

**T.C.**  
**HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ**  
**SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**KİSTİK FİBROZİS HASTALARINDA FENOTİPİK CİDDİYETİ**  
**ETKİLEYEN GENLERİN VE İLİŞKİLİ YOLAKLARIN**  
**ARAŞTIRILMASI**

**İlksen Berfin EKİNCİ**

**Tıbbi Biyoloji Programı**  
**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**ANKARA**

**2020**

## TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim süresince hem akademik hem de kişisel yaşantımda bana her konuda yardımcı olan, desteğini hiçbir zaman esirgemeyen ve araştırmacı yönümü geliştirmemde en büyük katkısı olan değerli hocam ve danışmanım Prof. Dr. Didem Dayangaç ERDEN'e,

Tez çalışmamda değerli önerileri ve katkıları için sayın jüri üyeleri Prof. Dr. Serap DÖKMECİ, Prof. Dr. Çetin KOCAEFE, Prof. Dr. Uğur ÖZÇELİK ve Doç. Dr. Bala GÜR DEDEOĞLU'na,

Tez çalışmama göstermiş oldukları emek ve ayırmış oldukları değerli vakit için sayın Doç. Dr. Nagehan EMİRALIOĞLU ve Arş. Gör. Dr. MİNA GHARİBZADEH HIZAL ve Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Göğüs Hastalıkları Anabilim Dalı Göğüs Hastalıkları Ünitesi'ndeki tüm değerli hocalarıma,

İstatistiksel analiz ve bu konudaki yorumlarında değerli yardımları için, sayın Prof. Dr. Mutlu HAYRAN hocama,

Akademik hayatımda eğitim sürecime katkılarından dolayı Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'nda görev yapan değerli tüm hocalarıma,

Yüksek lisans eğitimim boyunca bana her koşulda destek olan, çalışma ortamıma mutluluk katan tüm çalışma arkadaşlarıma,

Tez çalışmamda desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen ve bu günlere gelmemde en büyük katkısı olan bana her şekilde inanan ve her zaman yanımda olan sevgili annem ve babama,

Sevgisi ve desteği ile her zaman yanımda olan Çınar DAŞ'a, kedim Çamur'a,

En içten duygularla teşekkür ediyorum.

Bu tez Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi Tarafından desteklenmiştir (Proje No: TYL-2019-17977).

## ÖZET

**Ekinci, İ.B., Kistik Fibrozis Hastalığında Fenotipik Ciddiyeti Etkileyen Genlerin ve İlişkili Yolakların Araştırılması, Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyoloji Yüksek Lisans Tezi, Ankara, 2020.** Otozomal resesif kalıtılan hastalıklar arasında en sık görülen kistik fibrozis, *Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator* (CFTR) genindeki mutasyonlar sonucu oluşmaktadır. Hastalık ciddiyetinin belirlenmesinde CFTR mutasyonlarının yanı sıra ciddiyeti modifiye eden genler ve çevresel faktörler rol oynamaktadır. İlginç bir bulgu olarak, aynı CFTR mutasyonuna sahip olmalarına rağmen farklı klinik ciddiyete sahip hastalar da bulunmaktadır. Ciddiyetin hastalarda heterojenlik göstermesi ve genotip-fenotip korelasyonunun kurulamaması tedavi yaklaşımlarını oldukça zorlaştırmaktadır. Tez çalışması kapsamına; Sınıf II grubunda yer alan, F508del/F508del ve F508del/G85E mutasyonlarını içeren iki hasta kardeşten oluşan iki aile, Sınıf IV grubunda yer alan I1234V/I1234V mutasyonunu içeren üç hasta kardeşten oluşan bir aile ve kronik hastalık öyküsü olmayan üç sağlıklı kontrol dahil edilmiştir. Klinik seyirleri farklı olan (ağır/hafif) hasta kardeşler arasında ifade farklılığı gösteren genler gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu prensibine dayalı kistik fibrozis PCR array yöntemiyle saptanmış ve bu genlerle ilişkili yolaklar tanımlanmıştır. Sınıf II grubunda yer alan ağır seyirli hastalarda, inflamasyon ve immün cevapta görevli IL-17(CXCL1, CXCL2), NF kappa B (TNFRSF11A), TNF, sitokin-sitokin etkileşimi, araziidonik asit, nekroptozis, SNARE etkileşim (STX1A) ve sodyum iyonunun geri emilim (SLC9A3R2) yolakları saptanmıştır. Sınıf IV'e özgü olarak AGE-RAGE, TLR sinyal yolakları bulunmuştur. Tüm hastaların birlikte değerlendirilerek kontrol grubu ile karşılaştırıldığında ifade farklılığı anlamlı genler ICAM1, EZR, TNFRSF1A ve HSP70 olarak belirlenmiştir. Ek olarak, hastalarda ifade farklılığı gösteren genler ile karaciğer tutulum bulguları arasında korelasyon saptanarak bu genlerin AGE-RAGE, sitokin-sitokin etkileşim ve insülin direnci sinyal yolaklarında yer aldıkları gösterilmiştir. Bu çalışma ile, aynı sınıf mutasyona sahip ağır ve hafif seyir gösteren hasta kardeşler arasında fenotipik ciddiyeti etkileyebilecek genler ve ilişkili yolaklar aydınlatılmıştır. Tez çalışması, ileri dönemde tedavi için yeni hedef moleküllerin geliştirilmesine olanak sağlayabilecektir.

**Anahtar Kelimeler:** Kistik fibrozis, CFTR, modifiye edici genler,  
genotip-fenotip ilişkisi

Bu tez Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi Tarafından desteklenmiştir (Proje No: TYL-2019-17977).

## ABSTRACT

**Ekinci, İ.B., Investigation of Genes and Associated Pathways Affecting Phenotypic Severity in Patients with Cystic Fibrosis, Hacettepe University Graduate School of Health Sciences, Master Thesis of Medical Biology Programme, Ankara, 2020.** Cystic fibrosis, the most common autosomal recessive disease, is caused by mutations in the Cystic Fibrosis Transmembrane Regulator (CFTR) gene. In addition to CFTR mutations, modifier genes and environmental factors play a role in disease severity. Interestingly there are patients with different clinical severity despite having the same CFTR mutation. The heterogeneity of disease severity among patients and the inability to establish genotype phenotype correlations make treatment approaches difficult. In this study two families with two siblings with Class-II mutations (F508del/F508del and F508del/G85E), one family with three siblings with Class-IV mutation (I1234V/I1234V) and three healthy individuals with no disease symptoms were included. Differentially expressed genes and pathways were determined between affected siblings who have different disease severity (severe/mild) by using real-time PCR based cystic fibrosis PCR array. In severe siblings with Class-II mutation IL-17 (CXCL1, CXCL2), NF-kappa B (TNFRSF11A), TNF, cytokine cytokine receptor interaction, arachidonic acid metabolism, necroptosis, SNARE interaction (STX1A) and sodium reabsorption (SLC9A3R2) pathways were identified. AGE-RAGE, TLR pathways were determined only in Class IV severe siblings. As a result of analysis of all patients and comparison of them to control group; ICAM1, EZR, TNFRSF1A and HSP70 genes were found to be differentially expressed. In addition, a correlation was determined between differentially expressed genes in AGE-RAGE, cytokine cytokine receptor interaction, and insulin resistance pathways in patients and liver disease symptoms. As a result of this study, genes and pathways responsible from phenotypic severity among affected siblings carrying the same mutation were identified. The results will provide opportunity for development of novel target molecules for treatment of disease.

**Key words:** Cystic Fibrosis, CFTR gene, modifier genes, genotype-phenotype correlation

This thesis, was supported by Hacettepe University Scientific Research Projects Coordination Unit (Project No: TYL-2019-17977).

## İÇİNDEKİLER

ONAY SAYFASI	iii
YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI	iv
ETİK BEYAN	v
TEŞEKKÜR	vi
ÖZET	vii
ABSTRACT	viii
İÇİNDEKİLER	ix
SİMGELER VE KISALTMALAR	xii
ŞEKİLLER	xv
TABLolar	xvi
<b>1. GİRİŞ</b>	1
<b>2. GENEL BİLGİLER</b>	3
2.1. Kistik Fibrozis Patofizyolojisi	3
2.2. CFTR Geni ve Proteini	4
2.3. CFTR Mutasyonları	6
2.4. Kistik Fibrozis Hastalığında Fenotipik Ciddiyeti Etkileyen Genler	9
2.4.1. <i>Mannose Binding Lectin 2</i> (MBL2) Geni	10
2.4.2. <i>Transforming Growth Factor Beta-1</i> (TGFB1) Geni	10
2.4.3. <i>Nitric Oxide Synthase-3</i> (NOS3) Geni	11
2.4.4. <i>Adiponectin Receptor-2</i> (ADIPOR2) Geni	11
2.4.5. <i>Endothelin receptor type A</i> (EDNRA) Geni	11
2.4.6. <i>Transcription Factor 7 Like 2</i> (TCF7L2) Geni	11
2.4.7. <i>Interferon Related Developmental Regulator 1</i> (IFRD1) Geni	12
2.4.8. <i>Serpin Family A Member 1</i> (SERPINA1) Geni	12
2.4.9. <i>The epithelial sodium channels</i> (ENaC) Geni	12
2.4.10. Proinflamatuvar Genler	13
2.5. Kistik Fibrozis Hastalığında Yapılan Transkriptomik Araştırmalar	13
2.6. Kistik Fibrozis ve Mutasyona Özgü Tedavi	14
<b>3. BİREYLER VE YÖNTEM</b>	16
3.1. Bireyler	16
3.2. Çalışmalarda Kullanılan Kimyasal Malzeme, Solüsyon ve Cihazlar	18

3.2.1. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) ile Hasta DNA'larının Amplifikasyonu	18
3.2.2. PZR Sonucunun Agaroz Jel Elektroforezi ile Kontrolü	18
3.2.3. DNA Dizi Analizi	19
3.2.4. Nazal Epitel Hücrelerden RNA İzolasyonu	19
3.2.5. cDNA Sentezi	19
3.2.6. Kistik Fibrozis PCR Array (Qiagen)	20
3.3. Yöntemler	20
3.3.1. Hasta DNA'larının Amplifiye Edilmesi	20
3.3.2. DNA Dizi Analizi	20
3.3.3. Nazal Epitel Hücrelerden RNA İzolasyonu	21
3.3.4. RNA Derişimlerinin Ölçümü	22
3.3.5. cDNA Sentezi	23
3.3.6. Kistik Fibrozis PCR Array	23
3.3.7. Verilerin Değerlendirilmesi ve İstatistiksel Analiz	25
3.3.8. Yolak Analizi	25
<b>4. BULGULAR</b>	26
4.1. DNA Dizi Analizi	26
4.2. Elde Edilen RNA'ların Derişim ve Saflıkları	28
4.3. Elde Edilen RNA Örneklerinin Agaroz Jel Elektroforezi ile Kontrolü	28
4.4. Kistik Fibrozis PCR Array	29
4.4.1. Hastalarda Hiyerarşik Kümeleme Analizi	31
4.4.2. Sınıf II Grubunda Yer Alan Ağır ve Hafif Seyirli Hastalarda İfade Farklılığı Gösteren Genler ile Yolak Analizleri	32
4.4.3. Sınıf IV Grubunda Yer Alan Ağır ve Hafif Seyirli Hastalarda İfade Farklılığı Gösteren Genler ile Yolak Analizi	36
4.4.4. Sınıf II ve Sınıf IV Grubu Ağır ve Hafif Seyir Gösteren Hastalarda İfade Farklılığı Gösteren Genlerin Kesişim Kümesi ve Ortak Genlerin Yolak Analizi	38
4.4.5. Hasta Grubu ve Kontrol Grubu Arasında İfade Farklılığı Gösteren Genler ile Yolak Analizi	41
4.5. Sınıf II ve Sınıf IV Grubu Ağır ve Hafif Seyir Gösteren Hastalarda İfade Farklılığı Anlamlı Genlerin <i>Heatmap</i> Gösterimi	44
4.6. Hasta ve Kontrol Grubunda İfade Farklılığı Gösteren Genlerin <i>Heatmap</i> Gösterimi	45

4.7. Hastalarda Klinik Özellikler ile İfade Farklılığı Gösteren Genler Arasındaki Korelasyon	47
<b>5. TARTIŞMA</b>	50
<b>6. SONUÇ VE ÖNERİLER</b>	67
6.1. Sonuçlar	67
6.2. Öneriler	69
<b>7. KAYNAKLAR</b>	70
<b>8. EKLER</b>	
EK-1. Tez çalışması ile ilgili Etik Kurul İzni.	
EK-2. Sınıf II Grubu Ağır Seyirli Hastalarda İfade Farklılığı Gösteren Genler	
EK-3. Hasta ve Kontrol Grubu Arasında Hastalarda İfade Farklılığı Gösteren Genler	
EK-4. Tez Orjinallik Ekran Görüntüsü	
EK-5. Dijital Makbuz	
<b>9. ÖZGEÇMİŞ</b>	

## SİMGELER VE KISALTMALAR

<b>%</b>	Yüzde
<b>µl</b>	Mikrolitre
<b>°C</b>	Derece santigrat
<b>3'UTR</b>	3' translasyon olmayan bölge
<b>5'UTR</b>	5' translasyon olmayan bölge
<b>ABCC7</b>	<i>ABC transporter C family member 7</i>
<b>ACTB</b>	<i>Beta actin</i>
<b>ADIPOR2</b>	<i>Adiponectin Receptor-2</i>
<b>AGE</b>	<i>Advanced Glycation End Products</i>
<b>ATP</b>	Adenozin Trifosfat
<b>B2M</b>	<i>Beta 2 microglobulin</i>
<b>BAL</b>	Bronkoalveolar Lavaj
<b>bç</b>	Baz çifti
<b>cAMP</b>	Siklik Adenozin Monofosfat
<b>cDNA</b>	Komplementer DNA
<b>CFTR</b>	<i>Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator</i>
<b>Ct</b>	<i>Cycle of treshold</i>
<b>CXCL1</b>	<i>Chemokine (C-X-C motif) Ligand 1</i>
<b>CXCL2</b>	<i>Chemokine (C-X-C motif) Ligand 2</i>
<b>CXCL8</b>	<i>Chemokine (C-X-C motif) Ligand 8</i>
<b>DAMP</b>	<i>Damage Associated Molecular Patterns</i>
<b>dk</b>	Dakika
<b>DNA</b>	Deoksiribo Nükleit Asit



<b>E.R.</b>	Endoplazmik Retikulum
<b>EDNRA</b>	<i>Endothelin receptor type A</i>
<b>ENAC</b>	<i>The epithelial sodium channels</i>
<b>EZR</b>	<i>Ezrin</i>
<b>g</b>	Gram
<b>GAPDH</b>	<i>Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase</i>
<b>GWAS</b>	Genom apında İlişkilendirme alışmaları
<b>HPRT1</b>	<i>Hypoxanthine Phosphoribosyltransferase 1</i>
<b>HSP70</b>	<i>Heat shock 70kDa protein 1A</i>
<b>ICAM1</b>	<i>Intercellular adhesion molecule</i>
<b>IFRD1</b>	<i>Interferon Related Developmental Regulator 1</i>
<b>IL-18</b>	<i>İnterleukin 18</i>
<b>IL1B</b>	<i>İnterleukin 1 beta</i>
<b>KCNE1</b>	<i>Potassium Voltage-Gated Channel</i>
<b>LPS</b>	Lipopolisakkarit
<b>MBL-2</b>	<i>Mannose Binding Lectin 2</i>
<b>miRNA</b>	MikroRNA
<b>ml</b>	Mililitre
<b>mM</b>	Milimolar
<b>NBD1</b>	<i>Nucleotide Binding Domain 1</i>
<b>NBD2</b>	<i>Nucleotide Binding Domain 2</i>
<b>NFKB</b>	<i>Nuclear Factor kappa B</i>
<b>ng</b>	Nanogram
<b>NLRP3</b>	<i>Nod-like receptor family pyrin domain containing 3</i>
<b>nM</b>	Nanomolar

<b>NOD</b>	<i>Nucleotide-binding and oligomerization domain</i>
<b>NOS3</b>	<i>Nitric Oxide Synthase-3</i>
<b>PAMP</b>	<i>Pathogen Associated Molecular Patterns</i>
<b>PKA</b>	Protein Kinaz A
<b>PZR</b>	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
<b>R</b>	<i>Regulatory Domain</i>
<b>RAGE</b>	<i>Receptor of Advanced Glycation End Products</i>
<b>RNA</b>	Ribo Nükleik Asit
<b>RPLP0</b>	<i>Ribosomal protein lateral stalk subunit P0</i>
<b>rpm</b>	Revolutions per minute
<b>SERPINA1</b>	<i>Serpin Family A Member 1</i>
<b>SLC9A3R2</b>	<i>Solute Carrier Family 9 Member 3 Regulator 2</i>
<b>STX1A</b>	<i>Syntaxin 1A</i>
<b>TCF7L2</b>	<i>Transcription Factor 7 Like 2</i>
<b>TGFB1</b>	<i>Transforming Growth Factor Beta 1</i>
<b>TLR</b>	<i>Toll-like receptor</i>
<b>TMD1</b>	<i>Transmembrane Domain 1</i>
<b>TMD2</b>	<i>Transmembrane Domain 2</i>
<b>TNF</b>	<i>Tumour necrosis factor</i>
<b>TNFRSF11A</b>	<i>Tumor Necrosis Factor Receptor Superfamily, Member 11A</i>
<b>TNFSRF1A</b>	<i>Tumor Necrosis Factor Receptor Superfamily, Member 1A</i>

## ŞEKİLLER

Şekil	Sayfa	
2.1.	CFTR proteininin üç boyutlu yapısı.	5
2.2.	CFTR proteini veziküler trafik yolağı.	6
2.3.	CFTR mutasyon sınıfları.	9
3.1.	Kistik Fibrozis PCR Array düzeni.	24
4.1.	Çalışmaya dahil edilen hastaların elektroferogram sonuçları.	27
4.2.	Elde edilen RNA'ların jel fotoğrafı.	28
4.3.	Normfinder sonucu.	30
4.4.	Gerçek zamanlı PZR sonrası oluşan erime eğrisi grafikleri.	30
4.5.	Ağır ve hafif seyir gösteren hastaların hiyerarşik kümeleme analizi.	31
4.6.	Ağır seyirli hastalarda ifadesi artan ve azalan genler.	33
4.7.	Sınıf II ve Sınıf IV grubunda ifade farklılığı olan genlerin kesişim kümesi DAVID programı gen ontoloji sonuçları.	39
4.8.	Hasta ve kontrol grubunda, hastalarda ifadesi artış ve azalış gösteren genler.	42
4.9.	Sınıf II ve Sınıf IV grubu ağır ve hafif seyir gösteren hastalarla oluşturulan <i>heatmap</i> analizi.	44
4.10.	Kontrol grubu, Sınıf II Grubu ve Sınıf IV Grubunda ifade farklılığı gösteren genlerle oluşturulan <i>heatmap</i> gösterimi.	46
4.11.	Karaciğer tutulumu ile anlamlı olarak ilişkilendirilen yolaklar ve yolaklarda yer alan genler.	49
5.1.	Kistik fibroziste inflamasyon ve immün yanıtın oluşmasında rol alan moleküler yolakların mekanizması.	55
5.2.	Kistik fibrozis hastalığında miyeolid olmayan hücrede NLRP3 inflamazom aktivasyon mekanizması.	57
5.3.	CFTR proteininin, STX1A ve SNAP23 proteinleri ile etkileşim mekanizması.	59
5.4.	Sınıf II grubu ağır seyirli hastalarda tanımlanan nekroptozis yolağı ve yolakta yer alan genler.	60
5.5.	Sınıf IV grubu ağır seyirli hastada tanımlanan AGE-RAGE sinyal yolağı ve yolakta yer alan genler.	61

**TABLolar**

<b>Tablo</b>	<b>Sayfa</b>
2.1. CFTR geninde tanımlanan mutasyon tipleri.	7
3.1. Hastaların klinik özellikleri.	17
4.1. RNA örneklerinin derişim ve saflık değerleri.	28
4.2. Ağır seyirli hastalarda ifade farklılığı gösteren genlerin yer aldığı yolak analizi sonuçları.	35
4.3. Ağır seyirli hastada ifade farklılığı gösteren genler ve yolak analizi sonuçları.	37
4.4. Sınıf II ve Sınıf IV grubunda ifade farklılığı gösteren ortak genlerin yolak analizi.	40
4.5. Hastalarda ifade farklılığı gösteren genlerin yer aldığı yolak sonuçları.	43
4.6. Karaciğer tutulum şiddeti ile ilişkilendirilen genler ve yolak analizi sonuçları.	48

## 1. GİRİŞ

Otozomal resesif kalıtım modeline sahip hastalıklardan birisi olan Kistik Fibrozis, *Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator* (CFTR) genindeki mutasyonlar sonucu oluşur. Bu genden sentezlenen CFTR proteini epitel hücrelerde, klor iyonu taşınmasından sorumlu bir kanal proteinidir. CFTR geninde 2074 mutasyon tanımlanmıştır ve mutasyonlar; CFTR proteininin sentezi, katlanması, taşınması, hücre zarına yerleşmesi, iyon geçirgenliği ve protein stabilitesi üzerindeki etkilerine bağlı olarak 7 sınıfta toplanmıştır.

Kistik fibrozis akciğer patofizyolojisi ile karakterize olup pankreas, üst solunum yolları, erkek üreme sistemi, ter bezleri, bağırsak ve karaciğeri de etkileyen multisistemik bir hastalıktır. Mutasyonlar sonucunda, hücre içi ve dışındaki iyon dengesi bozulmakta ve bunun sonucunda akciğer patojenlere açık hale gelerek hastalarda enfeksiyon oluşmaktadır. Hastaların yaşam süreleri yaklaşık 30-40 yıl arasında olup hastaların çoğu tekrarlayan akciğer enfeksiyonu yüzünden hayatlarını kaybetmektedir.

Kistik fibrozis yaklaşık 1/2500 görülme sıklığı ile en yaygın olarak, Kuzey Amerika ve Avrupa'da görülmektedir. Ülkemizde kistik fibrozis hastalığının görülme sıklığı 1/3000 olarak bulunmuştur. Araştırmalar sonucunda, en sık görülen CFTR mutasyonunun F508del olduğu saptanmıştır. F508del mutasyonunun görülme sıklığı Avrupa ve Kuzey Amerika'da %70-80 iken Türkiye'de bu oran %18-28,5 arasındadır. Ülkemizde görülen mutasyonların farklılık gösterme sebebi popülasyonumuzdaki genetik heterojeniteden kaynaklanmaktadır.

Mutasyonların CFTR proteini üzerindeki etkilerine bağlı olarak hastaların klinik ciddiyetleri farklılık göstermektedir. Ancak yapılan çalışmalarda, aynı mutasyona sahip hastalarda klinik ciddiyette farklılıklar gözlemlenmiştir. Epigenetik, çevre gibi faktörler elimine edilerek ikiz ve kardeşler üzerinde yapılan çalışmalarda da klinik ciddiyette farklılık saptanmıştır. Bu durum kistik fibrozis hastalığında, klinik ciddiyeti etkileyebilecek CFTR dışındaki başka genlerin varlığını düşündürmektedir. Klinik ciddiyeti farklı olan ağır ve hafif seyir gösteren hastalarla yapılan transkriptomik çalışmalarda ifade düzeyi değişen genler saptanmıştır. Bu genler genel olarak; CFTR modifiye edici, CFTR proteini ile etkileşime giren,

inflamasyon ve immün yanıtta rol alan ve oksidatif strese görev alan genler olarak sınıflandırılmıştır. Günümüze kadar gerçekleştirilen transkriptomik çalışmalar aynı mutasyonu taşıyan ve klinik ciddiyeti farklı olan hastalar arasında yapılmış olup genetik kökenin benzer tutulduğu hasta kardeşleri içeren bir transkriptomik araştırma yapılmamıştır.

**Gerçekleştirilen tez çalışmasının amacı;** aynı mutasyonu taşıyan ve hastalık ciddiyeti farklı olan kardeşler arasında ifade farklılığı gösteren genlerin ve ilişkili yolların araştırılmasıdır.

Bu amaç doğrultusunda Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı ve Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı Göğüs Hastalıkları Ünitesi iş birliği ile gerçekleştirilen ön çalışmalar sonucunda mutasyonları aynı fakat klinik ciddiyetleri farklılık gösteren kardeşler belirlenmiştir. Kardeşlerden önceden izole edilen DNA'lar kullanılarak DNA Dizi Analizi yöntemi ile CFTR mutasyonları saptanmıştır. Devamında, kardeşlerin nazal epitel hücrelerinden RNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Hedeflenmiş transkriptomik Kistik Fibrozis PCR Array yöntemi kullanılarak hasta kardeşlerde ifade farklılığı gösteren genler bulunmuştur ve biyoinformatik araçlar kullanılarak yolak analizi gerçekleştirilmiştir.

Bu tez çalışması sonucunda, hasta kardeşlerde klinik farklılığın altında yatan temel moleküler mekanizmalar tanımlanabilmiştir. Bu çalışma, daha ileri dönemlerde tedavi için yeni hedef moleküllerinin geliştirilmesine olanak sağlayabilecektir.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Kistik Fibrozis Patofizyolojisi

Kistik fibrozis (OMIM 219700), *Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator* (CFTR) genindeki mutasyonlar sonucu oluşan otozomal resesif kalıtım modeline sahip hastalıklardan birisidir (1). Hastalığın, görülme sıklığı farklı popülasyonlarda değişken olmakla birlikte, en sık Kuzey Amerika (1/3500) ve Avrupa'da görülmektedir (1/2000-4500) (2). Türkiye'de yapılan bir çalışmada görülme sıklığının 1/3000 olduğu belirtilmiştir (3). Özellikle akciğerdeki fonksiyon bozukluğu ile karakterize olan kistik fibrozis; pankreas, üst solunum yolları, erkek üreme sistemi, ter bezleri, bağırsak ve karaciğeri de etkileyen multisistemik bir hastalıktır (4).

Sağlıklı bireylerin epitel hücrelerinde klor ve bikarbonat iyonu sekresyonundan sorumlu olan CFTR proteini, hücre içi ve hücre dışındaki iyon dengesinin korunmasında oldukça önemli rol oynamaktadır. Akciğerdeki silli epitel hücreler sil hareketleri ile klor, sodyum, bikarbonat gibi iyonların hücre içi ve hücre dışındaki konsantrasyonuna bağlı olarak hücre dışı matriste yer alan mukozal sıvıyı uzaklaştırmaktadır. Bu sayede, patojenlerin mukozal sıvı yardımıyla vücuttan atılması sağlanmaktadır (5). Kistik fibrozis hastalarında ise silli epitel hücreleri klor sekresyonununun yoksun oldukları için, hücre içi ve dışındaki iyon dengesi bozulmakta ve bu durum silli epitel hücreleri enfeksiyonlara karşı açık hale getirmektedir. Üretilen mukozal sıvının iyon bakımından yetersiz olması, özellikle akciğerde sil hareketinin kısıtlanmasına ve enfeksiyonla sonuçlanan bir patofizyolojiye neden olmaktadır (6).

*Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Stenotrophomonas maltophilia* ve *Burkholderia cepacia* hastalarda kronik akciğer enfeksiyonuna sebep olan başlıca bakterilerdir. Aynı zamanda virüs ve mantar enfeksiyonlarının da hastalarda akciğer enfeksiyonu oluşturduğu bilinmektedir. Bir mantar türü olan *Aspergillus fumigatus*'un kistik fibrozis hastalarında alerjik reaksiyon oluşturduğu gösterilmiştir (7). Bununla birlikte bakteriler tarafından üst solunum yolları etkilenen hastalarda sinüzit ve nazal polip oluşumu gözlemlenmektedir (8).

Pankreas CFTR protein ifadesinin en yüksek olduğu doku olup; mutant CFTR proteini varlığında hastalarda, pankreatik salgının su içeriği ve pH dengesi bozulmakta, pankreas viskozitesi artarak inflamasyon, kist ve fibrozis süreçleri ile devam eden bir patofizyoloji görülmektedir (1, 9). Besinlerin emilimi için gerekli olan pankreatik salgı enzimlerinin bağırsağa ulaşamaması, hastaların yaklaşık %60-80'inde görülen ekzokrin pankreas yetmezliğine sebep olur (10). Pankreastaki fonksiyon bozukluğu  $\beta$  hücrelerinin ölümüne sebep olmakta, bu hücrelerden salınan insülin hormonu sekresyonunun değişmesi, hastalarda kistik fibrozis ile ilişkili diyabet oluşmasında en büyük faktördür (11, 12).

CFTR proteini, bağırsak mukus asiditesinin korunmasında ve mukus hidrasyonunda rol oynamaktadır. Bağırsak fonksiyon bozukluğu hastaların %20'sinde görülen mekonyum ileus ile karakterize olup; bu durumun mikrobiyata profilini de etkilediğini gösteren çalışmalar mevcuttur (13, 14).

CFTR proteini safra kanalından salgılanan asitli bileşiklerin düzenlenmesinde de görevlidir. Hastaların yaklaşık %5-10'nunda, safranın işlevini yerine getirememesi sonucunda siroz ile sonuçlanan bir klinik tablo gözlemlenmektedir (15).

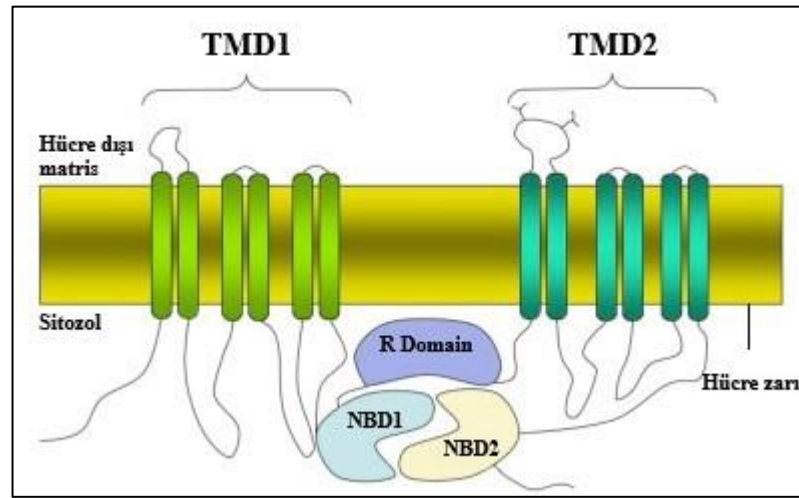
Doğuştan vaz deferens eksikliği (CBAVD) (OMIM 277180), erkek üreme sistemini etkileyen otozomal resesif kalıtım modeline sahip bir hastalıktır (16). CBAVD hastalığı, CFTR proteininin işlevselliğini daha az etkileyen mutasyonlara sahip kistik fibrozis hastaları ile ilişkilendirilmiştir (16, 17).

## 2.2. CFTR Geni ve Proteini

Kistik fibrozis hastalığından sorumlu CFTR geni, kromozomun 7q31.2 bölgesinde lokalizedir. Toplam 27 ekzondan oluşan CFTR geni, 250 kilobaz uzunluğunda olup; 1480 aminoasitlik *ATP-binding cassette* (ABC) süperailisinde yer alan CFTR proteinini kodlamaktadır. ABC süperailisi, çok sayıda substratın, adenzintrifosfat (ATP) hidrolizi ile hücre içi ve dışına taşınmasında görevli olan hücre zarı proteinlerini kodlamaktadır. Bu ailenin C altünitesinin 7'inci üyesi olan CFTR geni, *ABC transporter C family member 7* (ABCC7) olarak da adlandırılmaktadır (18). CFTR proteini, Protein Kinaz A (PKA) bağımlı olup kanal

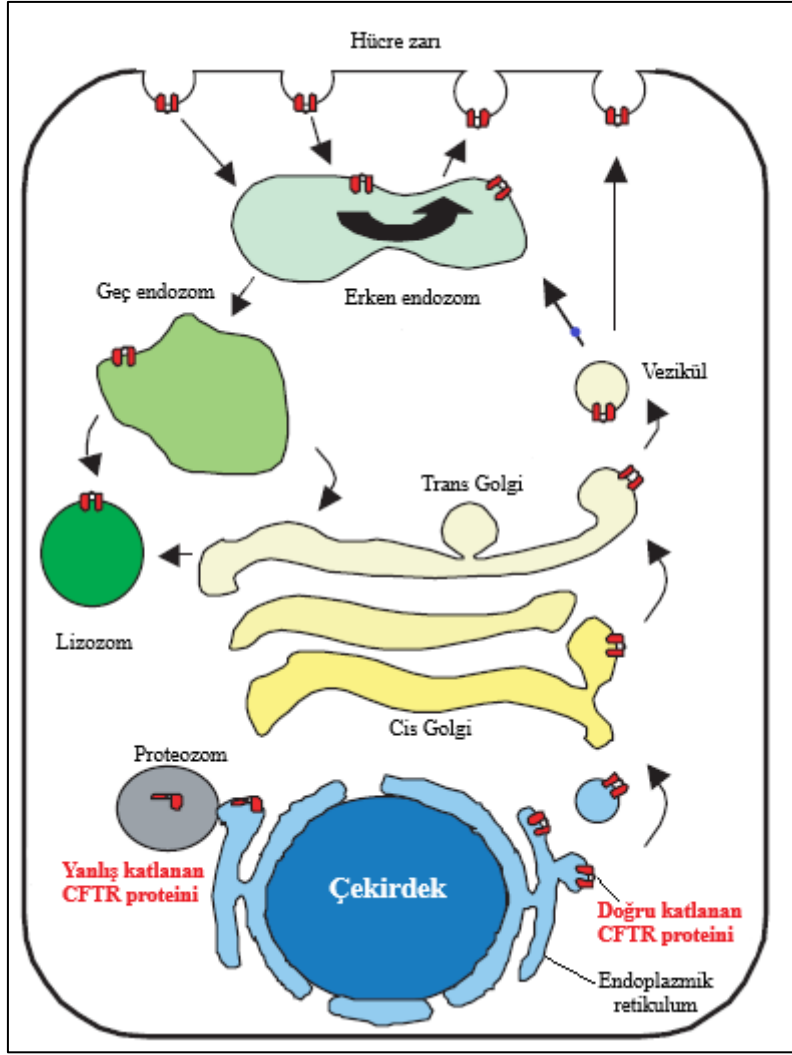


aktivitesi için ATP enerjisini kullanmaktadır. 6 adet alfa heliksten oluşan *Transmembrane Domain 1* (TMD1) ve *Transmembrane Domain 2* (TMD2), sitozolik Nucleotide Binding Domain 1 (NBD1) ve Nucleotide Binding Domain 2 (NBD2) ve Regulatory domain (R) olmak üzere CFTR proteini 4 işlevsel domainden oluşmaktadır. CFTR kanalının açılması için R domaininin PKA tarafından fosforillenmesi devamında NBD1-2 ile etkileşime giren kanalın açılması ve iyon sekresyonu tamamlandıktan sonra CFTR kanalının kapanması gerekmektedir (Şekil 2.1)(19).



**Şekil 2.1.** CFTR proteininin üç boyutlu yapısı (19).

CFTR proteini, hücredeki veziküler yollar ile hücre zarına taşınır. Genel olarak endositoz mekanizması hücre içerisine substrat ve diğer moleküllerin alınması ile ilişkilendirilse de endositik yollar G protein ilişkili reseptörlerin, reseptör tirozin kinazların, taşımada görevli proteinlerin ve kanal proteinlerinin de olduğu çok sayıda integral zar proteininin hücre içi trafiğinde görevlidir (20). Sentezi endoplazmik retikulumda tamamlanan CFTR polipeptidi, amino ucundan glikozillenerek işlevsel glikoprotein yapısını kazanmaktadır (Şekil 2.2)(21).



Şekil 2.2. CFTR proteini veziküler trafik yolağı (22).

### 2.3. CFTR Mutasyonları

CFTR geninin 1989 yılında tanımlanmasından günümüze kadar toplam 2074 adet mutasyon tanımlanmıştır (23, 24). Mutasyonların yaklaşık %40'nı yanlış anlamlı mutasyonlar (*missense*) oluşturmakta olup CFTR geninin kodlanan 27 ekzonu dışında promotör, 5' transkripsiyon olmayan bölge (5'UTR) ve 3' transkripsiyon olmayan bölgesinde de (3'UTR) mutasyonlar tanımlanmıştır (Tablo 2.1)(25).

**Tablo 2.1.** CFTR geninde tanımlanan mutasyon tipleri (25).

Mutasyon Tipi	Sayısı	Frekans (%)
Yanlış anlamlı	806	38,86
Çerçeve kayması	334	16,10
Varyasyon	269	12,97
<i>Splicing</i>	229	11,04
Anlamsız	174	8,39
Bilinmeyen	144	6,94
Büyük in/del	58	2,80
Çerçeve içi in/del	43	2,07
Promotör ve 5'UTR	31	0,82
3'UTR	4	0,10

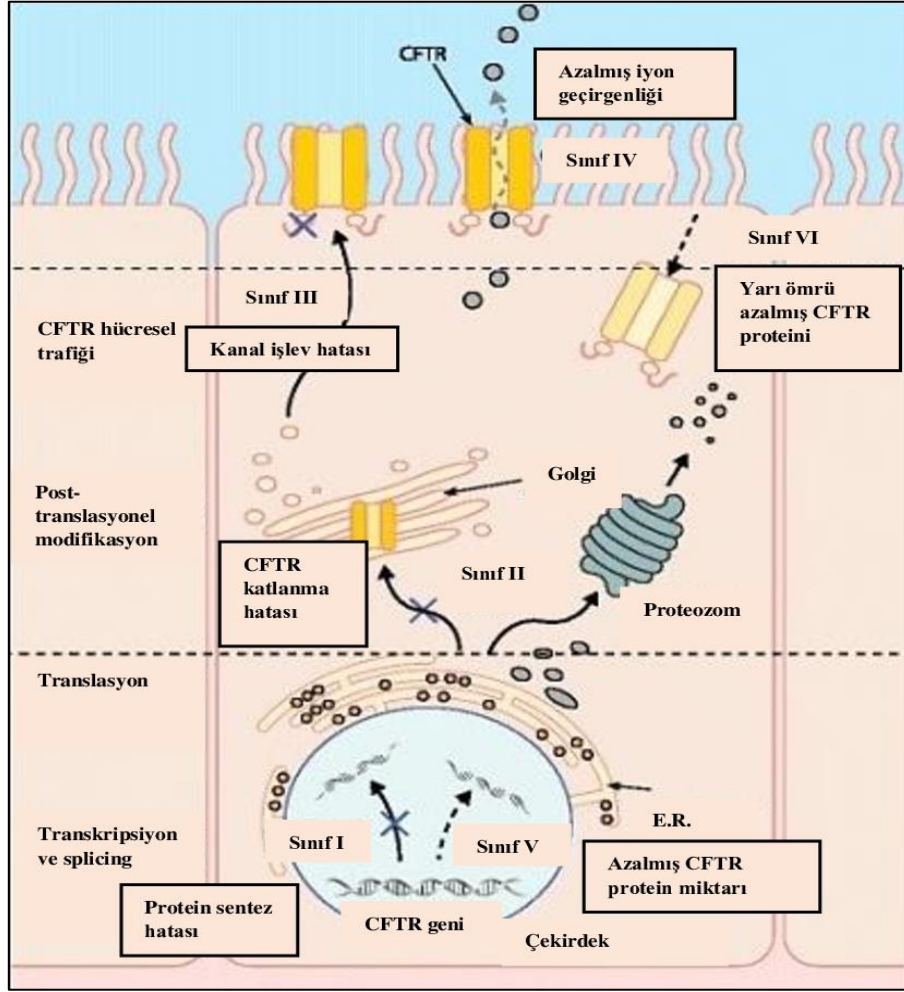
CFTR proteininin 508. pozisyonunda yer alan fenilalanin aminoasidinin delesyonu sonucu oluşan F508del mutasyonu, Kuzey Amerika ve Avrupa'da %70-80 görülme sıklığına sahip en sık görülen mutasyondur (2). Bu mutasyon sonucu CFTR proteini endoplazmik retikulumda degradasyona uğrar ve CFTR protein sentezi gerçekleşmez (26).

Ülkemizde F508del mutasyonunun görülme sıklığı %18-28,5'tur (27-29). Türkiye'de F508del mutasyonundan sonra sırasıyla en sık görülen mutasyonlar arasında 1677delTA (%4,4), N1303K (%3,3), G85E (%3), 2789+5G-A (%2,7), 2183AA-G (%2,7), G542X (%2,5), CFTRdele2 (%1,4), W1282X (%1,2), 3849+10kbC-T (%1,2), R334W (%1,1) yer almaktadır (27).

Son yıllarda yapılan çalışmalarda CFTR mutasyonları; CFTR proteininin yapı ve işlevselliğini etkileyen ve kişiye özgü tedavide kullanılabilecek mutasyonlar olmak üzere toplam 7 farklı grupta sınıflandırılmıştır (Şekil 2.3)(30).

- Sınıf IA Mutasyonlar: Büyük delesyon ve insersiyonları içeren bu gruptaki mutasyonlar sonucu CFTR mRNA sentezi gerçekleşmez. CFTR mRNA sentezinin gerçekleşmemesinden kaynaklı olarak günümüzde, kişiye özgü tedavi amacıyla hedeflenen mutasyon sınıfı olmamakla birlikte gelecekte gen terapi tedavisi için güçlü adaylar olabileceği düşünülmektedir. Bu gruptaki mutasyonlara CFTRdele2-9, CFTRdele14b-17b ve Türk popülasyonunda da %0,5 görülme sıklığına sahip olan CFTRdele2,3 örnek verilebilir.

- Sınıf IB Mutasyonlar: Erken dur kodonu oluşmasına sebep olan anlamsız mutasyonların yer aldığı bu grupta, doğru uzunlukta sentezlenemeyen CFTR mRNA'sı degradasyona uğrar. Bu gruptaki mutasyonların hedef alınarak düzeltici (*corrector*) ilaçlar ile tedavi edilmesi amaçlanmaktadır. G542X, W1282X, R1158X Sınıf IB'de yer alan mutasyonlardan birkaçıdır.
- Sınıf II Mutasyonlar: CFTR proteininin yanlış katlanmasına sebep olan bu gruptaki mutasyonlar sonucu E.R. aracılı degradasyon gerçekleşmektedir. CFTR proteini hücre içi trafiğini düzeltmeye yönelik olarak tasarlanan düzeltici ilaçlar bu gruptaki mutasyonlar için kullanılmıştır. En sık görülen F508del haricinde N1303K, G85E, R1066C mutasyonları da bu gruba dahildir.
- Sınıf III Mutasyonlar: CFTR proteininin R domaininde yer alan bu gruptaki mutasyonlar, doğru uzunlukta CFTR proteini sentezini engellememektedir. Fakat, cAMP'nin etkileşim gösterdiği R domaindeki bu mutasyonlar sonucu CFTR kanalı aktivite gösteremez. Kişiyeye özgü tedavide ilk kullanılan ve güçlendirici (*potentiator*) olarak adlandırılan ilaçlar, bu grupta yer alan G551D mutasyonunu tedavi etmeye yöneliktir. Bunun yanı sıra G551S, D1152H mutasyonları da bu grupta bulunmaktadır.
- Sınıf IV Mutasyonlar: Bu grupta yer alan mutasyonlar, CFTR kanalının iyon geçirgenliği azaltmaktadır. CFTR kanalını stabilize edici ilaçların kullanılarak bu gruptaki mutasyonların tedavi edilmesi hedeflenmektedir. R347P, R334W ve D110H bu grupta yer alan mutasyonlardan bazılarıdır.
- Sınıf V Mutasyonlar: Doğru uzunlukta fakat olması gerekenden daha az oranda CFTR proteini sentezine neden olan Sınıf V'te yer alan mutasyonlar için güçlendirici ve düzeltici ilaçların kullanımının hastalar için yararlı olabileceğini gösteren çalışmalar mevcuttur. 2789+5G-A, 3849+10kbC>T ve 5T bu grupta yer alan mutasyonlardan birkaçıdır.
- Sınıf VI Mutasyonlar: CFTR proteininin yarı ömrünün azalmasına sebep olan Sınıf VI mutasyonlarının, CFTR protein stabilitesini artıran ilaçlar ile tedavi edilebileceği düşünülmektedir. 4326delTC, 4279insA ve Q1412X mutasyonları bu grupta yer alan mutasyonlardan bazılarıdır.



Şekil 2.3. CFTR mutasyon sınıfları (31).

#### 2.4. Kistik Fibrozis Hastalığında Fenotipik Ciddiyeti Etkileyen Genler

Kistik fibrozis hastalarında hastalık ciddiyeti mutasyonların CFTR proteini üzerindeki etkisiyle ilişkilendirilse de aynı mutasyonu taşıyan hastalarda klinik heterojenitenin gözlemlendiği çalışmalar bulunmaktadır (32, 33). CFTR mutasyonları aynı olan ikiz ve kardeşlerle yapılan çalışmalarda da klinik heterojenitenin gözlemlenmesi, hastalıkta fenotipik ciddiyeti etkileyen başka genlerin rol aldığını düşündürmektedir (33, 34). Bunun yanı sıra epigenetik faktörler, farklı çevresel etmenler, sosyo-ekonomik statü de dolaylı olarak hastalık ciddiyetini etkilemektedir (34). Kistik fibrozis ve epigenetik üzerine yapılan çalışmalarda kodlanmayan RNA'lar ön plana çıkmakla birlikte bu grup içerisinde yer alan mikroRNA'lar (miRNA) üzerine yapılan çok sayıda çalışma bulunmaktadır. Kistik

fibroziste ifadesi değişen miRNA'ların belirlenmesi, miRNA'ların yeni tedavi adayları olabileceğini düşündürmektedir (35).

Fenotipik ciddiyeti modifiye eden genler CFTR proteininin hücre içi kompartmanlarla etkileşim süreçlerinde rol alabildikleri gibi; diyabet, karaciğer hastalığı, bağırsak fonksiyon bozukluğunda rol alan fenotipi modifiye edebilen genler tanımlanmıştır (36). Yapılan araştırmalarla, CFTR proteininin aktivitesi ve hücre içi trafiğinde, immün yanıtın oluşmasında, epitel hücre farklılaşmasında, inflamasyonda, CFTR proteini katlanma sürecinde ve oksitatif stres gibi pek çok moleküler mekanizmayla ilişkilendirilen genler tanımlanmıştır (34, 36).

#### **2.4.1. Mannose Binding Lectin 2 (MBL2) Geni**

Doğal bağışıklık yanıtının oluşmasında görev alan *Mannose Binding Lectin 2* (MBL-2) patojen kaynaklı mannoz ve N-asetilglukozamin'i tanıyan, karaciğerde sentezlenen bir serum proteindir. Bu genin azalmış ifadesi özellikle akciğer enfeksiyonlarına sebep olan bakteriyel ve viral enfeksiyonlara karşı oluşturulan yanıtla ilişkilendirilmiştir. MBL-2 ifadesi azalan hastalarda daha ciddi akciğer enfeksiyonları görülmekte olup; MBL-2 kistik fibrozis fenotipini modifiye eden aday genlerden birisi olarak belirlenmiştir (37).

#### **2.4.2. Transforming Growth Factor Beta-1 (TGFB1) Geni**

Büyüme faktörü olarak görev yapan *Transforming Growth Factor Beta-1* (TGF $\beta$ -1), hücre büyümesinin düzenlenmesinde, hücre bölünmesinde, farklılaşma ve hücre ölümü gibi biyolojik süreçlerde rol alan bir salgı proteindir. Artmış TGF $\beta$ -1 ifadesinin daha ciddi akciğer enfeksiyonuyla ilişkilendirildiği çalışmalar mevcuttur. *P.aeruginosa* enfeksiyonu olan hastalarda plazmadaki TGF $\beta$ -1 seviyesi arttığı bulunmuştur. Bronkoalveoler lavaj (BAL) sıvısında da artmış TGF- $\beta$ -1 ifadesinin gösterildiği bir çalışma mevcuttur. Kistik fibroziste TGF $\beta$ -1 ifadesinin daha ciddi akciğer enfeksiyonu olan hastaların hem plazma hem de bronşiyal sıvı örneklerinde artması, bu proteinin hastalık ciddiyeti ile ilişkili olduğunu göstermekle birlikte hastalığın ciddiyetinin önceden tahmin edilmesinde bir biyobelirteç olarak kullanılabileceğini düşündürmüştür (38).

### **2.4.3. Nitric Oxide Synthase-3 (NOS3) Geni**

*Nitric Oxide Synthase-3* (NOS-3), geni özellikle vasküler endotelyumda ifade olur ve nitrik oksit gazının sentezinden sorumludur. Nitrik oksit gazının anti-mikrobiyal süreçte rol aldığı bilinmektedir. Yapılan çalışmalarda, NOS-3 ifadesindeki azalışın üretilen nitrik oksit miktarının azalmasına sebep olduğu ve bu durumun *P.aeruginosa* enfeksiyonunu ve bakteri kolonizasyonunu tetiklediği gösterilmiştir (39, 40).

### **2.4.4. Adiponectin Receptor-2 (ADIPOR2) Geni**

*Adiponectin Receptor-2* (ADIPOR-2) geni hücre zarında bulunan Adiponektin reseptörünü kodlamaktadır ve bu reseptör adiposit hücreler tarafından salgılanan adiponektin hormonunun düzenlenmesinde görevlidir. Adiponektin hormonu, yağ asitlerinin oksidasyonunda ve glikoz seviyesinin düzenlenmesinde rol alır. Yapılan çalışmalarda, adiponektinin anti-inflamatuvar aktiviteye sahip olabileceği gösterilmiştir (41). Araştırmalar sonucunda, ADIPOR2'nin azalan ifadesi sonucu yağ asitlerinin oksidasyonu gerçekleşemediği gösterilmiştir. Bu durumun kistik fibrozis hastalarında mekonyum ileus oluşturma riskini arttırdığı düşünülmektedir. Anti-inflamatuvar bir etkiye sahip olan adiponektin ve akciğer enfeksiyonu arasındaki ilişki tam olarak aydınlatılamamıştır (42).

### **2.4.5. Endothelin receptor type A (EDNRA) Geni**

Kistik fibroziste fenotipik ciddiyeti modifiye eden genlerden birisi de *Endothelin receptor type A* (EDNRA) genidir. EDNRA, G-proteinine bağlı bir reseptör olarak endotel hücre zarında lokalizedir. Hücre bölünmesi ve kasılma gibi süreçlerde rol alan EDNRA'nın aynı zamanda, kistik fibrozis hastalarında hastalık ciddiyeti ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. Akciğer kasılmasında ifadesi artmış EDNRA geninin ağır seyirli hastalarda görülmesi, bu hastaların akciğer fonksiyon bozukluklarının daha kötü olması ile ilişkilendirilmiştir (43).

### **2.4.6. Transcription Factor 7 Like 2 (TCF7L2) Geni**

*Transcription Factor 7 Like 2* (TCF7L2) transkripsiyon faktörü olarak görev yapmakta olup; dolaşımdaki glikoz dengesinin korunmasında görevli sinyal

yolaklarının uyarılmasını sağlamaktadır. Çalışmalarda, kistik fibrozis hastalarında bu genin ifadesinin azalmasının hastalarda tip II diyabet oluşma riskini artırdığı bulunmuştur (44).

#### **2.4.7. *Interferon Related Developmental Regulator 1 (IFRD1) Geni***

*Interferon Related Developmental Regulator 1 (IFRD1)* nötrofil farklılaşmasında rol oynayan bu gendir. IFRD1 ifadesinin susturulduğu farelerde nötrofil farklılaşmasının gerçekleşmediği ve bunun sonucunda akciğer enfeksiyonu olan bölgeye nötrofil göçünün mümkün olmadığı saptanmıştır. Bu çalışma sonucunda IFRD1'in ifadesinin artması ile akciğer enfeksiyonuna karşı nötrofil cevabının daha iyi olduğu gösterilmiştir (45).

#### **2.4.8. *Serpin Family A Member 1 (SERPINA1) Geni***

Enfeksiyonda rol alan nötrofil elastaz nötrofillerden salınan serin proteaz ailesine ait bir enzimdir. Patojenlerin yok edilmesinde rol alan bu enzimin salınımı *Serpin Family A Member 1 (SERPINA1)* tarafından kontrol edilmektedir. Nötrofil elastaz aktivitesini inhibe eden SERPINA1 ifadesinin azalması, nötrofil cevabının engellenmesine sebep olmaktadır. Daha ağır seyirli hastalarda ifadesi azaldığı saptanan SERPINA1'in hastalığı modifiye edici genlerden birisi olduğu bulunmuştur (46).

#### **2.4.9. *The epithelial sodium channels (ENaC) Geni***

*The epithelial sodium channels (ENaC)* gen ürünü olan ENaC proteini, epitel hücre zarında bulunan ve sodyum absorpsiyonunu gerçekleştiren bir kanal proteindir. Sağlıklı bir epitel hücrede CFTR, ENaC kanalının negatif düzenleyicisidir ve bu sayede sodyumun hücre içerisine hiperabsorpsiyonu engellenmektedir. Kistik fibroziste yapılan in-vivo ve in-vitro çalışmalarda, ENaC'ın hiperaktivite gösterdiği bulunmuştur. Bu durum özellikle akciğer mukus tabakasının aşırı su kaybına sebep olmakla birlikte, akciğerleri patojenlere karşı daha savunmasız hale getirmektedir. ENaC ifadesinin artması hastalık ciddiyeti ile ilişkilendirilmiştir (47, 48).



#### 2.4.10. Proinflamatuvar Genler

Bakteri enfeksiyonu sonucunda inflamasyon cevabında görev alan *Interleukin-6* (IL-6), *Interleukin-8* (IL-8), TGF $\beta$ -1 ve *Tumor Necrosis Factor* (TNF) gibi sitokinlerin aktivasyonu immün cevabının tetiklenmesinde kritik bir öneme sahiptir. Proinflamatuvar sitokinlerin aktivasyonu, enfeksiyonlu bölgeye nötrofil ve monosit gibi hücrelerin göçü ile sonuçlanmaktadır (49, 50).

Bakteri tarafından üretilen lipopolisakkarit, bakteri yapısında yer alan flagella, bazı virüslerin tek ve çift zincirli genetik materyalleri ve metile olmamış CpG adacıkları *Toll-like receptor* (TLR) genlerinin kodladığı reseptörler tarafından tanınmaktadır (51). TLR reseptörleri aracılı uyarılan sinyal kaskadı sağlıklı bireylere kıyasla kistik fibrozis hastalarında daha sık uyarılmaktadır. Bu durum proinflamatuvar sitokinlerin hedeflediği hücrelerin enfeksiyonlu bölgeye sürekli göçü ve devamında inflamasyonla sonuçlanan bir moleküler patoloji oluşturmaktadır (50). Yapılan birçok çalışmada, IL-8 nötrofil hareketinde en önemli salgı sitokinlerinden birisi olup hastalarda ifadesinin arttığı gösterilmiştir (52-56).

#### 2.5. Kistik Fibrozis Hastalığında Yapılan Transkriptomik Araştırmalar

Sinyal iletim yolları hücrede büyüme, farklılaşma ve çoğalma gibi pek çok biyolojik süreçte görev alan hücre içi sinyallerin düzenlenmesinde görevlidir (57). Kistik fibrozis hastalığında etkilenen yollardan birisi immün sistem yolağıdır. NF kappa B sinyal yolağı proinflamatuvar sitokin ve kemokinlerin salınımını tetikleyen en önemli yolların başında gelmektedir. NF kappa B sinyal yolağında görevli olan sitokinlerin ifadelerindeki artış, hastalarda immün cevabın daha çok uyarılmasına sebep olmaktadır. Bu yollarda yer alan ve ifade farklılığı gösteren genlerin tedavi hedefi olarak kullanılabileceklerini gösteren çalışmalar mevcuttur (33, 34, 54).

Kistik fibroziste, bronşiyal epitel hücreler, nazal epitel hücreler, alveolar makrofaj ve kan gibi biyolojik materyaller kullanılarak yapılan transkriptomik çalışmalar mevcuttur. Bu çalışmalarda, inflamasyon yanıtında ve immün cevabın oluşmasında, hastalarda ifade farklılığı gösteren genler bulunmuştur (52, 54, 55, 56, 57).

Kistik fibrozis hastaları ve sağlıklı kontrollerin nazal epitel hücrelerinde mikroarray yöntemi kullanılarak gerçekleştirilen bir transkriptomik çalışmada; hastalarda hücre çoğalmasında görevli genlerin ifadesinin arttığı ve sil oluşumunda görevli genlerin ifadesinin azaldığı bulunmuştur (58). Homozigot F508del mutasyonunu taşıyan ağır ve hafif seyir gösteren hastalar ve sağlıklı kontrollerden alınan kan örneklerinde gerçekleştirilen RNA dizileme çalışmasında ise, tip 1 interferon yanıtında görevli olan genlerin ve ribozomal RNA (rRNA) ile etkileşim içerisinde olan ribosomal stalk proteinlerin fenotipik ciddiyeti etkileyebileceği bulunmuştur (55). Bir diğer transkriptomik çalışmada, homozigot F508del mutasyonunu taşıyan hafif ve ağır seyir gösteren hastalar ve sağlıklı kontrollerin nazal epitel hücreleri kullanılarak mikroarray gerçekleştirilmiştir. Çalışmanın sonucunda, ağır seyirli hastalarda lipid metabolizmasında, protein übikitinasyon mekanizmasında yer alan genlerin ifadesinin arttığı, protein metabolizması ve solunum yollarında immün cevapta görevli olan genlerin ifadesinin azaldığı bulunmuştur (59). 2011 yılında Ogilvie ve ark. (60) tarafından kistik fibrozis hastalarının nazal ve bronşiyal örnekleri kullanılarak gerçekleştirilen bir diğer transkriptomik araştırmada, nazal epitel hücrelerde etkilenen temel yolağın aminoasit metabolizması ve bronşiyal epitel hücrelerde etkilenen temel yolağın ise inflamasyon yanıtı olduğu gösterilmiştir.

## 2.6. Kistik Fibrozis ve Mutasyona Özgü Tedavi

Günümüzde, kistik fibrozis hastalığının kesin bir tedavisi yoktur. Bununla birlikte akciğer solunum kapasitesini artırmaya ve akciğerlerde biriken mukusu uzaklaştırmaya yönelik fizik tedavi ve egzersiz, bakteri enfeksiyonunu ve inflamasyonu azaltmaya yönelik anti-inflamatuvar ve antibakteriyel ilaçlar, pankreas yetmezliği görülen hastalarda besin emilimini artırmak amacıyla enzim replasman tedavisi (PERT) uygulanmaktadır. Uygulanan bu tedaviler ile hastaların yaşam standartlarında iyileşme sağlanmaktadır (61).

Son yıllarda CFTR mutasyonları ve protein üzerindeki etkilerine bağlı olarak tasarlanan küçük moleküller (düzelticiler ve güçlendiriciler) ile ilişkili araştırmalar hız kazanmıştır (62). İvacaftor (VX-770; Kalydeco), kişiye özgü tedavide kullanılan ilk CFTR güçlendiricisi olup; sınıf III grubunda yer alan G551D mutasyonu taşıyan

hastalar için geliştirilmiştir (63). Orkambi ise [İvacaftor-Lumacaftor (VX-809)] F508del mutasyonu için tasarlanan bir ilaç olup hem güçlendirici hem de düzeltici olarak görev yapmaktadır. Bu ilaç ile CFTR proteinin doğru bir şekilde katlanması ve hücre zarına yerleşip aktivite göstermesi mümkün olmaktadır. Symdeko [Tezacaftor(VX-661)-Ivacaftor] geliştirilen başka bir ilaç kombinasyonu olup; mutant CFTR proteininin doğru katlanıp kanal aktivitesi göstermesine yardımcı olmaktadır (64). Üçlü ilaç kombinasyonundan oluşan Trikafta [Elaxacaftor (VX-445)-Tezacaftor-Ivacaftor] ise homozigot ve heterozigot F508del mutasyonu taşıyan hastalar için tasarlanmıştır. Bu ilaç işlevsel ve sayıca daha fazla CFTR proteininin hücre zarına yerleşimini sağlamaktadır (65). Bir diğer üçlü ilaç kombinasyonu olan VX-659-Tezacaftor-Ivacaftor de Trikafta gibi homozigot ve heterozigot F508del mutasyonu taşıyan hastalar için tasarlanmıştır (66).

Küçük moleküllerin kullanılması ile tedavide oldukça umut vaadedici sonuçlar alınmakla birlikte, tedavi sadece belirli bir grup CFTR mutasyonunu kapsamaktadır. CFTR protein sentezinin gerçekleşmemesi ile sonuçlanan sınıf I grubunda yer alan mutasyonlar için kullanılabilecek küçük moleküller bulunmamaktadır. Faz II çalışmaları devam eden *Ataluren* (PTC-124), erken stop kodonlarını seçici olarak geçersiz kılan bir ajandır ve *Ataluren* ile CFTR protein sentezinin gerçekleşmesi hedeflenmektedir (62).

Anoctamin-1 (ANO-1; TMEM16A) gibi CFTR dışındaki diğer klor kanallarının aktivitesinin artırılması da tedavi hedeflerinden birisi olup; hastalık patofizyolojisini hafifletilebileceği düşünülmektedir (67). Kistik fibrozis ile ilişkili fenotipi modifiye eden genlerin hedef alınması da yeni bir tedavi stratejisi olup buna yönelik olarak sodyum kanallarından birisi olan ENaC inhibitörlerinin kullanımı araştırılmaktadır. Bu sayede sodyum hiperabsorpsiyonunun azaltılarak hastalık patofizyolojisinde gerileme elde edilebileceği düşünülmektedir (48, 68). En güncel tedavi yaklaşımlarından birisi ise miRNA'ların kullanılmasıdır. CFTR mRNA'sını doğrudan etkileyen veya CFTR mRNA ifadesini dolaylı olarak etkileyen genleri hedefleyen miRNA'ların ifadesinin arttırılması veya azaltılmasına yönelik tasarlanacak aday moleküller tedavi için yeni bir pencere oluşturmaktadır (35).

### 3. BİREYLER VE YÖNTEM

#### 3.1. Bireyler

Çalışmaya, ağır ve hafif seyir gösteren hasta kardeşlerden oluşan Aile 1 (A1-H1, A1-H2), Aile 2 (A2-H1, A2-H2) ve Aile 3 (A3-H1, A3-H2, A3-H3) dahil edilmiştir. Kistik fibrozis hastalığında, hastaların tekrarlayan akciğer enfeksiyonu geçirme durumu, karaciğer tutulum bulguları, solunum bulguları (% FEV1 değeri) ve kistik fibrozis ilişkili diyabet klinik ciddiyeti belirleyen parametrelerdir. Bu parametreler göz önüne alındığında; 1. ailede yer alan kardeşlerin (A1-H1 ve A1-H2) solunum ve tekrarlayan akciğer enfeksiyon bulguları benzer olmakla birlikte, A1-H2'nin karaciğer tutulumu daha şiddetli olup bu hastaya siroz tanısı konulmuştur. 1 ailedeki hasta kardeşler karaciğer tutulumu ve kistik fibrozis ilişkili diyabet parametreleri açısından değerlendirilmiştir ve 12 yaşındaki A1-H1 hafif seyirli, 16 yaşındaki A1-H2 ağır seyirli olarak belirlenmiştir. A1-H1 ve A1-H2 kardeşlerinin ebeveynlerinde herhangi bir akrabalık bulunmamaktadır.

2. ailede yer alan hasta kardeşlerde, (solunum fonksiyon testi 6 yaş ve üzeri hastalara uygulanabildiği için) solunum bulguları arasında karşılaştırma yapılamamıştır. A2-H2'nin karaciğer tutulumu daha şiddetli olmakla birlikte, bu hasta daha sık tekrarlayan akciğer enfeksiyonu geçirmektedir. A2'de yer alan hastalar karaciğer tutulumu ve tekrarlayan akciğer enfeksiyon geçirme durumu açısından değerlendirilerek A2-H1 (6 yaş) hafif seyirli, A2-H2 (3 yaş) ağır seyirli olduğu bulunmuştur. 2. ailede yer alan hasta kardeşlerin ebeveynleri birinci dereceden akrabadır.

3. ailede yer alan hasta kardeşler içerisinde A3-H3'ün solunum bulguları A3-H1 ve A3-H2'ye göre daha ağır olup; bu hasta daha sık tekrarlayan akciğer enfeksiyonu geçirmektedir. A3-H1 ve A3-H2'nin solunum bulguları ve tekrarlayan akciğer enfeksiyonu geçirme durumları benzerdir. A3'te yer alan hastalar tekrarlayan akciğer enfeksiyonu geçirme durumu bakımından değerlendirilmiştir ve 7 ve 19 yaşındaki A3-H1 ile A3-H2 hafif seyirli, 9 yaşındaki A3-H3 ağır seyirli olarak belirlenmiştir (Tablo 3.1). 3 hasta kardeşten oluşan 3. ailenin ebeveynleri birinci dereceden akrabadır. Tez çalışmasına, aktif solunum yakınması ve kronik hastalık öyküsü olmayan, fizik muayenesi normal ve ilaç kullanmayan üç sağlıklı kontrol

dahil edilmiştir. Kontroller, hastaların yaş aralığında olacak şekilde seçilmiştir. Tez çalışması kapsamında, Hacettepe Üniversitesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu onayı (Tarih: 15.01.2019 Karar No: 2019/02-14) alınmış olup (Bkz. Ek-1) tez çalışmasına katılan hasta ve kontrol bireylere “Bilgilendirilmiş Onam Formu” imzalatılmıştır.

**Tablo 3.1.** Hastaların klinik özellikleri. (YD: Yenidoğan)

Klinik Özellikler	Aile 1		Aile 2		Aile 3		
	Hasta 1	Hasta 2	Hasta 1	Hasta 2	Hasta 1	Hasta 2	Hasta 3
Mutasyon	F508del/G85E	F508del/G85E	F508del/F508del	F508del/F508del	I1234V/I1234V	I1234V/I1234V	I1234V/I1234V
Cinsiyet	Erkek	Kız	Erkek	Kız	Erkek	Erkek	Kız
Yaş	12	16	6	3	7	19	9
Teşhis Yaşı	3 aylık	4 aylık	5 aylık	YD	5,5 yaş	16 yaş	6 yaş
Terde Klor Konsantrasyonu (mmol/L)	96	110	101	96	88	80	150
FEV1(%)	88	105	-	-	99	89	53
Tuz Kaybı	Var	Yok	Var	Var	Yok	Yok	Var
Mekonyum İleus	Yok	Yok	Yok	Yok	Yok	Yok	Yok
Malabsorpsiyon	Var	Var	Var	Var	Var	Var	Var
Tekrarlayan Akciğer Enfeksiyonu	Yok	Yok	Var	Var	Yok	Var	Var
Karaciğer Tutulumu	Hafif	Ciddi (Siroz)	Hafif	Ciddi	Yok	Yok	Yok
Diyabet	Yok	Var	Yok	Yok	Yok	Yok	Yok
Pankreatik Atak	Yok	Yok	Yok	Yok	Yok	Var	Yok
Tedavi	Multivitamin takviyesi Tuz takviyesi Mukolitik tedavi Pankreatik Enzim Replasman Tedavisi (PERT) Antibiyotik						

### 3.2. Çalışmalarda Kullanılan Kimyasal Malzeme, Solüsyon ve Cihazlar

#### 3.2.1. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) ile Hasta DNA'larının Amplifikasyonu

15 mM MgCl<sub>2</sub> içeren Tampon, 10X (NH<sub>4</sub>)SO<sub>4</sub> (Ampliçon)

Deoksiribonükleotit trifosfat (dNTP)	: 12,5 mM
<i>Forward</i> primer	: 100 nM
<i>Reverse</i> primer	: 100 nM
Taq DNA Polimeraz (Ampliçon)	: 5 U/μl
DNA	:100ng/μl
Distile su	

#### 3.2.2. PZR Sonucunun Agaroz Jel Elektroforezi ile Kontrolü

Agaroz (moleküler biyoloji kullanım saflığında) (Prona)

Tris-Asetat-EDTA (TAE) Tamponu (pH:8,0):

- Trizma-baz (Merck)	: 2 M
- Glasiyal Asetik Asit (Merck)	: 57,1 ml
- Na <sub>2</sub> EDTA (Merck)	: 0,5 M
Yükleme Tamponu:	
- Gliserol	: 5,5 ml
- 1X TAE tamponu	: 4,5 ml
- <i>Orange G</i> boyası	: 0,01 g
- Etidyum Bromür (EtBr) (Sigma)	:10 mg/ml
- Distile su	
- Moleküler ağırlık belirleyicisi (50 bç) (Thermoscientific)	

### 3.2.3. DNA Dizi Analizi

*BigDye® Terminator v1.1* (Applied Biosystems)

Sekans tamponu, 5X

DNA :100 ng/ $\mu$ l

Primer : 3 nM

Distile su

### 3.2.4. Nazal Epitel Hücrelerden RNA İzolasyonu

Dietil pirokarbonat (DEPC) (Sigma)

2-Mercaptoethanol (Sigma)

*Proteinase K* (Thermo Scientific)

Dnaz-1 ve Dnaz-1 Solüsyonu (Bio-Rad)

Etanol (%96-100) (Emsure)

Soğutmalı santrifüj (Boeco)

Hibridizasyon fırını (Amersham Life Sciences)

*miRCURY™ RNA Isolation Kit* (Exiqon):

-Guanidin tiosiyanat içeren ve 2-merkaptöetanol eklenerek kullanılan lizis tamponu

-Etanol eklenerek kullanılan yıkama tamponu

-Rnaz içermeyen distile su

### 3.2.5. cDNA Sentezi

*RT<sup>2</sup> First Strand Kit* (Qiagen):

-Genomik DNA Eliminasyon tamponu

-BC3 tamponu, 5X

-Kontrol P2

-*RE3 Reverse Transcriptase* karışımı

-Rnaz içermeyen distile su

### 3.2.6. Kistik Fibrozis PCR Array (Qiagen)

*RT<sup>2</sup> SYBR Green Flour qPCR Master Mix* (Qiagen)

-RT<sup>2</sup> SYBR Green karışımı, 2X

*The Human Cystic Fibrosis RT2 Profiler PCR Array* (Qiagen)

## 3.3. Yöntemler

### 3.3.1. Hasta DNA'larının Amplifiye Edilmesi

Önceden izole edilen hasta kardeşlere ait DNA'lar *Gene Amplification PCR System 9700* (Applied Biosystem) cihazında amplifiye edilmiştir. Reaksiyonda 10X tampon, 100 nM *forward* primer, 100 nM *reverse* primer, 12,5 mM dNTP, 0,2 µl Taq DNA polimeraz son hacim 50 µl olacak şekilde kullanılmıştır.

Reaksiyon Koşulları:

94 <sup>0</sup> C'de	3 dk	
94 <sup>0</sup> C'de	30 sn	} 35 döngü
57 <sup>0</sup> C'de	45 sn	
72 <sup>0</sup> C'de	30 sn	
72 <sup>0</sup> C'de	3 dk	

PZR ürünü, %3'lük agaroz jel elektroforezi sonrasında ultraviyole ışık (UV) altında kontrol edilmiştir.

### 3.3.2. DNA Dizi Analizi

CFTR geninin kodlanan 27 ekzonu, ekzon-intron bağlantı bölgeleri, promotör ve 3'UTR bölgesi amplifiye edildikten sonra DNA Dizi Analizi gerçekleştirilmiştir. Dizileme yönteminde, tek zincirli DNA molekülünün sentezlenmesi yeterli



olduğundan CFTR genine özgü tasarlanan primer çiftlerinden yalnızca biri kullanılmıştır. Reaksiyonda, 4 µl 5X sekans tamponu, 2 µl BigDye® Terminator v1.1, 3 nM primer son hacim 20 µl olacak şekilde kullanılmıştır.

Reaksiyon Koşulları:

94 <sup>0</sup> C'de	4 dk		
94 <sup>0</sup> C'de	15 sn	}	25 döngü
50 <sup>0</sup> C'de	15 sn		
60 <sup>0</sup> C'de	4 dk		

1. PZR sonrası, tüp 2 µl 3M NaOAc eklendi ve tüp içerisindeki örnekler 60 µl %100 etanol içeren 1,5 ml'lik tüpe aktarıldı.
2. Tüp, -20<sup>0</sup>C'de 1 gece bekletildi.
3. Oda sıcaklığında 14.000 rpm'de 30 dk boyunca santrifüj yapılarak süpernatant uzaklaştırıldı.
4. 160 µl %70 etanol eklendi.
5. Oda sıcaklığında 14.000 rpm'de 30 dk boyunca santrifüj yapılarak süpernatant uzaklaştırıldı.
6. Tüpler 37<sup>0</sup>C'de 1 saat bekletildi ve etanolün tamamen uzaklaştırılması sağlandı.
7. Tüp içerisine, 20 µl formamit eklendi ve tüpün tamamı 96 kuyucuk içeren mikropolanın bir kuyucuğuna aktarıldı.
8. Mikropolaka, 95<sup>0</sup>C'de 10 dk denatüre edildi ve buz üzerine alınarak DNA Dizi Analizi cihazına (ABI 3030) yüklendi.

DNA Dizi Analizi sonuçları *Chromas* programı ile analiz edilmiştir.

### 3.3.3. Nazal Epitel Hücrelerden RNA İzolasyonu

Ağır ve hafif seyir gösteren hastalar ve sağlıklı kontrollerden 0.8 mm'lik fırça (TePe) yardımıyla alınan nazal sürüntü örneğinden *miRCURY™ RNA Isolation Kit* (Exiqon) ile RNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Elde edilen RNA'ların derişimleri

ve saflıkları spektrofotometrede (*NanoDrop ND-1000*, Thermo Scientific) tespit edilmiştir.

1. Hasta ve sağlıklı kontrollerden alınan nazal sürüntü örnekleri, içerisinde 6 µl 2-merkaptoetanol ve 600 µl lizis tamponu bulunan Rnaz içermeyen tüpe aktarıldı.
2. Tüp, 1 dk süreyle vorteklenerek homojenizasyon sağlandı.
3. Oda sıcaklığında 5 dk bekletildi.
4. Lizat, başka bir Rnaz içermeyen tüpe aktarıldı ve 40 µl *Proteinase K* (Thermo Scientific) eklendi.
5. Hibridizasyon fırınında 55<sup>0</sup>C'de 15 dk bekletildi.
6. Lizat ile eşit hacimde %70 etanol eklenerek vorteks yapıldı.
7. Lizat kolona aktarılarak 14.000 rpm'de oda sıcaklığında 1,5 dk santrifüjlendi ve toplama tüpünün altında kalan sıvı uzaklaştırıldı.
8. Kolon membranına direkt olarak 5 µl Dnaz-1 ve 75 µl Dnaz-1 solüsyonu eklenerek oda sıcaklığında 15 dk inkübasyon gerçekleştirildi.
9. Kolona, 400 µl yıkama tamponu eklendikten sonra 14.000 rpm'de oda sıcaklığında 1,5 dk santrifüj yapılarak toplama tüpünün altında kalan sıvı uzaklaştırıldı. Bu basamak 2 kere daha tekrar edilerek toplama tüpü uzaklaştırıldı.
10. Kolon 1,5 ml'lik yeni bir toplama tüpüne alındı.
11. Hibridizasyon fırınında 55<sup>0</sup>C'de ısıtılan Rnaz içermeyen 30 µl distile su direkt membrana eklendi ve oda sıcaklığında 5 dk bekletildi.
12. Oda sıcaklığında 14.000 rpm'de 2 dk boyunca santrifüjlenerek çökmesi sağlandı.
13. Elde edilen RNA'lar -80<sup>0</sup>C'de bekletildi.

#### **3.3.4. RNA Derişimlerinin Ölçümü**

Nazal epitel hücrelerden elde edilen RNA örneklerinin derişim ve saflıkları, spektrofotometre (*NanoDrop ND-1000*) ile belirlenmiştir.

### 3.3.5. cDNA Sentezi

Elde edilen RNA'lardan *RT<sup>2</sup> First Strand Kit* (Qiagen) ile cDNA sentezi gerçekleştirilmiştir.

1. Tüp içerisine, 2 µl Genomik DNA Eliminasyon tamponu ve RNA (1000 ng/µl) son hacim 10 µl olacak şekilde Rnaz içermeyen su eklendi ve genomik DNA eliminasyon karışımı hazırlandı.
2. Tüp, 42<sup>0</sup>C'de 5 dk boyunca bekletildi ve buz üzerine alındı.
3. Başka bir tüpte, 4 µl 5X BC3 tamponu, 3 µl Rnaz içermeyen distile su, 2 µl *RE3 Reverse Transcriptase* karışımı ve 1 µl Kontrol P2 eklenerek *reverse* transkripsiyon karışımı hazırlandı.
4. *Reverse* transkripsiyon karışımı genomik DNA eliminasyon tamponuna eklendi ve pipetaj yapıldı.
5. Tüp, 42<sup>0</sup>C'de 15 dk boyunca inkübe edildi ve devamında 95<sup>0</sup>C'de 5 dk inkübasyon yapılarak, *reverse* transkriptaz inaktive edildi.
6. Tüp içerisine 91 µl Rnaz içermeyen distile su eklenerek cDNA sentezi tamamlandı.

### 3.3.6. Kistik Fibrozis PCR Array

Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR), reaksiyon döngüsü boyunca artan ürüne paralel olarak artan floresan ışımaya miktarının, eş zamanlı olarak bilgisayar ekranından görüntülenmesini mümkün kılan bir sistemdir. Reaksiyon bileşenlerinden birisi olan *SYBR Green* çift zincirli DNA'ya bağlanarak floresan ışımaya yayan bir boyadır. Boyanın verdiği floresan ışımaya gerçek zamanlı PZR tarafından saptanır ve kantitatif analiz yapılır. Gerçek zamanlı PZR'da amplifikasyon miktarı logaritmik olarak belirlenmektedir ve floresan ışımaya sağlandığı ilk döngü *threshold cycle (Ct)* olarak adlandırılmaktadır.

Kistik Fibrozis PCR Array (Qiagen) gerçek zamanlı PZR tekniği temeline dayanan bir yöntem olup; hastalık ile ilişkili genler ve CFTR ile ilişkili yollarda (nötrofil kemotaksisi, immun ve inflamatuvar cevap, protein katlanması ve iyon

taşınımı, oksidatif stres) yer alan 84 adet genin ifadesi analiz edilebilmektedir. Array 96 kuyucuklu mikroparka formatında olup 84 adet genin normalizatörü olarak kullanılacak olan 5 adet *housekeeping gen* (ACTB, GAPDH, B2M, HPRT1 ve RPLP0) içerir. Ek olarak, cDNA sentezinin verimliliğini ölçen 3 adet *Reverse Transcription Control* (RTC) kuyucuğu, gerçek zamanlı PZR verimliliğini ve reaksiyon doğruluğunu belirleyen 3 adet *Positive PCR Control* (PPC) (18<Ct değeri>22) kuyucuğu ve Genomik DNA kirliliğini belirlemeye yönelik olarak 1 adet *Human Genomic DNA Contamination* (HGDC) (Ct değeri>30) kuyucuğu bulunmaktadır. *Reverse Transcription Control* (RTC) kuyucuklarında cDNA sentezi sırasında reaksiyon içeriğine katılan Kontrol P2'yi amplifiye eden bir primer seti, PPC kuyucuklarında plazmit DNA ve onu amplifiye eden bir primer seti, HGDC kuyucuğunda ise transkribe olmayan ve tekrarlayan DNA bölgelerini içeren ve bu bölgeleri amplifiye eden bir primer seti bulunmaktadır (Şekil 3.1).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	ACE	ADIPOR2	ADK	ADRB2	AHSA1	ALOX12B	CALR	CANX	CCL2	CFTR	CLU	CXCL1
B	CXCL2	CXCR2	DEFB1	DNAJA1	DNAJC5	DUSP1	EDN1	EDNRA	EPSTI1	EZR	FAS	GCLC
C	GOPC	GSTM1	HSP90AA1	HSPA1A	HSPA4	HSPA8	HSPH1	ICAM1	IFRD1	IGFBP5	IL10	IL1B
D	IL6	IL7R	CXCL8	ITGA2	ITGB2	KCNE1	KIT	LCN2	MAPK1	MBL2	MET	MSRA
E	NFKB1	NFKBIA	NME1	NOS3	NR4A2	PDZK1	PLA2G5	PPP2R4	PRKAA1	PRKAA2	PRKCE	PRTN3
F	PTGS2	S100A8	SCNN1B	SCNN1G	SERPINA1	SFTPB	SLC26A3	SLC9A3R1	SLC9A3R2	SLPI	SNAP23	STX1A
G	STX8	TCF7L2	TGFB1	TJP1	TLR2	TLR4	TLR5	TNF	TNFRSF11A	TNFRSF1A	TNFSF10	VCP
H	ACTB	B2M	GAPDH	HPRT1	RPLP0	HGDC	RTC	RTC	RTC	PPC	PPC	PPC

**Şekil 3.1.** Kistik Fibrozis PCR Array düzeni.

*RT<sup>2</sup> First Strand Kit* kullanılarak sentezlenen cDNA'dan 102 µl ve 1350 µl *RT<sup>2</sup> SYBR Green Flour qPCR Master Mix* son hacim 2700 µl olacak şekilde tüpte hazırlanmıştır. Hazırlanan reaksiyon içeriğinden 25 µl alınarak mikroparkanın her bir kuyucuğuna dağıtılmıştır. Gen ifadesi analizi *Bio-Rad IQ5 Real-time PCR* cihazında gerçekleştirilmiştir. Gen ifadesinin normalizasyonu için *housekeeping gen* olarak ACTB ve HPRT1 kullanılmıştır.

Reaksiyon Koşulları:

95 <sup>0</sup> C'de	10 dk	} 40 döngü
95 <sup>0</sup> C'de	15 sn	
60 <sup>0</sup> C'de	1 dk	
95 <sup>0</sup> C'de	1 dk	
55 <sup>0</sup> C'de	1 dk	

### 3.3.7. Verilerin Değerlendirilmesi ve İstatistiksel Analiz

Kistik Fibrozis PCR Array ile 84 genin ifade değışiklikleri Qiagen'e ait Excel® temelli analiz programı kullanılarak belirlenmiştir. Normalizasyonda kullanılacak olan uygun *housekeeping* genin seçilmesine yönelik, NormFinder (<https://moma.dk/normfinder-software>) programı kullanılmıştır. NormFinder programı ile hasta ve kontrol gruplarında en stabil iki housekeeping gen kombinasyonu olarak ACTB ve HPRT1 bulunmuştur. Normalizatör olarak ACTB ve HPRT1 kullanılarak gen ifadesi,  $2^{-\Delta\Delta CT}$  yöntemi ile hesaplanmıştır.

İstatistiksel analiz için, Qiagen'e ait Excel® temelli analiz programında yer alan *unpaired Student-t test* kullanılmıştır. Gen ifadesi 2 kat artan ve 2 kat azalan kat değışimleri ve istatistiksel olarak  $p < 0.05$  değeri anlamlı olarak kabul edilmiştir.

### 3.3.8. Yolak Analizi

Çalışmaya dahil edilen hastalarda ve kontrol gruplarında ifade farklılığı gösteren genler, Webgestalt (<http://www.webgestalt.org/>) programı alt sekmesinde yer alan *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes* (KEGG) ve *Wikipathways* programına yüklenerek yolak analizleri gerçekleştirilmiştir.

Array'de yer alan 84 genin normalize edilmiş değeri kullanılarak BRB Array Tool (<https://brb.nci.nih.gov/BRB-ArrayTools/>) yazılımı ile hiyerarşik kümeleme analizi yapılmıştır.

Çalışmada yer alan, hasta ve kontrol gruplarında ifade farklılığı gösteren genlerin *heatmap* analizi için, Heatmapper (<http://www2.heatmapper.ca/>) programı kullanılmıştır.

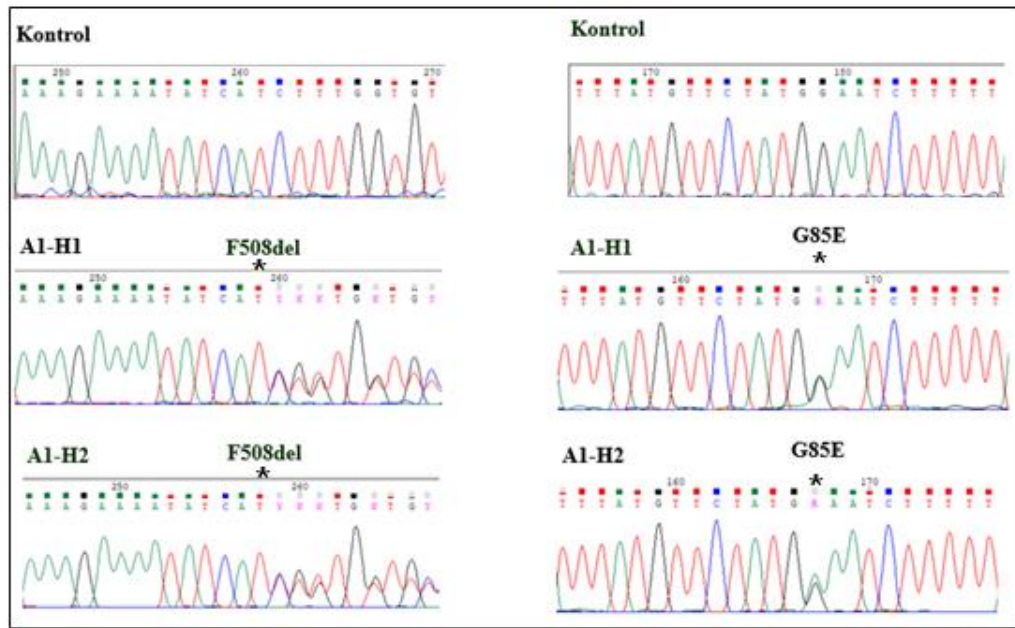
Hasta grubunda ifade farklılığı gösteren genlerle, hastaların klinik özellikleri açısından bir ilişki kurulması için IBM SPSS Version 22 programı içerisinde yer alan *spearman's bivariate correlation* istatistik yöntemi kullanılmıştır.

## 4. BULGULAR

### 4.1. DNA Dizi Analizi

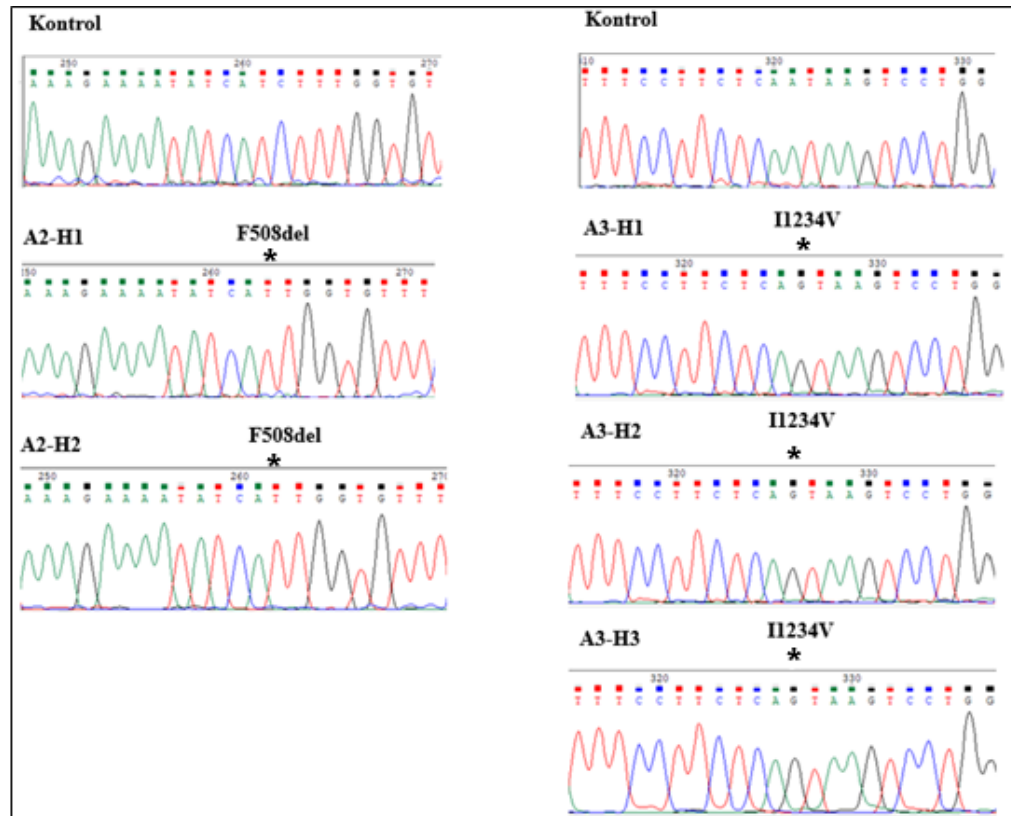
Hastalardan önceden izole edilen DNA'lar kullanılarak CFTR geninin kodlanan bölgesi (27 ekzon), ekzon-intron bağlantı bölgeleri promotör ve 3'UTR bölgesi PZR ile amplifiye edilmiş ve devamında DNA Dizi analizi gerçekleştirilmiştir. 1. ailedeki hasta kardeşlerin (A1-H1, A1-H2) mutasyonları F508del/G85E (Sınıf II/Sınıf II), 2. ailedeki hasta kardeşlerin (A2-H1, A2-H2) mutasyonları F508del/F508del (Sınıf II/Sınıf II), 3. ailedeki hasta kardeşlerin (A3-H1, A3-H2 ve A3-H3) mutasyonları I1234V/I1234V olarak saptanmıştır (Şekil 4.1).

A)



B)

C)



**Şekil 4.1.** Çalışmaya dahil edilen hastaların elektroferogram sonuçları (A: 1. Aile (A1-H1, A1-H2); B: 2. Aile (A2-H1, A2-H2); C: 3. Aile (A3 H1, A3-H2, A3-H3)).

#### 4.2. Elde Edilen RNA'ların Derişim ve Saflıkları

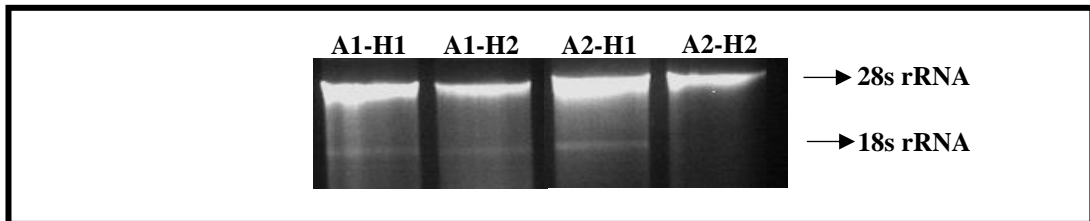
Hasta ve kontrol grubunda yer alan bireylerin nazal sürüntü örneklerinden elde edilen RNA'ların derişim ve saflıkları spektrofotometrede (*NanoDrop* ND-1000, Thermo Scientific) ölçülmüştür. Sonuçlar, Tablo 4.1'de özetlenmiştir.

**Tablo 4.1.** RNA örneklerinin derişim ve saflık değerleri.

Hasta Grubu ve Kontrol Grubu	RNA Derişimi (ng/ $\mu$ l)	260/280 Oranı
A1-H1	686,3 ng/ $\mu$ l	2,01
A1-H2	908,2 ng/ $\mu$ l	1,98
A2-H1	257,1 ng/ $\mu$ l	1,83
A2-H2	211,3 ng/ $\mu$ l	1,89
A3-H1	213,4 ng/ $\mu$ l	2,00
A3-H2	260,8 ng/ $\mu$ l	2,02
A3-H3	145,9 ng/ $\mu$ l	1,97
Kontrol 1	88,84 ng/ $\mu$ l	1,88
Kontrol 2	142,03 ng/ $\mu$ l	1,94
Kontrol 3	219,59 ng/ $\mu$ l	2,00

#### 4.3. Elde Edilen RNA Örneklerinin Agaroz Jel Elektroforezi ile Kontrolü

1. (A1-H1, A1-H2) ve 2. ailedeki (A2-H1, A2-H2) hasta kardeşlerin nazal sürüntü örneklerinden elde edilen RNA'ların kalitesinin belirlenmesi amacıyla %3'lük agaroz jel elektroforezi gerçekleştirilmiş ve sonrasında ultraviyole ışık altında görüntü alınmıştır (Şekil 4.2).



**Şekil 4.2.** 1. ve 2. ailedeki hastalara ait elde edilen RNA'ların jel fotoğrafı. (A3-H1, A3-H2, A3-H3) ailesinin RNA miktarının daha az olması sebebi ile bu hastaların RNA örneklerinin agaroz jel elektroforezi ile kontrolü gerçekleştirilememiştir.)



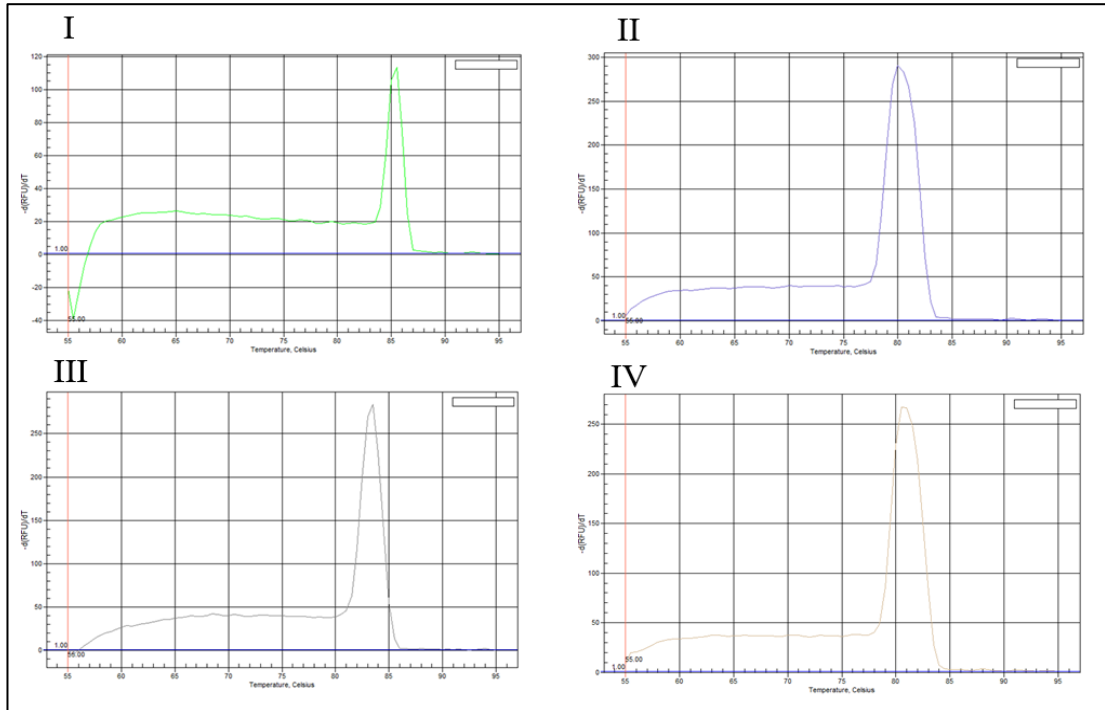
#### 4.4. Kistik Fibrozis PCR Array

Kistik Fibrozis PCR Array, kistik fibrozis hastalığında ifade farklılığı gösteren genleri ve CFTR ile etkileşim içerisinde olan toplam 84 adet geni içermektedir. Bu genler 8 sınıfta (CFTR modifiye edici genler, CFTR ile interaksiyonda olan genler, Nötrofil kemotaksisinde görevli genler, İnflamatuvar yanıtta rol alan genler, İmmün yanıtta rol alan genler, Katlanmamış CFTR protein mekanizmasında rol alan genler, İyon taşınımında görevli genler ve Oksidatif strese görev alan genler) toplanmıştır. Array'in çalışma prensibi gerçek zamanlı PZR yöntemine dayalı olup aynı anda birden fazla genin ifadesi kantitatif olarak analiz edilebilmektedir. Array içerisinde yer alan PPC, RTC ve HGDC kontrolleri ile cDNA sentezinin kalitesi, gerçek zamanlı PZR'nin verimliliği ve genomik DNA kontaminasyon varlığı analiz edilmektedir. Çalışmaya dahil edilen hastalarda ve kontrollerde cDNA sentez basamağının ve reaksiyonun doğru olduğu ve genomik DNA kontaminasyonu olmadığı tespit edilmiştir. Kistik Fibrozis PCR Array içerisinde yer alan 84 adet genin ifade değişimleri Qiagen'e ait Excel® temelli analiz programı kullanılarak saptanmıştır. Array içerisinde yer alan GAPDH, B2M ve RPLP0 *housekeeping* genlerinin ifadesi NormFinder programı tarafından gruplar arası ve grup içi değerlendirilmiş ve her iki durumda ifadelerinde değişiklik saptamıştır. Grup içi ve gruplar arasında ifadesi sabit olan en iyi iki *housekeeping* gen kombinasyonu olarak ACTB ve HPRT1 olarak bulunmuş ve bu 2 gen normalizatör olarak kullanılmıştır (Şekil 4.3).

Gene name	Stability value			Best gene	HPRT1
ACTB	0.964			Stability value	0.711
B2M	2.883				
GAPDH	1.625			Best combination of two genes	ACTB and HPRT1
HPRT1	0.711			Stability value for best combination of two genes	0.886
RPLP0	1.333				
<b>Intragroup variation</b>					
Group identifier	1	2	3		
ACTB	0.326	0.008	1.666		
B2M	7.244	14.756	0.744		
GAPDH	0.276	11.583	0.077		
HPRT1	0.241	0.008	0.154		
RPLP0	0.079	4.659	3.661		
<b>Intergroup variation</b>					
Group identifier	1	2	3		
ACTB	-0.808	0.084	0.724		
B2M	3.443	-1.741	-1.702		
GAPDH	-1.391	1.088	0.304		
HPRT1	-0.713	0.357	0.356		
RPLP0	-0.531	0.213	0.318		

Şekil 4.3. NormFinder sonucu.

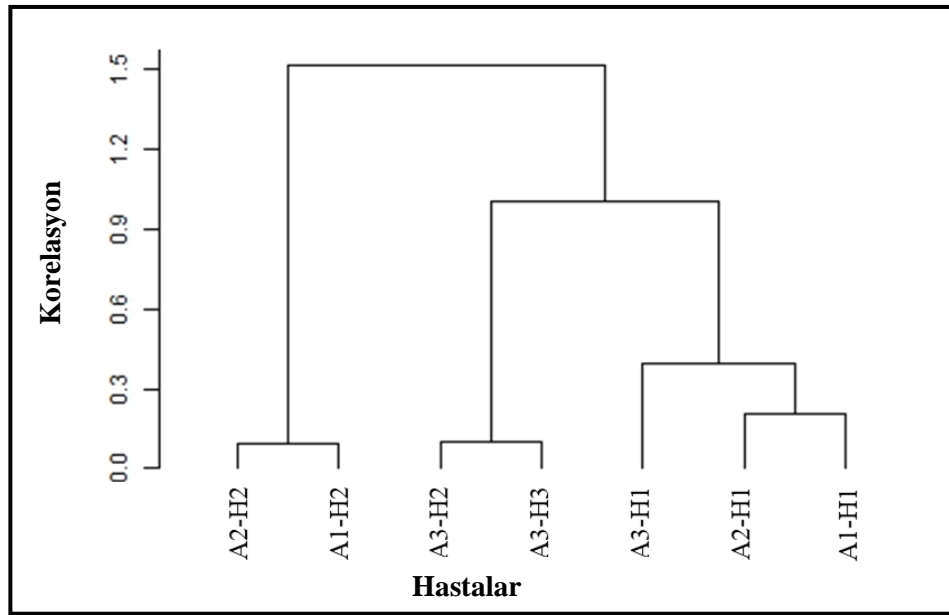
Gerçek zamanlı PZR sonucunda, Kistik Fibrozis PCR Array sonucunda *Angiotensin I Converting Enzyme* (ACE), *C-X-C Motif Chemokine Ligand 8* (CXCL8), *Integrin Subunit Beta 2* (ITGB2) ve *Secretory leukocyte peptidase inhibitor* (SLPI) genleri seçilerek oluşturulan örnek erime eğrisi grafikleri Şekil 4.4.'te gösterilmiştir.



Şekil 4.4. Gerçek zamanlı PZR sonrası oluşan erime eğrisi grafiğinde (I: ACE, II: CXCL8, III: ITGB2, IV: SLPI.) genleri örnek olarak verilmiştir.

#### 4.4.1. Hastalarda Hiyerarşik Kümeleme Analizi

Gerçekleştirilen Kistik Fibrozis PCR Array sonucunda 84 adet genin normalize edilmiş değerleri ile hastaların (1. aile, 2. aile, 3. aile) klinik ciddiyetlerinin belirtilmediği körleme analiz yöntemi gerçekleştirilerek hiyerarşik kümeleme analizi yapılmıştır. Bu amaçla kullanılan BRB Array Tool (<https://brb.nci.nih.gov/BRB-ArrayTools/>) yazılımı sonucunda, F508del/F508del ve F508del/G85E mutasyonlarını taşıyan Sınıf II grubunda yer alan hafif seyirli A1-H1 ve A2-H1 ile Sınıf IV grubunda yer alan hafif seyirli A3-H1'in gen profilleri benzer olarak bulunmuştur. Sınıf II grubundaki ağır seyirli A1-H2 ve A2-H2'nin gen profillerinin benzer olduğu bulunmuştur. I1234V/I1234V mutasyonunu taşıyan Sınıf IV grubunda yer alan ağır seyirli A3-H3 ile hafif seyirli A3-H2'nin gen profillerinin benzer olduğu dikkat çekmektedir (Şekil 4.5).



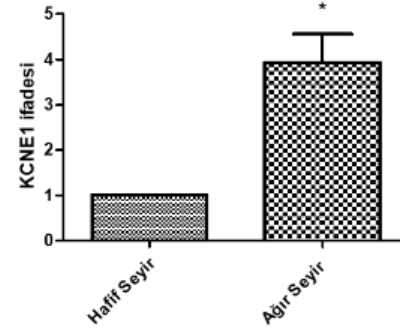
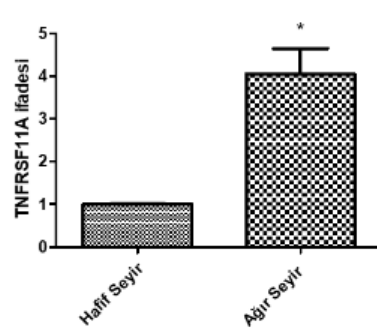
**Şekil 4.5.** Ağır ve hafif seyir gösteren hastaların hiyerarşik kümeleme analizi (Sınıf II grubu hafif seyirli hastalar; A1-H1, A2-H1. Sınıf II grubu ağır seyirli hastalar; A1-H2, A2-H2. Sınıf IV grubu hafif seyirli hastalar; A3-H1, A3-H2. Sınıf IV grubu ağır seyirli hasta; A3-H3.).

#### 4.4.2. Sınıf II Grubunda Yer Alan Ağır ve Hafif Seyirli Hastalarda İfade Farklılığı Gösteren Genler ile Yolak Analizleri

CFTR mutasyonları sınıflandırılmasında, aynı sınıf (Sınıf II) içerisinde yer alan F508del/F508del ve F508del/G85E mutasyonlarına sahip A1 ve A2 ailelerindeki hastaların nazal sürüntülerinden elde edilen RNA'lar kullanılarak Kistik Fibrozis PCR Array (Qiagen) gerçekleştirilmiştir. Ağır ve hafif seyir gösteren hastalar arasında ağır seyirli hastalarda ifade farklılığı gösteren 29 gen bulunmuştur (EK-2). Bu genler içerisinde ağır seyir gösteren hastalarda (A1-H2 ve A2-H2) 13 genin ifadesi artarken, 16 genin ifadesi azalmıştır. 29 gen içerisinde ağır seyirli hastalarda anlamlı olarak ifade farklılığı gösteren genler ( $p < 0.05$ ); *Tumor Necrosis Factor Receptor Superfamily, Member 11A* (TNFRSF11A; RANK), *Potassium Voltage-Gated Channel* (KCNE1), *Syntaxin 1A* (STX1A), *Solute Carrier Family 9 Member 3 Regulator 2* (SLC9A3R2; NHERF-2), *Chemokine (C-X-C motif) Ligand 1* (CXCL1), *Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator* (CFTR), *Chemokine (C-X-C motif) Ligand 2* (CXCL2) olarak bulunmuştur (Şekil 4.6). KEGG programı kullanılarak 29 genin dahil olduğu yolaklar belirlenmiştir (Tablo 4.2).

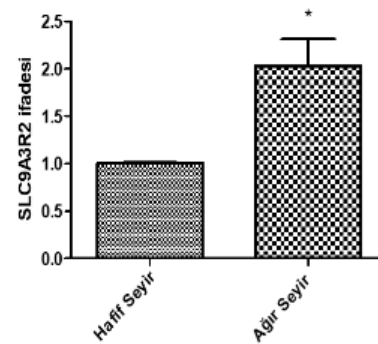
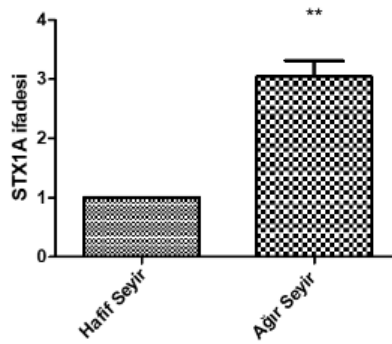
Gen Adı	Kat Değişimi	Gen Adı	Kat Değişimi
TNFRSF11A	4,03	CXCL1	-5,03
KCNE1	3,90	CFTR	-2,92
STX1A	3,03	CXCL2	-2,65
SLC9A3R2	2,02		

A)



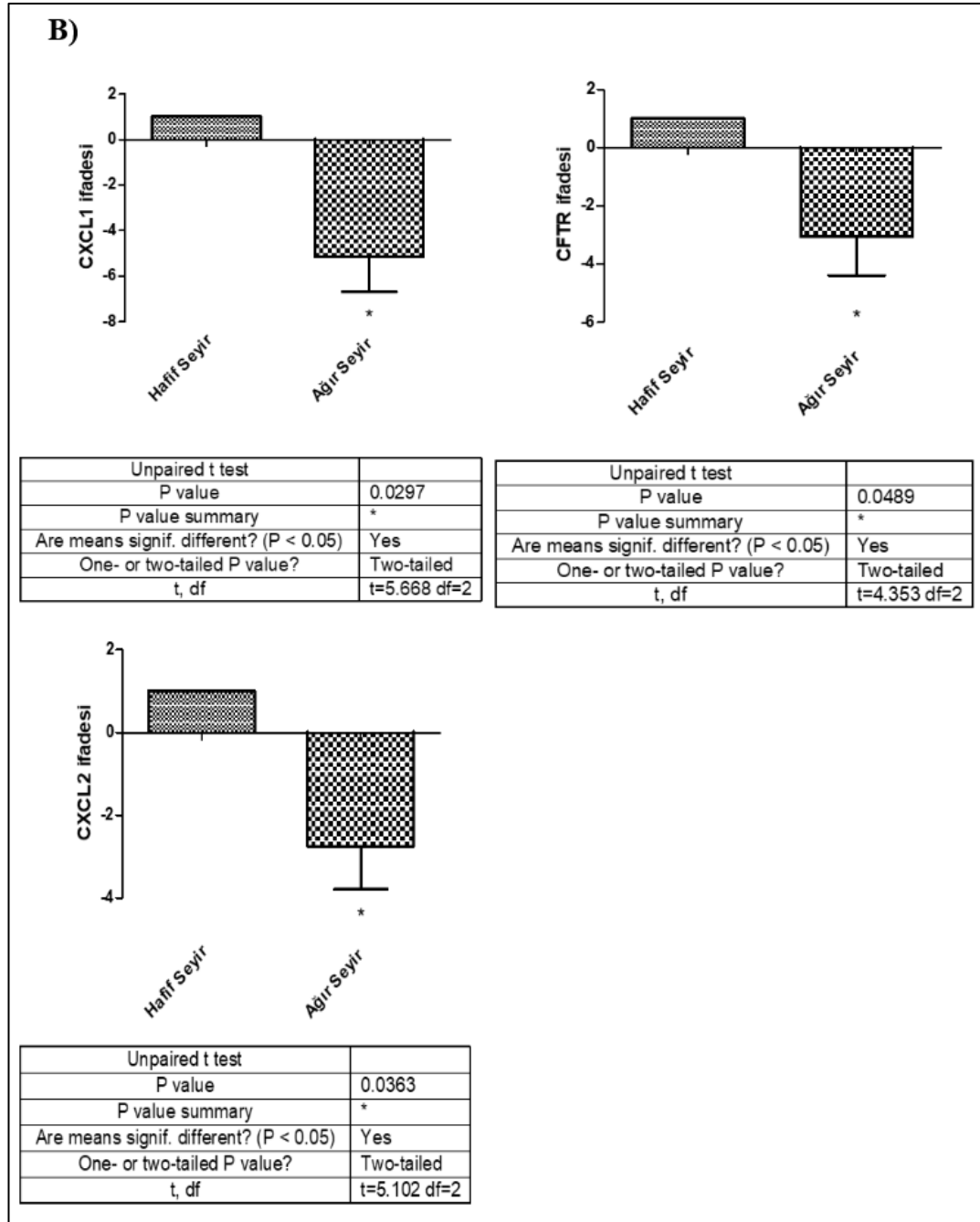
Unpaired t test	
P value	0,0185
P value summary	*
Are means signif. different? (P < 0.05)	Yes
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
t, df	t=7,249 df=2

Unpaired t test	
P value	0,0229
P value summary	*
Are means signif. different? (P < 0.05)	Yes
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
t, df	t=6,500 df=2



Unpaired t test	
P value	0,0086
P value summary	**
Are means signif. different? (P < 0.05)	Yes
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
t, df	t=10,71 df=2

Unpaired t test	
P value	0,0360
P value summary	*
Are means signif. different? (P < 0.05)	Yes
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
t, df	t=5,123 df=2



**Şekil 4.6.** Ağır seyirli hastalarda (A1-H2, A2-H2) ifadesi artan ve azalan genler.

(A: 2 kat ve üzerinde kat değişimi gösteren genler; TNFRSF11A, STX1A, KCNE1, SLC9A3R2. B: 2 kat ve altında kat değişimi gösteren genler; CXCL1, CFTR ve CXCL2.)

**Tablo 4.2.** Ağır seyirli hastalarda (A1-H2, A2-H2) ifade farklılığı gösteren genlerin yer aldığı yolak sonuçları (p<0.05 olan genler \* ile işaretlenmiştir.)

<b>Yolak Adı</b>	<b>İlişkili genler</b>	<b>P değeri</b>
IL -17 sinyal yolağı	CXCL1*, LCN2, CXCL2*, IL1B, CXCL8, HSP90AA1, PTGS2, S100A8	6.83E-10
NF-kappa B sinyal yolağı	CXCL2*, CXCL8, IL1B, PTGS2, TNFRSF11A*, TNFRSF1A	7.91E-07
Sitokin-sitokin reseptör etkileşimi	CXCL1*, CXCL2*, CXCL8, IL1B, TNFSF10, CXCR2, TNFRSF11A*, TNFRSF1A	5.37E-06
TNF sinyal yolağı	CXCL1*, CXCL2*, IL1B, PTGS2, TNFRSF1A	3.69E-05
Kan akış gerilimi ve aterosklerozis	DUSP1, HSP90AA1, IL1B, TNFRSF1A, GSTM1	0.000109
NOD-benzeri reseptör yolağı	CXCL1*, CXCL2*, CXCL8, HSP90AA1, IL1B	0.000275
Araşidonik asit metabolizması	PLA2G5, PTGS2, ALOX12B	0.001398
Nekroptozis	HSP90AA1, IL1B, TNFRSF1A, TNFSF10	0.002421
Kemokin sinyal yolağı	CXCL1*, CXCL2*, CXCL8	0.00422
Veziküler taşınımında SNARE etkileşimleri	SNAP23, STX1A*	0.00643
Aldosteron tarafından düzenlenen sodyum iyonunun geri emilimi	SCNN1G, SLC9A3R2*	0.00758

#### **4.4.3. Sınıf IV Grubunda Yer Alan Ağır ve Hafif Seyirli Hastalarda İfade Farklılığı Gösteren Genler ile Yolak Analizi**

CFTR geni mutasyon sınıflandırılmasında, Sınıf IV grubu içerisinde yer alan I1234V/I1234V mutasyonuna sahip A3 ailesindeki hastaların nazal sürüntülerinden elde edilen RNA'lar kullanılarak Kistik Fibrozis PCR Array (Qiagen) gerçekleştirilmiştir. Ağır ve hafif seyir gösteren hastalar arasında ağır seyirli hastada (A3-H3) ifade farklılığı gösteren 24 gen bulunmuştur. Bu genler içerisinde ağır seyir gösteren hastada 3 genin ifadesi artarken, 21 genin ifadesi azalmıştır. KEGG programı kullanılarak 29 genin dahil olduğu yolaklar belirlenmiştir (Tablo 4.3).



**Tablo 4.3.** Ağır seyirli hastada (A3-H3) ifadesi artan ve azalan genler ve yolak sonuçları. (A: 2 kat ve üzerinde kat değişimi gösteren genler. B: 2 kat ve altında kat değişimi gösteren genler. C: Ağır seyirli hastada ifade farklılığı gösteren 29 genin yer aldığı yolak sonuçları.)

A)		B)			
Gen Adı	Kat Değişimi	Gen Adı	Kat Değişimi	Gen Adı	Kat Değişimi
DEFB1	2,33	TNF	-2,07	SFTPB	-4,18
CCL2	2,29	HSP90AA1	-2,1	CXCR2	-4,38
CLU	2,11	CXCL1	-2,13	PLA2G5	-4,42
		PTGS2	-2,22	SERPINA1	-4,63
		CXCL8	-2,3	MBL2	-4,88
		IL1B	-2,91	NOS3	-5,09
		TLR4	-3,18	KCNE1	-5,44
		DUSP1	-3,2	IGFBP5	-7,27
		CFTR	-3,29	IL7R	-9,43
		ITGB2	-3,55		
		HSPH1	-3,75		
		ACE	-3,8		

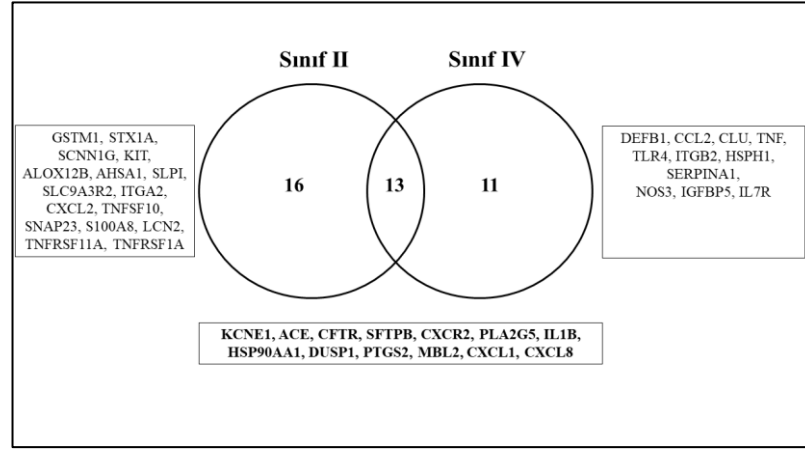
C)

Yolak Adı	İlişkili genler	P değeri
IL-17 sinyal yolağı	CCL2, CXCL1, CXCL8, TNF HSP90AA1, IL1B, PTGS2	4.48E-09
NOD-benzeri reseptör yolağı	CCL2, CXCL1, CXCL8, TNF HSP90AA1, IL1B, TLR4	2.75E-07
Kan akış gerilimi ve aterosklerozis	CCL2, DUSP1, HSP90AA1 IL1B, NOS3, TNF	1.8E-06
NF-kappa B sinyal yolağı	CXCL8, IL1B, PTGS2, TLR4 TNF	5.91E-06
Diyabetik komplikasyonlarda AGE-RAGE sinyal yolağı	CCL2, CXCL8, IL1B, NOS3, TNF	7.24E-06
Sitokin-sitokin reseptör etkileşimi	CCL2, CXCL1, CXCL8, IL1B CXCR2, IL7R, TNF	1.17E-05
TNF sinyal yolağı	CCL2, CXCL1, IL1B, PTGS2 TNF	1.21E-05
Koagülasyon yolağı	CLU, ITGB2, MBL2, SERPINA1	6.71E-05
TLR sinyal yolağı	CXCL8, IL1B, TLR4, TNF	0.000196

#### **4.4.4. Sınıf II ve Sınıf IV Grubu Ağır ve Hafif Seyir Gösteren Hastalarda İfade Farklılığı Gösteren Genlerin Kesişim Kümesi ve Ortak Genlerin Yolak Analizi**

Sınıf II grubunda ağır seyirli hastalarda (A1-H2, A2-H2) ifade farklılığı gösteren 29 gen ve Sınıf IV grubunda ağır seyirli hastada (A3-H3) ifade farklılığı gösteren 24 gen için ortak kesişim kümesi yapılarak, mutasyon bağımsız şekilde ortak olarak ifade farklılığı gösteren genler belirlenmiştir. Sınıf II grubunda ağır seyirli hastalarda ifade farklılığı gösteren 29 genden 16'sı Sınıf II grubuna ve Sınıf IV grubunda ağır seyirli hastada ifade farklılığı gösteren 24 genden 11'inin Sınıf IV grubuna ait olduğu bulunmuştur. 13 genin her iki grupta da ortak olduğu bulunmuştur. 13 gen için The Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery (DAVID) programında yer alan gen ontoloji analizleri (biyolojik işlev, moleküler fonksiyon, hücresel kompartman ve doku) gerçekleştirilmiştir. Oluşturulan kesişim kümesi ve gen ontoloji sonuçları Şekil 4.7'da gösterilmiştir. KEGG programı kullanılarak 13 genin dahil olduğu yolaklar belirlenmiştir (Tablo 4.4).

A)



B)

**DAVID Bioinformatics Resources 6.8**  
Laboratory of Human Retrovirology and Immunoinformatics (LHRI)

Home Start Analysis Shortcut to DAVID Tools Technical Center Downloads & APIs Term of Service Why DAVID? About Us

**i)**

Sublist	Category	Term	RT	Genes	Count	%	P-Value	Benjamini
<input type="checkbox"/>	GOTERM_BP_DIRECT	positive regulation of neutrophil chemotaxis	RT	3	0,2	1,1E-4	3,3E-2	
<input type="checkbox"/>	GOTERM_BP_DIRECT	inflammatory response	RT	5	0,3	1,1E-4	1,7E-2	
<input type="checkbox"/>	GOTERM_BP_DIRECT	positive regulation of nitric oxide biosynthetic process	RT	3	0,2	4,2E-4	4,2E-2	
<input type="checkbox"/>	GOTERM_BP_DIRECT	neutrophil chemotaxis	RT	3	0,2	9,8E-4	7,3E-2	
<input type="checkbox"/>	GOTERM_BP_DIRECT	chemokine-mediated signaling pathway	RT	3	0,2	1,1E-3	6,8E-2	
<input type="checkbox"/>	GOTERM_BP_DIRECT	negative regulation of cell proliferation	RT	4	0,2	2,4E-3	1,2E-1	
<input type="checkbox"/>	GOTERM_BP_DIRECT	response to oxidative stress	RT	3	0,2	2,7E-3	1,1E-1	
<input type="checkbox"/>	GOTERM_BP_DIRECT	positive regulation of angiogenesis	RT	3	0,2	2,9E-3	1,1E-1	
<input type="checkbox"/>	GOTERM_BP_DIRECT	chemotaxis	RT	3	0,2	3,3E-3	1,1E-1	
<input type="checkbox"/>	GOTERM_BP_DIRECT	positive regulation of fever generation	RT	2	0,1	3,6E-3	1,1E-1	

**ii)**

Sublist	Category	Term	RT	Genes	Count	%	P-Value	Benjamini
<input type="checkbox"/>	GOTERM_CC_DIRECT	extracellular region	RT	8	0,5	2,2E-5	1,3E-3	
<input type="checkbox"/>	GOTERM_CC_DIRECT	cell surface	RT	5	0,3	3,2E-4	9,0E-3	
<input type="checkbox"/>	GOTERM_CC_DIRECT	lysosome	RT	4	0,2	3,8E-4	7,2E-3	
<input type="checkbox"/>	GOTERM_CC_DIRECT	extracellular space	RT	6	0,4	1,1E-3	1,6E-2	
<input type="checkbox"/>	GOTERM_CC_DIRECT	apical plasma membrane	RT	3	0,2	1,5E-2	1,6E-1	
<input type="checkbox"/>	GOTERM_CC_DIRECT	protein complex	RT	3	0,2	2,9E-2	2,4E-1	
<input type="checkbox"/>	GOTERM_CC_DIRECT	membrane	RT	5	0,3	4,7E-2	3,3E-1	

**iii)**

Sublist	Category	Term	RT	Genes	Count	%	P-Value	Benjamini
<input type="checkbox"/>	GOTERM_MF_DIRECT	chemokine activity	RT	2	0,1	3,4E-2	9,6E-1	
<input type="checkbox"/>	GOTERM_MF_DIRECT	enzyme activator activity	RT	2	0,1	3,6E-2	8,0E-1	

**iv)**

Sublist	Category	Term	RT	Genes	Count	%	P-Value	Benjamini
<input type="checkbox"/>	UP_TISSUE	Lung	RT	5	0,3	6,9E-2	9,5E-1	
<input type="checkbox"/>	UP_TISSUE	Leukocyte	RT	2	0,1	8,7E-2	8,5E-1	

**Şekil 4.7.** Sınıf II ve Sınıf IV grubunda ifade farklılığı gösteren genlerin kesişim kümesi DAVID programı gen ontoloji sonuçları. [(A: Sınıf II ve Sınıf IV grubunda ifade farklılığı gösteren genlerin kesişim kümesi. B: İfade farklılığı ortak olan 13 gen ile gerçekleştirilen gen ontoloji (i: biyolojik işlev, ii: moleküler fonksiyon, iii: hücrel kompartman ve iv: doku) sonuçları)].

**Tablo 4.4.** Sınıf II ve Sınıf IV grubu ağır seyirli hastalarda ifade farklılığı gösteren ortak genlerin yolak analizi.

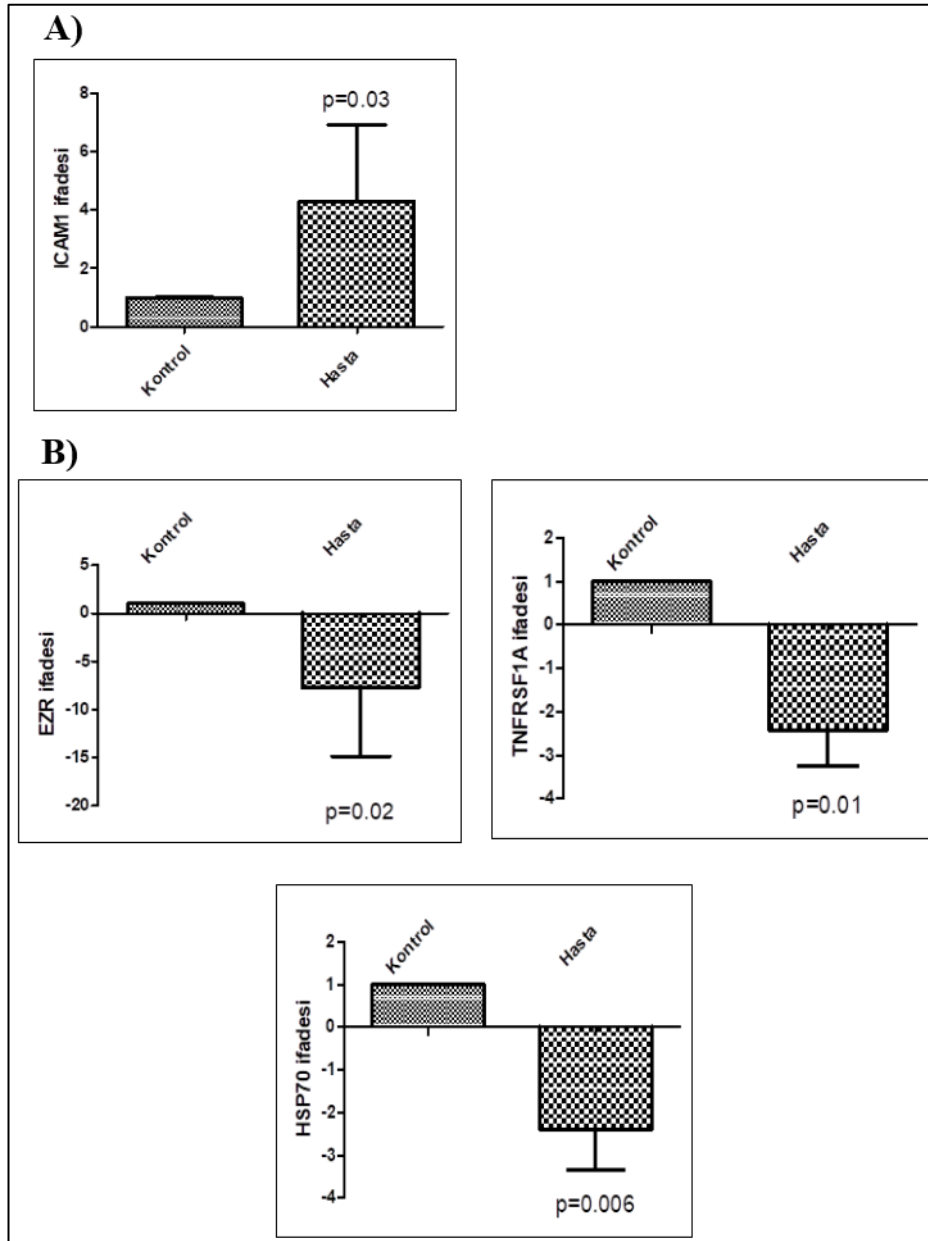
<b>Yolak Adı</b>	<b>İlişkili genler</b>	<b>P değeri</b>
IL-17 sinyal yolağı	CXCL1, HSP90AA1, IL1B, PTGS2	1.69E-06
TNF sinyal yolağı	CXCL1, IL1B, PTGS2	0.000179
Kan akış gerilimi ve aterosklerozis	DUSP1, IL1B, HSP90AA1	0.000349
NOD-benzeri reseptör yolağı	CXCL1, IL1B, HSP90AA1	0.000623
Araşidonik asit metabolizması	PLA2G5, PTGS2	0.002001
NF-kappa B sinyal yolağı	DUSP1, IL1B, HSP90AA1	0.004494
Pankreatik salgı	CFTR, PLA2G5	0.004587
Th17 hücre farklılaşması	IL1B, HSP90AA1	0.00567
Nekroptozis	IL1B, HSP90AA1	0.012648

#### 4.4.5. Hasta Grubu ve Kontrol Grubu Arasında İfade Farklılığı Gösteren Genler ile Yolak Analizi

Hafif ve ağır seyir gösteren 7 hasta (1. aile, 2. aile ve 3. aile) ve 3 kontrol (K1, K2 ve K3) arasında, Qiagen'e ait Excel® temelli analiz programı kullanılarak, hastalarda ifade farklılığı gösteren 39 gen bulunmuş ve hastalarda 30 genin ifadesi artarken, 9 genin ifadesi azalmıştır (EK-3). 39 gen içerisinde hastalarda anlamlı olarak ifade farklılığı gösteren genler ( $p < 0.05$ ); *Intercellular Adhesion Molecule 1* (ICAM1), *Ezrin* (EZR), *Tumor Necrosis Factor Receptor Superfamily, Member 1A* (TNFRSF1A), *Heat Shock 70kDa Protein 1A* (HSPA1A) olarak bulunmuştur (Şekil 4.8). KEGG programı kullanılarak 39 genin dahil olduğu yolaklar belirlenmiştir (Tablo 4.5).

Gen Adı	Kat Değişimi
ICAM1	3,50

Gen Adı	Kat değişimi
EZR	-5,51
TNFRSF1A	-2,34
HSP70	-2,26



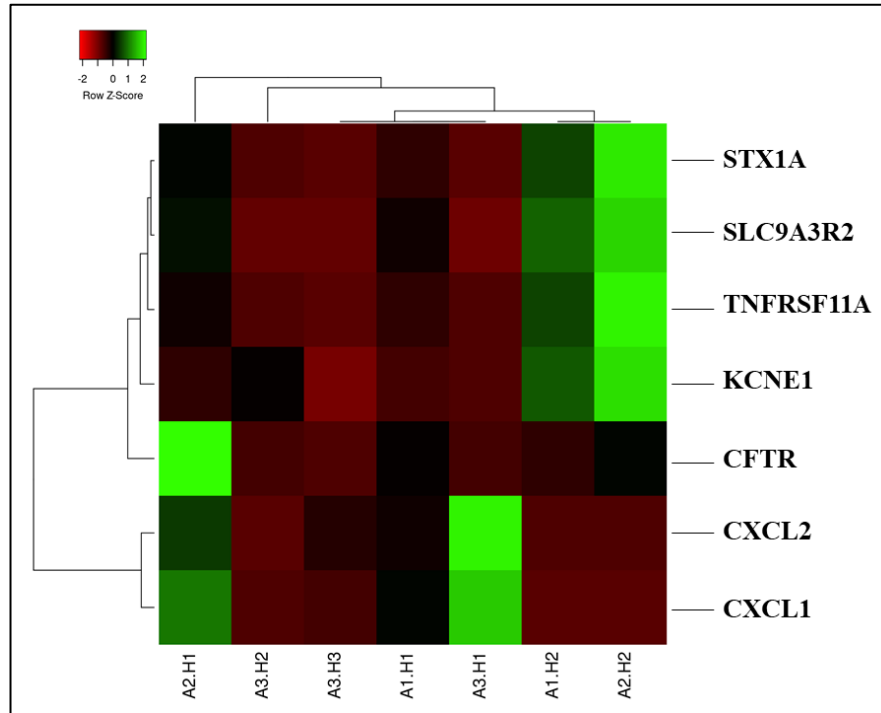
**Şekil 4.8.** Hasta (1 aile, 2. aile ve 3. aile) ve kontrol (K1, K2 ve K3) grubunda, hastalarda ifadesi artış ve azalış gösteren genler. (A: 2 kat ve üzerindeki kat değişimi gösteren gen; ICAM1. B: 2 kat ve altındaki kat değişimi gösteren genler; TNFRSF1A, HSP70, EZR.)

**Tablo 4.5.** Hastalarda (1 aile, 2. aile ve 3. aile) ifade farklılığı gösteren genlerin yer aldığı yolak sonuçları ( $p < 0.05$  olan genler \* ile işaretlenmiştir.).

<b>Yolak Adı</b>	<b>İlişkili genler</b>	<b>P değeri</b>
TNF sinyal yolağı	CCL2, CXCL1, CXCL2, EDN1 FAS, ICAM1*, IL6, NFKBIA, PTGS2, TNF	8.38E-13
IL-17 sinyal yolağı	CCL2, CXCL1, CXCL2, CXCL8 IL6, LCN2, NFKBIA, PTGS2, TNF	1.85E-10
NF-kappa B sinyal yolağı	CXCL2, CXCL8, ICAM1*, NFKBIA PTGS2, TLR4, TNF, TNFRSF1A	6.69E-09
Diyabetik komplikasyonlarda AGE-RAGE sinyal yolağı	CCL2, CXCL8, EDN1, ICAM1* IL6, NOS3, PRKCE, TNF	9.31E-09
NOD-benzeri reseptör yolağı	CCL2, CXCL1, CXCL2, CXCL8 IL6, NFKBIA, TLR4, TNF	5.84E-07
Sitokin-sitokin reseptör etkileşimi	CCL2, CXCL1, CXCL2, CXCL8 FAS, IL10, IL6, TNF, TNFRSF1A*	4.19E-06
TLR sinyal yolağı	CXCL8, IL6, NFKBIA, TLR2, TLR4 TNF	6E-06
İnsülin direnci	IL6, NFKBIA, NOS3, PRKCE, TNF TNFRSF1A*	7.08E-06

#### 4.5. Sınıf II ve Sınıf IV Grubu Ağır ve Hafif Seyir Gösteren Hastalarda İfade Farklılığı Anlamlı Genlerin *Heatmap* Gösterimi

Sınıf II grubunda yer alan ağır (A1-H2, A2-H2) ve hafif (A1-H1, A2-H1) seyirli, Sınıf IV grubunda yer alan ağır (A3-H3) ve hafif seyirli (A3-H1, A3-H2) hastalar arasında, ağır seyirli hastalarda ifade farklılığı anlamlı olan 7 gen ile (TNFRSF11A, KCNE1, STX1A, SLC9A3R2, CXCL1, CFTR ve CXCL2) ortalama bağlantı yöntemi kullanılarak (*average linkage*) *heatmap* oluşturulmuştur. *Heatmap*'te, ifadesi artış gösteren genler yeşil, ifadesi azalış gösteren genler kırmızı ve ifadesi değişmeyen genler siyah renk ile belirtilmiştir. *Heatmap* gösteriminde, Sınıf II grubundaki ağır seyirli hastaların (A1-H2, A2-H2) yakın ilişki içerisinde oldukları bulunmuştur. İlginç bir bulgu olarak, Sınıf IV grubu ağır seyirli (A3-H3), hafif seyirli (A3-H1) ve Sınıf II grubu hafif seyirli (A1-H1) hastaların da yakın ilişki içerisinde oldukları dikkat çekmektedir (Şekil 4.9).

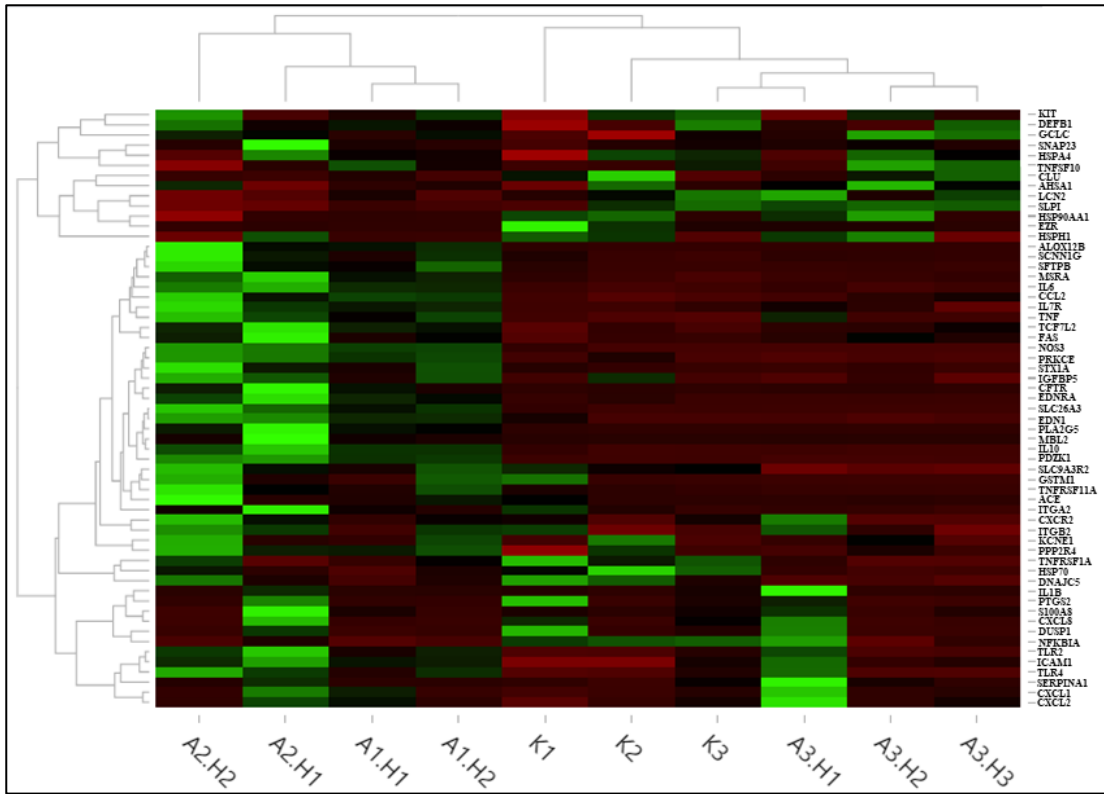


**Şekil 4.9.** Sınıf II grubu ağır seyirli hastalar (A1-H2, A2-H2) ve hafif seyirli hastalar (A1-H1, A2-H1) ile Sınıf IV grubu ağır seyirli hasta (A3-H3) ve hafif seyirli hastalar (A3-H1, A3-H2) arasında ifade farklılığı anlamlı olan 7 gen ile oluşturulmuş *heatmap* sonucu. (Kırmızı renk ifadesi azalan genleri, yeşil renk ifadesi artan genleri ve siyah renk ifadesi değişmeyen genleri göstermektedir.)



#### **4.6. Hasta ve Kontrol Grubunda İfade Farklılığı Gösteren Genlerin *Heatmap* Gösterimi**

Sınıf II grubu, Sınıf IV grubu ve 3 kontrolün dahil olduğu toplam 10 bireyde ifade farklılığı gösteren tüm genlerle oluşturulan *heatmap* sonucunda, kontrol grubunda yer alan bireylerin (K1, K2 ve K3) Sınıf IV grubunda yer alan hastalarla daha yakın ilişkide oldukları tespit edilmiştir. İlginç bir bulgu olarak, Sınıf IV grubunda yer alan ağır seyirli hastanın (A3-H3) hafif seyirli hasta ile (A3-H2) daha yakın ilişkide oldukları saptanmıştır. A3-H2 ve A3-H3 hastalarında ifadesi ortak olarak artan/azalan genler karaciğer tutulum bulguları ile ilişkilendirilmiştir. Bununla birlikte, A3-H2 ve A3-H3 hasta kardeşler arasında farklı ifade olan 17 genin kemotaksis, inflamasyon ve immün yanıtta görevli oldukları bulunmuştur. Sınıf II grubunda ise aynı ailede yer alan ağır (A1-H2) ve hafif (A1-H1) seyirli hastaların gen ifade profillerinin daha benzer olduğu gözlemlenmiştir. A1-H1 ve A1-H2 hasta kardeşlerde, ifadesi ortak olarak artan/azalan genlerin protein bağlanma süreci, sitokin ve kemokin aktivitesinde rol aldıkları belirlenmiştir. A1-H1 ve A1-H2 arasında farklı ifade olan 32 genin ağır seyirli A1-H2 hastasında karaciğer tutulum bulguları ile pozitif korelasyon gösterdiği saptanmıştır. Hasta ve kontrol grubundan oluşan *heatmap* şekil 4.10'da gösterilmiştir.



**Şekil 4.10.** Kontrol grubu (K1, K2 ve K3), Sınıf II Grubu (A1-H1, A2-H1, A1-H2, A2-H2), Sınıf IV Grubu (A3-H1, A3-H2, A3-H3) içerisinde ifade farklılığı gösteren genlerle oluşturulan *heatmap* gösterimi. (Kırmızı renk ifadesi azalan genleri, yeşil renk ifadesi artan genleri ve siyah renk ifadesi değişmeyen genleri göstermektedir.)

#### **4.7. Hastalarda Klinik Özellikler ile İfade Farklılığı Gösteren Genler Arasındaki Korelasyon**

Ağır ve hafif seyir gösteren hasta kardeşlerden oluşan hasta grubunda klinik ciddiyeti belirleyen özellikler (tekrarlayan akciğer enfeksiyonu geçirme durumu, karaciğer tutulum bulguları, solunum bulguları ve kistik fibrozis ilişkili diyabet) ile, Kistik Fibrozis PCR Array’de yer alan 84 gen arasında bir ilişki olup olmadığını belirlemek amacıyla SPSS programı (IBM SPSS Statistics, Version 22) kullanılmıştır. Klinik ciddiyeti belirleyen özelliklerden birisi olan karaciğer tutulum bulguları (karaciğer tutulumu olmayan (A3-H1, A3-H2 ve A3-H3), hafif karaciğer tutulumu olan (A1-H1 ve A2-H1) ve ciddi karaciğer tutulumu olan hastalar (A1-H2 ve A2-H2)) ve genler arasında yapılan korelasyon analizi sonucunda, istatistiksel olarak anlamlı 36 gen karaciğer tutulum bulguları ile ilişkilendirilmiştir. 36 gen içerisinde, 29 genin ifadesinin karaciğer tutulum şiddeti ile pozitif korelasyon gösterdiği, 7 genin ifadesinin karaciğer tutulum şiddeti ile negatif korelasyon gösterdiği bulunmuştur. KEGG programı kullanılarak 36 genin dahil olduğu yollar belirlenmiştir (Tablo 4.6). Karaciğer tutulum şiddeti ile anlamlı olarak ilişkilendirilen yollar kullanılarak oluşturulan grafikler Şekil 4.11’de özetlenmiştir.

**Tablo 4.6.** Karaciğer tutulum şiddeti ile ilişkilendirilen genler ve bu genlerle oluşturulan yolak analizi sonuçları. (A: Pozitif korelasyon, B: Negatif korelasyon, C: Yolak analizi sonuçları.)

A)

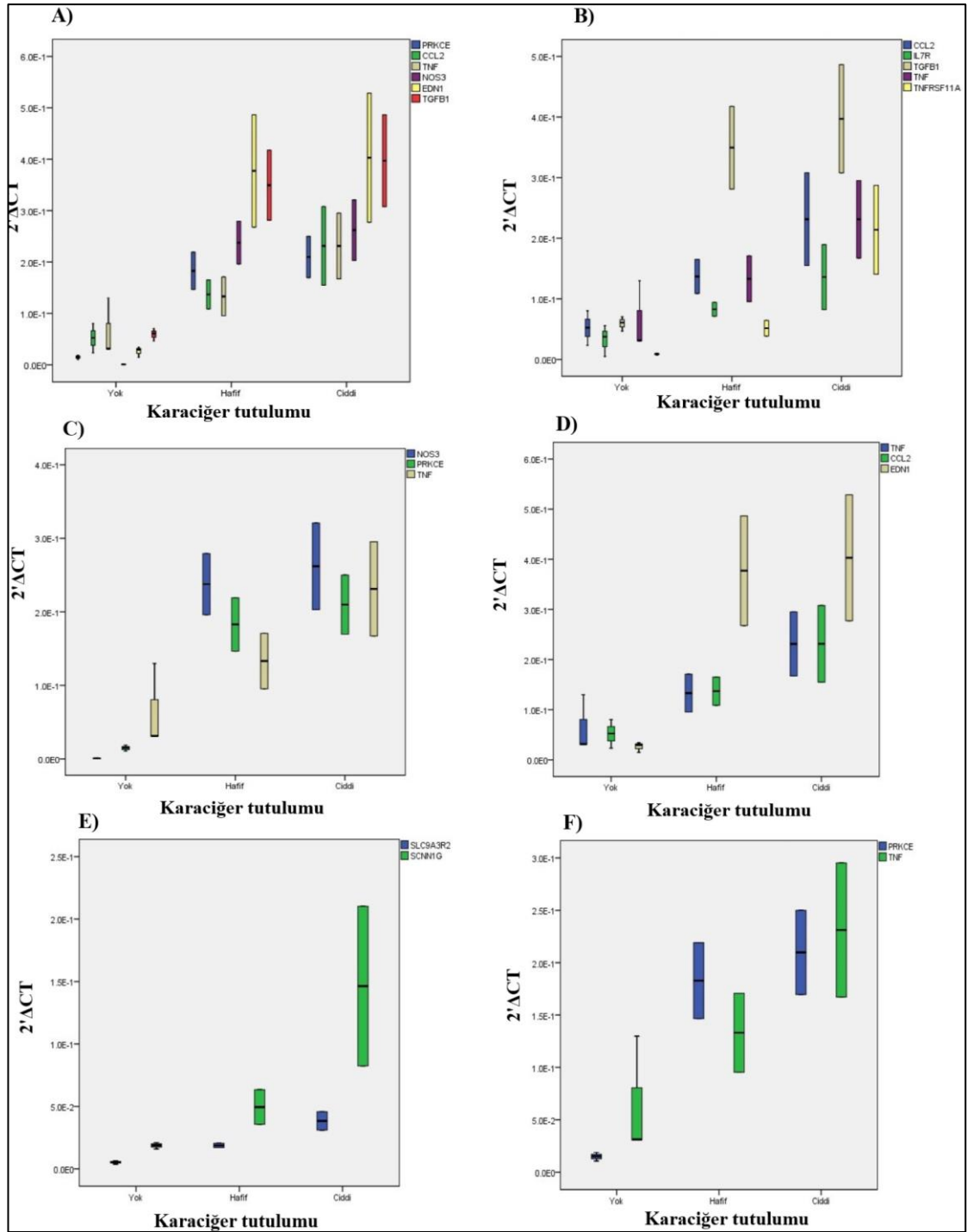
Karaciğer tutulum şiddeti arttıkça ifadesi artan genler	p değeri
ACE	0.001
ALOX12B	0.001
GSTM1	0.001
PPP2R4	0.001
PRTN3	0.001
SCNN1G	0.001
SFTPB	0.001
SLC9A3R2	0.001
STX1A	0.001
TLR5	0.001
TNFRSF11A	0.001
ADIPOR2	0.01
ADRB2	0.01
CCL2	0.01
DNAJC5	0.01
EDN1	0.01
IGFBP5	0.01
IL7R	0.01
NOS3	0.01
PRKCE	0.01
TGFB1	0.01
TJP1	0.01
ADK	0.03
MSRA	0.03
PDZK1	0.03
EPST11	0.04
KCNE1	0.04
NR4A2	0.04
TNF	0.04

B)

Karaciğer tutulum şiddeti arttıkça ifadesi azalan genler	p değeri
EZR	0.01
HSP90AA1	0.01
SLPI	0.01
SLC9A3R1	0.03
CLU	0.04
HSPA8	0.04
LCN2	0.04

C)

Yolak Adı	İlişkili genler	P değeri
Diyabetik komplikasyonlarda AGE-RAGE sinyal yolağı	CCL2, EDN1, NOS3, PRKCE, TGFB1, TNF	1.62E-06
Kan akış gerilimi ve aterosklerozis	CCL2, EDN1, GSTM1, HSP90AA1, NOS3, TNF	1.12E-05
IL-17 sinyal yolağı	CCL2, HSP90AA1, LCN2, TNF	0.000406
Hücreler arası sıkı bağlantı	EZR, PRKCE, SLC9A3R1, TJP1	0.00381
Antijen işleme ve sunumu	HSP90AA1, HSPA8, TNF	0.003092
Sitokin-sitokin reseptör etkileşimi	CCL2, IL7R, TGFB1, TNF, TNFRSF11A	0.004772
İnsülin direnci	NOS3, PRKCE, TNF	0.007769
TNF sinyal yolağı	CCL2, EDN1, TNF	0.008383
Aldosteron tarafından düzenlenen sodyum iyonunun geri emilimi	SCNN1G, SLC9A3R2	0.008764
Relaxin sinyal yolağı	EDN1, NOS3, TGFB1	0.013202
Tip II diyabet	PRKCE, TNF	0.013332
Th-17 hücre farklılaşması	HSP90AA1, TGFB1	0.040929



**Şekil 4.11.** Karaciğer tutulumu ile anlamlı olarak ilişkilendirilen yollar ve yollarda yer alan genler. (A: Diyabetik komplikasyonlarda AGE-RAGE sinyal yolağı B: Sitokin-sitokin reseptör etkileşimi, C: İnsülin direnci, D: TNF sinyal yolağı, E: Aldosteron tarafından düzenlenen sodyum iyonunun geri emilimi, F: Tip II diyabet.).

## 5. TARTIŞMA

Kistik fibrozis hastalığı, CFTR genindeki mutasyonlar sonucu oluşan, otozomal resesif kalıtım modeline sahip hastalıklar arasında en sık görülenlerden birisidir. Hastalık genel olarak, enfeksiyon kaynaklı akciğerdeki fonksiyon bozukluğu ile ilişkilidir (1). Epitel hücrelerde ifade olan CFTR proteini, cAMP ile aktive olan bir klor kanalıdır. Kistik fibroziste, CFTR protein yokluğu veya işlevsel olmayan CFTR proteini, hücre dışına klor salınımını engellemektedir. Hücre içi ve dışındaki iyon dengesinin bozulması akciğerdeki mukus tabakasının su kaybetmesine, devamında mukus tabakasının vücuttan uzaklaştırılmaması ile birlikte, tekrarlayan akciğer enfeksiyonuyla sonuçlanan bir klinik tabloyu oluşturmaktadır (69).

Hastalıktan sorumlu CFTR geninde 2074 mutasyon tanımlanmıştır (25). Mutasyonlar toplam 7 sınıfta gruplandırılmış olup klinik tablonun en ciddi olduğu mutasyon grubu Sınıf I (IA, IB) Sınıf II ve Sınıf III'tür. Sınıf IV, V ve VI grubunda yer alan mutasyonlar hafif klinik seyir ile karakterizedir (70). Yapılan çalışmalarda ülkemizde en sık görülen CFTR mutasyonu %20-28,5 görülme sıklığı ile F508del olarak bulunmuştur (27-29). Hastalığın en sık görüldüğü Avrupa ve Kuzey Amerika'da bu oran %70-80 arasındadır (2).

Kistik fibroziste klinik ciddiyeti belirleyen en büyük faktör CFTR mutasyonlarıdır. Aynı mutasyonu taşımalarına rağmen klinik ciddiyetleri farklı olan hastalarla yapılan çalışmalar mevcuttur. Bu durum hastalık ciddiyetini etkileyen başka faktörlerin de olabileceğini düşündürmektedir. Klinik ciddiyeti etkileyen faktörlerden bir diğeri ise hastalıkla ilişkilendirilen genlerdir ki bu genler hastalık ciddiyetini modifiye eden genler olarak ana başlıkta toplanmıştır. Ciddiyet ile ilişkilendirilen genlerin tanımlanmasında kullanılan genom çapında ilişkilendirme çalışmaları (GWAS) ile hastalık ciddiyetini etkileyebileceği düşünülen genlerde tek nükleotid değişimleri (SNP) saptanmıştır. Bu çalışmalar doğrultusunda çok sayıda gen modifier gen olarak tanımlanmıştır (32, 34, 53). Transkriptomik araştırmalar doğrultusunda da hastalık ciddiyetini etkileyebilecek ifade farklılığı gösteren gen veya gen setleri tanımlanmıştır (52-60). GWAS ve transkriptomik araştırmaları

içeren çalışmalar hasta/kontrol grubu arasında veya aynı mutasyonu taşıyan ağır ve hafif gösteren hastalar arasında yapılmıştır. Epigenetik ve çevresel faktörler de klinik ciddiyet üzerinde etkili olup, genetik kökenin benzer tutulduğu hasta kardeş ve ikiz çalışmaları çalışmaları oldukça önem taşımaktadır. Gerçekleştirilen transkriptomik araştırmalar, kısıtlı hasta sayısı yapılmış olup genetik kökenin benzer tutulduğu aile içi çalışmaları içermemektedir.

Gerçekleştirilen tez çalışması kapsamında, aynı mutasyonu taşımalarına rağmen hastalık seyri farklılık gösteren (ağır/ hafif seyirli) hasta kardeşler arasında, ifade farklılığı gösteren genlerin kistik fibrozis PCR array yöntemi kullanılarak saptanması ve bu genlerle ilişkili yolların tanımlanması amaçlanmıştır.

Bu amaç kapsamında, Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Göğüs Hastalıkları Ünitesi tarafından Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalına kistik fibrozis tanısı ile gönderilen (ter testi sonucu 60 mmol/L ve üzeri olan), ağır ve hafif seyir gösteren kardeşler içeren 3 aile (7 hasta) seçilmiştir. 1. ailede yer alan A1-H1 ve A1-H2 hasta kardeşlerde klinik ciddiyeti etkileyen özellikler göz önüne alındığında, kardeşler karaciğer tutulumu ve kistik fibrozis ilişkili diyabet açısından değerlendirilmiştir. Bu sonuçlara göre, 12 yaşındaki hastanın (A1-H1), 16 yaşındaki hastanın (A1-H2) karaciğer tutulumu geçirdiği yaşta semptom göstermemesi ve bu hastada kistik fibrozis ilişkili diyabet olmaması sebebi ile 12 yaşındaki hasta hafif seyirli, 16 yaşındaki hasta ise ağır seyirli olarak belirlenmiştir. Kistik fibrozis hastalığının ülkemizde Ocak 2015 tarihinden itibaren yenidoğan programına katılması sebebi ile 2. ailede yer alan A2-H2 (3 yaş) yenidoğan tarama sonucunda hastalık tanısı almıştır. Bu ailede yer alan hasta kardeşler tekrarlayan akciğer enfeksiyonu ve karaciğer tutulumu açısından değerlendirildiğinde, A2-H1 (6 yaş) hafif seyirli ve A2-H2 (3 yaş) ağır seyirli olarak belirlenmiştir. 3. ailede yer alan hasta kardeşler ise tekrarlayan akciğer enfeksiyonu açısından değerlendirilmiş ve 7 yaşındaki A3-H1 en hafif seyirli, 19 yaşındaki A3-H2 hafif seyirli ve 9 yaşındaki A3-H3 ağır seyirli olarak belirlenmiştir.

Hastaların CFTR mutasyonlarının belirlenmesi amacı ile hasta kanlarından daha önce izole edilmiş ve saklanmakta olan DNA örnekleri kullanılarak DNA dizi analizi gerçekleştirilmiştir. DNA Dizi Analizi sonuçlarına göre, 1. ailenin

mutasyonları F508del/G85E, 2. ailenin mutasyonları F508del/F508del ve 3. ailenin mutasyonları I1234V/I1234V olarak saptanmıştır. F508del ve G85E mutasyonları Sınıf II CFTR mutasyonları grubunda yer almaktadır. Bu mutasyonlar sonucunda CFTR proteini E.R. aracılı degradasyona uğrar. F508del ve G85E mutasyonları ciddi klinik bulgularla ilişkilendirilmiştir (71, 72). Decaestecker ve ark. (72) tarafından 2004 yılında gerçekleştirilen bir araştırmada, G85E/F508del ve F508del/F508del mutasyonlarına sahip hastaların benzer ciddi klinik bulgulara sahip olduğu gösterilmiştir.

I1234V mutasyonu Sınıf IV grubunda yer almaktadır. Bu mutasyon CFTR kanalının iyon geçirgenliğinin azalmasına sebep olmaktadır. Sınıf IV grubunda yer alan mutasyonlar, hafif klinik bulgular ile ilişkilendirilmiş olup literatürde, I1234V mutasyonu ile ilişkili bir çalışma bulunmamaktadır.

CFTR mutasyonları saptanan hastaların nazal sürüntü örneklerinden elde edilen RNA'lar kullanılarak diğer deney basamakları gerçekleştirilmiştir. Nazal mukoza heterojen bir hücre topluluğundan oluşmaktadır. Bu hücre tipleri arasında; epitel (silli, salgı (*squamous*), farklılaşmamış, bazal), endotel ve pyrimidal hücrelerden oluşan solunum yolu hücreleri bulunmaktadır (73). Nazal epitel hücreler, üst solunum yolunda bulunan epitel hücre tipidir. Yapılan çok sayıda çalışmada nazal epitel hücrelerin alt solunum yoluna fizyolojik olarak benzer özellikte olduğu bulunmuştur (74). Nazal epitel hücrelerinin gen profilinin alt solunum yolunda yer alan akciğer epitel hücre gen profili ile uyumlu olduğunu gösteren transkriptomik çalışmalar mevcuttur (54, 56, 58, 59, 60). Kolay erişilebilen bir hücre grubu olması, kistik fibrozis çalışmalarında sıklıkla kullanılması ve invazif olmayan bir yöntem kullanılarak örnek alınması sebebiyle tez çalışması kapsamında biyolojik materyal olarak nazal sürüntüden elde edilen nazal epitel hücreler kullanılmıştır.

Kistik Fibrozis PCR Array, kistik fibrozis hastalığında ifade farklılığı gösteren ve CFTR proteini etkileşen toplam 84 genden oluşmaktadır. Bu genler toplamda 8 farklı gruba ayrılmış olup 96 kuyucuk formatındaki mikrolakanın her bir kuyucuğuna bir gene ait tasarlanmış primerler tutturulmuştur. Ek olarak normalizasyon için 5 adet housekeeping gen, genomik DNA kontaminasyonunun belirlenmesi için 1 adet HGDC, cDNA sentezinin verimliliğini belirlemek için 3 adet



RTC ve gerçek zamanlı PZR'nin verimliliğini analiz etmek için 3 adet PPC bulunmaktadır. *RT<sup>2</sup> First Strand Kit* (Qiagen) içerisinde yer alan *random hexamer* primerler kullanılarak cDNA sentezi gerçekleştirilmiştir ve devamında gerçek zamanlı PZR'de kullanılan ve gen ifade analizinin tespit edilmesini sağlayan SYBR Green boyası ile Kistik Fibrozis PCR Array gerçekleştirilmiştir. Erime eğrisi grafiğinde her genin tek bir pik verdiği ve örneklerde primer dimerlerinin olmadığı belirlenmiştir.

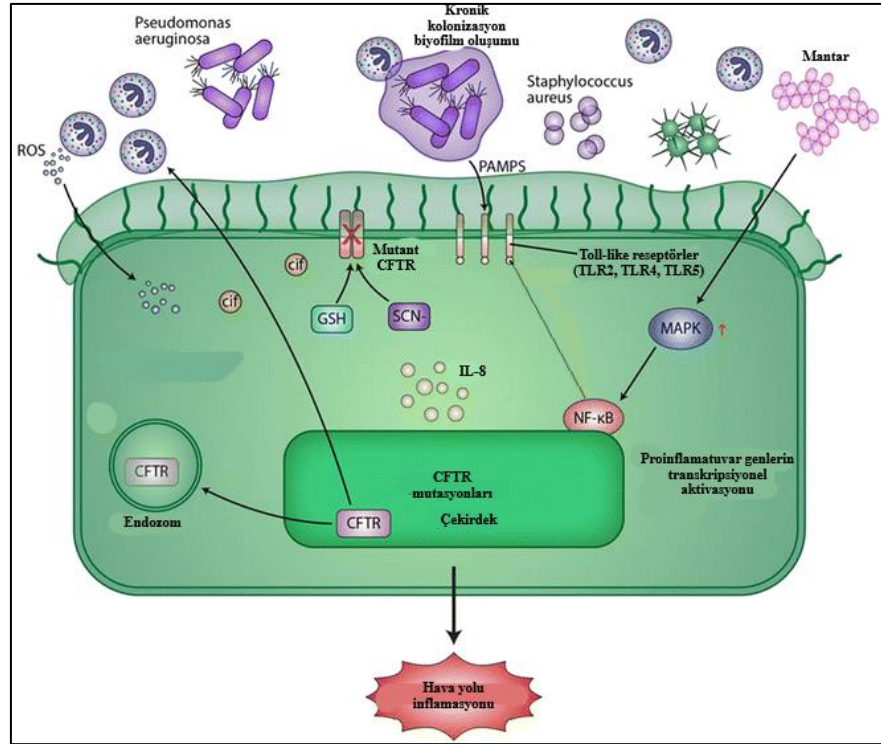
İfade farklılığı gösteren genlerin belirlenmesine yönelik olarak öncelikle uygun housekeeping genlerin seçilmesi amaçlanmıştır. NormFinder programı kullanılarak hasta ve kontrol gruplarında ifade düzeyi değişiklik göstermeyen iki gen ACTB ve HPRT1 olarak bulunmuştur. Kistik fibrozis hastalarının ve sağlıklı kontrollerin nazal epitel hücreleri kullanılarak gerçekleştirilen bir çalışmada, NormFinder sonuçları ile örtüşecek şekilde *Beta-2 microglobulin* (B2M) geninin nazal epitel hücreler için uygun referans gen olmadığı belirtilmiştir (75).

Tez çalışmasında, aynı mutasyonu taşıyan ve klinik seyirleri farklı olan hasta kardeşler kullanılması amaçlanmıştır. Fakat çalışmaya dahil edilen aileler aynı mutasyona sahip olmadığı için, analizler aynı sınıfta yer alan ağır ve hafif seyirli hasta kardeşler arasında gerçekleştirilmiştir. Böylelikle çalışma grubu Sınıf II ve Sınıf IV grubu olmak üzere iki farklı grupta toplanmıştır.

Sınıf II grubundaki ağır ve hafif seyir gösteren hastalar arasında ağır seyirli hastalarda ifade farklılığı gösteren 29 gen bulunmuştur. 29 gen içerisinde ağır seyirli hastalarda ifade farklılığı anlamlı olan 7 genden 4'ü kat artışı gösterirken (TNFRSF11A, KCNE1, STX1A ve SLC9A3R2) 3'ü kat azalışı (CXCL1, CFTR ve CXCL2) göstermiştir. Ağır seyirli hastalarda 4 kat artış gösteren TNFRSF11A, TNF reseptör grubunun bir üyesi olup NF kappa B sinyal yolağı aracılı proinflamatuvar sitokin ve kemokinlerin transkripsiyonel aktivasyonunu tetiklemektedir (76). NF kappa B aktivatörü olarak da bilinen TNFRSF11A'nın ifadesinin artması, ağır seyirli hastalarda enfeksiyon sonucu oluşan inflamasyon cevabının artırılmasına yönelik olabileceği düşünülmüştür. Ağır seyirli hastalarda TNFRSF11A reseptörü aracılı uyarılan sinyal yolağı devamında CXCL1-2-8 gibi kemokin ve IL1B gibi sitokinlerin salınımı tetiklenmiştir.

Kistik fibroziste yapılan birçok çalışmada kontrollere kıyasla bu kemokin ve sitokinlerin ifadesinin hasta gruplarında arttığı bulunmuştur (56, 58, 60). Bu çalışmalardan birisinde, hastaların nazal ve bronşiyel epitel hücreleri kullanılarak hastalarda sağlıklı kontrollere göre CXCL8 ve IL1B ifadesinin arttığı gösterilmiştir (60). Bu çalışmaya benzer şekilde, 2017 yılında yapılan araştırmada proinflamatuvar sitokinlerin ifadesinin hastalarda arttığı bulunmuştur (55). İlginç bir bulgu olarak, Ideozu ve ark. (52) tarafından 2019 yılında gerçekleştirilen bir çalışmada, kistik fibrozis hastalarında sağlıklı kontrollere kıyasla NF kappa B yolağının etkilenerek CXCL1 ve IL1B sitokinlerinin ifadesinin azaldığı gösterilmiştir. Bu çalışmaya benzer şekilde, Kormann ve ark. (55) ve Wright ve ark. (59) ağır ve hafif seyir gösteren hastalarda, CXCL8 (IL-8) ifadesinin ağır seyir gösteren hastalarda, tez çalışmasının bulguları ile uyumluluk gösteren bir sonuç olarak azaldığını belirtmişlerdir ve bu iki transkriptomik araştırmada da CXCL8 ifadesinin seyirli hastalarda klinik ciddiyetin belirlenmesinde güçlü bir rolü olmadığı belirtilmiştir. Gerçekleştirilen tez çalışması kapsamında, ağır seyirli hastalarda CXCL1 ve CXCL8 ifadesinin azalmasına yönelik olarak yapılan literatür araştırması sonucunda, 2016 yılında yapılan bir çalışmada, hastalarda E.R. stresinin CXCL1 ve CXCL8 salınımını azalttığı gösterilmiştir (77). E.R. stresinin kemokin salınımını azaltabileceği ve bununla birlikte, ağır seyirli hastalarda CFTR ifadesinin azalması, NF kappa B sinyal yolağının etkilenmesi, epigenetik faktörler ve bu hastaların daha sık tekrarlayan akciğer enfeksiyonu geçirme durumunun varlığı, ağır seyirli hastalarda inflamasyon cevabının baskılandığı sonucunu düşündürmüştür.

Ağır seyirli hastalarda 29 genin dahil olduğu biyolojik yolaklar KEGG programı kullanılarak bulunmuştur. Anlamlılığı en yüksek yolakların inflamasyon ve immün yanıtta görevli genleri içerdiği tespit edilmiştir. Proinflamatuvar genlerin ve kemokinlerin salınımının tetiklendiği IL-17 sinyal yolağı, NF-kappa B sinyal yolağı, Sitokin-sitokin reseptör etkileşimi, TNF sinyal yolağı, NOD-benzeri reseptör yolağı ve kemokin sinyal yolağı ağır seyirli hastalarda tanımlanan yolaklardandır. Bu yolaklarda yer alan genlerin ifadesindeki azalış ağır seyirli hastalarda inflamasyon yanıtının baskılandığı hipotezini güçlendirmektedir (Şekil 5.1).

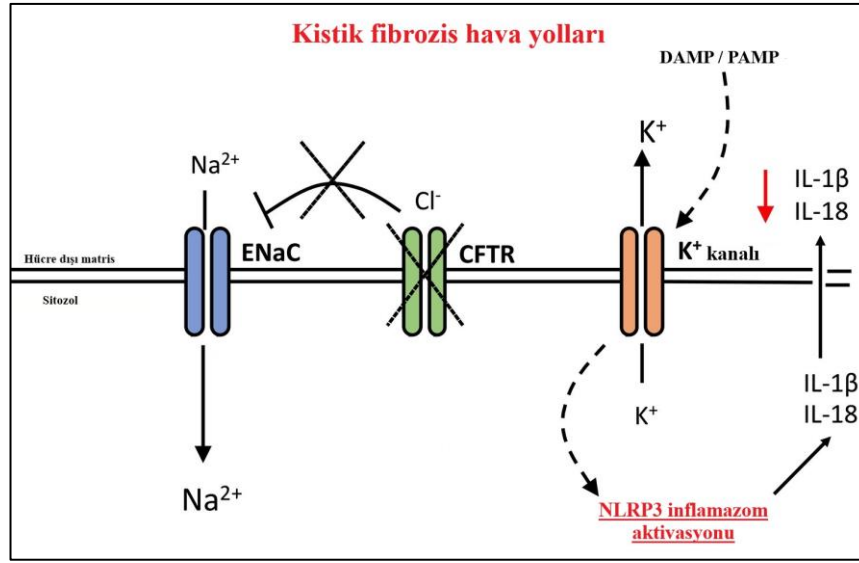


**Şekil 5.1.** Kistik fibroziste inflamasyon ve immün yanıtın oluşmasında rol alan moleküler yolların mekanizması (78). (MAPK: *Mitogen Activated Protein Kinase*)

Sınıf II grubu ağır seyirli hastalarda tanımlanan bir diğer yolak NOD benzeri reseptör yolağıdır. Bu yolak içerisinde yer alan ifade farklılığı anlamlı genlerden olan CXCL1 5 kat, CXCL2 3,6 kat azalış göstermiştir. İfade farklılığı anlamlı olmasa da bu yolağa giren IL1B'nin da ağır seyirli hastalarda ifadesinin azaldığı bulunmuştur. Kalıp Tanıma Reseptörleri [Pattern Recognition Receptors (PRR)] miyeloid hücreler tarafından üretilen reseptör grubudur. Kalıp tanıma reseptörleri; patojenler tarafından üretilen lipopolisakkarit (LPS), mannoz gibi moleküllerin, bakteriyel veya viral DNA/RNA'nın, hücre çekirdeğinden sitozole salınan DNA moleküllerinin tanınarak immün yanıtın başlama sürecinde görev alırlar (79). Hücre yüzeyi ve sitozol olmak üzere PRR'ler buldukları yere göre 2 gruba ayrılmıştır. TLR ve *C - type lectin* reseptörleri hücre zarında lokalize iken, *Nucleotide-binding and oligomerization domain* (NOD)-benzeri reseptörler ve Retinoik asit reseptörleri sitozolde lokalizedir. PRR'lerin tanıdığı moleküller iki gruba ayrılmıştır (80). Çekirdekten sitozole salınan hücre DNA'sı, mitokondriyel DNA ve immün hücreler tarafından salınan sitokinler ve ATP gibi moleküller Hasarla İlişkili Moleküler Yapılar [*Damage Associated*

*Molecular Patterns* (DAMP)] grubunda yer almaktadır. LPS, bakteriyel ve viral DNA/RNA molekülleri, bakteri toksinleri, patojen molekülleri ise Patojenle İlişkili Moleküler Yapılar [*Pathogen Associated Molecular Patterns* (PAMP)] olarak adlandırılmaktadır (79).

Sitozolda bulunan PRR'lerden birisi olan NOD benzeri reseptörler, uyarıldıkları zaman bir adaptör protein ile etkileşime geçerek aktif bir form oluştururlar ve devamında yapıya kaspaz enzimi eklenerek inflamasyon sürecinin başlaması için gerekli olan proinflamatuvar *Interleukin 1 beta* (IL1B) ve *Interleukin 18* (IL18)'in olgun forma dönüştürülmesi sağlanmaktadır. Reseptör-adaptör protein-kaspaz proteinlerinin bir araya gelerek oluşturduğu bu yapı inflamazom olarak adlandırılmaktadır (79). Proinflamatuvar sitokinlerin salınımı ile inflamasyon mekanizmasının uyarılması sağlanmaktadır. *NOD-, LRR- and pyrin domain-containing protein 3* (NLRP3) inflamazomu en iyi bilenen inflamazom tiplerinden birisidir (80, 81). Son yıllarda yapılan çalışmalarda, inflamazom mekanizmasının sadece miyeloid hücre tiplerinde değil aynı zamanda miyeloid olmayan hücre tiplerinde de bulunduğu gösterilmiştir (81). Bu hücre tiplerinde birisi olan epitel hücre ve kistik fibrozis üzerine yapılan çalışmalar hız kazanmıştır. Kistik fibrozis hastalarından elde edilen primer bronşiyal epitel hücre kültürü ve monositlerde gerçekleştirilen bir çalışmada NLRP3 inflamazomunun aktifleştiği gösterilmiştir. Yapılan bu çalışmada, CFTR protein ifadesinin azalması sonucunda, ENaC ifadesinin artması ve bu durumun hücrede sodyum iyonunun ve devamında potasyum iyonu artışına sebep olarak NLRP3 inflamazomunun uyarıldığı ve *Interleukin 18* (IL18) salınımının tetiklendiği bulunmuştur (82). McElvaney ve ark. (83) tarafından 2019 yılında gerçekleştirilen bir çalışmada ise, kistik fibrozis hastalarının kan ve akciğer sıvılarından elde edilen nötrofillerdeki NLRP3 inflamazomu araştırılmıştır. Aynı zamanda CFTR mutasyonu oluşturulan transgenik farelerle de çalışma in vivo olarak desteklenmiştir (Şekil 5.2). Sınıf II grubunda bu yolağın tanımlanması miyeloid olmayan nazal epitel hücrelerde de inflamazom mekanizmasının oluştuğunu destekler nitelikte olup, ağır seyirli hastalarda bu yolaktaki genlerin ifadesinin azalması hücredeki mutasyon veya bakteri kaynaklı E.R. stresinin varlığı ile açıklanabilir.



**Şekil 5.2.** Kistik fibrozis hastalığında miyeoid olmayan hücrede NLRP3 inflamazom aktivasyonu mekanizması (83).

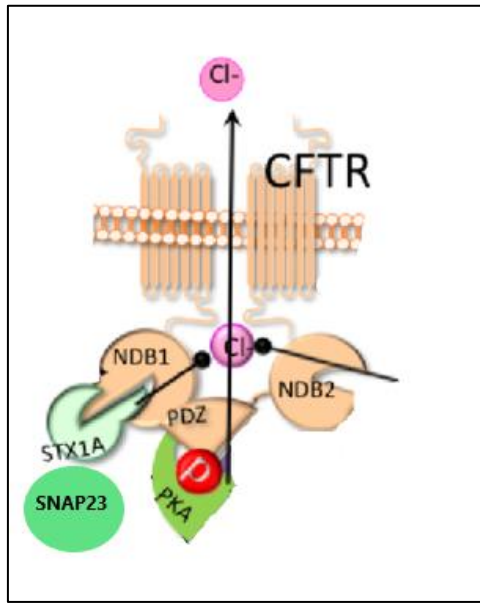
Sınıf II grubunda saptanan bir diğer yolak ise araşidonik asit metabolizmasıdır. Araşidonik asit metabolizmasının, nötrofil kemotaksisinde, damar büzülme ve damar genişlemesi gibi hücrede pek çok yolağın düzenlenmesinde rolü olduğu bilinmektedir (84). Araşidonik asit, hücre zarındaki fosfolipidlerin, fosfolipazlarca yıkımı sonrasında oluşan bir metabolittir. Bu metabolit 2 farklı mekanizma ile yıkıma uğramaktadır. Bunlardan birincisinde, araşidonik asit lipoksigenazlar tarafından yıkıma uğrayarak, kemoatraktan olarak görev yapan moleküllerin üretimi gerçekleşmektedir. İkinci mekanizmada ise araşidonik asit damar büzülme/genişleme gibi süreçlerde rol alan moleküllerin sentezinde görev alan siklooksigenazlar tarafından yıkıma uğramaktadır (85). Sınıf II grubu ağır seyirli hastalarda araşidonik asit metabolizmasında *Phospholipase A2, group V* [PLA2G5(fosfolipaz)], *Prostaglandin-endoperoxide synthase 2* [PTGS2 (siklooksigenaz)], *Arachidonate 12-lipoxygenase* [ALOX12B (lipoksigenaz)] genleri yer almıştır. Ağır seyirli hastalarda PTGS2 ve PLA2G5 genlerinin ifadesi azalmıştır. Sınıf II grubu ağır seyirli hastalarda tanımlanan bir diğer yolak olan NOD-benzeri reseptör yolağı sonucunda aktifleşen NLRP3 inflamazomunda yer alan aktif kaspaz 1'in araşidonik asit yıkım metabolizmasını tetiklemesi ve ifadesi artan ALOX12B geni araşidonik asit metabolizmasının lipoksigenaz yolağı ile yıkıma uğrayarak

nötrofil kemotaksisinde görevli moleküllerin sentezinin gerçekleşebileceği düşünülmüş ve araşidonik asit metabolizması NLRP3 inflamazomu ve devamında inflamasyon süreci ile ilişkilendirilmiştir.

Sınıf II grubunda tanımlanan Aldosteron tarafından düzenlenen sodyum iyonunun geri emiliminde yer alan genlerin ifadesi ağır seyirli hastalarda kat artışı göstermiştir. Bu yolakta ifade farklılığı anlamlı olan gen *Solute carrier family 9 member 3 regulator 2* (SLC9A3R2) 2 kat artış göstermiştir. SLC9A3R2, sodyum iyonunun taşınmasında rolü olan bir düzenleyicidir (86). CFTR ile etkileşim içerisinde olan SLC9A3R2'nin aktivitesinin CFTR tarafından negatif olarak düzenlendiği bilinmektedir (87). Tez çalışmasında, SLC9A3R2 ifadesinin artması, CFTR ifadesinin azalması ile ilişkilendirilmiş ve bunun sonucunda, epitel hücrelerdeki sodyum iyonunun ağır seyirli hastalarda emiliminin daha çok olması ve bu hastalardaki mukus tabakasının daha çok su kaybetmesine sebep olabileceği düşünülmüştür. CFTR tarafından negatif olarak düzenlenen başka bir sodyum kanalını kodlayan gen *Epithelial sodium channel* (ENaC)'dır. ENaC proteinin alt ünitesinden birisi olan *Sodium channel, nonvoltage-gated 1, gamma* (SCNN1G)'nin hastalarda ifadesinin artmasının hastalık ciddiyeti ile ilişkilendirildiği çalışmalar mevcuttur (47, 48). Hastalarda SCNN1G ifadesinin artması sonucunda oluşan mukus tabakasının iyon dengesi değişmektedir. Fazla miktarda sodyum iyonu içeren visköz ve dehidrate mukusun hastalık ciddiyetini etkileyeceği düşünülmüş ve bu yolak mukus viskozitesi açısından yorumlanmıştır.

Sınıf II grubu ağır seyirli hastalarda bulunan yolaklardan bir diğeri ise, Veziküler taşınımında SNARE etkileşimleridir. Bu yolakta yer alan ve ağır seyirli hastalarda ifade farklılığı anlamlı olan STX1A geni 3 kat artış göstermiştir. SNARE protein ailesinde biri olan STX1A, CFTR ile fiziksel etkileşimde olduğu gösterilen ilk proteindir (88). Yapılan çalışmalarda, *Syntaxin 1A* (STX1A)'nın CFTR proteininin amino ucu ile doğrudan etkileşime girdiği ve bunun sonucunda CFTR ifadesinin azaldığı bulunmuştur (89). Kistik fibrozis epitel hücre hatlarında gerçekleştirilen bir çalışmada STX1A'nın aynı zamanda CFTR proteinin kanal aktivitesi göstermesinde de rolü olduğu bulunmuştur (90). Bu sonuçlar doğrultusunda, STX1A'nın CFTR proteinin hem hücre yüzeyine ulaşmasında hem de CFTR kanalı aracılı klor sekresyonunda görevli olabileceği bulunmuştur. İfadesi

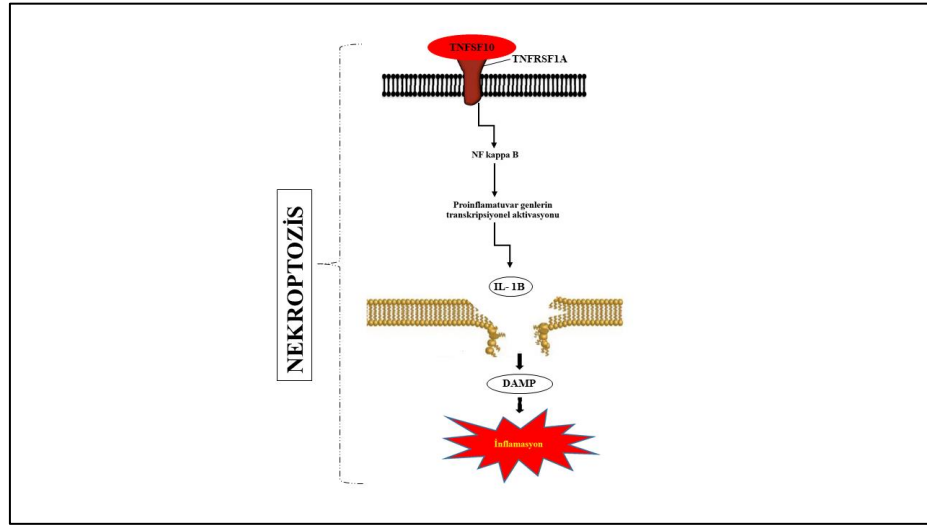
artan STX1A CFTR kanalının yüzeye ulaşmasını ve kanal aktivitesi göstermesini engellemektedir. Bu yolakta tanımlanan bir diğer gen olan *Synaptosomal-associated protein, 23kDa* (SNAP23), STX1A'nın protein partneri olup STX1A ile doğrudan etkileşime girmektedir (88, 89). CFTR proteinin taşınması ve aktivite gösterme süreçleri hem STX1A hem de SNAP23 tarafından düzenlenmekte olup bu iki genin ağır seyirli hastalarda ifadesinin artması, azalmış CFTR ifadesi ve kanal aktivitesi ile ilişkilendirilmiştir (Şekil 5.3).



**Şekil 5.3.** CFTR proteininin, STX1A ve SNAP23 proteinleri ile etkileşim mekanizması (91).

Sınıf II grubu ağır seyirli hastalarda saptanan nekroptozis, nekroz mekanizmasının programlanmış tipi olup, hücredeki oksidatif stres ve patojen kaynaklı enfeksiyon sonucu oluşan inflamasyonu takiben gerçekleşen bir hücre ölüm tipidir. *Tumor necrosis factor* (TNF) ve onun reseptörü aracılı sinyal iletimi nekroptozis yolağının aktive olmasında görevli sinyal yollarından birisidir. Sınıf II grubu ağır seyir gösteren hastalarda bu yolakta yer alan genlerden olan TNF ve onun reseptörü olan *Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 1A* (TNFRSF1A)'nın uyarıldığı ve bu uyarım sonucunda NF kappa aracılı proniflamatuvar sitokinlerin salınımı gerçekleşmektedir (92). Proinflamatuvar sitokinlerin salınımı, nekroptozis yolağının aktifleşmesinde görevli nekroptozom

komplekslerinin oluşmasını tetikleyerek hücrede nekroptosis yolagını harekete geçirdiği düşünölmektedir (Şekil 5.4).



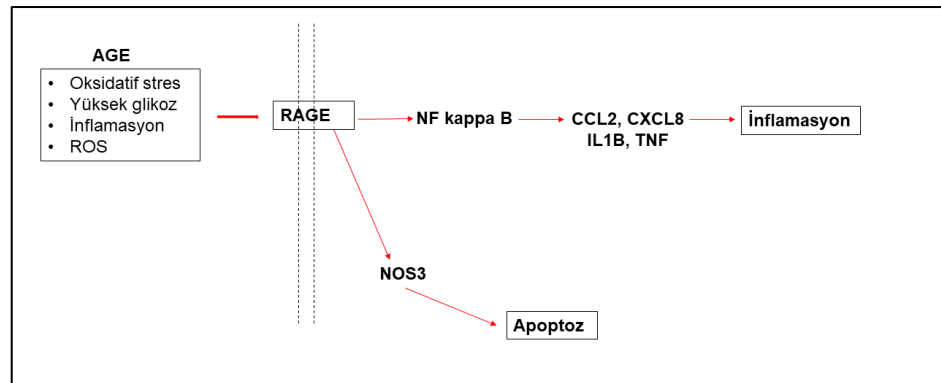
**Şekil 5.4.** Sınıf II grubu ağır seyirli hastalarda tanımlanan nekroptosis yolagı ve yolakta yer alan genler (93).

Sınıf IV grubundaki ağır ve hafif seyir gösteren hastalar arasında ağır seyirli hastada ifade farklılığı gösteren 24 gen (3 gen kat artışı, 21 gen kat azalışı) bulunmuştur. Tez çalışması kapsamında Sınıf IV grubu bir aileden (3 kardeş) oluştuğu için, ifade farklılığı gösteren genlerin istatistiksel açıdan anlamlılığı değerlendirilememiştir ve Sınıf IV grubu için saptanan yolaklar biyolojik anlamlılık açısından yorumlanmıştır. Yolak analizlerinde, IL-17 sinyal yolagı, NOD-benzeri reseptör yolagı, NF-kappa B sinyal yolagı, Sitokin-sitokin reseptör etkileşimi, TNF sinyal yolagı ve TLR sinyal yolakları bulunmuştur. Bunlar içerisinde Sınıf II grubundan farklı olarak Sınıf IV'e özgü olanlar Diyabetik komplikasyonlarda AGE-RAGE sinyal yolagı ve TLR sinyal yolagı olarak bulunmuştur.

Diyabetik komplikasyonlarda AGE-RAGE sinyal yolagı *Advanced Glycation End Products* (AGE) ligandlarının *Receptor of Advanced Glycation End Products* (RAGE) reseptörlerine bağlanarak hücre içerisindeki inflamasyon ile ilişkili sinyal yolaklarının aktive olmasını sağlar (94). AGE molekülleri glikoz, reaktif oksijen türleri (ROS), DNA, *High Mobility Group Box 1* (HMGB1) ve S100 protein ailesinden oluşmaktadır. Bu molekülleri tanımda görevli olan RAGE reseptörleri, immünoglobölin süper ailesinde yer almakta olup hepatik satelit hücrelerde ve



hepatositlerde ifade olur. AGE tarafından uyarılan RAGE reseptörü hücredeki sinyal yollarını uyararak hedef genlerin transkripsiyonel aktivasyonunun gerçekleşmesini sağlar (95). Ağır seyirli hastada bu yolda yer alan genlerin ifadesinde azalış bulunmuştur. Kistik fibroziste, akciğer enfeksiyonu ve devamında enfeksiyonlu bölgeye nötrofil göçü ile sonuçlanan bir mekanizma bulunmaktadır. Nötrofillerden enfeksiyonla mücadele etmek için dolaşıma nötrofil elastaz (NE), S100 proteinleri ve ROS salınımı olmaktadır (50, 51). Ağır seyirli hastada tekrarlayan akciğer enfeksiyonu daha şiddetli olup nötrofillerden salınan AGE miktarlarındaki artış RAGE yolağının aktivasyonu ile sonuçlanmaktadır. RAGE yolağının aktive olması ile salınan sitokin ve kemokindeki artış karaciğerde inflamasyon, diyabet ve damar tıkanıklığı ile ilişkilendirilmiştir. Ağır seyirli hastada karaciğer tutulum bulguları olmayıp, hastada bu yolağın Sınıf II grubuna kıyasla daha ciddi enfeksiyon ile ilişkili olabileceği düşünülmüştür (Şekil 5.5).



**Şekil 5.5.** Sınıf IV grubu ağır seyirli hastada tanımlanan AGE-RAGE sinyal yolağı ve yolda yer alan genler (96).

Sınıf IV grubunda tanımlanan bir diğer yolağın tanımlanan TLR sinyal yolağıdır. TLR sinyal yolağında yer alan genlerden birisi olan TLR4 bakteri tarafından üretilen LPS'nin tanınmasında görevli bir reseptördür (51). Ağır seyirli hastada bu reseptörün ifadesinin azalması ve dolayısıyla bu reseptörün hücre içerisinde uyardığı NF kappa B sinyal yolağı uyarımının azalması sonucu genlerin ifadesinin de azaldığı düşünülmüştür.

CFTR mutasyonlarından bağımsız olarak ağır ve hafif seyir gösteren hastalardaki durumu araştırmak amacıyla Sınıf II grubunda ağır seyirli hastalarda

ifade farklılığı gösteren 29 gen ve Sınıf IV grubunda ağır seyirli hastada ifade farklılığı gösteren 24 gen için ortak kesişim kümesi oluşturulmuştur. CFTR mutasyonlarından bağımsız şekilde ağır seyirli hastaların tamamında ifade farklılığı göstererek ortak olarak 13 genin ifadesinin azaldığı bulunmuştur. Bu genlerin biyolojik süreç, hücresel kompartman ve moleküler fonksiyonu üzerinde analizler gerçekleştirilmiştir. Ortak 13 genin nötrofil kemotaksisi ve düzenlenmesi, nötrofil kemotaksisinde, inflamasyon yanıtının oluşmasında, kemokin bağımlı sinyal yolağında ve oksidatif stres yanıtı gibi inflamasyon ve immün yanıt ile ilişkili biyolojik süreçlerde yer aldığı bulunmuştur.

13 gen ile gerçekleştirilen yolak analizleri sonucunda, farklı olarak bu grupta pankreatik salgı yolağı saptanmıştır. Bu yolak içerisinde yer alan ve ifadesi azalan genlerden birisi olan CFTR, kistik fibrozis hastalarında pankreatik ekzokrin yetmezliği ile ilişkilendirilmiştir. Hastalarda CFTR ifadesinin olmaması veya işlevsel olmayan CFTR proteini pankreas iyon dengesini değiştirerek pankreatik salgıların bağırsağa ulaşmasını engellemektedir (9, 10). Ekzokrin pankreas yetmezliği devamında hastaların yaklaşık %10'unda görülen kistik fibrozis ilişkili diyabet ile sonuçlanmaktadır. Dolayısı ile azalmış CFTR ifadesi insülin direncinin artmasına sebep olmaktadır (11, 12). Aynı zamanda bu yolak içerisinde yer alan PLA2G5 geni fosfolipaz olup hücre zarındaki fosfolipidlerin yıkımında görevli olan bir fosfolipaz proteini kodlamaktadır. Yapılan bir çalışmada insülin hormonunun salgılandığı  $\beta$  hücrelerinin düzenlenmesinde PLA2G5 geninin rolü olduğu bulunmuştur. PLA2G5 geni susturulmuş farelerde,  $\beta$  hücre çoğalmasının arttığı gösterilmiştir ve PLA2G5 geninin insülin salınımında negatif bir düzenleyici olduğu sonucuna varılmıştır (97). Mutasyondan bağımsız olarak ağır seyirli hastalarda ifadesi azalan PLA2G5 insülin salınımının artmasına sebep olabilir. Bu grupta tanımlanan bir diğer yolak olan araşidonik asit metabolizması ise Sınıf II grubundaki sonuçlara benzer olarak inflamasyon süreci ile ilişkilendirilmiştir.

Benzer karşılaştırmalar hasta ve kontrol grupları arasında yapıldığı zaman hasta ve kontrol grubu arasında hastalarda ifade farklılığı gösteren 39 gen bulunmuştur. 39 gen (30 gen kat artışı, 9 gen kat azalışı) içerisinde, istatistiksel olarak anlamlı bulunan genler *Intercellular adhesion molecule 1* (ICAM1), *TNFRSF1A*, *Heat shock 70kDa protein 1A* (HSP70) ve *Ezrin* (EZR)'dir. Hastalarda

ifade farklılığı gösteren 39 gen ile gerçekleştirilen yolak analizleri sonucunda inflamasyon ve immün yanıtta görevli yollar bulunmuştur. Bu yollarda yer alan ICAM1 hastalarda 3,50 kat artış göstermiştir. Glikoprotein yapısında bir hücre yüzeyi adezyon molekülüdür (98). Yapılan çalışmalarda, artmış ICAM1 ifadesi inflamasyon ile ilişkilendirilmiştir. Kistik fibrozis hastalığı ve ICAM1 ifadesinin araştırıldığı bir çalışmada ifadesi artan ICAM1'in kistik fibrozis hastalık ciddiyeti ile pozitif bir ilişkisi olduğu bulunmuştur (99, 100). Tez çalışması kapsamında, hastalarda ICAM1'in ifadesinin artması inflamasyon yanıtının artması ile ilişkilendirilmiştir.

HSP70 ve TNFRSF1A hücre hayatta kalımı ve apoptoz mekanizmalarının düzenlenmesinde görev alan proteinlerdendir (101). TNF reseptörü TNFRSF1A geninin hastalarda 2,34 kat azalış göstermesi NF kappa B aracılı hücre hayatta kalım mekanizmasının etkilendiğini göstermektedir. Aynı şekilde, hastalarda 2,26 kat azalış gösteren HSP70 apoptoz mekanizmasında görevli olup hücre ölümü ve hayatta kalımı mekanizmalarının hastalarda etkilendiği düşünülmektedir.

Sınıf II ve Sınıf IV grubu hastalarında ifade farklılığı anlamlı olan 7 gen ile oluşturulan *heatmap* gösteriminde, Sınıf II grubu ağır seyirli (A1-H2, A2-H2) hastaların gen ifade profillerinin benzer olması beklenen bir sonuçtur. Sınıf IV grubu ağır seyirli hastanın (A3-H3), Sınıf IV grubu hafif seyirli hasta (A3-H1) ve Sınıf II grubu hafif seyirli hastanın (A1-H1) birlikte oluşturduğu grup dikkat çeken bir bulgu olmuştur. Sınıf IV grubunda yer alan hastalardaki I1234V/I1234V mutasyonunun, CFTR proteini üzerindeki ciddiyetinin F508del/G85E mutasyonuna göre daha az olması, A3-H3 ağır seyirli hastanın Sınıf II grubu hafif seyirli hastaya daha yakın olabileceği sonucunu düşündürmektedir.

7 hasta (1 aile, 2. aile ve 3. aile) ve 3 (K1, K2 ve K3) kontrolün dahil olduğu 10 bireyle oluşturulan *heatmap* sonucunda, kontrollerin Sınıf IV grubu ile daha benzer gen ifade profillerinin olması, Sınıf IV grubu hastalarındaki I1234V/I1234V mutasyonunun CFTR proteini üzerinde daha hafif bir etkiye sahip olması ile açıklanmıştır. Sınıf IV grubu en hafif seyirli hasta olan A3-H1'in kontrol grubunda yer alan K3 ile yakın ilişkide olduğu göze çarpmaktadır.

İlginç olarak, Sınıf IV grubunda yer alan hafif seyirli A3-H2 ve ağır seyirli A3-H3 hastaları arasındaki benzerlik dikkat çekmektedir. A3-H2 ve A3-H3 hastalarında karaciğer tutulum bulgularının olmadığı bilinmektedir. Ağır seyirli A3-H3 ve hafif seyirli A3-H2 hastalarında ifade farklılığı ortak olan genler karaciğer tutulum bulguları ile ilişkilendirilmiştir. Her iki hastada ifadesi azalan genlerin karaciğer tutulum bulguları ile pozitif korelasyon gösterdiği saptanmıştır (Tablo 4.6). Bununla birlikte, A3-H2 ve A3-H3 hasta kardeşler arasında *heatmap* sonucunda farklı ifade olan 17 gen (KIT, DEFB1, SNAP23, HSPA4, CLU, AHS1, LCN2, HSP90AA1, EZR, HSPH1, CCL2, TCF7L2, FAS, KCNE1, PPP2R4, SERPINA1 ve CXCL2) önem taşımaktadır. Bu genlerin hücre kemotaksisinde, inflamasyon ve immün yanıtta görevli oldukları ve dahil oldukları hücresel sinyal yollarının TNF, kemokin ve IL-17 sinyal yolları olduğu bulunmuştur. Ayrıca A3-H2 ve A3-H3 arasında, 17 genin şaperon bağımlı protein stabilizasyonu ve katlanmamış protein süreçlerinde görevli oldukları da saptanmıştır. Oluşturulan *heatmap* doğrultusunda, Sınıf IV grubu A3-H2 ve A3-H3 arasında, karaciğer tutulum şiddetlerinin hafif ve benzer olduğu sonucu çıkarılmıştır. Ek olarak, inflamasyon yanıtında görevli ve protein işleme sürecinde tanımlanan yolların bu iki hasta arasındaki klinik ciddiyet farkının açıklanmasında rolü olabileceği düşünülmüştür.

*Heatmap*'te dikkat çeken başka bir bulgu, 1. ailedeki ağır seyirli A1-H2 ve hafif seyirli A1-H1 hastası arasında kurulan yakın ilişki olmuştur. A1-H1 ve A1-H2 arasında, ifade farklılığı ortak olan genlerin LPS yanıtı, sitokin ve kemokin aktivitesi ve protein bağlanma süreçlerinde rol aldıkları belirlenmiştir. Bununla birlikte, iki hasta arasında ifade farklılığı değişken olan 32 gen bulunmuştur. A1-H1 ve A1-H2 arasındaki klinik ciddiyet farklılığını açıklayan özellik karaciğer tutulum bulgusu şiddeti olup ağır seyirli hastanın karaciğer tutulum bulgusu daha ciddidir. Tablo 4.6'ta yer alan ve ağır seyirli A1-H2 hastasında ifadesi artan 32 genin karaciğer tutulum bulguları ile pozitif korelasyon gösterdiği saptanmıştır. 1. ailedeki ağır ve hafif seyirli hastaların inflamasyon yanıtında görevli yollar ve protein bağlanma süreçleri açısından benzer olduğu sonucuna ulaşılmıştır. Bu durumun aksine, A1-H1 ve A1-H2 hasta kardeşlerinin karaciğer tutulum bulguları açısından klinik ciddiyetlerinin farklı olduğu gösterilmiştir.

Son olarak hastalarda klinik özellikler ile ifade farklılığı gösteren genler arasındaki korelasyonu araştırmak amacıyla hastaların klinik özellikleri ile gen ifade düzeyleri arasında bir ilişki olup olmadığı analiz edilmiştir. Bu doğrultuda, karaciğer tutulum şiddeti ile istatistiksel olarak anlamlı 36 gende bir ilişki düzeyi saptanmıştır. Toplam 36 gen ile gerçekleştirilen yolak analizleri sonucunda, karaciğer tutulum şiddeti ile ilişkili olabilecek; Diyabetik komplikasyonlarda AGE-RAGE sinyal yolağı, Sitokin-sitokin reseptör etkileşimi, İnsülin direnci, TNF sinyal yolağı, Aldosteron tarafından düzenlenen sodyum iyonunun geri Emilimi ve Tip II diyabet yolları tanımlanmıştır.

Bu yollar arasında istatistiksel olarak en anlamlı yollardan olan diyabetik komplikasyonlarda AGE-RAGE sinyal yolağında 6 gen yer almıştır. Bu genlerin karaciğer tutulum şiddeti arttıkça ifadesinin arttığı bulunmuştur. Dolayısıyla bu genler karaciğer inflamasyonu ile ilişkilendirilmiş olup, genlerin ifadesinin artmasının karaciğer tutulum şiddetini artırabileceği düşünülmüştür.

Karaciğer tutulum şiddeti ile ilişkilendirilen insülin direnci ve tip II diyabet yolları birlikte tartışılmıştır. Her iki yolda da tanımlanan genlerin ifadesi arttıkça karaciğer tutulum şiddeti artmaktadır. Hastalarda, CFTR mutasyonları sonucu oluşan pankreas fonksiyon bozukluğu, insülin salınım mekanizmasını etkilemektedir. İnsülin sekresyonunun bozulması, dolaşımdaki glikoz miktarını artırmakta ve bu durum karaciğerde fonksiyon bozukluğuna sebep olmaktadır (102, 103). Artmış glikoz miktarı TNF sitokinin dolaşımdaki ifadesinin artmasına sebep olmakta ve bu durum karaciğer hücrelerinin lipogeneze ve inflamasyona sebep olmaktadır. Hastalarda glikoz metabolizmasının bozulması tip II diyabet yolağı ile de ilişkilendirilmiş olup bu yolk insülin direncinin oluşmasına ve bu durumun karaciğer fonksiyon bozukluğuna sebep olduğu düşünülmüştür.

Gerçekleştirilen bu tez çalışması doğrultusunda, ağır ve hafif seyir gösteren hasta kardeşler arasındaki klinik ciddiyet farkına sebep olabilecek temel mekanizmalar saptanmış ve ilişkili yollar aydınlatılmıştır. Literatürde sınıf II ve sınıf IV grubunun klinik ciddiyet açısından karşılaştırıldığı bir çalışma bulunmayıp tez çalışması bu çıktılar doğrultusunda özgün bir çalışmadır.

Tez çalışması ileri dönemde, tedavi için yeni hedef moleküllerin geliştirilmesine ve elde edilen adayların hem prognostik hemde terapötik biyobelirteç olarak kullanılmasına olanak sağlayabilecektir. Böylece hastalığa ait karaciğer tutulum bulgularının ilerlemesinin engellenmesi, hastaların yaşam süresi ve yaşam kalitesinin artırılması açısından önemli olacaktır. Aynı zamanda hasta ve sağlıklı kontroller arasında ifade farklılığı gösteren gen ve ilişkili yolların saptanması, kistik fibrozis hastalığına benzeyen diğer solunum yolu hastalıklarının da patogenezinine ışık tutacaktır.

## 6. SONUÇ VE ÖNERİLER

### 6.1. Sonuçlar

Gerçekleştirilen tez çalışması kapsamında, aşağıdaki sonuçlar elde edilmiştir.

- Nazal sürüntü örneklerinden izole edilen RNA miktarlarının 88-908 ng/ $\mu$ l arasında olduğu bulundu. Agaroz jel elektroforezi sonucunda, elde edilen RNA'larda 18S rRNA ve 28S rRNA bantları görüldü ve RNA'ların degrade olmadığı sonucuna varıldı. Elde edilen RNA miktarının deney planının diğer basamağını gerçekleştirmek için yeterli bir miktarda olduğu belirlendi.
- NormFinder programı ile ACTB ve HPRT1 genlerinin, hasta grubu ve kontrol grubunda ifade düzeyinin değişmediği bulunarak bu genler normalizatör olarak kullanıldı.
- Sınıf II grubu ağır ve hafif seyir gösteren hastalar arasında, ağır seyirli hastalarda ifade farklılığı gösteren 29 gen saptandı. Bu genler içerisinde anlamlı olarak TNFRSF11A geninde 4,03 kat artışı ( $p=0.01$ ), SLC9A3R2 geninde 2,02 kat artışı ( $p=0.03$ ), STX1A geninde 3,03 kat artışı ( $p=0.008$ ) ve KCNE1 geninde 3,90 kat artışı saptandı. CFTR geninde 2,92 kat azalışı ( $p=0.04$ ), CXCL1 geninde 5,03 kat azalışı ( $p=0.03$ ) ve CXCL2 geninde 2,65 kat azalışı ( $p=0.02$ ) saptandı.
- Sınıf II grubu ağır ve hafif seyir gösteren hastalar arasında, klinik ciddiyet ile ilişkilendirilebilecek IL -17 sinyal yolağı, NF-kappa B sinyal yolağı, Sitokin-sitokin reseptör etkileşimi, TNF sinyal yolağı, NOD-benzeri reseptör yolağı, Araşidonik asit metabolizması, Nekroptozis, Kemokin sinyal yolağı, Veziküler taşınımında SNARE etkileşimleri ve Aldosteron tarafından düzenlenen sodyum iyonunun geri emilimi yolakları tanımlandı.
- Sınıf IV grubunda ağır ve hafif seyir gösteren hastalar arasında, ağır seyirli hastalarda ifade farklılığı gösteren 24 gen saptandı.
- Sınıf IV grubu ağır ve hafif seyir gösteren hastalar arasında, klinik ciddiyet ile ilişkilendirilebilecek IL-17 sinyal yolağı, NOD-benzeri reseptör yolağı, NF-kappa B sinyal yolağı, Diyabetik komplikasyonlarda AGE-RAGE sinyal

yolağı, Sitokin-sitokin reseptör etkileşimi, TNF sinyal yolağı ve TLR sinyal yolağı tanımlandı.

- Sınıf II ve Sınıf IV grubu arasında ifade farklılığı gösteren genlerle ortak kesişim kümesi oluşturuldu. Her iki grupta da ağır seyirli hastalarda ifade farklılığı ortak olan 13 gen saptandı. Bu genler için gen ontoloji analizleri yapıldı ve genlerin nötrofil kemotaksisinin düzenlenme, inflamasyon yanıtının oluşmasında ve kemokin aktivitesinde yer alabilecekleri bulundu.
- Sınıf II ve Sınıf IV grubu arasında ifade farklılığı ortak olan genlerle yapılan yolak analizi sonuçlarında, ağır seyirli hastaların tamamında ortak olarak IL-17 sinyal yolağı, TNF sinyal yolağı, NOD-benzeri reseptör yolağı, Araşidonik asit metabolizması, NF-kappa B sinyal yolağı, Pankreatik salgı ve Nekroptozis yolakları tanımlandı.
- Hasta ve kontrol grupları arasında, hastalarda ifade farklılığı gösteren 39 gen saptandı. Bu genler içerisinde anlamlı olarak ICAM1 geninde 3,50 kat artışı ( $p=0.03$ ) saptandı. EZR geninde 5,51 kat azalışı ( $p=0.02$ ), TNFSRF1A geninde 2,34 kat azalışı ( $p=0.01$ ) ve HSP70 geninde 2,26 kat azalışı ( $p=0.006$ ) saptandı.
- Hasta ve kontrol grubu arasında hastalarda, ifade farklılığı gösteren genlerle yapılan yolak analizi sonuçlarında TNF sinyal yolağı, IL-17 sinyal yolağı, NF-kappa B sinyal yolağı, diyabetik komplikasyonlarda AGE-RAGE sinyal yolağı, NOD-benzeri reseptör yolağı, Sitokin-sitokin reseptör etkileşimi, TLR sinyal yolağı ve İnsülin direnci yolakları tanımlandı.
- Gerçekleştirilen hiyerarşik kümeleme analizi sonuçlarında, Sınıf II grubunda yer alan ağır seyirli hastaların gen profillerinin birbirine benzer ve yine bu grupta yer alan hafif seyirli hastaların gen ifade profillerinin birbirine benzer olduğu bulundu.
- Genler ve klinik özellikler arasında ilişki kurulması amacıyla gerçekleştirilen korelasyon analizi sonuçlarında, karaciğer tutulum şiddeti ile 36 gen arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki olduğu saptandı. Bu genlerle gerçekleştirilen yolak analizleri sonucunda, karaciğer tutulum şiddeti ile Diyabetik komplikasyonlarda AGE-RAGE sinyal yolağı, Sitokin-sitokin reseptör



etkileşimi, İnsülin direnci, TNF sinyal yolağı, Aldosteron tarafından düzenlenen sodyum iyonunun geri emilimi ve Tip II diyabet yolları ilişkilendirildi.

## 6.2. Öneriler

- Sınıf II ve Sınıf IV grubunda, ağır seyirli hastalarda hastalık ciddiyeti ile ilişkili olabileceği düşünülen gen veya gen setleri seçilerek, Kistik Fibrozis PCR Array sonuçlarının validasyonu yapılacaktır.
- Çalışmaya dahil edilen Sınıf IV grubu tek bir aileden oluştuğu için, Sınıf IV grubundaki verilerin doğrulanması amacı ile hasta sayısı artırılıp analizlerin tekrarlanması planlanmaktadır.
- Sınıf II ve Sınıf IV grubunda yer alan ağır seyirli hastalarda, hastalık ciddiyeti ile ilişkilendirilen genlerin, protein düzeyindeki değişikliklerini belirlemek amacı ile fonksiyonel analizler yapılması planlanmaktadır. Bu amaç doğrultusunda hasta nazal sürüntü örnekleri kullanılarak oluşturulacak olan primer hücre kültürlerinde fonksiyonel çalışmalar gerçekleştirilecektir.
- İnflamasyon sürecinde yer alan sitokinlerin, ağır seyirli hastalarda azalması sonucu doğrultusunda, hastalardan elde edilen serum örneklerinde salgı sitokinlerinin protein düzeyindeki ifadesinin araştırılması düşünülmektedir.
- Grubumuz tarafından kistik fibrozis hastalarında fenotipik farklılığı açıklamaya yönelik mikro RNA (miRNA)'ların araştırıldığı projede, ağır ve hafif seyir gösteren hasta kardeşlerden oluşan hasta grubunda miRNA'ların tanımlanması ve genlerin miRNA hedefleri olma durumunun araştırılması planlanmaktadır.

## 7. KAYNAKLAR

1. Cutting GR. Cystic fibrosis genetics: from molecular understanding to clinical application. *Nat Rev Genet.* 2015;16(1):45-56.
2. Mirtajani SB, Farnia P, Hassanzad M, Ghanavi J, Farnia P, Velayati AA. Geographical distribution of cystic fibrosis; The past 70 years of data analysis. *Biomed Biotechnol Res J.* 2017;(1):105-12.
3. Aydemir Ö, Kiper N. Dünyada ve Ülkemizde Kistik Fibrozis Hastalığı. *Türkiye Klinikleri J Int Med Sci.* 2007;3(14 Suppl 1):1-3.
4. Bombieri C, Claustres M, De Boeck K, Derichs N, Dodge J, Girodon E, ve ark. Recommendations for the classification of diseases as CFTR related disorders. *J Cyst Fibros.* 2011;10(Suppl 2):86-102.
5. Kreda SM, Mall M, Mengos A, Rochelle L, Yankaskas J, Riordan JR, ve ark. Characterization of Wild-Type and  $\Delta F508$  Cystic Fibrosis Transmembrane Regulator in Human Respiratory Epithelia. *Mol Biol Cell.* 2005;16(5):2154-67.
6. Wallis C. *Kendig's Disorders of the Respiratory Tract in Children.* 9<sup>th</sup> ed. Elsevier; 2019.
7. Justicia JL, Sole' A, Quintana-Gallego E, Gartner S, de Gracia J, Prados C, Ma'iz L. Management of pulmonary exacerbations in cystic fibrosis: still an unmet medical need in clinical practice. *Expert Rev Respir Med.* 2015;9(2):183-94.
8. Illing EA, Woodworth BA. Management of the upper airway in cystic fibrosis. *Curr Opin Pulm Med.* 2014;20(6):623-31.
9. Cipolli M, Castellani C, Wilcken B, Massie J, McKay K, Gruca M, ve ark. Pancreatic phenotype in infants with cystic fibrosis identified by mutations screening. *Arch Dis Child.* 2007;92(10):842-84.
10. Park HW, Nam JH, Kim JY, Namkung W, Yoon JS, Lee JS, ve ark. Dynamic regulation of CFTR bicarbonate permeability by Cl<sup>-</sup> and its role in pancreatic bicarbonate secretion. *Gastroenterology.* 2010;139(2):620-31.
11. Moran A, Pillay K, Becker D, Granados A, Hameed S, Acerini CL. ISPAD Clinical Practice Consensus Guidelines 2018: Management of cystic fibrosis-related diabetes in children and adolescents. *Pediatr Diabetes.* 2018;19(Suppl 27):64-74.
12. Lanng S. Glucose intolerance in cystic fibrosis patients. *Paediatr Respir Rev.* 2001;2(3):253-59.
13. Dupuis A, Keenan K, Ooi CY, Dorfman R, Sontag MK, Naehrlich L, ve ark. Prevalence of meconium ileus marks the severity of mutations of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) gene. *Genet Med.* 2016;18(4):333-40.

14. Manor O, Levy R, Pope CE, Hayden HS, Brittnacher MJ, Carr R, ve ark. Metagenomic evidence for taxonomic dysbiosis and functional imbalance in the gastrointestinal tracts of children with cystic fibrosis. *Sci Rep*. 2016;4(6):22493.
15. Flass T, Narkewicz MR. Cirrhosis and other liver disease in cystic fibrosis. *J Cyst Fibros*. 2013;12(2):116–24.
16. Dayangaç D, Erdem H, Yilmaz E, Şahin A, Sohn C, Özgüç M, ve ark. Mutations of the CFTR gene in Turkish patients with congenital bilateral absence of the vas deferens. *Hum Reprod*. 2004;19(5):1094-100.
17. Costes B, Girodon E, Ghanem N, Flori E, Jardin A, Soufir JC ve ark. Frequent occurrence of the CFTR intron 8 (TG)<sub>n</sub> 5T allele in men with congenital bilateral absence of the vas deferens. *Eur J Hum Genet*. 1995;3(5):285–93.
18. Csanady L, Vergani P, Gadsby DC. STRUCTURE, GATING, AND REGULATION OF THE CFTR ANION CHANNEL. *Physiol Rev*. 2019;99(1):707-38.
19. Kopito RR. Biosynthesis and degradation of CFTR. *Physiol Rev*. 1999;79(Suppl 1):167-73.
20. Ameen N, Silvis M, Bradbury NA. Endocytic trafficking of CFTR in health and disease. *J Cyst Fibros*. 2007;6(1):1-14.
21. Farinha CM, Matos P, Amaral MD. Control of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator membrane trafficking: not just from the endoplasmic reticulum to the Golgi. *FEBS J*. 2013;280(18):4396-406.
22. Ameen N, Silvis M, Bradbury NA. Endocytic Trafficking of CFTR in Health and Disease. *J Cyst Fibros*. 2007;6(1):1-14.
23. Riordan JR, Rommens JM, Kerem B, Alon N, Rozmahel R, Grzelczak Z ve ark. Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA. *Science*. 1989;245(4922):1066-73.
24. Clinical and Functional Translation of CFTR [Internet].2011[Erişim tarihi 20 Ocak 2020]. Erişim Adresi: <https://www.cftr2.org>
25. Cystic Fibrosis Mutation Database [Internet]. [Erişim tarihi 13 Ocak 2020]. Erişim adresi: <http://genet.sickkids.on.ca/app>
26. Nieddu E, Pollarolo B, Merello L, Schenone S, Mazzei M. F508del-CFTR rescue: a matter of cell stress response. *Curr Pharm Des*. 2013;19(19):3476-96.
27. Erden- Dayangac D, Eskici, N, Esref S, Ozcelik U, Günes-Yalcin E, Doğru-Ersoz D, ve ark. Molecular genetic analysis of CFTR gene in 952 Turkish cystic fibrosis patients and identification of novel mutations: 25 years experience. *FEBS OPEN BIO*. 2018;8(Suppl.1):382-83.

28. Atag E, Ikizoğlu NB, Ergenekon AP, Gokdemir Y, Eralp EE, Ata P, ve ark. Novel mutations and deletions in cystic fibrosis in a tertiary cystic fibrosis center in Istanbul. *Pediatr Pulmonol.* 2019;54(6):743-50.
29. Yilmaz E, Erdem H, Ozgüç M, Coşkun T, Ozçelik U, Göçmen A, ve ark. Study of 12 mutations in Turkish cystic fibrosis patients. *Hum Hered.* 1995;45(3):175-77.
30. Marson FAL, Bertuzzo CS, Ribeiro JD. Classification of CFTR mutation classes. *Lancet Respir. Med.* 2016; 4(8):37–8.
31. Brodlie M, Haq IJ, Roberts K, Elborn JS. Targeted therapies to improve CFTR function in cystic fibrosis. *Genome Med.* 2015;24(7):101.
32. Mekus F, Ballmann M, Bronsveld I, Bijman J, Veeze H, Tümmler B. Categories of delta F508 homozygous cystic fibrosis twin and sibling pairs with distinct phenotypic characteristics. *Twin Res.* 2000;3(4):277–93.
33. Terlizzi V, Lucarelli M, Salvatore D, Angioni A, Bisogno A, Braggion C, ve ark. Clinical expression of cystic fibrosis in a large cohort of Italian siblings. *BMC Pul Med.* 2018;18(1):1-8.
34. Marson FAL. Disease-modifying genetic factors in cystic fibrosis. *Curr Opin Pulm Med.* 2018;24(3):296-308.
35. Ekinci İB, Dayangaç-Erden D. Kistik fibrozis hastalığında mikro RNA'ların rolü ve yeni tedavi yaklaşımları açısından önemi. *DEU Tıp Fakültesi Dergisi.* 2019;33(2):175-82.
36. Cutting GR. Modifier genes in Mendelian disorders: the example of cystic fibrosis. *Ann N Y Acad Sci.* 2010;1214(1):57-69.
37. Garred P, Pressler T, Madsen HO, Frederiksen B, Svejgaard A, Hoiby N ve ark. Association of mannose-binding lectin gene heterogeneity with severity of lung disease and survival in cystic fibrosis. *J Clin Invest.* 1999;104(4):431-37.
38. Harris WT, Muhlebach MS, Oster RA, Knowles MR, Noah TL. Transforming growth factor-beta(1) in bronchoalveolar lavage fluid from children with cystic fibrosis. *Pediatr Pulmonol.* 2009;44(11):1057-64.
39. De Winter-de Groot KM, van der Ent CK. Nitric oxide in cystic fibrosis. *J Cyst Fibros.* 2005;4(Suppl 2):25-9.
40. Grasmann H, Storm van's Gravesande K, Buscher R, Knauer N, Silverman ES, Palmer LJ ve ark. Endothelial nitric oxide synthase variants in cystic fibrosis lung disease. *Am J Respir Crit Care Med.* 2003;167(3):390-4.
41. Yamauchi T, Iwabu M, Okada-Iwabu M, Kadowaki T. Adiponectin receptors: a review of their structure, function and how they work. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 2014;28(1):15-23.

42. De Lima Marson F, Zimmermann LA, Riberio JD, Bertuzzo CS. ADIPOR2 Polymorphisms in Cystic Fibrosis are Potential Modifiers of Clinical Severity. *J Genet Syndr Gene Ther.* 2014;5(5):1-7.
43. Darrah R, McKone E, O'Conner C, Rodgers C, Genatossio A, McNamara S, ve ark. EDNRA variants associate with smooth muscle mRNA levels, cell proliferation rates, and cystic fibrosis pulmonary disease severity. *Physiol Genomics.* 2010;41(1):71-7.
44. Blackman SM, Hsu S, Ritter SE, Naughton KM, Wright FA, Drumm ML, ve ark. A susceptibility gene for type 2 diabetes confers substantial risk for diabetes complicating cystic fibrosis. *Diabetologia.* 2009;52(9):1858-65.
45. Gu YY, Harley ITW, Henderson LB, Aronow BJ, Vietor I, Huber LA, ve ark. IFRD1 polymorphisms in cystic fibrosis with potential link to altered neutrophil function. *Nature.* 2009;458(7241):1039-42.
46. Frangolias DD, Ruan J, Wilcox PJ, Davidson AG, Wong LT, Berthiaume Y, ve ark. Alpha 1-antitrypsin deficiency alleles in cystic fibrosis lung disease. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2003;29(3):390-96.
47. Hobbs CA, Da Tan C, Tarran R. Does epithelial sodium channel hyperactivity contribute to cystic fibrosis lung disease? *J Physiol.* 2013;591(18):4377-87.
48. Hanukoglu I, Hanukoglu A. Epithelial sodium channel (ENaC) family: Phylogeny, structure-function, tissue distribution, and associated inherited diseases. *Gene.* 2016;579(2): 95–132.
49. Gasteiger G, D'Osualdo A, Schubert DA, Weber A, Bruscia EM, Hartl D. Cellular Innate Immunity: An Old Game with New Players. *J Innate Immun.* 2017;9(2):111-25.
50. Ralhan A, Laval J, Lelis F, Ballbach M, Grund C, Hector A, ve ark. Innate immunity in cystic fibrosis lung disease. *J Innate Immun.* 2016;8(6):531-40.
51. Rathinam VAK, Zhao Y, Shao F. Innate immunity to intracellular LPS. *Nat Immunol.* 2019;20(5):527-33.
52. Ideozu JE, Rangaraj V, Abdala-Valencia H, Zhang X, Kandpal M, Sala MA, ve ark. Transcriptional consequences of impaired immune cell responses induced by cystic fibrosis plasma characterized via dual RNA sequencing. *BMC Med Genomics.* 2019;12(1):1-16.
53. Guillot L, Beucher J, Tabary O, Le Rouzic P, Clement A, Corvol H. Lung disease modifier genes in cystic fibrosis. *Int J Biochem Cell Biol.* 2014;52:83-93.
54. Clarke LA, Botelho HM, Sousa L, Falcao AO, Amaral MD. Transcriptome meta-analysis reveals common differential and global gene expression profiles in cystic fibrosis and other respiratory disorders and identifies CFTR regulators. *Genomics.* 2015;106(5):268-77.

55. Kormann MSD, Dewerth A, Eichner F, Baskaran P, Hector A, Regamey N, ve ark. Transcriptomic profile of cystic fibrosis patients identifies type I interferon response and ribosomal stalk proteins as potential modifiers of disease severity. *PLoS One*. 2017;12(8):1-13.
56. Chu CY, Qiu X, Wang L, Bhattacharya S, Lofthus G, Corbett A, ve ark. The Healthy Infant Nasal Transcriptome: A Benchmark Study. *Sci Rep*. 2016;23(6):1-10.
57. Ideozu JE, Zhang X, McColley S, Levy H. Transcriptome Profiling and Molecular Therapeutic Advances in Cystic Fibrosis: Recent Insights. *Genes (Basel)*. 2019;10(3):1-15.
58. Clarke LA, Sousa L, Baretto C, Amaral MD. Changes in nasal transcriptome of native nasal epithelium expressing F508del-CFTR and intersecting data from comparable studies. *Respir Res*. 2013;14(38):1-19.
59. Wright JM, Merlo CA, Reynolds JB, Zeitlin PL, Garcia JG, Guggino WB, ve ark. Respiratory epithelial gene expression in patients with mild and severe cystic fibrosis lung disease. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2006;35(3):327-36.
60. Ogilvie V, Passmore M, Hyndman L, Jones L, Stevenson B, Wilson A, ve ark. Differential global gene expression in cystic fibrosis nasal and bronchial epithelium. *Genomics*. 2011;98(5):327-36.
61. Ulusal Erken Tanı ve Tarama Programı: Kistik Fibrozis. *Ankara Med J*. 2016;16(2):239-41.
62. Skov M, Hansen CR, Pressler T. Cystic fibrosis - an example of personalized and precision medicine. *APMIS*. 2019;127(5):352-60.
63. Ramsey BW, Davies J, McElvaney NG, Tullis E, Bell SC, Drevinek P, ve ark. A CFTR potentiator in patients with cystic fibrosis and the G551D mutation. *N. Engl. J. Med*. 2011;365:1663–72.
64. Taylor-Cousar JL, Munck A, McKone EF, Van der Ent CK, Moeller A, Simard C, ve ark. Tezacaftor-ivacaftor in patients with cystic fibrosis homozygous for Phe508del. *N. Engl. J. Med*. 2017; 377:2013–23.
65. Taylor-Cousar JL, Mall MA, Ramsey BW, McKone EF, Tullis E, Marigowda G, ve ark. Clinical development of triple combination CFTR modulators for cystic fibrosis patients with one or two F508del alleles. *ERJ Open Res*. 2019;5(2):1-13.
66. Davies JC, Moskowitz SM, Brown C, Horsley A, Mall MA, McKone EF, ve ark. VX-659Tezacaftor-Ivacaftor in patients with cystic fibrosis and one or two F508del alleles. *N Engl J Med*. 2018;379(17):1599-1611.
67. Sonnevile F, Ruffin M, Coraux C, Rousselet N, Le Rouzic P, Blouquit-Laye S, ve ark. MicroRNA-9 downregulates the ANO1 chloride channel and contributes to cystic fibrosis lung pathology. *Nat Commun*. 2017;8(1):1-11.

68. Bangel N, Dahloff C, Sobczak K, Weber WM, Kushe-Vihrog K. Upregulated expression of ENaC in human CF nasal epithelium. *J Cyst Fibros*. 2008;7(3):197-205.
69. Goetz D, Ren CL. Review of Cystic Fibrosis. *Pediatr Ann*. 2019;48(4):154-61.
70. Pereira SV, Ribeiro JD, Ribeiro AF, Bertuzzo CS, Marson FAL. Novel, rare and common pathogenic variants in the CFTR gene screened by high-throughput sequencing technology and predicted by in silico tools. *Sci Rep*. 2019;17(9):1-16.
71. Ferec C, Cutting GR. Assessing the Disease-Liability of Mutations in CFTR. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2012;2(12):1-14.
72. Decaestecker K, Decaestecker E, Castellani C, Jaspers M, Cuppens H, De Boeck K. Genotype/phenotype correlation of the G85E mutation in a large cohort of cystic fibrosis patients. *Eur Respir J*. 2004;23(5):679-84.
73. Ramezanpour M, Bolt H, Psaltis AJ, Worlmal PJ, Vreugde S. Primary human nasal epithelial cells: a source of poly (I:C) LMW-induced IL-6 production. *Sci Rep*. 2018;8(1):1-8.
74. McDougall CM, Blaylock MG, Douglas JG, Brooker RJ, Helms PJWalsh GM. Nasal Epithelial Cells as Surrogates for Bronchial Epithelial Cells in Airway Inflammation Studies. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2008;39(5):560-68.
75. Masvidal L, Alvarez A, Ruano L, de Garcia J, Larriba S, Casals T. GUSB and ATP2B4 are suitable reference genes for CFTR gene expression data normalization in nasal epithelium cells. *J Cyst Fibros*. 2012;11(5):398-404.
76. Monin L, Gaffen SL. IL-17 family cytokines: signaling mechanisms, biological activities and therapeutic implications. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2018;10(4):1-24.
77. Tang AC, Saferali A, He G, Sandford AJ, Strug LJ, Turvey SE. Endoplasmic Reticulum Stress and Chemokine Production in Cystic Fibrosis Airway Cells: Regulation by STAT3 Modulation. *J Infect Dis*. 2017;215(2):293-302.
78. Bhagirath AY, Li Y, Somayajula D, Dadashi M, Badr S, Duan K. Cystic fibrosis lung environment and *Pseudomonas aeruginosa* infection. *BMC Pulm Med*. 2016;16(1):1-22.
79. Broz P, Dixit VM. Inflammasomes: mechanism of assembly, regulation and signaling. *Nat Rev Immunol*. 2016;16(7):407-20.
80. Davis BK, Wen H, Ting JP. The Inflammasome NLRs in Immunity, Inflammation, and Associated Diseases. *Annu Rev Immunol*. 2011;29:707-35.
81. Cantin AM. Cystic Fibrosis Lung Disease and Immunometabolism: Targeting the NLRP3 Inflammasome. *Am J Respir Crit Care Med*. 2019;200(11):1335-37.

82. Scambler T, Griffiths HJ, Reyna S, Pathak S, Wong C, Holbrook J, ve ark. ENaC-mediated sodium influx drives NLRP3 inflammasome-dependent autoinflammation in cystic fibrosis. *eLife*. 2019;8:e49248.
83. McElvaney OJ, Zaslona Z, Becker-Flegler K, Palsson-McDermott EM, Boland F, Gunaratnam C, ve ark. Specific Inhibition of the NLRP3 Inflammasome as an Anti-Inflammatory Strategy in Cystic Fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med*. 2019;200(11):1381-91.
84. Bhagirath AY, Li Y, Somayajula D, Dadashi M, Badr S, Duan K. Cystic fibrosis lung environment and Pseudomonas aeruginosa infection. *BMC Pulm Med*. 2016;16(1):1-22.
85. Norris PC, Gosselin D, Reichart D, Glass CK, Dennis EA. Phospholipase A2 regulates eicosanoid class switching during inflammasome activation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014;111(35):12746-51.
86. Boratko A, Csontos C. NHERF2 is crucial in ERM phosphorylation in pulmonary endothelial cells. *Cell Commun Signal*. 2013;11(99):1-10.
87. Singh AK, Riederer B, Krabbenhöft A, Rausch B, Bonhagen J, Lehmann U, ve ark. Differential roles of NHERF1, NHERF2, and PDZK1 in regulating CFTR-mediated intestinal anion secretion in mice. *J Clin Invest*. 2009;119(3):540-50.
88. Von Kanel T, Stanke F, Weber M, Schaller A, Racine J, Kraemer R, ve ark. Clinical and molecular characterization of the potential CF disease modifier syntaxin 1A. *Eur J Hum Genet*. 2013;21(12):1462-66.
89. Ganeshan R, Di A, Nelson DJ, Quick MW, Kirk KL. The interaction between syntaxin 1A and cystic fibrosis transmembrane conductance regulator Cl<sup>-</sup> channels is mechanistically distinct from syntaxin 1A-SNARE interactions. *J Biol Chem*. 2003;278(5):2876-85.
90. Boyaka E, Di A, Chang SY, Naren AP, Tousson A, Nelson DJ, ve ark. CFTR chloride channels are regulated by a SNAP-23/syntaxin 1A complex. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99(19):12477-82.
91. Grumelli S, Islan GA, Castro GR. Consequences of cystic fibrosis transmembrane regulator mutations on inflammatory cells. *Pulm Crit Care Med*. 2016;1(2):39-51.
92. Dhuriya YK, Sharma D. Necroptosis: a regulated inflammatory mode of cell death. *J Neuroinflammation*. 2018;15(1):1-9.
93. Royce GH, Brown-Borg HM, Deepa SS. The potential role of necroptosis in inflammaging and aging. *GeroScience*. 2019;41(6):795-811.
94. Yamagishi S, Matsui T. Role of receptor for advanced glycation end products (RAGE) in liver disease. *Eur J Med Res*. 2015;20(1):1-7.
95. Ramasamy R, Yan SF, Schmidt AM. Receptor for AGE (RAGE): signaling mechanisms in the pathogenesis of diabetes and its complications. *Ann N Y Acad Sci*. 2011;1243:88-102.



96. Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, AGE-RAGE signaling pathway in diabetic complications-Homo sapiens (human) [Internet].1995[Erişim tarihi 20 Ocak 2020]. Erişim Adresi: <https://www.genome.jp/kegg/>
97. Shridas P, Noffsinger VP, Trumbauer AC, Webb NR. The Dual Role of Group V Secretory Phospholipase A2 in Pancreatic  $\beta$ -cells. *Endocrine*. 2017;58(1):47-58.
98. Frank PG, Lisanti MP. ICAM-1: role in inflammation and in the regulation of vascular permeability. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2008;295(3):1-13.
99. De Rose V, Oliva A, Messore B, Grosso B, Mollar C, Pozzi E. Circulating Adhesion Molecules in Cystic Fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med*. 1998;157(4):1234-39.
100. Nicolis E, Tamanini A, Melotti P, Rolfini R, Berton G, Cassatella MA, ve ark. ICAM-1 induction in respiratory cells exposed to a replication-deficient recombinant adenovirus in vitro and in vivo. *Gene Ther*. 1998;5(1):131-36.
101. Roufayel R, Kadry S. Molecular Chaperone HSP70 and Key Regulators of Apoptosis - A Review. *Curr Mol Med*. 2019;19(5):315-25.
102. Bartlett JR, Friedman KJ, Ling SC, Pace RG, Bell SC, Bourke B, ve ark. Genetic Modifiers of Liver Disease in Cystic Fibrosis. *JAMA*. 2009;302(10):1076-83.
103. Fiorotto R, Scirpo R, Trauner M, Fabris L, Hoque R, Spirli C, ve ark. Loss of CFTR Affects Biliary Epithelium Innate Immunity and Causes TLR4–NF- $\kappa$ B–Mediated Inflammatory Response in Mice. *Gastroenterology*. 2011;141(4):1498-1508.