

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

**AİLEVİ AKDENİZ ATEŞİ HASTALIĞINDA GÖRÜLEN  
İNFLAMASYON SÜRECİNDE ROL ALAN miRNA'LARIN  
TANIMLANMASI**

**Uzm. Zülfiye Yeliz AKKAYA ULUM**

**Tıbbi Biyoloji Programı**

**DOKTORA TEZİ**

**ANKARA**

**2018**



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

**AİLEVİ AKDENİZ ATEŞİ HASTALIĞINDA GÖRÜLEN  
İNFLAMASYON SÜRECİNDE ROL ALAN miRNA'LARIN  
TANIMLANMASI**

**Uzm. Zülfiye Yeliz AKKAYA ULUM**

**Tıbbi Biyoloji Programı**

**DOKTORA TEZİ**

**TEZ DANIŞMANI**

**Doç. Dr. Banu Peynircioğlu**

**ANKARA**

**2018**

## ONAY SAYFASI

**Ailevi Akdeniz Ateşi Hastalığında Görülen İnflamasyon Sürecinde Rol Alan**

**MiRNA'ların Tanımlanması**

**Zülfiye Yeliz AKKAYA ULUM**

**Danışman: Doç. Dr. Banu PEYNİRCİOĞLU**

Bu tez çalışması 24.09.2018 tarihinde jürimiz tarafından "Tıbbi Biyoloji Doktora Programı" nda doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

**Jüri Başkanı:**

*Prof. Dr. Serap DÖKMECİ*

*Hacettepe Üniversitesi*

**Üye:**

*Doç. Dr. Didem DAYANGAÇ-ERDEN*

*Hacettepe Üniversitesi*

**Üye:**

*Prof. Dr. Seza ÖZEN*

*Hacettepe Üniversitesi*

**Üye:**

*Prof. Dr. Engin YILMAZ*

*Acibadem Mehmet Ali Aydınlar Üniversitesi*

**Üye:**

*Doç. Dr. Çağdaş Devrim SON*

*Orta Doğu Teknik Üniversitesi*

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

28 Eylül 2018

*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.

Yükseköğretim Kurulu tarafından yayınlanan **“Lisansüstü Tezlerin Elektronik Ortamda Toplanması, Düzenlenmesi ve Erişime Açılmasına İlişkin Yönerge”** kapsamında tezim aşağıda belirtilen koşullar haricince YÖK Ulusal Tez Merkezi / H.Ü. Kütüphaneleri Açık Erişim Sisteminde erişime açılır.

- Enstitü / Fakülte yönetim kurulu kararı ile tezimin erişime açılması mezuniyet tarihimden itibaren 2 yıl ertelenmiştir. <sup>(1)</sup>
- Enstitü / Fakülte yönetim kurulunun gerekçeli kararı ile tezimin erişime açılması mezuniyet tarihimden itibaren 6.ay ertelenmiştir. <sup>(2)</sup>
- Tezimle ilgili gizlilik kararı verilmiştir. <sup>(3)</sup>

24/09/2018

Zülfiye Yeliz AKKAYA ULUM



<sup>1</sup>“Lisansüstü Tezlerin Elektronik Ortamda Toplanması, Düzenlenmesi ve Erişime Açılmasına İlişkin Yönerge”

- (1) Madde 6. 1. Lisansüstü teze ilgili patent başvurusu yapılması veya patent alma sürecinin devam etmesi durumunda, tez **danışmanın** önerisi ve **enstitü anabilim dalının** uygun görüşü üzerine **enstitü** veya **fakülte yönetim kurulu** iki yıl süre ile tezin erişime açılmasının ertelenmesine karar verebilir.
- (2) Madde 6. 2. Yeni teknik, materyal ve metotların kullanıldığı, henüz makaleye dönüşmemiş veya patent gibi yöntemlerle korunmamış ve internetten paylaşılması durumunda 3. şahıslara veya kurumlara haksız kazanç imkanı oluşturabilecek bilgi ve bulguları içeren tezler hakkında tez **danışmanın** önerisi ve **enstitü anabilim dalının** uygun görüşü üzerine **enstitü** veya **fakülte yönetim kurulunun** gerekçeli kararı ile altı ayı aşmamak üzere tezin erişime açılması engellenebilir.
- (3) Madde 7. 1. Ulusal çıkarları veya güvenliği ilgilendiren, emniyet, istihbarat, savunma ve güvenlik, sağlık vb. konulara ilişkin lisansüstü tezlerle ilgili gizlilik kararı, **tezin yapıldığı kurum** tarafından verilir \*. Kurum ve kuruluşlarla yapılan işbirliği protokolü çerçevesinde hazırlanan lisansüstü tezlere ilişkin gizlilik kararı ise, **ilgili kurum ve kuruluşun önerisi** ile **enstitü** veya **fakültenin** uygun görüşü üzerine **üniversite yönetim kurulu** tarafından verilir. Gizlilik kararı verilen tezler Yükseköğretim Kuruluna bildirilir.
- Madde 7.2. Gizlilik kararı verilen tezler gizlilik süresince enstitü veya fakülte tarafından gizlilik kuralları çerçevesinde muhafaza edilir, gizlilik kararının kaldırılması halinde Tez Otomasyon Sistemine yüklenir
- \* Tez **danışmanın** önerisi ve **enstitü anabilim dalının** uygun görüşü üzerine **enstitü** veya **fakülte yönetim kurulu** tarafından karar verilir.

## 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, Doç. Dr. Banu Peynircioğlu danışmanlığında tarafımdan üretildiğini ve Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Yönergesine göre yazıldığımı beyan ederim.

Zülfiye Yeliz AKKAYA ULUM



## TEŞEKKÜR

Akademik hayatımdaki ilk yol göstericim, desteğini hiçbir zaman esirgemeyen sayın hocam Prof. Dr. Engin Yılmaz'a;

Bana her konuda yardımcı olan, beni özgür şekilde bilim yapmaya teşvik eden sayın danışmanım Doç. Dr. Banu Peynircioğlu'na;

Tezin her aşamasında değerli fikirleriyle katkı sağlayan değerli hocalarım Prof.Dr. Neşe Atabey'e ve Doç. Dr. Didem Dayangaç-Erden'e;

Tez savunma sınavımdaki değerli jüri üyesi hocalarım Prof.Dr. Serap Dökmeçi'ye, Prof. Dr. Seza Özen'e ve Doç. Dr. Çağdaş Devrim Son'a;

Tezimin bakteri çalışmalarıyla ilgili aşamasında sağladığı önemli katkı için Prof. Dr. Y. Çetin Kocaefe'ye;

Doktora eğitimim ve öncesinde desteklerini hep hissettiğim Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'nda görev yapan tüm değerli hocalarıma ve öğretim üyelerine;

Laboratuvarda çalışmayı ve data tartışmayı eğlenceli hale getiren sevgili grup arkadaşlarım Tayfun Hilmi Akbaba ve Zeynep Tavukçuğlu'na;

Bu tezin gerçekleştirildiği Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı bünyesindeki tüm çalışanlara ve sevgili çalışma arkadaşlarıma;

Destekleriyle her zaman yanımda olduklarını hissettiren, bana yol gösteren ve her zaman başaracağıma inanan biricik annem, babam ve ablama;

Hayat arkadaşım, sevgili eşim Barış'a ve canım oğlum Aras'a;

Son olarak, doktora tez dönemi boyunca aldığım BİDEB 2211- Doğrudan Doktora Bursu için TÜBİTAK'a

En içten duygularla teşekkür ederim.

## ÖZET

**AKKAYA U., Z.Y., Ailevi Akdeniz Ateşi Hastalığında Görülen İnflamasyon Sürecinde Rol Alan miRNA'ların Tanımlanması. Hacettepe Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Biyoloji Doktora Tezi, Ankara, 2018.** Ailevi Akdeniz Ateşi (AAA); otozomal resesif olarak kalıtılan otoinflamatuvar bir hastalıktır. AAA hastalığı, pyrin proteinini kodlayan *Mediterranean Fever* (MEFV) geninde meydana gelen mutasyonlar sonucu ortaya çıkmaktadır. Hastalığın bilinen en iyi tedavisi günlük kolşisin uygulamasıdır. Birçok çalışmada pyrinin, önemli hücresel yollar olan; apoptoz, hücre iskeleti dinamiği, sinyal iletimi ve inflamasyon ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. Son yıllarda yapılan çalışmalar, otoinflamatuvar hastalıkların patogeneğinde kodlamayan RNA'lardan mikroRNA (miRNA)'ların inflamatuvar cevap sürecinde aktive edici veya baskılayıcı özellikleri olduğunu göstermiştir. Bu doğrultuda, inflamasyon durumunun görüldüğü AAA hastalığında, inflamasyon yolağında etkili miRNA'ların önemli olabileceği hipotezi doğmaktadır. Bu amaçla bu tez çalışmasında; seçilen kontrol ve hasta gruplarından alınan kan örneklerinden miRNA izolasyonu yapıldı. miRNA 2.0 mikrodizin analizi ile miRNA ifade analizi gerçekleştirildi. Aday miRNA'lar, görev aldıkları yolların sitokin salınımı veya apoptoz veya hücre göçü süreçlerindeki ilişkileri dikkate alınarak sınıflandırıldı. Bu kapsamda miR-20a ve miR-197 iki aday miRNA olarak belirlendi. Ardından, MEFV genini doğal olarak ifade eden hücre hatlarından ikisi kullanılarak, inflamasyon sürecinde rol oynayan aday miRNA'ların işlevleri araştırıldı. İşlevsel analizler sonucunda, miR-197'nin birçok inflamatuvar yolda görev aldığı belirlendi. Aday gen çalışmaları sonucunda ise, miR-197'nin inflamasyon sürecinin kilit moleküllerinden biri interlökin-1beta (IL-1 $\beta$ ) reseptörü olan interlökin 1 reseptör, tip I (IL1R1)'e bağlandığı gözlemlendi. Tez kapsamında elde edilen bulgular, AAA hastalığında görülen inflamasyon sürecinin anlaşılmasına katkı sağlayabileceği gibi mevcut kolşisin ve benzeri tedavilere ek olarak yeni ilaç hedefleri ve biyobelirteçler geliştirilmesine olanak sağlayabilecektir.

**Anahtar Kelimeler:** Ailevi Akdeniz Ateşi, inflamasyon, mikroRNA.

Bu tez, Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu, TÜBİTAK 1001-SBAG Proje Numarası: 214S106 ve Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi, Tez Destek, Doktora Proje Numarası: TDK-2017-16253 ve BAP Kapsamlı Proje Numarası: 013D05101005 projeleri ve Türk Romatoloji Derneği tarafından desteklenmiştir.



## ABSTRACT

**AKKAYA U., Z.Y., Identification of the miRNAs, which Play Roles in the Inflammation Process of the Familial Mediterranean Fever Disease. Hacettepe University, Graduate School of Health Sciences, Medical Biology PhD Thesis, Ankara, 2018.** Familial Mediterranean Fever (FMF); is an autosomal recessively inherited autoinflammatory disease. FMF is caused by the mutations in the Mediterranean Fever (MEFV) gene which encodes the pyrin protein. The best treatment for the disease is daily colchicine treatment. In many studies, pyrin has been implicated in important cellular processes; Apoptosis, cytoskeleton dynamics, signal transduction, and inflammation. Recent studies have shown that epigenetic control mechanisms, particularly non-coding RNAs, may play a role in the pathogenesis of autoinflammation. MicroRNAs (miRNAs) which is a group of non-coding RNAs have been shown to have activating or repressing properties in the inflammatory response process. Therefore, we hypothesized that miRNAs those have roles in inflammatory pathways may be important for the pathogenesis of the FMF disease. In this thesis study; miRNA isolation was done from blood samples taken from selected control and patient groups. miRNA expression analysis was performed by miRNA 2.0 array analysis. Candidate miRNAs were classified according to their roles in cytokine secretion or apoptosis or cell migration pathways. In this context, miR-20a and miR-197 were identified as two candidate miRNAs. Functional studies for identifying the functions of two candidate miRNAs were performed in two different cell lines that naturally express the MEFV gene. As a result of functional analysis, miR-197 was found to be involved in many inflammatory pathways. Subsequently, target gene studies for this miRNA were performed. miR-197 was found to bind to the interleukin-1beta (IL-1 $\beta$ ) receptor, type I (IL1R1), which is one of the key molecules of the inflammatory pathways. Thus, this study may contribute to understand the inflammatory process seen in FMF disease, as well as to development of the new drug targets and biomarkers in addition to the existing colchicine and similar treatments.

**Keywords:** Familial Mediterranean Fever, inflammation, microRNA.

This thesis was supported by The Scientific and Technological Research Council of Turkey TUBITAK 1001-SBAG Project Number: 214S106 and Hacettepe University Scientific Research Projects Coordination Unit, Thesis Support, PhD Project Number: TDK-2017-16253 and BAP Comprehensive Project Number: 013D05101005 and Turkey Rheumatology Association.

## İÇİNDEKİLER

ONAY SAYFASI	iii
YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI	iv
ETİK BEYAN	iv
TEŞEKKÜR	vi
ÖZET	vii
ABSTRACT	viii
SİMGELER VE KISALTMALAR	xii
ŞEKİLLER	xv
TABLolar	xviii
<b>1. GİRİŞ</b>	1
<b>2. GENEL BİLGİLER</b>	3
2.1. Kan Hücreleri ve İmmün Cevap	3
2.1.1. Nötrofiller	4
2.1.2. Monositler ve Lenfositler	5
2.2. Doğal Bağışıklık Sistemi	6
2.2.1. Toll-like Reseptörler	6
2.2.2. NF-κB	7
2.2.3. Sitokinler	8
2.2.4. Kemokinler	9
2.3. Ailevi Akdeniz Ateşi	10
2.3.1. Ailevi Akdeniz Ateşi Hastalığının Genetik Temelleri	10
2.3.2. AAA Hastalığında Genotip-Fenotip İlişkisi	12
2.4. Epigenetik Faktörler ve AAA	15
2.4.1. miRNA'lar	16
2.4.2. miRNA'ların Otoimmün ve Otoinflamatuvar Hastalıklarla İlişkisi	19
2.4.3. miRNA ve AAA	27
<b>3. GEREÇ VE YÖNTEM</b>	32
3.1. Gereçler	32
3.1.1. Örnek Toplama	32
3.1.2. RNA İzolasyonu ve cDNA Sentezi	32
3.1.3. Agaroz jel elektroforezi	32

3.1.4. Mikro Dizin ile İfade Analizi	32
3.1.5. Kantitatif Gerçek-Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (qRT-PCR)	32
3.1.6. Hücre Kültürü	32
3.1.7. Transfeksiyon	33
3.1.8. Apoptoz Deneylei	33
3.1.9. Hücre Göçü Deneylei	33
3.1.10. İnflamasyon Deneylei	33
3.1.11. Mutagenез için Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)	33
3.1.12. Bakteri Kültürü ve Transformasyon	34
3.1.13. Plazmid İzolasyonu	34
3.1.14. DNA Dizi Analizi	34
3.1.15. 3'UTR Lusiferaz Aktivitesinin Ölçülmesi	34
3.2. Yöntemler	34
3.2.1. Çalışma Grubunun Oluşturulması	34
3.2.2. miRNA Mikrodizin Analizi	36
3.2.3. miRNA Hedeflerinin Biyoinformatik Araçlar Kullanılarak Sınıflandırılması	39
3.2.4. Kantitatif Gerçek-Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (qRT-PCR)	41
3.2.5. Hücre Kültürü	44
3.2.6. Apoptoz Deneylei	45
3.2.7. Hücre Göçü Deneylei	45
3.2.8. İnflamasyon Deneylei	46
3.2.9. Aday Genin 3'UTR Vektörlerinde Mutagenез Yapılması	48
3.2.10. Mutagenез için Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)	49
3.2.11. Transformasyon	50
3.2.12. DNA Dizi Analizi	51
3.2.13. 3'UTR Lusiferaz Aktivitesinin Ölçülmesi	51
3.2.14. Verilerin Değerlendirilmesi ve İstatistiksel Analizler	52
<b>4. BULGULAR</b>	53
4.1. miRNA İfade Analizi ve Biyoinformatik Araçlarla Yolak Analizi	53
4.2. Kantitatif Gerçek-Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (qRT-PCR)	55
4.3. Hücre Kültürü ve İşlevsel Analizler	56

4.3.1. Apoptoz Deneylei	59
4.3.2. Hücye Göçü Deneylei	62
4.3.3. İnflamasyon Deneylei	70
4.3.4. THP-1 Hücye Hatları için İşlevsel Analizler	81
4.3.5. 3'UTR Lusiferaz Aktivite Deneylei	87
<b>5. TARTIŞMA</b>	90
<b>6. SONUÇ VE ÖNERİLER</b>	98
6.1. Sonuçlar	98
6.2. Öneriler	100
<b>7. KAYNAKLAR</b>	101
<b>8. EKLER</b>	119
EK-1: Tez Çalışması İle İlgili Etik Kurul İzni	
EK-2: Tez çalışması için protokol onayı ile ilgili etik kurul izni	
EK-3: Çalışma grubundaki bireylerin tüm kan sayımı (CBC) seviyeleri	
EK-4: I. Tez yayını	
EK-5: I. Orjinallik Ekran Çıktısı	
EK-6: Dijital Makbuz	
<b>9. ÖZGEÇMİŞ</b>	

## SİMGELER VE KISALTMALAR

<b>AAA</b>	Ailevi Akdeniz Ateşi
<b>ABCA6</b>	ATP-Bağlayıcı Kaset Alt Ailesi A Üyesi 6
<b>AGO</b>	Argonat
<b>APC</b>	Mononükleer Antijen Sunan Hücreler
<b>ARS2</b>	Arsenik Dirençli Protein 2
<b>ASC</b>	Apoptoz İlişkili <i>Speck</i> Benzeri Protein
<b>ASK 1</b>	Apoptoz Sinyal Düzenleyici Kinaz 1
<b>BD</b>	Behçet Hastalığı
<b>CBC</b>	Tam Kan Sayımı
<b>CD4 T</b>	Farklılaşma Sınıfı4 T lenfositleri
<b>CRP</b>	C-Reaktif Proteini
<b>CXCL1</b>	Kemokin (C-X-C motif) Ligandı 1
<b>CXCR1</b>	Kemokin (C-X-C motif) Reseptörü 1
<b>DEPC</b>	Dietil Pirokarbonat
<b>DMSO</b>	Dimetilsülfoksit
<b>DsRBPs</b>	Çift Zincirli RNA Bağlayıcı Proteinler
<b>DsRNA</b>	Çift Zincirli RNA
<b>ECM</b>	Hücreler Arası Matriks
<b>EtBr</b>	Etidyum Bromür
<b>FBS</b>	Fetal Sığır Serumumu
<b>FDR</b>	<i>False Discovery Rate</i>
<b>G-CSF</b>	Granülosit Koloni Uyarıcı Faktör
<b>GDF-15</b>	Büyüme Farklılaşma Faktörü-15
<b>GNAI3</b>	G Protein Subunit Alpha i3
<b>HIDS</b>	Hiperimünoglobulinemi D Sendromu
<b>IBD</b>	Inflamatuvar Bağırsak Hastalığı
<b>IKK</b>	IκB Kinaz
<b>IL-1ra</b>	İnterlökin 1 Reseptör Antagonisti
<b>IRAK1</b>	İnterlökin Reseptör-İlişkili Kinaz 1

<b>JIA</b>	Juvenil İdiopatik Artrit
<b>LB</b>	<i>Lysogeny broth</i>
<b>LN</b>	Lupus Nefrit
<b>LPS</b>	Lipopolisakkarit
<b>MAPK</b>	Mitojen-Aktive Edilmiş Protein Kinaz
<b>MCP-1</b>	Monosit Kemoatraktan Proteini-1
<b>MEFV</b>	<i>Mediterranean Fever</i>
<b>MeV</b>	<i>Multi Experiment Viewer</i>
<b>miRISC</b>	miRNA ile İndüklenen Susturum Kompleksi
<b>miRNA</b>	mikroRNA
<b>MMPs</b>	Matriks Metalloproteinazlar
<b>MS</b>	<i>Multiple Skleroz</i>
<b>mTOR</b>	Rapamisinin Memeli Hedefi
<b>MVK</b>	Mevalonat Kinaz
<b>MyD88</b>	Miyeloid Farklılaşma Birincil Cevap Geni 88
<b>NET</b>	Nötrofil Hücre Dışı Tuzaklar
<b>NF-κB</b>	Nüklear Faktör NF-kappaB
<b>NLRP3</b>	Nod Benzeri Reseptör Proteini 3
<b>OA</b>	Osteoartrit
<b>PAMPs</b>	Patojen-İlişkili Moleküler Paternler
<b>PBMCs</b>	Periferel Kan Mononükleer Hücreleri
<b>PDGF-AA</b>	Platelet- <i>derived</i> Büyüme Faktörü-AA
<b>PFAPA</b>	Aft, Farenjit, Adenit ile Birlikte olan Periyodik Ateş
<b>PI3Kγ</b>	Fosfoinosit 3-Kinaz Gamma
<b>Pol II</b>	Polimeraz II
<b>PSTPIP1</b>	Prolin-serin-treonin Fosfataz İlişkili Protein 1
<b>RA</b>	Romatoid Artrit
<b>RHEB</b>	Beyinde Ras Homoloji Kazanılmış
<b>RNAi</b>	RNA İnterferans
<b>RNU48</b>	Küçük Nükleolar RNA, C/D Kutusu 48
<b>ROS</b>	Reaktif Oksijen Türleri

<b>RU</b>	<i>Relative unit</i>
<b>SAA</b>	Serum Amiloid A
<b>SAM</b>	<i>Significance Analysis of Microarray</i>
<b>SHIP-1</b>	SH-2 İçeren İnositol 5' Polifosfataz 1
<b>SIRP<math>\alpha</math></b>	Sinyal Düzenleyici Protein $\alpha$
<b>SiRNA</b>	Susturucu RNA
<b>SLE</b>	Sistemik Lupus Eritematozus
<b>SOCS1</b>	Sitokin Sinyali 1'in Baskılayıcısı
<b>SS</b>	Sjogren Sendromu
<b>TAC</b>	Transkriptom Analiz Konsolu
<b>TAE</b>	Tris-Asetat-EDTA
<b>TF</b>	Transkripsiyon Faktörü
<b>TGF-<math>\beta</math></b>	Transforme Edici Büyüme Faktörü Beta
<b>TIR</b>	Toll/IL-1
<b>TIRAP/MAL</b>	TIR Domaini İçeren Adaptör Protein/MAL
<b>TLR</b>	Toll Benzeri Reseptör
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	Tümör Nekroz Faktörü-Alfa
<b>TRAF6</b>	Tümör Nekroz Faktörü Reseptörü-İlişkili Faktör 6
<b>TRAM</b>	Translokasyon İlişkili Membran Proteini
<b>TRAPS</b>	Tümör Nekroz Faktörü Reseptör İlişkili Periyodik Sendrom
<b>TRIF</b>	TIR Domain İçeren Adaptör Tetiklenen İnterferon- $\beta$

## ŞEKİLLER

Şekil	Sayfa	
2.1.	Otoinflamatuvar ve otoimmün hastalıklardaki patofizyolojik etkenler.	15
2.2.	miRNA işlenmesi ve ifadelerinin düzenlenmesi.	19
2.3.	Tez deney planı ve iş akışı.	31
3.1.	RNA'ların %2,5'luk agaroz jeldeki görüntüleri.	37
3.2.	Mikrodizin çiplerin hibridizasyon sonrası okuma görüntüsü.	38
3.3.	miRWalk veri tabanındaki aday genler listesi için örnek ekran görüntüsü.	40
3.4.	Mikrodizin haritaları. POS1 ve POS2-pozitif kontroller.	47
3.5.	<i>LightSwitch 3'UTR Reporter GoClone</i> vektör haritası.	48
3.6.	3'UTR lusiferaz aktivite deneylerinin prensibi.	52
4.1.	miR-20a'nın ve miR-197'nin görev alabileceği yolaklar listeleri.	55
4.2.	miR-20a ve miR-197 için qRT-PCR sonuçları.	56
4.3.	SW982 hücrelerinin 3 ul Lipofectamine 2000 ile transfeksiyon sonrası görüntüsü.	57
4.4.	Anti-miR-20a, inhibitör kontrol, pre-miR-197 ve mimic kontrol için qRT-PCR sonuçları.	58
4.5.	Pre-miR-197 ve anti-miR-20a transfekte edilen hücrelerde apoptoz deneyleri sonuçları.	60
4.6.	Pre-miR-197 ve anti-miR-20a transfekte edilen hücrelerde apoptoz deneylerinin 2. tekrar sonuçları.	61
4.7.	Pre-miR-197 ve anti-miR-20a transfekte edilen hücrelerde apoptoz deneylerinin 3. tekrar sonuçları.	61
4.8.	Pre-miR-197 ile transfekte edilen hücrelerde yara iyileşmesi deneyi sonuçları.	63
4.9.	Anti-miR-20a ile transfekte edilen hücrelerde yara iyileşmesi deneyi sonuçları.	64
4.10.	Pre-miR-197 ve anti-miR-20a transfekte edilen hücrelerde yara iyileşmesi deneylerinin 2. tekrar sonuçları.	65



<b>4.11.</b>	Pre-miR-197 ve anti-miR-20a transfekte edilen hücrelerde yara iyileşmesi deneylerinin 3. tekrar sonuçları.	65
<b>4.12.</b>	Pre-miR-197 transfekte edilen hücrelerde filtre deneyi sonuçları.	67
<b>4.13.</b>	Anti-miR-20a transfekte edilen hücrelerde filtre deneyi sonuçları.	68
<b>4.14.</b>	Pre-miR-197 ve anti-miR-20a transfekte edilen hücrelerde filtre deneylerinin 2. tekrar sonuçları.	69
<b>4.15.</b>	Pre-miR-197 ve anti-miR-20a transfekte edilen hücrelerde filtre deneylerinin 3. tekrar sonuçları.	69
<b>4.16.</b>	Pre-miR-197 ve anti-miR-20a transfekte edilen hücrelerde kaspaz 1 aktivite deneyi sonuçları.	70
<b>4.17.</b>	Pre-miR-197 ve anti-miR-20a transfekte edilen hücrelerde kaspaz 1 aktivite deneylerinin 2. tekrar sonuçları.	71
<b>4.18.</b>	Pre-miR-197 ve anti-miR-20a transfekte edilen hücrelerde kaspaz 1 aktivite deneylerinin 3. tekrar sonuçları.	72
<b>4.19.</b>	Anti-miR-20a transfekte edilen hücrelerde IL-1 $\beta$ , MEFV, IL-18 genlerinin ifade analizi sonuçları.	73
<b>4.20.</b>	Pre-miR-197 transfekte edilen hücrelerde IL-1 $\beta$ , MEFV, IL-18 genlerinin ifade analizi sonuçları.	74
<b>4.21.</b>	Pre-miR-197 ve mimic kontrol transfekte edilen hücrelerde ve kontrol hücrelerindeki TGF- $\beta$ ve TNF- $\alpha$ qRT-PCR sonuçları.	75
<b>4.22.</b>	Anti-miR-20a ve inhibitör kontrol transfekte edilen hücrelerde ve kontrol hücrelerindeki TGF- $\beta$ ve TNF- $\alpha$ qRT-PCR sonuçları.	75
<b>4.23.</b>	TNF- $\alpha$ ve TGF- $\beta$ uygulamaları sonrası miR-20a ve miR-197'nin ifade değişimleri.	77
<b>4.24.</b>	Mikrodizinlerdeki standart ve pozitif kontrollerin görüntüsü.	78
<b>4.25.</b>	MCP-1 proteinin pre-miR-197 ve mimic kontrol ile transfekte edilen hücrelerin süpernatanlarındaki miktar analizi.	79
<b>4.26.</b>	GDF-15 ve PDGF-AA proteinlerinin pre-miR-197 ve mimic kontrol ile transfekte edilen hücrelerin süpernatanlarındaki miktar analizi.	80
<b>4.27.</b>	İnsan kemokin antikor mikrodizin görüntüsü.	81
<b>4.28.</b>	THP-1 hücrelerinin 1,6 ul Lipofectamine 2000 ile transfeksiyon sonrası görüntüsü.	82

<b>4.29.</b>	Pre-miR-197 ve mimic kontrol için qRT-PCR sonuçları.	83
<b>4.30.</b>	Pre-miR-197 transfekte edilen THP-1 hücrelerinde IL-1 $\beta$ , MEFV, IL-18, TNF- $\alpha$ ve TGF- $\beta$ genlerinin ifade analizi sonuçları.	84
<b>4.31.</b>	Pre-miR-197 transfekte edilen hücrelerde kaspaz 1 aktivite deneyinin sonuçları.	85
<b>4.32.</b>	Pre-miR-197 transfekte edilen hücrelerde filtre deneyi sonuçları.	86
<b>4.33.</b>	Pre-miR-197 transfekte edilen hücrelerde IL1R1 geninin ifade analizi sonuçları.	87
<b>4.34.</b>	IL1R1 geninin 3'UTR bölgesindeki mutasyonlu dizi analizi.	88
<b>4.35.</b>	3'UTR lusiferaz aktivite deneyi sonuçları.	89
<b>5.1.</b>	AAA patogenezinde NF-kB ve IL-1 $\beta$ 'nin rolü.	91
<b>5.2.</b>	miR-197'nin AAA patogenezindeki IL1R1 geni aracılığıyla olan etkisinin şematik gösterimi.	93

## TABLOLAR

<b>Tablo</b>	<b>Sayfa</b>
<b>2.1.</b> miRNA'lar ile otoimmün ve otoinflamatuar hastalıklarla ilişkili yapılan güncel çalışmalar.	23
<b>2.2.</b> miRNA'lar ile AAA hastalığıyla ilişkili çalışmalar.	29
<b>3.1.</b> Hasta bireylerin klinik özellikleri.	35
<b>3.2.</b> RNA'ların miktarları ve saflıkları.	36
<b>3.3.</b> Okuma başarılarının gösterimi.	39
<b>3.4.</b> miR-197'nin IL1R1 genine bağlanma potansiyeli olan bölgedeki yapılması planlanan dizi değişiklikleri.	49
<b>3.5.</b> miRNA bağlantı bölgesi için mutagenez primer dizileri.	49
<b>4.1.</b> M694V/M694V hastalar vs. kontrol grubu için iki farklı analiz programından elde edilen sonuçlara göre 2 üzeri kat artışı ve azalışı gösteren miRNA'lar.	53
<b>4.2.</b> M694V/M694V hastalar vs. kontrol grubu için MeV-SAM ve TAC analiz programlarından ortak olarak elde edilen aday miRNA'ların kat değişimleri, q değerleri ve p değerleri.	54
<b>4.3.</b> Mikrodizin ve qRT-PCR ifade analizi sonuçlarının karşılaştırılması.	56

## 1. GİRİŞ

Otoinflamatuvar hastalıklar klinik olarak gösterdikleri farklılıklar ile ön plana çıkmakla beraber, inflamasyon yollarında önemli görevleri olan proteinleri kodlayan genlerdeki mutasyonlar sonucu ortaya çıkmaktadırlar (1). Bu proteinlerin hücre göçü, sitokin salınımı ve apoptoz gibi önemli hücresel işlevlerde rol oynayabildikleri tespit edilmiştir.

Otozomal resesif olarak kalıtılan AAA hastalığı, MEFV genindeki mutasyonlar sonucu ortaya çıkmaktadır. MEFV geni 16. kromozomun kısa kolunda (16p13.3) yer alır ve 3505 nükleotid içeren 10 ekzondan oluşur. Hastalarda kendini 2-3 gün süren ve tekrarlayıcı yüksek ateş ve abdominal ağrılarla gösterir. Türk AAA hastalarında en sık görülen MEFV geni mutasyonu; M694V (%51,4)'dir (2, 3). MEFV geninden pyrin proteini kodlanmaktadır (4). Pyrin proteininin inflamasyonun düzenlenmesinde işlevi olduğu düşünülmektedir. Miyeloid kökenli hücrelerde ve fibroblastlarda ifade edilen pyrin, inflamatuvar yollarda görevli birçok protein gibi PYD ve SPRY protein bölgelerini içerir.

miRNA'lar protein ifadesini düzenleyen kodlamayan RNA'lar olup, hücre ve dokulara özgü olarak miRNA genleri tarafından ifade edilmektedir. miRNA'lar *Dicer* enzimleriyle işlenerek ve miRNA ile uyarılan susturma kompleksini (*miRNA-induced silencing complex-miRISC*) oluşturarak hedef mRNA'larının 3'-translasyonu olmayan bölgesindeki belirli nükleotitler ile eşleşebilmektedir (5). Bu eşleşme ile başlangıç faktörlerinin mRNA'ya tam bağlanması engellenmekte ve translasyon baskılanmaktadır.

miRNA'lar ile ilgili son yıllarda birçok çalışma yürütülmekte ve bu çalışmalarda miRNA'ların çeşitli genlerin ifadesini düzenlemede önemli roller oynayabildiği gösterilmektedir. Ayrıca, miRNA'ların inflamatuvar hastalıklar ile ilişkili bazı yolların düzenlenmesinde görevli oldukları belirlenmiştir (6).

Epigenetik mekanizmaların, kanser ve diyabet gibi yaygın hastalıkların yanı sıra, otoinflamatuvar ve otoimmün hastalıklarda da rol alabildikleri tespit edilmiştir (7). DNA metilasyonu ve post-trankripsiyonel histon modifikasyonları gibi kodlamayan RNA'lardan miRNA'ların da inflamatuvar cevap sürecinde önemli ve etkili oldukları düşünülmektedir.

B ve T hücrelerinin gelişme ve farklılaşması, monosit ve nötrofillerin proliferasyonu, antikör aktivasyonu ve inflamatuvar düzenleyicilerin salınması gibi birçok immun cevap sürecinde etkili çok sayıda miRNA tanımlanmıştır (8). Romatoid artrit, multiple skleroz, sistemik lupus eritematozus ve bakteriyal enfeksiyonlarda hastalık patogeneğinde görevli miR-155, miR-21 ve miR-146a gibi ortak miRNA'lar belirlenmiştir (6). miR-155 ilk olarak farelerde tanımlanmış olup, bic geninin ekzon 2 bölgesinden transkripte olmaktadır (9). miR-155 *-/-* farelerde B ve T hücrelerinin işlevlerinde bozukluk olduğu gösterilmiştir (10). Bu miRNA'ların c-Maf, PU.1, sitokin sinyali 1'in baskılayıcısı (*suppressor of cytokine signaling 1-SOCS1*) ve SH-2 içeren inositol 5' polifosfat 1 (*SH-2 containing inositol 5' polyphosphatase 1-SHIP-1*) gibi transkripsiyon faktörleri ve sitokin salınımı ile ilgili genlerin ifadesini düzenledikleri belirlenmiştir (11, 12) miR-21'in ilk olarak birçok kanser türünde aşırı ifade edildiği gösterilmiş ardından tümör gelişimi aşamasında işlevi olduğu düşünülmüştür. Ayrıca, Toll benzeri reseptör (*Toll like receptor-TLR*) sinyal yolağında interlökin 1 reseptör-ilişkili kinaz-1 (*interleukin 1 receptor-associated kinase 1-IRAK1*) ve miyeloid farklılaşma birincil cevap geni 88 (*myeloid differentiation primary response gene 88-MyD88*) gibi hedefler üzerinden, yolağın negatif düzenleyicisi olarak işlev gösterdiği belirlenmiştir (13). miR-146a'nın ise lipopolisakkarit (LPS) uygulanmış THP-1 hücrelerinde ifadesinin arttığı, ifade artışının da nüklear faktör NF-kappaB (NF-κB) aracılığı ile olduğu gözlenmiştir (14). miR-146a'nın bağlandığı hedefleri içerisinde IRAK1 ve tümör nekroz faktörü reseptörü-ilişkili faktör 6 (*tumor necrosis factor receptor-associated factor 6-TRAF6*) bulunmaktadır. Hedefleri üzerinden IL-1β, interlökin 6 (IL-6) ve tümör nekroz faktörü alfa (TNF-α) salınımını düzenledikleri belirlenmiştir (15). Bu çalışmalar, inflamatuvar cevap sürecinde miRNA'ların önemli işlevleri olduğunu göstermektedir.

Bu tez kapsamında AAA hastalığında inflamasyonu etkilediği düşünülen miRNA'lar belirlendi. İnflamasyon sürecinde rolü olması beklenen bu miRNA'ların belirlenmesi, AAA tanısı açısından aday biyobelirteç olma özelliğini taşıyabileceği gibi, uzun vadede tedavi amaçlı hedef molekül olarak kullanılabilmelerine de olanak sağlayabilecektir.

## 2. GENEL BİLGİLER

Doğal bağışıklık sisteminin bir parçası olan inflamasyon; patojenler, hasarlı hücreler ya da irritanlar gibi zararlı uyarılara karşı organizmanın verdiği biyolojik bir cevaptır. Hasarlı bölgedeki çeşitli hücreler, vasküler sistem ve bağışıklık sistemini kapsayan bir yolak ile inflamatuvar cevap oluşturulmaktadır (16).

İnflamatuvar cevaplar hem enfeksiyonları hem de tümörleşmeyi engelleyen oldukça faydalı tepkilerdir. Bu cevapların eksikliğinde herhangi bir organizmanın hayatını devam ettirebilmesi mümkün değildir. Ancak, aşırı uyarılma veya immün cevabın sonlanmasındaki hatalar kronik inflamasyon veya otoimmüniteye yol açabilmektedir. Bu yüzden immün cevaptaki pro- ve anti-inflamatuvar faktörlerin dengesi hayatta kalmak ve sağlıklı olmak için gerekmektedir.

İnflamasyon süreci, ilk olarak nötrofillerin ve daha sonra diğer bağışıklık sistemi hücrelerinin hasarlı dokudan gelen kemoatraktan sinyaller doğrultusunda inflamatuvar bölgeye doğru göç etmeleri ile başlamaktadır (17,18). İnflamasyon sürecinde dokularda sayıca artan nötrofiller, oradaki görevlerini tamamladıktan sonra apoptoza girmektedir. Hücre kalıntıları ise, makrofaj ve dendritik hücreler tarafından fagositozla yok edilmektedir (19).

### 2.1. Kan Hücreleri ve İmmün Cevap

Lökositler (beyaz kan hücreleri) patojen saldırıları ve her türlü doku hasarına karşı aktive olan hücre gruplarıdır. Lökositler, kılcal damarların, doku hücrelerinin ve diğer bağışıklık hücrelerinin sinyalleri tarafından uyarılarak enfeksiyonlu bölgeye doğru göç etmektedirler. Uyarıma karşı iltihaplı bölgeye oksijensiz ortamda bile gidebilmektedirler. Son yıllarda, uyarım sırasında birçok sinyalin lökositler tarafından da verildiği, diğer lökositleri uyararak enfeksiyonlu bölgelere göç etmelerini sağladığı belirlenmiştir (20). Ancak lökositlerin uzak mesafelerdeki dokular ve bağışıklık hücreleri ile kurdukları iletişimin bozulduğu durumlarda ortaya kronik bir inflamasyon tablosu çıkmaktadır.

Lökositler, özelleşmiş uyarım mekanizmaları ile enfeksiyon ve travma bölgelerini bulabilmekte, birçok engele rağmen kan damarlarında ve dokularda göç etmektedirler. Göç sürecinin tamamı, kan damarlarından, dokulardan, bağışıklık sistemlerinden ve sinir sistemlerinden katılan birçok hücreden gelen sinyallerle

düzenlenmektedir (21). Lökositler, görevlerini tamamladıktan sonra programlanmış hücre ölümü veya otofaji ile ortadan kalkmaktadır. Yeni bulgular, lökositlerin göç ettikleri bölgelerden daha karmaşık sinyaller gönderdiklerini ve dokudan tekrar kana dönerek işlevlerine devam ettiklerini göstermiştir (20).

Lökositler, ekstraselüler matriks ile kimyasal gradyanlara ve sitokin sinyallerine cevap vermektedir. Bireysel hücreler, farklı aktin-miyozin motorlarının, dinamik iskelet yapılarının ve geçiş tübüllerinin çalışmasıyla sağlanan farklı üç boyutlu ortamlar için birden fazla hareket türüne sahiptirler. İçeriklerinde inflamasyon yanıtını artırabilen ve mikropları öldüren reaktif oksijen türleri (*Reactive oxygen species*-ROS) olarak adlandırılan moleküller üretmektedirler. ROS'lar ayrıca düzenleyici sinyaller olarak kullanılmaktadırlar. Diğer birçok sitokin sinyalini de kullanarak proteaz enzimleri üretmektedirler. Yapılarında bulunan granüller, farklı zamanlarda kullanılan 300'den fazla farklı protein barındırmaktadır (22). Bu proteinler, patojenleri öldürmek için görevli birçok enzim ve toksinden oluşmaktadır.

Hasarlı doku tamir edildiğinde veya patojenler temizlendiğinde lökositler yok edilmektedir. İltihaplı dokunun kronik bir hasar kaynağı haline geldiği durumlarda lökositler hayati önem taşımaktadır. Lökosit grubu içerisinde bulunan farklı hücre gruplarının da bu süreçte önemli görevleri bulunmaktadır. İnflamatuvar hücre göçü sürecinde, hasarlı dokuya ilk olarak ulaşan hücreler nötrofiller olup daha sonra monositler, lenfositler ve diğer bağışıklık sistemi hücreleri de bu sürece katılmaktadır (23).

### 2.1.1. Nötrofiller

Nötrofiller, polimorfonükleer hücreler olarak da bilinmektedir. Nötrofiller, patojenler veya konak hücreden salınan kimyasallara ve gradiyent oluşturan kemoatraktanlara karşı cevap oluşturup, uyarılırlar (24).

Lökositler içerisinde en yaygın bulunan hücre gruplarıdır. Normalde yaşam süreleri kısa olmalarına rağmen yakın zamanda komşu hücreleri aracılığıyla yeniden kan dolaşımına katıldıkları ve hasarlı bir başka bölgeye gittikleri gösterilmiştir. Nötrofillerin üretimi, sitokin granülosit koloni uyarıcı faktör (granulocyte-colony stimulating factor-G-CSF) gibi özgül sinyaller tarafından tetiklenmektedir (25).

Nötrofiller, DNA, histonlar ve diğer proteinlerden üretilen bir iskeleden oluşan nötrofil hücre dışı tuzaklar (*neutrophil extracellular traps-NEt*)'ları olarak adlandırılan yapı oluşturmaktadır. NEt'ler, mikroplara tutunarak enzimlerin dokulara ve mikroplara saldırmasına yardımcı olmaktadır. Ayrıca dendritik hücreler gibi diğer hücrelere de sinyal göndermektedir (26).

Stres nötrofillerin üretimini (granülopoiez) artırır ve bu süreçlerin bir kısmı kronik durumlarda ortaya çıkmaktadır. Nötrofillerle trombositler sıkı bir etkileşim içerisindedirler. Trombositler artrit, ateroskleroz ve bağırsak hastalıklarının kronik iltihaplanmasında da rol oynarlar. Bazı tetikleyici NEt'lerin daha fazla kan damarı plakına neden olduğu gösterilmiştir (27).

Akut inflamasyonda, çoğunlukla nötrofiller görevlidir ancak kronik inflamasyonda, monositler ve makrofajlarda önemli rollere sahip olurlar. Bu durumda, nötrofillerden gelen sinyaller monositleri uyarır.

### 2.1.2. Monositler ve Lenfositler

Monositler kanda dolaşan genç lökositlerdir. Kandan ayrıldıktan ve dokuya göç ettikten sonra makrofajlara dönüşürler. Karaciğerde, doku makrofajları Kupffer hücreleri olarak adlandırılır ve bağırsaktan çıkmış olan kandan zararlı ajanları çıkarmada uzmanlaşmışlardır. Alveolar makrofajlar, akciğerde solunmuş zararlı ajanları uzaklaştırır. Dalaktaki makrofajlar ise eski veya hasarlı kırmızı kan hücrelerini ve trombositleri dolaşımdan uzaklaştırır. Makrofajlar ayrıca antijenleri diğer bağışıklık hücrelerine sunan ve bir bağışıklık tepkisini tetikleyen "antijen sunan hücreler" dir (28).

Lenfositler, lenfoid kökenli hücre gruplarından oluşmaktadır. B lenfositleri antikor üreten hücreler haline gelmektedir. Antikorlar özgül bir antijene bağlanır ve bağışıklık hücrelerinin antijeni yok etmesini kolaylaştırır. T lenfositler antijenlere doğrudan saldırır ve bağışıklık yanıtını kontrol etmeye yardımcı olur. Ayrıca, tüm bağışıklık yanıtını kontrol eden sitokinleri de serbest bırakırlar. B ve T hücreleri oluştuğunda, bağışıklık sisteminiz için "hafıza" sağlanmış olmaktadır (28).

Bağışıklık sistemi, bağışıklıkta görev alan hücrelerle beraber vücudun kendisine yabancı ve zararlı görünen bakterilere, virüslere ve maddelere karşı



oluşturduğu savunma sistemidir. Kazanılmış (edinilmiş) ve doğal (özgül olmayan) bağışıklık olmak üzere iki çeşit bağışıklık sistemi bulunmaktadır.

## 2.2. Doğal Bağışıklık Sistemi

Doğal ya da özgül olmayan bağışıklık sistemi doğuştan gelen bir savunma sistemidir ve patojenlerin vücuda girmesini engellemek için programlanmışlardır. Bu engeller, bağışıklık sisteminin ilk savunma hattını oluşturmaktadır. Bu savunma hattında hücrelerin uyarımında ve alt sinyal yollarında cevabın gerçekleşmesini sağlayan bir protein grubu bulunmaktadır. Bu gruptaki proteinler; reseptörler, sitokinler, kemokinler ve transkripsiyon faktörlerinden oluşmaktadır.

### 2.2.1. Toll-like Reseptörler

TLR'ler, patojenlerin evrimsel olarak korunmuş motiflerini tanımaktadır. Bu motiflere patojen-ilişkili moleküler paternler (*pathogen associated molecular patterns*-PAMPs) denilmektedir (29). İnsanda her biri özgül ligand bağlanma sınıfı içeren toplam 10 TLRs (TLR1- TLR10) bulunmaktadır.

TLR1, TLR2, TLR4, TLR5 ve TLR6 birincil olarak hücre düzeyinde ifade olup, bakteri, mantar ve protozodan gelen PAMP'ları tanırlar (30). TLR2, gram-pozitif bakterilerin veya mantarların hücre duvarındaki çeşitli lipopeptidleri de tanımaktadır. TLR1 ve TLR6 ile heterodimer yapısı oluşturmaktadır (31). TLR4, gram-negatif bakterilerin hücre duvarının önemli bileşeni olan LPS'i tanımaktadır (32). TLR5 ise kamçıli bakterilerin kamçılarındaki evrensel süreçte korunmuş globüler protein olan flagellini tanımaktadır (33).

TLR3, TLR7, TLR8 ve TLR9 hücrenin endozomal kompartmanlarında yerleşim gösterir ve temel olarak viral ve bakteriyel nükleik asitleri tanımaktadır. TLR3, memeli hücrelerinde normalde bulunmayan RNA virüsleri tarafından üretilen çift-zincirli RNA (*double stranded* RNA-dsRNA)'yı tanımaktadır (34). Bazı belirli susturucu RNA (*silencing* RNA-siRNA)'ların TLR3 uyarımını tetikleyip, RNA interferans (RNAi) temelli ilaçlar için ciddi bir yan etkiye yol açtığına dair çalışmalar bulunmaktadır (35). TLR7 ve TLR8 ise daha çok viral kaynaklı olan tek-zincirli RNA'yı tanımaktadır (36, 37). TLR9, memeli hücrelerinde çok nadir görülen ancak

bakteriyel ve viral DNA'da çoğunlukla bulunan metile olmayan CpG motiflerini tanımak için özelleşmiştir (38)

Günümüze kadar TLR10 için herhangi bir ligand tanımlanmamış olup, periferel kan mononükleer hücrelerinde (*Peripheral blood mononuclear cells-PBMCs*), TLR2 aracılığı oluşan aktivasyonları inhibe ettiği düşünülmektedir (39). Tüm PBMC'lerde TLR1- 10'un ifade edildiği bildirilmiştir (40).

TLR'ler tarafından ligandların tanınması hücre içerisinde sinyal yollarını uyarıp, hücrenin uygun inflamatuvar cevabı vermesini sağlar. Temelde iki önemli sinyal yolağı bulunmaktadır. Bunlar; MyD88-bağımlı pro-inflamatuvar sitokinlerin ve kemokinlerin üretim yolağı ve TIR domain içeren adaptör tetiklenen interferon- $\beta$  (*TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- $\beta$ -TRIF*) bağımlı anti-viral interferonların ifade yolağıdır (41).

Tüm TLR'ler IL-1 reseptörlerinde bulunan hücre içi Toll/IL-1 (TIR) domaini içermektedir (42). Ligandın bağlanmasıyla TLR'lerin dimerizasyonu meydana gelir, bu durumda hücre içi adaptör moleküllerinin TIR domainine bağlanması gerçekleşir. Bilinen 4 adaptör molekülü MyD88, TRIF, translokasyon ilişkili membran proteini (*translocation associated membrane protein-TRAM*) ve TIR domaini içeren adaptör protein/MAL (*TIR domain containing adaptor protein/MAL-TIRAP/MAL*)'dır (43). TLR3 dışındaki tüm TLR'ler aktivasyondan sonra MyD88'i bağlar.

MyD88- bağımsız gerçekleşen sinyal yolağında, TLR uyarımı sonrasında, TRIF direkt olarak TLR3'e, TRAM'da TLR4'e bağlanır. MyD88-bağımlı yolağın tersine, TRIF aktivasyonu tip I interferonlarını üreterek bir şekilde antiviral bir cevap oluşturur. Kısacası bu yolak ile TRIF, TRAF3 ve TRAF6'ya bağlanıp, onları aktive eder. TRAF6, NF- $\kappa$ B ve mitojen aktive edilmiş protein kinaz (*mitogen-activated protein kinase-MAPK*) yollarını aktive ederken; TRAF3, interferonlar ve diğer antiviral genlerin ifadesini düzenleyen bir transkripsiyon faktörü olan IRF3 aktivasyonunu tetikler (41).

### 2.2.2. NF- $\kappa$ B

NF- $\kappa$ B, patojenlerle karşılaşma, inflamatuvar sitokinler, ultraviyole (UV) ışınlar veya serbest radikaller gibi hücresel streslere cevap olarak aktive olan bir transkripsiyon faktörüdür. Bilinen 5 farklı NF- $\kappa$ B proteinleri bulunmaktadır. Bunlar

p65 (RelA), RelB, cRel, p50 ve p52'dir (44). Transkripsiyon faktörlerinden NF- $\kappa$ B ailesi homo- veya heterodimerler olarak görev almaktadırlar. Farklı kombinasyonlara bağlı olarak, NF- $\kappa$ B transkripsiyonel bir aktivatör olabileceği gibi bir represör de olabilmektedir. Hücrenin pro-inflamatuvar uyarılardan IL-1, TNF- $\alpha$  veya TLR sinyalleri ile uyarılması I $\kappa$ B kinaz (IKK) kompleksinin aktivasyonunu sağlar (45). Aktive olan IKK kompleksi I $\kappa$ B proteinlerini fosforlar bu da proteinleri hızlı bir yıkıma götürür. Bu klasik yolak çoğunlukla NF- $\kappa$ B alt ünitelerinden p50 ve p65'i serbest bırakır, böylece çekirdeğe yerleşip, transkripsiyon faktörü gibi davranır.

Ailevi Akdeniz Ateşi (AAA) ile ilişkili B30.2 mutasyonlarını barındıran pyrin varyantları, normal tipteki pyrinden daha verimli olarak kesime uğramaktadır. Bu durumda, N-terminali bölünmüş fragman, NF- $\kappa$ B'nin p65 alt birimi ile etkileşime girip ve sırasıyla 15-aa bZIP temel alanı ve bitişik diziler aracılığıyla I $\kappa$ B- $\alpha$  ile etkileşip, çekirdeğe yerleşir. N-terminal fragmanın p65 ile etkileşimi p65'in çekirdek içersisine girişini arttırmıştır. Pyrin ve I $\kappa$ B- $\alpha$  kesim ürünlerinin AAA hastalarından alınan lökositlerde, sağlıklı kontrollere kıyasla önemli ölçüde arttığı belirlenmiştir (46).

NF- $\kappa$ B aktivasyonun periferik kan nötrofil ve monosit/makrofaj hücrelerinde inflamatuvar cevapta, apoptozda ve hücre proliferasyonunda rol oynadığı da gösterilmiştir (47, 48).

### 2.2.3. Sitokinler

Sitokinler, farklı hücreler arasında sinyal akışını sağlayan küçük bir protein grubudur. Hormonlara kıyasla sitokinler dokuda çok az derişimlerde bulunur ancak ifadeleri çok kuvvetli etki yaratabilir. İşlevsel olarak, sitokinler inflamasyonun düzenlenmesinde görevlidirler. Herhangi bir uyarana karşı vücudun tüm hücrelerinden salgılanabilirler. Sitokinler, doku ve üretilen hücre arasında bir gradiyent oluştururlar, bu da uzaktaki hücrelerde azalan miktar yoğunluğa göre komşu hücreleri etkilemektedir. AAA patogeneziyle ilgili olabilecek sitokinler aşağıda kısaca anlatılmıştır:

IL-1 sitokinleri inflamasyonla oldukça yakından ilişkilidir. Doğuştan olan bağışıklık sisteminin en önemli düzenleyicileridir. IL-1 ailesi 11 üyeden oluşmaktadır. Bunlardan IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-18, IL-33, IL-36 $\alpha$ , IL-36 $\beta$  ve IL-36 $\gamma$  pro-inflamatuvar olarak görev alırken; interlökin 1 reseptör antagonisti (IL-1ra), IL-36ra, IL-37 ve IL-

38 anti-inflamatuvar özelliktedir (49). IL-1 sitokinleri TLR ligandlarına benzer bir sinyal yolağını tetiklemektedir. Bu nedenle NF- $\kappa$ B ve MAPK yolaklarının aktivasyonu gerçekleşmektedir.

**IL-1 $\alpha$**  ve **IL-1 $\beta$** , birçok hücre tarafından doku hasarı veya patojenik motiflerle etkileşime karşı çok hızlı bir şekilde üretilmektedir. IL-1 $\alpha$ , nekroz sonrasında salınarak steril inflamasyonda görev almaktadır (50). IL-1 $\beta$  ise olgun formda AAA hastalığında kaspaz-1'nin olgunlaşmasını sağlayarak AAA patogenezinde görevli pyrin inflamazomunun uyarımını gerçekleştirmektedir. Bir reseptör antagonisti olan **IL-1ra** ise IL-1R1 reseptörünü herhangi bir cevaptan bağımsız olarak bloke etmektedir. Bu nedenle IL-1ra anti-inflamatuvar olarak davranmaktadır.

Transforme edici büyüme faktörü beta (*Transforming growth factor beta - TGF- $\beta$* ), multipotent bir sitokin olup güçlü bir kemoatraktan potansiyeli bulunmaktadır. TGF- $\beta$  sinyal yolağının inflamasyon, proliferasyon, apoptoz ve hücreler arası matriks (*Extracellular matrix-ECM*) depozitlerinin oluşması süreçlerinde görev aldığı belirlenmiştir (51, 52).

**TNF- $\alpha$** , pro-inflamatuvar bir sitokindir. **TNF- $\alpha$**  sinyal yolağının hem TGF- $\beta$  sinyal yolağı üzerinden hem de hücre membranındaki reseptörler aracılığıyla uyarımının gerçekleştirildiği, uyarım sonrası matriks metalloproteinaz (MMP)'ların, pro-inflamatuvar, kemokin ve anti-apoptotik genlerin ifadesinin arttığı gözlenmiştir (53).

#### 2.2.4. Kemokinler

Kemokinler, yönlü kemotaksisi tetikleyen, hücreler arası iletişimi sağlayan küçük peptidlerdir (54). Günümüzde farklı yapısal ailelerde 40'dan daha fazla kemokin bulunmaktadır. Bazı kemokinler sürekli salınırken, çoğu inflamatuvar özellikte olup uyarım sonrası salınmaktadır. Bir hücreden kemokinlerin salınmasıyla doku içerisinde kemotaktik derişim gradiyenti oluşmaktadır. Göç eden hücreler, kemokin reseptörleri sayesinde bu gradiyenti takip ederek kemokin üreten hücreye doğru göç ederler. Kemotaktik gradiyent ayrıca kan hücreleri tarafından da ulaşılır ve bu sayede dolaşımdan dokuya doğru immün hücrelerin geçişi sağlanır (55). Farklı hücre tipleri farklı kemokin reseptörlerini ifade etmektedir; Bu nedenle belirli kemokinlerin salınımı özgül immün hücreleri etkilemektedir.

İnflamatuvar bir uyarım sonrası, hasarlı hücreler tarafından salınan kemokin karışımları, koordineli bir şekilde nötrofil ve monosit hücrelerini uyarmaktadır. IL-8, kemokin (C-X-C motif) ligandı 1 (CXCL1) ve CXCL2 kemokinleri, nötrofil reseptörlerinden kemokin (C-X-C motif) reseptörü 1 (CXCR1) ve CXCR2 tarafından tanınır. Bu sayede nötrofiller inflamatuvar bölgeye doğru çekilirler (56).

### **2.3. Ailevi Akdeniz Ateşi**

#### **2.3.1. Ailevi Akdeniz Ateşi Hastalığının Genetik Temelleri**

AAA, 16. kromozomda bulunan MEFV geninde meydana gelen mutasyonlar sonucu oluşan otozomal resesif kalıtıma sahip otoinflamatuvar bir hastalıktır (4, 57). MEFV geni, 1997 yılında iki farklı grup tarafından tanımlanmıştır. 16. kromozomun kısa kolunda (16p13.3) yer alan gen, 3505 nükleotid içermekte ve 10 ekzondan oluşmaktadır. MEFV geni, pyrin proteinini kodlamaktadır (4).

AAA, tekrarlı ateş atakları ile serozal, sinoviyal ve kutanöz inflamasyon ile karakterize edilen bir hastalıktır. Hastalığın en önemli komplikasyonu sekonder olarak gelişen amiloidozisdir. Bazı hastalarda, ilerleyen amiloid birikimine bağlı olarak nefrotik sendromlar ve böbrek yetmezliği görülebilmektedir (58, 59).

Günümüze kadar 340 MEFV gen varyasyonu tanımlanmış ve bunlardan 205 tanesinin AAA klinik bulguları ile uyumlu olduğu bildirilmiştir (Infevers veri tabanı, <http://fmf.igh.cnrs.fr/ISSAID/infevers/search.php?n=1>, 2018). Yaygın olarak görülen M694V, M680I, M694I ve V726A mutasyonları genin 10. ekzonunda bulunmaktadır (60). Doğu Akdeniz kökenli insanlar arasında özellikle Yahudiler, Türkler, Ermeniler ve Araplar'da çok sık rastlanan (1/250-1/1000) AAA, Avrupa toplumlarında da görülmektedir (58).

Türk AAA hastalarında en sık görülen MEFV gen mutasyonları; M694V (%51,4), M680I (%14,4), V726A (%8,6), E148Q (%3,5) ve M694I (%1,7) olarak rapor edilmiştir (2, 3).

Pyrin genellikle monositler ve nötrofillerde ifade edilmektedir fakat dendritik hücreler, deri ve sinoviyal fibroblastlarda da ifade edilebildiği bilinen bilgiler arasındadır. 781 aminoasitten oluşan pyrin, 86 kDa moleküler ağırlığında, arjinin ve lizin aminoasitlerince zengin, pozitif yüklü bir proteindir. Pyrin proteini, dört işlevsel bölge içermektedir. Bu bölgeler; amino ucu PYRIN bölgesi (PyD veya DAPIN), 'B

*box zinc finger*' bölgesi (zf-B-box), 'Coiled coil' bölgesi (PRY), karboksi ucu SPRY bölgesi olarak isimlendirilmektedir (61).

Pyrinin AAA hastalığındaki patogeneze etkisinin nasıl olduğu halen tartışılmakla birlikte, inflamasyonun düzenlenmesinde görev alan önemli bir protein olduğu düşünülmektedir. Transfekte hücre hatları (COS7, 293T, HeLa) ve monositlerde sitoplazmada, sinoviyal fibroblastlar ve nötrofillerde ise daha çok çekirdekte yerleşim göstermesi, pyrin'in farklı hücre tiplerine göre çeşitli proteinler ile etkileşime girerek farklı işlevleri olabileceğini göstermektedir (62).

Pyrin proteini, IL-1 $\beta$  üretimi için gerekli olan hücre içi bir inflamatuvar kompleks olan Nod benzeri reseptör proteini 3 (NLRP3)'ün bir parçasıdır. Bu nedenle AAA, bir inflamazomopati olarak da sınıflandırılabilir (63).

Pyrin ile inflamatuvar bir adaptör protein olan apoptoz ilişkili *speck* benzeri protein (*apoptosis-associated speck-like protein-ASC*) etkileşime girdiğinde, kaspaz-1 aktivasyonu gerçekleşmekte ve IL-1 $\beta$ 'nin işlenmesi gerçekleşmektedir (64). 2007'de, Yu ve ark.'ları (65) aktive edilmiş pyrinin ASC ve Prolin-serin-treonin fosfataz ilişkili protein 1 (*proline-serine-threonine phosphatase interacting protein 1-PSTPIP1*) ile etkileştiğini ve kaspaz-1'i doğrudan aktive eden ve daha sonra aktif IL-1 $\beta$  salgılanmasına yol açan bir trimoleküler bir kompleks oluşturduğunu göstermiştir. Booty ve ark.'ları (66) ise sağlıklı kontrollere göre AAA hastalarında pyrin ifadesinde anlamlı bir artış olduğunu göstermiştir. Grubumuzun yapmış olduğu bir çalışmada, Booty ve ark.'larının (66) tam aksine pyrin ifadesinin azaldığı belirlenmiştir (yayınlanmamış veri). Bu azalışın nedeni olarak promotör bölgesinde metilasyon analizi yapılmış ve mRNA dizi analizi ile yapılarak olası varyantların araştırılması yapılmıştır. Ancak anlamlı bulgular elde edilememiştir.

Chae ve ark.larının (67), işlevsel bir kazanımı modelini (*gain-of function*) destekleyen çalışmalarında, AAA ile ilişkili B30.2 mutasyonlarının *knock-in* edildiği farelerde, pyrin eksikliği olanlara göre daha şiddetli spontan inflamatuvar fenotip ortaya çıkmıştır. Öte yandan Papin ve ark.'ları (68) tarafından pyrin yıkımının kaspaz-1 uyarımını ve IL-1 $\beta$  salınımını arttırdığı gösterilmiştir. Hesker ve ark.'ları (69) tarafından yapılan bir başka çalışmada ise, MEFV geni eksik olan bir fare suşunda, inflamatuvar uyaranlara karşı cevap olarak makrofajlar tarafından IL-1 $\beta$  salınımı artmıştır. Bu çalışmalar işlev kaybı modelini (*loss-of-function*) göstermektedir.

Yakın zamanda grubumuzun yapmış olduğu hücre göçü çalışmaları ile MEFV geni baskılanan nötrofil benzeri hücre hattı (HL-60) 'nda hücre göçü oranının azaldığı belirlenmiştir. Hasta nötrofil hücrelerinde ise mutasyona bağlı olarak; M694V homozigot bireylerde hücre göçü artmış, birleşik heterozigot ve heterozigotlarda göç oranı M694V homozigotlara oranla daha az artmıştır (yayınlanmamış veri). Bu sonuçlar işlevsel kazanımı modelini (*gain-of function*) desteklemektedir. MEFV mutasyonlarının işlev kaybına veya işlev kazanımına neden olup olmadığı halen tartışmalı bir konudur.

AAA patogenezi aydınlatmaya yönelik yapılan güncel çalışmalarda, Xu ve ark.'ları (70) pyrinin, Rho GTPaz'ların bakteriyel modifikasyonları için özgül bir immün algılayıcı olduğunu ve nozokomiyal (hastane kökenli) ishalin nedeni olan *Clostridium difficile*'e yanıt verdiğini göstermiştir. Park ve ark.'larının (71) yaptığı bir çalışmada ise, pyrin mutasyona uğradığında veya GTPase RhoA'nın bakteriyel modifikasyonuna cevap olarak inflamasyon oluşturduğu, RhoA'nın, pyrin bağlayan ve fosforile eden serin-treonin kinazları PKN1 ve PKN2'yi aktive ettiğini gösterilmiştir. Fosforile olan pyrinin, pyrin inflamazomunu bloke eden 14-3-3 proteinine bağlandığı ve inflamazomu inaktive ettiği belirlenmiştir. 14-3-3 ve PKN proteinlerinin AAA ile ilişkili mutant pyrine bağlanması önemli ölçüde azalmış ve PKN1 ve PKN2'nin aktive edilmesi ile AAA hastalarının periferik kan mononükleer hücrelerinden salınan IL-1 $\beta$  azalmıştır. Aynı durum mevalonat kinaz (MVK) mutasyonları sonucu oluşan hiperimünoglobulinemi D sendromuna (HIDS) için de gerçekleşmiş, HIDS'de görülen prenilasyondaki defektler RhoA inaktivasyonuna ve bunun sonucunda pyrin inflamazomunun aktivasyonuna yol açmıştır (71). Bu veriler, pyrinin işlevine yönelik önemli bulgular elde edilmesini sağlarken, görünürde farklı olan iki otoinflamatuvar bozukluk arasında da ortak bir temel moleküler bağlantı olduğunu göstermektedir.

### **2.3.2. AAA Hastalığında Genotip-Fenotip İlişkisi**

AAA hastalığında üç farklı fenotip tanımlanmaktadır. Genellikle tekrarlayan kısa süren atak süreleriyle ilişkili iki MEFV mutasyonu ile karakterize olan tip 1; hastalığın ilk klinik belirtisi olarak amiloidozun görüldüğü "sessiz homozigot veya

bileşik heterozigot durum" ile karakterize olan tip 2 ve asemptomatik olarak belirtilen tip 3 çeşitleridir (72).

M694V mutasyonunun erken yaşlarda ortaya çıktığına ve genelde ağır seyreden bir fenotip gösterdiğine dair raporlar bulunmasına rağmen, tam tersini savunan çalışmalar da mevcuttur. M694V mutasyonunun Yahudi, Ermeni ve Arap hastalarda amiloid geliştirme riskini arttırdığı rapor edilmişse de (73) birçok hastada (Türk hastalarda dahil), bu mutasyon ile amiloidozis arasında bir ilişki saptanamamıştır (2).

V726A mutasyonu taşıyan hastalarda, hastalık bulguları daha hafif görülürken, bu mutasyona sahip Türk hastaların bir kısmında amiloid geliştiği gösterilmiştir (74).

Bütün bu bilgiler ışığında, MEFV genindeki mutasyonların amiloidozisin tek belirleyicisi olmadığı akıllara gelmektedir. Amiloidozis ile birlikte ateş ve karın ağrıları gibi diğer klinik bulguların da mutasyonlar ile ilişkisi araştırılmış ancak, anlamlı bir ilişkiye rastlanamamıştır. (75).

Hastalığa her zaman klinik belirtiler eşlik etmemektedir. Ayrıca, hastalığa neden olan mutasyonların penetrasyonu özellikle hastalığın nadir olduğu toplumlarda değiştiğinden dolayı, tanı ikilemine yol açmaktadır (76). MEFV genotiplemesinin tanıyı doğrulamasına rağmen genotip-fenotip eksikliği nedeniyle AAA korelasyonu ve AAA tanısı koymak genellikle zor olmaktadır (76).

AAA hastalarında genotip-fenotip korelasyonu test edildiğinde, tanımlanan mutasyonlar ile klinik semptomlar arasında büyük değişkenlikler görülebilmektedir. Aynı mutasyonu taşıyan, aynı ailenin üyeleri hastalar arasında da fenotipik heterojenite görülmüştür. Bu durum, AAA hastalığının otozomal resesif bir kalıtım gösterdiği tezini çürüterek, AAA'nın "klasik olmayan" otozomal resesif kalıtım modeline sahip olduğunu göstermektedir (77)

1992 yılında, AAA fenotipinden sorumlu gen lokusu tanımlandıktan sonra Musevi, Arap ve Ermeni AAA hasta aileleri ile yapılan haplotip analizlerinde, AAA hastalığında bir genetik homojenite olduğu gösterilmişse de (78), Türk AAA hasta aileleri ile yapılan bağlantı analizleri sonucunda bu hastalıkta bir heterojenitenin olduğu saptanmıştır (79). Diğer ülkelerden de benzer ailelerin bildirilmesi, bu hipotezi doğrulamıştır (80, 81). Ayrıca MEFV geninin tamamının taranması ile yapılan



mutasyon analiz çalışmaları sonucunda bu popülasyonlarda hala tanımlanamayan mutant allelerin oranının %15-18 arasında olduğu bildirilmiştir (82).

Bugüne kadar izlenen AAA hastalarının klinik bulguları ve genetik analizleri birlikte değerlendirildiğinde bazı hastaların AAA fenotipi açıklanamamaktadır. Çevresel faktörlerin ve modifiye edici genlerin AAA patogenezi üzerine etkisinin olabileceği öngörülmüştür. Özellikle AAA hastalığı ile ilgili modifiye edici genlerden biri olan serum amiloid A (SAA)'dan kodlanan SAA proteini, inflamasyon atakları sırasında ve sonrasında artmakta, başlıca böbreklerde olmak üzere çeşitli doku ve organlarda birikim olabilmektedir. Ancak SAA tek başına hastalık patogenezi düzenleyen bir faktör olarak kabul edilmemektedir.

Grubumuz tarafından ilk olarak her iki allelinde de MEFV gen mutasyonu bulunmayan fakat fenotipik olarak AAA klinik bulguları olan ve kolşisin tedavisi alan hastalar ele alındı. Bu hastalara aileleri ile birlikte *Affymetrix 250K SNP* çipler ile analiz yapıldı ve bu ailelerde 7. kromozomda bir aday bölge (7q33-7q36.1) tespit edildi. Homozigotluk gösteren 10 Mb'lık bu bölgedeki aday genlerden bazıları DNA dizi analizi ile taranıp elendi. Daha sonra, bu bölgedeki gen sayısının fazla olması nedeni ile hastalarda ekzom dizileme yöntemleriyle tüm ekzonlar analiz edildi. Varyasyon belirlenen 10 gende Sanger dizi analizi ile tarama yapıldı ve bu tarama sonucunda genlerde mutasyon tespit edilemedi. Ancak ilginç olarak miR-548F-4 adlı bir miRNA'da SNP ve INDEL değişiklikleri tespit edildi. İkinci olarak ise tek allelinde MEFV gen mutasyonu taşıyıp fenotipik olarak AAA klinik bulguları olan ve kolşisin tedavisi alan hastalar ele alındı ve bu hastalarda görülen AAA fenotipini açıklayabilmek için mutant allelin normal allele göre daha fazla ifade olabileceği hipotezinden yola çıkıldı ve allelik ifade kantitasyonu yapıldı. Tek allelinde M694V mutasyonu taşıyan AAA hastalarının normal ve mutant allellerinin ifade oranları M694V mutasyonu taşıyan ve AAA hastalığı için taşıyıcı olan bireylerin allel oranları ile karşılaştırıldığında, tek allelinde mutasyon taşıyan bireylerde normal allel ile mutant allel arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farkın ( $p>0.05$ ) olmadığı saptandı (yayınlanmamış veri).

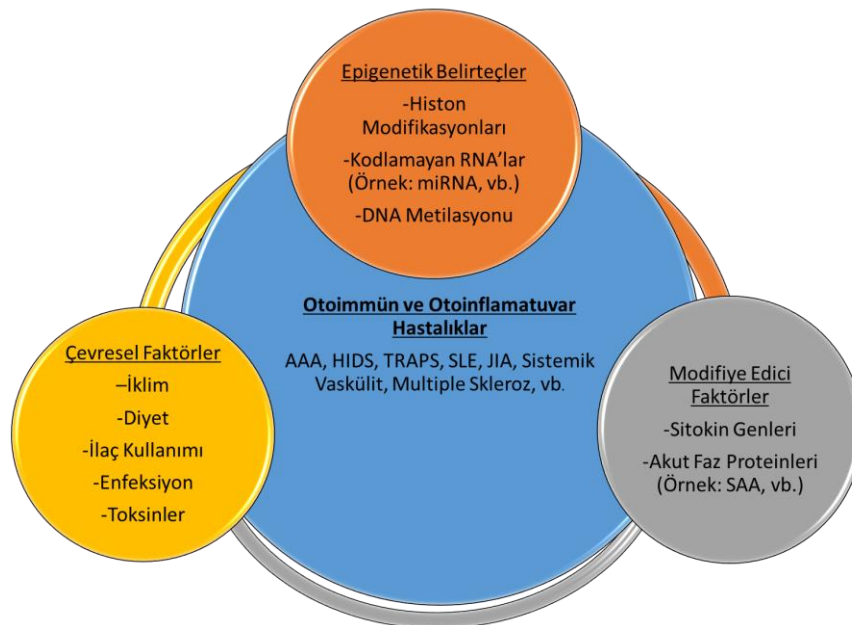
Grubumuzun ve diğer grupların yapmış olduğu çalışmalar birlikte değerlendirildiğinde, mutasyonu belirlenememiş bireylerde ve tek allelinde mutasyon olup hasta olan bireylerde atipik kalıtımın altında yatan nedenin ikinci bir gen olmadığı

ve allelik heterojenite ile açıklanamayacağı sonucu çıkmaktadır. Bu durumda aynı genotipe sahip ancak farklı fenotip gösteren bireyler için de bir açıklama yapılamamakta ve epigenetik modifikasyonların AAA hastalığının genotip-fenotip ilişkisine etki edebileceği akla gelmektedir.

#### 2.4. Epigenetik Faktörler ve AAA

Epigenetik, Conrad Waddington tarafından 1940'larda genleri ve fenotipi meydana getiren gen ürünleri arasındaki nedensel etkileşimleri inceleyen biyolojinin bir kolu olarak tanımlanmıştır (83). Günümüzde ise, kalıtsal olan ve DNA diziliminde bir değişikliğe neden olmayan gen ifadesindeki değişikliklerin incelenmesi olarak tanımlanmaktadır (84).

DNA metilasyonu, histon modifikasyonları ve kodlamayan RNA'lar olarak üç temel gruba ayırabileceğimiz epigenetik kontrol mekanizmaları, otoinflamatuar ve otoimmün hastalıkların patogenezinde de rol oynayabilmektedir (Şekil 2.1). *MEFV* geni üzerinde hem DNA metilasyonu hem de post-trankripsiyonel histon modifikasyonları gibi epigenetik düzenlemelerin yanı sıra miRNA'lar gibi genetik düzenleyicilerin de önemli olduğu düşünülmektedir.



**Şekil 2.1.** Otoinflamatuar ve otoimmün hastalıklardaki patofizyolojik etkenler.

AAA: Ailevi Akdeniz Ateşi, HIDS: Hiperimmünglobulinemi D Sendromu, TRAPS: TNF Reseptörü ile İlişkili Periyodik Sendrom, SLE: Sistemik Lupus Eritamatozus, JIA: Juvenil İdiyopatik Artrit.

Benzer genotipe sahip AAA hastaları, farklı hastalık fenotiplerini ifade edebilmektedir. Bu farklılık diğer modifiye edici genler, epigenetik faktörler veya çevrenin etkisinden kaynaklanabilmektedir. Çevresel faktörlerin ve mikrobiyotanın AAA hastalığının fenotipi üzerinde de oldukça önemli etkisi olabileceği düşünülmektedir. Doğu Akdeniz bölgesindeki hastaların, Avrupa'ya göç ettikleri takdirde daha az ciddi bir hastalık fenotipi gösterdiği belirlenmiştir (85). Daha önce Almanya'da yaşayan AAA'lı Türk çocuklarının, Türkiye'de yaşayanlara göre daha az ciddi bir hastalık fenotipi gösterdiği de tespit edilmiştir (86). Tüm bu bulgular, çevresel faktörlerin AAA hastalığı üzerindeki etkisini vurgulamaktadır.

Histon modifikasyonu, metilasyon ve miRNA'lar gibi epigenetik mekanizmaların da AAA patogenezinde rol oynayabileceği düşünülmektedir. Kirecetepe ve ark. (87), sağlıklı kontrollere kıyasla AAA hastalarında MEFV geninin ekzon 2 bölgesinin daha yüksek bir metilasyon düzeyi olduğunu göstermiştir. Epigenetik faktörlerden biri olan miRNA'lar ile ilgili olarak ise birçok çalışma bulunmaktadır.

#### **2.4.1. miRNA'lar**

İnsanlarda miRNA'nın keşfi, son 20 yıldaki en heyecan verici bilimsel gelişmelerden biridir. miRNA'lar, tipik olarak 20 ile 25 nükleotid uzunluğunda, proteinleri kodlamayan ancak gen ifadesini düzenleyen küçük RNA molekülleridir. İnsanda yaklaşık 2654 adet olgun miRNA (MiRBase, [www.mirbase.org](http://www.mirbase.org), 2018) tespit edilmiş ve bunların protein kodlayan gen ifadesinin %60'ını düzenlediği düşünülmektedir (88). Tek bir miRNA düzinelerce genin ifadesini düzenlemektedir (89).

miRNA'lar, genlerin transkripsiyon sonrası düzenleyicileri olarak görev yapan geniş bir ailedir. ~21-nükleotit uzunluğunda olup, ökaryotlarda birçok hücrel gelişim ve kontrol mekanizmasında görev almaktadır. miRNA'lar birçok hastalık için de tedavi hedefi olabileceği için oldukça önemli bir çalışma alanıdır.

Son yirmi yıllık araştırmalar ile miRNA biyogenezine katılan bileşenlerin birçoğu tanımlanmış ve miRNA işlevinin temel prensipleri belirlenmiştir (90). Son birkaç yılda yapılan çalışmalar ise, miRNA biyogenezinin çok sayıda protein

aracılığıyla düzenlendiğini göstermiştir. Bu düzenlemenin önemli bir rolü bulunmaktadır. miRNA'ların gelişim, fizyoloji ve hastalıklardaki görevlerinin tam olarak anlaşılması için miRNA'ların sentez, işleme ve kontrol mekanizmalarının aydınlatılması gerekmektedir (91).

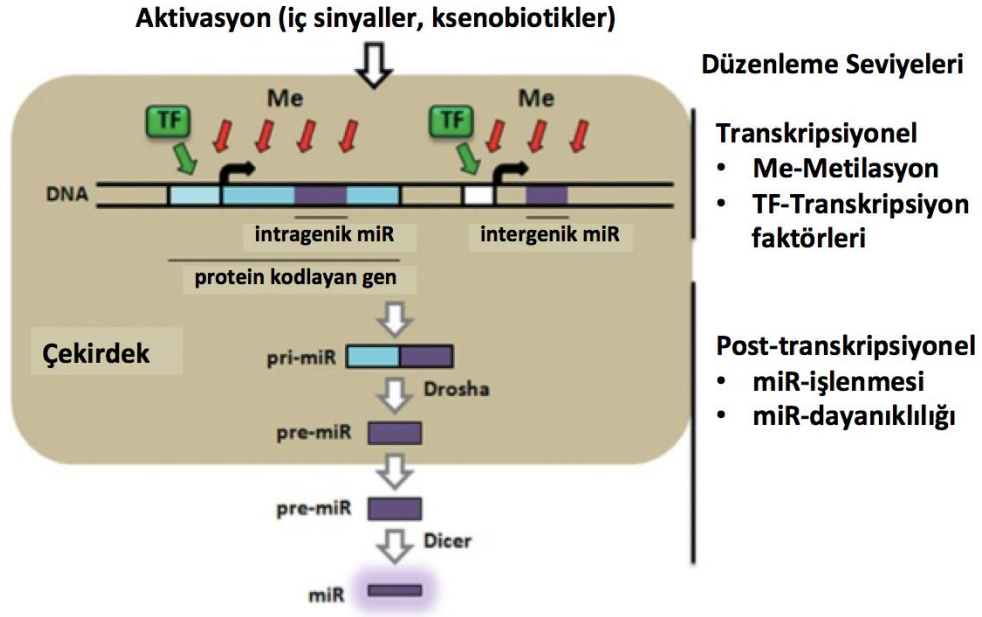
miRNA'lar protein ifadesini düzenleyen kodlamayan RNA'lar olup hücre ve dokulara özgü olarak miRNA genlerin intronlarından polimeraz II (pol II) aracılığıyla ifade edilmektedirler. Yaklaşık 70 nükleotid uzunluğundaki miRNA'lar çekirdekte primer mRNA'nın intron bölgelerinde saç tokası şeklinde kıvrılıp eşleşmekte ardından sitoplazmaya taşınmaktadır (92). Sitoplazmada bulunan Rnaz III enzimi (Dicer) RNA'ya bağlanmakta ve molekülü 21-23 nükleotid uzunluğunda kısa RNA parçacıkları halinde kesmektedir (93). Oluşan bu RNA'lar miRNA ile indüklenen susturum kompleksine (*miRNA-induced silencing complex*, miRISC) aktarılmaktadır (94). Argonat (Argonaute-AGO) proteinleri ve GW182 proteinleri miRISC'lerin oluşturulması ve işlevindeki temel faktörlerdir. Olgun miRNA zincirinin mRNA ile etkileşimi miRISC kompleksi içinde gerçekleşmektedir. miRISC yapısında bulunan miRNA, hedef mRNA'nın 3'-translasyonu olmayan bölgesindeki belirli nükleotidleri ile eşleşebilmektedir (5). Bu eşleşme başlangıç faktörlerinin mRNA'ya bağlanmasını engelleyerek translasyonu baskılamaktadır.

miRNA transkripsiyonunun aktivatörleri ve represörleri de miRNA genlerinin transkripsiyonu, protein kodlanmasına benzer bir şekilde düzenlenir. Birçok transkripsiyon faktörü (TF) ve diğer proteinler miRNA ifadesini doku veya gelişimsel bir şekilde pozitif veya negatif olarak düzenlemektedir. Örneğin, TF'leri c-Myc, N-Myc ve p53 miRNA ifadelerini de düzenlemektedir. MikroRNA işlenmesinin düzenlenmesi pri-miRNA işleme ve transkriptlerin 5'-terminalini kapatma ile bağlantılıdır. Arsenik dirençli protein (*Arsenic resistance protein 2-ARS2*), Drosha ile etkileşerek, pri-miRNA kararlılığını sağlamaktadır. Drosha ve Dicer genellikle çift iplik RNA bağlayıcı proteinler (*double stranded RNA binding proteins-dsRBPs*)'lerle beraber kompleks olarak çalışırlar. miRNA'ların birikimi ve seviyeleri, tüm bu proteinlerin aktivitelerini etkileyen düzenlemelerle regüle edilmektedir.

miRNA'ların, bağışıklık yanıtı, hücre döngüsü kontrolü, metabolizma, viral replikasyon, kök hücre farklılaşması ve büyüme-gelişme dahil olmak üzere çeşitli

biyolojik süreçlerde ayrılmaz bir rol oynadığı gösterilmiştir. Çoğu miRNA, birden fazla tür arasında korunmuştur. Bu durum, miRNA'ların kritik biyolojik yollarda evrimsel öneme sahip düzenleyiciler olduğunu göstermektedir. miRNA ifadesinin veya işlevinin kanser, kalp yetmezliği ve viral enfeksiyonlar dahil olmak üzere birçok hastalık durumunda önemli ölçüde değiştiği gösterilmiştir (90). miRNA'ların antisens oligonükleotid inhibitörleri veya miR-*mimic*'lerinin kullanımı, biyolojik yolları düzenleyerek hastalığın tedavisi için eşsiz bir yaklaşım oluşturmaktadır. miRNA'larla tedavi yaklaşımına yönelik çalışmalarda, immüno-inflamatuvar hastalıklar, onkoloji, kardiyovasküler ve metabolik hastalıklar, Hepatit C enfeksiyonu, fibrozis dahil olmak üzere birçok hastalıkta başarılı sonuçlar elde edilmektedir (91).

miRNA'ların işlevini ve aday genlerini aydınlatmaya yönelik çalışmalar kadar, miRNA'ların ifadelerinin değişme nedenlerine yönelik araştırmalar da oldukça önemlidir. İç sinyaller (hormonlar, sitokinler, vb.) ya da ksenobiyotikler (kimyasallar, patojenler) aracılığıyla gerçekleşecek miRNA ifadesinin düzenlenmesinin araştırılması için genel olarak iki yaklaşım bulunmaktadır. Bu yaklaşımlardan ilki genomda miRNA'yı kodlayan bölgeyi araştırmaktır. miRNA'nın gen içi (intragenik) ya da genler arası kodlamayan bölgelerden (intergenik) mi ifade olduğu belirlenmelidir. İntragenik ifade olan miRNA'ların buldukları genin regülasyonuna bağlı olarak ifadeleri değişmekte, genin promotör bölgesinin düzenlenmesi miRNA'nın ifadesini de etkilemektedir (95). miRNA'lar intergenik bölgelerden kodlandıkları durumda, kendilerine özgü promotör bölgeleri bulunmaktadır. Promotör bölge regülasyonunda transkripsiyon faktörlerinin önemli bir rolü bulunmaktadır. Ayrıca, her iki durumda da etkili olan bir diğer mekanizma ise CpG adacıklarının metilasyon durumudur. İkinci yaklaşım ise post-transkripsiyonel olarak miRNA'ların işlevsel analizidir. Bu noktada, miRNA'ların işlenme süreçleri, yarı ömürleri, yıkım mekanizmaları araştırılmaktadır (95) (Şekil 2.2).



Şekil 2.2. miRNA işlenmesi ve ifadelerinin düzenlenmesi. (95).

#### 2.4.2. miRNA'ların Otoimmün ve Otoinflamatuar Hastalıklarla İlişkisi

Her hücre tipi tarafından ifade edilen miRNA repertuarının oldukça özgül olduğu bilinmektedir. Benzer şekilde, farklı dokuların miRNA ifade paternleri de karakteristik olup, özgül doku özelliklerinin ve işlevlerinin şekillenmesine katkıda bulunmaktadır. Bazı miRNA'lar, belirli dokularda veya hücre tiplerinde bile sürekli olarak ifade edilmektedir. Bu nedenle, kanser, hematolojik, kardiyovasküler ve nörolojik hastalıklardan bağışıklık sisteminin işlev bozukluğunun neden olduğu patolojik koşullara kadar geniş bir yelpazede insan hastalıkları için de özgül bir miRNA ifade paterninin tanımlanabileceği şaşırtıcı değildir (96-99). miRNA'lar, sadece kendi genleri içinde gen ifadesini etkilemekle kalmaz, aynı zamanda hücreler arası iletişimi destekleyen sinyal molekülleri olarak da hareket ederler. Son araştırmalar, miRNA'ların eksozomlar veya mikro-tanecikler halinde paketlenbildiğini ve daha sonra hücrelerden çevreleyen dokuya ya da dolaşım içine salınabildiği belirlenmiştir (100-102). Diğer hücre dışı RNA moleküllerinin aksine, zarla çevrelenmiş veya lipide bağlı hücre dışı miRNA'ları oldukça karardır ve kan, tükürük, bronşiyal salgılar, idrar ve anne sütü dahil olmak üzere neredeyse tüm vücut

sıvılarında tespit edilebilir. Bu özgün özellikler (hastalık özgüllüğü, yüksek stabilite ve erişilebilirlik) nedeniyle, miRNA'lar, özgül hastalıkların tanısı için yararlı klinik biyobelirteçler olarak ve tedavi yanıtlarını izlemek açısından oldukça önemlidir. Geniş düzenleyici özelliklerinden dolayı miRNA'lar tedavi hedefi olarak da yüksek bir potansiyele sahiptir (103).

Son yıllarda miRNA'lar ile ilgili çok fazla çalışma yapılmış ve bu çalışmalarda birçok miRNA'nın inflamatuvar hastalıklarda inflamatuvar süreçlerin düzenlenmesinde görevli olabilecekleri belirlenmiştir (6). B ve T hücrelerinin gelişme ve farklılaşması, monosit ve nötrofillerin proliferasyonu, antikör aktivasyonu ve inflamatuvar düzenleyicilerin salınması gibi immün cevap ile ilişkili yollarda etkili çok sayıda miRNA tanımlanmıştır (8). Romatoid artrit (RA), *multiple* skleroz (MS), sistemik lupus eritematozus (SLE) ve bakteriyel enfeksiyonlarda hastalık patogeneğinde görevli miR-155 ve miR-146a gibi birçok ortak miRNA belirlenmiştir (6). Ayrıca son yıllarda, miR-21'in de birçok otoimmün hastalıkların (tip I diyabet, psoriyazis, MS, SLE, Sjogren sendromu (SS)) patogeneğinde etkili olduğu ve otoimmün cevapların düzenlenmesinde önemli rol oynayabileceği ortaya çıkmıştır (104-107). Tümör nekroz faktörü reseptör ilişkili periyodik sendrom (TRAPS) ve sistemik başlangıçlı juvenil idiopatik artrit gibi otoinflamatuvar hastalıklarda da ortak birçok miRNA bulunmaktadır (108, 109).

Bir otoimmün hastalık olan RA, sinoviyal eklem hasarı oluşturan hiperplazi ve kemik erozyonu ile karakterizedir. RA'da genellikle nötrofiller, monosit/makrofajlar ve sinoviyal fibroblast benzeri hücrelerden salgılanan değişik pro-inflamatuvar sitokinler ve kemokinler aracılığıyla T, B ve mononükleer antijen sunan hücreler (*Antigen presenting cells*-APC) ortama çekilip, sinoviyal mikroçevresinin eklem yıkımını teşvik eden proteazların salgılamasını teşvik etmektedir. RA dokularında, miR-15a, miR-16, miR-124a, miR-146a, miRNA-155, miR-203 ve miR-346'nın farklı ifade seviyelerinden oluşan benzersiz bir miRNA imzası tanımlanmıştır (110-113).

SLE çoğunlukla otoantikörler, otoreaktif bağışıklık kompleksleri ve kendiliğinden reaksiyon gösteren lenfositler aracılı otoimmün bir hastalıktır. Düzensiz immün yanıtlar böbreklerdeki endotel hücreler, mezangial hücreler ve podositler dahil olmak üzere birçok farklı hücre tipine zarar vermektedir. SLE, otoreaktif otoantikörlardan (örn. anti-DNA) kaynaklanmaktadır (114-116). Hastalık hakkında

çok şey öğrenilmiş olsa da, miRNA'ların SLE'nin patogenezi regülasyondaki hücrel ve moleküler rolü açıklığa kavuşturulmaya çalışılmaktadır. SLE hastalarında miR-21, miR-25, miR-125a, miR-146a, miR-148 ve miR-186'nın düzensiz ifadeleri rapor edilmiştir (117-121).

SS, özellikle ekzokrin bezlerin, özellikle tükürük ve lakrimal bezlerin kronik inflamasyonu ile karakterize sistemik bir otoimmün hastalıktır. Çoğu hastada ekstra glandüler bulgular da görülmektedir. Tandon ve ark.'larının (122) yapmış olduğu bir çalışmada, SS hastalarının minör tükürük bezlerinin RNA dizi analizi sonuçları bir dizi yeni miRNA'yı ortaya çıkarmıştır. Tanımlanan iki miRNA, miR-4524b-3p ve miR-4524b-5p, ATP-bağlayıcı kaset alt ailesi A üyesi 6 (ABCA6) geninin intronu içinde yer almaktadır (123).

MS, dünya çapında iki milyon insanı etkileyen bir otoimmün hastalıktır (124). Beyin ve omuriliği etkilemekte olup, bağışıklık reaksiyonları ve iltihap miyelin kılıfta bozulmaya neden olarak sinir uyarılarının iletimini yavaşlatır veya durdurur. Genellikle 20'li yaşlarda teşhis edilir ve genç erişkinlerde travmatik olmayan nörolojik yetersizliğin temel nedenidir (125). Yakın zamanda yapılan bir çalışmada, *relapsing-remitting* MS (RRMS) tanısı alan hastaların lenfositlerinde 365 miRNA'nın ifadesi analiz edilmiştir. MS hastalarında sağlıklı gönüllülerle karşılaştırıldığında farklılaşma sınıfı 4 T (cluster of differentiation 4 T-CD4 T), CD8 T'deki hücreler ve B hücrelerinde farklı miRNA ifade profilleri olduğu belirlenmiştir. Aynı çalışmada, miR17-5p'nin, MS hastalarının periferik kan CD4 T hücrelerinde ifadesinin arttığı ve tensin homoloji ve fosfatidilinositol-3-kinaz hedefleme düzenleyici alt birim 1'in bu miRNA'nın hedefi olduğu belirlenmiştir (126).

Tez kapsamında belirlenen aday miRNA'lar ile ilgili yapılan literatür araştırmalarının sonucunda, RA fibroblast benzeri sinoviyositlerde yapılan bir çalışmada miR-20a'nın TLR-4 yolağında önemli bir protein olan apoptoz sinyal düzenleyici kinaz 1 (*apoptosis signal-regulating kinase 1-Ask 1*)'in ifadesini düzenlediği belirlenmiştir (127). 3'UTR lusiferaz haberci deneyi sonuçlarına göre miR-20a'nın Ask-1'in direkt hedefi olduğu gösterilmiştir. Bir diğer çalışmada ise, miR-20a'nın makrofaj inflamatuvar cevabında, sinyal düzenleyici protein  $\alpha$  (Signal-regulatory protein  $\alpha$ -SIRP $\alpha$ )'nin ifadesini düzenlediği gösterilmiştir (128).



miRNA'lar ile otoimmün ve otoinflamatuvur hastalıklarla ilişkili yapılan güncel çalışmalar Tablo 2.1'de verilmiştir.

**Tablo 2.1.** miRNA'lar ile otoimmün ve otoinflamatuar hastalıklarla ilişkili yapılan güncel çalışmalar.

Hastalık	Hastalıktaki İfade Değişikliği		Çalışılan Hücre Hattı veya Doku	Hedef Gen	Etkilenen Sinyal Yolağı	Kaynaklar
	Artan	Azalan				
Romatoid Artirit (RA)	miR-143-3p		RA hastalarından alınan sinoviyum	IGFBP5	Ras/p38 MAPK	129
	miR-522		RA hastalarından alınan sinoviyal fibroblastlar	SOCS3	Pro-inflamatuar sitokinler ve matris metalloproteinazların (metalloproteinases-MMPs) ifadelerinin düzenlenmesi	130
		miR-29a	RA hastalarının serum, sinoviyal dokuları ve fibroblast benzeri sinoviositleri (fibroblast-like synoviocytes-FLS)	STAT3	Proliferasyonun inhibisyonu ve apoptozun tetiklenmesi	131
		miR-10a-5p	RA hastalarının sinoviyumu ve insan sinoviyal sarkoma hücre hattı SW982	TBX5	Eklemlerin inflamasyonunun düzenlenmesi	132

		miR-17	RA hastalarının serum, sinoviyal fibroblastları ve sinoviyal dokuları	TRAF2 ve cIAP2	TNF- $\alpha$ sinyal yolağı	133
	miR-126		RA hastalarının sinoviyal doku örnekleri ve sağlıklı kontroller	PIK3R2	Hücre proliferasyonu ve apoptoza direnç	134
Multiple Skleroz (MS)	miR-142		MS hastalarının beyin dokuları ve fareden izole edilen merkezi sinir sistemi (central nervous system-CNS) dokuları	TGFBR1 ve SOCS1	T hücreleri farklılaşmasının düzenlenmesi	135
		miR-140-5p	MS hastalarının periferel kan mononükleer hücreleri (peripheral blood mononuclear cells -PBMC)	STAT1	Ensefalitogenik yardımcı T tip 1 hücrelerinin farklılaşması	136
	miR-155-3p		MS fare modeli	Dnaja2 ve Dnab1	Isı şoku protein 40 (Heat Shock Protein 40-HSP40)'nın düzenlenmesi	137
Lupus Nefrit (LN)	miR-663a/ miR-423-5p		Biyopsi dokuları, LN fare modeli ve HEK293T hücreleri	TNIP2	NF- $\kappa$ B sinyal yolağının aktivasyonu	138

Sistemik Lupus Eritematozus (SLE)	miR-873		SLE hastalarının periferal kan mononükleer hücreleri (peripheral blood mononuclear cells –PBMC)	Foxo1	Th17 hücreleri farklılaşması	139
		miR-302d	SLE hastalarının monosit hücreleri	IRF9	IFN aracılığı tetiklenen gen ifadesinin düzenlenmesi	140
	miR-451a		SLE fare modeli	IRF8	Inflamatuvar sitokinlerin ifadesinin düzenlenmesi	141
Inflamatuvar Bağırsak Hastalığı ( <i>Inflammatory Bowel Disease</i> -IBD)	miR-132/ miR-223		IBD hastalarının ve farelerin IBD dokuları	Foxo3a	NF-κB sinyal yolağının aktivasyonu	142
	miR-223		Fare kolit modeli	CLDN8	IL-23 yolağı	143
	miR-425		IBD hastalarının kolonoskopik biyopsileri, periferal kan mononükleer hücreleri (peripheral blood mononuclear cells –PBMC), kolit fare modeli	Foxo1	Th17 hücrelerinin farklılaşmasının düzenlenmesi	144

Sjogren sendromu (SS)	miR-155		SS hastalarının dokuları	SOCS1	-	145
Psoriyazis		miR-99a	HaCaT hücreleri	FZD5/ FZD8	$\beta$ -katenin sinyal yolağı	146
Osteoartrit (OA)	miR-218-5p		OA hastalarının kondrosit ve kıkırdak dokuları	PIK3C2A	PI3K/Akt/mTOR sinyal yolaklarının düzenlenmesi	147
Tümör nekroz faktörü reseptör ilişkili periyodik sendrom (TRAPS)		miR-134, miR-17-5p, miR-498, miR-451a, miR-572, miR-92a-3p	TRAPS hastalarının kan örnekleri	Hedef gen bulunamamıştır	-	148
Behçet Hastalığı ( <i>Behcet Disease</i> -BD)		miR-155	BD hastalarının periferik kan mononükleer hücreleri (peripheral blood mononuclear cells –PBMC) ve monosit kökenli dendritik hücreleri	TAB2	TLR/IL-1 sinyal yolağı	149

### 2.4.3. miRNA ve AAA

Birçok araştırmacı AAA hastalığıyla ilişkili olabilecek miRNA'lar tanımlamıştır. Wada ve ark.'ları (150) MEFV genindeki mutasyonlara bağlı olarak AAA alt grupları arasında, hastalarda AAA atakları sırasında dolaşımdaki miRNA'ların seviyelerinin değiştiğini göstermiştir. Bu çalışmada üç AAA alt grubu ile çalışılmıştır. 1- Ekzon 10 mutasyonu bulunan, 2- Ekzon 3 mutasyonu bulunan, 3- Ekzon 3 veya 10'da mutasyon bulunmayan 24 AAA hastasından çalışma grubu kurulmuştur. Aft, farenjit, adenit ile birlikte olan periyodik ateş (*Periodic fever, aphthous stomatitis, pharyngitis, cervical adenitis*-PFAPA) hastaları, hastalık kontrolü olarak kullanılmıştır. *Agilent human microRNA mikro dizin release 14.0* ile analiz çalışması yapılmıştır. Sonuç olarak, MEFV mutasyonunu bağlı olarak oluşturulan alt gruplarda miRNA'ların ifade seviyeleri farklılık göstermiştir.

Latsoudis ve ark.'ları (151) insan pre-monositik hücre hattı (THP-1) hücrelerinde MEFV geni susturulmasını takiben Affymetrix miRNA 3.0 mikro dizin analizi yapılmıştır. Analizler sonucunda miR-4520a'nın ifadesinde anlamlı bir artış olduğu belirlenmiştir. Ardından bu miRNA için işlevsel analizler yapılmış ve bu miRNA'nın rapamisininin memeli hedefi (*mammalian target of rapamycin*-mTOR) sinyal yolağında ana aktivatör olan hedefi beyinde Ras homoloji kazanılmış (*Ras homologue enriched in brain*-RHEB) genine bağlandığı gösterilmiştir. Araştırmacılar, daha sonra kantitatif gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (*Quantitative real-time polymerase chain reaction*-qRT-PCR) tekniği ile miR-4520a'nın ifadesinin AAA hastalarında anlamlı bir değişiklik gösterdiğini ve bunun özellikle M694V tipi MEFV geni mutasyonlarının varlığına bağlı olduğunu belirlemiştir.

Amarilyo ve ark.'larının (152) yaptığı bir çalışmada 10 M694V homozigot AAA hastasından alınan kan örneklerinde *multiplexed NanoString nCounter* miRNA ifade mikro dizini ile 798 olgun miRNA'nın ifade seviyeleri araştırılmıştır. AAA hastalarında sağlıklı kontrollere göre miR-144-3p, miR-21-5p, miR-4454 ve miR-451a'nın ifadelerinin arttığı; miR-107, let-7d-5p ve miR-148b-3p'nin ifadesinin azaldığı belirlenmiştir. Bu pilot çalışmada sadece ifadesi değişen miRNA'lar tanımlanmış, işlevsel analizler henüz yapılmamıştır.

Son yıllarda yapılan bir başka çalışmada ise, miRNA'ların AAA patogenezindeki etkisini araştırmak üzere 51 hasta ve 49 sağlıklı kontrol ile miRNA

analizi yapılmıştır. Literatürden seçilen 15 miRNA için qRT-PCR ile ifade analizi gerçekleştirilmiştir. Sonuç olarak; MiR-125a, miR-132, miR-146a, miR-155, miR-15a, miR-16, miR-181a, miR-21, miR-223, miR-26a ve miR-34a'nın hasta grubunda anlamlı olarak azaldığı belirlenmiştir. Hastalardan oluşan çalışma grubu kendi içinde karşılaştırıldığında, kolşisin alan hasta grubunda miR-132, miR-15a, miR-181a, miR-23b ve miR-26a'nın arttığı; miR-146a, miR-15a, miR-16, miR-26a ve miR-34a'nın azaldığı tespit edilmiştir. Ataklı hastalarda ise miR-132, miR-15a, miR-21 ve miR-34a ifadeleri anlamlı bir şekilde azalmıştır. Atak sürecinde olmayan hastalarda ise miR-132, miR-146a, miR-15a, miR-16, miR-181a, miR-21, miR-223, miR-26a ve miR-34a'nın ifadeleri anlamlı bir şekilde azalmıştır (153).

Koga ve ark. (154) tarafından atakta ve atakta olmayan AAA hastalarının serum örneklerinden miRNA mikrodizini (*3D-Gene miRNA labelling kit, human\_miRNA\_V20*, Toray) yapılmıştır. Ataktaki AAA hastalarının serumlarında miR-204-3p'nin ifadesinin azaldığı belirlenmiştir. Toll-like reseptör (TLR) ligandları tarafından uyarılan ve makrofaja çevrilen THP-1 hücrelerinde bulunan miRNA'ların ifade seviyeleri araştırılmış, LPS ile uyarılan aynı hücre grubunda pre-miRNA'sı transfekte edilerek inflamatuvar sitokinlerin kantitasyonu yapılmıştır. Ardından 3'UTR lusiferaz aktivite deneyleri ile aday geni belirlenmiştir. Sonuç olarak, miR-204-3p'nin fosfoinosit 3-kinaz gamma (phosphoinositide 3-kinase  $\gamma$ -PI3K $\gamma$ ) yolağı üzerinden inflamatuvar sitokin salınımını engellediği bu sebeple iyi bir biyobelirteç olarak kullanılabileceği tespit edilmiştir

AAA hastalığında miRNA'ların rolüne yönelik yapılan çalışmalar, bulunan miRNA'lar, hedef ve işlevlerine yönelik bulunan sonuçlar Tablo 2.2'de özetlenmiştir.

**Tablo 2.2.** miRNA'lar ile AAA hastalığıyla ilişkili çalışmalar

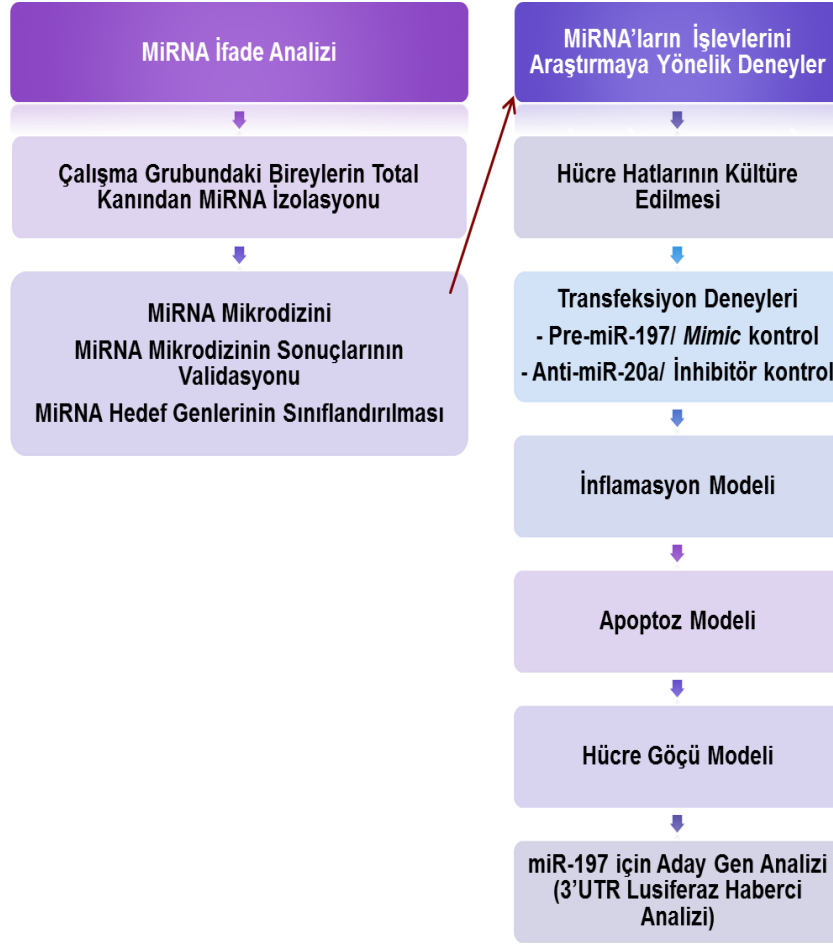
miRNA	İfade Değişikliği	Hedef Gen	Deneysel Yaklaşım	Kaynaklar	
miR-4520a	Artış	RHEB	<i>İn vivo, in vitro</i>	151	
miR-204	Azalış	PIK3CG	<i>İn vivo, in vitro</i>	154	
miR-125a	Azalış	Tanımlanmamış	<i>İn vivo</i>	153	
miR-132	Azalış	Tanımlanmamış	<i>İn vivo</i>		
miR146a	Azalış	Tanımlanmamış	<i>İn vivo</i>		
miR-155	Azalış	Tanımlanmamış	<i>İn vivo</i>		
miR-15a	Azalış	Tanımlanmamış	<i>İn vivo</i>		
miR-16	Azalış	Tanımlanmamış	<i>İn vivo</i>		
miR-181a	Azalış	Tanımlanmamış	<i>İn vivo</i>		
miR-21	Azalış	Tanımlanmamış	<i>İn vivo</i>		
miR223	Azalış	Tanımlanmamış	<i>İn vivo</i>		
miR-34a	Azalış	Tanımlanmamış	<i>İn vivo</i>		
miR-26a	Azalış	Tanımlanmamış	<i>İn vivo</i>		
miR-1225*	Artış	Tanımlanmamış	<i>İn vivo</i>		150
miR-2861*	Artış	Tanımlanmamış	<i>İn vivo</i>		
miR-320b*	Artış	Tanımlanmamış	<i>İn vivo</i>		
miR-320c*	Artış	Tanımlanmamış	<i>İn vivo</i>		
miR-320d*	Artış	Tanımlanmamış	<i>İn vivo</i>		
miR-320e*	Artış	Tanımlanmamış	<i>İn vivo</i>		
miR-3960*	Artış	Tanımlanmamış	<i>İn vivo</i>		
miR-4281*	Artış	Tanımlanmamış	<i>İn vivo</i>		
miR-4485*	Artış	Tanımlanmamış	<i>İn vivo</i>		
miR-4516*	Artış	Tanımlanmamış	<i>İn vivo</i>		
miR-451a*	Artış	Tanımlanmamış	<i>İn vivo</i>		
miR-6087*	Artış	Tanımlanmamış	<i>İn vivo</i>		
miR-6088*	Artış	Tanımlanmamış	<i>İn vivo</i>		
miR-6089*	Artış	Tanımlanmamış	<i>İn vivo</i>		
miR-6090*	Artış	Tanımlanmamış	<i>İn vivo</i>		
miR-6125*	Artış	Tanımlanmamış	<i>İn vivo</i>		
miR-638*	Artış	Tanımlanmamış	<i>İn vivo</i>		
miR-6510*	Artış	Tanımlanmamış	<i>İn vivo</i>		
miR-6800*	Artış	Tanımlanmamış	<i>İn vivo</i>		
miR-6869*	Artış	Tanımlanmamış	<i>İn vivo</i>		
miR-6891*	Artış	Tanımlanmamış	<i>İn vivo</i>		
miR-7107*	Artış	Tanımlanmamış	<i>İn vivo</i>		
miR-7150*	Artış	Tanımlanmamış	<i>İn vivo</i>		
miR-7704*	Artış	Tanımlanmamış	<i>İn vivo</i>		
miR-7975*	Artış	Tanımlanmamış	<i>İn vivo</i>		
miR-8069*	Artış	Tanımlanmamış	<i>İn vivo</i>		
miR-20a	Artış	Tanımlanmamış	<i>İn vivo</i>	155	
miR-197	Azalış	Tanımlanmamış	<i>İn vivo</i>		
miR-5743p	Artış	Tanımlanmamış	<i>İn vivo</i>		
let-7d	Artış	Tanımlanmamış	<i>İn vivo</i>		
let-7d	Azalış	Tanımlanmamış	<i>İn vivo</i>	152	
miR-107	Azalış	Tanımlanmamış	<i>İn vivo</i>		
miR-148b	Azalış	Tanımlanmamış	<i>İn vivo</i>		
miR-144	Artış	Tanımlanmamış	<i>İn vivo</i>		
miR-21	Artış	Tanımlanmamış	<i>İn vivo</i>		
miR-4454	Artış	Tanımlanmamış	<i>İn vivo</i>		
miR-451a	Artış	Tanımlanmamış	<i>İn vivo</i>		



Tez kapsamında, temel olarak hastalarda görülen inflamasyon süreciyle ilişkili olabilecek miRNA'ların tanımlanmasına ve işlevlerinin aydınlatılmasına odaklanılmıştır.

Bu amaç için daha önce Hacettepe Üniversitesi BAP: 013D05101005 numaralı proje için, GO13/54-07 Etik Kurul Onayı ile AAA hastalarından ve sağlıklı kontrollerden toplanmış olan miRNA örneklerinden miRNA mikrodizin analizi yapıp sonrasında işlevsel çalışmalarla birlikte miRNA'ların hastalık patogenezindeki rolü aydınlatılmaya çalışılmıştır. İşlevsel analizleri kapsayan protokol onayı için, tez ile aynı başlığı içeren GO18/501-08 numaralı yeni bir etik kurul onayı da alınmıştır (Ek 1 ve 2).

Bu kapsamda, tez bulgularına göre elde edilen iki aday miRNA (miR-20a-5p ve miR-197-3p)'nin hedef genlerin sınıflandırılmasıyla oluşturulan yollar tarafından etkilenebilecek hücre göçü, sitokin salınımı ve apoptoz gibi süreçler için işlevsel analizler yapıldı. İşlevsel analizler için iki farklı hücre hattı kullanıldı. İlk olarak ticari olarak satın alınan SW982 (İnsan sinoviyal fibroblast hücreleri) hücre hattı (ATCC, HTB-93™) ile çalışmalar yapıldı. SW982 hücreleri, kolay transfekte edilen, doğal olarak pürin ifadesi bulunan ve inflamasyon modelleri için sıklıkla kullanılan bir hücre hattı olduğu için tercih edildi. Tez çalışmalarının ilerleyen dönemlerinde transfeksiyon optimizasyonunun başarılı bir şekilde tamamlanmasını takiben THP-1 hücre hattında da miR-197 için belirli işlevsel analizler yapıldı. Bu hücre hattı, doğal olarak pürin ifade eden, AAA patogenezinde önemli bir role sahip olan monosit hücreleri benzeri hücreleridir. Bu nedenle hücre modeli olarak oldukça uygunlardır. Bu hücrelerde miR-197 aşırı ifadesi ve miR-20a baskılanması gerçekleştirildi. Başarılı bir susturmanın ve artan ifadenin gösterilmesini takiben, hücrelerde kontrol grubuna göre inflamasyonla ilişkili parametrelerden kaspaz 1 aktivitesi, *IL-1 $\beta$* , *IL-18*, *TNF- $\alpha$* , *TGF- $\beta$* , *MEFV* ifadeleri için qRT-PCR analizleri yapıldı. Ayrıca insan sitokin antikor mikrodizin analizi, hücre göçü ve apoptoz deneyleri gerçekleştirildi. Ardından miR-197 için aday gen çalışmaları yapıldı. İş akış planı Şekil 2.3'te verilmiştir.



**Şekil 2.3.** Tez deney planı ve iş akışı.

Çalışma sonucunda elde edilen bulguların birlikte değerlendirilmesiyle;

1- AAA hastalığında ortaya çıkan inflamasyon sürecindeki görevli miRNA'ların tanımlanması,

2- Bu miRNA'ların bağlandığı genler ve genlerin bulunduğu ilgili yollardaki işlevlerinin aydınlatılması,

3- AAA hastalığında inflamasyon açısından farklı fenotiplerin görüldüğü durumları açıklamak için benzer miRNA'ların incelenmesi yönünde yeni araştırma olanaklarının sağlanması mümkün olması,

4- miRNA düzenlenmesinin moleküler temeli açıklanabildiğinde, yeni tanı (biyobelirteç) ve tedavi yöntemlerinin geliştirilmesine katkı sağlanması da öngörülmektedir.

### 3. GEREÇ VE YÖNTEM

#### 3.1. Gereçler

##### 3.1.1. Örnek Toplama

*PAXgene Blood RNA* (Qiagen)

##### 3.1.2. RNA İzolasyonu ve cDNA Sentezi

*PreAnalytiX miRNA Kit* (Qiagen)

*TaqMan® MicroRNA Reverse Transcription Kit* (ABI)

*RNeasy® Plus Mini Kit* (50 rxn) (Qiagen)

*QuantiTect Reverse Transcription Kit* (50 rxn) (Qiagen)

##### 3.1.3. Agaroz jel elektroforezi

Agaroz (Biomax)

TAE (Tris-Asetat-EDTA) tamponu, 50X (pH 8,0)

*Orange G* boyası (Merck)

EtBr (Etidyum bromür) (Sigma)

Moleküler ağırlık belirleyicisi (50 bç) (Thermo Scientific)

##### 3.1.4. Mikro Dizin ile İfade Analizi

*GeneChip miRNA 2.0 Array* (Affymetrix)

##### 3.1.5. Kantitatif Gerçek-Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (qRT-PCR)

*TaqMan® MicroRNA Assays* (ABI) primerleri (miR-20a, miR-197, RNU48)

*TaqMan® Universal PCR Master Mix, no AmpErase® UNG* (ABI) Kit

*iTaq Universal SYBR Green Supermix* (Bio-Rad)

##### 3.1.6. Hücre Kültürü

SW982 (İnsan sinoviyal fibroblast hücreleri) hücre hattı (ATCC, HTB-93™)

THP-1 (İnsan pre-monositik hücreleri) hücre hattı (ATCC, TIB-202™)

RPMI (*Roswell Park Memorial Institute*) 1640 (Gibco)

L-Glutamin (Biochrome)

Fetal Dana Serumu (Biochrome)

Streptomisin/Penisilin (Biochrome)

DMSO (Dimetilsülfoksit) (Sigma)

### **3.1.7. Transfeksiyon**

*Lipofectamine* 2000 (Invitrogen)

*OptiMEM Reduced Serum Medium, no Phenol Red* (500 mL) (Gibco)

*Block-it Fluorescent Oligo-20*  $\mu$ M (Ambion)

*Hsa-miR-197-3p, mirVana® miRNA mimic* (Ambion)

*Hsa-miR-20a-5p, mirVana® miRNA inhibitor* (Ambion)

*MirVana™ miRNA Mimic, Negative Control #1* (Ambion)

*MirVana™ miRNA Inhibitor, Negative Control #1* (Ambion)

*LightSwitch™ 3'UTR Reporter GoClone®*- Boş vektör

*LightSwitch™ 3'UTR Reporter GoClone®-IL1R1* Yabanıl

*LightSwitch™ 3'UTR Reporter GoClone®-IL1R1* Mutant

### **3.1.8. Apoptoz Deneyleri**

*Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit*, APOAF, Sigma

### **3.1.9. Hücre Göçü Deneyleri**

*Transwell Thincert-8*  $\mu$ m çapında porlar içeren polikarbonat membranlı filtreler (Greiner Bio-One)

### **3.1.10. İnflamasyon Deneyleri**

*Caspase 1 Assay Kit (Fluorometric)* (Abcam)

*Human Cytokine Antibody Array* (120 Targets) - Kantitatif, 8 Test (Abcam)

### **3.1.11. Mutagenез için Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)**

*QuickChange II XL Site-directed Mutagenesis Kit* (Agilent Technologies)

*LightSwitch™ 3'UTR Reporter GoClone®-IL1R1* (SwitchGear Genomics, Active Motif)

HPLC purifiye mutagenез primerleri-IL1R1 (2 çift) (Oligomer)

### **3.1.12. Bakteri Kültürü ve Transformasyon**

Kompetan *E.coli DH5α* bakteri suşu (*Mix&Go* Competent Cells, Zymo Research)

Agar, bakteriyoloji kullanımını saflığında (AppliChem)

Sıvı *Lysogeny broth* (LB) besiyeri (pH 7,0-7,5)

Katı LB besiyeri

Ampisilin (Ampisina IV flakon-1000X)

*Mix&Go* E.coli Transformation Kit & Buffer Set (Zymo Research)

### **3.1.13. Plazmid İzolasyonu**

*Hybrid-Q, Plasmid Rapidprep, Total DNA Purification Kit* (GeneAll)

### **3.1.14. DNA Dizi Analizi**

*BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit* (Applied Biosystems)

Primer *Forward (F)* ya da *Reverse (R)* (5 pmol/μl)

Hi-Di Formamid (Applied Biosystems)

*Genetic Analyzer 10X Running Buffer with EDTA*(25 ml) (Applied Biosystems)

3130 POP-7 Polimer (3,5 ml) (Applied Biosystems)

*3130-Avant Capillary array, 4 x 36 cm Capillaries* (Applied Biosystems)

### **3.1.15. 3'UTR Lusiferaz Aktivitesinin Ölçülmesi**

*LightSwitch Luciferase Assay Reagent* (100 rxn) (Switchgear Genomics, Active Motif)

## **3.2. Yöntemler**

### **3.2.1. Çalışma Grubunun Oluşturulması**

M694V mutasyonu için homozigot olan (M694V/M694V) ve ağır fenotip

gösteren/kolşisin dirençli 6 AAA hastası ve kontrol grubu olarak 6 sağlıklı bireyden oluşan bir çalışma grubu oluşturuldu. Çalışma grubunun yaş aralığı 17-55 olup, yaş ortalaması 32 olarak hesaplandı. Kadın/erkek oranı ise 7/5 idi.

Hacettepe Üniversitesi, Tıp Fakültesi, İç Hastalıkları AD Romatoloji Ünitesi tarafından takip edilen hastaların günlük aldıkları ilaç düzeyleri, atak süreleri ve diğer klinik bulguları aşağıda özetlenmiştir (Tablo 3.1).

**Tablo 3.1. Hasta bireylerin klinik özellikleri.**

<b>M694V homozigot hastalar</b>	<b>MEFV geni mutasyonu</b>	<b>Bulgular</b>	<b>Tedavi</b>
Hasta 1	M694V/M694V	Ateş, Peritonit, Sakroiliit, Artrit	Kolşisin, Anakinra, Sertolizumab
Hasta 2	M694V/M694V	Ateş, Peritonit, Artrit	Kolşisin, Anakinra
Hasta 3	M694V/M694V	Ateş, Peritonit, Artrit	Kolşisin
Hasta 4	M694V/M694V	Ateş, Peritonit, Artrit	Kolşisin, Etanersept
Hasta 5	M694V/M694V	Ateş, Peritonit	Kanakinumab
Hasta 6	M694V/M694V	Ateş, Peritonit, Plevrit	Kanakinumab

Bireylerden *PAXgene Blood* RNA tüplerine 2.5 mL kan alındı. Eş zamanlı olarak hastalardan sedimentasyon ve C-reaktif protein (CRP) düzeylerinin tespiti ve tüm çalışma grubundaki bireylerden tam kan sayımı (*complete blood count-CBC*) için kan örneği alındı (Ek 3).

Toplam 12 bireyden oluşturulan çalışma grubu için 12 adet mikrodizin çalışması gerçekleştirildi. Hacettepe Üniversitesi BAP: 013D05101005 numaralı proje için, GO13/54-07 Etik Kurul Onayı ile AAA hastalarından ve sağlıklı kontrollerden toplanmış olan miRNA örneklerinden miRNA mikrodizin analizi yapıлып sonrasında işlevsel çalışmalarla birlikte miRNA'ların hastalık patogenezindeki rolü aydınlatılmaya çalışılmıştır. İşlevsel analizleri kapsayan protokol onayı için, tez ile

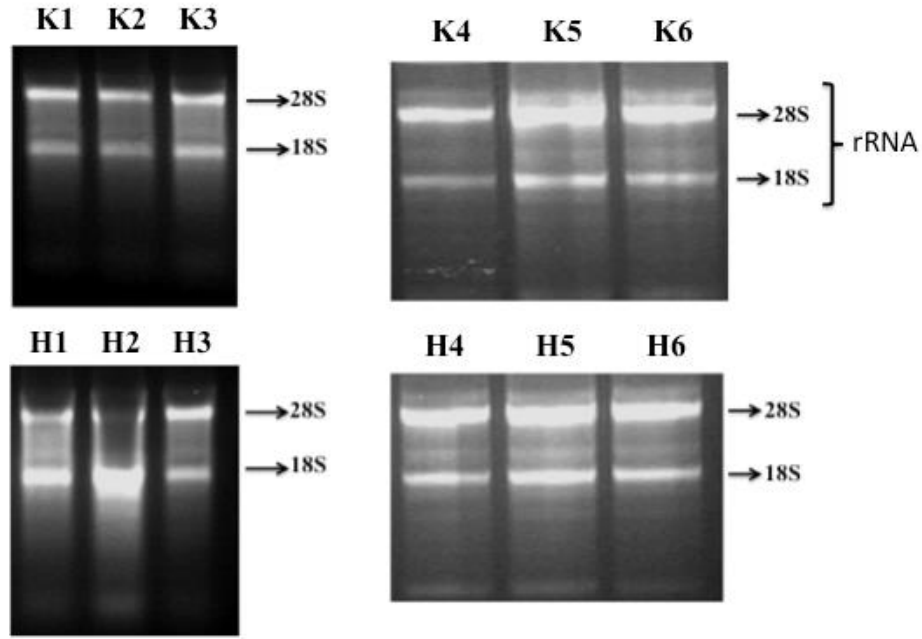
aynı başlığı içeren GO18/501-08 numaralı yeni bir etik kurul onayı da alınmıştır (Ek 1 ve 2).

### 3.2.2. miRNA Mikrodizin Analizi

Çalışma grubunu oluşturan hastalardan *PAXgene Blood RNA* tüplerine alınan kandan *PreAnalytiX* miRNA Kit (Qiagen) kullanılarak mikroRNA izolasyonu gerçekleştirildi. İzole edilen miRNA'ların kalite kontrolleri yapıldı. Bu amaçla RNA'ların saflıkları ve miktarları belirlendi (Tablo 3.2) ve örneklerin degrade olup olmadığı agaroz jel elektroforezi ile kontrol edildi (Şekil 3.1).

**Tablo 3.2.** RNA'ların miktarları ve saflıkları.

Çalışma Grubu	RNA derişimi (ng/ $\mu$ L)	A 260/280
Kontrol 1	73.0	2.05
Kontrol 2	70.4	1.97
Kontrol 3	90.2	2.03
Kontrol 4	74.3	2.06
Kontrol 5	125.8	2.07
Kontrol 6	102.3	2.10
Hasta 1	137.8	2.04
Hasta 2	248.8	1.94
Hasta 3	85.9	2.05
Hasta 4	100.8	1.70
Hasta 5	114.6	1.80
Hasta 6	78.9	1.70



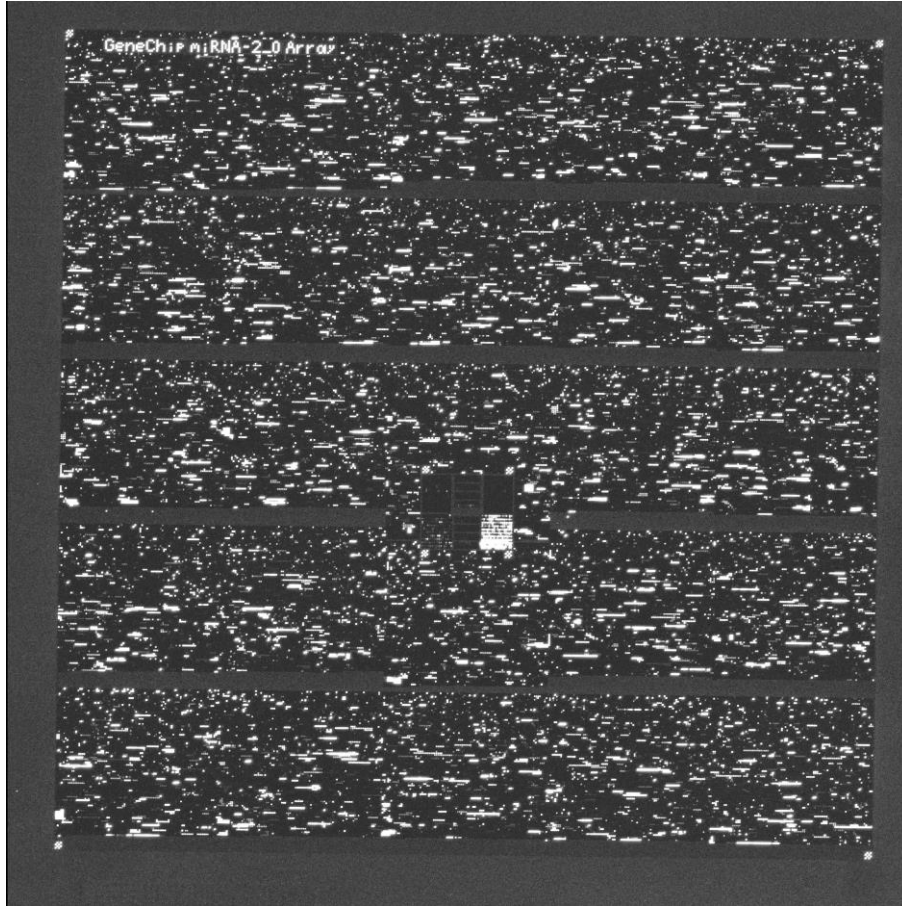
**Şekil 3.1.** RNA'ların %2,5'lük agaroz jel elektroforez görüntüleri. K: Kontrol grubu, H: M694V homozigot hasta, rRNA: Ribozomal RNA, S: *Svedberg* katsayısı.

Hasta gruplarındaki değişen miRNA ifadeleri *GeneChip miRNA 2.0* Mikrodizin (Affymetrix) analizi ile belirlendi. Mikrodizin kitindeki protokolü takiben miRNA'lar işaretlendi, ardından probalar ile hibridize edildi. Hibridizasyon sonrası elde edilen sinyaller, tarayıcıyla analiz edildi. Analiz sonrası, mikrodizin çiplerinden alınan sinyal yoğunlukları karşılaştırıldı. Her çipten aynı oranda sinyal alındığı ve hepsinin değerlendirme sınırları içerisinde olduğu belirlendi (Şekil 3.2 ve Tablo 3.3). Ardından ham veriler, *Multi Experiment Viewer* (MeV) programındaki *Significance Analysis of Microarray* (SAM) analizi ve *Affymetrix Transcriptome Analysis Console* (TAC) ile analiz edildi. Bu iki programının da birlikte kullanılma nedeni TAC programının analiz sonrasında çok sayıda miRNA'dan oluşan uzun bir liste vermesi ve bu sonuçlardaki *False Discovery Rate* (FDR) değerinin mikrodizin çalışmaları için maksimum kabul edilen 0.10 değerine yakın veya yüksek olması nedeniyle uygun filtreleme yapılamamasıdır. FDR değeri, bulunan kat değişiminin yanlışlıkla bulunmuş olma durumuna verilen bir değerdir. Bu değer 0.00 olması kat değişiminin yanlışlıkla bulunma ihtimalinin olmadığını göstermektedir. Bu nedenle FDR değerini



0.00 olarak kabul edebildiğimiz ve bu durumda anlamlı kat artışı ve azalışları gösteren MeV-SAM programında da analiz yapıldı. Ayrıca SAM analizinde kullanılan non-parametrik test ile TAC analizde yapılan ANOVA testi karşılaştırıldığında, SAM analizinin normal dağılım olmadığını varsayması nedeniyle, normal dağılım olduğunu varsayan parametrik bir test olan ANOVA'ya göre daha avantajlı olduğu görülmüştür. MeV-SAM analizinde bulunan miRNA'lar ile TAC analizi sonucunda belirlenmiş miRNA'lar arasında ortak olan miRNA'lar ile çalışmaya devam edildi. Bu durum, çalışmanın dayanağı olan istatistiksel analiz aşamasının daha güçlü olmasını sağladı.

miRNA'lar arasından her iki program tarafından da istatistiksel olarak anlamlı olanları, 2 kat ve üzeri artış ya da azalış gösterenler, aday miRNA'lar olarak belirlendi. Belirlenen miRNA'ların hedef genleri için biyoinformatik analizler yapıldı.



**Şekil 3.2.** Mikrodizin çiplerin hibridizasyon sonrası okuma görüntüsü.

**Tablo 3.3.** Okuma başarılarının gösterimi. P: Presence, A: Absence. Tüm çipler okuma sınırları içerisinde olup, tüm bireyler için çipteki 1:4 oranında yer alan insan miRNA'ların çoğunluğundan sinyal alınmıştır. Alınan sinyal yoğunlukları herbir çip için birbirine yakındır.

	<b>Eşik Değeri Testi</b>	<b>%P</b>	<b>%A</b>
Kont 1(miRNA-2_0).CEL.rma-dabg	Sınırlar içerisinde	24.04	75.96
Kont 2(miRNA-2_0).CEL.rma-dabg	Sınırlar içerisinde	23.91	76.09
Kont 3(miRNA-2_0).CEL.rma-dabg	Sınırlar içerisinde	24.32	75.68
Kont 4(miRNA-2_0).CEL.rma-dabg	Sınırlar içerisinde	22.29	77.71
Kont 5(miRNA-2_0).CEL.rma-dabg	Sınırlar içerisinde	20.12	79.88
Kont 6(miRNA-2_0).CEL.rma-dabg	Sınırlar içerisinde	22.35	77.65
Hom 1(miRNA-2_0).CEL.rma-dabg	Sınırlar içerisinde	25.17	74.83
Hom 2(miRNA-2_0).CEL.rma-dabg	Sınırlar içerisinde	23.63	76.37
Hom 3(miRNA-2_0).CEL.rma-dabg	Sınırlar içerisinde	25.83	74.17
Hom 4(miRNA-2_0).CEL.rma-dabg	Sınırlar içerisinde	24.60	75.40
Hom 5(miRNA-2_0).CEL.rma-dabg	Sınırlar içerisinde	24.12	75.88
Hom 6(miRNA-2_0).CEL.rma-dabg	Sınırlar içerisinde	23.60	76.40

### 3.2.3. miRNA Hedeflerinin Biyoinformatik Araçlar Kullanılarak Sınıflandırılması

*miWalk* veri tabanı kullanılarak miRNA'ların bağlanma olasılığı olan genler belirlendi. Bu veri tabanı, *DIANA-mT*, *PICTAR4*, *PICTAR5*, *miRanda*, *miRDB*, *PITA*, *miWalk*, *RNA22*, *RNAhybrid* ve *TargetScan* gibi birçok miRNA hedef geninin belirlenmesi için kullanılan programları tek bir sayfada birleştirmektedir. Bu doğrultuda, her bir miRNA için en az 6 program tarafından da belirlenen genlerden listeler oluşturuldu. Bu durumda, miRNA'lara bağlanma olasılığı daha yüksek olan

genler sınıflandırmaya alındı. miR-20a için miRWalk veri tabanında yapılan analiz ile elde edilen görüntü örnek olarak Şekil 3.3'te verilmiştir.

MicroRNA	Gene	DIANAmt	miRanda	miRDB	miRWalk	RNAhybrid	PICTAR4	PICTAR5	PITA	RNA22	Targetscan	SUM
hsa-miR-20a	NUP35	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	10
hsa-miR-20a	E2F5	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	10
hsa-miR-20a	HBP1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	10
hsa-miR-20a	ITGB8	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	10
hsa-miR-20a	ARID4B	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	10
hsa-miR-20a	RBL2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	10
hsa-miR-20a	RNF128	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	10
hsa-miR-20a	TRIP11	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	10
hsa-miR-20a	CFL2	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	9
hsa-miR-20a	PAPOLA	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	9
hsa-miR-20a	STK38	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	9
hsa-miR-20a	MED12L	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	9
hsa-miR-20a	CRK	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	9

hsa-miR-20a	RBL1	1	1	1	0	1	0	1	0	0	1	6
hsa-miR-20a	ZNF217	1	1	0	0	1	1	1	0	0	1	6
hsa-miR-20a	FYCO1	1	1	1	0	0	0	1	1	0	1	6
hsa-miR-20a	SGK269	1	1	1	0	0	0	1	1	0	1	6
hsa-miR-20a	TNFSF11	1	0	1	0	1	1	1	0	0	1	6
hsa-miR-20a	RABEP1	1	1	1	0	1	0	1	0	0	1	6
hsa-miR-20a	MLL4	1	1	1	0	1	0	1	0	0	1	6
hsa-miR-20a	PCDHA3	0	1	1	0	1	1	1	0	0	1	6
hsa-miR-20a	ABI1	1	0	0	1	0	0	1	0	1	1	5
hsa-miR-20a	TANK	1	1	0	1	0	0	1	0	0	1	5
hsa-miR-20a	PIGK	1	1	0	1	0	0	1	0	0	1	5
hsa-miR-20a	MAMLD1	1	1	0	1	0	0	1	0	0	1	5

**Şekil 3.3.** miRWalk veri tabanındaki aday genler listesi için örnek ekran görüntüsü.

1 sayılısı genin belirlenen programda bulunduğunu, 0 sayılısı ise bulunmadığını göstermektedir. Toplamda 6 program tarafından belirlenen gene kadar (mavi çizgi) olan tüm genler listeye dahil edildi. Şekilde miR-20a için bu yaklaşımla belirlenen hedef genler örnek olarak gösterilmiştir.

Belirlenen 5 miRNA'ya ait gen listeleri, *The Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery* (DAVID) v6.7 programına yüklendi, genler yollar açısından sınıflandırıldı. Sınıflandırma, *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes* (KEGG) programının analiz sonuçlarına göre yapıldı.

### 3.2.4. Kantitatif Gerçek-Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (qRT-PCR)

Yolak analizi sonucunda aday miRNA olarak belirlenen 2 miRNA'nın mikrodizin sonuçları qRT-PCR ile valide edildi.

RT-PCR ile cDNA'ya dönüştürülen RNA molekülünün enzimatik tepkime ile in-vitro çoğaltılması sağlandı. Bu yöntemde kantitasyon, reaksiyon sırasında oluşan ürüne bağlanan boya ile birlikte artan floresan ışımının ölçülmesi sayesinde yapılmaktadır. Yapılan RT-PCR deneylerinde FAM floresan boyası kullanıldı. Reaksiyon, seçilen uygun miRNA primerleri ile BioRad IQ5 cihazında gerçekleştirildi. Deneylerdeki değişkenlere bağlı olarak meydana gelen ifade değişimleri göreceli ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$  yöntemi) kantitasyon ile hesaplandı. İfade değişimleri hesaplanırken, *Small Nucleolar RNA, C/D Box 48* (RNU48) referans gen ifadesi normalizatör olarak kullanıldı.

İlk olarak, RNA'lar 5ng/ $\mu$ L olacak şekilde dilue edildi. Ardından *TaqMan® MicroRNA Reverse Transcription Kit* (ABI) kullanılarak cDNA sentezi yapıldı. cDNA çevirimi için seçilen miRNA'lar ve referans olarak kullanılacak RNU48 primeri ile tüm primerleri içeren primer karışımı yapıldı.

#### Primer Havuzu

RNU48	10 $\mu$ l
miR-20a	10 $\mu$ l
miR-197	10 $\mu$ l
TE Tamponu (DEPC su ile)	970 $\mu$ l
Toplam:	1000 $\mu$ l

**RT reaksiyonu**

10xRT tamponu	1,5 µl
RNaz inhibitörü	0,19 µl
100 mM ddNTP	0,30 µl
<i>MultiScribe Reverse Transcriptase</i> (50 U/µl)	2 µl
RT-primer karışımı	6 µl
Su (DEPC)	3,01 µl
Toplam karışımı	13 µl
RNA (5 ng)	2 µl
Toplam:	15 µl

**Reaksiyon Koşulları**

16°C 30 dk.

42°C 30 dk.

85°C 5 dk.

cDNA sentezinin ardından miR-20a-5p ve miR-197-3p'a uygun *TaqMan*® *MicroRNA Assays* (ABI) primerleri ile *TaqMan*® *Universal PCR Master Mix, no AmpErase*® *UNG* (ABI) kiti kullanılarak amplifikasyon gerçekleştirildi. Bu deney aşaması üçlü tekrarlar şeklinde gerçekleştirildi.

**PCR reaksiyonu**

Taqman MicroRNA Assay (20X )	1 µl
TaqMan 2x <i>Universal PCR Master Mix</i>	10 µl
Su	7,5 µl
Total <i>master</i> karışımı	18,5 µl
cDNA	1,5 µl
Toplam:	20,0 µl

### **Reaksiyon Koşulları**

50°C 2 dk.

95°C 10 dk.

---

95°C 15 sn.

60°C 1 dk. (40 döngü)

---

### **mRNA'ların gen ifade analizi için:**

İlgili genlerin ifade analizleri için; Anti-miR-20a, inhibitör kontrol, Pre-miR-197, *mimic* kontrol transfekte edilen hücrelerden *RNeasy® Plus Mini Kit* (Qiagen) ile RNA izolasyonu gerçekleştirildi.

SW982 ve THP-1 hücrelerinden izole edilen RNA'ların derişimlerinin ölçülmesi ve RNA kalitelerinin kontrol edilmesi için *NanoDrop® ND-1000* (Thermo Scientific) spektrofotometre cihazı ve yazılım programı kullanıldı. Derişimleri ölçülen ve kaliteleri kontrol edilen RNA'lardan *QuantiTect Reverse Transcription Kit* (Qiagen) ile cDNA sentezlendi. Her örneğin RNA derişimi 600 ng/µl olacak şekilde hazırlandı. cDNA sentezinden sonra qRT-PCR reaksiyonu gerçekleştirildi. *MEFV*, *IL-1β*, *IL-18*, *TNF-α*, *TGF-β*, *IL1R1* genlerinin ifade analizi yapabilmek için *GAPDH* gen ifadesi normalizatör olarak kullanıldı. Her örnek üçlü setler halinde çalışıldı ve reaksiyon BioRad IQ5 cihazında gerçekleştirildi.

2X <i>SYBR Green</i> karışımı	5,0 µl
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	1,2 µl
<i>Forward</i> Primer (10 µM)	0,4 µl
<i>Reverse</i> Primer (10 µM)	0,4 µl
cDNA	2,0 µl
Distile su	1,0 µl
<b>TOPLAM</b>	<b>10 µl</b>

---

### Reaksiyon Koşulları

94°C 2 dk.

94°C 5 sn.

---

59°C 20 sn.

72°C 15 sn. (50 döngü)

---

Her amplifikasyon döngüsünün sonunda cihazın SYBR Green boyasına uygun yeşil kanalında 470 nm'lik ışık kaynağı ve 510 nm'lik detektör ile ölçüm yapıldı.

### **3.2.5. Hücre Kültürü**

miRNA'ların ifade değişimlerinin valide edilmesinden sonra, aday miRNA'ların işlevlerine yönelik araştırmalar gerçekleştirildi.

Bu amaçla, pyrin ve ilişkili proteinleri doğal olarak ifade eden hücre hatlarından SW982 ve inflamatuvar süreçlerde görevli THP-1 hücreleri ile çalışıldı. Hücreler, ısı ile inaktive edilmiş FBS (%10 oranında), Penisilin/Streptomisin (%1 oranında) ve L-Glutamin (%1 oranında) içeren RPMI (*Roswell Park Memorial Institute*) 1640 (Gibco) besiyeri içerisinde, 3 günde bir pasajlanacak şekilde çoğaltıldı.

SW982 hücreleri 3 µl Lipofektamin 2000 ile 20 nM *hsa-miR-197-3p*, *mirVana*® *miRNA mimic* (Ambion), *hsa-miR-20a-5p*, *mirVana*® *miRNA inhibitor* (Ambion), *mirVana*™ *miRNA Mimic, Negative Control #1* (Ambion) ve *mirVana*™ *miRNA Inhibitor, Negative Control #1* (Ambion) ile transfekte edildi.

THP-1 hücreleri ise 1,6 µl Lipofektamin 2000 ile 20 nM *hsa-miR-197-3p*, *mirVana*® *miRNA mimic* (Ambion) ve *mirVana*™ *miRNA Mimic, Negative Control #1* (Ambion) ile transfekte edildi.

miRNA bağlantı analizi için, Pyrin ve ilişkili proteinleri doğal olarak ifade eden, inflamatuvar süreçte görevli insan THP-1 hücre hattı kullanılmasına karar verildi. Bu hücrelerin inflamasyon sürecinde de görev aldığı bilindiğinden, aday gen çalışmaları için iyi bir araç olacağı öngörüldü. miRNA'lar (20 nM) ve hazırlanan

mutant olmayan /mutant bağlantı bölgelerini içeren ifade vektörleri (100 ng/reak.) THP-1 hücre hatlarına birlikte transfekte edildi.

### **3.2.6. Apoptoz Deneyleri**

miRNA'ların transfeksiyonu sonrası hücrelerde *Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit*, APOAF, Sigma kullanılarak akım sitometri yöntemi ile hücre ölümü analizi gerçekleştirildi. Transfekte edilen hücreler, kit içerisinde yer alan protokol takip edilerek *Annexin V FITC Conjugate* ve/veya Propidyum İyodür (PI) solüsyonu ile boyandı, *BD FACS Aria II* cihazı ile analiz edildi.

### **3.2.7. Hücre Göçü Deneyleri**

#### **Yara İyileşmesi Deneyi**

Kurulan deney sisteminde, hücreler triplike olarak, %50 oranında zemini kaplayacak şekilde 6 kuyucuklu hücre kültürü petrilere koyuldu. Hücreler pre-miR-197 ve anti-miR-20a ile transfekte edildi. Transfeksiyon sonrası hücrelerin 37°C %5 CO<sub>2</sub> içeren etüvde %75-80 oranında zemini kaplaması beklendi. Daha sonra steril 10µl'lik mikro pipet ucu kullanılarak hücre katmanının üzerinde birbirine paralel 2 adet yara açıldı. Yaraların 0., 6., 12. ve 24. saatlerde ışık mikroskobunda fotoğrafları çekildi. Ardından *Image J* programı kullanılarak yara kapanma analizi yapıldı. Her zaman dilimindeki yara bölgesinin alanı 0. saattekine oranlandı ve elde edilen değerler 100 ile çarpılarak göç oranı yüzde olarak hesaplandı.

#### **Filtre Deneyi**

Bu deney sisteminde kullanılan filtrelerin alt ve üst kuyuları olmak üzere 2 adet kompartmanı bulunmaktadır. Üst kompartmana konan hücreler, polikarbonat membranın porlarından geçerek alt kompartmandaki kemoatraktan ya da serum gradiyentine doğru göç etmektedir. Alt kompartmana göç eden hücrelerin kantitasyonunu gerçekleştirmek amacıyla floresan işaretleme yöntemlerinden yararlanılmaktadır. Kalsein-AM boyaması en sık kullanılan metodlardan biridir. Canlı hücrelerde floresan olmayan kalsein-AM bileşiği, hücre içi esterazlar aracılığıyla hidrolize uğrar ve yeşil floresan ışımaya veren kalsein'e dönüşür.



24 kuyucuklu hücre kültürü petripleri içerisine 8 µm çapında porlar içeren polikarbonat membranlı filtreler yerleştirildi. Öncelikle filtrenin altına ve üstüne serumsuz medium konuldu, 37°C’de %5 CO<sub>2</sub> içeren etüvde 1 saat inkübe edilerek her iki tarafın eşitlenmesi sağlandı. Ardından filtrenin üst kompartmanına serumsuz medium ile son hacim 500 µl olacak şekilde 48 saat önceden transfekte edilen 3x10<sup>4</sup> hücre ekildi. Filtrenin alt kompartmanına ise, son hacim 500 µl olacak şekilde serumlu medium koyuldu. Hücreler 37°C’de %5 CO<sub>2</sub> içeren etüvde 24 saat inkübe edildi. 24 saatin sonunda filtrenin alt kısmında kalan hücreler 1 mM kalsein-AM ile muamele edildi ve 30 dakika boyunca 37°C’de %5 CO<sub>2</sub> içeren etüvde inkübe edildi. İnkübasyon sonunda Leica IM50 floresan mikroskopuyla filtrenin alt alanından 3 adet fotoğraf çekildi. Fotoğraflardaki hücreler *Image J* programı ile sayılarak analiz yapıldı.

### **3.2.8. İnflamasyon Deneyleri**

#### **Kaspaz 1 Aktivite Deneyleri**

Hücrelerdeki anti-miR-20a ve pre-miR-197 transfeksiyonu sonrası meydana gelen kaspaz 1 aktivitesi florometrik olarak kaspaz 1 aktivitesini ölçen Abcam kiti kullanılarak gerçekleştirildi. Kit içerisinde belirtilen protokolü takiben örnekler *SpectraMax M2 Microplate Reader* kullanılarak Ex/Em= 400/505 nm’de ölçüldü.

#### **İnflamatuvar Genlerin İfade Analizi**

Anti-miR-20a ve pre-miR-197 transfekte edilen hücrelerden RNA izolasyonu gerçekleştirildi. İzole edilen RNA’lardan cDNA sentezi gerçekleştirildi. Ardından inflamatuvar süreçlerde görevli olan *IL-1β*, *IL-18*, *TNF-α*, *TGF-β* ve mutasyonları AAA hastalığına yol açan *MEFV* geninin ifade farklılıkları qRT-PCR ile analiz edildi. Normalizatör olarak *GAPDH* geni kullanıldı. qRT-PCR, *SYBR Green Master Mix* (Sigma) kullanılarak BioRad IQ5 cihazında gerçekleştirildi.

Tezin bundan sonraki aşamasında hem fonksiyonel analizlerde hipotezimizi desteklemeye yönelik anlamlı daha çok veri elde ettiğimiz hem de tedavi molekülü olmak için daha kuvvetli bir aday olan miR-197 ile deneylere devam edildi. Hücrelere sadece pre-miR-197 ve *mimic* kontrol transfeksiyonları yapıldı.

### İnsan Sitokin Antikor Mikrodizin Analizi

Pre-miR-197 ve kontrolleri transkripte edilen SW982 hücrelerinin, transkripsiyon sonrası 48. saatte süpernatantları toplandı. Süpernatantlar analiz aşamasına kadar -80°C'de saklandı.

*Human Cytokine Antibody* Mikrodizin (120 Hedef)-Kantitatif, ab197426 (Abcam) kit kullanılarak sitokin antikor mikrodizini gerçekleştirildi. Kit içerisinde 40 hedeflik toplam 3 mikrodizin bulunmaktadır. Bunlar; İnsan inflamasyon antikor mikrodizini, insan büyüme faktörü antikor mikrodizini ve insan kemokin antikor mikrodizini (Şekil 3.4).

İnsan İnflamasyon Antikor *Array*

	1,2,3,4	5,6,7,8	9,10,11,12
a	POS1	POS2	BLC
b	Eotaxin	Eotaxin-2	G-CSF
c	GM-CSF	I-309	ICAM-1
d	IFN $\gamma$	IL-1 $\alpha$	IL-1 $\beta$
e	IL-1ra	IL-2	IL-4
f	IL-5	IL-6	IL-6sR
g	IL-7	IL-8	IL-10
h	IL-11	IL-12p40	IL-12p70
i	IL-13	IL-15	IL-16
j	IL-17	MCP-1	MCSF
k	MIG	MIP-1 $\alpha$	MIP-1 $\beta$
l	MIP-1 $\delta$	PDGF-BB	RANTES
m	TIMP-1	TIMP-2	TNF $\alpha$
n	TNF $\beta$	TNF RI	TNF RII

İnsan Büyüme Faktörü Antikor *Array*

	1,2,3,4	5,6,7,8	9,10,11,12
a	POS1	POS2	AR
b	BDNF	bFGF	BMP-4
c	BMP-5	BMP-7	$\beta$ -NGF
d	EGF	EGF R	EG-VEGF
e	FGF-4	FGF-7	GDF-15
f	GDNF	GH	HB-EGF
g	HGF	IGFBP-1	IGFBP-2
h	IGFBP-3	IGFBP-4	IGFBP-6
i	IGF-1	Insulin	MCF R
j	NGF R	NT-3	NT-4
k	OPG	PDGF-AA	PIGF
l	SCF	SCF R	TGF $\alpha$
m	TGF $\beta$ 1	TGF $\beta$ 3	VEGF
n	VEGF R2	VEGF R3	VEGF-D

İnsan Kemokin Antikor *Array*

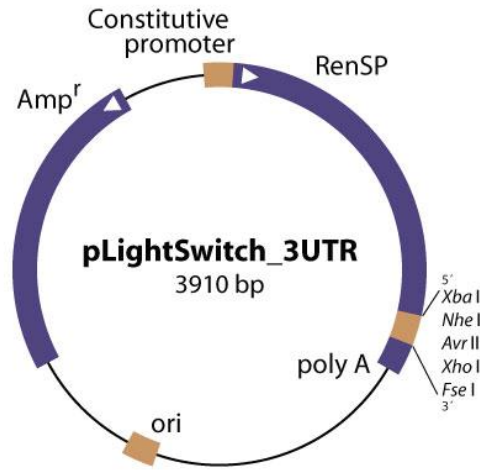
	1,2,3,4	5,6,7,8	9,10,11,12
a	POS1	POS2	6Ckine
b	Axl	BTC	CCL28
c	CTACK	CXCL16	ENA-78
d	Eotaxin-3	GCP-2	GRO
e	HCC-1	HCC-4	IL-9
f	IL-17F	IL-18 BPa	IL-28A
g	IL-29	IL-31	IP-10
h	I-TAC	LIF	LIGHT
i	Lymphotactin	MCP-2	MCP-3
j	MCP-4	MDC	MIF
k	MIP-3 $\alpha$	MIP-3 $\beta$	MPIF-1
l	MSP $\alpha$	NAP-2	OPN
m	PARC	PF4	SDF-1 $\alpha$
n	TARC	TECK	TSLP

**Şekil 3.4.** Mikrodizin haritaları. POS1 ve POS2-pozitif kontroller.

Kitte belirtilen protokol takip edilerek her mikrodizin için 8 standart; 1 hücre kültürü ortamı kontrolü; 1 transfekte edilmemiş, 3 pre-miR-197 ve 3 *mimic* kontrol ile transfekte edilen hücre süpernatantından toplam 16 örneklik setler kuruldu. Deney aşamasının tamamlanmasını takiben cam slaytlar *Innoscan 710 Microarray Scanner* (Innopsys) ile tarandı ve analiz edildi.

### 3.2.9. Aday Genin 3'UTR Vektörlerinde Mutageniz Yapılması

miR-197 ve belirlenen potansiyel hedef geni arasındaki fiziksel etkileşim analiz edildi. miR-197 ve hedef geni IL-1 $\beta$  reseptörü olan IL1R1'nin 3'-UTR bölgesi ile füzyon yapılmış olan lusiferaz geni içeren ifade vektörü ticari olarak satın alındı. Bu amaçla, *LightSwitch™ 3'UTR Reporter GoClone® Collection* kataloğundan IL1R1 geninin 3'UTR bölgesini içeren vektör temin edildi (Şekil 3.5).



Şekil 3.5. LightSwitch 3'UTR Reporter GoClone vektör haritası.

İlk olarak IL1R1 geninin 3'UTR bölgesinde 7 nükleotidlik miRNA bağlantı bölgesinin en az 4 nükleotidinin değiştirilmesine karar verildi (Tablo 3.4). Bu amaçla miR-197'nin aday genine bağlandığı belirlenen bölge mutageniz primeriyle amplifiye edildi.

**Tablo 3.4.** miR-197'nin IL1R1 genine bağlanma potansiyeli olan bölgedeki yapılması planlanan dizi değişiklikleri.

	<b>miR-197</b> <b>3'UTR'daki bağlantı dizileri;</b> <b>5' GUGGUGA 3'</b>
<b>IL1R1 3'UTR</b>	a. Pozisyon 1498-1504, IL1R1 3' UTR 5' ...CCCACUGCAGAGAUGGUGGUGAG... 3' CGACCCACCUCUCCACCACUU  Mutasyon sonrası oluşturulacak dizi: <u>CTCGAGT</u>

### 3.2.10. Mutageniz için Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)

Primerler, *QuikChange Primer Design Program* (www.agilent.com/genomics/qcpd) kullanılarak tasarlandı. Tasarlanan primerler ile *QuikChange II XL Site-Directed Mutagenesis Kit* (Agilent Technologies) kullanılarak mutageniz PCR'ı gerçekleştirildi. Mutageniz PCR'ı için tasarlanan primer dizileri Tablo 3.5'te verilmiştir.

**Tablo 3.5.** miRNA bağlantı bölgesi için mutageniz primer dizileri.

<b>3'UTR Bölgesi</b>	<b>Bağlanan Aday miRNA</b>	<b>Primer 1</b>	<b>Primer 2</b>
<b>IL1R1</b>	<b>miR-197</b>	IL1R1 A.1. 5'agcctcccagatgtgcactcgagca tctctgcagtgggc-3'	IL1R1 A.2. 5'gccactgcagagatgctcgagtgca catctgggaggct-3'

Reaksiyon, *Gene Amplification PCR System 9700* (Applied Biosystem) PCR cihazında gerçekleştirildi.

10X Reaksiyon Tamponu	5 µl
dsDNA kalıbı (10 ng)	x µl
Oligonükleotid primer #1 (125 ng)	x µl
Oligonükleotid primer #2 (125 ng)	x µl
dNTP karışımı	1 µl
<i>QuikSolution</i>	3 µl
ddH <sub>2</sub> O	ile 50 µl'e tamamlandı.

### **Reaksiyon Koşulları**

95°C 2 dk.

---

95°C 1 dk.

68°C 50 sn.

68°C 10 dk. (18 döngü)

---

68°C 7 dk.

Reaksiyon sonrası örneklerin üzerine, mutasyon içermeyen atasal zinciri parçalamak üzere 1 µl Dpn I restriksiyon enzimi (10 U/ µl) eklenerek 37°C'de 1 saat inkübe edildi. Örnekler, transformasyon aşamasına kadar -20°C'de bekletildi.

### **3.2.11. Transformasyon**

IL1R1 geninde miR-197'nin bağlandığı bölgede mutasyon yapılan IL1R1 3'UTR vektörleriyle transformasyon yapıldı. *Mix&Go* kompetan hücreleriyle (100 µl) mutant vektör (2 µl) karıştırıldı. 5 dk buz üzerinde inkübe edildi. Transformasyonun ardından bakteriler 1X ampisilin içeren LB agara ekildi. 37°C'de çalkalamalı etüvde 16-18 saat inkübe edildi. LB besiyerleri alttaki protokolleri takiben hazırlandı:

#### **Sıvı LB besiyeri (pH 7,0-7,5)**

Tripton 5gr

Maya özütü 2,5gr

NaCl 5gr

Distile su 500 ml'ye tamamlanır ve sterilize edilir.

Katı LB besiyeri: %1,5 agar içeren sıvı LB besiyeri

İnkübasyon sonrasında elde edilen kolonilerden seçilenler, 1X ampisilin içeren 3 ml LB sıvı besiyeri içerisinde, 37°C'de çalkalamalı etüvde 16-18 saat çoğaltıldı. Çoğaltılan koloniler, *Hybrid-Q*, *Plasmid Rapidprep*, *Total DNA Purification* (GeneAll) kiti kullanılarak miniprep yöntemi ile izole edildi. Plazmidlerde miR-197'nin bağlandığı bölgedeki mutasyonun varlığı DNA dizi analizi ile doğrulandı.

### 3.2.12. DNA Dizi Analizi

miR-197'nin bağlanma bölgesinde mutasyon içerdiği düşünülen IL1R1 plazmidlerinden, DNA dizi analizi ile doğrulanmak üzere aşağıda belirtilen şekilde reaksiyon gerçekleştirildi. IL1R1 plazmidine uygun olarak tasarlanan DNA dizi analizi primerleri kullanıldı.

3.1 BigDye Terminator	2,0 µl
5x Reaksiyon tamponu	4,0 µl
Primer <i>Forward</i> (3,3 pmol/µl)	1,0 µl
Plazmid DNA'sı (600 ng/ul)	x µl
dH <sub>2</sub> O	ile 20 µl'ye tamamlanır.

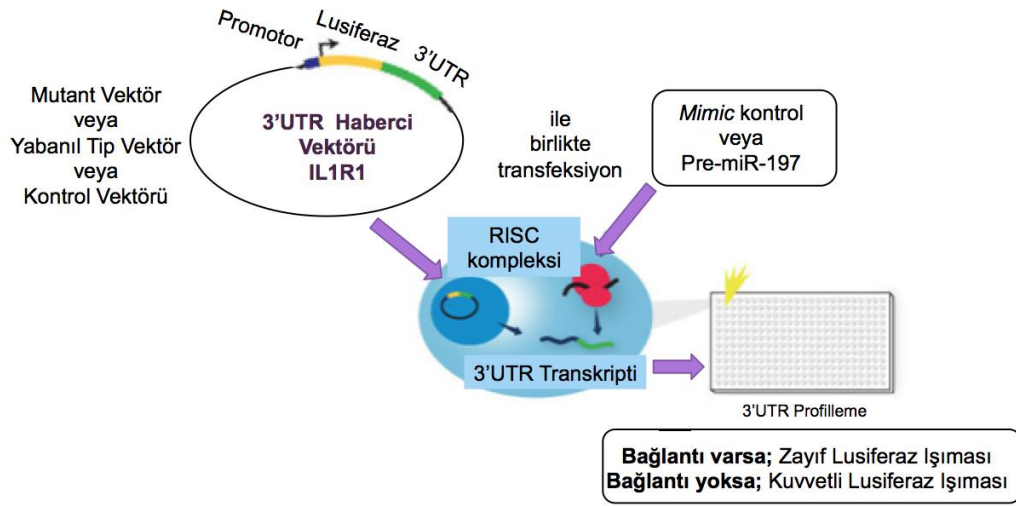
94 °C	5 dk.
<hr/>	
94 °C	15 sn.
50 °C	15 sn.
60 °C	4 dk. (25 döngü)
<hr/>	
60 °C	1 dk.

DNA dizi analizi sonuçları *Chromas* (versiyon 2.33) programı ile analiz edildi.

### 3.2.13. 3'UTR Lusiferaz Aktivitesinin Ölçülmesi

miRNA'ların gen ifadesi üzerinde herhangi bir düzenleme yapıp yapmadığı, transfeksiyon sonrası hücrelerin *LightSwitch Luciferase Assay Reagent* (SwitchGear Genomics) ile inkübe edilmesini takiben lusiferaz aktivite analizi ile ölçüldü. miRNA'nın transkribe olan mRNA'ya bağlanmadığı durumda lusiferaz geni ifade

olacak ve ışığa alınabilecektir. miRNA'nın transkribe olan mRNA'ya bağlandığı durumda ise lusiferazın translasyonu baskılanacak ve ışığa alınmayacaktır (Şekil 3.6). Hücrelerden gelen lusiferaz sinyali mikropılaka okuyucuları (*Molecular Devices, Spectramax i3x* ve *Spectramax M2*) yardımıyla ölçülerek miRNA'nın hedef gene bağlantısı direkt olarak analiz edildi.



Şekil 3.6. 3'UTR lusiferaz aktivite deneylerinin prensibi.

### 3.2.14. Verilerin Değerlendirilmesi ve İstatistiksel Analizler

miRNA'lardaki ve genlerdeki ifade değişimleri, örneklere ait tekrarların ortalama Ct değerlerinin alınmasıyla miRNA'lar için *RNU48* ve mRNA'lar için *GAPDH* referans genlerine göre normalize edildi. Elde edilen sonuçlar, kontrol grup ile karşılaştırılarak göreceli kantitasyon ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ) yöntemine göre hesaplandı.

Genlere ait ifade değişimlerinin saptanmasından sonra, kat artış/azalışlarının istatistiksel anlamlılıkları *Student's T-* testi ve *Mann-Whitney U* testi ile *GraphPad Prism 5.01* yazılımı kullanılarak analiz edildi. Buna göre;  $p \leq 0.05$  olan değerler anlamlı kabul edildi.

Tüm grafikler *GraphPad Prism 5.01* yazılımı kullanılarak analiz edildi ve çizildi.

## 4. BULGULAR

### 4.1. miRNA İfade Analizi ve Biyoinformatik Araçlarla Yolak Analizi

Toplam 12 birey için hem TAC hem de MeV-SAM analizi yapılarak iki program tarafından da anlamlı bulunan miRNA'lar aday miRNA'lar olarak belirlendi. Ortak olanlar belirlenen miRNA'lar Tablo 4.1'de ve ortak olanlara ait kat artış ve azalışları, istatistiksel anlamlılıkları Tablo 4.2'de verildi.

**Tablo 4.1.** M694V/M694V hastalar vs. kontrol grubu için iki farklı analiz programından elde edilen sonuçlara göre 2 kat ve üzeri artış/azalış gösteren miRNA'lar. Ortak olanlar koyu renk ile gösterilmiştir.

<i>Multi Experiment Viewer (MeV)</i>	<i>Transcriptome Analysis Console (TAC)</i>		
<b>hsa-miR-20a</b>	hsa-miR-143	<b>hsa-miR-30e</b>	hsa-mir-152
<b>hsa-miR-29b</b>	hsa-miR-19a	hsa-miR-199a-5p	hsa-miR-671
<b>hsa-miR-19b</b>	<b>hsa-miR-29b</b>	hsa-miR-181a-star	hsa-miR-660
<b>hsa-miR-30e</b>	hsa-miR-1246	hsa-miR-148a-star	hsa-miR-192
<b>hsa-miR-197</b>	<b>hsa-miR-19b</b>	hsa-miR-129-5p	hsa-miR-1826
hsa-miR-1308	hsa-miR-194	<b>hsa-miR-20a</b>	<b>hsa-miR-197</b>

Bu miRNA'lar arasından her iki program tarafından da istatistiksel olarak anlamlı olanları, 2 kat ve üzeri artış ya da azalış gösterenler, aday miRNA'lar olarak belirlendi (Tablo 4.2).



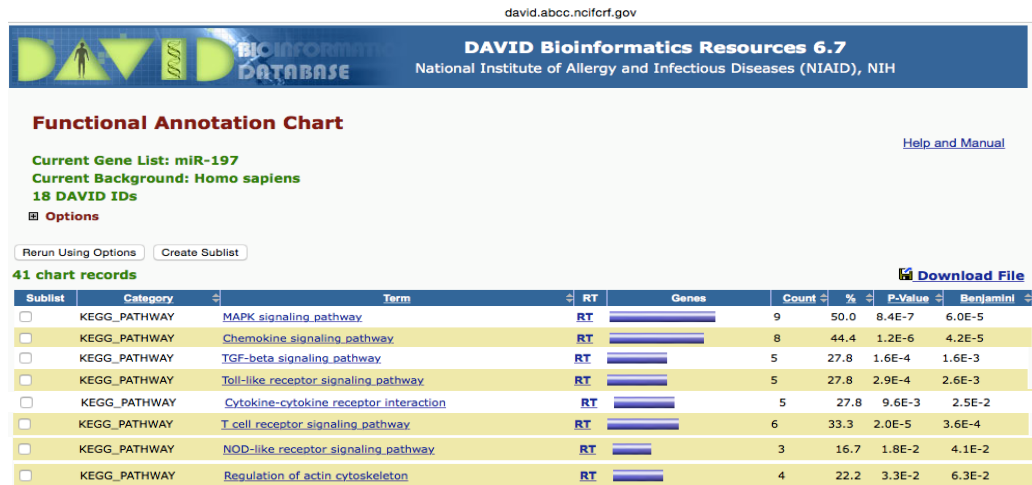
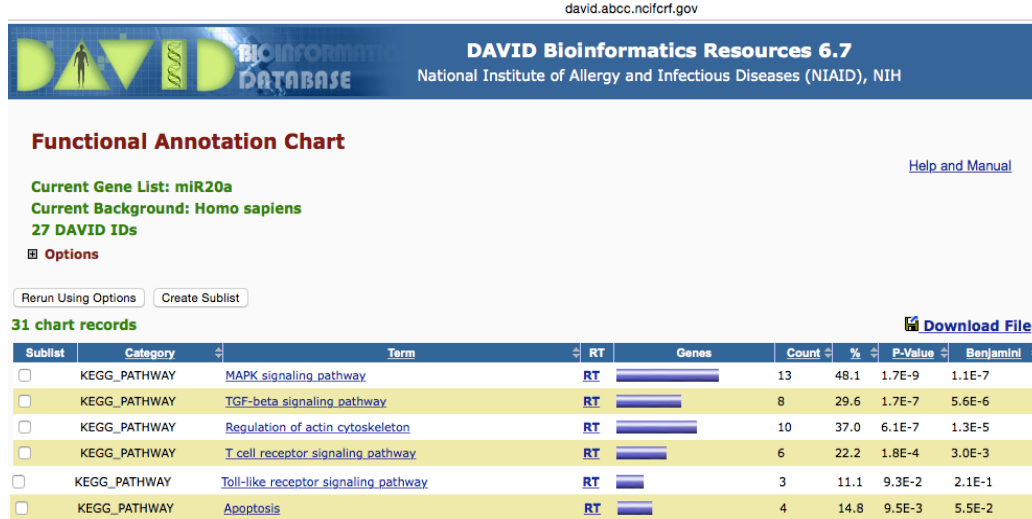
**Tablo 4.2.** M694V/M694V hastalar vs. kontrol grubu için MeV-SAM ve TAC analiz programlarından ortak olarak elde edilen aday miRNA'ların kat değişimleri, q değerleri ve p değerleri. q değeri; *False Discovery Rate*'i göstermektedir. Bu değer kat değişiminin yanlış olma olasılığını yüzde olarak vermektedir. \*  $p < 0.05$ .

	<i>Multi Experiment Viewer</i> (MeV)		<i>Transcriptome Analysis Console</i> (TAC)	
	Kat değişimi	q değeri (%)	Kat değişimi	ANOVA p değeri
<b>hsa-miR-20a</b>	5.55	0.0	3.60	0.017*
<b>hsa-miR-29b</b>	3.30	0.0	5.13	0.025*
<b>hsa-miR-19b</b>	2.64	0.0	3.75	0.018*
<b>hsa-miR-30e</b>	2.12	0.0	2.55	0.013*
<b>hsa-miR-197</b>	-2.27	0.0	-2.11	0.048*

M694V/M694V hastalar vs. kontrol grubunda; miR-20a, miR-29b, miR-19b, miR-30e ve miR-197 genleri için biyoinformatik analizler yapıldı.

*miRWalk* veri tabanı kullanılarak miRNA'ların bağlanma olasılığı olan genler belirlendi. Belirlenen 5 miRNA'ya ait gen listeleri, DAVID v6.7 programı ile yollar açısından sınıflandırıldı. Sınıflandırma, KEGG programının analiz sonuçlarına göre yapıldı.

Hedef genler üzerinden yapılan yolak analizleri sonucunda; miR-20a ve miR-197'nin kemokin sinyal, TGF-beta sinyal, Toll-like reseptör, sitokin-sitokin reseptör interaksyonu, T hücresi reseptör sinyal, apoptoz/pyroptoz ve aktin iskeleti düzenlenmesinde gibi inflamasyonla doğrudan ilişkili yollarda görevli olabilecekleri belirlendi (Şekil 4.1).

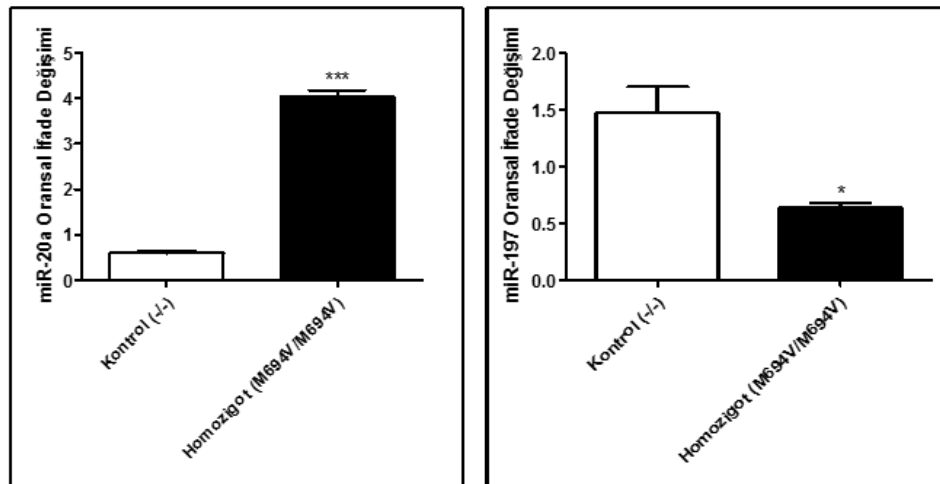


**Şekil 4.1.** miR-20a'nın ve miR-197'nin görev alabileceği yollar listeleri.

Tezin bir sonraki kısmında, biyoinformatik açıdan seçilen 2 miRNA'nın mikrodizin sonucundaki kat artışları qRT-PCR ile valide edildi.

#### 4.2. Kantitatif Gerçek-Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (qRT-PCR)

qRT-PCR sonrasında elde edilen kat değişimleri Şekil 4.2'de verildi. qRT-PCR sonrasında elde edilen kat değişimlerinin, mikrodizin analizi sonucunda elde edilen kat değişimlerine oldukça yakın olduğu gözlemlendi. Sonuç olarak, mikrodizin sonuçları M694V/M694V hastalar vs. kontrol grubu için yüksek bir başarıyla valide edildi.



**Şekil 4.2.** miR-20a ve miR-197 için qRT-PCR sonuçları. Mann-Whitney U test sonuçları, \*P < 0.05; \*\*P < 0.01; \*\*\*P < 0.001.

Mikrodizin ve qRT-PCR ifade analizi sonuçlarının karşılaştırılması Tablo 4.3'te verilmiştir.

**Tablo 4.3.** Mikrodizin ve qRT-PCR ifade analizi sonuçlarının karşılaştırılması.

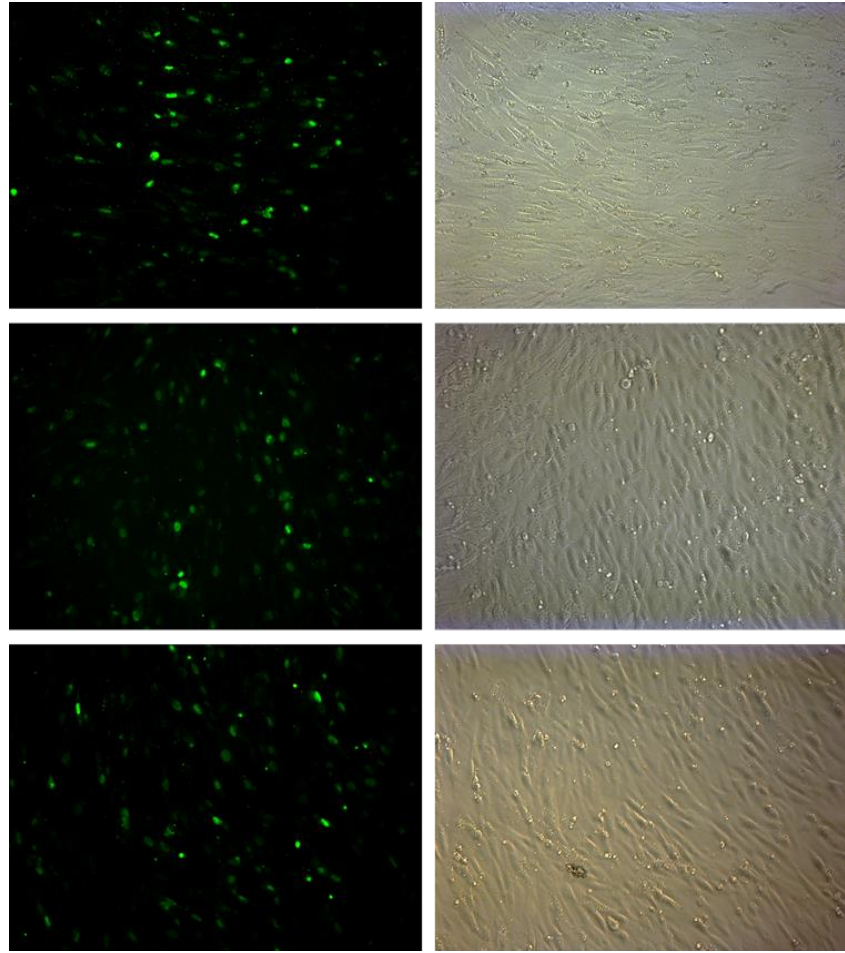
	Kat Değişimleri	
	Mikrodizin Sonucu	qRT-PCR Sonucu
<b>miR-20a</b>	5,55	5,86
<b>miR-197</b>	-2,27	-2,22

### 4.3. Hücre Kültürü ve İşlevsel Analizler

miRNA'ların ifade değişimlerinin valide edilmesinden sonra, aday miRNA'ların işlevlerine yönelik araştırmalar gerçekleştirildi.

İşlevsel analizler için, Pysin ve ilişkili proteinleri doğal olarak ifade eden, inflamatuvar süreçlerde görevli SW982 hücre hattı kültüre edildi. Bu hücrelerde miRNA'ların transfeksiyonları yapıldı, işlevsel analizler yapılacağı için ilk olarak hücrelerin transfeksiyon koşulları optimize edildi.

SW982 hücrelerinde ise 3 uL Lipofektamin derişiminde %85 oranında transfeksiyon başarısı elde edildi (Şekil 4.3).

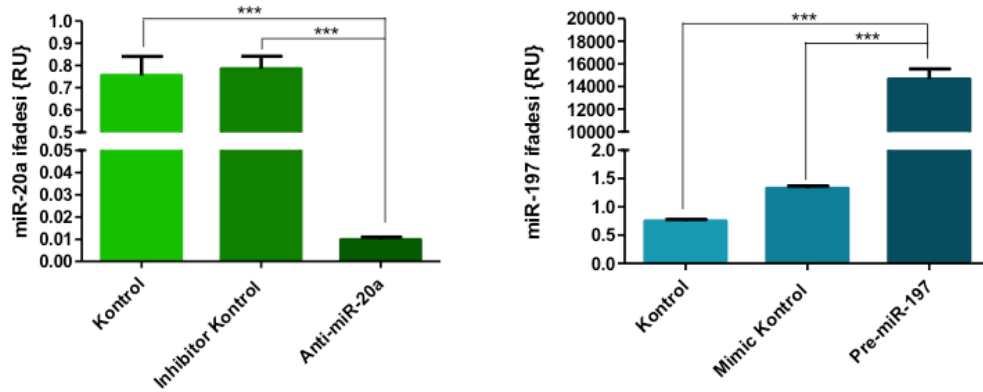


**Şekil 4.3.** SW982 hücrelerinin 3 ul Lipofectamine 2000 ile transfeksiyon sonrası görüntüsü. Transfeksiyon etkinliğinin yüksek olduğu görülmektedir. Gri, faz-kontrast görüntüsü, Yeşil, FITC işaretli oligonükleotid ile işaretli hücre, 20X.

SW982 hücrelerinin transfeksiyon optimizasyonun başarılı bir şekilde yapılmasının ardından, bu hücreler hsa-miR-197-3p, *mirVana*® *miRNA mimic* (Ambion), hsa-miR-20a-5p, *mirVana*® *miRNA inhibitor* (Ambion), *mirVana*™ *miRNA Mimic*, *Negative Control #1* (Ambion) ve *mirVana*™ *miRNA Inhibitor*, *Negative Control #1* (Ambion) ile transfekte edildi. M694V homozigot hastalarda miR-20a ifadesi hem mikrodizin hem de validasyon sonuçlarına göre arttığı için

SW982 hücrelerinde ifadesi baskılandı. miR-197'nin ifadesi azaldığı için, hücrelerde arttırılarak işlevsel analizler gerçekleştirildi. Bu yaklaşım ile hücrelerde miRNA'lar açısından ters etki yaratılarak, bu süreçte miRNA'ların işlevi aydınlatılmaya çalışıldı.

Pre-miR-197 ve anti-miR-20a transfeksiyonu sonrasında hücrelerdeki inhibisyon ve aşırı ifade seviyeleri qRT-PCR ile belirlendi (Şekil 4.4).



**Şekil 4.4.** Anti-miR-20a, inhibitör kontrol, pre-miR-197 ve mimic kontrol için qRT-PCR sonuçları. *Unpaired student T* test sonuçları, \*\*\*P < 0.0001.

Anti-miR-20a transfekte edilen hücrelerde, miR-20a'nın ifadesi çok yüksek bir verimlilikte baskılandı. Aynı şekilde pre-miR-197 transfekte edilen hücrelerde miR-197'nin ifadesi de yüksek bir başarıyla arttırıldı. Yüksek verimlilikteki miRNA transfeksiyonları sonrası işlevsel analizlere başlandı. miR-20a ve miR-197 için yapılan yolak analizleri sonucunda, kemokin sinyal, TGF-beta sinyal, Toll-like reseptör, sitokin-sitokin reseptör interaksyonu, T hücresi reseptör sinyal, apoptoz ve aktin iskeleti düzenlenmesinde görev alabilecekleri görüldüğünden anti-miR-20a ve pre-miR-197 transfekte edilen hücrelerde apoptoz analizi için *Annexin V/PI* boyaması yapıldı. Aktin iskeleti ile ilgili yolların bulunması nedeniyle hücre göçü analizleri yapıldı. Bu doğrultuda hem yara iyileşmesi hem de filtre deneyleri yapıldı. Bu deneyleri takiben, inflamatuvar genlerin ifadesi de araştırıldı. Bu genler: *IL-1 $\beta$* , *MEFV*, *IL-18*, *TNF- $\alpha$*  ve *TGF- $\beta$*  olarak seçildi. Diğer inflamatuvar yollarla ilişkili

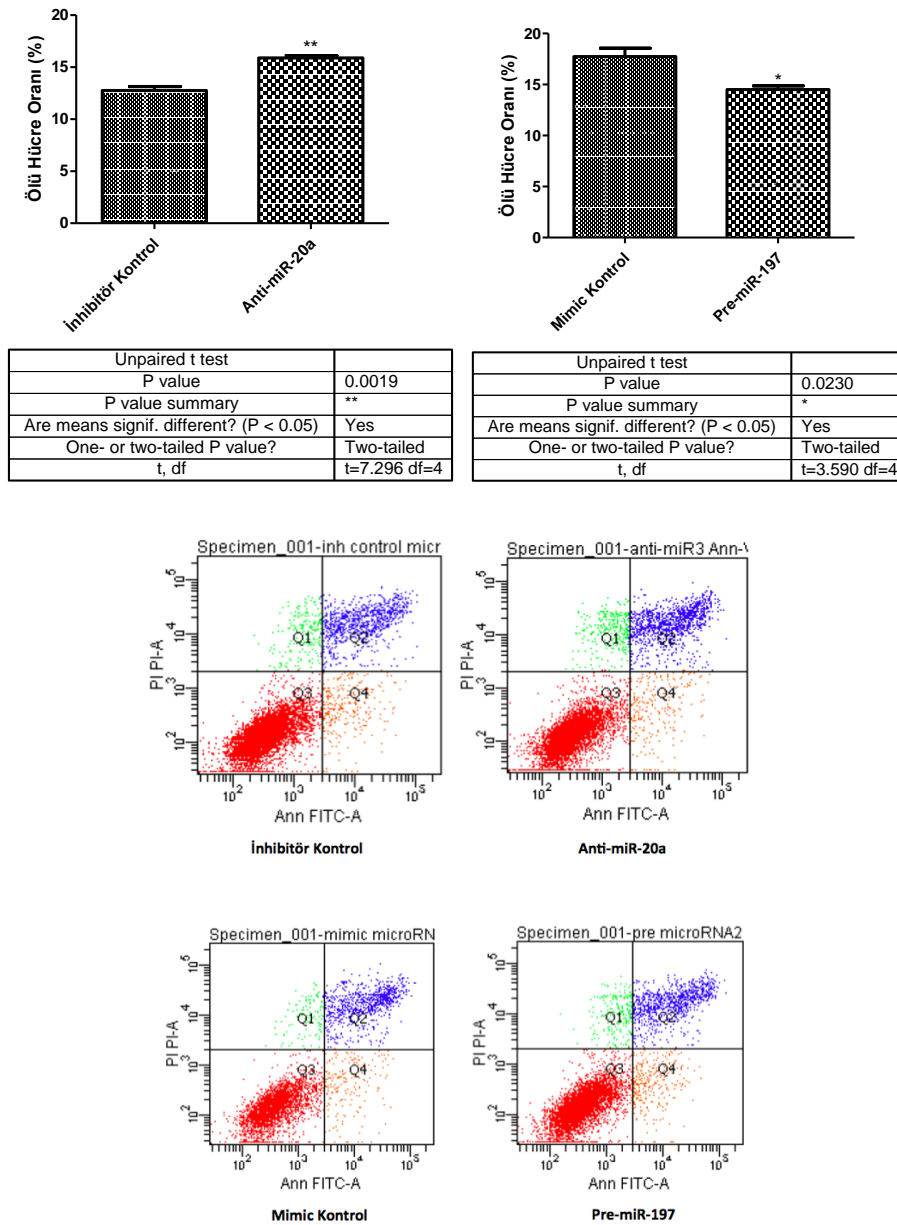
olması ve AAA patogenezinde etkili olması açısından kaspaz 1 aktivite deneyleri tasarlandı. Son olarak da insan sitokin antikor mikrodizin analizi gerçekleştirildi.

İnflamazom kompleksinin aktif olduğu durumda ve kaspaz 1 bağımlı meydana gelen hücre ölüm şekline “pyroptoz” adı verilmektedir. Bu nedenle işlevsel analizlerde geçen *Annexin V/PI* boyaması ile yapılan hücre ölümü deneyleri apoptoz oranını vermekte, inflamatuvar hücrelerdeki ölüm şekli olan pyroptozun tayini için kaspaz 1 aktivitesinin ölçülmesi gerekmektedir. Bu nedenle kaspaz 1 aktivite deneyleri pyroptoz tayini açısından da değerlendirildi.

İlk aşamada inflamatuvar yollarla ilgili olarak, apoptoz tayini deneyleri yapıldı.

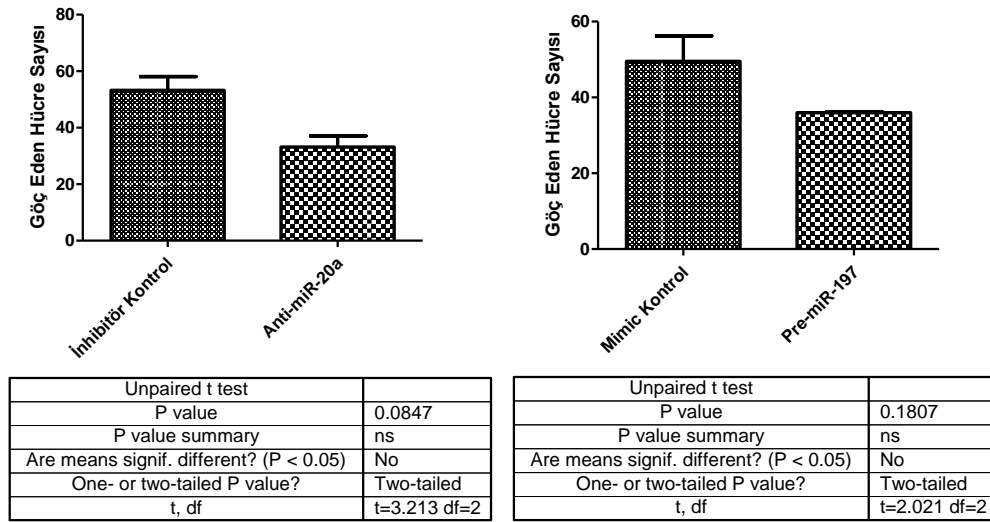
#### **4.3.1. Apoptoz Deneyleri**

Yapılan birinci deneyde, pre-miR-197 transfekte edilen hücrelerde, hücre ölüm oranı azaldı. Anti-miR-20a transfekte edilen hücrelerde de hücre ölüm oranının arttığı belirlendi (Şekil 4.5).



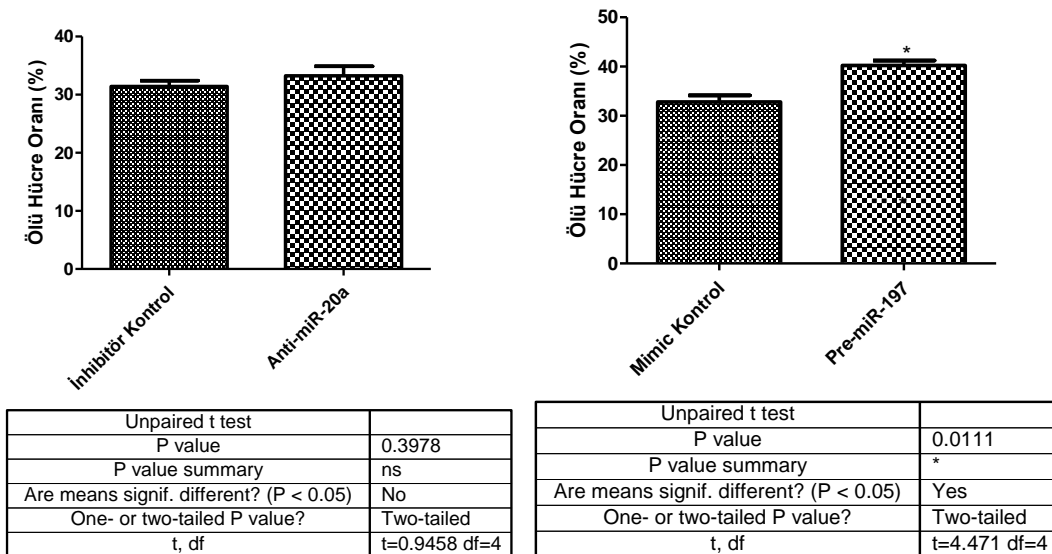
**Şekil 4.5.** Pre-miR-197 ve anti-miR-20a transfekte edilen hücrelerde apoptoz deneyleri sonuçları. \*P < 0.05; \*\*P < 0.01; \*\*\*P < 0.001. Akım sitometrisi sonuçları; Q1: Annexin V - / PI +, nekrotik hücreler. Q2: Annexin V + / PI +, geç dönem apoptotik hücreler. Q3: Annexin V - / PI -, canlı hücreler. Q4: Annexin V + / PI -, erken dönem apoptotik hücreler.

Yapılan ikinci biyolojik tekrarda, pre-miR-197 transfekte edilen hücrelerde, hücre ölüm oranı azaldı. Anti-miR-20a transfekte edilen hücrelerde de hücre ölüm oranının azaldığı belirlendi (Şekil 4.6).



**Şekil 4.6.** Pre-miR-197 ve anti-miR-20a transfekte edilen hücrelerde apoptoz deneylerinin 2. tekrar sonuçları. \*P < 0.05; \*\*P < 0.01; \*\*\*P < 0.001.

Yapılan üçüncü biyolojik tekrarda, pre-miR-197 transfekte edilen hücrelerde, hücre ölüm oranı arttı. Anti-miR-20a transfekte edilen hücrelerde de hücre ölüm oranının arttığı belirlendi (Şekil 4.7).



**Şekil 4.7.** Pre-miR-197 ve anti-miR-20a transfekte edilen hücrelerde apoptoz deneylerinin 3. tekrar sonuçları. \*P < 0.05;F \*\*P < 0.01; \*\*\*P < 0.001.



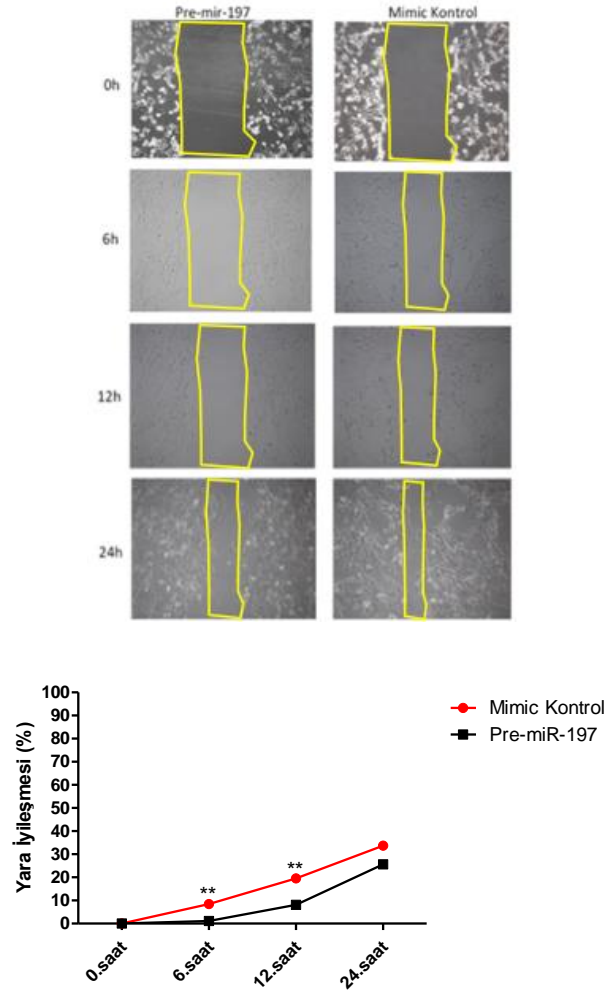
Pre-miR-197'nin ifadesindeki artış ile iki bağımsız biyolojik tekrarda da apoptoz oranı anlamlı olmasa da azalmıştır. Pre-miR-197 ile transfekte edilen hücrelerde apoptozun azalması bu miRNA'nın hedef geni üzerinden bu yolla görev alabileceğini, hedef genini aşırı baskılayarak apoptozu baskılayabileceğini ve bu şekilde inflamasyon üzerinde bir etkiye sahip olabileceğine işaret etmiştir.

Anti-miR-20a ile transfeksiyon sonrasında iki bağımsız biyolojik tekrarda da apoptoz oranı anlamlı olmasa da artmıştır. Anti-miR-20a ile transfekte edilen hücrelerde apoptozun artması bu miRNA'nın hedef geni üzerinden bu yolla görev alabileceğini, hedef geninin ifadesinin artmasıyla apoptozun arttığı, normal durumda da hedef geninin ifadesini baskılayarak apoptozu azalttığı ve bu şekilde inflamasyon üzerinde bir etkiye sahip olabileceğine işaret etmiştir.

#### **4.3.2. Hücre Göçü Deneyleri**

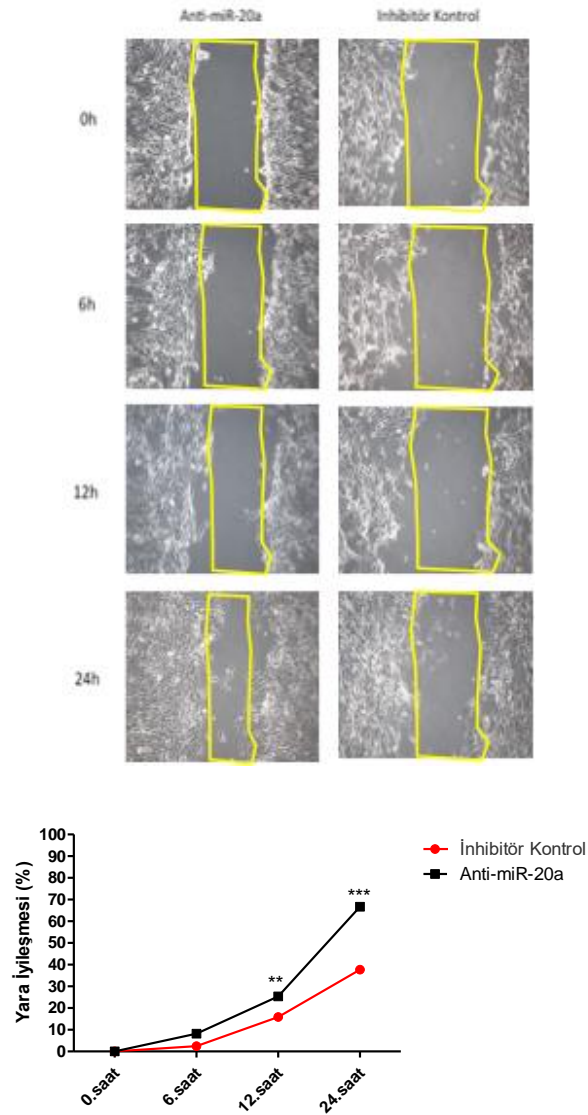
##### **Yara İyileşmesi Deneyi**

Yapılan birinci deneyde, pre-miR-197 ile transfekte edilen hücrelerde, hücre göçünde 6. ve 12. saatte anlamlı bir azalış gösterdiği belirlendi. Diğer saatlerde ise *mimic* kontrol ile herhangi bir farklılık gözlenmedi (Şekil 4.8).



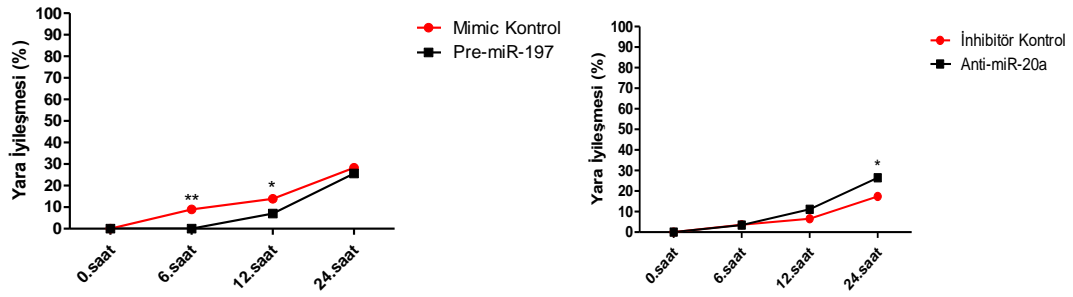
**Şekil 4.8.** Pre-miR-197 ile transfekte edilen hücrelerde yara iyileşmesi deneyi sonuçları. \*P < 0.05; \*\*P < 0.01; \*\*\*P < 0.001.

Yapılan birinci deneyde, anti-miR-20a ile transfekte edilen hücrelerde ise hücre göçünün 12. ve 24. saatte anlamlı bir artış gösterdiği belirlendi. (Şekil 4.9).



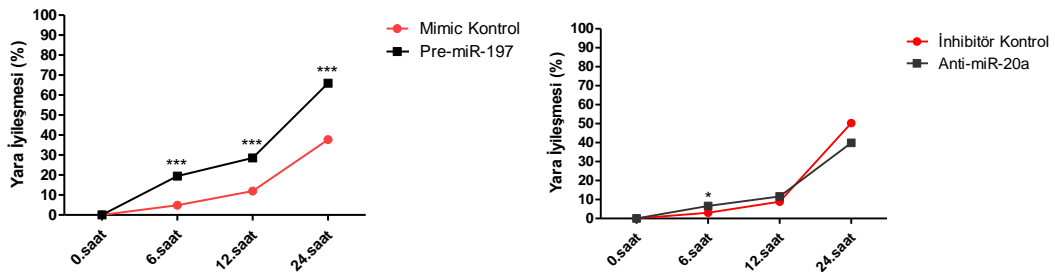
**Şekil 4.9.** Anti-miR-20a ile transfekte edilen hücrelerde yara iyileşmesi deneyi sonuçları. \*P < 0.05; \*\*P < 0.01; \*\*\*P < 0.001.

Yapılan ikinci biyolojik tekrarda, pre-miR-197 ile transfekte edilen hücrelerde, hücre göçünde 6. ve 12. saatte anlamlı bir azalış gösterdiği belirlendi. Anti-miR-20a ile transfekte edilen hücrelerde ise hücre göçünün sadece 24. saatte anlamlı bir artış gösterdiği belirlendi. (Şekil 4.10).



**Şekil 4.10.** Pre-miR-197 ve anti-miR-20a transfekte edilen hücrelerde yara iyileşmesi deneylerinin 2. tekrar sonuçları. \*P < 0.05; \*\*P < 0.01; \*\*\*P < 0.001.

Yapılan üçüncü biyolojik tekrarda, pre-miR-197 ile transfekte edilen hücrelerde, hücre göçünde 6., 12. ve 24. saatlerde artış gözlemlendi. Ancak yara iyileşmesi oranı ve süresi dikkate alındığında yara kapanma hızının normal olmaması ve diğer sonuçlarla benzerlik göstermemesi nedeniyle bu sonuç dikkate alınmadı. Anti-miR-20a ile transfekte edilen hücrelerde inhibitör kontrole göre yara iyileşmesinde sadece 6. saatte bir azalış olduğu belirlendi (Şekil 4.11).



**Şekil 4.11.** Pre-miR-197 ve anti-miR-20a transfekte edilen hücrelerde yara iyileşmesi deneylerinin 3. tekrar sonuçları. \*P < 0.05; \*\*P < 0.01; \*\*\*P < 0.001.

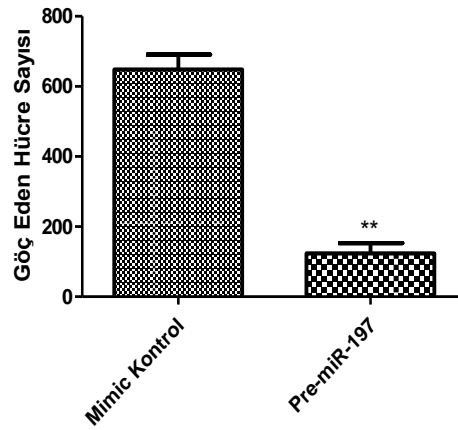
Pre-miR-197'nin ifadesindeki artış ile iki biyolojik tekrarda da 6. ve 12. saatte yara iyileşmesi oranı azaldı. Dolayısıyla bu miRNA'nın yara iyileşmesi sürecinde görev aldığı düşünülmektedir.

Anti-miR-20a ile transfekte edilen hücrelerde ise iki biyolojik tekrarda da sadece 24. saatte yara iyileşmesi oranı arttı. Bu doğrultuda, bu miRNA'nın da yara iyileşmesi sürecinde bir rolü olduğu sonucuna varıldı.

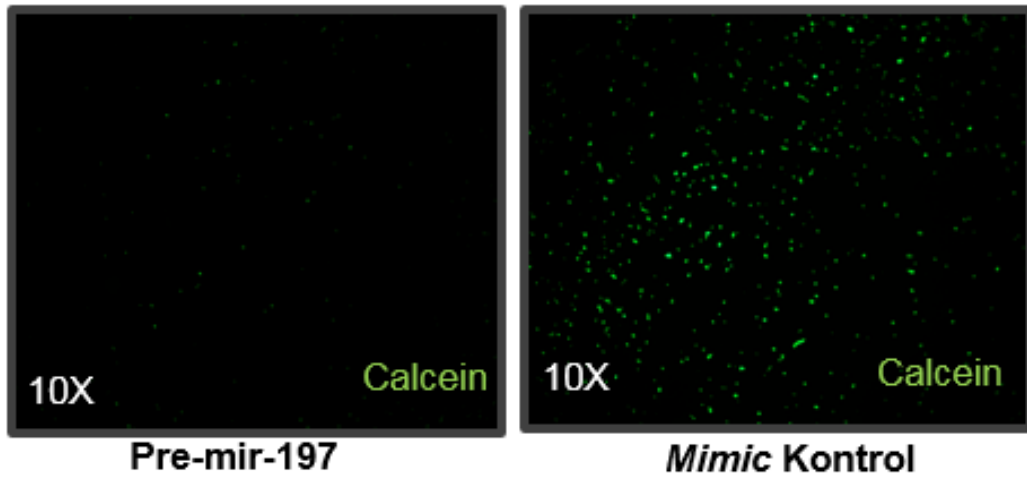
Yara iyileşmesi deneylerinde hücrelerin toplu göç özellikleri değerlendirilmektedir. Bu nedenle ilk olarak bu deney sistemi uygulanarak miRNA transfeksiyonları sonrası hücrelerde genel bir hücre göçü değişikliği olup olmadığının belirlenmesi amaçlandı. Ancak yara iyileşmesi deneylerinde, hücre proliferasyonunun açılan yarayı kapatma sürecinde etkili olması ve göç eden hücrelerin kantitatif olarak belirlenememesi nedeniyle hücre göçü değerlendirmelerinde tek başına etkili ve doğru sonuçlar vermediği düşünüldüğünden bu deney setine hücrelerin tek başına göç özelliklerini gösteren filtre deneyleri de eklenerek, hücre göçü analizleri yapıldı.

### **Filtre Denevi**

Yapılan birinci deneyde, pre-miR-197 transfekte edilen hücrelerde *mimic* kontrole göre karşılaştırıldığında hücre göçü açısından anlamlı bir azalma gözlemlendi (Şekil 4.12).

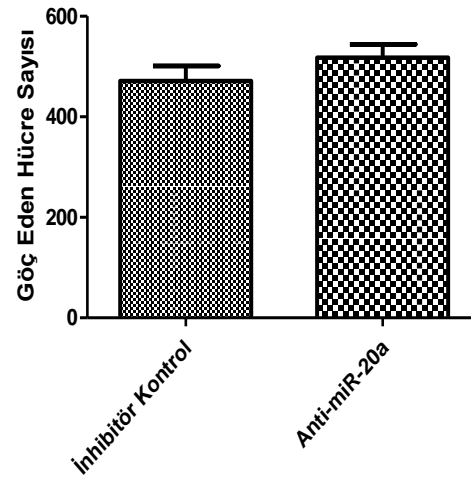


Unpaired t test	
P value	0.0018
P value summary	**
Are means signif. different? (P < 0.05)	Yes
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
t, df	t=10.56 df=3

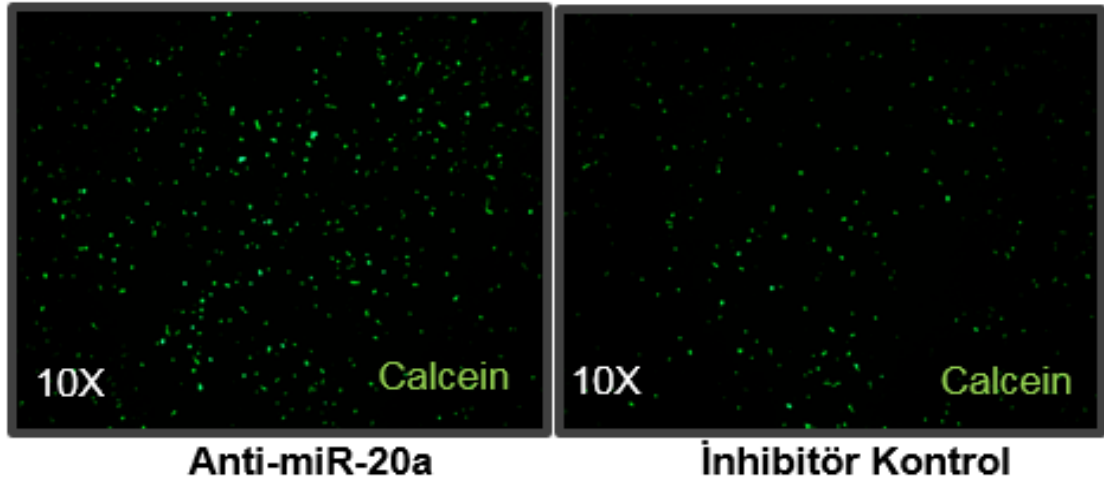


**Şekil 4.12.** Pre-miR-197 transfekte edilen hücrelerde filtre deneyi sonuçları. \*P < 0.05. Kalsein (Yeşil): filtrenin altına geçen canlı hücrelerin görüntüsü.

Yapılan birinci deneyde, anti-miR-20a transfekte edilen hücrelerde de inhibitör kontrole göre hücre göçünde bir artış gözlemlendi. Ancak bu artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı (Şekil 4.13).

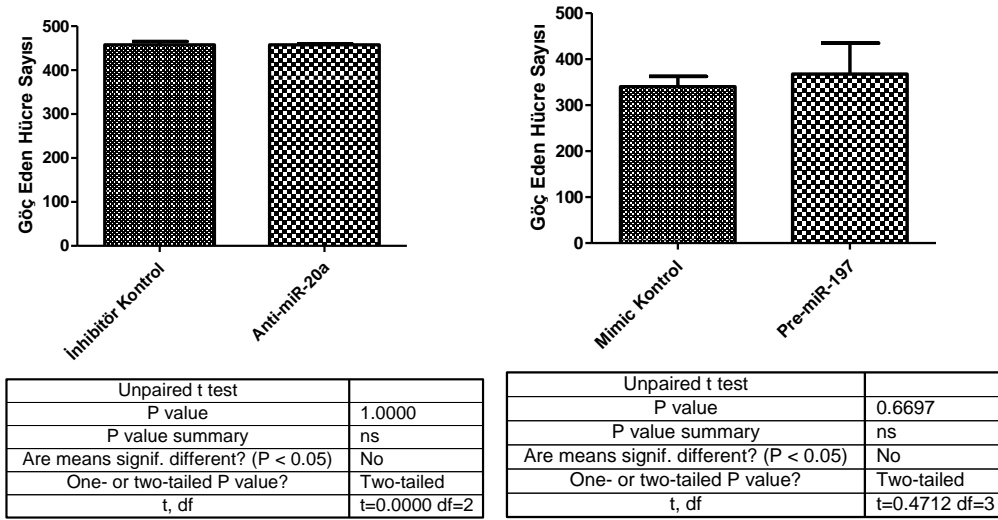


Unpaired t test	
P value	0.3382
P value summary	ns
Are means signif. different? (P < 0.05)	No
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
t, df	t=1.137 df=3



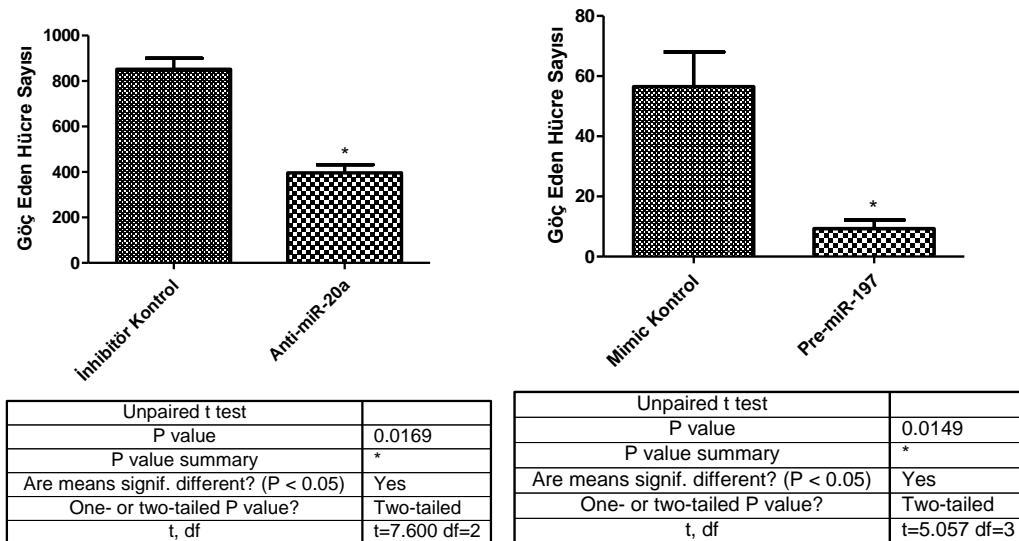
**Şekil 4.13.** Anti-miR-20a transfekte edilen hücrelerde filtre deneyi sonuçları. Kalsein (Yeşil): filtrenin altına geçen canlı hücrelerin görüntüsü.

Yapılan ikinci biyolojik deneyde, pre-miR-197 transfekte edilen hücreler *mimic* kontrole göre karşılaştırıldığında hücre göçü açısından istatistiksel olarak anlamlı olmayan bir artış gözlemlendi. Anti-miR-20a transfekte edilen hücrelerde de inhibitör kontrole göre hücre göçünde herhangi bir fark gözlemlenmedi (Şekil 4.14).



**Şekil 4.14.** Pre-miR-197 ve anti-miR-20a transfekte edilen hücrelerde filtre deneylerinin 2. tekrar sonuçları. \*P < 0.05; \*\*P < 0.01; \*\*\*P < 0.001.

Yapılan üçüncü biyolojik deneyde, pre-miR-197 transfekte edilen hücreler *mimic* kontrole göre karşılaştırıldığında hücre göçü açısından anlamlı bir azalma gözlemlendi. Anti-miR-20a transfekte edilen hücrelerde de inhibitör kontrole göre hücre göçünde anlamlı bir azalma gözlemlendi (Şekil 4.15).



**Şekil 4.15.** Pre-miR-197 ve anti-miR-20a transfekte edilen hücrelerde filtre deneylerinin 3. tekrar sonuçları. \*P < 0.05; \*\*P < 0.01; \*\*\*P < 0.001.



Pre-miR-197'nin ifadesindeki artış ile filtrenin altına göç eden hücre sayısı azalmıştır. Pre-miR-197 ile transfekte edilen hücrelerde hücre göçünün azalması bu miRNA'nın hedef geni üzerinden bu yolla görev alabileceğini, hedef genini aşırı baskılayarak hücre göçünü baskıladığını ve sonuç olarak anti-inflamatuvar bir etkiye sahip olmayabileceğini göstermektedir.

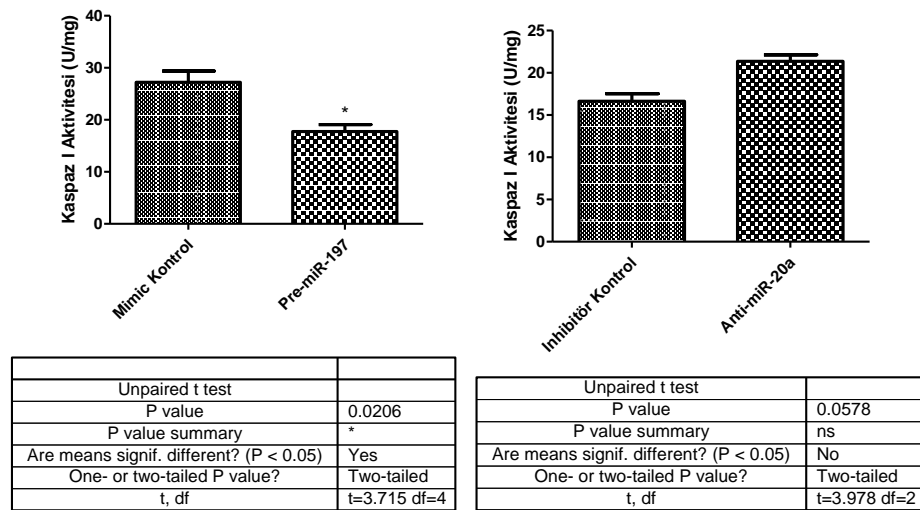
Anti-miR-20a ile transfeksiyon sonrasında üç farklı biyolojik tekrarda da farklı sonuçlar elde edildi. Bu doğrultuda, bu miRNA'nın hücre göçü yolağında bir rolü olmayabileceği sonucuna varılmıştır.

### 4.3.3. İnflamasyon DeneYleri

#### Kaspaz 1 Aktivite DeneYleri

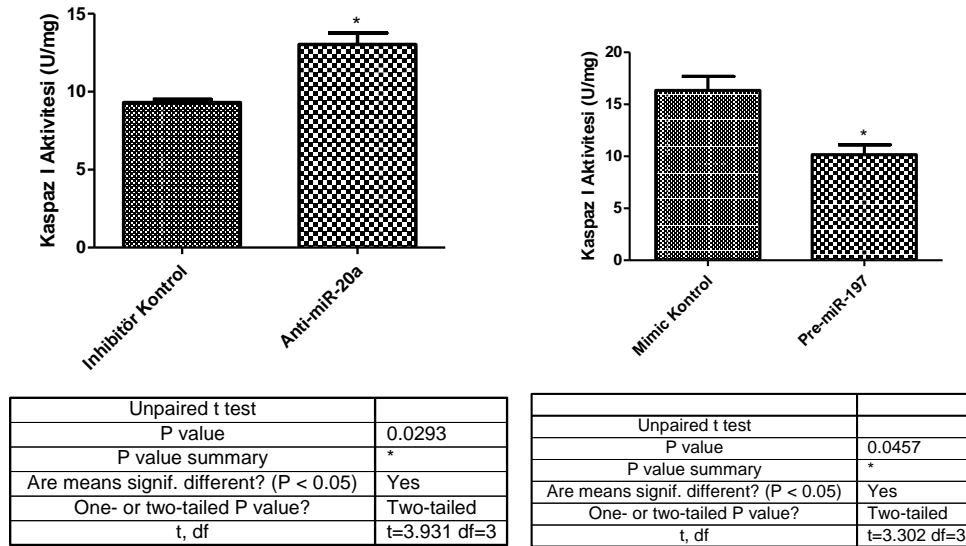
İnflamasyon sürecinde pyrin inflamazomu aktivasyonu ile kaspaz 1 aktivitesi artmaktadır. Bu nedenle inflamasyon ile ilgili hastalıklarda kaspaz 1 aktivitesinin test edilmesi inflamasyon belirteci olarak düşünülmektedir.

Yapılan birinci deneyde, anti-miR-20a transfekte edilen hücrelerde, kaspaz 1 aktivitesinin arttığı belirlendi. Pre-miR-197 transfekte edilen hücrelerde de kaspaz 1 aktivitesinin anlamlı bir şekilde azaldığı gözlemlendi (Şekil 4.16).



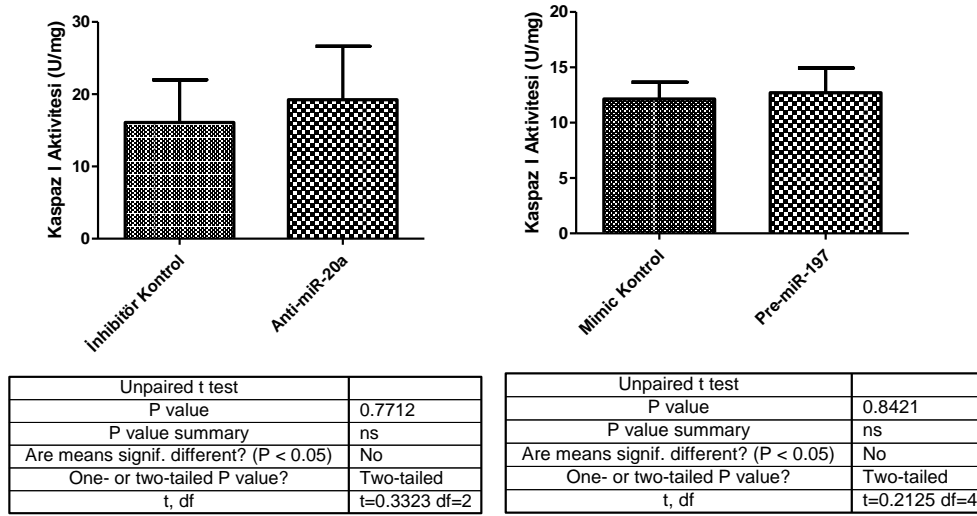
**Şekil 4.16.** Pre-miR-197 ve anti-miR-20a transfekte edilen hücrelerde kaspaz 1 aktivite deneyi sonuçları. \*P < 0.05; \*\*P < 0.01; \*\*\*P < 0.001.

Yapılan ikinci biyolojik tekrarda, anti-miR-20a transfekste edilen hücrelerde, kaspaz 1 aktivitesinin arttığı belirlendi. Pre-miR-197 transfekste edilen hücrelerde de kaspaz 1 aktivitesinin azaldığı gözlemlendi (Şekil 4.17).



**Şekil 4.17.** Pre-miR-197 ve anti-miR-20a transfekste edilen hücrelerde kaspaz 1 aktivite deneylerinin 2. tekrar sonuçları. \*P < 0.05; \*\*P < 0.01; \*\*\*P < 0.001.

Yapılan üçüncü biyolojik tekrarda, anti-miR-20a transfekste edilen hücrelerde, kaspaz 1 aktivitesinin arttığı belirlendi. Pre-miR-197 transfekste edilen hücrelerde de kaspaz 1 aktivitesinin arttığı gözlemlendi (Şekil 4.18). Her iki sonuç da istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı.



**Şekil 4.18.** Pre-miR-197 ve anti-miR-20a transfekte edilen hücrelerde kaspaz 1 aktivite deneylerinin 3. tekrar sonuçları. \*P < 0.05; \*\*P < 0.01; \*\*\*P < 0.001.

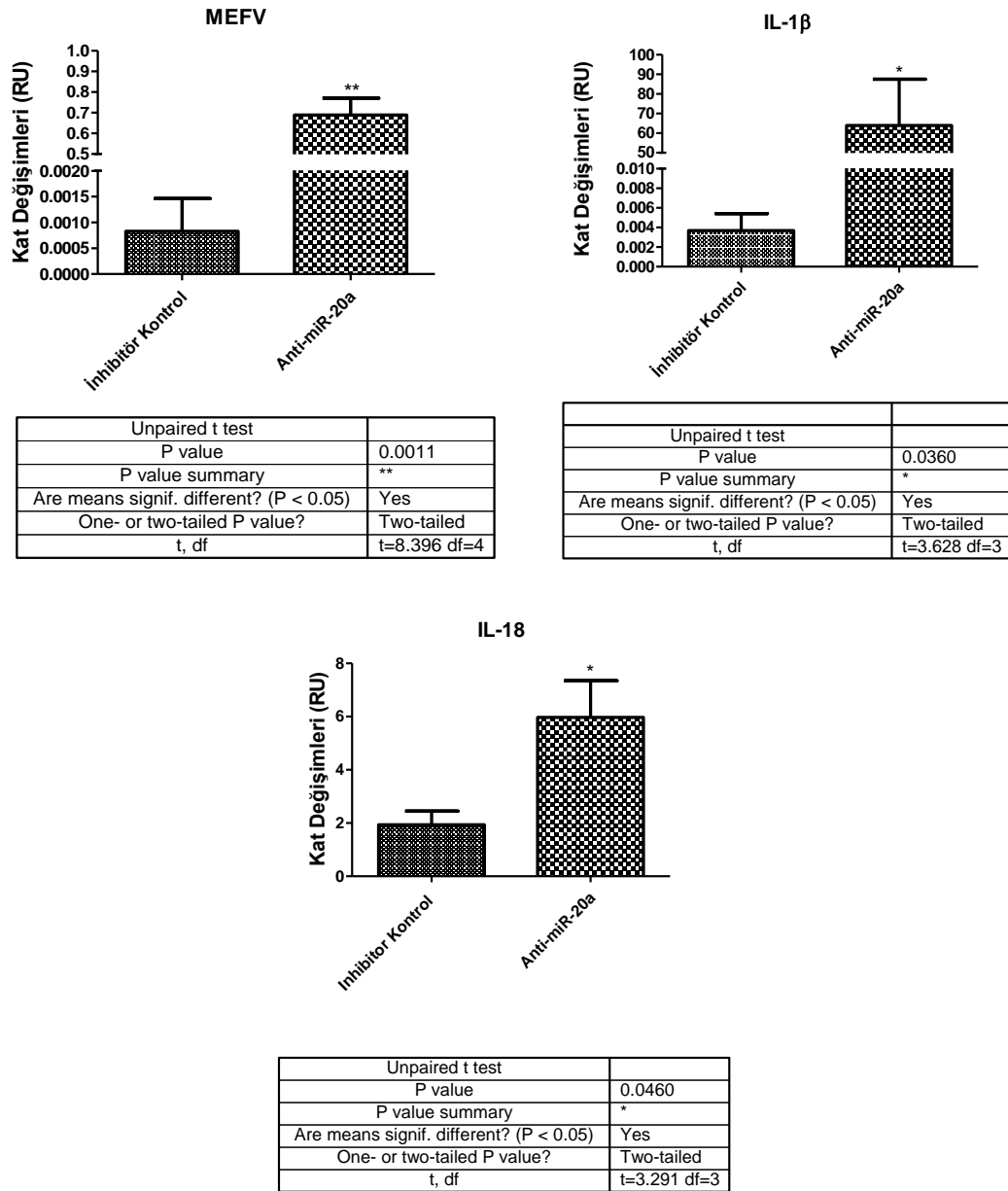
Pre-miR-197 transfeksiyonu sonrasında, iki biyolojik tekrarda da kaspaz 1 aktivitesinde azalma görüldü. Pre-miR-197 ile transfekte edilen hücrelerde kaspaz 1 aktivitesinin azalması bu miRNA'nın hedef geni üzerinden bu yolda görev alabileceğine, hedef genini aşırı baskılayarak inflamasyonu baskıladığını ve bu nedenle anti-inflamatuvar bir etkiye sahip olabileceğini göstermektedir.

Anti-miR-20a ile transfeksiyon sonrasında üç farklı biyolojik tekrarda da anlamlı olmasa da kaspaz 1 aktivitesi artmıştır. Bu miRNA'nın hedef geninin ifadesinin baskılanması azaldığı için bu yola uyarılmıştır. Normal süreçte miR-20a'nın, bu yolağı baskılayarak inflamasyonu baskıladığı sonucuna varabiliriz. Bu durumda bu miRNA da anti-inflamatuvar bir etkiye sahip olabilir.

### **İnflamatuvar Genlerin İfade Analizi**

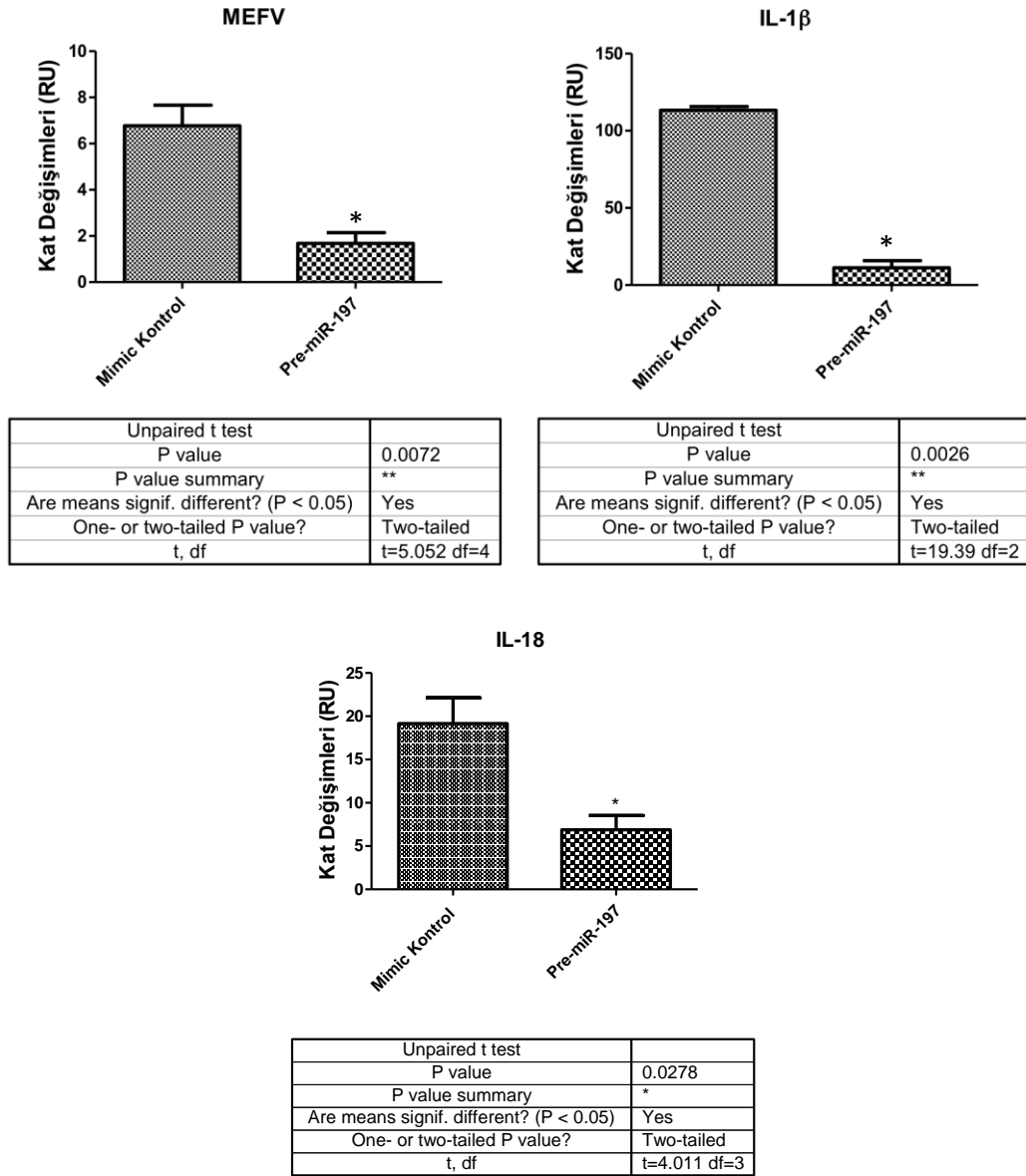
Bu aşamada, pro-inflamatuvar özellikteki, inflamasyon sürecinin başlatılması ve devamında önemli olan sitokinlerin gen ifadeleri ve buna ek olarak AAA hastalığından sorumlu *MEFV* geninin ifadesi analiz edildi.

Anti-miR-20a transfekte edilen hücrelerde *IL-1 $\beta$* , *MEFV*, *IL-18* genlerinin ifade seviyelerinde artış gözlemlendi (Şekil 4.19).



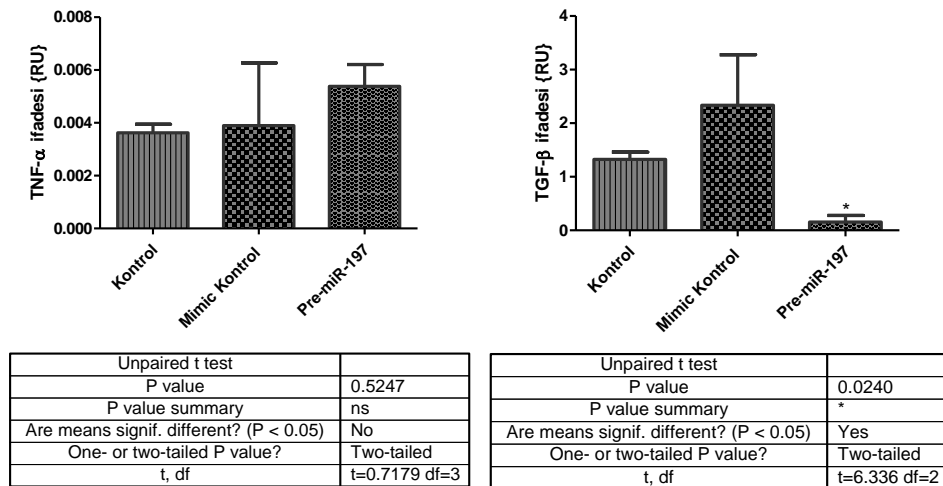
**Şekil 4.19.** Anti-miR-20a transfekte edilen hücrelerde *IL-1 $\beta$* , *MEFV*, *IL-18* genlerinin ifade analizi sonuçları. \*P < 0.05; \*\*P < 0.01; \*\*\*P < 0.001.

Pre-miR-197 transfekte edilen hücrelerde *IL-1 $\beta$* , *MEFV*, *IL-18* genlerinin ifade seviyelerinde azalma olduğu belirlendi (Şekil 4.20).



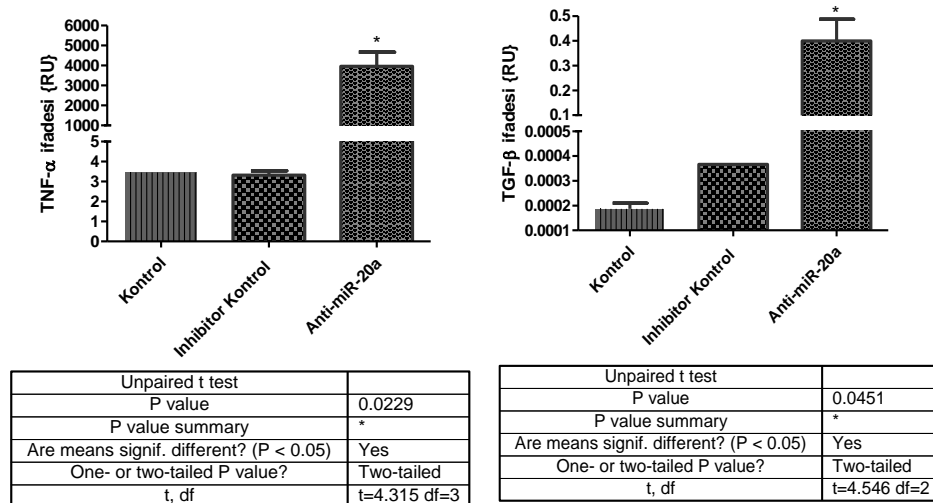
**Şekil 4.20.** Pre-miR-197 transfekte edilen hücrelerde IL-1 $\beta$ , MEFV, IL-18 genlerinin ifade analizi sonuçları. \*P < 0.05; \*\*P < 0.01; \*\*\*P < 0.001.

Pre-miR-197 transfekte edilen hücrelerde, *TGF- $\beta$*  ifadesinin de azaldığı belirlendi. Aynı setteki hücrelerde *TNF- $\alpha$*  seviyesinde anlamlı bir farklılık olmadığı gözlemlendi (Şekil 4.21).



**Şekil 4.21.** Pre-miR-197 ve mimic kontrol transfekte edilen hücrelerde ve kontrol hücrelerindeki *TGF-β* ve *TNF-α* qRT-PCR sonuçları. Kontrol grubuna herhangi bir transfeksiyon yapılmamıştır. *Mann-Whitney U* test sonuçları, \*P < 0.05; \*\*P < 0.01; \*\*\*P < 0.001.

Anti-miR-20a transfekte edilen hücrelerde ise *TNF-α* ve *TGF-β* ifade düzeylerinin yüksek oranda arttığı belirlendi (Şekil 4.22).



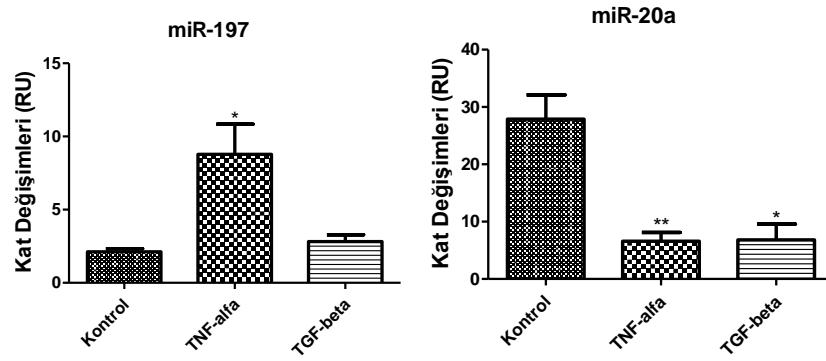
**Şekil 4.22.** Anti-miR-20a ve inhibitör kontrol transfekte edilen hücrelerde ve kontrol hücrelerindeki *TGF-β* ve *TNF-α* qRT-PCR sonuçları. Kontrol grubuna herhangi bir transfeksiyon yapılmamıştır. *Mann-Whitney U* test sonuçları, \*P < 0.05; \*\*P < 0.01; \*\*\*P < 0.001.

Pre-miR-197'nin transfeksiyonu sonrası, miR-197'nin ifadesindeki artışa bağlı olarak inflamasyon sürecinde görev alan birçok sitokin ve transkripsiyon faktörünün ifadesi anlamlı olarak azalmıştır. Sadece *TNF- $\alpha$*  geni üzerinde istatistiksel olarak anlamlı olmayan bir artış belirlenmiştir. Sonuç olarak, bu miRNA'nın hedef geni üzerinden sitokin salınımı ve inflamasyonun uyarımı gibi yollarda görev alabileceği, hedef genini aşırı baskılayarak inflamasyonu baskıladığı ve bu nedenle anti-inflamatuvar bir etkiye sahip olduğu sonucuna varabiliriz.

Anti-miR-20a ile transfeksiyon sonrasında inflamasyon sürecinde görev alan birçok sitokin ve transkripsiyon faktörünün ifadesi artmıştır. Anti-miR-20a transfeksiyonu ile bu miRNA'nın hedef geninin ifadesinin baskılanması azaldığı, dolayısıyla hedef genlerinin ifadesinde artış meydana geldiği için inflamasyon yolağı uyarılmıştır. Normal süreçte miR-20a'nın, bu yolağı baskılayarak inflamasyonu baskıladığı sonucuna varılabilmekte böylece bu miRNA'nın da anti-inflamatuvar özelliğe sahip olduğu düşünülmektedir.

*TNF- $\alpha$*  ve *TGF- $\beta$*  gen ifade düzeylerinin araştırıldığı deneylere ek olarak, miRNA transfeksiyonu yapılmayan hücrelere 10 ng/mL *TNF- $\alpha$*  ve 5 ng/mL *TGF- $\beta$*  uygulanarak miR-20a ve miR-197'nin ifade seviyelerindeki değişiklikler de araştırıldı. Bu sayede hücrelerde inflamasyon sürecinde sitokinlerle uyarımı takiben ilgili miRNA'ların endojen ifadeleri de analiz edilmiş oldu.

*TNF- $\alpha$*  ve *TGF- $\beta$*  uygulamaları miR-20a'nın ifadesini anlamlı bir şekilde düşürürken, miR-197'in ifadesi *TNF- $\alpha$*  uygulaması sonucunda anlamlı bir şekilde artmıştır (Şekil 4.23).



**Şekil 4.23.** TNF- $\alpha$  ve TGF- $\beta$  uygulamaları sonrası miR-20a ve miR-197'nin ifade değişimleri. \*P < 0.05; \*\*P < 0.01.

Sonuç olarak, TNF- $\alpha$  ve TGF- $\beta$  uygulamaları sonrasında inflamasyonun arttığı durumda, miR-197'nin de ifadesinin arttığı böylece inflamasyonun baskılanmaya çalışıldığı düşünülmektedir. Bu durum, miR-197'nin yine anti-inflamatuvar etkisini destekler bir bulgu olmuştur.

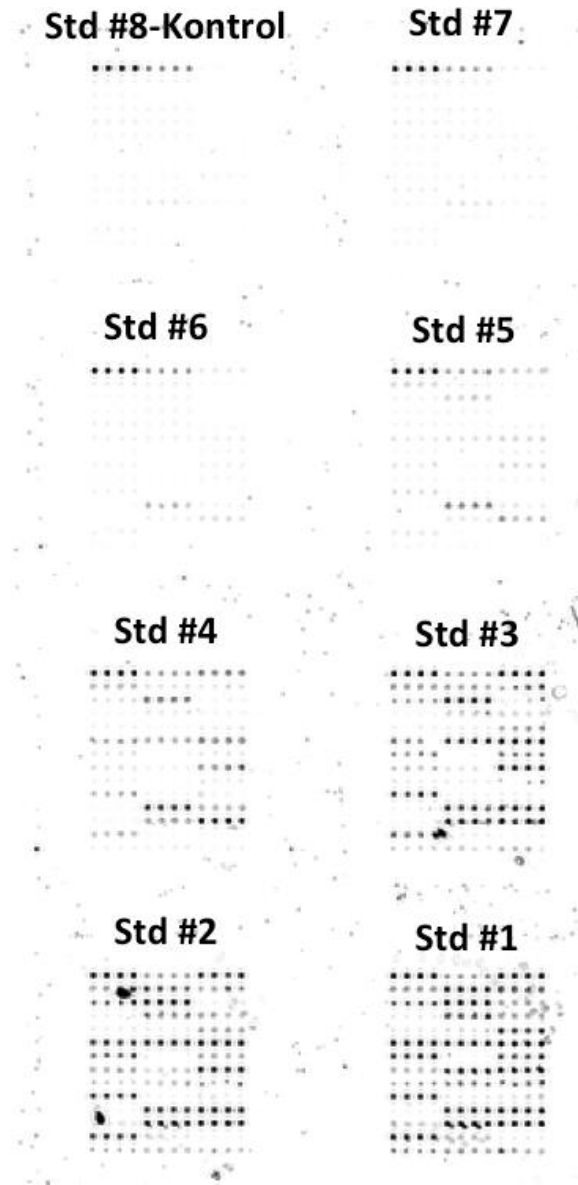
miR-20a açısından sonuçlar tam olarak yorumlanamamakla birlikte hastalarda da arttığı gözlenen bu miRNA'nın inflamatuvar süreçte daha geç bir evrede etki gösterebiliyor olacağı düşünülmüştür.

Tezin bundan sonraki aşamasında hem tedavi molekülü olmak için daha kuvvetli bir aday olan hem de işlevsel analizlerde hipotemizi desteklemeye yönelik daha çok veri elde ettiğimiz miR-197 ile deneylere devam edildi. Hücrelere sadece pre-miR-197 ve *mimic* kontrol transfeksiyonları yapıldı.

### **İnsan Sitokin Antikor Mikrodizin Analizi**

Cam slaytlar tarandıktan sonra toplam 3 slaytaki 16 mikrodizin analiz edildi. Standartların ve mikrodizinlerin ilk sırasındaki pozitif kontrollerin sinyallerinin tutarlı olduğu gözlemlendi (Şekil 4.24). Ardından analiz aşamasına geçildi.

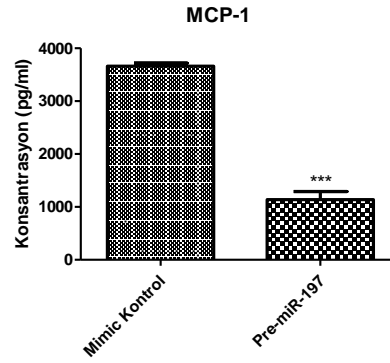
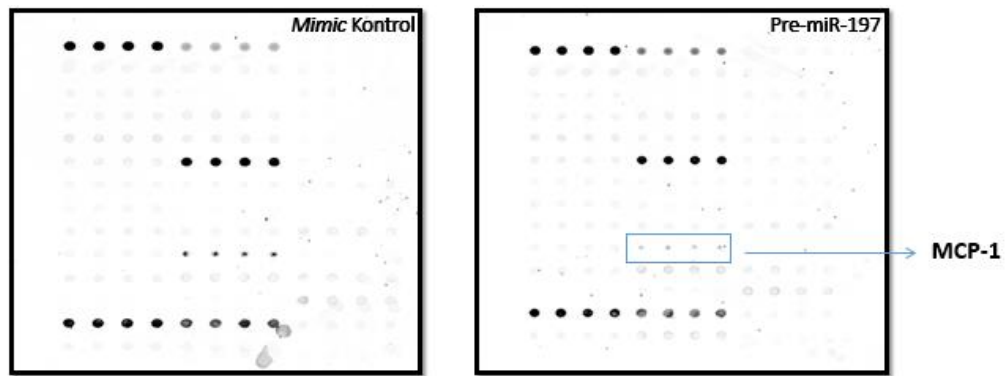




**Şekil 4.24.** Mikrodizinlerdeki standart ve pozitif kontrollerin görüntüsü. İnsan inflamasyon antikor mikrodizin için hazırlanan standartlar gösterilmiştir. Toplam 8 adet standart hazırlanmıştır. Std 8; Kontrol örneği olup derişimler Std 1'e doğru artmaktadır. Std 1 en yoğun örnek olduğu için en fazla ışımaya bu standarttan elde edilmiştir. Her mikrodizinin sol en üstteki ilk 4 örneği POS1, yanındaki 4 örnek ise POS2'dir. POS1 ve POS2 örneklerinin ışımaya şiddetleri her standart ve örnek için aynı olmalıdır. Std: Standart, POS1: Pozitif 1, POS2: Pozitif 2.

İlk olarak, sadece örneklerin görüntüleri karşılaştırıldı. İfade seviyesi açısından pre-miR-197 transfekte edilen hücrelerde farklılık gösteren proteinler belirlendi.

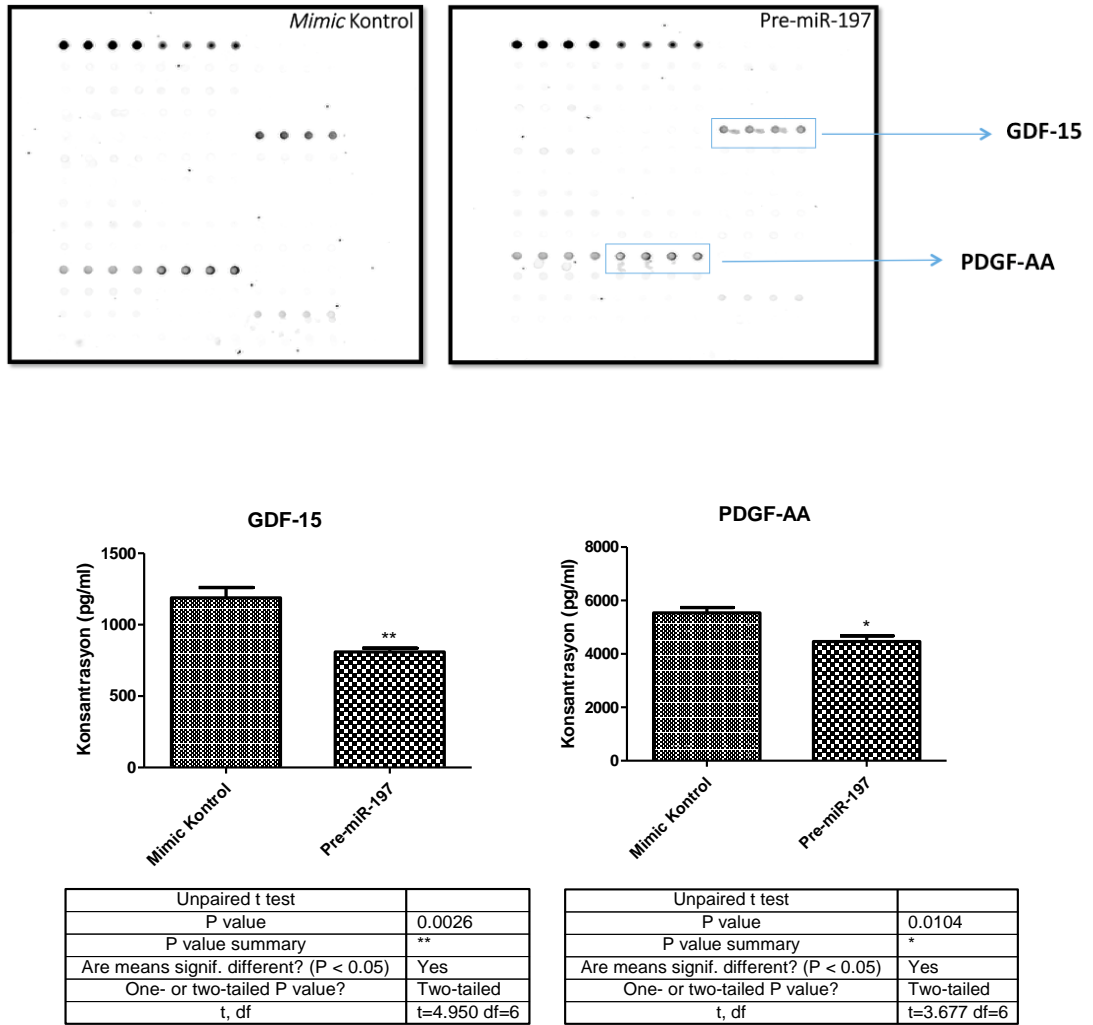
Örneklerin toplandığı saat çerçevesinde insan inflamasyon antikor mikrodizininde; pre-miR-197 transfekte edilen hücrelerin süpernatantında Monosit Kemoatraktan Proteini-1 (MCP-1) proteininin anlamlı bir şekilde azaldığı belirlendi ( $p < 0.0001$ ) (Şekil 4.25). Bir monosit kemoatraktan olan bu proteinin azalması, hücre göçünü azaltacağından dolayı miR-197'nin anti-inflamatuvar özelliği protein seviyesinde de doğrulanmış oldu.



Unpaired t test	
P value	< 0.0001
P value summary	***
Are means signif. different? (P < 0.05)	Yes
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
t, df	t=15.66 df=6

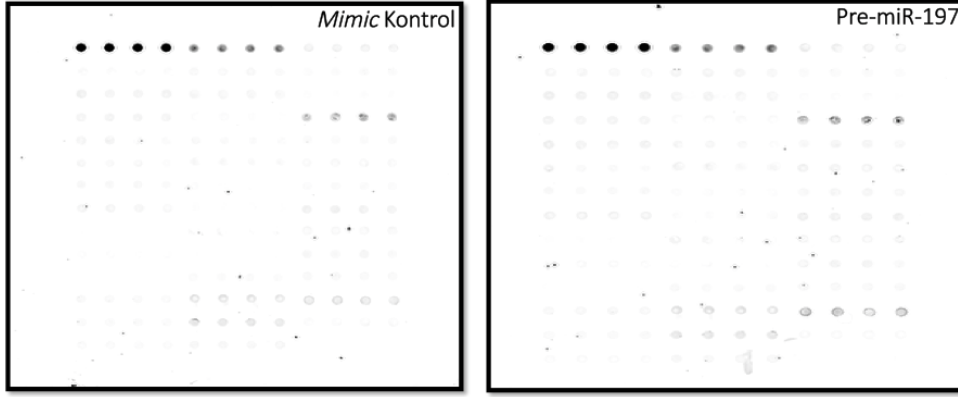
**Şekil 4.25.** MCP-1 proteinin pre-miR-197 ve mimic kontrol ile transfekte edilen hücrelerin süpernatantlarındaki miktar analizi. \*P < 0.05; \*\*P < 0.01; \*\*\*P < 0.001.

İnsan büyüme faktörü antikor mikrodizininde; pre-miR-197 transfekte edilen hücrelerin süpernatantında büyüme farklılaşma faktörü-15 (GDF-15) ( $p=0.0026$ ) ve Platelet-derived büyüme faktörü-AA (PDGF-AA) ( $p=0.0104$ ) proteinlerinin azaldığı gözlemlendi (Şekil 4.26). GDF-15, stres durumunda makrofajlardan ifade olan bir sitokin olup AAA patogenezinin sorumlu bilinen bir yolda görevli değildir. PDGF-AA ise hücre büyümesi ve bölünmeden sorumlu olup, bu protein ile de AAA patogenezi arasında bir ilişki kurulamamıştır.



**Şekil 4.26.** GDF-15 ve PDGF-AA proteinlerinin pre-miR-197 ve mimic kontrol ile transfekte edilen hücrelerin süpernatantlarındaki miktar analizi. \* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ .

İnsan kemokin antikor mikrodizininde; pre-miR-197 transfekte edilen hücrelerin süpernatantında *mimic* kontrole göre herhangi bir fark gözlenmedi (Şekil 4.27).

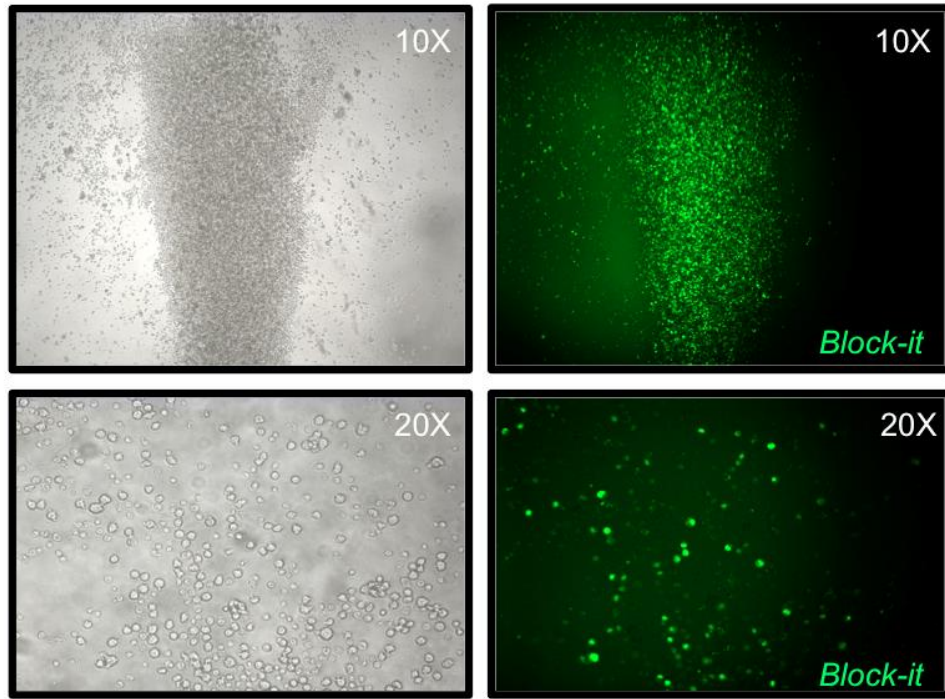


Şekil 4.27. İnsan kemokin antikor mikrodizin görüntüsü.

#### 4.3.4. THP-1 Hücre Hatları için İşlevsel Analizler

miR-197 için işlevsel analizlerin bir kısmı ikinci bir hücre hattında da yapıldı. Bu amaçla Pvrin ve ilişkili proteinleri doğal olarak ifade eden, inflamatuvar süreçte görevli insan THP-1 hücre hattı kullanılmasına karar verildi. Bu hücrelerin inflamatuvar yolların incelenmesi açısından iyi bir model olacağı öngörüldü.

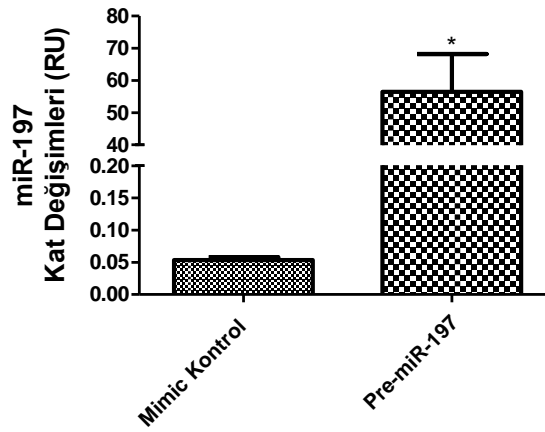
Bu hücrelerde miRNA'ların transfeksiyonları yapıp, işlevsel analizler yapılacağı için ilk olarak hücrelerin transfeksiyon optimizasyonları yapıldı. İlk denemelerde 1,6 uL Lipofektamin derişiminde yaklaşık %90 etkinlikte transfeksiyonun gerçekleştiği belirlendi (Şekil 4.28).



**Şekil 4.28.** THP-1 hücrelerinin 1,6 ul Lipofectamine 2000 ile transfeksiyon sonrası görüntüsü. Transfeksiyon etkinliğinin yüksek olduğu görülmektedir. Gri, faz-kontrast görüntüsü, Yeşil, FITC işaretli oligonükleotid ile işaretli hücre, 10X ve 20X.

THP-1 hücrelerinin transfeksiyon optimizasyonunun başarılı bir şekilde yapılmasının ardından, bu hücreler hsa-miR-197-3p, *mirVana® miRNA mimic* (Ambion) ve *mirVana™ miRNA Mimic, Negative Control #1* (Ambion) ile transfekte edildi. M694V homozigot hastalarda miR-197'nin ifadesi azaldığı için, hücrelerde arttırılarak işlevsel analizler gerçekleştirildi. Bu yaklaşım ile hücrelerde miRNA'lar açısından ters etki yaratılarak, bu süreçte miRNA'ların işlevi aydınlatılmaya çalışıldı.

Pre-miR-197 transfeksiyonu sonrasında hücrelerdeki aşırı ifade seviyeleri qRT-PCR ile belirlendi (Şekil 4.29).

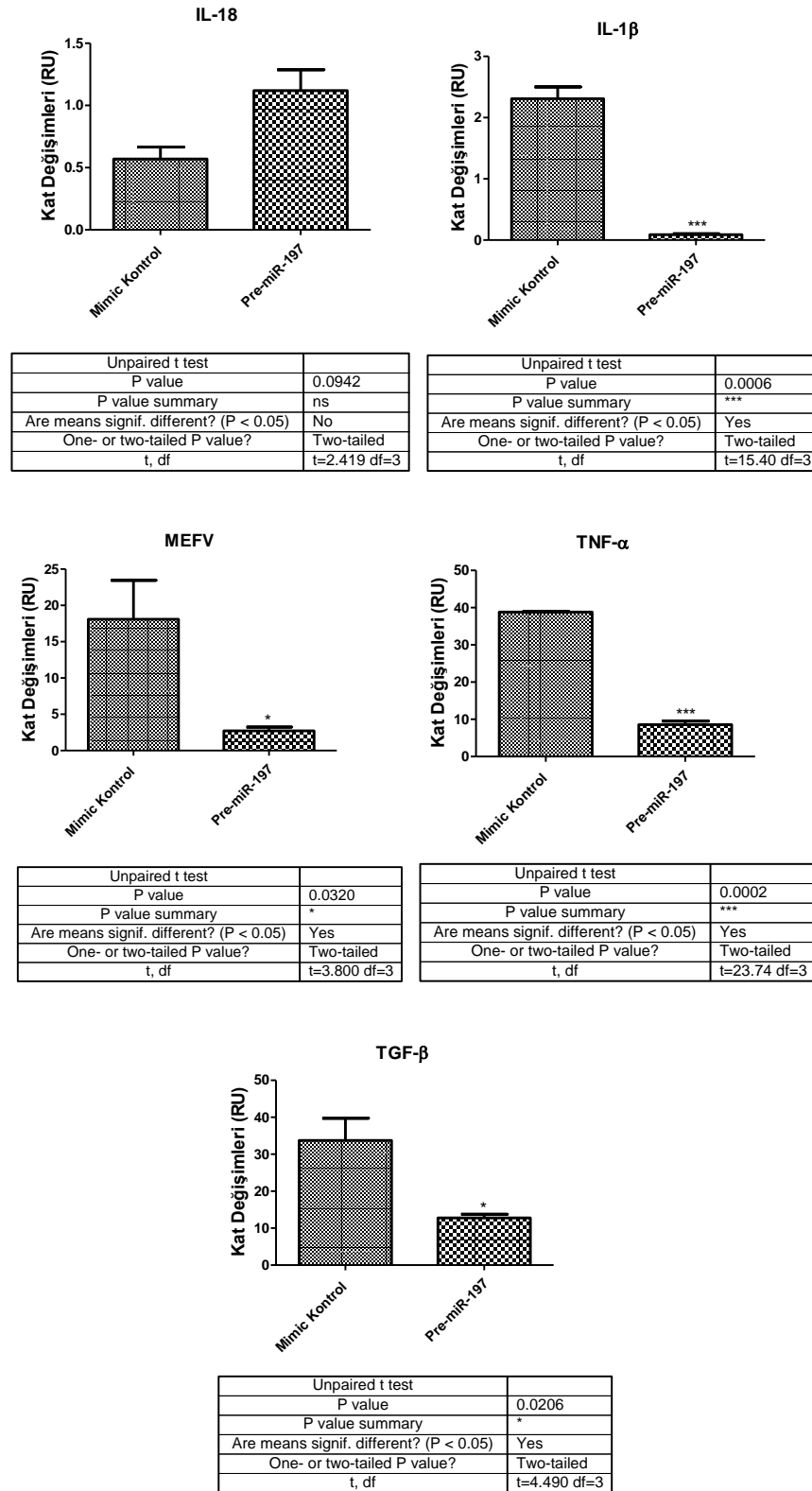


Unpaired t test	
P value	0.0408
P value summary	*
Are means signif. different? (P < 0.05)	Yes
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
t, df	t=4.796 df=2

**Şekil 4.29.** Pre-miR-197 ve mimic kontrol için qRT-PCR sonuçları. \*P < 0.05.

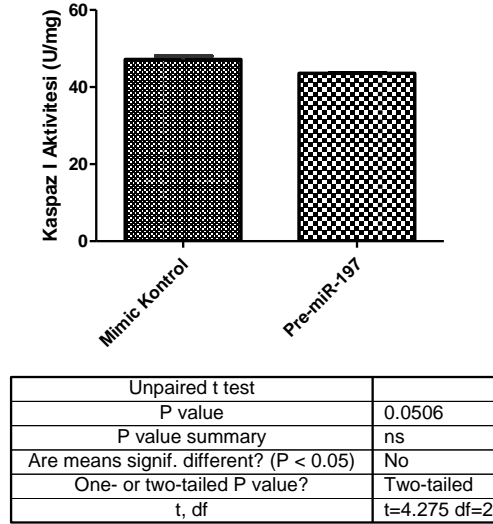
Pre-miR-197 transfekte edilen hücrelerde miR-197'nin ifadesi yüksek bir başarıyla artırıldı (p=0.0408). Yüksek verimlilikteki miRNA transfeksiyonu sonrası işlevsel analizlere başlandı. Pre-miR-197 transfekte edilen hücrelerde filtre deneyi, kaspaz 1 aktivite deneyleri yapıldı. Bu deneyleri takiben, inflamatuvar genlerin (*IL-1 $\beta$* , *MEFV*, *IL-18*, *TNF- $\alpha$*  ve *TGF- $\beta$* ) ifadesi de araştırıldı.

Pre-miR-197 transfekte edilen THP-1 hücrelerinde *IL-1 $\beta$*  (p=0.0006), *MEFV* (p=0.0320), *TNF- $\alpha$*  (p=0.0002) ve *TGF- $\beta$*  (p=0.0206) genlerinin ifade seviyelerinde azalma olduğu belirlendi. *IL-18* (p=0.0942) gen ifadesinin istatistiksel olarak anlamlı olmayan bir şekilde arttığı tespit edildi (Şekil 4.30).



**Şekil 4.30.** Pre-miR-197 transfekte edilen THP-1 hücrelerinde *IL-1 $\beta$* , *MEFV*, *IL-18*, *TNF- $\alpha$*  ve *TGF- $\beta$*  genlerinin ifade analizi sonuçları. \*P < 0.05; \*\*P < 0.01; \*\*\*P < 0.001.

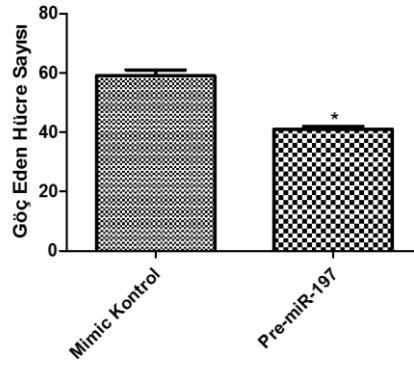
Pre-miR-197 transfekte edilen hücrelerde kaspaz 1 aktivitesinin anlamlı bulunmasa da azaldığı gözlemlendi ( $p=0.0506$ ) (Şekil 4.31).



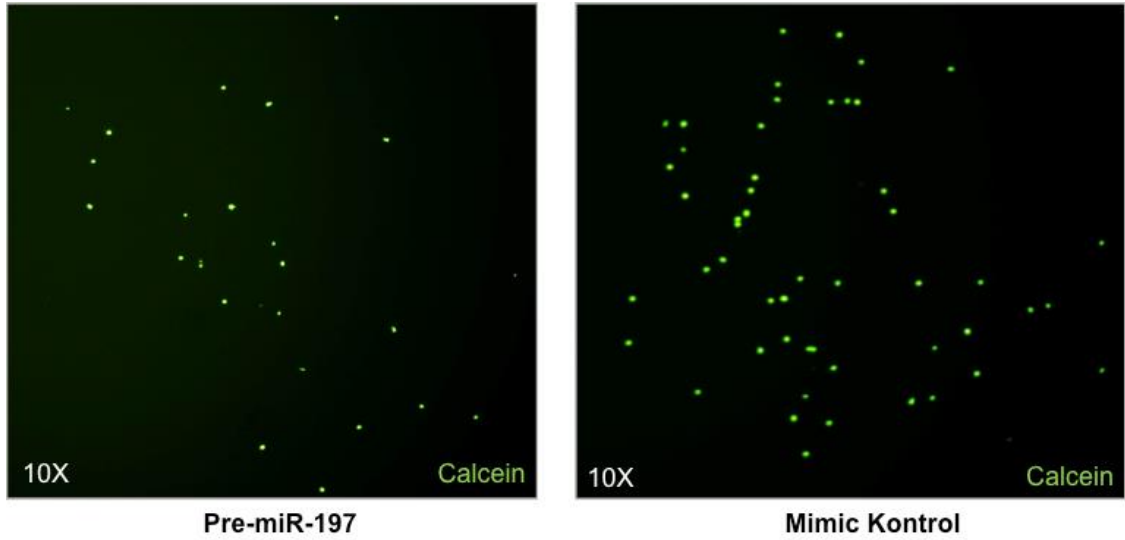
**Şekil 4.31.** Pre-miR-197 transfekte edilen hücrelerde kaspaz 1 aktivite deneyinin sonuçları.

Pre-miR-197 transfekte edilen hücrelerde *mimic* kontrole göre karşılaştırıldığında hücre göçü açısından anlamlı bir azalma gözlemlendi ( $p=0.0151$ ) (Şekil 4.32).





Unpaired t test	
P value	0.0151
P value summary	*
Are means signif. different? (P < 0.05)	Yes
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
t, df	t=8.050 df=2



**Şekil 4.32.** Pre-miR-197 transfekte edilen hücrelerde filtre deneyi sonuçları. \*P < 0.05. Kalsein (Yeşil): filtrenin altına geçen canlı hücrelerin görüntüsü.

Sonuç olarak, THP-1 hücrelerinde de miR-197'nin anti-inflamatuvar bir rolünün olduğu belirlendi. Bu doğrultuda, işlevsel çalışmaların bir kısmının bir başka hücre hattında da benzer sonuçlar vermesi elde ettiğimiz bulguları güçlendirdi.

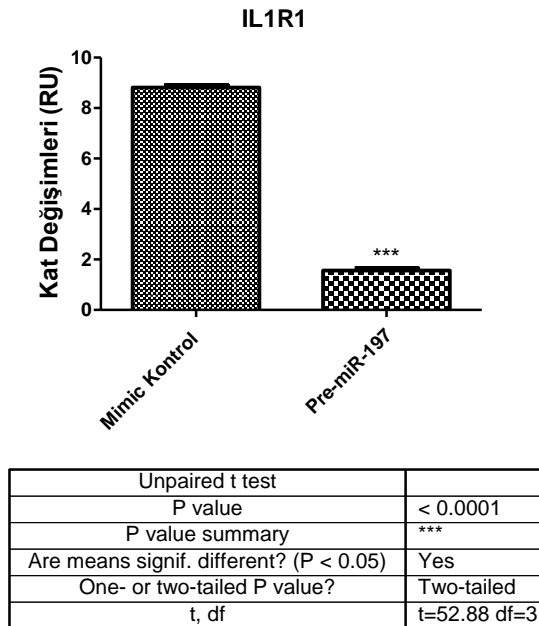
#### 4.3.5. 3'UTR Lusiferaz Aktivite Deneyi

##### Pre-miR-197 transfeksiyonu sonrası aday genlerden *IL1R1*'nin ifadesinin değişimi

miRNA bağlantı analizi için, Pürin ve ilişkili proteinleri doğal olarak ifade eden, inflamatuvar süreçte görevli insan THP-1 hücre hattı kullanılmasına karar verildi.

3'UTR lusiferaz aktivite deneyine geçmeden önce biyoinformatik olarak belirlenen aday genin THP-1 hücrelerinde pre-miR-197 transfeksiyonu sonrası gen ifade düzeyine bakıldı.

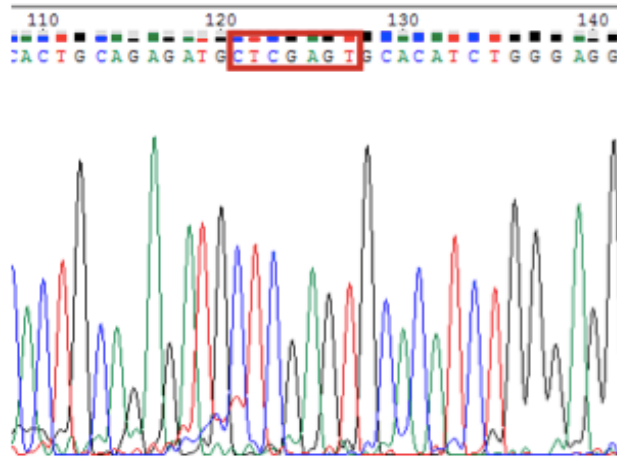
Pre-miR-197 transfeksiyonu sonrası, THP-1 hücrelerinde *IL1R1* gen ifadesinin anlamlı bir şekilde azaldığı belirlendi ( $p < 0.0001$ ) (Şekil 4.33). Bu gen için 3'UTR lusiferaz aktivite deneylerine başlandı.



**Şekil 4.33.** Pre-miR-197 transfekte edilen hücrelerde *IL1R1* geninin ifade analizi sonuçları. \*P < 0.05; \*\*P < 0.01; \*\*\*P < 0.001.

### IL1R1 geninin 3'UTR vektöründe miR-197'nin bağlantı bölgesinde mutagenез yapılması ve DNA dizi analizi

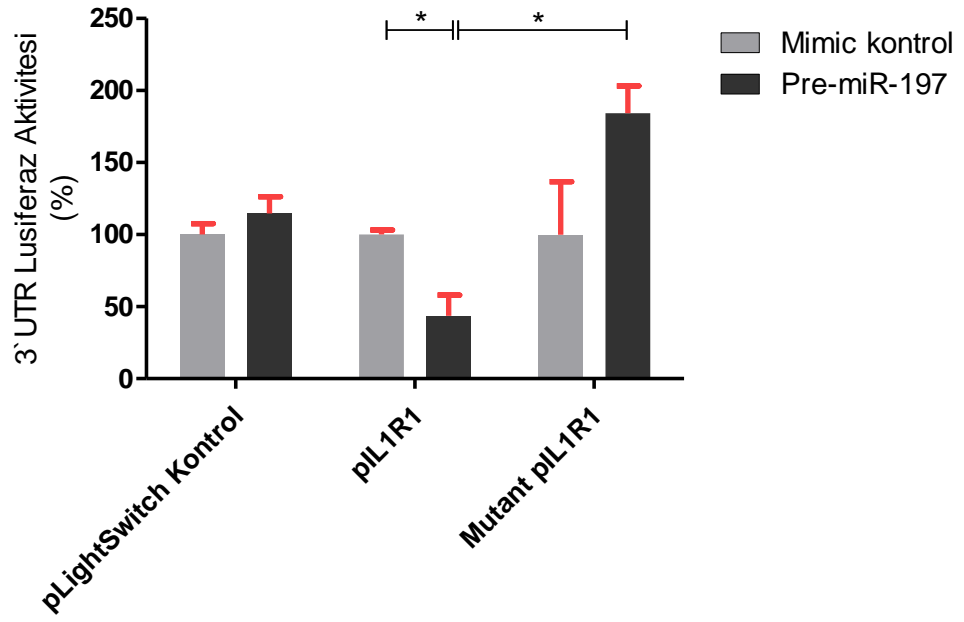
Mutagenез PCR'ı sonrası, PCR ürünü Dpn I enzimi ile kesildi. Ardından transformasyon aşamasına geçildi. Bakteri transformasyonu sonrasında yaklaşık 20 adet koloni elde edildi. Bu kolonilerden 4 tanesi mini-prep yöntemiyle çoğaltıldı. Ardından plazmid izolasyonu yapıldı. İzole edilen plazmidler DNA dizi analizi yöntemiyle kontrol edildi. Elde edilen tüm kolonilerin mutasyon içeren pozitif koloniler olduğu belirlendi (Şekil 4.34).



**Şekil 4.34.** IL1R1 geninin 3'UTR bölgesindeki mutasyonlu dizi analizi. Mutasyonlu dizi kırmızı çerçeve ile gösterilmiştir. Yabanıl dizi: GTGGTGA, Mutant dizi: CTCGAGT

### 3'UTR Lusiferaz Aktivite Denevi

IL1R1 geninin, miRNA'ların bağlandığı 3'UTR bölgesindeki nükleotidlerin 4 bazında mutasyon oluşturulmasını takiben, kontrol, yabanıl tip ve mutant vektörler, miRNA'lar ve negatif kontrolleriyle beraber THP-1 hücrelerine transfekte edildi. Ardından lusiferaz aktivitesinin ölçümü gerçekleştirildi (Şekil 4.35).



**Şekil 4.35.** 3'UTR lusiferaz aktivite deneyi sonuçları. Neg: Negatif Kontrol, WT: Yabanıl Tip, Mut: Mutant. \*P < 0.05; \*\*P < 0.01; \*\*\*P < 0.001.

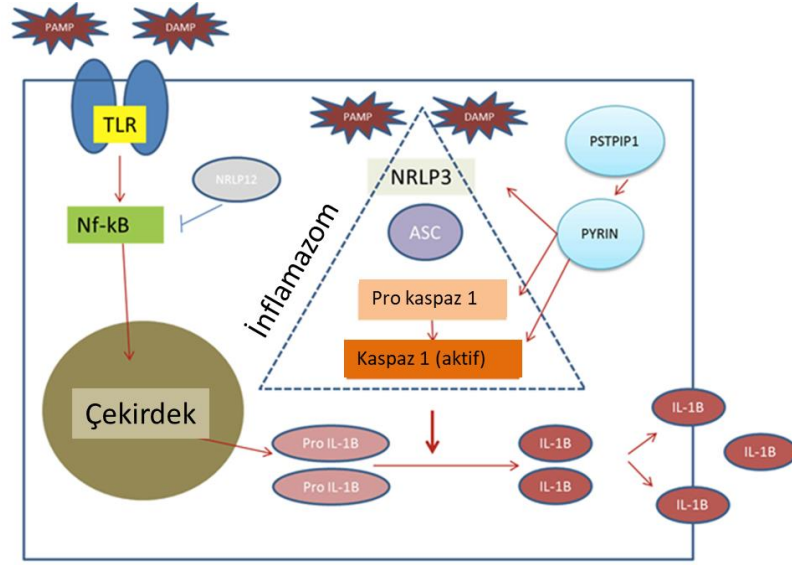
3'UTR lusiferaz aktivite deneyi sonuçlarına göre: IL1R1 geninin 3'UTR bölgesinde mutasyon olmadığında miR-197 gene bağlanmakta ve lusiferaz sinyali azalmaktadır. Bu bölgede mutasyon olduğu durumda, miRNA'ların bağlanma bölgesi ortadan kalkmakta ve lusiferaz ifadesi artmaktadır. Sonuç olarak, miR-197'nin IL1R1 geninin 3'UTR bölgesine bağlanabildiği, deneysel olarak da gösterilmiştir.

## 5. TARTIŞMA

Doğal immüitenin düzenlenmesinde meydana gelen bozukluklar sistemik otoinflamatuvar genetik hastalıklar olarak adlandırılmaktadır (1). AAA; otozomal resesif olarak kalıtılan otoinflamatuvar bir hastalıktır. AAA hastalığı, pyrin proteinini kodlayan MEFV geninde meydana gelen mutasyonlar sonucu ortaya çıkmaktadır (4).

Son yıllarda yapılan çalışmalar, otoinflamatuvar ve otoimmün hastalıkların patogeneğinde epigenetik kontrol mekanizmalarının, özellikle kodlamayan RNA'ların, rol oynabileceğini göstermiştir. Kodlamayan RNA'lardan miRNA'ların inflamatuvar cevap sürecinde aktive edici veya baskılayıcı özellikleri olduğu gösterilmiştir. Çoğunlukla miRNA'ların sitokinler, transkripsiyon faktörleri ve interlökin ilişkili genlerin ifade düzeylerini değiştirerek inflamasyon sürecini düzenlediği belirlenmiştir (6, 8). Bu doğrultuda tez kapsamında, miRNA'ların AAA hastalığı patogeneğinde görülen artan inflamasyon sürecine olası etkileri araştırılmıştır.

İnflamasyon mekanizması düşünüldüğünde; pro-inflamatuvar bir olay gerçekleştiğinde, inflamasyonlu hücre çeşitli basamaklardan geçerek hızlı bir şekilde homeostazisini yeniden kazanmakta veya pyroptozaya gitmektedir. Bu basamaklarda herhangi bir değişim olduğu zaman, hücrenin fizyolojik duruma dönmesi veya hücrenin apoptozaya girmesi uzun zaman almakta veya hiç gerçekleşmemektedir (156, 157). Bu süreçte inflamatuvar bölgede, hücre göçü artışı, inflamazom bileşenlerinin biraraya gelmesiyle kaspaz aktivasyonu ve sonrasında özellikle IL-1 $\beta$  işlenmesi ve salınımı önemli olaylardır (158) (Şekil 5.1). Bu nedenle yapılan bu tezde, işlevsel analizlerde bu basamaklar seçilerek miRNA'ların inflamasyon sürecine etkileri detaylı olarak araştırılmıştır.



Şekil 5.1. AAA patogenezinde NF-kB ve IL-1β'nin rolü (158).

Tez kapsamında elde edilen sonuçlar birlikte değerlendirildiğinde, miR-197 ve miR-20a'nın inflamasyon ile ilişkili önemli basamaklara etki eden miRNA'lar oldukları belirlendi.

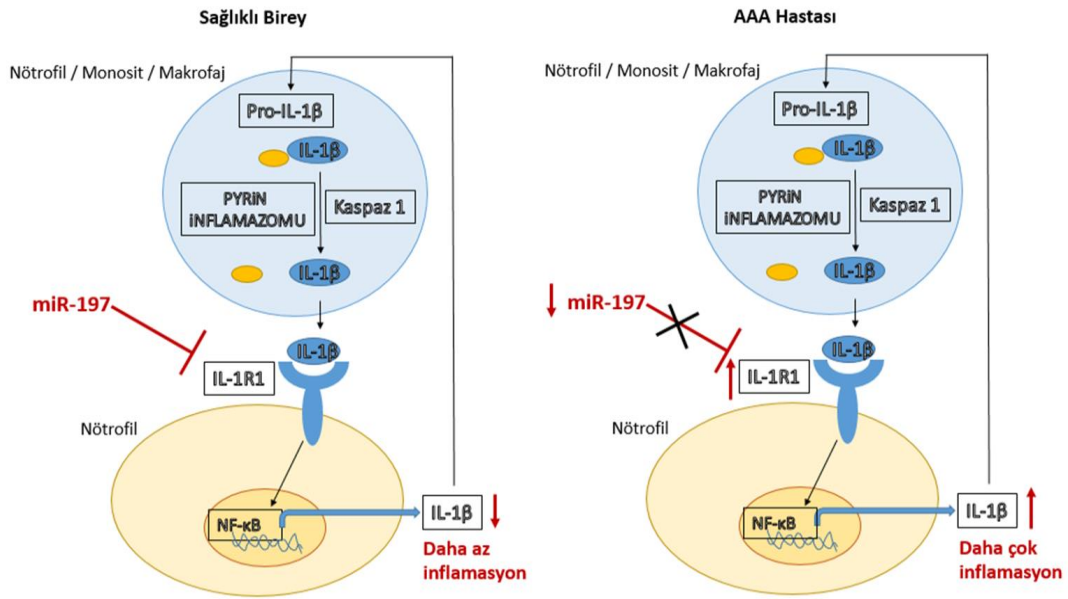
miR-197'nin anti-inflamatuvar etkiye sahip bir miRNA olduğu tespit edildi. Pre-miR-197 transfeksiyonunun sinoviyal fibroblastlarda, filtre deneylerine göre hücre göçünü engellediği, yara iyileşmesi deneylerine göre hücre göçünü 6. ve 12. saatlerde azalttığı ve apoptoz oranını anlamlı olmasa da azalttığı belirlendi. Transfeksiyon sonrasında, inflamasyonla ilişkili yollar açısından önemli olan; kaspaz 1 aktivitesinin düştüğü, *IL-1β*, *TGF-β* ve *IL-18* gen ifadelerinin azaldığı tespit edildi. *TNF-α* gen ifadesinin ise değişmediği gözlemlendi. Bu şekilde dolaylı yoldan inflamasyonla ilişkili genleri ve AAA hastalığından sorumlu olan *MEFV* gen ifadesini de etkilediği ve azalttığı belirlendi. Elde edilen mikrodizin sonuçları da düşünüldüğünde, hipotezimizi destekler şekilde miR-197'in anti-inflamatuvar bir etkiye sahip olduğu ve hastalarda ifadesinin azalması nedeniyle inflamatuvar sürecin tetiklendiği veya inflamasyonun baskılanamadığı düşünülmektedir.

Anti-miR-20a transfekte edilen hücrelerde ise filtre deneylerine göre hücre göçünün etkilenmediği, yara iyileşmesi deneylerine göre hücre göçünün 24. saatte arttığı ve apoptoz oranının anlamlı olmasa da arttığı tespit edildi. Transfeksiyon

sonrasında, inflamasyonla ilişkili olarak, kaspaz 1 aktivitesinin anlamlı olmasa da yükseldiği, *IL-1 $\beta$* , *TGF- $\beta$* , *TNF- $\alpha$*  ve *IL-18* gen ifadelerinin arttığı belirlendi. Dolaylı yoldan *MEFV* gen ifadesinin de arttığı belirlendi. Sonuç olarak, miR-20a'nın da miR-197 gibi inflamasyonu engelleyici bir özelliği olduğu belirlendi. Bu durumda, hastalarda artış göstermesi de inflamatuvar süreçte daha geç bir evrede baskılama açısından önemli olabileceğini düşündürmüştür.

miRNA'ların işlevlerinin tam olarak aydınlatılabilmesi için miRNA'ların aday genlerinin belirlenmesi oldukça önemli ve gereklidir. Bu nedenle, AAA patogenezi sürecindeki olası etkisi düşünülerek miR-197 için aday gen çalışmaları yapıldı. Tez kapsamında, miR-197'nin gen hedefinin hem biyoinformatik analizler hem de direkt bağlantının deneysel olarak gösterildiği 3'UTR lusiferaz aktivite deneyi ile *IL-1 $\beta$*  reseptörü olan *IL1R1* geni olduğunun gösterilmesi, bu miRNA'nın inflamasyon aşamalarının üst yolaklarında görevli olduğunu düşündürmüştür. *IL1R1* geni, *IL-1* reseptör ailesine ait bir sitokin reseptörünü kodlamaktadır. Kodlanan protein, *IL-1 $\alpha$*  ve *IL-1 $\beta$*  reseptörü olarak görev almaktadır. Birçok sitokin aracılığı düzenlenen immün ve inflamatuvar yanıtta önemli bir role sahiptir (159).

miR-197, *IL1R1* ifadesini baskılayarak membran üzerinde yerleşim gösteren reseptör sayısını azaltmaktadır. Bu durumda, *IL-1 $\beta$*  sinyal iletimi aracılı *NF- $\kappa$ B* uyarımını azaltmakta sonuç olarak öncül *IL-1 $\beta$*  ifadesi azalmaktadır. AAA patogenezindeki genel tablo düşünüldüğünde, mutant pyrinden kaynaklı inflamasyon bu şekilde bir ölçüde baskılanmaktadır. İnflamasyonun devamlı olduğu, kolşisin dirençli M694V homozigot hastalarda ise miR-197 ifadesinin azalmasına bağlı olarak, *IL1R1* ifadesi artmaktadır. Sonuç olarak, *NF- $\kappa$ B* aracılı öncül *IL-1 $\beta$*  ifadesi artmakta bu da var olan inflamasyonun artmasına veya baskılanamamasına yol açmaktadır (Şekil 5.2).



**Şekil 5.2.** miR-197'nin AAA patogenezindeki IL1R1 geni aracılığıyla olan etkisinin şematik gösterimi.

miR-197 için işlevsel çalışmalar ikinci bir hücre olarak; pyrin ve ilişkili proteinleri doğal olarak ifade eden, inflamatuvar süreçte görevli insan monosit hücre hattı (THP-1) kullanılarak yapıldı. Bu hücrelerin AAA hastalığı patogenezinde görülen inflamasyon sürecinde de görev aldığı bilindiğinden, aday gen ve işlevsel çalışmalar için iyi bir araç olacağı öngörüldü. Pre-miR-197 transfekte edilen THP-1 hücrelerinde filtre deneylerine göre hücre göçünün azaldığı ve kaspaz 1 aktivitesinin düştüğü tespit edildi. İnflamasyonla ilişkili olarak, *IL-1β*, *MEFV*, *TGF-β* ve *TNF-α* gen ifadelerinin azaldığı belirlendi. *IL-18* gen ifadesinin de istatistiksel olarak anlamsız bir şekilde arttığı tespit edildi. Tüm bu sonuçlar birlikte düşünüldüğünde, monositlerde de miR-197'nin anti-inflamatuvar bir etki gösterdiği ve inflamasyonu baskıladığı belirlendi. miRNA çalışmalarında miRNA'ların işlevlerinin en az iki farklı hücre hattında çalışılması ve benzer sonuçlar alınıp alınmadığının belirlenmesi önerilmektedir. Bu kapsamda, monositlerde elde edilen benzer sonuçlar oldukça önemlidir.

İnflamazom kompleksinin aktif olduğu durumda ve kaspaz 1 bağımlı meydana gelen hücre ölüm şekline “pyroptoz” adı verilmektedir. *Annexin V/PI* boyaması ile yapılan hücre ölümü deneyleri apoptoz oranını vermekte, inflamatuvar hücrelerdeki



ölüm şekli olan pyroptozun tayini için kaspaz 1 aktivitesinin ölçülmesi gerekmektedir. Bu nedenle kaspaz 1 aktivite deneyleri pyroptoz tayini açısından da değerlendirildi. Yapılan kaspaz 1 aktivite deneyleri sonuçlarına göre miR-197'nin pyroptozu da azalttığı belirlendi.

Pre-miR-197 transfekte edilen hücrelerin süpernatantında, insan inflamasyon antikorları, büyüme faktörü antikorları ve kemokin antikorlarını içeren sitokin antikor mikrodizin analizleri de yapıldı. İnsan inflamasyon antikor mikrodizininde; MCP-1 proteininin azaldığı, insan büyüme faktörü antikor mikrodizininde ise; GDF-15 ve PDGF-AA proteinlerinin azaldığı belirlendi. İnsan kemokin antikor mikrodizininde; pre-miR-197 transfekte edilen hücrelerin süpernatantında *mimic* kontrole göre herhangi bir fark gözlenmedi. Bu proteinler içerisinde özellikle MCP-1 proteininin monosit ve makrofaj uyarıcı bir kemoatraktan olması nedeniyle (160), pre-miR-197 transfekte edilen hücrelerde hücre göçünün bu protein aracılı azalabileceği sonucu ortaya çıkmaktadır. Bu sonuç da, miR-197'nin anti-inflamatuvar özellikte olduğunu gösteren bulgularımızı desteklemektedir. Gen ifadesi düzeyinde inflamasyonla ilişkili genlerde gördüğümüz değişimin salgılanan proteinlerde tespit edilememesi de iki şekilde açıklanabilir. İlk olarak, inflamasyonla ilişkili genlerin ifade düzeylerindeki etkinin proteine yansımaları ilerleyen zaman aralığında gerçekleşeceğinden sitokin antikor mikrodizin analizinin, RNA örneklerinin toplandığı saatten daha sonra yapılması, farklı saat aralıklarının analiz edilmesi, daha anlamlı sonuçlar verebilecektir. İkinci olarak da, *IL-1 $\beta$* , *TGF- $\beta$*  ve *TNF- $\alpha$*  gibi proteinlerin normal durumda hücredeki bazal ifadesi sınırlı olabileceğinden dolayı, protein seviyeleri tespit edilememiş olabilir. Bu durumda, hücrede inflamasyonu tetikleyerek sitokin antikor mikrodizini gerçekleştirmek sonuçları değiştirilebilecektir.

AAA hastalığıyla ilgili yapılan çalışmalarda, birçok grup serum/plazma veya kandan farklı miRNA'lar tanımlamıştır (150-155). Çok sayıda miRNA tanımlanması bir yolakta birden fazla miRNA'nın görev alabileceğini göstermektedir. Ayrıca miRNA'larla ilgili çalışılırken izlenen yöntemin, tedavi veya tanıya yönelik olan yaklaşımın ve çalışılan biyolojik materyalin ne olduğunun önemli olduğu sonucu ortaya çıkmaktadır. Yapılan çalışmalarda en sıklıkla kullanılan yöntem mikrodizin analizidir. Bunun dışında literatür bilgileri ışığında oluşturulan miRNA panelleri de qRT-PCR ile analiz edilmiştir. Genellikle total kan örnekleri kullanılırken, iki farklı

çalışmada serum örnekleri kullanılmıştır. Bu doğrultuda, kullanılan panellerdeki ve platformlardaki miRNA sayı ve çeşitleri farklılık göstereceğinden, biyolojik materyallerdeki ifade değişimleri de değişebileceğinden dolayı tüm çalışmalarda ortak tanımlanan miRNA sayıları oldukça azdır. miRNA'ların ifadelerinin yaşa ve cinsiyete göre de farklılık gösterdiği bilindiğinden dolayı (161), çalışma gruplarının dağılımındaki farklılık değişik miRNA'ların tanımlanmasının bir diğer nedenidir.

Bağışıklık sistemi ile ilgili bozukluklarda, farklı örnekler kullanılarak birçok miRNA'nın ifadesinde değişiklik olduğu belirlenmiştir. AAA hastalığı açısından, bu özellikteki biyobelirteçlerin belirlenmesi, kompleks vakalar için hastalığın ciddiyetini açıklamakta faydalı olacaktır. Yapılan iki çalışmada da bazı miRNA'ların MEFV genindeki mutasyonlara bağlı olarak hastalar arasında farklılık gösterdiği görülmüştür (150, 151). Bu çalışmalarda, MEFV geninde özellikle ekzon 10'da veya ekzon 3'de mutasyonu olan hastalardan oluşan bir çalışma grubu oluşturulduğu için, tanımlanan miRNA'lar daha çok hastalık açısından biyobelirteç olarak düşünülmektedir.

Eksozomlar içinde dolaşan, buna bağlı olarak plazma veya serum içerisinde korunaklı olarak bulunan miRNA'ların klinik kullanımda potansiyel biyobelirteç olmaları mümkündür. Grubumuzun içinde yer aldığı bir başka projede, AAA hastalarına ait serum örneklerinden izole edilen eksozomlarda, AAA hastalığı açısından önemli olan aday miRNA'ların varlığı araştırılmaktadır (Zeynep Tavukçuoğlu, Yüksek lisans tezi, devam ediyor). İlgili projede, bu tez çalışmasında yer alan hastaların serum örneklerinden izole edilen eksozomlarda miR-197 ifadesinin olduğu belirlenmiştir (yayınlanmamış veri). Bu miRNA'nın dolaşımında yer alarak, AAA hastalığı patogenezinde sistemik bir etkiye yol açabileceği öngörülmektedir. Kantitatif analiz sonrasında, hastaların serum örneklerinde bulunan eksozomlarda miR-197'nin ifadesinin azaldığı gözlemlendi. Bu azalma total kanda tespit edilen azalma ile korele olup, anti-inflamatuvar özellikteki bu miRNA'nın hastalarda sistemik olarak da azalmasının inflamasyonun artmasına yol açarak patogenezi etkilediği hipotezini desteklemektedir.

Grubumuzun içinde yer aldığı "Otoinflamatuvar Hastalıklarda (Tanımlanmış ve Tanımlanmamış) Kişiselleştirilmiş Moleküler Tıp İçin Klinik ve Deneysel Çalışma: Modifiye edici ('*Modifier*') Faktörlerin Rolü" başlıklı ERA-NET projesinde ise, pediatrik dönemdeki hastalardan oluşan, ağır fenotipli ve hafif fenotipli M694V

homozigot AAA hastaları arasında yapmış olduğumuz karşılaştırmada miR-197'nin anlamlı bir kat değişimi gösterdiği belirlendi. Ağır fenotipli hastalarda, hafif fenotip gösteren hastalara göre miR-197'nin ifadesinin azaldığı gözlemlendi (yayınlanmamış veri). Sonuç olarak, bu miRNA'nın farklı yaş gruplarında ortak olarak azaldığının görülmesi, yaşa bağlı olmayan epigenetik bir regülasyona sahip olduğunu ve AAA'da görülen inflamasyon açısından kritik bir önemi olduğunu düşündürmektedir.

Tez kapsamında işlevi aydınlatılan miR-20a ve miR-197'nin genomdaki yerleşimleri de araştırılmıştır. miR-20a intergenik olarak 13. kromozomda uzun kodlamayan RNA (lncRNA) içerisinden kodlanmaktadır. miR-197 ise 1. kromozomdan intragenik olarak G protein subunit alpha i3 (GNAI3) geninin içerisinden kodlanmaktadır. Her iki miRNA'nın artma ve azalma nedenlerinin belirlenmesi için gen ifadelerini etkileyebilecek mekanizmalar araştırılmalıdır. Bu sayede özellikle miR-197 için hastalık patogenezinin nedeni ya da sonucu olarak değişen miRNA ifadeleri eski seviyelerine getirilerek bir tedavi yöntemi olarak kullanılabilir.

Son zamanlarda, miRNA'ların hedef genlerinin 3'UTR bölgelerinden bağlanarak ifade düzeylerini azaltmasına karşılık; miRNA'ların hedef genlerinin ifadelerini arttırabileceği ile ilgili hipotezler ortaya atılmıştır. miRNA'ların hedef genlerinin 5'UTR'ından bağlanarak bu etkiye yol açtığı düşünülmüştür (162). Ancak son yıllarda, bu bağlantının çok zayıf olduğu ve ribozomun protein sentezi sırasında mRNA'ya bağlanırken miRNA-gen bağlantısını bozduğu ve bağlanmayı engellediği belirlenmiştir (163).

Tez çıktıları sayesinde, biyolojik temeli çok iyi bilinmeyen otoinflamatuvar hastalıkların temelinde yatan önemli bir mekanizmayı, miRNA'lar ile epigenetik düzenlemeyi, bu hastalıklar açısından değerlendirebiliyor olacağız ayrıca yeni tanı (biyobelirteç) ve tedavi yöntemlerinin geliştirilmesine katkı sağlayabileceğiz. Tüm sonuçlar değerlendirildiğinde, miR-197'nin hasta bireylerde ifadesinin azalmasıyla anti-inflamatuvar etkisinin ortadan kalktığı bu nedenle bu bireylerde artan inflamasyon görüldüğü düşünülmektedir. Bu durumda hastalarda miR-197 ifadesinin arttırılmasıyla inflamasyonu baskılayıcı bir etki sağlanabileceği öngörülmektedir.

Otoinflamatuvar hastalıkların birçoğu nadir olarak görülse de, patogenezlerinin daha iyi anlaşılması sık görülen hastalıklar açısından önemli olan, inflamasyon ve doğal bağışıklığın temel mekanizmalarının anlaşılmasına yardımcı olacaktır. Bu tür hastalıklara sebep olan faktörlerin araştırılması ile yeni etkin ve koruyucu tedavi protokolleri geliştirilebilecektir.

Sonuç olarak literatüre; AAA hastalığında görülen fenotipik farklılıkları açıklayabilmemize olanak sağlayan, inflamasyonda etkili olabilecek miRNA'ların belirlenmesi ve epigenetik kontrol mekanizmaları açısından önemli katkılar sağlanabilecektir. Elde edilen bulgular ayrıca ortak yolların etkilendiği ve benzer fenotiplerin görüldüğü diğer otoinflamatuvar hastalıklar açısından da yol gösterici olabilecek, yeni projeler için temel teşkil edebilecektir.

## 6. SONUÇ VE ÖNERİLER

### 6.1. Sonuçlar

- M694V/M694V hastalar vs. kontrol grubunda; miR-20a, miR-29b, miR-19b, miR-30e ve miR-197 anlamlı kat değişimi gösteren miRNA'lar olarak belirlendi.
- M694V/M694V hastalar vs. kontrol grubunda; miR-20a ve miR-197 kemokin sinyal, TGF-beta sinyal, *Toll-like* reseptör, sitokin-sitokin reseptör interaksyonu, T hücresi reseptör sinyal, *NOD-like* reseptör sinyal yolağı, apoptoz ve aktin iskeleti düzenlenmesinde görev alabilecekleri belirlendi.
- Mikrodizin sonuçları, M694V/M694V hastalar vs. kontrol grubu için yüksek bir başarıyla valide edildi.
  - Sinoviyal fibroblastlarda;
- Anti-miR-20a transfekte edilen hücrelerde, miR-20a'nın ifadesi çok yüksek bir verimlilikte baskılandı. Aynı şekilde pre-miR-197 transfekte edilen hücrelerde miR-197'nin ifadesi de yüksek bir başarıyla arttırıldı.
- Pre-miR-197 transfeksiyonu sonrası filtre deneylerine göre hücre göçünün engellendiği belirlendi.
- Anti-miR-20a transfekte edilen hücrelerde filtre deneylerine göre hücre göçünün etkilenmediği gözlemlendi.
- Pre-miR-197 transfeksiyonu sonrası yara iyileşmesi deneylerine göre hücre göçünün 6. ve 12. saatlerde azaldığı tespit edildi.
- Anti-miR-20a transfekte edilen hücrelerde yara iyileşmesi deneylerine göre hücre göçünün 24. saatte arttığı gözlemlendi.
- Pre-miR-197 transfeksiyonu sonrası apoptoz oranının anlamlı olmasa da azaldığı belirlendi.
- Anti-miR-20a transfekte edilen hücrelerde apoptoz oranının anlamlı olmasa da arttığı tespit edildi.
- Pre-miR-197 transfeksiyonu sonrası inflamasyonla ilişkili yollar açısından kaspaz 1 aktivitesinin düştüğü, *IL-1 $\beta$* , *TGF- $\beta$*  ve *IL-18* gen ifadelerinin azaldığı tespit edildi. *TNF- $\alpha$*  gen ifadesinin ise değişmediği gözlemlendi. Bu şekilde dolaylı

yoldan inflamasyonla ilişkili genleri ve AAA hastalığından sorumlu olan *MEFV* gen ifadesini de etkilediği ve azalttığı belirlendi.

- Anti-miR-20a transfekte edilen hücrelerde inflamasyonla ilişkili olarak, kaspaz 1 aktivitesinin anlamlı olmasa da yükseldiği, *IL-1 $\beta$* , *TGF- $\beta$* , *TNF- $\alpha$*  ve *IL-18* gen ifadelerinin arttığı belirlendi. Dolaylı yoldan *MEFV* gen ifadesinin de arttığı belirlendi.
- miR-197'in anti-inflamatuvar bir etkiye sahip olduğu ve hastalarda ifadesinin azalması nedeniyle inflamatuvar sürecin tetiklendiği veya inflamasyonun baskılanamadığı düşünülmektedir.
- miR-20a'nın da miR-197 gibi inflamasyonu engelleyici bir özelliği (anti-inflamatuvar) olduğu belirlendi. Bu durumda, hastalarda artış göstermesi de inflamatuvar süreçte daha geç bir evrede baskılama açısından önemli olabileceğini göstermiştir.
- Sitokin antikor mikrodizinin sonuçlarına göre, pre-miR-197 transfekte edilen hücrelerin süpernatantında insan inflamasyon antikor mikrodizinde; MCP-1 proteininin azaldığı, insan büyüme faktörü antikor mikrodizinde ise; GDF-15 ve PDGF-AA proteinlerinin azaldığı belirlendi. İnsan kemokin antikor mikrodizinde; pre-miR-197 transfekte edilen hücrelerin süpernatantında *mimic* kontrole göre herhangi bir fark gözlenmedi.
- MCP-1 proteininin monosit ve makrofaj uyarıcı bir kemoatraktan olması nedeniyle, pre-miR-197 transfekte edilen hücrelerde hücre göçünün bu protein aracılı azalabileceği sonucu ortaya çıkmaktadır. Bu sonuç da, miR-197'nin anti-inflamatuvar özellikte olduğunu gösteren bulgularımızı desteklemektedir.
  - THP-1 hücrelerinde;
- Pre-miR-197 transfeksiyonu sonrası filtre deneylerine göre hücre göçünün azaldığı ve kaspaz 1 aktivitesinin anlamlı olmasa da düştüğü tespit edildi. İnflamasyonla ilişkili olarak, *IL-1 $\beta$* , *MEFV*, *TGF- $\beta$*  ve *TNF- $\alpha$*  gen ifadelerinin azaldığı belirlendi. *IL-18* gen ifadesinin de istatistiksel olarak anlamsız bir şekilde arttığı tespit edildi.
- THP-1 hücrelerinde de miR-197'nin anti-inflamatuvar bir etki gösterdiği ve inflamasyonu baskıladığı belirlendi.

- 3'UTR aktivitesi deneyleri sonucunda miR-197'nin inflamasyon sürecinin kilit moleküllerinden biri olan IL-1 $\beta$  reseptörü olan IL1R1'e bağlandığı gözlemlendi.

## 6.2. Öneriler

- miR-20a ve miR-197 için hücre kültüründe yapılan transfeksiyonlarının tam tersi yapılarak, hastalardaki artış/azalış durumu taklit edilerek işlevsel analizler tekrar edilmesi,
- miR-197'nin bağlanma potansiyeli olan diğer genler için 3'UTR lusiferaz aktivite çalışmalarına devam edilmesi,
- miR-20a için de hedef gen araştırmalarının yapılması,
- miR-197 ve miR-20a'nın belirlenen hedef genleri siRNA ile susturularak işlevsel analizler tekrar edilmeli. Bu durumda hedef genlerinin yolaklar ile ilişkisinin direkt olarak tespit edilmesi,
- Sitokin antikör mikrodizin çalışması 72.saatten toplanacak örneklerle tekrar edilmesi,
- miR-197 ve miR-20a'nın ifadesinin düzenlenmesine sebep olan hücre içi mekanizmaların aydınlatılması,
- Aynı genotip ve benzer fenotiplere sahip hastalardan yüksek sayıda bir örneklem oluşturularak miRNA'ların tanı amaçlı (biyobelirteç) kullanımına yönelik çalışmalar yapılmalı ayrıca kan dışındaki diğer biyolojik materyallerde de miRNA'ların ifade analizleri yapılması
- miR-197'nin tedavi amaçlı kullanımına yönelik fare modeli çalışmalarının ve pre-miR-197 uygulama ve replasman çalışmalarının yapılması önerilmektedir.

## 7. KAYNAKLAR

1. Aksentijevich I, Kastner DL. Genetics of monogenic autoinflammatory diseases: past successes, future challenges. *Nature Reviews Rheumatology*. 2011;7(8):469-478.
2. Turkish FMF Study Group. Familial Mediterranean Fever (FMF) in Turkey results of a nationwide multicenter study. *Medicine*. 2005;84:1-11.
3. Yılmaz E, Özen S, Balcı B, Duzova A, Topaloglu R, Besbas N, et al. Mutation frequency of familial Mediterranean fever and evidence for a high carrier rate in the Turkish population. *European Journal of Human Genetics*. 2001;9:553-555.
4. International FMF Consortium. Ancient missense mutations in a new member of the Roret gene family cause familial Mediterranean fever. *Cell*. 1997;90:797-807.
5. Grishok A, Pasquinelli AE, Conte D, Li N, Parrish S, Ha I, et al. Genes and mechanisms related to RNA interference regulate expression of the small temporal RNAs that control *C.elegans* developmental timing. *Cell*. 2001;6:23-34.
6. O'Connell RM, Rao DS, Baltimore D. MicroRNA regulation of inflammatory responses. *Annu Rev Immunol*. 2012;30:295-312.
7. Hedrich CM. Genetic Variation and Epigenetic Patterns in Autoimmunity. *J Genet Syndr Gene Ther*. 2011;2:1; 1-3.
8. Lindsay MA. 2008. microRNAs and the immune response. *Trends Immunol*. 2008;29(7):343-351.
9. Lagos-Quintana M, Rauhut R, Yalcin A, Meyer J, Lendeckel W, Tuschl T. Identification of tissue-specific microRNAs from Mouse. *Curr Biol*. 2002;30;12(9):735-9.
10. Vigorito E, Kohlhaas S, Lu D, Leyland R. miR-155: an ancient regulator of the immune system. *Immunol Rev*. 2013;253(1):146-57.



11. Rodriguez A, Vigorito E, Clare S, Warren MV, Couttet P, Soond DR, et al. Requirement of bic/microRNA-155 for normal immune function. *Science*. 2007;27;316(5824):608-11.
12. Vigorito E, Perks KL, Abreu-Goodger C, Bunting S, Xiang Z, Kohlhaas S, et al. microRNA-155 regulates the generation of immunoglobulin class-switched plasma cells. *Immunity*. 2007;27(6):847-59.
13. Chen Y, Chen J, Wang H, Shi J, Wu K, Liu S, et al. HCV-induced miR-21 contributes to evasion of host immune system by targeting MyD88 and IRAK1. *PLoS Pathog*. 2013;9(4): e1003248.
14. Taganov KD, Boldin MP, Chang KJ, Baltimore D. NF-kappaB-dependent induction of microRNA miR-146, an inhibitor targeted to signaling proteins of innate immune responses. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103(33):12481-6.
15. Xie YF, Shu R, Jiang SY, Liu DL, Ni J, Zhang XL. MicroRNA-146 inhibits pro-inflammatory cytokine secretion through IL-1 receptor-associated kinase 1 in human gingival fibroblasts. *J Inflamm (Lond)*. 2013;6;10(1):20.
16. Medzhitov R. Origin and physiological roles of inflammation. *Nature*. 2008;454(7203), 428-435.
17. Sadik CD, Kim ND, Luster AD. Neutrophils cascading their way to inflammation. *Trends in Immunology*. 2011;32(10), 452-460.
18. Kumar V, Sharma A. Neutrophils: cinderella of innate immune system. *International Immunopharmacology*. 2010;10,1325-1334.
19. Kolaczowska E, Kubes P. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. *Nature Reviews Immunology*. 2013;13,159-175.
20. Lämmermann T, Germain RN. The multiple faces of leukocyte interstitial migration. *Semin. Immunopathol*. 2014;36: 227-251.
21. Ley K, Laudanna C, Cybulsky MI, Nourshargh S. Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. *Nat. Rev. Immunol*. 2007;7: 678-689.

22. Gullberg U, Andersson E, Garwicz D, Lindmark A, Olsson I. Biosynthesis, processing and sorting of neutrophil proteins: insight into neutrophil granule development. *Eur J Haematol.* 1997;58(3):137-53.
23. Pick R, Brechtefeld D, Walzog B. Intraluminal crawling versus interstitial neutrophil migration during inflammation. *Mol Immunol.* 2013 Aug;55(1):70-5.
24. Servant G, Weiner OD, Herzmark P, Balla T, Sedat JW, Bourne HR. Polarization of chemoattractant receptor signaling during neutrophil chemotaxis. *Science.* 2000 Feb 11;287(5455):1037-40.
25. Lieschke GJ, Grail D, Hodgson G, Metcalf D, Stanley E, Cheers C, et al. Mice lacking granulocyte colony-stimulating factor have chronic neutropenia, granulocyte and macrophage progenitor cell deficiency, and impaired neutrophil mobilization. *Blood.* 1994; 84(6):1737-46.
26. Kaplan MJ, Radic M. Neutrophil extracellular traps (NETs): Double-edged swords of innate immunity. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950).* 2012;189(6):2689-2695.
27. Zarbock A1, Polanowska-Grabowska RK, Ley K. Platelet-neutrophil-interactions: linking hemostasis and inflammation. *Blood Rev.* 2007 Mar;21(2):99-111.
28. Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. Properties and overview of immune responses. In: *Cellular and Molecular Immunology.* 9th ed. Philadelphia, PA: Elsevier; 2018:chap 1.
29. Kumar H, Kawai T, Akira S. Pathogen recognition by the innate immune system. *Int Rev Immunol.* 2011 Feb;30(1):16-34.
30. Kawai T, Akira S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nat Immunol.* 2010 May;11(5):373-84.
31. Takeuchi O, Kawai T, Mühlradt PF, Morr M, Radolf JD, Zychlinsky A, et al. Discrimination of bacterial lipoproteins by Toll-like receptor 6. *Int Immunol.* 2001 Jul;13(7):933-40.

32. Poltorak A, He X, Smirnova I, Liu MY, Van Huffel C, Du X, et al. Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene. *Science*. 1998 Dec 11;282(5396):2085-8.
33. Hayashi F, Smith KD, Ozinsky A, Hawn TR, Yi EC, Goodlett DR, et al. The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5. *Nature*. 2001 Apr 26;410(6832):1099-103.
34. Alexopoulou L, Holt AC, Medzhitov R, Flavell RA. Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3. *Nature*. 2001 Oct 18;413(6857):732-8.
35. Kleinman ME, Yamada K, Takeda A, Chandrasekaran V, Nozaki M, Baffi JZ, et al. Sequence- and target-independent angiogenesis suppression by siRNA via TLR3. *Nature*. 2008 Apr 3;452(7187):591-7.
36. Diebold SS, Kaisho T, Hemmi H, Akira S, Reis e Sousa C. Innate antiviral responses by means of TLR7-mediated recognition of single-stranded RNA. *Science*. 2004 Mar 5;303(5663):1529-31.
37. Heil F, Hemmi H, Hochrein H, Ampenberger F, Kirschning C, Akira S, et al. Species-specific recognition of single-stranded RNA via toll-like receptor 7 and 8. *Science*. 2004 Mar 5;303(5663):1526-9
38. Bauer S, Kirschning CJ, Häcker H, Redecke V, Hausmann S, Akira S, et al. Human TLR9 confers responsiveness to bacterial DNA via species-specific CpG motif recognition. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001 Jul 31;98(16):9237-42.
39. Oosting M, Cheng SC, Bolscher JM, Vestering-Stenger R, Plantinga TS, Verschueren IC, et al. Human TLR10 is an anti-inflammatory pattern-recognition receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014 Oct 21;111(42):E4478-84.
40. Siednienko J, Miggin SM. Expression analysis of the Toll-like receptors in human peripheral blood mononuclear cells. *Methods Mol Biol*. 2009;517:3-14.

41. Kawasaki T, Kawai T. Toll-like receptor signaling pathways. *Front Immunol*. 2014 Sep 25;5:461.
42. Slack JL, Schooley K, Bonnert TP, Mitcham JL, Qwarnstrom EE, Sims JE, et al. Identification of two major sites in the type I interleukin-1 receptor cytoplasmic region responsible for coupling to pro-inflammatory signaling pathways. *J Biol Chem*. 2000 Feb 18;275(7):4670-8.
43. Fitzgerald KA, Palsson-McDermott EM, Bowie AG, Jefferies CA, Mansell AS, Brady G, et al. Mal (MyD88-adaptor-like) is required for Toll-like receptor-4 signal transduction. *Nature*. 2001 Sep 6;413(6851):78-83.
44. Gilmore TD. Introduction to NF-kappaB: players, pathways, perspectives. *Oncogene*. 2006 Oct 30;25(51):6680-4.
45. Hayden MS, Ghosh S. Signaling to NF-kappaB. *Genes Dev*. 2004 Sep 15;18(18):2195-224.
46. Chae JJ, Wood G, Richard K, Jaffe H, Colburn NT, Masters SL, et al. The familial Mediterranean fever protein, pyrin, is cleaved by caspase-1 and activates NF-kappaB through its N-terminal fragment. *Blood*. 2008 Sep 1;112(5):1794-803.
47. Castro-Alcaraz S, Miskolci V, Kalasapudi B, Davidson D, Vancurova I. NF-kappa B regulation in human neutrophils by nuclear I kappa B alpha: correlation to apoptosis. *J Immunol*. 2002 Oct 1;169(7):3947-53.
48. Ichiyama T, Yoshitomi T, Nishikawa M, Fujiwara M, Matsubara T, Hayashi T, et al. NF-kappaB activation in peripheral blood monocytes/macrophages and T cells during acute Kawasaki disease. *Clin Immunol*. 2001 Jun;99(3):373-7.
49. Dinarello CA. Interleukin-1 in the pathogenesis and treatment of inflammatory diseases. *Blood*. 2011 Apr 7;117(14):3720-32.
50. Chen CJ, Kono H, Golenbock D, Reed G, Akira S, Rock KL. Identification of a key pathway required for the sterile inflammatory response triggered by dying cells. *Nat Med*. 2007 Jul;13(7):851-6.

51. Bakker AC, van de Loo FA, van Beuningen HM, Sime P, van Lent PL, van der Kraan PM, et al. Overexpression of active TGF-beta-1 in the murine knee joint: evidence for synovial-layer-dependent chondro-osteophyte formation. *Osteoarthritis Cartilage*. 2001 Feb;9(2):128-36.
52. Blaney Davidson EN, van der Kraan PM, van den Berg WB. TGF-beta and osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage*. 2007 Jun;15(6):597-604.
53. Huber AV, Saleh L, Bauer S, Husslein P, Knöfler M. TNFalpha-mediated induction of PAI-1 restricts invasion of HTR-8/SVneo trophoblast cells. *Placenta*. 2006 Feb-Mar;27(2-3):127-36.
54. Griffith JW, Sokol CL, Luster AD. Chemokines and chemokine receptors: positioning cells for host defense and immunity. *Annu Rev Immunol*. 2014;32:659-702.
55. Comerford I, McColl SR. Mini-review series: focus on chemokines. *Immunol Cell Biol*. 2011 Feb;89(2):183-4.
56. Larsen CG, Anderson AO, Oppenheim JJ, Matsushima K. Production of interleukin-8 by human dermal fibroblasts and keratinocytes in response to interleukin-1 or tumour necrosis factor. *Immunology*. 1989 Sep;68(1):31-6.
57. French FMF Consortium. A candidate gene for familial Mediterranean fever. *Nat Genet*. 1997 Sep;17(1):25-31.
58. Duzova A, Bakkaloglu A, Besbas N, Topaloglu R, Ozen S, Ozaltin F, et al. Role of A-SAA in monitoring subclinical inflammation and in colchicine dosage in familial Mediterranean fever. *Clin Exp Rheumatol*. 2003 Jul-Aug;21(4):509-14.
59. Grateau G. The relation between familial Mediterranean fever and amyloidosis. *Curr Opin Rheumatol*. 2000 Jan;12(1):61-4.
60. Schaner PE, Gumucio DL. Familial Mediterranean fever in the post-genomic era: how an ancient disease is providing new insights into inflammatory pathways. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy*. 2005 Feb;4(1):67-76.

61. Diaz, A, Hu C, Kastner DL, Schaner P, Reginato AM, Richards N, et al. Lipopolysaccharide-induced expression of multiple alternatively spliced MEFV transcripts in human synovial fibroblasts: a prominent splice isoform lacks the C-terminal domain that is highly mutated in familial Mediterranean fever. *Arthritis and Rheumatology*. 2004;50(11):3679-3689.
62. Manukyan G, Aminov R. Update on Pyrin Functions and Mechanisms of Familial Mediterranean Fever. *Frontiers in Microbiology*. 2016;7:456.
63. Ozen S, Bilginer Y. A clinical guide to autoinflammatory diseases: familial Mediterranean fever and next-of-kin. *Nat Rev Rheumatol*. 2014;10:135–147.
64. Park H, Bourla AB, Kastner DL, Colbert RA, Siegel RM. Lighting the fires within: the cell biology of autoinflammatory diseases. *Nat Rev Immunol*. 2012;12:570–580.
65. Yu JW, Fernandes-Alnemri T, Datta P. Pyrin activates the ASC pyroptosome in response to engagement by autoinflammatory PSTPIP1 mutants. *Mol Cell*. 2007;28:214–227.
66. Booty MG, Chae JJ, Masters SL. Familial Mediterranean fever with a single MEFV mutation: where is the second hit? *Arthritis Rheum*. 2009;60:1851–1861.
67. Chae JJ, Cho YH, Lee GS. Gain-of-function Pyrin mutations induce NLRP3 protein-independent interleukin-1 $\beta$  activation and severe autoinflammation in mice. *Immunity*. 2011;34:755–768.
68. Papin S, Cuenin S, Agostini L. The SPRY domain of Pyrin, mutated in familial Mediterranean fever patients, interacts with inflammasome components and inhibits proIL-1 $\beta$  processing. *Cell Death Differ*. 2007;14:1457–1466.
69. Hesker PR, Nguyen M, Kovarova M, Ting JP, Koller BH. Genetic loss of murine pyrin, the Familial Mediterranean Fever protein, increases interleukin-1 $\beta$  levels. *PloS One*. 2012;7:e51105.
70. Xu H, Yang J, Gao W. Innate immune sensing of bacterial modifications of Rho GTPases by the Pyrin inflammasome. *Nature*. 2014;513:237–241.

71. Park YH, Wood G, Kastner DL, Chae JJ. Pyrin Inflammasome Activation and RhoA Signaling in the Autoinflammatory Diseases FMF and HIDS. *Nature immunology*. 2016;17(8):914-921.
72. Camus D, Shinar Y, Amar S, Langevitz P, Ben-Zvi I, Livneh A, et al. 'Silent' carriage of two familial Mediterranean fever gene mutations in large families with only a single identified patient. *Clin Genet*. 2012 Sep;82(3):288-91.
73. Mimouni A, Magal N, Stoffman N, Shohat T, Minasian A, Krasnov M, et al. Familial Mediterranean fever: effects of genotype and ethnicity on inflammatory attacks and amyloidosis. *Pediatrics*. 2000; 105(5):E70.
74. Yalcinkaya F, Akar N, Mısırlıoğlu M. Familial Mediterranean fever: amyloidosis and the Val726Ala mutation. *N Eng J Med*. 1998; 338:993-994.
75. Zaks N, Shinar Y, Padeh S, Lidar M, Mor A, Tokov I, et al. Analysis of the three most common MEFV mutations in 412 patients with familial Mediterranean fever. *Isr Med Assoc J*. 2003; 5(8):585-588.
76. Gershoni-Baruch R, Shinawi M, Shamaly H, Katsinets L, Brik R. Familial Mediterranean fever: the segregation of four different mutations in 13 individuals from one inbred family: genotype-phenotype correlation and intrafamilial variability. *Am J Med Genet*. 2002 May 1;109(3):198-201.
77. Procopio V, Manti S, Bianco G, Conti G, Romeo A, Maimone F, et al. Genotype-phenotype correlation in FMF patients: A "non classic" recessive autosomal or "atypical" dominant autosomal inheritance? *Gene*. 2018 Jan 30;641:279-286.
78. Shohat M, Bu X, Shohat T, Fischel-Ghodsian N, Magal N, Nakamura Y, et al. The gene for familial Mediterranean fever in both Armenians and non-Ashkenazi Jews is linked to the alpha-globin complex on 16p: evidence for locus homogeneity. *Am J Hum Genet*. 1992;51(6):1349-54.

79. Akarsu AN, Saatci U, Ozen S, Bakkaloglu A, Besbas N, Sarfarazi M. Genetic linkage study of familial Mediterranean fever (FMF) to 16p13.3 and evidence for genetic heterogeneity in the Turkish population. *J Med Genet*. 1997;34(7):573-578.
80. Domingo C, Touitou I, Bayou A, Ozen S, Notarnicola C, Dewalle M, et al. Familial Mediterranean fever in the 'Chuetas' of Mallorca: a question of Jewish origin or genetic heterogeneity. *Eur J Hum Genet*. 2000; 8(4):242-246.
81. Booth DR, Gillmore JD, Lachmann HJ, Booth SE, Bybee A, Soytürk M, et al. The genetic basis of autosomal dominant familial Mediterranean fever. *QJM*. 2000; 93(4):217-221.
82. Touitou I. The spectrum of Familial Mediterranean Fever (FMF) mutations. *European Journal of Human Genetics*. 2001; 9:473- 483.
83. Dupont C, Armant DR, Brenner CA. Epigenetics: Definition, Mechanisms and Clinical Perspective. *Seminars in reproductive medicine*. 2009;27(5):351-357.
84. Wu CT, Morris JR. Genes, genetics, and epigenetics: a correspondence. *Science*. 2001;293: 1103–1105.
85. Ozen S, Batu ED. The myths we believed in familial Mediterranean fever: what have we learned in the past years? *Semin Immunopathol*. 2015;37:363–369.
86. Sönmez HE, Batu ED, Ozen S. Familial Mediterranean fever: current perspectives. *Journal of Inflammation Research*. 2016;9:13-20.
87. Kirectepe AK, Kasapcopur O, Arisoy N. Analysis of MEFV exon methylation and expression patterns in familial Mediterranean fever. *BMC Med Genet*. 2011;12:105.
88. Kumar M, Nath S, Prasad HK, Sharma G, Li Y. MicroRNAs: a new ray of hope for diabetes mellitus. *Protein & cell*. 2012;3(10):726-38.



89. Garzon R, Marcucci G, Croce CM. Targeting microRNAs in cancer: rationale, strategies and challenges. *Nat Rev Drug Discov.* 2010 Oct;9(10):775-89.
90. Kim VN, Han J, Siomi MC. Biogenesis of small RNAs in animals. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 2009;10, 126–139.
91. Krol J, Loedige I, Filipowicz W. The widespread regulation of microRNA biogenesis, function and degradation. *Nature Rev. Genet.* 2010;11, 597–610.
92. Lee YS, Dutta A. MicroRNAs in cancer. *Annu Rev Pathol Mech Dis.* 2009;4:199-227.
93. 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.* 2000;101:25-33.
94. Zeng Y, Yi R, Cullen BR. MicroRNAs and small interfering RNAs can inhibit mRNA expression by similar mechanisms. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2003; 100:5779-5784.
95. Gulyaeva LF, Kushlinskiy NE. Regulatory mechanisms of microRNA expression. *J Transl Med.* 2016 ;14(1):143.
96. Nana-Sinkam SP, Croce CM. MicroRNA regulation of tumorigenesis, cancer progression and interpatient heterogeneity: towards clinical use. *Genome Biol.* 2014;15:445.
97. Boon RA, Dimmeler S. MicroRNAs in myocardial infarction. *Nat Rev Cardiol.* 2015;12:135–142.
98. Issler O, Chen A. Determining the role of microRNAs in psychiatric disorders. *Nat Rev. Neurosci.* 2015;16:201–212.
99. Liao Q, Wang B, Li X, Jiang G. miRNAs in acute myeloid leukemia. *Oncotarget.* 2017;8:3666–3682.

100. Valadi H, Ekström K, Bossios A, Sjöstrand M, Lee JJ, Lötvall JO. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat Cell Biol.* 2007;9:654–659.
101. Zhang Y, Liu D, Chen X, et al. Secreted monocytic miR-150 enhances targeted endothelial cell migration. *Mol Cell.* 2010;39:133–144.
102. Hergenreider E, Heydt S, Tréguer K, et al. Atheroprotective communication between endothelial cells and smooth muscle cells through miRNAs. *Nat Cell Biol.* 2012;14:249–256.
103. Adams BD, Parsons C, Walker L, Zhang WC, Slack FJ. Targeting noncoding RNAs in disease. *J Clin Invest.* 2017;127:761–771.
104. Wang S, Wan X, Ruan Q. The MicroRNA-21 in Autoimmune Diseases. *International Journal of Molecular Sciences.* 2016;17(6):864.
105. Singh RP, Massachi I, Manickavel S, Singh S, Rao NP, Hasan S, et al. The role of miRNA in inflammation and autoimmunity. *Autoimmun Rev.* 2013;12:1160–5.
106. Perez-Hernandez J, Forner MJ, Pinto C, Chaves FJ, Cortes R, Redon J. Increased urinary exosomal microRNAs in patients with systemic lupus erythematosus. *PLoS One.* 2015;10:e0138618.
107. Wu M, Barnard J, Kundu S, McCrae KR. A novel pathway of cellular activation mediated by antiphospholipid antibody-induced extracellular vesicles. *J Thromb Haemost.* 2015;13:1928–40.
108. Lucherini OM, Obici L, Ferracin M, Fulci V, McDermott MF, Merlini G, et al. First report of circulating microRNAs in tumour necrosis factor receptor-associated periodic syndrome (TRAPS). *PLoS One.* 2013;8:e73443.
109. Kamiya Y, Kawada J, Kawano Y, Torii Y, Kawabe S, Iwata N, et al. Serum microRNAs as potential biomarkers of juvenile idiopathic arthritis. *Clin Rheumatol.* 2015;34:1705–12.

110. Duroux-Richard I, Jorgensen C, Apparailly F. miRNAs and rheumatoid arthritis — promising novel biomarkers. *Swiss Med Wkly*. 2011;141:w13175.
111. Nakasa T, Miyaki S, Okubo A, Hashimoto M, Nishida K, Ochi M, et al. Expression of microRNA-146 in rheumatoid arthritis synovial tissue. *Arthritis Rheum*. 2008;58:1284–92.
112. Pauley KM, Satoh M, Chan AL, Bubb MR, Reeves WH, Chan EK. Upregulated miR-146a expression in peripheral blood mononuclear cells from rheumatoid arthritis patients. *Arthritis Res Ther*. 2008;10:R101.
113. Stanczyk J, Pedrioli DM, Brentano F, Sanchez-Pernaute O, Kolling C, Gay RE, et al. Altered expression of MicroRNA in synovial fibroblasts and synovial tissue in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*. 2008;58:1001–9.
114. Hahn BH, McMahon MA, Wilkinson A, Wallace WD, Daikh DI, Fitzgerald JD, et al. American College of Rheumatology guidelines for screening, treatment, and management of lupus nephritis. *Arthritis Care Res (Hoboken)*. 2012;64:797–808.
115. Lau CS, Mak A. The socioeconomic burden of SLE. *Nat Rev Rheumatol*. 2009;5:400–4.
116. Rahman A, Isenberg DA. Systemic lupus erythematosus. *N Engl J Med*. 2008;358: 929–39.
117. Ceribelli A, Yao B, Dominguez-Gutierrez PR, Nahid MA, Satoh M, Chan EK. MicroRNAs in systemic rheumatic diseases. *Arthritis Res Ther*. 2011;13:229.
118. Pan W, Zhu S, Yuan M, Cui H, Wang L, Luo X, et al. MicroRNA-21 and microRNA-148a contribute to DNA hypomethylation in lupus CD4+ T cells by directly and indirectly targeting DNA methyltransferase 1. *J Immunol*. 2010;184:6773–81.

119. Tang Y, Luo X, Cui H, Ni X, Yuan M, Guo Y, et al. MicroRNA-146A contributes to abnormal activation of the type I interferon pathway in human lupus by targeting the key signaling proteins. *Arthritis Rheum.* 2009;60:1065–75.
120. Zhao S, Wang Y, Liang Y, Zhao M, Long H, Ding S, et al. MicroRNA-126 regulates DNA methylation in CD4+ T cells and contributes to systemic lupus erythematosus by targeting DNA methyltransferase 1. *Arthritis Rheum.* 2011;63:1376–86.
121. Zhao X, Tang Y, Qu B, Cui H, Wang S, Wang L, et al. MicroRNA-125a contributes to elevated inflammatory chemokine RANTES levels via targeting KLF13 in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 2010;62:3425–35.
122. TaNdon M, Gallo A, Jang SI, Illei GG, Alevizos I. Deep sequencing of short RNAs reveals novel microRNAs in minor salivary glands of patients with Sjogren's syndrome. *Oral Dis.* 2012;18:127–31.
123. Li G, Shi P, Wang Y. Evolutionary dynamics of the ABCA chromosome 17q24 cluster genes in vertebrates. *Genomics.* 2007;89:385–91.
124. Rosati G. The prevalence of multiple sclerosis in the world: an update. *Neurol Sci.* 2001;22:117–39.
125. Frohman EM, Racke MK, Raine CS. Multiple sclerosis—the plaque and its pathogenesis. *N Engl J Med.* 2006;354:942–55.
126. Lindberg RL, Hoffmann F, Mehling M, Kuhle J, Kappos L. Altered expression of miR-17-5p in CD4+ lymphocytes of relapsing-remitting multiple sclerosis patients. *Eur J Immunol.* 2010;40:888–98.
127. Philippe L, Alsaleh G, Pichot A, Ostermann E, Zuber G, Frisch B, et al. miR-20a regulates ASK1 expression and TLR4-dependent cytokine release in rheumatoid fibroblast-like synoviocytes. *Ann Rheum Dis.* 2013;72(6):1071–9.

128. Zhu D, Pan C, Li L, Bian Z, Lv Z, Shi L, et al. MicroRNA-17/20a/106a modulate macrophage inflammatory responses through targeting signal-regulatory protein  $\alpha$ . *J Allergy Clin Immunol*. 2013;132 (2):426-36.
129. Yang Z, Wang J, Pan Z, Zhang Y. miR-143-3p regulates cell proliferation and apoptosis by targeting IGF1R and IGFBP5 and regulating the Ras/p38 MAPK signaling pathway in rheumatoid arthritis. *Experimental and Therapeutic Medicine*. 2018;15(4), 3781–3790.
130. Wang X, Si X, Sun J, Yue L, Wang J, Yu Z. miR-522 Modulated the Expression of Proinflammatory Cytokines and Matrix Metalloproteinases Partly via Targeting Suppressor of Cytokine Signaling 3 in Rheumatoid Arthritis Synovial Fibroblasts. *DNA Cell Biol*. 2018; 37(4), 405-415.
131. Liu J, Fei D, Xing J, Du J. MicroRNA-29a inhibits proliferation and induces apoptosis in rheumatoid arthritis fibroblast-like synoviocytes by repressing STAT3. *Biomed Pharmacother*. 2017; 96, 173-181.
132. Hussain N, Zhu W, Jiang C, Xu J, Wu X, Geng M, et al. Down-regulation of miR-10a-5p in synoviocytes contributes to TBX5-controlled joint inflammation. *J Cell Mol Med*. 2018;22(1), 241-250.
133. Akhtar N, Singh AK, Ahmed S. MicroRNA-17 Suppresses TNF- $\alpha$  Signaling by Interfering with TRAF2 and cIAP2 Association in Rheumatoid Arthritis Synovial Fibroblasts. *J Immunol*. 2016;197(6), 2219-2228.
134. Gao J, Zhou XL, Kong RN, Ji LM, He LL, Zhao DB. microRNA-126 targeting PIK3R2 promotes rheumatoid arthritis synovial fibro-blasts proliferation and resistance to apoptosis by regulating PI3K/AKT pathway. *Exp Mol Pathol*. 2016;100(1), 192-198.
135. Talebi F, Ghorbani S, Chan WF, Boghazian R, Masoumi F, Ghasemi S, et al. MicroRNA-142 regulates inflammation and T cell differentiation in an animal model of multiple sclerosis. *Journal of Neuroinflammation*. 2017;14, 55.

136. Guan H, Singh UP, Rao R, Mrelashvili D, Sen S, et al. Inverse correlation of expression of microRNA-140-5p with progression of multiple sclerosis and differentiation of encephalitogenic T helper type 1 cells. *Immunology*. 2016;147(4), 488–498.
137. Mycko MP, Cichalewska M, Cwiklinska H, Selmaj KW. miR-155-3p Drives the Development of Autoimmune Demyelination by Regulation of Heat Shock Protein 40. *J Neurosci*. 2015;35:16504-16515.
138. Wang W, Gao J, Wang F. miR-663a/miR-423-5p are involved in the pathogenesis of lupus nephritis via modulating the activation of NF- $\kappa$ B by targeting TNIP2. *American Journal of Translational Research*. 2017; 9(8), 3796–3803.
139. Liu L, et al. Elevated expression of microRNA-873 facilitates Th17 differentiation by targeting forkhead box O1(Foxo1) in the pathogenesis of systemic lupus erythematosus, *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2017; 492(3):453-460.
140. Smith S, Fernando T, Wu PW, et al. MicroRNA-302d targets IRF9 to regulate the IFN-induced gene expression in SLE, *J. Autoimmun*. 2017; 79:105e111.
141. Cheng J, Wu R, Long L, Su J, Liu J, Wu X-D, et al. miRNA-451a targets IFN regulatory factor 8 for the progression of systemic lupus erythematosus. *Inflammation*. 2017;40(2):676–87.
142. Kim H, Kwon H, Ha Thi H, Lee H, Kim G, Hahm K, et al. MicroRNA-132 and microRNA-223 control positive feedback circuit by regulating FOXO3a in inflammatory bowel disease. *J Gastroenterol Hepatol*. 2016;31:1727–1735.
143. Wang H, Chao K, Ng SC, Bai AH, Yu Q, Yu J, et al. Pro-inflammatory miR-223 mediates the cross-talk between the IL23 pathway and the intestinal barrier in inflammatory bowel disease. *Genome Biology*. 2016;17, 58.

144. Yang X, He Q, Guo Z, Xiong F. MicroRNA-425 facilitates pathogenic Th17 cell differentiation by targeting forkhead box O1 (Foxo1) and is associated with inflammatory bowel disease. *Biochemical and biophysical research communications*. 2018; 496 (2018) 352-358.
145. Chen JQ. Simultaneously increased expression of microRNA-155 and suppressor of cytokine signaling 1 (SOCS1) gene in the peripheral blood mononuclear cells of patients with primary Sjogren's syndrome. *Int. J. Rheum. Dis.* 2017; 20 (5),609–613
146. Shen H, Tian Y, Yao X, Liu W, Zhang Y, Yang, Z. miR-99a inhibits keratinocyte proliferation by targeting Frizzled-5 (FZD5) / FZD8 through  $\beta$ -catenin signaling in psoriasis. *Die Pharmazie*. 2017; 72 8, 461-467.
147. Lu J, Ji M, Zhang X, Shi P, Wu H, Wang C, et al. MicroRNA-218-5p as a potential target for the treatment of human osteoarthritis. *Molecular Therapy*. 2017; 25(12):2676-2688
148. Lucherini OM, Obici L, Ferracin M, Fulci V, McDermott MF, Merlini G, et al. First Report of Circulating MicroRNAs in Tumour Necrosis Factor Receptor-Associated Periodic Syndrome (TRAPS). *PLoS ONE* 8(9): e73443.
149. Qingyun Z, Xiang X, Chaokui W, Xuedong Z, Fuzhen L, Yan Z, et al. Decreased microRNA-155 Expression in Ocular Behcet's Disease but Not in Vogt Koyanagi Harada Syndrome. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2012;53(9):5665-5674.
150. Wada T, Toma T, Matsuda Y. Microarray analysis of circulating microRNAs in familial Mediterranean fever. *Mod Rheumatol*. 2017;Feb 6:1-18.
151. Latsoudis H, Mashreghi MF, Grün JR. Differential Expression of miR-4520a Associated With Pyrin Mutations in Familial Mediterranean Fever (FMF). *Journal of Cellular Physiology*. 2017;Jun; 232(6):1326-1336.
152. Amarilyo G, Pillar N, Ben-Zvi I, Weissglas-Volkov D, Zalcman J. Analysis of microRNAs in familial Mediterranean fever. *PLOS ONE*. 2018;13(5): e0197829.

153. Hortu HO, Karaca E, Sozeri B, Gulez N, Makay B, Gunduz C, et al. Evaluation of the effects of miRNAs in familial Mediterranean fever. *Clin Rheumatol*. 2018;Feb 13. doi: 10.1007/s10067-017-3914-0. [Epub ahead of print]
154. Koga T, Migita K, Sato T, Sato S, Umeda M, Nonaka F, et al. MicroRNA-204-3p inhibits lipopolysaccharide-induced cytokines in familial Mediterranean fever via the phosphoinositide 3-kinase  $\gamma$  pathway. *Rheumatology (Oxford)*. 2018 Apr 1;57(4):718-726.
155. Akkaya-Ulum YZ, Balci-Peynircioglu B, Karadag O, Eroglu FK, Kalyoncu U, Kiraz S, et al. Alteration of the microRNA expression profile in familial Mediterranean fever patients. *Clin Exp Rheumatol*. 2017 Nov-Dec;35 Suppl 108(6):90-94.
156. Galeazzi M, Gasbarrini G, Ghirardello S, Grandemange S, Hoffman HM, Manna R, et al. Autoinflammatory syndromes. *Clin Exp Rheumatol*. 2006;24:79-85.
157. Reed JC. Mechanisms of apoptosis. *Am J Pathol*. 2000;157: 1415–1430.
158. Sozeri B, Kasapcopur O. Autoinflammatory diseases in childhood. *Modern Research in Inflammation*. 2014;Vol.3, No.1, 7-18.
159. Akhabir L, Sandford A. Genetics of interleukin 1 receptor-like 1 in immune and inflammatory diseases. *Curr Genomics*. 2010 Dec;11(8):591-606.
160. Deshmane SL, Kremlev S, Amini S, Sawaya BE. Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1): an overview. *J Interferon Cytokine Res*. 2009 Jun;29(6):313-26.
161. Noren Hooten N, Fitzpatrick M, Wood WH, De S, Ejiogu N, Zhang Y, et al. Age-related changes in microRNA levels in serum. *Aging (Albany, NY)*. 2013;5:725–40.
162. Zhang Y, Fan M, Zhang X. Cellular microRNAs up-regulate transcription via interaction with promoter TATA-box motifs. *RNA*. 2014;20(12):1878-1889. doi:10.1261/rna.045633.114.



163. Oliveto S, Mancino M, Manfrini N, Biffo S. Role of microRNAs in translation regulation and cancer. *World Journal of Biological Chemistry*. 2017;8(1):45-56. doi:10.4331/wjbc.v8.i1.45.

## 8. EKLER

### EK-1: Tez çalışması ile ilgili etik kurul izni



**HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ**  
**GİRİŞİMSSEL OLMAYAN**  
**KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU**

06100 Sıhhiye-Ankara  
Telefon: 0 (312) 305 1082 • Faks: 0 (312) 310 0580  
E-posta: goetik@hacettepe.edu.tr

28 Ocak 2013

Sayı: B.30.2.HAC.0.05.07.00/216

### ARAŞTIRMA PROJESİ DEĞERLENDİRME RAPORU

Toplantı Tarihi : 13.02.2013 ÇARŞAMBA  
Toplantı No : 2013/03  
Proje No : GO 13/54 (Değerlendirme Tarihi 23.01.2013)  
Karar No : GO 13/54 - 07

Üniversitemiz Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, öğretim üyelerinden Prof. Dr. Engin Yılmaz'ın sorumlu araştırmacı olduğu Yrd. Doç. Dr. Banu Peynircioğlu, Zülfiye Yeliz Akkaya, Cansın Güler, Prof. Dr. İhsan Ertenli, Prof. Dr. Sedat Kiraz, Doç. Dr. Ömer Karadağ, Prof. Dr. Seza Çizen, Dr. Fehime Kara, Dr. Ezgi Deniz Batu ve Dr. Erdal Sağ ile birlikte çalışacakları GO 13/54 kayıt numaralı ve "*Epigenetik Faktörlerin Ailevi Akdeniz Ateşi Hastalığının Moleküler Patofizyolojisi Üzerine Etkisi*" başlıklı proje önerisi Kurulumuzda değerlendirilmiş olup, etik açıdan uygun bulunmuştur.

- |                                   |          |                                      |       |
|-----------------------------------|----------|--------------------------------------|-------|
| 1. Prof. Dr. Nurten Akarsu        | (Başkan) | 9. Prof. Dr. Songül Yaizoğlu         | (Üye) |
| 2. Prof. Dr. Nüket Örnek Buken    | (Üye)    | GÖREVLİ                              |       |
| 3. Prof. Dr. Hakan S. Orer        | (Üye)    | 10. Prof. Dr. Melahat Görduysus      | (Üye) |
| 4. Prof. Dr. Sevdâ F. Müftüoğlu   | (Üye)    | 11. Doç. Dr. R. Köksal Özgül         | (Üye) |
| Prof. Dr. Cenk Sokmensüer         | (Üye)    | 12. Prof. Dr. Cansın Saçkesen        | (Üye) |
| 6. Prof. Dr. Kafiye Eroğlu        | (Üye)    | 13. Doç. Dr. Ayşe Lale Doğan         | (Üye) |
| 7. Prof. Dr. Volga Bayrakçı Tunay | (Üye)    | GÖREVLİ                              |       |
| 8. Prof. Dr. Yılmaz Selim Erdal   | (Üye)    | 14. Doç. Dr. S. Kutay Demirkan       | (Üye) |
|                                   |          | 15. Yrd. Doç. Dr. H. Hüsrev Turnagöl | (Üye) |
|                                   |          | 16. Av. Meltem Onurlu                | (Üye) |

### EK-2: Tez çalışması için protokol onayı ile ilgili etik kurul izni



**T.C.**  
**HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ**  
Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu

Sayı : 16969557-1050

Konu :

**ARAŞTIRMA PROJESİ DEĞERLENDİRME RAPORU**

**Toplantı Tarihi** : 21 HAZİRAN 2018 PERŞEMBE  
**Toplantı No** : 2018/16  
**Proje No** : GO 18/501 (Değerlendirme Tarihi: 05.06.2018)  
**Karar No** : GO 18/501-08

Üniversitemiz Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı öğretim üyelerinden Doç. Dr. Banu PEYNİRCİOĞLU'nun sorumlu araştırmacı olduğu, Üzm. Bio. Zülfiye Yeliz Akkaya ULUM'un doktora tezi olan GO 18/501 kayıt numaralı, "*Ailevi Akdeniz Ateşi Hastalığında Görülen İnflamasyon Sürecinde Rol Alan miRNA'ların Tanımlanması*" başlıklı proje önerisi araştırmanın gerekece, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş olup, 01 Temmuz 2018 – 01 Temmuz 2019 tarihleri arasında geçerli olmak üzere etik açıdan uygun bulunmuştur.

- |   |   |
|---|---|
| 1. Prof. Dr. Nurten AKARSU (Başkan)     | 10 Doç. Dr. Gözde GİRGİN (Üye)          |
| 2. Prof. Dr. Sevda F. MÜFTÜOĞLU (Üye)   | 11 Doç. Dr. Fatma Visal OKUR (Üye)      |
| İZİNLİ                                  | İZİNLİ                                  |
| 3. Prof. Dr. M. Yıldırım SARA (Üye)     | 12. Doç. Dr. Can Ebru KURT (Üye)        |
| 4. Prof. Dr. Necdet SAĞLAM (Üye)        | 13. Doç. Dr. H. Hüsrev TURNAGÖL (Üye)   |
| 5. Prof. Dr. Hatice Doğan BUZUGLU (Üye) | 14. Dr. Öğr. Üyesi Özay GÖKÖZ (Üye)     |
| 6. Prof. Dr. R. Köksal ÖZGÜL (Üye)      | 15. Dr. Öğr. Üyesi Müge DEMİR (Üye)     |
| 7. Prof. Dr. Ayşe Lale DOĞAN (Üye)      | 16. Öğr. Gör. Dr. Meltem ŞENGELEN (Üye) |
| 8. Prof. Dr. Mintaze Kerem GÜNEL (Üye)  | 17. Av. Meltem ONURLU (Üye)             |
| 9. Prof. Dr. Oya Nuran EMİROĞLU (Üye)   |   |

**EK-3: Çalışma grubundaki bireylerin tüm kan sayımı (CBC) seviyeleri**

		Hemoglobin g/dL	Hematokrit %	Lökosit x10 <sup>3</sup> /μL	Lenfosit %	Monosit %	Nötrofil %	Eozinofil %	Bazofil %	Trombosit x10 <sup>3</sup> /μL
<b>M694V homozigot hastalar</b>	Hasta 1	12,9	37,4	7,6	25,6	7,2	65	2	0,2	245
	Hasta 2	11,3	34,1	10,8	13,5	4,2	82,1	0	0,2	230
	Hasta 3	16,1	46,9	7,9	31,1	9,8	56,4	2,1	0,6	287
	Hasta 4	13,9	43,6	11,5	24,2	11,7	61,5	2,2	0,4	326
	Hasta 5	11,4	34,4	5	34,1	9	54,3	1,9	0,7	255
	Hasta 6	12,5	38,7	13,2	18	7,2	74	0,4	0,4	500
<b>Sağlıklı kontrol</b>	Kontrol 1	15,5	46,2	5	23,3	10,7	64	1,3	0,7	318
	Kontrol 2	14,2	42,1	4,8	36	12	48,9	2,6	0,5	289
	Kontrol 3	12,6	37,5	7,8	29	5,8	63,4	1,5	0,3	306
	Kontrol 4	13,5	39,9	6,1	37,1	8,8	52,1	1,2	0,8	267
	Kontrol 5	13,1	39,3	7,3	32,2	7,3	58,4	1,7	0,4	358
	Kontrol 6	15,9	48,7	7,1	32	8,8	57,6	1	0,6	280

## EK-4: I. Tez yayını

Clin Exp Rheumatol. 2017 Nov-Dec;35 Suppl 108(6):90-94. Epub 2017 Nov 27.

### Alteration of the microRNA expression profile in familial Mediterranean fever patients.

Akkaya-Ulum YZ<sup>1</sup>, Balci-Peynircioglu B<sup>1</sup>, Karadag O<sup>2</sup>, Eroglu FK<sup>3</sup>, Kalyoncu U<sup>2</sup>, Kiraz S<sup>2</sup>, Ertenli AI<sup>2</sup>, Özen S<sup>3</sup>, Yilmaz E<sup>4</sup>.

#### Author information

#### Abstract

**OBJECTIVES:** Phenotypic heterogeneity in familial Mediterranean fever (FMF) disease indicated that FMF is not a simple monogenic disease. Therefore it has been suggested that epigenetic factors can be one of the reason for the variations. We undertook this study to test potential involvement of miRNAs in the pathogenesis of FMF.

**METHODS:** miRNA array was performed on whole blood RNA samples from 6 healthy controls (-/-), 6 FMF patients (M694V/M694V), 6 carriers who displayed the disease phenotype (M694V/-) and 6 healthy carriers (M694V/-). The raw data was analysed by Multi Experiment Viewer (MeV) and candidate miRNAs were determined according to fold change (more than 2.0 or less than -2.0). The validation of differentially expressed miRNAs was done by qRT-PCR. Then we performed pathway analyses with using bioinformatics tools.

**RESULTS:** 14 miRNAs were found to be significant among groups through the analysis with MeV. miR-20a-5p, miR-197-3p, let-7d-3p and miR-574-3p were found to be associated with inflammatory pathway related genes according to DAVID analysis. MiR-20a-5p (FDR: 0.00, FCH: 5.55) was significantly up regulated whereas miR-197-3p (FDR: 0.00, FCH: -2.27) was down regulated in homozygotes patients. Both let-7d-3p (FDR: 0.00, FCH: 28.75) and miR-574-3p (FDR: 0.00, FCH: 3.95) were up regulated in heterozygote patients group.

**CONCLUSIONS:** We showed that there are several differentially expressed miRNAs both in homozygote and heterozygote FMF patients compared to controls and healthy carriers. Thus we suggest that these miRNAs, related with inflammatory pathways may be responsible for the expression of the disease in FMF.

## CLINICAL AND EXPERIMENTAL RHEUMATOLOGY

ISSN: 0392-856X

CLINICAL & EXPER RHEUMATOLOGY  
VIA SANTA MARIA 31, 56126 PISA, ITALY  
ITALY

[Go to Journal Table of Contents](#) [Go to Ulrich's](#)

#### Titles

ISO: Clin. Exp. Rheumatol.  
JCR Abbrev: CLIN EXP RHEUMATOL

#### Categories

RHEUMATOLOGY - SCIE

#### Languages

English

6 Issues/Year

#### Key Indicators

Year	Total Cites <a href="#">Graph</a>	Journal Impact Factor <a href="#">Graph</a>	Impact Factor Without Journal Self Cites <a href="#">Graph</a>	5 Year Impact Factor <a href="#">Graph</a>	Immediacy Index <a href="#">Graph</a>	Citable Items <a href="#">Graph</a>	Cited Half-Life <a href="#">Graph</a>	Citing Half-Life <a href="#">Graph</a>	Eigenfactor Score <a href="#">Graph</a>	Article Influence Score <a href="#">Graph</a>	% Articles in Citable Items <a href="#">Graph</a>	Normalized Eigenfactor <a href="#">Graph</a>	Average JIF Percentile <a href="#">Graph</a>
2017	8,090	3.201	2.380	2.592	0.585	265	7.2	6.5	0.01...	0.698	86.79	1.47...	56.452

#### Source Data

#### Rank

#### Cited Journal Data

#### JCR Impact Factor

JCR Year	RHEUMATOLOGY		
	Rank	Quartile	JIF Percentile
2017	14/31	Q2	56.452

# Alteration of the microRNA expression profile in familial Mediterranean fever patients

Y.Z. Akkaya-Ulum<sup>1</sup>, B. Balci-Peynircioglu<sup>1</sup>, O. Karadag<sup>2</sup>, F.K. Eroglu<sup>3</sup>,  
U. Kalyoncu<sup>2</sup>, S. Kiraz<sup>2</sup>, A.I. Ertenli<sup>2</sup>, S. Özen<sup>3</sup>, E. Yilmaz<sup>1,4</sup>

<sup>1</sup>Department of Medical Biology,

<sup>2</sup>Department of Rheumatology,

<sup>3</sup>Department of Paediatric Rheumatology, Hacettepe University, Ankara, Turkey;

<sup>4</sup>Department of Medical Biology, Acibadem Mehmet Ali Aydınlar University, Istanbul, Turkey (present address).

Yeliz Z. Akkaya-Ulum, MSc

Banu Balci-Peynircioglu, PhD

Omer Karadag, MD

Fehime K. Eroglu, MD

Umut Kalyoncu, MD

Sedat Kiraz, MD

Ali İhsan Ertenli, MD

Seza Özen, MD

Engin Yilmaz, PhD

Please address correspondence to:

Dr Engin Yilmaz,

Acibadem Mehmet Ali Aydınlar

University, Faculty of Medicine,

Department of Medical Biology,

Kerem Aydınlar Campus,

32 Kayışdağı Street,

34752 Ataşehir, Istanbul, Turkey.

E-mail: engin.yilmaz@acibadem.edu.tr

Received on May 13, 2017; accepted in revised form on September 26, 2017.

Clin Exp Rheumatol 2017; 35 (Suppl. 108): S90-S94.

© Copyright CLINICAL AND EXPERIMENTAL RHEUMATOLOGY 2017.

**Key words:** inflammation, epigenetics, microRNAs, familial Mediterranean fever, array, inflammatory pathways.

**Ethics:** Written consent was acquired from the patients and controls involved in the study and approved by national ethics committee (23.01.2013, no. GO13/54-07).

**Funding:** This work was supported by Technical and Scientific Research Council of Turkey (TUBITAK), grant no: 214S106 and Hacettepe University, Scientific Research Projects Coordination Unit, grant no: 013D05101005, and the Turkish Society of Rheumatology, Turkey.

**Competing interests:** none declared.

## ABSTRACT

**Objective.** Phenotypic heterogeneity in familial Mediterranean fever (FMF) disease indicated that FMF is not a simple monogenic disease. Therefore it has been suggested that epigenetic factors can be one of the reason for the variations. We undertook this study to test potential involvement of miRNAs in the pathogenesis of FMF.

**Methods.** miRNA array was performed on whole blood RNA samples from 6 healthy controls (-/-), 6 FMF patients (M694V/M694V), 6 carriers who displayed the disease phenotype (M694V/-) and 6 healthy carriers (M694V/-). The raw data was analysed by Multi Experiment Viewer (MeV) and candidate miRNAs were determined according to fold change (more than 2.0 or less than -2.0). The validation of differentially expressed miRNAs was done by qRT-PCR. Then we performed pathway analyses with using bioinformatics tools.

**Results.** 14 miRNAs were found to be significant among groups through the analysis with MeV. miR-20a-5p (FDR: 0.00, FCH: 5.55) was significantly up regulated whereas miR-197-3p (FDR: 0.00, FCH: -2.27) was down regulated in homozygotes patients. Both let-7d-3p (FDR: 0.00, FCH: 28.75) and miR-574-3p (FDR: 0.00, FCH: 3.95) were up regulated in heterozygote patients group.

**Conclusion.** We showed that there are several differentially expressed miRNAs both in homozygote and heterozygote FMF patients compared to controls and healthy carriers. Thus we suggest that these miRNAs, related with inflammatory pathways may be responsible for the expression of the disease in FMF.

## Introduction

Familial Mediterranean fever (FMF) is the most common autoinflammatory disease among Eastern Mediterranean (1). It is known as rare disease, but has a high prevalence in Turkish population. FMF is caused by mutations in the MEFV (Mediterranean FeVer) gene (2). Several studies examining genotype-phenotype correlation in FMF patients with different clinical findings and therapeutic approaches showed that FMF may not be a simple monogenic disease. Different modifiers like epigenetic factors can be the reason for phenotypic seen in FMF. Recent data claimed that epigenetic dysregulation is effective in the pathogenesis of certain inflammation and autoimmunity (3).

Among epigenetic changes, microRNAs (miRNAs) play role as gene expression regulators and have emerged as crucial players in various biological processes such as cellular proliferation and differentiation, and apoptosis (3). Thus miRNAs may be responsible for post-transcriptional and/or translational changes in inflammatory protein products and hence may have a role in the expression of rheumatic diseases. It has been shown that, miR-155 and miR-146a are induced by LPS (Lipopolysaccharide), TNF- $\alpha$  (Tumour necrosis factor-alpha) and IL-1 $\beta$  (Interleukin-1 beta) in a NF- $\kappa$ B-dependent manner (Nuclear factor-kappaB) (4, 5). The increased expression of miR-146a in several cell types has been consistently reported to have a role in the pathogenesis of rheumatoid arthritis (6). MiR-155, miR-146a and miR-21 are the common miRNAs related with multiple sclerosis, systemic lupus erythematosus and bacterial infections (7). Recently two different groups showed different miRNAs related with FMF. Wada *et al.* showed that expression pat-

**Table I.** Demographic and clinical characteristics of patients and healthy subjects.

		<i>MEFV</i> mutation	Signs and symptoms	Treatment
Homozygote patients	Patient 1.LZ	M694V/M694V	fever, peritonitis, sacroiliitis, arthritis,	Colchicine, Anakinra, Certolizumab
	Patient 2.DNU	M694V/M694V	fever, peritonitis, arthritis	Colchicine, Anakinra
	Patient 3.CI	M694V/M694V	fever, peritonitis, arthritis	Colchicine
	Patient 4.FK	M694V/M694V	fever, peritonitis, arthritis	Colchicine, Etanercept
	Patient 5.TB	M694V/M694V	fever, peritonitis	Canakinumab
	Patient 6.MK	M694V/M694V	fever, peritonitis, pleuritis	Canakinumab
Heterozygote patients	Patient 1.YEK	M694V/-	fever, peritonitis	Colchicine
	Patient 2.RDZ	M694V/-	fever, peritonitis	Colchicine
	Patient 3.BŞ	M694V/-	fever, peritonitis, pleuritis	Colchicine
	Patient 4.EA	M694V/-	fever, peritonitis	Colchicine
	Patient 5.MÇ	M694V/-	fever, peritonitis	Colchicine
	Patient 6.YA	M694V/-	fever, peritonitis	Colchicine

terns of circulating miRNAs in patients between FMF episodes differ among FMF subgroups based on *MEFV* mutations, which may use as useful biomarkers (8). Latsoudis *et al.* studied miR-4520a and its target RHEB, the main activator of mTOR signalling. They suggested that miR-4520a expression levels are significantly deregulated in FMF patients and highly dependent on the presence of pyrin mutations, especially of the M694V type (9).

This study aimed to explore the potential involvement of miRNAs in the pathogenesis of FMF and whether they could offer an explanation to the phenotypic heterogeneity seen in disease. For this purpose we studied homozygote patients with severe disease phenotype. We also hypothesised that epigenetic factors may be operative in the disease expression in heterozygotes. For this aim we compared heterozygotes with disease expression and those who were healthy carriers.

### Materials and methods

#### Patients

Blood samples were collected in PAX-gene Blood RNA (Qiagen, Valencia, California, USA) tubes from 6 healthy controls (-/-), 6 patients (M694V/M694V), 6 carriers who displayed the disease phenotype (M694V/-) and 6 healthy carriers (M694V/-) from Hacettepe University Hospital, Ankara, Turkey. All patients displayed a typical phenotype with attacks of 12–72 hour duration. C-reactive protein (CRP) levels and complete blood count (CBC) of patients were also checked.

**Table II.** MicroRNA profile of total blood of control, carrier and patient group using GeneChip miRNA 2.0 Array (Affymetrix). Statistical analysis was performed using SAM. FCH > 2.0; FDR < 0.05. FCH: fold change; FDR: false discovery rate.

		FCH	FDR
Homozygote patients (M694V/M694V) vs. controls (-/-)	hsa-miR-20a-5p	5.554	0.000
	hsa-miR-29b	3.299	0.000
	hsa-miR-19b	2.641	0.000
	hsa-miR-30e	2.118	0.000
	hsa-miR-197-3p	0.437	0.000
	hsa-miR-1308	0.425	0.000
Heterozygote patients (M694V/-) vs. healthy carriers (M694V/-)	hsa-let-7d*	28.745	0.000
	hsa-miR-1226	16.096	0.000
	hsa-miR-125a-5p	10.412	0.000
	hsa-miR-574-3p	3.953	0.000
	hsa-miR-197	3.711	0.000
	hsa-miR-4298	3.326	0.000
	hsa-miR-941	3.041	0.000
	hsa-miR-1826	0.176	0.000

Since the homozygote patients had a severe disease phenotype, 5 of them were also receiving biologic therapies. The median ages were 28 for homozygote patients, 26 for heterozygote patients, 33 for heterozygote carriers, 34 for healthy controls. Female/Male ratio was 11/13 (Table I). Written consent was acquired from the patients and controls involved in the study and approved by national ethics committee (23.01.2013 date, GO13/54-07 number). Mutation analysis was performed on *MEFV* gene by DNA sequencing for every individual.

#### RNA isolation and microarray

RNA was isolated from total blood with PreAnalytiX miRNA Kit (Qiagen, Valencia, California, USA), given the fact that neutrophils and monocytes are the main cell types important in FMF pathology and the possibility of prob-

ing miRNAs in circulation. The quality and quantity of RNAs were determined by spectrophotometric measurements at 260 and 280 nm with a NanoDrop ND 1000 (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA).

The expression levels of miRNAs were determined with GeneChip miRNA 2.0 Array (Affymetrix) according to the manufacturer's recommendations. The raw data was analysed by Multi Experiment Viewer (MeV) and candidate miRNAs were determined according to fold change (more than 2.0 or less than -2.0), false discovery rate, and abundance in neutrophils and monocytes.

#### Real time quantitative PCR analysis

The validation of differentially expressed miRNAs was done by qRT-PCR (Quantitative reverse transcription polymerase chain reaction). The number of the patients was increased

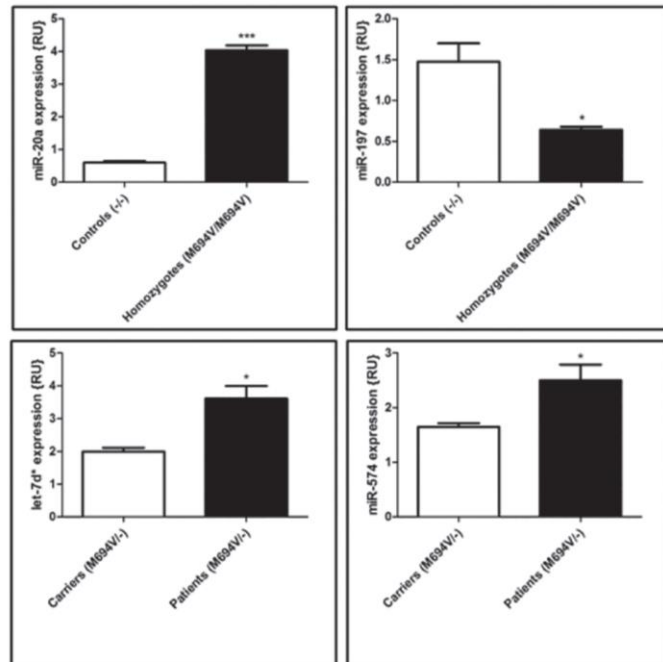
for the validation step (n=10 for each group) (Supplementary Table I). Reverse transcription was carried out using TaqMan<sup>®</sup> MicroRNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). PCR amplification was done using an ABI Prism 7500 sequence detector (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). All reactions were performed with TaqMan<sup>®</sup> MicroRNA Assays (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) primers by using TaqMan<sup>®</sup> Universal PCR Master Mix, no AmpErase<sup>®</sup> UNG (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) in Biorad iQ5 (Bio-rad, Hercules, CA, USA). For quantification, 2<sup>-ΔΔCT</sup> method was used. Each sample was tested in triplicate and all quantifications were normalised using RNU48 as referans gene.

#### Bioinformatics analysis

miRNA target genes were determined in miRWalk, the database on predicted and validated miRNA targets. This database combines many prediction programs including DIANA-miT, PICTAR4, PICTAR5, miRanda, miRDB, PITA, miRWalk, RNA22, RNAhybrid, TargetScan. We chose the target genes that were determined by at least six of these programs. Then the target gene list was clustered in DAVID (The Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery) v6.7 through BioCarta and KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) pathway maps.

#### Results

**Fourteen miRNAs expression levels altered significantly among the groups**  
Many miRNAs were found as differentially expressed significantly among groups through the analysis with Multi Experiment Viewer (MeV) (Table II). Among these 14 candidate miRNAs, miR-20a-5p, miR-197-3p, let-7d-3p and miR-574-3p were found to be associated with inflammatory pathway related genes according to DAVID analysis (Supplementary Fig. 1-7). MiR-20a-5p (FDR: 0.00, FCH: 5.55) was significantly up regulated whereas miR-197-3p (FDR: 0.00, FCH: -2.27) was down regulated in homozygotes patients. Both let-7d-3p (FDR: 0.00,



**Fig. 1.** Validation of differentially expressed miRNAs by qRT-PCR. RNAs from control, carrier and patient groups were used and the expression of the indicated miRNAs was measured using qRT-PCR. MiRNA expression was normalised to U48 RNA. \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$ .

**Table III.** CRP (C-reactive protein) and ESR (erythrocyte sedimentation rate) levels of patients.

		CRP mg/dL	ESR mm/hour
Homozygote patients	Patient 1. LZ	2.73	27
	Patient 2. DNU	11.1	37
	Patient 3. CI	1.59	6
	Patient 4. FK	13.2	15
	Patient 5. TB	0.162	6
	Patient 6. MK	1.6	40
Heterozygote patients	Patient 1. YEK	0.21	10
	Patient 2. RDZ	0.388	2
	Patient 3. BŞ	0.161	2
	Patient 4. EA	0.12	2
	Patient 5. MÇ	8.66	15
	Patient 6. YA	0.2	3

FCH: 28.75) and miR-574-3p (FDR: 0.00, FCH: 3.95) were up regulated in heterozygote patients group.

#### Four selected miRNAs were validated successfully

Results of the miRNA expression profiling were validated in patients. qRT-PCR analysis confirmed the results of

the miRNA profiling for 4 miRNAs. From two of them; miR-20a showed induction and the other one; miR-197 showed reduction in the homozygote group compared to controls. Another two miRNAs; miR-574 and let-7d increased in heterozygote patients compared to carriers (Fig. 1). All these miRNAs found to play possible role



in TGF-beta (Transforming growth factor beta) signal, TLR (Toll-like receptor), and NLR (NOD-like receptor) signalling pathway, apoptosis and actin cytoskeleton regulation, they were chosen as candidate miRNAs for the remaining experiments.

### Discussion

FMF is characterised by clinical and laboratory signs of inflammation. We suggested that two miRNAs (miR-20a and miR-197) are effective in the inflammation of homozygote FMF patients with severe disease phenotype. We also have studied the heterozygote *MEFV* mutation carriers who display the disease phenotype and compared them to healthy carriers, to understand whether epigenetic mechanisms were effective in the presentation of the disease in this specific group of patients. We have shown that there were marked expression of two specific miRNAs (miR-574 and let-7d\*) in heterozygotes that display the disease phenotype, that were not present in those who were "healthy". Complete blood count (CBC) samples were also taken at the same time for standardisation of the number of the cells in patients. Especially the percentage of the inflammatory cells was checked. Also patient's clinical status was carefully examined. All samples have similar percentage of neutrophil cells (Supplementary Table II and III). During the blood sample evaluation we aim the get to less disease activity with effective agents including anakinra and canakinumab (Table I).

Treatments of FMF patients were tailored according to frequency, duration and severity of FMF attacks. As shown in Table II, some of patients were on parenteral treatments such as anakinra and canakinumab. To eliminate the possible confounding effects of FMF attacks on miRNA levels, blood samples of both patient groups were taken at attack-free periods. However, some patients had increased acute phase reactants (Table III, Supplementary Table IV). The possible association of acute phase reactants with miRNA levels during FMF attacks should be assessed in further studies.

Abnormal expression of several miR-

NAs has been reported in different kinds of samples in immune system related disorders. The ones circulated inside exosomes and stable in plasma or serum maybe suitable for clinical use as potential biomarkers. In FMF, detection of such a biomarker may be used for explaining the severity of the disease for complex cases. Recently two groups were focused on biomarkers studies for FMF disease. Wada *et al.* and Latsoudis *et al.* showed some miRNAs levels differs among patients dependent on their mutations in *MEFV* gene (8, 9). They are more likely to identify possible biomarkers for disease, as the study groups are from patients who have mutations in exon 10 or exon 3. But our study mainly focused on the miRNAs related with inflammation seen in patients for explaining pathophysiology of the disease with epigenetics. In this study, we showed for the first time that there are several differentially expressed miRNAs both in homozygote and heterozygote FMF patients compared to controls and healthy carriers apart from their mutation types, which seems to be important in disease pathogenesis. Our experimental and bioinformatics analysis results may contribute to explain phenotypic heterogeneity seen in patients. The differential expression of miR-197 in homozygous FMF patients and symptomatic carriers can be explained by different treatments that those patients have. All homozygote patients are using drugs other than colchicine such as anakinra, certolizumab, etanercept and canakinumab, however, heterozygote patients are being treated by daily use of colchicine (Table I). Actually these differences according to phenotype make miR-197 a more important target for FMF disease. However functional studies are needed to explain its exact effect on the autoinflammation mechanism.

One of the candidate miRNAs in homozygotes vs. control group, miR-20a has been shown to be negative regulator of inflammation in rheumatoid arthritis (RA) fibroblast-like synoviocytes (FLS) by modulating expression of apoptosis signal-regulating kinase (ASK) 1, a key component of the toll-

like receptors 4 pathway, upstream of p38 mitogen-activated protein kinase (10). In another study, signal-regulatory protein  $\alpha$  (SIRP $\alpha$ ) that modulates leukocyte inflammatory responses, was found to be one of the target genes of miR-20a and its belonging cluster miR-17-92 (11). The other miRNA, miR-197 was found to have an important role in the reactivation of liver inflammation by targeting IL-18 during HBV (Hepatitis b virus) infection (12) and regulate IL-6/STAT3 (Interleukin 6/ Signal transducer and activator of transcription 3) inflammatory signalling pathway in hepatocellular carcinoma (HCC) (13).

It has been known for a long time that some carriers display the disease although this is an autosomal recessive disease. Many studies have addressed possible explanations such as a second candidate gene, allelic gene expression analysis and complex heredity models were theorised (14). Since there was no substantial explanation we hypothesised that epigenetic control mechanisms such as DNA methylation, histone modifications, chromatin remodeling and non-coding RNAs (miRNAs, etc.) can be important for explaining molecular pathophysiology of FMF. MiR-574, in heterozygotes *versus* healthy carrier group, was indicated as a possible modulator of inflammation (raised IL-8, reduced miR-146a) with type 2 diabetes (T2D) patients (15). There is no study that shows the relation between inflammation and let-7d\* as yet.

Bioinformatics analysis revealed that some of these miRNAs target mRNAs clustered in inflammatory pathways such as cytokine secretion, apoptosis, and cell migration. Functional validation efforts of differentially expressed miRNAs, through identifying its target genes experimentally and manipulating miRNA levels (overexpression or knock-down of miRNA) in specific cells are underway.

The descriptive results of this study revealed that miRNAs can be one of the epigenetic factors that play role in FMF pathogenesis which will in turn represent a model for its possible application to the other inherited autoinflammatory disorders.

## References

1. BEN-CHEIRITE, TOUITOU I: Familial Mediterranean Fever in the world. *Arthritis Rheum* 2009; 61: 1447-53.
2. INTERNATIONAL FMF CONSORTIUM: Ancient missense mutations in a new member of the Roret gene family cause familial Mediterranean fever. *Cell* 1997; 90: 797-807.
3. RAISCH J, DARFEUILLE-MICHAUD A, NGUYEN HTT: Role of microRNAs in the immune system, inflammation and cancer. *World J Gastroenterol* 2013; 19: 2985-96.
4. TAGANOV KD, BOLDIN MP, CHANG KJ et al.: NF-kappaB-dependent induction of microRNA miR-146, an inhibitor targeted to signaling proteins of innate immune responses. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; 103: 12481-6.
5. O'CONNELL RM, TAGANOV KD, BOLDIN MP et al.: MicroRNA-155 is induced during the macrophage inflammatory response. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007; 104:1604-9.
6. CERIBELLI A, NAHID MA, SATOH M et al.: MicroRNAs in rheumatoid arthritis. *FEBS letters* 2011; 585: 3667-74.
7. O'CONNELL RM, RAO DS, BALTIMORE D: MicroRNA regulation of inflammatory responses. *Annu Rev Immunol* 2012; 30: 295-312.
8. WADA T, TOMA T, MATSUDA Y et al.: Microarray analysis of circulating microRNAs in familial Mediterranean fever. *Mod Rheumatol* 2017; Feb 6: 1-18.
9. LATSOURDIS H, MASHREGHI MF, GRÜN JR et al.: Differential Expression of miR-4520a Associated With Pyrin Mutations in Familial Mediterranean Fever (FMF). *Journal of Cellular Physiology*. 2017 Jun; 232: 1326-36.
10. PHILIPPE L, ALSALEH G, PICHOT A et al.: MiR-20a regulates ASK1 expression and TLR4-dependent cytokine release in rheumatoid fibroblast-like synoviocytes. *Ann Rheum Dis* 2013; 72: 1071-9.
11. ZHU D, PAN C, LI L et al.: MicroRNA-17/20a/106a modulate macrophage inflammatory responses through targeting signal-regulatory protein  $\alpha$ . *J Allergy Clin Immunol* 2013; 132: 426-36.e8.
12. CHEN L, LI C, PENG Z et al.: miR-197 Expression in Peripheral Blood Mononuclear Cells from Hepatitis B Virus-Infected Patients. *Gut Liver* 2013; 7: 335-42.
13. WANG H, SU X, YANG M et al.: Reciprocal control of miR-197 and IL-6/STAT3 pathway reveals miR-197 as potential therapeutic target for hepatocellular carcinoma. *Oncotarget* 2015; 4: e1031440.
14. MAREK-YAGEL D, BERKUN Y, PADEH S et al.: Clinical disease among patients heterozygous for familial mediterranean fever. *Arthritis Rheum* 2009; 60: 1862-6.
15. BALDEÓN ROJAS L, WEIGELTK, DE WITTH et al.: Study on inflammation-related genes and microRNAs, with special emphasis on the vascular repair factor HGF and miR-574-3p, in monocytes and serum of patients with T2D. *Diabetol Metab Syndr* 2016; 8: 6.

**EK-5:** Orjinallik Ekran Çıktısı

# Ailevi Akdeniz Ateşı Hastalığında Görülen İnflamasyon Sürecinde Rol Alan miRNA'ların Tanımlanması

*by* Yeliz Z. Akkaya-ulum

---

**Submission date:** 10-Sep-2018 09:48AM (UTC+0300)

**Submission ID:** 999436805

**File name:** Turnitin.pdf (1.76M)

**Word count:** 15674

**Character count:** 98918

## Ailevi Akdeniz Ateşi Hastalığında Görülen İnflamasyon Sürecinde Rol Alan miRNA'ların Tanımlanması

### ORIGINALITY REPORT

<b>11</b> %	<b>10</b> %	<b>10</b> %	<b>8</b> %
SIMILARITY INDEX	INTERNET SOURCES	PUBLICATIONS	STUDENT PAPERS

### PRIMARY SOURCES

<b>1</b>	<b>www.bib.unesc.net</b> Internet Source	<b>2</b> %
<b>2</b>	<b>embomm.embopress.org</b> Internet Source	<b>1</b> %
<b>3</b>	<b>pure.roehampton.ac.uk</b> Internet Source	<b>1</b> %
<b>4</b>	<b>epublications.uef.fi</b> Internet Source	<b>1</b> %
<b>5</b>	<b>d-nb.info</b> Internet Source	<b>1</b> %
<b>6</b>	<b>Submitted to University College London</b> Student Paper	<b>1</b> %
<b>7</b>	<b>tip.ogu.edu.tr</b> Internet Source	<b>1</b> %
<b>8</b>	<b>espace.library.uq.edu.au</b> Internet Source	<b>&lt;1</b> %
<b>9</b>	<b>mirdsnp.ccr.buffalo.edu</b>	

## EK-6: Dijital Makbuz



### Digital Receipt

This receipt acknowledges that Turnitin received your paper. Below you will find the receipt information regarding your submission.

The first page of your submissions is displayed below.

Submission author: Yeliz Z. Akkaya-ulum  
Assignment title: Tez  
Submission title: Ailevi Akdeniz Ateşi Hastalığında G...  
File name: Turnitin.pdf  
File size: 1.76M  
Page count: 85  
Word count: 15,674  
Character count: 98,918  
Submission date: 10-Sep-2018 09:48AM (UTC+0300)  
Submission ID: 999436805



## 9. ÖZGEÇMİŞ

Adres: Hacettepe Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, Sıhhiye,  
Ankara

Telefon: 0312 305 25 41

E-mail: yelizakkaya@hacettepe.edu.tr

### 1. KİŞİSEL BİLGİLER

Doğum Tarihi : 21.07.1987  
Uyruğu : T.C.  
Medeni Hali : Evli  
Yabancı Dil : İngilizce, Almanca

### 2. İŞ

2012– Araştırma Görevlisi  
Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı  
Hacettepe Üniversitesi, Ankara

### 3. EĞİTİM

2012– Doktora (Ph.D.)  
*Tez Başlığı: Ailevi Akdeniz Ateşi Hastalığında Görülen İnflamasyon Sürecinde Rol Alan miRNA'ların Tanımlanması*  
Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı  
Hacettepe Üniversitesi, Ankara

2010–2012 Yüksek Lisans (M.Sc.)  
*Tez Başlığı: Hücre Göçü Sürecinde Pyrin-PSTPIP1 İlişkisinin İncelenmesi*  
Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı  
Hacettepe Üniversitesi, Ankara

2009–2011 İkinci Üniversite  
Açıköğretim Fakültesi, Sağlık Kurumları İşletmeciliği  
Anadolu Üniversitesi, Eskişehir

2004–2009 Lisans (B.Sc.)  
Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü  
Hacettepe Üniversitesi, Ankara

2001–2004 Aldemir-Atilla Konuk Anadolu Lisesi, Antalya

#### 4. YURTDIŞI EĞİTİM VE GÖREVLENDİRMELER

25-29.09/2017 Doktora Kursu (1496) “*Flow cytometry: from theory to application*” Karolinska Enstitüsü  
Stockholm, İsveç

09.02–09.08/2015 Doktora (Ph.D.)- Proje Çalışması  
Karolinska Enstitüsü, Tıp Bölümü, Solna  
Dermatoloji ve Veneroloji Birimi, CMM L8:02  
Stockholm, İsveç

30.06–30.07/2008 Staj  
Moleküler Genetik Bölümü  
Mikrobiyoloji ve Genetik Enstitüsü  
Georg-August Göttingen Üniversitesi, Göttingen, Almanya

09/2007–02/2008 Lisans (1 Dönem)-ERASMUS Programı kapsamında  
Biyoloji Fakültesi  
Georg-August Göttingen Üniversitesi, Göttingen, Almanya

## 5. STAJ, KURS, SEMİNER VE SERTİFİKALAR

02-06/2017	Bilimsel Araştırma ve Yayın Teknikleri, Hacettepe Üniversitesi, Tıp Fakültesi Dekanlığı, 2016-2017 Bahar Dönemi Kursu
04-07.05/2017	Autoinflammation 2017, 9.Uluslararası FMF ve SAID Kongresi, Acapulco Otel Kongre Merkezi, KKTC
23-24.02/2016	I. Yaşam Bilimleri Sempozyumu, Abdullah Gül Üniversitesi, Kayseri, Türkiye
27-30.10/2015	XIV. Ulusal Tıbbi Biyoloji ve Genetik Kongresi, Fethiye, Ölüdeniz
30.09-03.10/2015	Autoinflammation 2015, 8.Uluslararası FMF ve SAID Kongresi, Hilton Otel, Dresden, Almanya
17.04/2015	Karolinska Dermatoloji Sempozyumu, Deri-Eski hastalıklar için yeni tedaviler, Bonniers Konferans Merkezi, Stockholm, İsveç
12.12/2014	Temel İş Sağlığı ve Güvenliği Eğitimi, Hacettepe Üniversitesi, Personal Dairesi Başkanlığı ve İş Sağlığı ve Güvenliği Meslek Hastalıkları Uygulama ve Araştırma Merkezi (HİSAM), Ankara
08.11/2013	Kök Hücre Günü, Kök Hücre Araştırma ve Uygulama Merkezi, PEDİ-STEM, Hacettepe Üniversitesi, Ankara
27-30.10/2013	XIII. Ulusal Tıbbi Biyoloji ve Genetik Kongresi, Kuşadası, Aydın
22-26.05/2013	Autoinflammation 2013, 7.Uluslararası FMF ve SAID Kongresi, University Hospital of Lausanne(CHUV), Lozan, İsviçre
01/2012	ATCC™ Hücre Kültürü Semineri
2-6.09/2010	Autoinflammation 2010, 6.Uluslararası FMF ve SAID Kongresi, Royal Tropical Institute (KIT), Amsterdam, Hollanda
25-26.06/2010	I. Kök Hücre Kursu ve V. Kök Hücre Sempozyumu, Türkiye Bilimler Akademisi, Ankara



05/2010	Deney Hayvanları Kullanım Sertifikası Kursu, KOBAY D.H.L. A.Ş.
22.06–31.07/2009	Yaz Stajı Hacettepe Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı

## 6. BURSLAR VE ÖDÜLLER

25-29.09/2017	Erasmus+ Personel-Eğitim Alma Hareketliliği, Avrupa Birliği Ofisi, Hacettepe Üniversitesi ve Türkiye Ulusal Ajansı.
2015	<b>En İyi Poster Ödülü:</b> B Balci Peynircioglu, <b>YZ Akkaya Ulum</b> , EZ Taskiran, M Arici and E Yilmaz. The effect of anti-inflammatory drugs on ASC gene level and cellular viability. Pediatric Rheumatology 2015, 13(Suppl 1):P117). 8th International Congress of Familial Mediterranean Fever and Systemic Autoinflammatory Diseases (ISSAID), Dresden, Almanya. 30 Eylül-3 Ekim 2015.
2012-2017	TÜBİTAK, BİDEB 2211-Doğrudan Yurt İçi Doktora Bursu
2010-2012	TÜBİTAK, BİDEB 2210-Yurt İçi Yüksek Lisans Bursu
09/2007-03/2008	Avrupa Birliği Ofisi, Hacettepe Üniversitesi, ERASMUS Öğrenci Bursu

## 7. ÜYELİKLER VE YÜRÜTTÜĞÜ FAALİYETLER

Hacettepe Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Temel Tıp Bilimleri Bölümü Araştırma Görevlileri Temsilciliği (2017- )

Türkiye Klinikleri Dergileri Danışma Kurulu Üyeliği (2015- )

Tıbbi Biyoloji ve Genetik Derneği Üyeliği (2011- )

Hacettepe Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Topluluğu Üyeliği (2005–2009)

Hacettepe Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü Öğrenci Temsilciliği (2005–2007)

## 8. GÖREV ALDIĞI PROJELER

H.Ü. BAB Hızlı Destek Projesi- THD-2017-16316 (07.12.2017-07.12.2018) “Ailevi Akdeniz Ateşi (AAA) Hastalığında Belirlenen Aday miRNA'ların Dolaşımdaki Varlığının Eksozomlar Üzerinden Araştırılması” **Yardımcı araştırmacı**

H.Ü. BAB Tez Projesi Doktora- TDK-2017-16253, (26.10.2017-26.04.2018) “Ailevi Akdeniz Ateşi Hastalığında Görülen İnflamasyon Sürecinde Rol Alan miRNAların Tanımlanması” **Yardımcı araştırmacı**

H.Ü. BAB Kapsamlı Araştırma Projesi-14413- TSA-2017-14413, (02.08.2017-02.08.2019) “Nöromusküler Hastalıklarda Hedefe Yönelik Tedavide Mitokondriyal Mikro RNA Biyobelirteçlerinin Tanımlanması” **Yardımcı araştırmacı**

TÜBİTAK 1001- ERANET- SBAG 315S096, (2016-2019) "Otoinflamatuvar Hastalıklarda (Tanımlanmış ve Tanımlanmamış) Kişiselleştirilmiş Moleküler Tıp İçin Klinik ve Deneysel Çalışma: Modifiye edici ('Modifier') Faktörlerin Rolü" **Bursiyer**

TÜBİTAK 1001- SBAG 214S106, (2015-2017) "Ailevi Akdeniz ateşi patogeneğinde MEFV gen ifadesinin düzenlenmesinde rol oynayan miRNA'ların belirlenmesi"  
**Bursiyer**

H.Ü. BAB 6091- 014 G 602 002, (09.02.2015-09.08.2015) "Melanomun Motilite ve Anjiyojenik Potansiyeli: miR-203 Rolü ve Etki Mekanizmasının Aydınlatılması"  
**Yardımcı araştırmacı**

H.Ü. BAB 6083- 013D05101005, (2013-2014) "Epigenetik Faktörlerin Ailevi Akdeniz Ateşi Hastalığının Moleküler Patofizyolojisi Üzerine Etkisi" **Yardımcı araştırmacı**

TÜBİTAK 1001- SBAG 111S507, (2012-2014) "Pyrin proteininin inflamatuvar hücre göçü üzerindeki işlevinin araştırılması" **Bursiyer**

H.Ü. BAB, (2011-2012) "Monosit-makrofaj farklılaşma sürecinde kolşisinin gen ifadesi üzerine etkisi" **Yardımcı araştırmacı**

H.Ü. BAB, (2011-2013) "Amiloid hayvan modelinde, ASC (*Apoptosis-associated Speck-like protein containing a Caspase recruitment domain*) proteininin, AA Tipi amiloid patogeneğindeki işlevinin aydınlatılması" **Yardımcı araştırmacı**

Hacettepe Üniversitesi (H.Ü.) BAB, 010D03101004, (2010-2011) "Pyrin proteini ve mutantlarının ASC (*Apoptosis-associated Speck-like protein containing a Caspase recruitment domain*) speck oluşumuna etkisi ve bu süreçte kolşisinin rolü" **Yardımcı araştırmacı**

## 9. YAYINLAR

### A. Uluslararası Hakemli Dergiler

**A.1. Y.Z. Akkaya-Ulum**, B. Balci-Peynircioglu, O. Karadag, F. Kara-Eroglu, U. Kalyoncu, S. Kiraz, A.I. Ertenli, S. Ozen, E. Yilmaz. Alteration of the microRNA expression profile in familial Mediterranean fever patients. *Clin Exp Rheumatol*. 27 Nov 2017, 35 Suppl 108(6):90-94.

**A.2.** Warangkana Lohcharoenkal, Kunal Das Mahapatra, Lorenzo Pasquali, Caitrin Crudden, Lara Kular, **Yeliz Z. Akkaya Ulum**, Lingyun Zhang, Ning Xu Landén, Leonard Girnita, Maja Jagodic, Mona Stähle, Enikö Sonkoly, Andor Pivarcsi. Genome-wide screen for microRNAs reveals a role for miR-203 in melanoma metastasis. *The Journal of Investigative Dermatology*. 02 Nov 2017, 138(4):882-892. doi: 10.1016/j.jid.2017.09.049.

**A.3.** Eda Ezgi Aslantaş, Yasemin Aksoy, **Yeliz Zulfiye Akkaya Ulum**, Deniz Ceyhan, Banu Peynircioglu and Hatice Doğan Buzoğlu. Effects of calcium hydroxide and N-acetylcysteine on MMP-2, MMP-9, TIMP-1 and TIMP-2 in LPS-stimulated macrophage cell lines, *Turk J Biochem* 2017; aop, Received February 10, 2017; accepted March 23, 2017. DOI 10.1515/tjb-2017-0046.

**A.4.** Pinar Karapinar S, **Akkaya Ulum YZ**, Ozcelik B, Dogan Buzoglu H, Ceyhan D, Balci Peynircioglu B, Aksoy Y. The effect of N-acetylcysteine and calcium hydroxide on TNF- $\alpha$  and TGF- $\beta$ 1 in lipopolysaccharide-activated macrophages. *Archives of Oral Biology*, 2016; 68: 48–54. doi: 10.1016/j.archoralbio.2016.03.017.

**A.5. Akkaya-Ulum, Y. Z.**, Balci-Peynircioglu, B., Purali, N. and Yilmaz, E. Pypin–PSTPIP1 colocalises at the leading edge during cell migration. *Cell Biology International*, 2015; 39: 1384–1394. doi: 10.1002/cbin.10514.

**A.6.** Taskiran EZ, Cetinkaya A, Balci-Peynircioglu B, **Akkaya YZ**, Yilmaz E. The effects of colchicine on Pypin and Pypin interacting proteins 2012; *J Cell Biochem* Nov; 113 (11): 3536-46.

## **B. Ulusal Hakemli Dergiler**

**B.1.** Yavuz Ayhan, **Yeliz Akkaya**, Ayşe Ece Çalı. Bipolar Afektif Bozuklukta Güncel Genetik Bulgular, *Turkiye Klinikleri J Psychiatry- Special Topics* 2013; 6(2) 1-13.

**B.2.** **Zülfiye Yeliz Akkaya**, Pervin Dinçer. Tedavi yaklaşımlarında yeni bir dönem: Kodlamayan RNA'lar ve hastalıklar, *Marmara Medical Journal*, 2013; 26:5-10.

**B.3.** **Zülfiye Yeliz Akkaya**, Banu Peynircioğlu. Amiloid Peptid Kanalları, *Hacettepe Tıp Dergisi*, 2011; 42: 190-195.

## **10. POSTERLER VE SÖZLÜ BİLDİRİLER**

### **A. Uluslararası Kongreler**

#### **A.1. Sözlü Bildiriler**

**A.1.1. Yeliz Z. Akkaya-Ulum\***, Ezgi Deniz Batu, Ömer Karadağ, Umut Kalyoncu, Ali İhsan Ertenli, Sedat Kiraz, Seza Özen, Engin Yılmaz, Banu Balci-Peynircioğlu. Possible role of microRNA-20a and microRNA-197 in Familial Mediterranean Fever pathogenesis. 9th International Congress of Familial Mediterranean Fever and Systemic Autoinflammatory Diseases (ISSAID), Acapulco Otel Kongre Merkezi, KKTC. 04-07 Mayıs 2017. \*Sunan Yazar

**A.1.2. YZ Akkaya Ulum\***, E Avcı, ED Batu, O Karadag, S Ozen, N Purali, E Yılmaz and B Balci Peynircioğlu. Investigation of the inflammatory cell migration process in familial Mediterranean fever. *Pediatric Rheumatology* 2015, 13(Suppl 1):O13). 8th International Congress of Familial Mediterranean Fever and Systemic Autoinflammatory Diseases (ISSAID), Dresden, Almanya. 30 Eylül-3 Ekim 2015. \*Sunan Yazar

**A.1.3. B Peynircioğlu\***, **ZY Akkaya**, C Guler, A Cetinkaya, ZE Taskiran, E Yılmaz. OR2-001 – The possible role of pyrin on cell migration, *Pediatric Rheumatology* 2013, 11(Suppl 1):A1. 7th Congress of International Society of Systemic Auto-Inflammatory Diseases (ISSAID) Lozan, İsviçre. 22-26 May 2013. \*Sunan Yazar

**A.1.4.** Taskiran Z.E.\*, Cetinkaya A., **Akkaya Z.Y.**, Balci-Peynircioglu B., Yilmaz E. The Effect of Colchicine on Pypin-PSTPIP1 Interaction (Abstract). Autoinflammation 2010, 6th International Congress of Familial Mediterranean Fever and Systemic Autoinflammatory Diseases (ISSAID), Royal Tropical Institute (KIT), Amsterdam, Hollanda. 2-6 Eylül 2010. \*Sunan Yazar

## **A.2. Posterler**

**A.2.1.** Zeynep Tavukcuoglu, **Yeliz Z. Akkaya-Ulum**, Nilgun Yersal, Tayfun Hilmi Akbaba, Utku Horzum, Gunes Esendagli, Petek Korkusuz, Banu Balci-Peynircioglu, Characterization of Circulating Exosomes and Analysis of Exosomal microRNAs, 6th International Congress of the Molecular Biology Association of Turkey, İzmir, Turkey. 5-8 Eylül 2018

**A.2.2.** Aksu E., **Akkaya-Ulum Y.Z.**, Balci-Peynircioglu B., Dayangac-Erden D., Yuzbasioglu A., Bakir-Gungor B., Talim B., Balci Hayta B. 2018. Common miRNA signatures in a group of rare neuromuscular disorders. FEBS Open Bio, 8: P.24-023. doi:10.1002/2211-5463.12453

**A.2.3.** Banu Balci-Peynircioglu, Edibe Avci, **Yeliz Z. Akkaya-Ulum**, Ezgi Deniz Batu, Seza Ozen, Engin Yilmaz. Differential rate of neutrophil migration in Familial Mediterranean Fever Patients. 9th International Congress of Familial Mediterranean Fever and Systemic Autoinflammatory Diseases (ISSAID), Acapulco Otel Kongre Merkezi, KKTC. 04-07 Mayıs 2017

**A.2.4.** **Yeliz Z. Akkaya-Ulum**, Ezgi Deniz Batu, Omer Karadag, Fehime Kara Eroglu, Ali İhsan Ertenli, Sedat Kiraz, Seza Ozen, Engin Yilmaz, and Banu Balci-Peynircioglu. Differential expression of microRNAs in Familial Mediterranean fever patients. European Journal of Human Genetics, Volume 24 E-Supplement 1, May 2016, P17.23. The European Human Genetics Conference 2016, Barselona, İspanya. 21-24 Mayıs 2016

**A.2.5.** **YZ Akkaya Ulum**, B Balci Peynircioglu, ED Batu, C Guler, O Karadag, AI Ertenli, S Kiraz, S Ozen and E Yilmaz. MEFV gene methylation pattern analysis in familial Mediterranean fever patients with altered expression levels. Pediatric Rheumatology 2015, 13(Suppl 1):P113). 8th International Congress of Familial

Mediterranean Fever and Systemic Autoinflammatory Diseases (ISSAID), Dresden, Almanya. 30 Eylül-3 Ekim 2015

**A.2.6.** B Balci Peynircioglu, **YZ Akkaya Ulum**, EZ Taskiran, M Arici and E Yilmaz. The effect of anti-inflammatory drugs on ASC gene level and cellular viability. *Pediatric Rheumatology* 2015, 13(Suppl 1):P117). 8th International Congress of Familial Mediterranean Fever and Systemic Autoinflammatory Diseases (ISSAID), Dresden, Almanya. 30 Eylül-3 Ekim 2015. **En İyi Poster Ödülü**

**A.2.7.** E Avcı, **YZ Akkaya Ulum**, E Yilmaz and B Balci-Peynircioglu. The analysis of inflammatory cell migration using primary neutrophils. *Pediatric Rheumatology* 2015, 13(Suppl 1):P136). 8th International Congress of Familial Mediterranean Fever and Systemic Autoinflammatory Diseases (ISSAID), Dresden, Almanya. 30 Eylül-3 Ekim 2015

**A.2.8.** **ZY Akkaya**, B Balci-Peynircioglu, A Cetinkaya, N Purali, E Yilmaz. PW01-001 – Pyrin-PSTPIP1 relation during cell migration. *Pediatric Rheumatology* 2013, 11(Suppl 1):A54. 7th Congress of International Society of Systemic Auto-Inflammatory Diseases (ISSAID) Lozan, İsviçre. 22-26 May 2013

**A.2.9.** A. Cetinkaya, E. Taskiran, **Y. Akkaya**, B. Peynircioglu, M. Alikasifoglu, E. Yilmaz. The Role of Pyrin On Cell Migration and The Effect of Colchicine In The Process. The 12<sup>th</sup> International Congress of Human Genetics and the American Society of Human Genetics 61<sup>st</sup> Annual Meeting Montreal, Kanada. 11-15 Ekim 2011

**A.2.10.** E. Yilmaz, E. Taskiran, A. Cetinkaya, **Y. Akkaya**, B. Peynircioglu. The Effect of Colchicine on LPS induced MEFV Gene Expression. The 12<sup>th</sup> International Congress of Human Genetics and the American Society of Human Genetics 61<sup>st</sup> Annual Meeting Montreal, Kanada. 11-15 Ekim 2011

**A.2.11.** Cetinkaya A., Taskiran Z.E., **Akkaya Z.Y.**, Balci-Peynircioglu B., Yilmaz E. The Effects of Pyrin Protein and Its Mutants on ASC Speck Formation and Role of Colchicine In The Process (Abstract). *Autoinflammation* 2010, 6th International Congress of Familial Mediterranean Fever and Systemic Autoinflammatory Diseases (ISSAID), Royal Tropical Institute (KIT), Amsterdam, Hollanda. 2-6 Eylül 2010

## **B. Ulusal Kongreler**

### **B.1. Sözlü Bildiriler**

**B.1.1. Yeliz Z. Akkaya Ulum\***, Banu Balcı Peynircioğlu, Ezgi Deniz Batu, Cansın Güler, Ömer Karadağ, Umut Kalyoncu, Ali İhsan Ertenli, Sedat Kiraz, Seza Özen ve Engin Yılmaz. Epigenetik faktörlerin ailevi Akdeniz ateği hastalığının moleküler patofizyolojisi üzerine etkisi. XIV. Ulusal Tıbbi Biyoloji ve Genetik Kongresi, Fethiye, Ölüdeniz. 27 - 30 Ekim 2015. \*Sunan Yazar

**B.1.2. Edibe Avcı\***, **Yeliz Zülfiye Akkaya Ulum**, Ezgi Deniz Batu, Ömer Karadağ, Seza Özen, Nuhan Puralı, Engin Yılmaz, Banu Balcı-Peynircioğlu. Ailevi Akdeniz Ateđi hastalarında nötrofil göçünün incelenmesi. XIV. Ulusal Tıbbi Biyoloji ve Genetik Kongresi, Fethiye, Ölüdeniz. 27 - 30 Ekim 2015. \*Sunan Yazar

### **B.2. Posterler**

**B.2.1. Yeliz Z. Akkaya Ulum**, Ekim Z. Taşkıran, Mustafa Arıcı, Engin Yılmaz ve Banu Balci Peynircioğlu. Anti-inflamatuvar İlaçların ASC Gen İfadesine ve Hücreyel Canlılığa olan Etkisi. I. Yaşam Bilimleri Sempozyumu, Abdullah Gül Üniversitesi, Kayseri, Türkiye. 23-24 Şubat 2016

**B.2.2. Edibe Avcı**, **Yeliz Z. Akkaya Ulum**, Engin Yılmaz ve Banu Balci Peynircioğlu. Primer Nötrofil Aracılı İnflamatuvar Hücre Göçünün İncelenmesi. I. Yaşam Bilimleri Sempozyumu, Abdullah Gül Üniversitesi, Kayseri, Türkiye. 23-24 Şubat 2016

**B.2.3. Yeliz Z. Akkaya-Ulum**, Banu Balcı Peynircioğlu, Nuhan Puralı, Engin Yılmaz. İnflamatuvar hücre göçünde Pysin-PSTPIP1 ilişkisinin incelenmesi. XIII. Ulusal Tıbbi Biyoloji ve Genetik Kongresi, Kuşadası, Aydın. 27-30 Ekim 2013

**B.2.4. Cansın Güler**, **Yeliz Z. Akkaya-Ulum**, Nuhan Puralı, Engin Yılmaz, Banu Balcı-Peynircioğlu. İnflamatuvar hücre göçü sürecinde Aktin ile ilişkili genlerin ifadelerinin incelenmesi. XIII. Ulusal Tıbbi Biyoloji ve Genetik Kongresi, Kuşadası, Aydın. 27-30 Ekim 2013