

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

**KARDİOVASKÜLER SİSTEM PATOFİZYOLOJİSİNDE ROL ALAN
MİKRORNALARIN İNCELENMESİ**

Dr. Denizhan ÖZDEMİR

**Tıbbi Biyoloji Programı
DOKTORA TEZİ**

**ANKARA
2017**

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

**KARDİYOVASKÜLER SİSTEM PATOFİZYOLOJİSİNDE ROL ALAN
MİKRORNALARIN İNCELENMESİ**

Dr. Denizhan Özdemir

**Tıbbi Biyoloji Programı
DOKTORA TEZİ**

**TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. Serap DÖKMECİ
Doç. Dr. Mark W FEİNBERG**

ANKARA

2017

ONAY SAYFASI

Kardiyovasküler Sistem Patofizyolojisinde Rol Alan MikroRNAların İncelenmesi

Dr. Denizhan Özdemir

Bu çalışma 16/11/2017 tarihinde jürimiz tarafından "Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Programı" nda doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı: Prof. Dr. Meral Özgüç (imza) 
Hacettepe Üniversitesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Serap Dökmeçi (imza) 
Hacettepe Üniversitesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı

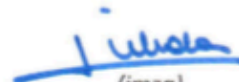
Üye: Prof. Dr. Hilal Özdağ (imza) 
Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü

Üye: Doç. Dr. Banu Peynircioğlu (imza) 
Hacettepe Üniversitesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı

Üye: Yardımcı Doç. Dr. Özgür Şahin (imza) 
Bilkent Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik
Bölümü

Bu tez Hacettepe Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri tarafından uygun bulunmuştur.

04 Aralık 2017


(imza)

Prof. Dr. Diclehan Orhan
Enstitü Müdürü

YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI

Enstitü tarafından onaylanan lisansüstü tezimin/raporumun tamamını veya herhangi bir kısmını, basılı (kağıt) ve elektronik formatta arşivleme ve aşağıda verilen koşullarla kullanıma açma iznini Hacettepe Üniversitesine verdiğimi bildiririm. Bu izinle Üniversiteye verilen kullanım hakları dışındaki tüm fikri mülkiyet haklarım bende kalacak, tezimin tamamının ya da bir bölümünün gelecekteki çalışmalarda (makale, kitap, lisans ve patent vb.) kullanım hakları bana ait olacaktır.

Tezin kendi orijinal çalışmam olduğunu, başkalarının haklarını ihlal etmediğimi ve tezimin tek yetkili sahibi olduğumu beyan ve taahhüt ederim. Tezimde yer alan telif hakkı bulunan ve sahiplerinden yazılı izin alınarak kullanılması zorunlu metinlerin yazılı izin alınarak kullandığımı ve istenildiğinde suretlerini Üniversiteye teslim etmeyi taahhüt ederim.

- ✓ **Tezimin/Raporumun tamamı dünya çapında erişime açılabilir ve bir kısmı veya tamamının fotokopisi alınabilir¹.**

(Bu seçenekle teziniz arama motorlarında indekslenebilecek, daha sonra tezinizin erişim statüsünün değiştirilmesini talep etmeniz ve kütüphane bu talebinizi yerine getirirse bile, teziniz arama motorlarının önbelleklerinde kalmaya devam edebilecektir)

15/09/2017

Dr. Denizhan ÖZDEMİR



ETİK BEYAN

Bu çalışmadaki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi, görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu, kullandığım verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı, yararlandığım kaynaklara bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu, tezimin kaynak gösterilen durumlar dışında özgün olduğunu, Prof. Dr. Serap DÖKMECİ ve Mark W FEİNBERG danışmanlığında tarafımdan üretildiğini ve Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Yönergesine göre yazıldığını beyan ederim.

Dr. Denizhan ÖZDEMİR



TEŞEKKÜR

Doktora çalışmalarım boyunca bilgi, zamanı ve tecrübelerinden her zaman önemli dersler öğrendiğim tez danışmanım Prof. Dr. Serap DÖKMECİ'ye ve Mark W FEINBERG'e, çalışmalarına önemli katkılarda bulunan tez izleme komitesi hocalarım Prof. Dr. Meral Özgüç ve Prof. Dr. Hilal Özdağ'a, deneyimlerini hiç bir zaman esirgemeyip çalışmalarına destek olan Öğretim Görevlisi Başak İÇLİ'ye, başta arkadaşlarım Uzm. Ayşe Kaymaz ve Araştırma Görevlisi Yeliz AKKAYA ULUM'a olmak üzere Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'nda görev yapan tüm hocalarıma ve bu süreçte tanıştığım birbirinden başarılı sayısız arkadaşşıma en içten teşekkürlerimi sunarım.

Hayallerimin izinde koşarken, en büyük destekçim olan aileme sonsuz teşekkür ederim.

Bu çalışma, Tübitak 2214-A Yurt Dışı Doktora Sırası Araştırma Burs Programı tarafından desteklenmiştir.

ÖZET

Denizhan Özdemir A. Kardiyovasküler Sistem Patofizyolojisinde Rol Alan MikroRNAların İncelenmesi. Hacettepe Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Biyoloji Doktora Tezi, Ankara, 2017.

Kardiyovasküler system hastalıkları (KVH) ve komplikasyonları; akut koroner sendrom, periferik damar hastalıkları, felç gibi birbirleri ile metabolik bozukluklar bakımından ilişkili fakat farklı klinik formlarda ortaya çıkabilmektedir. KVH'a rol açan risk faktörleri arasında diabetes mellitus, kronik inflamasyon veya anjiogenik uyarılara yetersiz cevap veren damar yapısı benzer etiyoloji olarak gösterilmiştir. Kan akımını düzenleyen en aktif bölüm olan endotel, damarın iç lümenini oluşturmaktadır. Endotel, birçok uyarana cevap oluşturarak dokunun beslenmesini düzenlediği gibi uzun dönemli damar yapılanmasında da etkilidir. Bu uyarıların başlıca grupları; anjiogenik uyarı için VEGF, bFGF, inflamasyon için TNF α , diyabetojenik uyarılar için D-glukozdur. MikroRNA'lar 20-22 nükleotid uzunluğunda, transkripsiyon sonrası gen ifadesini kontrol eden kodlamayan RNA dizileridir. Yakın zamanda yapılan araştırmalar, mikroRNA'ların gelişimin erken basamaklarından, birçok hastalık patofizyolojisine kadar rol olduğunu göstermiştir. Bu tezin iki ana amacı olup ilki, vasküler endotelinde görev gören mikroRNA panelini, farklı uyarılar ile inceleyerek, mikroRNA'ların ifade düzeyinin nasıl değiştirdiğini bulmaktır. İkincisi, bu mikroRNA'ların hangi sinyal yollarında görev aldığını saptamak ve ilişkili olabileceği yollar ile özgülüğünü belirlemektir. Akut koroner sendrom geçiren hastalarda iki bağımsız mikrodizilim profillemesi yapılmıştır. Her iki kohortta saptanan istatistiksel olarak anlamlı şekilde regüle olan mikroRNA'lardan, incelemek üzere panel oluşturulmuştur. Bu mikroRNA panelini TNF α , VEGF, bFGF ve D-glukoz ile uyararak ifade düzeyleri belirli bir zaman aralığında izlenmiştir. Anlamlı ifade düzeyi bulunan mikroRNA-615-5p'nin (miR-615-5p) endotel hücrelerde (HUVEC), fonksiyon kazanımı ve kaybı çalışmaları ile basal membran varlığında damar yapısını düzenlediği bulunmuştur. İmmunoblot analizi ile sinyal yolları araştırıldığında, miRNA-615-5p özgül olarak Akt/eNOS yolağını düzenlerken; yakın ilişkili olan p38 ve ERK1/2 üzerine etki etmemiştir. MiR-615-5p ifadesi varlığında Akt/eNOS yolları baskılanırken, miR-615-5p inhibe edildiğinde Akt/eNOS sinyalinin dinamik olarak arttığı gözlenmiştir. Bu çalışma ile akut koroner sendrom geçiren hastalarda ifadesi değişen miR-615-5p'nin endotel hücrede Akt/eNOS yolağını VEGF varlığında özgül olarak düzenlediği bulunmuştur.

Anahtar kelimeler: mikroRNA, anjiogenez, Akt/eNOS sinyal yolları

ABSTRACT

Denizhan Özdemir A. The role of microRNAs in cardiovascular system pathophysiology. Hacettepe University Institute of Health Sciences, Ph.D. thesis in Medical Biology, Ankara, 2017. The diseases and attendant complications of cardiovascular system consist of acute coronary syndrome, peripheral vascular disease and stroke that are distinct clinical manifestations yet stem from metabolically-originated processes. Diabetes mellitus, chronic inflammatory state and the lack of proper response to angiogenic stimuli account for predisposing risk factors to cardiovascular diseases. Endothelium constitutes crucial inner lining of the vasculature. It regulates blood flow to the organs as well as responds to a variety of stimuli, which are important in re-modeling of vascular structure in the long-term. Major groups of stimuli consist of VEGF and bFGF that govern angiogenesis, TNF α that drives inflammation, and D-glucose that is a diabetogenic stimulant. MicroRNAs are non-coding 20-22 nt RNA sequences that regulate gene expression at the post-transcriptional level. Recent studies have shown that microRNAs (miRs) function broadly from early stage of development to several disease processes. This study aims to address two major questions. First, to explore the expression levels of a cohort of miRs that might take functional roles in vascular endothelium. Second, to identify the pathways by which miRs can exert their effects and localize the specificity via examining closely-related signaling mechanisms. To this end, two independent microarray profiling are performed in patients with ACS compared to controls. A panel of concordant miRs in both cohorts are elicited for further analysis. This panel is subjected to qPCR analysis in endothelial cells in the presence of respective stimuli such as TNF α , VEGF, bFGF and D-glucose for aforementioned processes. MicroRNA-615-5p is significantly regulated in response to different stimuli, and can reciprocally regulate vessel network formation through gain- and loss-of-function studies in the presence of basal membrane. In addition, miR-615-5p specifically acts on Akt/eNOS pathway without altering p38, ERK1/2 pathways that are closely-associated with angiogenic effects. MiR-615-5p overexpression can suppress Akt/eNOS pathways whereas inhibition of miR-615-5p leads to dynamic amplification of Akt/eNOS signaling. This dissertation contributes to an understanding of mechanism of miR-615-5p that is regulated in patients with ACS, and hence can distinctly modulate Akt/eNOS pathway in the presence of VEGF.

Keywords: microRNAs, angiogenesis, Akt/eNOS signaling pathways

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ONAY SAYFASI	iii
YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI	iv
ETİK BEYAN	v
TEŞEKKÜR	vi
ÖZET	vii
ABSTRACT	viii
İÇİNDEKİLER	ix
SİMGELER VE KISALTMALAR	xi
ŞEKİLLER	xiii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. MikroRNA'lar ve fonksiyonları	3
2.1.1 MikroRNA'ların Kardiyovasküler Hastalıklardaki Rolü	6
2.2 Anjiogenez ve Endotel Hücre Etkileşimi	9
2.2.1 Anjiogenez ve ilgili sinyal yolları	10
3. GEREÇ VE YÖNTEM	13
3.1. Mikrodizilim profil çalışması ve anlamlı bulunan mikroRNA paneli	13
3.2. Gereçler	13
3.2.1. Hücre kültürü çalışmaları	13
3.2.2. qPCR analizi	14
3.2.3. İmmunoblot analizi	15
3.2.4. Mikrodizilim analizi	15
3.3. Yöntemler	16
3.3.1. Hücre kültürü çalışmaları	16
3.3.2. Kantitatif PCR (RT-qPCR) analizi	16
3.3.3. Transfeksiyon çalışmaları	18
3.3.4. Fonksiyonel çalışmalar	20
3.3.5. İmmunoblot çalışmaları	21

3.3.6. İstatistik çalışmaları	22
4. BULGULAR	23
4.1. MikroRNA panelinin iki farklı kohortta incelenmesi	23
4.2. MikroRNA panelinin HUVEC'lerde çeşitli uyaranlara gösterdiği ifade	24
5. TARTIŞMA	36
6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER	39
6.1. Sonuçlar	39
6.2. Öneriler	41
7. KAYNAKLAR	
8. ÖZGEÇMİŞ	

SİMGELER VE KISALTMALAR

Ago	<i>Argonaute</i> kompleksi
ASO	Antisens oligonükleotit
BSA	Sığır serum albümin
cm	Santimetre
°C	Derece santigrat
dk	Dakika
ERK 1/2	Ekstraselüler regüle edici kinaz 1/2
G	Yerçekimi
gr/ml	gram/mililitre
G:U	Guanin:Urasil
HUVEC	İnsan umbilikal ven endotel hücreleri
IgG	İmmünglobülin G
KDR	<i>Kinase insert domain receptor</i>
kg	Kilogram
miRNA	mikroRNA
mRNA	mesajcı RNA
ml	mililitre
µg/ml	Mikrogram/mililitre
µl	Mikrolitre
mM	milimol
mRNA	Mesajcı ribonükleik asit
ng/ml	nanogram/mililitre
NO	Nitrik oksit
nt	nükleotit
PBS	Tuzlu fosfat tamponu
PoliA	Poliadenilasyon
RISC	RNA aracılı susturucu kompleks (<i>RNA-induced silencing complex</i>)
ROS	Reaktif oksijen türleri

rpm	<i>Revolutions per minute</i>
RT	<i>Reverse transcriptase</i>
RT-qPCR	<i>Reverse transcriptase</i> quantitative polymerase chain reaction
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
TNFα	Tümör nekroz faktörü alfa
VEGF	Vasküler endotel büyüme faktörü
3' UTR	Kodlanmayan 3 primer ucu

ŞEKİLLER

Şekil	Sayfa
2.1. MikroRNA'ların nükleus ve sitoplazmada üretim aşamaları	6
4.1. Anlamlı bulunan mikroRNA'lar sonraki aşamalarda incelenmiştir.	24
4.2. MikroRNA'ların TNF α ile uyarılması sonucu ifade değişim sonuçları	25
4.3. MikroRNA'ların VEGF-A ile uyarılması sonucu ifade değişim sonuçları	26
4.4. MikroRNA'ların bFGF ile uyarılması sonucu ifade değişim sonuçları	27
4.5. MikroRNA'ların D-glukoz ile uyarılması sonucu ifade değişim sonuçları	28
4.6. MikroRNA-615-5p'nin damar yapısında yer alan farklı hücre türlerindeki ifadesi	29
4.7. MikroRNA-615-5p mimik ve inhibitörlerinin matrigel damar ağı oluşumu üzerindeki etkisi	30
4.8. MikroRNA-615-5p mimik ve inhibitörlerinin endotel hücre göçü üzerindeki etkisi	31
4.9. MikroRNA-615-5p mimik ve inhibitörlerinin çeşitli sinyal yolları üzerindeki etkisi	32
4.10. NS _m (-) ve miR-615-5p _m ile gerçekleştirilen immüno blot çalışmaları	33
4.11. NS _{inh} (-) ve miR-615-5p _{inh} (+) ile transfekte edilmiş HUVEC'lerin, VEGF-A ile uyarılarak immüno blot ile incelenmesi	34
4.12. NS _{inh} (-) ve miR-615-5p _{inh} ile gerçekleştirilen immüno blot çalışmaları dansitometre sonuçları	35
5.1. MiR-615-5p'nin etki ettiği sinyal yolları	41

1. GİRİŞ

Kardiyovasküler hastalıklar, kalp ve damar sistemini etkileyen hastalıklardır¹. Günümüzde, dünya genelinde en önemli ölüm ve morbidite sebebidir². Akut koroner sendrom (miyokard enfarktüsü, stabil anjina, anstabil anjina), periferik damar hastalıkları, felç, hipertansiyon gibi ana gruplara ayrılır^{3,4}. Bu hastalıklara bağlı olarak komplikasyon olarak adlandırılan kalp yetmezliği, aritmiler, aortik anevrizmalar, tromboembolizm gibi ikincil hastalıklara yol açabilirler⁴. Bu hastalıkların ortak patofizyolojik mekanizması, dokuların beslenme ve oksijenizasyonun sağlayan kan perfüzyonunun bozulması ve doku canlılığının yitirilmesidir⁵. Bozulan damar yapısı, altta yatan uzun süreçte ortaya çıkan metabolik bozukluklardan kaynaklanmaktadır⁶. Anjiojenik uyarılara verilen yetersiz cevap, kronik inflamasyon, diyabet, hipertansiyon, sigara gibi etmenler damar idamesini bozan başlıca risk faktörleridir⁷.

Endotel hücreler kan ile sürekli temas halinde olduğu için, damar yapısı ile ilgili birçok süreçte ilk aşama cevabını oluşturdukları gösterilmiştir⁸. TNF α gibi inflamatuvar uyarılar varlığında adezyon molekülleri eksprese ederek dokuya lökositlerin infiltrasyonunu kolaylaştırma; VEGF-A varlığında nitrik oksit ile damar genişlemesi, büyüme ve geçirgenliğini artırma; D-glukoz varlığında endotel hücrelerin anjiojenik özelliklerinin azalması gibi süreçlerde ilk basamak cevabı oluşturmaktadır⁹⁻¹¹. Bu fonksiyonlar endotel hücrelerin, dinamik ve aktif rolleri olabileceğini, aynı zamanda belirtilen süreçlerde yön verici olduğunu göstermiştir¹².

MikroRNA'lar, gen ifadesini translasyon düzeyinde kontrol ederek gelişimden hastalık sürecine kadar değişik basamaklarda ince ayar (*fine-tuning*) yapan RNA dizileridir¹³. Hedef mRNA'nın 3' kodlamayan bölgesine komplementer olarak bağlanarak, gen ifadesini azaltırlar¹⁴. Bir mikroRNA, birden çok mRNA'ya bağlanabilir ve aynı yolda yer alan birden fazla geni kontrol edebilir¹⁵. Benzer şekilde, bir mRNA dizisine birden fazla farklı miRNA bağlanabilmektedir¹⁵. Bu ince ayar mekanizması sayesinde, hücre ihtiyaç ve metabolik ihtiyaçlarına ek bir kontrol seviyesi sağlanarak transkripte edilen bir mRNA zincirinden farklı seviyelerde protein sentezlenebilir. MikroRNA'lar hücre dışındaki ortamlarda küçük yapılarından

dolayı Ribonükleaz etkisinden etkilenmeyerek, kararlı formda korunabilirler¹⁶. İnsanlarda ekstrasellüler ortamlardan, kan plazmasından ve eksozomlardan kolayca izole edilebilir¹⁷. Dış ortamlardaki bu biyokimyasal direnç, mikroRNA'ları biyobelirteç, tanı veya tedavi için elverişli kılmaktadır¹⁸.

Bu tez çalışmasında, kardiyovasküler hastalıklara günümüzdeki yaklaşım modeli, daralan damarın fiziksel veya enzimsel yöntemler ile açılmasına dayanmaktadır¹⁹. Bu yaklaşım makrovasküler olarak adlandırılan belli bir büyüklükteki daralmayı hedeflerken, mikrovasküler olarak adlandırılan daha küçük çaptaki damar bozuklukları (vaskülopati) için yetersiz kalmaktadır³. Özellikle yaygın olarak etkilenmiş dokularda, vaskülopatiyi direk olarak hedefleyen bir tedavi formu bulunmamaktadır²⁰.

Kardiyovasküler hastalıkların bir formu olan akut koroner sendromda ifadesi sağlıklı bireylere göre değişen bir mikroRNA panelinin belirlenmesi amaçlanmıştır. MikroRNA'ların birçok dokuda görev aldığı düşünüldüğünde, endotel hücrelerin bahsi geçen cevap sürecinde rol alması önem taşımaktadır. Belirlenen paneli farklı uyaranlar ile test ederek, seçilecek bir mikroRNA'nın belirli uyaranlar ile ifadesi incelenecektir. Anlamlı ifade değişikliği gösteren mikroRNA'nın rol oynayabileceği patofizyolojik yolaktaki olası rolünün, fonksiyon kazanım ve kaybı çalışması ile planlanmıştır. Son olarak, hem fonksiyonel çalışmalarla incelenmesi hem de sinyal yollarındaki etkisinin araştırılması hedeflenmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. MikroRNA'lar ve fonksiyonları

MikroRNA'lar ilk defa *C. elegans* larvası incelenirken lin-4 adlı bir genin larva gelişimini kontrol ettiği, fakat protein kodlamadığının farkedilmesi ile keşfedilmiştir²¹. Lin-4, 22 ve 61 nükleotitten oluşan küçük bir RNA çifti kodlamaktadır²². Uzun olan dizi, katlanarak kısa olan olgun (matür) diziyi oluşturmaktadır²². Daha sonra yapılan çalışmalar, matür dizinin mRNA'ların 3' kodlamayan ucuna komplementer olarak bağlandığını göstermiştir²³. Eklenen çalışmalar, lin-4 mRNA ifadesi değişmeden, protein ifadesinin değişebildiğini göstermiştir^{24,25}. Bu çalışmaların ortak sonucu, translasyon seviyesinde yer alan bir ince ayar mekanizması olduğunu göstermektedir²⁶.

MikroRNA'lar, 20-22 nükleotitten oluşan, endojen olarak sentezlenen RNA dizileridir^{13,27,28}. Protein kodlayan mRNA'ların 3' ucuna bağlanarak, translasyon basamağının üretkenliğini azaltırlar^{13,27,28}. Bu sonucun ortaya çıkması için, iki farklı mekanizma ana rol oynamaktadır^{29,30}. Memeli hayvanlarda, %84 oranında mRNA seviyesini azaltarak, %16 civarında mRNA seviyesi sabit kalırken mRNA aktivitesini azaltarak gerçekleşmektedir³⁰.

Her mikroRNA, yüzlerce geni hedefleyerek ifade düzeylerini optimize etmektedir^{31,32}. Baskın mekanizma olan mRNA yıkımı için *Argonuate* aracılı mRNA katalizasyonu ile olmaktadır³³. Bu mekanizma polyA kuyruğunun kısaltılması ve ribonükleazların mRNA'yı daha hızlı dönüşüme katması aracılığı ile olmaktadır^{34,35}. Protein kodlayan insan genomunun, en az üçte birinin miRNA tarafından kontrol edildiği tahmin edilmektedir³⁶. Tek bir mikroRNA'nın ifadesinin bozulması, gelişim, farklılaşma, hücre metabolizması ve ölüm gibi süreçleri bozmasına neden olabilmektedir³⁷⁻⁵⁵.

MikroRNA'lar genlerin intronik bölgelerinde ve genler arası bölgelerde yer alırlar^{31,56,57}. Protein kodlayan genler ile benzer olarak, iyi tanımlanmış transkripsiyon faktörleri ile sentezlenirler^{23,58,59}. MikroRNA'ların transkripsiyonu, RNA polimeraz II aracılığıyla olmaktadır ve bu enzimin ürettiği diğer transkriptler gibi polyadenilasyon ve 5' ucunun korunması için başlık takılmaktadır⁶⁰. Transkripsiyon

aşamasında, pri-miR olarak adlandırılan uzun ilmik şeklindeki dizi olarak adlandırılır⁶¹. Bu uzun dizi, öncelikle kendi üzerine katlanır ve kement şeklini alır^{57,61}. DGCR8 (*DiGeorge Syndrome critical region 8*) olarak adlandırılan çift zincirli RNA tanıyan bir proteine bağlanır ve Drosha'nın bir sonraki basamakta bağlanmasına ortam hazırlar^{35,59,61,62}. *Drosha RibonükleazIII* enzimi olduğu için pri-miR'i işlenip kısaltılarak 70 nükleotid uzunluğunda pre-miR elde edilmektedir^{59,61}. *Drosha* kompleksine, RNA helikazlar (p68 ve p72), RNA bağlayıcı proteinler (KSRP, hnRNP A1) gibi birçok kofaktör eşlik etmektedir^{26,59-61}.

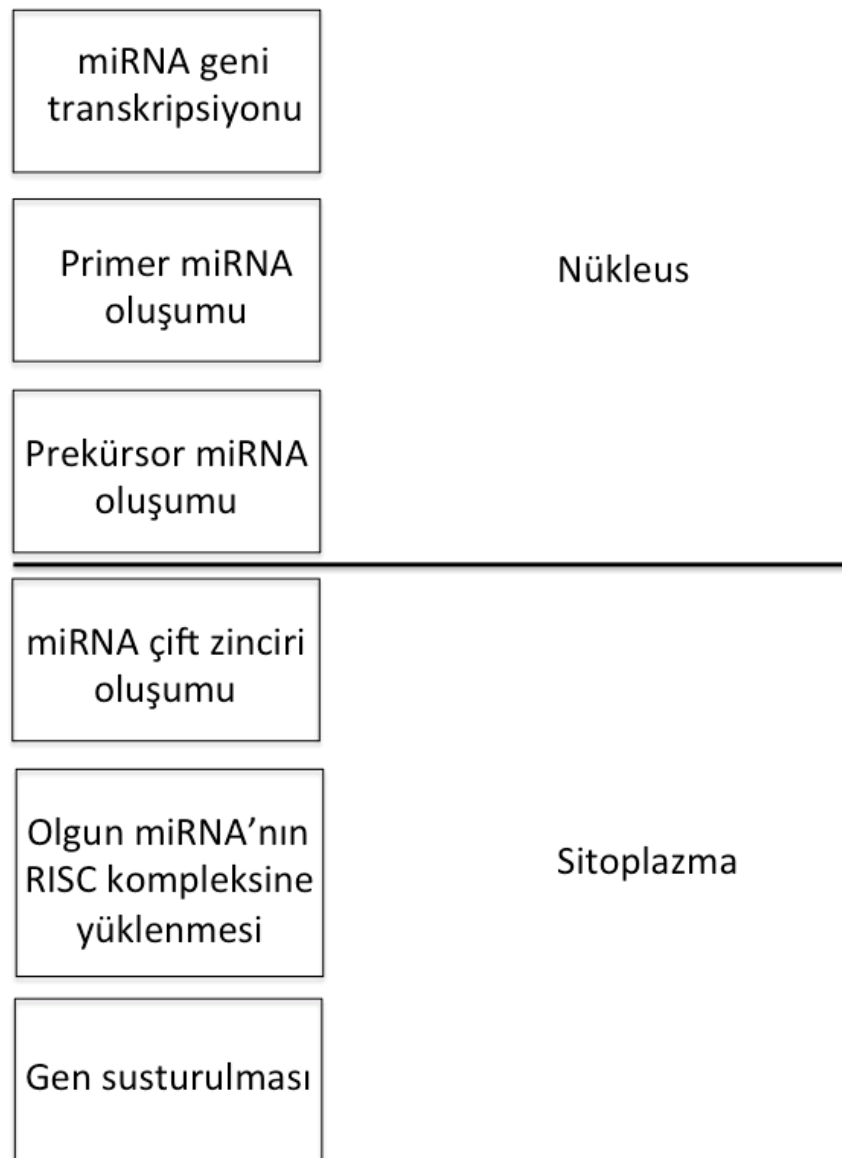
MikroRNA'ların çekirdekten sitoplazmaya taşınması, karyoferin ailesinden proteinler ile olmaktadır^{54,63}. Exportin-5, çekirdekten sitoplazmaya Ran-GTP aracılı transferi sağlayan bir taşıyıcıdır^{64,65}. Pre-miR, exportin5 aracılığıyla ile sitoplazmaya taşınır^{64,65}. Sitoplazmada bir başka RibonükleazIII olan Dicer enzimi pre-miR'e bağlanarak yaklaşık 22 nükleotid uzunluğunda çift zincirli miRNA oluşturmaktadır^{23,59,66}. Çift zincirli miRNA, RNA helikaz yardımıyla sarmalı açılarak, matür dizinin Argonuate 1-4 proteinlerinden bir tanesine yüklenmektedir^{67,68,69}. Çok istisnai durumlar dışında, diğer zincir ise yıkılmaktadır⁶⁰. *Argonuate* (Ago) ile bütünleşen mikroRNA dizisi, RISC (*microRNA-induced silencing complex*) olarak adlandırılır⁷⁰. RISC kompleksinin hedef mRNA'sını tanıması 3' ucundaki kodlamayan bölgeye komplementer bağlanması ile olmaktadır⁷¹. Hedef genin tanınması, miRNA'nın 2-7. nükleotitleri olarak bilinen 'çekirdek' dizinin komplementer bağlanması aracılığıyla olur^{72,73}. Çekirdek dizinin komplementer olarak bağlanmasından sonra, mRNA'nın farklı şekillerde inaktive olabildiği gösterilmiştir⁷⁴. Meister ve arkadaşları 2-15 nükleotitler arasında oluşan komplementer bağlanma sonrası, mRNA'nın 10 ve 11. nükleotitler arasında fosfodiester bağının hidrolize olduğunu sunmuştur^{75,76}. Bir diğer taraftan, Felice ve arkadaşları, 1 veya 2 nükleotit hatalı eşleşmesinin (G:U gibi) tolere edilebileceğini söylemiştir^{77,78}. Sonuç olarak, hedef mRNA ile etkileşen RISC kompleksi poliA nükleaz enzimi ile etkileşip deadenilasyon sürecini başlatır. Kararlılığı bozulan mRNA, nihai olarak yıkılmış olur.

Yukarıda açıklanan mekanizma her ne kadar baskın olsa da, araştırmalar 5' ucuna bağlanma ve kodlayan bölgeye bağlanma gibi 'fonksiyonel' komplementer

dizilerin olduğunu da göstermiştir⁷⁹. Bu konuda hedef dizinin nasıl tanıdığı halen kesin bilinmemektedir.

Her ne kadar mRNA-mikroRNA etkileşiminin anlaşılmasında yol katedilmiş olsa da, miRNA ifadesinin anlaşılması halen yeterli seviyede değildir. En kabul edilmiş düşünce, mRNA'ların intron bölgelerinde bulunan mikroRNA'ların transkripsiyon aşamasında eş zamanlı olarak sentezlenmesidir^{15,80,81}. Bunun yanında, intronik bölgelerde yer almayan ve tek başına kodlanan gen olarak fonksiyon gören mikroRNA'lar için ise, cis-düzenleyici elementlerin mikroRNA promoterlarını kontrol ettiği düşünülmektedir^{82,83}. Benzer şekilde, Drosha kompleksinde yer alan kofaktörlerin de (hnRNA A1, NF90/NF40, KSRP, Lin28) mikroRNA'nın transkripsiyon sonrası düzenleyicileri olmaktadır⁸⁴⁻⁸⁶. Benzer şekilde, hücrenin içinde bulunduğu gelişim basamağı, hücre yoğunluğu veya hücre döngüsü durumu gibi fizyolojik durumlar mikroRNA seviyesini dinamik olarak etkileyen başka kontrol etmenlerindedir⁸⁷.

MikroRNA'ların etki gösterdiği RISC mekanizmasını, insan sağlığı ve hastalıkların tedavisinde kullanmak üzere iki klinik çalışma aktif olarak devam etmektedir^{88,89}. Bunlardan ilki, hepatit C virüsünü tedavi etmek için kullanılan bir ASO (anti-sens oligonükleotit), diğeri ise kardiyovasküler hastalıklara sebep olan kolesterol (LDL) üretimini azaltan RNA interferans mekanizmasında kullanılan siRNA molekülleridir.



Şekil 2.1. MikroRNA'ların nükleus ve sitoplazmada üretim aşamaları

2.1.1 MikroRNA'ların Kardiyovasküler Hastalıklardaki Rolü

Miyokard infarktüsü, kalbin koroner sisteminin kalbin yeterli oksijen ihtiyacını sağlayamayarak kas dokusunun nekrozu ile doku ölümüne yol açan hastalıktır⁹⁰. Miyokard infarktüsü, komplikasyonları sebebiyle de morbiditesi çok yüksektir⁴. Miyokard infarktüsünden sonra oluşan doku kaybının hemen çevresinden perifer alan iskemik bölge olarak adlandırılmaktadır. Bu bölge yetersiz oksijen (hipoksi) sağlanmasına bağlı olarak fonksiyonunu kaybetse de, yeterli kan akımı sağlandıktan sonra zaman içerisinde kasılma fonksiyonunu geri kazanarak

oluşan doku kaybının etkisini sınırlandırabilmektedir⁹¹. Bu durumun tam tersi olan, yeterli kan akımının sağlanamaması durumunda ise ilk başta doku nekrozuna giden bölgenin yanında, iskemik bölgede intraselüler mekanizmalara yetersiz oksijen sağlanamaması durumunda zaman içerisinde nekroza giderek infarkt alanını büyütmektedir⁹²⁻⁹⁴. Oluşan infarkt alanı mortalite ve morbidite ile doğru orantılıdır⁴. Bu sebeple yeterli kan akımının sağlanmasında anjiogenezin erken süreçte olması önemli rol oynamaktadır^{8,10,95}.

Kardiyoloji ve kardiyovasküler hastalıkların tanı ve tedavisindeki gelişimlere rağmen, halen en önemli ölüm ve morbiditeyi oluşturmaktadır. Moleküler ve hücresel düzeyde daha bütüncül olarak mekanizmaların anlaşılması, erken tanı ve tedavileri geliştirme potansiyeline sahiptir. Kardiyovasküler sistemde rol alan mekanizmaların çeşitli yollar ile gerçekleşmesi, bunun yanında mikroRNA'ların kontrol edebildiği biyolojik süreçlerin spektrumu düşünüldüğünde, bu alanın önemini vurgulamaktadır. Buna ek olarak, hipoksi ve oksidatif stress gibi hücresel stress durumlarında transkripsiyon mekanizmasının azaldığı bilinmektedir^{96,97}. MikroRNA'ların transkripsiyon sonrası fonksiyon göstermesi ve bu gibi patofizyolojik durumlardaki rolü hücrelerin adaptasyonu veya stresten kurtulması için büyük önem taşımaktadır^{98,99}.

Kardiyovasküler sistemde rol alan mikroRNA'ların önemi, Drosha, DGCR8, Argonaute, Dicer gibi enzimlerin bu sisteme özgül olarak yıkılması sonucu meydana gelen gelişim ve fonksiyon kaybı ile incelenmiştir⁶⁶. Hayvan modellerinde ulaşılan sonuç, tek bir mikroRNA'nın yıkımı ile her zaman lethalite (öldürücülük) ortaya çıkmadığını göstermiştir. Bu çalışmalardan çıkan sonuç, mikroRNA'lar arasında fazlalık (redundancy) olduğu, yani aynı fonksiyonu sağlayan çok sayıda mikroRNA olduğu çıkarılmıştır^{21,91,100}. Bu bulgu, mikroRNA'ların tek başlarına genleri açma/kapamadan ziyade, ince ayar yapma görevinin olduğunu göstermiştir^{54,101}.

Memelilerde damar sistemi oluşumu, mezodermden türeyen anjioblast hücrelerinin labirent biçimli tüp ağ yapısına dönüşmesi ile olmaktadır¹⁰². Endotel hücrelere özgül Tie2 promotor-Cre sistemi ile delesyonu yapılan Dicer hücre hattı, VEGF'e cevap göstermemiştir¹. Gözlenen etkiler arasında, azalmış endotel hücre

büyümesi, nitrit oksit (NO) sentezinin bozulması, vasküler ağların azalması olmuştur^{10,103,104}.

Örnek olarak; miR-126 Egl7 geninin intron bölgesinden kodlanıp, Spred1'i hedefleyerek MAPK sinyal yolu aracılığıyla aort kökünün gelişimini düzenler^{105,106}. MiR-126 inhibisyonu vasküler organizasyon kaybına ve kanamaya yol açmaktadır. Bir başka çalışma, miR-92'nin iskemi veya miyokard enfarktüsünden sonra ifadesinin artmasıyla, damar düz kas hücreleri aracılığıyla damar oluşumunu azalttığını göstermiştir⁴¹.

MiR-10a/10b, HOX gen kümesi içerisinde yüksek derecede korunmuştur ve endotel hücrelerde ifadesi fazladır⁴². MiR-10, VEGF reseptörü olan FLT1 genini düzenleyerek anjiogenez sürecini düzenler¹⁰⁷. MiR-218 ise Slit-Robo sinyal yolu aracılığıyla, endotel hücre göçünü düzenleyerek retina damar pleksusunu kontrol edebilmektedir¹⁰⁸.

Damar hasarı, basınç yükü, hipoksi veya farmakolojik uyarılar gibi farklı etmenler sayesinde, kardiyovasküler sistemde gelişim sırasındaki genlerin tekrar olarak uyarılması veya susturulması gerçekleşmektedir¹⁰⁹. Erişkin hayatta ise bunun bir sonucu olarak, uyum sağlayamayan bir kalp veya damar dokusu ortaya çıkmaktadır. Kalp kasılmasının azalmasından, damar büyümesinin bozulması gibi farklı bozukluklar şeklinde kardiyovasküler hastalıklara yol açabilmektedir. Bunun bir örneği olarak; miR-208a'nin kalp kasında transgenik olarak fazla ifadesi hipertrofiye yol açmaktadır¹¹⁰. Bu durumun karşıtı olarak, miR-208a'nin delesyonu β -MHC ifadesini baskılayarak hipertrofidan korumaktadır¹¹⁰. Aynı zamanda, anti-oligo nükleotit aracılığıyla sistemik olarak miR-208a inhibisyonu benzer etki yaparak hipertrofidan koruyucu etki göstermektedir¹¹⁰.

MikroRNA'ların kardiyovasküler sistemdeki rollerinin anlaşılması, altta yatan mekanizmalardaki boşluğu bir adım daha yaklaştırmaktadır. Bununla beraber, pre-miRNA ve mikroRNA'ların sistemik dolaşımında eksozomlar ile tarafından taşınması erken tanı ve tedavi potansiyeli sunmaktadır^{111,112}. Miyokard infarktüsü sonucunda damar gelişiminin artması hasarı kısıtlamakla beraber, gelişen erken cevabın mekanizması bilinmemektedir. Bizim çalışmamız da bu konudaki bilinmeyenleri

araştırmak için tasarlanmıştır. Bu çalışmanın amacı, belirli bir mikroRNA kohortundan kardiyovasküler sistemde rol alan bir örneği bulmak ve fonksiyonunu incelemek için tasarlanmıştır.

2.2 Anjiogenez ve Endotel Hücre Etkileşimi

Anjiogenez (yeni damar oluşumu), pro- ve anti-anjiogenik faktörlerin vasküler endotel hücreleri üzerindeki dengesi ile kontrol edilir¹⁰. Yeni damar oluşumu için; bazal membrane yıkımı, hücre çoğalması, hücre göçü ve tüp oluşumu gereklidir^{10,113}. Endotel hücreler, bu sürecin kontrolünü sağlayan orkestra şefleri gibi rol almaktadır. Endotel hücrelerin bu kritik görevini yapamama durumuna endotel disfonksiyonu adı verilmektedir¹¹⁴. Bu sürecin bozulması, patolojik olan kardiyovasküler hastalıklara yol aabilmektedir¹¹⁴.

Tek bir hücre katmanı olan endotel hücreler, damar iç çeperini sararak kan akımı ile aralıksız temas eden yüzeyi oluştururlar. Bu katman, sadece pasif bir tabaka olmayıp, birçok önemli fonksiyon gerekleřtirebilmektedir¹¹⁵. Bunlar arasında, kan yolu ile ulaşan uyarılara ilk cevabı oluşturmak, koağülasyonu düzenlemek, besin alımını düzenlemek, anjiogenezi yönlendirmek gibi görevler bunlardan sadece belli bir kısmıdır^{6,7,63}.

Endotel hücreler, vasküler endotelyal büyüme faktörü(VEGF), fibroblast büyüme faktörü (bFGF) gibi uyarılara (pro-anjiogenik) karşı büyüme ve çoğalma cevabı vermektedir¹¹⁶. Bunun yanında, anjiogenezi inhibe eden D-glukoz gibi uyarılar karşısında bahsedilen fonksiyonları azalmakta, TNF α gibi inflamatuvar uyarılar varlığında lökosit geçirgenliğini artırarak adeta bir bekçi görevi görebilmektedir^{9,117}. Bu bulgular, endotel hücrelerin sadece pasif birer yapısal eleman değil, metabolik olarak da süreci yönlendiren etmenler olduğunu göstermektedir.

Kardiyovasküler hastalıklara risk olan diabetes mellitus varlığında, yüksek glukoz varlığı kalp ve kas hücrelerinde önemli bir metabolizma düzenleyicisi olan PGC-1 α (proliferator-activated receptor-gamma coactivator 1a) aktivitesini artırmaktadır¹¹⁸. Fakat aynı PGC-1 α artışı endotel hücreleri anjiogenik uyarılara cevap verme kapasitesini düşürürken, anjiogenezi azaltmaktadır¹¹⁸. Benzer şekilde

yüksek glukoz, ilk katman görevi gören bu hücre türünde reaktif oksijen hasarına (ROS) yol açabilmektedir^{119,120}.

VEGF, ilk defa damar geçirgenliğini arttıran bir faktör olarak keşfedilmiştir, yara iyileşmesi, ödem oluşması, geçirgenliğin artması gibi fonksiyonları bulunurken bunları endotel hücrelerin oluşturduğu sıvı geçirmez bariyeri yıktığı, bunun da endotel hücreleri aktive ederek olduğu anlaşılmıştır¹¹⁶. VEGF; hipoksik doku ve hücrelerden salınarak, yeterli oksijenizasyonu tekrar tesis etmek için endotel hücreleri uyarmaktadır^{121,122}. Memeli canlılarda, VEGF'in 5 farklı ligand formu tanımlanmıştır ve her biri farklı *splice* varyasyonları şeklinde ortaya çıkmıştır (VEGF A, B, C, D ve PLGF)^{123,124}. İnsanlardaki izoformaları ise şöyle adlandırılmaktadır; VEGFA121, VEGFA145, VEGFA165, VEGFA189 ve VEGFA206. Bu ligandlar yaklaşık 40 kDa dimerik glikoproteinler olup, VEGFR olarak adlandırılan 3 reseptör tipine bağlanmaktadır¹²⁵. VEGFR1 monosit ve makrofaj göçünden, VEGFR2 vasküler endotel hücre aktivitesinden, VEGFR3 ise lenfendotel hücrelerinde baskın olarak rol almaktadır, anjiogenez sürecinde ise, VEGFR2 en önemli reseptör türünü oluşturmaktadır¹²⁵. VEGFR2, membranı geçen bir protein olup, intrasellüler domaini olarak tirozin kinaz içermektedir, VEGF bağlanması ile dimerizasyona uğrayarak aktive olup, tirozin kinazları üzerindeki fosfor gruplarını transfer edebilmektedir¹²⁶.

Hipoksi, insanlarda VEGFA ligandını en güçlü olarak uyaran etmendir¹²⁷. Hipoksi ile beraber, HIF (hypoxia-inducible factors) olarak adlandırılan ve VEGFA'nın promoter bölgesine bağlanan transkripsiyon faktörleri hızlı bir ifade artışına gitmektedir¹²⁸. Benzer şekilde HIF, VEGFR2 ifadesini de artırmaktadır.

Aktif olan VEGF reseptörleri yanında, hücre içi tirozin kinaz fonksiyonu olmayan VEGF-bağlayıcı molekül olarak tanımlanan heparan sülfat proteoglikanlar ve nöropilinler de yer almaktadır^{129,130}. Fakat, bu reseptörlerin önemi araştırma aşamasındadır.

2.2.1 Anjiogenez ve ilgili sinyal yolları

VEGF endotel hücreleri için yaşamı devam ettiren temel bir moleküldür; sekiz ekzon ve yedi introndan oluşan gen, alternatif birleşme ile dört ana izoform şeklinde

aktiftir(VEGF₁₂₁, VEGF₁₆₅, VEGF₁₈₉, VEGF₂₀₆). VEGF₁₆₅ dominant formu olup, farklı VEGF ligand ve VEGF reseptörleri, alternatif birleşme ile farklı hetero- ve homodimerler oluştururlar¹³¹. Her ne kadar bu reseptörler birden fazla ligandı tanıyabilse de, bunlara karşı afinitesi farklı olmaktadır ve asıl olarak incelenen VEGFR2 ve sonrasında uyardığı sinyal yollarıdır¹²³. Tip 3 tirozin kinaz olan VEGFR2 reseptörü; hücre göçü, çoğalma, farklılaşma, hayatta kalma (survival), damar geçirgenliği ve genişlemesi görevlerini görmektedir^{87,116,125,132}. VEGFR2 fosforlaşması ana görev olarak yer almaktadır. VEGFR2 intrasellüler domainleri (tirozin 1054, 1059 gibi) dimerleştikten sonra, Akt ve mitojen aktive edilen kinazları uyarmaktadır^{121,133}. Kinazlar iki fonksiyonel domaine ayrılarak, KDR (kinase insert domain receptor) olarak adlandırılırlar. PLC-gamma ise tirozin 1175'e direk bağlanarak, MAPK-Erk1/2 ile hücre göçünü kontrol eder¹³⁴. VEGFR2 mutant formu oluşturulan fare modellerinde, tirozin 1173 veya tirozin 951 kısımlarında fosforilasyon defekti olanların damar gelişimi eksikliği olduğu gösterilmiştir¹³⁵.

Anjiogenezde rol alan diğer ana sinyal yollarında bir diğeri ise Notch'dur. 4 Notch reseptörü (Notch 1-4) ve 5 Notch ligandından (Jagged-1 and -2; Delta-1, -3, and -4) oluşan bu kompleks sistem asıl olarak daha büyük çapta damarlar olan arter (Notch-4) ve ven oluşumunda rol oynar; aktivasyon ile beraber, hücre içi domain transmembran reseptöründen ayrılarak, çekirdeğe transloke olmaktadır^{136,137}.

Ephrin ve reseptörleri (Ephs), embriyogenez sürecinde anjiogenezde rol alırlar, ilk olarak nöron gelişiminde tanımlanmışlardır¹³⁸. Bu sebeple, farklı dokular arasında kompartmantalizasyonu yönlendirebildikleri düşünülmektedir¹³⁹. Bahsedilen mekanizmalara ek olarak, semaforinler ve membran ilişkili glikoproteinler diğer bir sınıfı oluşturur; genel olarak 8 altgruptan oluşan ve omurgalı hayvanlarda yer alan bu proteinlerin, sadece 5 altgrubu omurgalılarda yer alır¹⁴⁰. Omurgalılarda yer alan immunoglobine benzer domainleri, salgılanarak nöropilinlerle etkileşerek hücre göçü ile alakalı olduğu düşünülmüştür. Araştırılan semaforinlerden, Sema3'ün en çok anjiogenez ile alakalı olduğu düşünülmüştür^{129,140}.

Hedgehog'lar 10 kilodaltondan oluşan ve hücre yüzeyinde heparin ile etkileşen proteinlerdir. İnsanlarda hedgehog'ların 3 homologu bulunup, sonic hedgehog (Shh) en yaygın bulunan türüdür^{121,141}. Shh'nin embriyonik çağda eksikliği lethaldir, Hedgehog'ların asıl olarak arteriogeneizde rol aldığı düşünülmektedir¹⁴².

Son olarak, *Drosophila*'da keşfedilen Sprouty (Spry), memelilerde 3 homolog geni keşfedilmiştir; memelilerdeki fonksiyonunun, trakea gelişimini bFGF homologu bir gen ile kontrol edebildiği ve MAPK yolu üzerinde etkisi olabileceği düşünülmektedir^{121,143}.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Mikrodizilim profil çalışması ve anlamlı bulunan mikroRNA paneli

Çalışmada akut koroner sendrom geçiren stabil olmayan (*unstable angina*) anjina grubunda hastalar ile kontrol grubundaki bireylerin plazma örnekleri iki farklı kohortta (n=4 ve n=4) ayrılarak diferansiyel ifade analizi ile incelenmiştir. İki farklı kohortta incelenerek, her iki analizde bulunan benzer değişimlerin gerçek bulgu olarak doğrulanması amaçlanmıştır. Bu kohortlar, ABD'deki Brigham & Women's Hastanesi'ne başvuran göğüs ağrısı olan hastalardan anjiyografi yapılması ve gerekli bilgilendirilmiş onam alınması sonrası belirlenmiştir. Operatör kardiyolog gerekli etik izinleri yazılı olarak elde etmiştir. Bizim çalışmamız için hastalarla direkt bir sağlanmamış olup, örnekler üzerindeki tüm kişisel bilgiler kimliksizleştirilmiştir ve bu sebeple ek bir etik kurul izin gerekmemektedir. Buna rağmen, sonraki referanslar için etik kurul sayısı belirtildiği gibidir "BWH IRB # is 2007P002181/BWH". Örnekler, EDTA içeren tüplerde -80'de muhafaza edilmiştir. Oda sıcaklığında 1500g'de 15 dakika boyunca santrifüj edilerek plazma elde edilmiştir. Mikrodizilim çalışmaları için Toray şirketinden Sanger MirBase 21 veritabanı baz alınarak problemler dizayn edilmiştir (*custom-made*). Herhangi bir kohortta ifadesi tespit edilen 50 mikroRNA'dan benzer yönde regüle olan, yani ifadesi benzer şekilde artan veya azalan mikroRNA'lar, RT-qPCR ile ifade değişimi doğrulanmıştır. Belirlenen panel, HUVEC hücrelerinde TNF α , VEGF, bFGF, D-glukoz uyarıcıları ile test edilmiştir. Diğer mikroRNA'lar sonraki aşamalarda incelenmemek üzere filtre edilmiştir.

3.2. Gereçler

3.2.1. Hücre kültürü çalışmaları

- İnsan umbilikal ven endotel hücreleri (HUVEC, cc-2519; Lonza, Walkersville, MD)
- Büyüme ortamı ve faktörleri (EGM $\text{\textcircled{C}}$ -2, EGM-2 BulletKit; cc-3156 & CC-4176, Lonza, Walkersville, MD)
- DPBS (ThermoFisher Scientific 14190250)
- Tripsin (cc-5012, Lonza)

- 12 kuyucuklu hücre petri kap (Corning Inc. 353043)
- 50 mililitre falkon tüp (Corning Inc. 14-432-22)
- miRNeasy Mini Kit (Qiagen 217004)
- RNAaz arındırılmış su (Qiagen 129112)
- 200 derece etanol (Fisher Scientific BP2818500)
- Nanodrop™ 2000 (ThermoFisher)
- Matrigel extracellular matrix (Corning Inc. 354234)
- ChemTX çok kuyucuklu sistem (Neuro probe Inc, MD)
- VEGF-A (25 ng/μl) (R&D, 293-VE-010)
- bFGF (10 ng/μl) (R&D, 233-FB-025)
- TNFα (R&D, 210-TA/CF)
- D-glukoz ve D-mannitol (her ikisi de 30 μM) (Sigma, 50-99-7 ve 69-65-8)
- Lipofectamine™ 2000 transfeksiyon reaktanı (Invitrogen, P/N 52887)
- miR-615-5p mimik (30 nμ) (Ambion, Inc, MC12460)
- miR-615-5p inhibitörleri (100 nμ) (Ambion, Inc, MH12460)
- CyTM3 işaretli özgül olmayan oligonükleotid mimik (Ambion, Inc, AM17120)
- CyTM3 işaretli özgül olmayan oligonükleotid inhibitör (Ambion, Inc, AM17011)
- Hemositometre (INCYTO C-chip, DHC-N01-5)
- Optimem indirgenmiş serum ortam (ThermoFisher, 31985070)

3.2.2. qPCR analizi

- hsa-5s primer (Qiagen, MS00007574)
- hsa-miR-615-5p primer (Qiagen, MS00010332)
- miScript RT enzyme (Qiagen, 218161)
- SYBR green (Qiagen, 218073)
- hsa-miR-4675 primer (Qiagen, MS00040222)
- hsa-miR-4649-5p primer (Qiagen, MS00040495)
- hsa-miR-6768-5p primer (Qiagen, MS00046718)

- hsa-miR-6800-5p primer (Qiagen, MS00047082)
- AriaMx Real-time PCR sistemi (Agilent Technologies)

3.2.3. İmmunoblot analizi

- t-Akt antikor, fare (Cell Signaling, 2920S), 1/2000
- p-Akt antikor, Ser473, tavşan (Cell Signaling, 4060L), 1/1000
- t-p38, tavşan (Cell Signaling, 9212S), 1/3000
- p-p38, Thr180/Tyr182, tavşan (Cell Signaling, 4511L), 1/2000
- eNOS, tavşan (Cell Signaling, 9572S), 1/1000
- p-eNOS, Ser1177, tavşan (Cell Signaling, 9570L), 1/500-1/750
- p44/42 MAPK (Erk1/2) , tavşan: 9102S, 1/5000
- Phospho-p44/42 MAPK (Erk1/2) (Thr202/Tyr204), tavşan, (Cell Signaling, 4370S), 1/2000
- Beta aktin, tavşan: 1/2500
- Anti-tavşan IgG, HRP-bağlı antikor (Cell Signaling, 7074S), 1/5000
- Anti-fare sekonder antikor (Cell Signaling, SC-2005), 1/3000
- 4–20% Mini-PROTEAN® TGX™ Precast Protein Jel (katalog 456-1084)
- Pierce™ ECL Western Blot solüsyonu (ThermoFisher, RPN2236)
- Western filmleri (LabScientific, EBA45)
- ECL Solüsyonu (Amersham ECL Prime Western Blotting Detection Reagent, RPN2236)
- Halt™ Proteaz ve Fosfataz inhibitör Kokteyli (ThermoFisher, 1861281)
- RIPA buffer solüsyonu (50 mM Tris-HCL pH 7.4, 150 mM NaCl, 1%NP-40, 0.5% sodium deoxycholate, 0.1% SDS)
- Pierce™ BCA Protein Assay Kiti (Thermo Scientific, 23225)
- ImageJ dansitometre yazılımı (NIH)

3.2.4. Mikrodizilim analizi

- Toray, Sanger MirBase 21 veritabanı, *custom-made*
- Protokol no: BWH IRB # is 2007P002181/BWH

3.3. Yöntemler

3.3.1. Hücre kültürü çalışmaları

1. İnsan umbilikal ven endotel hücreleri (HUVEC) için iki ile beşinci pasaj arasındaki hücreler kullanılmıştır ve kontaminasyonu önlemek için hava bariyerli istasyonda çalışılmıştır. Hücre ihtiyacına göre T75 veya T150 kullanılmıştır.

2. Hücreler yüzde 80 yoğunluğa geldikten sonra, DPBS ile bir kez yıkanarak ardından 5 ml tripsin-EDTA eklenerek bir film şeklinde tüm yüzeye temas etmesi sağlanmıştır. Tripsinizasyon sırasında, hücre stresini azaltmak için mikroskop altında hücre kültür kapları sıklıkla kontrol edilmiştir. HUVEC'lerin büyük bir çoğunluğu yüzeyden ayrılıp yüzmeye başladığında veya iğsi uzantıları hücreye doğru gerilemeye başladığında 15 ml EGM-2 ortam eklenerek nötralizasyon sağlanmıştır.

3. Elektronik pipet ile birkaç kez hücre kültür kap tabanı yıkanarak, solüsyon 50 ml falkon tüplere aktarılmıştır. Ağırlık dengesi sağlandıktan sonra, 4 °C 280 G hızında 5 dakika boyunca santrifüj edilmiştir. Supernatan solüsyon tahliye edildikten sonra, hücre pelletine 40 ml taze ortam eklenerek pellet tamamen görünmez olana kadar pipetlenme gerçekleştirilmiştir.

4. 10 µl örnek hücre sayımı için hemositometre üzerine yüklenerek 4 alan sayılarak ortalaması alınmıştır. Sitokinler ile stimülasyon, transfeksiyon, matrigel, immüno blot çalışmaları için her bir petri kap kuyucuğuna aynı konsantrasyon olan 50.000 hücre ekilmiştir. Hücreler bir gece petri kapta bekletilerek, yeniden tabana yapışması ve adapte olması sağlanmıştır. Sitokinler için ekimden sonraki gün stimülasyonlara başlanırken, immüno blot çalışmaları için transfeksiyondan iki gün sonra çalışmalara devam edilmiştir. Matrigel ve hücre göçü çalışmaları için üçüncü güne kadar beklenmiştir.

3.3.2. Kantitatif PCR (RT-qPCR) analizi

1. HUVEC'ler en az üç bağımsız örnek elde edilmesi amacı ile yeterli sayıda petri kaplarında ekilerek bir gece yeni koşullara adapte olması beklenmiştir. TNFα 10 ng/ml, VEGF-A 25 ng/ml, bFGF 10 ng/ml'da kullanılırken aynı volümdeki DBPS eş zamanlı kontrol olarak kullanılmıştır. D-glukoz ve etkisi yanında osmolar yük taşıdığı

için kontrolü olan D-mannitol ile beraber 30 mM'de kullanılmıştır. Zaman aralığı olarak uyarılara belirtilen noktalar seçilmiştir; TNF α için 1,3,6 ve 24 saat; VEGF-A ve bFGF için 1,4, 12 ve 24 saat; D-glukoz için 24, 48 ve 72 saat seçilmiştir.

2. Belirtilen zaman sürelerin sonunda miRNeasy Mini Kiti ile üreticinin talimatlarına göre RNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Nanodrop ile 260/280 değeri 2 ve civarı olan değerler ile kontaminasyon ve degradasyon olmadığı doğrulandıktan sonra 20-30 mikrolitre Ribonükleaz'dan arındırılmış su eklenerek -80 °C dondurucu da muhafaza edilmiştir.

3. RT basamağı için 1 mikrogram RNA miScript RT enzim kiti kullanılarak üreticinin talimatları takip edilerek cDNA elde edildikten sonra 1:5 oranında sulandırılmıştır. Belirtilen cDNA ile elden dilüsyon çeşitli primer setleri ile denenerek 25-35 Ct aralığında sonuç verdiği doğrulandıktan sonra kullanılmıştır.

HiFlex buffer: 4 μ l

Konsantre edilmiş nükleotitler: 2 μ l

RNA: 1 mikrogram olacak şekilde hacmi ayarlanmıştır

Ribonükleaz arındırılmış su: RNA'den gelen hacim ile toplamı 12 μ l olacak şekilde ayarlanmıştır.

miScrip ters transkriptaz enzimi: 2 μ l

Toplam hacim: 20 μ l

Ters transkriptaz basamağı döngü ayarları:

İnkübasyon: 37 °C 60 dakika boyunca

İnaktivasyon: 95 °C 5 dakika boyunca

4. qPCR basamağı için SYBR green boyası ile mikroRNA'lara özgül forward primerler ve RT basamağında sentezlenen polyA 3' uçlarını tanıyan adaptor 'universal primer' kullanılmıştır. Aşağıda belirtilen miktardaki solüsyon vortekslendikten sonra, takibindeki qPCR döngüsü kullanılarak Ct değerleri elde edilmiştir. Döngü sonrası erime eğrisi kontrol edilerek özgül olmayan sentez olmadığı her reaksiyondan sonra doğrulanmıştır.

cDNA: 1.5 mikrolitre

Özgül primer: 2.5 mikrolitre

Universal primer: 2.5 mikrolitre

SYBR green karışımı (nükleotit ve diğer reaktanları içermektedir): 7.5 mikrolitre

Ribonükleaz ve Deoksiribonükleaz arındırılmış su: 11 mikrolitre

Pipetaj hatasını önlemek için yukarda toplamı 25 mikrolitre olan karışımdan 22 mikrolitre alınarak her kuyucuğa yüklenmiştir.

qPCR döngü ayarları:

PCR aktivasyon basamağı (hotstart olarak da biliniyor): 95 °C 15 dakika boyunca Toplam 40 döngü olacak şekilde;

Denatürasyon: 94 °C 15 saniye boyunca

Birleşme basamağı: 60 °C 30 saniye boyunca

Sentezleme basamağı: 70 °C 30 saniye boyunca

Özgüllüğü doğrulamak için ayrışma eğrisi: 60 °C'de bir dakika boyunca ve 95 °C'den kademeli şekilde her 20 saniyede bir 0.5 °C azaltılmıştır.

5. Referans gen olarak 5S kullanılmıştır ve analizlerde $\Delta\Delta C_t$ methodu uygulanmıştır. 3 biyolojik örneğin ortalaması alınarak, istatistiksel anlamlılık için 'Student t-test' uygulanarak 2 yönlü analizde p değeri 0.05'nin altında olanlar anlamlı kabul edilmiştir.

3.3.3. Transfeksiyon çalışmaları

1. 5 nanomol halindeki mimik ve inhibitörler 100 mikrolitre Ribonükleaz'dan arındırılmış su ile çözülerek buz üzerinde degrede olması önlenerek hazırlanmıştır. Benzer şekilde, kontrol amacıyla kullanılan özgül olmayan mimik veya inhibitör kontrol dizileri de aynı şekilde hazırlanmıştır. Transfeksiyon yöntemi olarak lipofeksiyon kullanılmıştır. Hedef konsantrasyonlar için maksimum etki ve minimal toksisite göz önüne alınarak mimikler için 30 nanomol, inhibitörler için 100 nanomol kullanılmıştır.

2. 12 kuyucuklu petri kaplarda, her bir kuyucuğa 50.000 HUVEC ekildikten sonra bir gece beklenerek hücrelerin adapte olması ve yeniden büyüme fazına geçmesi sağlanmıştır. Mikroskop altında HUVEC'lerin normal morfoloji gösterdiği doğrulandıktan sonra ekim sırasında kullanılan besin ortamı atılarak, 800 mikrolitre taze ortam eklenmiştir. Bunla eş zamanlı olarak, 5 mililitrelik polisitren tüplerde aşağıda belirtilen miktarlarda transfeksiyon solüsyonu hazırlanmıştır.

Mimikler için;

- 1491 mikrolitre Optimem indirgenmiş ortam ve 9 mikrolitre oligonükleotid konsantrasyonu (tüp A)

- 1470 mikrolitre Optimem indirgenmiş ortam ve 30 mikrolitre Lipofektamin (tüp B)

İnhibitörler için;

- 1470 mikrolitre Optimem indirgenmiş ortam ve 30 mikrolitre oligonükleotid konsantrasyonu (tüp A)

- 1470 mikrolitre Optimem indirgenmiş ortam ve 30 mikrolitre Lipofektamin (tüp B)

hazırlandıktan sonra 250 G'de vortex edilerek lipid parçacıklarının lipozom oluşturması için beş dakika inkübe edilmiştir. Bu sürenin sonunda tüp B, tüp A'ya eklenmiştir ve yirmi dakika boyunca mikroRNA oligonükleotitlerinin lipozomların içerisine penetrasyonunu sağlanmıştır. Elde edilen transfeksiyon solüsyonu, Basamak 2'de hazırlanan kuyucuklara 200 mikrolitre eklenmiştir. Eklenme aşamasında spiral şeklinde damla damla pipetaj yapılarak homojen dağılım amaçlanmıştır.

3. Transfeksiyon etkinliğini göstermek için mimik grubu ve kontrolü ile yapılan qPCR analiz sonucu yüksek oranda fazla ifade olduğu doğrulanmıştır. İmmüno blot çalışmaları için transfeksiyon sonrası ikinci günde VEGF-A stimülasyonları yapılırken, matrigel çalışmaları için beşinci güne kadar beklenmiştir.

3.3.4. Fonksiyonel çalışmalar

Matrigel damar oluşumu çalışmaları

1. Matrigel bazal membranı normalde muhafaza edildiği $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ dondurucudan $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$ dolaba transfer edilerek pasif şekilde çözülmesi sağlanmıştır. 96 kuyucuklu petri kaplara 100 mikrolitre eklenerek sıvı formda iken balon oluşmamasına dikkat edilmiştir. Oluşan balonlar ise görüntüleme sırasında kaliteyi bozabileceğinden steril iğne uçları aracılığıyla sıvı formdayken ortadan kaldırılmıştır. Petri kaplar $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ inkübatörde 10 dakika bekletilerek katılaşması sağlanmıştır.

2. Basamak 3.3.3'de belirtildiği şekilde hazırlanan HUVEC'ler, üçüncü günün sonunda her bir kuyucuğa 10.000 sayıda eklenmiştir. 3, 4.5 ve 6. saatlerde örneklerin damar ağı oluşması sayılmıştır. 6. saatten sonra damar ağının dejenere olduğu gözlemlendiği ve 4.5 saat en aktif aralık olduğu belirlendiği için analiz noktası olarak belirlenmiştir.

3. Beş farklı biyolojik örnek olarak hazırlanan örnekler 4.5 saat sonunda 4x ve 10x zoom yakınlıkta fotoğraflanarak her bir kapalı alan bir damar ağı oluşumu şeklinde sayılmıştır. Mimik ve inhibitör gruplarının kendi kontrolü ile karşılaştırılması yapılmıştır. Sonuçlar istatistiksel anlamlılık için 'student t-test' uygulanarak 2 yönlü analizde p değeri 0.05'nin altında olanlar anlamlı kabul edilmiştir.

Hücre göçü (kemotaksis) çalışmaları

1. Basamak 3.3.3 tanımlandığı üzere 10.000 sayıda HUVEC, transfeksiyondan sonra üç gün bekletilerek mikroRNA'nın hedef gendeki etkisinin gerçekleşmesi beklenmiştir. 5 mm por boyutlu ChemTX sisteminin üst kuyucuklarına hücreler transfer edilmiştir. Alt kompartmanlar ise kemogradient oluşturmak için 25 ng/ml VEGF-A konsantrasyonundaki EBM-2 ortam ile doldurulmuştur. 16 saat sonra, alt kompartmana göç eden hücreler hemositometre ile sayılmıştır. Üç teknik numune ile tekrarlanan deney, istatistiksel anlamlılık için 'student t-test' uygulanarak 2 yönlü analizde p değeri 0.05'nin altında olanlar anlamlı kabul edilmiştir.

3.3.5. İmmunoblot çalışmaları

1. MiR-615-5p mimik veya miR-615-5p inhibitörleri ile beraber özgül olmayan nükleotid (negatif kontrol) ile transfekte edilen HUVEC'ler 30 saat inkübe edilmiştir. Stimülasyon çalışmaları için büyümeyi besleyen ve birbiri ile yakın etkileşimdeki sinyal yollarını susturabilmek için 16 saat boyunca büyüme faktörsüz (FBS, VEGF-A ve bFGF çıkarılmış) ortamda bekletilmiştir. Bu süre sonunda, 25 ng/ml VEGF-A ile uyarılmak suretiyle 0,15,30 ve 60. dakikalarda proteinler proteaz ve fosfataz inhibitörlerinin eklendiği RIPA (50 mM Tris-HCL pH 7,4, 150 mM NaCl, 1%NP-40, 0,5% sodium deoksikolat, 0,1% SDS) solüsyonu ile elde edilmiştir. Fosfataz inhibitörleri, dinamik fosforilasyon sürecini durdurması açısından kritik önem taşımaktadır.

2. Protein izolasyonu için, 3000 G'de 15 dakika 4 °C'de santrifüje edildikten sonra süpernatant yeni bir ependorf tüpüne aktararak hücre yıkıntılarında arındırılmıştır. Protein kantifikasyonu BCA kiti ile yapılarak önceden albümin seri dilüsyonları ile oluşturulan standart eğriye göre ölçülmüştür.

3. Protein konsantrasyonu ölçülen örnekler, indirgeyici SDS-tampon ile üreticinin talimatlarına göre karıştırılmıştır. Kullanılmayan örnekler -80 °C'de saklanmıştır.

4. Mini-PROTEAN® TGX™ gradient jel hazırlanarak her bir kuyucuğa 30 mikrogram protein ekstraktı yüklenmiştir. İlk aşamada 80 voltta 20 dakikada yürütülen jel, etkili ayrıştırma için 120 voltta incelenecek protein bandının işaretleyici boyası dikkate alınarak ortalama 50 dakika yürütülmüştür. Sonraki aşamada, kuru transfer sistemi ile PVDF membranına 10 dakika transfer edilen örnekler, oda sıcaklığında bir saat boyunca %5 sütte bloklanmak için çalkalanmıştır. Blotting aşaması için gece boyunca 4°C'de %5 sütte gece boyu belirtilen antikolar ile çalkalanmaya bırakılmıştır.

5. Primer antikor ile gece boyu inkübasyondan sonra TBST ile 10 dakika aralıklarla üç kez yıkanan membrane, yukarıda belirtilen sekonder antikolar ile oda sıcaklığında bir saat boyunca %5 süt içerisinde inkübe edilmiştir. Bu süre sonunda,

20 dakika aralıklarla üç kez yıkanan membran kemoluminasan aşamasına hazır haldedir.

6. Streç film üzerine alınan membranlar hafifçe kurularak, ECL solüsyonunun bire bir karışımı ile oluşan bileşimle 5-10 dakika arasında inkübe edilmiştir. Kemolüminans basamağı, karanlık odada 10 saniye, 30 saniye, 1 dakika, 5 dakika gibi farklı süreler denenerek optimal banttaki görüntülerin alınması ile sonuçlanmıştır.

7. Fosfo protein ifadesi elde edilen protein örnekten, en objektif sonuçları almak amacıyla aynı membrandan antikor ayrıştırıcı tampon (stripping buffer) 1:5 oranında seyreltilerek on dakika inkübe edilmiştir. Aynı proteinin, total formu ile benzer şekilde bir gece inkübe edilerek yukardaki basamak 5 ve 6 tekrarlanmıştır. Örneğin; fosfo-Akt ifadesi elde edildikten sonra aynı membran ayrıştırıcı tamponla fosfo-Akt antikorları yıkanarak total-Akt ile inkübe edilmiştir. Bu şekilde ifadesi hassas ve dinamik şekilde değişebilen sinyal yolları için en tarafsız analiz amaçlamıştır.

8. En son basamakta, toplam yükleme oranını elde etmek için beta aktin kullanılarak basamak 5 ve 6 tekrarlanmıştır.

9. Filmler tarayıcı da 300 piksel çözünürlükte taranarak, ImageJ yazılımının dansitometre özelliği ile analiz edilmiştir. Deneyler en az 3 bağımsız örnekle tekrarlanmıştır.

3.3.6. İstatistik çalışmaları

Her deney en az üç bağımsız biyolojik örnek ile tekrarlanarak, grafikler ortalama ve ortalamanın standart hatası ($\text{mean} \pm \text{SEM}$) olarak grafiklerde belirtilmiştir. İstatistiksel anlamlılık için 'Student t-test' uygulanarak 2 yönlü analizde p değeri 0,05'nin altında olanlar anlamlı kabul edilmiştir.

4. BULGULAR

4.1. MikroRNA panelinin iki farklı kohortta incelenmesi

Rastlantısal bulguları azaltmak için, mikrodizilim iki farklı kohortta yapılarak, örtüşen bulguların analiz edilmesi tasarlanmıştır. Şekil 4.1’de gösterilen anlamlı kabul edilen 50 aday mikroRNA arasında, her iki grupta da en az 2 kat ifade artışı gösteren miR-615-5p, miR-4649-5p, miR-4675 olarak belirlenmiştir. Ayrıca, ifadesi azalan miR-6768-5p ve miR-6800-5p’de hedeflediği yolağın ifadesini artırabileceği düşünülerek sonraki aşamadaki panele dahil edilmiştir. MiR-6780b-5p uygun aralıkta ifade göstermesine rağmen, analiz zamanında uygun ticari primerinin olmaması ve bunun yaratacağı teknik zorluk sebebi ile değerlendirmeye katılamamıştır. İfade düzeyleri ile ilgili detaylar Tablo 4.1’de gösterilmiştir. İncelenmek üzere ele alınan 5 mikroRNA’nın mikrodizilimdeki ifade değişimleri RT-qPCR ile doğrulanmıştır (gösterilmeyen veri).

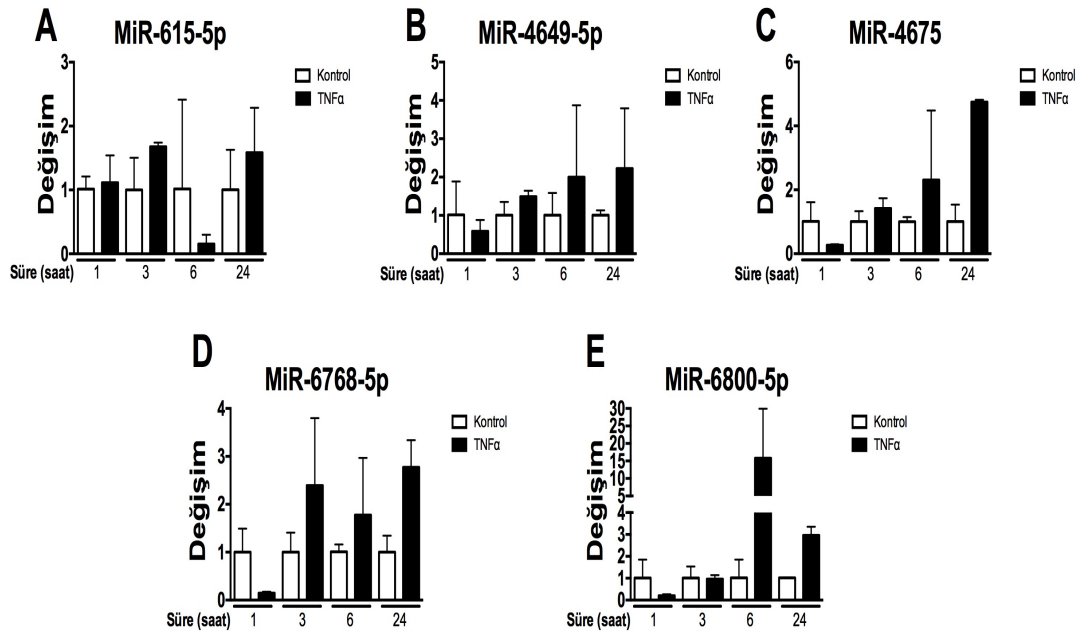
MikroRNA	Kohort 1	Kohort 2	MikroRNA	Kohort 1	Kohort 2
hsa-miR-4675	2,11	2,048	hsa-miR-4508		1,201
hsa-miR-4649-5p	2,38	1,964	hsa-miR-6515-3p		1,394
hsa-miR-615-5p	2,32	2,151	hsa-miR-6738-5p		1,941
hsa-miR-6768-5p		0,7	hsa-miR-3679-3p		1,327
hsa-miR-6800-5p		0,57	hsa-miR-6789-5p		1,241
hsa-miR-4532	1,87	1,568	hsa-miR-663b		1,542
hsa-miR-3195	1,85	1,175	hsa-miR-4731-5p		1,697
hsa-miR-6885-5p		1,616	hsa-miR-92b-5p		1,234
hsa-miR-486-3p		1,382	hsa-miR-3944-3p	2,08	
hsa-miR-4516		1,243	hsa-miR-514b-5p	2,01	
hsa-miR-4488		1,164	hsa-miR-4632-3p	1,84	
hsa-miR-3665		1,436	hsa-miR-371b-3p	1,78	
hsa-miR-1913		0,952	hsa-miR-4667-5p	1,7	
hsa-miR-128-2-5p		1,57	hsa-miR-940	1,48	
hsa-miR-6869-5p		1,392	hsa-miR-4442	3,18	
hsa-miR-6727-5p		1,548	hsa-miR-1185-1-3p	2,19	
hsa-miR-8069		1,249	hsa-miR-4751	1,84	
hsa-miR-6845-5p		1,17	hsa-miR-4785	1,74	
hsa-miR-6805-5p		1,169	hsa-miR-658	1,7	
hsa-miR-4446-3p		1,872	hsa-miR-1203	1,68	
hsa-miR-3178		1,54	hsa-miR-548q	1,68	
hsa-miR-1273g-3p		1,249	hsa-miR-3917	1,68	
hsa-miR-4734		1,236	hsa-miR-6780b-5p		0,59
hsa-miR-665		1,177	hsa-miR-1268b	0,83	
hsa-miR-1915-3p		1,434	hsa-miR-149-3p	0,84	

* Gri renkle belirtilen mikroRNA'lar anlamlı bulunmuştur.

Şekil 4.1. Anlamlı bulunan mikroRNA'lar* sonraki aşamalarda incelenmiştir.

4.2. MikroRNA panelinin HUVEC'lerde çeşitli uyarılara gösterdiği ifade

Aday mikroRNA'lar miRNA-615-5p, miRNA- 4675, miRNA-4649-5p, miRNA-6768-5p, miRNA-6800-5p'da çeşitli uyarılar ile uyarım sonucu ifade değişiklikleri HUVEC hücrelerinde analiz edilmiştir. Sonuçlar aşağıda gösterildiği gibidir.

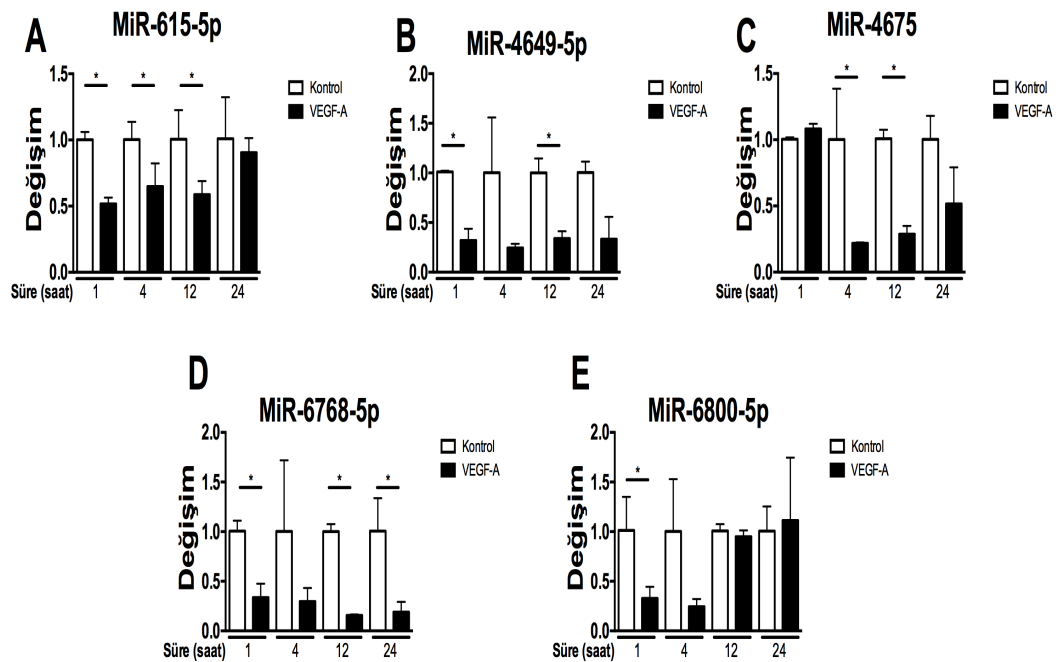


Şekil 4.2. MikroRNA'ların TNF α ile uyarılması sonucu ifade değişim sonuçları.

Bu sonuçlar ışığında, TNF α ile uyarım sonucu Şekil 4.2'de belirtildiği üzere;

- A: MiR-615-5p, 6. saatte baskılanırken, 1,3 ve 24. saatlerde ifadesi artmıştır. Sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır.
- B: MiR-4649-5p, 1. saatte baskılanırken, 3,6 ve 24. saatlerde ifadesi artış eğilimi göstermiştir. Sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır.
- C: MiR-4675, 1. saatte baskılanırken, özellikle 6 ve 24. saatlerde ifadesi artış eğilimi göstermiştir. Sadece 1 ve 24. saatler istatistiksel anlamlı bulunmuştur.
- D: MiR-6768-5p, 1. Saatte baskılanırken, 3,6 ve 24 saatlerde ifadesi artmıştır. Sadece 1 ve 24. saatler istatistiksel anlamlı bulunmuştur.
- E: MiR-6800-5p, 1. saatte baskılanırken, 3. saatte ifadesi değişmemiştir. 6 ve 24 saatlerde ifadesi artış göstermiştir. 1, 6 ve 24. saatler istatistiksel anlamlı bulunmuştur.

Bu sonuçlar göz önüne alındığında, TNF α belirtilen beş mikroRNA'nın ifadesini istikrarlı biçimde değiştirmemektedir. Sonraki basamaklarda ortaya çıkabilecek tutarlı sonuçlar için, sitokin ile uyarımın belirli bir yönde olması aranan bir özelliktir. Ortaya çıkan ifade şeklinin, TNF α direk etkisinden ziyade değişen ikincil süreçlere bağlı olduğu düşünülmüştür.

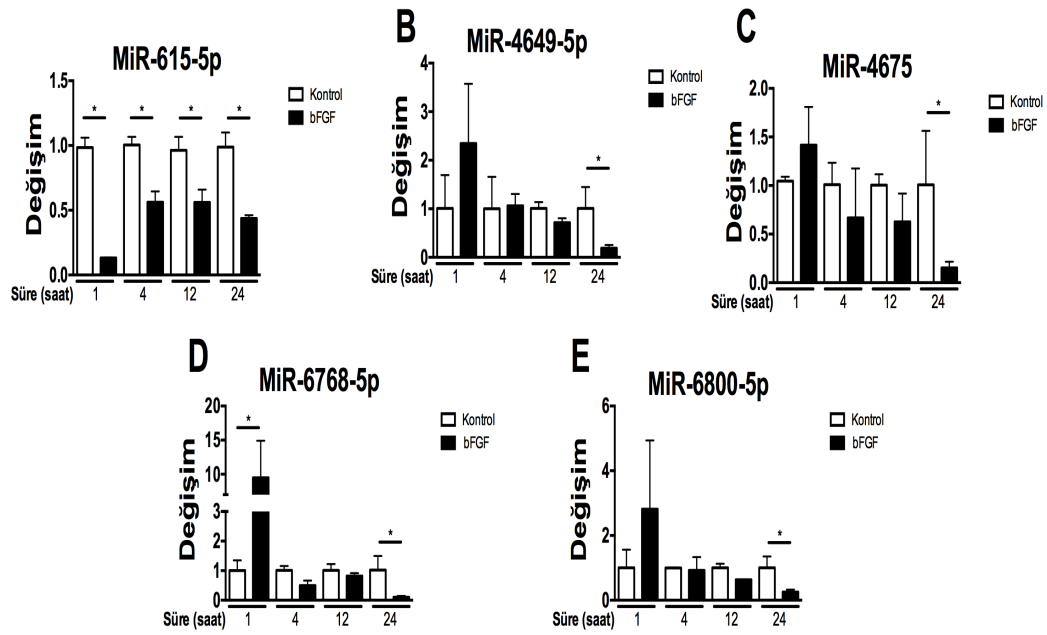


Şekil 4.3. MikroRNA'ların VEGF-A ile uyarılması sonucu ifade değişim sonuçları.

Bu sonuçlar ışığında, VEGF-A ile uyarım sonucu Şekil 4.3'de belirtildiği üzere;

- A: MiR-615-5p; 1, 4 ve 12. saatlerde baskılanırken, 24. saatte ifadesi bazal seviyeye dönmüştür. Sonuçlar, 1,4,12. saatlerde istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur.
- B: MiR-4649-5p, tüm zaman aralıklarında baskılanırken, 1 ve 12. saatlerde istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur.
- C: MiR-4675, 1. saatte ifadesi artış eğilimi gösterirken, 4,12 ve 24. saatte baskılanmıştır. Sadece 4 ve 12. saatler istatistiksel anlamlı bulunmuştur.
- D: MiR-6768-5p, 1,4,12 ve 24 saatlerde baskılanma eğilimi göstermiştir. 1, 12 ve 24. saatler istatistiksel anlamlı bulunmuştur.
- E: MiR-6800-5p, 1 ve 4. saatte baskılanırken, 12. saatte ifadesi değişmemiştir. 24. saatte ifadesi artış göstermiştir. 1 ve 4. saatler istatistiksel anlamlı bulunmuştur.

Bu sonuçlar göz önüne alındığında, VEGF-A belirtilen beş mikroRNA'dan en istikrarlı biçimde miR-615-5p'nin ifadesini değiştirmiştir. MiR-4649-5p ve miR-6768-5p için baskılanma eğilimi ortaya çıkmasına rağmen, ara zamanlarda istatistiksel anlamlı sonuç elde edilememiştir.

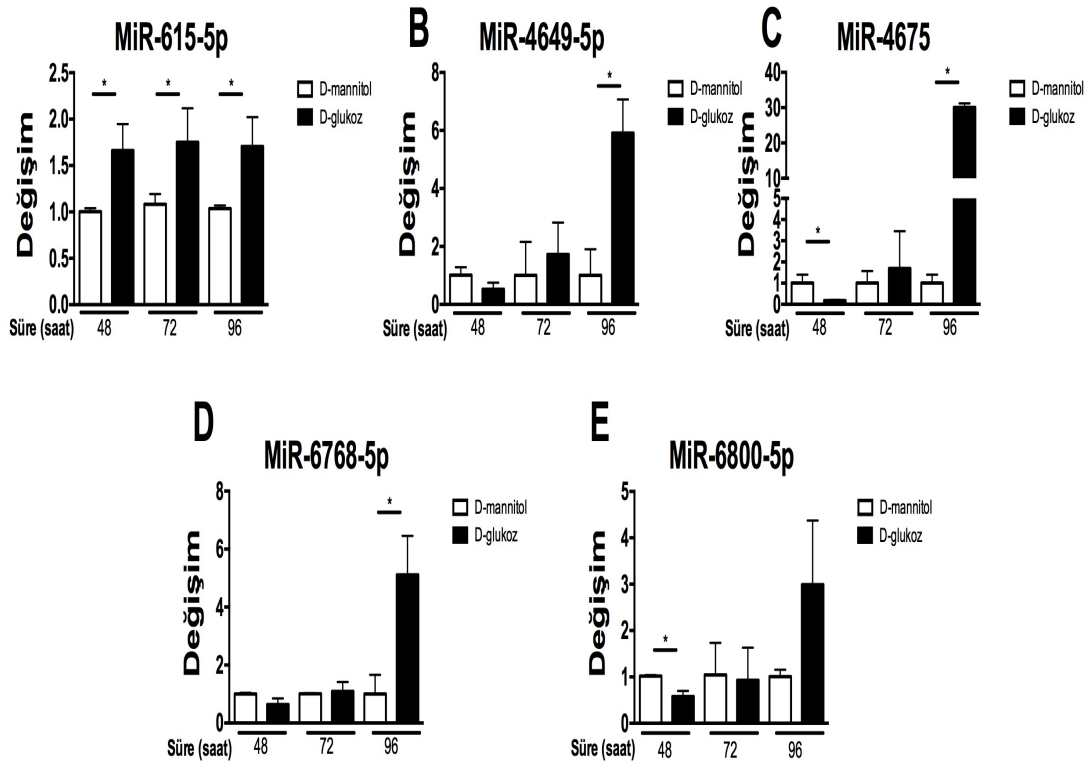


Şekil 4.4. MikroRNA'ların bFGF ile uyarılması sonucu ifade değişim sonuçları.

Bu sonuçlar ışığında, bFGF ile uyarım sonucu Şekil 4.4'te belirtildiği üzere;

- A: MiR-615-5p; 1, 4, 12 ve 24. saatlerde baskılanmıştır. Sonuçlar, tüm zaman noktalarında istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur.
- B: MiR-4649-5p, 1. saatte artma eğilimi gösterirken, sonraki zaman aralıklarında dereceli olarak azalmıştır. Sadece 24. saat anlamlı bulunmuştur.
- C: MiR-4675, 1. saatte ifadesi artış eğilimi gösterirken, 4,12 ve 24. saatte baskılanmıştır. Sadece 24. saat istatistiksel anlamlı bulunmuştur.
- D: MiR-6768-5p, 1. saatte 10 kata kadar artış gösterirken, 4. saatte baskılanmış, 12. saatte sabit kalmış ve 24. saatte tekrar baskılanma eğilimi göstermiştir. Sadece 24. saat istatistiksel anlamlı bulunmuştur.
- E: MiR-6800-5p, 1. saatte artma eğilimi gösterirken, 4 ve 12. saatte ifadesi değişmemiştir. 24. saatte ifadesi azalmıştır. Sadece son zaman noktası istatistiksel anlamlı bulunmuştur.

Bu sonuçlar göz önüne alındığında, bFGF belirtilen beş mikroRNA'dan en istikrarlı biçimde miR-615-5p'nin ifadesini değiştirmiştir. MiR-4675 için baskılanma eğilimi ortaya çıkmasına rağmen, ara zamanlarda istatistiksel anlamlı sonuç elde edilememiştir.



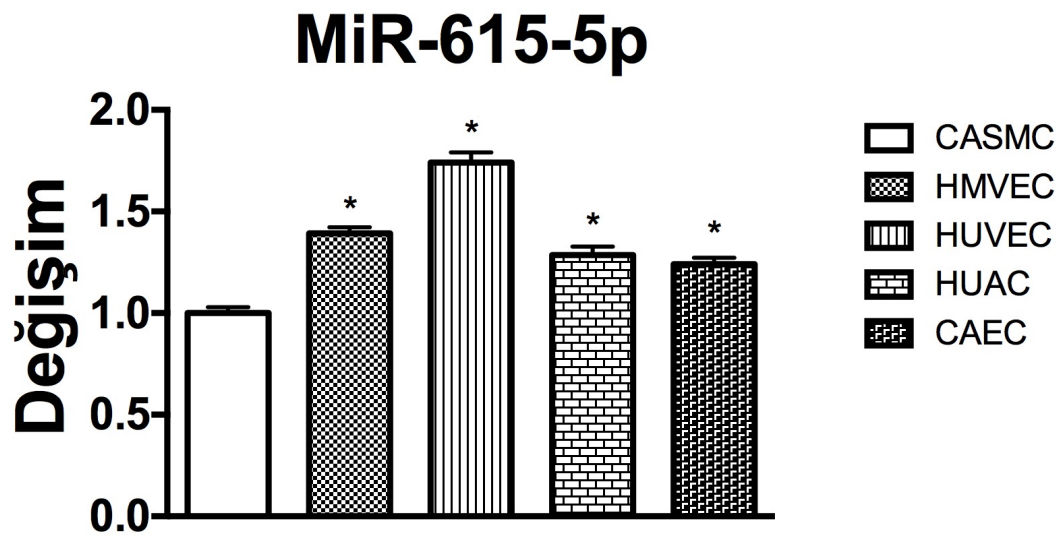
Şekil 4.5. MikroRNA'ların D-glukoz ile uyarılması sonucu ifade değışim sonuçları.

Bu sonuçlar ışığında, D-glukoz ile uyarım sonucu Şekil 4.5'te belirtildiği üzere;

- A: MiR-615-5p; 48, 72 ve 96. saatlerde artış göstermiştir. Sonuçlar, tüm zaman noktalarında istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur.
- B: MiR-4649-5p, 48. saatte azalma eğilimi gösterirken, sonraki zaman aralıklarında dereceli olarak azalmıştır. Sadece 96. saat anlamlı bulunmuştur.
- C: MiR-4675, 48. saatte azalırken, sonraki zaman aralıklarında dereceli olarak azalmıştır. 48 ve 96. saatler istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur.
- D: MiR-6768-5p, 48 ve 72. saatlerde sabit kalmış ve 96. saatte artmıştır. 96. saat istatistiksel anlamlı bulunmuştur.
- E: MiR-6800-5p, 48. saatte azalırken, 72. saatte ifadesi değışmemiştir. 96. saatte ifadesi artma eğilimi göstermiştir. Sadece ilk zaman noktası istatistiksel anlamlı bulunmuştur.

Bu sonuçlar göz önüne alındığında, D-glukoz kontrolü olan D-mannitol'e göre, belirtilen beş mikroRNA'dan en istikrarlı biçimde miR-615-5p'nin ifadesini değiştirmiştir.

Uygulanan uyarıların tamamı incelendiğinde, miR-615-5p'nin pro-anjiojenik uyarımlar olan VEGF-A ve bFGF varlığında baskılandığı, anjiogenezi baskılayan D-glukoz varlığında ise arttığı görülmüştür. Bu nedenle, damar oluşumu sürecinde rolü olabileceği düşünülen miR-615-5p, bu süreçte anahtar rolü olan endotel hücrelerde; ifadesi, fonksiyonel rolü ve bu süreci oluşturabilecek sinyal yolları için sonraki basamaklarda incelenmiştir.



Şekil 4.6. MikroRNA-615-5p'nin damar yapısında yer alan farklı hücre türlerindeki ifadesi.

İncelenen hücre türleri;

CASC: İnsan koroner arter düz kas hücresi (human coronary artery smooth muscle cell)

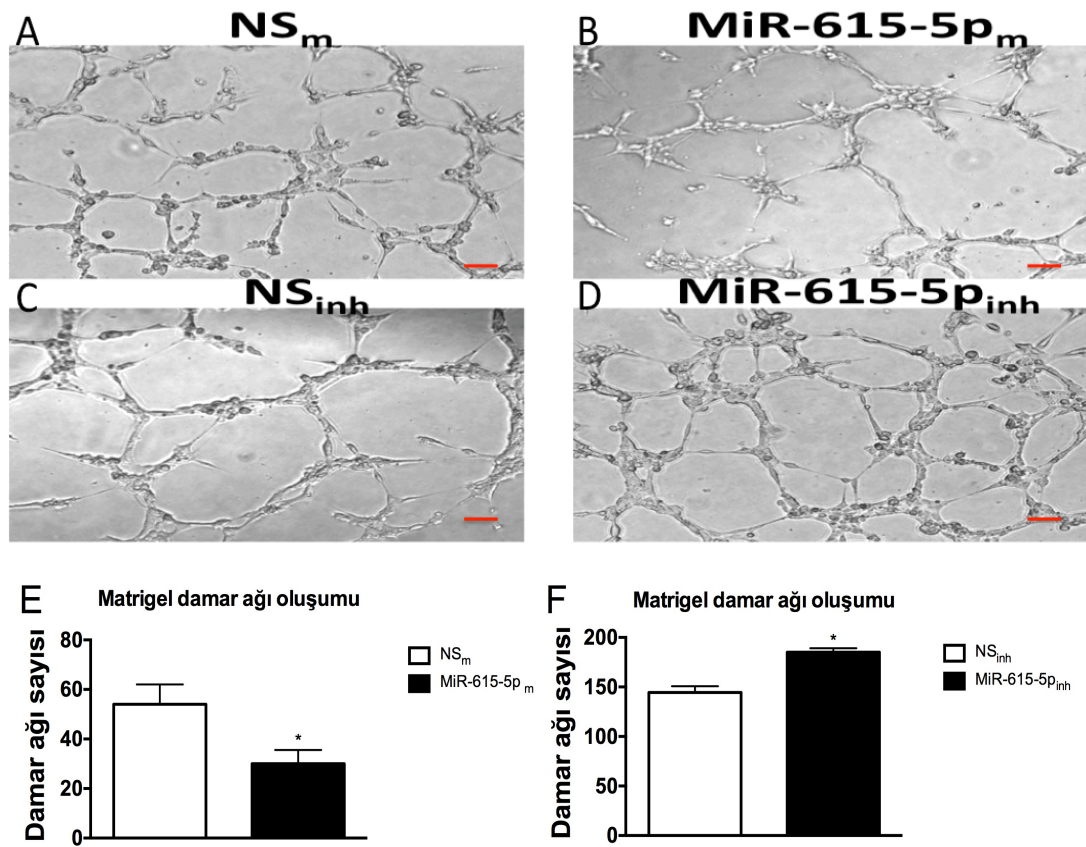
HMVEC: İnsan dermal mikrovasküler endotel hücreleri (human dermal microvascular endothelial cell)

HUVEC: İnsan umbilikal ven endotel hücreleri (human umbilical vein endothelial cell)

HUAEC: İnsan umbilikal arter endotel hücreleri (human umbilical artery endothelial cell)

HCAEC: İnsan koroner arter endotel hücreleri (human coronary artery endothelial cell)

Şekil 4.6'da endotel hücresi olmayan CASMC ile, dört farklı endotel hücre türü karşılaştırıldığında, tüm endotel hücrelerinde %25-70 arasında miRNA-615-5p'nin ifadesinin fazla olduğu görülmüştür. MiR-615-5p sonraki basamaklarda incelenirken, ifadesinin en fazla olduğu HUVEC hücre serisi seçilmiştir.



Şekil 4.7. MikroRNA-615-5p mimik ve inhibitörlerinin matrigel damar ağı oluşumu üzerindeki etkisi

Damar ağı çalışmaları için bahsedilen oligonükleotit dizileri kullanılmıştır:

NS_m: mimik için negatif kontrol dizisi

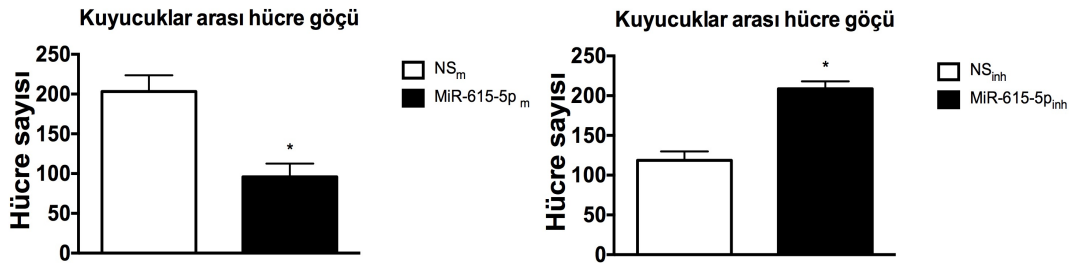
MiR-615-5p_m: MiR-615-5p'in etkilerini gösteren sentetik matür miRNA dizisi

NS_{inh}: inhibitör için negatif kontrol dizisi

MiR-615-5p_{inh}: MiR-615-5p'e komplementer olarak bağlanıp etkilerini nötralize eden sentetik oligonükleotit dizisi

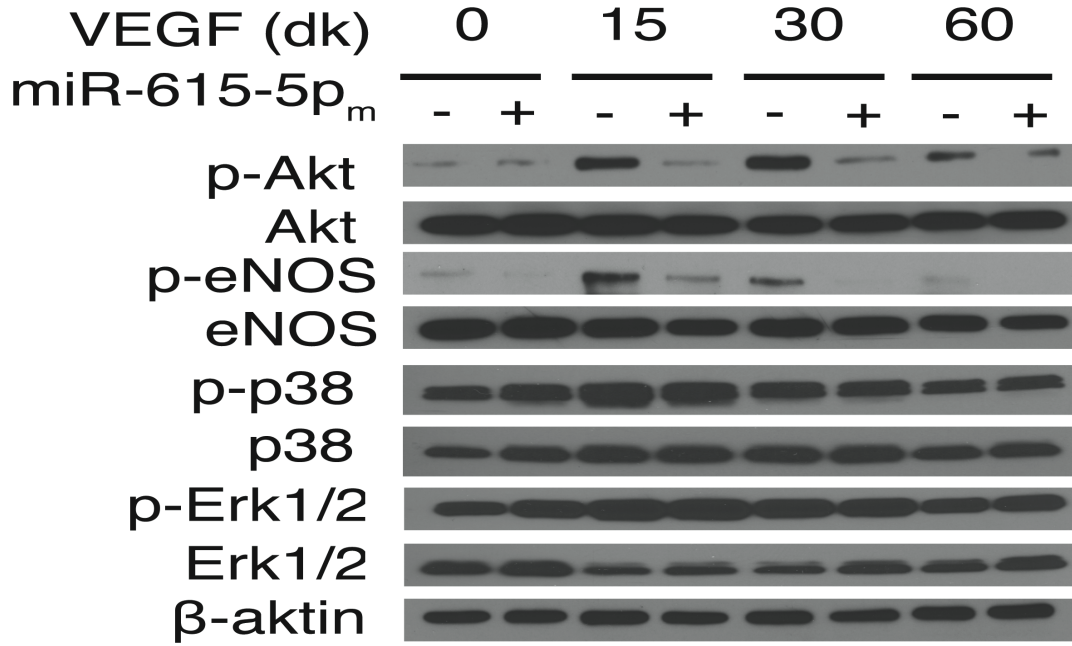
Bu sonuçlar ışığında matrigel bazal membrane varlığında; MiR-615-5p_m damar ağı oluşumunu %45 oranında azaltırken, MiR-615-5p_{inh} %28 oranında arttırmıştır. Bu bulgular, miR-615-5p'nin damar gelişimini bazal membran varlığında endotel hücreler aracılığı ile baskılayan bir mikroRNA olabileceğini göstermektedir.

Matrigel'den oluşan bazal membran varlığında, miR-615-5p'nin damar gelişimini etkilediği gözlenmiştir. Bu aşamada, endotel hücre üzerindeki direk etkisini incelemek üzere göç çalışması yapılmıştır.



Şekil 4.8. MikroRNA-615-5p mimik ve inhibitörlerinin endotel hücre göçü üzerindeki etkisi

Bu sonuçlar ışığında; MiR-615-5p_m HUVEC endotel hücrelerinin 5 mikrometre boyuttaki porlardan geçerek, kuyucuklar arasında göçünü %53 oranında azaltırken, MiR-615-5p_{inh} %76 oranında arttırmıştır. Bu bulgular miR-615-5p'nin damar gelişimini, direk endotel hücreler aracılığı ile baskılayan bir mikroRNA olabileceğini göstermektedir.

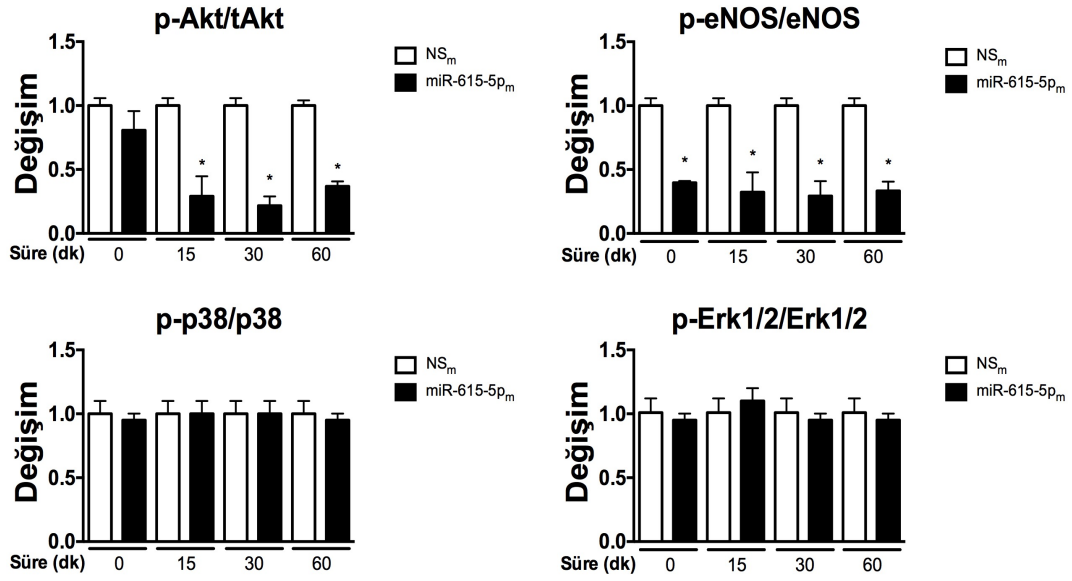


Şekil 4.9. MikroRNA-615-5p mimik ve inhibitörlerinin çeşitli sinyal yolları üzerindeki etkisi

NS_m: mimik için negatif kontrol dizisi

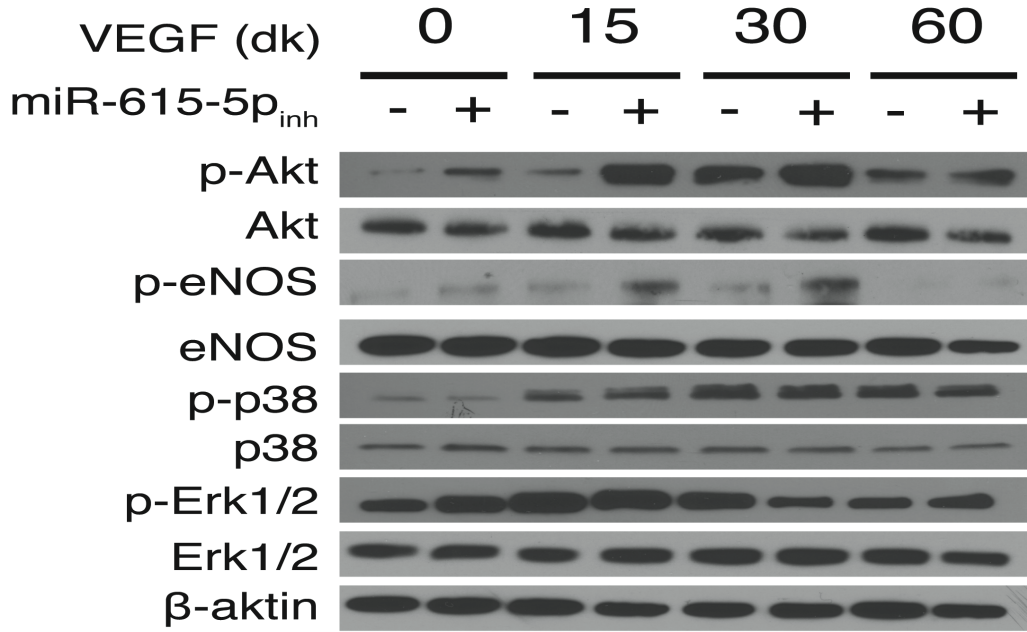
MiR-615-5p_m: MiR-615-5p'in etkilerini gösteren sentetik matür miRNA dizisi

NS_m (-) ve miR-615-5p_m (+) ile transfekte edilmiş HUVEC'ler, VEGF-A ile uyarılarak anjiogenez sürecinde rol alan sinyal yollarının cevabı immünoiblot ile incelenmiştir. Belirtilen Akt, eNOS, p38, Erk1/2 primer hücre hatlarında dinamik bir şekilde kontrol edildiği için 0, 15, 30 ve 60. dakikalarda protein fosforilasyon düzeyinde incelenmiştir. Belirtilen zaman noktaları için aynı protein örnekleri kullanılarak, dört farklı sinyal yolağındaki değişimler arasındaki ilişki paralel olarak araştırılmıştır. NS_m (-) ile belirtilen negatif kontrol örneklerine bakılarak, uyarıcı etkisinden sonra hızlı bir şekilde artıp azalan fosforile protein görülebilir. Akt, eNOS, p38, Erk1/2 sinyal yollarında eşit yükleme için doğrulama olarak fosforile formun toplam proteini yanında, beta-aktin de kullanılmıştır.



Şekil 4.10. NS_m (-) ve miR-615-5p_m ile gerçekleştirilen immüno blot çalışmaları

Şekil 4.9’da bantları verilen çalışmanın dansitometre ile analizi sunulmuştur. Bu sonuçlar ışığında, mikroRNA-615-5p (miR-615-5p_m), Akt ve eNOS fosforilasyonunu en çok 15 ve 30. dakikalarda azaltırken etki 60. dakikada devam etmekte fakat bazal seviyeye dönme eğilimi göstermektedir. p38 ve Erk1/2 sinyal yolları üzerinde anlamlı bir etki gözlenmemiştir. Bu sonuç, mikroRNA-615-5p anjiogenez sürecini özgül olarak Akt/eNOS yolağı üzerinden kontrol ettiğini göstermektedir.

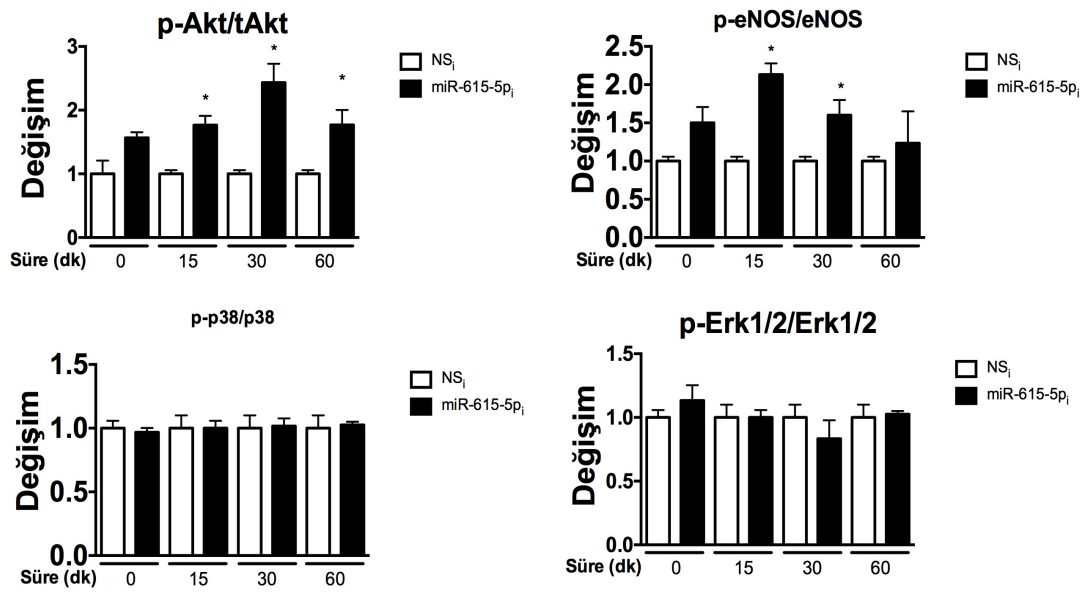


Şekil 4.11. NS_{inh} (-) ve miR-615-5p_{inh} (+) ile transfekte edilmiş HUVEC'lerin, VEGF-A ile uyarılarak immünoiblot ile incelenmesi.

NS_{inh}: inhibitör için negatif kontrol dizisi

MiR-615-5p_{inh}: MiR-615-5p'e komplementer olarak bağlanıp etkilerini nötralize eden sentetik oligonükleotit dizisi

NS_{inh} (-) ve miR-615-5p_{inh} (+) ile transfekte edilmiş HUVEC'ler, VEGF-A ile uyarılarak anjiogenez sürecinde rol alan sinyal yollarının cevabı immünoiblot ile incelenmiştir. Belirtilen Akt, eNOS, p38, Erk1/2 primer hücre hatlarında dinamik bir şekilde kontrol edildiği için 0, 15, 30 ve 60. dakikalarda protein fosforilasyon düzeyinde incelenmiştir. Belirtilen zaman noktaları için aynı protein örnekleri kullanılarak, dört farklı sinyal yolağındaki değişimler arasındaki ilişki paralel olarak araştırılmıştır. NS_m (-) ile belirtilen negatif kontrol örneklerine bakılarak, uyarıcı etkisinden sonra hızlı bir şekilde artıp azalan fosforile protein görülebilir. Akt, eNOS, p38, Erk1/2 sinyal yollarında eşit yükleme için doğrulama olarak fosforile formun toplam proteini yanında, beta-aktin de kullanılmıştır.



Şekil 4.12. NS_{inh} (-) ve miR-615-5p_{inh} ile gerçekleştirilen immüno blot çalışmaları dansitometre sonuçları

Şekil 4.11’de bantları gösterilen çalışmanın dansitometre ile analizi sunulmuştur. Bu sonuçlar ışığında, mikroRNA-615-5p inhibitörü (miR-615-5p_{inh}), Akt ve eNOS fosforilasyonunu özellikle 15 ve 30. dakikalarda arttırmakten, etki 60. dakikada devam etmekte fakat bazal seviyeye dönme eğilimi göstermektedir. p38 ve Erk1/2 sinyal yollarında çoğunlukla fosforilasyon değişiminde farklılık gözlenmemiştir. Bu sonuç, mikroRNA-615-5p anjiogenez sürecini özgül olarak Akt/eNOS yoluğ üzerinden kontrol ettiğini göstermektedir.

5. TARTIŞMA

MikroRNAların hedef mRNA'nın 3' ucuna komplementer olarak bağlanarak, kodlama yapmadığı halde kodlayan RNA dizilerini kontrol ederek önemli bir fonksiyonu olduğu gösterilmiştir. Hedef mRNA'nın yıkılarak veya aktivasyonunu azaltarak, transkripsiyon sonrası seviyede protein ifade düzeyini kontrol etmesi temel işlev mekanizmasıdır. Büyümenin ilk aşamalarından, hastalıkların gelişim ve ilerlemesine kadar birçok fizyolojik ve patofizyolojik süreçte korunmuş mikroRNA dizilerinin aldığı roller çeşitli disiplinlerde halen incelenmektedir. MikroRNA'ların kan dolaşımında ve diğer vücut sıvılarında, kararlı olarak bulunması incelenmesi açısından teknik kolaylık sağlamaktadır. Bu çalışmada ise, kardiyovasküler sistem hastalıklarında ilişkili mekanizmalardaki etkisi incelenmiştir.

Kardiyovasküler hastalıkların günümüzde kullanılan tedavi yöntemleri; büyük damarların bypass olarak geçilmesi, stentlerle daralmaların açılması, daralmaların tekrarının önlenmesi veya oluşan kan pıhtılarının trombotik denilen pıhtı çözücü enzimlerle açılması olarak sınıflandırılabilir. Bu girişimlerin ana amacı, dolaşımı azalan dokuya tekrar kan akımını sağlayarak gereken oksijen ve besinlerin ulaştırılması ile canlılığını idame ettirmeti amaçlamaktadır. Fakat yukardaki girişimler, dokunun mikrodolaşımındaki bozuklukları direk olarak düzeltmemektedir. Anjiogenez sürecinin daha hassas seviyede kontrolü, yaygın olarak etkilenmiş kalp, deri gibi yaygın olarak etkilenmiş organlarda tam olarak anlaşılammış bir konu olarak kalmaktadır.

MikroRNA'ların iskemik kardiyovasküler hastalık süreçlerinde farklı ifade göstermesi, bu çalışmanın başlangıç noktasını oluşturmaktadır. Bu çalışmada, akut koroner sendrom geçiren iki farklı hasta grubu sağlıklı bireyler ile karşılaştırılarak farklı ifade biçimi gösteren mikroRNA grubu belirlenmiştir. İki farklı kohortta incelenerek, rastlantısal bulguların azaltılması amaçlanmıştır. Klinik olarak hasta bireyler ile sağlıklı bireylerin dolaşımındaki ifade farklılıkları, mikroRNAların direk veya indirek olarak bu süreci kontrol ettiğini veya patofizyolojinin bir yan ürünü olarak ortaya çıkabildiğini göstermektedir. Daha önce yapılan çalışmalar, inflamasyon için TNF α , anjiogenez sürecinin VEGF-A ve bFGF, diabetes mellitus için

D-glukoz tarafından başlatılıp devam ettirilebildiğini göstermiştir. Glukoz pleiotropik etkisinden dolayı anjiogenez karşıtı etkiler de göstermektedir. Bu sitokinler dışında birçok interlökin, kemokin, lipid parçacıkları gibi organik partiküller yanında, inorganik maddelerde literatürde yer almaktadır. Bu çalışmanın amacı, öncelikle major uyarıları incelemektir. MikroRNA-615-5p'nin uyarılar karşısında verdiği ifade şekli, bütünsel olarak incelendiğinde anjiogenik ve anti-anjiogenik uyarılara ters yönde gösterdiği cevaptan dolayı, anjiogeneze sürecinde rol alabileceği düşünülmüştür. Bu hipotezi doğrulamak için, fonksiyonel çalışmalar ile miR-615-5p mimik ve inhibitörleri fazla ve eksik ifade çalışmaları tasarlanmıştır. MikroRNA-615-5p'nin fazla ve eksik ekspresyon çalışmaları sonucunda; matrigel varlığında yani bazal membrane bulunan ortamda endotel hücrelerinin büyüme ve göçünü değiştirmektedir. Bu sonucu, direk olarak endotel hücrelerdeki etkisini ölçmek için hücre göçü çalışması tasarlanmıştır. Bazal membransız ortamda mikroRNA-615-5p, endotel hücre davranışını fazla ifade varlığında baskılamak, eksik ifade durumunda artırmaktadır. Tespit edilen fonksiyonel rol için, ilgili sinyal yollarının incelenmesi immüno blot ile yapılmıştır. Vurgulanması önemli olan bir nokta ise, ilgili sinyal yollarının özgüllüğünü belirleyebilmek için benzer görevi görenlerin de incelenmiştir. MikroRNA-615-5p'nin incelenen major sinyal yollarından, sadece Akt/eNOS kontrol ettiği bulunurken, p38 ve Erk1/2 yolağını etkilemediği keşfedilmiştir. Anahtar-kilit mekanizmasına benzer şekilde, mimik ve inhibitörlerin ters yönde etki göstermesi hem yan etkiden kaynaklanma olasılığını hem rastlantısal olma ihtimalini kaldırmaktadır. Ayrıca, biyolojideki özgüllüğün, evrensel bilgi havuzundaki değeri arttırdığı bilinmektedir. Bir sinyal yolağının mikroRNA tarafından kontrol edilerek, özgül bir şekilde aktive düzenleyici rol göstermesi nükleik asit temelli ve hedefli girişimler için yol açmaktadır. Bu sebeple, mikroRNA-615-5p'nin Akt/eNOS sinyal yolağını özgül olarak kontrol etmesi hedefli tanı, tedavi, çalışmalar için önem taşımaktadır.

Sonuçlar bütüncül olarak göz önüne alındığında, mikroRNA-615-5p akut koroner sendrom geçiren hastalarda, hastalığın klinik olarak ortaya çıkmasından önce ifadesi artmaya başlayarak endotel hücre büyüme ve göçünü azaltmaktadır. Bu

mekanizma ile akut koroner sendroma yatkınlık yaratan bir yolağı kontrol etmekte ve ifadesinin artması ile akut koroner sendrom riskini artırmaktadır.

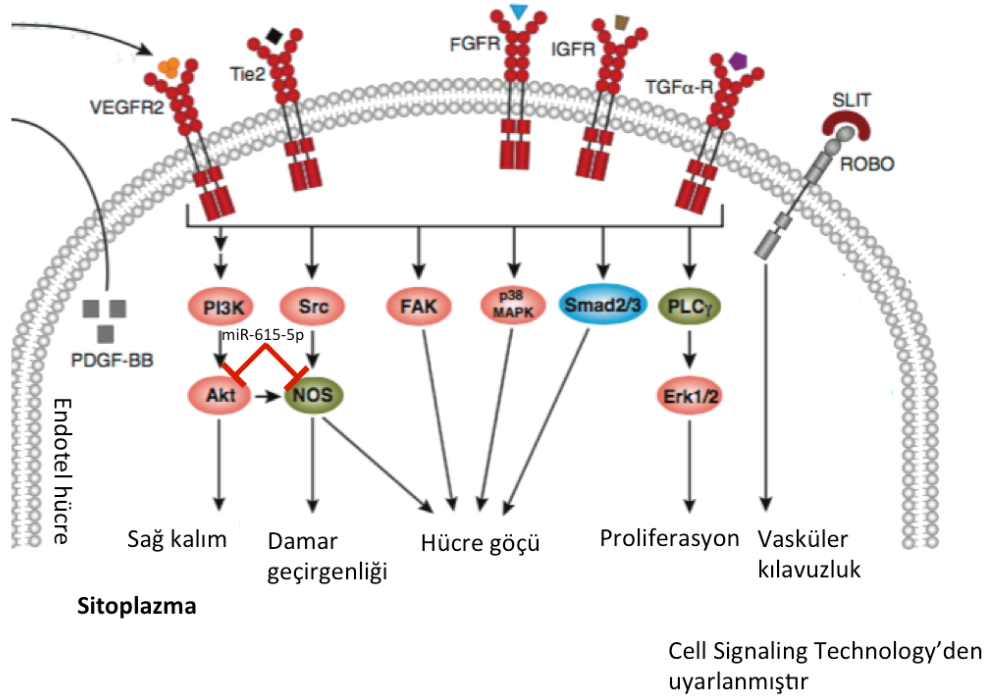
6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

6.1. Sonuçlar

- Mikrodizilim profillemeye incelendiğinde, miRNA-615-5p, miRNA-4675, miRNA-4649-5p iki kohortta da en az iki kat artarken; miRNA-6768-5p, miRNA-6800-5p'nin azaldığı bulunmuştur. Değişimlerin her iki kohortta benzer yönde olması anlamlı bulunmuştur. MiR-4532 ve miR-3195 artış göstermesine rağmen iki kattan az artış gösterdiği için sonraki analizlerde incelemeye dahil edilmemiştir. İlginç olarak, ifadesi azalan mikroRNA'lar artış gösterenlerden daha az sayıda olmuştur. Bunun birincil sebebi olarak, azalan ifade sonucu tespit edilemeyecek düzeylere düşen mikroRNA'ların olduğu düşünülmektedir. Bu nedenle ifadesi azalış gösteren mikroRNA'lar için iki kat değişim uygulanmayıp miRNA-6768-5p, miRNA-6800-5p ve miRNA-6780-5p incelemenmiştir. MiRNA-6780-5p için primer olmaması sebebi ile teknik zorluktan dolayı analizlerden çıkarılmıştır.
- Kullanılan uyaranlar sırasıyla; inflamasyon için TNF α , angiogenez için VEGF-A ve bFGF, diabetes mellitus için D-glukoz olmuştur. D-glukoz diyabetojenik özelliği olurken aynı zamanda angiogenez baskılaması sebebiyle iki farklı mekanizma ile ifade üzerine etki edebilmektedir. İncelenen beş mikroRNA'dan miR-615-5p, VEGF-A ve bFGF varlığında ifadesi azalırken, D-glukoz varlığında ifadesi artış göstermiştir. Bu sonuçlar, miR-615-5p'nin angiogenez sürecinde baskılanması gereken bir mikroRNA olduğunu, bu mekanizma ile hedef sinyal yolağı üzerindeki inhibe edici etkisinin azalabileceğini göstermektedir.
- MiR-615-5p ile yapılan fonksiyon kazanma ve kaybı çalışmaları, endotel hücrelerde bazal membrane varlığında damar ağı oluşumunun değiştiğini göstermiştir. MiR-615-5p'nin mimikler ile fazla ifadesi damar ağı oluşumunu azaltırken, miR-615-5p inhibitörleri hedef sinyal yolağı üzerindeki inhibe edici etkiyi kaldırarak damar ağı oluşumunu hızlandırmıştır. Bazal membrane ve endotel hücre arasındaki etkileşim çok faktörlü olduğu için, sonraki basamakta sadece endotel hücreler üzerindeki etki hücre göçü çalışması ile

incelenmiştir. Benzer olarak, miR-615-5p'nin mimikler ile fazla ifadesi endotel hücre göçünü azaltırken, miR-615-5p inhibitörleri hedef sinyal yolağı üzerindeki inhibe edici etkiyi kaldırarak hücre göçünü hızlandırmıştır.

- Bu noktaya kadar gözlenen fenotipin altında yatan mekanizmayı araştırmak için, anjiogenez sürecinde işlev gören major sinyal yolları incelenmiştir. En potent anjiogenik uyarılardan olan VEGF-A varlığında bu mekanizmalar aktive olmaktadır. Fonksiyon kazanma ve kaybı çalışmaları ile Akt ve eNOS sinyal mekanizmalarının dinamik ve spesifik olarak düzenlendiğı görülürken, p38 ve Erk1/2 sinyal yolları değışme göstermemiştir. Bu sonuç, Akt/eNOS kaskadını etkilerken, diğere mekanizmaları değıştirmemesi ile özgüllük göstermesi bakımından önem taşımaktadır.
- **Bu çalışma sonuç olarak; miR-615-5p'nin anjiogenez sürecini endotel hücreler ile baskılayan bir miR olduğunu, bu etkiyi Akt/eNOS sinyal mekanizması ile özgül olarak gerçekleştirdiğini, anjiogenik ortam ve uyarılar varlığında miR-615-5p'nin ifadesi azalarak hedeflediğı sinyal yolağının fonksiyonunu arttığını göstermiştir.**
- Aşağıdaki Şekil 6'da, miR-615-5p'nin etkisinin gerçekleştirdiğı sinyal yolağındaki basamak eldeki bulgular ışığında belirtilmiştir.



Şekil 5.1. MiR-615-5p'nin etki ettiği sinyal yolları

6.2. Öneriler

- Hedef genin, miR-615-5p fazla ifadesi varlığında mRNA profillemeye ve 3' kodlamayan uç mutasyonu çalışmaları ile belirlenmesi önerilmektedir. Günümüzdeki tahmin algoritmaları ve biyoinformatik veritabanları her ne kadar kesinlikten uzak olsa da, ilave bir filtre olarak dahil edilebilir. Sonraki basamakta, protein seviyesindeki etki; *luciferase assay* ve immunoblot ile doğrulanması gerçek hedef (bona fide) olmasını doğrulaması bakımından önem taşımaktadır. Benzer şekilde RISC-immünopresipitasyon'da bu amaç için kullanım potansiyeline sahiptir.
- Eğer RNA temelli yaklaşım verimli sonuçlar vermediği takdirde, kütle spektrometresi çalışması düşünülebilir. Bu çalışmada ortaya çıkacak, özgül olmayan sinyalleri ayırt etmek için optimize edilmesi açısından önemlidir.
- HIF-1 yani majör hipoksi cevabı oluşturan transkripsiyon faktörlerinin, miR-615-5p ile etkileşimini tanımlamak, ek bir kontrol mekanizmasını aydınlatılabileceği için önerilmektedir.
- Hayvan modellerinde korelasyon ve fenotipik etkinin, terapötik amaçlı kullanılması önerilmektedir.

- Son olarak, klinik hedefli yaklaşımlar için ex vivo çalışmalar ve dokulara dağıtım sistemleri ile mikroRNA temelli tedavi yöntemleri önerilebilir.

7. KAYNAKLAR

1. 1990-2010 Global Cardiovascular Disease Atlas. *WHF*. VOL. 9, NO. 1, 2014
2. Global, regional, and national age-sex specific all-cause and cause-specific mortality for 240 causes of death, 1990-2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. *Lancet*. Jan 10 2015;385(9963):117-171.
3. Beckman JA, Paneni F, Cosentino F, Creager MA. Diabetes and vascular disease: pathophysiology, clinical consequences, and medical therapy: part II. *European heart journal*. Aug 2013;34(31):2444-2452.
4. Nabel EG, Braunwald E. A tale of coronary artery disease and myocardial infarction. *The New England journal of medicine*. Jan 05 2012;366(1):54-63.
5. Dimmeler S. Cardiovascular disease review series. *EMBO molecular medicine*. Dec 2011;3(12):697.
6. Bornfeldt KE, Tabas I. Insulin resistance, hyperglycemia, and atherosclerosis. *Cell metabolism*. Nov 2 2011;14(5):575-585.
7. Davignon J, Ganz P. Role of endothelial dysfunction in atherosclerosis. *Circulation*. Jun 15 2004;109(23 Suppl 1):lii27-32.
8. Eelen G, de Zeeuw P, Simons M, Carmeliet P. Endothelial cell metabolism in normal and diseased vasculature. *Circulation research*. Mar 27 2015;116(7):1231-1244.
9. Baker RG, Hayden MS, Ghosh S. NF-kappaB, inflammation, and metabolic disease. *Cell metabolism*. Jan 5 2011;13(1):11-22.
10. Carmeliet P. Angiogenesis in health and disease. *Nature medicine*. Jun 2003;9(6):653-660.
11. Paneni F, Costantino S, Cosentino F. Insulin resistance, diabetes, and cardiovascular risk. *Current atherosclerosis reports*. Jul 2014;16(7):419.
12. Kolluru GK, Bir SC, Kevil CG. Endothelial Dysfunction and Diabetes: Effects on Angiogenesis, Vascular Remodeling, and Wound Healing. *International Journal of Vascular Medicine*. 2012;2012.
13. Bartel DP. MicroRNAs: Genomics, Biogenesis, Mechanism, and Function. *Cell*. 1/23/ 2004;116(2):281-297.
14. Baek D, Villen J, Shin C, Camargo FD, Gygi SP, Bartel DP. The impact of microRNAs on protein output. *Nature*. Sep 4 2008;455(7209):64-71.
15. Cai Y, Yu X, Hu S, Yu J. A brief review on the mechanisms of miRNA regulation. *Genomics, proteomics & bioinformatics*. Dec 2009;7(4):147-154.
16. Mitchell PS, Parkin RK, Kroh EM, et al. Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. Jul 29 2008;105(30):10513-10518.

17. Schulte C, Zeller T. microRNA-based diagnostics and therapy in cardiovascular disease-Summing up the facts. *Cardiovascular diagnosis and therapy*. Feb 2015;5(1):17-36.
18. Creemers EE, Tijssen AJ, Pinto YM. Circulating microRNAs: novel biomarkers and extracellular communicators in cardiovascular disease? *Circulation research*. Feb 3 2012;110(3):483-495.
19. Barton M. Prevention and endothelial therapy of coronary artery disease. *Current opinion in pharmacology*. Apr 2013;13(2):226-241.
20. Bowling FL, Rashid ST, Boulton AJ. Preventing and treating foot complications associated with diabetes mellitus. *Nature reviews. Endocrinology*. Oct 2015;11(10):606-616.
21. Grimson A, Srivastava M, Fahey B, et al. Early origins and evolution of microRNAs and Piwi-interacting RNAs in animals. *Nature*. Oct 30 2008;455(7217):1193-1197.
22. Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*. Dec 03 1993;75(5):843-854.
23. Moreno-Moya JM, Vilella F, Simon C. MicroRNA: key gene expression regulators. *Fertility and sterility*. Jun 2014;101(6):1516-1523.
24. Grishok A, Pasquinelli AE, Conte D, et al. Genes and mechanisms related to RNA interference regulate expression of the small temporal RNAs that control *C. elegans* developmental timing. *Cell*. Jul 13 2001;106(1):23-34.
25. Wightman B, Ha I, Ruvkun G. Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene *lin-14* by *lin-4* mediates temporal pattern formation in *C. elegans*. *Cell*. Dec 03 1993;75(5):855-862.
26. Shukla GC, Singh J, Barik S. MicroRNAs: Processing, Maturation, Target Recognition and Regulatory Functions. *Molecular and cellular pharmacology*. 2011;3(3):83-92.
27. Bartel DP. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell*. Jan 23 2009;136(2):215-233.
28. Friedman RC, Farh KK, Burge CB, Bartel DP. Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome research*. Jan 2009;19(1):92-105.
29. Eichhorn SW, Guo H, McGeary SE, et al. mRNA destabilization is the dominant effect of mammalian microRNAs by the time substantial repression ensues. *Molecular cell*. Oct 2 2014;56(1):104-115.
30. Guo H, Ingolia NT, Weissman JS, Bartel DP. Mammalian microRNAs predominantly act to decrease target mRNA levels. *Nature*. Aug 12 2010;466(7308):835-840.
31. Altuvia Y, Landgraf P, Lithwick G, et al. Clustering and conservation patterns of human microRNAs. *Nucleic acids research*. 2005;33(8):2697-2706.

32. Lewis BP, Shih IH, Jones-Rhoades MW, Bartel DP, Burge CB. Prediction of mammalian microRNA targets. *Cell*. Dec 26 2003;115(7):787-798.
33. Shin C, Nam JW, Farh KK, Chiang HR, Shkumatava A, Bartel DP. Expanding the microRNA targeting code: functional sites with centered pairing. *Molecular cell*. Jun 25 2010;38(6):789-802.
34. Addo-Quaye C, Eshoo TW, Bartel DP, Axtell MJ. Endogenous siRNA and miRNA targets identified by sequencing of the Arabidopsis degradome. *Current biology : CB*. May 20 2008;18(10):758-762.
35. Zamore PD, Tuschl T, Sharp PA, Bartel DP. RNAi: double-stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals. *Cell*. Mar 31 2000;101(1):25-33.
36. Chiang HR, Schoenfeld LW, Ruby JG, et al. Mammalian microRNAs: experimental evaluation of novel and previously annotated genes. *Genes & development*. May 15 2010;24(10):992-1009.
37. Adam L, Zhong M, Choi W, et al. miR-200 expression regulates epithelial-to-mesenchymal transition in bladder cancer cells and reverses resistance to epidermal growth factor receptor therapy. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. Aug 15 2009;15(16):5060-5072.
38. Bertero T, Gastaldi C, Bourget-Ponzio I, et al. miR-483-3p controls proliferation in wounded epithelial cells. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. Sep 2011;25(9):3092-3105.
39. Chen WJ, Yin K, Zhao GJ, Fu YC, Tang CK. The magic and mystery of microRNA-27 in atherosclerosis. *Atherosclerosis*. Jun 2012;222(2):314-323.
40. Emadi SS, Soufi FG, Khamaneh AM, Alipour MR. MicroRNA-146a expression and its intervention in NF-small ka, CyrillicB signaling pathway in diabetic rat aorta. *Endocrine regulations*. 2014;48(2):103-108.
41. Fang Y, Davies PF. Site-specific microRNA-92a regulation of Kruppel-like factors 4 and 2 in atherosusceptible endothelium. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. Apr 2012;32(4):979-987.
42. Fang Y, Shi C, Manduchi E, Civelek M, Davies PF. MicroRNA-10a regulation of proinflammatory phenotype in athero-susceptible endothelium in vivo and in vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. Jul 27 2010;107(30):13450-13455.
43. Fasanaro P, D'Alessandra Y, Di Stefano V, et al. MicroRNA-210 modulates endothelial cell response to hypoxia and inhibits the receptor tyrosine kinase ligand Ephrin-A3. *The Journal of biological chemistry*. Jun 6 2008;283(23):15878-15883.

44. Fiedler J, Jazbutyte V, Kirchmaier BC, et al. MicroRNA-24 regulates vascularity after myocardial infarction. *Circulation*. Aug 9 2011;124(6):720-730.
45. Icli B, Wara AK, Moslehi J, et al. MicroRNA-26a regulates pathological and physiological angiogenesis by targeting BMP/SMAD1 signaling. *Circulation research*. Nov 8 2013;113(11):1231-1241.
46. Jin Y, Tymen SD, Chen D, et al. MicroRNA-99 Family Targets AKT/mTOR Signaling Pathway in Dermal Wound Healing. *PloS one*. 2013;8(5).
47. Li D, Wang A, Liu X, et al. MicroRNA-132 enhances transition from inflammation to proliferation during wound healing. *The Journal of clinical investigation*. Aug 3 2015;125(8):3008-3026.
48. Li H, Chang L, Du WW, et al. Anti-microRNA-378a Enhances Wound Healing Process by Upregulating Integrin Beta-3 and Vimentin. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy*. Oct 2014;22(10):1839-1850.
49. Lü MH, Hu CJ, Chen L, et al. miR-27b Represses Migration of Mouse MSCs to Burned Margins and Prolongs Wound Repair through Silencing SDF-1a. *PloS one*. 2013;8(7).
50. Meloni M, Marchetti M, Garner K, et al. Local inhibition of microRNA-24 improves reparative angiogenesis and left ventricle remodeling and function in mice with myocardial infarction. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy*. Jul 2013;21(7):1390-1402.
51. Meng S, Cao JT, Zhang B, Zhou Q, Shen CX, Wang CQ. Downregulation of microRNA-126 in endothelial progenitor cells from diabetes patients, impairs their functional properties, via target gene Spred-1. *Journal of molecular and cellular cardiology*. Jul 2012;53(1):64-72.
52. Nagpal N, Kulshreshtha R. miR-191: an emerging player in disease biology. *Frontiers in genetics*. 2014;5:99.
53. Qian L, Van Laake LW, Huang Y, Liu S, Wendland MF, Srivastava D. miR-24 inhibits apoptosis and represses Bim in mouse cardiomyocytes. *The Journal of experimental medicine*. Mar 14 2011;208(3):549-560.
54. Sun X, Icli B, Wara AK, et al. MicroRNA-181b regulates NF-kappaB-mediated vascular inflammation. *The Journal of clinical investigation*. Jun 2012;122(6):1973-1990.
55. Wang T, Feng Y, Sun H, et al. miR-21 regulates skin wound healing by targeting multiple aspects of the healing process. *The American journal of pathology*. Dec 2012;181(6):1911-1920.
56. Griffiths-Jones S, Grocock RJ, van Dongen S, Bateman A, Enright AJ. miRBase: microRNA sequences, targets and gene nomenclature. *Nucleic acids research*. Jan 1 2006;34(Database issue):D140-144.

57. Ruby JG, Stark A, Johnston WK, Kellis M, Bartel DP, Lai EC. Evolution, biogenesis, expression, and target predictions of a substantially expanded set of *Drosophila* microRNAs. *Genome research*. Dec 2007;17(12):1850-1864.
58. Shechner DM, Bartel DP. The structural basis of RNA-catalyzed RNA polymerization. *Nature structural & molecular biology*. Sep 2011;18(9):1036-1042.
59. Weinberg DE, Nakanishi K, Patel DJ, Bartel DP. The inside-out mechanism of Dicers from budding yeasts. *Cell*. Jul 22 2011;146(2):262-276.
60. Mohr AM, Mott JL. Overview of microRNA biology. *Seminars in liver disease*. Feb 2015;35(1):3-11.
61. Auyeung VC, Ulitsky I, McGeary SE, Bartel DP. Beyond secondary structure: primary-sequence determinants license pri-miRNA hairpins for processing. *Cell*. Feb 14 2013;152(4):844-858.
62. Winter J, Jung S, Keller S, Gregory RI, Diederichs S. Many roads to maturity: microRNA biogenesis pathways and their regulation. *Nature cell biology*. Mar 2009;11(3):228-234.
63. Fish JE, Cybulsky MI. Taming endothelial activation with a microRNA. *The Journal of clinical investigation*. Jun 1 2012;122(6):1967-1970.
64. Kim VN. MicroRNA precursors in motion: exportin-5 mediates their nuclear export. *Trends in cell biology*. Apr 2004;14(4):156-159.
65. Yi R, Qin Y, Macara IG, Cullen BR. Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs. *Genes & development*. Dec 15 2003;17(24):3011-3016.
66. Bhattacharya S, Aggarwal R, Singh VP, Ramachandran S, Datta M. Downregulation of miRNAs during Delayed Wound Healing in Diabetes: Role of Dicer. *Molecular Medicine*. 2015;21(1):847-860.
67. Hutvagner G, Simard MJ. Argonaute proteins: key players in RNA silencing. *Nature reviews. Molecular cell biology*. Jan 2008;9(1):22-32.
68. Song JJ, Joshua-Tor L. Argonaute and RNA--getting into the groove. *Current opinion in structural biology*. Feb 2006;16(1):5-11.
69. Dueck A, Meister G. Assembly and function of small RNA - argonaute protein complexes. *Biological chemistry*. Jun 2014;395(6):611-629.
70. Cambronne XA, Shen R, Auer PL, Goodman RH. Capturing microRNA targets using an RNA-induced silencing complex (RISC)-trap approach. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. Dec 11 2012;109(50):20473-20478.
71. Pratt AJ, MacRae IJ. The RNA-induced silencing complex: a versatile gene-silencing machine. *The Journal of biological chemistry*. Jul 03 2009;284(27):17897-17901.

72. Garcia DM, Baek D, Shin C, Bell GW, Grimson A, Bartel DP. Weak seed-pairing stability and high target-site abundance decrease the proficiency of lsi-6 and other microRNAs. *Nature structural & molecular biology*. Oct 2011;18(10):1139-1146.
73. Lewis BP, Burge CB, Bartel DP. Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell*. Jan 14 2005;120(1):15-20.
74. Grimson A, Farh KK, Johnston WK, Garrett-Engele P, Lim LP, Bartel DP. MicroRNA targeting specificity in mammals: determinants beyond seed pairing. *Molecular cell*. Jul 6 2007;27(1):91-105.
75. Beitzinger M, Meister G. Preview. MicroRNAs: from decay to decoy. *Cell*. Mar 05 2010;140(5):612-614.
76. Dueck A, Meister G. MicroRNA processing without Dicer. *Genome biology*. 2010;11(6):123.
77. Felice KM, Salzman DW, Shubert-Coleman J, Jensen KP, Furneaux HM. The 5' terminal uracil of let-7a is critical for the recruitment of mRNA to Argonaute2. *The Biochemical journal*. Aug 13 2009;422(2):329-341.
78. Xia Z, Clark P, Huynh T, et al. Molecular dynamics simulations of Ago silencing complexes reveal a large repertoire of admissible 'seed-less' targets. *Scientific reports*. 2012;2:569.
79. Chi SW, Hannon GJ, Darnell RB. An alternative mode of microRNA target recognition. *Nature structural & molecular biology*. Feb 12 2012;19(3):321-327.
80. Ruegger S, Grosshans H. MicroRNA turnover: when, how, and why. *Trends in biochemical sciences*. Oct 2012;37(10):436-446.
81. Neilson JR, Zheng GX, Burge CB, Sharp PA. Dynamic regulation of miRNA expression in ordered stages of cellular development. *Genes & development*. Mar 01 2007;21(5):578-589.
82. Chavali PL, Funa K, Chavali S. Cis-regulation of microRNA expression by scaffold/matrix-attachment regions. *Nucleic acids research*. Sep 01 2011;39(16):6908-6918.
83. Zhang S, Xu L, Wang F, et al. Genetic control of primary microRNA insight into cis- and trans-regulatory variations by RNA-seq. *Gene*. Apr 01 2013;517(2):224-229.
84. Li S, Wang L, Fu B, Dorf ME. Trim65: a cofactor for regulation of the microRNA pathway. *RNA biology*. 2014;11(9):1113-1121.
85. Kawahara Y, Mieda-Sato A. TDP-43 promotes microRNA biogenesis as a component of the Drosha and Dicer complexes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. Feb 28 2012;109(9):3347-3352.

86. Wilson RC, Tambe A, Kidwell MA, Noland CL, Schneider CP, Doudna JA. Dicer-TRBP complex formation ensures accurate mammalian microRNA biogenesis. *Molecular cell*. Feb 05 2015;57(3):397-407.
87. Yuan HX, Zhang JP, Kong WT, et al. Elevated microRNA-185 is associated with high vascular endothelial growth factor receptor 2 expression levels and high microvessel density in clear cell renal cell carcinoma. *Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*. Dec 2014;35(12):12757-12763.
88. Janssen HL, Reesink HW, Lawitz EJ, et al. Treatment of HCV infection by targeting microRNA. *The New England journal of medicine*. May 2 2013;368(18):1685-1694.
89. Fitzgerald K, Kallend D, Simon A. A Highly Durable RNAi Therapeutic Inhibitor of PCSK9. *The New England journal of medicine*. May 04 2017;376(18):e38.
90. Eltzschig HK, Eckle T. Ischemia and reperfusion--from mechanism to translation. *Nature medicine*. 2011;17(11):1391-1401.
91. Kukreja RC, Yin C, Salloum FN. MicroRNAs: new players in cardiac injury and protection. *Molecular pharmacology*. Oct 2011;80(4):558-564.
92. Li Q, Xie J, Li R, et al. Overexpression of microRNA-99a attenuates heart remodelling and improves cardiac performance after myocardial infarction. *Journal of cellular and molecular medicine*. May 2014;18(5):919-928.
93. Libby P, Ridker PM, Hansson GK. Progress and challenges in translating the biology of atherosclerosis. *Nature*. May 19 2011;473(7347):317-325.
94. Zhu H, Fan GC. Role of microRNAs in the reperfused myocardium towards post-infarct remodelling. *Cardiovascular research*. May 1 2012;94(2):284-292.
95. Eming SA, Martin P, Tomic-Canic M. Wound repair and regeneration: Mechanisms, signaling, and translation. *Science translational medicine*. Dec 3 2014;6(265):265sr266.
96. Kasper LH, Brindle PK. Mammalian Gene Expression Program Resiliency: The Roles of Multiple Coactivator Mechanisms in Hypoxia-Responsive Transcription. *Cell Cycle*. 2014;5(2):142-146.
97. Roy S, Sen CK. miRNA in wound inflammation and angiogenesis. *Microcirculation (New York, N.Y. : 1994)*. Apr 2012;19(3):224-232.
98. Dorn GW, 2nd. MicroRNAs: redefining mechanisms in cardiac disease. *Journal of cardiovascular pharmacology*. Dec 2010;56(6):589-595.
99. Magenta A, Greco S, Gaetano C, Martelli F. Oxidative stress and microRNAs in vascular diseases. *International journal of molecular sciences*. 2013;14(9):17319-17346.
100. Leroith D. microRNAs: what the clinician should know about this new frontier. *Diabetes care*. May 2014;37(5):1176-1177.

101. Sun X, Lin J, Zhang Y, et al. MicroRNA-181b Improves Glucose Homeostasis and Insulin Sensitivity by Regulating Endothelial Function in White Adipose Tissue. *Circulation research*. January 7, 2016 2016.
102. Era T, Izumi N, Hayashi M, Tada S, Nishikawa S, Nishikawa S. Multiple mesoderm subsets give rise to endothelial cells, whereas hematopoietic cells are differentiated only from a restricted subset in embryonic stem cell differentiation culture. *Stem cells (Dayton, Ohio)*. Feb 2008;26(2):401-411.
103. Goveia J, Stapor P, Carmeliet P. Principles of targeting endothelial cell metabolism to treat angiogenesis and endothelial cell dysfunction in disease. *EMBO molecular medicine*. Sep 2014;6(9):1105-1120.
104. Potente M, Gerhardt H, Carmeliet P. Basic and therapeutic aspects of angiogenesis. *Cell*. Sep 16 2011;146(6):873-887.
105. Wang S, Aurora AB, Johnson BA, et al. The endothelial-specific microRNA miR-126 governs vascular integrity and angiogenesis. *Developmental cell*. Aug 2008;15(2):261-271.
106. Wei Y, Nazari-Jahantigh M, Neth P, Weber C, Schober A. MicroRNA-126, -145, and -155: a therapeutic triad in atherosclerosis? *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. Mar 2013;33(3):449-454.
107. Hassel D, Cheng P, White MP, et al. MicroRNA-10 regulates the angiogenic behavior of zebrafish and human endothelial cells by promoting vascular endothelial growth factor signaling. *Circulation research*. Nov 09 2012;111(11):1421-1433.
108. He H, Di Y, Liang M, et al. The microRNA-218 and ROBO-1 signaling axis correlates with the lymphatic metastasis of pancreatic cancer. *Oncology reports*. Aug 2013;30(2):651-658.
109. Aryal B, Rotllan N, Fernandez-Hernando C. Noncoding RNAs and atherosclerosis. *Current atherosclerosis reports*. May 2014;16(5):407.
110. Tang H, Fernandez RA, Yuan JX. miRNA208/Mef2 and TNF-alpha in right ventricular dysfunction: the transition from hypertrophy to failure. *Circulation research*. Jan 2 2015;116(1):6-8.
111. Garcia NA, Ontoria-Oviedo I, Gonzalez-King H, Diez-Juan A, Sepulveda P. Glucose Starvation in Cardiomyocytes Enhances Exosome Secretion and Promotes Angiogenesis in Endothelial Cells. *PloS one*. 2015;10(9):e0138849.
112. Hulsmans M, Holvoet P. MicroRNA-containing microvesicles regulating inflammation in association with atherosclerotic disease. *Cardiovascular research*. Oct 1 2013;100(1):7-18.
113. Carmeliet P, Jain RK. Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature*. Sep 14 2000;407(6801):249-257.
114. Deanfield J, Donald A, Ferri C, et al. Endothelial function and dysfunction. Part I: Methodological issues for assessment in the different vascular beds: a

- statement by the Working Group on Endothelin and Endothelial Factors of the European Society of Hypertension. *Journal of hypertension*. Jan 2005;23(1):7-17.
115. Polovina MM, Potpara TS. Endothelial dysfunction in metabolic and vascular disorders. *Postgraduate medicine*. Mar 2014;126(2):38-53.
 116. Ferrara N, Gerber HP, LeCouter J. The biology of VEGF and its receptors. *Nature medicine*. Jun 2003;9(6):669-676.
 117. Muntoni S, Muntoni S. Insulin resistance: pathophysiology and rationale for treatment. *Annals of nutrition & metabolism*. 2011;58(1):25-36.
 118. Attie AD, Kendziorski CM. PGC-1alpha at the crossroads of type 2 diabetes. *Nature genetics*. Jul 2003;34(3):244-245.
 119. Magenta A, Greco S, Capogrossi MC, Gaetano C, Martelli F. Nitric oxide, oxidative stress, and p66Shc interplay in diabetic endothelial dysfunction. *BioMed research international*. 2014;2014:193095.
 120. Vara D, Pula G. Reactive oxygen species: physiological roles in the regulation of vascular cells. *Current molecular medicine*. 2014;14(9):1103-1125.
 121. Ahmed Z, Bicknell R. Angiogenic signalling pathways. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*. 2009;467:3-24.
 122. Kim BS, Chen J, Weinstein T, Noiri E, Goligorsky MS. VEGF expression in hypoxia and hyperglycemia: reciprocal effect on branching angiogenesis in epithelial-endothelial co-cultures. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*. Aug 2002;13(8):2027-2036.
 123. Liu D, Jia H, Holmes DI, Stannard A, Zachary I. Vascular endothelial growth factor-regulated gene expression in endothelial cells: KDR-mediated induction of Egr3 and the related nuclear receptors Nur77, Nurr1, and Nor1. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. Nov 1 2003;23(11):2002-2007.
 124. Olsson AK, Dimberg A, Kreuger J, Claesson-Welsh L. VEGF receptor signalling - in control of vascular function. *Nature reviews. Molecular cell biology*. May 2006;7(5):359-371.
 125. Shibuya M. Differential roles of vascular endothelial growth factor receptor-1 and receptor-2 in angiogenesis. *Journal of biochemistry and molecular biology*. Sep 30 2006;39(5):469-478.
 126. Morabito A, De Maio E, Di Maio M, Normanno N, Perrone F. Tyrosine kinase inhibitors of vascular endothelial growth factor receptors in clinical trials: current status and future directions. *The oncologist*. Jul-Aug 2006;11(7):753-764.
 127. Law AY, Wong CK. Stanniocalcin-2 is a HIF-1 target gene that promotes cell proliferation in hypoxia. *Experimental cell research*. Feb 1 2010;316(3):466-476.

128. Lin C, McGough R, Aswad B, Block JA, Terek R. Hypoxia induces HIF-1 α and VEGF expression in chondrosarcoma cells and chondrocytes. *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society*. Nov 2004;22(6):1175-1181.
129. Lampropoulou A, Ruhrberg C. Neuropilin regulation of angiogenesis. *Biochemical Society transactions*. Dec 2014;42(6):1623-1628.
130. Plein A, Fantin A, Ruhrberg C. Neuropilin regulation of angiogenesis, arteriogenesis, and vascular permeability. *Microcirculation (New York, N.Y. : 1994)*. May 2014;21(4):315-323.
131. Tischer E, Mitchell R, Hartman T, et al. The human gene for vascular endothelial growth factor. Multiple protein forms are encoded through alternative exon splicing. *The Journal of biological chemistry*. Jun 25 1991;266(18):11947-11954.
132. Shibuya M. Vascular endothelial growth factor and its receptor system: physiological functions in angiogenesis and pathological roles in various diseases. *Journal of biochemistry*. Jan 2013;153(1):13-19.
133. Sato T, Ramsbair S, Higuchi K, Yanagisawa T, Medin JA. Vascular endothelial growth factor broadens lentivector distribution in the heart after neonatal injection. *Journal of cardiology*. Oct 2009;54(2):245-254.
134. Lawson ND, Mugford JW, Diamond BA, Weinstein BM. phospholipase C gamma-1 is required downstream of vascular endothelial growth factor during arterial development. *Genes & development*. Jun 01 2003;17(11):1346-1351.
135. Koolwijk P, Peters E, van der Vecht B, et al. Involvement of VEGFR-2 (kdr/flk-1) but not VEGFR-1 (flt-1) in VEGF-A and VEGF-C-induced tube formation by human microvascular endothelial cells in fibrin matrices in vitro. *Angiogenesis*. 2001;4(1):53-60.
136. Blanco R, Gerhardt H. VEGF and Notch in tip and stalk cell selection. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*. Jan 01 2013;3(1):a006569.
137. Moya IM, Umans L, Maas E, et al. Stalk cell phenotype depends on integration of Notch and Smad1/5 signaling cascades. *Developmental cell*. Mar 13 2012;22(3):501-514.
138. Germain S, Eichmann A. VEGF and ephrin-B2: a bloody duo. *Nature medicine*. Jul 2010;16(7):752-754.
139. Davy A, Gale NW, Murray EW, et al. Compartmentalized signaling by GPI-anchored ephrin-A5 requires the Fyn tyrosine kinase to regulate cellular adhesion. *Genes & development*. Dec 01 1999;13(23):3125-3135.
140. Torres-Vazquez J, Gitler AD, Fraser SD, et al. Semaphorin-plexin signaling guides patterning of the developing vasculature. *Developmental cell*. Jul 2004;7(1):117-123.

- 141.** Suh HN, Han HJ. Sonic hedgehog increases the skin wound-healing ability of mouse embryonic stem cells through the microRNA 200 family. *British Journal of Pharmacology*. Feb 2015;172(3):815-828.
- 142.** Kusano KF, Allendoerfer KL, Munger W, et al. Sonic hedgehog induces arteriogenesis in diabetic vasa nervorum and restores function in diabetic neuropathy. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. Nov 2004;24(11):2102-2107.
- 143.** Wietecha MS, Chen L, Ranzer MJ, et al. Sprouty2 downregulates angiogenesis during mouse skin wound healing. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology*. Feb 2011;300(2):H459-467.

7. ÖZGEÇMİŞ

I- Bireysel Bilgiler

Adı-Soyadı: Denizhan Özdemir

İletişim Adresi ve Telefonu: denizhanozdemir@outlook.com, +1 617 758 9485

II- Eğitimi

2017-2020: Dahiliye asistanı, Yale Üniversitesi Hastaneleri, Yale Tıp Fakültesi

2012-2017: Doktora, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi
MD/PhD Programı

2008-2014: Tıp Doktoru, İngilizce Tıp Programı, Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi
Dönem Üçüncüsü

III- Mesleki Deneyimi

2015-2017: Araştırmacı, Kardiyovasküler Tıp Bölümü, Brigham & Women's Hastanesi, Harvard Üniversitesi Tıp Fakültesi

2014-2014: Yoğun bakım intörnü, New York Presbyterian Hastanesi, Weill Cornell Tıp Fakültesi

2014-2014: Kardiyoloji elektif rotasyonu, Ulusal Sağlık Enstitüsü (NIH), ABD

IV- Bilimsel Faaliyetleri

Projeler

2014-2017: Kardiyovasküler Sistem Patofizyolojisinde Rol Alan MikroRNAların İncelenmesi, Araştırmacı.

2012-2012: Duodenom ve pankreatik kanser türlerinin karşılaştırılması, Emory Üniversitesi, ziyaretçi araştırmacı.

2011-2011: Plasental varyasyon ve ölü doğuma yol açan plasenta türlerinin karakterizasyonu, Brown Üniversitesi, ziyaretçi araştırmacı.

Yayınlar

Regulation of impaired angiogenesis in diabetic dermal wound healing by microRNA-26a. Icli B, Nabzdyk CS, Lujan-Hernandez J, Cahill M, Auster ME, Wara AK, Sun X, **Ozdemir D**, Giatsidis G, Orgill DP, Feinberg MW. J Mol Cell Cardiol. 2016 Feb;91:151-9

Whipple Made Simple For Surgical Pathologists: Orientation, Dissection, and Sampling of Pancreaticoduodenectomy Specimens For a More Practical and Accurate Evaluation of Pancreatic, Distal Common Bile Duct, and Ampullary Tumors. Adsay NV, Basturk O, Saka B, Bagci P, **Ozdemir D**, Balci S, Sarmiento JM, Kooby DA, Staley C, Maithel SK, Everett R, Cheng JD, Thirabanjasak D, Weaver DW. Am J Surg Pathol. 2014 Jan 21

Öğrenci yazar: Le T, Bhushan V, Sochat M. First Aid Step 1 2015. McGraw-Hill Medical

Sözlü Bildiri ve Posterler

The role of microRNA-135a in ischemic vascular disease. Basak Icli MS.,Ph.D. *, **Denizhan Ozdemir MD***, Giorgio Giatsidis MD, AKM Wara Ph.D., Xin Liu Ph.D., Trevon Waters, Kevin Croce MD., Ph.D., Mark W. Feinberg, MD. 19th International Vascular Biology Meeting, Boston, 2016. ***Co-first author**, Poster presentation.

Ozdemir D, Saka B, Bagci P, Dursun N, Erbarut I, Bandyopadhyay S, Ducato L, Reid M, Farris AB, Basturk O, Adsay V. Histology and Histopathology of Minor Papilla (Accessory Ampulla): An Analysis of 160 Cases with Emphasis on Features with Potential Impact on Daily Surgical Pathology Practice (Abstract). Modern Pathology 26(2S):171A, 2013

Saka B, Bagci P, Krasinskas A, Basturk O, Tajiri T, Ohike N, Kim GE, Balci S, Jang K-T, Bandyopadhyay S, Kooby D, Maithel SK, Sarmiento J, Staley C, **Ozdemir D**, Kong SY, Farris AB, Adsay V. Duodenal Carcinomas of Non-Ampullary Origin Are Significantly More Aggressive Than Ampullary Carcinomas (Abstract). Modern Pathology 26(2S):176A, 2013

Saka B, Tajiri T, Ohike N, Bagci P, Krasinskas A, Kim GE, Maithel SK, Sarmiento J, Kooby D, **Ozdemir D**, Basturk O, El-Rayes B, Kong SY, Goodman M, Farris AB, Adsay V. Clinicopathologic Comparison of Ampullary Versus Pancreatic Carcinoma: Preinvasive Component, Size of Invasion, Stage, Resectability and Histologic Phenotype Are the Factors for the Significantly Favorable Outcome of Ampullary Carcinoma (Abstract). Modern Pathology 26(2S):429A, 2013