

ANKARA ÜNİVERSİTESİ  
BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJELERİ  
KOORDİNASYON BİRİMİ KOORDİNATÖRLÜĞÜNE

**Proje Türü** : Bağımsız Proje (B)  
**Proje No** : 18B0230010  
**Proje Yürütücüsü** : Dr. Öğr. Üyesi Halil Gürhan Karabulut  
**Proje Başlığı** : Huntington Hastalarının plazmasında Biyolojik Belirteç Olarak Nöron Kökenli Ekzozomlarda Mitokondrial DNA Düzeyi ile miR-27a ve miR-124 Ekspresyonunun Araştırılması

Yukarıda bilgileri yazılı olan projemin sonuç raporunun e-kütüphanede yayınlanmasını;

STEM YORUM

STEM YORUM  GEREKÇESİ

..... / ..... / 20  
Dr. Öğr. Üyesi Halil Gürhan Karabulut  
Muzakara

**ANKARA ÜNİVERSİTESİ  
BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJESİ  
SONUÇ RAPORU**

Huntington Hastalarının İzleminde Biyolojik Belirteç Olarak Nöron Kökenli Ekzozomlarda Mitokondrial DNA Düzeyi ile miR-27a ve miR-124 Ekspresyonunun Araştırılması

Dr. Öğr. Üyesi Halil Gürhan Karabulut

Prof. Dr. Muhittin Çenk Akbostancı  
Uzm. Dr. Zerin Özaydın Aksun  
Uzm. Dr. Seyda Erdoğan  
Prof. Dr. Atilla ELHAN  
Arş. Gör. Dr. Mustafa GÖKÖLÜ

18B0230010

10.12.2018 - 10.12.2020

26.05.2021

Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri  
Ankara - 2021

## I. Projenin Türkçe ve İngilizce Adı ve Özetleri

**Türkçe Adı** : Huntington Hastalarının zleminde Biyolojik Belirteç Olarak Nöron Kökenli Ekzozomlarda Mitokondrial DNA Düzeyi ile miR-27a ve miR-124 Ekspresyonunun Ara tırılması

**İngilizce Adı** : Investigation of Mitochondrial DNA Level and miR-27a, miR-124 Expression in Neuronally Derived Exosomes as Biomarkers for Follow-up of Huntington's Disease Patients

## Özetleri

: Türkçe Adı:

Huntington Hastalarının zleminde Biyolojik Belirteç Olarak Nöron Kökenli Ekzozomlarda Mitokondriyal DNA Düzeyi ile miR-27a ve miR-124 Ekspresyonunun Ara tırılması

Özet:

Huntington hastalı ı istemsiz koreiform hareketler, bili sel ve psikiyatrik belirtilerle karakterize ilerleyici nörodejeneratif bir hastalıktır. Hastalı ın patogenezinde HTT genindeki CAG tekrar sayısının artı ı sorumludur. Bu artı nedeniyle genin kodladı ı ürün olan huntingtin proteininin katlanması bozulmakta, buna ba ılı olarak nörodejenerasyonla sonuçlanan bazı süreçler ba lamaktadır. Bu süreçlerin en çok kabul görenlerinden biri de mitokondriyal disfonksiyondur. Nörodejeneratif süreçler nedeniyle oksidatif stres artı ı oldu u ve bu durumun zamanla mitokondriyal DNA'ya hasar verdi i bildirilmi tir. Öte yandan yapılan çalı malarda miR-27a ve miR-124'ün düzeyindeki de i imler de mitokondriyal disfonksiyon ile ili kili bulunmu tur.

Bu çalı mada Huntington hastalarının serum örneklerinden elde edilen nöron kökenli ekzozomlarda mitokondriyal hasarın göstergesi olarak mitokondriyal DNA düzeyi incelenmi tir. Aynı zamanda miR-27a ve miR-124 düzeyleri ara tırılmı tir. Çalı maya 35 hasta ve 20 sa ılıklı birey dahil edilmi tir. Hastalı ın erken ve ileri evreleri arasında kıyaslama yapabilmek amacı ile hastalar UHDRS skorlarına göre alt gruplara ayrılmı tir.

Hasta ve kontrol grubu arasında mitokondriyal DNA düzeyleri arasında fark bulunamamı tir. Hasta grubu içinde yapılan kıyaslamalarda da fark bulunamamı tir. Öte yandan, Huntington hastalı ında mitokondriyal harabiyet oldu u bilinmektedir. Bu nedenle gruplar arasında fark bulunamaması olgu sayısının az olmasına ba ılı olabilir. Daha geni bir hasta grubunda çalı manın gerçekleştirilmesi halinde bu farkın gösterilebilece i dü ünülmektedir.

Bildi imiz kadarı ile literatürde nöron kökenli ekzozomlarda mitokondriyal DNA ile ilgili yapılan bir çalı ma bulunmamaktadır. Bu nedenle bu çalı mamız, nöron kökenli ekzozomlarda mitokondriyal DNA'nın varlı ını göstermekle birlikte mitokondriyal disfonksiyon/harabiyetle seyreden çok sayıda hastalık grubunda bu konuda çalı maların yapılabilece ini de göstermi tir.

ngilizce Adı:

Investigation of Mitochondrial DNA Level and miR-27a and miR-124 Expression in Neuron-derived Exosomes as Biomarkers for the Follow-up Patients with Huntington Disease

Summary:

Huntington disease is a progressive neurodegenerative disorder characterized by involuntary choreic movements, cognitive decline and psychiatric disturbances. CAG repeat expansion in HTT gene is responsible for the disorder. This repeat expansion causes misfolding of the gene product, huntingtin protein, and triggers some cellular processes leading to neurodegeneration. One of the most known of these processes is mitochondrial dysfunction. Neurodegenerative processes increase oxidative stress and in time, this leads to mitochondrial DNA damage. On the other hand, it has been shown that changes in miR-27a and miR-124 levels are associated with mitochondrial dysfunction.

In this study, mitochondrial DNA level was investigated in neuron-derived

exosomes isolated from serum samples of Huntington disease patients as a marker of mitochondrial damage. miR-27a and miR-124 levels were also investigated. 35 patients and 20 healthy individuals were included in the study. To be able to make comparisons between patients in early and advanced stages of the disease, the patients were divided into subgroups based on their UHDRS scores.

No statistically significant difference was found between patient and control group for mitochondrial DNA levels. There was also no statistically significant difference between patient subgroups, early-stage and late-stage cases. On the other hand, it is known that there is mitochondrial degeneration in Huntington disease. Therefore, the reason of failure in showing the difference may be due to limited number of cases. We suggest that it is highly possible to show the difference by performing studies in large group of patients.

To our knowledge, there is no study in the literature on neuron-derived exosomal mitochondrial DNA. Therefore, this study not only show the presence of mitochondrial DNA in neuron-derived exosomes but also shows that many studies may be performed on this area in a vast number of diseases with mitochondrial degeneration/dysfunction.

## II. Amaç ve Kapsam

Huntington Hastalığı otozomal dominant geçişli, ilerleyici, nörodejeneratif bir hastalıktır. Kuzey Avrupa ülkelerinde daha sık görülmekle birlikte prevalansı 100.000'de 3-10'dur. Bulgular 35-50 yaş aralığında başlar. İlk semptomdan 15-20 yıl sonra ölümle sonuçlanmaktadır [1]. Stemsiz koreiform hareketler, progresif kognitif gerileme ve psikiyatrik bozukluklar hastalığın klasik triadını oluşturmaktadır. Motor belirtiler genellikle başlangıçta mevcuttur. Sakarlık, göz takibinde güçlük, istemsiz koreiform hareketler, hareketlerde yavaşlama ve disartri erken dönemde görülebilir.

İlerleyen dönemde motor bulgulara distoni, bradikinezi ve rijidite eklenir. Kognitif olarak, yavaş ilerleyen bilişsel bozulma, unutkanlık, dikkat dağınıklığı, geç dönemde konuma kaybı ve demans görülebilir. Nöropsikiyatrik olarak, kişilik değişimleri (irritabilite, apati, seksüel bozukluk, disinhibisyon), majör depresif bozukluk ve izofrenik belirtiler görülebilir [2].

Hastalığın genetik tanısı, 4p16.3 lokusunda yer alan HTT geninin 1. ekzonundaki CAG tekrar sayısının belirlenmesi ile konulur. CAG tekrar sayısına göre genotip sınıflandırması şu şekilde yapılmaktadır:

1. p.Gln18(<27): Tekrar sayısı 27'den küçüktür. Normal aleldir.
2. p.Gln18(27-35): Tekrar sayısı 27 ile 35 arasındadır. Ara alel olarak adlandırılır.
3. p.Gln18(36-39): Tekrar sayısı 36 ile 39 arasındadır. Düşük penetranslı hastalık alelidir.
4. p.Gln18(>39): Tekrar sayısı 39'dan büyüktür. Tam penetranslı hastalık alelidir.

Ara alel olan hastalarda hastalık belirtisi görülmez ancak CAG tekrar bölgesi instabil olduğu için bireyin çocuklarında tekrar sayısı artarak patolojik düzeylere ulaşabilir. Düşük penetranslı alel olan grupta hastalık riski yüksek olmakla birlikte hastalık semptomları gelişmeyebilir. Tam penetranslı alel olan grup ise hayatlarının bir döneminde hastalığa yakalanacaktır [2]. CAG tekrar sayısı ile hastalığın başlangıç yaşı arasında ters bir ilişki vardır; tekrar sayısı ne kadar fazla ise hastalık o kadar erken yaşta başlanmaktadır [3].

Huntingtin proteini (HTT) yaklaşık 3100 aminoasitten oluşmaktadır. Çoğunlukla sitoplazmada bulunur. Normal embriyonik gelişim için esansiyel olan HTT [5], çok sayıda protein ile etkileşime girerek vezikül transportu, protein trafiği, post-sinaptik sinyalizasyon, transkripsiyonel regülasyon ve apoptozis gibi biyolojik olaylarda önemli görevler üstlenmektedir. HTT geninin 1. ekzonundaki CAG tekrar sayısındaki artış HTT proteininin NH<sub>2</sub>-terminalinde (18. aminoasit pozisyonundan başlayan) uzamı poliglutamin kuyruğu oluşmasına neden olur [4].

Hastalığın patogenezinde birçok mekanizma öne sürülmüştür. Bunlardan bazıları glutamaterjik eksitotoksitesite, dopamin toksisitesi, mitokondriyal disfonksiyon, oksidatif stres artışı, apoptoz defekti, otofaji defekti, transkripsiyonel disregülasyon, agregat klirens defekti ve ubiquitin proteazom sistemi defektidir [6]. Bu mekanizmaların hepsi birbirleriyle doğrudan ve dolaylı olarak bağlantılı olsa da majör mekanizma transkripsiyonel disregülasyon gibi görülmektedir. Transkripsiyonel disregülasyonun en önemli nedeni de REST sistemindeki defektidir. REST (Repressor element-1 silencing transcription factor) bir transkripsiyon faktörüdür [7]. Nükleusta genlerin RE1 (repressor element-1) konsensus dizilerine bağlanarak nöronal gen ekspresyonunu represe eder. Normal şartlarda REST nöronlarda düşük düzeyde eksprese olur ve REST proteini huntingtin proteinine bağlanarak nükleustan sitoplazmaya sekestre edilir ve böylelikle homeostazisi sağlanır. Ancak, huntingtinde mutasyon varsa bu ilişki bozulur ve REST sitoplazmaya sekestre edilemeyip nükleusa transloke olur. Bu anormal hücre içi dağılımın sonucu olarak bazı genlerin RE1 represör dizilerine REST'in bağlanması ile ekspresyonları azalır ve bu durum transkripsiyonel disregülasyonla sonuçlanır [8]. Buna ek olarak, normal şartlarda huntingtin proteini CBP, TBP ve TAFII130 gibi transkripsiyonel faktörlerle ilişki halindedir [9]. Mutant huntingtin varlığında bu ilişki bozulur ve bu transkripsiyon faktörlerinin fonksiyonlarında defektler oluşur. Bu durum transkripsiyonel disregülasyona katkı sağlar.

Huntington hastalığının en önemli patolojik özelliklerinden biri etkilenmiş nöronların nükleus ve

sitoplazmalarında bulunan agregatlardır. Bu agregatların yapısında poliglutamin tekrarları içeren mutant huntingtin N-terminal fragmanları bulunmaktadır [10]. N-terminal fragmandaki uzamı poliglutamin kuyruğu, proteinin üç boyutlu yapısını bozar ve hatalı katlanmalara neden olur. Bunun sonucu olarak, çözünemeyen non-fonksiyonel proteinler oluşmaktadır ve bu proteinler agregatların oluşumunu tetiklemektedir. Bunun yanı sıra, uzamı kuyruklar arasında transglutaminazlar aracılığıyla çapraz köprüler oluşmaktadır [6]. Bu durum, stabiliteyi artırarak proteozomal kompleks tarafından eliminasyonu zorla tırmaktadır. Böylelikle, akümülyasyon ve klirens arasındaki denge akümülyasyon yönüne doğru bozulmaktadır [11].

Ekzozomlar, 30-120 nm çaplı, çift katlı lipit membranla çevrili veziküllerdir [12, 13]. 1980'lerde Johnstone ve arkadaşları tarafından koyun retikülositlerinin maturasyonu üzerine yaptıkları çalışmaları sırasında keşfedilmiştir [14, 15]. Hücrelerin birbirleriyle iletişimi, adaptif immün yanıt oluşumu, protein, RNA, lipit gibi maddelerin taşınımı, miad dolmuş proteinlerin eradikasyonu, apoptoz, anjiyogenez, koagülasyon ve tümör hücre disseminasyonu gibi olaylarda görevleri vardır [12, 16, 17]. Her türlü hücreden kaynaklanabilirler ve tüm vücut sıvılarında mevcuttur [18].

Ekzozomların yapısında birçok lipit ve protein bulunur. Seramid, sfingomyelin, kolesterol gibi lipit türleri ekzozomun hedef hücre tarafından tanınmasını kolaylaştırır [17]. Ekzozomal membranda bol bulunan seramidler, ekzozomların ekstraselüler alana salınımında önemli rol oynarlar [19]. CD9, CD63, CD81 gibi ILV formasyonunda rol oynayan tetraspaninler ve Alix, Tsg101 gibi MVB (multi-vesikular body) biyogenez proteinleri spesifik yüzey markerleri olarak bulunmaktadır [12, 17].

Ekzozomlar, plazma membranından dolayı yollarla oluşur. İlk olarak hücre membranı endozom oluşumu üzerine internalize olur. Bu yapıya erken endozom denir. Daha sonra, endozom membranından içeri doğru küçük invajinasyonlar oluşmaya başlar. Bu invajinasyonlar vezikül haline dönüşerek endozom lümeni içinde depolanır. Oluşan bu yapıya geç endozom veya MVB denir ve içerisindeki veziküllere de intraluminal vezikül (ILV) adı verilir [20]. MVB hücre membranı ile kaynaşarak ILV'ler ekstraselüler alana sekrete edilir. Bu olayın mekanizması net bilinmemesine rağmen Rab11, Rab27, Rab35 gibi küçük GTPazlar ve SNARE (Soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor activating protein receptor) proteininin etkin olduğu ileri sürülmektedir [19]. Sekrete olan veziküllerin ismi bu aşamadan sonra ekzozomdur [19, 21, 22]. Sekrete edilmiş ekzozomlar hedef hücrelerle farklı şekillerde etkileşebilir. Ekzozomal yüzey markerleri aracılığıyla hedef hücrelerdeki sinyal proteinleri ile etkileşebilir veya hedef hücrenin plazma membranı ile füzojen proteinler aracılığıyla kaynaşma içeriğini doğrudan sitozole aktarabilirler. Ya da hedef hücre tarafından bir bütün halinde fagositoz, makropinositoz gibi endositotik yollarla internalize edilip endozom yapılarına katılabilirler [19, 20].

Ekzozom formasyonu için ILV yüzeyinde bulunan ESCRT (Endosomal sorting complex required for transport) kompleksine ihtiyaç duyulmaktadır. Bu kompleks, ekzozomal içeriğin belirlenmesi, içerikteki proteinlerin düzenlenmesi ve endozomal kargonun doğru şekilde vezikül içerisine yönlendirilmesi için mutlaka gereklidir [19, 23]. ESCRT kompleksi alt ünitelerinden ESCRT-0, ubiquitinize olmuş proteinleri bağlayarak akümülyasyonunu sağlarken, ESCRT-1 ve ESCRT-2 endozomal membranın tomurcuklanmasını başlatır. ESCRT-3 ise tomurcuklanmanın tamamlanmasını sağlayarak, vezikülün endozomal membrandan fisyonunu gerçekleştirir. ESCRT alt üniteleri ile ilişkide olan Alix ve Tsg101 proteinleri de luminal kargo akümülyasyonunda rol oynar [19].

Nöronal sistemde ekzozomlar sinapslardaki nörotransmitter taşınımı, nöronal destek ve korunumu, myelin membran proteinlerinin turnover'i gibi olaylarda görev alır [24, 25]. Öte yandan, nörodejeneratif hastalıkların progresyonu, bu hastalıklara bağlı oluşan agregasyon ürünlerinin interselüler yayılımı, patojenlerin hücrelerarası transferi gibi patolojik olaylarda da önemli rol oynamaktadır [24]. Ekzozomlar kan beyin bariyerini geçebildiği için patolojik süreçlere ait biyolojik belirteçler, ekzozom içinde dolaşıma katılırlar [26, 27]. Bu ekzozomların içeriğinin incelenmesi ile beyindeki patojenetik olaylara ait veriler elde edilebilir. Üstelik kan beyin bariyerini geçiş özelliği

kullanılarak ilaç veya tedavi materyali olabilecek sentetik ürünler ekzozom içerisine yerleştirilip terapötik amaçlı kullanılabilir.

Ekzozomların klinik tanı, biyomarker ve terapötik çalışmalarında sağladığı avantajlar, çalışmamızda ekzozomların tercih edilmesinin en önemli gerekçeleridir. Bunlardan bazıları aşağıda sıralanmıştır:

1. Ekzozomlar hastalık ve patolojik süreçlerde değişimler gösteren nükleik asit, protein ve lipid yapıları içerirler ve bunlarda meydana gelen değişimler hastalık tanısı koymada, bilinen hastalığın izleminde, verilen tedavinin başarısının değerlendirilmesinde kullanılabilir.
2. Non-invaziv yollarla vücut sıvılarından elde edilebildikleri için, tanı ve izlem için biyopsi gibi invaziv yöntemler gerektiren hastalıklarda kolaylık sağlarlar.
3. Çerçiklerini ekstraselüler endonükleazlardan korudukları için, RNAi sistemleri gibi biyomühendislik ürünlerinin güvenilir biçimde spesifik hedeflere gönderilmesi için esiz taşıyıcıdır. Örneğin Didiot ve arkadaşlarının çalışmasında, Huntingtin mRNA'sını hedefleyen siRNA'lar (small interference RNA) ekzozomlara yerleştirilerek primer kortikal nöronlara yönlendirilmiş ve Huntingtin mRNA'sında kısmi ancak önemli düzeyde bir represyon sağlanmıştı [28].
4. Yarı ömürleri uzundur, immün sistem tarafından elimine edilmezler ve non-toksiktirler. Bu özellikleri ile terapötik moleküllerin taşınımı için kolaylık sağlarlar [29].
5. Kan beyin bariyerini kolayca geçebilmeleri nedeniyle Alzheimer, Parkinson, ALS, akut beyin hasarı gibi nörolojik hastalıkların erken tanı, tarama, izlem ve tedavilerinde ciddi umut vadetmektedir.
6. Stabiliteilerinin yüksek olması nedeniyle uzun süre laboratuvar şartlarında saklanıp, analizler ve çalışmalar yapılabilir, biyobankalar kurulabilir [25].

MicroRNA'lar (miRNA) 17-24 nükleotit uzunluğunda evrimsel olarak iyi korunmuş küçük kodlamayan RNA'lardır [30, 31]. Post-transkripsiyonel gen ekspresyonunun regülasyonunda çok önemli rolleri olan miRNA'lar, hedef mRNA'nın 3'-untranslated region (UTR) bölgesindeki komplementer dizilere bağlanarak mRNA degradasyonu ve translasyon inhibisyonu yoluyla gen ekspresyonunu baskırlar [30]. miRNA'ların önemli bir kısmı santral sinir sisteminde bulunmaktadır. Beyin gelişimi, beyin stabilitesi ve homeostazisi üzerine gen ekspresyon değişiklikleri aracılığıyla regülasyonda önemli rol oynarlar [32].

Ekzozomların RNA içerdiği ilk kez Valadi ve arkadaşları tarafından kanıtlanmıştı [33]. Bu keşif, öncesinde görevi sadece atıkları taşıma olarak bilinen ekzozomlara verilen önemi artırmıştır. Özellikle ekzozomal miRNA'lar üzerine birçok diagnostik marker çalışması yapılmıştır. Bu çalışmalarda miRNA'ların tercih edilmesinin nedeni küçük yapıları nedeniyle daha stabil olması ve RNase bağışlı degradasyondan kaçabilmesidir. Bu özellikleri sayesinde ekzozomal miRNA'lar hastalıkların non-invaziv değerlendirilmesinde ideal biyolojik belirteç adaylarının başında gelmektedir. Ayrıca, sentetik miRNA'lar ekzozomlara yerleştirilerek terapötik amaçlı kullanılabilme potansiyeline sahiptir. Bu gerekçeler nedeniyle, çalışmamızda ekzozomal miRNA'ların analiz edilmesi tercih edilmiştir.

Huntington hastalığında transkripsiyonel disregülasyonun ana nedeni olan REST represör kompleksi, miRNA transkriptlerinin upstreamindeki RE1 dizilerine bağlanarak miRNA ekspresyonunu etkileyebilir. Huntington hastalarında REST-huntingtin ilişkisinin bozulmasına bağlı olarak gelişen REST mislokasyonu nedeniyle bazı miRNA'ların sentezinde represyon görülebilmektedir. Bunlardan ön plana çıkanlardan biri miR-124'tür. miR124, yüksek düzeyde ve spesifik olarak nöronlarda ekspresyon olur [32, 34]. Majör olarak nöronal kimliğinin korunumu, uzun dönem hafıza



gelişiminde altta yatan sinaptik plastisitenin sağlanması gibi fonksiyonlarda, CREB [35], Egr1 (Zif268) [36] ve PTBP [37] gibi transkripsiyon faktörlerinin regülatörü olarak rol oynamaktadır [32]. Malmevik ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, doğrudan miR124 inhibisyonunun farelerde öğrenme ve bellekte yetmezlik sebepleri olarak düşünülmektedir, bu rolü destekler niteliktedir [38]. miR-124'ün Huntington hastalarının ve transgenik hayvan modellerinin korteks dokusu ve striatumunda düşük düzeylerde ekspresyon olduğu gösterilmiştir [7, 9, 37, 39].

Azalan miR-124'ün çeşitli taşıyıcı sistemlerle, özellikle de ekzozomlar aracılığıyla nöronlara ulaştırılması terapötik potansiyel taşımaktadır. Lee ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada, R6/2 HD transgenik fare modelinin striatum dokusuna enjeksiyon ile miR-124 içeren ekzozomlar verilmiştir. İstatistiksel olarak anlamlı bir klinik düzelme sağlanmasa da striatum dokusunda anormal artan REST düzeyinde anlamlı bir düşüş tespit edilmiştir. Bu çalışmada, ekzozom tabanlı teslim yöntemi kullanılarak terapötik stratejiler geliştirilmesinde önem taşımaktadır [40].

GLT-1 (glutamate transporter-1) astroglial hücrelerden ekspresyon alan bir proteindir. Fonksiyonu sinaptik yarıktaki ekstraselüler glutamati geri alarak ortadan kaldırmaktır. Huntington fare modellerinde yapılan çalışmalarda, striatum ve beyin korteksinde ekspresyonlarının düşüşü gözlemlenmiştir. Bunun sonucu olarak, sinaptik aralıkta glutamat geri alımı defektli olduğu ve bu durumun glutamat eksitotoksitesisi ile ilişkili olduğu düşünülmüştür [41]. Bu durumla ilişkili olarak, Morel ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, nöronlardan kaynaklanan, içinde miR-124a bulunan ekzozomların hedef olarak astrositlere geçmesi ve burada yaptığı regülatuar değişiklikler irdelenmiştir. Nöron kaynaklı ekzozomal miR-124a'nın astrositlere geçerek burada tam tanımlanamayan indirekt mekanizmalarla GLT1'in astroglial hücrelerdeki ekspresyonunu artırdığı gösterilmiştir. Buna paralel olarak, miR-124a'yı bloke eden antisense oligonükleotitler, farelere intrastriatal yoldan verince astroglial GLT1 protein ekspresyonunun düşüşü görülmüştür [42]. Özet olarak, miR-124 down-regülasyonunun indirekt yollarla GLT1 seviyesinin düşüşüne neden olması, Huntington hastalığı mekanizmalarından olan glutamat eksitotoksitesisi ile örtülmektedir.

MDR-1 (ABCB1)(multidrug-resistance protein-1); toksik proteinlerin ve ksenobiyotiklerin hücre içinden dışarı atılmasında rol oynayan ATP bağımlı bir P-glikoprotein pompa sistemidir [43]. Birçok kanserde, ilaç direnci nedeniyle tedavi başarısızlığının nedeni olduğu [44, 45] ve santral sinir sistemi hücrelerinde biriken agregatların temizlenmesi ile ilişkili olduğu bilinmektedir [46, 47]. Yaşlanmayla birlikte ortaya çıkan nörodejeneratif hastalıklarda MDR1 azalmasının etkisi olduğu düşünülmektedir [48]. MDR-1 nöronal hücrelerde belirgin olarak ekspresyon almaktadır. Ayrıca mutant huntingtinin poliglutamin bölgesi ile ilişkili halindedir [11, 43]. Bu nedenle, Huntington hastalığında mutant huntingtin agregatlarının klirensinde önemli bir etkidir ve fenotipin şiddetini azaltmaya yardımcı olur [11, 43]. Ancak mutant huntingtinin protein-protein ilişkilerindeki bozukluklar ve transkripsiyonel defektler nedeni ile MDR1 ekspresyonunda azalma görülmektedir. Im ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, MDR-1'in R6/2 HD fare modelinin nöronal hücrelerinde ekspresyonunun azaldığı gösterilmiştir. Bu hücrelerde plazmit aracılığıyla MDR-1 overekspresyonu sağlandıığında ise mutant huntingtin agregatlarının akümüülasyonunda önemli bir azalma gerçekleşmiştir [43].

miR-27a'nın, R6/2 HD transgenik fare modellerinin beyinlerinde ekspresyonunun normale göre azaldığı yapılan miRNA ekspresyon profil çalışmalarından bilinmektedir [49]. Ban ve arkadaşlarının R6/2 HD farelerin nöronal hücrelerinden yaptıkları çalışmada, miR-27a ekspresyonunun azalmasının MDR-1 seviyelerini düşürdüğü görülmüştür. Buna cevaben mutant huntingtin (mHtt) agregasyonunun arttığı ortaya çıkarılmıştır. miR-27a'nın bu hücelere transfeksiyonu ile MDR-1 ekspresyonunun artması ve hücre içi agregat azalmasının görülmesi aradaki ilişkiyi sağlamıştır [50]. Sonuç olarak, miR-27a induksiyonu ile MDR-1 artırılarak huntingtin agregatlarının klirensinin uyarılması terapötik potansiyel taşımaktadır.

Huntington hastalığı patogeneğinde yer alan önemli mekanizmalardan biri de mitokondriyal disfonksiyondur [51]. Mitokondrinin nöronlarda ATP jenerasyonu, kalsiyum homeostazisi,

antioksidan etki gibi çok önemli fonksiyonları bulunmaktadır. Bu fonksiyonların devamlılığı için mitokondri homeostazisi ve dinamikleri sağlam olmalıdır [51]. Mutant huntingtin proteini varlığında bu dengede bozulmalar meydana gelmektedir [52-54]. Sonuç olarak ATP eldesinde düşme, reaktif oksijen radikallerinin seviyesinde artma, apoptoza yatkınlık görülmektedir [51].

Mitokondriyal homeostazisin kontrolünde transportasyon, füzyon ve fisyon mekanizmaları rol oynamaktadır. Nöronlar bu mekanizmaların yolunda gitmesi sayesinde enerji ihtiyaçlarını karşılamakta ve yapısal bütünlüklerini korumaktadırlar. Füzyon esnasında bir mitokondri diğer bir mitokondri ile birleşip içerik alıverişi yapmaktadır. Bu yolla hasar görmüş bir mitokondri, normal bir mitokondri ile füzyon yaparak kendini tamir etmeye yarayacak içeriklere sahip olabilmektedir [51]. Aksine fisyon olayında ise mitokondriyal içerik parçalanma sonucu sitoplazmaya bırakılmaktadır ve bu durumda sitokrom c gibi apoptoza indükleyen etkenler açığa çıkmaktadır [55]. Bu olayların tümüne mitokondriyal dinamikler denilmektedir. Mitokondriyal dinamikler; mitofusin1 (MFN1), MFN2, mitochondrial fission factor (MFF), dynamin-related protein 1 (DRP1), mitochondrial fission-1, mitochondrial dynamics 51, optic atrophy protein-1 (OPA1) gibi koruyucu proteinler tarafından yönetilmektedir [56-60]. Mitokondriyal dinamiklerin regülasyonu ile elektron transport sisteminin aktivitesi, mitokondri metabolizması ve mitokondriyal DNA'nın hasarlardan korunumu sağlanmaktadır [61, 62]. Mitokondriyal zarında lokalize olan huntingtin proteini [63], normal şartlarda huntingtin interacting protein 1 (HIP1), dynamin, klatrin gibi proteinlerle interaksiyona girerek, füzyon-fisyon döngülerinin bir başkanı olarak mitokondriyal dinamiklerin kontrol altında tutulmasını sağlamaktadır [64]. Ayrıca, mekanizmaları tam olarak açıklanamasa da normal huntingtinin, mitokondriyal transportun ve mitokondriyal membran potansiyelinin regülasyonunda önemli rolleri olduğu vurgulanmaktadır [65, 66]. Huntington hastalığında mutant huntingtin varlığı nedeniyle bu kontrol mekanizmalarında disfonksiyon gelişmektedir. Çalışmamızda incelenecek olan miRNAlardan miR-27'nin mitokondriyal dinamikler üzerine doğrudan etkisinin olduğu gösterilmiştir. Tak ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada miR-27'nin MFF (Mitochondrial Fission Factor) mRNA'sının 3'UTR (untranslated region) bölgesine bağlanarak ekspresyonunu azalttığı ve böylelikle mitokondriyal fisyonu baskılayıp, füzyonu desteklediği gösterilmiştir. Ek olarak, ekotopik verilen miR-27'nin mitokondriyal membran potansiyelini ve ATP seviyesini artırdığı gözlemlenmiştir [67]. Huntington hastalarında, miR-27 azalmasının yukarıda anlatılan mekanizmaları bozması sonucu mitokondriyal disfonksiyona neden olduğu düşünülmektedir.

Disfonksiyonel mitokondri varlığı nöronun apoptoza gidişini indükleyici potansiyele sahip olduğu için, nöron hücresi yaşamını sürdürebilmek adına defektif mitokondriyi mitofaji denilen yolla elimine etmektedir. Mitofaji, otofagozom-lizozom kompleksi aracılığıyla gerçekleşen mitokondriyal otofajidir [68]. Huntington hayvan modellerinde mitokondri ile otofagozom kompleksi bütünlüğünde mesinde defekt olduğu ve mutant huntingtinin mitofajik ilişkili reseptörleri bloke ettiği gösterilmiştir [69]. Kim ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada miR-27'nin mitofajik bağlantısında anahtar rolü olan PINK1'i (PTEN induced putative kinase 1) hedefleyerek mitofajiyi regüle ettiği gösterilmiştir. PINK1 normal fizyolojide çok düşük ekspresyon alan bir proteindir. Ancak mitokondriyal hasar varlığında güçlü bir şekilde aktive olarak mitofajik süreçleri hızlandırmaktadır. Bu durumda, miR-27 ise PINK1'i suprese ederek kontrol altında tutmaktadır ve gereğinden fazla mitofajik etkinin oluşmasını ve mitokondriyal deplasyonu önlemeye çalışmaktadır [70]. Huntington hastalığında miR-27 azalması ile kontrolsüz mitofajik aktivasyona bağlı olarak istenmeyen mitokondriyal kayıplar oluşabileceği ve bu durumun mitokondriyal disfonksiyona neden olabileceği düşünülmektedir.

Huntington hastalığındaki mitokondriyal disfonksiyonun en önemli faktörlerinden biri PGC1 (Peroxisome proliferator-activated receptor co-activator-1 alpha) proteininin ekspresyonunda, mutant huntingtinin neden olduğu transkripsiyonel disregülasyonla ilgili olduğu düşünülen, azalma ve fonksiyonlarında bozulmadır [71-73]. PGC1, mitokondri biyogenezinde, metabolik süreçlerde, mitokondriyal DNA'nın replikasyon ve transkripsiyonunun regülasyonunda rol oynayan majör transkripsiyonel ko-aktivatörlerden biridir [71, 73-75]. Liu ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, miR-124'ün PGC1 ekspresyonu üzerine olan etkisi incelenmiştir. R6/2 Huntington fare modelinde

yapılan bu çalı mada, miR-124'ün intrastriatal enjeksiyon yoluyla verilmesi sonucunda farelerde görülen davranı sal problemlerin iyile me gösterdi i ve PGC1 ekspresyonunda artı sa layarak nöronal ya am süresini ve diferansiasyon yetene ini artırdı ı gözlenmi tir [76]. miR-124'ün PGC1 üzerine olan bu etkisi nedeniyle Huntington hastalı nda görülen miR-124 azalmasının mitokondriyal disfonksiyonla ili kisi olabilece i dü ünülmektedir.

Huntington hastalı ı gibi poliglutamin hastalıklarında protein agregasyon ve akümüasyonu sonucu hücrel oksidatif strete artı görülmektedir. Bu durum, zamanla mitokondriyal DNA'ya hasar vererek miktarlarında de i ime neden olmaktadır ve en sonunda mitokondriyal DNA deplesyonu ile sonuçlanmaktadır [77]. Liu ve arkada ları Huntington Hastalı ının klinik manifestasyonlarının iddetini tahmin etmede mitokondriyal DNA içeri inin ölçümünün biyolojik belirteç olabilece ini dü ünümlerdir ve lökositlerde yaptıkları ölçümlerde Huntington hastalı nda mitokondriyal DNA'nın azaldı ını göstermi lerdir [77]. Ba ta lökositlerde olmak üzere birçok çalı mada farklı dokularda mitokondriyal DNA kopya sayısı ölçülmü tür. Bunlardan bir kısmında mitokondriyal DNA kopya sayısı azalmı olarak bulunurken [78, 79]; di er kısmında artımı olarak bulunmu tur [77, 78, 80, 81]. Bu sonuçlar birbirleriyle çeli iyor gibi görünse de genel görü , hücreler oksidatif hasara girdiklerinde erken moleküler de i iklik olarak mitokondriyal DNA kopya sayısında kompensasyon amaçlı bir artı oldu u, uzun dönemde ise oksidatif stresin antagonize edilmesinin kronik progresif kaybına ba lı olarak DNA hasarı geli ti i ve mitokondriyal DNA kopya sayısında azalma ile sonuçlandı ı yönündedir [75, 81-83].

Sonuç olarak, yukarıdaki literatür bilgileri ı ında, Huntington hastalarına ait nöron kökenli ekzozomlarda miR-124 ve miR-27a'nın ekspresyonunun ve mitokondriyal DNA miktarının ölçülmesi tarafımızca dü ünülmü tür. Bu parametrelerin hastaların izleminde kullanılabilece i, herhangi bir invaziv giri ime gerek kalmadan sadece basit bir periferik kan alımı ile nöronlardaki hastalıkla ili kili patogenetik süreçlerin de erlendirilebilece i öngörülmü tür. Ayrıca, hastalı ın farklı evrelerindeki hasta gruplarında bu parametrelerin ölçümsel farklılıklarının olup olmadı ı ortaya konularak, hastalı ın progresyon durumu hakkında bilgi sahibi olunabilecektir. Ek olarak, bu parametrelerde saptanan de i imlerin biyomühendislik yöntemleri ile manipülasyonu terapötik bir potansiyel ta ımaktadır.

### III. Materyal ve Yöntem

#### III.1. Çalışma Grubu

Çalışmaya 35 hasta birey dahil edilmiştir. Huntington Hastalığı ile ilgili değerlendirilebilecek herhangi bir motor, nöropsikiyatrik, kognitif özelliği ve ailede Huntington Hastalığı öyküsü olmayan 20 yaşlı gönüllü birey de kontrol grubu olarak çalışmaya alınmıştır. Çalışma için Ankara Üniversitesi Klinik Araştırmalar Etik Kurul kararı alınmıştır ve her birey, sözel bilgilendirme yapıldıktan sonra gönüllü olur formu alındıktan sonra araştırmaya dahil edilmiştir.

Hastalar, Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı ve Nöroloji Anabilim Dalı ile Ankara şehir Hastanesi Nöroloji Polikliniğine başvuran, bu branşlarda tanı, takip ve tedavi süreçlerini geçirmekte olan hasta bireylerden seçilmiştir. Hastaların hepsi, daha önce genetik test yapılarak Huntington hastalığı tanısı almış kişilerdir.

Hastaların klinik değerlendirilmesinde Huntington Study Group tarafından hazırlanmış UHDRS (Unified Huntington's Disease Rating Scale) skorlaması ve bu skorun motor DCL (Diagnostik confidence level) puanlaması uygulanmıştır. Buradan çıkan sonuçlara göre hasta grubundaki bireyler alt gruplara ayrılmıştır.

#### III.2. Yöntem

##### III.2.1. Serum Eldesi

- Her katılımcıdan 20 ml steril enjektör ile 15 ml periferik kan alınmıştır.
- Alınan kan, 15 ml steril santrifüj tüpüne aktarılmıştır.
- Oda sıcaklığında 30-45 dk pıhtılaşmasına izin verilmiştir.
- Pıhtılaşma sonrası 2500 rpm'de 10 dk santrifüj edilmiştir.
- Süpernatant kısmından 5 ml serum pastör pipeti ile alınmıştır.
- Alınan serum 1 ml kısımlara bölünüp kullanılabildiği kadar -80°C'de saklanmıştır.

##### III.2.2. Serumdan Ekzozom İzolasyonu

- Serumdan ekzozom izolasyonu için Total Exosome Isolation (from serum) Kit (Thermo Fisher, Cat. No: 4478360) kullanılmıştır.
- 1 ml serum örneği stoktan çıkarılıp 25°C su banyosunda eritilmiştir. Tamamen sıvı hale gelince hemen buz üzerine alınmıştır.
- Rezidü hücre ve debris kalmaması için 2000xg'de 30 dk santrifüj edilmiştir.
- Süpernatant pelet kaldırılmadan dikkatlice temiz bir 1.5 ml mikrosantrifüj tüpüne aktarılmıştır. Sonrasında hemen buz üzerine aktarılmıştır.
- Temizlenmiş serum üzerine 200 µl 'Total Exosome Isolation' solüsyonundan (Thermo Fisher) eklenmiştir.
- Vorteksleyerek veya pipetaj ile homojenize olana kadar karıştırılmıştır.
- Sonrasında 2-8°C'de 30 dk inkübe edilmiştir.
- Inkübasyon sonrası 10.000xg'de 10 dk oda sıcaklığında santrifüj edilmiştir.
- Süpernatant kısmı atılmıştır. Ekzozomlar tüpün dibindeki pelette bulunmaktadır.
- Peletin üzerine 300 µl 1X PBS (phosphate buffered saline) eklenerek resüspanse edilmiştir.
- Bu amaçla total serum ekzozomları sonraki analizler ve daha ileri purifikasyonlar için kullanıma hazırdır.
- 2-8°C'de bir hafta, -20°C ve daha düşük sıcaklıklarda uzun dönem saklanmıştır.

##### III.2.3. Nöronal ekzozom zenginleştirme

- Elde edilen ekzozomların üzerine 2 µg (4µL) Mouse anti-human CD171 (L1CAM) biyotinize antikor (Thermo Fisher, Cat. No: 13-1719-82) ve 100 µl %3 Blocker BSA (Thermo Fisher, Cat. No: 37525) eklenmiştir.
- 4°C'de 60 dk rotator mikser üzerinde inkübe edilmiştir.
- Inkübasyon sonrası üzerine 15 µl Streptavidin UltraLink Resin (Thermo Fisher, Cat. No:53114), 40 µl %3 Blocker BSA ile birlikte eklenmiştir.
- 30 dk boyunca 20°C'de inkübe edilmiştir.

- nkübasyon sonrası 300 xg'de 10 dk boyunca 4°C sıcaklıkta santrifüj edilmi tir.
- Süpernatant kısmı atılmı tir. Pelette reçine içinde hapsedim nöronal ekzozomlar bulunmaktadı.
- Ekzozomların reçineden ayrılması için pelet üzerine 200 µl 0.05M Glisin-HCl (pH:3) eklenmi tir ve 30 saniye vorteksle karı tırılmı tir.
- 4500 xg'de 10 dk boyunca 4°C sıcaklıkta santrifüj edilmi tir.
- Süpernatant kısmı alınmı tir ve 15 µl 1M TRIS-HCl(pH:8) eklenerek nötralize edilmi tir.
- Bu a amada nöronal ekzozomlar ileri testler için kullanıma hazırdır.
- Elde edilen süspansiyon 300 µl hacime gelene kadar üzerine PBS eklenmi tir.

#### III.2.4. Nöronal Ekzozomdan DNA zolasyonu

- Nöronal ekzozomdan DNA izolasyonu QIAMP DNA Mini Kit (QIAGEN, Cat. No: 51304) kullanılarak gerçekte tirilmı tir.
- 20 µL QIAGEN Protease (ya da Proteinase K) 1,5 ml mikrosantrifüj tüpüne pipetlenmi tir.
- 200 µL örnek (nöronal ekzozom) (100 µL nöronal ekzozom alınıp 100 µL PBS eklenerek ba langıç örnek hacmi QIAGEN Protease hacminin 10 katı olacak ekilde 200 µL'ye tamamlanmı tir) mikrosantrifüj tüpüne eklenmi tir.
- Üzerine 200 µL Buffer AL ve 1 µL Carrier RNA eklenmi ve 15 saniye vorteksle karı tırılmı tir.
- 56°C'de 10 dakika inkübe edilmi tir.
- Mikrosantrifüj tüpü kısa spinlenmi tir.
- 230 µL %100 etanol eklenmi ve 15 saniye vorteksle karı tırılmı tir. Mikrosantrifüj tüpü kısa spinlenmi tir.
- Karı ım 'QIAamp Mini Spin Kolon'a (2 ml toplama tüpüyle) aktarılmı tir. Tam hızda 1 dakika santrifüj edilmi tir. Toplama tüpüne geçen sıvı kısım ile birlikte tüp atılmı tir.
- 'QIAamp Mini Spin Kolon' yeni bir 2 ml toplama tüpüne aktarılmı ve üzerine 500 µL Buffer AW1 eklenmi tir. 6.000 x g (8.000 rpm)'de 1 dakika santrifüj edilmi tir. Toplama tüpüne geçen sıvı kısım ile birlikte tüp atılmı tir.
- 'QIAamp Mini Spin Kolon' yeni bir 2 ml toplama tüpüne aktarılmı ve üzerine 500 µL Buffer AW2 eklenmi tir. Tam hızda 20.000 x g (14.000 rpm)'de 3 dakika santrifüj edilmi tir. Toplama tüpüne geçen sıvı kısım ile birlikte tüp atılmı tir.
- 'QIAamp Mini Spin Kolon' yeni bir 2 ml toplama tüpüne (kit haricinde) aktarılmı ve tam hızda 20.000 x g (14.000 rpm)'de 1 dakika santrifüj edilmi tir. Toplama tüpüne geçen sıvı kısım ile birlikte tüp atılmı tir.
- 'QIAamp Mini Spin Kolon' yeni bir 1,5 ml toplama tüpüne (kit haricinde) aktarılmı ve kolona 60 µL Buffer AE veya distile su eklenmi , oda sıcaklı ında (15-25 °C) 5 dakika inkübe edilmi ve takiben 6.000 x g (8.000 rpm)'de 1 dakika santrifüj edilmi tir. Toplama tüpüne geçen DNA solüsyonu temiz bir tüpe aktarılıp -200C'de saklanmı tir.

#### III.2.5. Mitokondriyal DNA Kopya Sayısının Real-Time PCR ile Belirlenmesi

- Mitokondriyal DNA kopya sayısının tespiti için QuantiTech SYBR Green PCR Kit (QIAGEN, Cat. No: 204143) kullanılmı tir.
- Mitokondriyal gen olan MT-ND1 ve nükleer gen olan B2M (beta-2-mikroglobulin) genleri için uygun primer çiftleri (forward ve reverse primerler) tasarlanmı tir.
  - o MT-ND1- geni Forward Primeri: 5'-CCCTAAAACCCGCCACATCT-3'
  - o MT-ND1- geni Reverse Primeri: 5'-GAGCGATGGTGAGAGCTAAGGT-3'
  - o B2M- geni Forward Primeri: 5'-TGCTGTCTCCATGTTTGATGTATCT-3'
  - o B2M- geni Reverse Primeri: 5'-TCTCTGCTCCCCACCTCTAAGT -3'
- Reaksiyon karı ımı a a ıdaki oranlarda hazırlanmı ve real-time PCR tüplerine da ıtılmı tir:

Komponent	Reaksiyon Ba ına Konulan Hacim
2x QuantiTech SYBR Green PCR Master Mix	10 µl
Forward Primer	0.50 µl
Reverse Primer	0.50 µl

DNA	4 µl
H2O	5 µl
Toplam	20 µl

• Her örnek duplike olarak çalı ılımlı ve her reaksiyon NTC (no-template control) e li inde çalı ılımlı tır.

• Real-time PCR (Bio-RADx CFX96) cihazına tüpler yerle tirilmi ve a a ıdaki sıcaklık ve sürelerde reaksiyon gerçekte tirilmi tir:

- o 95°C'de 15 dakika
- o 45 döngü
- o 94°C'de 15 saniye
- o 52°C'de 30 saniye
- o 72°C'de 30 saniye
- o Melting curve analizi için 60-95°C

• Real-time PCR sonuçlarında her bir örnek için duplike reaksiyonların Ct (cycle of threshold) de erlerinin ortalaması alınmı tır. Bu i lem hem mitokondriyal gen olan MT-ND1 (hedef gen) hem de nükleer gen olan B2M (housekeeping gen) için ayrı ayrı hesaplanmı tır. Her bir örne in MT-ND1 geninin ortalama Ct de erinden B2M geninin ortalama Ct de eri çıkarılmı ve böylece her örnek için “ Ct” de erleri hesaplanmı tır.

$$Ct = MT-ND1 \text{ Ortalama Ct De eri} - B2M \text{ Ortalama Ct De eri}$$

• Daha sonra kontrol grubunun ortalama Ct de eri hesaplanmı , her bir örne in Ct de erinden kontrol grubu ortalama Ct de eri çıkarılarak her bir örne e ait Ct de erleri hesaplanmı tır. Son olarak her bir örnek için 2- Ct de erleri hesaplanarak mitokondriyal DNA düzeyleri belirlenmi tir.

$$Ct = \text{Örne e Ait Ct De eri} - \text{Kontrol Grubu Ortalama Ct De eri}$$

$$\text{Mitokondriyal DNA kopya sayısı} = 2^{-Ct}$$

### III.2.6. Ekzozomal RNA izolasyonu

Ekzozomal RNA izolasyonu, 200µl nöronal ekzozom süspansiyonundan Total Exosome RNA and Protein Isolation Kit (Thermo Scientific) kullanılarak gerçekte tirilmi tir.

Total Exosome RNA and Protein Isolation Kit içeri i

Komponent	Miktar	Saklama Ko ulları
miRNA Wash Solution 1 (Kullanımdan önce 21 mL 100% etanol eklenir)	9 mL	Oda sıcaklı ı
Wash Solution 2/3 (Kullanımdan önce 40 mL 100% etanol eklenir)	10 mL	Oda sıcaklı ı
Toplama Tüpleri	2x40 adet	Oda sıcaklı ı
Filtreli Kolonlar	2x40 adet	Oda sıcaklı ı
Exosome Resuspension Buffer	25ml	4 °C
2X Denaturing Solution (Kullanımdan önce 375 µL 2-mercaptoethanol eklenir)	25ml	4 °C
Acid-Phenol:Chloroform	2x25ml	4 °C
Elution Solution	5ml	4 °C

### Solüsyonların Hazırlanması

• 2X Denaturing Solution içine 375 µL 2-mercaptoethanol eklenmi tir. Kullanım öncesi 37 °C'ye getirilmi tir.

- miRNA Wash Solution 1 içine 21 ml 100% etanol eklenmi tir.
- Wash Solution 2/3 içine 40 ml 100% etanol eklenmi tir.

#### RNA zolasyonunun Organik Ekstraksiyon A aması

- 200 µL ekzozom süspansiyonu üzerine 200 µL 2X denaturing solution eklenmi ve iyice karı tırlıdır.
- Karı ım 5 dakika boyunca buz üzerinde inkübe edilmi tir.
- Üzerine 400 µL Acid-Phenol:Chloroform eklenmi ve 30-60 saniye vorteksle karı tırlıdır.
- 12.000 xg'de 5 dakika oda sıcaklı ında santrifüj edilmi tir.
- Dikkatli bir ekilde üstte kalan aköz faz, altta kalan organik fazla karı madan alınmi ve temiz bir mikrosantrifüj tüpüne aktarılmı tir. Aköz fazın hacmi ölçülmü tür.

#### RNA Pürifikasyon A aması

##### a-RNA'nın Ba lanması

- Eldeki hacmin 1.25 katı kadar %100 etanol aköz faz üzerine eklenmi ve iyice karı tırlıdır.
- Karı ımın 700 µL kısmı filtrelı kolon içine alınmi tir. Karı ımın 700 µL'den fazlası için bu basamak aynı filtreden ardı ık olarak geçirilerek tekrarlanmi tir.
- 10.000 xg'de 15 saniye santrifüj edilmi tir. Toplama tüpüne geçen sıvı kısım atılmı ve filtre aynı toplama tüpüne yerle tirilmi tir.

##### b-RNA'nın Yıkanması

- 700 µL 'miRNA Wash Solution 1' filtreye eklenmi tir.
- 10.000 xg'de 15 saniye santrifüj edilmi tir. Toplama tüpüne geçen sıvı kısım atılmı ve filtre aynı toplama tüpüne yerle tirilmi tir.
- Filtreye 500 µL Wash Solution 2/3 eklenmi tir.
- 10.000 xg'de 15 saniye santrifüj edilmi tir. Toplama tüpüne geçen sıvı kısım atılmı ve filtre aynı toplama tüpüne yerle tirilmi tir.
- Filtreye tekrar 500 µL Wash Solution 2/3 eklenmi tir.
- 10.000xg'de 60 saniye santrifüj edilmi tir. Toplama tüpüne geçen sıvı kısım atılmı ve filtre yeni bir toplama tüpüne aktarılmı tir.

##### c- RNA'nın Elüsyonu

- Filtrenin tam ortasına önceden 95°C sıcaklıkta ısıtılmı olan Elution Solution'dan veya nuclease-free sudan 50 µL eklenmi tir.
- 10000 xg'de 30 saniye santrifüj edilmi tir. Toplama tüpüne geçen kısımda RNA bulunmaktadır.
- Elution Solution'dan 50 µL daha filtreye konulmu tur.
- 10000 xg'de 30 saniye santrifüj edilmi tir. Toplama tüpüne geçen kısımda RNA mevcuttur ve kullanıma hazırdır.

### III.2.7. miR-124 Ekspresyonunun Real Time PCR ile Kantifikasyonu

Ekspresyon analizi için 'hsa-miR-124 Real-time RT-PCR Detection Kit' (Cohesion Biosciences) kullanılmı tir.

#### hsa-miR-124 Real-time RT-PCR Detection Kit içeri i

Komponent	200 reaksiyonluk miktar	Saklama
ko ulları		
RT Buffer (5X)	800 µL	4°C
dNTP (10 mM)	160 µL	-20°C
M-MLV Reverse Transcriptase (200 U/µl)	40 µL	-20°C
Real-time PCR Master Mix (2X)	1ml x2	4°C karanlıkta
hsa-mir-124 RT Primer (10µM)	40 µL	4°C

hsa-mir-124 Specific Primer Set (10 µM)	80 µL	4°C
ROX Reference Dye (50X)	400 µL	4°C karanlıkta
Taq DNA Polymerase (5 U/µl)	40 µL	-20°C
PCR enhancer	400 µL	4°C karanlıkta
Synthetic hsa-mir-124 Standard	1 pmol	-20°C
RNase Free H2O	1.5 ml x2	4°C
Steril H2O	1ml	4°C
RNA Dilution Buffer	1ml	4°C

#### Sentetik miRNA Standardı Hazırlama

- Sentetik miR-124 standardı içeren tüp 10.000 x rpm'de 1 dakika santrifüj edilmiştir.
- Üzerine 1 ml RNA Dilution Buffer eklenmiştir. Böylece 1nM stok solüsyonu hazırlanmıştır.
- 1.5 ml bu mikrosantrifüj tüpünde 1nM stok solüsyonundan yeteri kadarı 1:10 oranında RNase-free su ile dilüe edilmiştir (Örneğin, 100 µL stok solüsyonu üzerine 900 µL su). Böylece 0.1 nM çalıtma solüsyonu elde edilmiştir.
- 0.1 nM solüsyondan 1:10 oranında RNase-free su kullanılarak 5-7 kez ardıcıl dilüsyonlar yapılmıştır.

#### miRNA RT Primer Hazırlama

- 10µM RT primer 1:10 oranında gereken miktarda dilüe edilerek 1µM çalıtma solüsyonu elde edilmiştir.

#### RT Reaksiyon Miksi Hazırlama (cDNA Sentezi)

Komponent	Reaksiyon Baına Konulan Volüm
5X RT Master Mix	4 µl
dNTP (10 mM)	0.75 µl
MiR-RT Primers (1 µM)	1.20 µl
MMLV Reverse Transcriptase (200 U/µl)	0.2 µl
RNase inhibitör (20 U/µl)	0.25 µl
Toplam	6.40 µl

- Hazırlanan miks örnek baına 6.40 µl olacak şekilde 0.2 ml PCR tüplerine dağıtılmıştır.
- Üzerlerine 13.60 µl RNA örneği konularak final hacim 20 µl'ye tamamlanmıştır.
- Termal cycleler ile aşağıda belirtilen koşullarda cDNA sentezi gerçekleştirilmiştir.
- 25 °C'de 30 dk
- 42 °C'de 30 dk
- 85 °C'de 5 dk

#### Real Time PCR Miksi Hazırlama

Komponent	Reaksiyon Baına Konulan Volüm
2X Real-time PCR Master Mix	10 µl
miR Specific Primer Set (10 µM)	0.4 µl
PCR enhancer	1 µl
Taq DNA Polymerase (5 U/µl)	0.2 µl
cDNA	2 µl
dH2O	6.4 µl
Toplam	20 µl

Aşağıdaki sıcaklık ve sürelerde Real-time PCR uygulanmıştır.

- 95°C'de 30 dk
- 95°C'de 12 sn
- 62°C'de 40 sn



### Standart Curve Olu turma

- Hazırlanan sentetik miRNA standartlarından iki er µl alınıp 20 µl final hacimde cDNA sentez reaksiyonu gerçekte tirilmi tir.
- Elde edilen cDNA ürünlerinden 4'er µl alınıp 40 µl final hacimde real-time PCR gerçekte tirilmi tir.
- Buradan çıkan sonuçlara göre standart curve olu turulmu tur. A a ıdaki tablo hangi standart solüsyonunda ne kadar kopya sayısı oldu unu göstermektedir.

Standart Solüsyonu	Kopya Sayısı
0.1 nM	6x10 <sup>7</sup>
10 <sup>-2</sup> nM	6x10 <sup>6</sup>
10 <sup>-3</sup> nM	6x10 <sup>5</sup>
10 <sup>-4</sup> nM	6x10 <sup>4</sup>
10 <sup>-5</sup> nM	6x10 <sup>3</sup>
10 <sup>-6</sup> nM	600
10 <sup>-7</sup> nM	60

### III.2.8. miR-27a Ekspresyonunun Real Time PCR ile Kantifikasyonu

Ekspresyon analizi için 'hsa-miR-27a Real-time RT-PCR Detection Kit' (Cohesion Biosciences) kullanılmı tir.

#### hsa-miR-27a Real-time RT-PCR Detection Kit çeri i

Komponent	200 reaksiyonluk miktar	Saklama
ko ulları		
RT Buffer (5X)	800 µL	4°C
dNTP (10 mM)	160 µL	-20°C
M-MLV Reverse Transcriptase (200 U/µl)	40 µL	-20°C
Real-time PCR Master Mix (2X)	1ml x2	4 °C karanlıkta
hsa-mir-27a RT Primer (10µM)	40 µL	4°C
hsa-mir-27a Specific Primer Set (10 µM)	80 µL	4°C
ROX Reference Dye (50X)	400 µL	4°C karanlıkta
rTaq DNA Polymerase (5 U/µl)	40 µL	-20°C
PCR enhancer	400 µL	4°C karanlıkta
Synthetic hsa-mir-27a Standard	1 pmol	-20°C
RNase Free H2O	1.5 ml x2	4°C
Steril H2O	1ml	4°C
RNA Dilution Buffer	1ml	4°C

#### Sentetik miRNA Standardı Hazırlama

- Sentetik miR-27a standardı içeren tüp 10.000 x rpm'de 1 dakika santrifüj edilmi tir.
- Üzerine 1 ml RNA Dilution Buffer eklenmi tir. Böylece 1nM stok solüsyonu hazırlanmı tir.
- 1.5 ml bo mikrofüj tüpünde 1nM stok solüsyonundan yeteri kadarı 1:10 oranında RNase-free su ile dilüe edilmi tir (Örne in, 100 µL stok solüsyonu üzerine 900 µL su). Böylece 0.1 nM çalı ma solüsyonu elde edilmi tir.
- 0.1 nM solüsyondan 1:10 oranında RNase-free su kullanılarak 5-7 kez ardı ık dilüsyonlar yapılmı tir.

#### miRNA RT Primer Hazırlama

- 10 µM RT primer 1:10 oranında gereken miktarda dilüe edilerek 1µM çalı ma solüsyonu elde edilmi tir.

### RT Reaksiyon Miksi Hazırlama (cDNA Sentezi)

Komponent	Reaksiyon Ba ına Konulan Hacim
5X RT Master Mix	4 µl
dNTP (10 mM)	0.75 µl
MiR-RT Primers (1 µM)	1.20 µl
MMLV Reverse Transcriptase (200 U/µl)	0.2 µl
RNase inhibitör (20 U/µl)	0.25 µl
Toplam	6.40 µl

- Hazırlanan mik s örnek ba ına 6.40 µl olacak ekilde 0.2 ml PCR tüplerine da ıtılmı tır.
- Üzerlerine 13.60 µl RNA örne i konularak final hacim 20 µl'ye tamamlanmı tır.
- Termal cyclus ile a a ıda belirtilen ko ullarda cDNA sentezi yapılmı tır.
- 25°C'de 30 dk
- 42°C'de 30 dk
- 85°C'de 5 dk

### Real Time PCR Miksi Hazırlama

Komponent	Reaksiyon Ba ına Konulacak Volüm
2X Real-time PCR Master Mix	10 µl
miR Specific Primer Set (10 µM)	0.4 µl
PCR enhancer	1 µl
Taq DNA Polymerase (5 U/µl)	0.2 µl
cDNA	2 µl
dH2O	6.4 µl
Toplam	20 µl

A a ıdaki sıcaklık ve sürelerde Real-time PCR gerçekte tirilmi tir.

- 95°C'de 30 dk
- 95°C'de 12 sn
- 62°C'de 40 sn

### Standart Curve Olu turma

- Hazırlanan sentetik miRNA standartlarından iki er µl alınıp 20 µl final hacimde cDNA sentezi gerçekte tirilmi tir.
- Elde edilen cDNA ürünlerinden 4'er µl alınıp 40 µl final hacimde real-time PCR gerçekte tirilmi tir.
- Buradan çıkan sonuçlara göre standart curve olu turulur. A a ıdaki tablo hangi standart solüsyonunda ne kadar kopya sayısı oldu unu göstermektedir.

Standart Solüsyonu	Kopya Sayısı
0.1 nM	6x10 <sup>7</sup>
10 <sup>-2</sup> nM	6x10 <sup>6</sup>
10 <sup>-3</sup> nM	6x10 <sup>5</sup>
10 <sup>-4</sup> nM	6x10 <sup>4</sup>
10 <sup>-5</sup> nM	6x10 <sup>3</sup>
10 <sup>-6</sup> nM	600
10 <sup>-7</sup> nM	60

### III.2.9. statistiksel Analiz

Hasta ve kontrol grubu arasındaki kıyaslamalarda Mann Whitney U, hasta grubu içindeki kıyaslamalarda da Kruskal Wallis Varyans Analizi yöntemi kullanılmı tır.

## IV. Analiz ve Bulgular

### IV.1. Hastalara Ait UHDRS Skorları

Hastaların klinik de erlendirilmesi sonunda elde edilen UHDRS skorları Tablo IV.1’de verilmi tir. 80 ve üzeri UHDRS skoru olan 17 hasta bulunurken (tam ba ımsız hastalar)18 hastanın 79 ve altı skora sahip oldu u (ba ımlı hastalar) saptanmı tir. Ba ımlı grupta yer alan 5 hastanın 30 ve altı skora sahip oldu u (tam ba ımlı hastalar) belirlenmi tir.

### IV.2. Hasta ve Kontrol Grubuna Ait Mitokondriyal DNA Düzeyleri

#### IV.2.1. Real-time PCR Uygulamaları

Hasta ve kontrol grubuna ait örnek real-time PCR amplifikasyon e rileri ve melting curve analizi görüntüleri ekil IV.2.1, IV.2.2, IV.2.3 ve IV.2.4’de verilmi tir.

A B  
ekil IV.2.1. Kontrol grubundaki bireylere ait örnek MT-ND1 geni amplifikasyon e rileri (A) ve melting curve analizi görüntüsü (B)

A B  
ekil IV.2.2. Hasta grubundaki bireylere ait örnek MT-ND1 geni amplifikasyon e rileri (A) ve melting curve analizi görüntüsü (B)

A B  
ekil IV.2.3. Kontrol grubundaki bireylere ait örnek B2M geni amplifikasyon e rileri (A) ve melting curve analizi görüntüsü (B)

A B  
ekil IV.2.4. Hasta grubundaki bireylere ait örnek B2M geni amplifikasyon e rileri (A) ve melting curve analizi görüntüsü (B)

#### IV.2.2. Mitokondriyal DNA Düzeyleri

Hasta ve kontrol grubuna ait Ct, Ct ve 2- Ct (mitokondriyal DNA düzeyi) de erleri sırasıyla Tablo IV.1 ve IV.2’de verilmi tir.

Tablo IV.1. Hasta grubuna ait UHDRS skorları, Ct, Ct ve 2- Ct (mitokondriyal DNA düzeyi) de erleri

Hasta Grubu	UHDRS skoru	MT-ND1			B2M					
		Ct	2- Ct (Mitokondriyal DNA düzeyi)	Ct1	Ct2	Ortalama Ct	Ct1	Ct2		
H1	100	21,04	20,84	20,94	36,65	36,23				
H2	100	36,44	-15,50	-4,65	25,11	22,36	22,27	22,32	33,03	33,22
H3	100	33,13	-10,81	0,04	0,97	22,58	22,28	22,43	35,79	35,01

H4	35,40		-12,97	-2,12	4,35				
		100			22,29	22,3	22,30		34,85
	33,87	34,36		-12,07	-1,22	2,32			
H5		100			27,05	27,04	27,05	37,12	36,2
36,66		-9,61	1,24		0,42				
H6		100			22,13	21,84	21,99	28,99	28,81
	28,90		-6,92	3,94		0,07			
H7		100			20,68	21,07	20,88	35,02	36,01
	35,52		-14,64	-3,79	13,83				
H8		100			19,29	19,3	19,30		33,38
	33,07	33,23		-13,93	-3,08	8,46			
H9		90			21,43	21,51	21,47	33,25	33,53
	33,39		-11,92	-1,07	2,10				
H10		90			21,31	21,27	21,29	32,92	30,01
	31,47		-10,18	0,67	0,63				
H11		90			22,59	21,95	22,27	33,74	32,81
	33,28		-11,01	-0,16	1,11				
H12		90			23,42	23,29	23,36	35,76	35,96
	35,86		-12,51	-1,66	3,15				
H13		90			23,12	23,02	23,07	32,16	31,63
	31,90		-8,83	2,03	0,25				
H14		90			19,9	19,74	19,82	38,2	
38,20		-18,38	-7,53	184,82					
H15		80			23,14	23,28	23,21	34,95	35,13
	35,04		-11,83	-0,98	1,97				
H16		80			22,52	23,05	22,79	31,55	31,24
	31,40		-8,61	2,24	0,21				
H17		80			24,82	24,62	24,72	31,31	29,73
	30,52		-5,80	5,05	0,03				
H18		76			21,53	21,43	21,48	33,19	33,45
	33,32		-11,84	-0,99	1,99				
H19		76			23,13	23,12	23,13	36,03	37,75
	36,89		-13,77	-2,92	7,54				
H20		72			20,21	20,07	20,14	37,36	37,17
	37,27		-17,13	-6,28	77,44				
H21		72			22,36	22,13	22,25	33,53	33,83
	33,68		-11,44	-0,59	1,50				
H22		70			23,21	23,08	23,15	33,13	31,94
	32,54		-9,39	1,46	0,36				
H23		64			24,39	24,2	24,30		35,71
	35,39	35,55		-11,26	-0,40	1,32			
H24		60			22,36	22,6	22,48		37,23
	37,12	37,18		-14,70	-3,85	14,37			
H25		60			20,55	20,3	20,43		35,31
	36,21	35,76		-15,34	-4,49	22,39			
H26		56			26,29	26,08	26,19	33,6	
34,42		34,01		-7,83	3,02	0,12			
H27		52			20,78	20,8	20,79		34,02
	33,35	33,69		-12,90	-2,05	4,13			
H28		52			23,31	23,39	23,35	33,99	32,99
	33,49		-10,14	0,71	0,61				
H29		50			22,4	22,12	22,26	32,11	31,78
	31,95		-9,69	1,17	0,45				
H30		48			22,05	21,94	22,00	33,33	32,61

H31	32,97		-10,98	-0,12	1,09				
		30			22,91	22,86	22,89	31,89	34,01
H32	32,95		-10,07	0,78	0,58				
		30			24,37	24,11	24,24	32,78	32,94
H33	32,86		-8,62		2,23	0,21			
		30			23,27	23,14	23,21	33,08	32,32
H34	32,70		-9,50		1,36	0,39			
		28			22,28	22,39	22,34	32,37	32,24
H35	32,31		-9,97		0,88	0,54			
		4			24,13	23,67	23,90	34,81	36,32
	35,57		-11,67	-0,82	1,76				
Ortalama								22,50	
33,98		-11,48	-0,63	11,05					

Tablo IV.2. Kontrol grubuna ait Ct, Ct ve 2- Ct (mitokondriyal DNA düzeyi) de erleri

Kontrol grubu	Ct	Ct	2- Ct	MT-ND1			B2M	
				Ct (Mitokondriyal DNA düzeyi)			Ct1	Ct2
Ortalama Ct				Ct1	Ct2	Ortalama Ct	Ct1	Ct2
K1				23,91	23,77	23,84	33,79	34,99
	34,39		-10,55	0,30	0,81			
K2				22,55	22,43	22,49	34,34	35,57
	34,96		-12,47	-1,62	3,06			
K3				25,04	24,95	25,00	34,22	34,8
	34,51	-9,52	1,34		0,40			
K4				21,49	21,41	21,45	35,7	35,2
	35,45	-14,00	-3,15	8,88				
K5				21,08	21,08	21,08	34,64	33,4
	34,02	-12,94	-2,09	4,26				
K6				20,24	19,84	20,04	35,32	33,72
	34,52		-14,48	-3,63	12,38			
K7				18,56	19,09	18,83	30,63	31,45
	31,04		-12,22	-1,37	2,58			
K8				21,69	20,22	20,96	32,69	32,12
	32,41		-11,45	-0,60	1,52			
K9				22,67	22,83	22,75	33,19	31,81
	32,50		-9,75	1,10	0,47			
K10				24,09	24,08	24,09	32,8	
	32,56	32,68	-8,60	2,26	0,21			
K11				23,19	23,08	23,14	32,35	32,33
	32,34		-9,21	1,64	0,32			
K12				23,37	23,28	23,33	31,13	31,78
	31,46		-8,13	2,72	0,15			
K13				22,32	21,98	22,15	33,26	33,92
	33,59		-11,44	-0,59	1,51			
K14				20,02	20,09	20,06	35,33	35,18
	35,26		-15,20	-4,35	20,39			
K15				22,31	22,17	22,24	34,15	35,03
	34,59		-12,35	-1,50	2,83			
K16				22,2	22,28	22,24	20,36	20,14
	20,25		1,99	12,84	0,00			

K17				22,15	20,68	21,42	32,24	33,9
33,07	-11,66	-0,81	1,75					
K18				22,34	22,4	22,37		32,62
	34,18	33,40		-11,03	-0,18	1,13		
K19				22,35	22	22,18		35,37
	33,27	34,32		-12,15	-1,30	2,45		
K20				21,69	21,7	21,70		33,63
	33,67	33,65		-11,96	-1,11	2,15		
Ortalama							22,07	
32,92	-10,85	0,00	3,36					

#### IV.2.3. miR-27a ve miR-124 düzeyleri

Farklı kitlelerle defalarca tekrarlanan denemelere rağmen hasta ve kontrol grubunda miR-27a ve miR-124 düzeylerine ait real-time PCR reaksiyonlarından sonuç alınamamıştır.

#### IV.2.4. istatistiksel Analiz

Mitokondriyal DNA düzeyleri arasındaki istatistiksel analiz için hasta grubunda iki farklı şekilde sınıflandırma yapılmıştır:

- UHDRS skoru 80 ve üzeri olanlar (tam bağımsız olanlar) – UHDRS skoru 79 ve altı olanlar (bağımlı olanlar)
- UHDRS skoru 80 ve üzeri olanlar (tam bağımsız olanlar) – UHDRS skoru 30 ve altı olanlar (tam bağımlı olanlar)

Kontrol grubu ile birlikte yukarıda belirtildiği şekilde sınıflandırılan hasta gruplarına ait mitokondriyal DNA düzeyleri arasında istatistiksel analizler gerçekleştirilmiştir.

- Kontrol grubu ile tüm hasta grubu arasında yapılan analizde fark bulunamamıştır (Mann Whitney U testi).
- UHDRS skoru 80 ve üzeri olanlar ile UHDRS skoru 79 ve altı olanlar arasında fark bulunamamıştır. Yine bu gruplarla kontrol grubu arasında yapılan analizlerde de fark bulunamamıştır (Kruskal Wallis Varyans Analizi).
- UHDRS skoru 80 ve üzeri olanlar ile UHDRS skoru 30 ve altı olanlar arasında fark bulunamamıştır. Yine bu gruplarla kontrol grubu arasında yapılan analizlerde de fark bulunamamıştır (Kruskal Wallis Varyans Analizi).

### V. Sonuç ve Öneriler

Çalışmamızda hasta ve kontrol grubu arasında mitokondriyal DNA düzeyleri arasında fark bulunamamıştır. Hasta grubunun kendi içinde yapılan kıyaslamalarda da fark bulunamamıştır.

Huntington hastalığında mitokondriyal harabiyet olduğu bilinen bir gerçektir. Bu nedenle sağlıklı bireylere kıyasla hasta bireylerde mitokondriyal DNA düzeylerinde azalma ya da artma, her iki yönde de olabilecek bir farkın, kolaylıkla öngörülebilecek bir durum olduğu düşünülmektedir. Buna rağmen gerek hasta-kontrol grupları arasında, gerekse hastalığın erken ve ileri dönemleri arasında fark bulunamamasının nedeninin olgu sayılarının azlığı olduğu düşünülmüştür. Çalışmanın daha yüksek olgu sayıları ile gerçekleştirilmesi halinde bu farkın gösterilebileceği öngörülmektedir.

### VI. Gelecekteki Öngörülen Katkıları

Literatürde ekzozomal mitokondriyal DNA ile yapılan çalışmalar bulunmakla birlikte nöron kökenli ekzozomlarda mitokondriyal DNA ile yapılan bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu nedenle bu çalışmamız, nöron kökenli ekzozomlarda mitokondriyal DNA'nın varlığını göstermekle birlikte mitokondriyal disfonksiyon/harabiyetle seyreden çok sayıda hastalık grubunda da bu konuda çalışmaların yapılabileceğini göstermiştir.

**VII. Sa lanan Altyapı Olanakları ile Varsa Gerçekle tirilen Projeler**

Proje kapsamında sadece sarf malzemesi alımı yapılmı tır.

**VIII. Sa lanan Altyapı Olanaklarının Varsa Bilim/Hizmet ve E itim Alanlarındaki Katkıları**

Proje kapsamında sadece sarf malzemesi alımı yapılmı tır.

## IX. Kaynaklar

1. Ho, A.K., A.O. Robbins, and R.A. Barker, Huntington's disease patients have selective problems with insight. *Movement Disorders*, 2006. 21(3): p. 385-389.
2. Warby, S.C., R.K. Graham, and M.R. Hayden, Huntington disease. 2014.
3. Squitieri, F., M. Cannella, and M. Simonelli, CAG mutation effect on rate of progression in Huntington's disease. *Neurological Sciences*, 2002. 23(2): p. s107-s108.
4. MacDonald, M.E., et al., A novel gene containing a trinucleotide repeat that is expanded and unstable on Huntington's disease chromosomes. *Cell*, 1993. 72(6): p. 971-983.
5. Leavitt, B.R., et al., Wild-type huntingtin reduces the cellular toxicity of mutant huntingtin in vivo. *The American Journal of Human Genetics*, 2001. 68(2): p. 313-324.
6. Gil, J.M. and A.C. Rego, Mechanisms of neurodegeneration in Huntington's disease. *European Journal of Neuroscience*, 2008. 27(11): p. 2803-2820.
7. Packer, A.N., et al., The bifunctional microRNA miR-9/miR-9\* regulates REST and CoREST and is downregulated in Huntington's disease. *Journal of Neuroscience*, 2008. 28(53): p. 14341-14346.
8. Hodges, A., et al., Regional and cellular gene expression changes in human Huntington's disease brain. *Human molecular genetics*, 2006. 15(6): p. 965-977.
9. Johnson, R., et al., A microRNA-based gene dysregulation pathway in Huntington's disease. *Neurobiology of disease*, 2008. 29(3): p. 438-445.
10. DiFiglia, M., et al., Aggregation of huntingtin in neuronal intranuclear inclusions and dystrophic neurites in brain. *Science*, 1997. 277(5334): p. 1990-1993.
11. Yadav, S. and M.G. Tapadia, Neurodegeneration caused by polyglutamine expansion is regulated by P-glycoprotein in *Drosophila melanogaster*. *Genetics*, 2013. 195(3): p. 857-870.
12. Lin, J., et al., Exosomes: novel biomarkers for clinical diagnosis. *The scientific world journal*, 2015. 2015.
13. Sarko, D.K. and C.E. McKinney, Exosomes: Origins and therapeutic potential for neurodegenerative disease. *Frontiers in neuroscience*, 2017. 11: p. 82.
14. Pan, B.-T. and R.M. Johnstone, Fate of the transferrin receptor during maturation of sheep reticulocytes in vitro: selective externalization of the receptor. *Cell*, 1983. 33(3): p. 967-978.
15. Pan, B.-T., et al., Electron microscopic evidence for externalization of the transferrin receptor in vesicular form in sheep reticulocytes. *The Journal of cell biology*, 1985. 101(3): p. 942-948.
16. Simons, M. and G. Raposo, Exosomes—vesicular carriers for intercellular communication. *Current opinion in cell biology*, 2009. 21(4): p. 575-581.
17. Ersöz, E., O.B. Can, and S. Uzuno lu, Eksozomların Kanserdeki Rolü. *CBU-SBED Celal Bayar Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 2016. 3(1): p. 144-152.
18. Théry, C., L. Zitvogel, and S. Amigorena, Exosomes: composition, biogenesis and function. *Nature Reviews Immunology*, 2002. 2(8): p. 569.
19. Cocucci, E. and J. Meldolesi, Ectosomes and exosomes: shedding the confusion between extracellular vesicles. *Trends in cell biology*, 2015. 25(6): p. 364-372.
20. Zhang, J., et al., Exosome and exosomal microRNA: trafficking, sorting, and function. *Genomics, proteomics & bioinformatics*, 2015. 13(1): p. 17-24.
21. Gruenberg, J. and F.G. Van der Goot, Mechanisms of pathogen entry through the endosomal compartments. *Nature reviews Molecular cell biology*, 2006. 7(7): p. 495.
22. Stoorvogel, W., et al., The biogenesis and functions of exosomes. *Traffic*, 2002. 3(5): p. 321-330.
23. Simpson, R.J., S.S. Jensen, and J.W. Lim, Proteomic profiling of exosomes: current perspectives. *Proteomics*, 2008. 8(19): p. 4083-4099.
24. Levy, E., Exosomes in the diseased brain: first insights from in vivo studies. *Frontiers in neuroscience*, 2017. 11: p. 142.
25. Kanninen, K.M., et al., Exosomes as new diagnostic tools in CNS diseases. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*, 2016. 1862(3): p. 403-410.
26. Li, X., et al., Nano carriers for drug transport across the blood–brain barrier. *Journal of drug targeting*, 2017. 25(1): p. 17-28.



27. Record, M., et al., Exosomes as intercellular signalosomes and pharmacological effectors. *Biochemical pharmacology*, 2011. 81(10): p. 1171-1182.
28. Didiot, M.-C., et al., Exosome-mediated delivery of hydrophobically modified siRNA for Huntingtin mRNA silencing. *Molecular Therapy*, 2016. 24(10): p. 1836-1847.
29. Li, M., et al., Analysis of the RNA content of the exosomes derived from blood serum and urine and its potential as biomarkers. *Phil. Trans. R. Soc. B*, 2014. 369(1652): p. 20130502.
30. Bartel, D.P., MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *cell*, 2004. 116(2): p. 281-297.
31. Yang, Y. and C. Liang, MicroRNAs: an emerging player in autophagy. *ScienceOpen research*, 2015. 2015.
32. Hernandez-Rapp, J., S. Rainone, and S.S. Hébert, MicroRNAs underlying memory deficits in neurodegenerative disorders. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 2017. 73: p. 79-86.
33. Valadi, H., et al., Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nature cell biology*, 2007. 9(6): p. 654.
34. Smirnova, L., et al., Regulation of miRNA expression during neural cell specification. *European Journal of Neuroscience*, 2005. 21(6): p. 1469-1477.
35. Rajasethupathy, P., et al., Characterization of small RNAs in *Aplysia* reveals a role for miR-124 in constraining synaptic plasticity through CREB. *Neuron*, 2009. 63(6): p. 803-817.
36. Yang, Y., et al., EPAC null mutation impairs learning and social interactions via aberrant regulation of miR-124 and Zif268 translation. *Neuron*, 2012. 73(4): p. 774-788.
37. Makeyev, E.V., et al., The MicroRNA miR-124 promotes neuronal differentiation by triggering brain-specific alternative pre-mRNA splicing. *Molecular cell*, 2007. 27(3): p. 435-448.
38. Malmevik, J., et al., Distinct cognitive effects and underlying transcriptome changes upon inhibition of individual miRNAs in hippocampal neurons. *Scientific reports*, 2016. 6: p. 19879.
39. Martí, E., et al., A myriad of miRNA variants in control and Huntington's disease brain regions detected by massively parallel sequencing. *Nucleic acids research*, 2010. 38(20): p. 7219-7235.
40. Lee, S.-T., et al., Exosome-based delivery of miR-124 in a Huntington's disease model. *Journal of movement disorders*, 2017. 10(1): p. 45.
41. Lievens, J.-C., et al., Impaired glutamate uptake in the R6 Huntington's disease transgenic mice. *Neurobiology of disease*, 2001. 8(5): p. 807-821.
42. Morel, L., et al., Neuronal exosomal miRNA-dependent translational regulation of astroglial glutamate transporter GLT1. *Journal of Biological Chemistry*, 2013. 288(10): p. 7105-7116.
43. Im, W., et al., Multidrug resistance protein 1 reduces the aggregation of mutant huntingtin in neuronal cells derived from the Huntington's disease R6/2 model. *Scientific reports*, 2015. 5: p. 16887.
44. Katayama, K., K. Noguchi, and Y. Sugimoto, Regulations of P-glycoprotein/ABCB1/MDR1 in human cancer cells. *New Journal of Science*, 2014. 2014.
45. Vaidyanathan, A., et al., ABCB1 (MDR1) induction defines a common resistance mechanism in paclitaxel-and olaparib-resistant ovarian cancer cells. *British journal of cancer*, 2016. 115(4): p. 431.
46. Cirrito, J.R., et al., P-glycoprotein deficiency at the blood-brain barrier increases amyloid-deposition in an Alzheimer disease mouse model. *The Journal of clinical investigation*, 2005. 115(11): p. 3285-3290.
47. Wang, W., A. M Bodles-Brakhop, and S. W Barger, A role for P-glycoprotein in clearance of Alzheimer amyloid  $\beta$ -peptide from the brain. *Current Alzheimer research*, 2016. 13(6): p. 615-620.
48. Toornvliet, R., et al., Effect of age on functional P glycoprotein in the blood brain barrier measured by use of (R) [11C] verapamil and positron emission tomography. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, 2006. 79(6): p. 540-548.
49. Lee, S.-T., et al., Altered microRNA regulation in Huntington's disease models. *Experimental neurology*, 2011. 227(1): p. 172-179.
50. Ban, J.-J., et al., MicroRNA-27a reduces mutant huntingtin aggregation in an in vitro model of Huntington's disease. *Biochemical and biophysical research communications*, 2017. 488(2): p. 316

-321.

51. Farshbaf, M.J. and K. Ghaedi, Huntington's Disease and Mitochondria. *Neurotoxicity research*, 2017. 32(3): p. 518-529.
52. Guedes-Dias, P., et al., HDAC6 inhibition induces mitochondrial fusion, autophagic flux and reduces diffuse mutant huntingtin in striatal neurons. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*, 2015. 1852(11): p. 2484-2493.
53. Pellman, J.J., et al., Ca<sup>2+</sup> handling in isolated brain mitochondria and cultured neurons derived from the YAC128 mouse model of Huntington's disease. *Journal of neurochemistry*, 2015. 134(4): p. 652-667.
54. Brustovetsky, N., Mutant huntingtin and elusive defects in oxidative metabolism and mitochondrial calcium handling. *Molecular neurobiology*, 2016. 53(5): p. 2944-2953.
55. Estaquier, J. and D. Arnoult, Inhibiting Drp1-mediated mitochondrial fission selectively prevents the release of cytochrome c during apoptosis. *Cell death and differentiation*, 2007. 14(6): p. 1086.
56. Smirnova, E., et al., A human dynamin-related protein controls the distribution of mitochondria. *The Journal of cell biology*, 1998. 143(2): p. 351-358.
57. Zhang, Y. and D.C. Chan, Structural basis for recruitment of mitochondrial fission complexes by Fis1. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2007. 104(47): p. 18526-18530.
58. Otera, H., et al., Mff is an essential factor for mitochondrial recruitment of Drp1 during mitochondrial fission in mammalian cells. *The Journal of cell biology*, 2010. 191(6): p. 1141-1158.
59. Losón, O.C., et al., Fis1, Mff, MiD49, and MiD51 mediate Drp1 recruitment in mitochondrial fission. *Molecular biology of the cell*, 2013. 24(5): p. 659-667.
60. Santel, A., et al., Mitofusin-1 protein is a generally expressed mediator of mitochondrial fusion in mammalian cells. *Journal of cell science*, 2003. 116(13): p. 2763-2774.
61. Ono, T., et al., Human cells are protected from mitochondrial dysfunction by complementation of DNA products in fused mitochondria. *Nature genetics*, 2001. 28(3): p. 272.
62. Chen, H., A. Chomyn, and D.C. Chan, Disruption of fusion results in mitochondrial heterogeneity and dysfunction. *Journal of Biological Chemistry*, 2005. 280(28): p. 26185-26192.
63. Choo, Y.S., et al., Mutant huntingtin directly increases susceptibility of mitochondria to the calcium-induced permeability transition and cytochrome c release. *Human molecular genetics*, 2004. 13(14): p. 1407-1420.
64. Bossy-Wetzell, E., A. Petrelli, and A.B. Knott, Mutant huntingtin and mitochondrial dysfunction. *Trends in neurosciences*, 2008. 31(12): p. 609-616.
65. Trushina, E., et al., Mutant huntingtin impairs axonal trafficking in mammalian neurons in vivo and in vitro. *Molecular and cellular biology*, 2004. 24(18): p. 8195-8209.
66. Ismailoglu, I., et al., Huntingtin protein is essential for mitochondrial metabolism, bioenergetics and structure in murine embryonic stem cells. *Developmental biology*, 2014. 391(2): p. 230-240.
67. Tak, H., et al., miR-27 regulates mitochondrial networks by directly targeting the mitochondrial fission factor. *Experimental & molecular medicine*, 2014. 46(11): p. e123.
68. Ashrafi, G. and T.L. Schwarz, PINK1-and PARK2-mediated local mitophagy in distal neuronal axons. *Autophagy*, 2015. 11(1): p. 187-189.
69. Martinez-Vicente, M., et al., Cargo recognition failure is responsible for inefficient autophagy in Huntington's disease. *Nature neuroscience*, 2010. 13(5): p. 567.
70. Kim, J., et al., miR-27a and miR-27b regulate autophagic clearance of damaged mitochondria by targeting PTEN-induced putative kinase 1 (PINK1). *Molecular neurodegeneration*, 2016. 11(1): p. 55.
71. Johri, A., A. Chandra, and M.F. Beal, PGC-1<sup>-/-</sup>, mitochondrial dysfunction, and Huntington's disease. *Free Radical Biology and Medicine*, 2013. 62: p. 37-46.
72. Cui, L., et al., Transcriptional repression of PGC-1<sup>β</sup> by mutant huntingtin leads to mitochondrial dysfunction and neurodegeneration. *Cell*, 2006. 127(1): p. 59-69.
73. Weydt, P., et al., Thermoregulatory and metabolic defects in Huntington's disease transgenic mice implicate PGC-1<sup>β</sup> in Huntington's disease neurodegeneration. *Cell metabolism*, 2006. 4(5): p.

349-362.

74. McGill, J.K. and M.F. Beal, PGC-1 , a new therapeutic target in Huntington's disease? Cell, 2006. 127(3): p. 465-468.

75. Malik, A.N. and A. Czajka, Is mitochondrial DNA content a potential biomarker of mitochondrial dysfunction? Mitochondrion, 2013. 13(5): p. 481-492.

76. Liu, T., et al., MicroRNA-124 slows down the progression of Huntington's disease by promoting neurogenesis in the striatum. Neural regeneration research, 2015. 10(5): p. 786.

77. Liu, C.-S., et al., Depletion of mitochondrial DNA in leukocytes of patients with poly-Q diseases. Journal of the neurological sciences, 2008. 264(1): p. 18-21.

78. J drak, P., et al., Mitochondrial DNA levels in Huntington disease leukocytes and dermal fibroblasts. Metabolic brain disease, 2017. 32(4): p. 1237-1247.

79. Petersen, M.H., et al., Reduction in mitochondrial DNA copy number in peripheral leukocytes after onset of Huntington's disease. Mitochondrion, 2014. 17: p. 14-21.

80. Chen, C.-M., et al., Increased oxidative damage and mitochondrial abnormalities in the peripheral blood of Huntington's disease patients. Biochemical and biophysical research communications, 2007. 359(2): p. 335-340.

81. Lee, H.-C., et al., Increase of mitochondria and mitochondrial DNA in response to oxidative stress in human cells. Biochemical journal, 2000. 348(Pt 2): p. 425.

82. Kang, D. and N. Hamasaki, Alterations of mitochondrial DNA in common diseases and disease states: aging, neurodegeneration, heart failure, diabetes and cancer. Current medicinal chemistry, 2005. 12(4): p. 429-441.

83. BAI, R.K., et al., Quantitative PCR analysis of mitochondrial DNA content in patients with mitochondrial disease. Annals of the New York Academy of Sciences, 2004. 1011(1): p. 304-309.

## **X. Ekler**

a) Mali Bilanço ve Açıklamaları:

Proje kapsamında sadece sarf malzemesi alımı yapılmı tır.

b) Makine ve Teçhizatın Konumu ve lerideki Kullanımına Dair Açıklamalar:

Proje kapsamında makine / teçhizat alımı yapılmamı tır.

c) Teknik ve Bilimsel Ayrıntılar :

d) Sunumlar (bildiriler ve teknik raporlar) (**Altyapı ve Yönlendirilmi Projeler için uygulanmaz**):

e) Yayınlar (hakemli bilimsel dergiler) ve tezler (**Altyapı ve Yönlendirilmi Projeler için uygulanmaz**):