miFinder 384HC miRNA PCR array	SYBR Green RTqPCR	Spiked in cel-MIR39-3p MIR608 MIR328- 3p
Yazar	s/f	Değişim Artış	Azalış	RNA extraction	RT-qPCR validasyon	RT-qPCR Düzgüleme
*** Liguori ve Ark., 2018	s		MIR15A-5p MIR15B-5p MIR151A-5p MIR151B MIR16-5p MIR22-3p MIR23A-3p MIR26A-5p MIR26B-5p MIR27B-3p MIR28-3p MIR30B-5p MIR30C-5p MIR93-5p MIR103A-3p MIR106B-3p MIR128-3p MIR130B-3p MIR144-5p MIR148A-3p MIR148B-3p MIR182-5p MIR183-5p MIR186-5p MIR221-3p MIR223-3p MIR342-3p MIR425-5p	PAXgene Blood RNA	TaqMan Advanced miRNA RTqPCR	MIR484

s, sporadik f, familyal; *, serum; **, plazma; ***, beyaz küre; ****, beyin omurilik sıvısı



Şekil 1.5. ALS hastalık teşhisinde kullanılan Biyobelirteçler (a) Espresyonu artan miRNA biyobelirteçleri (b) Espresyonu azalan miRNA biyobelirteçleri (Taguchi et al.,2018)

1.5. ALS Etiyolojisi

ALS hastalığı çeşitli ırk ve etnik kökenden insanları etkilemekte olup kesin etiyolojisi net olarak bilinmemektedir. Ancak yaş, cinsiyet, etnik köken, kimyasallara maruz kalma, sigara kullanımı, vücut kitle indeksi ve metabolik hastalıklar gibi çeşitli risk faktörleri bulunmaktadır.

1.5.1. Yaş

Bu güne kadar yapılan çalışmalarda ALS başlangıç yaşı yaklaşık olarak 51 ile 66 yaş arasında değiştiği tahmin edilmektedir. Ancak tüm dünyadaki hastalık başlangıç yaşı incelendiğinde Avrupa kıtasında hastalık başlama yaşı Asya ve Güney Amerika kıtasına göre daha geç olmaktadır. Buna örnek olarak Çin’de ALS

hastalık başlama yaşı yaklaşık 51 olur iken Almanya’da yaklaşık 61 yaştır.

1.5.2. Cinsiyet

Yapılan çalışmalarda ALS hastalığının erkeklerde görülme sıklığının kadınlara göre yaklaşık 2 kat fazla olduğu belirlenmiştir. Avrupa, Asya ve Amerika’da yapılan çalışmalarda erkeklerdeki insidansın kadınlara göre daha yüksek olduğu Çizelge 1.3’te belirtilmiştir (McCombe ve ark., 2010).

Çizelge 1.3. ALS hastalığının ülkelere göre insidans oranları (McCombe ve ark., 2010)

Çalışmanın Yapıldığı Ülke	Yıllık İnsidans/100.000			Erkek/Kadın Oranı
	Toplam	Erkek	Kadın	
Güneybatı İngiltere	1,06	1,23	0,91	1,35
Uruguay	1,37	1,95	0,84	2,32
İtalya(Piedmont)	2,64	2,97	2,32	1,28

Çalışmanın Yapıldığı Ülke	Yıllık İnsidans/100.000			Erkek/Kadın Oranı
	Toplam	Erkek	Kadın	
İrlanda	1,80	2,10	1,90	1,11
İskoçya	2,10	2,50	1,80	1,39
İtalya (Lombardiya)	2,09	2,43	1,76	1,38
Amerika	2,24	2,52	1,90	1,33

Toplamda 185 ALS hastasından alınan örneklerle (114’ü Kuzey Afrika; 41’i Batı Afrika; 30’u Güney Afrika) yapılan çalışma sonucunda erkek hastaların oranı kadın hastaların oranının 2,9 katı olduğu tespit edilmiştir ve hastalık başlama

yaşı 53 olarak bildirilmiştir. 2000 li yıllarda dünyada yapılan çalışmalar hastalık oranının yaklaşık 1,26 ile 1,9 arasında olduğu bildirilmiştir (McCombe ve ark., 2010). Araştırma sonuçları göz önüne alındığında erkeklerin hastalığa yakalanma oranının kadınlara göre daha fazla olduğu ancak bu farkın zaman geçtikçe yani hastanın yaşı ilerledikçe azalabileceği tahmin edilmektedir (Çizelge 1.4). Ayrıca Tam kesin bir sonuç için daha fazla çalışmaya gereksinim vardır.

Çizelge 1.4. ALS hastalığının cinsiyetlere göre dağılımı (McCombe ve ark., 2010)

Çalışmanın Yapıldığı Ülke	Toplam ALS	Erkek/Kadın Oranı	Hastalık Başlangıç Yaşı	
			Erkek	Kadın
Güneybatı İngiltere	472	1,5	58,9	63
Uruguay	143	1,9	57,5	60,5

Çalışmanın Yapıldığı Ülke	ALS Sayısı	Erkek/Kadın Oranı	Hastalık Başlangıç Yaşı	
			Erkek	Kadın
İtalya(Piedmont)	1260	1,2	64,4	65,3
İrlanda	231	1,2	64,2	67,8
İskoçya	114	1,2	62,5	68
Hindistan	1153	3,0	45,7	47,6
Yeni Zelanda	393	1,2	64,6	64,6
İran	98	2,1	54,5	50,1
Brezilya	251	1,67	-	-
Japonya	3429	1,37	64,6	66,4
Amerika	1200	1,7	-	-
Amerika	1034	1,90	57,6	52,4
Fransa	201	1,05	68,1	67,8
İsveç	3481	1,2	67	69,1

1.5.3. Sigara Kullanımı

Sigara içtiği zehirli kimyasallarda kaynaklı hücrelerde oksidatif stresi arttırdığı için ALS hastalığına yol açmaktadır (Weisskopf ve ark. 2004, Wang ve ark., 2011). Wang ve ark. (2011) tarafından yapılan çalışmada 832 ALS hastası incelenmiş olup çalışmanın sonucu sigara kullanımının ALS riskini arttırdığını göstermiştir. Sigara kullanımının ALS hastalığına neden olma olasılığı tam olarak bilinmediği için daha fazla çalışma yapılması gerekmektedir.

1.5.4. Pestisit

Tüm dünyada genel olarak tarımı korumak amacıyla yoğun miktarda pestisit kullanılmaktadır. Bu pestisitler doğada bozunduklarında daha toksik yan ürünlere dönüşebilmektedir ve oluşan yan ürünlerden bazıları nörotoksik olup Na/K pompasının düzgün çalışmasını engellemektedir. Bu nedenle pestisitler ALS oluşumu riskini arttırabilmektedir. Kamel ve ark. 2012 yılında yaptıkları çalışmada organoklorür, piretroid ve herbisitlerin ALS oluşum riskini arttırabileceğini belirtmiştir (aldrin, dieldrin ve DDT).

1.6. ALS Mekanizmaları

ALS hastalığında motor nöronların aşırı uyarılmasını kontrol etmek için tasarlanmış en sık reçete edilen ilaç riluzoldür, ancak hastalığın tedavisinde etkisi minimumdur (Sreedharan ve Brown, 2013). ALS hastalığında oluşan nöroinflamatuvar reaksiyonları engelleyen iki yeni tedavi seçeneği olarak edaravone, serbest radikalleri hücrelerden uzaklaştırmayı sağlamak için ve protein kinaz inhibitörü olan masitinib'dir (Petrov ve ark., 2017) Bu ilaçların ALS üzerine etkisi hala araştırılmaktadır. ALS hastalığı motor nöronların oksidatif stres, aksonal taşıma kusurları, glutamat eksitotoksitesi, mitokondriyal bozukluk, bozulmuş ubiquitin-proteazom sistemi ve protein agregasyonu ve RNA metabolizmasındaki bozuklukların neden olduğu nöroinflamasyon gibi bir dizi hücresel stres altında oluşmaktadır

Protein agregasyonu birçok nörodejeneratif hastalığın ayırdedici özelliği olduğu bilinmektedir. SOD1 mutasyonunun bulunmasından itibaren, protein yanlış katlanması, ubikutin eklenmiş agregasyonların oluşması ALS patojenezinde ilgi odağı olmuştur. Proteazomun N-terminali ve ubikutin eklenmiş proteinin V-terminaline bağlanan UBQLN2, ALS hastalığında mutasyona uğradığı bildirilmiştir. Mutasyonlar hücrede C-terminalde bulunan proteinlerin prolinen zengin alanında oluşmaktadır.

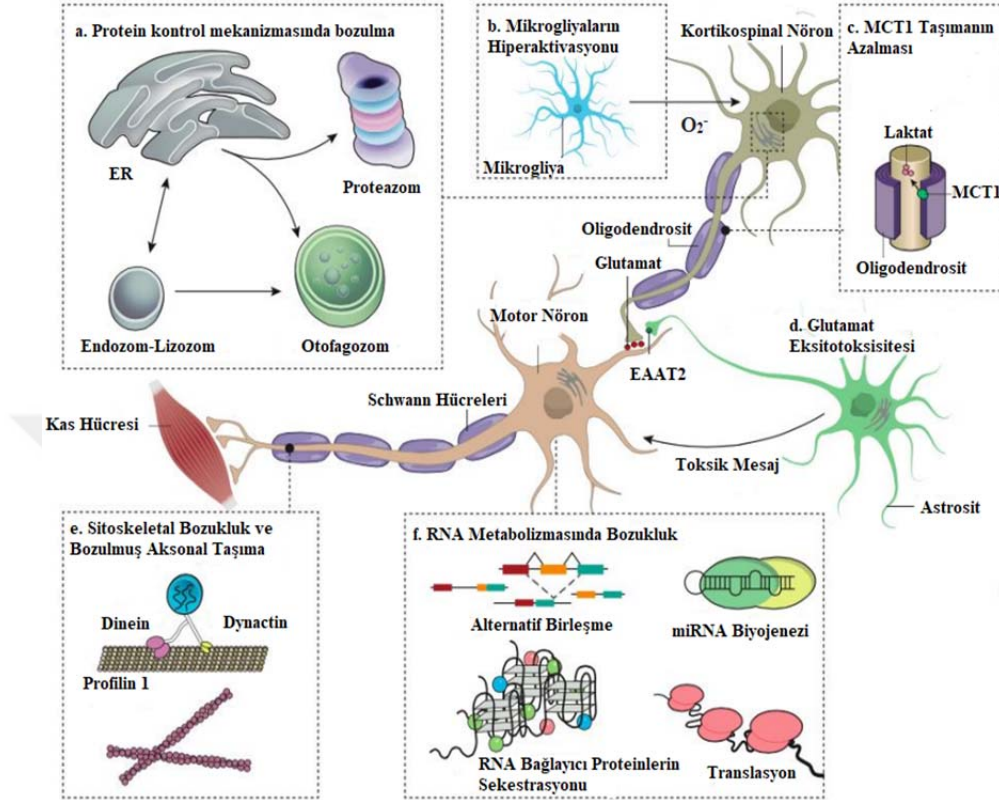
Bu nedenle proteozomdaki taşıyım mutasyon varlığında bozulmaktadır. ER stresinin ALS üzerindeki etkisi ilk olarak yanlış katlanmış SOD1'in ER membran proteininin Derlin-1'in sitoplazmik yüzeyine bağlandığı mutant SOD1 çalışmalarından ortaya çıkmıştır. Sitoplazmik yüzeye bağlanma ER ile ilgili bozunmanın (ER da yanlış katlanmış proteinin bozunması) engellenmesine yol açmaktadır (ERAD). Ayrıca hayvan modelleri üzerine yapılmış çalışmalar ER stresin uzaklaştırılması hastalık ilerleyişini geciktirdiği gözlemlenmiştir (Şekil 1.6a).

Motor nöronların dejenerasyon ve ölümünde glial hücrelerin önemi mutant SOD1 sentezinin mikroglia, astrosit veya oligodendrosit öncü hücrelerinin susturulmasıyla yapılmış çalışmalar sonucunda anlaşılmıştır. Sinir sisteminin doğuştan gelen bağışıklık hücreleri olan mikroglia tüm ALS türlerinde aktif hale gelmektedir. Mikroglia tarafından sentezlenen mutant SOD1 hastalığın hızlı ilerleyişindeki önemli belirleyicidir. Bu bulgular ile faktör NF-kB transkripsiyonunun engellenmesi mikrogliallerin toksik nöroinflamatuvar bileşenlerinin baskılanmasını sağlamaktadır. Süperoksit üreten bir kompleks olan yanlış katlanmış mutant SOD1 ile NADPH aktivasyonunu kontrol eden GTPase, RAC1 ilişkilendirilebilir. SOD1 normal işlevi olarak hücre içi süperoksiti uzaklaştırmak yerine mikroglia hücre dışı süperoksit üretmesine neden olmaktadır (Şekil 1.6b).

Mutant SOD1 patojenezi oligodendrositler, yukarı motor nöronlar ve alt motor nöronların ilk aksonal segmentlerini myelinlendirmek ile görevlidir. Oligodendrositlerin ilk olgunlaşma aşamasında mutant SOD1 sentezindeki azalma hastalığın başlangıcında bir gecikmeye neden olmaktadır. Oligodendrositler ayrıca motor nöron fonksiyonlarını desteklemektedir (Şekil 1.6d).

Aksonal hücre iskeletinin ve özellikle nörofilamentlerin düzensizliği hem ailesel hem de sporadik ALS'nin göze çarpan bir özelliğidir. Motor nöronlar asimetric hücreler olup hücre gövdelerinde sentezlenen bileşenlerin akson ve sinapslara taşınmasında aksonal taşınımına bağlıdır. Mutant SOD1 nörodejenerasyondan aylar önce anterograd ve retrograd taşınımın yavaşlattığı görülmüştür.

Dynactinde oluşan mutasyondan kaynaklı retrograd taşınımında azalma insanlarda motor nöron hastalıklarına neden olmaktadır (Şekil 1.6e).



Şekil 1.6. ALS Hastalık Mekanizmaları (Taylor ve ark., 2016)

1.7. Oksidatif Stres ve Nedenleri

Reaktif oksijen türleri, peroksitler (ROOR), tekli oksijen, peroksinitrit (ONOO^-) ve hidroksil radikal ($\text{OH}^\cdot$) gibi üzerinde olabilir. Çoğunlukla solunum ve redoks enzimleri gibi hücresel süreçler tarafından üretilirler. Reaktif oksijen türleri, aerobik metabolizmanın yan ürünleri olarak ortaya çıkmaktadır. Fizyolojik O_2 seviyelerinde, mitokondride indirgenen moleküler oksijenin %1-3'ünün süperoksit oluşturabileceği tahmin edilmektedir.

Mitokondri yaklaşık olarak %85-90 miktarında oksijen kullanmaktadır ve bu yüzden mitokondri reaktif oksijen türlerinin çoğunu oluşmasına neden olmaktadır. Kalan oksijen (%10-15) hücresel oksidatif enzimler tarafından kullanılmaktadır. Bunlar sitoplazmada bulunan ksantin oksidaz ve reaktif oksijen

üretebilen endoplazmik retikulumda bulunan sitokrom P450 sisteminin oksidaz aktivitesidir.

Reaktif oksijenler proteinlere, lipidlere ve DNA'ya oksidatif olarak hasarlara yol açabilir. Buna bağlı olarak protein yapısı bozulup enzimlerin aktif bölgeleri bozulur. ALS patolojisinin en önemli nedeni oksidatif strestir ve bu presinaptik vericileri etkilemektedir. Oksidatif stres serbest oksijen konsantrasyonunda ya da reaktif oksijen türlerinde oluşan dengesizlik olarak tanımlanır. Serbest radikaller ve reaktif oksijen türleri canlı organizmalarda her yerde üretilmektedir. Mitokondri duvarındaki solunum dizisi vücuttaki oksijenin yaklaşık %85-90'ını tüketmektedir. Ancak bazen elektronlar solunum dizisinden kaçarak aerobik metabolizmada tamalanmayarak indirgenebilmektedir. Bu durum hücrelerde ROS miktarında artışa neden olmaktadır.

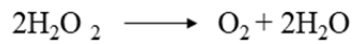
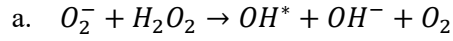
Daha önce ALS hastası olan farelerde yapılan çalışmalarda sinir hücrelerinin ROS'a karşı hassas olduğu görülmüştür. Ayrıca oksidatif stres, kalsiyum miktarının artmasına ve kas sinir kavşağında presinaptik azalmaya neden olmaktadır. Bu, inflamasyona ve hücreSEL büyümeyi teşvik eden faktörlerin kaybına neden olmaktadır. Diğer bir deyişle, bozulmuş aksonal transport, bozulmuş kalsiyum dengesi ve mitokondri disfonksiyonu aksonal dejenerasyona neden olur ve sonunda nöronun ölümüne yol açar.

1.7.1. Oksidatif Stresin Amyotrofik Lateral Skleroz Patojenindeki Rolü

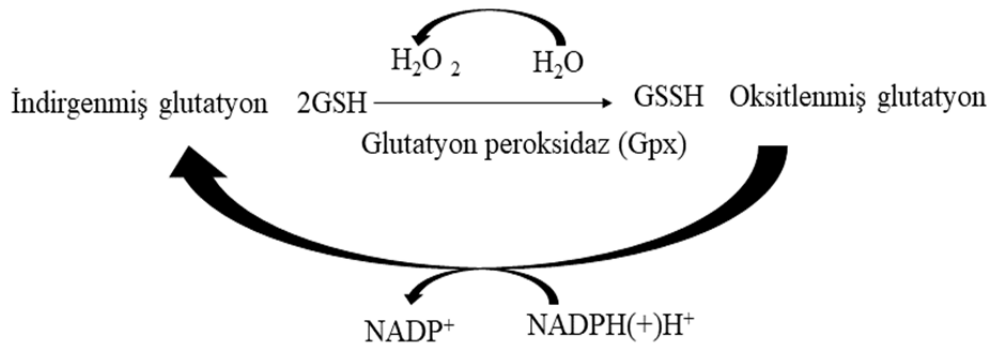
Tüm aerobik hücreler oksidatif strese maruz kalmaktadır fakat nöronlar daha hassas ve duyarlıdır. Bunun nedeni nöronların oldukça büyük hücreler olması ve mitoz sonrası evredeki nöronlarda yenilenmenin yavaş olmasıdır. Ayrıca nöronların boyutlarının büyük olmasından dolayı oksijen ihtiyaçları oldukça fazladır bu da ROS miktarında artışa neden olmaktadır. Katalaz gibi antioksidan enzimler nöronlarda diğer hücrelere kıyasla daha azdır. Tüm bunlar düşünüldüğünde nöronlar diğer hücrelere göre ROS'tan daha fazla etkilenmektedir.

1.8. Vücuttaki Oksidatif Strese Karşı Antioksidan Mekanizmaları

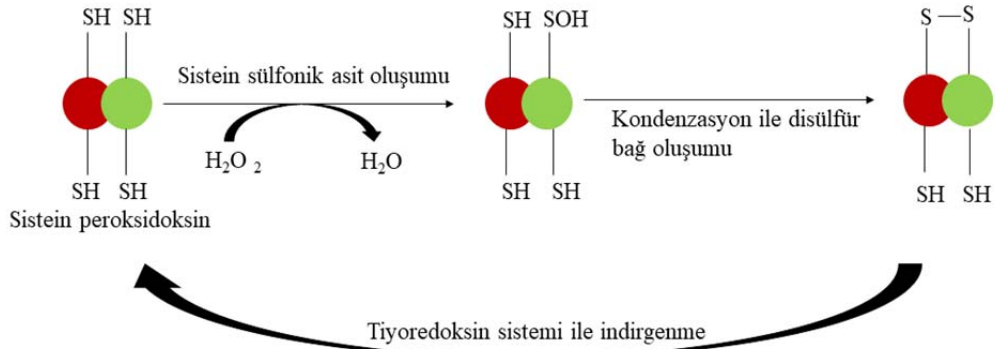
Vücutta hem enzimatik (alfa-dioksijenaz, askorbat peroksidaz, katalaz, dehidroaskorbat redüktazlar, glutatyon peroksidaz, glutatyon redüktaz, glutatyon-S-transferaz, NADPH oksidaz, peroksiredoksin ve süperoksit dismutaz) hem de enzimatik olmayan (glutatyon, melatonin, mikotiyol, fenolikler ve serum albümini) antioksidan mekanizmaları bulunmaktadır (Irato ve Santovito, 2021). ALS hastalığında temel olarak enzimatik antioksidan mekanizması bulunmaktadır. Bunlar, Haber-Weiss, SOD, Katalaz ve Glutatyon peroksidazdır (GPxs) (Hemerková ve ark., 2021). Bu enzimler hücrelerde üretilen hidrojen peroksitin (H_2O_2) uzaklaştırılmasında aktif olarak rol almaktadır. H_2O_2 hem redoks sinyal molekülü hem de oksidatif stres molekülü olarak davranmaktadır. H_2O_2 , hücre şekli değişiklikleri, proliferasyonun başlatılması, bağışıklık hücrelerinin aktifleştirilmesi, endoplazmik retikulum ve mitokondri lümeninde kalsium sinyali gibi önemli hücresel süreçleri kontrol etmede rol oynar. Ayrıca, H_2O_2 ikincil haberci olarak insülin sinyalinde rol alır. H_2O_2 1-10 nM konsantrasyon aralığında olup fizyolojik oksidatif stres altında üretilmektedir. Hidrojen peroksit yoğunluğunun 100 nM üzerine çıkması oksidatif stres olarak bilinmektedir. H_2O_2 'nin hücrelerden katalaz, glutatyon peroksidaz ve sistein peroksidoksin enzimleri ile uzaklaştırılma mekanizması Şekil 1.7'de gösterilmiştir. Hidrojen peroksit serbest radikal olmayıp serbest radikal oluşumuna neden olduğu için reaktif oksijen tür sınıfına girmektedir. Hidrojen peroksit demir ve bakır metalleri ile hidroksil radikalının oluşmasına neden olmaktadır. Bu reaksiyon fenton reaksiyon olarak adlandırılmaktadır ve reaksiyon Şekil 1.7'de gösterilmiştir. ayrıca hidrojen peroksit ortamda süperoksit radikallerinin bulunması ile hidroksil radikalının oluşmasına sebep olmaktadır. Bu reaksiyon Haber-Weiss reaksiyonu olarak adlandırılmaktadır ve Şekil 1.7'de gösterilmiştir.



b.



c.



d.

Şekil 1.7. H_2O_2 ' nin hücrelerden uzaklaştırılma mekanizmaları

1.9. Süperoksit Dismutaz (SOD)

SOD tüm aerobik organizmalarda bulunan en kuvvetli hücresel enzimatik antioksidandır. SOD kofaktör olarak metal atomlarına ihtiyaç duyduğu için metaloenzim olarak sınıflandırılmıştır. Fe^{+2}SOD (SOD1) prokaryotlarda ve bazı bitkilerin kloroplastında bulunan ilk formudur. Mn^{+2}SOD (SOD2) prokaryotlarda ve ökaryotik mitokondride bulunmaktadır. Son olarak $\text{Cu}^{+2}/\text{Zn}^{+2}\text{SOD}$ (SOD3) mitokondri, peroksizom, ökaryot bitkilerin sitozolünde bulunmaktadır ve aktif olması için posttranslasyonel olarak düzenlenmektedir. Zn SOD1 molekülünü dengede tutmaktadır bu yüzden yapısal rolü vardır. Cu oluşan radikalleri uzaklaştırmada görev almaktadır. SOD1, protein ailesinin yüksek oranda korunmuş bir üyesidir ve ayrıca SOD2 ve SOD3 enzimleri de vardır. Bu üç protein birbirinden farklı hareket ederler. SOD1 enzimi sitozolde ve mitokondrinin iç zarında bulunur ve toplam proteinin yaklaşık %1'ini oluşturur. SOD2 mitokondrion matrisinde bulunur. SOD3 ise çoğunlukla hücre dışı matriste bulunur. Bir diğer fark ise SOD1 bir homodimer iken SOD2 ve SOD3 homotetramerik proteinlerdir. SOD1 ve SOD3, Cu^{+2} 'nin dismutasyonu yoluyla $\text{O}_2^{\cdot -}$ 'nin dismutasyonunu katalize ederken, SOD2 dismutasyon için redoks aktif geçiş metali olarak mangan kullanır. SOD1 izoformu proteinin esas olarak ALS patolojisinde yer alır. Hücrelerde radikal gurupları uzaklaştıran SOD'da üç farklı izoenzim vardır. Bunlar SOD'un aktif bölgesinde bulunan metallere bağlı olarak Mn-SOD, Fe-SOD, veya Cu,Zn-SOD (SOD_1 , SOD_2 , SOD_3) gruplarından oluşmaktadır. Bu metalloenzim grubu süperoksit radikallerinin hidrojen peroksit (H_2O_2) ve oksijenin dismutasyonunu kataliz eder. Reaksiyon mekanizması Şekil 1.7'de gösterilmiştir.

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

2.1. miRNA125b Biyobelirtecinin Kullanıldığı Hastalıklar

Olgunlaşmış miRNA-125b, miRNA-125b-1 ve miRNA-125b-2'den oluşmuştur. miRNA-125b-1, uzun ve kodlamayan RNA (lncRNA)–MIR100HG'den (miR-100/let-7a-2/miR-125b-1, kromozom 11) türetilir, ve miR-125b-2, miRNA kümesinden türetilir (miR-99a/let-7c/miR-125b-2, kromozom 21). Son zamanlarda, miR-125b hastalık tespiti için önemli bir düzenleyici olmuştur (Wang ve ark., 2020). Şimdiye kadar miRNA125b biyobelirtecinin kullanıldığı hastalıklar Çizelge 2.1' de gösterilmiştir.

Çizelge 2.1. miRNA125b biyobelirtecinin kullanıldığı hastalıklar (Wang ve ark., 2020)

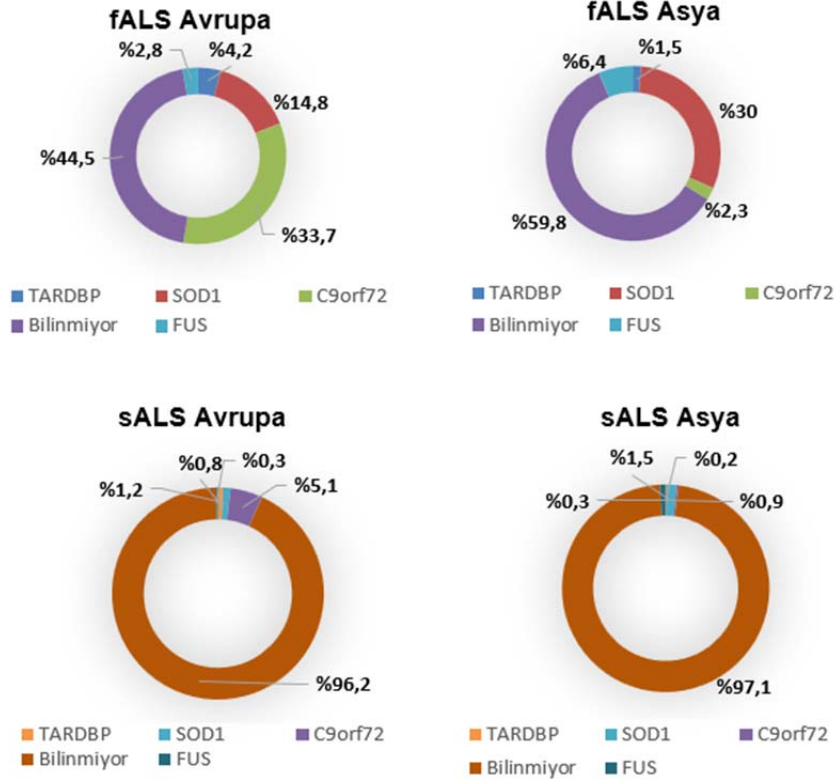
Kanser Tipi	Ekspresyon	İncelenen Örnek	Hedef Gen
Nazofarenks Karsinomu	Artarak düzenleme	Doku	A20
	Azaltarak düzenleme	Hücre Dizisi	Bcl2
Retinoblastoma	Artarak düzenleme	Hücre Dizisi	DRAM2
Küçük Hücreli Olmayan Akciğer Kanseri	Artarak düzenleme	Hücre Dizisi	TP53INP1
	Azaltarak düzenleme	Hücre Dizisi	KLC2
Akut Lenfoblastik Lösemi	Artarak düzenleme	Lösemi Hücresi	A20, Bcl2
Akut Miyeloid Lösem	Artarak düzenleme	Lösemi Hücresi	CBFβ
Mide Kanseri	Artarak düzenleme	Doku	STARD13, NEU1, PPP1CA
Tiroidin Anaplastik Karsinomları	Azaltarak düzenleme	Doku	PIK3CD

Çizelge 2.1 devamı

Kanser Tipi	Ekspresyon	İncelenen Örnek	Hedef Gen
Mesane Kanseri	Azaltarak düzenleme	Doku	Trop-2, SphK1, E2F3, SIRT7, MALAT1, MMP13
Yumurtalık Kanseri	Azaltarak düzenleme	Doku	SET, EIF4EBP1, BCL3
Osteosarkom	Azaltarak düzenleme	Doku	Bcl2, STAT3, HK2
Göğüs Kanseri	Azaltarak düzenleme	Doku	TSTA3, MAP2K7, STARD13, ETS1, ENPEP, CK2- α , CCNJ, MEGF9, EPO, EPOR, MUC1
Kalın Bağırsak Kanseri	Azaltarak düzenleme	Doku	NA
	Artarak düzenleme	Doku	DKK3, ZNRF3, RNF43, APC2
Rahim Ağzı Kanseri	Artarak düzenleme	Hücre Dizisi	HMGA1

2.2. ALS Hastalığı ve miRNA125b

Zou ve Ark. (2017) çalışmasında Avrupa ve Asya kıtasında ALS hastalığına neden olan yaygın mutasyonları incelenmiş ve sonuçlar Şekil 2.1’ de gösterilmiştir. Toplamda 274 çalışma araştırılıp 56,182 hastanın sonuçları incelenip Şekil 1 oluşturulmuştur. Bu hastaların 2634, 1267, 2107 ve 2630’u fALS olup sırasıyla SOD1, TARDBP, FUS ve C9orf72 genindeki mutasyonlara aittir. Kalan hastaların 7811, 10,681, 10,877 ve 18,175’i sALS olup sırasıyla SOD1, TARDBP, FUS ve C9orf72 geninde oluşan mutasyonlara aittir.



Şekil 2.1 Avrupa ve Asya'daki ALS mutasyon yüzdeleri (Zou ve ark., 2017)

Daha önce yapılmış bir çalışmada Türkiye'de en sık karşılaşılan ALS genleri bulunmuştur (Özoğuz ve Ark., 2015). Bu çalışmada toplam 477 ALS hastası incelenmiştir ve bu hastaların 116'sı fALS ve 361'i sALS dir. Yapılan çalışmalar sonucunda ALS hastalığına sebep olan genlerdeki mutasyonların yüzdeleri sırasıyla C9orf72 %18.3, SOD1 %12.2, FUS %5, TARDBP %3.7, ve UBQLN2 %2.4. Bu oranlarda Türkiye'deki fALS hastalığının yaklaşık %40'ını oluşturmaktadır. Ayrıca ekzom sekanslama OPTN, SPG11, DJ1, PLEKHG5, SYNE1, TRPM7, ve SQSTM1 genlerindeki mutasyonları da göstermiştir. Türkiyede ALS hastalığına neden olan en yaygın gen mutasyonları şehirlere göre Şekil 2.2' de gösterilmiştir.



Şekil 2.2. Türkiye'deki şehirlere göre en yaygın ALS mutasyon genleri (Özoğuz ve Ark., 2015)

Japonya hariç tüm dünyada, C9orf72 geninde oluşan mutasyonlar ALS hastalığına yol açan en yaygın faktördür. ALS hastalarında en sık görülen ikinci mutasyon SOD1 geninde oluşmaktadır (Tunca ve Ark., 2020). Özoğuz (2015) çalışmalarında Çukurova Bölgesindeki ALS hastalığının sebebi C9orf72 geninde oluşan mutasyondan kaynaklı olduğunu göstermiştir (Özoğuz ve Ark., 2015).

3. MATERYAL VE METOD

Bu yüksek lisans tez çalışması, Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulu onayı alınması sonrası gerçekleştirilmiştir (06.11.2020 tarih, karar no:57). Çalışmaya ÇÜ Tıp Fakültesi Nöroloji Anabilim Dalı Nöromusküler polikliniğinde AL tanısı konan hastalar dahil edilmiştir.

3.1. Hasta ve Kontrol Gruplarının Oluşturulması

Bu çalışmada ALS tanısı almış bireyler ve sağlıklı bireylerde gen ekspresyon düzeylerinin anlaşılabilmesi için miR-125b biyobelirteci ile gerçekleştirilmiştir. Hasta ve kontrol grupları Çukurova Üniversitesi, Tıp Fakültesi Araştırma ve Uygulama Hastanesi Nöroloji Anabilim Dalı'na başvuran gönüllü 20 hasta ve Kontrol bireylerini kapsamaktadır. Hasta ve kontrol grubunun oluşturulması için çalışmaya alınma kriterleri oluşturuldu ve bunlar:

Hasta grubu için 18-65 yaş aralığında ve ALS tanısı almış olmak, kontrol grubu için 18-65 yaş aralığında ve ALS tanısı almamış olmak olarak belirlendi.

Kan örnekleri Çukurova Üniversitesi Nöroloji anabilim dalı hastalarından elde edilmiştir ve etik kurul onayı alınmıştır (06.11.2020 karar no:57).

Çalışmaya katılmayı onaylayan hastalardan EDTA'lı hemogram tüplerine 2 ml kan örneği alındı. Alınan kan örnekleri birkaç kez alt üst edildikten sonra, RNA izolasyonu için kullanılacak olan Quick-RNA™(R-1057) Miniprep Plus Kit içeriğindeki lizis buffer eklenerek çalışma yapılacak zamana kadar saklanmak üzere -20'de bekletildi.

3.2 Gereçler

3.2.1. Cihazlar

- ♣ Real-Time PCR (ABI 7500, Applied Biosystems, ABD),
- ♣ Santrifüj (Nüve NF-800, Türkiye),
- ♣ Etüv (Nüve EN-500, Türkiye),
- ♣ Vorteks (VELP Scientifica, ABD),

- ♣ Mikropipet Seti (Eppendorf, Almanya),
- ♣ Derin Dondurucu (Arçelik-2031D, Türkiye),

3.3 Kan Örneklerinden RNA İzolasyonu

ALS tanısı almış olan (n=20) ve almamış olan sağlıklı (n=20) kontrol grubundan alınan kan örneklerinden Quick-RNA™ (R-1057) Miniprep Plus Kit kullanılarak mikroRNA izolasyonu yapılmıştır.

3.3.1 Örnek Hazırlama

RNA izolasyonu için Quick-RNA™ (R-1057) Miniprep Plus Kit kullanılmıştır. İzolasyon aşamasında takip edilen adımlar sırasıyla açıklanmıştır.

1. Kan örnekleriyle PBS (Fosfat tampon çözeltisi) bire bir oranında karıştırıldıktan sonra dörde bir oranında RNA lizis tamponu ile PBS karıştırılarak RNAlater™ hazırlandı. RNAlater™ DNA/RNA Shield içinde yeniden askıya alındı (3 mL kan örneği için 300µl DNA/RNA Shield™ kullanıldı). DNA/RNA Shield™ hücrelerin parçalanmasını sağlamakta ve nükleaz'ın inaktivasyonu ile kontaminasyona “yol açabilecek maddeleri uzaklaştırdığı için izolasyonda kullanılmaktadır.
2. Her 300 µL kan örneği için 15 µL proteinaz K ve 30 µL proteinaz parçalama tamponu eklendi. Oluşan karışım yaklaşık olarak 20-30°C arasında 30 dakika inkübe edildi.
3. Örnek vorteks ile iyice karıştırıldıktan sonra en yüksek hızda 3 dakika boyunca santrifüj yapıldı.
4. Santrifüj sırasında üstte kalan sıvının 300 µL 'si içerisinde nükleaz içermeyen tüplere koyuldu. Daha sonra 300 µL RNA lizis tamponu eklenip karıştırıldı ve RNA izolasyon aşamasına geçildi.

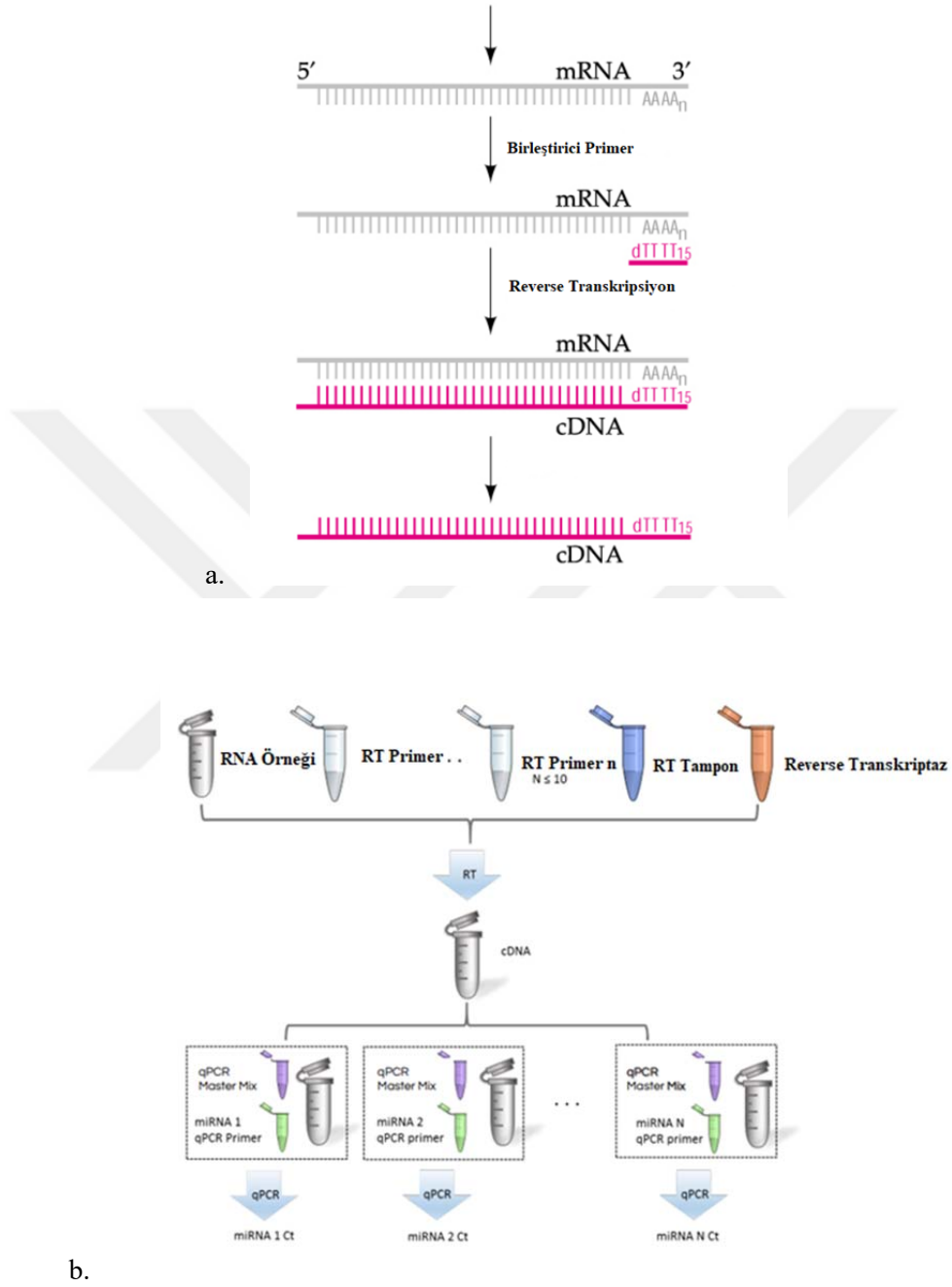
3.3.2. RNA İzolasyonu

Her aşama oda sıcaklığında gerçekleştirilmiştir. Santrifüj 10000-16000g hızında yarım saat uygulanmıştır.

1. RNA lizis tamponunda parçalanmış örnekler a Spin-Away™ Filter den geçirilerek toplama tüplerine aktarıldı. Daha sonra genomik DNA'nın çoğunun uzaklaştırılması için santrifüj uygulandı.
2. Bire bir oranında %95-100'lük etanol sürekli akış olarak eklendi ve karıştırıldı. Daha sonra örnek a Zymo-Spin™ IIICG kolonundan geçirilerek toplama tüpüne alındı ve santrifüj yapıldı.
3. Kolon 400 µL RNA yıkama tamponuyla yıkanıp santrifüj yapıldı. İçerisinde nükleaz bulunmayan tüplere 5 µL DNase I, 75 µl DNA parçalama tamponu eklenip karıştırıldı ve kolon matrisine eklendi. Kolon daha sonra oda sıcaklığında yaklaşık 15 dakika inkübe edildi.
4. 400 µL RNA Prep tamponu kolona eklendi ve santrifüj yapıldı.
5. 700 µL RNA yıkama tamponu kolona eklendi ve santrifüj uygulandı. Daha sonra 400 µL RNA yıkama tamponu eklenip 1 dakika boyunca yıkama tamponunun tamamen uzaklaştırılması için santrifüj uygulandı. Kolon dikkatlice nükleaz içermeyen tüpe aktarıldı. 100 µL DNaze/RNaze içermeyen su kolon matrisine eklenip santrifüj yapıldı.

3.3.3. cDNA Elde Etme Metodu

Çalışmada RNA izolasyonundan sonra cDNA elde etmek için Şekil 3.1'de gösterilen adımlar takip edilmiştir. Çok sayıda ters transkripsiyon uygulandı.



Şekil 3.1. cDNA elde etme metodu

3.4. Ters Transkripsiton Protokol (Reverse Transkription)**3.4.1. Ters Transkripsiyon**

1. Protein sentezi için şablon görevi yapan RNA buz üzerinde çözündürüldü. Her ter transkripsiyon için 1 µg şablon kullanıldı.
2. ID3EAL miRNA RT tamponu (4x) ve ID3EAL RT Primer 1-plexes (20x) çözündürülüp vorteks ile karıştırıldıktan sonra santrifüj uygulandı. (ID3EAL miRNA RT tamponunda çökelme görülür ise 37°C’ de inkübe edilmelidir.)

Ters transkripsiyon için kullanılan reaktif ve miktarları Çizelge 3.1’de gösterilmiştir. Ters transkriptaz -20 °C’de tutlup en son kullanıldı.

Çizelge 3.1. RT için kullanılan reaktifler ve miktarları

Reaktif	Hacim (µL)
RNA şablonu	5
ID3EAL miRNA RT tamponu (4x)	5
ID3EAL RT Primer 1-plexes (20x)	2
ID3EAL Reverse Transcriptase (20x)	1
Nükleazdan arındırılmış su	7 (20 µL’ye tamamlanacak miktarda eklendi.)

Her reaktif iyice karıştırıldıktan sonra ise 42°C’ de 30 dakika inkübe edildi. Daha sonra reaksiyon ısıtma yoluyla biyolojik aktivitesini yok etmek için ise 95°C’ de 5 dakika inkübe edildi.

3.4.2. Eş Zamanlı qPCR Amplifikasyonu

cDNA, ID3EAL miRNA qPCR Master Mix (2x) ve ID3EAL miRNA qPCR assays (10x) ile buzda çözündürüldü, vorteks ile karıştırılıp santrifüj uygulandı. cDNA 10⁻¹ oranında nükleazdan arındırılmış su ile seyreltildi. Her PCR reaksiyonu için seyreltilmiş DNA şablonu Çizelge 3.2’de gösterilmiştir. qPCR reaksiyonundan

sonra 30 saniye boyunca 200g’de santrifüj uygulandı. Daha sonra Çizelge 3.3’te verilen adımlar uygulanarak eş zamanlı qPCR amplifikasyonu yapıldı.

Çizelge 3.2. qPCR reaksiyon düzeneği (her 1 reaksiyon için)

Reaktif	Hacim (µl)
ID3EAL qPCR Master Mix (2x)	10
Nükleazdan arındırılmış su	3
ID3EAL qPCR assays (10x)	2
Seyreltilmiş cDNA	5
Toplam Hacim	20

Çizelge 3.3 Eş zamanlı qPCR sıcaklık döngüsü

Döngü	Sıcaklık (°C)	Süre	Durum
1x	95	10 dakika	Polymeraz
	40	5 dakika	aktivasyonu
40x	95	10 saniye	Denatürasyon
	60	30 saniye	Yeniden birleştirme

3.5. İstatistiksel Analiz

Null hipotez olarak miRNA125b biyobelirtecinin ALS hastalığının teşhisinde önemli bir parametre olup olmadığı araştırıldı. Verilerin istatistiksel analizinde Excel programı kullanıldı ve %95 güven aralığı esas alınıp p değeri hesaplandı.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Nöroloji Anabilim Dalı'na Ocak 2020 ile Mayıs 2020 tarihleri arasında farklı şikayetlerle başvuran ve Nöromusküler Polikliniğinde değerlendirildikten sonra ALS tanısı konan 20 hasta ve kontrol grubu araştırılmıştır. Hasta grubunun 8'i (%40) kadın, 12'si (%60) erkek hastadan oluşmaktadır.

4.1. Bulgular

4.1.1. ALS'de MİR 125-b ve U6 Housekeeping Gen Ekspresyon Sonuçları

$2^{-\Delta\Delta Ct}$ yöntemi olarak da bilinen delta-delta Ct yöntemi, gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu gerçekleştirirken numunelerin gen ekspresyonunu hesaplamak için kullanılan basit bir formüldür. Deney bulguları Formül 1'i kullanarak bulunmuştur ve Çizelge 4.1 de gösterilmiştir.

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct (\text{Örnek}) - \Delta Ct (\text{Referans})$$

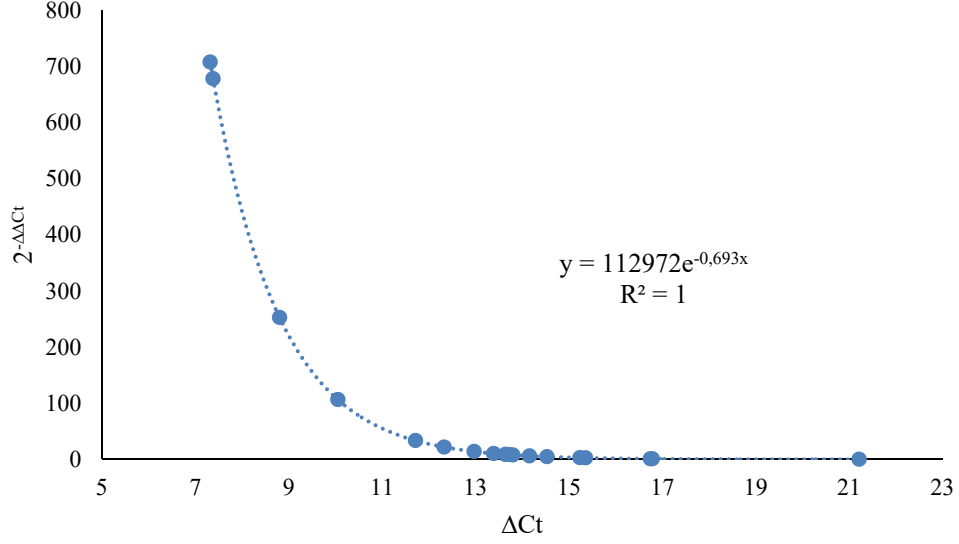
Formül 1

Çizelge 4.1. Gen ekspresyon sonuçları

Örnek	Housekeeping Gen		(miRNA 125 b)		ΔCt	$\Delta\Delta Ct$	$2^{(-\Delta\Delta Ct)}$
	Ct	Ortalama	Ct	Ortalama			
1	12,865	12,865	26,666	26,666	13,801	-2,985	7,915
2	20,439	20,439	27,818	27,818	7,379	-9,406	678,587
3	11,646	11,646	27,002	27,002	15,356	-1,430	2,694
4	15,684	15,684	36,900	36,900	21,216	4,430	0,046
5	12,294	12,294	24,623	24,623	12,329	-4,457	21,956
6	18,312	18,312	28,364	28,364	10,052	-6,734	106,445

Çizelge 4.1 devamı,

7	16,688	16,688	30,333	30,333	13,645	-3,242	8,821
8	15,135	15,135	31,879	31,879	16,744	-0,042	1,029
9	12,458	12,458	26,988	26,988	14,529	-2,256	4,777
10	20,298	20,298	27,616	27,616	7,318	-9,468	707,997
11	14,343	14,343	27,732	27,732	13,389	-3,396	10,530
12	12,598	12,598	25,568	25,568	12,970	-3,816	14,084
13	12,872	12,872	28,107	28,107	15,235	-1,551	2,929
14	12,615	12,615	29,401	29,401	16,786	0	1,000
15	13,959	13,959	27,600	27,600	13,641	-3,144	8,841
16	14,459	14,459	26,173	26,173	11,714	-5,072	33,629
17	13,976	13,975	27,703	27,703	13,727	-3,058	8,331
18	13,346	13,346	27,502	27,502	14,156	-2,629	6,188
19	18,695	18,694	27,498	27,498	8,804	-7,982	252,828
20	19,779	19,779	22,715	22,715	2,936	-13,85	14763



Şekil 4.1. ΔCt vs $2^{-\Delta\Delta Ct}$ grafiği

4.1.2. İstatistiksel Sonuç

$2^{-\Delta\Delta Ct}$ değerlerini temel alarak iki uçlu t testi ve regresyon analizi uygulandı. Beş hastanın sonuçları uç değer olduğu için hesaplamalara eklenmedi. Sonuç olarak p değerinin 0,05 ten daha küçük olduğu tespit edildi ($p=0,0293$). Bu durum tezin hipotez sorusunun doğruluğunu desteklemektedir. Bulunan değerler anlamlıdır (Çizelge 4.2). Ayrıca miRNA125b'nin ALS hastalık teşhisinde biyobelirteç olarak kullanılabileceğini göstermektedir.

Çizelge 4.2. İstatistiksel analiz sonucu

Regresyon İstatistikleri								
Çoklu R	0,561852542							
R Kare	0,315678279							
Ayarlı R Kare	0,263038146							
Standart Hata	7,657824695							
Gözlem	15							
ANOVA								
	df	SS	MS	F	Anlamlılık F			
Regresyon	1	351,6726	351,6726	5,9969	0,0293			
Fark	13	762,3496	58,6423					
Toplam	14	1114,0223						
	Katsayılar	Standart Hata	t Stat	P-değeri	Düşük %95	Yüksek %95	Düşük 95,0%	Yüksek 95,0%
Kesişim	56,1840	19,4293	2,8917	0,0126	14,2096	98,1585	14,2096	98,1585
X Değişkeni	-1,6738	0,6835	-2,4489	0,0293	-3,1504	-0,1972	-3,1504	-0,1972

4.2. Tartışma

Amyotrofik Lateral Skleroz (ALS), dünya çapında en yaygın görülen dejeneratif hastalıkların üçüncüsüdür (Boillee ve ark., 2006). Sporadik tip ALS hastalığının kadınlara göre erkeklerde yaygın, ancak bulbar başlangıçlı olduğunda ise kadınlarda erkeklerden daha fazla görüldüğü bilinmektedir (Andersen ve ark., 1997; Andersen ve Al-Chalabi, 2011).

Hem ailesel hem de sporadik tip ALS hastalığındaki genetik analizler sonucunda en çok C9orf72, SOD1, TARDBP, FUS ve VAPB genlerinde mutasyon belirlenmiştir. ALS'nin en yaygın mutasyonu C9orf72 geninin birinci intronundaki GGGGCC (G4C2) hekzanükleotid tekrar sayısındaki artış olarak bilinmektedir (CooperKnock ve ark., 2014; Bunton-Stasyshyn ve ark., 2015). Renton ve ark. (2011), Finlandiya'daki ALS hastalarını incelemiş ve , 402 ALS hastasının 113'ünde (52 fALS hastalarının % 46.4'ü, 61 sALS hastalarının % 21'i) ve 478 sağlıklı bireylerin 2'sinde (% 0.4'ünde) tekrar eden hekzanükleotid sayısında artış gözlemlemiştir (Renton ve ark., 2011). Özoğuz ve ark. (2015), Türkiye'deki ALS olgusunu araştırmıştır. Yapılan çalışmada 361 sALS hastalarının 11'inde (% 3.1'inde) tekrar eden hekzanükleotid sayısında artış tespit edilmiştir (Ozoguz ve ark., 2015). ALS hastalığı ile yakından ilgili gen olan SOD1de oluşan 166 mutasyonun, 147'sini missense mutasyonları, 19'unu nonsense ve delesyon mutasyonları, ve ayrıca 8 sessiz mutasyon ve 9 intronik varyant tanımlanmıştır (Andersen ve ark., 2003). SOD1 geninde oluşan mutasyonların yaklaşık % 20'sinin f tip ALS ve % 1'nin s tip ALS hastalığı ile ilgili olduğu tespit edilmiştir (DW., 2009).

ALS hastalarının büyük çoğunluğunda ALS'nin etiyolojisi belirsizdir. Bazı fALS hastalarının patojenitesi çok çeşitli gen mutasyonları ile ilişkili olmasına rağmen ilgili genler hala tam olarak aydınlatılamamıştır. ALS'nin birçok patolojik mekanizması araştırılmış olmasına rağmen halen ölümcül bir hastalıktır ve etkili bir tedavisi bulunmamaktadır. Yapılan çalışmalar, ALS'nin çok faktörlü ve çok sistemli bir hastalık olduğunu göstermektedir. 1993 yılında SOD1 mutasyonunun

bulunmasından beri, ALS'nin genetik bileşenleri derinlemesine araştırılmıştır. Bu nedenle etkili tedavi bulmak için hastalık patojenini daha iyi anlamak gerekmektedir. ALS hastalığının tanısında ve teşhisinde çeşitli biyobelirteçler kullanılmaktadır.

Sıvı bazlı ALS biyobelirteçleri beyin omurilik sıvısı, kan, idrar ve tükürük çalışmalarından önerilmiştir ve bu biyobelirteçler nesnel, nicel ve potansiyel olarak çok boyutludur [6, 10]. Beyin omurilik sıvısı biyobelirteçleri umut vadetmektedir ancak BOS'un biyobelirteç olarak kullanılması zaman alıcı olmaktadır ve baş ağrısı gibi bazı olumsuz etkilere neden olmaktadır. Bu yüzden BOS biyobelirteç olarak tercih edilmemektedir. ALS tanısı için klinik kullanıma sahip kan bazlı biyobelirteçler, fosforile edilmiş nörofilament ağır zincir (pNFH), nörofilament hafif zincir (NFL), mikroRNA'lar (örn., miRNA-1234-3p), inflamatuvar belirteçler (örn., IL-6, IL-8, IL-5 ve IL-2), TDP- 43 ve metabolitler (örn., glutamat ve lizin), hastalık tanısının koyulmasını kolaylaştırmaktadır (Vu ve ark., 2017). Ayrıca kan bazlı biyobelirteçler, hasta bireylerin sağlıklı bireylerden kolaylıkla ayırt edilmesini sağlamaktadır (Lu ve ark., 2017). Bu çalışmada hastalardan alınan kan örnekleri incelendiği için miRNA biyobelirteci kullanılmıştır.

Son yıllardaki yoğun araştırma faaliyetlerine rağmen, miRNA'ların ALS tanısı için biyobelirteç olarak kullanımı hala gelişmekte olan bir alandır. Günümüze kadar hastalık ilerleyişine ilişkin önemli bilgiler elde edilmiştir. Bununla birlikte, farklı çalışmalarda elde edilen sonuçlar çoğu zaman birbiriyle çelişkilidir ve çalışmalar yetersiz olduğundan tekrarlanması gerekmektedir. İnsan genomunun endojen genleri olarak miRNA'lar, gelişme ve hücrenin hayatta kalması, çoğalması ve farklılaşmasında hayati rollere sahiptir. miRNA'ların düzenleyici mekanizması hücre bakımında ve homeostazda çok önemlidir. Genomik değişimler ya da mutasyonlar, amplifikasyonlar, transkripsiyonel değişimler ve enzimatik değişimlerin neden olduğu miRNA biyogenez değişikliklerinin neden olduğu anormal miRNA ekspresyonu ve fonksiyonu, hastalık oluşumuna ve gelişimine neden temel faktörler olduğu düşünülmektedir

Giderek daha güçlü bir araç olarak gen tedavisi, çeşitli nörodejeneratif hastalıklarda patogeneze için tedavi sağlayabilir. Yaşlanan nüfusta gerekli tedavi yöntemlerini geliştirmek gerekmektedir ve gen tedavisi tedavi eksikliğini doldurabilmektedir. Buna dayanarak, Foust ve ark. AAV'ye dayalı ALS gen tedavisi alanında ufuk açıcı ve önemli araştırmalar yapmıştır. Çalışmalar sonucunda gen tedavisinin hastalık ilerleyişini yavaşlattığı gözlemlenmiştir. Ayrıca, nöronal ölümün altında yatan temel mekanizmaları daha iyi aydınlatmak için devam gen terapisi çalışmaları da vardır.

Kim ve ark. (2020), ilk olarak miR-18b-5p ekspresyon seviyesinin ALS hastalarında azaldığını gözlemlemiştir. Yapılan çalışmanın bulguları şu şekilde özetlenebilmektedir. miR-18b-5p'nin azalması Hif1 α 'nın ekspresyonunu post-transkripsiyonel olarak düzenlemektedir, Hif1 α , Mef2c ekspresyonunu transkripsiyon faktörü olarak arttırmaktadır. Çalışmada Mef2c'nin, miR-206 ekspresyonunu büyük derecede arttırdığı bulunmuştur. miR-206, hem mctpl'i hem de Rarb'yi azaltmaktadır. Azalan mctpl, Ca²⁺ sinyalini engellediği, ve azalan Rarb, nöronal hücre farklılaşmasını engellediği gözlemlenmiştir. Ayrıca, azalan miR-18b-5p'nin ekspresyonu, ALS SOD1 mutasyonuna neden olarak apoptotic hücre ölümünü arttırdığı gözlemlenmiştir. Kim ve ark., yaptıkları çalışmada miR-18b-5p'nin dovnregülasyonunu ALS hastalığıyla ilişkilendirmiştir (Kim ve ark., 2020).

Nolan ve ark. (2014), ALS hastalığının ilerlemesinde miR-29a'nın işlevini araştırmıştır. Çalışmada, ALS hastalığının ilerleyişi sırasında miR-29a ekspresyonunun farelerin omuriliklerinde bulunan SOD1G93A geninde upregüle olduğu saptanmıştır. Bu yüzden, miR-29a'nın SOD1G93A farelerinde hastalık teşhisi ve hastalık ilerlemesinin bir belirteci olarak kullanılabileceği vurgulanmıştır (Nolan ve ark., 2014).

Türkiye, zengin tarihi geçmişi ve eşsiz coğrafyası ile Avrupa ile Asya arasında Avrupa'nın güneydoğu sınırında doğal bir köprü oluşturmaktadır. Akdeniz'deki geniş kıyı alanları,

Yakın Doğu'yu çevreleyen deniz ve geniş kırsal kesimleri ve Karadeniz,

Türkiyenin etnik çeşitlilik ile zengin bir genetik havuza sahip olmasını sağlamaktadır. Diğer Avrupa ülkelerinin aksine(7-10/1000), Türkiye'deki doğum oranı yüksektir (17/1000). Ayrıca akraba evlilikleri Türkiye'nin doğu bölgelerinde %60'ı aşan orandadır bu yüzden otozomal resesif geçişli hastalıklar Türkiye'de beklenen oranın üzerindedir. ALS hastalığının Türkiye'deki prevalans değeri 100 binde 6000 ile 7000 arasındadır. Türkiye'de ALS epidemiyolojisi, allelik ve lokus heterojenliği fALS vakalarının %60' tan fazlasının geleneksel yöntemlerle çözülmemiş olması, büyük ailelerde aileler arasında ve aile içi fenotipik heterojenliklerin varlığı, mutasyonların değişken penetrasyon oranının olması, yeni mutasyonların varlığı ve daha genç yaş başlangıçlı insidansın olması ALS araştırmasını ve teşhisini Türkiye'de zorlaştırmaktadır.

Bu çalışmada miR-125b'nin ALS hastalığı teşhisindeki rolü araştırılmıştır. Çalışmaya sadece Çukurova Bölgesinden hastalar dahil edilmiştir, alınan örneklerdeki cinsiyet dağılımı ALS hastalığının erkeklerde daha fazla olduğunu göstermiştir.

ALS hastası farelerinden alınan mikrogliyalarda miR-125b ekspresyonunun arttığı ve P2X7r üzerinde etkili olan BzATP gibi inflamatuvar uyarılara yanıt olarak indüklendiği daha önceki çalışmada gösterilmiştir (Gurney ve Ark., 1994). Bu çalışmaya ek olarak Di Carlo ve Ark. (2013) ve Morlando ve Ark. (2012) yaptığı çalışmaya göre TDP43 ve FUS genlerinde miR- 125b ekspresyonunun arttığı gözlemlenmiştir. Yapılan çalışmalar sonucunda miRNA-125b' nin ALS hastalığıyla ilişkilendirilebileceği sonucuna ulaşılmıştır (Parisi ve Ark., 2016; Gurney ve Ark., 1994) .

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

ALS hastalığının teşhisinde kullanılan biyobelirteçler oldukça çeşitlidir. Ancak şimdiye kadar yapılan birkaç çalışma miRNA-125b nin kullanılabileceğini göstermiştir.

Bu çalışmada %95 güven aralığı baz alınarak hesaplanan $2^{-\Delta\Delta Ct}$ nin p değeri miRNA-125b biyobelirtecinin (5'UCCCUGAGACCCUAAUUGUGA) ALS hastalık teşhisinde kullanılabileceği gösterilmiştir. Bu yüzden miRNA125b ekspresyonu üzerine daha fazla çalışma yapmak gerekmektedir.

Yapılan çalışmanın sonucunda kadınların hastalık yaş ortalamasının 59 olduğu ve erkek hastaların yaş ortalamasının 64 olduğu tespit edilmiştir. Yapılan çalışmaların aksine Türkiye’de kadınlarda hastalık başlama yaşının daha erken olduğu bulunmuştur. Bu durum Amerika ve Fransa ‘da aynı olup kadınlarda hastalık başlama yaşının erkeklere göre daha genç yaşta olduğu belirlenmiştir.



KAYNAKLAR

- Benigni M, Ricci C, Jones AR, Giannini F, Al-Chalabi A, Battistini S. Identification of miRNAs as potential biomarkers in cerebrospinal fluid from amyotrophic lateral sclerosis patients. *Neuromolecular Med.* (2016) 18:551–60
- Bicker, S., Schratt, G. (2015). MicroRNAs in ALS: small pieces to the puzzle
- Borgese, N., Iacomino, N., Colombo, S. F., & Navone, F. (2021). The Link between VAPB Loss of Function and Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Cells*, 10(8), 1865.
- Chiò A., Logroscino G., Traynor B. J., Collins J., Simeone J. C., Goldstein L. A., et al. (2013). Global epidemiology of amyotrophic lateral sclerosis: a systematic review of the published literature. *Neuroepidemiology* 41 118–130.
- De Andrade HM, de Albuquerque M, Avansini SH, de SRC, Dogini DB, Nucci A, et al. MicroRNAs-424 and 206 are potential prognostic markers in spinal onset amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol Sci.* (2016) 368:19–24.
- De Felice, B., Annunziata, A., Fiorentino, G., Borra, M., Biffali, E., Coppola, C., et al. miR-338-3p is over-expressed in blood, CFS, serum and spinal cord from sporadic amyotrophic lateral sclerosis patients. *Neurogenetics.* (2014) 15:243–53.
- De Fougères, A., Vornlocher, H. P., Maraganore, J., Lieberman, J. (2007). Interfering with disease: a progress report on siRNA-based therapeutics.
- DeJesus-Hernandez, M., Mackenzie, I. R., Boeve, B. F., Boxer, A. L., Baker, M., Rutherford, N. J., Nicholson, A. M., Finch, N. A., Flynn, H., Adamson, J., Kouri, N., Wojtas, A., Sengdy, P., Hsiung, G. Y., Karydas, A., Seeley, W. W., Josephs, K. A., Coppola, G., Geschwind, D. H., Wszolek, Z. K., Rademakers, R. (2011). Expanded GGGGCC hexanucleotide repeat in noncoding region of C9ORF72 causes chromosome 9p-linked FTD and ALS. *Neuron*, 72(2), 245–256.

- Freischmidt A, Muller K, Ludolph AC, Weishaupt JH. Systemic dysregulation of TDP-43 binding microRNAs in amyotrophic lateral sclerosis. *Acta Neuropathol Commun.* (2013) 1:42.
- Freischmidt A, Muller K, Zondler L, Weydt P, Mayer B, von Arnim CA, et al. Serum microRNAs in sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Neurobiol Aging.* (2015) 36:2660.e2615–e2620.
- Freischmidt A, Muller K, Zondler L, Weydt P, Volk AE, Bozic AL, et al. Serum microRNAs in patients with genetic amyotrophic lateral sclerosis and pre-manifest mutation carriers. *Brain.* (2014) 137(Pt 11):2938–50.
- Hemerková, P., & Vališ, M. (2021). Role of Oxidative Stress in the Pathogenesis of Amyotrophic Lateral Sclerosis: Antioxidant Metalloenzymes and Therapeutic Strategies. *Biomolecules*, 11(3), 437.
- Irato, P., & Santovito, G. (2021). Enzymatic and Non-Enzymatic Molecules with Antioxidant Function. *Antioxidants (Basel, Switzerland)*, 10(4), 579. <https://doi.org/10.3390/antiox10040579>
- Kamel, F., Umbach, D. M., Bedlack, R. S., Richards, M., Watson, M., Alavanja, M. C., Blair, A., Hoppin, J. A., Schmidt, S., & Sandler, D. P. (2012). Pesticide exposure and amyotrophic lateral sclerosis. *Neurotoxicology*, 33(3), 457–462.
- Kim, K.Y.; Kim, Y.R.; Choi, K.W.; Lee, M.; Lee, S.; Im, W.; Shin, J.Y.; Kim, J.Y.; Hong, Y.H.; Kim, M.; et al. Downregulated miR-18b-5p triggers apoptosis by inhibition of calcium signaling and neuronal cell differentiation in transgenic SOD1 (G93A) mice and SOD1 (G17S and G86S) ALS patients. *Transl. Neurodegener.* 2020, 9, 23.

- Kwiatkowski, T. J., Jr, Bosco, D. A., Leclerc, A. L., Tamrazian, E., Vanderburg, C. R., Russ, C., Davis, A., Gilchrist, J., Kasarskis, E. J., Munsat, T., Valdmanis, P., Rouleau, G. A., Hosler, B. A., Cortelli, P., de Jong, P. J., Yoshinaga, Y., Haines, J. L., Pericak-Vance, M. A., Yan, J., Ticozzi, N., ... Brown, R. H., Jr (2009). Mutations in the FUS/TLS gene on chromosome 16 cause familial amyotrophic lateral sclerosis. *Science* (New York, N.Y.), 323(5918), 1205–1208.
- Lee, R. C., Feinbaum, R. L., & Ambros, V. (1993). The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*, 75(5), 843–854
- Liguori M, Nuzziello N, Introna A, Consiglio A, Licciulli F, D'Errico E, et al. Dysregulation of microRNAs and target genes networks in peripheral blood of patients with sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Front Mol Neurosci.* (2018) 11:288.
- Lu CH, Macdonald-Wallis C, Gray E, Pearce N, Petzold A, Norgren N, Giovannoni G, Fratta P, Sidle K, Fish M, Orrell R, Howard R, Talbot K, Greensmith L, Kuhle J, Turner MR, Malaspina A. Neurofilament light chain: A prognostic biomarker in amyotrophic lateral sclerosis. *Neurology.* 2015 Jun 2;84(22):2247-57.
- Majounie, E., Renton, A. E., Mok, K., Dopper, E. G., Waite, A., Rollinson, S., Chiò, A., Restagno, G., Nicolaou, N., Simon-Sanchez, J., van Swieten, J. C., Abramzon, Y., Johnson, J. O., Sendtner, M., Pamphlett, R., Orrell, R. W., Mead, S., Sidle, K. C., Houlden, H., Rohrer, J. D., Traynor, B. J. (2012). Frequency of the C9orf72 hexanucleotide repeat expansion in patients with amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal dementia: a cross-sectional study. *The Lancet. Neurology*, 11(4), 323–330.

- Matamala JM, Arias-Carrasco R, Sanchez C, Uhrig M, Bargsted L, Matus S, et al. Genome-wide circulating microRNA expression profiling reveals potential biomarkers for amyotrophic lateral sclerosis. *Neurobiol Aging*. (2018) 64:123–38.
- McCombe, A. P., Henderson, R.D. (2010). Effects of gender in amyotrophic lateral sclerosis, *Gender Medicine*, Volume 7, Issue 6.
- McKee, A. C., Gavett, B. E., Stern, R. A., Nowinski, C. J., Cantu, R. C., Kowall, N. W., Perl, D. P., Hedley-Whyte, E. T., Price, B., Sullivan, C., Morin, P., Lee, H. S., Kubilus, C. A., Daneshvar, D. H., Wulff, M., & Budson, A. E. (2010). TDP-43 proteinopathy and motor neuron disease in chronic traumatic encephalopathy. *Journal of neuropathology and experimental neurology*, 69(9), 918–929.
- Özoğuz, A., Uyan, Ö., Birdal, G., Iskender, C., Kartal, E., Lahut, S., Ömür, Ö., Agim, Z. S., Eken, A. G., Sen, N. E., Kavak, P., Saygı, C., Sapp, P. C., Keagle, P., Parman, Y., Tan, E., Koç, F., Deymeer, F., Oflazer, P., Hanağası, H., ... Başak, A. N. (2015). The distinct genetic pattern of ALS in Turkey and novel mutations. *Neurobiology of aging*, 36(4), 1764.e9-1764.e18.
- Parisi C, Napoli G, Amadio S, Spalloni A, Apolloni S, Longone P, Volonté C. MicroRNA-125b regulates microglia activation and motor neuron death in ALS. *Cell Death Differ*. 2016 Mar;23(3):531-41.
- Petrov, D., Mansfield, C., Moussy, A., & Hermine, O. (2017). ALS Clinical Trials Review: 20 Years of Failure. Are We Any Closer to Registering a New Treatment?. *Frontiers in aging neuroscience*, 9, 68.

- 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., Hernandez, D. G., ... Traynor, B. J. (2011). A hexanucleotide repeat expansion in C9ORF72 is the cause of chromosome 9p21-linked ALS-FTD. *Neuron*, 72(2), 257–268.
- Shang, Y., & Huang, E. J. (2016). Mechanisms of FUS mutations in familial amyotrophic lateral sclerosis. *Brain research*, 1647, 65–78.
- Sreedharan, J., & Brown, R. H., Jr (2013). Amyotrophic lateral sclerosis: Problems and prospects. *Annals of neurology*, 74(3), 309–316.
- Taguchi, Y. H., & Wang, H. (2018). Exploring microRNA Biomarker for Amyotrophic Lateral Sclerosis. *International journal of molecular sciences*, 19(5), 1318.
- Taylor, J., Brown, R. & Cleveland, D. Decoding ALS: from genes to mechanism (2016). *Nature* 539, 197–206
- Toivonen JM, Manzano R, Olivan S, Zaragoza P, Garcia-Redondo A, Osta R. MicroRNA-206: a potential circulating biomarker candidate for amyotrophic lateral sclerosis. *PLoS ONE*. (2014) 9:e89065.
- Tunca, C., Şeker, T., Akçimen, F., Coşkun, C., Bayraktar, E., Palvadeau, R., Zor, S., Koçoğlu, C., Kartal, E., Şen, N. E., Hamzeiy, H., Özoğuz Erimiş, A., Norman, U., Karakahya, O., Olgun, G., Akgün, T., Durmuş, H., Şahin, E., Çakar, A., Başar Gürsoy, E., Başak, A. N. (2020). Revisiting the complex architecture of ALS in Turkey: Expanding genotypes, shared phenotypes, molecular networks, and a public variant database. *Human mutation*, 41(8), e7–e45.

- Vance, C., Rogelj, B., Hortobágyi, T., De Vos, K. J., Nishimura, A. L., Sreedharan, J., Hu, X., Smith, B., Ruddy, D., Wright, P., Ganesalingam, J., Williams, K. L., Tripathi, V., Al-Saraj, S., Al-Chalabi, A., Leigh, P. N., Blair, I. P., Nicholson, G., de Belleruche, J., Gallo, J. M., Shaw, C. E. (2009). Mutations in FUS, an RNA processing protein, cause familial amyotrophic lateral sclerosis type 6. *Science (New York, N.Y.)*, 323(5918), 1208–1211.
- Vu LT, Bowser R. Fluid-Based Biomarkers for Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Neurotherapeutics*. 2017 Jan;14(1):119-134.
- Wang, H., O'Reilly, É. J., Weisskopf, M. G., Logroscino, G., McCullough, M. L., Thun, M. J., Schatzkin, A., Kolonel, L. N., & Ascherio, A. (2011). Smoking and risk of amyotrophic lateral sclerosis: a pooled analysis of 5 prospective cohorts. *Archives of neurology*, 68(2), 207–213.
- Wang, Y., Zeng, G., & Jiang, Y. (2020). The Emerging Roles of miR-125b in Cancers. *Cancer management and research*, 12, 1079–1088. <https://doi.org/10.2147/CMAR.S232388>
- Weisskopf, M. G., McCullough, M. L., Calle, E. E., Thun, M. J., Cudkowicz, M., Ascherio, A. (2004). Prospective Study of Cigarette Smoking and Amyotrophic Lateral Sclerosis, *American Journal of Epidemiology*, Volume 160, Issue 1, 1 Temmuz 2004, 26–33
- Wightman, B., Ha, I., & Ruvkun, G. (1993). Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene *lin-14* by *lin-4* mediates temporal pattern formation in *C. elegans*. *Cell*, 75(5), 855–862.
- Wood H. (2011). A hexanucleotide repeat expansion in C9ORF72 links amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal dementia. *Nature reviews. Neurology*, 7(11), 595
- Zou, Z. Y., Zhou, Z. R., Che, C. H., Liu, C. Y., He, R. L., & Huang, H. P. (2017). Genetic epidemiology of amyotrophic lateral sclerosis: a systematic review and meta-analysis. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry*, 88(7), 540–549.

ÖZGEÇMİŞ

Özlem KARA, Lise öğrenimini Adana Cumhuriyet Lisesi'nde tamamladı. 2010 yılında kazandığı Osmaniye Korkut Ata üniversitesi kimya teknolojisi bölümünden 2012 yılında birincilikle mezun oldu. Daha sonra 2012 yılında girdiği DGS sınavı ile İnönü Üniversitesi Fen- Edebiyat Fakültesi Kimya bölümünü kazanarak 2016 yılında ikincilikle mezun oldu. 2019 yılında Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoteknoloji Anabilim Dalı'nda yüksek lisansa başladı.

