

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

**KOLŞİSİN DİRENCİ OLAN AİLEVİ AKDENİZ ATEŞİ
HASTALARINDA İFADESİ DEĞİŞEN MİRNA'LARIN
İNFLAMASYON VE İLAÇ DİRENCİ İLE İLİŞKİSİNİN
BELİRLENMESİ**

Bilgesu ŞAFAK TÜMERDEM

**Tıbbi Biyoloji Programı
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

ANKARA

2022

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

**KOLŞİSİN DİRENCİ OLAN AİLEVİ AKDENİZ ATEŞİ
HASTALARINDA İFADESİ DEĞİŞEN MİRNA'LARIN
İNFLAMASYON VE İLAÇ DİRENCİ İLE İLİŞKİSİNİN
BELİRLENMESİ**

Bilgesu ŞAFAK TÜMERDEM

**Tıbbi Biyoloji Programı
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. Banu PEYNİRCİOĞLU**

ANKARA

2022

HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Kolşisin Direnci Olan Ailevi Akdeniz Ateşi Hastalarında İfadesi Değişen miRNA'ların
İnflamasyon ve İlaç Direnci ile İlişkisinin İncelenmesi

Öğrenci: Bilgesu Şafak Tümerdem

Danışman: Prof. Dr. Banu Peynircioğlu

Bu tez çalışması 08/02/2022 tarihinde jürimiz tarafından "Tıbbi Biyoloji Programı"
nda yüksek lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

- Jüri Başkanı:** *Prof. Dr. Serap Dökmeci*
Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji A.D.
- Tez Danışmanı:** *Prof. Dr. Banu Peynircioğlu*
Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji A.D.
- Üye:** *Prof. Dr. Seza Özen*
Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Pediatrik Romatoloji
Bilim Dalı
- Üye:** *Doç.Dr. Burcu Balcı*
Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji A.D.
- Üye:** *Doç. Dr. Pelin Mutlu*
Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü

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

01 Mart 2022

Prof. Dr. Müge YEMİŞÇİ ÖZKAN
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. ⁽¹⁾
- Enstitü / Fakülte yönetim kurulunun gerekçeli kararı ile tezimin erişime açılması mezuniyet tarihimden itibaren 6 ay ertelenmiştir. ⁽²⁾
- Tezimle ilgili gizlilik kararı verilmiştir. ⁽³⁾

01/03/2022

Bilgesu Şafak TÜMERDEM

1

¹“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 **danışmanının 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 **danışmanının 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 **danışmanının 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, Prof. Dr. Banu PEYNİRCİOĞLU Danışmanlığında tarafımdan üretildiğini ve Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Yönergesine göre yazıldığımı beyan ederim.

Bilgesu Şafak TÜMERDEM

TEŞEKKÜR

Her zaman sabırlı ve anlayışlı yaklaşımıyla beni destekleyen ve yol gösteren, akademik yaşamımın başında tanıştığım için kendimi çok şanslı hissettiğim sayın danışmanım Prof. Dr. Banu PEYNİRCİOĞLU'na,

Tezimi okuyan ve değerli katkılarını sunan jüri üyesi hocalarım Prof. Dr. Serap DÖKMECİ, Prof. Dr. Seza ÖZEN, Doç. Dr. Burcu BALCI, Doç. Dr. Pelin MUTLU'ya,

Her zaman desteğini hissettiğim, birlikte çalışmaktan çok keyif aldığım ve kendisinden çok şey öğrendiğim grup arkadaşım sevgili Arş. Gör. Tayfun Hilmi AKBABA'ya,

Çalışma ortamını keyifli hale getiren Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalındaki tüm çalışma arkadaşlarıma,

Bana inanan ve destekleyen, her zaman yanımda olduklarını hissettiğim canım annem ve babam Hülya ve Suat ÖZDEMİR'e,

Varlıklarıyla dünyamı güzelleştiren ve her şeyi daha kolay hale getiren hayat arkadaşım İlker Umut TÜMERDEM ve sevgili kızlarım Tina, Tilda ve Vera'ya,

En içten duygularıyla teşekkür ederim.

ÖZET

Tümerdem, B. Ş., Kolşisin Direnci Olan Ailevi Akdeniz Ateşi Hastalarında İfadesi Değişen miRNA'ların İnflamasyon ve İlaç Direnci ile İlişkisinin Belirlenmesi, Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyoloji Yüksek Lisans Tezi, Ankara, 2022. Ailevi Akdeniz ateşi klinik heterojenitenin görüldüğü monogenik bir sistemik otoinflamatuvar hastalıktır. Ailevi Akdeniz ateşinde en yaygın tedavi yöntemi günlük kolşisin kullanımımıdır. Fakat hastaların %2-5'lik kısmında kolşisin direnci görülmektedir. İlaç direncinin gelişiminde epigenetik mekanizmaların özellikle kodlamayan RNA'lardan mikroRNA'ların rol oynadığına dair çalışmalar mevcuttur. Bu sebeple kolşisin dirençli hastalarda ifadesi değişen mikroRNA'ların ilaç direnci ve inflamasyon ile muhtemel ilişkisinin değerlendirilmesi gerektiği düşünülmüştür. Grubumuz tarafından daha önce gerçekleştirilen *miRNA 4.0 array* ile mikroRNA ifade analizi yeniden değerlendirilmiş; kolşisin dirençli ve duyarlı hasta grupları arasında ifadesi en az 2 kat değişen 25 mikroRNA bulunmuştur. Bu mikroRNA'lardan ilaç direnci ile yüksek oranda ilişkili bulunanlar hasta grubunda kantitatif gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu ile valide edilmiş, miR-183-5p ve miR-15b-5p'nin ifadesinin kolşisin dirençli hastalarda anlamlı şekilde azaldığı, miR-125a-5p'nin ifadesinin anlamlı olmayan bir azalış gösterdiği bulunmuştur. Biyoinformatik araçlar kullanılarak hem inflamasyon hem de ilaç direnci ile ilişkili genlerin listesi oluşturmuş, kolşisin dirençli hastalarda anlamlı azalış gösteren mikroRNA'ların ilaç direnci ve inflamasyonla ilişkili olası hedef genleri belirlenmiştir. Genlerin ifade analizi için yapılan kantitatif gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu deneylerinde, kolşisin dirençli hastalarda azaldığı görülen mikroRNA'ların olası hedef genleri olarak seçilen *NR3C1* ve *NFKB1*'in ifadesinin, aynı hasta grubunda arttığı gösterilmiştir. Grubumuzun önceki projeleri sırasında oluşturulmuş kolşisin dirençli hücre hattında da aynı mikroRNA'ların ve hedef genlerinin hasta grubuyla benzer değişim gösterdiği saptanmıştır. Bu çalışma sonucunda belirlenen ifadesi değişen mikroRNA'ların, ileride kolşisin direncinin erken tanısı için biyobelirteç olma potansiyeli taşıdığı düşünülmektedir.

Anahtar kelimeler: AAA, kolşisin direnci, mikroRNA

ABSTRACT

Tümerdem, B. Ş., Investigation of the Differentially Expressed miRNA's in terms of Their Role in Inflammation and Drug Resistance in Colchicine Resistant Familial Mediterranean Fever Patients, Hacettepe University Graduate School of Health Sciences Medical Biology Programme Master of Science Thesis, Ankara, 2022. Familial Mediterranean fever (FMF) is a monogenic systemic autoinflammatory disease that clinical heterogeneity observed. The most common treatment method for familial Mediterranean fever is daily colchicine usage. However, in 2-5% of patients, colchicine resistance is observed. It is thought that epigenetic factors may play a role in the development of it. There are studies showing that epigenetic mechanisms, especially microRNAs from non-coding RNAs, play a role in the development of drug resistance. For this reason, it was thought that the possible relationship of microRNAs whose expression is changed in colchicine resistant patients with drug resistance and inflammation should be evaluated. The miRNA 4.0 array and miRNA expression analysis previously performed by our group was reevaluated within the scope of the thesis; 25 miRNAs with at least 2-fold expression change were found between the colchicine resistant patient group and the colchicine sensitive patient group. From these miRNA's the ones that are highly associated with drug resistance were validated by qRT-PCR in the patient group, miR-15b-5p and miR-183-5p found significantly decreased in colchicine resistant patients while the expression of miR-125a-5p was found to decrease insignificantly. Using bioinformatics tools, a list of genes associated with both inflammation and drug resistance was created, and possible target genes of microRNAs associated with drug resistance and inflammation were determined. It was shown that the expression of selected possible target genes NR3C1 and NFKB1 was increased in the same patient group in correlation with miRNAs. In the colchicine resistant cell line created during previous projects of our group, it was shown that expression of selected miRNAs and target genes showed a similar change with the patient group. The miRNAs whose expression is changed in colchicine resistant patients determined by this study have the potential to be a biomarker for the early diagnosis of colchicine resistance in the future.

Keywords: FMF, drug resistance, colchicine, microRNA

İÇİNDEKİLER

ONAY SAFASI	iii
YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI	iv
ETİK BEYAN	v
TEŞEKKÜR	vi
ÖZET	vii
ABSTRACT	viii
İÇİNDEKİLER	ix
SİMGELER VE KISALTMALAR	xii
ŞEKİLLER	xiv
TABLolar	xvi
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Ailevi Akdeniz Ateşi	3
2.2. Epigenetik ve Ailevi Akdeniz Ateşi	5
2.3. miRNA'lar	7
2.3.1 Ailevi Akdeniz Ateşi ve miRNA'lar	9
2.3.2. İlaç Direnci ve miRNA'lar	12
2.4. miRNA Hedef Genlerinin Belirlenmesi Amacı ile Kullanılan Biyoinformatik Araçlar	15
2.5. Hedef Genleri Araştırma Amacı ile Kullanılan Metin Madenciliği Uygulamaları	16
3. GEREÇ VE YÖNTEMLER	17
3.1. Gereçler	17
3.1.1. RNA izolasyonu, Total Kandan miRNA İzolasyonu ve cDNA Sentezi	17
3.1.2. miRNA'lar ve mRNA'lar için Kantitatif Gerçek-Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (qRT-PCR)	17
3.2. Yöntemler	17
3.2.1. Çalışma Grubunun Oluşturulması	17
3.2.2. miRNA Hedef Genlerinin Belirlenmesi	20
3.2.3. Belirlenen Hedef Genlerin ve miRNA'ların İlaç Direnci ve İnflamasyonla İlişkilerine Göre Sınıflandırılmaları	21

3.2.4. Hedef Genler için Metin Madenciliği Uygulamaları Kullanarak Literatür Araması Yapılması	21
3.2.5. Total Kandan miRNA İzolasyonu	22
3.2.6. Total RNA İzolasyonu	24
3.2.7. miRNA'lar için cDNA Sentezi	24
3.2.8. miRNA'lar için qRT-PCR	26
3.2.9. mRNA'lar için cDNA Sentezi	26
3.2.10. mRNA'lar için qRT-PCR	27
3.2.11. Verilerin Değerlendirilmesi ve İstatistiksel Analiz	27
4. BULGULAR	28
4.1. İlaç Direnci ve İnflamasyonla İlişkili miRNA'lar ve Hedef Genlerin Belirlenmesi	28
4.1.1. İlaç Direnci ve İnflamasyonla İlişkili miRNA'lar	28
4.1.2. İlaç direnci ve İnflamasyonla İlişkili Hedef Genler	31
4.2. Aday miRNA'ların qRT-PCR ile Validasyonu	33
4.2.1. hsa-miR-183-5p'nin qRT-PCR ile Validasyonu	33
4.2.2. hsa-miR-125a-5p'nin qRT-PCR ile Validasyonu	34
4.2.3. hsa-miR-15b-5p'nin qRT-PCR ile Validasyonu	34
4.3. Hedef Genlerin İfadesinin qRT-PCR ile Karşılaştırılması	35
4.3.1. <i>NFKBI</i> 'in qRT-PCR ile Analizi	36
4.3.2. <i>NR3CI</i> 'in qRT-PCR ile Analizi	36
4.3.3. <i>PPARA</i> 'in qRT-PCR ile Analizi	37
4.4. Kolşisin Dirençli Hücrelerde miRNA ve Hedef Genlerinin qRT-PCR ile Analizi	38
4.4.1. miR-183-5p'nin qRT-PCR ile Analizi	39
4.4.2. miR-15b-5p'nin qRT-PCR ile Analizi	39
4.4.3. <i>MDRI</i> 'in qRT-PCR ile Analizi	40
4.4.4. <i>NFKBI</i> 'in qRT-PCR ile Analizi	41
4.4.5. <i>NR3CI</i> 'in qRT-PCR ile Analizi	42
4.4.6. <i>PPARA</i> 'nın qRT-PCR ile Analizi	43
5. TARTIŞMA	45
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	53

6.1. Sonuçlar	53
6.2. Öneriler	54
7. KAYNAKLAR	55
8. EKLER	
EK-1. Tez alışması ile İlgili Etik Kurul İzni.	
EK-2. Orijinallik Ekran Görüntüsü	
EK-3. Dijital Makbuz	
9. ÖZGEÇMİŞ	

SİMGELER VE KISALTMALAR

°C	: Santigrat Derece
µL	: Mikrolitre
2DMC	: 2-demetilkolşisin
3'UTR	: 3' translasyon olmayan bölge
3DMC	: 3-demetilkolşisin
5'UTR	: 5' translasyon olmayan bölge
AAA	: Ailevi Akdeniz Ateşi
ABCB1	: ATP Bağlayıcı Kaset Alt Ailesi B Üyesi 1
ADME	: <i>Absorption, Distribution, Metabolism, and Excretion</i>
AGO	: Argonat
ASC	: <i>Apoptosis-associated speck-like protein</i>
bZIP	: <i>Basic Leucine Zipper Domain</i>
cDNA	: <i>Komplementer DNA</i>
CRP	: C-reaktif protein
CYP3A4	: <i>Cytochrome P450 3A4</i>
DAVID	: <i>Database for Annotation, Visualization, and Integrated Discovery</i>
DGCR8	: <i>DiGeorge</i> kritik sendrom bölgesi 8
dk	: dakika
DMET™	: <i>Drug Metabolizing Enzymes and Transporters Plus Panel</i>
DNA	: Deoksiribo Nükleit Asit
dNTP	: <i>Deoxynucleotide</i>
g	: <i>Gravity</i>
GAPDH	: <i>Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase</i>
IL1R1	: <i>Interleukin 1 receptor, type I</i>
IL-1β	: İnterlökin 1- Beta
IL-6	: İnterlökin-6
KEGG	: <i>Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes</i>
LPS	: Lipopolisakkarit
MDR1	: Çoklu İlaç Direnç Geni 1
MEFV	: <i>Mediterranean Fever</i>
MeV	: <i>Multiple Experiment Viewer</i>

miRNA	: mikroRNA
ml	: Mililitre
MRP2	: Çoklu İlaç Direnci İlişkili Protein 2
mTOR	: Rapamisinin Memeli Hedefi
MTT	: 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5 Diphenyltetrazolium Bromide
NF-kB	: Nükleer Faktör NF-kappaB
NFKB1	: Nükleer Faktör NF-kappa-B p105 Alt Birimi
ng	: Nanogram
NR3C1	: Glukokortikoid reseptörü
PCR	: <i>Polymerase Chain Reaction</i>
PFAPA	: <i>Periyodik Ateş, Aftöz Stomatit, Farenjit ve Adenit</i>
P-gp	: P-glikoprotein
PI3Kγ	: Fosfoinosit 3-Kinaz Gamma
PIK3CG	: Fosfatidilinositol-4,5-bisfosfat 3-kinaz katalitik alt birim gama izoformu,
piRNA	: Piwi etkileşimli RNA
PKN1	: <i>Protein kinase N1</i>
PKN2	: <i>Protein kinase N2</i>
PPARα	: <i>Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Alpha</i>
PXR	: <i>Pregnane X receptor</i>
qRT-PCR	: <i>Quantitative Real Time- Polymerase Chain Reaction</i>
RHEB	: Beyinde Ras Homoloji Kazanılmış
RISC	: RNA-indüklenmiş susturucu kompleks
RNU48	: <i>Small Nucleolar RNA, C/D Box 48</i>
rpm	: <i>revolutions per minute</i>
SAA	: <i>Serum Amiloid A</i>
siRNA	: Susturucu RNA
SNP	: <i>Single-nucleotide polymorphism</i>
TAC	: <i>Transcriptome Analysis Console</i>
TRAF6	: Tümör Nekroz Faktörü Reseptörü-İlişkili Faktör 6
TUBB1	: <i>Tubulin beta-1</i>
VDR	: <i>Vitamin D receptor</i>

ŞEKİLLER

Şekil	Sayfa
4.1. Mikrodizin çalışmalarından aşamasından valide edilen miRNA'ların seçimine kadar iş akışını gösteren görsel.	29
4.2. miR-183-5p'in hedef genlerinin görev aldıkları KEGG yolakları. Yolaklar istatistiksel olarak anlamlılığa göre sıralanmıştır ve bar renkleri koyulaştıkça miRNA'nın o yolaktaki etkisi azalmaktadır.	29
4.3. miR-125a-5p'in hedef genlerinin görev aldıkları KEGG yolakları. Yolaklar istatistiksel olarak anlamlılığa göre sıralanmıştır ve bar renkleri koyulaştıkça miRNA'nın o yolaktaki etkisi azalmaktadır.	30
4.4. miR-15b-5p'in hedef genlerinin görev aldıkları KEGG yolakları. Yolaklar istatistiksel olarak anlamlılığa göre sıralanmıştır ve bar renkleri koyulaştıkça miRNA'nın o yolaktaki etkisi azalmaktadır.	30
4.5. miR-15b-5p, miR-125a-5p ve miR-183-5p'nin olası hedef genlerinin Cytoscape programı ile gösterimi. Kırmızı renkli karelerde gözükten hedef genler hem miR-125a-5p hem de miR-15b-5p'nin olası hedef genidir, lila renkli karelerde gözükten hedef gen.	31
4.6. İnflamasyon ve ilaç direnci ile ilişkili genlerin kesişim kümesini gösteren Venn diyagramı	32
4.7. miR-183-5p'nin kolşisin duyarlı ve kolşisin dirençli hasta grubundaki qRT-PCR sonuçları.	33
4.8. miR-125a-5p'nin kolşisin duyarlı ve kolşisin dirençli hasta grubundaki qRT-PCR sonuçları.	34
4.9. miR-15b-5p'nin kolşisin duyarlı ve kolşisin dirençli hasta grubundaki qRT-PCR sonuçları.	35
4.10. <i>NFKBI</i> 'nin kolşisin duyarlı ve kolşisin dirençli hasta grubundaki qRT-PCR sonuçları.	36
4.11. <i>NR3CI</i> 'nin kolşisin duyarlı ve kolşisin dirençli hasta grubundaki qRT-PCR sonuçları.	37
4.12. <i>PPARA</i> 'nın kolşisin duyarlı ve kolşisin dirençli hasta grubundaki qRT-PCR sonuçları.	38
4.13. miR-183-5p'nin normal ve kolşisin dirençli hücre hatlarındaki qRT-PCR sonuçları.	39
4.14. miR-15b-5p'nin normal ve kolşisin dirençli hücre hatlarındaki qRT-PCR sonuçları.	40
4.15. <i>MDRI</i> 'nin normal ve kolşisin dirençli hücre hatlarındaki qRT-PCR sonuçları.	41
4.16. <i>NFKBI</i> 'in normal ve kolşisin dirençli hücre hatlarındaki qRT-PCR sonuçları.	42

- 4.17.** *NR3C1*'in normal ve kolşisin dirençli hücre hatlarındaki qRT-PCR sonuçları 43
- 4.18.** *PPARA*'nın normal ve kolşisin dirençli hücre hatlarındaki qRT-PCR sonuçları. 44

TABLULAR

Tablo		Sayfa
3.1.	Çalışmaya katılan kolşisin dirençli AAA hastalarının klinik bilgileri.	18
3.2.	Çalışmaya katılan kolşisin duyarlı AAA hastalarının klinik bilgileri.	19
4.1.	Mikrodizin analizleri ve qPCR analizi sonucunda miR-183-5p, miR-15b-5p, miR-125a-5p'nin kat değişimlerinin karşılaştırılması.	35

1. GİRİŞ

Ailevi Akdeniz ateşi (AAA) ülkemizde taşıyıcılık oranı yüksek olan nadir bir sistemik otoinflamatuvar hastalıktır. AAA, 16. Kromozomun kısa kolunda bulunan *MEFV* genindeki mutasyonlar sebebiyle ortaya çıkan otozomal resesif kalıtmımlı bir tek gen hastalığıdır (1). AAA monogenik bir hastalık olmasına rağmen hastalar arasında tam bir genotip-fenotip ilişkisi kurulamamakta ve klinik heterojenite gözlemlenmektedir. AAA'da en yaygın tedavi yöntemi günlük kolşisin kullanımınıdır. Fakat hastaların %5'e kadar varabilen bir kısmında kolşisin direnci gözlenmektedir. Kolşisin direnci tolere edilebilir en yüksek doz kolşisin kullanılmasına rağmen altı aydan daha uzun bir süre ayda bir ya da daha fazla atak görülmesi ve remisyon dönemlerindeki C-reaktif protein (CRP) ve serum amiloid A (SAA) seviyelerinin artışıyla tanımlanabilir (2). Kolşisin dirençli hastalarda etkin tedavi alamadıkları için büyüme geriliği, amiloidozis, anemi, kısırlık gibi sorunlar görülebilir. Bu nedenle kolşisin dirençli hastaların erken aşamada tespiti oldukça önemlidir.

MEFV geninde sık görülen mutasyonlardan M694V için homozigot olan hastalarda kolşisin direncine daha sık rastlanmasına ve bazı tek nükleotid polimorfizmleri'nin (*Single-nucleotide polymorphism-SNP*) direnç üzerinde etkileri olabileceği düşünülmesine rağmen bugüne kadar kolşisin direnci genetik faktörlerle doğrudan ilişkilendirilememiştir. Bu durum epigenetik faktörlerin direnç üzerindeki muhtemel etkisini düşündürmüştür. miRNA'ların ilaç direnci gelişimindeki rolünü gösteren birçok çalışma mevcuttur. miRNA'lar ilaç direnci gelişimini ilaçların emilim, dağılım, metabolizma ve atılım süreçlerinde rol alan genlerin (*absorption, distribution, metabolism, and excretion – ADME*) ya da bu genlerin ifadesini düzenleyen transkripsiyon faktörlerinin ifadesini değiştirerek etkileyebilmektedir. miRNA'ların AAA patogenezindeki rolü ile ilgili grubumuz tarafından gerçekleştirilmiş çalışmalar mevcuttur. Bu çalışmaların çıktılarında biri olarak daha önce gerçekleştirilen miRNA 4.0 *array* sonuçları, kolşisin dirençli hasta grubu ve kolşisin duyarlı hasta grubu açısından yeniden değerlendirilmiş, değişken ifadeye sahip 25 miRNA bulunmuştur. Grubumuzun gerçekleştirdiği "Ailevi Akdeniz Ateşi (AAA) Hastalarında Saptanan miRNA'ların İlaç Direnci Üzerindeki Etkilerinin Araştırılması" isimli Tübitak 1001 projesinde, kolşisin direnci olan hasta grubunda ifadesi değişen miRNA'lardan, ilaç direnci açısından en iyi bilinen genler olan, *ABCBI* ve *CYP3A4*'ü hedeflediği

biyoinformatik olarak gösterilen miRNA'lar çalışmaya dahil edilmiştir. Bu kapsamda biyoinformatik olarak *CYP3A4*'ü hedeflediği tahmin edilen ve değişken ifadesi kantitatif gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (*quantitative real time-polymerase chain reaction- qRT-PCR*) ile doğrulanmış miR-505-5p'nin *CYP3A4*'ü hedeflediği deneysel olarak gösterilmiştir. Ancak, ilaç direnci olan AAA hastalarımızda değişken ifadesi gösterilen miR-505-5p dışındaki diğer miRNA'ların ilaç direnciyle ve inflamasyonla ilişkili diğer mekanizmalar üzerinden direnç gelişimine katkı sağlıyor olabileceği düşünülmektedir.

Bu bilgiler ışığında tez çalışmasının hipotezi; kolşisin direnci görülen AAA hastalarında anlamlı değişimi saptanan, inflamasyon ve ilaç direnciyle ilişkili olduğu gösterilmiş miRNA'ların ilgili yolaklardaki ortak hedef genlerinin ifadesini düzenleyerek kolşisin direncine sebep olduğudur. Tez çalışmasında, hastalarda değişimi gösterilmiş miRNA'ların öncelikli olarak biyoinformatik araçlarla hedef genlerini tanımlamak, bu miRNA'lardan inflamasyonla ve ilaç direnciyle ilişkili olabilecek potansiyel hedef genler içerenleri belirlemek, sonrasında elde edilen aday miRNA'lar ve hedef genlerinin hastalarımızda analiz edilmesi amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Ailevi Akdeniz Ateşi

Ailevi Akdeniz ateşi (AAA) pyrin proteinini kodlayan *MEFV* genindeki mutasyonlar sebebiyle ortaya çıkan tekrarlayan ateşlerle karakterize resesif kalıtmı sistemik otoinflamatuvar bir hastalıktır (1). AAA, esas olarak resesif kalıtım modeline sahip bir hastalık olmakla birlikte, dominant kalıtımın görüldüğü vakalara da rastlanmaktadır (3).

AAA hastalarında 12-72 saat süren, sıklıkla peritonit, plörezi, artrit ile birlikte kendini gösteren ve kendiliğinden meydana gelen tekrarlayan ateş atakları görülmektedir. Bu inflamatuvar reaksiyon sırasında etkilenen dokulara yoğun bir polimorfonükleer lökosit akışı söz konusudur (1). Hastalığın en önemli komplikasyonu tedavi edilmemiş hastalarda görülen ve erken ölümlere sebep olabilen böbrek amiloidozudur (3).

MEFV geni tarafından kodlanan pyrin, 782 amino asitten oluşmakta, proinflamatuvar bir sitokin olan IL-1 β 'nın üretimini NF-kB ve kaspaz-1 aracılığı ile düzenlemekte görev almakta ve özellikle nötrofil ve makrofajlarda ifade olmaktadır (1).

MEFV genini tanımlamak için bir pozisyonel klonlama yaklaşımı uygulanmıştır. 16. Kromozomun kısa kolunda (16p13.3) bulunan *MEFV*, 3.5 kb uzunluğunda bir transkripte sahiptir (4). *MEFV* geni 10 ekzondan oluşmaktadır ve otoinflamatuvar hastalıkların mutasyonları için oluşturulmuş bir veritabanı olan Infevers'da bugüne kadar çoğunluğu tek nükleotid değişikliği olmak üzere 389 sekans varyantı rapor edilmiştir; bunlardan 28 tanesi patojenik ya da muhtemel patojeniteye sahip varyantlardır (5). En sık rastlanan beş mutasyon 10. Ekzonda bulunan V726A, M694V, M694I, M680I ve 2. Ekzonda bulunan E148Q'dur (6).

AAA genellikle Seferad Yahudilerinde, Ermeni, Arap ve Türk kökenli bireylerde görülür. (4). AAA'nın Türkiye'deki tahmin edilen prevalansı 1/1070'tir (10). Sağlıklı Türk popülasyonunda en yaygın 5 mutasyonun frekans oranına bakılarak yapılan çalışmaya göre taşıyıcılık oranı 1:5'tir (7).

Pyrin proteini dört bölgeden oluşmaktadır. İlk bölge, birinci ekzon tarafından kodlanan pyrin bölgesidir, bu bölge amino ucunda bulunmaktadır. Bunun yanısıra

ikinci ekzon tarafından kodlanan bZIP transkripsiyon faktör *basic* bölgesi ve üçüncü ekzon tarafından kodlanan '*B-box zinc finger*' bölgesi bulunmaktadır. Proteinin karboksi ucunda ise B30.2/SRPY/rfp olarak isimlendirilen bölge bulunmaktadır (8). İnsanlarda AAA ile ilişkili olan yanlış anlamlı mutasyonların çoğunluğu bu B30.2 bölgesinde bulunmaktadır, bu bölge primat ve insan pyrininde görülürken sıçan pyrini bu bölgeden yoksundur (9). Patojenik *MEFV* mutasyonlarının büyük bir kısmının C-terminal bölgesinde yoğunlaşmış olması bu bölgenin fonksiyonel önemini göstermektedir (10).

Pyrin, ASC (*Apoptosis-associated speck-like protein*) ve kaspaz-1 ile bir araya gelerek kaspaz-1'in kesimini aktive edebilir. Pyrin aynı zamanda inflamazom yapısının oluşmasının negatif düzenleyicisi olarak da bilinmektedir, B30.2 bölgesinde görülen mutasyonlar ise kaspaz-1 ile etkileşimleri düşürmekte ve kaspaz-1 aktivasyonuna sebep olmaktadır (9). Pyrinin bilinen en önemli görevleri inflamazom yapısına katılmasıyla; hücre içi tehlike sinyallerini algılaması, inflamasyon araçlarını aktive etmesi olarak sıralanabilir. AAA mutasyonlarının görüldüğü durumda ise pyrin hücre içi tehlike sinyallerine daha hassas ve doğal bağışıklık sistemi cevaplarının ortadan kaldırılması konusunda daha yavaştır (11) .

Bakterilerin GTPaz RhoA üzerindeki aktiviteleri pyrinin inflamazom yapısını oluşturmasına sebep olmaktadır. Normal koşullarda RhoA pyrine bağlayarak pyrini fosforlayan serin kinazlar PKN1 ve PKN2'nin aktive olmasını sağlar, fosforlanan pyrin ise inflamazom yapısının oluşumunu engelleyen 14-3-3 proteinlerine bağlanır. Pyrinin mutant olduğu durumda ise 14-3-3 proteinlerinin ve PKN'lerin pyrine bağlanması zayıflamaktadır (12). Pyrinin patojen modifikasyonlarını ve Rho GTPazların inaktivasyonlarını algılayan bir sensör işlevi görmekte olduğu tanımlanmıştır (13).

AAA bir tek gen hastalığı olmasına rağmen klinik heterojenitenin gözlemlendiği bir hastalıktır. AAA hastalığı *MEFV* genindeki farklı mutasyonlar sonucunda oluşabilmektedir yani bir genetik heterojenite söz konusudur. AAA'da gözlemlenen klinik heterojenitenin kısmen de olsa genetik heterojenite ile açıklanabileceği düşünülmektedir. (3).

Fenotip-genotip korelasyonu ile ilişkili en önemli bulgular M694V mutasyonu ile ilişkilidir. AAA hastalarında görülen en yaygın dört genotip için genotip-fenotip

karşılaştırması yapıldığında M694V mutasyonunun daha ciddi hastalık seyri ile ilişkili olduğu görülmüştür (14).

Modifiye edici genlerin de hastalık ciddiyeti üzerinde etkisi olduğu düşünülmektedir. M694V homozigot hastalar aynı zamanda MICA A9 genotipine sahiplerse hastalığın daha erken başladığı MICA A4 genotipinin ise daha hafif hastalık durumlarında gözlemlendiği görülmüştür (15).

Ayrıca, tek alelinde mutasyon olan fakat klinik olarak AAA bulguları gösteren hastalar mevcuttur. 2009 yılında Booty ve ark. tarafından 46 heterozigot hastada yapılan çalışmada tüm *MEFV* gen bölgesi tekrar sekanslanmış ve pyrin ifadesine bakılmıştır. Bu çalışmanın sonucunda heterozigot hastalarda ikinci bir *MEFV* mutasyonuna rastlanmamış ve tek alelinde mutasyon taşıyan hastalarla iki alelinde mutasyon taşıyan hastalar arasında pyrin ifadesi açısından bir farklılık gözlemlenmemiştir (16).

2.2. Epigenetik ve Ailevi Akdeniz Ateşi

Epigenetik, DNA dizisi üzerinde bir değişikliğe sahip olmamasına rağmen gen ifadesini etkileyen mitotik ve (bazı durumlarda mayozla da aktarılabilen) kalıtsal değişiklikler olarak tanımlanabilir. Epigenetik faktörlerin, sinyal yolları ve transkripsiyon faktörleri ile çevresel faktörler ile genom arasında aracılık ettiği gözlemlenmektedir. Temel epigenetik mekanizmalar; DNA metilasyonu, histon modifikasyonları, kodlamayan RNA'lar olarak üç ana başlığa ayrılabilir. DNA metilasyonu, epigenetik olarak transkripsiyonun susturulmasında önemli bir role sahiptir. Metilasyon sitozinlerin 5' ucuna bir metil grubunun eklenmesi ile gerçekleşmektedir. DNA metilasyonu, DNA metiltransferazlar tarafından katalize edilmektedir (17, 19). Histon modifikasyonları, histon proteinlerinde translasyon sonrası gerçekleşen kovalent modifikasyonlardır. Metilasyon, asetilasyon, fosforilasyon, ubiquitinasyon, sumolasyon bu modifikasyonlardan bazılarıdır. En sık görülen modifikasyonlar ise metilasyon ve asetilasyondur. Histon asetilasyonu histon proteinlerinin lizince zengin bölgelerine histon asetiltransferazlar aracılığı ile histon kuyruklarına asetil grubu eklenmesi ile gerçekleşir. Asetilasyon genellikle gen aktivasyonu ile bağdaştırılan bir modifikasyondur. Histon metilasyonu ise histon metiltransferazlar tarafından katalizlenen bir reaksiyondur. Metilasyon hangi

kalıntıların (*residue*) metillendiğine bağlı olarak aktif ya da baskılanmış kromatine sebep olabilmektedir. Kodlamayan RNA'lar ise DNA'dan kopyalanan ancak proteinlere dönüştürülmeyen fonksiyonel RNA molekülleri grubudur. Kodlamayan RNA'lar iki ana başlık altında incelenebilmektedir. 200 nükleotidden daha küçük kodlamayan RNA'lar küçük kodlamayan RNA'lar olarak gruplandırılırken; 200 nükleotidden daha uzun kodlamayan RNA'lar uzun kodlamayan RNA'lar olarak sınıflandırılmaktadır. En çok çalışılan küçük kodlamayan RNA'lar arasında piRNA (Piwi etkileşimli RNA)'ler, miRNA (MikroRNA) ve siRNA (küçük interferans yapan RNA)'ler bulunmaktadır (18). Son yıllarda epigenetik değişikliklerin, otoimmün ve otoinflamatuar hastalıklar dahil olmak üzere pek çok hastalığın patogeneziğine etkisi olabileceği gösterilmiştir (19).

Çevresel faktörlerin AAA hastalık gidişatına etkisini gösteren çalışmalar mevcuttur. 2008 yılında Özen ve ark.'ları tarafından Türkiye ve Almanya'da yaşayan Türk çocuklarında AAA hastalık ciddiyeti açısından bir fark bulunup bulunmadığını araştırmak için yapılan çalışmada Türkiye'de yaşayan çocuklarda hastalık seyrinin daha ciddi olduğu gözlemlenmiştir. Çalışmaya hepsi 18 yaşının altında olan Türkiye'de doğmuş ve büyümüş 55 Türkiye kökenli çocuk ile Almanya'da doğmuş ve büyümüş 45 Türkiye kökenli çocuk dahil edilmiştir (20). Bu çalışmadan sonra 2012 yılında Özen ve ark.'ları tarafından yapılan bir diğer çalışmada etnik farklılıkların, çevresel ve genetik faktörlerin AAA hastalık seyrine etkisini gözlemlemek için oluşturulmuş Eurofever kayıtlarından elde edilen verilere göre 346 AAA hastası hastalık ciddiyet skorlarına, etnik kökenlerine ve çevresel etkiyi incelemek için nerede yaşadıklarına göre sınıflandırılmışlardır. Bu hastalardan 215 birey Doğu Akdeniz kökenli (Türkiye, İsrail, Ermenistan, Fas, Azerbaycan ve Mısır) ve Doğu Akdeniz bölgesinde yaşamakta, 71 birey Doğu Akdeniz kökenli olup Avrupa'da yaşamaktadır. Geri kalan 60 hasta ise Avrupa kökenli bireylerden oluşmaktadır. Bu çalışmanın sonucunda Doğu Akdeniz kökenli olup Avrupa'da ikamet etmekte olan hastaların Doğu Akdeniz bölgesinde yaşayan hastalara göre hastalık ciddiyetinin daha hafif olduğu gözlemlenmiştir. Bu sonuçlar monogenik bir hastalık olan AAA'da hastalık ciddiyetinin çevresel etmenlerden etkilenebileceği konusunda önemli bir sonuç olmuştur (21). 2021 yılında Özen ve ark. tarafından bağırsak mikrobiyotasının AAA hastalık ciddiyetine etkisini araştırmak için yapılan çalışmada Türkiye ve Amerika

Birleşik Devletlerindeki AAA hastaları ve sağlıklı kontrollerin bağırsak bakteri çeşitliliği karşılaştırılmıştır. Bu çalışma sonucunda bağırsak mikrobiyotasının hastalık şiddeti üzerinde anlamlı bir etkisi bulunamamıştır (22).

AAA fenotipinde, *MEFV* mutasyonlarının, modifiye edici genlerin ve çevresel faktörlerin etkisini incelemek amacıyla 10 tek yumurta ikizi ve 7 çift yumurta ikizinde ikizler arasındaki klinik farklılıklar incelenmiştir. Tek yumurta ikizleri arasındaki farklılıkların çevresel faktörleri, çift yumurta ikizleri arasındaki farklılıkların modifiye edici genleri yansıttığı düşünülerek yapılan çalışmada çevresel faktörlerin AAA üzerindeki tahmin edilen etkisinin $11,9 \pm 6,6\%$ ve modifiye edici genlerin etkisinin $17,4 \pm 15,5\%$ olduğu hesaplanmıştır (23).

2011 yılında Kirectepe ve ark. tarafından *MEFV* geninin metilasyonunu analiz etmek için yapılan çalışmada, 51 AAA hastası ve 21 sağlıklı kontrolde metilasyon seviyeleri ve *MEFV* ifade seviyeleri karşılaştırılmıştır. Çalışmanın sonuçlarına göre; AAA hastalarında *MEFV* geni ifade seviyesinin anlamlı bir şekilde düştüğü ve bununla uyumlu bir şekilde ekzon 2'deki metilasyon seviyesinin anlamlı bir şekilde arttığı saptanmıştır (24).

2.3. miRNA'lar

MikroRNA'lar birer polimeraz-III tip protein olan *Drosha* ve *Dicer* tarafından üretilen olgun hali yaklaşık 22 nükleotid uzunluğunda küçük kodlanmayan RNA'lardır. (25) miRNA'lar ilk kez 1993 yılında Lee ve ark. tarafından C. Elagans'ta gösterilmiştir (26). Birçok miRNA geninin transkripsiyonu RNA polimeraz II tarafından gerçekleştirilmektedir. miRNA'lar hedef mRNA'larına çoğunlukla 3' UTR bölgesinden bağlanarak post-transkripsiyonel düzenlemeye aracılık ederler. Bu bağlanma genel olarak hedef genin translasyonel baskılanmasına ve ekzonükleolitik mRNA yıkımına sebebiyet vermektedir. Bunun yanı sıra miRNA'lar aracılığıyla translasyonel aktivasyon ve heterokromatin oluşumuna sebep olan düzenlemeler de görülebilmektedir (25). Bir miRNA hedef geni olarak birçok geni düzenleyebilmekte ve bir gen birçok miRNA tarafından hedeflenebilmektedir (26). miRNA ile hedef geninin ilişkisi dinamik ve birçok faktöre bağımlı olarak gerçekleşen bir süreçtir. miRNA'nın hücre içerisindeki konumlanması, hedef mRNA'nın ve miRNA'nın miktarı, miRNA-mRNA etkileşiminin ne kadar güçlü olduğu gibi faktörler miRNA-

hedef gen ilişkisini etkileyen dinamikler olarak gösterilebilir. miRNA'lar ekzozomlar aracılığı veya başka proteinlere bağlanarak taşınabilir ve ifade oldukları dokudan farklı bir bölgede etkinlik gösterebilirler.

Çalışmaların çoğunluğu miRNA'ların genlerin 3' UTR bölgesine bağlandığını gösterse de mRNA'ların farklı bölgelerinde de miRNA bağlantı bölgeleri tespit edilmiştir. Bunlar arasında promoter bölgeleri ve 5'UTR da bulunmaktadır. (28). miRNA'ların hedef tanınması oldukça komplekstir. miRNA- hedef gen arasındaki baz eşleşmesinin mükemmel olması gerekmediği için miRNA'nın hedef genine sadece kısmen tamamlayıcı olması yeterlidir (29). Olgun miRNA'ların ismi miRNA zincirinin yönü ile belirlenir pre-miRNA saç tokasının 5' ucundan oluşmuş olgun miRNA'lar 5p olarak adlandırılırken 3' ucundan oluşmuş olgun miRNA'lar 3p olarak adlandırılır (28).

Çoğu memeli miRNA ailesi muhtemelen gen duplikasyonundan kaynaklı olarak çok sayıda izoforma sahiptir. Bu izoformlarda genellikle miRNA'ların 5' ucundan 2-7 pozisyonunda bulunan nükleotidler aynıdır. miRNA-hedef gen etkileşiminde tohum(*seed*) adı verilen 6 nükleotidlik bir bölge önemli bir yer tutmaktadır. Bu bölgedeki eşleşmeden dolayı izoformların birbirleri ile benzer görevler alabileceği düşünülmektedir. Fakat 3' ucunun da aynı şekilde hedef bölgeye bağlanmada katkı sunması ve bu kardeş miRNA'ların ifade paternlerinin sıklıkla birbirinden farklı olması sebebi ile aynı tohum ailesinden miRNA'lar oldukça farklı görevlere sahip olabilirler.

Transkripsiyonel seviyede çeşitli polimeraz II ilişkili transkripsiyon faktörleri miRNA gen transkripsiyonunu kontrol etmektedir. Post-transkripsiyonel seviyede ise, miRNA'ların *Drosha* ve *Dicer* enzimlerinin ifadesindeki değişimlerden dolayı ifadesi azalabilir. Bunlara ek olarak endojen kimyasal yapılar ya da ksenobiyotik de miRNA'ların ifadesinde değişikliğe sebep olabilmektedir. Bu yollarla miRNA'ların ifadesi belirli durumlarda ve farklı hücre türlerinde düzenlenmektedir. (25)

Polimeraz II tarafından sentezlenen birincil transkriptler (pri-miRNA) genelde birkaç kilobaz uzunluğundadır. Nükleusta *Drosha* tarafından pri-miRNA'lardaki bu saç tokası yapısının kökünün kesilmesiyle pre-miRNA'lar oluşur. *Drosha* kofaktörü olan *DiGeorge* kritik sendrom bölgesi 8 (DGCR8) proteiniyle bir kompleks oluşturur. Ardından pre-miRNA'lar *Exportin 5* tarafından sitoplazmaya taşınır. Nükleustan

sitoplazmaya olan taşınmanın ardından pre-miRNA'lar Dicer enzimi yardımıyla kesilir ve bu aşamanın sonucunda yaklaşık 22 nükleotid uzunluğunda çift zincirli miRNA'lar oluşur. Ardından çift zincirli RNA yapısı Argonat (AGO) proteinine yüklenir ve efektör kompleks olan RISC (RNA kaynaklı susturma kompleksi) yapısı oluşur. Bu aşamada çift zincirli RNA'nın bir zinciri olgun miRNA olarak AGO proteinin üstünde kalırken diğer zincir yıkıma uğrar.

miRNA'lar birçok hastalığın teşhisi, ilerlemesi ve tedavisi konusunda potansiyel hedef ve önemli biyobelirteç adayları olarak görülmektedir (29, 30).

2.3.1 Ailevi Akdeniz Ateşi ve miRNA'lar

Epigenetik faktörler içerisinde sınıflandırılan miRNA'lar, ailevi Akdeniz ateşinde görülen fenotipik heterojeniteyi açıklamaya yardımcı faktörlerden biri olabilir. miRNA'ların değişen ifadesi bir çok otoimmün ve otoinflamatuar hastalıkta gösterilmiştir. miRNA'ların hastalık patogenezindeki rolünün anlaşılması, tanıda yardımcı biyobelirteç olarak kullanılmasının da önünü açabilir. Aynı genotipe sahip AAA hastaları farklı fenotipler gösterebilmektedir. Bu farklılıklar modifiye edici genlerle, epigenetik faktörlerle ya da çevresel etmenlerle açıklanabilir (31).

2016 yılında Wada ve ark. tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada 24 AAA hastasının ve hastalık kontrolü olarak 8 PFAPA (Periyodik Ateş, Aftöz Stomatit, Farenjit ve Adenit) hastasının RNA'larından miRNA'ları profilemek amacı ile mikrodizin çalışmaları yapılmıştır. 24 AAA hastası üç alt gruba ayrılmıştır; A grubu ekzon 10 mutasyonuna sahip 8 AAA hastasından, B grubu ekzon 3 mutasyonuna sahip 8 AAA hastasından, C grubu ise bu ekzonlar dışında mutasyonlara sahip AAA hastasından oluşmaktadır. Araştırmacılar çalışmalarında birden fazla miRNA'nın ifade motiflerinin alt grupları sınıflandırmada kullanılabileceğini öne sürmüşlerdir. 26 miRNA'nın ifade motiflerini kullanarak AAA hastaları ve PFAPA hastalarını %78,1 başarı oranı ile doğru sınıflandırabilmişlerdir. 24 miRNA'nın ifade motiflerine bakılarak yapılan karşılaştırma sonucunda AAA alt grupları olan A ve B alt gruplarını %93,8 başarı oranı ile sınıflandırılabilmişlerdir. A ve C alt grupları ise seçilen 30 miRNA'nın ifade profili kullanılarak %87,5 başarı oranı ile sınıflandırılabilmiştir. 25 miRNA'nın ifade motiflerine bakılarak yapılan B ile C grupları arasındaki

sınıflandırma ise %100 oranında başarılı bulunmuştur. Bu çalışma miRNA'ların AAA alt gruplarını ayırmada biyobelirteç işlevi görebileceğini göstermektedir (32).

Yine 2016 yılında Latsoudis ve ark. tarafından yapılan çalışmada THP-1 hücrelerinde siRNA aracılığı ile *MEFV* geni susturulmuş ve *MEFV* geni susturulmuş örnekler ile kontrol örnekleri arasında ifadesi değişen miRNA'ları tespit etmek amacı ile mikrodizin çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmalar neticesinde ifadesi değişen 29 miRNA seçilmiş ve *in silico* çalışmalar sonucunda bu miRNA'lardan miR-378/422a süper ailesine ait sekiz miRNA'nın birlikte çalışıyor olabileceği gözlemlenmiş ve kalan miRNA'lardan potansiyel hedef genlerine göre seçim yapılmıştır. miR-4520a'nın mTOR kompleksi aktivatörü *RHEB* (Beyinde zenginleştirilmiş Ras homologu) hedefleyebileceği tahmin edilmiş, daha sonra bu hedef gen miRNA ilişkisi lusiferaz aktivite analizi ile valide edilmiştir. Hastalardan elde edilen monositlerde miR-4520a ifadesine bakıldığında ise hastalarda anlamlı bir artış olduğu görülmüştür (33).

2017 yılında Akkaya-Ulum ve ark. tarafından miRNA'ların AAA hastalığı patogenezindeki potansiyel rollerini araştırmak ve ifade profillerindeki değişiklikleri saptamak amacıyla 6 sağlıklı kontrol, 6 FMF hastası (M694V/M694V), 6 hastalık fenotipi gösteren taşıyıcı (M694V/-), 6 sağlıklı taşıyıcı toplam 24 birey ile mikrodizin çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmalar neticesinde hem homozigot hastalarda hem de heterozigot hastalarda sağlıklı bireylere ve sağlıklı taşıyıcılara göre ifadesi değişen toplam 14 miRNA tespit edilmiştir. Bu miRNA'lardan DAVID (*Database for Annotation, Visualization, and Integrated Discovery*) analizleri sonucunda inflamatuvar yolaklarla ilişkili hedef genleri olduğu gösterilen dört miRNA hasta sayısı artırılarak Kantitatif Gerçek-Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (qRT-PCR) ile valide edilmiştir. Bunun sonucunda sağlıklı taşıyıcılara göre heterozigot hastalarda let-7d ve miR-574 ifadesinin anlamlı olarak arttığı, sağlıklı kontrollere göre ise homozigot hastalarda miR-20'a ifadesinin anlamlı olarak arttığı miR-197 ifadesinin anlamlı olarak azaldığı gösterilmiştir (34).

2018 yılında Amarilyo ve ark.'ları M694V homozigot 10 FMF hastasının, 10 sağlıklı kontrole göre periferik kanlarında değişen miRNA ifadesine baktıkları çalışmada taranan 103 miRNA'dan 7 miRNA'nın ifadesinin değiştiğini; 4 artan (miR-144-3p, miR-21-5p, miR-4454, and miR-451'a) 3 azalan (miR-107, let-7d-5p, and

miR-148b-3p) olacak şekilde göstermişlerdir. Bu miRNA'ların hepsi immün sistemin düzenlenmesi ile ilişkilendirilmiştir (35).

Hortu ve ark. tarafından yapılan çalışmada, 51 AAA hastasında ve 49 sağlıklı kontrolde daha önce otoinflamatuar hastalıklarla ilişkisi saptanmış ve immün cevapta rolü olan 15 miRNA'nın ifadesi değerlendirilmiştir. Bunlardan 11 miRNA'nın ifade seviyesi hasta grupta sağlıklı gruba göre anlamlı olarak daha düşük bulunmuştur. Hasta gruplar kendi içerisinde incelendiğinde ise kolşisin alan hastalarda 5 miRNA'nın anlamlı bir şekilde arttığı 5 miRNA'nın ise anlamlı şekilde azaldığı bulunmuştur. Ayrıca kontrol grubuna göre karşılaştırma yapıldığında; atak döneminde bulunan hastalarda 4 miRNA'nın ifadesi, atak döneminde olmayan hastalarda 9 miRNA'nın ifadesi anlamlı olarak düşük bulunmuştur. Bu çalışma miRNA'ların AAA hastalarında değişen ifadesini gösteren önemli bir çalışmadır (36).

2018 yılında Koga ve ark. tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada atak ve remisyon dönemlerindeki AAA hastalarının serumlarından yapılan mikrodizin sonuçlarına göre atak dönemindeki hastalarda miR-204-3p'nin anlamlı şekilde azaldığı bulunmuştur. Yapılan fonksiyonel analizlerle pro-inflamatuar sitokinlerin salınımı tetiklendiğinde miR-204-3p'nin ifadesinin düştüğü, ayrıca pre-miR-204-3p'nin LPS'e maruz kalan hücrelerde IL-6 ve IL-12p40 üretiminde anlamlı bir düşüşe sebep olarak anti-inflamatuar bir görev aldığı gösterilmiştir. Ayrıca lusiferaz aktivite analizi sonucunda miR-204-3p'nin PIK3CG'yi (Fosfatidilinositol-4,5-bisfosfat 3-kinaz katalitik alt birim gama izoformu) hedefleyerek PI3K γ yolağında yer aldığını göstermiştir (37).

2019 yılında Demir ve ark. tarafından 30 pediatrik FMF hastasının ve 30 kontrolün periferik kan örnekleri kullanılarak atak ve remisyon dönemlerinde miRNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Atak ve remisyon dönemlerinde ifadesi bakılan 4 miRNA'dan (miR-16-5p, miR-155-5p, miR-204-5p, miR-451-5p) 155-5p'nin ve 204-5p'nin remisyon dönemindeki hastalarda kontrol grubuna göre anlamlı derecede değiştiği bulunmuştur (38).

2021 yılında Karpuzoglu ve ark. tarafından pyrinin apoptozda bir rolü olduğu hipotezinden yola çıkarak apoptozla ilişkili 33 miRNA'nın ifadesine 191 AAA hastasında 31 sağlıklı kontrole göre bakılmıştır. Bu 33 miRNA'dan 26 tanesinin FMF hastalarında değiştiği gözlemlenmiştir. Değişen miRNA'ların 19'unun ifadesi

artmakta iken 7 tanesinin ifadesi azalmaktadır. Araştırmacılar bu çalışmanın sonucunda AAA hastalarında ifade değişikliği gösteren miRNA'ların AAA patogenezinde apoptoz ile ilişkili olabileceğini öngörmektedir (39).

2021 yılında Akkaya-Ulum ve ark. tarafından yapılan çalışmada ise daha önceki çalışmalarda klinik seyri daha ağır olan AAA hastalarında anlamlı bir şekilde azaldığı belirlenen miR-197-3p'nin monositlerde, sinoviyal fibroblastlarda ve makrofajlarda yapılan fonksiyonel analizlerde anti-inflamatuvar etkisi gösterilmiştir. Aynı çalışmada ayrıca miR-197-3p'nin, *IL1RI*'i (İnterlökin 1 Reseptör Tip 1) hedeflediği lusiferaz assayle gösterilmiştir. Bu çalışmanın sonucunda miR-197-3p'nin AAA hastalarında patogeneze etki edebilecek, inflamatuvar süreçlerde önemli bir miRNA olduğu gösterilmiştir (40).

2.3.2. İlaç Direnci ve miRNA'lar

İlaçlar ile tedavi yaklaşımında, terapiye başladıktan bir süre sonra ilacın etkinliğinde düşüş veya ilaca karşı yetersiz cevap görülmektedir. Bu durum ilaç direnci olarak adlandırılmaktadır. Özellikle kanser tedavisinde görülen bu durum ciddi problemlere sebep olabilmektedir. Kanserde görülen ilaç direnci doğal olarak veya edinilmiş olarak gerçekleşmektedir. Doğal ilaç direnci tedaviden önce de mevcuttur. Edinilmiş ilaç direncinde ise genomik instabiliteden dolayı heterojenik bir yapı gösteren kanser hücrelerinde ilaca karşı farklı duyarlılık oranlarının olması ve ilaca karşı en az duyarlı olan hücrelerin pozitif seçim yolu ile seçilmesi söz konusu olmaktadır (41).

Yeterli biyoyararlanımın olmaması, ilacın hücre dışına atılımından (*efflux*) sorumlu pompaların artan ifadeleri veya ilaç hedefinde olan genlerde meydana gelen değişiklikler ile açıklanabilmektedir (42). İlaç direncinin gelişmesinde *efflux* pompalarında meydana gelen değişikliklerin yanısıra ilaç metabolizmasından sorumlu genlerde meydana gelen değişimlerin ya da DNA onarımı süreçlerindeki ve enerji programlanmasındaki aksaklıkların rolü olduğu düşünülmektedir. İlaç direnci durumunda ilaçların emilim, salınım, atılım ve metabolizmasından sorumlu genlerde (ADME) yani farmakokinetik özelliklerinde değişiklikler olduğu görülmektedir (43). miRNA'ların ilaç cevabında önemli bir rolü olabileceğinin öğrenilmesi ile miRNA'ların ilaç direncindeki olası etkilerine yönelik çalışmalar artış göstermiştir.

(Xie,2019) İlaç direnci konusunda oldukça bilinen bir etkiye sahip genlerden biri *ABCB1* (ATP bağlayıcı kaset alt ailesi B üyesi 1) diğer bilinen adlarıyla *MDR1* (çoklu ilaç direnç geni 1) ya P-glikoprotein (P-gp)'dir. P-gp ilaçların hücre dışına atılımında rol alan bir ATP ile çalışan efflux pompası olarak işlev göstermektedir. İlaç direnci ve miRNA'lara ilişkin ilk çalışmalar miRNA'ların bu gen üzerindeki etkisini gösteren çalışmalardan oluşmaktadır (42).

Meme kanserininin tedavisinde kullanılan doksorubisin ilacına meme kanseri hücrelerinin sıklıkla direnç geliştirdiği bilinmektedir. Kovalchuk ve ark., 2008 yılında doksorubisin dirençli MCF-7 (meme kanseri hücreleri) hücre hattında yaptıkları çalışmalarda miRNA'ların direnç üzerindeki rolünü araştırdıkları bir çalışmaları bulunmaktadır. Araştırmacılar dirençli hücre hattında miRNA profilinin değiştiğini ve ifadesi değişen miRNA'lardan biri olan miR-451'in *MDR1* geninin ifadesini etkileyerek ilaç direncine katkıda bulunduğunu göstermiştir. Dirençli hücre hattına miR-451 transfekte edildiğinde hücreler doksorubisin duyarlı hale döndüğünü göstermişlerdir. (43).

Yine meme kanseri tedavisinde kullanılan bir ilaç olan fulvestranta hastaların zaman içerisinde direnç geliştirdiği bilinmektedir. Xi Rao ve ark. tarafından yapılan çalışma sonucuna göre ise fulvestrant dirençli hücre hatlarında miR-221/222'nini ifadesi artmakta, artan miR-221/222 ifadesi de daha önce ilaç direnciyle ilişkilendirilmiş yollarda düzensizliğe neden olmaktadır (44).

Kolşisin, AAA hastalığı tedavisinde etkinliği saptanmış güvenilir ve sık kullanılan bir ilaçtır. Hastalarda atak sayısını ve ciddiyetini azalttığı ve amiloidozisi engellediği gösterilmiştir. Kolşisin tolere edilebilen dozlarda oldukça etkili bir ilaç olmasına rağmen AAA hastalarının %2-5'inin kolşisin dirençli olduğu rapor edilmiştir. Kolşisin direnci, tolere edilebilen en yüksek doz alındığı halde devam eden hastalık aktivitesi,altı aydan uzun bir süre ayda bir kere ya da daha fazla sayıda atak varlığı ve ataklar arasında artan CRP ve SAA seviyesi varlığı ile tanımlanabilir (2). Kolşisinin terapötik dozlarda uygulandığında ilaç uygulamasından sonra hızla plazmadan ayrıldığı bilinmektedir. Kolşisinin vücuttan atılımı ise esas olarak bağırsakta safra aracılı atılım olarak ya da doğrudan atılım şeklinde gerçekleşmektedir. Ayrıca, bir kısmının idrar yoluyla değişken konsantrasyonlarda atıldığı bulunmuştur. Bu çalışmalar böbrek ve safra yolları aracılı atılımının olduğunu düşündürmektedir

(45, 46). Hastalarda jejunum ileum fonksiyon bozukluğu olduğu durumlarda yüksek kolşisin dozlarının absorpsiyonunda problemler olduğu görüldüğü için, emiliminin esas olarak jejunum ve ileumdan gerçekleştiği tespit edilmiştir (47). İlk kolşisin uygulamasından sonra lökositlerde tespit edilen yüksek kolşisin konsantrasyonu ve kolşisinin plazma konsantrasyonundaki önemli azalmanın, ilacın lökositlerde birikmesi ve safra yollarından atılımından kaynaklandığı düşünülmektedir (48).

Kolşisinin en yüksek yüzdesi metabolize edilmemiş halde kalsa da daha küçük bir kısmı karaciğerden atılmadan önce NADPH ve oksijen varlığında demetilasyona uğramakta ve iki metabolit, 3-demetilkolşisin (3DMC) 2-demetilkolşisin (2DMC) oluşmaktadır (49). *CYP3A4* (Sitokrom P450 3A4) ile ilişkili metabolitlerinin miktarı kolşisin ile tedaviden sonra hepatik mikrozomlarda gösterildiği için *CYP3A4*'ün kolşisin metabolizmasından sorumlu ana izoform olduğu gösterilmiştir (50). Kolşisin atılımına ise çoklu akış pompalarının dahil olduğu düşünülmektedir. Hem *ABCBI* hem de *MRP2* (çoklu ilaç direnci ilişkili protein 2) inhibitörleri kolşisinin bağırsak geçirgenliğini etkilemektedir. Bu iki taşıyıcının birleşik etkisi, kolşisin taşınmasına aracılık ediyor gibi görünmektedir (51). *ABCBI*'in aşırı ekspresyonu, bir akış pompası işlevi gördüğünden ilaç direncine yol açabilmekte ve artan ilaç akışı, hücre içindeki ilaç konsantrasyonunda bir azalmaya neden olabilmektedir. Kolşisinin direnci diğer ilaçlarla da ilişkili olabilmektedir (52). *ABCBI*'de gözlenen polimorfizmler de P-glikoprotein ekspresyonunu değiştirebileceğinden kolşisinin etkilerini değiştirebilmektedir (53).

Kolşisin esas olarak karaciğer yoluyla atıldığı için, karaciğer veya böbrek fonksiyon bozukluğu olan hastalar önemli yan etkilere maruz kalabilmektedir. Bu hastalarda doz çok dikkatli ayarlanmalıdır. Kolşisin metabolizması esas olarak *CYP3A4* aracılığıyla gerçekleştiğinden, klaritromisin, eritromisin, ketokonazol gibi *CYP3A4* inhibitörleri kolşisin birikimine ve toksik yan etkilere neden olabilmektedir. Ayrıca, kolşisin ile etkileşime girdiği bildirilen P-gp inhibitörleri de ciddi yan etkilere sebep olabilmektedir (54) (55)

2.4. miRNA Hedef Genlerinin Belirlenmesi Amacı ile Kullanılan Biyoinformatik Araçlar

Birçok önemli biyolojik süreçte rol olan miRNA'ların hedef genlerinin tanımlanması bu miRNA'ların işlevlerinin anlaşılabilmesi açısından oldukça önemlidir. Fakat bu miRNA-hedef gen ilişkisinin doğrulanması zaman alıcı ve maliyetlidir. Bu sınırlamalar sebebiyle miRNA-hedef gen ilişkisini tahmin etmeye yönelik birçok uygulama bulunmaktadır. Bu uygulamalar potansiyel miRNA hedeflerinin daha sonrasında deneysel olarak doğrulanabilmesi için hedef daraltmaya yardımcı olmaktadır. Potansiyel hedef genleri bulmak için farklı yaklaşımlar geliştiren uygulamalar mevcuttur (56). Bu uygulamalarda potansiyel miRNA hedeflerini tahmin etmek için farklı algoritmalar kullanılmaktadır. Birçok uygulama miRNA-hedef gen ilişkisini tahmin ederken miRNA'ların tohum (*seed*) bölgesinin mRNA'lerin 3'UTR ile komplementar olup olmadığına bakmaktadır. PicTar, PITA, RNAhybrid, miRU bu yöntemle miRNA-hedef gen ilişkisini tahmin eden uygulamalardan bazılarıdır. Bazı uygulamaların algoritmalarında mRNA'ların 5' UTR ya da kodlayan diziler de bağlanma bölgesi potansiyel bağlanma bölgesi tahminlerine dahil edilmektedir. Fakat tek başına bu komplementerlik miRNA-hedef gen ilişkisini belirlemede yeterli değildir. miRNA ve hedef bölgesi arasında tam komplementerlik olmadığı fakat miRNA'nın hedef genin translasyonunu baskılayarak ifadesini etkilediği durumlar mevcuttur. DIANA tools algoritması içerisinde bu da göz önünde bulundurulmaktadır. miRNA-hedef gen bağlanmanın gerçekleşmesi için gerekli serbest enerji ne kadar düşükse RNA-RNA bağlantısı o kadar güçlü bir şekilde gerçekleşmektedir. Birçok uygulama bu enerjiyi ölçen paketler kullanmaktadır, bunun yanı sıra PITA gibi programlar serbest enerjiyi mRNA'nın 3'UTR bölgesinin ne kadar ulaşılabilir olduğunu hesaplamak için de kullanmaktadır. Bunlara ek olarak bağlantı bölgesinin türler arasındaki korunma durumu ve miRNA'ların 3' ucundaki 13-16 nükleotid arasındaki bölge de bu bölgedeki bir komplementerlik 3'UTR'deki uyumsuzluğu telafi edebileceği için, algoritmalara dahil edilmektedir. TargetScan, PicTar, PITA, RNAhybrid, miRU, 15 iranda, DIANA Tools potansiyel miRNA hedef genlerini bulmak için geliştirilen uygulamalardan bazılarıdır (57).

2.5. Hedef Genleri Araştırma Amacı ile Kullanılan Metin Madenciliği Uygulamaları

Bilimsel literatür bir araştırma konusuyla ilişkili elde edilen yeni verilerin ve hipotezlerin paylaşıldığı ana merkez konumundadır. Fakat özellikle biyomedikal araştırmalar konusundaki literatür genişledikçe araştırılan konuyla ilişkili bilgileri bulmak ve bilimsel bilgi parçaları arasındaki bağlantıyı çıkarmak zorlaşmaktadır. Metin madenciliği metinlerden bilimsel bilginin keşfini ve çıkarılmasını içerir ve farklı yayınlardan çıkarılan bilgilerin birleştirilmesiyle yeni hipotezler oluşturulmasına kadar farklı bilimsel çıktılar oluşturabilir (61).

Bu tez çalışmasında, mikrodizin sonuçlarına göre kolşisin dirençli hasta grubunda anlamlı değişimi gösterilen miRNA'ların da ilaç direnciyle ve inflamasyonla ilişkili diğer mekanizmalar üzerinden direnç gelişimine katkı sağlıyor olabileceği düşünülmüştür. Bu kapsamda, hastalarda ifadesi değişen miRNA'lar muhtemel hedef genlerinin görev aldıkları yollara göre sınıflandırılmış, ilaç metabolizması ve direnci ile ilgili yollarda rol alan miRNA'lar seçilmiştir. Bunların ifadesi qRT-PCR ile test edilmiştir. Literatürden ve mevcut gen listelerini içeren kaynaklardan yararlanarak hem inflamasyon hem de ilaç direncinde görev alan genleri içeren gen listeleri oluşturulmuştur. İfadesinde anlamlı değişim saptanan miRNA'ların bu gen listeleri içerisinde bulunan muhtemel hedef genleri incelenmiştir. Bu hedef genler kolşisin metabolizmasındaki olası rollerine göre değerlendirilmiş bu listelerden bazı genlerin ifadesi hastalarda analiz edilmiştir. Ayrıca seçilen miRNA'ların ve muhtemel hedef genlerinin ifadesi kolşisin dirençli hastalara ek olarak kolşisin dirençli hücre hattında da değerlendirilmiştir.

3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

3.1. Gereçler

3.1.1. RNA izolasyonu, Total Kandan miRNA İzolasyonu ve cDNA Sentezi

- *PAXgene Blood miRNA Kit (Qiagen) TaqMan® MicroRNA Reverse Transcription Kit (ABI)*
- *QuantiTect Reverse Transcription Kit (50 rxn) (Qiagen)*
Rneasy Protect Cell Mini Kit (50 rxn) (Qiagen)

3.1.2. miRNA'lar ve mRNA'lar için Kantitatif Gerçek-Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (qRT-PCR)

- *TaqMan® MicroRNA Assays (ABI) primerleri (miR-183, miR-15b-5p, miR-125a-5p RNU48)*
- *TaqMan® Universal PCR Master Mix, no AmpErase® UNG (ABI) Kit*
- *Promega GoTaq® Master Mix*

3.2. Yöntemler

3.2.1. Çalışma Grubunun Oluşturulması

Daha önceki çalışmalarımız kapsamında, Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Erişkin Romatoloji Bölümü ve Hacettepe Üniversitesi İhsan Doğramacı Çocuk Hastanesi Pediatri Anabilim Dalı Romatoloji Bölümü tarafından kanları toplanan hastaların yaşları, tanı aldıkları yaşlar, kullandıkları ilaçlar (dozlarıyla birlikte) ve otoinflamatuvar hastalık aktivite indeksleri (AIDAI) not edilmiştir. Bu hastalardan 6 kolşisin dirençli 6 kolşisin duyarlı hasta kullanarak çalışma grupları oluşturulmuştur. Bu çalışma kapsamında RNA'ları kullanılan kolşisin dirençli AAA 6 hastasının klinik bilgileri Tablo 3.1'de kolşisin duyarlı 6 AAA hastasının klinik bilgileri tablo 3.2'de özetlenmiştir.

Tablo 3.1. Çalışmaya katılan kolşisin dirençli AAA hastalarının klinik bilgileri.

Hasta Kodu	Mutasyon	Yaş	İlaç	İlaç Dozu	CRP (C-Reaktif Protein) Değerleri (mg/dL)	Otoinflamatuvar hastalık aktivite indeksi (AIDAI)
MG	M694V/M694V	1 yıl 9 ay	Kolşisin	2x1 mg	0,17	65
ENK	M680I/M680I	17 yıl 5 ay	Kolşisin Kanakinumab	2x1 mg 150 mg	0,15	77
AK	M680I/M694V	9 yıl 1 ay	Kolşisin Kanakinumab	2x1 mg 150 mg	0,74	86
ÖB	M694V/M694V	13 yıl 10 ay	Kolşisin	3x1 mg	<<0,1	92
ŞK	M694V/M694V	14 yıl 1 ay	Kolşisin Kanakinumab	3x1 mg	0,17	83
SS	M694V/M694V	18	Kolşisin Kanakinumab	2x1 mg 150 mg	0,56	81

Tablo 3.2. Çalışmaya katılan kolşisin duyarlı AAA hastalarının klinik bilgileri.

Hasta Kodu	Mutasyon	Yaş	İlaç	İlaç Dozu	CRP (C-Reaktif Protein) Değerleri (mg/dL)	Otoinflamatuvar hastalık aktivite indeksi (AIDAI)
MAE	M694V/M694V	6 yıl 4 ay	Kolşisin	2x1 mg	0,26	3
UEM	M694V/V726A	11 yıl	Kolşisin	2x1 mg	0,14	0
AD	M680I/M694V	9 yıl	Kolşisin	2 x ½ mg	0,27	2
ZSG	M680I/M694V	12 yıl 11 ay	Kolşisin	3 x 1 mg	0,24	0
ZY	M694V/M694V	16 yıl 10 ay	Kolşisin	4 x 1 mg	0,17	0
ENP	M694V/M694V	11 yıl 1 ay	Kolşisin	2 x 1 mg	0,17	0

3.2.2. miRNA Hedef Genlerinin Belirlenmesi

Laboratuvarımızda daha önce tamamlanan projelerimizden elde edilen mikrodizin verilerinin MeV 4.9.0 – (*Multiple Experiment Viewer*) programı kullanılarak yapılan analizlerde kolşisin dirençli AAA hastalarında ifadesi en az iki kat artan veya azalan 25 miRNA tespit edilmişti. (p değeri <0,05). Belirlenen bu 25 miRNA'nın hedef gen ve miRNA ilişkisi miRWalk 2.0 veritabanı kullanılarak incelendi. Bu veri tabanında 12 farklı veritabanının miRNA-hedef gen ilişkisine yönelik tahminleri bulunmaktadır. Bu ilişkiler miRWalk, mirRDB, PITA, MicroT4, miRMap, RNA22, 20iranda, miRNAMap, RNAhybrid, miRBridge, PICTAR2 ve Targetscan veri tabanlarından elde edilmiştir. miRWalk veritabanımında miRNA'lar için yapılan aramalar sonucunda en az altı farklı veritabanı tarafından o miRNA'nın hedef gen olarak tahmin edilen genler ile miRNA'ların olası hedef genlerini içeren listeler oluşturuldu. Ayrıca miRNA-hedef gen ilişkilerini gösteren miRTarBase veri tabanında bulunan hedef genler eğer önceki listede bulunmuyorsa bu listelere eklendi.

- **miRWalk;** miRNA'ların hedef genlerini sadece 3' UTR'larına bağlanarak değil aynı zamanda 5' UTR'larına aminoasit kodlayan bölgelerine ya da promotor bölgelerine bağlanarak da hedefleyebildiği gösterilmiştir. miRWalk sadece 3' UTR'a yönelik bir miRNA-hedef gen ilişkisini değil diğer bölgelerdeki miRNA bağlanma bölgelerini de tespit etme amaçlı kapsayıcı bir veritabanıdır. (58) miRWalk 2.0 tahmin edilen ve deneysel olarak valide edilmiş miRNA-hedef gen ilişkilerinin birçoğuna ulaşmaya imkan sağlayan kapsayıcı bir arşiv niteliğindedir. Varolan miRNA-hedef gen kaynaklarından tahmini veri setlerini birleştirerek bir miRNA'nın bir genin tüm bölgeleriyle olası etkileşimlerini tahmin etmeyi amaçlamaktadır (59). miRWalk bilinen insan, fare, sıçan, köpek ve inek genlerinin tahmin edilen ve valide edilmiş miRNA bağlanma bölgelerini içeren açık kaynaklı bir platformdur. miRWalk miRNA hedef bölgelerini tahmin etmek için rasgele-orman-bazlı yaklaşım yazılımı TarPmiR'i kullanmaktadır. Bunun yanı sıra başka veri tabanlarındaki tahmin edilen ve valide edilmiş miRNA-hedef gen ilişkilerine de bu veritabanı üzerinden erişilebilmektedir (57).

• **miRTarBase**; miRTarBase valide edilmiş miRNA-hedef gen etkileşimlerine dair kapsamlı bilgi sağlayan bir veri tabanıdır. Veritabanı 2020 itibariyle 11,021 makaleden manüel olarak elde edilmiş 13,404'ten fazla miRNA-hedef gen ilişkisini içermektedir (60).

3.2.3. Belirlenen Hedef Genlerin ve miRNA'ların İlaç Direnci ve İnflamasyonla İlişkilerine Göre Sınıflandırılmaları

Kolşisin dirençli hastalarda ifadesi değişen miRNA'ların potansiyel hedef genlerinin inflamasyon ve ilaç direnci ile ilişkilerini belirlemek için inflamasyon ve ilaç direnci ile ilişkili genlerin ayrı ayrı listesi oluşturuldu. Daha sonra bu iki listede ortak olan genler tespit edilerek hem inflamasyonla ilişkili hem de ilaç direnci ile ilişkili genler belirlendi. Bu genlerden miRNA'ların potansiyel hedef genleri arasında olanlar literatür aramaları için listelendi. İnflamasyonla ilişkili bir liste oluşturmak için IRIS veri tabanındaki genler ve Matthew J. Loza ve ark. tarafından hazırlanan inflamasyonla ilişki genler (64) birleştirilerek bir liste oluşturuldu. Aynı şekilde, PharmaADME veritabanında ilaç direnciyle, ilaç metabolizmasıyla ve ilaç tutunmasıyla ilişkilendirilen genler, DMET™ (*Drug Metabolizing Enzymes and Transporters Plus Panel*-Thermo Fisher) ve miRTarBase veritabanındaki ilaç metabolizmasıyla ilişkili genleri kullanarak ikinci bir liste oluşturuldu.

3.2.4. Hedef Genler için Metin Madenciliği Uygulamaları Kullanarak Literatür Araması Yapılması

Kolşisin dirençli hastalarda ifadesi değişen miRNA'ların ilaç direnci ve inflamasyonla ilişkili hedef genlerinin kolşisin direnci ile ilişkili olup olamayacağının belirlenmesi için bu genlerle ilişkili literatür aramaları yapıldı. Bu genlerin ilaç direnci ve inflamasyonla ilişkilerini anlamak için BioTextQuest+, Chilibot, Illumina BaseSpace Correlation Engine gibi metin madenciliği uygulamalarından yararlanıldı.

• **BioTextQuest**; PubMed'te bulunan makale kümelerindeki önemli terimlerin keşfini sağlayan bir metin madenciliği sistemidir. BioTextQuest+'te kavram tabanlı bir kümeleme sistemi kullanılmaktadır. Bunun için biyomedikal terimleri önemlerine göre ayıklayan ve bu terimleri benzerliklerine göre gruplandıran bir prototip olan TextQuest+ baz alınmaktadır (62). Orijinal prototipe ek olarak BioTextQuest+

opsiyonel olarak Lovins gövdeleme algoritmasının kullanımını, farklı kümeleme algoritmalarının seçimini ve interaktif bir şekilde tekrar analizini mümkün kılar. Bu sistem sayesinde literatür çıktıları belirli anlamlı terimler açısından gruplandırılarak belge kümeleri ile özetlenebilir. Bu sistem sayesinde yapılan aramayla ilişkili kavram ilişkilendirilmesi ve hipotez üretimi yapılabilir. Sonuçlar etiket bulutu tabanlı illüstrasyonlar şeklinde görüntülenmektedir, bu illüstrasyonlarda küme içerisinde o terime sahip belgelerin oranına bağlı olarak terimin boyutu değişir (63).

- **Chilibot;** aranan terimlerle ilişkili cümleleri PubMed literatür veritabanında bulunan makale özetlerinden metin madenciliği ile çıkaran özelleşmiş bir arama yazılımıdır. Bu yazılım sayesinde kullanıcı aradığı her iki terimi de içeren cümlelere ve bu cümlelerin geçtiği bilgilere doğrudan ulaşım sağlayabilir, bu ilişkiler genler proteinler ya da ilgilenilen başka anahtar kelimeler ile ilgili olabilir. Chilibot'ta biyolojik kavramlar arasında ilişki ağları oluşturmak için doğal dil işleme tabanlı bir metin madenciliği yaklaşımı kullanılmaktadır. Chilibot'ta arama yapmak için gen/protein sembolleri ya da anahtar kelimeler olmak üzere iki tür terim kullanılabilir (64).

- **Illumina BaseSpace;** ürününün literatür aramaları uygulaması herkes tarafından kullanıma açıktır. Bu literatür uygulamasını kullanarak bir anahtar kelime girildiğinde kullanıcı anahtar kelimeyle uygunluk sırasına göre makalelerde geçen terimlere etiket bulutu yaklaşımı ile ulaşabilmektedir. Daha sonra bu terimlerin bulunduğu makalelere yine uygulama üzerinden ulaşım sağlanabilir. Kullanıcı hangi tür etiketlerin bu etiket bulutunda gözükmelerini istediğini terimleri filtreleyerek seçebilir. Örneğin sadece bir fenotipi ya da hastalığı filtreleyerek aranan anahtar kelimeyle ilişkili terimler bu hastalık ya da fenotip özelinde daraltılabilir. Ayrıca anahtar kelimenin aramasının yapıldığı literatür yayınlanma yılı, hangi dergide yayımlandığı ve yayın türü seçilerek daraltılabilmektedir.

3.2.5. Total Kandan miRNA İzolasyonu

- Bir gece önceden oda sıcaklığında bekletilmiş *PAXGene Blood RNA* tüpleri 10 dk 3850 g'de santrifüj edildi.
- Sıvı faz (*süpernatant*) döküldü, pellet 4 ml Rnase içermeyen suda çözdürüldü.

- Çökelti (*pellet*) çözülene kadar vortekslendi daha sonra 15 dk 3850 g'de santrifüj edildi, sıvı faz döküldü.
- Pellete 350 µL BM1 eklendi. Pellet tamamen çözülene kadar vortekslendi.
- Örnekler 1,5 mL'lik mikrosantrifüj tüpüne alındı daha sonra üzerine 300 µL BM2, 40 µL *proteinase K* eklendikten sonra elle karıştırıldı. 15 dk 55°C hibridizasyon fırınında karıştırıcının üzerinde inkübe edildi.
- Örnekler *PaxGene Shredder Spin Column*'a aktarıldı, kolonların altına 2 mL'lik ependorflar konuldu. 4 dk 15.000 g'de santrifüj edildi.
- Alttaki tüpte kalan su yeni bir 1.5 mL'lik mikrosantrifüj tüpüne aktarıldı.
- 700 µL isopropanol eklendi, vorteksleyerek karıştırıldı.
- 700 µL ürün *PaxGene RNA spin colomn*'a yerleştirildi, altına 2 mL'lik ependorf konuldu. Kapağı kapatıldı ve 15.000 g'de 1 dk santrifüj edildi. Altta kalan sıvı çöpe döküldü.
- Kalan ürün de kırmızı kolona konuldu, 15.000 g'de 1 dk santrifüj edildikten sonra altta kalan sıvı çöpe döküldü.
- 350 µL BM3 *RNA spin* kolona eklendi, 30 sn 15.000 g'de santrifüj edildi. Altta kalan sıvı çöpe döküldü.
- Her bir örnek için 10 µL *Dnase I* ve 70 µL *RDD buffer* bir PCR tüpünde karıştırıldı. Yuvarlağın tam ortasına gelecek şekilde kolona eklendi.
- 15 dk benç üzerinde inkübe edildi.
- Kolona 350 µL BM3 eklendi. 30 sn 15.000 g'de santrifüj edildikten sonra altta kalan sıvı dökülüp alta yeni bir tüp yerleştirildi.
- 500 µL BM4 kolona eklendi. 15.000 g'de 30 sn santrifüj edildi. Altta kalan sıvı döküldü.
- Tekrar 500 µL BM4 kolona eklendi. 15.000 g'de 3 dk santrifüj edildi Altta kalan sıvı çöpe döküldü.
- Kolon yeni bir tüpe yerleştirildi ağız açık bir şekilde 2 dk 15.000 g'de santrifüj edildi. Altta kalan sıvı döküldü ve alta yeni bir ependorf eklendi.
- 55 °C de ısıtılmış 55 µL Rnaz içermeyen su halkanın tam ortasına denk gelecek şekilde kolonlara eklendi. Örnekler 9 dk benç üzerinde bekletildiler. Daha sonra 4 dk 15.000 g'de inkübasyon gerçekleştirildi.

- RNA konsantrasyonları *Nanodrop ND-1000* ile ölçüldükten sonra kullanıma kadar -80 °C’de muhafaza edildi.

3.2.6. Total RNA İzolasyonu

- Hücreler *RNA protect* içerisinde oda sıcaklığına getirildi ve iyice vortekslendi.
- Hücreler 10.000 rpm’de 6 dk 23 °C’de santrifüj edildi.
- Sıvı faz atıldı.
- 350 mL *RLT Plus Buffer* eklendi ve bir dakika vortekslendi. Ardından örnekler *gDNA Eliminator Mini Spin Columns 50*’e konuldu.
- 15.000 rpm’de 1 dk santrifüj edildi.
- Kolonlar atıldı.
- 350 µL %70 Ethanol eklendi.
- Örnekler *Rneasy Mini Spin Column*’a aktarıldı.
- 15.000 rpm’de 1 dk santrifüj edildi.
- Tüpün altındaki sıvı çöpe döküldü ve yeni tüp alındı.
- Örneklerin üzerlerine 700 µL RW1 eklendi.
- 15.000 rpm’de 1 dk santrifüj edildi. Tüpün altındaki sıvı çöpe döküldü.
- 500 µL RPE eklendi.
- Tekrar 15.000 rpm’de 1 dk santrifüj edildi. Tüpün altındaki sıvı çöpe döküldü.
- 500 µL RPE eklendi. 15.000 rpm’de 2 dk santrifüj edildi. 15.000 rpm’de 1 dk santrifüj edildi.
- Tüpler 1 dk kapakları açık şekilde boş çevrildi.
- Alt kısım atıldı, kolonlar 1.5 mL’lik ependorf tüplerinin üstlerine yerleştirildi.
- Kolonların tam ortasındaki daireye gelecek şekilde 20 µL Rnaz içermeyen su eklendi ve 5 dk bekletildi. Ardından 4 dk 15.000 rpm’de santrifüj edildi.
- RNA konsantrasyonları *Nanodrop ND-1000* ile ölçüldükten sonra kullanıma kadar -80 °C’de muhafaza edildi.

3.2.7. miRNA’lar için cDNA Sentezi

cDNA sentezi için *TaqMan® MicroRNA Reverse Transcription Kit* (ABI) kullanıldı, sentez 5 ng/ul’e dilue edilmiş RNA’lar kullanılarak yapıldı. Referans

primeri olarak seçilen *Small Nucleolar RNA, C/D Box 48* (RNU48) ile her seferde iki miRNA olacak şekilde primer havuzu hazırlandı. RT-primer havuzu, 10x RT tampon, RNAz inhibitörü, 100 mM dNTP, *Reverse Transcriptase* ve RNAz içermeyen suyla birlikte reaksiyon karışımı hazırlandı. Hazırlanan karışımdan her bir örnek için 13 uL kullanıldı ve üzerlerine 2 uL RNA (10 ng) eklendi. Hazırlanan örnekler uygun reaksiyon koşulları ayarlandıktan sonra polimeraz zincir reaksiyonu (*polymerase chain reaction-PCR*) cihazına yerleştirildi. Reaksiyon tamamlandıktan sonra hazır cDNA örnekleri seyreltilmeden -80'e konularak muhafaza edildi.

Primer Havuzu	Hacim (µl)
miR-125a-5p	10 µl
miR-183-5p	10 µl
RNU48	10 µl
RNAz içermeyen dH ₂ O	970 µl
Toplam hacim	1000 µl

Primer Havuzu	Hacim (µl)
miR-15b-5p	10 µl
miR-125a-5p	10 µl
RNU48	10 µl
RNAz içermeyen dH ₂ O	970 µl
Toplam hacim	1000 µl

Reverse Transkripsiyon Reaksiyonu	1 rxn (ul)
10X RT Buffer	1,5 µl
Rnase ihibitor	0,19 µl
100 mM dNTP	0,3 µl
Reverse Transcriptase	3,9 µl
RT Primer Pool	26 µl
RNAz İçermeyen Su	78 µl
Toplam hacim	39.13 µl

Reaksiyon Koşulları

16 °C 30 dk

42 °C 30 dk

85 °C 5 dk

4 °C ∞

3.2.8. miRNA'lar için qRT-PCR

Bir önceki aşamada 6 iyi gidişli, 6 kötü gidişli hastanın cDNA çevrimi yapıldıktan sonra, her biri için uygun *TaqMan*® *MicroRNA Assays* (ABI) primerleri ile miR-15b-5p, miR-183-5p, miR-125a-5p ve RNU48 primerleri ve *TaqMan*® *Universal PCR Master Mix, no AmpErase*® *UNG* (ABI) kiti kullanılarak Kantitatif Gerçek-Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu gerçekleştirildi.

qRT-PCR reaksiyonu	1 rxn (µl)
<i>TaqMan</i> ® <i>Universal PCR Master Mix</i>	10 µl
<i>TaqMan</i> ® <i>MicroRNA Assay</i> (20X)	1 µl
dH ₂ O	7.5 µl

3.2.9. mRNA'lar için cDNA Sentezi

cDNA sentezi için *QuantiTect Reverse Transcription Kit* (50 rxn) (Qiagen) kullanıldı, sentez için RNA'lar toplam RNA miktarı 12 µl 'de 500 ng olacak şekilde RNAz içermeyen su ile dilue edildi. Her bir örnek için 12 µl'lik RNA ve su karışımına 2 µl *gDNA wipeout* eklendi.

Mix 1

Reaksiyon Karışımı	1 rxn (µl)
RNA ve RNAz içermeyen dH ₂ O	12 µl
<i>gDNA wipeout</i>	2 µl

Toplam 14 µl olacak şekilde hazırlanan örnekler 42 °C' de 5 dk inkübe edildi.

Reverse Transkripsiyon Reaksiyonu	1 rxn (ul)
Reaksiyon Tamponu (7x)	4 µl
Reverse Transcriptase	1 µl
Primer (0.5 µl)	1 µl

Reaksiyon sonrasında örnekler doğrudan buza alındı. Reaksiyon tamponu, *reverse transcriptase* ve primer kullanılarak bir reaksiyon karışımı oluşturuldu. Hazırlanan reaksiyon karışımından her bir örnek üzerine 6 µl eklendi.

Ardından örnekler;

42 °C' de 30 dk

95 °'de 5 dk

İnkübe edildi. Reaksiyonun ardından cDNA'ların üzerine 60 µl su eklenerek 1:4 oranında dilue edildi.

3.2.10. mRNA'lar için qRT-PCR

Aday hedef genlerin ifade analizi için qRT-PCR reaksiyonu gerçekleştirildi. Aday hedef genler olarak seçilen *PPARα*, *NR3C1*, *NFKB1* primerleri bu genlerin ifadesini kötü gidişli ve iyi gidişli hastalarda analiz etmek için kullanıldı. *GAPDH* ise gen ifadesini normalize etmek için kullanıldı. *PPARα*, *NR3C1*, *NFKB1*, *GAPDH* hedef genlerini çoğaltmak için her biri kendi dizilerine göre tasarlanmış forward ve reverse primerler, Promega GoTaq® Master Mix ve su kullanılarak her bir gen için ayrı reaksiyon karışımı hazırlandı. Reaksiyon BioRad IQ5 cihazında gerçekleştirildi, her örnek 3 teknik replika olacak şekilde çalışıldı.

qRT-PCR reaksiyonu	1 rxn (µl)
2x Promega Master Mix	5 µl
Forward Primer	0.4 µl
Reverse Primer	0.4 µl
Distile su	2.2 µl

Toplam reaksiyon karışımı: 8 µl

cDNA: 2 µl

Toplam karışım miktarı: 10 µl

3.2.11. Verilerin Değerlendirilmesi ve İstatistiksel Analiz

miRNA'ların ifadesini belirlemek için RNU48, mRNA'ların ifadesini belirlemek için *GAPDH* referans gen olarak kullanarak gen ifadesi normalize edildi. $2^{-\Delta\Delta C_t}$ yöntemi kat değişimlerini ile hesaplamak için kullanıldı ve kat değişimlerinin grafikleri GraphPad Prism 5.0 kullanılarak oluşturuldu ve istatistiksel analiz yapıldı. Kat değişimlerinin anlamlı olup olmadığının incelenmesi için Mann-Whitney U ve unpaired t-test yapıldı. Bu testlere göre p değeri 0.05'ten küçük olan sonuçlar anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

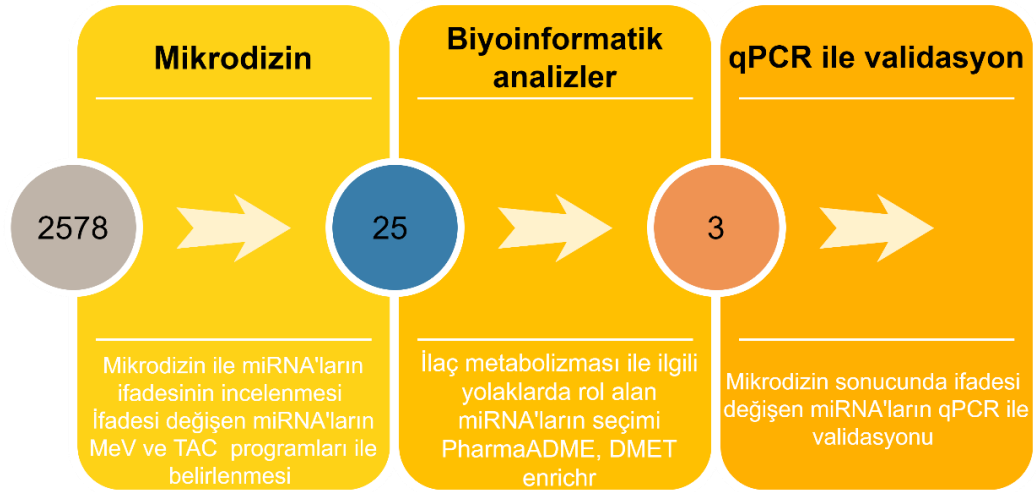
4.1. İlaç Direnci ve İnflamasyonla İlişkili miRNA'lar ve Hedef Genlerin Belirlenmesi

Grubumuzun daha önce görev aldığı ERA-NET (Otoinflamatuvar Hastalıklarda Kişiselleştirilmiş Moleküler Tıp İçin Klinik ve Deneysel Çalışma: Modifiye edici Faktörlerin Rolü) kapsamında yapılan mikrodizin çalışmalarında elde edilen ham veriler daha sonra grubumuzun TÜBİTAK 1001 (Ailevi Akdeniz Ateşi (AAA) Hastalarında Saptanan miRNA'ların İlaç Direnci Üzerindeki Etkilerinin Araştırılması) projesi dahilinde MeV programı kullanılarak kolşisin dirençli ve kolşisin duyarlı AAA hasta grupları arasında tekrar analiz edilmiştir. Bu tez çalışmasında MeV programı ile yapılan analiz sonucunda ifadesi en az 2 kat değişen miRNA'ların miRWalk 2.0 ve miRTarBase veritabanları aracılığıyla olası ve bilinen hedef genleri araştırılmıştır. İlgili çalışmaları içeren iş akış şeması Şekil 4.1'de verilmiştir.

4.1.1. İlaç Direnci ve İnflamasyonla İlişkili miRNA'lar

Bu aşamada miR-6756-5p, miR-6747-3p, miR-6776 ve miR-6894-3p'nin hedef genleri en fazla 4 farklı veritabanı tarafından tahmin edilmiş olduğu için bu miRNA'ların hedef gen listeleri oluşturulamamıştır. Genevenn programı kullanılarak ilaç metabolizması ile ilişkili gen listesi ve hedef gen listelerinin ortaklığına bakılmış, böylece her bir miRNA'nın olası hedef genleri içerisindeki ilaç metabolizması ile ilişkili genler saptanmıştır. Bu miRNA'lardan miR-937-5p ve miR-1247-3p ilaç metabolizması ile ilgili sadece bir adet olası hedef gene sahip olduğu, miR-3620-5p ise ilaç metabolizması ile ilgili olası hedef gene sahip olmadığı için yolak analizleri gerçekleştirilememiştir. Geri kalan 17 miRNA'nın hedef genleri için enrichr aracılığı ile KEGG yolak analizi gerçekleştirilmiştir. Bu miRNA'lardan sayıca en fazla ilaç metabolizması ile ilişkili olası geni hedefleyen ve bu genlerin yolak analizleri sonucunda ksenobiyotiklerin Sitokrom P450 aracılı metabolizması, ABC taşıyıcıları, ilaç metabolizması ve ilaç direnci ile ilişkili yolakların üst sıralarda olduğu miRNA'lar (miR-183-5p, miR-125a-5p, miR-15b-5p) daha sonraki aşamalarda ifade değişimlerini

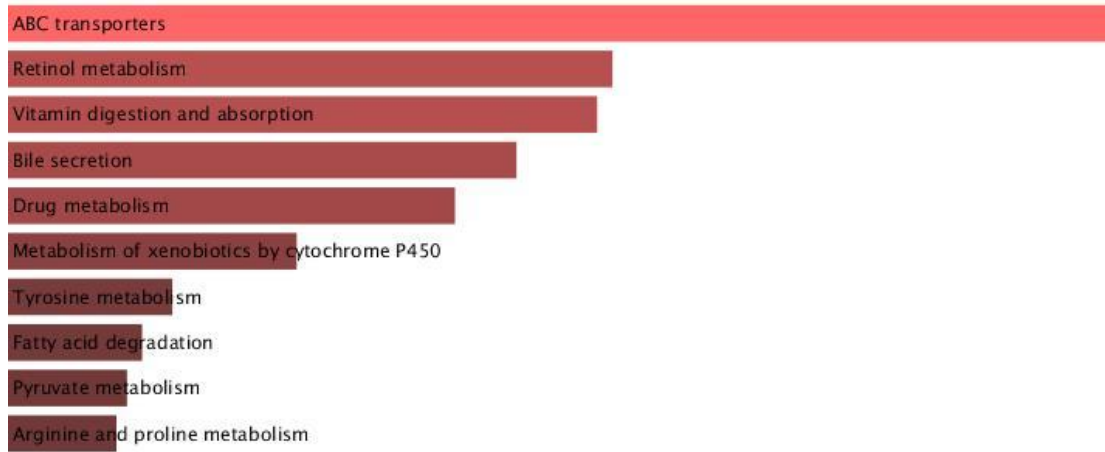
valide etmek için seçilmiştir. Seçilen üç miRNA'nın ilaç direnci ile ilişkili olası hedef genleri Cytoscape programı aracılığı ile görselleştirilmiştir.



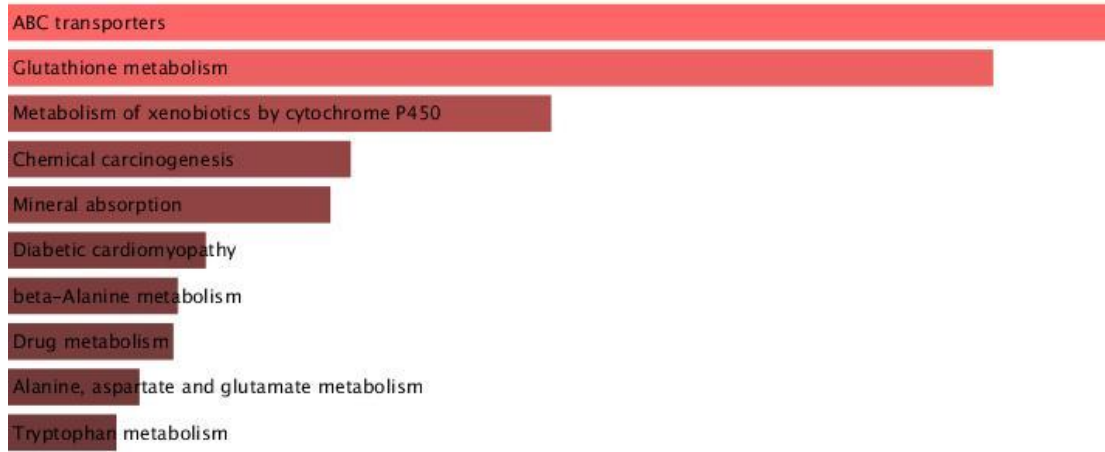
Şekil 4.1. Mikrodizin çalışmalarından aşamasından valide edilen miRNA'ların seçimine kadar iş akışını gösteren görsel.



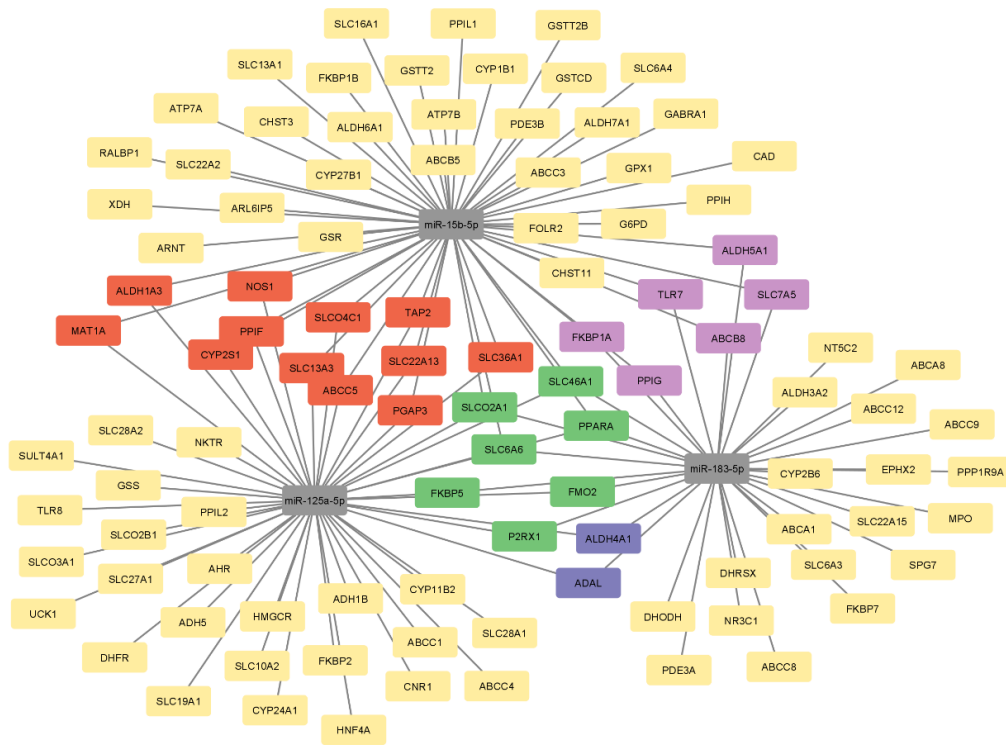
Şekil 4.2. miR-183-5p'in hedef genlerinin görev aldıkları KEGG yolları. Yollar istatistiksel olarak anlamlılığa göre sıralanmıştır ve bar renkleri koyulaştıkça miRNA'nın o yolaktaki etkisi azalmaktadır.



Şekil 4.3. miR-125a-5p'in hedef genlerinin görev aldıkları KEGG yolları. Yollar istatistiksel olarak anlamlılığa göre sıralanmıştır ve bar renkleri koyulaştıkça miRNA'nın o yolaktaki etkisi azalmaktadır.



Şekil 4.4. miR-15b-5p'in hedef genlerinin görev aldıkları KEGG yolları. Yollar istatistiksel olarak anlamlılığa göre sıralanmıştır ve bar renkleri koyulaştıkça miRNA'nın o yolaktaki etkisi azalmaktadır.

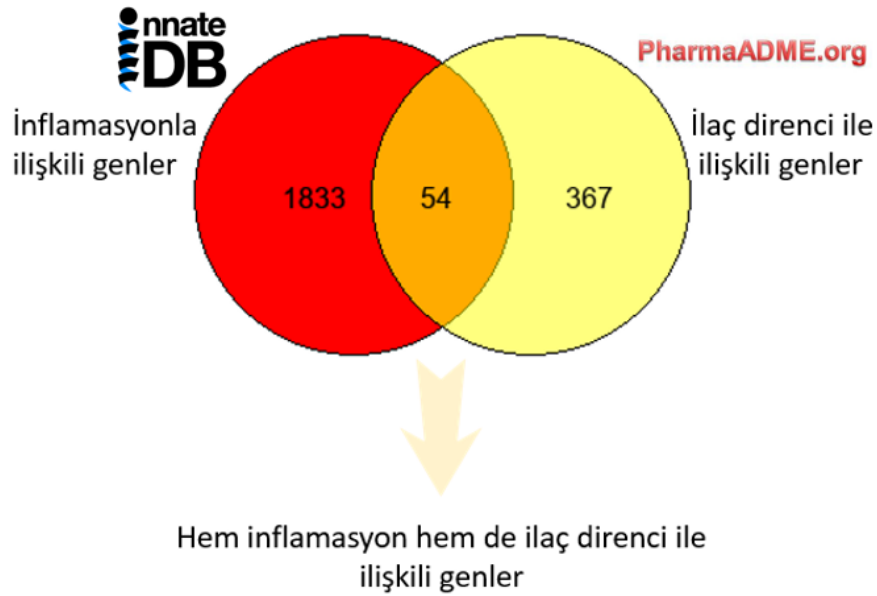


Şekil 4.5. miR-15b-5p, miR-125a-5p ve miR-183-5p'nin olası hedef genlerinin Cytoscape programı ile gösterimi. Kırmızı renkli karelerde gözükten hedef genler hem miR-125a-5p hem de miR-15b-5p'nin olası hedef genidir, lila renkli karelerde gözükten hedef gen.

4.1.2. İlaç direnci ve İnflamasyonla İlişkili Hedef Genler

Kolşisin dirençli hastalarda ifadesi değişen miRNA'ların potansiyel hedef genlerinin inflamasyon ve ilaç direnci ile ilişkilerini belirlemek için inflamasyon ve ilaç direnci ile ilişkili genlerin ayrı ayrı listesi oluşturuldu. Daha sonra bu iki listede ortak olan genler tespit edilerek hem inflamasyonla ilişkili hem de ilaç direnci ile ilişkili genler belirlendi. Bu genlerden, 4.1.1. numaralı bulgular kısmında seçilen miRNA'ların potansiyel hedef genleri arasında olanlar literatür aramaları için listelendi. İnflamasyonla ilişkili bir liste oluşturmak için IRIS veri tabanındaki genler ve Matthew J. Loza ve ark. tarafından hazırlanan inflamasyonla ilişki genler (65) birleştirilerek bir liste oluşturuldu. Aynı şekilde, PharmaADME veritabanında ilaç direnciyle, ilaç metabolizmasıyla ve ilaç tutunmasıyla ilişkilendirilen genler, DMET™ (*Drug Metabolizing Enzymes and Transporters Plus Panel*-Thermo Fisher) ve miRTarBase veritabanındaki ilaç metabolizmasıyla ilişkili genleri kullanarak ikinci bir liste oluşturuldu.

İnflamasyon ile ilişkili genleri içeren hedef gen listesi ile ilaç direnci ile ilişkili genleri içeren hedef gen listesinin kesişim kümeleri oluşturuldu. Bu kesişim kümesinde bulunan hem inflamasyon hem de ilaç direnci ile ilişkili 54 genlik bir liste oluşturuldu. Bu 54 genlik liste içerisinde 19 tanesinin daha önceki aşamalarda ilaç direnci ile ilişkilendirilen üç miRNA tarafından hedeflendiği tahmin edilen miRNA'lar olduğu gösterildi. Bu 19 genin AAA hastalarında görülen kolşisin direnci ile olası bağlantısını araştırmak amacıyla literatür analizleri gerçekleştirildi. Bu analizlerin sonucunda 19 genden; *NFKB1*, *PPARA* ve *NR3C1*'in kolşisin direnci ile alakalı olabilecek yollarda rol alan proteinler olduğu bulundu.



Şekil 4.6. İnflamasyon ve ilaç direnci ile ilişkili genlerin kesişim kümesini gösteren Venn diyagramı

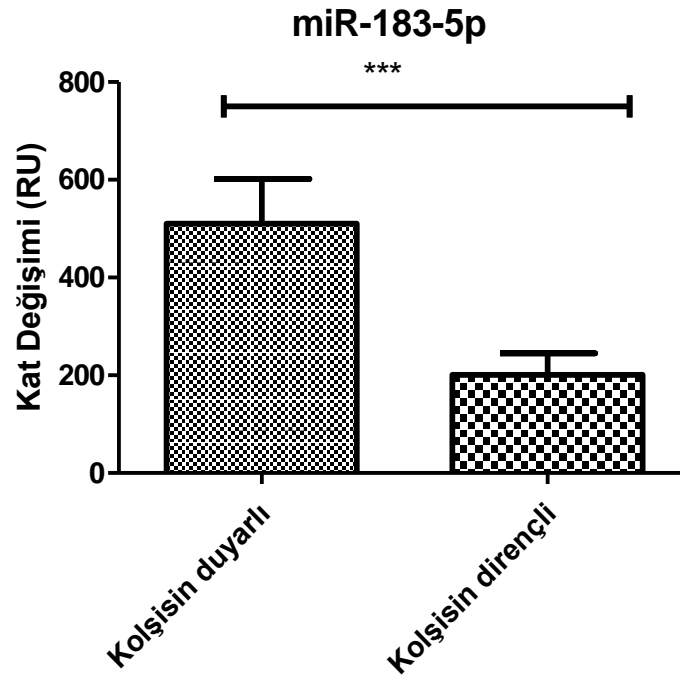
Olası hedef genleri ilaç direnci ve metabolizması ile ilişkili yollarda yer alan ve sayıca daha fazla ilaç direnci ile ilişkili geni hedeflediği tahmin edilen miR-15b-5p , miR-125a-5p , miR-183-5p ilaç direnci ile ilişkili bulunmuştur. İlaç direnci ve inflamasyonla ilişkili ortak genler arasından bu miRNA'ların olası hedef genlerinden *PPARA*, *NFKB1*, *NR3C1* kolşisinin metabolizmasından ve atılımından sorumlu genleri doğrudan etkiledikleri bilindiği ve AAA patolojisiyle uyum gösterdiği için hastalarda gözükken kolşisin direnci ile ilişkili olabilecek olası hedef genler olarak seçilmiştir.

4.2. Aday miRNA'ların qRT-PCR ile Validasyonu

Olası hedef genlerine göre ilaç direnci ve inflamasyonla en çok ilişki gösterdiği düşünülen miRNA'ların ifadesindeki değişim qRT-PCR'la valide edilmeye çalışılmıştır. Bu amaçla miR-15b-5p, miR-183-5p ve miR-125a-5p'nin altı kolşisin altı kolşisin duyarlı AAA hastasında ifade analizleri yapılmıştır.

4.2.1. hsa-miR-183-5p'nin qRT-PCR ile Validasyonu

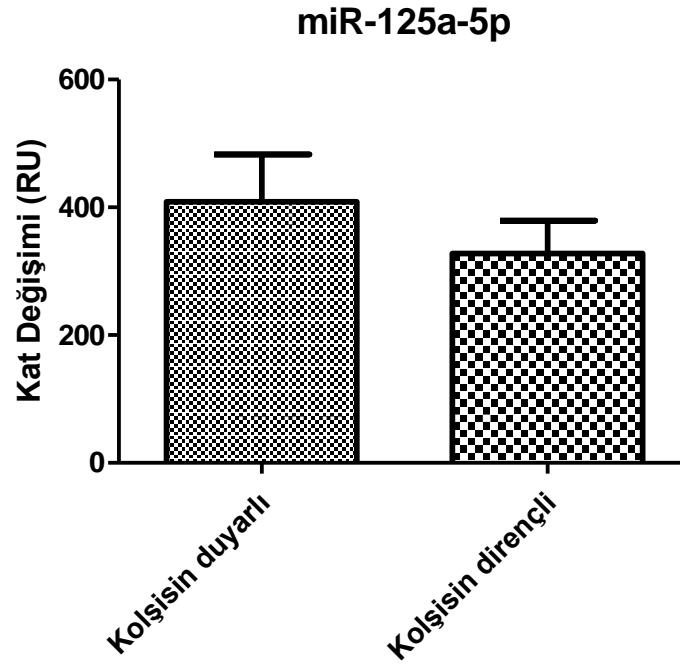
Kolşisin dirençli ve kolşisin duyarlı altışar hastanın cDNA'ları kullanılarak miR-183-5p için yapılan qRT-PCR sonucunda kolşisin dirençli bireylerde kolşisin duyarlı bireylere göre anlamlı olarak 2,87 kat azalış görülmüştür ($p=0.0007$) (Şekil 4.7.).



Şekil 4.7. miR-183-5p'nin kolşisin duyarlı ve kolşisin dirençli hasta grubundaki qRT-PCR sonuçları. (* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$.)

4.2.2. hsa-miR-125a-5p'nin qRT-PCR ile Validasyonu

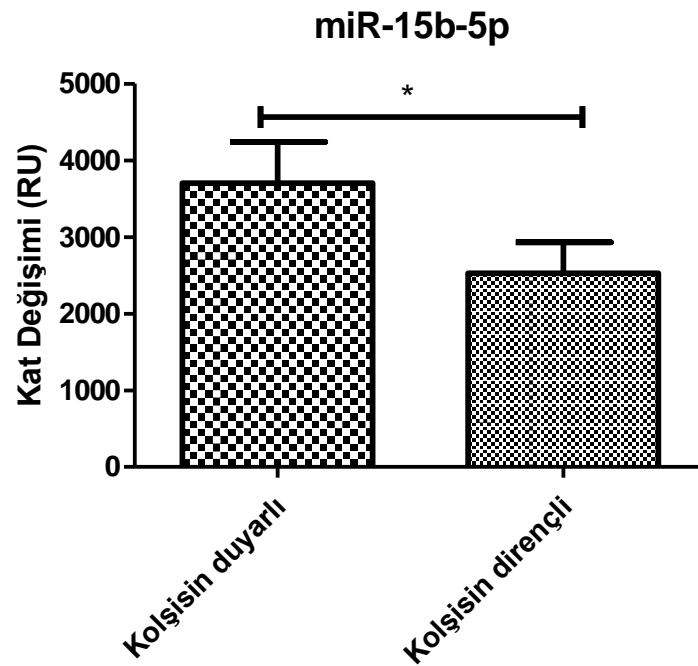
Kolşisin dirençli ve kolşisin duyarlı AAA hastalarından elde edilen cDNA'lar kullanılarak miR-125a-5p için yapılan qRT-PCR sonucunda kolşisin dirençli AAA hastalarında kolşisin duyarlı AAA hastalarına göre 1,32 kat azalış görülmüştür ($p=0,3936$) (Şekil 4.8.).



Şekil 4.8. miR-125a-5p'nin kolşisin duyarlı ve kolşisin dirençli hasta grubundaki qRT-PCR sonuçları. (* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$.)

4.2.3. hsa-miR-15b-5p'nin qRT-PCR ile Validasyonu

Kolşisin dirençli ve kolşisin duyarlı AAA hastalarından elde edilen cDNA'lar kullanılarak miR-15b-5p için yapılan qRT-PCR sonucunda kolşisin dirençli AAA hastalarında kolşisin duyarlı AAA hastalarına göre anlamlı olarak 2,06 kat azalış görülmüştür ($p=0,0473$) (Şekil 4.9.).



Şekil 4.9. miR-15b-5p'nin kolşisin duyarlı ve kolşisin dirençli hasta grubundaki qRT-PCR sonuçları. (*P <0,05; **P < 0,01; ***P < 0,001.)

Tablo 4.1. Mikrodizin analizleri ve qPCR analizi sonucunda miR-183-5p, miR-15b-5p, miR-125a-5p'nin kat değişimlerinin karşılaştırılması.

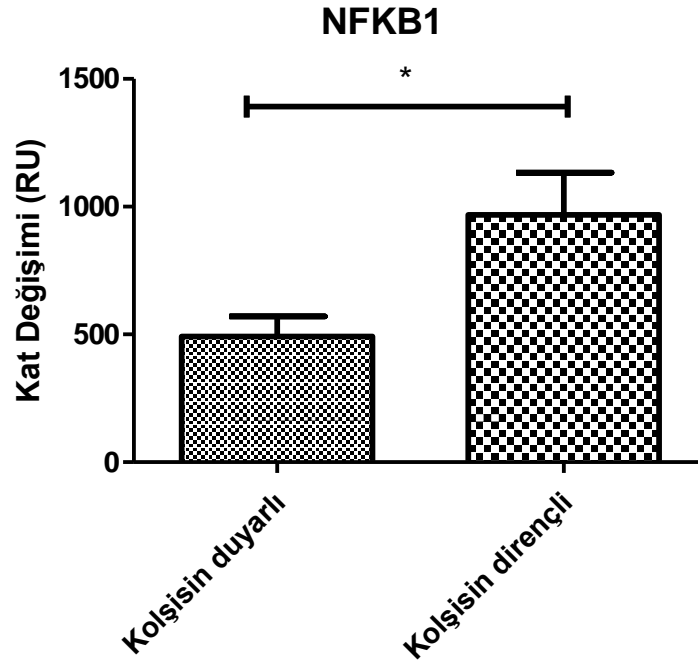
	Multi Experiment Viewer(MeV)	Transcriptome Analysis Console (TAC)	qRT-PCR sonuçları
hsa-miR-183-5p	-3,8	-4,13	-2,87
hsa-miR-15b-5p	-2,9	-2,44	-2,06
hsa-miR-125a-5p	-4,5	-3,6	-1,32

4.3. Hedef Genlerin İfadesinin qRT-PCR ile Karşılaştırılması

İfadesi anlamlı olarak değişen miRNA'ların inflamasyon ve ilaç direnci ile ilişkili yollarda rol alan olası hedef genleri seçilerek kolşisin duyarlı ve kolşisin dirençli AAA hastalarında ifadesi araştırılmıştır.

4.3.1. *NFKB1*'in qRT-PCR ile Analizi

NFKB1 hem miR-15b-5p hem de miR-183-5p tarafından hedeflendiği tahmin edilen bir gen dir. *NFKB1* NF- κ B protein kompleksinin p50 alt ünitesini kodlar. NF- κ B'nin *ABCB1* geninin promotör bölgesine bağlanarak ifade seviyesinin artmasına sebep olduğu gösterilmiştir (71). Bu nedenle *NFKB1*'in kolşisin direncinde rol oynayabileceği düşünülmüş ve ifadesi kolşisin dirençli ve kolşisine duyarlı AAA hastalarında analiz edilmiştir. Kolşisin dirençli ve kolşisin duyarlı AAA hastalarından elde edilen cDNA'lar kullanılarak *NFKB1* primerleri ile yapılan qRT-PCR sonucunda kolşisin dirençli AAA hastalarında kolşisin duyarlı AAA hastalarına göre anlamlı olarak 1,75 kat artış görülmüştür. ($p=0,0147$) (Şekil 4.10.).

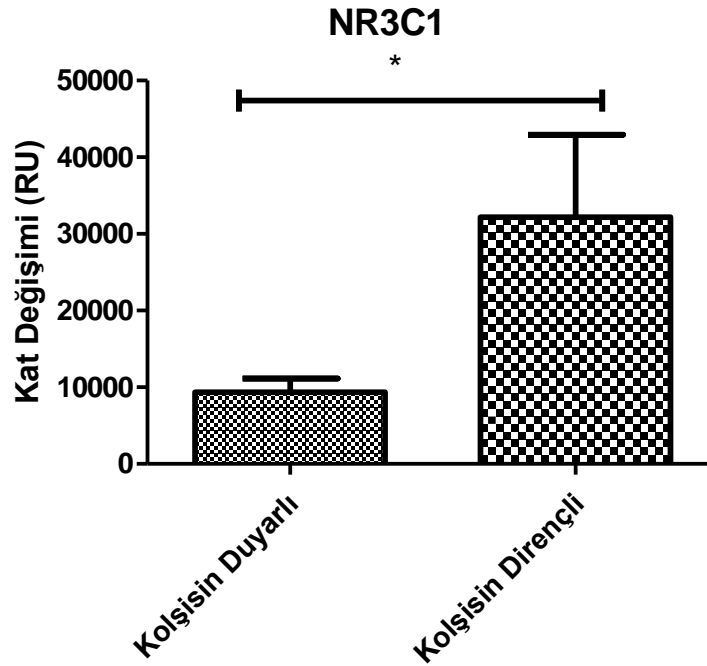


Şekil 4.10. *NFKB1*'nin kolşisin duyarlı ve kolşisin dirençli hasta grubundaki qRT-PCR sonuçları. (* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$.)

4.3.2. *NR3C1*'in qRT-PCR ile Analizi

NR3C1 biyoinformatik araçlarla miR-183-5p'nin hedef geni olduğu tahmin edilen bir gen dir. *NR3C1* tarafından kodlanan glukokortikoid reseptörünün kolşisin metabolizmasından sorumlu *CYP3A4*'ün ifadesini hem doğrudan hem de *PXR*

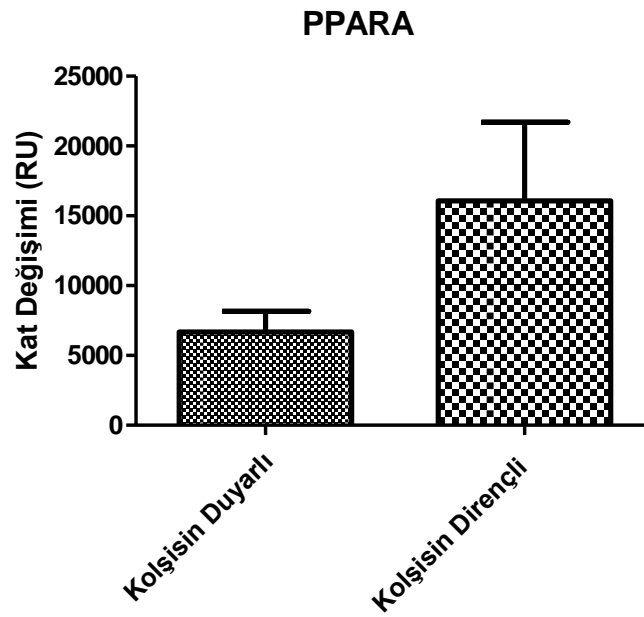
üzerinden dolaylı olarak etkilediği gösterilmiştir (73). Bu sebeple bu genin ifade değişikliği kolşisin direnci açısından önemli bulunmuş ve bu tez kapsamında değerlendirilmiştir. Kolşisin dirençli ve kolşisin duyarlı AAA hastalarından elde edilen cDNA'lar kullanılarak *NR3C1* primerleri ile yapılan qRT-PCR sonucunda kolşisin dirençli AAA hastalarında kolşisin duyarlı AAA hastalarına göre anlamlı olarak 2,36 kat artış görülmüştür ($p=0,0494$) (Şekil 4.11.).



Şekil 4.11. *NR3C1*'nin kolşisin duyarlı ve kolşisin dirençli hasta grubundaki qRT-PCR sonuçları. (* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$.)

4.3.3. *PPARA*'in qRT-PCR ile Analizi

miRWalk veritabanına göre *PPARA*'nın miR-15b-5p, miR-125a-5p ve miR-183-5p'nin hedef geni olduğu tahmin edilmektedir. *PPARA* *CYP3A4*'ün ifadesini düzenlediği bilinen nükleer reseptörlerden biridir (75). Bu sebeple kolşisin direnci üzerinde dolaylı bir etkisinin olabileceği düşünülmüş ve kolşisin dirençli hastalarda ifade değişikimi analiz edilmiştir. Kolşisin dirençli ve kolşisin duyarlı AAA hastalarından elde edilen cDNA'lar kullanılarak *PPARA* primerleri ile yapılan qRT-PCR sonucunda kolşisin dirençli AAA hastalarında kolşisin duyarlı AAA hastalarına göre 2,10 kat artış görülmüştür ($p=0,1076$) (Şekil 4.12.).



Şekil 4.12. PPARA'nın kolşisin duyarlı ve kolşisin dirençli hasta grubundaki qRT-PCR sonuçları. (*P <0,05; **P < 0,01; ***P < 0,001.)

4.4. Kolşisin Dirençli Hücrelerde miRNA ve Hedef Genlerinin qRT-PCR ile Analizi

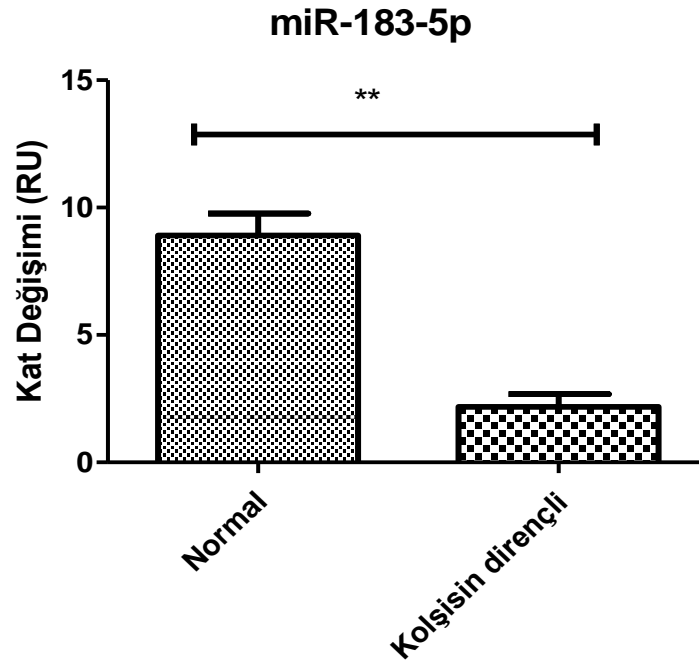
Grubumuzun tamamlamış olduğu grubumuzun TÜBİTAK 1001 (Ailevi Akdeniz Ateşi (AAA) Hastalarında Saptanan miRNA'ların İlaç Direnci Üzerindeki Etkilerinin Araştırılması) projesinin son iş paketi kapsamında oluşturulan kolşisin dirençli HEPG2 (hepatosellüler karsinoma hücre hattı) hücre hattından, tez kapsamında RNA izolasyonu yapılarak ifadesi değişen miRNA'ların ve hedef genlerin analizi gerçekleştirilmiştir.

Proje kapsamında kolşisin dirençli hücre hattı oluşturulurken öncelikli olarak kolşisin dozunu belirlemek amacıyla MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide) analizi gerçekleştirilmiştir. Yapılan analizler neticesinde kolşisin direnci için 72 saat ve 12.3723 ng/ml eşik değeri olarak belirlenmiştir. Daha sonra 1 ng'dan başlayarak 72 saatlik kolşisin uygulaması arkasından 24 saatlik kolşisin içermeyen ortamda iyileşme aşaması gerçekleştirilmiştir, daha sonra 72 saatlik 2 ng'lık kolşisin uygulaması ardından 24 saatlik kolşisin içermeyen ortamda 24 saatlik iyileşme evresi ile döngüye devam

edilmiştir. Kolşisin dozları bu döngü içerisinde 4 ng, 5 ng, 8 ng, 10 ng, 15 ng ve son olarak 20 ng'a arttırıldıktan sonra hücreler RNA izolasyonu için toplanmıştır.

4.4.1. miR-183-5p'nin qRT-PCR ile Analizi

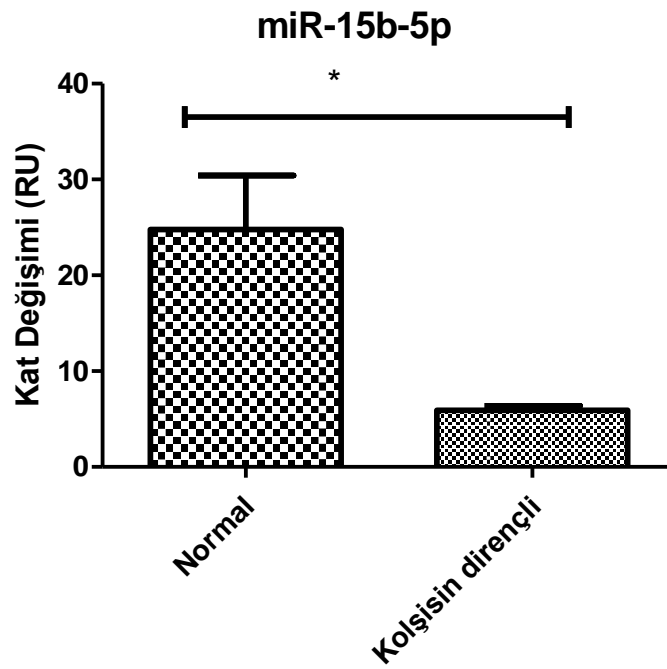
Kolşisin dirençli HEPG2 hücre hattından ve kolşisin uygulanmamış normal HEPG2 hücre hattından elde edilen cDNA'lar kullanılarak miR-183-5p primerleri ile yapılan qRT-PCR sonucunda kolşisin dirençli hücre hattında kolşisin uygulanmamış hücre hattına göre miR-183-5p ifadesinde anlamlı olarak 4,31 kat azalış görülmüştür. ($p=0,0025$) (Şekil 4.13.).



Şekil 4.13. miR-183-5p'nin normal ve kolşisin dirençli hücre hatlarındaki qRT-PCR sonuçları. (* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$.)

4.4.2. miR-15b-5p'nin qRT-PCR ile Analizi

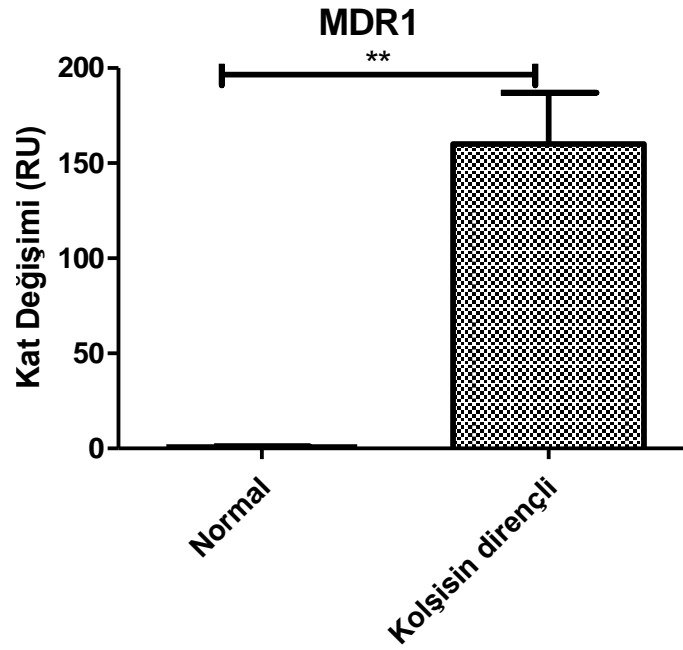
Kolşisin dirençli HEPG2 hücre hattından ve kolşisin uygulanmamış normal HEPG2 hücre hattından elde edilen cDNA'lar kullanılarak miR-15b-5p primerleri ile yapılan qRT-PCR sonucunda kolşisin dirençli hücre hattında kolşisin uygulanmamış hücre hattına göre miR-15b-5p ifadesinde anlamlı olarak 3,88 kat azalış görülmüştür. ($p=0,0286$) (Şekil 4.14.).



Şekil 4.14. miR-15b-5p'nin normal ve kolşisin dirençli hücre hatlarındaki qRT-PCR sonuçları. (*P <0,05; **P < 0,01; ***P < 0,001.)

4.4.3. *MDR1*'in qRT-PCR ile Analizi

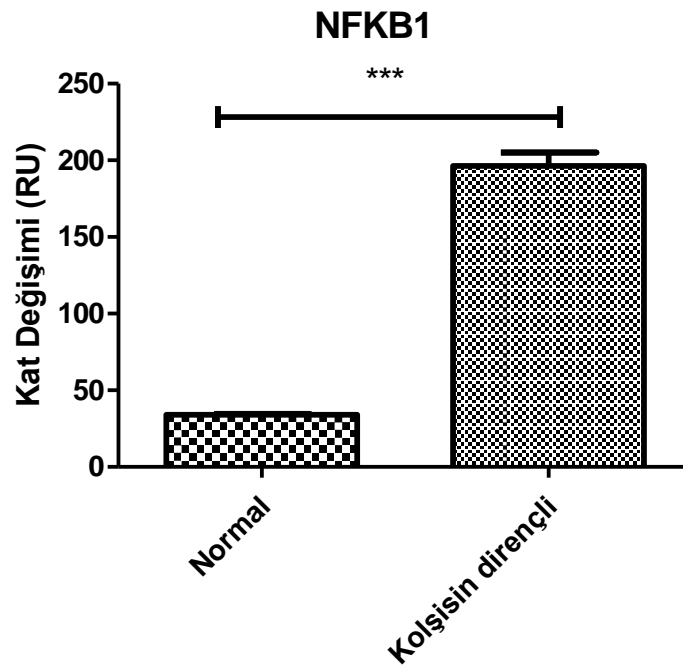
Kolşisin dirençli HEPG2 hücre hattından ve kolşisin uygulanmamış normal HEPG2 hücre hattından elde edilen cDNA'ler kullanılarak *MDR1* primerleri ile yapılan qRT-PCR sonucunda kolşisin dirençli hücre hattında, kolşisin uygulanmamış hücre hattına göre *MDR1* ifadesinde anlamlı olarak 161,46 kat artış görülmüştür. (p=0,0041) (Şekil 4.15.).



Şekil 4.15. *MDR1*'nin normal ve kolşisin dirençli hücre hatlarındaki qRT-PCR sonuçları. (*P <0,05; **P < 0,01; ***P < 0,001.)

4.4.4. *NFKB1*'in qRT-PCR ile Analizi

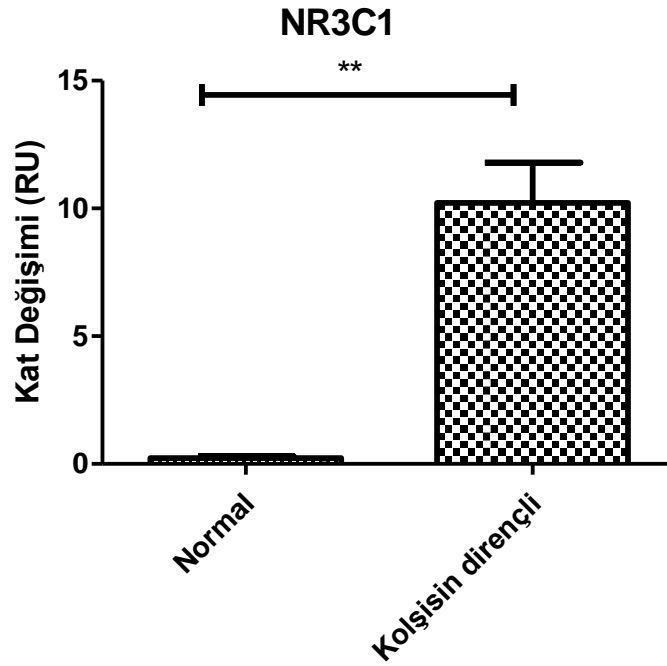
Kolşisin dirençli HEPG2 hücre hattından ve kolşisin uygulanmamış normal HEPG2 hücre hattından elde edilen cDNA'ler kullanılarak *NFKB1* primerleri ile yapılan qRT-PCR sonucunda kolşisin dirençli hücre hattında kolşisin uygulanmamış hücre hattına göre *NFKB1* ifadesinde anlamlı olarak 5,75 kat artış görülmüştür. (p<0.0001) (Şekil 4.16.).



Şekil 4.16. *NFKB1*'in normal ve kolşisin dirençli hücre hatlarındaki qRT-PCR sonuçları. (*P <0,05; **P < 0,01; ***P < 0,001.)

4.4.5. *NR3C1*'in qRT-PCR ile Analizi

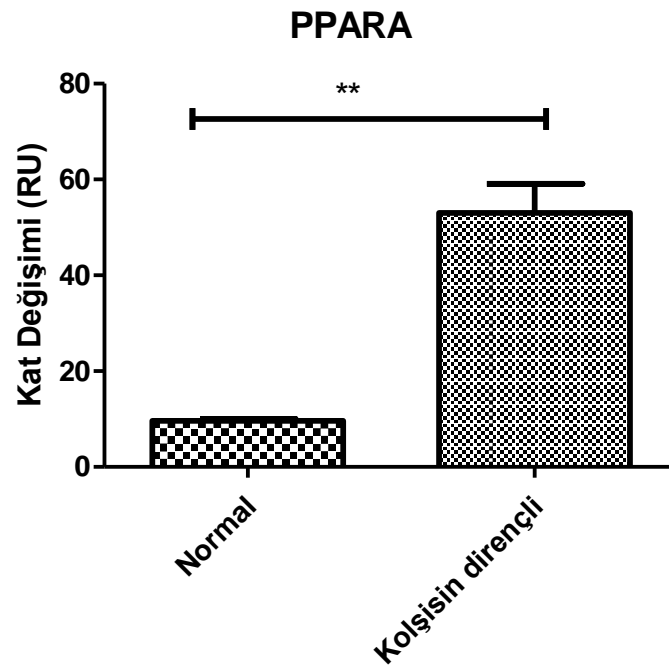
Kolşisin dirençli HEPG2 hücre hattından ve kolşisin uygulanmamış normal HEPG2 hücre hattından elde edilen cDNA'ler kullanılarak *NR3C1* primerleri ile yapılan qRT-PCR sonucunda kolşisin dirençli hücre hattında kolşisin uygulanmamış hücre hattına göre *NR3C1* ifadesinde anlamlı olarak 45,68 kat artış görülmüştür. (p=0,0031) (Şekil 4.17.).



Şekil 4.17. *NR3C1*'in normal ve kolşisin dirençli hücre hatlarındaki qRT-PCR sonuçları (* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$.)

4.4.6. *PPARA*'nın qRT-PCR ile Analizi

Kolşisin dirençli HEPG2 hücre hattından ve kolşisin uygulanmamış normal HEPG2 hücre hattından elde edilen cDNA'ler kullanılarak *PPARA* primerleri ile yapılan qRT-PCR sonucunda kolşisin dirençli hücre hattında kolşisin uygulanmamış hücre hattına göre *PPARA* ifadesinde anlamlı olarak 5,43 kat artış görülmüştür ($p=0,0021$) (Şekil 4.18.).



Şekil 4.18. *PPARA*'nın normal ve kolşisin dirençli hücre hatlarındaki qRT-PCR sonuçları. (* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$.)

5. TARTIŞMA

Ailevi Akdeniz ateşi *MEFV* genindeki mutasyonlar sebebiyle görülen sistemik bir otoinflamatuvar hastalıktır. Hastalığın en önemli tedavisi günlük kolşisin kullanımınıdır.

Fakat hastaların yüzde %2-5'lik bir kısmında kolşisin direnci görülmektedir. AAA hastalarında kolşisin direnci oranları farklı kaynaklarda değişen aralıklarla verilmektedir. Bunun altında yatan sebep kolşisin direncini tanımlamanın zorluğu olabilir. Hastanın tedaviye devamlılığının takip edilmesindeki güçlük gerçek kolşisin direnci gösteren hastalarla tedaviye uyum göstermeyen hastaların birbirinden ayırt edilmesini zorlaştırmaktadır. Kolşisinin hayat boyu günlük kullanılması gereken bir ilaç olması ve bazı hastalarda gastrointestinal yan etkilerin görülmesi hastanın tedaviye devamlılığını zorlaştıran etmenlerdir. Bunun yanısıra kolşisini etkili olduğu dozlarda tolere edemediği için kolşisinin etkili olmadığı bir hasta grubu mevcuttur. Kolşisin intoleransı olan bu hasta grubunda kolşisin direncinde olduğu gibi hasta uygun tedaviye erişemediği için atakların devam ettiği görülmektedir. Kolşisin intoleransı olan hasta grubunun bazen kolşisin dirençli hasta grubuyla karışabildiği görülmektedir. Bu sebeple kolşisin direncinin genel bir tanımı olması oldukça önemlidir. Kolşisin direncinin en güncel tanımı hastada tolere edilebilen en yüksek doz kolşisin kullanılmasına rağmen altı aydan uzun bir süre ayda bir ya da daha fazla sayıda atak varlığı, ataklar arasındaki dönemde CRP ve SAA seviyelerinde artış görülmesidir. Kolşisin direncinin görüldüğü bu hasta grubunda etkinliği ve güvenilirliği kanıtlanmış biyolojik ajanların kullanımı mümkündür. Fakat bu ilaçların maliyetinin oldukça yüksek olması sebebiyle kolşisin kullanımı halen tercih sebebidir. Kolşisin direnci tanısının zaman alan bir süreç olduğu bilinmektedir. Tanıda bu gecikme 10 yıl kadar sürebilmektedir (65). Zamanında tedaviye ulaşamayan kolşisin dirençli hastalarda hastalık aktivitesi devam ettiği için amiloidozis, çocuklarda büyüme geriliği, kısırılık gibi yan etkiler yaşanabilir. Ayrıca bu hastaların yaşam kalitesinde ciddi bir düşüş olmaktadır. Bu sebeple kolşisin dirençli hastaların erken tespitini kolaylaştıracak biyobelirteç adaylarının varlığı önem kazanmaktadır.

Bugüne kadar kolşisin direncinin mekanizmasını araştıran çalışmalar genetik farklılıklara odaklanmıştır daha önce kolşisinin atılımından sorumlu olduğu bilinen *ABCB1* ve metabolizmasından sorumlu olduğu bilinen *CYP3A4* genindeki

polimorfizmlerin kolşisin cevabıyla muhtemel bağlantısına bakılmış fakat anlamlılık tespit edilememiştir. *ABCBI* geninin ifadesinde değişikliğe sebep olan bir polimorfizmle ilgili yapılan çalışmalarda ise iki ayrı grup farklı genotipleri kolşisin direnci ile bağdaştırmıştır (67,68,60). Kolşisinin mikrotübül inhibisyonuna sebep olan bir ajan olması sebebiyle tübülindeki polimorfizmlerin de kolşisinin etkinliğinde rolü olabileceği öne sürülmüş bu sebeple grubumuz tarafından lökositlerde ifade olan tübülün izoformu *TUBBI* polimorfizmlerinin kolşisin direnci ile muhtemel ilişkisinin araştırıldığı bir çalışma gerçekleştirilmiştir. Bu çalışma sonucunda kolşisin dirençli hasta grubunda önemli olabilecek bir tübülün polimorfizmi bulunamamıştır (69). Yapılan genetik çalışmaların kolşisin direncini açıklamakta yetersiz kalması kolşisin direncinde epigenetik faktörlerin muhtemel rolüne dikkat çekmektedir. Bu tez çalışması epigenetik faktörlerden olan miRNA'lar ve kolşisin direnci arasındaki muhtemel ilişkiyi araştırması sebebiyle önemlidir.

miRNA'lar oldukça güçlü biyobelirteç adaylarıdır. Analizlerinin ve değerlendirmelerinin kolay olması sebebiyle kliniğe uyarlanabilirlik bu durumun temel sebeplerindedir. Ayrıca miRNA'ların farklı biyolojik sıvılardaki varlıkları daha az invazif yöntemlerle analiz edilmelerini mümkün kılmaktadır. İdeal bir biyobelirteç hastalığa özgün olmalı, minimum invazyonla sonuç vermeli ve hassas olmalıdır. Bu ölçütlerin değerlendirilebilmesi için biyobelirteç çalışmalarında geniş bir örneklem ile çalışılmalıdır (71). Bu çalışmada kolşisin dirençli hastalarda ifadesinin anlamlı olarak azaldığı tespit edilen miR-183-5p ve miR-15b-5p daha geniş bir hasta grubunda tekrar araştırılmalıdır. Ayrıca daha az invazif yöntemlerin kullanılıp kullanılmayacağını araştırılması için bu miRNA'ların farklı biyolojik örneklerde analiz edilmesi gerekmektedir. İfadesi değişen bu miRNA'ların kolşisin dirençli AAA hastalığına özgünlüğünün değerlendirilebilmesi için özellikle başka otoinflamatuvar hastalıklardan ve kolşisinin kullanıldığı diğer hastalıklardan hasta kontrol gruplarının çalışmalara dahil edilmesi gerektiği öngörülmektedir. Önerilerde de belirtildiği gibi bu çalışma sonucunda ifadesinin değiştiği gösterilen miRNA'ların kolşisinin erken tespitine yönelik biyobelirteç olma ihtimallerinin incelenmesi için ek çalışmalar gerekmektedir. AAA hastalarında kolşisin direnci sık rastlanmayan bir durum olması sebebiyle hasta örneklerine ulaşılması uzun sürebilmektedir. Tez kapsamında bu çalışmalar tez

süresindeki ve bütçedeki sınırlar sebebiyle istatistiksel olarak yeterli bulunan minimum hasta sayısı ile gerçekleştirilmiştir.

Öte yandan kolşisin direncinde ifadesi değişen bu miRNA'ların ileriki çalışmalarda biyobelirteç adayları olarak değerlendirilmelerinin yanısıra bu miRNA'ların potansiyel hedef genlerinin incelenmesi ile kolşisin direnci mekanizması da anlaşılmasına çalışılmıştır.

Bu amaçla mevcut literatürde ilaç direnci ile ilişkili çalışılan mekanizmalar ve aday biyomoleküllerin ilaç direncine yönelik belirleyici olma potansiyelleri araştırılmıştır. Bu incelemelerde kanserle ilgili mekanizmalar kolşisin direnci ile bağdaşmadığı için dışarda bırakılmıştır. Bu şekilde literatür taraması yapıldığında ilaç direnci ile ilgili yapılan çalışmalarda sıklıkla ADME genleri ve bu genlerin transkripsiyon faktörleri ile ilgili genetik ve epigenetik faktörlerin araştırıldığı görülmektedir. ADME genleri ilaçların emilim, dağılım, metabolizma ve atılımından sorumlu genlerdir. Bu genlerde bulunan mutasyonlar, polimorfizmler, post-transkripsiyonel regülasyonlar gibi gen ifadesinde farklılığa sebep olan etmenler ya da bu genlerin ifadesini etkileyen genlerdeki değişiklikler ilaçların farmakokinetik özelliklerini etkileyerek bireyler arasında ilaçlara farklı tepkiler oluşmasına sebep olur (43). Son zamanlarda miRNA'ların ADME genlerini ve bunların ifadesini düzenleyen genleri etkileyerek ilaç metabolizmasında ve direncinde değişikliklere sebep olduğu gösterilmiştir. Şimdiye kadar yapılan çalışmalar miRNA'ların enzimlerin, nükleer reseptörlerin ya da taşıyıcıların ifadesini etkileyerek ADME süreçlerinde rol aldığı gösterilmiştir (42). Çalışmalarda aynı miRNA'nın ilaçların farmakokinetik özelliklerini etkileyen farklı genleri etkilediği ya da birden fazla miRNA'nın aynı gen üzerinde çalıştığı gösterilmiştir. Bu tarz çalışmalar miRNA'ların ilaç cevabı üzerindeki geniş rolünü göstermektedir ve özellikle kişiye özgü tedavi yollarına gidildiği kişiselleştirilmiş tıp gibi alanların önünü açmaktadır (66). Bu tez çalışması kapsamında da kolşisin dirençli hastalarda ifadesi değişen miRNA'ların ADME genleriyle ve onlar üzerinde düzenleyici rolü olan genlerle olan muhtemel ilişkisi değerlendirilmiştir .

Çalışmada bulunan miRNA'ların hedefi olan ve hasta gruplarında ifadesi değerlendirilen *NR3C1*, *PPARA* ve *NFKB1* birçok genin ifadesinin düzenlenmesinde rol oynayan önemli transkripsiyon faktörleridir. *NFKB1* NF- κ B'nin p50 alt ünitesini

kodlayarak içerisinde *ABCB1*'in de bulunduğu birçok genin ifadesini düzenleyen bir transkripsiyon faktörü olan NF- κ B transkripsiyon kompleksinin yapısına katılır .NF- κ B bağışlıkta ve inflamatuvar cevabın düzenlenmesinde önemli bir rolü olan bir transkripsiyon faktörüdür. Bu işleviyle NF- κ B ailevi Akdeniz ateşi patolojisiyle de ilişkili görülmektedir. Kolşisin dirençli ailevi Akdeniz ateşi hastalarında hastalık ciddiyetinin daha fazla olduğu bilinmektedir. Tez çalışmasında *NFKB1* ifadesinin kolşisin dirençli hasta grubunda arttığı gösterilmiştir. Bu artış dirençli hastalarda gözlemlenen hastalık ciddiyetiyle bağlantılı olabilir. Ayrıca NF- κ B'nin *MDR1* geninin promotör bölgesine bağlanarak ifadesinin artmasına sebep olduğu bilinmektedir (72). Daha önce hücre kültüründe yapılan çalışmalarda ilaç direnci geliştirilmiş olan HEPG2 hücrelerinde hem NF- κ B hem de *MDR1* ifadelerinin normal HEPG2 hücrelerine göre aynı anda artış gösterdiği gösterilmiştir (73). Bu sebeple tez kapsamında anlamlı azalışı tespit edilen miR-183-5p ve miR-15b-5p ve muhtemel hedef genleri *NFKB1* arasındaki ilişki daha detaylı çalışılmalıdır. NF- κ B hem inflamasyondaki rolü hem de dirençteki rolü sebebiyle kolşisin direnci görülen AAA hastalarının patolojisini anlama konusunda umut verici bir hedef olarak gözükmektedir. Grubumuzun Tübitak projesi kapsamında oluşturulan kolşisin dirençli hücre hattında, tez çalışması kapsamında bu genlerin ifadesi incelendiğinde yine benzer şekilde normal HEPG2 hücre hattında *MDR1* ve *NFKB1* seviyeleri düşükken kolşisin dirençli hücre hattında iki genin birden ifadesinde artış olduğu gözlemlenmiştir. *NFKB1*'in biyoinformatik olarak kolşisin dirençli hastalarda ifadesi değişen miR-183-5p ve miR-15b-5p tarafından hedeflendiği tahmin edilmektedir. Bu miRNA'ların ifadesinin kolşisin dirençli hastalarda azaldığı gösterilmiştir. Bu miRNA'ların hedef geni olan *NFKB1*'in ifadesi ise biyoinformatik sonuçlarla uyumlu bir şekilde artmaktadır. miRNA ve olası hedef gen ifadelerindeki bu değişiklikler miRNA'nın hedef gen üzerindeki etkisine yönelik doğrudan bir kanıt oluşturmamakla birlikte muhtemel bir ilişkiye yönelik önemli bir ön bulgu görevi görmektedir. Tez çalışmasında yapılan literatür analizleri sırasında ilaç direnci ve metabolizmasıyla ilişkili bulunan bir diğer gen *NR3C1* yani glukokortikoid reseptörünü kodlayan genidir. Literatürde *NR3C1*'in ifadesini düzenleyerek ilaçların farmakokinetik özelliklerini etkileyen miRNA'lara yönelik çalışmalar mevcuttur. *NR3C1* birçok genin ifadesini düzenleyen bir nükleer reseptördür. ADME genlerinin ifadesinin düzenlenmesinde

önemli bir rolü mevcuttur. Kolşisin metabolizmasında önemli bir rolü olduğu bilinen *CYP3A4* geninin ve kolşisinin hücre dışına atılımından sorumlu proteini kodlayan *ABCB1* geninin promotor bölgelerine bağlanarak ifadelerini doğrudan düzenlediği bilinmektedir. Bu doğrudan etkinin yanısıra *NR3C1* ADME genlerinin ifadesinin düzenlenmesinde master bir regülatör olarak işlev gösterdiği bilinen *PXR*'ın da ifadesini düzenleyerek birçok ilaç metabolize edici enzim üzerinde doğrudan bir etkiye de sebep olmaktadır. *NR3C1* aracılığı ile ADME genlerinde gerçekleşen bu hem doğrudan hem de dolaylı düzenleme glukokortikoid reseptörünün kolşisin dirençli hastalarda önemli bir rolü olduğunu düşündürmektedir (74). *NR3C1* dirençli hastalarda değişken ifade gösteren miR-183-5p tarafından hedeflendiği tahmin edilen bir gen dir. miRNA ve hedef gen ifadeleri hem hastalarda hem de kolşisin dirençli hücre hattında birbirleriyle korele bir şekilde değişmektedir. Bu ilişkinin detaylı araştırılmasının kolşisin direnci mekanizmalarının daha iyi anlaşılmasına yardımcı olacağı öngörülmektedir. Bu tez çalışması kapsamında yapılan literatür aramalarında *CYP3A4* ve *ABCB1* ve diğer birçok genin ifadesini düzenleyen fakat kanda ifadesi olmadığı için kolşisin dirençli hasta grubunda ifadesi araştırılmayan *HNF4A* yine kolşisin direncinde önemli olabilecek bir nükleer reseptör olarak öne çıkmaktadır (75). Aynı zamanda bu çalışma kapsamında ifade değişikliği araştırılan fakat anlamlı bir değişiklik saptanamayan miR-125a-5p tarafından hedeflendiği tahmin edilen *VDR*, *CYP3A4*'ün ifadesini düzenleyen bir nükleer reseptördür (76). Daha önce yapılan çalışmalarda miR-125b-5p ve *VDR* arasındaki ekileşim deneysel olarak kanıtlanmıştır. miR-125a-5p ve miR-125b-5p'nin *VDR* genine bağlandığı tahmin edilen bölge tamamen aynıdır. Bu sebeple miR-125a-5p'nin de *VDR* üzerinde düzenleyici bir rolü olduğu öngörülebilir. Bu sebeple tez çalışması kapsamında anlamlı olmasa da kolşisin dirençli hastalarda ifadesinin düştüğü saptanan miR-125a-5p'nin ifadesi daha geniş hasta gruplarında tekrar değerlendirilmelidir. Ayrıca miR-125a-5p'nin NF- κ B'nin üst yollarında bulunan ve aktivasyonunda görev olan *TRAF6*'yı hedeflediği de gösterilmiştir. miR-125a-5p'nin *TRAF6*'yı doğrudan hedeflediği bilinmektedir (77). Bu sebeple daha geniş hasta gruplarında miR-125a-5p'nin ifadesinde anlamlı bir değişiklik saptandığı durumda bu yolak üzerinden çalışmalar yürütülebilir. Literatürde pankreas kanserinde yapılan buna benzer bir çalışma mevcuttur. Çalışmada pankreatik kanserde görülen ilaç direncinde, dirençli dokularda ifadesinin düştüğü saptanan miR-

146a-5p'nin *TRAF6*'yı doğrudan hedeflediği ve *TRAF6*'nın NF- κ B üzerindeki etkisi sebebiyle ilaç direncinde rol aldığı gösterilmiştir (78). Bu çalışmadaki literatür aramalarında ön plana çıkan bir diğer nükleer reseptör $PPAR\alpha$ 'dır. Bu nükleer reseptör yine hücre içerisinde birçok mekanizmada düzenleyici role sahip olmakla birlikte *CYP3A4* gibi birçok önemli ADME geninin ifadesinin düzenlenmesinde de rol oynamaktadır (76). $PPAR\alpha$, önceki projelerimizde ifadesinin değiştiği saptanan 25 miRNA'nın 23'ünün hedef geni olarak tahmin edilmektedir. Ayrıca tez çalışması kapsamında hedef genlerinin görev aldıkları yollar açısından ilaç direnci ile ilişkili olduğu gösterilen üç miRNA'nın da muhtemel hedef genleri arasındadır. Hastalardaki ifadesinde anlamlı değişiklik saptanamasa da kolşisin dirençli hücre hattında anlamlı olarak arttığı gözlemlenen $PPAR\alpha$ 'nın değişken ifadesi gösterilen birçok miRNA'nın olası hedef geni olması dikkat çekicidir. Kolşisin direncinin mekanizması tam olarak anlaşılabilmiş değildir. Kolşisin dirençli hasta grubunun farklı mekanizmalar sebebiyle ilaca farklı yanıtlar veren heterojen bir grup hastadan oluşma ihtimali söz konusudur. Tez çalışması kapsamında araştırıldığı gibi ilacın farmakokinetik özelliklerini etkileyerek ilaca karşı farklı tepkilerin oluşmasına sebep olan ADME genleri bu hasta gruplarında hem genetik hem epigenetik olarak incelenmelidir. Tez kapsamında araştırılan miRNA'ların ve onların muhtemel hedefleri olan nükleer reseptörlerin kolşisine verilen farklı cevaplarda rolü olması mümkündür. Biyoinformatik araçlarla tez kapsamında araştırılan miRNA'ların aynı gen üzerinde etki gösterdiği ya da bir gende araştırılan birden fazla miRNA'nın etki gösterme olasılığı olduğu gösterilmiştir. Bu muhtemel etkiyi kuvvetlendirici bir role sahip olabilir. ADME genleri çok sıkı düzenlemelere tabi olan hücre içi mekanizmaların korunmasında önemli genlerdir ve kolşisin metabolizmasında da birden fazla nükleer reseptörün görev alması söz konusu olabilir. Bu sebeple tez kapsamında olabildiğince fazla gen değerlendirilmeye çalışılmıştır. Kolşisin direnci ile ilgili yapılan polimorfizm çalışmalarında bu tez kapsamında araştırılan genler olan *NR3C1*, *PPARA* ve *NFKB1* ile ilgili veri bulunamamıştır. Epigenetik faktörlerin yanı sıra bu genlerdeki ilaç direnci ile ilişkili olabilecek muhtemel polimorfizimlerin değerlendirilmesi gerekmektedir. Bu tarz çalışmalar hastaya özgü değerlendirme yapabilmenin ve ilaç dozunu hastaya özgü bir şekilde ayarlayabilmenin yani kişiselleştirmiş tıbbın önünü

açabilecektir. miRNA'lar kliniğe uyarlamalarındaki kolaylık sebebiyle bu alanda öncül olabilecek moleküllerdir.

Kolşisin dirençli hastalarda genelde daha ciddi bir hastalık seyri gözlemlenmektedir. Bu sebeple hipotezimiz kolşisin dirençli hastalarda ifadesi değişen miRNA'ların hem inflamasyon hem ilaç direnci üzerinde etki göstererek kolşisin metabolizmasını düzenlediğine yöneliktir. Öte yandan inflamasyon ve ilaç direnci arasındaki ilişki uzun zamandır araştırılmaktadır ve oldukça karmaşıktır. Hürelere ya da hayvan modellerine LPS verilerek yaratılan inflamasyon durumunda nükleer reseptörlerin birçoğunun ifadesinin azaldığı bunun da ilaç metabolize edici enzimlerin ifadesinde azalmaya sebep olduğu bilinmektedir. Fakat otoimmün ve otoinflamatuvar hastalıklarda farklı yolların da etkisi söz konusu olduğundan her zaman bu şekilde bir bağlantı gözlemlenmemektedir. Otoimmün hastalıkların bazılarında ilaç direnci genlerinde artış saptandığı da görülmüştür, aynı şekilde farklı dokularda farklı ifade değişiklikleri söz konusudur (79). Bu sebeple kolşisin direncindeki inflamasyonun ilaç direnci ile ilişkisi değerlendirilirken hastalığa ve doku tipine özgü değerlendirme yapılmalıdır. Yapılan çalışmada NFKB1 ifadesinin kolşisin dirençli hasta grubunda artış gösterdiği gösterilmiştir. Bu sebeple kolşisin dirençli hastalarda NF-KB hem inflamasyondaki hem de ilaç direncindeki rolü sebebiyle ayrıntılı araştırılması gereken bir yolak olarak öne çıkmaktadır. ADME genlerindeki genetik ve epigenetik değişikliklerin yanısıra serum ve plazmadaki kolşisin metabolitleri oranları da hastada kolşisinin emilim ya da atılım süreçlerindeki muhtemel sorunların erken tespiti için kullanılabilir. Bu kolşisin direnci görülen hastaların tanısında yardımcı olabilir. Serum ya da plazmada kolşisin metabolitlerinin tespiti için sıvı kromatografi sonrasında kütle spektrometresi ile kolşisinin metabolitlerinin tayini gerçekleştirilebilir. Bu yöntemin ADME genlerinin değerlendirilmesi ile birlikte kliniğe uyarlanması kolşisine yanıt vermeyen hastaların tespitini büyük ölçüde hızlandıracaktır. Bu tez çalışması kapsamında değerlendirilen hastalar çalışmaya dahil edildikleri sırada direnç tespit edilmiş olduğundan, klinikte farklı ilaçların kullanımına başlanmıştır. Bu sebeple kolşisin metabolitlerinin bu hastalarda değerlendirilmesi mümkün olmamıştır fakat bundan sonra planlanabilecek çalışmalarda kolşisin direnci tanısı konulan fakat henüz başka ilaçlar kullanmaya

başlamamış hastaların çalışmaya dahil edilerek kolşisin metabolitlerinin değerlendirilmesinin yararlı bir ön bilgi olacağı düşünülmektedir.

Sonuç olarak, bu tez kapsamında yapılan çalışmalar kolşisin direnci görülen AAA hastalarında erken tanıyı kolaylaştıracak olası bir biyobelirteç için ön çalışma niteliği taşımaktadır. Ayrıca kolşisin direncinin mekanizmalarını anlamaya yönelik çalışmalara da katkı sağlayabilecektir. Elde edilen miRNA ve muhtemel hedef genler ve yolaklar yeni projeler için başlangıç noktası olabilecektir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

6.1. Sonuçlar

- Kolşisin dirençli ve kolşisin duyarlı AAA hasta grupları arasında en az iki kat ifade farklılığı gösteren 25 miRNA'nın olası hedef genlerinin inflamasyon ve ilaç direnci ile ilişkilerine, ayrıca bu hedef genlerin yolak analizlerine göre 25 miRNA içerisinden en çok miR-183-5p, miR-15b-5p, miR-125a-5p, miR-197-3p inflamasyon ve ilaç direnci ile ilişkilendirilmiştir.
- qRT-PCR sonuçlarına göre kolşisin dirençli hastalarda miR-15b-5p, miR-183-5p anlamlı olarak azaldığı görülmüştür (p değerleri sırasıyla; 0,0473, 0.0007).
- qRT-PCR sonuçlarına göre kolşisin dirençli hastalarda miR-125a-5p ifadesinin azaldığı görülmüştür. Sonuçlarda anlamlılık saptanamamıştır. (p=0,3936)
- Biyoinformatik olarak miR-183-5p'nin hedef geni olduğu tahmin edilen *NR3C1*'in kolşisin dirençli hasta grubunda ifadesinin miR-183-5p'nin ifadesi ile uyumlu şekilde anlamlı 2,36 kat artış gösterdiği görülmüştür. (p=0,0494)
- Biyoinformatik olarak ilaç direnci ve inflamasyonla ilişkilendirilen 4 miRNA'nın da (miR-183-5p, miR-197-3p, miR-15b-5p, miR-125a-5p) hedef geni olduğu tahmin edilen *PPARα*'nın kolşisin dirençli hasta grubunda ifadesinin miRNA'ların ifadesi ile uyumlu şekilde 2,1 kat artış gösterdiği görülmüştür. Ancak bu artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. (p= 0,1076)
- Biyoinformatik olarak miR-183-5p ve miR-15b-5p'nin hedef geni olduğu tahmin edilen *NFKB1*'in kolşisin dirençli hasta grubunda ifadesinin miR-183-5p ve miR-15b-5p'nin ifadesi ile uyumlu şekilde anlamlı 1,75 kat artış gösterdiği görülmüştür. (p=0,0147)
- Kolşisin dirençli hücre hattında miR-183-5p ve miR-15b-5p'nin ifadesinin kolşisin dirençli hasta grubuna benzer bir şekilde anlamlı bir azalış gösterdiği (p =0.0025, p=0.0286) *MDR1*, *NFKB1*, *NR3C1*, *PPARα*'nın ifadesinin anlamlı bir artış gösterdiği bulunmuştur.

6.2. Öneriler

- Kolşisin dirençli hasta grubunda ifadesinin anlamlı olarak azaldığı gösterilen üç miRNA'nın da (miR-183-5p, miR-125a-5p, miR-15b-5p) ortak hedef geni olarak tahmin edilen ancak hasta grubunda ifadesinde anlamlı bir farklılık tespit edilemeyen *PPARα*'nın ifadesi çalışma grubuna daha fazla hasta dahil edilerek değerlendirilebilir.
- Kolşisin dirençli hasta grubunda ifadesinin anlamlı olarak azaldığı gösterilen miR-183-5p ve miR-15b-5p'nin ifadeleri çalışma grubuna daha fazla hasta dahil edilerek tekrar değerlendirilebilir, bu miRNA'ların ileriki aşamalarda kolşisin direncinin erken tespitine yönelik birer biyobelirteç olma potansiyelleri incelenebilir.
- miR-183-5p ve miR-15b-5p'nin farklı biyolojik örneklerdeki (idrara, serum vb.) ifadeleri araştırılabilir.
- *NR3C1* ve *NFKB1*'in miR-183-5p'nin doğrudan hedefi olup olmadığını araştırmak amacıyla 3'UTR lusiferaz aktivitesi ile bağlantı analizi yapılabilir.
- Kolşisin dirençli hücre hattına miR-183-5p ve miR-15b-5p'nin pre-miR'leri transfekte edilerek bu miRNA'ların direnci tersine çevirip çeviremeyeceği tespit edilebilir.

7. KAYNAKLAR

1. Grandemange S, Aksentijevich I, Jeru I, Gul A, Touitou I. (2011). The regulation of MEFV expression and its role in health and familial Mediterranean fever. In *Genes and Immunity* (Vol. 12, Issue 7). <https://doi.org/10.1038/gene.2011.53>.
2. Ozen S, Demirkaya E, Erer B, Livneh A, Ben-Chetrit E, Giancane G, et al. EULAR recommendations for the management of familial Mediterranean fever. *Ann Rheum Dis*. 2016 Apr;75(4):644–51.
3. Twig G, Livneh A, Vivante A, Afek A, Shamiss A, Derazne E, et al. Mortality risk factors associated with familial Mediterranean fever among a cohort of 1.25 million adolescents. *Ann Rheum Dis*. 2014 Apr;73(4):704–9.
4. Aksentijevich I, Centola M, Deng Z, Sood R, Balow J, Wood G, et al.; The International FMF Consortium. Ancient missense mutations in a new member of the RoRet gene family are likely to cause familial Mediterranean fever. *Cell*. 1997 Aug;90(4):797–807.
5. Boursier, G. The registry of Hereditary Auto-inflammatory Disorders Mutations [Internet]. 2022 [Erişim Tarihi 26 Ocak 2022]. Erişim adresi: <https://infevers.umai-montpellier.fr/web/>
6. Touitou I. (2001). The spectrum of Familial Mediterranean Fever (FMF) mutations. In *European Journal of Human Genetics* (Vol. 9, Issue 7). <https://doi.org/10.1038/sj.ejhg.5200658>.
7. Yilmaz E, Ozen S, Balci 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. *Eur J Hum Genet*. 2001 Jul;9(7):553–5.
78. Schaner PE, Gumucio DL. (2005). Familial Mediterranean fever in the post-genomic era: How an ancient disease is providing new insights into inflammatory pathways. In *Current Drug Targets: Inflammation and Allergy* (Vol. 4, Issue 1). <https://doi.org/10.2174/1568010053622803>.
9. Park H, Bourla AB, Kastner DL, Colbert RA, Siegel RM. (2012). Lighting the fires within: the cell biology of autoinflammatory diseases. In *Nature Reviews Immunology* (Vol. 12, Issue 8). <https://doi.org/10.1038/nri3261>.
10. Tunca M, Ozdogan H, Kasapcopur O, Yalcinkaya F, Ozen S, Topaloglu R, et al. Familial Mediterranean fever (FMF) in Turkey: results of a nationwide multicenter study. *Medicine (Baltimore)*. 2005 Jan;84(1):1–11.
11. Manukyan G, Aminov R. Update on pyrin functions and mechanisms of familial mediterranean fever. *Frontiers in Microbiology*. Volume 7. Issue MAR; 2016. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00456>.
12. Park YH, Wood G, Kastner DL, Chae JJ. Pyrin inflammasome activation and RhoA signaling in the autoinflammatory diseases FMF and HIDS. *Nat Immunol*. 2016 Aug;17(8):914–21.

13. Xu H, Yang J, Gao W, Li L, Li P, Zhang L, et al. Innate immune sensing of bacterial modifications of Rho GTPases by the Pyrin inflammasome. *Nature*. 2014 Sep;513(7517):237–41.
14. Shinar Y, Livneh A, Langevitz P, Zaks N, Aksentijevich I, Koziol DE, et al. Genotype-phenotype assessment of common genotypes among patients with familial Mediterranean fever. *J Rheumatol*. 2000 Jul;27(7):1703–7.
15. Touitou I, Picot MC, Domingo C, Notarnicola C, Cattan D, Demaille J, et al. The MICA region determines the first modifier locus in familial Mediterranean fever. *Arthritis Rheum*. 2001 Jan;44(1):163–9.
16. Booty MG, Chae JJ, Masters SL, Remmers EF, Barham B, Le JM, et al. Familial Mediterranean fever with a single MEFV mutation: where is the second hit? *Arthritis Rheum*. 2009 Jun;60(6):1851–61.
17. Akbaba TH, Sag E, Balci-Peynircioglu B, Ozen S. (2020). Epigenetics for Clinicians from the Perspective of Pediatric Rheumatic Diseases. In *Current Rheumatology Reports* (Vol. 22, Issue 8). <https://doi.org/10.1007/s11926-020-00912-9>.
18. Jin B, Li Y, Robertson KD. (2011). DNA methylation: Superior or subordinate in the epigenetic hierarchy? In *Genes and Cancer* (Vol. 2, Issue 6). <https://doi.org/10.1177/1947601910393957>.
19. Hombach S, Kretz M. Non-coding RNAs: Classification, biology and functioning. *Adv Exp Med Biol*. 2016; 937:3–17.
20. Ozen S, Aktay N, Lainka E, Duzova A, Bakkaloglu A, Kallinich T. Disease severity in children and adolescents with familial Mediterranean fever: a comparative study to explore environmental effects on a monogenic disease. *Ann Rheum Dis*. 2009 Feb;68(2):246–8.
21. Ozen S, Demirkaya E, Amaryan G, Koné-Paut I, Polat A, Woo P, et al.; Paediatric Rheumatology International Trials Organisation; Eurofever Project. Results from a multicentre international registry of familial Mediterranean fever: impact of environment on the expression of a monogenic disease in children. *Ann Rheum Dis*. 2014 Apr;73(4):662–7.
22. Ozen, S., Lutz, H. L., Rivera, V. M., Reiff Andreas, Batu, E. D., Anderson, E., Garcia, M. S., Aldrovandi, G., Akbaba, T. H., Pazarbasi, İ., Bilginer, Y., Balat, A., Balci-Peynircioglu, B., Gilbert, J. A., Dedeoglu, F., & Hausmann, J. S. (2021). Microbiome is not linked to clinical disease severity of familial Mediterranean fever in an international cohort of children. *Paediatric Rheumatology*, 39(5), 102–108. <https://www.clinexprheumatol.org/abstract.asp?a=16649>
23. Ben-Zvi I, Brandt B, Berkun Y, Lidar M, Livneh A. The relative contribution of environmental and genetic factors to phenotypic variation in familial Mediterranean fever (FMF). *Gene*. 2012 Jan;491(2):260–3.
24. Kirectepe AK, Kasapcopur O, Arisoy N, Celikyapi Erdem G, Hatemi G, Ozdogan H, et al. Analysis of MEFV exon methylation and expression patterns in familial Mediterranean fever. *BMC Med Genet*. 2011 Aug;12(1):105.

25. Kim VN, Han J, Siomi MC. (2009). Biogenesis of small RNAs in animals. In *Nature Reviews Molecular Cell Biology* (Vol. 10, Issue 2). <https://doi.org/10.1038/nrm2632>.
26. Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*. 1993 Dec;75(5):843–54.
27. Hashimoto Y, Akiyama Y, Yuasa Y. Multiple-to-multiple relationships between microRNAs and target genes in gastric cancer. *PLoS One*. 2013 May;8(5):e62589.
28. O'Brien J, Hayder H, Zayed Y, Peng C. Overview of microRNA biogenesis, mechanisms of actions, and circulation. *Frontiers in Endocrinology*. Volume 9. Issue AUG; 2018. <https://doi.org/10.3389/fendo.2018.00402>.
29. Lam JK, Chow MY, Zhang Y, Leung SW. (2015). siRNA versus miRNA as therapeutics for gene silencing. In *Molecular Therapy - Nucleic Acids* (Vol. 4, Issue 9). <https://doi.org/10.1038/mtna.2015.23>.
30. Gulyaeva LF, Kushlinskiy NE. (2016). Regulatory mechanisms of microRNA expression. In *Journal of Translational Medicine* (Vol. 14, Issue 1). <https://doi.org/10.1186/s12967-016-0893-x>.
31. Balci-Peynircioglu B, Akkaya-Ulum YZ, Akbaba TH, Tavukcuoglu Z. (2019). Potential of miRNAs to predict and treat inflammation from the perspective of Familial Mediterranean Fever. In *Inflammation Research* (Vol. 68, Issue 11). <https://doi.org/10.1007/s00011-019-01272-6>.
32. Wada T, Toma T, Matsuda Y, Yachie A, Itami S, Taguchi YH, et al. Microarray analysis of circulating microRNAs in familial Mediterranean fever. *Mod Rheumatol*. 2017 Nov;27(6):1040–6.
33. Latsoudis H, Mashreghi MF, Grün JR, Chang HD, Stuhlmüller B, Repa A, et al. Differential Expression of miR-4520a Associated With Pyrin Mutations in Familial Mediterranean Fever (FMF). *J Cell Physiol*. 2017 Jun;232(6):1326–36.
34. 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(6 Suppl 108):90–4.
35. Kirectepe AK, Kasapcopur O, Arisoy N, Celikyapi Erdem G, Hatemi G, Ozdogan H, et al. Analysis of MEFV exon methylation and expression patterns in familial Mediterranean fever. *BMC Med Genet*. 2011 Aug;12(1):105.
36. 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*. 2019 Mar;38(3):635–43.
37. 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 γ pathway. *Rheumatology (Oxford)*. 2018 Apr;57(4):718–26.

38. DemİR F, Çebİ AH, Kalyoncu M. Assessment of circulating microribonucleic acids in patients with familial mediterranean fever. *Arch Rheumatol*. 2019 Nov;35(1):52–9.
39. Karpuzoglu EM, Kisla Ekin RM, Balci S, Bisgin A, Yilmaz M. Altered expression of apoptosis-related, circulating cell-free miRNAs in children with familial Mediterranean fever: a cross-sectional study. *Rheumatol Int*. 2021 Jan;41(1):103–11.
40. Akkaya-Ulum YZ, Akbaba TH, Tavukcuoglu Z, Chae JJ, Yilmaz E, Ozen S, et al. Familial Mediterranean fever-related miR-197-3p targets IL1R1 gene and modulates inflammation in monocytes and synovial fibroblasts. *Sci Rep*. 2021 Jan;11(1):685.
41. Guo QR, Wang H, da Yan Y, Liu Y, Su CY, Chen HB, et al. The Role of Exosomal microRNA in Cancer Drug Resistance. *Frontiers in Oncology*. Volume 10. Frontiers Media S.A.; 2020. <https://doi.org/10.3389/fonc.2020.00472>.
42. Haenisch S, Cascorbi I. (2012). MiRNAs as mediators of drug resistance. In *Epigenomics* (Vol. 4, Issue 4, pp. 369–381). <https://doi.org/10.2217/epi.12.39>.
43. Kovalchuk O, Filkowski J, Meservy J, Ilnytskyy Y, Tryndyak VP, Chekhun VF, et al. Involvement of microRNA-451 in resistance of the MCF-7 breast cancer cells to chemotherapeutic drug doxorubicin. *Mol Cancer Ther*. 2008 Jul;7(7):2152–9.
44. Rao X, Di Leva G, Li M, Fang F, Devlin C, Hartman-Frey C, et al. MicroRNA-221/222 confers breast cancer fulvestrant resistance by regulating multiple signaling pathways. *Oncogene*. 2011 Mar;30(9):1082–97.
45. Wallace SL, Omokoku B, Ertel NH. Colchicine plasma levels. Implications as to pharmacology and mechanism of action. *Am J Med*. 1970 Apr;48(4):443–8.
46. Hunter AL, Klaassen CD. Biliary excretion of colchicine in newborn rats. *Drug Metab Dispos*. 1975 Nov-Dec;3(6):530–5.
47. Wallace SL, Ertel NH. Plasma levels of colchicine after oral administration of a single dose. *Metabolism*. 1973 May;22(5):749–53.
48. Chappay ON, Niel E, Wautier JL, Hung PP, Dervichian M, Cattan D, et al. Colchicine disposition in human leukocytes after single and multiple oral administration. *Clin Pharmacol Ther*. 1993 Oct;54(4):360–7.
49. Schönharting M, Mende G, Siebert G. Metabolic transformation of colchicine, II. The metabolism of colchicine by mammalian liver microsomes. *Hoppe Seylers Z Physiol Chem*. 1974 Nov;355(11):1391–9.
50. Tateishi T, Soucek P, Caraco Y, Guengerich FP, Wood AJ. Colchicine biotransformation by human liver microsomes. Identification of CYP3A4 as the major isoform responsible for colchicine demethylation. *Biochem Pharmacol*. 1997 Jan;53(1):111–6.
51. Dahan A, Sabit H, Amidon GL. Multiple efflux pumps are involved in the transepithelial transport of colchicine: combined effect of p-glycoprotein and multidrug resistance-associated protein 2 leads to decreased intestinal

- absorption throughout the entire small intestine. *Drug Metab Dispos.* 2009 Oct;37(10):2028–36.
52. Levchenko A, Mehta BM, Lee JB, Humm JL, Augensen F, Squire O, et al. Evaluation of ¹¹C-colchicine for PET imaging of multiple drug resistance. *J Nucl Med.* 2000 Mar;41(3):493–501.
 53. Tufan A, Babaoglu MO, Akdogan A, Yasar U, Calguneri M, Kalyoncu U, et al. Association of drug transporter gene ABCB1 (MDR1) 3435C to T polymorphism with colchicine response in familial Mediterranean fever. *J Rheumatol.* 2007 Jul;34(7):1540–4.
 54. Garzon R, Marcucci G, Croce CM. (2010). Targeting microRNAs in cancer: Rationale, strategies and challenges. In *Nature Reviews Drug Discovery* (Vol. 9, Issue 10). <https://doi.org/10.1038/nrd3179>.
 55. Terkeltaub RA, Furst DE, Digiacinto JL, Kook KA, Davis MW. Novel evidence-based colchicine dose-reduction algorithm to predict and prevent colchicine toxicity in the presence of cytochrome P450 3A4/P-glycoprotein inhibitors. *Arthritis Rheum.* 2011 Aug;63(8):2226–37.
 56. Sticht C, De La Torre C, Parveen A, Gretz N. miRWalk: an online resource for prediction of microRNA binding sites. *PLoS One.* 2018 Oct;13(10):e0206239.
 57. Riffo-Campos ÁL, Riquelme I, Brebi-Mieville P. (2016). Tools for sequence-based miRNA target prediction: What to choose? In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 17, Issue 12). <https://doi.org/10.3390/ijms17121987>.
 58. Dweep H, Sticht C, Pandey P, Gretz N. miRWalk—database: prediction of possible miRNA binding sites by “walking” the genes of three genomes. *J Biomed Inform.* 2011 Oct;44(5):839–47.
 59. Dweep H, Gretz N. (2015). MiRWalk2.0: A comprehensive atlas of microRNA-target interactions. In *Nature Methods* (Vol. 12, Issue 8). <https://doi.org/10.1038/nmeth.3485>.
 60. Huang HY, Lin YC, Li J, Huang KY, Shrestha S, Hong HC, et al. miRTarBase 2020: updates to the experimentally validated microRNA-target interaction database. *Nucleic Acids Res.* 2020 Jan;48 D1:D148–54.
 61. Rebholz-Schuhmann D, Oellrich A, Hoehndorf R. (2012). Text-mining solutions for biomedical research: Enabling integrative biology. In *Nature Reviews Genetics* (Vol. 13, Issue 12). <https://doi.org/10.1038/nrg3337>.
 62. Iliopoulos I, Enright AJ, Ouzounis CA. (2001). Textquest: document clustering of Medline abstracts for concept discovery in molecular biology. *Pacific Symposium on Biocomputing. Pacific Symposium on Biocomputing.* https://doi.org/10.1142/9789814447362_0038.
 63. Papanikolaou N, Pafilis E, Nikolaou S, Ouzounis CA, Iliopoulos I, Promponas VJ. BioTextQuest: a web-based biomedical text mining suite for concept discovery. *Bioinformatics.* 2011 Dec;27(23):3327–8.
 64. Rebholz-Schuhmann D, Oellrich A, Hoehndorf R. (2012). Text-mining solutions for biomedical research: Enabling integrative biology. In *Nature Reviews Genetics* (Vol. 13, Issue 12). <https://doi.org/10.1038/nrg3337>.

65. Ugurlu S, Ergezen B, Egeli BH, Selvi O, Ozdogan H. Anakinra treatment in patients with familial Mediterranean fever: a single-centre experience. *Rheumatology (Oxford)*. 2021 May;60(5):2327–32.
66. Yu AM, Pan YZ. Noncoding microRNAs: small RNAs play a big role in regulation of ADME? *Acta Pharm Sin B*. 2012 Apr;2(2):93–101.
67. Tufan A, Babaoglu MO, Akdogan A, Yasar U, Calguneri M, Kalyoncu U, et al. Association of drug transporter gene ABCB1 (MDR1) 3435C to T polymorphism with colchicine response in familial Mediterranean fever. *J Rheumatol*. 2007 Jul;34(7):1540–4.
68. Bezalel Y, Gershoni-Baruch R, Dagan E, Lidar M, Livneh A. The 3435T polymorphism in the ABCB1 gene and colchicine unresponsiveness in familial Mediterranean fever. *Clin Exp Rheumatol*. 2009 Mar-Apr;27(2 Suppl 53):S103–4.
69. Dogruer D, Tug E, Bes C, Soy M. Lack of an effect of CYP3A4 and MDR1 gene polymorphisms on colchicine pharmacogenetics in the treatment of Familial Mediterranean fever. *Genet Mol Res*. 2013 Jan;12(3):3521–8.
70. Akbaba TH, Ustabas G, Kasap-Cuceloglu M, Ozen S, Balci-Peynircioglu B. Analysis of polymorphisms in the colchicine binding site of tubulin in colchicine-resistant familial Mediterranean fever patients. *Mol Biol Rep*. 2020 Nov;47(11):9005–11.
71. Condrat CE, Thompson DC, Barbu MG, Bugnar OL, Boboc A, Cretoiu D, et al. (2020). miRNAs as Biomarkers in Disease: Latest Findings Regarding Their Role in Diagnosis and Prognosis. In *Cells* (Vol. 9, Issue 2). <https://doi.org/10.3390/cells9020276>.
72. Bentires-Alj M, Barbu V, Fillet M, Chariot A, Relic B, Jacobs N, et al. NF-kappaB transcription factor induces drug resistance through MDR1 expression in cancer cells. *Oncogene*. 2003 Jan;22(1):90–7.
73. Liu T, Wei R, Zhang Y, Chen W, Liu H. Association between NF-κB expression and drug resistance of liver cancer. *Oncol Lett*. 2019 Jan;17(1):1030–4.
74. El-Sankary W, Bombail V, Gibson GG, Plant N. Glucocorticoid-mediated induction of CYP3A4 is decreased by disruption of a protein: DNA interaction distinct from the pregnane X receptor response element. *Drug Metab Dispos*. 2002 Sep;30(9):1029–34.
75. Hwang-Verslues WW, Sladek FM. (2010). HNF4α-role in drug metabolism and potential drug target? In *Current Opinion in Pharmacology* (Vol. 10, Issue 6). <https://doi.org/10.1016/j.coph.2010.08.010>.
76. Dluzen DF, Lazarus P. (2015). MicroRNA regulation of the major drug-metabolizing enzymes and related transcription factors. In *Drug Metabolism Reviews* (Vol. 47, Issue 3). <https://doi.org/https://doi.org/10.3109/03602532.2015.1076438>.
77. Xie C, Zhang LZ, Chen ZL, Zhong WJ, Fang JH, Zhu Y, et al. A hMTR4-PDIA3P1-miR-125/124-TRAF6 Regulatory Axis and Its Function in NF kappa B Signaling and Chemoresistance. *Hepatology*. 2020 May;71(5):1660–77.

78. Meng Q, Liang C, Hua J, Zhang B, Liu J, Zhang Y, et al. A miR-146a-5p/TRAF6/NF- κ B p65 axis regulates pancreatic cancer chemoresistance: functional validation and clinical significance. *Theranostics*. 2020 Mar;10(9):3967–79.
79. Wu KC, Lin CJ. (2019). The regulation of drug-metabolizing enzymes and membrane transporters by inflammation: Evidences in inflammatory diseases and age-related disorders. In *Journal of Food and Drug Analysis* (Vol. 27, Issue 1). <https://doi.org/10.1016/j.jfda.2018.11.005>.

8. EKLER

EK-1. Tez Çalışması ile İlgili Etik Kurul İzni.



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

Sayı : 16969557-527

Konu :

ARAŞTIRMA PROJESİ DEĞERLENDİRME RAPORU

Toplantı Tarihi : 02 MART 2021 SALI
Toplantı No : 2021/05
Proje No : GO 21/287 (Değerlendirme Tarihi: 02.03.2021)
Karar No : 2021/05-28

Üniversitemiz Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı öğretim üyelerinden Prof. Dr. Banu PEYNİRCİOĞLU'nun sorumlu araştırmacı olduğu, Arş. Gör. Tayfun Hilmi AKBABA ile birlikte çalışacakları ve Bilgesi Şafak ÖZDEMİR'in yüksek lisans tezi olan, GO 21/287 kayıt numaralı, "*Kolşisin Direnci Olan Ailevi Akdeniz Ateşi Hastalarında İfadeyi Değişen miRNA'ların İnflamasyon ve İlaç Direnci ile İlişkinin Belirlenmesi*" başlıklı proje önerisi araştırmanın gerekece, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş olup, 03 Mart 2021-03 Mart 2023 tarihleri arasında geçerli olmak üzere etik açıdan uygun bulunmuştur. Çalışma tamamlandığında sonuçlarını içeren bir rapor örneğinin Etik Kurulumuza gönderilmesi gerekmektedir.

1. Prof. Dr. Ayşe Lale DOĞAN	(Başkan)	7. Doç. Dr. Nüket Paksoy ERBAYDAK	(Üye)
2. Prof. Dr. G. Burcu AYDIN	(Üye)	8. Doç. Dr. Betül Çelebi SALTIK	(Üye)
3. Prof. Dr. M. Özgür UYANIK	(Üye)	9. Doç. Dr. Hande Güney DENİZ	(Üye)
4. Prof. Dr. Ayşe Kin İŞLER	(Üye)	10. Dr. Öğr. Üyesi Müge DEMİR	(Üye)
5. Doç. Dr. H. Tuna Çak ESEN	(Üye)	IZINLI	
6. Doç. Dr. Can Ebru KURT	(Üye)	11. Av. Serap MORALIOĞLU	(Üye)

EK-2. Orijinallik Ekran Görüntüsü

Match Overview
×

7%

<
>

Currently viewing standard sources

[View English Sources \(Beta\)](#)

Matches

1	<p style="color: #c00000; margin: 0;">Submitted to Hacettep...</p> <p style="font-size: small; margin: 0;">Student Paper</p>	2%	>
2	<p style="color: #c00000; margin: 0;">acikbilim.yok.gov.tr</p> <p style="font-size: small; margin: 0;">Internet Source</p>	1%	>
3	<p style="color: #c00000; margin: 0;">www.openaccess.hace...</p> <p style="font-size: small; margin: 0;">Internet Source</p>	1%	>
4	<p style="color: #0070c0; margin: 0;">openaccess.hacettepe....</p> <p style="font-size: small; margin: 0;">Internet Source</p>	<1%	>
5	<p style="color: #0070c0; margin: 0;">Yongjun Chu, Shinnichi ...</p> <p style="font-size: small; margin: 0;">Publication</p>	<1%	>
6	<p style="color: #0070c0; margin: 0;">Wang, Lin, Miao-Jun Zh...</p> <p style="font-size: small; margin: 0;">Publication</p>	<1%	>
7	<p style="color: #c00000; margin: 0;">openaccess.ogu.edu.tr:...</p> <p style="font-size: small; margin: 0;">Internet Source</p>	<1%	>

EK-3. 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: Bilgesu Şafak Tümerdem
Assignment title: Bilgesu Tez
Submission title: Kolşisin Direnci Olan Ailevi Akdeniz Ateşi Hastalarında İfade...
File name: Tez_Turnitim.docx
File size: 2.27M
Page count: 70
Word count: 12,591
Character count: 88,383
Submission date: 01-Mar-2022 02:59PM (UTC+0300)
Submission ID: 1773782267



9. ÖZGEÇMİŞ