

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ALZHEİMER VE PARKİNSON HASTALIĞI İÇİN BİYOMARKIR GELİŞTİRİLMESİ

ERDEN EREN

TEMEL SİNİRBİLİMLER
DOKTORA TEZİ

İZMİR-2018

TEZ KODU: DEU.HSI.PhD-2013970192

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ALZHEİMER VE PARKİNSON HASTALIĞI İÇİN BİYOMARKIR GELİŞTİRİLMESİ

TEMEL SİNİRBİLİMLER
DOKTORA TEZİ

ERDEN EREN

Danışman Öğretim Üyesi: Prof. Dr. Şermin GENÇ

Bu araştırma Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK) tarafından
112S335 ve 110S146 proje numaralarıyla desteklenmiştir.

TEZ KODU: DEU.HSI.PhD-2013970192

Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Sinirbilimler Anabilim Dalı, Temel Sinirbilimler Doktora programı öğrencisi Erden EREN ‘**Alzheimer ve Parkinson Hastalığı İçin Biyomarkör Geliştirilmesi**’ konulu Doktora tezini 06/02/2018 tarihinde başarılı olarak tamamlamıştır.

Prof. Dr. Görsev YENER
BAŞKAN
(DEÜ Tıp Fakültesi)

Prof. Dr. Şermin GENÇ (Danışman)
ASİL ÜYE
(DEÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü)

Prof. Dr. Pınar AKAN
ASİL ÜYE
(DEÜ Tıp Fakültesi)

Prof. Dr. İbrahim ÖZTURA
ASİL ÜYE
(DEÜ Tıp Fakültesi)

Prof. Dr. M. Cengiz TATAROĞLU
ASİL ÜYE
(ADÜ Tıp Fakültesi)

Yrd. Doç. Dr. Çiğdem TOSUN
ASİL ÜYE
(İYTE Fen Fakültesi)

Yrd. Doç. Dr. Yavuz OKTAY
YEDEK ÜYE
(DEÜ Tıbbi Biyoloji ABD)

Doç. Dr. Petek BALLAR KIRMIZIBAYRAK
YEDEK ÜYE
(EÜ Eczacılık Fakültesi)

İÇİNDEKİLER

İÇİNDEKİLER	i
TABLolar DİZİNİ	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ	v
KISALTMALAR	vi
TEŞEKKÜR	viii
ÖZET	1
ABSTRACT	3
1. GİRİŞ VE AMAÇ	5
1.1. Problemin Tanımı ve Önemi	5
1.2. Araştırmanın amaçları	6
1.3. Araştırmanın Hipotezleri	6
2. GENEL BİLGİLER	7
2.1. Alzheimer Hastalığı	7
2.1.1. Klinik	7
2.1.2. Patoloji	7
2.1.3. Risk Faktörleri	10
2.1.4. Tanı	11
2.1.5. Alzheimer Hastalığında miRNA'lar	11
2.2. Parkinson Hastalığı	13
2.2.1. Klinik	13
2.2.2. Patoloji	14
2.2.3. Genetik	14
2.2.4. Risk Faktörleri	15
2.2.5. Tanı	16
2.3. MikroRNA	16
2.3.1. Biyogenez	17
2.3.2. Regülasyon	19
2.4. Eksozom	19

2.4.1.	Eksozom Biyogenezi	20
2.5.	Biyobelirteç.....	21
2.5.1.	Görüntüleme Biyobelirteçleri	22
2.5.2.	Biyokimyasal Biyobelirteçler	23
2.5.3.	Yeni biyobelirteç adayları.....	25
3.	GEREÇ VE YÖNTEM.....	27
3.1.	Araştırmanın Tipi.....	27
3.2.	Araştırmanın Yeri ve Zamanı	27
3.3.	Araştırmanın Evreni ve Örneklemi/Çalışma Grupları	27
3.4.	Çalışma Materyali.....	27
3.5.	Araştırmanın Değişkenleri	27
3.6.	Veri Toplama Araçları	28
3.6.1.	Alzheimer Hastalığı için Yöntemler	28
3.6.1.1.	Olgu Veri Kayıt Formları.....	28
3.6.1.2.	Nöropsikolojik Veri Toplama	28
3.6.1.3.	BOS'ta A β ₍₁₋₄₂₎ ve pTau _(181p) Düzeylerinin Ölçümleri.....	28
3.6.1.4.	Serumdan Eksozom İzolasyonu.....	29
3.6.1.5.	Dinamik Işık Saçılım (DLS) Analizi	30
3.6.1.6.	Eksozomların Kantitatif Ölçümü	30
3.6.1.7.	Serumda ve eksozomlarda bulunan total RNA'ların izolasyonu.....	30
3.6.1.8.	Komplementer DNA (cDNA) Sentezi	31
3.6.1.9.	Gerçek Zamanlı Kantitatif PCR (qPCR) Analizi.....	32
3.6.1.10.	Biyoinformatik Analizi	33
3.6.2.	Parkinson Hastalığı için Yöntemler	33
3.6.2.1.	BOS'ta α -sinüklein Düzeylerinin Ölçümü.....	33
3.7.	Araştırma Planı ve Takvimi	34
3.8.	Verilerin Değerlendirilmesi	34
3.9.	Araştırmanın Sınırlılıkları.....	35
3.10.	Etik Kurul Onayı.....	35
4.	BULGULAR.....	36
4.1.	Demografik veriler.....	36
4.2.	Alzheimer Hastalığı için Bulgular	36

4.2.1.	Alzheimer hastalığında mikroarray yöntemi ile belirlenen serum miRNA'lar ...	36
4.2.2.	Seçilmiş ifadesi değişen miRNA'ların yeni hasta grubunun serum örneklerindeki seviyelerinin belirlenmesi	37
4.2.3.	Serumdan elde edilmiş eksozomlarda miRNA'ların seviyelerinin incelenmesi..	39
4.2.4.	İfadesi anlamlı olarak değişen miRNA'ların biyoinformatik araçlarla hedef yollarının belirlenmesi	41
4.2.5.	miRNA seviyelerinin klinik parametreler ile korelasyonlarının değerlendirilmesi	42
4.2.6.	Demans tanısında miRNA'ların potansiyel biyobelirteç olarak değerlendirilmesi	43
4.2.7.	Ventriküler hacimlerinin AH biyobelirteçlerinin tanısal değerlerine etkisi	45
4.3.	Parkinson Hastalığı için Bulgular	45
4.3.1.	Parkinson hastalarında alfa-sinüklein seviyelerinin belirlenmesi	45
5.	TARTIŞMA	47
5.1.	Alzheimer Hastalığı	47
5.2.	Parkinson Hastalığı	51
6.	SONUÇ VE ÖNERİLER.....	52
7.	KAYNAKLAR	53
8.	EKLER	67

TABLÖLER DİZİNİ

Tablo 1: AH'de ifadesi değişen miRNA'lardan bazıları.....	12
Tablo 2. cDNA sentezlemek için gerekli malzemeler ve miktarları	31
Tablo 3. qPCR reaksiyonu için gerekli malzemeler ve miktarları	32
Tablo 4. Analizde kullanılan miRNA primerleri	32
Tablo 5: Hasta ve Kontrol grubunun demografik verileri.....	36
Tablo 6: Mikroarray analizi ile belirlenen ifadesi değişmiş miRNA'lar	37
Tablo 7. miRNA'ların klinik veriler ile korelasyonu.	43
Tablo 8. Serum ve Eksozom miRNA'ları için ROC analizi.	44



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. Serum ve Eksozomlarda seviyesi ölçülen miRNA'ların normalize edilmiş Ct değerlerinin heatmap gösterimi.....	38
Şekil 2. Farklı hasta gruplarının serumdaki miRNA seviyeleri.....	39
Şekil 3. Eksozomların karakterizasyonu.....	40
Şekil 4. Farklı hasta gruplarının serumdan elde edilen eksozomlarındaki miRNA seviyeleri.....	41
Şekil 5. Alzheimer hastalığında anlamlı olarak değişimi tespit edilen miRNA'ların tahmini hedefleri.	42
Şekil 6. Parkinson hastalarının BOS örneklerindeki farklı seyreltme oranlarında alfa-sinüklein seviyesi.....	46

KISALTMALAR

¹²³I-FP-CIT: ¹²³I-N-3floropropil-2betakarbometoksi-3beta-4-İodofenil

AA: Amino asit

AH: Alzheimer Hastalığı

APOE: Apolipoprotein E

APP: Amiloid öncül proteini (Amyloid Precursor Protein)

ATP13A2: Probable cation-transporting ATPase 13A2

AUC: Eğri Altında Kalan Alan

Aβ: Beta Amiloid

BACE1: Beta-sekretaz 1

BOS: Beyin omurilik sıvısı

BT: Bilgisayarlı Tomografi

cDNA: Komplementer DNA

CTF83: C-terminal Fragment 83

DAT-SPECT: Dopamin taşıyıcı Tek Foton Emisyon Bilgisayarlı Tomografi

DGCR8: DiGeorge sendrom kritik bölge gen 8

DJ-1: Parkinson disease protein 7

DLS: Dinamik Işık Saçılımı

DSM-IV: Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders 4th Edition

dsRNA: Çift sarmallı RNA

ELISA: Enzyme-linked Immunosorbent Assay

ESCRT: Endosomal sorting compex required for transport

FAH: Erken yaş başlangıçlı ailesel Alzheimer hastalığı

FBXO7: F-box only protein 7

FDG: 18 Florodeoksiglukoz

FTD: Frontotemporal Demans

GBA: Glukoserebrosidaz

GWAS: Genom çapında ilişkilendirme çalışmaları (Genome-wide association studies)

HKB: Hafif Kognitif Bozukluk

ILV: Intralüminal veziküller

KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes

LC: Lewy Cisimciği
LRRK2: Leucine Rich repeat kinase 2
MAPT: microtubule associated protein tau
miRNA: mikroRNA
MRG: Manyetik Rezonans Görüntüleme
MVC: Multiveziküler cisimler
NfL: Neurofilament light chain
NINCDS-ADRDA: National Institute of Neurological and Communicative Disorders and Stroke and Alzheimer's disease and Related Disorders Association
PARN: Poli(A)-özümlü ribonükleaz
PET: Pozitron Emisyon Tomografisi
PH: Parkinson Hastalığı
PINK1: PTEN induced kinaz 1
PLA2GB: Fosfolipaz A2, grup VI
PRKN: Parkin
PSEN1: Presenilin 1
PSEN2: Presenilin 2
pTau: Hiperfosforile tau
qPCR: Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RISC: RNA induced silencing complex
ROC: Receiver Operating Characteristic
sAPP α : Solüblü APP alfa
SMMT: Standardize Mini Mental Test
SNpc: Substansiya Nigra pars kompakta
TACE: TNF-alfa dönüştürücü enzim (TNF-alpha converting enzyme)
TNP: Tek nükleotid polimorfizm
TRBP: TAR-RNA bağlanan protein
TREM2: Triggering receptor expressed on myeloid cell 2
tTau: Toplam tau
UTR: Translasyon olmayan bölge (Untranslated Region)
VSP35: Vacuolar protein sorting 35

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim boyunca; tezin projelendirme, uygulama ve yazım aşamalarında yardımcı olan, bizden bilimsel bilgi, birikim ve deneyimlerini esirgemeyen ve bana her türlü konuda yardımcı olan değerli danışman hocam Prof. Dr. Şermin GENÇ'e,

Yoğun programına rağmen çalışma kaynağını sağlayan ve yardımını hiçbir zaman esirgemeyen değerli hocam Prof. Dr. Görsev YENER'e,

Çalışmamızın istatistiksel ve veri kontrolleri konusunda yardımlarını esirgemeyen Prof. Dr. Pembe KESKİNOĞLU'na,

Çalışmamın süresi boyunca benden hiçbir yardımını esirgemeyen hem takım arkadaşlarım Dr. Kemal Uğur TÜFEKÇİ ve Kamer Burak İŞÇİ'ye, hem de manevi olarak hep destek olan, Dr. Ufuk VURGUN, Bora TAŞTAN ve Burak ARIÖZ'e

Beni bugüne kadar hep destekleyen, yanımda olan ve bugüne kadar sahip olduğum her şey için aileme,

Bu yolculukta hiçbir zaman yanımdan ayrılmayan, en zor zamanlarda bile pozitif düşünmemi sağlayan ve yaptığım her şeyde desteğini esirgemeyen nişanlım Tülay KARAKULAK'a

Projeyi maddi açıdan destekleyen TÜBİTAK'a teşekkürü bir borç bilir ve saygılarımı sunarım.

ALZHEİMER VE PARKİNSON HASTALIĞI İÇİN BİYOMARKIR GELİŞTİRİLMESİ

Erden Eren, Dokuz Eylül Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Sinirbilimler Anabilim
Dalı, 35340, İnciraltı, İzmir

ÖZET

Amaç: Alzheimer hastalığı (AH) ve Parkinson hastalığı (PH) günümüzde en sık görülen nörodejeneratif hastalıklardır ve kesin tanıları ancak post-mortem beyin dokusunun histopatolojik incelemesiyle mümkündür. Günümüzde bu hastalıklarda kesin tanı için biyobelirteç bulunmamaktadır. Ancak, dolaşımda bulunan mikroRNA (miRNA)'lar gibi yeni biyobelirteç adayları araştırılmaktadır. miRNA'lar, 20-22 nükleotid uzunluğunda kodlamayan küçük RNA molekülleri olarak tanımlanmaktadır. Ayrıca, miRNA'lar vücut sıvıları ve eksozomlar gibi mikroveziküllerin içinde de bulunabilmektedir. Bu özellikleri dolayı son yıllarda biyobelirteç alanında ilgi çekmektedirler. Bu çalışmada güncel biyobelirteçlerin standardizasyonu ve yeni AH biyobelirteçlerin geliştirilmesi amaçlanmıştır

Yöntem: Laboratuvarımız tarafından yapılan mikroarray çalışmasından elde edilen sonuçları doğrulamak için bağımsız bir hasta örnekleminde (AH=24, FTD=17 ve Kontrol=29) serum ve eksozomal miRNA'ları gerçek zamanlı PCR ile inceledik. DIANA miRPath v3.0 sunucusu kullanılarak miRNA'ların olası hedef yolları belirlendi. "Receiver operating characteristic" (ROC) analizi kullanılarak miRNA'ların tanısal değerleri incelendi. Standardize yöntemler kullanılarak alfa-sinüklein seviyeleri "enzyme-linked immunosorbent assay" (ELISA) kullanılarak ölçüldü.

Bulgular: Çalışmamızda AH'de beş miRNA'nın (miR-20b, miR-663-3, miR-762, miR-320b and miR-1915-5p) ifadesinin değiştiğini gösterdik. Bu miRNA'ların olası hedefleri östrojen, ras yolları, sirkadiyen ritim ve akson yönlendirme yollarının olduğu tespit edildi. Çalışmamızda serumda bulunan miR-320b ve miR-1915-5p'nin potansiyel tanısal değerleri %100 olarak bulunmuştur. Ayrıca, ventriküler hacmin AH tanısında amiloid beta seviyelerinin yorumlanmasında önemli bir faktör olduğu gösterilmiştir. Alfa-sinüklein ELISA kitinin standardizasyonunda kullanılan örneklerin farklı seyreltmelerinde ELISA kitinin benzer performans verdiğini gösterdik.

Sonuç: Serumda bulunan miRNA'lar AH'yi sağlıklı ve nörolojik hasta kontrol grubu (FTD) hastalarından ayırt etmede iyi biyobelirteç adayı olarak değerlendirilebilir. Alfa-sinüklein ELISA kitinin biyobelirteç olarak kullanılması öncesinde laboratuvar içi ve laboratuvarlar arası standardizasyonu yapılması gerekliliği ortaya konmuştur.

Anahtar Kelimeler: Alzheimer Hastalėı, Parkinson Hastalėı, Biyobelirteç, mikroRNA, Eksozom



DEVELOPMENT OF BIOMARKERS FOR ALZHEIMER'S AND PARKINSON'S DISEASES

Erden EREN, Dokuz Eylul University, Institute of Health Sciences, Department of Neuroscience, 35340, Inciralti, Izmir

ABSTRACT

Objectives: Nowadays, Alzheimer's (AD) and Parkinson's (PD) disease are the most prevalent neurodegenerative disorders. Definitive diagnosis of these two diseases is only possible after examination of post-mortem brain tissue. There is no definitive diagnostic biomarker for these diseases. However, there are advancement in biomarker candidates such as circulating microRNAs (miRNA). microRNAs are 20-22 nucleotide long non-coding small RNA molecules which are post-transcriptional regulators of gene expression. They can be found in body fluids and also in exosomes and these features make them attractive candidate as biomarkers. In this study, we aimed to identify novel biomarker candidates and standardize the existing ones.

Method: In order to validate miRNA hits from microarray study which previously done by our laboratory, we used serum and exosome samples from independent patient cohort (AD=24, FTD=17 and Control=29) and analyzed miRNAs with real time PCR. Their predicted pathway targets were analyzed with DIANA miRPath v3.0 server. Receiver Operating Characteristic (ROC) analysis was used to potential diagnostic values of validated miRNAs. Alpha-synuclein levels were measured with enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) following standardized protocols.

Results: In our study, we found five miRNAs (miR-20b, miR-663-3, miR-762, miR-320b and miR-1915-5p) were differentially expressed in AD. The predicted targets of these miRNAs include estrogen and ras signaling, axon guidance and circadian rhythm. We found that the potential diagnostic values of miR-320b and miR-1915-5p in serum were found to be 100%. Additionally, ventricular volume is an important confounding factor for interpreting amyloid beta levels in diagnosis of AD. We showed that the alpha-synuclein ELISA kit gave similar performance in different dilutions of the samples.

Conclusion: Serum miRNAs can be utilized as good biomarker candidates in discrimination of AD from control and FTD as neurological disease control group. The need

for standardization between intra- and interlaboratory studies has been demonstrated before use of the alpha-synuclein ELISA kit as a biomarker.

Keywords: Alzheimer's disease, Parkinson's disease, microRNA, Exosomes, Biomarker



1. GİRİŞ VE AMAÇ

1.1. Problemin Tanımı ve Önemi

Demans klinik olarak kişinin gündelik hayatını etkileyen derecede bilişsel kapasitesinde kayıp ve duygudurum bozukluk olarak tanımlanabilmektedir. Genellikle yaşlılık döneminde ortaya çıkan, ilerleyen yaş ile birlikte prevalansı artan, belirli bir patolojik bozuklukla açıklanması mümkün olmayan ve birden fazla hastalıkla ilişkili bir klinik tablodur. Bununla birlikte günümüzün en büyük sağlık problemlerinde biridir ve kesin bir tedavisi bulunmamaktadır. Alzheimer hastalığı (AH) ve Parkinson hastalığı (PH) en yaygın nörodejeneratif hastalılardır.

Bu hastalıkların kesin tanısı sadece post-mortem beyin dokusunun histopatolojik olarak incelenmesi ile yapılabilmektedir. Günümüzde kullanılan görüntüleme teknikleri ve biyokimyasal biyobelirteçler hastalıkların tanısı kolaylaştırmakta ancak kesin ayırıcı tanı yapamamaktadırlar. Görüntüleme tekniklerinin pahalı olması, her klinikte bulunamaması, karmaşık yazılım ve donanım gerektirmesi gibi sebepler bu biyobelirteçlerin kullanımlarını sınırlandırmaktadır. Bununla birlikte beyin omurilik sıvısı (BOS)'nda ölçülen moleküller de ayırıcı tanıda kullanılabilmektedir. Ancak ölçümler arası varyasyon, standardize örnek toplama yöntemlerinin eksikliği gibi sebepler bu analizlerin kullanımını kısıtlamaktadır.

miRNA'lar 20-22 nükleotid uzunluğunda transkripsiyon sonrası gen ifadelerini düzenleyen küçük RNA molekülleridir. miRNA'lar vücut sıvılarında özellikle kanda ve eksozom adı verilen 30-110 nm boyutlarında olan hücre membranından türeyen ekstrasellüler nanokeseciklerin içerisinde paketlenmiş olarak bulunabilirler. Hem serbest hem de eksozomların içerisinde dolaşan miRNA hücreler arasında iletişimde kullanılabilmekte ve alıcı hücrenin gen regülasyonunu değiştirebilmektedir. Özellikle Alzheimer hastalığında serbest dolaşan ve dokularda bulunan miRNA'ların ifadelerinin değiştiği bildirilmiştir. Bugüne kadar yapılan çalışmalarda serbest dolaşan ve eksozom içerisinde bulunan miRNA'ların Alzheimer hastalığında biyobelirteç adayı olarak kullanılabilecekleri öne sürülmüştür. Ancak, yapılan çalışmalarda elde edilen miRNA'ların ayırıcı tanısallık değerleri düşüktür.

Parkinson hastalığında alfa-sinüklein ise biyobelirteç adayı olarak ilgi çekmektedir. Ancak, alfa-sinüklein'in BOS'nda ölçümünde standardize olmayan yöntemlerin, immunoassaylerin ve sertifikalı referans materyalinin olmayışı ölçümlerin karşılaştırılmasını ve yorumlanmasını sınırlamaktadır.

1.2. Araştırmanın amaçları

Yaptığımız bu çalışma Uluslararası Alzheimer Ortak Programlara İnisiyatifi kapsamında desteklenmiş olup, Avrupa genelinde yaklaşık 48 laboratuvarın katıldığı bir çalışmanın bir parçasıdır. Bu çalışmanın amacı AH ve PH için yeni biyobelirteç adaylarının bulunması ve kullanımda olan biyobelirteçlerin standardizasyonudur. Ayrıca, AH hastalarında ifadesi değişen serbest dolaşan ve eksozomal miRNA'ların tanısal değerlerinin incelenmesi ve bununla birlikte PH'de kullanılan α -sinüklein ölçümünün standardize edilmesi amaçlanmıştır. Ayrıca, Ventiküler hacimdeki farkların tanıda kullanılan BOS biyobelirteç seviyelerini yorumlarken dikkat edilmesi gereken önemli bir faktör olarak etkisinin araştırılması amaçlanmıştır.

1.3. Araştırmanın Hipotezleri

Çalışmanın temel hipotezi AH hastalarında dolaşımdaki miRNA'ların ve eksozomal miRNA'ların seviyelerinin AH'nın ayırıcı tanısında kullanılabileceğidir. Çalışmanın ikincil hipotezi ise alfa-sinüklein seviyelerinin ölçümde kullanılan ticari ELISA kitinin standardize edilmiş protokoller ile kullanılması laboratuvar içi ve laboratuvarlar arası varyasyonları azaltmaktadır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Alzheimer Hastalığı

Alzheimer hastalığı (AH) demans vakalarının yaklaşık %60-70'ini oluşturmaktadır. Dünya Alzheimer raporuna göre 2015 yılı itibariyle dünyada 46,8 milyon kişi AH ile yaşamaktadır ve bu sayının her 20 yılda bir ikiye katlanması tahmin edilmektedir. Ayrıca, her üç saniyede bir kişinin AH tanısı alabileceği öngörülmüştür. Bununla birlikte düşük gelirli ülkelerde hastaların %10'undan azına ancak doğru teşhis konulabilmektedir (Prince, 2016). AH ilk olarak Dr. Alois Alzheimer tarafından 1907 yılında tanımlanmıştır. İlk hasta olan Auguste Deter'in post-mortem beyin dokusunda nörofibriler yumaklar ve nöritik plaklar görmüştür (O'Brien ve Wong, 2011). Daha sonra nörofibriler yumaklar hiperfosforile olan tau proteini ve nöritik plakların ise 40-42 amino asit arasında büyüklüğü olan amiloid peptidi olduğu Glenner ve ark. tarafından gösterilmiştir (Glenner ve Wong, 1984).

2.1.1. Klinik

AH yaşlanma ile beraber ortaya çıkan ve yavaş ilerleyen bir bilişsel bozukluk durumudur. İlerleyici bir hastalık olmasından dolayı erken, orta ve geç olmak üzere üç farklı evreye ayrılır (Şahin, 2009). Kişiler hastalığın erken evresinde doğru kelimeleri ve isimleri hatırlamakta zorlanırlar ve planlama ve organizasyon yaparken zorluk yaşarlar ancak günlük yaşamlarını idame ettirebilirler. Orta evrede ise kişi kelimeleri karıştırmaya başlar, duygu durumunda değişimler yaşanır, günleri karıştırmaya başlar ve davranışsal değişimler gözlenir. Bu evre yıllar boyu sürebilir. Hastalığın son evresinde kişi artık etrafına tepki veremez hale gelir. Bazı kelime ve cümleleri hatırlayabilmesine rağmen iletişim kurmak artık çok zordur. Ayrıca kişi günlük aktivitelerini yerine getirebilmek için kapsamlı yardıma ihtiyaç duyar (Alzheimer's, 2016).

2.1.2. Patoloji

Post mortem beyin örneklerinden ve moleküler çalışmalardan elde edilen verilere göre AH patolojisi iki ana agregat ile karakterize olduğu gösterilmiştir. Agregatlar nöritik plak ve nörofibriller yumaklar olarak isimlendirilmekle birlikte, yapılan moleküler çalışmalar sonucunda nöritik plakların amiloid beta ve nörofibriller yumakların hiperfosforile tau proteininden oluştuğu öğrenilmiştir. Bunlarla birlikte bir diğer patolojik bulgular nöron ve

sinapsların kaybı ve serebral amiloid anjiopatidir (Braak ve Braak, 1991; Haass ve Selkoe, 2007; Meraz-Rios ve ark., 2010).

Amiloid beta

Amiloid beta “amyloid precursor protein” (APP) adı verilen membran proteininin farklı enzimler ile kesilmesi ile oluşmakta ve APP’nin kesimi nöronal aktivite ile düzenlenmektedir. APP’nin kesimi sonucunda amiloid ve non-amiloid yolakları oluşur ve bu yolların hangisinin seçileceği APP’yi kesen enzimlerin türleri belirler (Haass ve Selkoe, 2007). APP, α -, β -, ve γ -sekretaz olmak üzere üç farklı enzim tarafından kesilmektedir. Tümör nekroz faktör- α dönüştürücü enzim (TACE) olarak da bilinen α -sekretaz tarafından APP’nin kesimi sonucunda solübl APP α (sAPP α) oluşur. Yapılan çalışmalar bu peptidin hücre kültüründe nöronları oksijen-glukoz deprivasyonundan koruduğunu göstermiştir (Mattson ve ark., 1993; Furukawa ve ark., 1996). Bununla birlikte, sinaptogenez, nörit büyümesini destekleme gibi birtakım etkileri de gösterilmiştir (Gakhar-Koppole ve ark., 2008). Daha sonra ikinci kesim γ -sekretaz aracılığı ile gerçekleşir ve p3 peptidi oluşur. “Beta secretase-1” (BACE1) olarak da bilinen β -sekretaz, APP’yi kesen ikinci önemli enzimdir. APP’nin bu enzim ile kesimi sonucunda sAPP β ekstrasellüler ortama salınmaktadır. Ancak, bu peptidin, sAPP α ile ilişkili nöroprotektif etkileri bulunmamaktadır ve bunun sebebi karboksi-terminalinde A β 1-16 bölgesinin bulunmamasıdır. β -sekretaz ile APP’nin kesimi, amiloidojenik yolağa geçişin ilk basamağıdır. Kesim sonucunda sAPP β dışında “C-terminal fragment 83” (CTF83) oluşur. Daha sonra γ -sekretaz enzimi bu membranda kalan CTF83 peptidini farklı bölgelerde keserek toksik β -amiloid (A β) peptidinin oluşmasına neden olur (Chow ve ark., 2010; Zhang ve ark., 2011).

Beta amiloid (A β), AH patolojisinin merkezinde bulunan bir moleküldür. β -sekretaz ve γ -sekretaz enzimlerinin sırasıyla APP’yi kesmesi sonucunda oluşur ve peptid uzunluğu 38 ile 43 amino asit (aa) arasında değişmektedir. En toksik formu ise 1-42 aa uzunluğunda bulunan A β (1-42)’dir ve fibril oluşturmaya en yatkın formudur (Kozlov ve ark., 2017). 1992 yılında J. Hardy’nin ortaya attığı amiloid kaskad hipotezine göre A β , hastalığın ana etkeni olmakla birlikte hücre kaybı, vasküler hasar ve nörofibriller yumakların oluşmasında da etkili olabileceğini öne sürmüştür (Hardy ve Higgins, 1992). Ancak, yapılan son çalışmalarda bu hipotez hastalığın patogenizi açıklamada yetersiz kaldığı ve hastalığın temelinde daha

kompleks moleküler mekanizmaların olduğu ortaya çıkmıştır (Canevelli ve ark., 2017; Chandra, 2017; Kozlov ve ark., 2017).

Amiloid yolağındaki rol olan APP ve proteaz genlerinde oluşan mutasyonlar erken yaş başlangıçlı ailesel (FAH) AH'ye neden olmaktadır ve bu mutasyonlar üç gende bulunmaktadır. İlki APP geninde bulunan mutasyonlardır. APP geninde 24 farklı mutasyon olduğu bildirilmiştir. Diğer genler ise γ -sekretaz ile ilişkili olan presenilin 1 ve 2 (*PSEN1* ve *PSEN2*)'dir. *PSEN1*'de 185 ve *PSEN2*'de ise 13 farklı mutasyon olduğu bildirilmiştir. Bu mutasyona sahip bireyler 60 yaşın altında AH'nı geliştirmektedir. Bununla beraber Down sendromuna sahip bireylerde 21. kromozom üç kopya olarak bulunmaktadır. APP geni ise bu kromozomda bulunmakta ve fazla olan bir kopya A β üretiminin artışına neden olmaktadır (Wiseman ve ark., 2015). Erken yaş başlangıçlı AH'li bireyler hastalığın yaklaşık %10-20'sini oluşturmaktadır (Bateman ve ark., 2011; Tanzi, 2012).

Tau

Hücre iskeletinin temel yapı birimi olan mikrotübüllerin ana bileşeni tau proteinidir. Tau proteini 17. kromozomda bulunan "microtubule-associated protein tau" (MAPT) geninden kodlanmaktadır. Tau proteini mikrotübüllerin stabilizasyonunu ve organizasyonunu sağlar. Böylece mikrotübüller akson ve dendritte transportun gerçekleşmesini sağlar. Tau proteini hücrel morfolojinin korunmasını sağlar ve aksonal transportta görev alır. Bunların dışında tau proteininin nükleolar yapıların oluşmasına katkıda bulunduğu öne sürülmektedir (Meraz-Rios ve ark., 2010). Tau proteininin santral sinir sisteminde 6 farklı izoformu bulunmaktadır. Protein sentezlendikten sonra fosforilasyon, asetilasyon ve nitrasyon gibi birçok posttranslasyonel modifikasyona uğramaktadır. AH'nin karakteristik patolojik özelliklerinden nörofibriller yumakların ana bileşeni hiperfosforile tau proteinidir. Hiperfosforilasyon sonucunda tau proteinleri mikrotübüllere bağlanamaz ve hücre içinde veya dışında filamentler oluştururlar. Nörofibriller yumaklar AH'nda ana histopatolojik bulgu olmasına rağmen, hastalığa neden olan toksik unsur olmadığı düşünülmektedir. Ayrıca, bu yumakların hastalığın gelişimindeki etkisi tam anlamıyla anlaşılamamıştır. Yapılan çalışmalardan elde edilen verilere göre, hiperfosforile olan tau oligomerlerinin nöronal hasara neden olduğu ve hastalığın başlangıcında rol oynayabileceğini göstermiştir. Bu bağlamda yumaklardan ziyade hiperfosforile tau

oligomerlerinin nöronal fonksiyon bozukluklarına yol açtığı söylenebilir (Shafiei ve ark., 2017).

Bugüne kadar MAPT geninde 53 farklı mutasyon keşfedilmiştir. Bu mutasyonlar otozomal dominant bir şekilde bir sonraki nesillere geçmektedir. Buna ek olarak, tau patolojisi FTD, progresif supranükleer palsi gibi diğer nörodejeneratif hastalıklarda da bulunmuştur ve genel olarak bu hastalıklara taupati adı verilmektedir. Ayrıca, MAPT geninde bulunan p.A152T mutasyonunun hem FTD hem de AH hastalarında bulunduğu ve hastalık riskini arttırdığı bildirilmiştir (Lee ve ark., 2013).

2.1.3. Risk Faktörleri

Bugüne kadar yapılan çalışmalara göre AH birkaç istisnai durum dışında genellikle birden fazla faktörün bir araya gelmesi ile ortaya çıkmaktadır. Hastaların %10-20'si hastalıkla ilişkili (*APP*, *PSEN1* ve *PSEN2*) genlerde bulunan mutasyonlar sonucunda ortaya çıkan erken yaş başlangıçlı AH'dir. Ancak, hastaların büyük çoğunluğu sporadik AH denilen geç yaş başlangıçlı AH tanısı almaktadır. Sporadik AH'nın belirli bir nedeni olmamakla birlikte, birden fazla risk faktörü hastalığın gelişmesini tetikleyebilmektedir (Alzheimer's, 2016). Bu hastalığın en büyük risk faktörü yaşlanmadır. Bireylerin yaşlanması ile birlikte özellikle 65 yaş ve üzeri kişilerde AH'ye yakalanma riski %32'ye kadar çıkabilmektedir (Hebert ve ark., 2010). Buna ek olarak, bireyin ailesinde daha önce AH tanısı almış bir kişi mevcut ise bu bireyin AH'ye yakalanma riski bulunmaktadır (Lautenschlager ve ark., 1996). Ayrıca, düşük eğitim seviyesine sahip bireylerin AH tanısı alma ihtimalleri yüksek eğitim almış bireylere göre daha yüksektir (Sando ve ark., 2008). Bunların dışında kardiyovasküler hastalık riskleri, diyabet, obezite ve sigara kullanımı gibi nedenler de AH için risk faktörleridir (Anstey ve ark., 2007; Ronnema ve ark., 2011; de Nazareth, 2017; Kivimaki ve ark., 2017).

AH için genetik risk faktörleri de bulunmaktadır. Hastalıkla ilişkili genlerinin aksine bazı genlerde bulunan mutasyonlar AH riskini arttırmaktadır. Bugüne kadar AH için risk faktörü taşıyan polimorfizimleri bulabilmek için birçok genom çapında ilişkilendirme (GWAS) çalışması gerçekleştirilmiştir. Yapılan GWAS çalışmalarının sonuçlarına göre apolipoprotein E (*APOE*) en yüksek risk taşıyan genlerden biridir. *APOE* geninin e2, e3 ve e4 olarak üç farklı izoformu bulunmaktadır ve popülasyonda e3 izoformu en sık görülendir. Ancak, e4 izoformuna

sahip bireylerin AH'ye yakalanma riskleri %35'e kadar çıkmaktadır ve bu oran bireyin e4 izorformunun bir veya iki kopyasına sahip olup olmamasına göre değişmektedir (Genin ve ark., 2011). Bir diğer risk faktörü "triggering receptor expressed on myeloid cell 2" (TREM2) olarak bilinen membran proteinidir. Bu gende bulunan R47H mutasyonuna sahip bireylerin AH'ye yakalanma riskleri APOEε4 izoformunu taşıyan bireylerin AH'ye yakalanma risklerine yakındır (Kleinberger ve ark., 2014). GWAS çalışmalarından elde edilen sonuçlara göre AH riski taşıyan 20 özgün genetik bölge tespit edilmiştir ve bu genlerdeki polimorfizmler yaygın olmasına rağmen AH riski çok küçüktür (Scheltens ve ark., 2016).

2.1.4. Tanı

AH'nin kesin tanısı sadece post-mortem patolojik değerlendirilmesiyle, nöritik plakların ve nörofibriler yumakların varlığının belirlenmesi ile yapılabilmektedir ve bu sayede hastalığın hangi evrede olduğu da belirlenebilmektedir. Günümüzde AH tanısı nörolojik muayene ve hasta hikayesinin alınması ile başlar. Daha sonra hasta nöropsikolojik değerlendirme, kan (B12 vitamini, T4 seviyesi gibi) analizi, ve görüntüleme testleri ile diğer hastalıkların ihtimalleri elenerek muhtemel AH tanısı konulabilir (Alzheimer's, 2016). AH tanısında kullanılmak üzere oluşturulan tanı kriterleri 1984 yılında McKhann ve ark. tarafından yayımlanmıştır (McKhann ve ark., 1984). Bu kriterler 2011 yılında güncellenmiştir. Yeni tanı kriterlerine farklı demans seviyeleri olan AH kaynaklı hafif kognitif bozukluk (HKB) tanısı (Albert ve ark., 2011), preklinik AH tanısı (Sperling ve ark., 2011) ve AH kaynaklı demans tanıları (McKhann ve ark., 2011) eklenmiştir. Bu güncellenmiş tanı kriterlerine AH biyobelirteçlerinin kullanımı da eklenmiştir (McKhann ve ark., 2011). Bu biyobelirteçler sayesinde BOS'ta Aβ seviyesinin azalması ve amiloid pozitif pozitron emisyon tomografi (PET) görüntülemesi ile Aβ birikimi ve BOS'ta hem pTau hem de tTau seviyesinde artış ile nöronal dejenerasyon görülebilir. Temporo-parietal kortekste azalmış ¹⁸florodeoksiglukoz (FDG) alımı ve manyetik rezonans görüntüleme ile orantısız atrofi görüntülenebilir (McKhann ve ark., 2011).

2.1.5. Alzheimer Hastalığında miRNA'lar

miRNA'ların fizyolojik ve/veya patolojik birçok biyolojik süreci düzenleyici görevleri olduğu yapılan çalışmalarla gösterilmiştir. Bu sayede miRNA'lar nörodejeneratif hastalıklar gibi patolojik mekanizmaların tam olarak aydınlatılamadığı hastalıklarda en çok ilgi çeken araştırma konuları olmuşlardır. Beyine özgü miRNA'lar toplam miRNA sayısının 30'da birini

oluşturmaktadır ve bu durum miRNA ekspresyonlarının zamansal ve mekânsal olarak sıkı kontrol edildiğini göstermektedir. Son yıllarda yapılan çalışmalar, miRNA'ların nörogelişim, sinaptik plastisite, nörodejenerasyon gibi birçok nörolojik süreçte önemli rolleri olduğunu açığa çıkarmıştır.

Alzheimer hastalarında kapsamlı miRNA ekspresyon profillemeye çalışmaları gerçekleştirilmiştir ve birçok miRNA'nın AH hastalarında disregüle olduğu bildirilmiştir (Wang ve ark., 2009; Nunez-Iglesias ve ark., 2010; Maciotta ve ark., 2013). Lukiw ve ark. tarafından yapılan çalışmada miR-9 ve miR-128'in hastaların hipokampusünde arttığını göstermiştir (Lukiw, 2007). Ayrıca, diğer bir çalışmada ise AH hastalarının frontal giruslarında miR-9, -26a, -132 ve -146b dahil 8 miRNA'nın downregüle ve e miR-27, -29, -30, -34 ve -125b dahil 15 miRNA'nın upregüle olduğu bildirilmiştir (Cogswell ve ark., 2008). Sporadik AH hastalarının korteksinde 13 miRNA'nın downregüle ve 3 miRNA'nın upregüle olduğu gösterilmiştir (Hebert ve ark., 2008). Bunlarla birlikte AH patogenizinde rol alan proteinlerin regülasyonunda da miRNA'lar rol almaktadır. Yapılan *in vitro* çalışmalarda *APP*'nin miR-106a, miR-20 ailesi, miR-16 ve miR-101'in düzenlenmesinde rol oynadıkları gösterilmiştir (Hebert ve De Strooper, 2007; Vilardo ve ark., 2010; Long ve Lahiri, 2011). Ayrıca, miR-34a ve miR-26b'nin tau proteini baskıladığı ettiği bildirilmiş ve miR-146'nın presenilin regülasyonunda görev aldığı gösterilmiştir (Absalon ve ark., 2013; Dickson ve ark., 2013; Jayadev ve ark., 2013). Ayrıca, miR-9'un FTD hastalarında TDP-43'ü düzenlediği, miR-132 ve -132-3p kümesinin FTD'ye özgü *TMEM106B* genini hedeflediği gösterilmiştir. Progranulinin kodlandığı *GRN* geninde bulunan mutasyonlar FTD hastalarında gözlemlenmektedir ve bir başka çalışmada AH'de ekspresyonu değişen miR-29'un *GRN* geninin ekspresyonunu düzenlediğini göstermişlerdir (Piscopo ve ark., 2016).

Tablo 1: AH'de ifadesi değişen miRNA'lardan bazıları

miRNA değişimi	Örneklem	Kaynak
↑miR-34a, miR-181b	Periferik kan hücreleri	(Schipper ve ark., 2007)
↑miR-9, miR-125b, miR146a, miR-155	BOS ve beyinden elde edilen hücre dışı sıvı	(Lukiw, 2007)
↓miR-26a-5p, miR-181c-3, miR-584, miR-126-5p, miR-22-3p, miR-148b-5p	Serum	(Guo ve ark., 2017)

↑ miR-221-3p, miR-106b-3p, miRNA-144-5p, miR-6119-5p, miR-1388-3p, miR-1246, miR- 660-5p		
↓miR-15b-5p, miR-34a-5p, miR-142-3p, miR-545-3p, let- 7d-5p ve miR-146a-5p	Plazma	(Cosin-Tomas ve ark., 2017)
↓miR-210, miR-181c, miR-15a, miR-9, miR-22, miR-101, miR- 29b-1, let-7i, miR-19b, miR- 106b, miR-26b, miR-363, miR- 93	Sporadik AH beyin	(Hebert ve ark., 2008)
↑miR-197, miR-511, miR-320		

2.2. Parkinson Hastalığı

Parkinson hastalığı (PH) substansiya nigra’da bulunan dopaminerjik nöronları etkileyen nörodejeneratif bir hastalıktır. İlk olarak James Parkinson tarafından 1817 yılında “An Essay on the Shaking Palsy” isimli makalesinde tanımlanmıştır. Ancak, hastalığın PH olarak anılmaya başlaması ancak 1877 yılında Jean Martin Charcot tarafından mümkün olmuştur (Nussbaum ve Ellis, 2003; Poewe ve ark., 2017). PH 65 yaş üstündeki nüfusun %2-3’ünü etkileyen ikinci en yaygın nörodejeneratif hastalıktır (Poewe ve ark., 2017).

2.2.1. Klinik

Hastalığın en belirgin motor semptomları; titreme, bradikinezi, akinezi, yürüyüş bozuklukları, kamburluk ve rijidite olarak sayılabilir. Her hastanın birbirinden farklı semptomları olabilmekte ve hastalık süreci kişiden kişiye değişmektedir. Hastalık herhangi bir yaşta görülebilmesine rağmen ortalama ortaya çıkma yaşı 60 ve üzeridir (Marras ve Lang, 2013). Ancak, hastalık nadir de olsa genç yaşlarda da görülebilir. Bu durumda kalıtsal nedenlerin araştırılması gerekmektedir. Hastalığın motor olmayan semptomları da bulunmaktadır ve bunlar depresyon, kabızlık, uyku bozuklukları, yorgunluk, anksiyete, kognitif fonksiyon bozukluklarıdır (Khoo ve ark., 2013). Hastalığın başlangıcında tedavi süreci semptomların hayat kalitesini düşürmesini engellemeye yöneliktir. Ancak, hastalık ilerledikçe, semptomatik tedaviler etkisiz olmaya başlar ve daha uzun süreli tedavi seçenekleri düşünülmeye başlanır. Günümüzde hastalığın kesin bir tedavisi bulunmamakla birlikte genetik nedenler dışında PH’ye neden olabilecek bir neden belirlenememiştir (Kalia ve Lang, 2015).

2.2.2. Patoloji

Hastalığın en önemli iki patolojik bulgusundan biri substantia nigra pars kompakta (SNpc)'da dopaminerjik nöron kaybıdır. Dopaminerjik nöron kaybı, hipotalamus, amigdala gibi beyin farklı bölgelerinde de görülebilmektedir. Yapılan çalışmalardan elde edilen verilere göre, SNpc'de nöron kaybının motor fonksiyonlarındaki bozukluğa neden olabileceğini göstermiştir (Dickson ve ark., 2009). Bununla birlikte, bu nöronal kayıp hastalığın ilk aşamalarında bile görülebilmektedir ve erken aşamadaki nöronal kayıplar nöronların kurtarılabilirliğini anlamına gelebilmektedir (Kordower ve ark., 2013). İkinci önemli patolojik bulgu ise Lewy cisimciklerinin (LC) beyindeki varlığıdır. LC'de ana bileşeninin α -sinüklein olduğu gösterilmiştir. α -sinüklein sinüklein alfa (*SCNA*) geninden kodlanır ve presinaptik bir proteindir. Proteinin yanlış katlanması sonucunda insolübl ve agregat haline gelirler ve hem hücre içinde hem de nöritlerde bulunabilirler. Bununla birlikte LC sadece beyinde değil ayrıca omurilik ve periferel sinir sisteminde de görülebilmektedir (Masters ve ark., 2011; Goedert ve ark., 2013). α -sinüklein beyinde noktasal, ipliksel, solübl oligomer ve presinaptik birikimler şeklinde birden fazla formda bulunabilir. Özellikle bazı solübl oligomer formları PH'de nöronal kayba neden olabilmektedir (Saito ve ark., 2003). PH'nın yaklaşık %50'nde, AH patolojisi olan nöritik plaklar ve nörofibriler yumaklar tespit edilmiş olup eşlik eden AH patolojisi LC patolojisini daha kötü etkileyerek PH'nin gelişmesinin hızlandırabilmektedir. Hiperfosforile tau birikimleri LC ile kolokelize olduğu gösterilmiştir ve fosforile tau birikimi hücre yapısının stabilitesini bozarak dopaminerjik nöron kaybına katkıda bulunmaktadır (Irwin ve ark., 2012; Irwin ve ark., 2013). Ayrıca, Gomperts ve ark. A β birikiminin PH'de kognitif bozukluğun nedeni olduğunu bildirmiştir (Gomperts ve ark., 2013). Birçok çalışmada, PH tanısı almış bireylerin beyinlerinde LC patolojisi gözlemlenmemiştir (Poulopoulos ve ark., 2012). Ancak, α -sinükleinin farklı formlarının oluşturduğu agregatlar ve α -sinüklein'den farklı moleküllerin oluşturduğu inklüzyonlar da PH hastalığının patolojisinde gözlemlenebilmektedir.

2.2.3. Genetik

Önceleri PH'nin sporadik bir hastalık olduğu düşünülmekteydi. Ancak, son 15 yılda yapılan çalışmalardan ortaya çıkan sonuçlar PH'de monogenik otozomal dominant veya resesif mutasyonlar keşfedilmiştir (Kalia ve Lang, 2015). İlk olarak α -sinüklein'i kodlayan *SCNA* geninde mutasyonların PH'ye neden olabileceği gösterilmiştir ve sonraki çalışmalarda diğer genlerde bulunan mutasyonlar da bulunmuştur. Otozomal dominant olan mutasyonlar *SCNA*,

LRRK2 ve *VSP35* genlerinde tespit edilmiştir (Hernandez ve ark., 2016). *SCNA* geninde A53T mutasyonu dahil 6 farklı mutasyon otozomal dominant olarak ailesel PH'ye neden olduğu bildirilmiştir. *LRRK2* geninde bugüne kadar 100'den fazla mutasyonun otozomal dominant olarak ailesel PH'ye neden olduğu gösterilmiştir. *LRRK2* geninde bulunan mutasyonlar ailesel PH'nin bilinen en yaygın nedenidir ve bu mutasyonlar ailesel PH'nin yaklaşık %30'unun ve sporadik vakaların ise yaklaşık %3-5'inin nedeni olduğu gösterilmiştir (Zimprich ve ark., 2004). Otozomal resesif olan mutasyonlar ise parkin (*PRKN*), "PTEN induced kinase 1" (*PINK1*), "Parkinson disease protein 7" (*DJ-1*), "Probable cation transporting ATPase 13A2" (*ATP13A2*), "F-box only protein 7" (*FBXO7*) ve fosfolipaz A2, grup VI (*PLA2GB*) genlerinde tespit edilmiştir (Hernandez ve ark., 2016). Bu mutasyonlar genel olarak nadir bulunmakla birlikte ortalama ailesel PH vakalarının %20'sinde ve sporadik vakaların ise %3'ünde görülmektedir.

2.2.4. Risk Faktörleri

PH gibi kompleks olan hastalıklarda hem genetik hem de çevresel risk faktörleri hastalığın ortaya çıkışında önemli rol oynarlar. Ayrıca, PH'de tespit edilen otozomal dominant ve resesif mutasyonlar vakaların sadece küçük bir bölümünde bulunması, başka genetik risk faktörlerinin de hastalığın gelişiminde rol alması ihtimalini güçlendirmektedir.

Bugüne kadar yapılmış birçok GWAS çalışmasından elde edilen sonuçlara bakıldığında birden fazla gende PH için risk faktörü oluşturan tek nükleotid polimorfizmleri (TNP) tespit edilmiştir. *SCNA* geninde tespit edilen TNP'lerin sporadik PH riskini önemli ölçüde arttırdığı GWAS çalışmaları ile gösterilmiştir (Pankratz ve ark., 2009). Kruger ve ark. tarafından yapılan çalışmada *APOEε4* alleli ve *SCNA* promoter poliformizmi birlikte PH riskini 12 kat arttırdığını göstermişler ancak bu sonuç tekrarlanamamıştır (Kruger ve ark., 1999). *LRRK2* geninde bulunan mutasyonların PH'ye neden olmasının ortaya çıkmasından sonra yapılan GWAS çalışmalarında bu gende birden fazla TNP tespit edilmiştir ve bu TNP'lerin PH riskini 2 kat arttırdığı gösterilmiştir (Fu ve ark., 2013). Otozomal resesif lizozomal rahatsızlığa neden olduğu bilinen glukoserebrosidaz (*GBA*) geni Gaucher hastalarında bulunmaktadır. Klinik gözlemlerde bu hastalığa sahip olan bireylerde de parkinsonizm belirtileri gözlemlenmesi sebebiyle bu genin PH için bir risk faktörü olup olmadığı araştırılmıştır ve bu genin 2 farklı

varyantı PH riskini 5 kat arttırdığı bildirilmiştir. Ayrıca, bu varyantlar Gaucher hastalığına neden olmamaktadır (Tayebi ve ark., 2003; Nalls ve ark., 2013).

Genetik çalışmalar sonucunda elde edilen veriler PH'nin heterojenik bir hastalık olduğunu göstermiştir. Ancak, genetik risk faktörü taşıyan veya hastalıkla ilişkili gen mutasyonlarına sahip olan hasta oranı yaklaşık %10'dur. Geriye kalan yaklaşık %90'lık kesimde PH'nin nedeni bilinmemektedir. Epidemiyolojik çalışmalar sonucunda birçok çevresel ve/veya davranışsal faktörlerin PH riskini artırma veya azaltma etkisi olabileceğini göstermiştir. Daha önce geçirilmiş kafa travması, paraquat gibi pestisitlere maruz kalma, ilerleyen yaş gibi faktörler PH riskini yükseltmektedir. Bu faktörlere ek olarak, kişinin etnik kökeni (Hispanik kökenli bireylerde risk daha yüksektir), uyuşturucu kullanımı ve alkolizm gibi faktörler de PH riskini arttırmaktadır. Bununla birlikte farklı çevresel ve davranışsal faktörlerin PH üzerine koruyucu etkisi olabilmektedir. Sigara kullanımı, kafein tüketimi, yeşil ve siyah çay tüketimi, hareketli yaşam ve non-stereoidal anti-inflammatory ilaç kullanımı gibi faktörlerin bireylerde PH riskini azaltabildiği gösterilmiştir (Kalia ve Lang, 2015; Ascherio ve Schwarzschild, 2016).

2.2.5. Tanı

Günümüzde PH'nin kesin klinik tanısını yapabilecek test bulunmamaktadır. Bunun yerine klinisyenler hastanın hikayesine, semptomlarına, nörolojik ve fiziksel muayeneye dayanarak tanı koyarlar. Hastalığın tanısı öncelikle bradikinezi, rijidite ve dinleme sırasında olan titreme gibi semptomların baz alınması ile başlar. Ancak, postür bozukluğun varlığı hastalığın ileri aşamada olduğunu göstergesidir. UK Parkinson's Disease Society Brain Bank kriterleri kullanıldığında tanısal hassaslık %90'a kadar yükselebilmektedir (Hughes ve ark., 1992). SNpc'de orta-şiddetli nöron kaybı, canlı nöronlarda LC varlığı ve parkinsonizme neden olan patolojinin eksikliği PH'nin klinik tablosu olarak görülebilir. Ayrıca, kan ve görüntüleme testleri (MRG ve PET gibi) diğer hastalık ihtimallerini elemek için yapılmaktadır (Kalia ve Lang, 2015).

2.3. MikroRNA

miRNA'lar sap-ilmik yapısında olan 20-22 nükleotid uzunluğunda kodlamayan RNA molekülleridir ve genomda polisistronik veya monosistronik olarak kodlanabilirler. miRNA'lar

ilk kez *Caenorhabditis elegans* 'ta let-7 ve lin-4 olarak gelişimi düzenleyen kodlamayan RNA olarak keşfedilmiştir. Hedef mRNA'ların 3'UTR (Translasyon olmayan bölge, "Untranslated Region") bölgesine komplementer olarak bağlanıp translasyonu geciktirme veya mRNA degradasyonunu sağlayarak genleri düzenlerler. Ayrıca, her bir miRNA'nın tahmini hedeflediği gen sayısı 100'den fazla olabilmektedir. Bugün miRNA'ların birçok fizyolojik yolda düzenleyici etkileri gösterilmesinin yanında birçok patolojik durumda farklı fonksiyonları da bulunduğu bilinmektedir (Erson ve Petty, 2008; Peterson ve ark., 2014).

2.3.1. Biyogenez

Klasik yola

miRNA'yı kodlayan genler RNA polimeraz II ile transkribe olur. Bu transkript sap-ilmik yapısındadır. Matür miRNA sekansı bu yapının içindedir. miRNA transkribe olduktan sonra pri-miRNA olarak isimlendirilir ve yaklaşık 1 kilobaz uzunluğundadır (Lee ve ark., 2002) ve nükleusta bulunur. Nükleusta Drosha ve DiGeorge sendrom kritik bölge gen 8 (DGCR8) birlikte mikroşlemci kompleksi oluştururlar (Gregory ve ark., 2004). Komplekste bulunan Drosha'nın RNA kesimi için gerekli RNase tip III endonükleaz aktivitesi vardır ve DGCR8'de ise çift sarmallı RNA'yı (dsRNA) tanıyan dsRNA-bağlanma bölgesi bulunmaktadır (Han ve ark., 2006). Mikroşlemci kompleksi ile işlenen pri-miRNA hem 3' hem de 5' ucundan kesilir ve sonunda 3' ucunda iki nükleotid uzunluğunda açık uç kalmış toplam yaklaşık 65 nükleotid uzunluğunda pre-miRNA oluşur (Lee ve ark., 2003).

Bu aşamadan sonra pre-miRNA'nın olgunlaşma için nükleustan sitoplazmaya geçişi gereklidir. Exportin-5 proteini pre-miRNA ve GTP-binding nükleer protein RAN-GTP ile transport kompleksi oluşturur. Oluşan kompleksin sitoplazmaya geçişinden sonra komplekste bulunan GTP hidrolize olur ve pre-miRNA sitoplazmaya salınır (Kim, 2004; Lund ve ark., 2004). Dicer sitoplazmada bulunan RNase tip III endonükleaz'dır ve pre-miRNA'nın sitoplazmada kesilmesinden sorumludur (Gu ve ark., 2012). Dicer yapısının N-terminal'inde helikaz bölgesi bulunur ve bu bölge pre-miRNA'yı terminal-iplik bölgesinden tanıır. C-terminal bölgesinde iki tane RNase III bölgesi dimerleşerek enzimin aktif bölgesini oluşturur. pre-miRNA Dicer tarafından tanındıktan sonra terminal-iplik bölgesinden kesilerek çift sarmallı küçük RNA molekülü olan matür miRNA oluşur (Gu ve ark., 2012). Bu işlem sırasında Dicer proteini "TAR-RNA binding protein" (TRBP) ile kompleks oluşturur ve TRBP matür

miRNA'nın uzunluğunu ve pre-miRNA'nın kesim verimliliğini düzenler (Lee ve Doudna, 2012).

Matür miRNA oluştuktan sonra sitoplazmada AGO proteinine bağlanarak efektör kompleksini oluştur ve bu komplekse RNA-induced silencing complex (RISC) adı verilir (Hammond ve ark., 2001). Bu komplekte RNA dubleksinin AGO proteinine yüklenir ve burada dubleks açılarak kılavuz iplik açığa çıkar. AGO proteini dört farklı bölümden oluşur. Bunlar N-terminal bölgesi, PAZ bölgesi, PIWI bölgesi ve MID bölgesidir. Kılavuz RNA PIWI-MID bölgeleri arasında 5' monofosfat kısmından bağlanır. PIWI bölgesinde RNase H'e benzer RNA kesici bölge bulunmaktadır. PIWI-MID bölgeleri arasında bağlanan kılavuz RNA hedef mRNA'nın 3'UTR bölgesinde komplementer sekans tarar ve PIWI bölgesi hedef mRNA'ya bağlandıktan sonra komplementer bölgenin 10 ve 11. nükleotid arasından keser (Song ve ark., 2004; Parker ve ark., 2005).

Alternatif yolk

DGCR8, Drosha ve Dicer knockout hücrelerden elde edilen küçük RNA sekanslama verilerine göre miRNA'lar mikroişlemci kompleksi veya Dicer olmadan da üretilebilmektedir. Drosha bağımsız olarak oluşturulan miRNA'lar mirtron olarak isimlendirilmektedir. Mirtronlar yapılarında kesim akseptörü ve donör sekansı bulunmaktadır ve mRNA splicing mekanizması ile pre-miRNA oluşmaktadır. Bu aşamadan sonra oluşan pre-miRNA klasik yolağa katılarak matür hale gelir. Bununla birlikte, bu miRNA'ların RNA polimeraz III ile sentezlendiği düşünülmesine rağmen küçük bir kısmı yine RNA polimeraz II ile sentezlenmektedir (Flynt ve ark., 2010; Yang ve Lai, 2011). Bu miRNA'ların bazılarında 5' ucunda 7-metilguanozin şapkası bulunmakta ve exportin 1 ile nükleustan sitoplazmaya transfer olmaktadır (Cai ve ark., 2004). Dicer ile işlemiden sonra 5p'de 7 metilguanozin şapkası bulunduğu için 3p miRNA özellikle seçilmektedir (Yang ve Lai, 2011).

Çoğu alternatif yolk ile üretilen miRNA'lar Dicer bağımlı olmasında rağmen, bazı miRNA'lar Dicer bağımsız olarak da üretilebilmektedir. Bu miRNA'lara splicing-bağımsız mirtron-benzeri miRNA'lar (simtron) adı verilmektedir. Örnek olarak miR-451 bu yolla matür hale gelmektedir. Pri-miR-451'in transkripsiyonundan sonra pri-miRNA Drosha yardımı ile kesilmekte ve 18 nükleotid uzunluğunda sapa sahip kısa saç tokası yapıda pre-miRNA oluşur.

Bu yapı Dicer'in tanıyamayacağı kadar kısadır. Bu yüzden pre-miRNA direkt olarak AGO'ya yüklenir ve 3' ucunun ortasından AGO yardımı ile kesilir. Son aşamada Poli(A)-özgül ribonükleaz (PARN) ile 3' ucundan kırılarak matür hale getirilir (Yoda ve ark., 2013).

2.3.2. Regülasyon

miRNA sekansları genomda birden fazla şekilde bulunabilirler. Özellikle insanlarda kodlanan veya kodlanmayan RNA'ların intronik bölgelerinde ve bazı miRNA'lar ise eksonik bölgelerde de buluna bilmektedir. miRNA kodlayan sekanlar genomda çoğunlukla kümeler şeklinde bulunur. Bu sayede aynı kümeye ait miRNA'lar (mir-100~let-7~mir-125) aynı anda transkribe olurlar ancak regülasyonları post-transkripsiyonel olarak tek tek de olabilmektedir (Lee ve ark., 2002; Roush ve Slack, 2008).

Protein kodlayan genlerin intronik bölgelerinde bulunan miRNA'lar bu genin promoter'ını kullanabilir ve bazı durumlarda da kendi promoter bölgeleri olabileceği gibi birden fazla promoter bölgesine de sahip olabilirler. RNA polimeraz II tarafından transkribe olan miRNA'lar, RNA polimeraz II'yi regüle eden faktörler ile ekspresyonları düzenlenebilmektedir. DNA metilasyonu ve histon modifikasyonu gibi epigenetik faktörler'de miRNA ekspresyonlarının düzenlenmesinde rol alabilmektedir (Ozsolak ve ark., 2008; Monteys ve ark., 2010).

2.4. Eksozom

Eksozomlar 30-110 nm boyutlarında olan hücre membranından türeyen ekstrasellüler nanokeseciklerdir. Çeşitli hücrelerden salgılanmakta birlikte kan, BOS, süt, idrar ve amniyotik sıvı gibi birçok vücut sıvısında varlıkları tespit edilebilmektedir (Gallo ve ark., 2012; Manek ve ark., 2017; Xie ve ark., 2017). Varlıkları Pan ve Johnstone tarafından yapılan çalışmada hücrelerden kopan veziküller olarak tanımlanmıştır (Pan ve ark., 1985). Ayrıca, bu veziküller hücrelerin istenmeyen molekülleri olarak bilinse de 1990 yılından sonra yapılan çalışmalarda eksozomların hücre artığından fazlası olduğu ve hücreler arasında iletişimde görev aldığı gösterilmiştir. Eksozomların hem fizyolojik hem de patolojik durumlarda da salgılandığı ve içeriklerinin salgılandıkları hücre ve fizyolojik duruma göre değişebildiği gösterilmiştir (Isola ve Chen, 2017).

Eksozomların içerikleri rastgele değildir. Her bir eksozom spesifik bir kargo taşır. Bunların içerisinde nükleik asitler, lipidler, proteinler ve şekerler olabilmektedir ve bir eksozomun içeriği salgılanan hücreye göre değişkenlik göstermektedir. Antijen sunucu hücrelerden salınan eksozomlar Majör histokompatibilite kompleks II ve CD86 gibi proteinleri, kardiyomiyositler HP60 ve platelet ve sitotoksik T hücreleri Willebrand faktörü ve perforin gibi proteinleri taşırlar (Peters ve ark., 1991; Heijnen ve ark., 1999; Schorey ve Bhatnagar, 2008). Ayrıca, lipid içerikleri kolesterol, sfingolipidler, digliseridler, fosfolipidler olabilir. En fazla bulunabilen makromoleküller ise nükleotidlerdir (Schorey ve Bhatnagar, 2008). Eksozom içeriğinde bulunan özellikle miRNA ve mRNA'lar alıcı hücredeki hücre siklusu, epigenetik modifikasyon, anjiyogenez ve migrasyon gibi birçok biyolojik olayı etkileyebilir (Isola ve Chen, 2017).

2.4.1. Eksozom Biyogenezi

Eksozom biyogenezi endozomal sistemde başlar. Öncelikle hücre membranı kendi içine doğru katlanarak erken endozomları oluşturur. Hücre sitoplazmasında geç endozom olarak matür hale gelirler. Endozom membranının invajinasyonu sonucunda intralüminel veziküller (ILV) oluşur ve son haline multiveziküler cisimler (MVC) denir. MVC'ler oluşuktan sonra iki farklı sürece girebilirler. (i) Lizozom ile birleşebilir ve (ii) hücre zarı ile birleşerek eksozomları ekstraselüler boşluğa bırakabilir. ILV'nin oluşması iki şekilde olur; "Endosomal Sorting Complex Required for Transport" (ESCRT) bağımlı ve ESCRT-bağımsız (Hessvik ve Llorente, 2017).

ESCRT kompleksi dört farklı kompleks ve ilişkili proteinlerden oluşurlar. ESCRT-0 kargo kümelenmesinde görevlidir. ESCRT-I ve -II tomurcuklanma oluşmasında ve ESCRT-III ise veziküllerin kesiminde rol alır. Yapılan RNAi çalışmalarından elde edilen verilere göre ESCRT-0 ve -I'in baskılanması eksozom salgılanmasını azalttığı gibi ESCRT-III ve ilgili proteinlerin baskılanması eksozom salgılanmasını arttırmıştır. İlgili proteinlerden olan ALIX proteininin baskılanmasıyla eksozom salgısı dentritik hücrelerde azalmasına rağmen, ALIX'in eksozom kargo içeriğinin belirlenmesi ve eksozomların alt tiplerinin belirlenmesinde rol oynadığı belirtilmiştir (Babst, 2011; Kowal ve ark., 2014).

ESCRT proteinlerinin baskılandığı çalışmalarda ILV oluşumları hücre içinde devam ettiğinin gösterilmesi, eksozom oluşumunda ESCRT-bağımsız bir yolak daha olduğunu göstermiştir. Bu yolda tetraspaninler görev almaktadır. Yapılan çalışmalarda CD9 ve CD82'nin ekspresyonları eksozomal salımının artmasına neden olduğu bildirilmiştir. Aynı çalışmada CD9'un baskılandığı koşullarda eksozom ilişkili flotillin-1 proteinin azaldığı gösterilmiştir. Son zamanlarda yapılan çalışmalar CD63'ün de eksozom salgılanmasında gerekli olduğunu göstermiştir. Eksozomal biyogenezin iki farklı yolak ile tanımlanmasında rağmen bu iki yolağın sinerjistik bir şekilde çalışabileceği ve farklı alt tip eksozomların oluşması farklı yollara bağımlı olabilir (Babst, 2011; Isola ve Chen, 2017).

2.5. Biyobelirteç

Biyobelirteçler, normal biyolojik, patojenik veya herhangi bir terapötik müdahale sonucunda alınan farmakolojik yanıtın tarafsızca ölçülüp değerlendirilen belirteçlerdir (Biomarkers Definitions Working, 2001). Dünya Sağlık Örgütü tarafından yapılan daha geniş tanımında ise sadece hastalığın insidans veya sonucunu belirtmeyen, ayrıca tedaviye, herhangi bir müdahaleye, beslenme veya kimyasallar gibi istemsizce maruz kalınan çevresel etkilere olan yanıtı gösteren belirteçler olarak tanımlanmaktadır (Strimbu ve Tavel, 2010). Biyobelirteçler tanım itibari ile biyolojik süreçlerin ölçülebilen nitelikleridir. Bu bağlamda hastanın deneyimleyebileceği veya hissedebileceği sonuçlar olmayabilir. Bu sebeple biyobelirteçler çoğunlukla dolaylı sonuçlar olarak nitelendirilebilir. Kısaca, biyobelirteçlerin kullanımı ile tedavilerin güvenilirliği ve etkinliği hakkında bilgi klinik sonucun takip edildiği sırada alınabilir ve araştırmacılar daha küçük ve verimli klinik çalışmalar tasarlayabilir ve hatta ilaç geliştirme çalışmalarının süreleri kısabilir (Humpel, 2011).

Günümüzde en sık görülen nörodejeneratif hastalıklardan olan AH ve PH için yoğun bir biyobelirteç geliştirme çabası vardır. Çünkü, bu hastalıkların günümüzde hala kesin bir tanısı bulunmamakla birlikte, hastalığın tedavisini takip etmek için güvenilir, ucuz, hızlı ve ölçümü sürekli tekrarlanabilen bir biyobelirteç bulunmamaktadır. Bugüne kadar geliştirilen biyobelirteçler (i) görüntüleme biyobelirteçleri ve (ii) biyokimyasal biyobelirteçler olarak iki ana kategoriye ayrılabilir.

2.5.1. Görüntüleme Biyobelirteçleri

Görüntüleme biyobelirteçleri bir biyolojik özelliğin görüntü kullanılarak ölçülmesidir. Günümüzde PET, manyetik rezonans görüntüleme (MRG) ve bilgisayarlı tomografi (BT) gibi teknikler kullanılmaktadır. Bu tip biyobelirteçlerde hedef hastalığın veya durumun varlığı ile yakın bir şekilde ilişkili olması, ölçümlerin doğru, tekrar edilebilir ve uygulanabilir olması gerekmektedir.

Görüntüleme teknikleri AH ve PH'nin klinik tanısında kilit rol oynamaktadır. Klasik görüşe göre her bir hasta en az bir defa MRG ve BT taraması yaptırmaları gerekmektedir. Kognitif bozukluğa sahip hastalarda yapılacak olan MRG veya BT taraması diğer intrakraniyal olasılıkların elenmesi için gereklidir. Bu yöntemlerle hastaların hipokampal hacimleri daha doğru bir şekilde ölçülebilmektedir (Frisoni ve ark., 2013). Ancak, bu yöntemler karmaşık donanım ve yazılım gerektirdiğinden dolayı klinikte kullanımları kısıtlıdır. Ek olarak MRG taraması ile beyindeki vasküler değişimler gözlemlenebilmekte ve bu yüzden bu sistemlerin otomotizasyonu ve validasyonları çok büyük önem taşımaktadır (Boccardi ve ark., 2015). Bu iki yöntemin dışında PET taraması da AH tanısını kolaylaştırmak için kullanılabilir. FDG ligandı kullanılarak nöronal ve glial hücrelerin glukoz alımları ölçülerek hipometabolizma ve sinaptik bozukluklara karşı hassas bir yöntemdir (Perani ve ark., 2014). Pozitif tarama temporo-parietal ve posterior singulatta ise AH, anterior veya asimetrik veya her ikiside birden var ise FTD olduğunu gösterebilir. Bu sebeple tarama sonuçları incelenirken tüm korteks dikkatle incelenmeli ve bir uzman tarafından yorumlanmalıdır. Bu analizde kullanılan Patern tanıyıcı sınıflandırma yazılımları hastalarda sınıflandırma yapabilir ancak sinaptik bozukluklar da bu analize dahil olabilmektedir. Bu sebeple bu yöntemlerin standardizasyon ve validasyonlarının yapılması ile bireysel tanıda kullanılabilirliği mümkün olabilecektir (Womack ve ark., 2011). Florbetabir, florbetaben ve flutemetamol gibi ligandlar kullanılarak PET taraması ile amiloid beta birikimi görüntülenebilmektedir (Herholz ve Ebmeier, 2011). Bu ligandların doğrulukları çok yüksek olmasına rağmen 60 yaş üstü kognitif olarak sağlıklı bireylerde de yaşa bağlı amiloid beta birikimi yüzünden pozitiflik görülebilmektedir. Bu yüzden amiloid PET taramasının negatif sonucu AH hastalığını dışlamada kullanılması daha uygun olabilmektedir (Wahlster ve ark., 2013). Bununla birlikte beyinde farklı florlanmış ligandlar kullanılarak fibriler tau yumakları da ölçülebilmekte ancak bu ligandların klinikteki uygunluklarının test edilmesi gerekmektedir (Villemagne ve ark., 2015).

PH'de görüntüleme biyobelirteçleri için dört farklı yöntem bulunmaktadır. Dopamin taşıyıcı tek foton emisyonu bilgisayarlı tomografi (DAT-SPECT) yöntemi ile presinaptik dopamin taşıyıcılarının fonksiyonunu ve dopamin yıkımını gösterir. Bu yöntem ligand olarak ^{123}I -N-3floropropil-2betakarbometoksi-3beta-4-iodofenil trofan (^{123}I -FP-CIT) kullanılarak SN'da dopaminerjik inervasyonu gözlemlenmesine olanak sağlar (Seifert ve Wiener, 2013). Bunun dışında florlanmış levodopa formu olan F-DOPA ise PET taramasında ligand olarak kullanılmaktadır. Bunun sebebi ise striatumda dopamin kullanımının analiz edilmesini sağlamasıdır. Testin sonucu PH hastalarında hipokinezi ve rijidite ile korele bulunmuştur. α -sinüklein için son yıllarda PET probu geliştirmek için birçok madde geliştirilmeye çalışılmıştır. Bugüne kadar üretilen ligandlar α -sinüklein için ortalama afiniteye sahiplerdir ve amiloid beta ve tau'ya karşı seçiciliği çok yüksek değildir (Kotzbauer ve ark., 2016). Bir diğer yöntem ise transkraniyal sonografidir. Bu yöntemle SNpc'deki mezensefalik hiperekoik sinyaller alınır ve demir birikimi ölçülür. Demir birikimi PH hastalarında nörodejenerasyonla ilgili olduğu düşünülmektedir (Bouwman ve ark., 2013). MRG yöntemi kullanılarak beyinde demir birikimi hakkında bilgi alınabilir. Beyinde demir birikimi en iyi T2/T2* relaksometri ile ölçülür. Bu görüntüleme yöntemi PH tanısında standart bir prosedür haline gelmiştir ve bu sayede ikincil nedenler elenebilmektedir (Pyatigorskaya ve ark., 2014). Görme duyusu PH'den etkilenen non-motor sistemlerden biridir. Yapılan çalışmalar retinal nöronlarda dopamin seviyesinin azaldığını göstermiştir. Gözde dopamin üreten amakrin hücrelerinin bulunduğu retinal nöron fiber katmanının kalınlığının ölçüldüğü optik koherens tomografi yöntemi potansiyel görüntüleme biyobelirteç adaylarındandır (Satue ve ark., 2016).

2.5.2. Biyokimyasal Biyobelirteçler

Biyokimyasal biyobelirteçler çeşitli vücut sıvıları kullanılarak araştırılmaktadır. Ancak yapılan çoğu çalışmalar iki temel vücut sıvısına yoğunlaşmaktadır. Bunlardan birincisi BOS'tur. BOS toplama yöntemi invazif olmasına karşın BOS'un santral sinir sistemi ile yakın temas etmesi ve beyindeki atıkların temizlenmesinde görev alması sebebiyle, BOS analizi ile beyin kimyasının takibi elverişli olmaktadır. Bir diğer popüler vücut sıvısı ise kandır. Bireylerden kan alınmasının görece invazif olmayan bir yöntem olması, tekrarlanabilir bir şekilde yeni örnek alımının kolay olması ve AH ve PH gibi hastalıklarda kan beyin bariyerinin

bozulmasıyla kana geçebilen beyin moleküllerinin azda olsa bulunabilmesi gibi özellikleri kanı ilgi çekici bir biyobelirteç kaynağı haline getirmektedir.

AH'de BOS'tan ölçülen üç ana biyobelirteç bulunmaktadır. Bunların her biri hastalıkta gerçekleşen anahtar patofizyolojik olayları yansıtabilmektedir. Bugün klinikte de kullanılmakta olan bu proteinler A β (1-42), total-tau (tTau) ve hiperfosfo-tau (pTau) olarak üç tanedir (Olsson ve ark., 2016). Bu proteinlerin ölçümü için en çok kullanılan yöntem ELISA yöntemidir. Yapılan meta-analiz sonuçlarına göre AH'de BOS'ta ölçülen tTau ve pTau seviyelerinde artış ve A β (1-42) seviyesinde azalma olmaktadır. Ayrıca, bu biyobelirteçlerin tanısal performansları otopsi sonuçları ile valide edilmiştir ve klinik tanıdan daha iyi tanısal performansları olduğu bilinmektedir (Koopman ve ark., 2009; Shaw ve ark., 2009). Bu biyobelirteçlerin en büyük problemleri laboratuvarlar arasında veya kullanılan malzeme serilerin farklı olması durumunda ölçümler arasında farklılıklar olabilmesidir. Kütle spektrometrisi ile ölçülmüş ve valide edilmiş referans standart örneklerinin kullanılması ve otomatikleştirilmiş robotize sistemlerin kullanımı bu varyasyon kaynaklarını ortadan kaldırılmasına yardım etmektedir (Mattsson ve ark., 2011). Bunlar dışında neurofilament light chain (NfL), Neurogranin, Trem2 ve YKL-40 gibi sinaptik dejenerasyonu ve nöroinflamasyonu gösteren birçok aday biyobelirteç bulunmaktadır (Blennow, 2017; Zetterberg, 2017). Görüntüleme ve BOS biyobelirteçleri hastalığın patofizyolojisini iyi yansıtmasına rağmen PET gibi görüntüleme yöntemleri pahalı ve sadece uzmanlaşmış merkezlerde bulunabilmektedir. Ayrıca, BOS'tan örnek toplanması birçok klinisyen tarafından zaman alıcı, invazif ve karmaşık görülebilmektedir. Bu yüzden kandan biyobelirteç arayışları daha pratik bir yöntem olarak karşımıza çıkmaktadır. A β (1-42) ve tau proteinleri kanda da ölçülebilmektedir ancak beyindeki patoloji ile korelasyonları düşüktür. Plazmada ölçülen NfL seviyesi ise BOS'ta ölçülen seviye, düşük kognisyon ve beyin atrofisi ile yüksek seviyede korele olduğu bildirilmiştir (Blennow, 2017).

PH hastalığında ise bugüne kadar BOS ve kanda bulunan birçok molekül biyobelirteç adayı olarak PH tanısı veya diğer parkinsonizmlerden ayırt etme amacıyla incelenmiştir. Bunların arasında en dikkat çekici olanları α -sinüklein ve *DJ-1*'dir (Kang ve ark., 2016). Ancak, yapılan çalışmalardan elde edilen sonuçlar arasında varyasyonlar bulunmaktadır. Standardize olmayan örnek toplama yöntemleri, örnek kontaminasyonu, heterojen çalışma popülasyonu gibi sebepler varyasyonlara neden olabilir (Le ve ark., 2017). Bunların dışında serumda ölçülen ürat seviyesi

PH riski ile apolipoprotein A1 seviyesi ise erken PH başlangıcı ve motor semptomlarının şiddeti ile korele bulunmuştur (Lotankar ve ark., 2017).

2.5.3. Yeni biyobelirteç adayları

Son yıllarda yapılan çalışmalarda elde edilen veriler miRNA düzensizliklerinin nörodejenerasyona katkıda bulunduğu ve hatta nörodejenerasyonda rol oynayan birçok mekanizmayı etkilediği gösterilmesi sebebiyle miRNA'lar biyobelirteç çalışmalarının ilgi odağı olmuştur. AH ve PH'de ifadesi değişen miRNA'ların belirlenmesi hastalıkların erken tanısının yapılabilmesine yardımcı olabileceği ve uygulanan tedavinin takibinin daha kolay olabileceği düşünülmektedir. Biyobelirteç çalışmalarında kaynak olarak kullanılan BOS ve kanda miRNA'lar serbest halde veya eksozomların içerisinde paketlenmiş olarak bulunabilirler. Bu miRNA'ların yıkıma dayanıklılıkları ve kan beyin bariyerini geçebilmeleri sayesinde kanda veya BOS'nda tespitleri kolaydır.

Bugüne kadar yapılan çalışmalarda öncelikle miRNA'ların tek tek tanısal değerleri incelenmiş ancak tartışmalı sonuçlar elde edilmiştir. Bundan sonraki çalışmalar miRNA imzaları oluşturmaya yönelik olmuştur. Denk ve ark. yaptığı çalışmada BOS'ta 1178 miRNA'nın ifade değişimi RT-qPCR tabanlı array kullanılarak üç miRNA'nın BOS protein biyobelirteçleri ile birlikte AH'yi %95,5 doğruluk payı ile sınıflandırabilmektedir (Denk ve ark., 2015). Ayrıca, Kumar ve ark. yaptığı çalışmada plazmada yedi miRNA imzası ile AH'nı kontrol grubundan %95 oranında ayırt edebilmiştir (Kumar ve ark., 2013). Ayrıca, tanısal miRNA arayışları eksozomal miRNA'ların kullanılmasıyla devam etmektedir. Cheng ve ark. yaptığı çalışmada 16 eksozomal miRNA imzası AH'nı tahmin edilmesinde %87 hassaslık ve %77 özgüllük bulunmuştur (Cheng ve ark., 2015). Bir başka çalışmada ise miR-9 ve miR-598'in AH'nın ayırt edici tanısında potansiyel biyobelirteç olabileceği öne sürülmüştür (Riancho ve ark., 2017).

miRNA'lardan biyobelirteç arayışları PH için de yapılmaktadır. miR-19b'un PH'nda downregüle olduğu ve hastalığın ortaya çıkışından 4.5 yıl öncesinde de seviyesinin değiştiğini bildirmişlerdir (Fernandez-Santiago ve ark., 2015). Bir başka çalışmada BOS örneklerinden yapılan analizde miR-1 ve miR-19b'nin ifadelerinin azaldığını göstermişlerdir. Ayrıca, PH hastalarından alınan plazma örneklerinden incelenen miRNA'lardan miR-626 ve -505'in tahmini tanısal değerinin %100 doğrulukta ve %91 özgüllükte olduğu bildirilmiştir (Khoo ve ark., 2012). PH'nda da eksozomal miRNA çalışmaları yapılmaktadır ve Cao ve ark. yaptığı

Çalışmaya göre miR-19b ve -24'n PH'de potansiyel tanısal değerlerinin olabileceği gösterilmiştir (Cao ve ark., 2017).



3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Araştırmanın Tipi

Çalışma Olgu-Kontrol tipinde, deneysel bir çalışmadır.

3.2. Araştırmanın Yeri ve Zamanı

Çalışma Ocak 2015 ile Aralık 2017 tarihleri arasında Dokuz Eylül Üniversitesi Araştırma laboratuvarı ve İzmir Biyotıp ve Genom Enstitüsü, Genç Lab'ta gerçekleştirilmiştir.

3.3. Araştırmanın Evreni ve Örneklemi/Çalışma Grupları

Dokuz Eylül Nöroloji A.B.D. Demans polikliniğinde izlenmekte muhtemel Alzheimer tanısı almış hastalar (n=24) ve muhtemel FTD tanısı almış hastalar (n=17) nörolojik hasta kontrol grubu olarak çalışmaya alındı. Hastalıkların tanısı muhtemel Alzheimer hastalığı için “Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, 4th edition” (DSM-IV) ve “The National Institute of Neurological and Communicative Disorders and Stroke and the Alzheimer’s disease and Related Disorders Association” (NINCDS-ADRDA) tanı kriteri baz alınarak konuldu. Kontrol grubu (n=29) ise nörolojik herhangi bir rahatsızlığı bulunmayan, hastaneye herhangi bir ameliyat için yatırılan ve spinal anesteziye gerek duyulan bireylerden seçildi. α -sinüklein ölçümü için gerekli olan BOS örnekleri yurtdışından gönderilmiştir.

3.4. Çalışma Materyali

Hasta ve kontrol grubundan alınan beyin omurilik sıvısı ve periferik kan örneklerinden elde edilen serum örnekleri ve klinik görüşme sırasında uygulanan mini mental durum muayenesi skorları çalışma materyali olarak kullanıldı.

3.5. Araştırmanın Değişkenleri

Serum ve ekzozom miRNA düzeyleri (Bağımlı Değişken)

BOS'ta Amiloid beta ve pTau düzeyleri (Bağımlı Değişken)

Alzheimer Hastalığı (Bağımsız Değişken)

Frontotemporal Demans Hastalığı (Bağımsız Değişken)

Cinsiyet kadın ve erkek olarak belirtildi.

Standardize mini mental test (SMMT) kullanılarak bilişsel durum değerlendirildi.

3.6. Veri Toplama Araçları

3.6.1. Alzheimer Hastalığı için Yöntemler

3.6.1.1. Olgu Veri Kayıt Formları

Çalışmaya katılan katılımcılardan, yaş, cinsiyet ve hastalık başlangıç yaşı bilgilerinin alınıp kaydedilmesi için demografik bilgi formu kullanılmıştır.

3.6.1.2. Nöropsikolojik Veri Toplama

Hastaların ve kontrol grubunun kognitif durumlarının değerlendirilmek amacıyla standardize nöropsikolojik test olan SMMT uygulanmıştır.

3.6.1.3. BOS'ta $A\beta_{(1-42)}$ ve $pTau_{(181p)}$ Düzeylerinin Ölçümleri

Hasta ve kontrollerden toplanan BOS örneklerinden AH için $A\beta_{(1-42)}$ ve $pTau_{(181p)}$, PH için ise α -sinüklein seviyeleri ELISA yöntemine göre çalışan ticari kitler kullanılarak ölçümler gerçekleştirildi.

$A\beta_{(1-42)}$ ölçümü için aşağıda belirtilen adımlar izlendi.

- BOS örnekleri kullanılmadan önce 10 sn boyunca vortekslendi.
- Standart örnekleri 2000 pg/ml, 1500 pg/ml, 1000 pg/ml, 500 pg/ml, 250 pg/ml, 125 pg/ml ve kör olacak şekilde hazırlandı
- 96-kuyucuklu polipropilen plağa 30µl örnek ve standartlar sırası ile konuldu.
- Antikor ile kaplı başka plağa önce kuyu başına 75 µl conjugate working 1 solüsyonu ve daha sonra aynı sıra ile örnek ve standartlar 25 µl hacimde eklendi.
- Plak 1 dk boyunca 1000 rpm'de karıştırıldı ve 1 saat boyunca oda sıcaklığında inkübe edildi.
- İnkübasyon sonunda plak 5 defa yıkama solüsyonu ile yıkandı.
- Yıkama sonrasında plağa kuyu başına 100µl olacak şekilde conjugate working 2 solüsyonu eklendi ve 30 dk boyunca oda sıcaklığında inkübe edildi.
- Plak 5 defa yıkama solüsyonu ile yıkandı.
- Yıkama bitiminde plağa kuyucuk başına 100 µl olacak şekilde substrate working solüsyonu eklendi ve 30 dk boyunca oda sıcaklığında ve karanlıkta inkübe edildi.
- İnkübasyon bitiminde her bir kuyucuğa 50 µl stop solüsyonu eklendi ve 450 nm dalga boyunda (620 nm referans dalga boyu ile birlikte) plak okuyucuda okutuldu.

- Örneklerin konsantrasyonları standart eğri kullanılarak hesaplandı.

pTau_(181p) ölçümü için aşağıda belirtilen adımlar izlendi.

- BOS örnekleri kullanılmadan önce 10 sn boyunca vortekslendi.
- Standart örnekleri 500 pg/ml, 250 pg/ml, 125 pg/ml, 62,5 pg/ml, 31,25 pg/ml, 15,6 pg/ml ve kör olacak şekilde hazırlandı.
- Antikor ile kaplı plağa önce kuyu başına 25 µl conjugate working 1 solüsyonu ve daha sonra aynı sıra ile örnek ve standartlar 75 µl hacimde eklendi.
- Plak 1 dk boyunca 1000 rpm’de karıştırıldı ve gece boyunca + 4 °C’de inkübe edildi.
- İnkübasyon sonunda plak 5 defa yıkama solüsyonu ile yıkandı.
- Yıkama sonrasında plağa kuyu başına 100µl olacak şekilde conjugate working 2 solüsyonu eklendi ve 60 dk boyunca oda sıcaklığında inkübe edildi.
- Plak 5 defa yıkama solüsyonu ile yıkandı.
- Yıkama bitiminde plağa kuyucuk başına 100 µl olacak şekilde substrate working solüsyonu eklendi ve 30 dk boyunca oda sıcaklığında ve karanlıkta inkübe edildi.
- İnkübasyon bitiminde her bir kuyucuğa 50 µl stop solüsyonu eklendi ve 450 nm dalga boyunda (620 nm referans dalga boyu ile birlikte) plak okuyucuda okutuldu.
- Örneklerin konsantrasyonları standart eğri kullanılarak hesaplandı.

3.6.1.4. Serumdan Eksozom İzolasyonu

Serumda bulunan eksozomların izolasyonu için ticari olarak satılan Serum Total Exosome Isolation solüsyonu (Invitrogen, ABD) kullanılmıştır. İzolasyon aşağıdaki adımlar izlenerek gerçekleştirilmiştir.

- Serum örnekleri oda sıcaklığında eritildi. 200 µl serum örneği kullanılarak hücre ve kalıntılarından kurtulmak için 2000 x g’de 30 dk boyunca santrifüj edildi.
- Süpernatantlar yeni RNase ve DNase free tüplere aktarıldı.
- Her bir örneğe elde edilen süpernatantların hacimlerinin 5’te 1’i oranında izolasyon solüsyonu eklendi ve karışım vortekslendi.
- Örnekler +4 °C’de 30 dk boyunca inkübe edildi.
- Örnekler inkübasyon bitiminde oda sıcaklığında 10000 x g’de 10 dk boyunca santrifüj edildi.

- Süpernatantlar uzaklaştırıldı ve tüplerin dibinde kalan pellet 200 µl 1X PBS kullanılarak çözüldü.
- Örnekler sonraki analizlere kadar -20 °C’de saklandı.

3.6.1.5. Dinamik Işık Saçılım (DLS) Analizi

İzole edilen eksozomların karakterizasyonu için DLS analiz yöntemi kullanılmıştır. Bunun için eksozom örneklerinden rastgele seçilen örnek 1:1000 olacak şekilde 1X PBS ile seyreltildi ve Zetasizer nanoseries enstrümanı (Malvern Nano-Zetasizer, $\lambda = 532 \text{ nm}$) kullanılarak izole edilen eksozomların boyu ölçüldü.

3.6.1.6. Eksozomların Kantitatif Ölçümü

Her bir hasta grubundan rastgele 5 eksozom örneği seçilmiştir ve miktarlarının ölçülmesi için ticari olarak satılan ExoCET (System Biosciences, ABD) kiti kullanıldı. Ölçümler için aşağıdaki basamaklar izlendi.

ExoCET kit adımları;

- 20 µl eksozom 80 µl liziz tamponu ile karıştırılarak 37 °C’de liziz için inkübe edildi.
- Örnekler 15 saniye boyunca vortekslendi.
- Örnekler 5 dk boyunca 1500 x g’de santrifüjlendi ve süpernatantları yeni tüplere aktarıldı.
- ExoCET standartların içindeki eksozom sayıları 1.28E10, 6.40E9, 3.20E9, 1.60E9, 8.00E8, 4.00E8, 2.00E8 ve kör olacak şekilde hazırlandı.
- Kullanılacak olan her bir kuyucuğa 50 µl Reaksiyon tamponundan eklendi.
- Daha sonra, standartlar ve örnekler ilgili kuyucuklara 50 µl olacak şekilde eklendi.
- Plak oda sıcaklığında 10 dk inkübe edildi.
- Varioskan plak okuyucu (Thermo Scientific, ABD) kullanılarak 405 nm’de ölçüm yapıldı.
- Örneklerin miktarları standart eğri çizilerek hesaplandı.

3.6.1.7. Serumda ve eksozomlarda bulunan total RNA’ların izolasyonu

Serumda bulunan ve biyobelirteç değeri taşıyabilecek miRNA’lar daha önce grubumuz tarafından yapılan mikroarray çalışması sonucunda elde edilen verilerden belirlendi. Buna göre;

Serum ve eksozomlardan miRNA izolasyonu ticari kit (Qiagen, Almanya) kullanılarak aşağıda anlatılan adımlar izlenerek gerçekleştirildi.

- 200µl serum örneğine 5µl liziz solüsyonundan eklenip vortekslendi ve oda sıcaklığında 5 dk inkübe edildi.
- Daha sonra 5 nM konsantrasyonunda hazırlanmış 5 µl spike in kontrol miRNA'sı (Ce_miRNA_39) her bir örneğin karışımına eklenip 2 dk oda sıcaklığında inkübe edildi.
- Örnekler 15 dk boyunca 12.000xg'de +4°C'de santrifüj edildi.
- Renksiz üst kısım alınarak 1,5 katı kadar mutlak etanol eklenip karıştırıldı.
- 700 µl karışımdan alınıp kolona eklenerek ve >8000 x g'de santrifüjlendi.
- Kolonlara 700µl RWT yıkama solüsyonu eklenerek aynı şekilde santrifüjlendi.
- Kolonlara 500 µl RPE yıkama solüsyonu eklenerek aynı şekilde santrifüjlendi.
- Kolonlara 500µl RPE yıkama solüsyonu eklenerek aynı şekilde santrifüjlendi.
- Kolonlar boş bir şekilde santrifüj edilerek kalan etanolden arındırıldı.
- Daha sonra kolona 14 µl DNase ve RNase free su eklenerek elüsyon gerçekleştirildi.

3.6.1.8. Komplementer DNA (cDNA) Sentezi

Bir önceki aşamadan elde edilmiş olan toplam 40 ng ticari olarak satılan miScript RT II kiti (Qiagen, Almanya) kullanılarak cDNA sentezi için kullanılmıştır. Reaksiyon, her bir örnek için Tablo 2'de gösterilen malzemeler ile belirtilen miktarlar kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

Tablo 2. cDNA sentezlemek için gerekli malzemeler ve miktarları

Bileşen	Hacim
5x HiSpec tampon	4µl
10x Nükleik Asit	2µl
RNase-free su	Toplam hacim 20 µl'ye tamamlanacak
miScript Reverse Transcription Mix	2µl
Template RNA	Değişken

- Yukarıdaki tabloya göre hazırlanan reaksiyon karışımı 37°C'de 60 dk boyunca inkübe edildi.

- Daha sonra karışım 95°C'ye ısıtılarak 5 dk boyunca enzim inaktivasyonu için inkübe edildi.
- Elde edilen cDNA 'lara 20 µl RNase-free su eklenerek -20°C'de saklandı.

3.6.1.9. Gerçek Zamanlı Kantitatif PCR (qPCR) Analizi

Elde edilen cDNA 'lardan ticari olarak satılan miScript SYBR Green Master Mix (Qiagen, Germany) kullanılarak analiz gerçekleştirildi. Her bir qPCR reaksiyonu Tablo 3'te belirtilen miktarlarda bileşenler kullanılarak gerçekleştirildi. miRNA 'ların kat değişimi $2^{-\Delta\Delta Ct}$ yöntemi ile hesaplandı. Sentetik ce-miR-39 normalizasyon için kullanıldı.

Tablo 3. qPCR reaksiyonu için gerekli malzemeler ve miktarları

Bileşen	Hacim
2x Master Mix	10µl
10x Universal Primer	2µl
10x miRNA özgül primer	2µl
RNase free Su	5µl
Template RNA	1 µl (1ng cDNA'ya eşit)

Tablo 4. Analizde kullanılan miRNA primerleri

miRNA	miRBase Accession #	Dizi
ce_miR-39	MIMAT0000010	5'UCACCGGGUGUAAAUCAGCUUG
miR-16	MIMAT0000069	5'UAGCAGCACGUAAAUAUUGGCG
miR-126	MIMAT0000445	5'UCGUACCGUGAGUAAUAAUGCG
miR-20b	MIMAT0001413	5'CAAAGUGCUCAUAGUGCAGGUAG
miR-320a	MIMAT0000510	5'AAAAGCUGGGUUGAGAGGGCGA
miR-320b	MIMAT0005792	5'AAAAGCUGGGUUGAGAGGGCAA
miR-320c	MIMAT0005793	5'AAAAGCUGGGUUGAGAGGGU
miR-663-3	MIMAT0003326	5'AGGCGGGGCGCCGCGGGACCGC
miR-762	MIMAT0010313	5'GGGGCUGGGGCGGGGCGGAGC
miR-1469	MIMAT0007347	5'CUCGGCGCGGGGCGCGGGCUCC
miR-1915-3p	MIMAT0007892	5'CCCCAGGGCGACGCGGCGGG

miR-1915-5p	MIMAT0007891	5'ACCUUGCCUUGCUGCCCGGGCC
-------------	--------------	--------------------------

3.6.1.10. Biyoinformatik Analizi

miRNA'ların tahmin edilen hedeflerini ve ilgili “Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes” (KEGG) yollarını DIANA-miRPath v3.0 çevrimiçi analizi ile inceledik . KEGG zenginleştirme analizi için istatistiksel anlamlılık seviyesini 0.001 olarak belirledik (Vlachos ve ark., 2015). miRNA ve yollar arasındaki ilişkiyi görselleştirmek için Cytoscape 3.5 yazılımı kullanıldı (Shannon ve ark., 2003).

3.6.2. Parkinson Hastalığı için Yöntemler

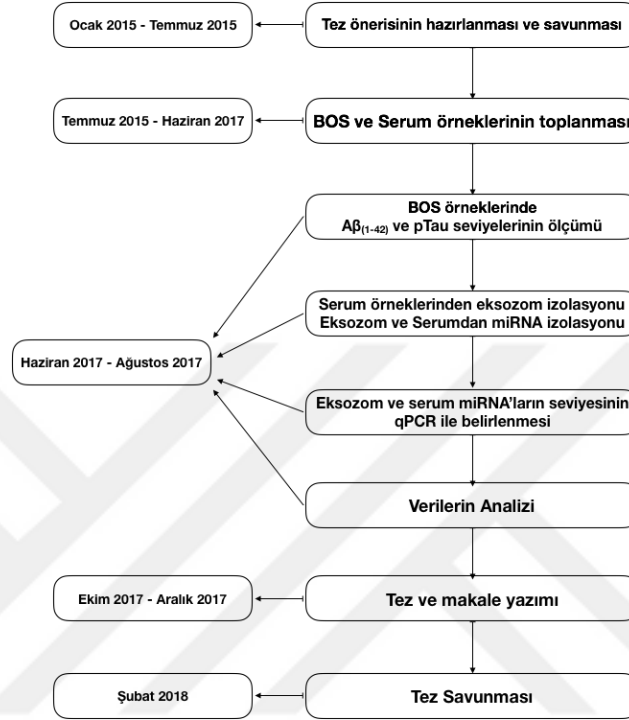
3.6.2.1. BOS'ta α -sinüklein Düzeylerinin Ölçümü

BOS'ta α -synüklein (Covance, ABD) ölçümleri için aşağıda belirtilen adımlar izlendi.

- Standart örneklerinin konsantrasyonları 1500 pg/ml, 600 pg/ml, 240 pg/ml, 96 pg/ml, 38.4 pg/ml, 15.4 pg/ml, 6.1 pg/ml ve kör olacak şekilde 1X reagent diluent kullanılarak hazırlandı.
- BOS örnekleri 1X reagent kullanılarak 1:10 ve 1:25 olarak iki farklı seyreltme oranı kullanılarak seyreltildi.
- Örneklerin ve standartların hazırlanmasından sonra, antikor ile kaplanmış olan plak 300µl/kuyucuk olacak şekilde yıkama solüsyonu ile 4 defa yıkandı.
- Yıkama işleminden sonra standartlar 200 µl/kuyucuk olacak şekilde üçlü olarak plağa eklendi. Örnekler 200µl/kuyucuk olacak şekilde duplike olarak plağa eklendi. Plak gece boyunca +4 °C’de inkübe edildi.
- Ertesi gün plak 4 defa yıkama solüsyonu ile yıkandı.
- Daha sonra 1X reagent diluent ile 1:1000 seyreltilen antikor biotinylated primer antikor 50µl/kuyucuk olacak şekilde plağa eklendi ve oda sıcaklığında 2 saat inkübe edildi.
- Inkübasyon sonunda plak tekrar 4 defa yıkama solüsyonu ile yıkandı.
- Streptavidin-HRP 1X reagent diluent kullanılarak 1:15000 olarak seyreltildi. Solüsyon 200µl/kuyucuk olarak plağa eklendi ve oda sıcaklığında 1 saat boyunca inkübe edildi.
- Inkübasyon bitiminde plak 4 defa yıkama solüsyonu ile yıkandı.
- Kemilüminesan A ve B solüsyonları 1:1 olacak şekilde karıştırıldı ve 100µl/kuyucuk olarak plağa eklendi.

- Plak okuyucu (Biotek, ABD) kullanılarak kemilüminesan okuma yapıldı.
- Örneklerin konsantrasyonları standart eğri kullanılarak hesaplandı.

3.7. Araştırma Planı ve Takvimi



3.8. Verilerin Değerlendirilmesi

Verilerin istatistiksel analizi için IBM SPSS Statistics for Mac (IBM, ABD) programının 20.0 versiyonu kullanıldı. Ayrıca, verilerin görselleştirilmesi için Prism 7.0a (Graphpad, ABD) programı kullanıldı. Elde edilen değerlerin dağılımını belirlemek için Kolmogorov-Smirnov testi kullanıldı. Dağılımın normal olmaması durumunda Kruskal Wallis testi, normal dağılım durumunda Mann-Whitney U testi kullanıldı ve $p < 0,05$ değerleri anlamlı olarak kabul edildi.

Elde edilen miRNA verilerinin hastalıkları birbirinden ayırt ediciliğini belirlemek için, ROC eğim analizi kullanıldı. $p < 0.001$ değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi ve eğim altında kalan alan (AUC) için en uygun kesim değerleri, özgüllük ve hassasiyet değerleri hesaplandı.

miRNA ifade seviyeleri ile klinik parametrelerin ($p\text{Tau}_{(181P)}$, $A\beta_{(1-42)}$, SMMT skoru ve yaş) korelasyon analizi Pearson korelasyon analizi kullanılarak yapıldı. Ki-kare testi gruplar arasındaki cinsiyet farklarını analiz etmek için kullanıldı.

3.9. Araştırmanın Sınırlılıkları

Çalışmadan elde edilen serum miRNA'ların seviyeleri bağımsız ve farklı merkezlerden toplanan örnekler ile genişleterek sonuçların tekrarlanabilirliği gösterilmelidir. Ayrıca, çalışmamızda elde edilen eksozomal miRNA'lar kanda bulunan nöronal kökenli eksozomlarda tekrar edilmelidir. Bu şekilde çalışmanın güvenilirliği ve değeri artmış olacaktır. Tüm bunları desteklemek amacı ile AH ve FTD fare modelinde bu miRNA'ların rolleri belirlenebilir. Çalışma AH ile FTD tanısında 'ye ayırıcı tanıyı kolaylaştırabilecektir. AH çok uzun yıllardır bilinen bir hastalık olmakla birlikte patogenezi yeni aydınlığa kavuşmaktadır. Patojenezde miRNA'ların rolü son yıllarda ortaya konmuştur. Bu çalışma ile AH'nın patojenezine yeni bir katkı sağlanmıştır. α -sinüklein ELISA testi sonuçlarının diğer laboratuvarların sonuçları ile karşılaştırılması için gerekli olan sertifikalı referans materyalinin olmaması bu testin yorumlanmasını sınırlamaktadır.

3.10. Etik Kurul Onayı

Araştırmamız, Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulundan 17.09.2015 tarihli ve 32-SBKAEK Protokol numaralı 2015/16-24 kararı ile etik kurul iznine sahiptir.

4. BULGULAR

4.1. Demografik veriler

Hasta gruplarına ilişkin demografik veriler Tablo 5'te verilmiştir. Validasyon grubundan elde edilen $A\beta_{(1-42)}$ ve $p\text{Tau}_{(181p)}$ seviyeleri AH tanısını desteklemiştir. Ayrıca, yaş ve SMMT skorları için hasta grupları arasında istatistiksel olarak bir farklılık bulunmamıştır. Parkinson hastalarının BOS örnekleri Klinik Nörokimya/Sahlrenska Mölndal Üniversite hastanesinde toplanmıştır. Ancak, bize yollanan örneklerin demografik verileri paylaşılmamıştır ve/veya makalede yayınlanmamıştır.

Tablo 5: Hasta ve Kontrol grubunun demografik verileri

	Tarama Grubu		Validasyon Grubu			<i>p</i> -değeri
	Kontrol (n= 10)	AH (n=10)	Kontrol (n= 29)	AH (n=24)	FTD (n=17)	
Yaş, Ortalama (SD)	69.5 (9.9)	76.9 (2.1)	64.7 (11.2)	61.6 (1.6)	57.5 (2.8)	0.56
Cinsiyet, Kadın/Erkek	4/6	8/2	7/22	15/9	7/10	0.019
SMMT Skoru, Ortalama (SD)		17.4 (2.4)		16.5 (1.6)	15.2 (1.9)	0.73
CSF $A\beta_{(1-42)}$, Ortalama (SD). pg/ml			1181 (284.9)	569.2 (261.2)	655.9 (201.8)	<0.0001
CSF $p\text{Tau}_{(181p)}$, Ortalama (SD). pg/ml			41.15 (16.41)	90.74 (40.37)	43.24 (24.54)	<0.0001

4.2. Alzheimer Hastalığı için Bulgular

4.2.1. Alzheimer hastalığında mikroarray yöntemi ile belirlenen serum miRNA'lar

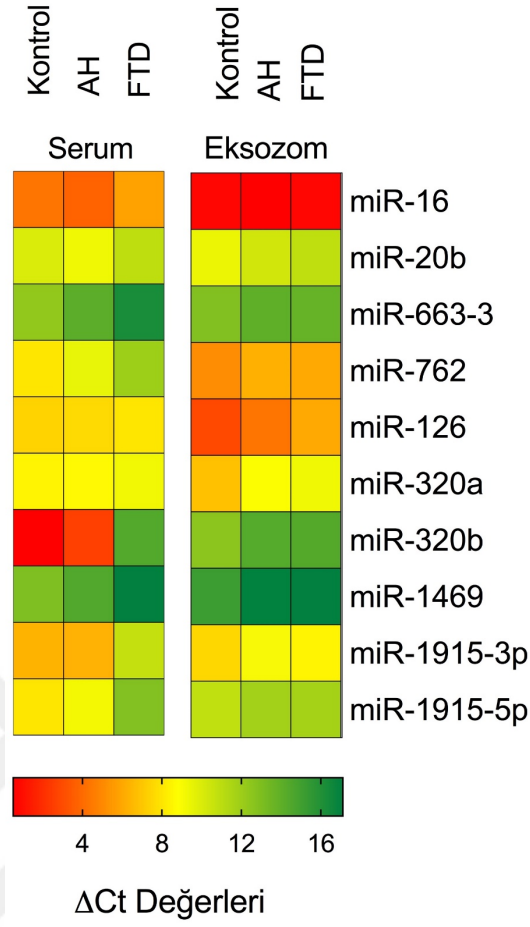
Serumda bulunan ve biyobelirteç değeri taşıyabilecek miRNA'lar daha önce grubumuz tarafından yapılan microarray çalışması sonucunda elde edilen veriler kullanılarak belirlenmiştir (Öner, 2012). Bunun için Affymetrix firması tarafından üretilen GeneChip miRNA 2.0 Array çipi kullanılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre AH serum örneklerinde 21 miRNA'nın ifadesinin değiştiği belirlenmiştir. miRNA'ların listesi Tablo 6'da verilmiştir. Daha sonra valide etmek istediğimiz miRNA'ları seçmek için 2 kat ifade değişimi ve istatistiksel olarak *p* değerinin 0,05'ten küçük olması kriterleri uygulanmıştır. Buna göre 10 adet miRNA'yı (seçilen miRNA'ları Tablo 6'da gri olarak belirtilmiştir.) bağımsız yeni bir hasta-kontrol grubu kullanarak yeniden analiz edilmiştir.

Tablo 6: Mikroarray analizi ile belirlenen ifadesi değişmiş miRNA'lar

miRNA	Karşılaştırmalı İfade Değişimi (AH/Kontrol)	<i>p</i> değeri
Upregölasyon		
hsa-miR-16	6.16	0.046
hsa-miR-126	2.09	0.044
hsa-miR-20b	2.02	0.016
hsa-miR-15a	1.56	0.039
hsa-miR-30d	1.35	0.037
hsa-miR-660	1.29	0.003
hsa-miR-324-3p	1.23	0.024
hsa-miR-92b	1.22	0.026
hsa-miR-3148	1.21	0.044
hsa-miR-1263	1.16	0.001
Downregölasyon		
hsa-miR-129-3p	0.90	0.043
hsa-miR-1825	0.74	0.017
hsa-miR-1280	0.72	0.034
hsa-miR-762	0.46	0.031
hsa-miR-1915	0.45	0.017
hsa-miR-663	0.44	0.002
hsa-miR-320b	0.43	0.034
hsa-miR-320c	0.43	0.020
hsa-miR-1469	0.39	0.005
hsa-miR-320a	0.36	0.023

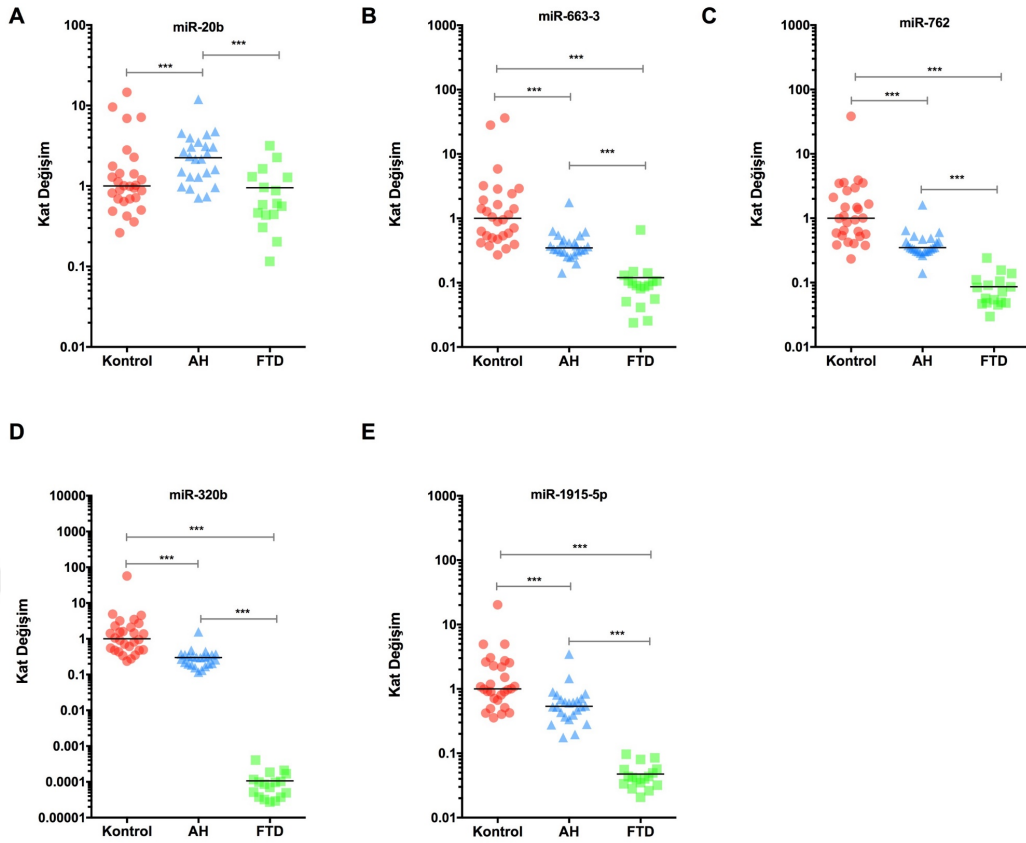
4.2.2. Seçilmiş ifadesi değişen miRNA'ların yeni hasta grubunun serum örneklerindeki seviyelerinin belirlenmesi

Mikroarray analizi sonucunda seçtiğimiz miRNA'ların validasyonu için yeni bir hasta grubu kullanılmıştır. Hasta grubunun demografik verileri Tablo 5'te gösterilmiştir. miRNA'ların ifade değişimleri, serumdan ve eksozomdan izole edilen RNA'lar ile qPCR yöntemi kullanılarak incelenmiştir. Tüm miRNA'ların normalize edilmiş Ct değerleri karşılaştırma için Şekil 1'de gösterilmiştir.



Şekil 1. Serum ve Eksozomlarda seviyesi ölçülen miRNA'ların ce-miR-39 spike-in kontrol ile normalize edilmiş Ct değerlerinin heatmap gösterimi.

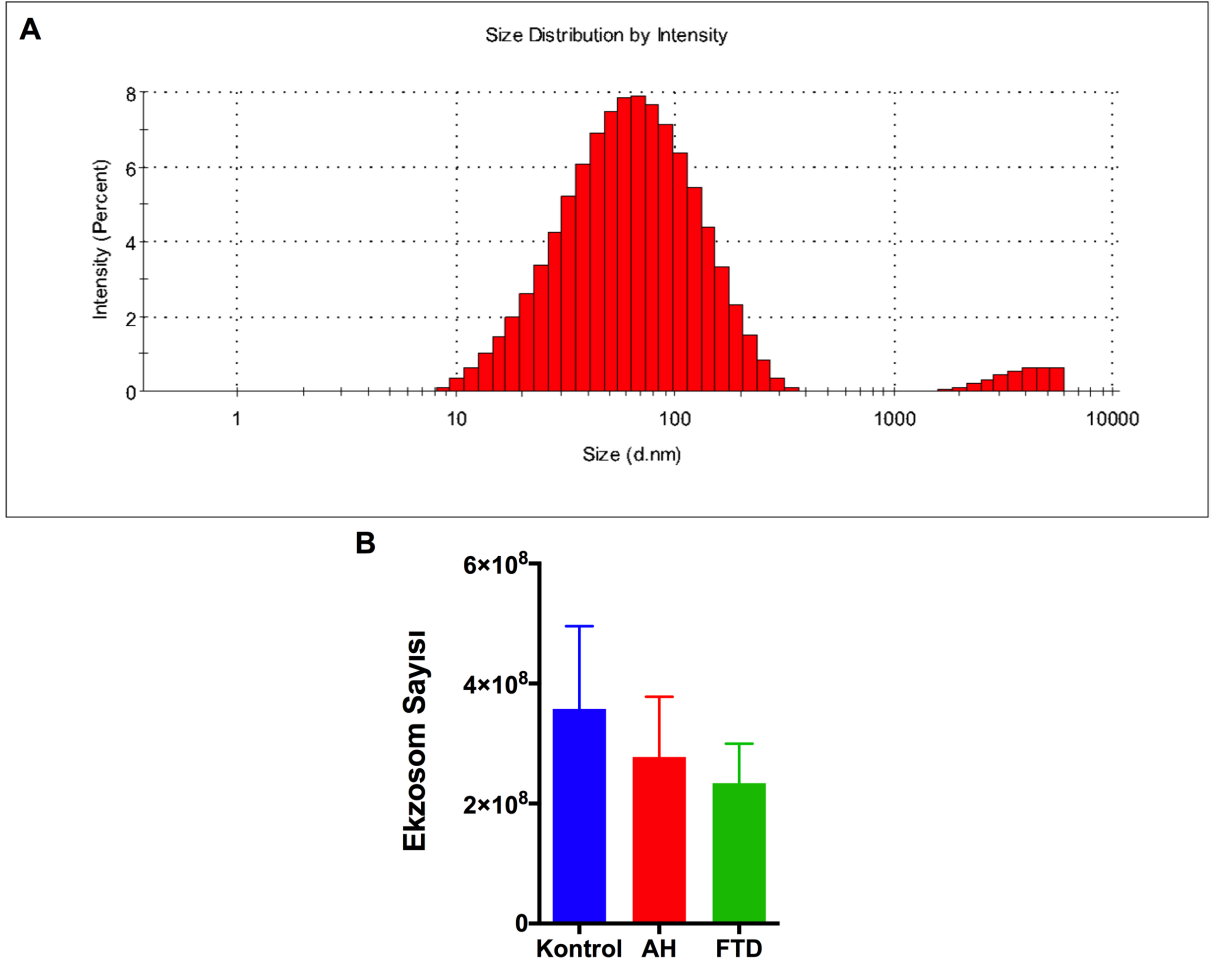
Elde edilen sonuçlara göre, sadece 5 miRNA, mikroarray sonuçları ile uyumlu bulunmuştur. Bu miRNA'lardan miR-20b AH hastalarında istatistiksel anlamlılıkta artış göstermiştir. miR-663, miR-762, miR-320b ve miR-1915-5p seviyeleri AH hastalarında istatistiksel anlamlılıkta azaldığını gösterilmiştir. Ancak, miR-320c seviyesi serumda belirlenememiştir (Şekil 2).



Şekil 2. Farklı hasta gruplarının serumdaki miRNA seviyeleri. Karşılaştırmalı miRNA seviyeleri qPCR yöntemi ile ölçülmüştür. Gruplar arasındaki farklar Kruskal-Wallis ve Mann Withney-U testi kullanılarak analiz edilmiştir. (** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$)

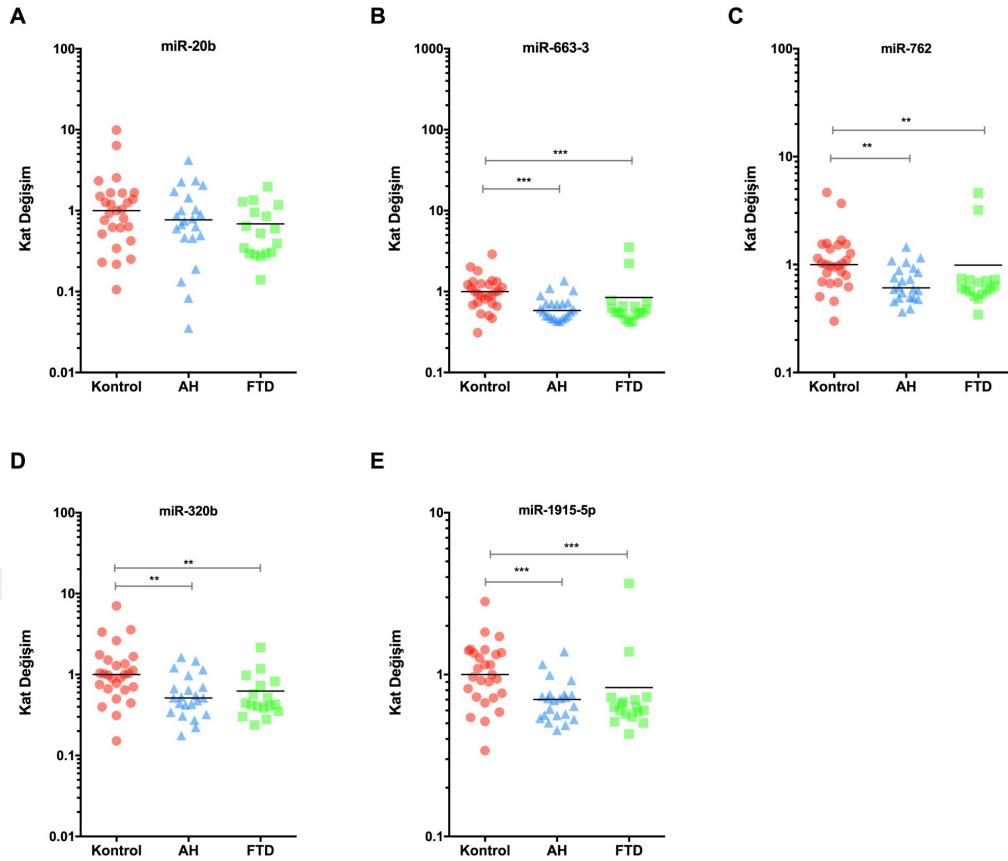
4.2.3. Serumdan elde edilmiş eksozomlarda miRNA'ların seviyelerinin incelenmesi

Aynı hasta grubundan alınmış serumlar kullanılarak eksozom izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Elde edilen eksozomların karakterizasyonu için öncelikle eksozom örneklerinin boyut analizi dinamik ışık saçılımı yöntemi ile yapılarak konfirme edilmiştir (Şekil 3A). Bununla birlikte eksozomların karakterizasyonu eksozom membranında bulunan bir tetraspanin olan CD63'ü (Andreu ve Yanez-Mo, 2014) ve eksozomlarda fazlaca bulunduğu gösterilmiş asetil-CoA asetilkoesteraz enzim aktivitesini (Gupta ve Knowlton, 2007) eksozom belirteci olarak kullanan ticari ELISA tabanlı kitler kullanılarak gerçekleştirilmiştir ve örneklerimizin eksozom olduğu saptanmıştır (Şekil 3B ve 3C).



Şekil 3. Ekzomların izolasyonundan sonra 3 adet birbirinden bağımsız ekzom karakterizasyon analizi kullanıldı. (A) Dinamik Işık Saçılımı analizi, (B) Asetil-CoA asetilkolinesteraz enzim aktivitesi. Analizler rastgele seçilen beş örnek kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

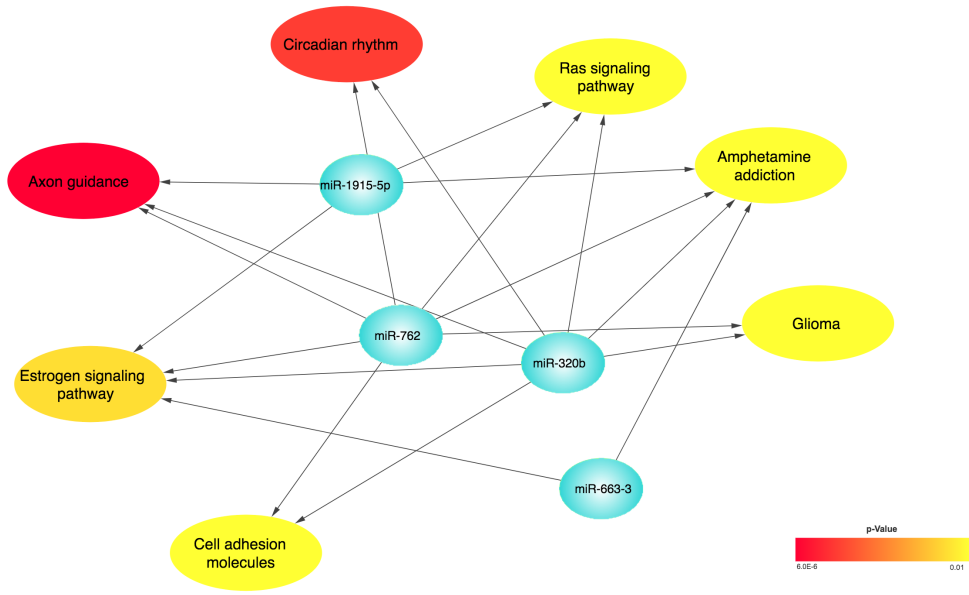
Aynı miRNA'ların seviyeleri serumdan elde ettiğimiz ekzom örneklerinde qPCR yöntemi ile çalışılmıştır. Elde ettiğimiz sonuçlara göre, miR-663, miR-762, miR-320b ve miR-1915-5p istatistiksel anlamlılıkta azaldığını tespit edilmiştir. Ancak, miR-20b seviyesinde istatistiksel anlamlılıkta herhangi bir değişim tespit edilememiştir (Şekil 4). Serum ve ekzomlarda bulunan miRNA'lar karşılaştırıldığında ise sadece 4 miRNA'nın benzer sonuçlar verdiği görülmektedir.



Şekil 4. Farklı hasta gruplarının serumdan elde edilen eksozomlarındaki miRNA seviyeleri. Karşılaştırmalı miRNA seviyeleri qPCR yöntemi ile ölçülmüştür. Gruplar arasındaki farklar Kruskal-Wallis ve Mann Withney-U testi kullanılarak analiz edilmiştir (** $p<0.01$, *** $p<0.001$).

4.2.4. İfadesi anlamlı olarak değişen miRNA'ların biyoinformatik araçlarla hedef yollarının belirlenmesi

Bir sonraki aşamada, istatistiksel olarak anlamlı ifadesi değişen miRNA'ların tahmini hedeflerinin belirlenmesi amaçlandı. KEGG yolak zenginleştirme analizi için DIANA-mirPath v3.0 sunucusu kullanıldı ve miRNA'ların tahmini AH yolları belirlendi. Analiz sonucuna göre, bu miRNA'ların deregülasyonu (miR-320b, miR-762, miR-663-3 ve miR-1915-5p) AH ile ilişkili akson yönlendirme, sirkadiyen ritmi, Ras ve östrojen yollarını hedeflendiği ortaya çıkmıştır (Şekil 5).



Şekil 5. Alzheimer hastalığında anlamlı olarak değişimi tespit edilen miRNA'ların tahmini hedefleri. miRNA ve yolakların ilişkileri Cytoscape yazılımı ile görsel hale getirilmiştir.

4.2.5. miRNA seviyelerinin klinik parametreler ile korelasyonlarının değerlendirilmesi

Bir sonraki aşamada ifadesi değişen miRNA'ların klinik parametreler ($p\text{Tau}_{(181P)}$, $A\beta_{(1-42)}$, SMMT skoru ve yaş) ile korelasyonları analiz edilmiştir. Elde edilen veriler incelendiğinde ise serumda bulunan miR-663-3 seviyesi SMMT skorları ile ortalama pozitif bir korelasyon göstermektedir. Bununla birlikte eksozomdan elde edilen miRNA'ların klinik parametrelerden $A\beta_{(1-42)}$ ile pozitif ortalama korelasyon göstermektedir. Bunun dışındaki elde edilen verilere göre miRNA'lar diğer parametreler ile istatistiksel anlamlılıkta korelasyon göstermemektedir (Tablo 7).

Tablo 7. miRNA'ların klinik veriler ile korelasyonu.

	SMMT		pTau ₍₁₈₁₎		β-Amiloid ₍₁₋₄₂₎		Yaş	
	Rho (ρ)	p-değeri	Rho (ρ)	p-değeri	Rho (ρ)	p-değeri	Rho (ρ)	p-değeri
Serum miRNA								
hsa-miR-663-3	0.335	0.049	0.147	0.227	-0.131	0.279	0.128	0.293
hsa-miR-762	0.212	0.222	-0.064	0.599	0.184	0.131	0.214	0.078
hsa-miR-320b	0.256	0.138	-0.053	0.661	0.166	0.173	0.215	0.076
hsa-miR-1915-5p	0.103	0.557	-0.079	0.516	0.216	0.075	0.195	0.108
Eksosom miRNA								
hsa-miR-663-3	-0.11	0.537	-0.125	0.319	0.361	0.003	0.19	0.13
hsa-miR-762	-0.079	0.658	-0.104	0.407	0.319	0.01	0.198	0.114
hsa-miR-320b	-0.136	0.444	-0.169	0.176	0.468	<0.001	0.113	0.037
hsa-miR-1915-5p	-0.096	0.59	-0.186	0.136	0.363	0.003	0.122	0.332

4.2.6. Demans tanısında miRNA'ların potansiyel biyobelirteç olarak değerlendirilmesi

Son aşamada istatistiksel olarak anlamlı değişen 4 miRNA'nın tanısal değerlerinin belirlenmesi için ROC eğrisi analizi yapıldı. %95 güven aralığında serum ve eksozomal miRNA'ların ROC eğrileri çizildi ve AUC değerleri hesaplandı. Bugüne kadar yapılan biyobelirteç çalışmalarında doğruluk yüzdeleri %70-95 arasında değişmektedir. Bu sebeple daha güvenilir biyobelirteç adayları belirlemek için ROC analizi sonucunda doğruluk yüzdesi %90 ve üzeri olan miRNA'ları seçildi. Elde ettiğimiz sonuçlara göre, AH'yi kontrol grubundan ayırt etmede AUC değerleri miR-320b için 0,909, miR-663-3 için 0,865, miR-762 için 0,877 ve miR-1915-5p için 0,789 olarak bulunmuştur. Bunun dışında, AH'yi FTD grubundan ayırt etmede AUC değerleri miR-663-3 için 0,940, miR-762 için 0,995, miR-320b için 1,000 ve miR-1915-5p için 1,000 olarak hesaplanmıştır. FTD'yi kontrol grubundan ayırt etmede AUC değerleri miR-663-3 için 0,997, miR-762 için 0,998, miR-320b için 1,000 ve miR-1915-5p için 1,000 olarak hesaplanmıştır.

Aynı analiz eksozomdan elde edilen miRNA'lar için gerçekleştirildi. Buna göre, AH'yi kontrol grubundan ayırt etmede AUC değerleri miR-663-3 için 0,783, miR-762 için 0,753, miR-320b için 0,749 ve miR-1915-5p için 0,774 olarak hesaplandı. FTD'yi kontrol grubundan ayırt etmede AUC miR-663-3 için 0,758, miR-762 için 0,754, miR-320b için 0,775 ve miR-1915-5p için 0,776 olarak hesaplanmıştır. Ancak, AH'yi FTD'den ayırt etmede kullanılabilecek miRNA'lar için istatistiksel anlamlılıkta bir sonuç elde edilememiştir. Tüm miRNA'lar için ROC analiz sonucu aşağıda Tablo 8'de verilmiştir.

Tablo 8. Serum ve Eksozom miRNA'ları için ROC analizi.

Serum	AUC	95% CI	P değeri	Cut-off	Hassaslık	Özgüllük
AH vs. Kontrol						
hsa-miR-663-3	0.865	0.765 - 0.964	<0.001	0.468	0.792	0.821
hsa-miR-762	0.877	0.780 - 0.975	<0.001	0.532	0.875	0.786
hsa-miR-320b	0.909	0.828 - 0.991	<0.001	0.403	0.875	0.857
hsa-miR-1915-5p	0.789	0.662 - 0.917	<0.001	0.818	0.833	0.679
AH vs. FTD						
hsa-miR-663-3	0.94	0.832 - 1.047	<0.001	0.136	1.000	0.824
hsa-miR-762	0.995	0.982 - 1.008	<0.001	0.139	1.000	0.882
hsa-miR-320b	1.000	1.000 - 1.000	<0.001	0.059	1.000	1.000
hsa-miR-1915-5p	1.000	1.000 - 1.000	<0.001	0.136	1.000	1.000
FTD vs. Kontrol						
hsa-miR-663-3	0.997	0.931 - 1.023	<0.001	0.209	0.941	1.000
hsa-miR-762	0.998	0.991 - 1.005	<0.001	0.310	1.000	0.964
hsa-miR-320b	1.000	1.000 - 1.000	<0.001	0.119	1.000	1.000
hsa-miR-1915-5p	1.000	1.000 - 1.000	<0.001	0.226	1.000	1.000
Eksozom	AUC	95% CI	P değeri	Cut-off	Hassaslık	Özgüllük
AH vs. Kontrol						
hsa-miR-663-3	0.783	0.650 - 0.916	0.001	0.735	0.818	0.741
hsa-miR-762	0.753	0.616 - 0.890	0.001	0.936	0.818	0.630
hsa-miR-320b	0.749	0.608 - 0.890	0.003	0.683	0.727	0.741
hsa-miR-1915-5p	0.774	0.640 - 0.907	0.001	0.761	0.818	0.741
AH vs. FTD						
hsa-miR-663-3	0.501	0.313 - 0.690	0.989	0.557	0.591	0.529
hsa-miR-762	0.504	0.317 - 0.691	0.966	0.614	0.500	0.529
hsa-miR-320b	0.535	0.348 - 0.721	0.713	0.435	0.636	0.529
hsa-miR-1915-5p	0.567	0.381 - 0.752	0.479	0.607	0.636	0.471
FTD vs. Kontrol						
hsa-miR-663-3	0.758	0.593 - 0.923	0.004	0.793	0.882	0.704
hsa-miR-762	0.754	0.591 - 0.917	0.005	0.769	0.882	0.741
hsa-miR-320b	0.775	0.629 - 0.920	0.002	0.742	0.765	0.704
hsa-miR-1915-5p	0.776	0.619 - 0.932	0.002	0.745	0.882	0.741

4.2.7. Ventriküler hacimlerinin AH biyobelirteçlerinin tanısal değerlerine etkisi

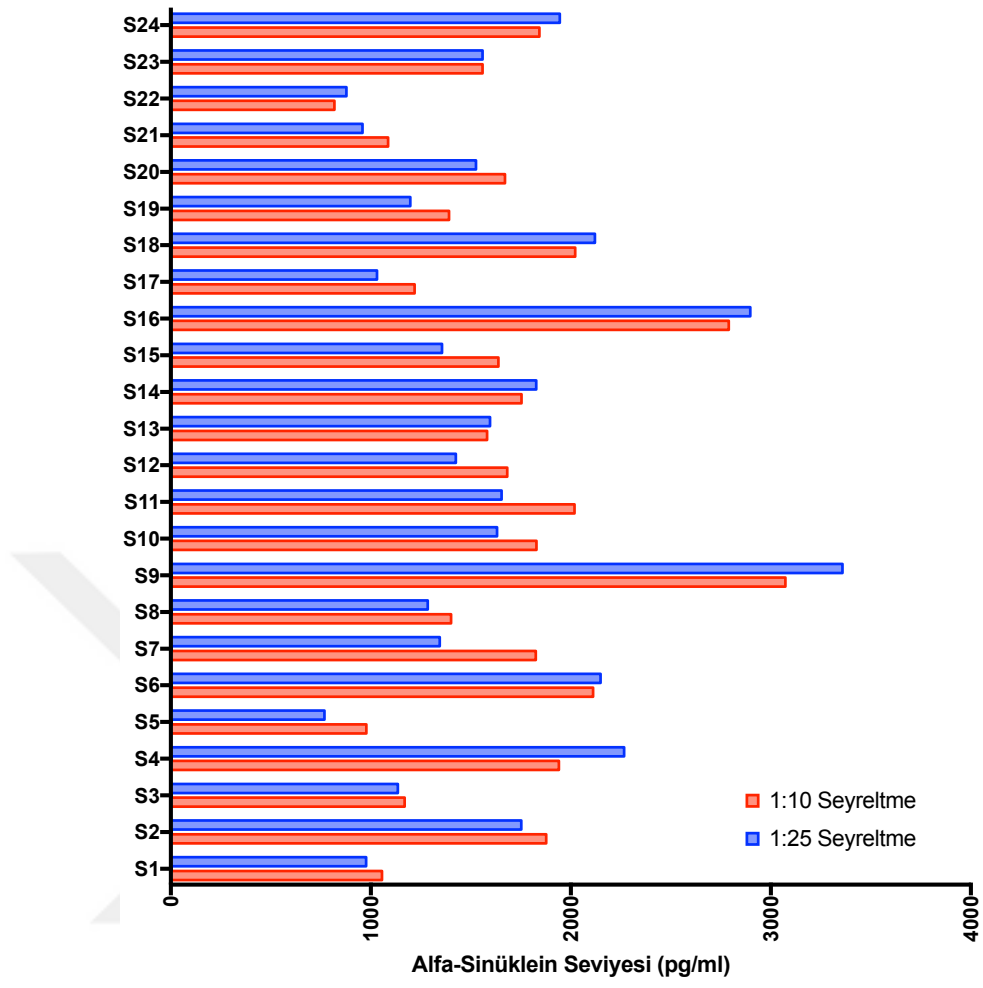
Çalışmanın bu bölümünde, proje kapsamında BOS'ta ölçülen $A\beta_{(1-42)}$ ve $pTau_{(181p)}$ seviyelerine beyinde lateral ventriküler hacimlerinin etkisi incelenmiştir. Bu bağlamda, bu çalışmaya 13 Avrupa hafıza kliniğinden toplam 730 hasta örneği ve bu hastaların $A\beta_{(1-42)}$, $pTau_{(181p)}$ ve ventriküler hacim ölçümleri toplanmıştır. Elde edilen sonuçlar ventriküler hacmin BOS $A\beta_{(1-42)}$ seviyelerini yorumlarken en önemli etkilere biri olduğunu göstermiştir. Çalışmanın sonuçları “Journal of Alzheimer’s disease” dergisinde yayımlanmıştır.

4.3. Parkinson Hastalığı için Bulgular

4.3.1. Parkinson hastalarında alfa-sinüklein seviyelerinin belirlenmesi

Son yıllarda BOS'ta bulunan düşük α -sinüklein seviyesinin PH'de biyobelirteç olarak kullanılabileceği bildirilmiştir. Ancak, çalışmalarda kontrol grubuna kıyasla bu düşüşün küçük bir oranda olduğu ve çalışmalar arasında tutarsızlık olduğu bildirilmiştir. Laboratuvarlar arası ölçümlerde bulunan varyasyonlar, standardizasyon ihtiyacını ortaya çıkarmıştır. Bu çalışmamızda ortak oluşturulan BOS havuzundan çalışmaya katılan 18 farklı laboratuvara örnek gönderildi ve tüm laboratuvarlarda yapılan ölçümlerde oluşturulmuş olan standart operasyon prosedürleri kullanıldı. Bu çalışma kapsamında kullanılan ELISA kitinin hassaslık değeri 6 pg/ml olarak bulunmuştur (Mollenhauer ve ark., 2013) ve BOS örneklerinde farklı konsantrasyonlarda çalışıldığında üretici firma tarafından belirtilen geri kazanım oranı %90'ın üzerindedir. Bununla birlikte kitin varyasyon katsayısı aynı koşullarda %10'un altında olduğu belirtilmektedir (Kruse ve ark., 2015).

Dahil olduğumuz bu çalışmada bizim laboratuvarımızca örneklerin farklı seyreltme oranının alfa-sinüklein ölçümüne etkisi ve Covance marka ELISA kitinin örneklerin değişik seyreltme oranlarındaki performansı incelenmiştir. Elde edilen sonuçlara göre Parkinson hastalarının BOS örneklerinde 1:10 ve 1:25 seyreltme oranları ile hesaplanan alfa-sinüklein seviyeleri tutarlı olarak bulundu (Şekil 6). Bu deney ile dahil olduğumuz çalışmadan elde edilen sonuçlara göre örneklerin 1:10 seyreltme düzeyinde örneklerin %98'nden fazlasında varyasyon katsayısı %20'in altında hesaplanmıştır. Ayrıca, 1:25 oranında seyreltme yapılan örneklerin %94'ünde varyasyon katsayısı %20'in altında olduğu bildirilmiştir. Bu sonuçlar örneklerin gönderildiği laboratuvarlarda elde edilen sonuçlar ile karşılaştırmasıyla elde edilmiştir.



Şekil 6. Parkinson hastalarının BOS örneklerindeki farklı seyreltme oranlarında alfa-sinüklein seviyesi.

5. TARTIŞMA

5.1. Alzheimer Hastalığı

Günümüzde muhtemel AH tanısı çoğunlukla diğer nörolojik hastalıkların dışlanması, beyin görüntüleme ve psikolojik testler gibi pahalı ve zaman alan teknikler ile mümkün olabilmektedir. Son zamanlarda klinik ve moleküler analiz yöntemler değerli biyobelirteç adaylarını ortaya çıkarmıştır. BOS tabanlı A β (1-42), pTau(181p) ve total Tau seviyeleri AH tanısını desteklemek amacıyla kullanılmasına rağmen, BOS tabanlı biyobelirteçler invazif yöntemler olduğu için bu biyobelirteçlerin ilaç denemelerinde, boylamsal çalışmalarda ve hastalığın izlenmesinde kullanımları kısıtlıdır (Sharma ve Singh, 2016). Bu sebepler, hızlı, ucuz ve invazif olmayan yöntemlerin geliştirilmesi gerekliliğini vurgulamaktadır. Son zamanlarda, kan tabanlı biyobelirteç geliştirilmesinin kolaylığını gösteren çalışma sayısında artış vardır (Thambisetty ve Lovestone, 2010; Henriksen ve ark., 2014; Keshavan ve ark., 2017). Ayrıca, kan tabanlı biyobelirteç taraması hem invazif olmayan hem de tekrar eden örnek toplanmasına izin veren bir yöntemdir. Bu çalışmamızda, grubumuzca daha önce AH'de kontrol grubuna göre mikroyarray yöntemi ile belirlenmiş farklı olarak ifade edilen miRNA'lar kullanılarak, bağımsız yeni bir hasta grubunda bu miRNA'ların ifadelerini hem serumda hem de serumdan elde edilmiş olan eksozomlarda inceledik. Buna göre, serumda bulunan miR-20b, miR-663-3, miR-762, miR-320b ve miR-1915-5p istatistiksel anlamlılıkta ifade değişimlerini doğruladık. Özellikle, serumda ifadesi değişen bu miRNA'ların Alzheimer hastalarını hem FTD hem de kontrol grubundan ayırt etmede yüksek potansiyelleri olduğunu gösterdik. Ayrıca, Parkinson hastalarından toplanan BOS örneklerinde Covance marka ticari ELISA kiti ile ölçülen alfa-sinüklein seviyelerinin örneklerin seyreltilmesinden bağımsız olarak tutarlı bir şekilde ölçülebileceğini gösterdik. Bununla birlikte ELISA testlerinin standardize yöntemler ile ölçülmesinin laboratuvarların rutinlerini geliştirmesini ve ilerideki ELISA çalışmalarının stabil sonuçlar vermesine yardımcı olabilecektir. Ayrıca,

Serbest dolaşan miRNA'ların ilk kez diffüz büyük B hücreli lenfoma hastalığında biyobelirteç olarak kullanılabileceği gösterilmiştir (Lawrie ve ark., 2007). Bu çalışmadan sonra birçok grup biyobelirteç olarak miRNA'ları kullanmayı amaçlamıştır. Bunun nedenleri arasında miRNA'ların birçok hücresel fonksiyonu düzenleyebilmesi bulunmaktadır. Farklı patolojik durumlarda farklı miRNA'ların dahil olduğu bilinmektedir. Ayrıca, spesifik veya bir grup miRNA seviyesindeki değişimlerin patolojik sürecin durumu hakkında bilgi verebilir ve bu miRNA'ların seviyelerindeki değişim ve hatta varlık veya yoklukları hastalık sürecinin

göstergesi olabilmektedir. Bunun yanında, miRNA'ların farklı vücut sıvılarında varlıkları ayrıca gösterilmiştir. Dolaşımdaki stabilite ve günümüzdeki tespit yöntemleri sayesinde hızlı ve güvenilir bir şekilde dolaşımdaki seviyeleri belirlenebilmektedir. Bu özellikleri miRNA'ları herhangi bir patolojik durumda ideal biyobelirteç adayı olarak göstermektedir.

Birçok çalışma farklı olarak ifade edilen miRNA'ları hem beyinde hem de BOS'nda göstermiştir (Grasso ve ark., 2014; Viswambharan ve ark., 2017). Bununla birlikte, miRNA'ların ve eksozom içeriklerinin yaşlanma ile birlikte değişimleri daha önceki çalışmalarda bildirilmiştir (Xu ve Tahara, 2013). İlginç bir şekilde, belirli miRNA imzalarının hastalığın gelişimini ve/veya semptomları kesişen hastalıkların ayırt edilmesinde kullanılabilme potansiyeli gösterilmiştir (Shafi ve ark., 2010). Birçok çalışma farklı ifade edilen miRNA'ları belirlemek için BOS ve kan gibi farklı örnek tiplerini kullanmıştır (Galimberti ve ark., 2014; Grasso ve ark., 2014; Dong ve ark., 2015; Gui ve ark., 2015) Burgos ve ark. Alzheimer ve Parkinson hastalarının BOS ve serum örneklerinde 13 özgün miRNA'nın farklı ifade edildiğini yeni nesil dizileme yöntemi kullanarak göstermiştir (Burgos ve ark., 2014). Ayrıca, Dong ve ark. AH'nda miR-31, miR-93, miR-143 ve miR-146a'nın ifadelerinin serumda azaldığını göstermişlerdir (Dong ve ark., 2015). Yapılan çalışmalarda elde edilen miRNA değişimlerinin yorumlanmasında ifade değişimlerinin yaşlanmaya bağlı olarak değişebileceği ihtimali göz önünde bulundurulmalıdır. Bu çalışmamızda, AH ve FTD hastalarının serum örneklerinde miR-663-3, miR-762, miR-320b ve miR-1915-5p'nin farklı olarak ifade edildiğini gösterdik.

Eksozomların hastalığa özgü protein ve nükleik asit taşıyabilme özellikleri, vücut sıvılarındaki dayanıklılıkları, miRNA'larca zengin olmaları ve kan beyin bariyerini geçebilmeleri birçok çalışma tarafından gösterilmiştir (Cheng ve ark., 2014; Kumar ve ark., 2017; Riancho ve ark., 2017). Bu özellikleri sayesinde eksozomlar ideal biyobelirteç kaynağı olarak ilgi çekmektedir. Serum ve eksozom miRNA seviyelerinin farklı olabileceğini Cheng ve ark. daha önce göstermişlerdir (Cheng ve ark., 2014). Farklı bir çalışmada ise yeni nesil dizileme yöntemi ile bulunan ve qPCR yöntemi ile valide edilen 16 eksozomal miRNA'nın kullanılması AH'nın tanısını kolaylaştırabileceği gösterilmiştir (Cheng ve ark., 2015). Başka bir çalışmada ise plasmadan elde edilen eksozomlardan izole edilmiş yedi miRNA'nın %83-89 arasında doğruluk ile AH'yı tahmin edebilmiştir (Lugli ve ark., 2015). Yaptığımız çalışmada, serumdan elde edilmiş eksozomlarda serumda farklı ifade edildiğini gösterdiğimiz miRNA'ların seviyelerini inceledik. Bu miRNA'ların eksozomda bulunan seviyeleri ile serumda bulunan seviyeleri farklı olmasına rağmen benzer ifade değişimleri bulunmuştur.

Bu miRNA'ların nörodejenerasyon ile ilgili yollarda rolleri olup olmadığını araştırmak için bu miRNA'ların tahmini hedef yollarını network analizi ile araştırdık. Analiz sonucu bu dört miRNA'nın Ras ve östrojen sinyalleme, sirkadien ve akson yönlendirme yollarını hedefleyebileceğini gösterdi. Bu yolların daha önce yapılan çalışmalarda nörodejenerasyon ile ilişkileri gösterilmiştir (Lin ve ark., 2009; Van Battum ve ark., 2015; Wang ve ark., 2016; La Morgia ve ark., 2017). Bu yolların önemi fizyolojik koşullarda birbirleri ile iç içe geçmiş olmaları ve bu yolların deregölasyonlarının nörodejenerasyonla ilgili olmasıdır (Godoy ve ark., 2014). Hedeflenen yollardan özellikle östrojen sinyalleme yolağı ilgi çekicidir. Bugüne kadar yapılan çalışmalarda kadınların AH'ye yakalanma riskinin erkeklere oranla daha yüksek olduğu bildirilmiştir (Mosconi ve ark., 2017). Bununla birlikte, yapılan çalışmalar kadınlarda menopoza geçiş evresi ve sonrasında kognitif fonksiyonlarla ilişkili olduğunu açığa çıkarmıştır. Ayrıca, östrojen hormon terapisi alan kadınlarda menopozun erken döneminde kognitif fonksiyonlarda düzelme görölmekle birlikte, geç dönemde başlayan östrojen hormon tedavisi durumun daha kötüye gitmesine neden olabileceğini göstermiştir (Cholerton ve ark., 2002; Cui ve ark., 2013). Ayrıca, çalışmada kullandığımız kohortta kadın oranı yüksektir. Bu sebeple, bu çalışmadan elde edilen ifadesi değişmiş miRNA'ların östrojen sinyalleme yolağını tahmini olarak hedeflemesinin bulunmasını etkilemiş olabilir.

Ancak, bu yolların ve bu çalışmada analiz edilen miRNA'ların gerçek etkileşimlerinin doğrulanması gerekmektedir. Bunlarla birlikte, miR-663-3'ün TDP-43'e direk bağlanabildiği ve nörojenez'de görev alan genleri baskıladığı gösterilmiştir (Buratti ve ark., 2010; Shu ve ark., 2015). miR-762'nin M2 fenotipindeki mikrogial hücrelerde ifadesinde artış bulunmuş (Martinez ve Peplow, 2017) ve miR-320b'nin ifadesi prion ile indüklenen nörodejenerasyonda artmış ancak şizofren hastalarının kanlarda azalmıştır (Vachev ve ark., 2016).

Bugüne kadar yapılan birçok çalışmada miRNA'ların çeşitli hastalıklarda, özellikle demans ve kanser hastalıklarında, tanısal değerleri incelenip tartışılmıştır (Wang ve ark., 2016). Son zamanlarda yapılan çalışmalarda miR-9, miR-181c, miR-26b, miR-106 ve miR-29 en çok deregölasyonu gösterilen miRNA'lar olmuştur (Viswambharan ve ark., 2017). Tan ve ark. tarafından yapılan çalışmada miR-342-3p'nin AH'yi kontrol grubundan ayırt etmede %81,5 doğruluk payına ulaşmıştır (Tan ve ark., 2014). Başka bir çalışmada BOS'ta bulunan miR-100, miR-103 ve miR-375'in kombinasyonu AH'yi sınıflandırmada %95,5 doğruluk payı olduğunu göstermiştir (Denk ve ark., 2015). Galimberti ve ark. hem serum hem de BOS'ta miR-125b'nin AH'yi non-inflamatuvar hastalıklardan %82 doğrulukla ayırt edebildiğini göstermiştir. Ancak,

AH'yi FTD'den ayırt etmede herhangi istatistiksel anlamlılıkta bir sonuç bulamamışlardır (Galimberti ve ark., 2014). Kumar ve ark. ve Leidinger ve ark. yaptıkları çalışmalarda AH'yi ayırt etmede %93'ten fazla doğruluk payına ulaşmışlardır (Kumar ve ark., 2013; Leidinger ve ark., 2013). Bugüne kadar yapılan tüm çalışmalar incelendiğinde AH tanısında kullanılabileceği öne sürülen miRNA'ların başka çalışmalar tarafından tekrar edilemediği görülmektedir. Bunun sebepleri arasında kullanılan protokollerin standardize olmaması ve farklı metodolojilerin kullanılması; özellikle kanda aranan biyobelirteçlerde kanda bulunan miRNA ve/veya metabolitlerin seviyelerinin birçok farklı durumdan etkilenmesi tekrarlanabilirlik sorunlarını ortaya çıkarmaktadır. Çalışılan örneklerin farklı olması (serum, plazma gibi), örnek toplama, saklama ve hazırlama yöntemlerinin çalışmalar arası farklılık göstermesi en büyük tekrarlanabilirlik problemlerinden biridir.

Çalışmamızda tekrarlanabilirlik sorununu aşmak amacıyla, örnek toplama, saklama ve hazırlama yöntemlerini projemiz kapsamında oluşturulan standardize yöntemlerini kullandık. Çalışmamızda ifade değişimlerini gösterdiğimiz miRNA'ların tanısal değerlerini inceledik ve bu miRNA'ların daha önce AH'nda deregülasyonları gösterilmemiştir. Sonuçlarımıza göre serum miR-663-3, miR-762 ve miR-320b AH'yi kontrol grubundan ayırt etmede %85'ten fazla doğruluk payına sahiptir. Bununla birlikte, eksozomal miRNA'ların tanısal değerleri hesaplandığında ise belirlediğimiz kriteri sağlamamakla birlikte serum miRNA'ların potansiyel tanı değerlerinin gerisinde kalmıştır. Ancak, eksozomal miRNA'ların özellikle AH ve FTD'yi kontrol grubu ile karşılaştırdığımızda ROC sonuçlarındaki hassaslık değerleri miR-320b dışında 0.80'in üzerinde bulunmuştur ve sonuçlara göre bu miRNA'ların tarama testi olarak kullanılabilme potansiyelleri görülmektedir.

FTD hastalarında mRNA-miRNA ağında önemli değişimler tespit edilmiştir (Detaylı derleme (Rivero-Santana ve ark., 2017)). Bozulmuş miRNA biyogenez ve spesifik miRNA genlerinin FTD'nin patojenezine katıldığı düşünülmektedir (Eitan ve Hornstein, 2016). Bugüne kadar yapılmış çalışmaların aksine, çalışmamızda bulduğumuz miRNA'ların FTD hastalarını AH ve kontrol grubundan ayırt etme potansiyellerini inceledik. Yaptığımız çalışmada dört miRNA'nın (miR-663-3, miR-762, miR-320b ve miR-1915-5p) FTD hastalarını AH ve kontrol grubundan %90'dan fazla doğrulukla ayırt edebildiğini gösterdik. Özellikle, miR-320b ve miR-1915-5p'nin doğruluk oranlarını %100 olarak bulduk.

BOS'tan ölçülen AH biyobelirteçleri AH tanısını kolaylaştıran en önemli faktörlerdendir. Bu biyobelirteçler devam eden nöronal değişimlerin ve A β ve tau birikimlerini iyi bir şekilde

yansıtabilmektedir. Ancak, ölçülen $A\beta_{(1-42)}$ ve $p\text{Tau}_{(181p)}$ seviyelerini yorumlarken karışıklığa neden olabilecek sebepleri dışlamak gerekmektedir. Ventriküler hacim/Toplam intracranial hacim oranı (VH/TİP) bu karışıklığa sebep olabilecek nedenlerin en başında gelmektedir. Projemiz kapsamında dahil olduğumuz çalışmada BOS biyobelirteçleri VH/TİP ile düzeltilerek bu biyobelirteçlerinin tanısal güçlerinin arttırılabileceğini göstermiştir (van Waalwijk van Doorn ve ark., 2017).

5.2. Parkinson Hastalığı

Kantitatif analizlerin validasyonu biyobelirteç alanındaki en büyük problemlerden biridir. Laboratuvarlar arası ve hatta aynı laboratuvarda yapılan aynı analizler bile farklı sonuçlar verebilmektedir (Vanderstichele ve ark., 2017). Ayrıca ölçümleri etkileyen farklı etkenler bulunmaktadır. Bunların arasında kullanılan antikorların, analiz metotlarının, örnek saklama koşullarının ve örnek dilüsyonlarının farklı olması gibi birçok faktör bulunmaktadır (Kruse ve ark., 2015). Çalışmamızda aynı lot numarasına sahip, aynı standardize yöntemlerle toplanmış BOS örnekleri kullanılarak alfa-sinüklein seviyeleri 2 farklı örnek dilüsyonu ile ölçüldü. 2 farklı dilüsyonu ile ölçülen alfa-sinüklein seviyeleri benzer ölçüldü. Bununla birlikte, çalışmaya katılan diğer 17 laboratuvarın sonuçları referans ölçüm kabul edilen örneklerin yollandığı laboratuvar ile karşılaştırıldığında sonuçların kabul edilen düzeyde varyasyona ($\leq 20\%$) sahip olduğu gözlenmiştir. Mattsson ve ark. tarafından yapılan uluslararası BOS biyobelirteç kalite kontrol çalışmasında elde edilen varyasyon seviyesi ile benzerlik göstermiştir (Mattsson ve ark., 2011). Ayrıca, günümüzde alfa-sinüklein ölçümlerinde kullanılabilecek sertifikalı referans materyali bulunmamaktadır. Referans materyalinin geliştirilmesi ve üretilmesi farklı laboratuvarlar tarafından ölçülen alfa-sinüklein seviyelerinin karşılaştırılmasını kolaylaştıracaktır. Sonuca göre, örnek toplama yöntemleri, kullanılan pipetler ve firmaların kitlerin üretiminde standardizasyonu sağlaması gibi faktörlerin standardizasyonu, ölçümlerin daha doğru ve tutarlı olmasını sağlayacaktır.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmamızda dört miRNA'nın Alzheimer ve FTD hastalıklarında ifade değişimlerini tespit ettik. Ayrıca, bu serumdan elde edilen miR-320b ve miR-1915-5p'nin %100 doğruluk oranıyla FTD grubunu AH ve kontrol grubundan ayırt edebildiğini bulduk. Bununla beraber eksozomlardan izole edilen miRNA'ların da bu amaçla kullanılabileceğini gösterdik.

Hastaları tanılarının doğru olma olasılığının arttırmak için temel BOS biyobelirteçleri kullanılmıştır. Ancak, hasta ve kontrol gruplarının tek bir merkez yerine birden fazla merkezden toplanması ve daha fazla sayıda hasta örneğinin kullanılması çalışmanın güvenilirliğini arttıracaktır.

Eksozomlardan elde edilen miRNA'ların tanısal değerlerinin arttırılabilmesi için kanda nöronal kökenli eksozomların izolasyonu yapılarak merkezi sinir sistemine özgü eksozomlardan elde edilecek miRNA'ların daha güvenilir sonuçlar verebileceği göz önünde bulundurulmalıdır.

Bu dört miRNA'nın DIANA mirPath v3.0 kullanılarak belirlediğimiz tahmini hedef yolları içerisinde sirkadiyen ritim, Ras ve östrojen sinyalleme ve akson yönlendirme yolları nörodejenerasyon ile oldukça ilgilidir. Bu sebeple bu hedef yolları tahmini oldukları için doğruma deneyleri gereklidir.

7. KAYNAKLAR

- Absalon S, Kochanek DM, Raghavan V ve Krichevsky AM. MiR-26b, upregulated in Alzheimer's disease, activates cell cycle entry, tau-phosphorylation, and apoptosis in postmitotic neurons. *J Neurosci* 2013; 33(37): 14645-14659.
- Albert MS, DeKosky ST, Dickson D, Dubois B, ve ark. The diagnosis of mild cognitive impairment due to Alzheimer's disease: recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement* 2011; 7(3): 270-279.
- Alzheimer's A. 2016 Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimers Dement* 2016; 12(4): 459-509.
- Andreu Z ve Yanez-Mo M. Tetraspanins in extracellular vesicle formation and function. *Front Immunol* 2014; 5: 442.
- Anstey KJ, von Sanden C, Salim A ve O'Kearney R. Smoking as a risk factor for dementia and cognitive decline: a meta-analysis of prospective studies. *Am J Epidemiol* 2007; 166(4): 367-378.
- Ascherio A ve Schwarzschild MA. The epidemiology of Parkinson's disease: risk factors and prevention. *Lancet Neurol* 2016; 15(12): 1257-1272.
- Babst M. MVB vesicle formation: ESCRT-dependent, ESCRT-independent and everything in between. *Curr Opin Cell Biol* 2011; 23(4): 452-457.
- Bateman RJ, Aisen PS, De Strooper B, Fox NC, ve ark. Autosomal-dominant Alzheimer's disease: a review and proposal for the prevention of Alzheimer's disease. *Alzheimers Res Ther* 2011; 3(1): 1.
- Biomarkers Definitions Working G. Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework. *Clin Pharmacol Ther* 2001; 69(3): 89-95.
- Blennow K. A Review of Fluid Biomarkers for Alzheimer's Disease: Moving from CSF to Blood. *Neurol Ther* 2017; 6(Suppl 1): 15-24.
- Boccardi M, Bocchetta M, Morency FC, Collins DL, ve ark. Training labels for hippocampal segmentation based on the EADC-ADNI harmonized hippocampal protocol. *Alzheimers Dement* 2015; 11(2): 175-183.
- Bouwman AE, Vlaar AM, Mess WH, Kessels A, ve ark. Specificity and sensitivity of transcranial sonography of the substantia nigra in the diagnosis of Parkinson's disease: prospective cohort study in 196 patients. *BMJ Open* 2013; 3(4).

Braak H ve Braak E. Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathol* 1991; 82(4): 239-259.

Buratti E, De Conti L, Stuardi C, Romano M, ve ark. Nuclear factor TDP-43 can affect selected microRNA levels. *FEBS J* 2010; 277(10): 2268-2281.

Burgos K, Malenica I, Metpally R, Courtright A, ve ark. Profiles of extracellular miRNA in cerebrospinal fluid and serum from patients with Alzheimer's and Parkinson's diseases correlate with disease status and features of pathology. *PLoS One* 2014; 9(5): e94839.

Cai X, Hagedorn CH ve Cullen BR. Human microRNAs are processed from capped, polyadenylated transcripts that can also function as mRNAs. *RNA* 2004; 10(12): 1957-1966.

Canevelli M, Bruno G ve Cesari M. The sterile controversy on the amyloid cascade hypothesis. *Neurosci Biobehav Rev* 2017.

Cao XY, Lu JM, Zhao ZQ, Li MC, ve ark. MicroRNA biomarkers of Parkinson's disease in serum exosome-like microvesicles. *Neurosci Lett* 2017; 644: 94-99.

Chandra SR. Alzheimer's disease: An alternative approach. *Indian J Med Res* 2017; 145(6): 723-729.

Cheng L, Doecke JD, Sharples RA, Villemagne VL, ve ark. Prognostic serum miRNA biomarkers associated with Alzheimer's disease shows concordance with neuropsychological and neuroimaging assessment. *Mol Psychiatry* 2015; 20(10): 1188-1196.

Cheng L, Sharples RA, Scicluna BJ ve Hill AF. Exosomes provide a protective and enriched source of miRNA for biomarker profiling compared to intracellular and cell-free blood. *J Extracell Vesicles* 2014; 3.

Cholerton B, Gleason CE, Baker LD ve Asthana S. Estrogen and Alzheimer's disease: the story so far. *Drugs Aging* 2002; 19(6): 405-427.

Chow VW, Mattson MP, Wong PC ve Gleichmann M. An overview of APP processing enzymes and products. *Neuromolecular Med* 2010; 12(1): 1-12.

Cogswell JP, Ward J, Taylor IA, Waters M, ve ark. Identification of miRNA changes in Alzheimer's disease brain and CSF yields putative biomarkers and insights into disease pathways. *J Alzheimers Dis* 2008; 14(1): 27-41.

Cosin-Tomas M, Antonell A, Llado A, Alcolea D, ve ark. Plasma miR-34a-5p and miR-545-3p as Early Biomarkers of Alzheimer's Disease: Potential and Limitations. *Mol Neurobiol* 2017; 54(7): 5550-5562.

Cui J, Shen Y ve Li R. Estrogen synthesis and signaling pathways during aging: from periphery to brain. *Trends Mol Med* 2013; 19(3): 197-209.

de Nazareth AM. Type 2 diabetes mellitus in the pathophysiology of Alzheimer's disease. *Dement Neuropsychol* 2017; 11(2): 105-113.

Denk J, Boelmans K, Siegismund C, Lassner D, ve ark. MicroRNA Profiling of CSF Reveals Potential Biomarkers to Detect Alzheimer's Disease. *PLoS One* 2015; 10(5): e0126423.

Dickson DW, Braak H, Duda JE, Duyckaerts C, ve ark. Neuropathological assessment of Parkinson's disease: refining the diagnostic criteria. *Lancet Neurol* 2009; 8(12): 1150-1157.

Dickson JR, Kruse C, Montagna DR, Finsen B, ve ark. Alternative polyadenylation and miR-34 family members regulate tau expression. *J Neurochem* 2013; 127(6): 739-749.

Dong H, Li J, Huang L, Chen X, ve ark. Serum MicroRNA Profiles Serve as Novel Biomarkers for the Diagnosis of Alzheimer's Disease. *Dis Markers* 2015; 2015: 625659.

Eitan C ve Hornstein E. Vulnerability of microRNA biogenesis in FTD-ALS. *Brain Res* 2016; 1647: 105-111.

Erson AE ve Petty EM. MicroRNAs in development and disease. *Clin Genet* 2008; 74(4): 296-306.

Fernandez-Santiago R, Iranzo A, Gaig C, Serradell M, ve ark. MicroRNA association with synucleinopathy conversion in rapid eye movement behavior disorder. *Ann Neurol* 2015; 77(5): 895-901.

Flynt AS, Greimann JC, Chung WJ, Lima CD, ve ark. MicroRNA biogenesis via splicing and exosome-mediated trimming in *Drosophila*. *Mol Cell* 2010; 38(6): 900-907.

Frisoni GB, Bocchetta M, Chetelat G, Rabinovici GD, ve ark. Imaging markers for Alzheimer disease: which vs how. *Neurology* 2013; 81(5): 487-500.

Fu X, Zheng Y, Hong H, He Y, ve ark. LRRK2 G2385R and LRRK2 R1628P increase risk of Parkinson's disease in a Han Chinese population from Southern Mainland China. *Parkinsonism Relat Disord* 2013; 19(3): 397-398.

Furukawa K, Barger SW, Blalock EM ve Mattson MP. Activation of K⁺ channels and suppression of neuronal activity by secreted beta-amyloid-precursor protein. *Nature* 1996; 379(6560): 74-78.

Gakhar-Koppole N, Hundeshagen P, Mandl C, Weyer SW, ve ark. Activity requires soluble amyloid precursor protein alpha to promote neurite outgrowth in neural stem cell-derived neurons via activation of the MAPK pathway. *Eur J Neurosci* 2008; 28(5): 871-882.

Galimberti D, Villa C, Fenoglio C, Serpente M, ve ark. Circulating miRNAs as potential biomarkers in Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* 2014; 42(4): 1261-1267.

Gallo A, Tandon M, Alevizos I ve Illei GG. The majority of microRNAs detectable in serum and saliva is concentrated in exosomes. *PLoS One* 2012; 7(3): e30679.

Genin E, Hannequin D, Wallon D, Sleegers K, ve ark. APOE and Alzheimer disease: a major gene with semi-dominant inheritance. *Mol Psychiatry* 2011; 16(9): 903-907.

Glenner GG ve Wong CW. Alzheimer's disease: initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein. *Biochem Biophys Res Commun* 1984; 120(3): 885-890.

Godoy JA, Rios JA, Zolezzi JM, Braidy N, ve ark. Signaling pathway cross talk in Alzheimer's disease. *Cell Commun Signal* 2014; 12: 23.

Goedert M, Spillantini MG, Del Tredici K ve Braak H. 100 years of Lewy pathology. *Nat Rev Neurol* 2013; 9(1): 13-24.

Gomperts SN, Locascio JJ, Rentz D, Santarlasci A, ve ark. Amyloid is linked to cognitive decline in patients with Parkinson disease without dementia. *Neurology* 2013; 80(1): 85-91.

Grasso M, Piscopo P, Confaloni A ve Denti MA. Circulating miRNAs as biomarkers for neurodegenerative disorders. *Molecules* 2014; 19(5): 6891-6910.

Gregory RI, Yan KP, Amuthan G, Chendrimada T, ve ark. The Microprocessor complex mediates the genesis of microRNAs. *Nature* 2004; 432(7014): 235-240.

Gu S, Jin L, Zhang Y, Huang Y, ve ark. The loop position of shRNAs and pre-miRNAs is critical for the accuracy of dicer processing in vivo. *Cell* 2012; 151(4): 900-911.

Gui Y, Liu H, Zhang L, Lv W, ve ark. Altered microRNA profiles in cerebrospinal fluid exosome in Parkinson disease and Alzheimer disease. *Oncotarget* 2015; 6(35): 37043-37053.

Guo R, Fan G, Zhang J, Wu C, ve ark. A 9-microRNA Signature in Serum Serves as a Noninvasive Biomarker in Early Diagnosis of Alzheimer's Disease. *J Alzheimers Dis* 2017; 60(4): 1365-1377.

Gupta S ve Knowlton AA. HSP60 trafficking in adult cardiac myocytes: role of the exosomal pathway. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2007; 292(6): H3052-3056.

Haass C ve Selkoe DJ. Soluble protein oligomers in neurodegeneration: lessons from the Alzheimer's amyloid beta-peptide. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007; 8(2): 101-112.

Hammond SM, Boettcher S, Caudy AA, Kobayashi R, ve ark. Argonaute2, a link between genetic and biochemical analyses of RNAi. *Science* 2001; 293(5532): 1146-1150.

Han J, Lee Y, Yeom KH, Nam JW, ve ark. Molecular basis for the recognition of primary microRNAs by the Drosha-DGCR8 complex. *Cell* 2006; 125(5): 887-901.

Hardy JA ve Higgins GA. Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis. *Science* 1992; 256(5054): 184-185.

Hebert LE, Bienias JL, Aggarwal NT, Wilson RS, ve ark. Change in risk of Alzheimer disease over time. *Neurology* 2010; 75(9): 786-791.

Hebert SS ve De Strooper B. Molecular biology. miRNAs in neurodegeneration. *Science* 2007; 317(5842): 1179-1180.

Hebert SS, Horre K, Nicolai L, Papadopoulou AS, ve ark. Loss of microRNA cluster miR-29a/b-1 in sporadic Alzheimer's disease correlates with increased BACE1/beta-secretase expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008; 105(17): 6415-6420.

Heijnen HF, Schiel AE, Fijnheer R, Geuze HJ, ve ark. Activated platelets release two types of membrane vesicles: microvesicles by surface shedding and exosomes derived from exocytosis of multivesicular bodies and alpha-granules. *Blood* 1999; 94(11): 3791-3799.

Henriksen K, O'Bryant SE, Hampel H, Trojanowski JQ, ve ark. The future of blood-based biomarkers for Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement* 2014; 10(1): 115-131.

Herholz K ve Ebmeier K. Clinical amyloid imaging in Alzheimer's disease. *Lancet Neurol* 2011; 10(7): 667-670.

Hernandez DG, Reed X ve Singleton AB. Genetics in Parkinson disease: Mendelian versus non-Mendelian inheritance. *J Neurochem* 2016; 139 Suppl 1: 59-74.

Hessvik NP ve Llorente A. Current knowledge on exosome biogenesis and release. *Cell Mol Life Sci* 2017.

Hughes AJ, Daniel SE, Kilford L ve Lees AJ. Accuracy of clinical diagnosis of idiopathic Parkinson's disease: a clinico-pathological study of 100 cases. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry* 1992; 55(3): 181-184.

Humpel C. Identifying and validating biomarkers for Alzheimer's disease. *Trends Biotechnol* 2011; 29(1): 26-32.

Irwin DJ, Lee VM ve Trojanowski JQ. Parkinson's disease dementia: convergence of alpha-synuclein, tau and amyloid-beta pathologies. *Nat Rev Neurosci* 2013; 14(9): 626-636.

Irwin DJ, White MT, Toledo JB, Xie SX, ve ark. Neuropathologic substrates of Parkinson disease dementia. *Ann Neurol* 2012; 72(4): 587-598.

Isola AL ve Chen S. Exosomes: The Messengers of Health and Disease. *Curr Neuroparmacol* 2017; 15(1): 157-165.

Jayadev S, Case A, Alajajian B, Eastman AJ, ve ark. Presenilin 2 influences miR146 level and activity in microglia. *J Neurochem* 2013; 127(5): 592-599.

Kalia LV ve Lang AE. Parkinson's disease. *Lancet* 2015; 386(9996): 896-912.

Kang JH, Mollenhauer B, Coffey CS, Toledo JB, ve ark. CSF biomarkers associated with disease heterogeneity in early Parkinson's disease: the Parkinson's Progression Markers Initiative study. *Acta Neuropathol* 2016; 131(6): 935-949.

Keshavan A, Heslegrave A, Zetterberg H ve Schott JM. Blood Biomarkers for Alzheimer's Disease: Much Promise, Cautious Progress. *Mol Diagn Ther* 2017; 21(1): 13-22.

Khoo SK, Petillo D, Kang UJ, Resau JH, ve ark. Plasma-based circulating MicroRNA biomarkers for Parkinson's disease. *J Parkinsons Dis* 2012; 2(4): 321-331.

Khoo TK, Yarnall AJ, Duncan GW, Coleman S, ve ark. The spectrum of nonmotor symptoms in early Parkinson disease. *Neurology* 2013; 80(3): 276-281.

Kim VN. MicroRNA precursors in motion: exportin-5 mediates their nuclear export. *Trends Cell Biol* 2004; 14(4): 156-159.

Kivimaki M, Luukkonen R, Batty GD, Ferrie JE, ve ark. Body mass index and risk of dementia: Analysis of individual-level data from 1.3 million individuals. *Alzheimers Dement* 2017.

Kleinberger G, Yamanishi Y, Suarez-Calvet M, Czirr E, ve ark. TREM2 mutations implicated in neurodegeneration impair cell surface transport and phagocytosis. *Sci Transl Med* 2014; 6(243): 243ra286.

Koopman K, Le Bastard N, Martin JJ, Nagels G, ve ark. Improved discrimination of autopsy-confirmed Alzheimer's disease (AD) from non-AD dementias using CSF P-tau(181P). *Neurochem Int* 2009; 55(4): 214-218.

Kordower JH, Olanow CW, Dodiya HB, Chu Y, ve ark. Disease duration and the integrity of the nigrostriatal system in Parkinson's disease. *Brain* 2013; 136(Pt 8): 2419-2431.

Kotzbauer PT, Tu Z ve Mach RH. Current status of the development of PET radiotracers for imaging alpha synuclein aggregates in Lewy bodies and Lewy neurites. *Clinical and Translational Imaging* 2016; 5(1): 3-14.

Kowal J, Tkach M ve Thery C. Biogenesis and secretion of exosomes. *Curr Opin Cell Biol* 2014; 29: 116-125.

Kozlov S, Afonin A, Evsyukov I ve Bondarenko A. Alzheimer's disease: as it was in the beginning. *Rev Neurosci* 2017; 28(8): 825-843.

Kruger R, Vieira-Saecker AM, Kuhn W, Berg D, ve ark. Increased susceptibility to sporadic Parkinson's disease by a certain combined alpha-synuclein/apolipoprotein E genotype. *Ann Neurol* 1999; 45(5): 611-617.

Kruse N, Persson S, Alcolea D, Bahl JM, ve ark. Validation of a quantitative cerebrospinal fluid alpha-synuclein assay in a European-wide interlaboratory study. *Neurobiol Aging* 2015; 36(9): 2587-2596.

Kumar P, Dezso Z, MacKenzie C, Oestreicher J, ve ark. Circulating miRNA biomarkers for Alzheimer's disease. *PLoS One* 2013; 8(7): e69807.

Kumar S, Vijayan M, Bhatti JS ve Reddy PH. MicroRNAs as Peripheral Biomarkers in Aging and Age-Related Diseases. *Prog Mol Biol Transl Sci* 2017; 146: 47-94.

La Morgia C, Ross-Cisneros FN, Sadun AA ve Carelli V. Retinal Ganglion Cells and Circadian Rhythms in Alzheimer's Disease, Parkinson's Disease, and Beyond. *Front Neurol* 2017; 8: 162.

Lautenschlager NT, Cupples LA, Rao VS, Auerbach SA, ve ark. Risk of dementia among relatives of Alzheimer's disease patients in the MIRAGE study: What is in store for the oldest old? *Neurology* 1996; 46(3): 641-650.

Lawrie CH, Soneji S, Marafioti T, Cooper CD, ve ark. MicroRNA expression distinguishes between germinal center B cell-like and activated B cell-like subtypes of diffuse large B cell lymphoma. *Int J Cancer* 2007; 121(5): 1156-1161.

Le W, Dong J, Li S ve Korczyn AD. Can Biomarkers Help the Early Diagnosis of Parkinson's Disease? *Neurosci Bull* 2017; 33(5): 535-542.

Lee HY ve Doudna JA. TRBP alters human precursor microRNA processing in vitro. *RNA* 2012; 18(11): 2012-2019.

Lee SE, Tartaglia MC, Yener G, Genc S, ve ark. Neurodegenerative disease phenotypes in carriers of MAPT p.A152T, a risk factor for frontotemporal dementia spectrum disorders and Alzheimer disease. *Alzheimer Dis Assoc Disord* 2013; 27(4): 302-309.

Lee Y, Ahn C, Han J, Choi H, ve ark. The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature* 2003; 425(6956): 415-419.

Lee Y, Jeon K, Lee JT, Kim S, ve ark. MicroRNA maturation: stepwise processing and subcellular localization. *EMBO J* 2002; 21(17): 4663-4670.

Leidinger P, Backes C, Deutscher S, Schmitt K, ve ark. A blood based 12-miRNA signature of Alzheimer disease patients. *Genome Biol* 2013; 14(7): R78.

Lin L, Lesnick TG, Maraganore DM ve Isacson O. Axon guidance and synaptic maintenance: preclinical markers for neurodegenerative disease and therapeutics. *Trends Neurosci* 2009; 32(3): 142-149.

Long JM ve Lahiri DK. MicroRNA-101 downregulates Alzheimer's amyloid-beta precursor protein levels in human cell cultures and is differentially expressed. *Biochem Biophys Res Commun* 2011; 404(4): 889-895.

Lotankar S, Prabhavalkar KS ve Bhatt LK. Biomarkers for Parkinson's Disease: Recent Advancement. *Neurosci Bull* 2017; 33(5): 585-597.

Lugli G, Cohen AM, Bennett DA, Shah RC, ve ark. Plasma Exosomal miRNAs in Persons with and without Alzheimer Disease: Altered Expression and Prospects for Biomarkers. *PLoS One* 2015; 10(10): e0139233.

Lukiw WJ. Micro-RNA speciation in fetal, adult and Alzheimer's disease hippocampus. *Neuroreport* 2007; 18(3): 297-300.

Lund E, Guttinger S, Calado A, Dahlberg JE, ve ark. Nuclear export of microRNA precursors. *Science* 2004; 303(5654): 95-98.

Maciotta S, Meregalli M ve Torrente Y. The involvement of microRNAs in neurodegenerative diseases. *Front Cell Neurosci* 2013; 7: 265.

Manek R, Moghieb A, Yang Z, Kumar D, ve ark. Protein Biomarkers and Neuroproteomics Characterization of Microvesicles/Exosomes from Human Cerebrospinal Fluid Following Traumatic Brain Injury. *Mol Neurobiol* 2017.

Marras C ve Lang A. Parkinson's disease subtypes: lost in translation? *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2013; 84(4): 409-415.

Martinez B ve Peplow PV. Immunomodulators and microRNAs as neurorestorative therapy for ischemic stroke. *Neural Regen Res* 2017; 12(6): 865-874.

Masters CL, Kril JJ, Halliday GM, Pamphlett R, ve ark. Overview and recent advances in neuropathology. Part 2: Neurodegeneration. *Pathology* 2011; 43(2): 93-102.

Mattson MP, Cheng B, Culwell AR, Esch FS, ve ark. Evidence for excitoprotective and intraneuronal calcium-regulating roles for secreted forms of the beta-amyloid precursor protein. *Neuron* 1993; 10(2): 243-254.

Mattsson N, Andreasson U, Persson S, Arai H, ve ark. The Alzheimer's Association external quality control program for cerebrospinal fluid biomarkers. *Alzheimers Dement* 2011; 7(4): 386-395 e386.

McKhann G, Drachman D, Folstein M, Katzman R, ve ark. Clinical diagnosis of Alzheimer's disease: report of the NINCDS-ADRDA Work Group under the auspices of Department of Health and Human Services Task Force on Alzheimer's Disease. *Neurology* 1984; 34(7): 939-944.

McKhann GM, Knopman DS, Chertkow H, Hyman BT, ve ark. The diagnosis of dementia due to Alzheimer's disease: recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement* 2011; 7(3): 263-269.

Meraz-Rios MA, Lira-De Leon KI, Campos-Pena V, De Anda-Hernandez MA, ve ark. Tau oligomers and aggregation in Alzheimer's disease. *J Neurochem* 2010; 112(6): 1353-1367.

Mollenhauer B, Trautmann E, Taylor P, Manninger P, ve ark. Total CSF alpha-synuclein is lower in de novo Parkinson patients than in healthy subjects. *Neurosci Lett* 2013; 532: 44-48.

Monteys AM, Spengler RM, Wan J, Tecedor L, ve ark. Structure and activity of putative intronic miRNA promoters. *RNA* 2010; 16(3): 495-505.

Mosconi L, Berti V, Quinn C, McHugh P, ve ark. Sex differences in Alzheimer risk: Brain imaging of endocrine vs chronologic aging. *Neurology* 2017; 89(13): 1382-1390.

Nalls MA, Duran R, Lopez G, Kurzawa-Akanbi M, ve ark. A multicenter study of glucocerebrosidase mutations in dementia with Lewy bodies. *JAMA Neurol* 2013; 70(6): 727-735.

Nunez-Iglesias J, Liu CC, Morgan TE, Finch CE, ve ark. Joint genome-wide profiling of miRNA and mRNA expression in Alzheimer's disease cortex reveals altered miRNA regulation. *PLoS One* 2010; 5(2): e8898.

Nussbaum RL ve Ellis CE. Alzheimer's disease and Parkinson's disease. *N Engl J Med* 2003; 348(14): 1356-1364.

O'Brien RJ ve Wong PC. Amyloid precursor protein processing and Alzheimer's disease. *Annu Rev Neurosci* 2011; 34: 185-204.

Olsson B, Lautner R, Andreasson U, Ohrfelt A, ve ark. CSF and blood biomarkers for the diagnosis of Alzheimer's disease: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Neurol* 2016; 15(7): 673-684.

Öner MG (2012). Alzheimer Hastalığında Yeni Biyomarkır Geliştirilmesi: Serumdan Mikrorna Analizi, Dokuz Eylül Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü (Yüksek Lisans Tezi)

Ozsolak F, Poling LL, Wang Z, Liu H, ve ark. Chromatin structure analyses identify miRNA promoters. *Genes Dev* 2008; 22(22): 3172-3183.

Pan BT, Teng K, Wu C, Adam M, ve ark. Electron microscopic evidence for externalization of the transferrin receptor in vesicular form in sheep reticulocytes. *J Cell Biol* 1985; 101(3): 942-948.

Pankratz N, Wilk JB, Latourelle JC, DeStefano AL, ve ark. Genomewide association study for susceptibility genes contributing to familial Parkinson disease. *Hum Genet* 2009; 124(6): 593-605.

Parker JS, Roe SM ve Barford D. Structural insights into mRNA recognition from a PIWI domain-siRNA guide complex. *Nature* 2005; 434(7033): 663-666.

Perani D, Della Rosa PA, Cerami C, Gallivanone F, ve ark. Validation of an optimized SPM procedure for FDG-PET in dementia diagnosis in a clinical setting. *Neuroimage Clin* 2014; 6: 445-454.

Peters PJ, Borst J, Oorschot V, Fukuda M, ve ark. Cytotoxic T lymphocyte granules are secretory lysosomes, containing both perforin and granzymes. *J Exp Med* 1991; 173(5): 1099-1109.

Peterson SM, Thompson JA, Ufkin ML, Sathyanarayana P, ve ark. Common features of microRNA target prediction tools. *Front Genet* 2014; 5: 23.

Piscopo P, Albani D, Castellano AE, Forloni G, ve ark. Frontotemporal Lobar Degeneration and MicroRNAs. *Front Aging Neurosci* 2016; 8: 17.

Poewe W, Seppi K, Tanner CM, Halliday GM, ve ark. Parkinson disease. *Nat Rev Dis Primers* 2017; 3: 17013.

Poulopoulos M, Levy OA ve Alcalay RN. The neuropathology of genetic Parkinson's disease. *Mov Disord* 2012; 27(7): 831-842.

Prince M, Comas-Herrera, Adelina, Knapp, Martin, Guerchet, Maëleenn and Karagiannidou, Maria (2016). World Alzheimer report 2016: improving healthcare for people living with dementia: coverage, quality and costs now and in the future. London, UK, Alzheimer's Disease International (ADI).

Pyatigorskaya N, Gallea C, Garcia-Lorenzo D, Vidailhet M, ve ark. A review of the use of magnetic resonance imaging in Parkinson's disease. *Ther Adv Neurol Disord* 2014; 7(4): 206-220.

Riancho J, Vazquez-Higuera JL, Pozueta A, Lage C, ve ark. MicroRNA Profile in Patients with Alzheimer's Disease: Analysis of miR-9-5p and miR-598 in Raw and Exosome Enriched Cerebrospinal Fluid Samples. *J Alzheimers Dis* 2017; 57(2): 483-491.

Rivero-Santana A, Ferreira D, Perestelo-Perez L, Westman E, ve ark. Cerebrospinal Fluid Biomarkers for the Differential Diagnosis between Alzheimer's Disease and Frontotemporal Lobar Degeneration: Systematic Review, HSROC Analysis, and Confounding Factors. *J Alzheimers Dis* 2017; 55(2): 625-644.

Ronnemaa E, Zethelius B, Lannfelt L ve Kilander L. Vascular risk factors and dementia: 40-year follow-up of a population-based cohort. *Dement Geriatr Cogn Disord* 2011; 31(6): 460-466.

Roush S ve Slack FJ. The let-7 family of microRNAs. *Trends Cell Biol* 2008; 18(10): 505-516.

Şahin HA. Alzheimer Hastalığı'nın Klinik Belirtileri ve Seyri. *Türkiye Klinikleri Journal of Neurology Special Topics* 2009; 2(1): 31-35.

Saito Y, Kawashima A, Ruberu NN, Fujiwara H, ve ark. Accumulation of phosphorylated alpha-synuclein in aging human brain. *J Neuropathol Exp Neurol* 2003; 62(6): 644-654.

Sando SB, Melquist S, Cannon A, Hutton M, ve ark. Risk-reducing effect of education in Alzheimer's disease. *Int J Geriatr Psychiatry* 2008; 23(11): 1156-1162.

Satue M, Obis J, Rodrigo MJ, Otin S, ve ark. Optical Coherence Tomography as a Biomarker for Diagnosis, Progression, and Prognosis of Neurodegenerative Diseases. *J Ophthalmol* 2016; 2016: 8503859.

Scheltens P, Blennow K, Breteler MM, de Strooper B, ve ark. Alzheimer's disease. *Lancet* 2016; 388(10043): 505-517.

Schipper HM, Maes OC, Chertkow HM ve Wang E. MicroRNA expression in Alzheimer blood mononuclear cells. *Gene Regul Syst Bio* 2007; 1: 263-274.

Schorey JS ve Bhatnagar S. Exosome function: from tumor immunology to pathogen biology. *Traffic* 2008; 9(6): 871-881.

Seifert KD ve Wiener JJ. The impact of DaTscan on the diagnosis and management of movement disorders: A retrospective study. *Am J Neurodegener Dis* 2013; 2(1): 29-34.

Shafi G, Aliya N ve Munshi A. MicroRNA signatures in neurological disorders. *Can J Neurol Sci* 2010; 37(2): 177-185.

Shafiei SS, Guerrero-Munoz MJ ve Castillo-Carranza DL. Tau Oligomers: Cytotoxicity, Propagation, and Mitochondrial Damage. *Front Aging Neurosci* 2017; 9: 83.

Shannon P, Markiel A, Ozier O, Baliga NS, ve ark. Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. *Genome Res* 2003; 13(11): 2498-2504.

Sharma N ve Singh AN. Exploring Biomarkers for Alzheimer's Disease. *J Clin Diagn Res* 2016; 10(7): KE01-06.

Shaw LM, Vanderstichele H, Knapik-Czajka M, Clark CM, ve ark. Cerebrospinal fluid biomarker signature in Alzheimer's disease neuroimaging initiative subjects. *Ann Neurol* 2009; 65(4): 403-413.

Shu R, Wong W, Ma QH, Yang ZZ, ve ark. APP intracellular domain acts as a transcriptional regulator of miR-663 suppressing neuronal differentiation. *Cell Death Dis* 2015; 6: e1651.

Song JJ, Smith SK, Hannon GJ ve Joshua-Tor L. Crystal structure of Argonaute and its implications for RISC slicer activity. *Science* 2004; 305(5689): 1434-1437.

Sperling RA, Aisen PS, Beckett LA, Bennett DA, ve ark. Toward defining the preclinical stages of Alzheimer's disease: recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement* 2011; 7(3): 280-292.

Strimbu K ve Tavel JA. What are biomarkers? *Curr Opin HIV AIDS* 2010; 5(6): 463-466.

Tan L, Yu JT, Tan MS, Liu QY, ve ark. Genome-wide serum microRNA expression profiling identifies serum biomarkers for Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* 2014; 40(4): 1017-1027.

Tanzi RE. The genetics of Alzheimer disease. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2012; 2(10).

Tayebi N, Walker J, Stubblefield B, Orvisky E, ve ark. Gaucher disease with parkinsonian manifestations: does glucocerebrosidase deficiency contribute to a vulnerability to parkinsonism? *Mol Genet Metab* 2003; 79(2): 104-109.

Thambisetty M ve Lovestone S. Blood-based biomarkers of Alzheimer's disease: challenging but feasible. *Biomark Med* 2010; 4(1): 65-79.

Vachev TI, Popov NT, Stoyanova VK, Ivanov HY, ve ark. Alterations of miR-320 Family Members as a Novel Diagnostic Biomarkers in Peripheral Blood of Schizophrenia Patients. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences* 2016; 5(3): 865-875.

Van Battum EY, Brignani S ve Pasterkamp RJ. Axon guidance proteins in neurological disorders. *Lancet Neurol* 2015; 14(5): 532-546.

van Waalwijk van Doorn LJ, Gispert JD, Kuiperij HB, Claassen JA, ve ark. Improved Cerebrospinal Fluid-Based Discrimination between Alzheimer's Disease Patients and Controls after Correction for Ventricular Volumes. *J Alzheimers Dis* 2017; 56(2): 543-555.

Vanderstichele H, Demeyer L, Janelidze S, Coart E, ve ark. Recommendations for cerebrospinal fluid collection for the analysis by ELISA of neurogranin trunc P75, alpha-synuclein, and total tau in combination with Abeta(1-42)/Abeta(1-40). *Alzheimers Res Ther* 2017; 9(1): 40.

Vilardo E, Barbato C, Ciotti M, Cogoni C, ve ark. MicroRNA-101 regulates amyloid precursor protein expression in hippocampal neurons. *J Biol Chem* 2010; 285(24): 18344-18351.

Villemagne VL, Fodero-Tavoletti MT, Masters CL ve Rowe CC. Tau imaging: early progress and future directions. *Lancet Neurol* 2015; 14(1): 114-124.

Viswambharan V, Thanseem I, Vasu MM, Poovathinal SA, ve ark. miRNAs as biomarkers of neurodegenerative disorders. *Biomark Med* 2017; 11(2): 151-167.

Vlachos IS, Zagkanas K, Paraskevopoulou MD, Georgakilas G, ve ark. DIANA-miRPath v3.0: deciphering microRNA function with experimental support. *Nucleic Acids Res* 2015; 43(W1): W460-466.

Wahlster P, Niederlander C, Kriza C, Schaller S, ve ark. Clinical assessment of amyloid imaging in Alzheimer's disease: a systematic review of the literature. *Dement Geriatr Cogn Disord* 2013; 36(5-6): 263-278.

Wang C, Zhang F, Jiang S, Siedlak SL, ve ark. Estrogen receptor-alpha is localized to neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease. *Sci Rep* 2016; 6: 20352.

Wang J, Chen J ve Sen S. MicroRNA as Biomarkers and Diagnostics. *J Cell Physiol* 2016; 231(1): 25-30.

Wang X, Liu P, Zhu H, Xu Y, ve ark. miR-34a, a microRNA up-regulated in a double transgenic mouse model of Alzheimer's disease, inhibits bcl2 translation. *Brain Res Bull* 2009; 80(4-5): 268-273.

Wiseman FK, Al-Janabi T, Hardy J, Karmiloff-Smith A, ve ark. A genetic cause of Alzheimer disease: mechanistic insights from Down syndrome. *Nat Rev Neurosci* 2015; 16(9): 564-574.

Womack KB, Diaz-Arrastia R, Aizenstein HJ, Arnold SE, ve ark. Temporoparietal hypometabolism in frontotemporal lobar degeneration and associated imaging diagnostic errors. *Arch Neurol* 2011; 68(3): 329-337.

Xie J, Zhou Y, Gao W, Li Z, ve ark. The relationship between amniotic fluid miRNAs and congenital obstructive nephropathy. *Am J Transl Res* 2017; 9(4): 1754-1763.

Xu D ve Tahara H. The role of exosomes and microRNAs in senescence and aging. *Adv Drug Deliv Rev* 2013; 65(3): 368-375.

Yang JS ve Lai EC. Alternative miRNA biogenesis pathways and the interpretation of core miRNA pathway mutants. *Mol Cell* 2011; 43(6): 892-903.

Yoda M, Cifuentes D, Izumi N, Sakaguchi Y, ve ark. Poly(A)-specific ribonuclease mediates 3'-end trimming of Argonaute2-cleaved precursor microRNAs. *Cell Rep* 2013; 5(3): 715-726.

Zetterberg H. Applying fluid biomarkers to Alzheimer's disease. *Am J Physiol Cell Physiol* 2017; 313(1): C3-C10.

Zhang YW, Thompson R, Zhang H ve Xu H. APP processing in Alzheimer's disease. *Mol Brain* 2011; 4: 3.

Zimprich A, Biskup S, Leitner P, Lichtner P, ve ark. Mutations in LRRK2 cause autosomal-dominant parkinsonism with pleomorphic pathology. *Neuron* 2004; 44(4): 601-607.

8. EKLER



KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARAR FORMU

ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Alzheimer Ve Parkinson Hastalığı İçin Biyomarkör Geliştirilmesi
VARSA ARAŞTIRMANIN PROTOKOL KODU	-
ETİK KURUL PROTOKOL NUMARASI	32-SBKAEK

ETİK KURUL BİLGİLERİ	ETİK KURULUN ADI	Dokuz Eylül Üniversitesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu
	AÇIK ADRESİ:	Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Yerleşkesi Dekanlık Binası Kat:2 Inciraltı 35340 İZMİR-TÜRKİYE
	TELEFON	0 232 4122254 - 0 232 4122258
	FAKS	0232 4122243
	E-POSTA	etikkurul@deu.edu.tr

BAŞVURU BİLGİLERİ	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACI UNVANI/ADI/SOYADI	Prof.Dr.Şermin GENÇ
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ UZMANLIK ALANI	
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ BULUNDUĞU MERKEZ	Sağlık Bilimleri Enstitüsü Sinir Bilimleri A.D
	VARSA İDARİ SORUMLU UNVANI/ADI/SOYADI	-
	DESTEKLEYİCİ	-
	PROJE YÜRÜTÜCÜSÜ UNVANI/ADI/SOYADI (TÜBİTAK vb. gibi kaynaklardan destek alanlar için)	-
	DESTEKLEYİCİNİN YASAL TEMSİLCİSİ	
	ARAŞTIRMANIN FAZI VE TÜRÜ	FAZ 1 ☐
		FAZ 2 ☐
		FAZ 3 ☐
		FAZ 4 ☐
		Gözlemsel ilaç çalışması ☐
		Tıbbi cihaz klinik araştırması ☐
		In vitro tıbbi tanı cihazları ile yapılan performans değerlendirme çalışmaları ☐
		İlaç dışı klinik araştırma ☒
	Diğer ise belirtiniz	
	ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	TEK MERKEZ ☒ ÇOK MERKEZLİ ☐ ULUSAL ☒ ULUSLARARASI ☐

DEĞERLENDİRİLEN BELGELER	Belge Adı	Tarihi	Versiyon Numarası	Dili		
	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ			Türkçe ☐	İngilizce ☐	Diğer ☐
	Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formu			Türkçe ☐	İngilizce ☐	Diğer ☐
	OLGU RAPOR FORMU			Türkçe ☐	İngilizce ☐	Diğer ☐
	ARAŞTIRMA BROŞÜRÜ			Türkçe ☐	İngilizce ☐	Diğer ☐
DEĞERLENDİRİLEN DİĞER BELGELER	Belge Adı	Açıklama				
	SİGORTA	☐				
	ARAŞTIRMA BÜTÇESİ	☐				
	BIYOLOJİK MATERYEL TRANSFER FORMU	☐				
	İLAN	☐				
	YILLIK BİLDİRİM	☐				
	SONUÇ RAPORU	☐				
	GÜVENLİLİK BİLDİRİMLERİ	☐				
	DİĞER:	☒	-Değiştirilmiş başvuru formu -Protokol değişikliği (Biyobanka bölümünün çalışmadan çıkarılması)			

Etik Kurul Başkanının
Unvanı/Adı/Soyadı: Prof.Dr.Ayşegül Yıldız
İmza:

Not: Etik kurul başkanı, imzasının yer almadığı her sayfaya imza atmalıdır.

DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALARI ETİK KURULU KARAR FORMU

KARAR BİLGİLERİ	Karar No:2012/08-01	Tarih: 05.04.2012							
	Doç.Dr.Şermin GENÇ 'in sorumlusu olduğu "Alzheimer Ve Parkinson Hastalığı İçin Biyomarkör Geliştirilmesi" isimli klinik araştırmaya ait başvuru dosyası ve ilgili belgeler araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş, etik açıdan çalışmanın gerçekleştirilmesinin uygun olduğuna oy birliği ile karar verilmiştir. Biyobanka oluşturulması öngörüldüğünden çalışmaya başlamadan önce Sağlık Bakanlığı'ndan izin alınması gerekmektedir.								
	DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALARI ETİK KURULU								
ÇALIŞMA ESASI			Klinik Araştırmalar Hakkında Yönetmelik, İyi Klinik Uygulamaları Kılavuzu						
BAŞKANIN UNVANI / ADI / SOYADI:			Prof.Dr.Ayşegül YILDIZ						
Unvanı/Adı/Soyadı	Kurumu	Uzmanlık Alanı	Cinsiyet		Araştırma ile ilişki		Katılım *		İmza
Prof.Dr.Ayşegül YILDIZ	Psikiyatri	DEU Tıp Fakültesi Psikiyatri Anabilim Dalı	E ☐	K ☒	E ☐	H ☒	E ☐	H ☐	
Dr.Ecz.İskender İNCE	Biyofarmasötik ve Farmakokinetik	Ege Üniversitesi İlaç ve Farmakokinetik Arş-Uyg.Merk.	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☐	H ☐	
Prof.Dr.Hale AKPINAR	İç Hastalıkları (Gastroenteroloji)	DEU Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı	E ☐	K ☒	E ☐	H ☒	E ☐	H ☐	
Prof.Dr.Caner ÇAVDAR	İç Hastalıkları (Nefroloji)	DEU Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☐	H ☐	
Prof.Dr.Nuray DUMAN	Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları (Yeni Doğan)	DEU Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı	E ☐	K ☒	E ☐	H ☒	E ☐	H ☐	
Prof.Dr.Hülya ELLİDOKUZ	Halk Sağlığı	DEU Onkoloji Enstitüsü Prevanatif Onkoloji A.D.	E ☐	K ☒	E ☐	H ☒	E ☐	H ☐	
Prof.Dr.Dayimi KAYA	Kardiyoloji	DEU Tıp Fakültesi Kardiyoloji Anabilim Dalı	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☐	H ☐	
Prof.Dr.Murat ÖZGÖREN	Biyofizik	DEU Tıp Fakültesi Biyofizik Anabilim Dalı	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☐	H ☐	
Prof.Dr.Yeşim ÖZTÜRK	Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları (Gastroenteroloji)	DEU Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı	E ☐	K ☒	E ☐	H ☒	E ☐	H ☐	
Prof.Dr.Erol TAYMERGEN	Kadın Hastalıkları ve Doğum	Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☐	H ☐	
Prof.Dr.Yeşim TUNÇOK	Farmakoloji	DEU Tıp Fakültesi Farmakoloji Anabilim Dalı	E ☐	K ☒	E ☐	H ☒	E ☐	H ☐	
Prof.Dr.Şule KALKAN	Farmakoloji	DEU Tıp Fakültesi Farmakoloji Anabilim Dalı	E ☐	K ☒	E ☐	H ☒	E ☐	H ☐	
Doç.Dr.Taner DAĞCI	Fizyoloji	Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☐	H ☐	
Tayfun OZANKAYA	Hukuk	Serbest	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☐	H ☐	
İhsan ÇELİKDEMİR	75.Yıl Özel İlköğretim Okulu Md. Yard.	Sağlık Mesleği Mensubu Olmayan Üye	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☐	H ☐	

* :Toplantıda Bulunma

KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARAR FORMU

ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Alzheimer Ve Parkinson Hastalığı İçin Biyomarkör Geliştirilmesi
VARSA ARAŞTIRMANIN PROTOKOL KODU	-
ETİK KURUL PROTOKOL NUMARASI	32-SBKA EK

KARAR BİLGİLERİ	Karar No:2015/16-24	Tarih:17.09.2015
	Prof.Dr.Şermin GENÇ'in sorumlusu olduğu "Alzheimer Ve Parkinson Hastalığı İçin Biyomarkör Geliştirilmesi" isimli projeye ilişkin sorumlu araştırmacı tarafından gönderilen 08.09.2015 tarihli dilekçeye ilişkin;	
	-Değiştirilmiş başvuru formu -Protokol değişikliği (Biyobanka bölümünün çalışmadan çıkartılması) ile ilgili belgeler incelenerek uygun bulunmuştur.	

KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU	
ETİK KURULUN ÇALIŞMA ESASI	İlaç ve Biyolojik Ürünlerin Klinik Araştırmaları Hakkında Yönetmelik, İyi Klinik Uygulamaları Kılavuzu
BAŞKANIN UNVANI / ADI / SOYADI:	Prof.Dr.Ayşegül Yıldız

Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyet	Araştırma ile ilişkisi	Katılım *	İmza
Prof.Dr.Ayşegül YILDIZ	Psikiyatri	DEU Tıp Fakültesi Psikiyatri Anabilim Dalı	E ☐ K ☒	E ☐ H ☒	E ☐ H ☐	
Prof.Dr.Hülya ELLİDOKUZ	Halk Sağlığı	DEU Onkoloji Enstitüsü Prevaltif Onkoloji A.D.	E ☐ K ☒	E ☐ H ☒	E ☐ H ☐	
Prof.Dr.Nuray DUMAN	Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları (Yeni Doğan)	DEU Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı	E ☐ K ☒	E ☐ H ☒	E ☐ H ☐	
Prof.Dr.Hale ÖREN	Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları (Çocuk Hematoloji)	DEU Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı	E ☐ K ☒	E ☐ H ☒	E ☐ H ☐	
Prof.Dr.A.Necati GÖKMEN	Anesteziyoloji ve Reanimasyon	Anesteziyoloji ve Reanimasyon A.D	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☐ H ☐	
Prof.Dr.Taner DAĞCI	Fizyoloji	Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☐ H ☐	
Doç.Dr.Pembe KESKİNOĞLU	Biyoistatistik	DEU Tıp Fakültesi Biyoistatistik ve Tıbbi Bilişim A.D	E ☐ K ☒	E ☐ H ☒	E ☐ H ☐	
Doç.Dr.Erdem YAKA	Nöroloji	DEU Tıp Fakültesi Nöroloji A.D	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☐ H ☐	
Doç.Dr.Uğur Önsel TÜRK	Kardiyoloji	Ege Üniversitesi İlaç ve Farmakokinetik Arş-Uyg.Merk	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☐ H ☐	
Doç.Dr.Yasemin BASKIN	Temel Onkoloji	DEU Onkoloji Enstitüsü Temel Onkoloji A.D	E ☐ K ☒	E ☐ H ☒	E ☐ H ☐	
Yard.Doç.Dr.Yasemin ERAÇ	Farmakoloji	Ege Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmakoloji Anabilim Dalı	E ☐ K ☒	E ☐ H ☒	E ☐ H ☐	
Av.Semra MARMARA	Hukuk	DEU Rektörlüğü	E ☐ K ☒	E ☐ H ☒	E ☐ H ☐	
Av.Nazan PEDÜKÇOŞKUN	Hukuk	Alsancak Nevvar Salih İşgören Hastanesi	E ☐ K ☒	E ☐ H ☒	E ☐ H ☐	
Hayat ALBAYRAK	Emekli	Sağlık Mesleği Mensubu Olmayan Üye	E ☐ K ☒	E ☐ H ☒	E ☐ H ☐	

*:Toplantıda Bulunma

Etik Kurul Başkanının
Unvanı/Adı/Soyadı: Prof.Dr.Ayşegül Yıldız
İmza:

Not: Etik kurul başkanı, imzasının yer almadığı her sayfaya imza atmalıdır.

ÖZGEÇMİŞ

Erden EREN

TC Kimlik No / Pasaport No:	13847566998
Doğum Yılı:	1989
Yazışma Adresi :	DEÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü Sınirbilimler ABD. İnciraltı 35340 İzmir/Türkiye
Telefon :	232-4126552
Faks :	
e-posta :	erdeneren@gmail.com

EĞİTİM BİLGİLERİ

Ülke	Üniversite	Fakülte/Enstitü	Öğrenim Alanı	Derece	Mezuniyet Yılı
Türkiye	Dokuz Eylül Üniversitesi	SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ	SİNİRBİLİM	Doktora	Devam ediyor
Türkiye	Dokuz Eylül Üniversitesi	SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ	SİNİRBİLİM	Yüksek Lisans	2014
Türkiye	İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü	FEN FAKÜLTESİ	MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK	Lisans	2012

AKADEMİK/MESLEKTE DENEYİM

Kurum/Kuruluş	Ülke	Şehir	Bölüm/Birim	Görev Türü	Görev Dönemi
Deutsches Zentrum für Neurodegenerative Erkrankungen (DZNE) e.V. -München	Almanya	Münih	Biyokimya Bölümü. Haass-AG	Ziyaretçi Öğrenci	Mart-Haziran 2017

UZMANLIK ALANLARI

Uzmanlık Alanları
Moleküler Biyoloji ve Genetik, Nöroimmünoloji, Biyobelirteç, Nörodejenerasyon, Nörobiyoloji, Eksozom

PROJE DENEYİMİ

Proje Adı	Kurum	Bütçe	Tarih	Görev	Proje Türü
Alzheimer ve Parkinson Hastalığı için Biyomarkır Geliştirilmesi	TÜBİTAK	242120	15.08.2012-15.08.2015	Bursiyer	Uluslararası
Uyarılmış Pluripotent Kök Hücrelerin (Upkh) Üretim Ve Farklılaştırma Teknolojilerinin Geliştirilmesi Ve Deneysel Hücre Tedavilerinde Uygulanması	TÜBİTAK	1.992.748,76	01.10.2014-01.10.2017	Bursiyer	Ulusal

DİĞER AKADEMİK FAALİYETLER

Son Bir Yılda Uluslararası İndekslere Kayıtlı Makale/Derleme İçin Yapılan Danışmanlık Sayısı			
Son Bir Yılda Projeler İçin Yapılan Danışmanlık Sayısı			
Yayınlara Alınan Toplam Atıf Sayısı			
Danışmanlık Yapılan Öğrenci Sayısı		Tamamlanan	Devam Eden
	Yüksek Lisans		
	Doktora		
	Uzmanlık		
Diğer Faaliyetler (Eser/görev/faaliyet/sorumluluk/olay/üyelik vb.)			

ÖDÜLLER

	Ödülün Adı	Alındığı Kuruluş	Yılı
☐	Short-term Fellowship	EMBO	2017
	Katılım Bursu	Alzheimer's Association	2014

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

1) N. Kruse, N. Kruse, S. Persson, S. Persson, D. Alcolea, D. Alcolea, J. M. C. Bahl, J. M. C. Bahl, I. Baldeiras, I. Baldeiras, E. Capello, E. Capello, D. Chiasserini, D. Chiasserini, L. B. Chiavetto, L. B. Chiavetto, A. Emersic, A. Emersic, S. Engelborghs, S. Engelborghs, E. Eren, E. Eren, T. Fladby, T. Fladby, G. Frisoni, G. Frisoni, M. Garcia-Ayllon, M. Garcia-Ayllon, S. Genc, S. Genc, O. Gkatzima, O. Gkatzima, N. H. H. Heegaard, N. H. H. Heegaard, A. M. Janeiro, A. M. Janeiro, B.

- Kovacech, B. Kovacech, H. B. Kuiperij, H. B. Kuiperij, M. J. Leita, M. J. Leita, A. Lleo, A. Lleo, M. Martins, M. Martins, M. Matos, M. Matos, H. M. Mollergard, H. M. Mollergard, F. Nobili, F. Nobili, A. Ohrfelt, A. Ohrfelt, L. Parnetti, L. Parnetti, C. R. De Oliveira, C. R. De Oliveira, U. Rot, U. Rot, J. Saez-Valero, J. Saez-Valero, H. Struyfs, H. Struyfs, J. T. Tanassi, J. T. Tanassi, P. Taylor, P. Taylor, M. Tsolaki, M. Tsolaki, E. Vanmechelen, E. Vanmechelen, M. M. Verbeek, M. M. Verbeek, N. Zilka, N. Zilka, K. Blennow, K. Blennow, H. Zetterberg, H. Zetterberg, B. Mollenhauer & B. Mollenhauer, Validation of a quantitative cerebrospinal fluid alpha-synuclein assay in a European-wide interlaboratory study, *NEUROBIOLOGY OF AGING*, 2015, 0197-4580, 36, 9, 2587-2596.
- 2) J. D. Gispert, L. J. C. V. W. V. Doorn, P. J. Visser, N. Salvadori, C. Teunissen, E. Cavedo, E. Eren, V. Greco, C. R. D. Oliveira, G. Yener, G. B. Frisoni, K. K. Oguz, H. B. Kuiperij, S. Genc, R. Tarducci, M. Tsolaki, E. Saka, O. Meulenbroek, E. Vilaplana, M. M. Verbeek, Y. Freund-Levi, E. Scarpini, J. L. Molinuevo, F. M. Nobili, P. Eusebi, H. Hampel, R. Sanchez-Valle, H. Soininen, A. Urbani, M. Pikkarainen, D. Galimberti, A. K. Wallin, S. Herukka, P. Scheltens, A. Picco, C. Fenoglio, J. A. H. R. Claassen, A. Arighi, I. Baldeiras, J. F. Ormaechea, K. Blennow, A. Lleo, J. Pereira, D. D. Emek-Savas, I. Santana, Y. Liu, M. Bozzali, M. Castelo-Branco, A. Llado, L. Farotti & L. Parnetti, Improved Cerebrospinal Fluid-Based Discrimination between Alzheimer's Disease Patients and Controls after Correction for Ventricular Volumes, *JOURNAL OF ALZHEIMERS DISEASE*, 2017, 1387-2877, 56, 2, 543-555.
- 3) A. Gumurdu, R. Yildiz, E. Eren, G. Karakulah, T. Unver, S. Genc & Y. Park, MicroRNA exocytosis by large dense-core vesicle fusion, *SCIENTIFIC REPORTS*, 2017, 2045-2322, 7.

Diğer dergilerde yayınlanan makaleler

Hakemli konferans/sempozyumların bildiri kitaplarında yer alan yayınlar

E. Eren, Sulforaphane Exerts Protective Effects İn Microglial Cells By Switching Polarization Phenotypes, Poster Sunumu, Xii European Meeting On Glial Cells İn Health And Disease
E. Eren, Serum Mir-16 Levels Show Negative Correlation With Amyloid-Beta1-42 Levels İn Alzheimer'S Disease Patients, Poster Sunumu, 3rd International Congress Of The Molecular Biology Association Of Turkey, 11 Eylül 2014, 11 Eylül 2014.
E. Eren, The New Cut-Off For Cerebrospinal Fluid Biomarker Of Alzheimer's Disease İn The Differentiation Between Ftld And Control Subjects For Turkish Population, Poster Sunumu, Alzheimer's Association International Conference, 13 Temmuz 2014, 13 Temmuz 2014, 10, 4, 361 - 362.
E. Eren, Sulforaphane Attenuates İnflammatory Responses İn Primary Mouse Astrocytes, Poster Sunumu, 9th Fens Forum Of Neuroscience, 05 Temmuz 2014, 05 Temmuz 2014.

E. Eren, Sülforafan'ın Primer Fare Astrositlerinde Koruyucu Ve Anti-İnflamatuvar Etkisi, Poster Sunumu, 12. Ulusal Sinirbilimleri Kongresi, 30 Mayıs 2014, 30 Mayıs 2014.

E. Eren, Dexamethasone And Phytochemicals Suppress Lipopolysaccharide Induced Mir-155 Expression İn Microglia, Poster Sunumu, Fens Featured Regional Meeting, 11 Eylül 2013, 11 Eylül 2013, 1, 1, 285 - 285.

E. Eren, Sulforaphane Protects Murine Microglia From Lps-İnduced Apoptosis And İnflammatory Response, Poster Sunumu, Fens Featured Regional Meeting , 11 Eylül 2013, 11 Eylül 2013, 1, 1, 267 - 267

Diğer Yayınlar

Erdogan Pekcan ERKAN, **Erden EREN**, Sermin GENC, and Kemal Kursad GENC, “Stem cell-based approaches for treatment of Glioblastoma” Neurological Regeneration, 2017, Springer International Publishing

Erden EREN, Erdogan Pekcan ERKAN, Sermin GENC, and Kemal Kursad GENC Induced Pluripotent Stem Cell Therapy and Safety Concerns in Age-related Chronic Neurodegenerative Diseases. Neurological Regeneration, 2017, Springer International Publishing

Alzheimer ve Parkinson Hastalığı için Biyomarkır

1	Adı ve Soyadı (Sadece başharfleri)	
2	Hasta /kontrol kodu	
3	Yaş	
4	Cinsiyet	
5	Hastalık başlangıç yaşı (Hastalar için)	
6	Hastalık süresi (Hastalar için)	
7	Özgeçmiş	
8	Soygeçmiş	

Doldurulma tarihi	
Dolduran kişi adı ve soyadı	
İmzası	

GÖNÜLLÜ BİLGİLENDİRME VE ONAY FORMU

Alzheimer Hastalığı (AH) ve Parkinson Hastalığı (PH), ileri yaşta sıklıkla karşımıza çıkan nörolojik hastalıklardır. AH ve PH toplumdaki genel ölüm nedenleri sıralamasında üst sıralarda yer almaktadır. AH'da kognitif fonksiyonlarda kayıp ile birlikte bellek bozukluğu en önemli klinik bulgularıdır. Bu bulgulara ileri dönemde fiziksel fonksiyonlarda da kayıp eklenir. AH'nın klinik tanısı demansa yol açabilecek diğer nedenlerin ekarte edilmesi ile yapılmaktadır. PH'de ise titreme, sertlik ve hareketlerde yavaşlama en önemli semptomlardır. Daha sonraki dönemde duruşsal bozukluklar da semptomlara eklenmektedir. Parkinson hastalığının tanısı ise nörolojik muayene ve benzer klinik tabloların semptomlarının ekarte edilmesi ile konmakta ve Levodopa kullanımı sonucu düzelme ile kontrol edilmektedir.

Bu çalışmada, Alzheimer ve Parkinson hastalarında hastalığın tanısında ve tedavinin izlenmesinde kullanılan geçerli biyomarker testlerin örnek alımından standardizasyonuna kadarki aşamalarının standardizasyonu amaçlanmıştır.

Çalışmaya Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi, Nöroloji Anabilim Dalı, Demans polikliniğinde izlenen, klinik olarak Alzheimer veya Parkinson tanısı almış hastalar arasından 30 kişi erken dönem demans, 30 kişi geç dönem demans ve 30 kişi Parkinson hastası alınacaktır. Kontrol grubu olguları cerrahi girişim için epidural anestezi uygulanacak kişilerden oluşturulacaktır. **Gönüllülerden örnek alma işleminin gönüllüye herhangi bir olumsuz risk veya rahatsızlığı olmayacaktır. Gönüllülerden araştırma için yalnızca bir defa örnek alınacak ve testlere tabi tutulacaktır.** Tüm hasta ve kontrollerden bir kez koldan 10 ml kan örneği ve lomber ponksiyon ile 5 ml Beyin Omurilik Sıvısı örneği alınacaktır. Kontrol grubundan BOS alma işlemini çalışmada yer alan Anestezi Profesörü Dr. Leyla İyilikçi gerçekleştirecektir. Hastalardan ise bu işlemleri Nöroloji Anabilim Dalından Dr. Anıl Tanburoğlu ve Dr. Gülşah Çökelez gerçekleştirecektir. **Kan örnekleri, örneklerden elde edilen serumlar ve BOS örnekleri çalışma bitiminde imha edilecektir.**

Bu çalışma sırasında uygulanacak testlerin ve araştırma ile ilgili gerçekleştirilecek diğer işlemlerin masrafları size veya güvencesi altında bulunduğunuz resmi ya da özel hiçbir kurum veya kuruluşa ödetilmeyecektir.

Araştırmanın gönüllüye herhangi bir yararı olmayacaktır. Gönüllü bu çalışmaya katılmayı red etme hakkına sahiptir. Bu çalışmaya katılmamanız daha sonraki tıbbi bakımınızı etkilemeyecektir. Araştırmacı da gönüllünün kendi rızasına bakmadan, olguyu araştırma dışı bırakabilir.

Bu çalışmada yer aldığınız süre içerisinde kayıtlarınızın yanı sıra ilişkili sağlık kayıtlarınız kesinlikle gizli kalacaktır. Bununla birlikte kayıtlarınız kurumun yerel etik kurul komitesine ve Sağlık Bakanlığına açık olacaktır. Hassas olabileceğiniz kişisel bilgileriniz yalnızca araştırma amacıyla toplanacak ve işlenecektir. Çalışma verileri herhangi bir yayın ve raporda kullanılırken bu yayında isminiz kullanılmayacak ve veriler izlenerek size ulaşılamayacaktır.

Yukarıda gönüllüye araştırmadan önce verilmesi gereken bilgileri okudum. Bunlar hakkında bana yazılı ve sözlü açıklamalar yapıldı. Bu koşullarla söz konusu klinik araştırmaya kendi rızamla, hiçbir baskı ve zorlama olmaksızın katılmayı kabul ediyorum.

Hastanın;

Adı Soyadı:

Telefon Numarası :

Adresi :

Tarih:

İmza:

Hasta Yakınının;

Adı Soyadı:

Telefon Numarası :

Adresi :

Tarih:

İmza:

Olur Alma İşlemine Başından Sonuna Kadar Tanıklık Eden Kuruluş Görevlisinin

Adı Soyadı:

Tarih:

İmza:

Araştırma Yapan Araştırmacının

Adı Soyadı: şermin Genç

Tel: 02324122601

02322390077

Tarih:

İmza:



**III. INTERNATIONAL CONGRESS OF
THE MOLECULAR BIOLOGY
ASSOCIATION**



CERTIFICATE of ATTENDANCE

This is to certify that

Erden EREN

has participated to the **III. International Congress of the Molecular Biology Association of Turkey**, which was held in İzmir (Turkey) between September 10 – 12, 2014.

Ahmet KOÇ
President
Organizing Committee

Mustafa KÖKSAL
Secretary
Organizing Committee



İZMİR YÜKSEK TEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ

Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü

Gülbahçe, 35430 Urla, İZMİR

Tel. 232-7507300, Faks. 232-7507303, Email: ahmetkoc@iyte.edu.tr

KAYIT VE KABUL BELGESİ

Sayın Erden Eren

23 Temmuz 2014

Türkiye Moleküler Biyoloji Derneği'nce ve İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü ev sahipliğinde 10-12 Eylül 2014 tarihlerinde düzenlenecek olan III. Uluslararası Moleküler Biyoloji Kongresine karşı gösterdiğiniz ilgiden dolayı teşekkür ederiz. Kongreye kayıt işlemlerinizi başarı ile tamamlanmıştır ve **“Serum miR-16 levels show negative correlation with amyloid-beta₁₋₄₂ levels in Alzheimer's disease patients”** ve başlıklı bildiriniz poster sunumu için kabul edilmiştir.

Kongre Bilgileri:

Yer: İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü, Prof. Dr. Erdal Saygın Konferans Salonu, Urla, İzmir

Tarih: 10-12 Eylül 2014

İnternet sayfası: <http://mbd2014.iyte.edu.tr/>

Saygılarımızla,
Kongre Düzenleme Kurulu adına

Prof. Dr. Ahmet KOÇ

İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü
Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölüm Başkanı

P157. Serum miR-16 levels show negative correlation with amyloid-beta₁₋₄₂ levels in Alzheimer's disease patients

Erden Eren^{1,2*}, Erdogan Pekcan Erkan^{1,2}, Kemal Ugur Tufekci^{1,2}, Gulsah Gokce³, Anil Tanburoglu³, Nurhak Demir³, Gorsev Yener³, Sermin Genc^{1,2}

¹*Department of Neuroscience, Health Science Institute, Dokuz Eylul University*

²*Advanced Biomedical Research Center, iBG-Izmir Project, Dokuz Eylul University,*

³*Department of Neurology, Dokuz Eylul University Medical School*

**Erden Eren. E-mail: erdeneren@gmail.com*

Abstract

Alzheimer's disease (AD) is a progressive neurodegenerative disease, and represents the most common form of dementia. AD has no known cure, and eventually leads to death. The disease is characterized by the formation of amyloid-beta plaques, and neurofibrillary tangles (NTF). Alterations in microRNA (miRNA) expression profiles have been linked to AD pathogenesis, and several studies suggest that altered miRNA signatures could serve as diagnostic markers for AD. We have previously performed a microarray-based screening by using serum samples from AD patients (n=10) and controls (n=10), and found several dysregulated miRNAs in AD patients. Of note, miR-16 showed the highest level of overexpression in AD patients, compared to healthy controls. Here, our aim was to validate the microarray data on a larger patient cohort. Quantitative real-time PCR analysis showed that miR-16 expression was approximately 3.5-fold higher in AD patients (n=24) compared to healthy controls (n=24). Moreover, we analyzed amyloid-beta expression by using ELISA, and we compared A β ₍₁₋₄₂₎ levels and miR-16 expression levels by Spearman's Rank Order correlation test. Correlation analysis revealed a significant negative correlation between A β ₍₁₋₄₂₎ levels and miR-16 expression levels.. Altogether, our results suggest that elevated miR-16 levels and low A β ₍₁₋₄₂₎ levels can serve as a novel biomarker signature for AD patients.

Keywords: Alzheimer's Disease, miRNA, Amyloid-beta, Biomarker



Certificate of Attendance

This is to certify that

Erden Eren

has attended

The Alzheimer's Association International Conference

July 12-17, 2014

**Bella Center A/S Center Boulevard
Copenhagen, Denmark**

pathology. Imaging using markers of β -amyloid combined with Positron Emission Tomography (PET) allows a semi-quantitative in vivo assessment of β deposition in the subject brains. However, this approach is invasive, costly and restricted to specialised centres. Candidate blood protein biomarkers that predicted global neocortical brain amyloid load have been recently identified (our group and Burnham et al. 2013). However, temporo-parietal junction, posterior cingulate and precuneus are areas of early β -amyloid deposition in Alzheimer's disease (AD) (Villain et al. 2012). Blood-based protein biomarkers that could predict brain amyloid burden in those specific regions could thus be used as markers of early amyloidosis. Using an unbiased approach, we have identified distinct peripheral protein levels that are associated with specific regions of the brain where β -amyloid deposits. **Methods:** Peripheral biomarker discovery was in a cohort of 78 subjects from the Australian Imaging, Biomarker & Lifestyle Flagship Study of Ageing (AIBL) cohort which pathological status was determined by the measurement of PiB in 18 brain regions. Isobaric tandem mass tagging (TMT) combined with SDS-PAGE fractionation and LC-MS/Mass spectrometry (Orbitrap Velos-Pro) were used to detect and quantify plasma proteins. Linear regressions were performed, co-varying for age, gender and APOE4 presence. **Results:** Regression analysis (co-varying for age, gender and APOE4 status) identified that the regional PiB levels of 6 peripheral plasma proteins, previously identified as candidates of global amyloid load (Bazenet et al), had a significant regional PiB pattern (FDR < 0.05). **Conclusions:** We have discovered distinct sets of plasma proteins that have potential to predict regional brain amyloid burden as a measure of AD pathology. Some of those brain regions identified have been suggested to display accumulation at the earliest stages of amyloid accumulation. Those candidates, if replicated and validated in other cohorts, could thus represent very early markers of prodromal AD.

P1-167 SERUM LIPOCALIN-2: MONITORING THE NEUROPATHOLOGICAL PROGRESSION OF AD IN DOWN SYNDROME?

Alain Dekker¹, Antonia Coppus², Pieter Naudé³, Cornelia van Duijn², Peter Paul De Deyn⁴, ¹University Medical Center Groningen, Groningen, Netherlands; ²Erasmus University Medical Center, Rotterdam, Netherlands; ³University of Groningen, Groningen, Netherlands; ⁴Laboratory of Neurochemistry and Behavior, Institute Born-Bunge, University of Antwerp, Antwerp, Belgium. Contact e-mail: alaindekker@gmail.com

Background: With an incidence of approximately 1 in 650-1000 live births, Down syndrome (DS) or trisomy 21 is the most common genetic intellectual disability in humans. A distinct characteristic is early-onset dementia, which is predominantly attributed to Alzheimer's disease (AD). Whereas, almost all individuals have developed a full-blown AD-like pathology around mid-life, the onset of dementia symptoms varies tremendously. Therefore, predicting and monitoring the progression of AD in DS is necessary to enable adaptive caretaking. The undesirability of relatively invasive CSF-sampling procedures in DS illustrates the need for an efficient blood biomarker. The pro-inflammatory factor Lipocalin-2 (LCN2) might be a promising candidate, as increased plasma levels were reported in MCI and AD patients. Interestingly, it has been demonstrated that significantly higher levels are present in healthy DS individuals as well. Therefore, this study investigates the potential of LCN2 as biomarker for AD in DS. **Methods:** Using an optimized and previously documented ELISA, LCN2 concentrations were quantified in serum of 308 DS subjects (≥ 45 years) and 19 age-matched healthy non-DS controls. Among the DS population, three groups were considered: DS subjects with AD (demented), without AD (non-demented) and AD and a group of non-demented individuals that developed AD over time (converters). **Results:** Compared to non-DS controls, serum LCN2 levels were strongly elevated in DS, regardless of the presence dementia. Although serum LCN2 levels were not associated with clinical symptoms of dementia in DS, they correlated significantly with previously determined plasma levels of A β 1-40, A β 1-42 and truncated A β n42 in demented subjects and with truncated A β n40 in the converted and non-demented group. Furthermore, we demonstrated a significant

association between serum LCN2 levels and the age of the subjects at the moment of blood sampling. **Conclusions:** As the current population is 45 years or older, these DS subjects presumably presented a full-blown AD-like neuropathology, including A β plaques deposition, neurofibrillary tangles and inflammation. Whereas the serum LCN2 levels were not associated with clinical symptoms of dementia in DS, they correlated significantly with A β plasma levels. Therefore, serum LCN2 levels do not monitor cognitive decline in DS, but might rather monitor the neuropathological progression.

P1-168 SEX DIFFERENCES IN ANTIBODY LEVELS IN ALZHEIMER'S DISEASE

Michala Kolarova, Jan Ricny, Ales Bartos, Daniela Ripova, *Prague Psychiatric Center, Prague, Czech Republic. Contact e-mail: kolarova.michala@pcp.lf3.cuni.cz*

Background: Tau protein is one of the cytoskeletal neuronal proteins and under some pathological conditions it can be released into the extracellular fluid. One of promising therapeutic options for Alzheimer disease (AD) is tau vaccination. Therefore we aimed to find out corresponding immunologic background in normal population and in patients with AD prior to vaccination. **Methods:** We measured anti-tau antibodies using ELISA in serum samples from AD patients fulfilling NIA-AA criteria and age- and sex- matched cognitively normal controls (NC) in two independent experiments (firstly, 36 AD vs 34 NC, secondly, 30 AD vs 30 NC). We used different tau antigens involved in AD pathology or resembling brain tau protein: the longest isoform (441 amino acids), the shortest isoform ("fetal" 352 amino acids), two misdisordered forms of tau protein (151-391 3R and 151-391 4R), a cleaved form (151-421 amino acids) and native bovine tau protein. **Results:** Levels of serum anti-tau antibodies did not differ between the AD patients and the controls in both experiments. Moreover, anti-tau levels were independent of age in both NC groups. Interestingly, we found some differences depending on gender and the used antigen. We noticed that anti-tau antibody levels were in opposite direction in male and female population which could have an influence on statistics. **Conclusions:** We found similar immunological background of anti-tau antibodies in serum from individuals with AD or without it. Gender changes in serum anti-tau antibodies due to AD should be taken into consideration in tau vaccination interventions. The size of our groups does not allow us to perform rigorous statistical analysis and our preliminary findings should be validated on larger sample. The study was supported by grant GAČR P304/12/G069 and GAČR 13-26601S, IGA NT 13183 and MH CZ - DRO (PCP, 00023752), UK 266705/SVV/2014.

P1-169 THE NEW CUT-OFF FOR CEREBROSPINAL FLUID BIOMARKER OF ALZHEIMER'S DISEASE IN THE DIFFERENTIATION BETWEEN FTLD AND CONTROL SUBJECTS FOR A TURKISH POPULATION

Erden Eren¹, Pembe Keskinoglu², Kemal Ugur Tufekci², Gülsah Gökçe³, Anil Tanburoglu², Nurhak Demir², Derya Durusu Emek-Savas⁴, Görsev G. Yener², Åzmerin Genç², ¹Dokuz Eylul University Institute of Health Sciences, Izmir, Turkey; ²Dokuz Eylul University, Izmir, Turkey; ³Dokuz Eylul University Medical School, Izmir, Turkey; ⁴Istanbul Kultur University, Istanbul, Turkey. Contact e-mail: erdeneren@gmail.com

Background: We aimed to compare CSF levels of A β 1-42, and pTau (181) between AD, Frontotemporal dementia (FTD) and controls. We hope to look at possible new cut-off point of CSF biomarkers in our Turkey population. **Methods:** In this study, we collected 44 dementia subjects (24 AD, 20 FTD) and 29 controls for CSF analysis. A β 1-42 and pTau levels in CSF samples were measured by enzyme-linked immunoassay (ELISA) by INNOTEST (Ghent, Belgium). **Results:** Mean CSF A β 1-42, pTau (181), and pTau/A β 1-42 in the AD group were 473.5 ± 54.6 pg/mL, 101.8 ± 12.1 pg/mL and 0.215 ± 0.222 accordingly. Mean CSF A β 1-42, pTau (181), and pTau/A β 1-42 in the FTD group were 637.4 ± 74.0 pg/mL, 28.1 ± 7.5 pg/mL and 0.044 ± 0.102 accordingly. Mean CSF A β 1-42, pTau (181), and pTau/A β 1-42 in the controls were 1246.1 ± 60.9 pg/mL, 23.1 ± 4.0

pg/mL, and 0.019 ± 0.066 respectively. There is significant difference between AD and controls groups in CSF A β 1-42, pTau and pTau/A β 1-42 ($p < 0.0001$). There is significant difference between FTD and controls groups in CSF A β 1-42 ($p < 0.0001$). However, there is no significant difference between FTD and control groups in CSF pTau ($p = 0.935$) and pTau/A β 1-42 ($p = 0.200$). Moreover, there is a significant difference between AD and FTD in CSF pTau and pTau/A β 1-42 ($p < 0.0001$). However, there is no significant difference in CSF A β 1-42 ($p = 0.104$). Optimal A β 1-42 cut-off level was 514.3 pg/ml and optimal P-tau181P cut-off level was 41.8 pg/ml and optimal p- pTau/A β 1-42 cut-off level was 0.0612 for differentiating AD from controls. Optimal P-tau181P cut-off level was 32.6 pg/ml and optimal P- pTau/A β 1-42 cut-off level for differentiating AD from FTD was 0.0410. **Conclusions:** Optimal A β 1-42, P-tau181P and P-tau181P/A β 1-42 cut-off levels help discrimination of AD from controls and FTD dementia. * This project was supported by The Scientific and Technological Research Council of Turkey (112S335).

P1-170

PROTEOMIC ANALYSIS OF SERUM PROTEINS IN TRIPLE TRANSGENIC ALZHEIMER'S DISEASE MICE: IMPLICATIONS FOR IDENTIFYING BIOMARKERS FOR USE TO SCREEN POTENTIAL CANDIDATE THERAPEUTIC DRUGS FOR EARLY AD

Sun Qian¹, Xiaojing Sui², Jianjun Liu², Xifei Yang², ¹Shenzhen University, Shenzhen, China; ²Shenzhen Center for Disease Control and Prevention, Shenzhen, China. Contact e-mail: 770891531@qq.com

Background: Alzheimer's disease (AD) is the most common fatal neurodegenerative disease affecting the elderly worldwide. There is an urgent need to identify novel biomarkers of early AD. This study aims to search for potential early protein biomarkers in serum from a triple transgenic (PS1 M146V/APP Swe/Tau P301L) mouse model. **Methods:** Proteomic analysis via two-dimensional fluorescence difference gel electrophoresis was performed on serum samples from wild-type (WT) and triple transgenic mice that were treated with or without coenzyme Q10 (CoQ10) (800mg/kg body weight/day), a powerful endogenous antioxidant displaying therapeutic benefits against AD pathology and cognitive impairment in multiple AD mouse models, for a period of three months beginning at two months of age. **Results:** A total of 15 differentially expressed serum proteins were identified between the WT and AD transgenic mice. The administration of CoQ10 was found to alter the changes in the differentially expressed serum proteins by up-regulating 10 proteins and down-regulating 10 proteins. Among the proteins modulated by CoQ10, clusterin and alpha-2-macroglobulin were validated via ELISA assay. These findings revealed significant changes in serum proteins in the AD mouse model at an early pathological stage and demonstrated that administration of CoQ10 could modulate these changes in serum proteins. **Conclusions:** Our study suggested that these differentially expressed serum proteins could serve as potential protein biomarkers of early AD and that screening for potential candidate AD therapeutic drugs and monitoring of therapeutic effects could be performed via measurement of the changes in these differentially expressed serum proteins. This work was supported by NSFC (the National Natural Science Foundation of China) (81102154), Medical Scientific Research Foundation of Guangdong Province (B2012322, A2013598), Shenzhen Scheme of Science and Technology (Medicine and Health) (201202086, 201302148), and Shenzhen Special Fund Projection Strategic Emerging Industry Development (JCYJ20130329103949650). (Correspondence should be addressed to Dr. YANG Xifei (xifeiyang@gmail.com)).

P1-171

DEMENTIA EXPERTS' PERCEIVED DIAGNOSTIC VALUE OF PET AMYLOID IMAGING

Cristina Muscio¹, **Marina Boccardi**¹, Michela Pievani², Patrizio Pasqualetti³, Samantha Galluzzi², Barbara Borroni⁴, Alessandro Padovani⁴, Giovanni Frisoni⁵, ¹LENITEM, Brescia, Italy; ²Laboratory of Epidemiology, Neuroimaging and Telemedicine, IRCCS Centro San Giovanni di Dio Fatebenefratelli, The National Center for

Research and Care of Alzheimer's and Mental Diseases, Brescia, Italy; ³AFaR-CRCCS, Ospedale Fatebenefratelli, Rome, Italy; ⁴Centre for Neurodegenerative Disorders, Neurology Unit, University of Brescia, Brescia, Italy; ⁵Memory Clinic and LANVIE - Laboratory of Neuroimaging of Aging, University Hospitals and University of Geneva - Laboratory of Epidemiology, Neuroimaging and Telemedicine, IRCCS Centro San Giovanni di Dio Fatebenefratelli, The National Center for Research and Care of Alzheimer's and Mental Diseases, Brescia, Italy. Contact e-mail: mboccardi@fbf@googlemail.com

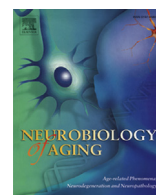
Background: Amyloid PET imaging is a biomarker of amyloid pathology and can assist in the differential diagnosis of Alzheimer's Disease (AD) from other non-AD dementias. Evidence that amyloid PET has an impact on the diagnostic thinking of dementia experts is starting to emerge but is still limited (Vandenberghe et al., 2013; Grudman et al., 2012). This study was aimed at assessing whether amyloid positivity/negativity has an impact on the diagnostic thinking of dementia experts (DEs) as assessed through an ad-hoc questionnaire. **Methods:** This study was carried out in the context of a larger one on the diagnostic value of amyloid PET imaging in Eastern Lombardy, Italy. Twenty-two DEs of second level referral centres participated to the study. Six clinical case-vignettes representative of patients with diagnostic uncertainty were developed and submitted to the DEs. Each case-vignette included the following information: patient's age, sex, cognitive/behavioural symptoms, FDG-PET and MRI results, and initial diagnosis before amyloid-PET scan. DEs were then asked to rate the probability (from 0 to 100) of a change in diagnosis after knowledge of amyloid-PET results (positive A β +/negative A β -). **Results:** When assessing the 6 case-vignettes, the highest probability of a change in diagnosis was for cases with an initial diagnosis of (i) AD with atypical profile (logopenic variant) and A β - (66% probability), and of (ii) subcortical ischemic vascular dementia and A β + (62%). There was no significant difference between the two case-vignettes ($p > 0.05$ on post-hoc ANOVA). The lowest probability was in the cases with an initial diagnosis of (iii) LBD and A β - (14%), and of (iv) AD and A β - (33%). These case-vignettes were significantly different from case-vignettes (i) and (ii) ($p < 0.01$). For cases with an initial diagnosis of bvFTD and CBD and A β + the probability of a change in diagnosis was intermediate (43 and 44%). These values were significantly higher compared with those of case-vignette (iii) ($p < 0.01$). **Conclusions:** Amyloid biomarkers proved to be most informative to rule out an AD etiology in cases with atypical AD, and to support an AD etiology in cases with a non-AD dementia. A change in the diagnosis was less frequent in cases of suspected non-amyloid pathology.

P1-172

THE INCREMENTAL DIAGNOSTIC VALUE OF 18F-FLORBETAPIR IMAGING IN NATURALISTIC PATIENTS WITH COGNITIVE IMPAIRMENT: THE INDIA-FBP STUDY

Cristina Muscio¹, **Marina Boccardi**¹, Ugo Paolo Guerra², Barbara Paghera³, Claudio Pizzocaro², Michela Pievani⁴, Alessandro Padovani⁵, Giovanni Frisoni⁶, ¹LENITEM, Brescia, Italy; ²Fondazione Poliambulanza, Brescia, Italy; ³University of Brescia and Spedali Civili di Brescia, Brescia, Italy; ⁴Laboratory of Epidemiology, Neuroimaging and Telemedicine, IRCCS Centro San Giovanni di Dio Fatebenefratelli, The National Center for Research and Care of Alzheimer's and Mental Diseases, Brescia, Italy; ⁵Centre for Neurodegenerative Disorders, Neurology Unit, University of Brescia, Brescia, Italy; ⁶Memory Clinic and LANVIE - Laboratory of Neuroimaging of Aging, University Hospitals and University of Geneva - Laboratory of Epidemiology, Neuroimaging and Telemedicine, IRCCS Centro San Giovanni di Dio Fatebenefratelli, The National Center for Research and Care of Alzheimer's and Mental Diseases, Brescia, Italy. Contact e-mail: mboccardi@fbf@googlemail.com

Background: Amyloid PET imaging enables the in vivo estimation of brain β -amyloid neuritic plaque density and can be used to support an Alzheimer's Disease (AD) diagnosis in research settings (Albert et al., 2011). The added value of amyloid PET imaging in clinical settings is less known. Data are starting to emerge but still limited (Vandenberghe et al., 2013; Grundman et al., 2012). We report preliminary findings about the incremental



Validation of a quantitative cerebrospinal fluid alpha-synuclein assay in a European-wide interlaboratory study



Niels Kruse^{a,*}, Staffan Persson^b, Daniel Alcolea^{c,d}, Justyna M.C. Bahl^e, Ines Baldeiras^f, Elisabetta Capello^g, Davide Chiasserini^h, Luisella Bocchio Chiavetto^{i,j}, Andreja Emersic^k, Sebastiaan Engelborghs^l, Erden Eren^m, Tormod Fladbyⁿ, Giovanni Frisoni^{o,p}, María-Salud García-Ayllón^{d,q}, Sermin Genc^m, Olymbia Gkatzima^r, Niels H.H. Heegaard^{e,s}, André M. Janeiro^t, Branislav Kováčech^u, H. Bea Kuiperij^{v,w}, Maria J. Leitão^f, Alberto Lleó^{c,d}, Madalena Martins^{x,y}, Mafalda Matos^x, Hanne M. Møllergaardⁿ, Flavio Nobili^g, Annika Öhrfelt^b, Lucilla Parnetti^h, Catarina Resende de Oliveira^f, Uros Rot^k, Javier Sáez-Valero^{d,q}, Hanne Struyfs^l, Julia T. Tanassi^e, Peggy Taylor^z, Magda Tsolaki^r, Eugene Vanmechelen^{aa}, Marcel M. Verbeek^{v,w}, Norbert Zilka^u, Kaj Blennow^b, Henrik Zetterberg^{b,ab}, Brit Mollenhauer^{a,ac,ad}

^a Department of Neuropathology, University Medical Center, Göttingen, Germany

^b Clinical Neurochemistry Laboratory, Department of Psychiatry and Neurochemistry, Institute of Neuroscience and Physiology, The Sahlgrenska Academy at the University of Gothenburg, Sahlgrenska University Hospital, Mölndal, Sweden

^c Department of Neurology, Institut Investigacions Biomèdiques, Hospital de Sant Pau, Barcelona, Spain

^d Centro de Investigación Biomédica en Red en enfermedades Neurodegenerativas—CIBERNED, Madrid, Spain

^e Department of Autoimmunology & Biomarkers, Statens Serum Institut, Copenhagen S, Denmark

^f Neurochemistry Laboratory, Department of Neurology, Faculty of Medicine, CHUC—Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra, CNC—Center for Neuroscience and Cell Biology, University of Coimbra, Coimbra, Portugal

^g Department of Neuroscience (DINOEMI), Clinical Neurology Unit, Genoa, Italy

^h Centre for Memory Disturbances and Alzheimer's Centre—Laboratory of Clinical Neurochemistry, Department of Medicine, Section of Neurology, University of Perugia, Perugia, Italy

ⁱ Neuropsychopharmacology Unit, IRCCS Centro S. Giovanni di Dio Fatebenefratelli, Brescia, Italy

^j Faculty of Psychology, eCampus University, Novedrate (Como), Italy

^k Department of Neurology, University Medical Centre, Ljubljana, Slovenia

^l Reference Centre for Biological Markers of Dementia (BIODEM), Institute Born-Bunge, University of Antwerp, Antwerp, Belgium

^m Department of Neuroscience, Health Science Institute, Dokuz Eylül University, Izmir, Turkey

ⁿ Department of Neurology, Akershus University Hospital, Lørenskog, Norway

^o Laboratory of Alzheimer's Neuroimaging and Epidemiology, IRCCS Centro S. Giovanni di Dio Fatebenefratelli, Brescia, Italy

^p Departments of Psychiatry and Internal Medicine, University Hospitals and University of Geneva, Geneva, Switzerland

^q Instituto de Neurociencias de Alicante, Universidad Miguel Hernández-CSIC, Sant Joan d'Alcant, Spain

^r 3rd Neurology Department, Aristotle University of Thessaloniki, Thessaloniki, Greece

^s Department of Clinical Biochemistry and Pharmacology, Odense University Hospital, Odense C, Denmark

^t Genomed, Diagnósticos de Medicina Molecular, Instituto de Medicina Molecular, Edifício Egas Moniz, Lisbon, Portugal

^u Institute of Neuroimmunology, Slovak Academy of Sciences, Bratislava, Slovakia

^v Department of Neurology, Donders Institute for Brain, Cognition and Behaviour, Radboud University Medical Centre, Nijmegen, The Netherlands

^w Department of Laboratory Medicine, Donders Institute for Brain, Cognition and Behaviour, Radboud University Medical Centre, Nijmegen, The Netherlands

^x Instituto de Medicina Molecular, Edifício Egas Moniz, Lisbon, Portugal

^y Instituto Gulbenkian de Ciência, Oeiras, Portugal

^z BioLegend, Inc., Dedham, MA, USA

^{aa} ADx NeuroSciences NV, Gent, Belgium

^{ab} Department of Molecular Neuroscience, UCL Institute of Neurology, London, UK

^{ac} Paracelsus-Elena-Klinik, Kassel, Germany

^{ad} Department of Neurosurgery, University Medical Center, Göttingen, Germany

* Corresponding author at: Department of Neuropathology, University Medical Center Göttingen, Robert-Koch-Strasse 40, 37075 Göttingen, Germany. Tel.: +49 551 39 8466; fax: +49 551 39 8472.

E-mail address: n.kruse@med.uni-goettingen.de (N. Kruse).

ARTICLE INFO

Article history:

Received 25 September 2014

Received in revised form 17 March 2015

Accepted 10 May 2015

Available online 15 May 2015

Keywords:

Alpha-synuclein

Cerebrospinal fluid

ELISA

Validation

Biomarker

ABSTRACT

Decreased levels of alpha-synuclein (aSyn) in cerebrospinal fluid (CSF) in Parkinson's disease and related synucleinopathies have been reported, however, not consistently in all cross-sectional studies. To test the performance of one recently released human-specific enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the quantification of aSyn in CSF, we carried out a round robin trial with 18 participating laboratories trained in CSF ELISA analyses within the BIOMARKAPD project in the EU Joint Program - Neurodegenerative Disease Research. CSF samples (homogeneous aliquots from pools) and ELISA kits (one lot) were provided centrally and data reported back to one laboratory for data analysis. Our study showed that although factors such as preanalytical sample handling and lot-to-lot variability were minimized by our study design, we identified high variation in absolute values of CSF aSyn even when the same samples and same lots of assays were applied. We further demonstrate that although absolute concentrations differ between laboratories the quantitative results are comparable. With further standardization this assay may become an attractive tool for comparing aSyn measurements in diverse settings. Recommendations for further validation experiments and improvement of the interlaboratory results obtained are given.

© 2015 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

In the last years, decreased concentrations of alpha-synuclein (aSyn) in cerebrospinal fluid (CSF) have been shown and proposed as a biomarker for Parkinson's disease, multiple system atrophy and dementia with Lewy bodies (Hall et al., 2012; Hong et al., 2010; Kasuga et al., 2010; Mollenhauer and Schlossmacher, 2008; Mollenhauer et al., 2008, 2011, 2013; Parnetti et al., 2011; Tateno et al., 2012; Tokuda et al., 2006, 2010; Wennstrom et al., 2013). The degree of change of CSF aSyn in Parkinson's disease is only minor, with aSyn being in the range of 80%–90% of the level in matched controls. Discrepant findings showing no change or elevated levels have been reported by other groups (Aerts et al., 2012; Lee et al., 2011; Noguchi-Shinohara et al., 2009; Ohrfelt et al., 2009; Park et al., 2011; Reesink et al., 2010; Spies et al., 2009; Wang et al., 2012). Several factors could explain these discrepancies, including the use of different assay formats and antibodies as well as differences in sample handling (Mollenhauer et al., 2010). There is also evidence that CSF aSyn levels are elevated in diseases with severe synaptic and/or neuronal degeneration, for example, Creutzfeldt-Jakob and Alzheimer's disease (Hall et al., 2012; Mollenhauer et al., 2008). Thus, reduced levels in synucleinopathies may be masked if there is concomitant release of aSyn into the CSF from degenerating neurons and synapses. The inclusion of such cases may account for some of the variation across studies.

Large variability between laboratories can occur, as has been demonstrated for the quantification of beta-amyloid and tau protein in CSF, even when the same assay and standard operating procedure for sample handling were used (Mattsson et al., 2011). Hence, to understand and compare aSyn levels between laboratories and studies, it is important to establish the variation across different laboratories. Within the BIOMARKAPD project, a European Union Joint Program - Neurodegenerative Disease Research, we therefore performed a round robin trial using one specific enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) suitable for the quantification of CSF aSyn and report here on the interassay variability across 18 different laboratories.

2. Material and methods

Seventeen laboratories from 13 countries within the BIOMARKAPD consortium (www.biomarkapd.org) and one from the United States participated in the trial (#1–18). All laboratories are experienced in the quantification of CSF proteins by ELISA kits. Except for two laboratories (#18 and #4), none of the participating laboratories had previously used the ELISA kit under investigation.

Participants were not specifically trained to use the assay under investigation but all laboratories were experienced in performing ELISA assays on CSF proteins and some even in ELISA development (Supplementary Table 1). All participants received 24 CSF samples provided by one central laboratory in a blinded manner. Measurements performed in the originator laboratory of the assay (#18) were used as reference values for comparison with the other laboratories.

2.1. CSF samples

Human CSF pools were prepared at the Clinical Neurochemistry Laboratory/Sahlgrenska University Hospital in Mölndal, Sweden, from a large number of samples obtained during routine clinical workflow. CSF samples were collected after performance of all planned analyses, after which left-over aliquots would have been destroyed. Samples were deidentified so that they cannot be traced back to an individual patient. All samples underwent one freeze-thaw cycle before pooling. No extra amount of aSyn (spiking) was added to the samples. The individual samples were thawed and pooled into 50 mL centrifuge tubes, centrifuged at 2000g for 10 minutes, and were then divided into 500 µL aliquots in polypropylene screw-cap tubes (Sarstedt AG & Co, Nümbrecht, Germany) during continuous mixing to ensure homogeneity of the pools. The samples were refrozen at –80 °C, and distributed to the participating laboratories on dry ice by courier.

Two identical sets of 12 CSF samples were provided centrally to 18 laboratories; the order of the samples was changed in set 2 compared with set 1. Results were reported back to one central laboratory for data analysis.

We conducted the study according to the Declaration of Helsinki and all subjects provided written informed consent. The ethics committee of the University of Gothenburg approved the procedure for collection of samples.

2.2. aSyn ELISA assay

Quantification of aSyn was performed using the aSyn ELISA kit (Cat.-# SIG-38974, Covance, Dedham, MA USA). The ELISA assay is intended for research use only. Data on the analytical performance have been published recently (Mollenhauer et al., 2013). All kits used in this study were from one single lot (Lot-# D13DK01212; exp: 26/Oct/13). Each participating laboratory received two kits. Assays were performed according to the manufacturer's instructions in the kit insert. CSF samples were analyzed at 1:10 and 1:25 dilution. One laboratory used 1:20 instead of 1:25, and two

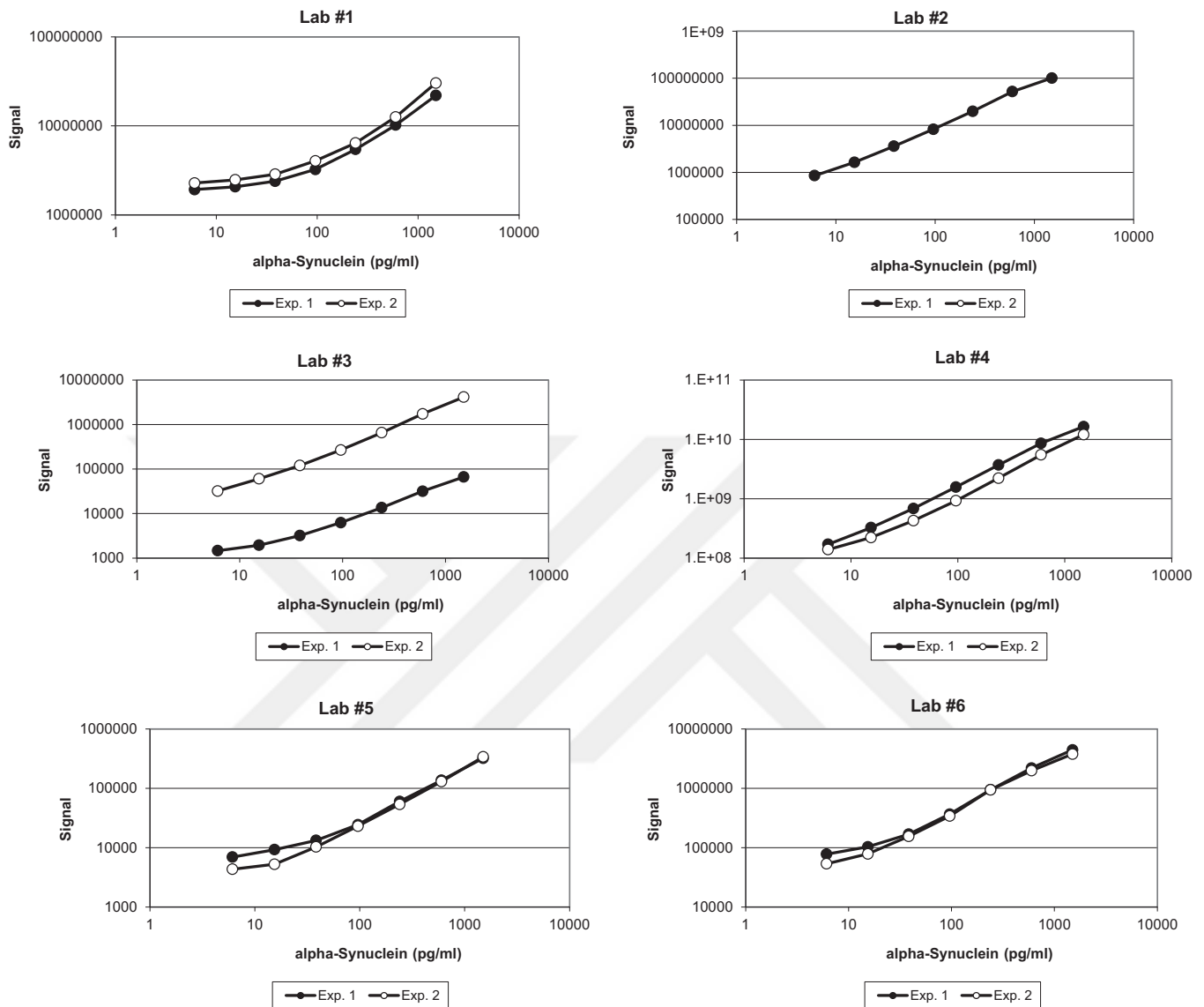


Fig. 1. Standards curves from two alpha-synuclein quantification experiments show variable performance. Raw data for standard curve signal readings from two independent experiments are shown per laboratory. In most laboratories both curves are highly comparable whereas in some significant differences were observed.

laboratories also analyzed 1:50 dilutions. Samples were analyzed in either duplicate or triplicate.

Covance provided the ELISA kits, and analyzed the same CSF samples as originator laboratory #18 but was not involved in the design of the study. In addition the company was neither involved in data analysis nor interpretation of the results.

2.3. Instruments

According to the manufacturer's instructions, the BioTek Synergy 2 luminescence reader was recommended. Luminescence detection was carried out with 11 different instruments in 18 laboratories: BioTek Instruments Synergy HT (laboratories #3, #6, #14, #18), PerkinElmer VICTOR3 Wallac (laboratories #9, #12, #13, #16), PerkinElmer VICTOR X4 (laboratory #4), PerkinElmer 2 (laboratory #11), EnVision Multilabel Reader 2104-0010 (laboratory #10), BMG Labtech LUMIstar Optima (laboratory #7), Tecan Infinite M200 (laboratories #2, #8), Tecan Infinite 200 Pro (laboratory #17), POLARstar Omega (laboratory #5), LabSystems Fluoroskan Ascent FL (laboratory #15), Fuji Instruments LAS-3000 (laboratory #1).

2.4. Data analysis

Duplicates or triplicates of standards and CSF samples were analyzed in two independent experiments. Data were reported back to one central laboratory (Göttingen) for analysis. Samples diluted 1:20 in one laboratory were taken along with samples diluted 1:25 in the other laboratories. Background values were subtracted from standard and sample readings. Means of the signal readings were calculated for standard replicates. Standard curves were plotted using Microsoft Office Excel 2003. Resulting curve parameters of linear regression curves were used to calculate aSyn concentrations in individual samples, as is considered acceptable according to the kit insert. Concentrations were adjusted for dilution factors. To test the intra-assay variability, coefficients of variance (CVs) were calculated for every sample measured in each laboratory. Dilution linearity was analyzed by comparing mean concentrations of adjusted protein concentrations on individual plates measured at two different dilutions. Within-laboratory variability was analyzed by comparing individual samples at both dilutions from both experiments. Precision refers to the variability

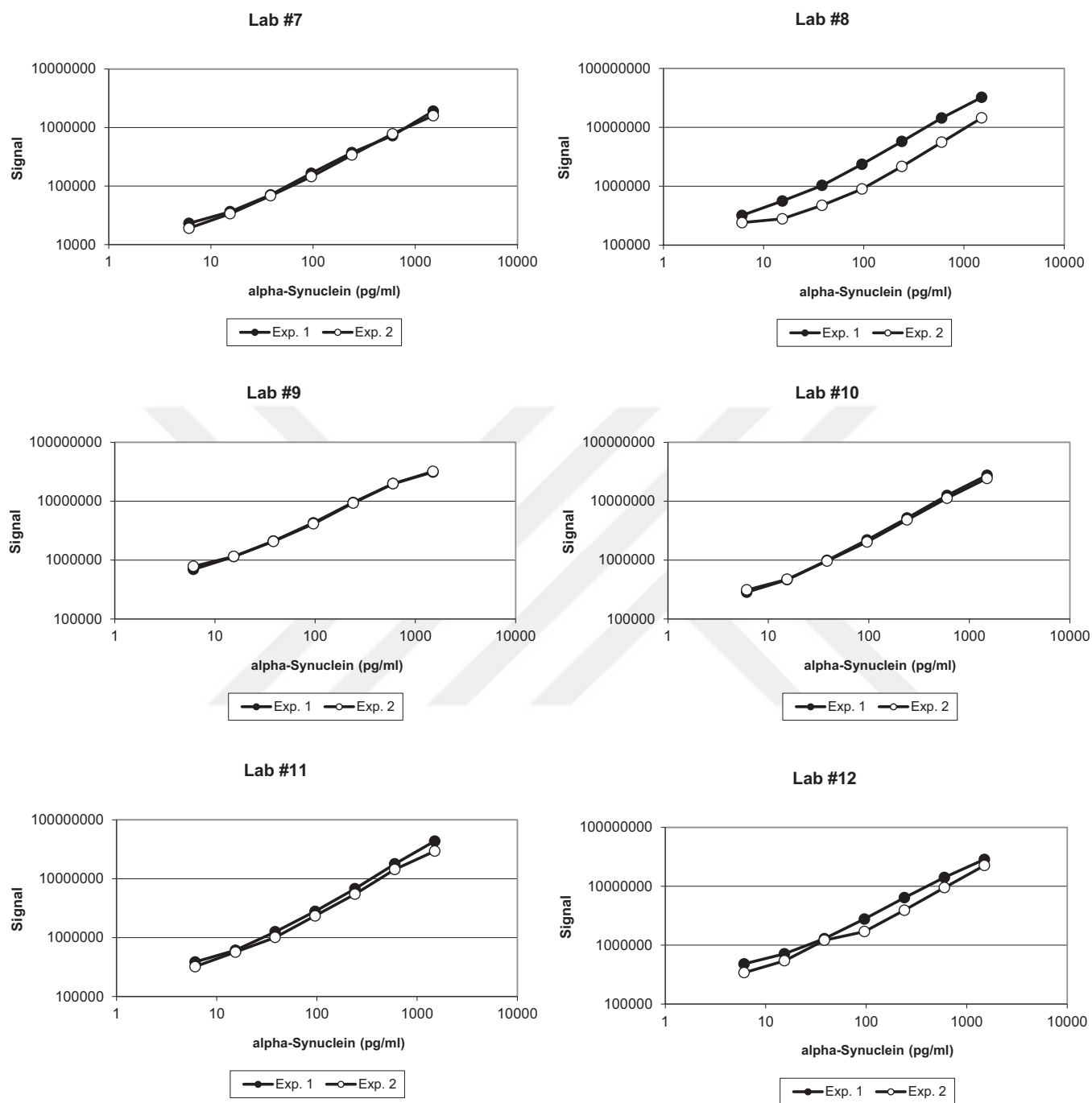


Fig. 1. (Continued)

of mean concentrations of individual samples at both dilutions from both experiments. Reliable results were defined as those with CVs for replicate determinations of analyte concentration of <20%. Figures were prepared using Excel software.

3. Results

3.1. Participants and analytical techniques

All participants followed the instruction manual provided with the kits with minor adaptations. Four laboratories used plate washers and 14 washed plates manually as specified in the

instruction manual. At least two laboratories used Milli-Q water instead of reverse osmosis de-ionisation (RODI) water. Laboratory #2 analyzed CSF samples in a single run. Results were treated as if they came from two independent experiments.

3.2. Standard curves across laboratories and different luminescence readers

Performance and reproducibility of standard curves were analyzed first for all laboratories. In 13/18 laboratories standard curves from both runs were comparable with less than a two-fold difference in signal readings (Fig. 1). In four laboratories there

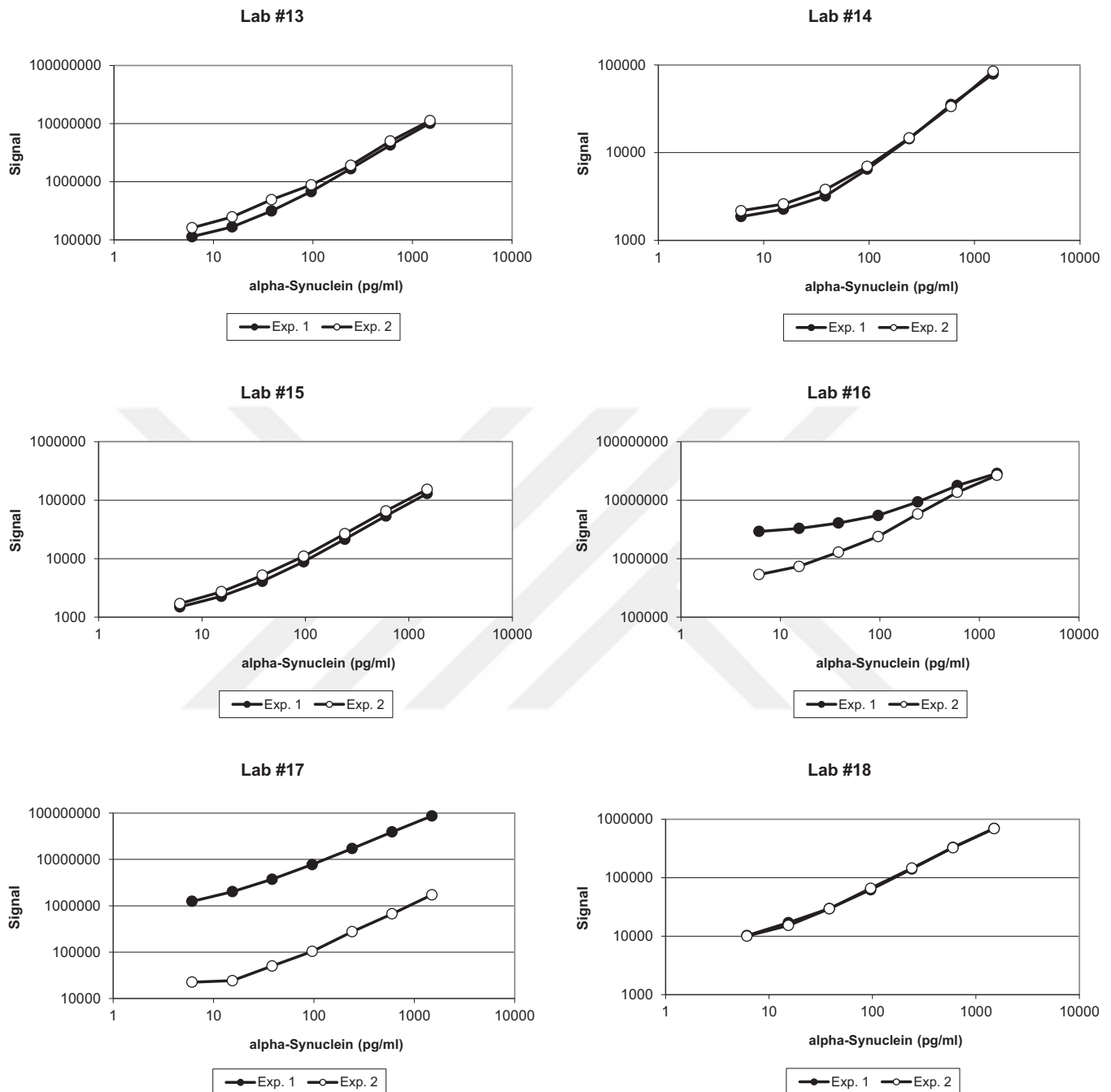


Fig. 1. (Continued)

were variations of up to nearly 100-fold in signal values for individual standard concentrations between both runs (Fig. 1, laboratories #3, 8, 16, and 17). One laboratory reported data for one run only (laboratory #2). We included all results for further analysis and will discuss these separately when describing different aspects of data analysis.

3.3. Intra-assay variability (means of duplicates)

When analyzing the 1:10 dilution, as suggested in the ELISA manual, 16 laboratories (89%) obtained mean concentrations from both runs with all CVs <20%. Two laboratories (11%) had 3 and 5 samples with CVs >20%. For the 1:25 dilutions more samples

reached CVs >20% (11 laboratories [61%] with all CVs <20%, three laboratories (17%) with 1 sample and four laboratories (22%) with 2–9 samples with CVs >20%). Overall, for all analyses >98% of samples were quantified with <20% CV at 1:10 dilution and 94% at 1:25 dilution (Fig. 2).

Among the laboratories with high numbers of samples with CVs >20% this variability may be attributed to pipetting errors when preparing either the standard curves or the sample dilutions. The standard curve of the first experiment in laboratory #16 shows a very long plateau phase at low aSyn concentrations (Fig. 1). This is probably the reason why we found 6 samples with CVs >20% with regard to intra-assay variability. Four of these 6 samples were measured at <100 pg/mL aSyn at 1:25 dilution. Within the plateau

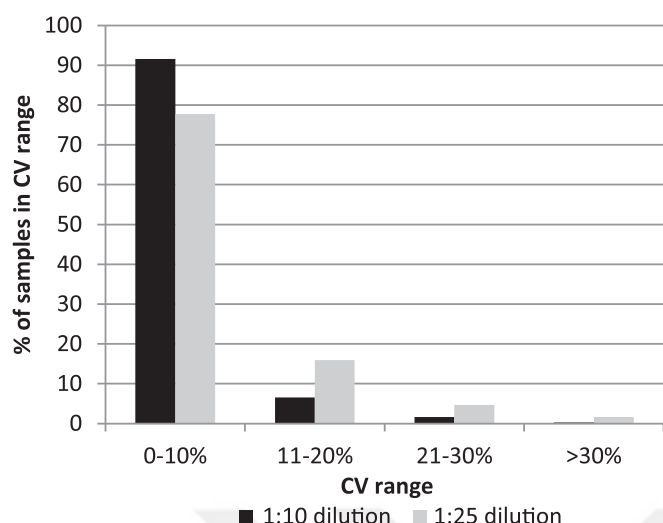


Fig. 2. Quantification of alpha-synuclein in cerebrospinal fluid samples is highly consistent. Results of duplicate determinations of alpha-synuclein concentration at different dilution were grouped into CV ranges. Percentages of each group were calculated. More than 75% of results exhibited CVs <10% at both dilutions. Abbreviation: CV, coefficient of variance.

phase, minor differences in signal readings have strong effects on the concentration determined for these samples. All measurements at 1:10 dilution and at 1:25 dilution in the second experiment showed CVs <20%.

Nine samples with CVs >20% were found by laboratory #5. All of the variability was found in the 1:25 dilution and were probably due to inconsistencies in pipetting as the standard curves were similar in both experiments (Fig. 1). The same holds true for laboratory #1, where 8 samples were measured with high CVs (5 from experiment 1 and 3 from experiment 2).

3.4. Within-laboratory variability and interassay variability

To test the interassay variability, quantification results from identical samples from both runs were compared. In nine laboratories (50%) all samples diluted 1:10 were similar with CVs <20%. Three laboratories (17%) measured 1 sample with CVs >20% and six laboratories (33%) measured 2–12 samples with CVs >20%. At 1:25 dilutions, six laboratories (33%) determined similar concentrations with CVs <20% for all samples. Three laboratories (17%) found 1 sample with CVs >20% and nine laboratories (50%) found 2–12 samples with CVs >20%.

For laboratory #4 very high concentrations were determined in experiment 2 as compared with experiment 1. The reason for this observation is that signal readings for standards in experiment 1 are higher than those in experiment 2 (Fig. 1). Therefore, higher concentrations were assigned to samples in experiment 2 as compared with experiment 1 (Fig. 3). The same effect was found in laboratory #8 (Figs. 1 and 3). In both experiments most of the samples showed high CVs (12 and 11 samples at both dilutions, respectively).

Standard curves from both experiments in laboratories #3 and #17 differed to a great extent. In laboratory #3 signal readings for both standards as well as samples differed at similar levels in the two experiments. Therefore, comparable concentrations were assigned to the samples (Fig. 3). By contrast, signal readings for samples differed to a larger extent in laboratory #17 as compared with those for standards. This resulted in much higher concentration assignment for samples in experiment 1 (Fig. 3). We found 7

samples with CVs <20% at 1:10 dilution and 11 samples at 1:25 dilution.

3.5. Dilution linearity

Dilution linearity was analyzed by comparing results obtained at 1:10 and 1:25 dilutions. Mean concentrations back-calculated from the diluted samples in most cases had CVs <20%. For nine laboratories (50%) this holds true for all samples in both experiments. Furthermore, six laboratories (33%) had 1–5 samples with CVs >20%, while three laboratories (17%) had 9–14 samples with CV >20%. Results shown in Fig. 2 indicate that diluting samples 1:10 gave more consistent results compared with higher dilutions. This becomes more evident when results from the two laboratories using 1:50 dilutions (laboratories #7 and #17) were taken into account. If mean concentrations were calculated from all three dilutions, 10 and 12 samples gave inconsistent results with CVs >20% (data not shown). In one of these laboratories (#17) all samples with CVs >20% were on the same plate indicating that the particular experiment had some inherent problems, as already seen from the standard curves (Fig. 1).

3.6. Absolute concentration

When concentrations determined for individual samples were compared, a marked variability in absolute values was observed (Fig. 3). Up to six-fold differences were assigned to identical samples. For example, the aSyn concentration of sample 1 was determined to be 433 pg/mL in laboratory #2 and 2617 pg/mL in laboratory #12 (Fig. 3). Lowest aSyn concentrations for all samples were measured in laboratory #2 (Fig. 4). These were at a mean level of 57% relative to the concentrations determined in laboratory #18. Highest mean levels were determined in laboratory #8, with a mean level of 222% relative to laboratory #18 (Fig. 4). Between six and 11 laboratories measured aSyn concentrations in individual CSF samples that were in the range of 80%–120% of the values measured in reference laboratory #18.

3.7. Within-laboratory precision

Precision was calculated per laboratory from all concentrations determined for individual samples, that is, mean concentrations were calculated from both dilutions on both plates. This analysis revealed that in some laboratories many samples had CVs >20%. In seven laboratories (39%) all samples gave reliable results (CV <20%). Seven laboratories (39%) obtained 1–4 samples with CV >20%, and four laboratories (22%) had >5 for the reasons already described previously.

3.8. Correlation between samples between laboratories (total variability)

To gain an overview of the consistency of quantitative results, we normalized all concentrations determined for single samples to the concentrations determined in laboratory #18, which were set to 100% accordingly. Although absolute concentrations differed between laboratories, relative values were, in most cases, very consistent, that is, they follow the same trend (Fig. 4). Eight of 17 laboratories obtained concentrations comparable to laboratory #18, that is, mean relative concentrations were in the range of 80%–120% of those determined in laboratory #18. Interestingly, the laboratories experienced with running the assay (laboratories #4 and #18) showed highly comparable results.

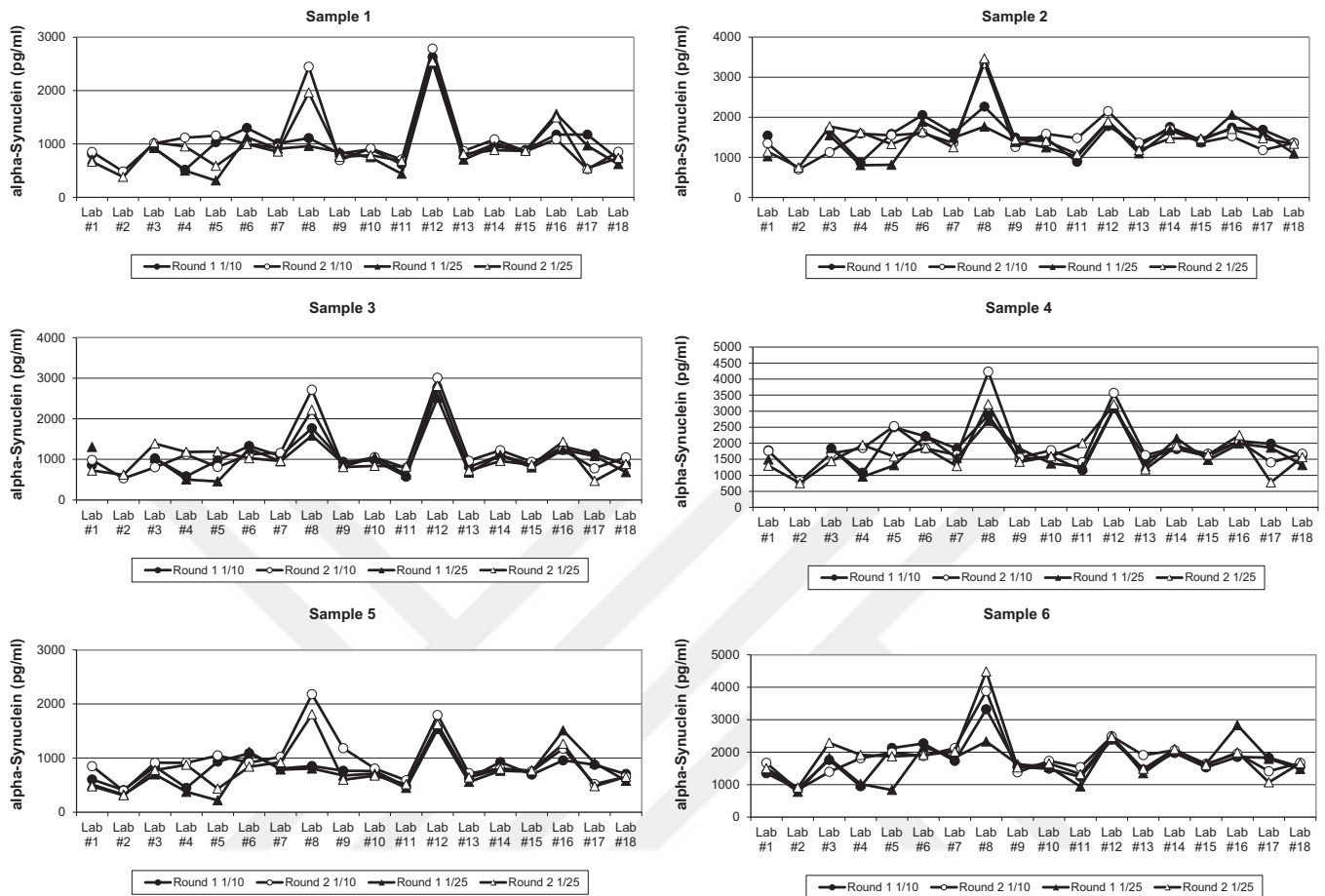


Fig. 3. Absolute concentration of alpha-synuclein in cerebrospinal fluid (CSF) samples. Alpha-synuclein concentrations in 12 CSF samples quantified by all laboratories in 2 experiments at different dilutions were plotted per CSF sample. Quantitative results for most CSF samples were highly comparable irrespective of sample dilution.

4. Discussion

Validation of quantitative assays is of major concern in research and clinical settings (see www.biomarkapd.org) (Del Campo et al., 2012; Koel-Simmelink et al., 2014). We report here on a first large round robin trial based on a recently released, commercially available ELISA kit for the quantification of aSyn in human CSF. Seventeen laboratories from 13 European countries, and one laboratory from the United States, used the aSyn ELISA kit from one single lot to analyze 24 (2×12) CSF samples provided centrally. All laboratories participating in this study have years-long experience in quantification of CSF proteins by ELISA, but none, except for laboratories #18 and #4, had previously used the tested aSyn ELISA.

To compare data between the participating laboratories, raw data were analyzed centrally and identically for all experiments. Such procedure excludes differences in concentration assignment based on different algorithms used by the various luminescence readers used in the study. Main analyses included intra-assay and interassay variability, dilution linearity, and precision. In most laboratories standard curves derived from two independent experiments were comparable with <two-fold differences in signal readings for individual standard concentrations. Four laboratories observed significantly larger differences (up to 100-fold) between standard curves from both runs. This observation, in combination with variabilities in analytical procedure (operator and/or technician effects), is responsible for occasional large differences in

absolute concentration assignment in individual CSF samples. According to the kit instructions, the highest concentration of the standard curve is prepared in three consecutive dilution steps. Thus, small pipetting errors will have a great impact on the concentration, although differences up to 100-fold cannot be explained by pipetting errors alone.

Detailed analysis of aSyn concentrations determined in CSF samples revealed that comparable results with acceptable variation of about 20% relative to the results from a reference laboratory were obtained in most of the participating laboratories. Some laboratories determined concentrations strongly deviating from reference data. Nevertheless, all these results followed the same trend. Similar variations in quantitative results have been reported previously in a large international quality control program for other CSF biomarkers (Mattsson et al., 2011). In their study, Mattsson et al. found considerable variation with respect to within-laboratory precision of biomarker protein quantification. This may be due to the fact that several multiplex assays were used, while our test is a singleplex ELISA. One major problem related to protein quantification using multiplex assays is that all samples are subjected to common dilution factors that do not necessarily reflect the right dilution for all analytes. A further problem is potential interaction of multiple assay constituents, that is, antibodies and analytes. Our study clearly shows that there is a distinct challenge in comparative measurements of the absolute concentration of aSyn in CSF between different laboratories, an issue that needs to be addressed in further studies.

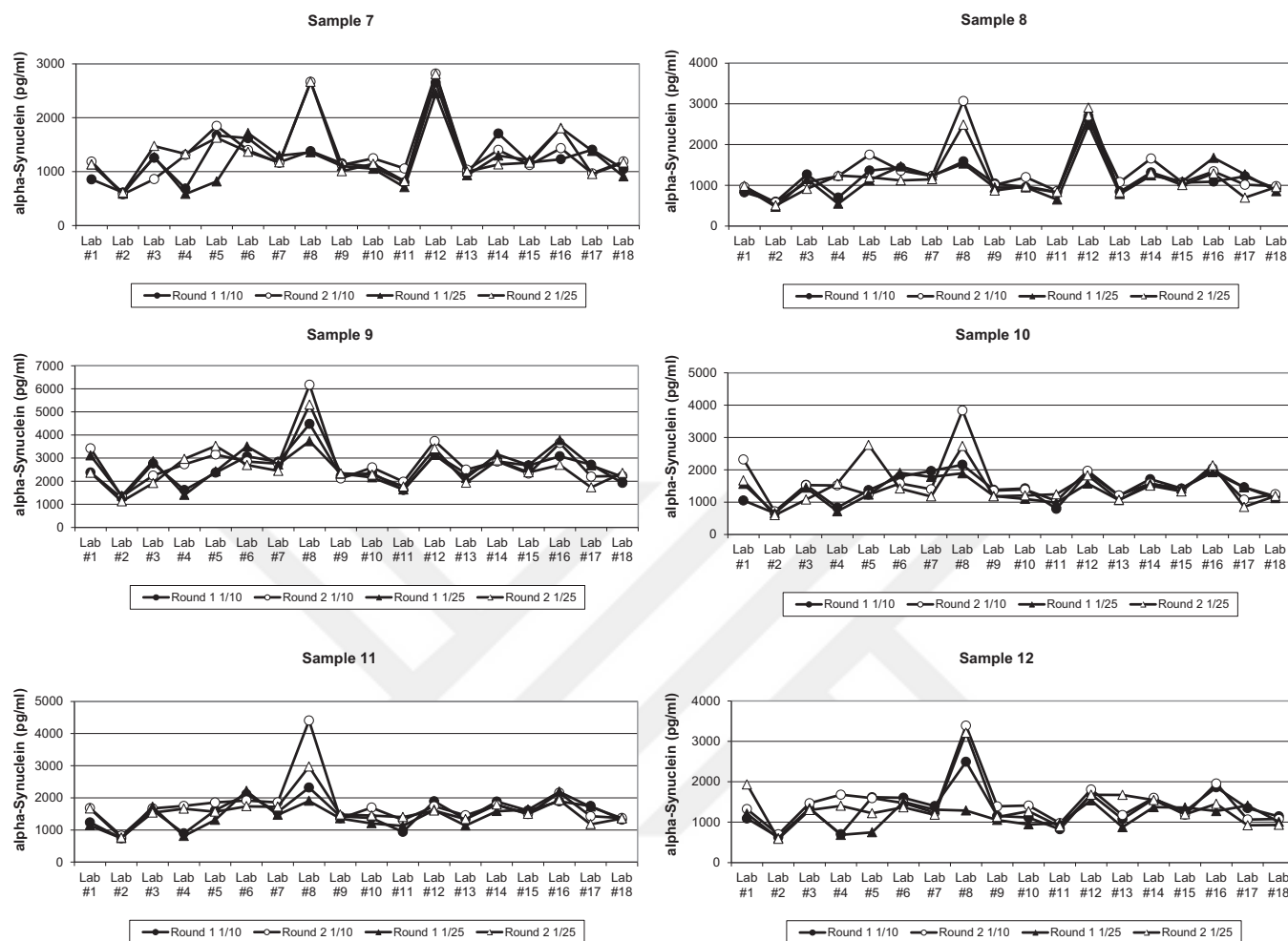


Fig. 3. (Continued)

Intra-assay and interassay variability were found to be very low. Within-laboratory precision, as determined from quantification of individual CSF samples in independent runs, was very high and matched accepted criteria (DeSilva et al., 2003; Lee et al., 2006). At

1:10 dilutions, 50% of the laboratories obtained comparable results for all 12 CSF samples. In only four laboratories >3 samples were quantified with CVs >20%. At higher dilutions (1:25) this number slightly increased. We therefore conclude that, at the current state

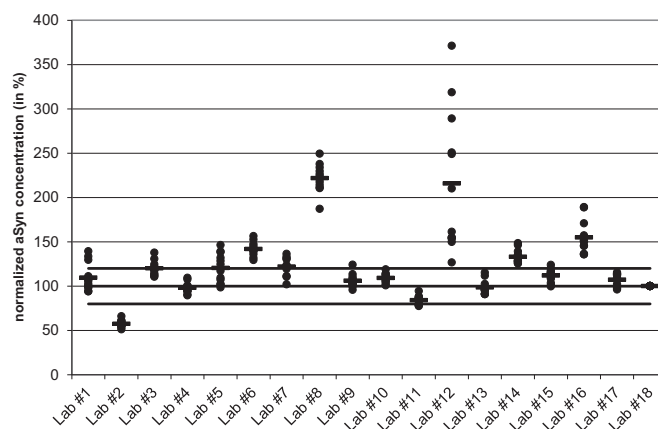


Fig. 4. Quantification of alpha-synuclein concentration is comparable across laboratories. Quantification results for individual CSF samples were normalized to those in laboratory #18. Eight of 17 laboratories obtained results in the range of 80%–120% of those from laboratory #18. Three laboratories obtained strongly diverging results. 80%, 100%, and 120% lines are shown for comparability. Abbreviation: aSyn, alpha-synuclein.

of assay validation users should adhere to 1:10 dilution to measure CSF aSyn. Although only very limited data were obtained regarding dilution linearity (due to space limitations), we found that comparable results were obtained at 1:10 and 1:25 dilutions in nine laboratories. Thirteen of 18 laboratories measured ≤ 3 CSF samples with CVs $>20\%$ in aSyn concentration.

We found that in some laboratories standard curves varied considerably. Increased signal readings in one experiment were not necessarily reflected with CSF samples, that is, while signal readings for standards increased, those for CSF samples decreased. This was not to be expected and was the cause of inconsistent results with large CVs.

We are aware that this study is only an initial validation study. All assays were performed with one single lot of the ELISA on CSF samples prepared under highly standardized conditions. These factors exclude differences in the manufacturing process as a source of variability of results. Preanalytical differences were also excluded to a very large degree as all samples were provided centrally. Therefore, analytical differences, including interoperator variability, analytical instrumentation, and ELISA kit variability, are most likely responsible for the variations observed in this study. Furthermore, more detailed studies are required to address more preanalytical and analytical factors that might have an impact on quantification results. These include, but are not limited to, different procedures in lumbar puncture, influence of centrifugation and other procedures before storage of CSF samples, time delay before freezing, different storage conditions, methods of thawing CSF, number of freeze-thaw cycles, and most importantly artificial blood contamination, which impacts the aSyn concentration in CSF tremendously. In addition, multiple lots of the ELISA assay should be tested. The use of certified reference materials (standard reference materials) will aid in the comparison of data raised within and between studies. An initiative was started at the Sahlgrenska University Hospital in Mölndal, Sweden, to address this issue (Mattsson et al., 2011). A full validation study may lead to similar analytical refinements as has been achieved after a systematic validation of a commercially and widely used ELISA assay for quantification of A β 42 (Cullen et al., 2012). Moreover, because ELISA assays are susceptible to variation in assay performance, training of laboratory technicians by experienced assay performers could minimize the interlaboratory variances. It is to be expected that variations in quantification will decrease when laboratories gain more experience using the aSyn ELISA as has been shown in another study (Mattsson et al., 2011).

Overall, our round robin trial showed that even when other factors (such as preanalytical sample handling, lot-to-lot variability) were minimized by the design of our study, we identified high variation in absolute values of CSF aSyn when the same samples and same lots of assays are applied. This calls for standardization efforts ranging from optimization of the assay, for example, ready-to-use calibrators and standardized operating procedures both for preanalytical and analytical procedures. This will enable laboratories to develop routines to control for longitudinal stability of their results. Determination of own reference limits and comparison against laboratories who have published similar data will increase the confidence of the results.

Disclosure statement

MM Verbeek was an advisory board member for Roche. B Mollenhauer has received independent research grants from TEVA-Pharma, Desitin, Boehringer Ingelheim, GE Healthcare and honoraria for consultancy from Bayer Schering Pharma AG, Roche, AbbVie, TEVA-Pharma, Biogen and for presentations from GlaxoSmithKline, Orion Pharma, TEVA-Pharma and travel costs from

TEVA-Pharma. BM is member of the executive steering committee of the Parkinson Progression Marker Initiative of the Michael J. Fox Foundation for Parkinson's Research and has received grants from the BMBF, EU, Deutsche Parkinson Vereinigung, Michael J. Fox Foundation for Parkinson's Research, Stifterverband für die deutsche Wissenschaft, and has scientific collaborations with Roche, Bristol Myers Squibb, Ely Lilly, Covance and Biogen. BM is listed as co-inventors in a patent application to the US Patent Office related to the quantification of α -synuclein in biological fluids for the purpose of improved diagnosis.

The other authors have no conflicts of interest to disclose.

Acknowledgements

This is an EU Joint Program – Neurodegenerative Disease Research (JPND) project. The project is supported through the following funding organizations under the aegis of JPND—www.jpnd.eu: The Alzheimer Research Foundation (SAO-FRA), Belgium (grant number S#12018); Danish Council for Strategic Research, Denmark (grant number 0603-00511B); Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF), Germany (grant number OIED1203C); General Secretary of Research and Technology, Greece; Italian Ministry of Health (Ricerca Corrente), Italy; The Fundação para a Ciência e a Tecnologia, Portugal (grant numbers JPND/0004/2011, IMM/BPD/51-2013, IMM/BI/7-2013, JPND/0005/2011); Fondo de Investigaciones Sanitarias, Instituto de Salud Carlos III, Spain (grant numbers PI11/03026, PI11/03035; cofinanced by the Fondo Europeo de Desarrollo Regional); The Ministry of Education, Research and Sport of the Slovak Republic, Slovakia; The Slovenian Research Agency, Slovenia (grant number A3-0001); The Swedish Research Council, Sweden; Ministry of Education for Netherlands: ZonMw (The Netherlands Organisation for Health Research and Development), The Netherlands (grant number 629000002); The Scientific and Technological Research Council of Turkey (grant number 112S335).

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, <http://dx.doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2015.05.003>.

References

- Aerts, M.B., Esselink, R.A., Abdo, W.F., Bloem, B.R., Verbeek, M.M., 2012. CSF alpha-synuclein does not differentiate between parkinsonian disorders. *Neurobiol. Aging* 33, 430.
- Cullen, V.C., Fredenburg, R.A., Evans, C., Conliffe, P.R., Solomon, M.E., 2012. Development and advanced validation of an optimized method for the quantitation of A β 42 in human cerebrospinal fluid. *AAPS J.* 14, 510.
- Del Campo, M., Mollenhauer, B., Bertolotto, A., Engelborghs, S., Hampel, H., Simonsen, A.H., Kapaki, E., Kruse, N., Le Bastard, N., Lehmann, S., Molinuevo, J.L., Parnetti, L., Perret-Liaudet, A., Saez-Valero, J., Saka, E., Urbani, A., Vanmechelen, E., Verbeek, M., Visser, P.J., Teunissen, C., 2012. Recommendations to standardize preanalytical confounding factors in Alzheimer's and Parkinson's disease cerebrospinal fluid biomarkers: an update. *Biomark. Med.* 6, 419.
- DeSilva, B., Smith, W., Weiner, R., Kelley, M., Smolec, J., Lee, B., Khan, M., Tacey, R., Hill, H., Celniker, A., 2003. Recommendations for the bioanalytical method validation of ligand-binding assays to support pharmacokinetic assessments of macromolecules. *Pharm. Res.* 20, 1885.
- Hall, S., Ohrfelt, A., Constantinescu, R., Andreasson, U., Surova, Y., Bostrom, F., Nilsson, C., Widner, H., Decraemer, H., Nagga, K., Minthon, L., Londos, E., Vanmechelen, E., Holmberg, B., Zetterberg, H., Blennow, K., Hansson, O., 2012. Accuracy of a panel of 5 cerebrospinal fluid biomarkers in the differential diagnosis of patients with dementia and/or parkinsonian disorders. *Arch. Neurol.* 69, 1445.
- Hong, Z., Shi, M., Chung, K.A., Quinn, J.F., Peskind, E.R., Galasko, D., Jankovic, J., Zabetian, C.P., Leverenz, J.B., Baird, G., Montine, T.J., Hancock, A.M., Hwang, H., Pan, C., Bradner, J., Kang, U.J., Jensen, P.H., Zhang, J., 2010. DJ-1 and alpha-synuclein in human cerebrospinal fluid as biomarkers of Parkinson's disease. *Brain* 133, 713.

- Kasuga, K., Tokutake, T., Ishikawa, A., Uchiyama, T., Tokuda, T., Onodera, O., Nishizawa, M., Ikeuchi, T., 2010. Differential levels of alpha-synuclein, beta-amyloid42 and tau in CSF between patients with dementia with Lewy bodies and Alzheimer's disease. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 81, 608.
- Koel-Simmelink, M.J., Vennegoor, A., Killestein, J., Blankenstein, M.A., Norgren, N., Korth, C., Teunissen, C.E., 2014. The impact of pre-analytical variables on the stability of neurofilament proteins in CSF, determined by a novel validated SinglePlex Luminex assay and ELISA. *J. Immunol. Methods* 402, 43.
- Lee, J.W., Devanarayan, V., Barrett, Y.C., Weiner, R., Allinson, J., Fountain, S., Keller, S., Weinryb, I., Green, M., Duan, L., Rogers, J.A., Millham, R., O'Brien, P.J., Sailstad, J., Khan, M., Ray, C., Wagner, J.A., 2006. Fit-for-purpose method development and validation for successful biomarker measurement. *Pharm. Res.* 23, 312.
- Lee, H.J., Bae, E.J., Jang, A., Ho, D.H., Cho, E.D., Suk, J.E., Yun, Y.M., Lee, S.J., 2011. Enzyme-linked immunosorbent assays for alpha-synuclein with species and multimeric state specificities. *J. Neurosci. Methods* 199, 249.
- Mattsson, N., Andreasson, U., Persson, S., Arai, H., Batish, S.D., Bernardini, S., Bernardini, S., Bocchio-Chiavetto, L., Blankenstein, M.A., Carrillo, M.C., Chabbot, S., Coart, E., Chiasserini, D., Cutler, N., Dahlfors, G., Duller, S., Fagan, A.M., Forlenza, O., Frisoni, G.B., Galasko, D., Galimberti, D., Hampel, H., Handberg, A., Heneka, M.T., Herskovits, A.Z., Herukka, S.K., Holtzman, D.M., Humpel, C., Hyman, B.T., Iqbal, K., Jucker, M., Kaeser, S.A., Kaiser, E., Kapaki, E., Kidd, D., Klivenyi, P., Knudsen, C.S., Kummer, M.P., Lui, J., Llado, A., Lewczuk, P., Li, Q.X., Martins, R., Masters, C., McAuliffe, J., Mercken, M., Moghekar, A., Molinuevo, J.L., Montine, T.J., Nowatzke, W., O'Brien, R., Otto, M., Paraskevas, G.P., Parnetti, L., Petersen, R.C., Prvulovic, D., de Reus, H.P., Rissman, R.A., Scarpini, E., Stefani, A., Soininen, H., Schroder, J., Shaw, L.M., Skinningsrud, A., Skrogstad, B., Spreer, A., Talib, L., Teunissen, C., Trojanowski, J.Q., Tumani, H., Umek, R.M., Van Broeck, B., Vanderstichele, H., Vecsei, L., Verbeek, M.M., Windisch, M., Zhang, J., Zetterberg, H., Blennow, K., 2011. The Alzheimer's Association external quality control program for cerebrospinal fluid biomarkers. *Alzheimers Dement.* 7, 386.
- Mollenhauer, B., Cullen, V., Kahn, I., Krastins, B., Outeiro, T.F., Pepivani, I., Ng, J., Schulz-Schaeffer, W., Kretschmar, H.A., McLean, P.J., Trenkwalder, C., Sarracino, D.A., Vonsattel, J.P., Locascio, J.J., El-Agnaf, O.M., Schlossmacher, M.G., 2008. Direct quantification of CSF alpha-synuclein by ELISA and first cross-sectional study in patients with neurodegeneration. *Exp. Neurol.* 213, 315.
- Mollenhauer, B., Schlossmacher, M., 2008. Purification and quantification of neuronal alpha-synuclein: relevance for pathogenesis and biomarker development. In: Nass, R., Przedborski, S. (Eds.), *Parkinson's Disease: Molecular and Therapeutic Insights from Model Systems*, p. 559. Academic Press, New York, NY, USA.
- Mollenhauer, B., El-Agnaf, O.M., Marcus, K., Trenkwalder, C., Schlossmacher, M.G., 2010. Quantification of alpha-synuclein in cerebrospinal fluid as a biomarker candidate: review of the literature and considerations for future studies. *Biomark. Med.* 4, 683.
- Mollenhauer, B., Locascio, J.J., Schulz-Schaeffer, W., Sixel-Döring, F., Trenkwalder, C., Schlossmacher, M.G., 2011. α -Synuclein and tau concentrations in cerebrospinal fluid of patients presenting with parkinsonism: a cohort study. *Lancet Neurol.* 10, 230.
- Mollenhauer, B., Trautmann, E., Taylor, P., Manninger, P., Sixel-Döring, F., Ebentheuer, J., Trenkwalder, C., Schlossmacher, M.G., 2013. Total CSF alpha-synuclein is lower in de novo Parkinson patients than in healthy subjects. *Neurosci. Lett.* 532, 44.
- Noguchi-Shinohara, M., Tokuda, T., Yoshita, M., Kasai, T., Ono, K., Nakagawa, M., El-Agnaf, O.M., Yamada, M., 2009. CSF alpha-synuclein levels in dementia with Lewy bodies and Alzheimer's disease. *Brain Res.* 1251, 1.
- Ohrfelt, A., Grognet, P., Andreasen, N., Wallin, A., Vanmechelen, E., Blennow, K., Zetterberg, H., 2009. Cerebrospinal fluid alpha-synuclein in neurodegenerative disorders—a marker of synapse loss? *Neurosci. Lett.* 450, 332.
- Park, M.J., Cheon, S.M., Bae, H.R., Kim, S.H., Kim, J.W., 2011. Elevated levels of alpha-synuclein oligomer in the cerebrospinal fluid of drug-naïve patients with Parkinson's disease. *J. Clin. Neurol.* 7, 215.
- Parnetti, L., Chiasserini, D., Bellomo, G., Giannandrea, D., De Carlo, C., Qureshi, M.M., Ardah, M.T., Varghese, S., Bonanni, L., Borroni, B., Tambasco, N., Eusebi, P., Rossi, A., Onofri, M., Padovani, A., Calabresi, P., El-Agnaf, O., 2011. Cerebrospinal fluid Tau/ α -synuclein ratio in Parkinson's disease and degenerative dementias. *Mov. Disord.* 26, 1428.
- Reesink, F.E., Lemstra, A.W., van Dijk, K.D., Berendse, H.W., van de Berg, W.D., Klein, M., Blankenstein, M.A., Scheltens, P., Verbeek, M.M., van der Flier, W.M., 2010. CSF alpha-synuclein does not discriminate dementia with Lewy bodies from Alzheimer's disease. *J. Alzheimers Dis.* 22, 87.
- Spies, P.E., Melis, R.J., Sjogren, M.J., Rikkert, M.G., Verbeek, M.M., 2009. Cerebrospinal fluid alpha-synuclein does not discriminate between dementia disorders. *J. Alzheimers Dis.* 16, 363.
- Tateno, F., Sakakibara, R., Kawai, T., Kishi, M., Murano, T., 2012. Alpha-synuclein in the cerebrospinal fluid differentiates synucleinopathies (Parkinson Disease, dementia with Lewy bodies, multiple system atrophy) from Alzheimer disease. *Alzheimer Dis. Assoc. Disord.* 26, 213.
- Tokuda, T., Salem, S.A., Allsop, D., Mizuno, T., Nakagawa, M., Qureshi, M.M., Locascio, J.J., Schlossmacher, M.G., El-Agnaf, O.M., 2006. Decreased alpha-synuclein in cerebrospinal fluid of aged individuals and subjects with Parkinson's disease. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 349, 162.
- Tokuda, T., Qureshi, M.M., Ardah, M.T., Varghese, S., Shehab, S.A., Kasai, T., Ishigami, N., Tamaoka, A., Nakagawa, M., El-Agnaf, O.M., 2010. Detection of elevated levels of (alpha)-synuclein oligomers in CSF from patients with Parkinson disease. *Neurology* 75, 1766.
- Wang, H., Wang, K., Xu, W., Wang, C., Qiu, W., Zhong, X., Dai, Y., Wu, A., Hu, X., 2012. Cerebrospinal fluid α -synuclein levels are elevated in multiple sclerosis and neuromyelitis optica patients during relapse. *J. Neurochem.* 122, 19.
- Wennstrom, M., Surova, Y., Hall, S., Nilsson, C., Minthon, L., Boström, F., Hansson, O., Nielsen, H.M., 2013. Low CSF levels of both α -synuclein and the α -synuclein cleaving enzyme neurosin in patients with synucleinopathy. *PLoS One* 8, e53250.

Improved Cerebrospinal Fluid-Based Discrimination between Alzheimer's Disease Patients and Controls after Correction for Ventricular Volumes

Linda J.C. van Waalwijk van Doorn^{a,b,1}, Juan D. Gispert^{c,d,e,1}, H. Bea Kuiperij^{a,b}, Jurgen A.H.R. Claassen^f, Andrea Arighi^g, Inês Baldeiras^h, Kaj Blennow^{i,j}, Marco Bozzali^k, Miguel Castelo-Branco^l, Enrica Cavedo^{m,n}, Derya D. Emek-Savaş^o, Erden Eren^p, Paolo Eusebi^q, Lucia Farotti^q, Chiara Fenoglio^g, Juan Fortea Ormaechea^r, Yvonne Freund-Levi^{s,t}, Giovanni B. Frisoni^{m,u}, Daniela Galimberti^g, Sermin Genc^p, Viviana Greco^v, Harald Hampel^w, Sanna-Kaisa Herukka^x, Yawu Liu^x, Albert Lladó^y, Alberto Lleó^r, Flavio M. Nobili^z, Kader K. Oguz^{aa}, Lucilla Parnetti^q, João Pereira^l, Agnese Picco^z, Maria Pikkarainen^x, Catarina Resende de Oliveira^h, Esen Saka^{aa}, Nicola Salvadori^q, Raquel Sanchez-Valle^y, Isabel Santana^h, Elio Scarpini^g, Philip Scheltens^{ab,ac}, Hilkka Soininen^x, Roberto Tarducci^q, Charlotte Teunissen^{ad}, Magda Tsolaki^{ae}, Andrea Urbani^{v,af}, Eduard Vilaplana Martinez^r, Pieter Jelle Visser^{ab,ac,ag}, Asa K. Wallin^{ah}, Görsev Yener^{ai}, José L. Molinuevo^{c,aj}, Olga Meulenbroek^f and Marcel M. Verbeek^{a,b,*}

^aDepartment of Neurology, Donders Institute for Brain, Cognition and Behaviour, Radboud Alzheimer Centre, Radboud University Medical Center, Nijmegen, The Netherlands

^bDepartment of Laboratory Medicine, Donders Institute for Brain, Cognition and Behaviour, Radboud Alzheimer Centre, Radboud University Medical Center, Nijmegen, The Netherlands

^cBarcelona Beta Brain Research Centre, Pasqual Maragall Foundation, Barcelona, Spain

^dCentro de Investigación Biomédica en Red de Bioingeniería, Biomateriales y Nanomedicina (CIBER-BBN), Zaragoza, Spain

^ePompeu Fabra University, Barcelona, Spain

^fDepartment of Geriatrics, Donders Institute for Brain, Cognition and Behaviour, Radboud Alzheimer Centre, Radboud University Medical Center, Nijmegen, The Netherlands

^gUniversity of Milan, Fondazione Ca' Granda, IRCCS Ospedale Policlinico, Milan, Italy

^hCenter for Neuroscience and Cell Biology (CNC.IBILI), Faculty of Medicine, Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra, Coimbra, Portugal

ⁱDepartment of Psychiatry and Neurochemistry, Institute of Neuroscience and Physiology, the Sahlgrenska Academy at the University of Gothenburg, Mölndal, Sweden

^jClinical Neurochemistry Laboratory, Sahlgrenska University Hospital, Mölndal, Sweden

^kNeuroimaging Laboratory, IRCCS Santa Lucia Foundation, Rome, Italy

^lInstitute for Biomedical Imaging and Life Sciences (CNC.IBILI) and ICNAS (Institute for Nuclear Sciences Applied to Health), University of Coimbra, Portugal

¹These authors contributed equally to this work.

*Correspondence to: Dr. Marcel M. Verbeek, TML, r.830, Department of Neurology, Radboud University Medical Center, P.O. Box 9101, 6500 HB Nijmegen, The Netherlands.

Tel.: +31 243614567; Fax: +31 2436 68754; E-mail: Marcel.verbeek@radboudumc.nl.

^mLaboratory of Epidemiology, Neuroimaging and Telemedicine, IRCCS San Giovanni di Dio Fatebenefratelli, Brescia, Italy

ⁿAXA Research Fund & UPMC Chair, Sorbonne Universities, Pierre et Marie Curie University, Paris 06, Institute of Memory and Alzheimer's Disease (IM2A) & Brain and Spine Institute (ICM) UMR S 1127, Department of Neurology, Hôpital Pitié-Salpêtrière, Paris, France

^oDepartment of Psychology, The Faculty of Arts, Department of Neurosciences, The Health Sciences Institute, Dokuz Eylül University, Izmir, Turkey

^pDepartment of Neurosciences, Izmir Biomedicine and Genome Institute, The Health Sciences Institute, Dokuz Eylül University, Izmir, Turkey

^qSection of Neurology, Center for Memory Disturbances, University of Perugia, Perugia, Italy

^rNeurology Department, Hospital de Sant Pau, Barcelona, Spain

^sDepartment of Neurobiology, Caring Sciences and Society (NVS), Division of Clinical Geriatrics, Karolinska Institutet, Stockholm, Sweden

^tDepartment of Geriatric Medicine, Karolinska University Hospital Huddinge, Stockholm, Sweden

^uUniversity Hospitals and University of Geneva, Geneva, Switzerland

^vProteomics and Metabolomics Unit, IRCCS-Fondazione Santa Lucia, Rome, Italy

^wCentre des Maladies Cognitives et Comportementales, Institut du Cerveau et de la Moelle épinière, Paris, France and Université Pierre et Marie Curie-Paris 6, AP-HP, Hôpital de la Salpêtrière, Paris, France

^xDepartment of Neurology, University of Eastern Finland and Kuopio University Hospital, Kuopio, Finland

^yAlzheimer's disease and Other Cognitive Disorders Unit, Neurology Service, Hospital Clínic, IDIBAPS, Barcelona, Spain

^zDepartment of Neuroscience (DINOEMI), Clinical Neurology, University of Genoa and IRCCS AOU San Martino-IST, Genoa, Italy

^{aa}Department of Neurology, Faculty of Medicine, Hacettepe University, Sıhhiye, Ankara, Turkey

^{ab}Alzheimer center, Neuroscience Campus Amsterdam, VU University Medical Center, Amsterdam, The Netherlands

^{ac}Department of Neurology, Neuroscience Campus Amsterdam, VU University Medical Center, Amsterdam, The Netherlands

^{ad}Department of Clinical Chemistry, Neuroscience Campus Amsterdam, VU University Medical Center, Amsterdam, The Netherlands

^{ae}Aristotle University of Thessaloniki, Memory and Dementia Center, 3rd Department of Neurology, "G Papanicolaou" General Hospital, Thessaloniki, Greece

^{af}Istituto di Biochimica e Biochimica Clinica, Università Cattolica, Roma, Italy

^{ag}Department of Psychiatry and Neuropsychology, Maastricht University, School for Mental Health and Neuroscience, Alzheimer Center Limburg, Maastricht, The Netherlands

^{ah}Department of Clinical Sciences Malmö, Clinical Memory Research Unit, Lund University, Malmö, Sweden

^{ai}Department of Neurology, Medical School Izmir, Biomedicine and Genome Institute, Brain Dynamics Multidisciplinary Research Center, Dokuz Eylül University, Izmir, Turkey

^{aj}Alzheimer's disease and Other Cognitive Disorders Unit, Neurology Service, Hospital Clínic, IDIBAPS, Barcelona, Spain

Handling Associate Editor: Fabrizio Piazza

Accepted 2 November 2016

Abstract. Cerebrospinal fluid (CSF) biomarkers may support the diagnosis of Alzheimer's disease (AD). We studied if the diagnostic power of AD CSF biomarker concentrations, i.e., $A\beta_{42}$, total tau (t-tau), and phosphorylated tau (p-tau), is affected by differences in lateral ventricular volume (VV), using CSF biomarker data and magnetic resonance imaging (MRI) scans of 730 subjects, from 13 European Memory Clinics. We developed a Matlab-algorithm for standardized automated segmentation analysis of T1 weighted MRI scans in SPM8 for determining VV, and computed its ratio with total intracranial volume (TIV) as proxy for total CSF volume. The diagnostic power of CSF biomarkers (and their combination), either corrected for VV/TIV ratio or not, was determined by ROC analysis. CSF $A\beta_{42}$ levels inversely correlated to VV/TIV in the whole study population ($A\beta_{42}$: $r = -0.28$; $p < 0.0001$). For CSF t-tau and p-tau, this association only reached statistical significance in the combined MCI and AD group (t-tau: $r = -0.15$; p-tau: $r = -0.13$; both $p < 0.01$). Correction for differences in VV/TIV improved the differentiation of AD versus controls based on CSF $A\beta_{42}$ alone (AUC: 0.75 versus 0.81) or in combination with t-tau (AUC: 0.81 versus 0.91). In conclusion, differences in VV may be an important confounder in interpreting CSF $A\beta_{42}$ levels.

Keywords: Alzheimer's disease, amyloid biomarkers, cerebrospinal fluid, lateral ventricles, tau protein

INTRODUCTION

Alzheimer's disease (AD) is a progressive and irreversible neurodegenerative disease. The neuropathological features of AD comprise the extracellular accumulation of amyloid- β (A β) in plaques and in the cerebrovasculature and intracellular neurofibrillary tangles containing hyperphosphorylated tau protein [1].

The diagnosis of AD is based on clinical criteria, comprising medical history, physical and neurological exams, and neuropsychological testing. However, the diagnostic accuracy of these criteria is relatively low (sensitivity: 71–88%; specificity: 44–71%) [2]. Additional tools that may help to support or refute the diagnosis of AD include amyloid positron emission tomography (amyloid PET), fluorodeoxyglucose PET (FDG PET), structural brain magnetic resonance imaging (MRI), and cerebrospinal fluid (CSF) protein analysis [3–5]. Amyloid PET imaging techniques can trace *in vivo* fibrillar A β accumulation in the brain by abnormal tracer retention [6]. With FDG PET, information will be obtained on the degree of neuronal degeneration or synaptic injury by visualizing reduction of glucose metabolism in cortical neurons and glial cells in AD patients [7, 8]. Structural MRI allows accurate measurement of the three-dimensional volume of brain structures. More specifically, structural MRI has revealed a specific pattern of atrophy in AD in the medial, basal, and lateral temporal lobe, and medial and lateral parietal cortices [9, 10]. Regarding CSF protein analysis, the combination of decreased concentrations of A β_{42} and increased concentrations of both total and hyperphosphorylated tau proteins in the CSF is compatible with AD pathology [11] and may predict the progression to AD dementia in patients with mild cognitive impairment (MCI) [12, 13]. Moreover, recent studies have shown that abnormal levels of A β_{42} can be detected already in cognitively normal individuals, 10 to 20 years before clinical symptoms occur [14].

CSF biomarkers have recently been included in diagnostic criteria for AD and may improve the accuracy of AD diagnosis to >85% [4, 15]. However, it is also well known that CSF biomarkers are influenced by several confounding factors. These confounders may include pre-analytical handling of the CSF and laboratory-specific procedures for the CSF analysis and may cause inter-laboratory variation in results and interpretation [16, 17]. Furthermore, an unstudied potential confounder in the interpretation of CSF

results is the CSF volume. In aging and in AD, CSF production is known to be impaired, probably affecting the clearance of A β and tau and may also impact the total ventricular volume (VV) [18]. This might potentially result in an altered concentration of these proteins in the CSF. On the one hand, at a given production rate of A β or tau proteins, an increase in the CSF volume may lead to decreased CSF concentrations of these biomarkers. On the other hand, an increased VV is also related to increased tissue atrophy in AD. Even though changes in CSF dynamics across the AD continuum are still not completely understood, the interplay among brain atrophy, CSF production rates, and CSF protein concentrations, all known to be altered in AD [18], may contribute to dynamic changes in core AD CSF biomarker concentrations. The VV can be quantified on MRI, and used as a proxy for the total CSF volume in the brain [19, 20], which allows to study the effects of CSF volume on biomarker concentrations.

In this observational study, we investigated (1) whether there is an association between core AD CSF biomarkers and CSF volume and (2) whether correcting for this association might impact the diagnostic capacity of the CSF biomarkers. Our hypothesis is that correcting for the effect of VV may optimize clinical application of CSF biomarkers. We studied if the diagnostic power of AD CSF biomarker concentrations, i.e., A β_{42} , t-tau, and p-tau, can be improved by correction for VV as a proxy for total CSF volume, in a multi-center setting.

MATERIALS AND METHODS

Subjects

T1 weighted MRI scans and AD CSF biomarker data of 800 subjects were acquired from 13 research centers within the Biomarkers for Alzheimer's and Parkinson's Disease (BIOMARKAPD) project, a consortium of the European initiative Joint Program for Neurodegenerative Diseases (JPND). The study was approved by the local ethics committee or the institutional review board of each center. The participants or their legal representatives gave written informed consent.

All subjects underwent clinical and neurological assessment, lumbar puncture, MRI scanning, and CSF analysis at their local laboratory. The diagnostic criteria used in the different groups are presented in Supplementary Table 1; the locally applied cut-off

values for the use of the CSF biomarkers are shown in Supplementary Table 2. The patient groups comprised: 180 neurological controls, including healthy controls and subjective memory complainers, 336 MCI patients, 185 AD patients, 61 frontotemporal dementia (FTD) patients, and 38 patients with other dementias (e.g., vascular dementia, dementia with Lewy bodies, dementia not otherwise specified, corticobasal ganglionic degeneration, progressive supranuclear palsy).

The data of the subjects fulfilled the following requirements: the time between the lumbar puncture and the T1 weighted MRI scan was less than 6 months, and the T1 weighted MRI scans had a maximum voxel size of $2\text{ mm} \times 2\text{ mm} \times 2\text{ mm}$. Additionally, information about the height, age, gender, diagnosis according to internationally accepted criteria (AD: [4, 21–24], MCI: [5, 25, 26], FTD: [27, 28]), scanner type, and magnetic field strength, were recorded and analyzed as covariates. In Supplementary Tables 3 and 4, information on the MRI scanner type, acquisition parameters, and whether a center used a specific protocol or not, can be found.

Segmentation algorithm for ventricular volume

Existing atlas-based algorithms were tried to segment the CSF volume in the brain, but did not provide robust segmentations in extremely enlarged ventricles [29]. To overcome this limitation, we developed a ventricle segmentation algorithm to be applied on a CSF segmentation of the MRI scans. The target ventricular region of interest (ROI) consisted of the lateral and third ventricles. The algorithm is based on a mixed region growing and atlas based approach and implemented in MATLAB using the tissue segmentation tool in the VBM8 toolbox of SPM8 (<http://dbm.neuro.uni-jena.de/vbm8/>). Briefly, the MRI scans were spatially normalized to the Montreal Neurological Institute (MNI) atlas using the DARTEL algorithm implemented in SPM8. In the normalized CSF *a priori* image, ‘seed points’ were placed in the lateral and third ventricles and the main anatomical boundaries of the ventricles were manually delineated. Then, the seed points and the boundaries in the normalized space were brought to the individual space by applying the inverse spatial normalization field. In the CSF segmented image, the ventricular ROI, was created by adding CSF-classified voxels adjacent to the seed points and this process was iterated by adding more CSF contiguous voxels to the

ventricular ROI. This iterative process stops when no more voxels can be added to the ROI, either because contiguous voxels are not classified as CSF or because they were beyond the specified morphological boundaries. All the ventricular masks underwent visual quality control by an experienced reader. The ventricular segmentation algorithm is available at <https://github.com/jdgispert/Ventricular-segmentation> under a GNU license.

The algorithm was validated using publicly available datasets (<https://sites.google.com/site/mrilateralventricle/>) and following the methodology described in [29]. Accuracy of the lateral ventricle segmentation was determined for healthy young adults and AD patients. Test-retest reproducibility was estimated with repeated acquisitions in the same scanner, as well as for different scanners and pulse sequences. Accuracy and reproducibility were quantified using the intraclass correlation coefficient (ICC) measure (single measure, 2-way mixed model, consistency). For accuracy results, the ICC quantifies how well the automated segmentations agree with respect to the gold standard measures (average of two manual segmentations by the same rater). For reproducibility, the ICC value quantifies the consistency of the segmentations. For further details on the validation methodology and characteristics of the test datasets, please see [29].

Total intracranial volume

The total intracranial volume (TIV) was determined by tissue segmentation, to correct the ventricular volume measurements. Voxels in MRI images were assigned to white matter, grey matter, or CSF in the brain using the algorithm included in the SPM8 suite. In the spatial normalization processes, the individual image was deformed to a template, in this case the MNI atlas. The template resembles a normal image with information about whether a voxel is more likely to represent a particular tissue depending on its position in the brain. The information of tissue types acquired is then applied to subject’s space by quantifying the probabilities based on location in the subject’s image rather than the template and thus the deformation is undone. The segmentation combines the latter information as well as the voxel intensity one in a Bayesian framework to define the tissue type. This process is repeated for all images and collected for each subject in our study population.

AD CSF biomarkers

The ELISA's from Fujirebio (Gent, Belgium) were used according to the manufacturers' protocol for the determination of $A\beta_{42}$ (INNOTEST[®] β -AMYLOID (1–42)), t-tau (INNOTEST[®] hTAU Ag), p-tau (INNOTEST[®] PHOSPHO-TAU (181P)) at each site separately. In all participating laboratories, the CSF samples were collected in polypropylene tubes. The CSF samples were directly transported to the laboratory, centrifuged, and measured or stored at -80°C until use.

AD-CSF-indices [30, 31] were calculated applying the following formulas:

$$AD - CSF - Index(t - tau) = \frac{A\beta_{\max} - A\beta_{42}}{A\beta_{\max} - A\beta_{\min}} + \frac{ttau - ttau_{\min}}{ttau_{\max} - ttau_{\min}} \quad (1)$$

$$AD - CSF - Index(p - tau) = \frac{A\beta_{\max} - A\beta_{42}}{A\beta_{\max} - A\beta_{\min}} + \frac{ptau - ptau_{\min}}{ptau_{\max} - ptau_{\min}} \quad (2)$$

where $A\beta_{\max}$, $ttau_{\max}$, and $ptau_{\max}$ represent the 95th percentile of the respective values; $A\beta_{\min}$, $ttau_{\min}$, and $ptau_{\min}$ represent the 5th percentile of the distribution values; and $A\beta_{42}$, $ttau$, and $ptau$ represent the biomarker values for every individual. Derivation of 'minimum' and 'maximum' values of the biomarkers was based on the 5th and 95th percentiles of their respective distributions after pooling the different sample data (inter-site).

MTA scoring

Medial temporal lobe atrophy (MTA) scoring was used as measure for hippocampal atrophy and was used in a subset of patients to study the correlation between hippocampal atrophy (as a proxy for disease progression) and VV/TIV. In 34 AD patients and 13 controls from the Radboud University Medical Center the MTA was scored visually on the coronal T1 weighted images throughout the hippocampus at the level of the anterior pons. This score ranged from 0 (no atrophy) to 4 (severe atrophy) and assessed the width of the choroid fissure, width of the temporal horn of the lateral ventricle and the height of the hippocampus [32].

Data and statistical analysis

Statistical analyses were performed using IBM SPSS Statistics 22 (Armonk, NY, USA) and Graph-

pad Prism 5.03 (La Jolla, CA, USA). Significant differences between AD patients and control subjects were tested using a non-parametric Mann-Whitney test, because the data was not normally distributed according to the D'Agostino and Pearson omnibus normality test. The Chi-square test was used to check gender differences between the diagnostic groups. Significant differences between the CSF biomarkers in the diagnostic groups were estimated by non-parametric Kruskal-Wallis test. Bivariate correlations were determined using Spearman correlation coefficient. Models were constructed using forward (conditional) logistic regression analysis.

The diagnostic power of CSF biomarkers (or combinations) was determined by receiver operating characteristic (ROC) analyses. The area under the curve (AUC) in the ROC analyses was determined and the sensitivity at 85% specificity along with the positive likelihood ratio ($LR+ = \text{sensitivity}/(1-\text{specificity})$) were compared between different CSF biomarkers and combinations in models. MedCalc version 16.2.1 (Mariakerke, Belgium) was used to check whether the ROC curves were significantly different.

RESULTS

Validation of ventricular volume segmentation algorithm

The ventricular segmentation algorithm successfully segmented all images in the accuracy and reproducibility datasets. Regarding accuracy, the algorithm achieved an ICC of 0.9895 for healthy young adults and 0.9893 for AD patients. The ICC for the test-retest reproducibility was of 0.9995 for the between-scanner and 0.9990 for the pulse sequence reproducibility. Average time to process each scan was 10 min approximately in a standard laptop (CPU 3.0 GHz 64-bit). Individual ventricular masks and volumetric results of the validation process can be found in (<https://github.com/jdgispert/Ventricular-segmentation>).

All ventricular masks obtained with the segmentation algorithm were visually checked for each patient and revealed correct segmentation for the small and large ventricular volume in most cases (Fig. 1). Unfortunately, 70 subjects had to be excluded from the study group (Supplementary Table 5), since in these subjects the visual inspection of the segmentation showed an underestimation or overestimation

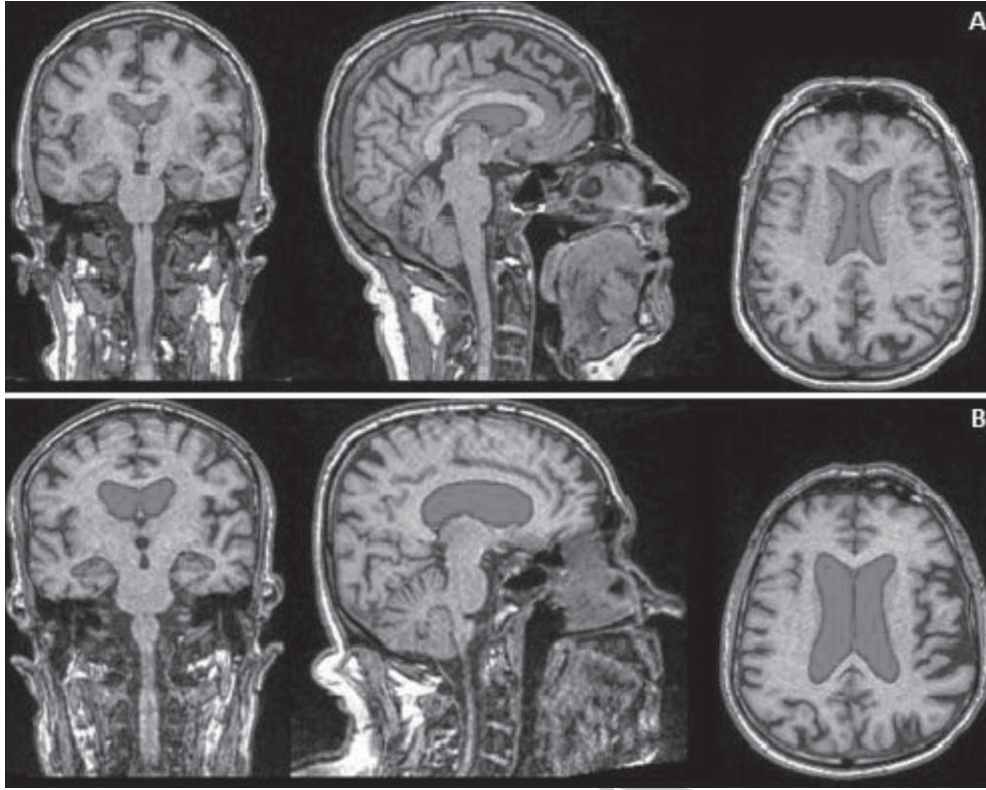


Fig. 1. Segmentation of ventricular volume (VV). (A) and (B) From left to right: coronal, sagittal, and transverse plane. The segmentation of the lateral and third ventricles were included in the region of interest (ROI) by the ventricle segmentation algorithm. Red indicates the segmentation mask on a T1 weighted MRI scan of cognitive healthy person (A) and Alzheimer's disease patient (B).

of the ventricle size. The excluded subjects were measured on different scanners: 7 subjects were measured on 1.0 T MRI scanners, 32 subjects on 1.5 T scanners, and 31 subjects on 3.0 T scanners. Thus 730 subjects remained in the study and their demographics are shown in Table 1 and the number of included and excluded patients per center and per disease group can be found in Supplementary Table 5. Control subjects had significantly ($p < 0.0001$) lower VV/TIV ratios compared to AD patients (Table 1).

Clinical validation of AD CSF biomarkers

The $A\beta_{42}$ concentrations were significantly decreased ($p < 0.0001$) in AD patients (mean: 495 pg/mL) compared to control subjects (mean: 703 pg/mL) (Fig. 2A). The mean t-tau (Fig. 2B) and p-tau (Fig. 2C) concentrations were significantly increased ($p < 0.0001$) in AD patients (t-tau: 720 pg/mL, p-tau: 98 pg/mL) compared to control subjects (t-tau: 296 pg/mL, p-tau: 57 pg/mL). Table 1

provides an overview of the CSF analysis data of all patient groups.

Correlations between CSF biomarkers and VV

Bivariate correlations between the CSF biomarkers and VV, corrected for the size of the head (TIV) as VV/TIV ratio, are displayed in Fig. 3A, B, C for all patients. $A\beta_{42}$ negatively, albeit weakly, correlated with the VV/TIV ratio ($r = -0.28$; $p < 0.0001$), but both t-tau and p-tau did not correlate with the VV/TIV ratio (t-tau: $r = 0.04$; p-tau: $r = -0.03$; both $p > 0.34$). Similar results were found for correlations of VV/TIV with $A\beta_{42}$ ($r = -0.35$; $p < 0.0001$), t-tau ($r = 0.11$; $p > 0.17$), and p-tau ($r = -0.11$; $p > 0.17$) for the group of controls only (Fig. 3D-F). When considering only AD and MCI patients, we found significant correlations of VV/TIV with both $A\beta_{42}$ ($r = -0.23$; $p < 0.0001$), t-tau ($r = -0.15$; $p < 0.01$), and p-tau ($r = -0.13$; $p < 0.01$) (Fig. 3G-I), although it should be noted that r values of these latter correlations are low.

Table 1
Demographic data and CSF biomarker concentrations across the diagnostic groups

	Control	AD	MCI	FTD	Other	<i>p</i> -value
Sample size: <i>n</i>	157	175	308	57	33	
Gender: female <i>n</i> (%)	98 (62)	107 (61)	151 (49)	24 (42)	15 (45)	<0.01 ^a
Age: years mean (SD)	63.6 (8.6)	67.4 (8.7)	69.8 (7.4)	65.1 (10.5)	68.5 (10.1)	<0.0001 ^b
A β ₄₂ : mean in pg/mL (SD)	703 (250)	495 (238)	630 (305)	774 (256)	643 (243)	<0.0001 ^b
t-tau: mean in pg/mL (SD)	296 (223)	723 (454)	519 (328)	342 (228)	371 (307)	<0.0001 ^b
p-tau: mean in pg/mL (SD)	57 (39)	98 (64)	78 (48)	43 (24)	61 (34)	<0.0001 ^b
VV: mean in cm ³ (SD)	26 (17)	40 (19)	40 (22)	52 (30)	67 (50)	<0.0001 ^b
VV/TIV: mean (SD)	0.019 (0.011)	0.030 (0.013)	0.029 (0.015)	0.039 (0.021)	0.047 (0.033)	<0.0001 ^b

CSF, cerebrospinal fluid; AD, Alzheimer's disease; MCI, mild cognitive impairment; FTD, frontotemporal dementia; Other, other dementias; A β ₄₂, amyloid- β ; t-tau, total tau; p-tau, phosphorylated tau; SD, standard deviation. ^aChi-square test. ^bKruskal-Wallis test.

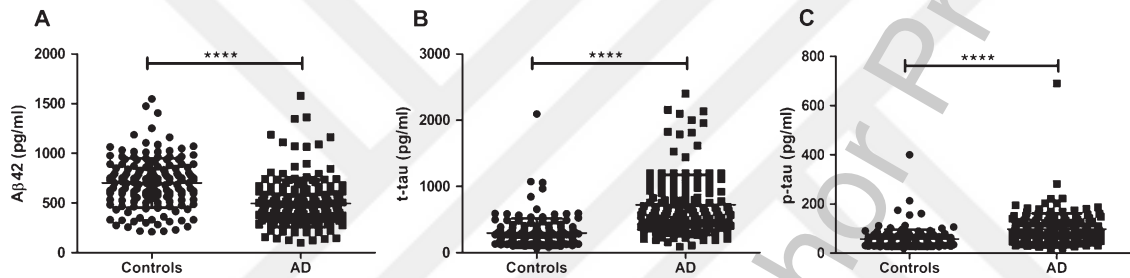


Fig. 2. Clinical validation of AD CSF biomarkers: A β ₄₂ (*n* = 332), t-tau (*n* = 306), and p-tau (*n* = 331). Clinical validation of (A) A β ₄₂ with Controls (*n* = 157), and Alzheimer's disease (AD) patients (*n* = 175), (B) t-tau with Controls (*n* = 156) and AD patients (*n* = 150), and (C) p-tau with Controls (*n* = 156) and AD patients (*n* = 175). *****p* < 0.0001.

Comparison of diagnostic power

Next, we compared whether correction for VV/TIV improved the biomarker performance of A β ₄₂, t-tau, and p-tau in differentiating AD from controls (Table 2, index 1–6). The diagnostic power increased when correcting A β ₄₂ for the VV/TIV, but an opposite result was observed for both t-tau and p-tau. For differentiation of AD and controls, the AUC for A β ₄₂ (0.75, 95% confidence interval (CI): 0.70–0.81), but not for t-tau and p-tau, increased significantly (*p* < 0.01) after correction for VV/TIV (AUC: 0.81, 95% CI: 0.77–0.86). The full list of AUCs and 95% CIs can be found in Table 2. Additionally, the sensitivity for A β ₄₂ improved from 49% to 57% at a fixed specificity of 85% and the positive likelihood ratio increased (3.7 versus 3.2) after correction for VV/TIV.

We also compared whether correction for VV/TIV improved the biomarker performance of A β ₄₂, t-tau, and p-tau in differentiating AD from FTD and other dementias. No improvement in differentiation could be found in correcting either of the three AD CSF biomarkers for VV/TIV (data not shown).

Next, we determined the diagnostic power of combined AD CSF biomarker concentrations in differentiating AD from controls (Table 2, index 7–10).

The AD-CSF-Index t-tau (AUC: 0.86) showed no significantly different (*p* = 0.97) result compared to t-tau (AUC: 0.87). The AD-CSF-Index p-tau (AUC: 0.83) showed no significantly different (*p* = 0.09) result compared to p-tau (AUC: 0.79). The sensitivities, at a fixed specificity of 85%, and positive likelihood ratios were equal for the AD-CSF-Index of t-tau or p-tau compared to t-tau or p-tau alone, respectively. Logistic regression modeling using the three AD CSF biomarkers resulted in model 1, in which p-tau was not included. The combination of A β ₄₂ and t-tau (Model 1) improved the diagnostic value (AUC: 0.88, 95% CI: 0.84–0.92) to discriminate AD from controls, compared to A β ₄₂ alone. This diagnostic power (AUC: 0.91, 95% CI: 0.88–0.94) was even higher when CSF A β ₄₂ was normalized to the VV/TIV ratio in combination with the CSF t-tau analysis (Model 2). The AUC of Model 2 was significantly (*p* < 0.01) higher than that of Model 1. Additionally, the sensitivity of Model 2 (83%) was higher than that of model 1 (71%) at a fixed specificity of 85%. The positive likelihood ratio was also higher in Model 2 than Model 1 (5.7 versus 4.8) (see Table 2). Height, age, gender, scanner type, and magnetic field strength were analyzed as covariates, but did not affect the above-mentioned results.

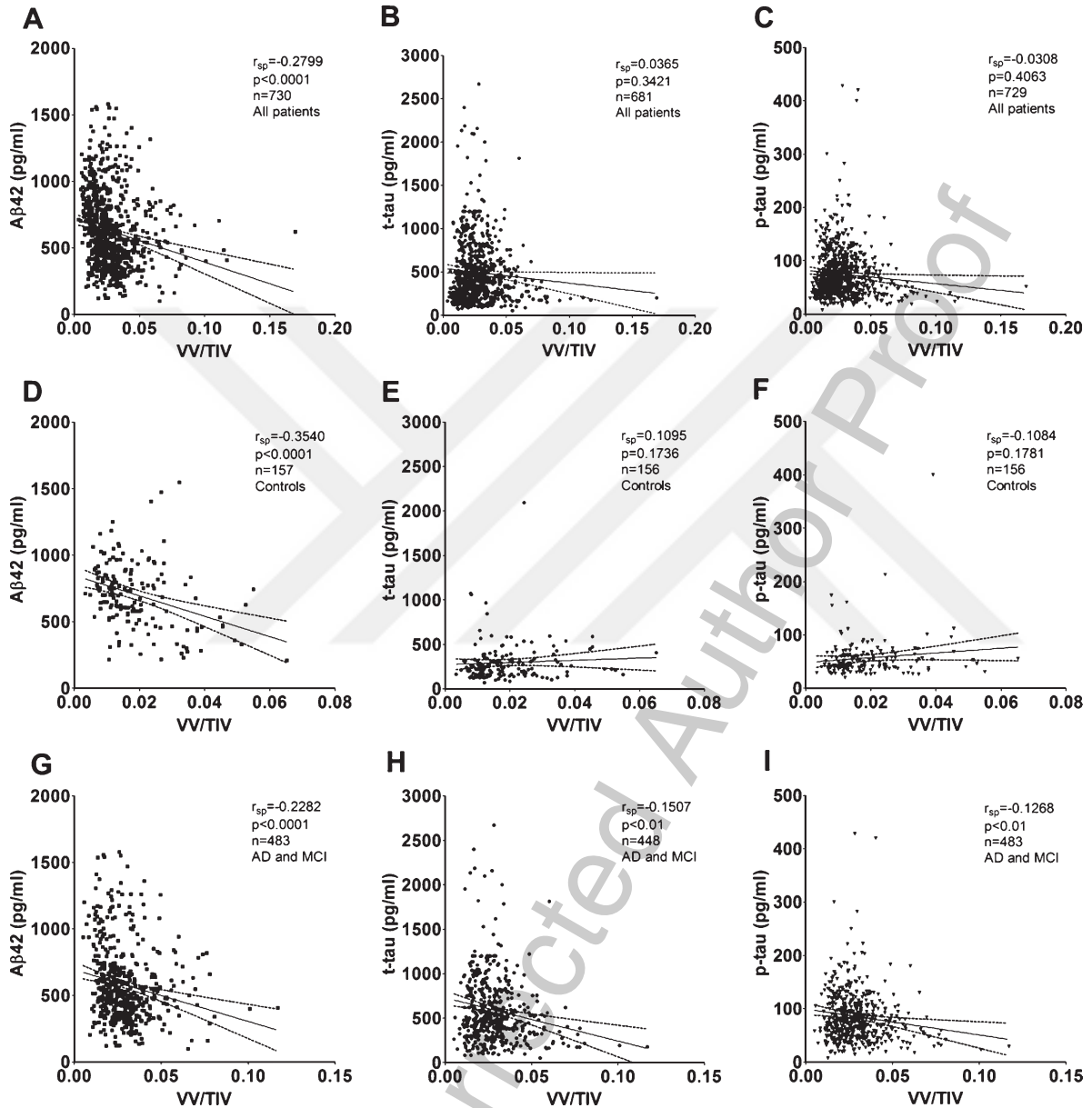


Fig. 3. Correlation of ventricular volume with CSF Aβ₄₂, t-tau, and p-tau in all patients. Ventricular volume corrected for total intracranial volume (VV/TIV) versus CSF Aβ₄₂ (A, D, G), t-tau (B, E, H), and p-tau (C, F, I) concentrations of all patients combined (A-C; i.e., controls, Alzheimer's disease (AD), mild cognitive impairment (MCI), frontotemporal dementia (FTD), and other dementias (Aβ₄₂: $n = 730$; t-tau: $n = 681$; p-tau: $n = 729$)), of controls only (D-F; Aβ₄₂: $n = 157$; t-tau: $n = 156$; p-tau: $n = 156$) and AD plus MCI patients only (G-I; Aβ₄₂: $n = 483$; t-tau: $n = 448$; p-tau: $n = 483$). A significant ($p < 0.0001$) correlation was found between VV/TIV and CSF Aβ₄₂ concentrations (A, D), but not t-tau (B, E) or p-tau (C, F) for all patients combined and the control group only. For AD plus MCI patients, a significant correlation was found between VV/TIV and both CSF Aβ₄₂ concentrations ($p < 0.0001$) (G), t-tau ($p < 0.01$) (H), and p-tau ($p < 0.01$) (I). For p-tau in panel C and I, one data point (690 pg/mL) is outside the axes limit. r_{sp} = spearman r .

Hippocampal atrophy

The improvement of correcting Aβ₄₂ for VV/TIV could be due to a general dilutional effect, but could also be related to disease progression. We performed a pilot study to test this hypothesis. We measured

hippocampal atrophy (MTA score) as a measure for disease progression in 34 AD patients and 13 controls and analyzed the correlation with VV/TIV. The VV/TIV ratio raised significantly with increasing MTA score (Fig. 4), suggesting that the improved biomarker functioning after correction for VV/TIV

Table 2
Comparison of CSF biomarker (combinations) with and without correction for VV/TIV ratio

Index		AUC (95% CI)	Sensitivity (%) at 85% specificity	LR+	Patients C + AD (n)
1	A β 42	0.754 (0.701–0.808)	49.1	3.2	332
2	A β 42/(VV/TIV)	0.813 (0.765–0.861)	57.1	3.7	332
3	t-tau	0.867 (0.826–0.908)	75.3	5.1	306
4	t-tau/(VV/TIV)	0.637 (0.574–0.699)	35.3	2.4	306
5	p-tau	0.793 (0.743–0.842)	66.9	4.4	331
6	p-tau/(VV/TIV)	0.503 (0.440–0.565)	23.4	1.5	331
7	AD-CSF-Index t-tau (pooled)	0.864 (0.821–0.907)	77.0	4.9	306
8	AD-CSF-Index p-tau (pooled)	0.829 (0.783–0.875)	66.3	4.3	331
9	Model 1 (A β 42 and t-tau) ^a	0.880 (0.840–0.920)	71.3	4.8	305*
10	Model 2 (A β 42/(VV/TIV) and t-tau) ^b	0.912 (0.880–0.944)	83.3	5.7	305*

AUC, area under the curve; CI, confidence interval; LR+, positive likelihood ratio; A β 42, amyloid- β ; t-tau, total tau; p-tau, phosphorylated tau; VV, ventricular volume; TIV, total intracranial volume; AD, Alzheimer's disease; C: controls. ^a $Y = (-0.650118) + (-0.002705) * [AB42] + (0.005129) * [T-Tau]$ Covariates: A β 42, p-tau, t-tau. ^b $Y = (-0.568419) + (-0.000055) * [AB42]/(VV/TIV) + (0.005053) * [T-Tau]$ Covariates: A β 42/(VV/TIV), p-tau, t-tau. *Input data was $n = 332$, but $n = 26$ are missing t-tau and $n = 1$ is missing p-tau. These $n = 27$ patients were not used in creating the model.

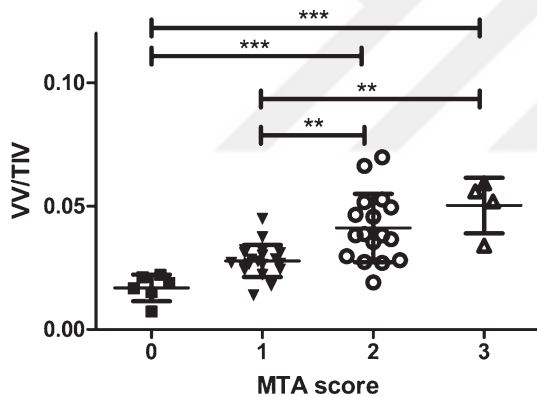


Fig. 4. Correlation of ventricular volume with hippocampal atrophy ($n=47$). Ventricular volume corrected for total intracranial volume (VV/TIV) versus medial temporal lobe atrophy (MTA) score as measure for hippocampal atrophy in Controls and AD patients (pilot: total $n=47$). Significant differences in VV/TIV were found between the different MTA scores (** $p \leq 0.01$ and *** $p \leq 0.001$).

may, at least in part, be related to differences in disease progression.

DISCUSSION

Quantification of CSF biomarker concentrations may be a valuable addition for early diagnosis of AD, because these biomarkers reflect the ongoing process of amyloid deposition and neuronal changes. The added value of CSF biomarkers can be optimized if as many confounding factors as possible are excluded. One of these confounders may be variation in CSF volume, and normalizing CSF biomarker results for

the VV/TIV ratio may correct for this confounding factor.

Validation of ventricular volume segmentation algorithm

In this study, we developed and validated a novel algorithm for automated measurement of VV in T1 images. The algorithm showed excellent accuracy and reproducibility and was capable of segmenting all the images in the validation dataset, thus, also showing appropriate robustness. This is advantageous compared to other existing segmentation algorithms, which did not provide robust segmentations in extremely enlarged ventricles, as are often seen in severe cases of AD [29]. However, the ventricular segmentation algorithm failed in a non-negligible percentage of the MRI scans available for this study. To this regard, it has to be noted that the images in this study come from a previously-acquired convenience sample in a multi-center setting in which no previous MRI protocol harmonization was conducted. Therefore, images were acquired in a variety of scanners with a wide range of parameters in the pulse-sequences. This resulted in significant contrast variation within the dataset, a situation that is challenging for automatic segmentation algorithms. This fact can account for the relatively high number of failures in the study dataset, even though the algorithm was able to process all the scans in the validation dataset and the resulting accuracy and test-retest variability were excellent. This behavior highlights the relevance of protocol harmonization in multicenter studies aiming at obtaining quantitative measurements using MRI.

Clinical validation of AD CSF biomarkers

We decided to pool the healthy control subjects and SMC in one group as neurological controls. A recent study showed that SMC are very similar to healthy controls in terms of prevalence of amyloid pathology [14]. The diagnostic value of A β ₄₂ for the discrimination of AD versus these controls was slightly, but significantly improved ($p < 0.01$) by correction for VV/TIV. CSF A β ₄₂ slightly decreased when VV/TIV increased, which is compatible with a dilutional effect, as described previously [19], but could also be explained by more advanced brain atrophy related to enlarged VV, which is a measure of disease progression [33, 34]. Indeed, it has been suggested that CSF A β ₄₂ concentrations decrease steadily with advancing disease progression [10, 35–38]. It should be noted, however, that the variation in the biomarker concentrations between the participating groups was larger than would be expected and, possibly, could be smaller when all biomarker results were obtained from the same laboratory. It is therefore possible that the diagnostic gain is higher when the biomarker analyses are more harmonized. Furthermore, it could be argued that there is a circularity in testing the diagnostic capacity of core AD CSF biomarkers when, in some of the participating centers, these have also been used as a support for the diagnosis of AD. This would likely lead to an increased observed discriminative power of the CSF biomarkers in these selected samples. In this article, however, our main interest was to test whether correcting for VV increased their discriminative power as compared to non-corrected values, and not to estimate the absolute diagnostic capacity of the core AD biomarkers in a clinical setting. Since both approaches were compared in the same selection of samples, we do not expect our main results to be affected by any potential biases in the absolute discrimination power.

Correlations between CSF biomarkers and VV

In contrast, the CSF t-tau and p-tau concentrations did not correlate with VV or the VV/TIV ratio when analyzed for all patients together, and normalization for this ratio did not affect the diagnostic accuracy of these parameters. This lack of correlation may be explained by a combination of events with opposite effects. On one hand, t-tau and p-tau concentrations could be lower at higher VV because of dilution, but this effect may be counteracted by higher rates of

tau protein release in the CSF during neurodegeneration. The latter may especially be true for p-tau, since CSF p-tau, as well as VV, are strongly associated with disease progression in MCI and AD patients [10, 38–40]. A biomarker dilution effect is supported by the significant negative correlation of t-tau and p-tau with VV/TIV in the combined group of MCI and AD patients, however, we did not observe such a correlation between t-tau or p-tau levels and VV/TIV in the control group, where neurodegeneration is not expected to occur. This argues not necessary against such a dilution effect, because both tau levels and VV displayed a reduced range of variation in the control group in comparison to that observed in the combined group of MCI and AD patients as a consequence of the neurodegenerative process in the latter group. In the combined MCI and AD groups, however, the disease progression is linked to VV.

Limitations

Although promising, the results of this study should be interpreted with caution for a number of reasons. Firstly, the measurement of CSF ventricular volume is a proxy for the total CSF volume in the brain and only globally indicates brain atrophy. Furthermore, it is important to note that CSF biomarker concentrations were determined in different laboratories and, despite that the same assays were used, variation in the pre-analytical and analytical procedures used will influence our data [31]. Efforts for more standardized methods are needed to measure CSF biomarkers, and standardized guidelines are developed using uniform reference materials within the JPND-BIOMARKAPD project (<http://biomarkapd.org/>). Additionally, there was neither a standardized MRI protocol used for this study nor patients were scanned using the same scanner, therefore variations in scanning protocol could have influenced our data. Furthermore, we have not evaluated the possible correlations between CSF biomarker levels (in particular CSF A β ₄₂) and disease progression of AD in the entire group, but only in a small subgroup. Patients at a more advanced stage of AD may have larger ventricular volumes, and—according to our results—disease progression may explain part of the relation we found between A β ₄₂ and VV/TIV ratio. In controls, both VV and t-tau showed normal population variability (i.e., not linked with disease progression). Just the opposite was found when we compared the combined MCI and AD groups, in which the disease progression is

correlated to VV. The only way to untangle variations in VV from tissue atrophy would be to have concentrations of a CSF biomarker known not to vary with AD, but unfortunately we do not have such a biomarker in this study. Also in this study, we did not have access to APOE genotyping data and therefore we could not determine the effects of APOE genotype on either CSF biomarkers or on the ventricular volume. However, despite these limitations we found that correction for differences in ventricular volume improved the differentiation of AD versus controls based on CSF A β ₄₂ alone or in combination with t-tau.

CONCLUSION

In summary, we studied if the differences in CSF volume may act as a confounding factor for interpretation of CSF biomarkers. We used VV as a surrogate marker of brain atrophy. For this purpose, we developed and validated a novel algorithm for automated measurement of VV in T1 MRI images available to accurately segment normal as well as abnormally large ventricular volumes. CSF A β ₄₂ concentrations decreased with increasing VV; correction for differences in this volume improved the differentiation of AD versus controls based on CSF A β ₄₂ alone or in combination with t-tau. The correlation between VV and hippocampal atrophy gives an indication that the dilutional effect could be partly explained by ongoing brain atrophy in AD, as an indirect measurement of disease progression. Dilution of CSF biomarkers by increased VV may affect interpretation of the results of CSF biomarker analysis.

ACKNOWLEDGMENTS

We would like to thank Hawra Kadhim, MSc, for her assistance on the visual quality control of the MRI scans.

BIOMARKAPD is an EU Joint Programme–Neurodegenerative Disease Research (JPND) project. This project was supported through national funding organizations under the aegis of JPND (<http://www.jpnd.eu>). These national funding organizations included the Netherlands Organisation for Health Research and Development (ZonMw), the Netherlands; the Instituto de Salud Carlos III (ISCIII) (grant numbers: PI11/3035, PI11/02425 and PI14/01126), Spain; the Italian Ministry of Health (grant number: IG-2014-2354450), Italy;

Health Research Council of the Academy of Finland (grant number: 263193), Finland; TUBITAK (project number: 112S360), Turkey; Fundação para a Ciência e a Tecnologia (FCT) (grant numbers: PIC/IC/83206/2007 and JPND/0005/2011), Portugal. Additionally, this work was funded by ZonMW and the Dutch national ‘Deltaplan for Dementia’ (zonmw.nl/dementiaresearch), the CAVIA project to Verbeek: nr. 733050202), Alzheimer Nederland, Alzheimer’s drug discovery foundation, ISAO, the CIBERNED program (Program 1, Alzheimer Disease), Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER), Unión Europea, “Una manera de hacer Europa” and a “Marató TV3” grant (grant number: 201412.10), Alzheimer’s Association, IMI Project “PharmaCog”, FP7, H2020, and Swiss National Science Foundation.

Authors’ disclosures available online (<http://j-alz.com/manuscript-disclosures/16-0668r2>).

SUPPLEMENTARY MATERIAL

The supplementary material is available in the electronic version of this article: <http://dx.doi.org/10.3233/JAD-160668>.

REFERENCES

- [1] Blennow K, de Leon MJ, Zetterberg H (2006) Alzheimer’s disease. *Lancet* **368**, 387–403.
- [2] Beach TG, Monsell SE, Phillips LE, Kukull W (2012) Accuracy of the clinical diagnosis of Alzheimer disease at National Institute on Aging Alzheimer Disease Centers, 2005–2010. *J Neuropathol Exp Neurol* **71**, 266–273.
- [3] Wang HF, Tan L, Cao L, Zhu XC, Jiang T, Tan MS, Liu Y, Wang C, Tsai RM, Jia JP, Yu JT, Alzheimer’s Disease Neuroimaging Initiative (2016) Application of the IWG12 diagnostic criteria for Alzheimer’s disease to the ADNI. *J Alzheimers Dis* **51**, 227–236.
- [4] McKhann GM, Knopman DS, Chertkow H, Hyman BT, Jack CR Jr, Kawas CH, Klunk WE, Koroshetz WJ, Manly JJ, Mayeux R, Mohs RC, Morris JC, Rossor MN, Scheltens P, Carrillo MC, Thies B, Weintraub S, Phelps CH (2011) The diagnosis of dementia due to Alzheimer’s disease: Recommendations from the National Institute on Aging–Alzheimer’s Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer’s disease. *Alzheimers Dement* **7**, 263–269.
- [5] Albert MS, DeKosky ST, Dickson D, Dubois B, Feldman HH, Fox NC, Gamst A, Holtzman DM, Jagust WJ, Petersen RC (2011) The diagnosis of mild cognitive impairment due to Alzheimer’s disease: Recommendations from the National Institute on Aging–Alzheimer’s Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer’s disease. *Alzheimers Dement* **7**, 270–279.
- [6] Nordberg A, Rinne JO, Kadir A, Langstrom B (2010) The use of PET in Alzheimer disease. *Nat Rev Neurol* **6**, 78–87.

- [7] Eisenmenger LB, Huo EJ, Hoffman JM, Minoshima S, Matesan MC, Lewis DH, Lopresti BJ, Mathis CA, Okonkwo DO, Mountz JM (2016) Advances in PET imaging of degenerative, cerebrovascular, and traumatic causes of dementia. *Semin Nucl Med* **46**, 57-87.
- [8] Barthel H, Schroeter ML, Hoffmann K-T, Sabri O (2015) PET/MR in dementia and other neurodegenerative diseases. *Semin Nucl Med* **45**, 224-233.
- [9] Jack CR Jr, Albert MS, Knopman DS, McKhann GM, Sperling RA, Carrillo MC, Thies B, Phelps CH (2011) Introduction to the recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement* **7**, 257-262.
- [10] Nestor SM, Rupsingh R, Borrie M, Smith M, Accomazzi V, Wells JL, Fogarty J, Bartha R, Initiative AsDN (2008) Ventricular enlargement as a possible measure of Alzheimer's disease progression validated using the Alzheimer's disease neuroimaging initiative database. *Brain* **131**, 2443-2454.
- [11] Clark CM, Xie S, Chittams J, Ewbank D, Peskind E, Galasko D, Morris JC, McKeel DW, Farlow M, Weitlauf SL (2003) Cerebrospinal fluid tau and β -amyloid: How well do these biomarkers reflect autopsy-confirmed dementia diagnoses? *Arch Neurol* **60**, 1696-1702.
- [12] Blennow K, Dubois B, Fagan AM, Lewczuk P, de Leon MJ, Hampel H (2015) Clinical utility of cerebrospinal fluid biomarkers in the diagnosis of early Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement* **11**, 58-69.
- [13] Diniz BSO, Pinto JA, Forlenza OV (2008) Do CSF total tau, phosphorylated tau, and β -amyloid 42 help to predict progression of mild cognitive impairment to Alzheimer's disease? A systematic review and meta-analysis of the literature. *World J Biol Psychiatry* **9**, 172-182.
- [14] Jansen WJ, Ossenkoppele R, Knol DL, Tijms BM, Scheltens P, Verhey FR, Visser PJ, Aalten P, Aarsland D, Alcolea D, Alexander M, Almdahl IS, Arnold SE, Baldeiras I, Barthel H, van Berckel BN, Bibeau K, Blennow K, Brooks DJ, van Buchem MA, Camus V, Cavedo E, Chen K, Chetelat G, Cohen AD, Drzezga A, Engelborghs S, Fagan AM, Fladby T, Fleisher AS, van der Flier WM, Ford L, Forster S, Fortea J, Foskett N, Frederiksen KS, Freund-Levi Y, Frisoni GB, Froelich L, Gabryelewicz T, Gill KD, Gkatzima O, Gomez-Tortosa E, Gordon MF, Grimmer T, Hampel H, Hausner L, Hellwig S, Herukka SK, Hildebrandt H, Ishihara L, Ivanoiu A, Jagust WJ, Johannsen P, Kandimalla R, Kapaki E, Klimkowicz-Mrowiec A, Klunk WE, Kohler S, Koglin N, Kornhuber J, Kramberger MG, Van Laere K, Landau SM, Lee DY, de Leon M, Lisetti V, Lleó A, Madsen K, Maier W, Marcussen J, Mattsson N, de Mendonca A, Meulenbroek O, Meyer PT, Mintun MA, Mok V, Molinuevo JL, Mollergard HM, Morris JC, Mroczko B, Van der Mussele S, Na DL, Newberg A, Nordberg A, Nordlund A, Novak GP, Paraskevas GP, Parnetti L, Perera G, Peters O, Popp J, Prabhakar S, Rabinovici GD, Ramakers IH, Rami L, Resende de Oliveira C, Rinne JO, Rodrigue KM, Rodriguez-Rodriguez E, Roe CM, Rot U, Rowe CC, Ruther E, Sabri O, Sanchez-Juan P, Santana I, Sarazin M, Schroder J, Schutte C, Seo SW, Soetewey F, Soininen H, Spira L, Struyfs H, Teunissen CE, Tsolaki M, Vandenbergh R, Verbeek MM, Villemagne VL, Vos SJ, van Waalwijk van Doorn LJ, Waldemar G, Wallin A, Wallin AK, Wiltfang J, Wolk DA, Zboch M, Zetterberg H (2015) Prevalence of cerebral amyloid pathology in persons without dementia: A meta-analysis. *JAMA* **313**, 1924-1938.
- [15] Vanderstichele H, Bibl M, Engelborghs S, Le Bastard N, Lewczuk P, Molinuevo JL, Parnetti L, Perret-Liaudet A, Shaw LM, Teunissen C, Wouters D, Blennow K (2012) Standardization of preanalytical aspects of cerebrospinal fluid biomarker testing for Alzheimer's disease diagnosis: A consensus paper from the Alzheimer's Biomarkers Standardization Initiative. *Alzheimers Dement* **8**, 65-73.
- [16] Bjerke M, Portelius E, Minthon L, Wallin A, Anckarsäter H, Anckarsäter R, Andreasen N, Zetterberg H, Andreasen U, Blennow K (2010) Confounding factors influencing amyloid beta concentration in cerebrospinal fluid. *Int J Alzheimers Dis* **2010**, 11.
- [17] del Campo M, Mollenhauer B, Bertolotto A, Engelborghs S, Hampel H, Simonsen AH, Kapaki E, Kruse N, Le Bastard N, Lehmann S, Molinuevo JL, Parnetti L, Perret-Liaudet A, Saez-Valero J, Saka E, Urbani A, Vanmechelen E, Verbeek M, Visser PJ, Teunissen C (2012) Recommendations to standardize preanalytical confounding factors in Alzheimer's and Parkinson's disease cerebrospinal fluid biomarkers: An update. *Biomark Med* **6**, 419-430.
- [18] Johanson CE, Duncan JA 3rd, Klinge PM, Brinker T, Stopa EG, Silverberg GD (2008) Multiplicity of cerebrospinal fluid functions: New challenges in health and disease. *Cerebrospinal Fluid Res* **5**, 10.
- [19] Ott BR, Cohen RA, Gongvatana A, Okonkwo OC, Johanson CE, Stopa EG, Donahue JE, Silverberg GD, Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative (2010) Brain ventricular volume and cerebrospinal fluid biomarkers of Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* **20**, 647-657.
- [20] Hodel J, Lebrecht A, Petit E, Leclerc X, Zins M, Vignaud A, Decq P, Rahmouni A (2013) Imaging of the entire cerebrospinal fluid volume with a multistation 3D SPACE MR sequence: Feasibility study in patients with hydrocephalus. *Eur Radiol* **23**, 1450-1458.
- [21] McKhann G, Drachman D, Folstein M, Katzman R, Price D, Stadlan EM (1984) Clinical diagnosis of Alzheimer's disease Report of the NINCDS-ADRDA Work Group* under the auspices of Department of Health and Human Services Task Force on Alzheimer's Disease. *Neurology* **34**, 939-939.
- [22] American Psychiatric Association (1994) Diagnostic and statistical manual of mental disorders (DSM). American Psychiatric Association, Washington, DC, pp. 143-147.
- [23] Dubois B, Feldman HH, Jacova C, DeKosky ST, Barberger-Gateau P, Cummings J, Delacourte A, Galasko D, Gauthier S, Jicha G (2007) Research criteria for the diagnosis of Alzheimer's disease: Revising the NINCDS-ADRDA criteria. *Lancet Neurol* **6**, 734-746.
- [24] Dubois B, Feldman HH, Jacova C, Cummings JL, DeKosky ST, Barberger-Gateau P, Delacourte A, Frisoni G, Fox NC, Galasko D (2010) Revising the definition of Alzheimer's disease: A new lexicon. *Lancet Neurol* **9**, 1118-1127.
- [25] Petersen RC, Smith GE, Waring SC, Ivnik RJ, Tangalos EG, Kokmen E (1999) Mild cognitive impairment: Clinical characterization and outcome. *Arch Neurol* **56**, 303-308.
- [26] Petersen RC (2004) Mild cognitive impairment as a diagnostic entity. *J Internal Med* **256**, 183-194.
- [27] Neary D, Snowden JS, Gustafson L, Passant U, Stuss D, Black SA, Freedman M, Kertesz A, Robert P, Albert M (1998) Frontotemporal lobar degeneration A consensus on clinical diagnostic criteria. *Neurology* **51**, 1546-1554.
- [28] Rascovsky K, Hodges JR, Knopman D, Mendez MF, Kramer JH, Neuhaus J, van Swieten JC, Seelaar H, Dopper EG, Onyike CU (2011) Sensitivity of revised diagnostic criteria for the behavioural variant of frontotemporal dementia. *Brain* **134**, 2456-2477.

- [29] Kempton MJ, Underwood TSA, Brunton S, Stylios F, Schmechtig A, Ettinger U, Smith MS, Lovestone S, Crum WR, Frangou S, Williams SCR, Simmons A (2011) A comprehensive testing protocol for MRI neuroanatomical segmentation techniques: Evaluation of a novel lateral ventricle segmentation method. *Neuroimage* **58**, 1051-1059.
- [30] Molinuevo JL, Gispert JD, Pujol J, Rojas S, Llado A, Balasa M, Antonell A, Sanchez-Valle R, Rami L (2012) A new approach to the Alzheimer's disease diagnosis with biomarkers: Description of the AD-CSF-Index. *Rev Neurol* **54**, 513-522.
- [31] Molinuevo JL, Gispert JD, Dubois B, Heneka MT, Lleo A, Engelborghs S, Pujol J, de Souza LC, Alcolea D, Jessen F, Sarazin M, Lamari F, Balasa M, Antonell A, Rami L (2013) The AD-CSF-index discriminates Alzheimer's disease patients from healthy controls: A validation study. *J Alzheimers Dis* **36**, 67-77.
- [32] Scheltens P, Leys D, Barkhof F, Huglo D, Weinstein HC, Vermersch P, Kuiper M, Steinling M, Wolters EC, Valk J (1992) Atrophy of medial temporal lobes on MRI in "probable" Alzheimer's disease and normal ageing: Diagnostic value and neuropsychological correlates. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* **55**, 967-972.
- [33] Jack CR, Wiste HJ, Knopman DS, Vemuri P, Mielke MM, Weigand SD, Senjem ML, Gunter JL, Lowe V, Gregg BE, Pankratz VS, Petersen RC (2014) Rates of β -amyloid accumulation are independent of hippocampal neurodegeneration. *Neurology* **82**, 1605-1612.
- [34] Henneman WJ, Sluimer JD, Barnes J, van der Flier WM, Sluimer IC, Fox NC, Scheltens P, Vrenken H, Barkhof F (2009) Hippocampal atrophy rates in Alzheimer disease: Added value over whole brain volume measures. *Neurology* **72**, 999-1007.
- [35] Fagan AM, Head D, Shah AR, Marcus D, Mintun M, Morris JC, Holtzman DM (2009) Decreased cerebrospinal fluid Abeta(42) correlates with brain atrophy in cognitively normal elderly. *Ann Neurol* **65**, 176-183.
- [36] Susanto TA, Pua EP, Zhou J (2015) Cognition, brain atrophy, and cerebrospinal fluid biomarkers changes from preclinical to dementia stage of Alzheimer's disease and the influence of apolipoproteine. *J Alzheimers Dis* **45**, 253-268.
- [37] Chou YY, Lepore N, Avedissian C, Madsen SK, Parikshak N, Hua X, Shaw LM, Trojanowski JQ, Weiner MW, Toga AW, Thompson PM (2009) Mapping correlations between ventricular expansion and CSF amyloid and tau biomarkers in 240 subjects with Alzheimer's disease, mild cognitive impairment and elderly controls. *Neuroimage* **46**, 394-410.
- [38] Carmichael OT, Kuller LH, Lopez OL, Thompson PM, Dutton RA, Lu A, Lee SE, Lee JY, Aizenstein HJ, Meltzer CC, Liu Y, Toga AW, Becker JT (2007) Cerebral ventricular changes associated with transitions between normal cognitive function, mild cognitive impairment, and dementia. *Alzheimer Dis Assoc Disord* **21**, 14-24.
- [39] Han SD, Gruhl J, Beckett L, Dodge HH, Stricker NH, Farias S, Mungas D (2012) Beta amyloid, tau, neuroimaging, and cognition: Sequence modeling of biomarkers for Alzheimer's disease. *Brain Imaging Behav* **6**, 610-620.
- [40] Vemuri P, Wiste HJ, Weigand SD, Knopman DS, Trojanowski JQ, Shaw LM, Bernstein MA, Aisen PS, Weiner M, Petersen RC, Jack CR Jr (2010) Serial MRI and CSF biomarkers in normal aging, MCI, and AD. *Neurology* **75**, 143-151.

Notification to co-authors of submission to BMC Neurology NURL- D-17-00674 - erdeneren@gmail.com - Gmail

NURL-D-17-00674

Identification of circulatory miRNA's in Alzheimer's disease and Frontotemporal Dementia as potential biomarkers

Erden Eren; Erdogan Pekcan Erkan, PhD.; Kemal Ugur Tufekci, PhD.; Meryem Gulfem Oner; Gokhan Karakulah, PhD.; Pembe Keskinoglu, MD. PhD.; Gorsev Yener, MD. PhD.; Sermin Genc, MD, PhD

Dear author:

You are receiving this email because you have been listed as an author on a manuscript recently submitted to BMC Neurology. The manuscript details are below.

Title: Identification of circulatory miRNA's in Alzheimer's disease and Frontotemporal Dementia as potential biomarkers

Authors: Erden Eren; Erdogan Pekcan Erkan, PhD.; Kemal Ugur Tufekci, PhD.; Meryem Gulfem Oner; Gokhan Karakulah, PhD.; Pembe Keskinoglu, MD. PhD.; Gorsev Yener, MD. PhD.; Sermin Genc, MD, PhD

Corresponding author: Prof. Sermin Genc

If you are not aware of the submission, or if you should not be listed as contributing author, please notify the Editorial Office. Contact details for the Editorial Office are available under "Contact Us" on the journal website.

Kind regards,

Editorial Office

BMC Neurology

<https://bmcneurol.biomedcentral.com/>



Identification of circulatory miRNA's in Alzheimer's disease and Frontotemporal Dementia as potential biomarkers --Manuscript Draft--

Manuscript Number:	NURL-D-17-00674					
Full Title:	Identification of circulatory miRNA's in Alzheimer's disease and Frontotemporal Dementia as potential biomarkers					
Article Type:	Research article					
Section/Category:	3.Dementias					
Funding Information:	<table border="1"> <tr> <td>The Scientific and Technological Research Council of Turkey (110S146)</td><td>Prof. Gorsev Yener</td></tr> <tr> <td>The Scientific and Technological Research Council of Turkey (112S335)</td><td>Prof. Sermin Genc</td></tr> </table>		The Scientific and Technological Research Council of Turkey (110S146)	Prof. Gorsev Yener	The Scientific and Technological Research Council of Turkey (112S335)	Prof. Sermin Genc
The Scientific and Technological Research Council of Turkey (110S146)	Prof. Gorsev Yener					
The Scientific and Technological Research Council of Turkey (112S335)	Prof. Sermin Genc					
Abstract:	Background: Alzheimer's disease (AD) and frontotemporal dementia (FTD) are common dementia types and often show overlapping symptoms that can hamper clinical diagnosis of early-onset dementia. They represent a global health problem for both patients and their caregivers. Their definitive diagnosis is only possible post mortem and there are no early tests for their definitive diagnoses. Objective: The aim of this study is to identify differentially expressed miRNAs in both AD and FTD patients and also investigate their potential diagnostic values. Method: For this purpose, an initial microarray analysis was performed on a screening cohort (AD=10 and control=10). Real-time PCR was used to validate differentially expressed miRNAs in serum of the independent cohort (AD=24, FTD=17, and control=29). miRNA-KEGG pathway association network was generated using Cytoscape 3.5.1. Receiver operating characteristic (ROC) curves were plotted to determine the sensitivity, specificity, and accuracy values. Results: Five miRNAs (miR-20b, miR-663-3, miR-762, miR-320b and miR-1915-5p) were found to be differentially expressed in AD. Additionally, same expression pattern was found in serum derived exosomes. Further, network analysis revealed that predicted targets of differentially expressed miRNAs include axonal guidance, Ras, and estrogen signaling pathways and circadian rhythm. Among these miRNAs, miR-320b and miR-1915-5p were found to have 100% accuracy, sensitivity, and specificity. However, the accuracy of exosomal miRNAs was not above 80%. Conclusion: Our study suggests that serum and exosomal miRNAs are differentially expressed in AD and FTD and can be used to support differential diagnosis of AD and FTD.					
Corresponding Author:	Sermin Genc, MD, PhD Dokuz Eylul Universitesi Izmir International Biomedicine and Genome Institute Izmir, TURKEY					
Corresponding Author Secondary Information:						
Corresponding Author's Institution:	Dokuz Eylul Universitesi Izmir International Biomedicine and Genome Institute					
Corresponding Author's Secondary Institution:						
First Author:	Erden Eren					
First Author Secondary Information:						
Order of Authors:	<table border="1"> <tr><td>Erden Eren</td></tr> <tr><td>Erdogan Pekcan Erkan, PhD.</td></tr> <tr><td>Kemal Ugur Tufekci, PhD.</td></tr> <tr><td>Meryem Gulfem Oner</td></tr> </table>		Erden Eren	Erdogan Pekcan Erkan, PhD.	Kemal Ugur Tufekci, PhD.	Meryem Gulfem Oner
Erden Eren						
Erdogan Pekcan Erkan, PhD.						
Kemal Ugur Tufekci, PhD.						
Meryem Gulfem Oner						

	Gokhan Karakulah, PhD.
	Pembe Keskinoglu, MD. PhD.
	Gorsev Yener, MD. PhD.
	Sermin Genc, MD, PhD
Order of Authors Secondary Information:	
Opposed Reviewers:	



[Click here to view linked References](#)

Identification of circulatory miRNA's in Alzheimer's disease and Frontotemporal Dementia as potential biomarkers

Erden Eren^{1,2}, Erdogan Pekcan Erkan², Kemal Ugur Tufekci^{1,2}, Meryem Gulfem Oner², Gokhan Karakulah¹, Pembe Keskinoglu⁵, Gorsev Yener^{2,4}, Sermin Genc^{*1,2}

¹ Izmir International Biomedicine and Genome Institute Dokuz Eylul University, Izmir, Turkey

² Department of Neuroscience, Institute of Health Sciences, Dokuz Eylul University, Izmir, Turkey

³ Department of Biostatistics and Medical Informatics, Faculty of Medicine, Dokuz Eylul University, Izmir, Turkey

⁴ Department of Neurology, Dokuz Eylul University, Izmir, Turkey

* Corresponding Author

Sermin Genc, MD, Ph.D.

Izmir International Biomedicine and Genome Institute

Dokuz Eylul University, Izmir, Turkey

35340, Inciralti, Izmir

Phone: 90.232.4126552

Fax: 90.232.4126509

E-mail: sermin.genc@deu.edu.tr

Abstract

Background: Alzheimer's disease (AD) and frontotemporal dementia (FTD) are common dementia types and often show overlapping symptoms that can hamper clinical diagnosis of early-onset dementia. They represent a global health problem for both patients and their caregivers. Their definitive diagnosis is only possible post mortem and there are no early tests for their definitive diagnoses.

Objective: The aim of this study is to identify differentially expressed miRNAs in both AD and FTD patients and also investigate their potential diagnostic values.

Method: For this purpose, an initial microarray analysis was performed on a screening cohort (AD=10 and control=10). Real-time PCR was used to validate differentially expressed miRNAs in serum of the independent cohort (AD=24, FTD=17, and control=29). miRNA-KEGG pathway association network was generated using Cytoscape 3.5.1. Receiver operating characteristic (ROC) curves were plotted to determine the sensitivity, specificity, and accuracy values.

Results: Five miRNAs (miR-20b, miR-663-3, miR-762, miR-320b and miR-1915-5p) were found to be differentially expressed in AD. Additionally, same expression pattern was found in serum derived exosomes. Further, network analysis revealed that predicted targets of differentially expressed miRNAs include axonal guidance, Ras, and estrogen signaling pathways and circadian rhythm. Among these miRNAs, miR-320b and miR-1915-5p were found to have 100% accuracy, sensitivity, and specificity. However, the accuracy of exosomal miRNAs was not above 80%.

Conclusion: Our study suggests that serum and exosomal miRNAs are differentially expressed in AD and FTD and can be used to support differential diagnosis of AD and FTD.

Keywords: Dementia; Alzheimer's disease; Frontotemporal dementia; microRNA; serum;
biomarker; neurodegeneration, exosome



Introduction

Alzheimer's disease (AD) and frontotemporal dementia (FTD) are the first and the second most common causes of early onset dementia, respectively [1]. AD commonly presents with progressive memory loss while, FTD is characterized by the predominance of behavioral and language disturbances. Since, clinical phenotypes of AD and FTD often overlap, the differential diagnosis between these two diseases may be challenging [2]. Definitive diagnosis of both AD and FTD is possible only with post-mortem histopathological examination of the brain tissue.

With the emergence of miRNAs as important regulators in physiological and pathological pathways in brain in the last few years, their possible role in neurodegenerative disorders has gained increasing interest. Recent studies have shown that expression levels of miRNAs are altered under different pathological conditions as well as neurodegenerative diseases [3-5]. These miRNAs can be found in various body fluids such as urine, saliva and cerebrospinal fluid (CSF) in secreted (or circulating) form [6]. They were shown to be very stable in circulation and their tissue/cell specific expression can reflect disease pathology. Their detection and analyses are also considerably easy with current methodology. Therefore, given these features makes them ideal biomarker candidates (e.g. real-time PCR) [7]. They, therefore, can serve as a key starting point for biomarker studies in neurodegenerative diseases, especially because of cost-effectiveness, easy applicability, and minimal invasiveness. Even though altered miRNA expressions in FTD have been reported in various studies [8], there is no report on use of miRNA as a biomarker for discriminating FTD from other types of dementia or control subjects. However, a number of studies have envisaged miRNA signatures as biomarkers for AD (Reviewed in [3]).

miRNAs can also be detected in biological fluids as encapsulated within extracellular vesicles such as exosomes, which are small membrane-derived vesicles that measure about 30-150 nm

1 in diameter [9]. Previous studies have shown that exosomes are highly enriched in miRNAs
2 and their cargoes are protected from degradation and free from endogenous ribosomal RNA
3 contaminations [9]. Further, studies have also suggested that miRNA expression profiles in
4 exosomes can be promising prognostic markers for neurodegenerative diseases [10, 11]. Till
5 date, different groups have reported the several altered exosomal miRNAs in AD patients [9,
6 12, 13].

7
8
9
10
11
12
13
14 In this study, we have attempted to identify novel miRNAs that could discriminate AD and
15 FTD patients from healthy controls. First, we carried out microarray-based screening to
16 determine the differentially expressed serum miRNAs in AD patients and control subjects.
17 Then, we used quantitative real-time PCR to validate the 10 most significant miRNA hits in an
18 independent group of AD patients, FTD patients, and control subjects.
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

Material and Methods

Study participants

Ten patients diagnosed with AD and 10 control subjects were included in the initial screening cohort. Twenty-four patients diagnosed with AD, 17 patients diagnosed with FTD and 29 normal control subjects were included in the independent cohort. Patients with FTD and AD were recruited from the Department of Neurology, Dokuz Eylul University Hospital, Izmir. Clinical diagnosis of probable AD was made according to Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, 4th edition (DSM-IV) and the National Institute of Neurological and Communicative Disorders and Stroke and the Alzheimer's disease and Related Disorders Association (NINCDS-ADRDA) diagnostic criteria [14]. FTD diagnosis was made according to the new revised consensus criteria [15]. Control subjects were chosen from individuals who required spinal anesthesia for any surgical intervention. None of the control subjects had history, symptoms, or signs of cognitive or other neurological disorders. All control subjects had a clinical dementia rating (CDR) score of 0.

Informed written consent was obtained from all participants or their legal representatives prior to participation. Ethics approval was granted from the Clinical Research Ethics Committee of Dokuz Eylul University Faculty of Medicine.

Sample collection

CSF and blood samples were collected and stored according to the Alzheimer's Biomarkers Standardization Initiative guidelines [16]. Sample collection was performed during routine clinical assessment. CSF samples were collected into 10 ml polypropylene tubes with screw caps (Sarstedt, Germany). Blood samples were collected into clot activator-containing tubes (Vacutest Kima, Italy). Then, samples were centrifuged at 2,000 x g for 10 minutes. Aliquots of 500 µl of the supernatants were transferred to 0.5 ml polypropylene screw cap tubes

(Sarstedt, Germany). Collected samples were stored at -80°C for 1-2 years. Samples did not undergo freeze-thaw cycles.

Amyloid-beta ($A\beta_{(1-42)}$) and pTau_(181P) ELISA

For quantification of $A\beta_{(1-42)}$ levels and pTau_(181P) levels in CSF samples, the INNOTEST® β -AMYLOID (1-42) (Innogenetics, Belgium; Cat#:80324) and the INNOTEST PHOSPHO-TAU (181P) solid-phase enzyme immunoassay kit (Innogenetics, Belgium; Cat#: 80317), respectively, were used according to the manufacturer's instructions. The absorbance at 450 nm was measured on a spectrophotometric multiplate reader. For background subtraction, absorbance at 620 nm was measured.

Isolation of circulating miRNAs

miRCURY miRNA isolation kit-Body fluids (Exiqon, Denmark; Cat#: 300112) was used to isolate circulating RNAs from serum samples. Briefly, 200 microliters of serum samples were used for RNA isolation. During RNA isolation, synthetic ce-miR-39 (Qiagen, Germany; Cat#: 219610) was added as a spike-in RNA, after the addition of lysis reagent. RNA samples were eluted in nuclease-free water, and quantified on a Nanodrop 2000™ spectrophotometer (Thermo Scientific, USA). Samples were stored at -80°C until further analysis.

Exosome isolation and quantification from serum samples

To isolate exosomes from serum samples, Total Exosome Isolation (from serum) kit (Invitrogen, Life Technologies, USA; Cat#: 4478360) was used according to the manufacturer's instructions. Exosome pellets were resuspended in 100 μ l of 1X PBS. Exosome samples were stored at -80°C until further analysis. For characterization of exosome samples, dynamic light scattering was carried out using Zetasizer nanoseries instrument (Malvern Nano-Zetasizer, Country; λ = 532 nm laser wavelength). Following isolation, samples were diluted 1:1000 with Phosphate buffered saline (PBS) prior to analysis. Each measurement was carried out in triplicate.

For quantification of exosome samples, ExoCET kit exosome quantitation assay (System Biosciences, CA, USA; Cat#: EXOCET96A-1) were used according to the manufacturer's instructions. Absorbance was measured at 405 nm. A standard curve was plotted, and total particle number was calculated according to the standard curve.

Exosomal RNA isolation

miRNeasy RNA isolation kit (QIAGEN, Germany; Cat#: 217004) was used to isolate exosomal RNAs. Briefly, 80 microliters of exosome samples were used for RNA isolation. Synthetic ce-miR-39 was added as a spike-in RNA, after addition of lysis reagent. Exosomal RNA samples were eluted in nuclease-free water, and quantified on a spectrophotometer (NanoDrop 2000, Thermo-Scientific, USA). Samples were stored at -80°C until further analysis.

Analysis of differential miRNA expression

Microarray analysis was carried out by Aros Applied Biotechnology A/S (Denmark). GeneChip miRNA 2.0 Array (Affymetrix) was used for expression analysis. The probes on chips include 15,644 probe sets belonging to 131 organisms, which were designed to all mature and mature* sequences available on MirBase release 15.0 (April 2010). (<http://microrna.sanger.ac.uk/sequences/index.shtml>).

Bioinformatics Analysis

We predicted putative targets of miRNAs (hsa-miR-762, hsa-miR-663a, hsa-miR-320b and hsa-miR-1915-5p) and their associated Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) pathways with DIANA-mirPath v.3 online analysis suit [17]. We set the significance level of KEGG enrichments analysis to 0.001 and significant miRNA-KEGG pathway association network was generated using Cytoscape 3.5.1[18].

Reverse-transcription

Equal amount of serum and exosomal RNA samples (40 ng) were reverse-transcribed by using the miScript RT II kit (QIAGEN, Germany; Cat#: 218161) according to the manufacturer's

instructions. Then, cDNA samples were diluted with nuclease-free water to a final volume of 40 µl, and stored at -20 C until real-time PCR.

Real-time PCR

Specific miRNA primer assays (QIAGEN, Germany) and miScript SYBR Green PCR kit (QIAGEN, Germany; Cat#: 218075) were used for real-time PCR experiments. miRNAs with a cut-off value for $C_t \leq 35$ were considered to be actively expressed. The $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method was used to determine relative gene expression [19]. The synthetic miRNA ce-miR-39 was used to normalize gene expression.

Statistical analysis

Statistical analyses were performed on SPSS v.22.0 (IBM, USA) and graphs were prepared with Prism 7.0a (Graphpad, USA). Continuous variables were represented with mean $\pm$ standard error of mean (S.E.M). Categorical variables were represented with frequencies and percentages. Kolmogorov-Smirnov test was used to analyze the distribution of serum and exosomal miRNA levels in all groups. For non-normally distributed variables, Kruskal-Wallis test was used to analyze the difference between the groups. For significant parameters identified by Kruskal-Wallis test, Mann-Whitney U test with Dunn correction was used to determine which groups were responsible for the observed difference. Statistical significance was established at an alpha value of 0.05.

Receiver operating characteristic (ROC) curve analysis was carried out to analyze the discriminating features of serum and exosomal miRNAs between different groups. For ROC curve analysis, statistical significance was established at area under curve (AUC) >0.85 and alpha <0.001 . The optimal cut-off points, sensitivity and specificity values were calculated for individual miRNAs accordingly.

Chi-square test was used to compare gender differences between the groups. Unpaired t-test was used to analyze the differences in pTau_(181P) levels, A β ₍₁₋₄₂₎ levels, and total exosome numbers between the groups.



Results

Characteristics of study participants

Ten healthy subjects and 10 AD patients were recruited for an initial screening study. For discovery set, the mean age of control subjects was 69.5 ± 9.9 . The male/female ratio was 6/4. For AD patients, the mean age was 76.9 ± 2.1 years. The male/female ratio was 2/8, and the mean MMSE score was 17.4 ± 2.4 . We also used independent samples, which consisted of control subject (n=29), AD patients (n=24) and FTD patients (n=17). The mean age of control subjects, AD, and FTD patients were 64.7 ± 11.2 , 61.1 ± 1.6 and 57.5 ± 2.8 years, respectively. The male/female ratio was 22/7, 9/15 and 10/7, respectively. The mean MMSE scores of AD and FTD patients were 16.5 ± 1.6 and 15.2 ± 1.9 respectively. To support clinical diagnosis, we used commercial ELISA kits to quantify pTau(181P) and A β (1-42) levels in CSF samples of all patients to further confirm AD diagnosis. A β (1-42) levels were significantly lower in AD patients ($569.2 \text{ pg/ml} \pm 53.31$), compared to control subjects ($1181.0 \text{ pg/ml} \pm 52.90$). However, there was no significant difference between FTD patients ($655.9 \text{ pg/ml} \pm 50.45$) and AD patients. pTau(181P) levels were significantly higher in AD patients ($90.74 \text{ pg/ml} \pm 8.24$), compared to control subjects ($41.15 \text{ pg/ml} \pm 3.05$). Additionally, there was a significant difference between FTD patients ($43.24 \text{ pg/ml} \pm 5.95$) and AD patients. Taken together, these results further support the diagnosis of AD.

Microarray analysis reveals differentially expressed miRNAs in AD

To identify differentially expressed miRNAs in serum of AD patients, we used human GeneChip miRNA 2.0 Array (Affymetrix) to analyze global miRNA expression in a discovery set. Microarray analysis showed that 21 miRNAs were differentially expressed between AD patients and control subjects. Eleven miRNAs were upregulated in AD patients, whereas 10 miRNAs were downregulated in AD patients, compared to control subjects. After applying

selection criteria (selection criteria: 2-fold; $p < 0.05$) (Table 1; highlighted in grey), we selected 10 of 21 miRNAs for further experiments.

Expressions of selected miRNAs in serum and serum-derived exosomes in AD and FTD

Selected 10 miRNAs were analyzed with RT-qPCR using serum samples from independent cohort. Considering the results of microarray screening, we were able to validate the five miRNAs in the independent cohort. miR-20b was significantly upregulated. On the other hand, miR-663, miR-762, miR-320b, and miR-1915-5p were significantly downregulated in AD compared with the control subjects (Figure 1). We, however, could not detect miR-320c with qPCR in both serum and serum-derived exosome samples.

We further pursued to explore whether the same set of miRNAs could be found in exosomes which were isolated from serum samples of independent cohort. Isolated exosomes were confirmed by using commercial ELISA-based assays and dynamic light scattering (DLS). (SI Figure 1). The same set of validated miRNAs were analyzed by RT-qPCR in serum-derived exosomes and we observed the consistent results for miR-663, miR-762, miR-320b and miR-1915-5p with serum miRNAs. However, expression of miR-20b was not significantly changed in AD compared to control subjects ($p = 0.173$) (Figure 2). Normalized Ct values for miRNAs were depicted as heat map and found in SI Figure 2. Taken together, our results show that exosomal miRNA profiling can yield similar results as the serum-based miRNA profiling.

Bioinformatics analysis of differentially expressed miRNAs

In the next step, we searched for more mechanistic evidence for biomarker potential of differentially expressed miRNAs. For this purpose, we analyzed the association of miRNAs with related pathways of AD. KEGG pathway enrichment analysis of differentially expressed miRNAs with DIANA-mirPath v.3 revealed that axon guidance, Ras, and estrogen signaling pathways and circadian rhythm pathways may be modulated with de-regulation of miR-320b,

miR-1915-5p, miR-663a and miR-762 and found to be good biomarker candidates in our study (Figure 3).

Evaluating the potential of miRNAs as diagnostic markers for dementia

Eventually, we evaluated the diagnostic potential of miRNAs for dementia. We created ROC curves for serum and exosomal miRNAs and calculated the area under curve (AUCs) at 95% confidence intervals. Since most of the published biomarker candidates have accuracy between 70 - 90%, we pursued to look for miRNAs that have better accuracy. We, therefore, applied a selection criterion (>90% accuracy) to determine more reliable biomarker candidates. The complete list for ROC analysis can be found in SI Table 2. For serum miRNAs, only hsa-miR-320b had >90% accuracy to discriminate AD patients from control subjects. miR-663-3, miR-762, miR-320b and miR-1915-5p had >90% accuracy to discriminate AD patients from FTD patients (Figure 4). Notably, hsa-miR-320b and hsa-miR-1915-5p had perfect accuracy (Sensitivity: 100% and Specificity: 100% for both miRNAs). The same set of miRNAs also had >90% accuracy to discriminate FTD patients from control subjects. Similarly, hsa-miR-320b and hsa-miR-1915-5p had perfect accuracy (Sensitivity: 100% and Specificity: 100% for both miRNAs). No exosomal miRNAs could show more than 80% accuracy (SI Table 2).

Discussion

Some recent studies have reported differential expression of miRNAs in brain and CSF samples of different neurodegenerative diseases [8, 20]. Interestingly, certain miRNA signatures have the potential of reflecting disease progression and/or help to differentiate diseases with overlapping symptoms [21]. Several studies have relied on analysis of different body fluids (CSF, serum, and plasma) to identify differentially expressed miRNAs in different neurodegenerative diseases (Reviewed in [7]). Our recent study shows differentially expressed miRNAs in AD compared to FTD and control subjects. Microarray analysis of our screening samples show 21 differentially expressed serum miRNAs in AD patients compared to controls. Importantly, we validated differentially expressed miR-20b, miR-663-3, miR-762, miR-320b and miR-1915-5p using independent samples. In particular, serum hsa-miR-320b and miR-1915-5p have promising diagnostic potential in discriminating FTD from AD and control subjects. These microRNAs expression changes have not been reported in Alzheimer's disease. There are also inconsistent or discrepant results in previous miRNA expression changes studies. It is likely that differences in analysis of data, source of miRNA and several pre-analytical factors all of which can cause inconsistency among these studies could have precluded the identification of possible biomarkers.

To the question whether these miRNAs have a further role in neurodegeneration-related pathways, we established a network analysis using predicted targets of those differentially expressed miRNAs. Predicted targets of our miRNAs showed that miR-762, miR-320b and miR-1915-5p are involved in Ras signaling pathway [22], axon guidance [23, 24], estrogen signaling pathway [25, 26] and in circadian rhythm [27, 28]. Most pertinent to note is that these pathways are intertwined and, their dysregulation can lead to the pathogenesis of neurodegenerative diseases [29, 30]. Particularly, miR-663 has been reported to bind directly to TDP-43, which is known to have role in FTD and ALS [31] and further, mimicking of miR-

663 has been reported to suppress human neural stem cell differentiation [32]. On the other hand, upregulation of miR-320b is reported in prion induced neurodegeneration and, downregulation of it in peripheral blood of schizophrenia patients [33]. miR-762 is reported to upregulate the M2 phenotype of microglia [34]. However, a genuine interaction between these miRNAs and proteins in the above pathways remains to be validated.

Current diagnoses of AD and FTD are mostly dependent on exclusion of other neurological diseases and involves application of expensive and time-consuming methods such as histopathological and psychological tests and brain imaging. To date, methods of clinical and molecular analysis have yielded valuable biomarker candidates. CSF-based biomarkers, including amyloid- β ($A\beta_{(1-42)}$), total Tau, and phosphorylated-tau ($p\text{Tau}_{(181P)}$) are being used to support the diagnosis of AD, yet, these CSF-based biochemical biomarkers requires an invasive sample collection procedure which limits the use of such markers in drug trials, longitudinal studies and monitoring of disease progression [35]. These highlight the imperativeness to develop novel biomarkers that are non-invasive, cheap, and fast. Studies on the feasibility of discovering blood-based biomarkers for neurodegeneration has seen an increase during the last decade. The sampling procedure in blood-based screening studies is less invasive compared to CSF [36] and allows repeated measurements. Therefore, we investigated the discriminative power of these miRNAs in different patient groups via ROC curve analysis. Our results suggest that serum hsa-miR-663-3, hsa-miR-762, and hsa-320b can discriminate AD patients from control subjects with >85% accuracy. This level of accuracy is quite higher compared to the other studies [37, 38]. On the other hand, our results fall short to reach the level of accuracy obtained by Leidinger et al. and Kumar et al. (2013), which have reached of 93% accuracy and 95% accuracy, respectively [39, 40].

Significant transcriptomic alterations, particularly in the mRNA-miRNA networks (reviewed in [41]), have been identified in FTD patients. It has been suggested that certain deregulated

1 miRNAs or mutations in FTD-related genes can result in FTD-specific miRNA signatures [41,
2 42]. Defective miRNA biogenesis and specific miRNA genes are considered to contribute to
3 pathogenesis of FTD [43]. We also investigated miRNAs that can discriminate FTD patients
4 from control subjects and AD patients. Our results show that 4 miRNAs (hsa-miR-663, hsa-
5 miR-762, hsa-miR-320b and hsa-miR-1915-5p) can discriminate AD patients from FTD
6 patients, and FTD patients from control subjects with >90% accuracy. Notably, hsa-miR-320b
7 and hsa-miR-1915-5p had 100% accuracy. A recent study reported that combined set of
8 miRNAs can differentiate FTD from control subjects or AD. However, their findings showed
9 that these combined set of brain-enriched miRNAs (miR-9*/miR-129-3p, miR-7/miR-451 and
10 miR-335-5p/ let-7e) showed less than 85% of accuracy [44]. When compared to our results,
11 their accuracy falls behind of diagnostic potential of our miRNAs.
12

13
14 Given their potential to carry disease-specific proteins and/or nucleic acids, exosomes gained
15 great attention as diagnostic markers. A growing body of evidence also suggests that they are
16 highly stable in body fluids and enriched with miRNAs [9]. AD-specific 16 miRNAs, which
17 isolated from serum-derived exosomes have been proposed to predict AD [45]. Additionally,
18 Gui et al. showed that combinational use of CSF-derived exosomal miR-153 and miR-409-3p
19 can be used as reliable diagnostic markers for Parkinson's disease with 99% of accuracy [11].
20 Combination of three serum-derived exosome miRNAs can predict relapsing-remitting
21 multiple sclerosis with high accuracy [46]. Here, we analyzed the expression levels of miRNAs
22 in exosomes isolated from serum samples of AD, FTD and control subjects. Our results
23 suggested that these exosomal miRNAs give consistent results as serum miRNAs, yet their
24 diagnostic potential fall behind the diagnostic potential of serum miRNAs. Fiandanca et al.
25 showed that neural derived exosomes can increase classification of AD and FTD patients [12].
26 Therefore, neural derived exosomes can be used to increase the diagnostic potential of our
27 miRNAs.
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1 Patient recruitment from a single center, small sample size and lack of pathological
2 confirmation of the participants are the important limitations of our study. We also used the
3
4 CSF core biomarker profile, together with clinical diagnosis, to increase the likelihood of a
5
6 correct diagnosis. Furthermore, different biological factors either from the underlying
7
8 neurological condition or, from patients' overall physical condition, may affect serum miRNA
9
10 expression levels, and hence, could probably have a confounding effect on the observed results.
11
12 Finally, due to overlap in expression levels of miRNAs, more than one miRNA should be
13
14 required to assign a diagnostic value.
15
16
17

18 **Conclusion**

19
20 In the present study, we could identify several differentially expressed miRNAs in AD, FTD
21
22 and control subjects. We also discerned that serum hsa-miR-320b and hsa-miR-1915-5p levels
23
24 could be employed to discriminate AD patients from FTD patients with perfect accuracy.
25
26 Additional studies need to be carried out in a larger patient cohort to validate the diagnostic
27
28 potential of these miRNAs.
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

Declarations

Acknowledgements

We kindly thank Dr. Gulsah Boluk, Dr. Anil Tanburoglu, Dr. Nurhak Demir and Prof. Dr. Leyla İyilikçi for their valuable technical input. This study received financial support from the national grant from the Scientific and Technological Research Council of Turkey (TUBITAK) (Project number 110S146 and 112S335).

EE, EPE, KUT, and MGO designed the research; EE and EPE conducted the experiments; KUT, assisted during the experiments; MGO performed microarray and initial screening experiments; GK performed bioinformatics; PK, SG and GY analyzed the data; and Erden Eren, All authors contributed in writing the manuscript. Sermin Genc had primary responsibility for the final content. All authors read and approved the final manuscript.

Conflict of interest

The authors declare no potential conflict of interest.

References

1. Rivero-Santana A, Ferreira D, Perestelo-Perez L, Westman E, Wahlund LO, Sarria A, Serrano-Aguilar P: **Cerebrospinal Fluid Biomarkers for the Differential Diagnosis between Alzheimer's Disease and Frontotemporal Lobar Degeneration: Systematic Review, HSROC Analysis, and Confounding Factors.** *J Alzheimers Dis* 2017, **55**(2):625-644.
2. Du AT, Schuff N, Kramer JH, Rosen HJ, Gorno-Tempini ML, Rankin K, Miller BL, Weiner MW: **Different regional patterns of cortical thinning in Alzheimer's disease and frontotemporal dementia.** *Brain* 2007, **130**(Pt 4):1159-1166.
3. Batistela MS, Josviak ND, Sulzbach CD, de Souza RL: **An overview of circulating cell-free microRNAs as putative biomarkers in Alzheimer's and Parkinson's Diseases.** *Int J Neurosci* 2017, **127**(6):547-558.
4. Correia CN, Nalpas NC, McLoughlin KE, Browne JA, Gordon SV, MacHugh DE, Shaughnessy RG: **Circulating microRNAs as Potential Biomarkers of Infectious Disease.** *Front Immunol* 2017, **8**:118.
5. Matsuzaki J, Ochiya T: **Circulating microRNAs and extracellular vesicles as potential cancer biomarkers: a systematic review.** *Int J Clin Oncol* 2017, **22**(3):413-420.
6. Tufekci KU, Meuwissen RL, Genc S: **The role of microRNAs in biological processes.** *Methods Mol Biol* 2014, **1107**:15-31.
7. Kumar S, Reddy PH: **Are circulating microRNAs peripheral biomarkers for Alzheimer's disease?** *Biochim Biophys Acta* 2016, **1862**(9):1617-1627.
8. Grasso M, Piscopo P, Confaloni A, Denti MA: **Circulating miRNAs as biomarkers for neurodegenerative disorders.** *Molecules* 2014, **19**(5):6891-6910.
9. Cheng L, Sharples RA, Scicluna BJ, Hill AF: **Exosomes provide a protective and enriched source of miRNA for biomarker profiling compared to intracellular and cell-free blood.** *J Extracell Vesicles* 2014, **3**.
10. Lugli G, Cohen AM, Bennett DA, Shah RC, Fields CJ, Hernandez AG, Smalheiser NR: **Plasma Exosomal miRNAs in Persons with and without Alzheimer Disease: Altered Expression and Prospects for Biomarkers.** *PLoS One* 2015, **10**(10):e0139233.
11. Gui Y, Liu H, Zhang L, Lv W, Hu X: **Altered microRNA profiles in cerebrospinal fluid exosome in Parkinson disease and Alzheimer disease.** *Oncotarget* 2015, **6**(35):37043-37053.
12. Fiandaca MS, Kapogiannis D, Mapstone M, Boxer A, Eitan E, Schwartz JB, Abner EL, Petersen RC, Federoff HJ, Miller BL *et al*: **Identification of preclinical Alzheimer's disease by a profile of pathogenic proteins in neurally derived blood exosomes: A case-control study.** *Alzheimers Dement* 2015, **11**(6):600-607 e601.
13. Van Giau V, An SS: **Emergence of exosomal miRNAs as a diagnostic biomarker for Alzheimer's disease.** *J Neurol Sci* 2016, **360**:141-152.
14. McKhann G, Drachman D, Folstein M, Katzman R, Price D, Stadlan EM: **Clinical diagnosis of Alzheimer's disease: report of the NINCDS-ADRDA Work Group under the auspices of Department of Health and Human Services Task Force on Alzheimer's Disease.** *Neurology* 1984, **34**(7):939-944.
15. Rascovsky K, Hodges JR, Knopman D, Mendez MF, Kramer JH, Neuhaus J, van Swieten JC, Seelaar H, Dopper EG, Onyike CU *et al*: **Sensitivity of revised diagnostic criteria for the behavioural variant of frontotemporal dementia.** *Brain* 2011, **134**(Pt 9):2456-2477.
16. Vanderstichele H, Bibl M, Engelborghs S, Le Bastard N, Lewczuk P, Molinuevo JL, Parnetti L, Perret-Liaudet A, Shaw LM, Teunissen C *et al*: **Standardization of preanalytical aspects of cerebrospinal fluid biomarker testing for Alzheimer's disease diagnosis: a consensus paper from the Alzheimer's Biomarkers Standardization Initiative.** *Alzheimers Dement* 2012, **8**(1):65-73.
17. Vlachos IS, Zagganas K, Paraskevopoulou MD, Georgakilas G, Karagkouni D, Vergoulis T, Dalamagas T, Hatzigeorgiou AG: **DIANA-miRPath v3.0: deciphering microRNA function with experimental support.** *Nucleic Acids Res* 2015, **43**(W1):W460-466.
18. Shannon P, Markiel A, Ozier O, Baliga NS, Wang JT, Ramage D, Amin N, Schwikowski B, Ideker T: **Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks.** *Genome Res* 2003, **13**(11):2498-2504.
19. Livak KJ, Schmittgen TD: **Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method.** *Methods* 2001, **25**(4):402-408.
20. Viswambharan V, Thanseem I, Vasu MM, Poovathinal SA, Anitha A: **miRNAs as biomarkers of neurodegenerative disorders.** *Biomark Med* 2017, **11**(2):151-167.
21. Shafi G, Aliya N, Munshi A: **MicroRNA signatures in neurological disorders.** *Can J Neurol Sci* 2010, **37**(2):177-185.
22. Kirouac L, Rajic AJ, Cribbs DH, Padmanabhan J: **Activation of Ras-ERK Signaling and GSK-3 by Amyloid Precursor Protein and Amyloid Beta Facilitates Neurodegeneration in Alzheimer's Disease.** *eNeuro* 2017, **4**(2).

23. Lin L, Lesnick TG, Maraganore DM, Isacson O: **Axon guidance and synaptic maintenance: preclinical markers for neurodegenerative disease and therapeutics.** *Trends Neurosci* 2009, **32**(3):142-149.
24. Van Battum EY, Brignani S, Pasterkamp RJ: **Axon guidance proteins in neurological disorders.** *Lancet Neurol* 2015, **14**(5):532-546.
25. Wang C, Zhang F, Jiang S, Siedlak SL, Shen L, Perry G, Wang X, Tang B, Zhu X: **Estrogen receptor-alpha is localized to neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease.** *Sci Rep* 2016, **6**:20352.
26. Wang YQ, Qu DH, Wang K: **Therapeutic approaches to Alzheimer's disease through stimulating of non-amyloidogenic processing of amyloid precursor protein.** *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2016, **20**(11):2389-2403.
27. La Morgia C, Ross-Cisneros FN, Sadun AA, Carelli V: **Retinal Ganglion Cells and Circadian Rhythms in Alzheimer's Disease, Parkinson's Disease, and Beyond.** *Front Neurol* 2017, **8**:162.
28. Kang DW, Lee CU, Lim HK: **Role of Sleep Disturbance in the Trajectory of Alzheimer's Disease.** *Clin Psychopharmacol Neurosci* 2017, **15**(2):89-99.
29. Godoy JA, Rios JA, Zolezzi JM, Braidly N, Inestrosa NC: **Signaling pathway cross talk in Alzheimer's disease.** *Cell Commun Signal* 2014, **12**:23.
30. Serchov T, Heumann R: **Constitutive activation of ras in neurons: implications for the regulation of the mammalian circadian clock.** *Chronobiol Int* 2006, **23**(1-2):191-200.
31. Buratti E, De Conti L, Stuani C, Romano M, Baralle M, Baralle F: **Nuclear factor TDP-43 can affect selected microRNA levels.** *FEBS J* 2010, **277**(10):2268-2281.
32. Shu R, Wong W, Ma QH, Yang ZZ, Zhu H, Liu FJ, Wang P, Ma J, Yan S, Polo JM *et al*: **APP intracellular domain acts as a transcriptional regulator of miR-663 suppressing neuronal differentiation.** *Cell Death Dis* 2015, **6**:e1651.
33. Vachev TI, Popov NT, Stoyanova VK, Ivanov HY, Minchev DS: **Alterations of miR-320 Family Members as a Novel Diagnostic Biomarkers in Peripheral Blood of Schizophrenia Patients.** *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences* 2016, **5**(3):865-875.
34. Martinez B, Peplow PV: **Immunomodulators and microRNAs as neurorestorative therapy for ischemic stroke.** *Neural Regen Res* 2017, **12**(6):865-874.
35. Sharma N, Singh AN: **Exploring Biomarkers for Alzheimer's Disease.** *J Clin Diagn Res* 2016, **10**(7):KE01-06.
36. Thambisetty M, Lovestone S: **Blood-based biomarkers of Alzheimer's disease: challenging but feasible.** *Biomark Med* 2010, **4**(1):65-79.
37. Tan L, Yu JT, Tan MS, Liu QY, Wang HF, Zhang W, Jiang T, Tan L: **Genome-wide serum microRNA expression profiling identifies serum biomarkers for Alzheimer's disease.** *J Alzheimers Dis* 2014, **40**(4):1017-1027.
38. Galimberti D, Villa C, Fenoglio C, Serpente M, Ghezzi L, Cioffi SM, Arighi A, Fumagalli G, Scarpini E: **Circulating miRNAs as potential biomarkers in Alzheimer's disease.** *J Alzheimers Dis* 2014, **42**(4):1261-1267.
39. Leidinger P, Backes C, Deutscher S, Schmitt K, Mueller SC, Frese K, Haas J, Ruprecht K, Paul F, Stahler C *et al*: **A blood based 12-miRNA signature of Alzheimer disease patients.** *Genome Biol* 2013, **14**(7):R78.
40. Kumar P, Dezso Z, MacKenzie C, Oestreicher J, AgoulNIK S, Byrne M, Bernier F, Yanagimachi M, Aoshima K, Oda Y: **Circulating miRNA biomarkers for Alzheimer's disease.** *PLoS One* 2013, **8**(7):e69807.
41. Gascon E, Gao FB: **The emerging roles of microRNAs in the pathogenesis of frontotemporal dementia-amyotrophic lateral sclerosis (FTD-ALS) spectrum disorders.** *J Neurogenet* 2014, **28**(1-2):30-40.
42. Kocerha J, Kouri N, Baker M, Finch N, DeJesus-Hernandez M, Gonzalez J, Chidamparam K, Josephs KA, Boeve BF, Graff-Radford NR *et al*: **Altered microRNA expression in frontotemporal lobar degeneration with TDP-43 pathology caused by progranulin mutations.** *BMC Genomics* 2011, **12**:527.
43. Eitan C, Hornstein E: **Vulnerability of microRNA biogenesis in FTD-ALS.** *Brain Res* 2016, **1647**:105-111.
44. Sheinerman KS, Toledo JB, Tsivinsky VG, Irwin D, Grossman M, Weintraub D, Hurtig HI, Chen-Plotkin A, Wolk DA, McCluskey LF *et al*: **Circulating brain-enriched microRNAs as novel biomarkers for detection and differentiation of neurodegenerative diseases.** *Alzheimers Res Ther* 2017, **9**(1):89.
45. Cheng L, Doecke JD, Sharples RA, Villemagne VL, Fowler CJ, Rembach A, Martins RN, Rowe CC, Macaulay SL, Masters CL *et al*: **Prognostic serum miRNA biomarkers associated with Alzheimer's**

disease shows concordance with neuropsychological and neuroimaging assessment. *Mol Psychiatry* 2015, **20**(10):1188-1196.

46. Ebrahimkhani S, Vafae F, Young PE, Hur SSJ, Hawke S, Devenney E, Beadnall H, Barnett MH, Suter CM, Buckland ME: **Exosomal microRNA signatures in multiple sclerosis reflect disease status**. *Sci Rep* 2017, **7**(1):14293.



Figure Legends:

Figure 1: Differentially expressed miRNAs in serum samples. Relative expression levels of serum-derived miRNAs were assessed with qRT-PCR. Differences between groups were analyzed with Kruskal-Wallis Test and Mann Whitney-U test, ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$.

Figure 2: Differentially expressed serum-derived exosomal miRNAs. Relative quantification of exosome-derived miRNAs was evaluated with qRT-PCR. Differences between groups were analyzed with Kruskal-Wallis Test and Mann Whitney-U test, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$.

Figure 3: miRNA-Pathway network map for selected miRNAs. After selection and validation of differentially expressed miRNAs, network map was generated using Cytoscape.

Color of pathway nodes indicate significance level.

SI Figure 1: Characterization of exosomes. Following exosome isolation from serum samples, three independent assays were used to characterize exosome samples. **(A)** Dynamic light scattering (DLS) analysis was carried out to determine the size distribution of exosomes. The result of a representative sample (mean diameter ~90 nm) is shown. **(B)** ExoCET assay (System Biosciences, USA) was used to analyze acetyl-CoA acetylcholinesterase (AChE) activity, which is known to be enriched in exosomes. Data represent mean $\pm$ S.E of 5 randomly selected samples.

SI Figure 2: Heatmap showing Δ Ct values. The heatmap shows normalized Ct values of both serum and serum derived exosome miRNAs in Control subjects, AD and FTD patients.

Table 2: Differentially expressed microRNAs between patients with Alzheimer's disease and control subjects

miRNA	Relative expression (AD/Control)	<i>p</i> value*
<u>Upregulated</u>		
hsa-miR-16	6.16	0.046
hsa-miR-126	2.09	0.044
hsa-miR-20b	2.02	0.016
hsa-miR-15a	1.56	0.039
hsa-miR-30d	1.35	0.037
hsa-miR-660	1.29	0.003
hsa-miR-324-3p	1.23	0.024
hsa-miR-92b	1.22	0.026
hsa-miR-3148	1.21	0.044
hsa-miR-1263	1.16	0.001
<u>Downregulated</u>		
hsa-miR-129-3p	0.90	0.043
hsa-miR-1825	0.74	0.017
hsa-miR-1280	0.72	0.034
hsa-miR-762	0.46	0.031
hsa-miR-1915	0.45	0.017
hsa-miR-663	0.44	0.002
hsa-miR-320b	0.43	0.034
hsa-miR-320c	0.43	0.020
hsa-miR-1469	0.39	0.005
hsa-miR-320a	0.36	0.023

* Mann-Whitney U-test, $p < 0.05$

Figure 1

[Click here to download Figure Figure 1.tiff](#)

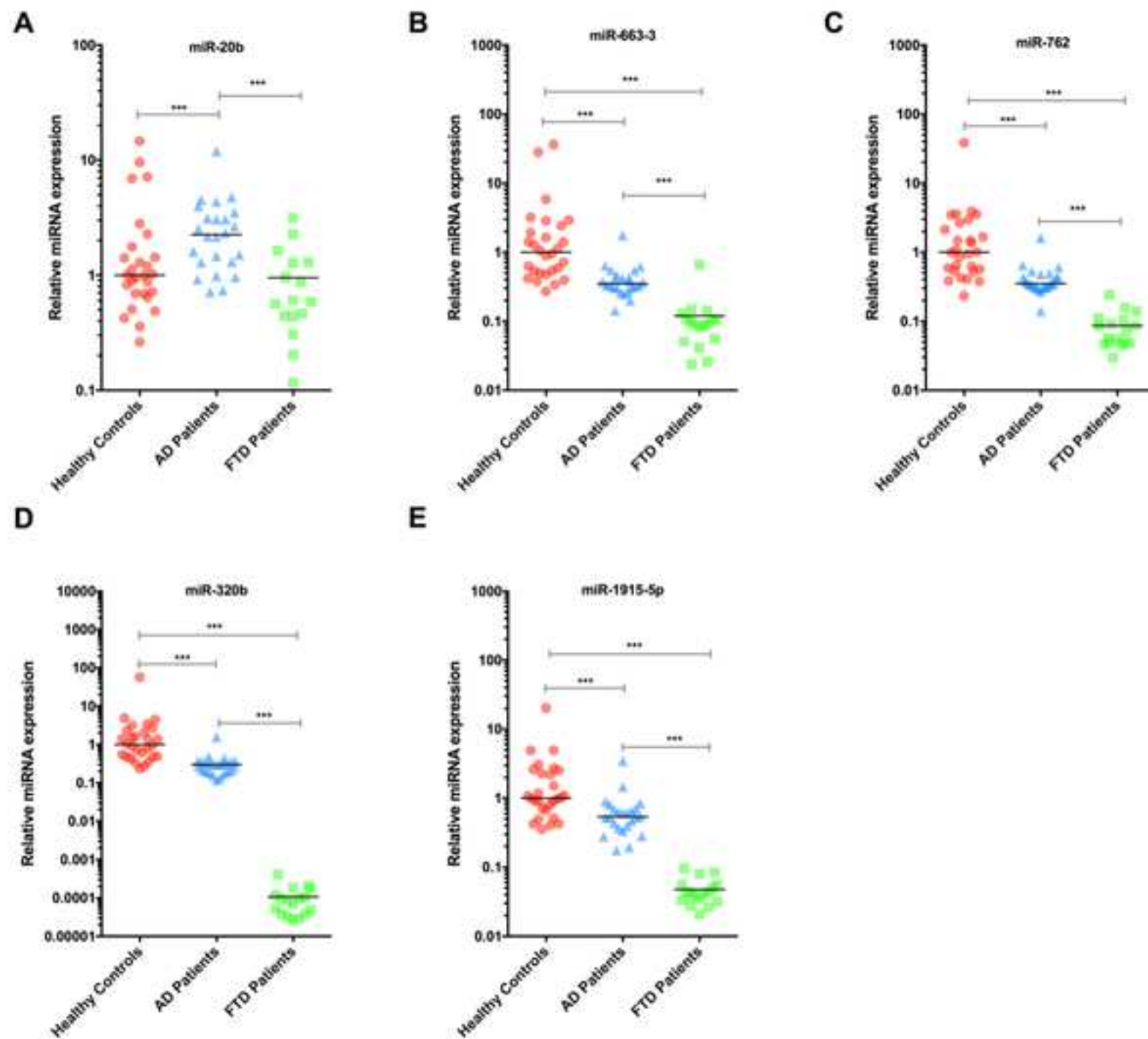


Figure 2

[Click here to download Figure Figure 2.tiff](#)

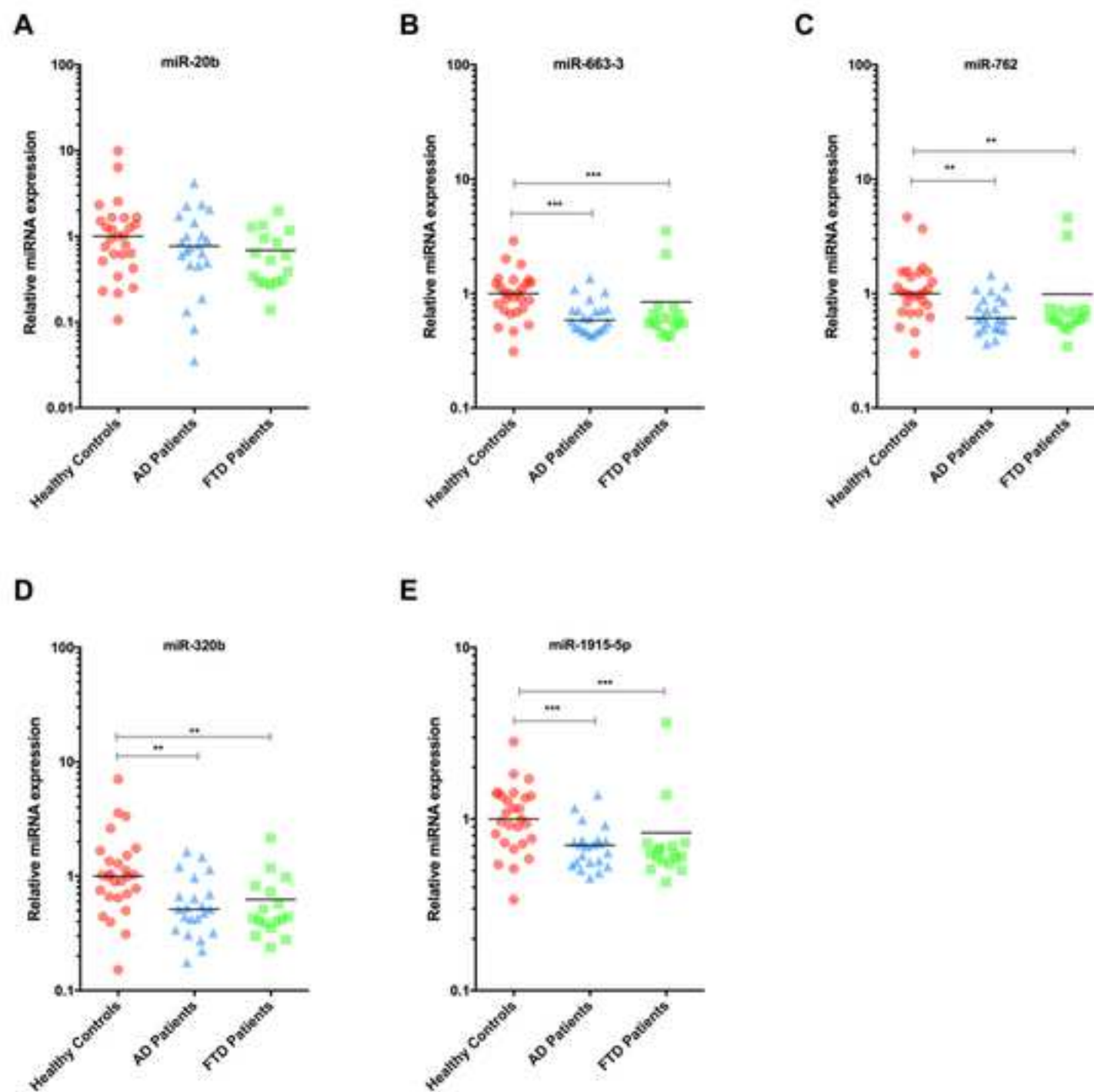
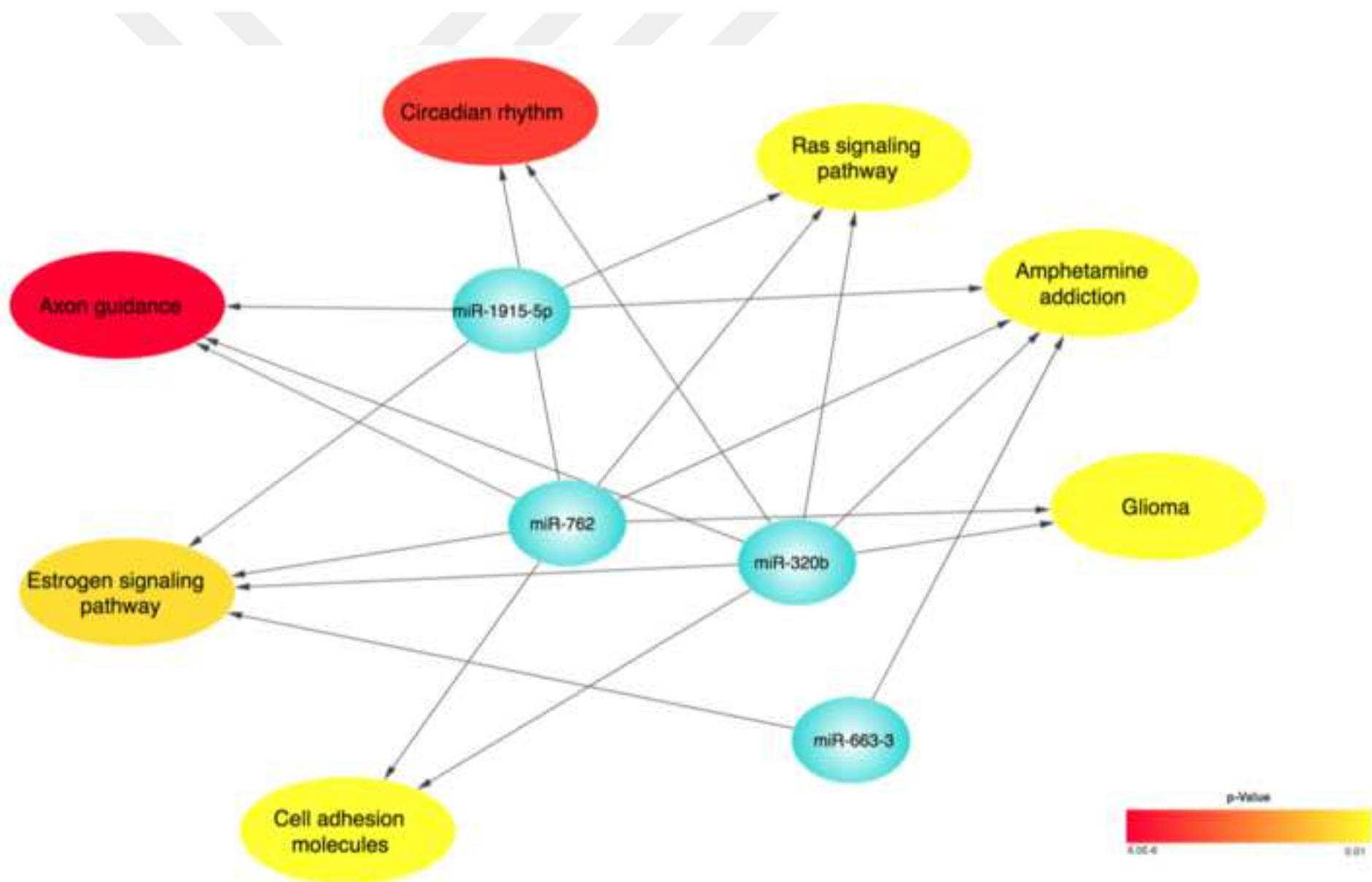


Figure 3





[Click here to access/download](#)
Supplementary Material
SI Figure 1.tiff



[Click here to access/download](#)
Supplementary Material
SI Figure 2.tiff



Click here to access/download
Supplementary Material
SI Table 1.docx

