

T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**OTOİNFLAMATUVAR HASTALIKLARDA ROLÜ OLAN
mRNA VE miRNA MOLEKÜLLERİNİN META-ANALİZİ**

Gizem USTABAŞ

**Tıbbi Biyoloji Programı
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

ANKARA

2022

T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

OTOİNFLAMATUVAR HASTALIKLARDA ROLÜ OLAN
mRNA VE miRNA MOLEKÜLLERİNİN META-ANALİZİ

Gizem USTABAŞ

Tıbbi Biyoloji Programı
YÜKSEK LİSANS TEZİ

TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. Banu PEYNİRCİOĞLU

ANKARA

2022

ONAY SAYFASI

HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
OTOİNFLAMATUVAR HASTALIKLARDA ROLÜ OLAN MRNA VE MİRNA
MOLEKÜLLERİNİN META-ANALİZİ
Öğrenci: Gizem USTABAŞ
Danışman: Prof. Dr. Banu PEYNİRCİOĞLU

Bu tez çalışması 06/09/2022 tarihinde jürimiz tarafından "Tıbbi Biyoloji Programı"nda yüksek lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı: *Doç. Dr. Pelin Mutlu*
(Ankara Üniversitesi)

Tez Danışmanı: *Prof. Dr. Banu Peynircioğlu*
(Hacettepe Üniversitesi)

Üye: *Prof. Dr. Çetin Kocaepe*
(Hacettepe Üniversitesi)

Üye: *Prof. Dr. Didem Dayangaç Erden*
(Hacettepe Üniversitesi)

Üye: *Doç. Dr. Burcu Balcı Hayta*
(Hacettepe Üniversitesi)

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

Prof. Dr. Müge YEMİŞCİ 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⁾

:-

06/09/2022

GİZEM USTABAŞ

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 engellenir.
- (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 Peynircioğlu danışmanlığında tarafımdan üretildiğini ve Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Yönergesine göre yazıldığını beyan ederim.

Gizem USTABAŞ

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans dönemim boyunca yanımda olan, desteğini hiçbir zaman esirgemeyen ve bana her zaman inanan değerli hocam ve sayın danışmanım Prof. Dr. Banu PEYNİRCİOĞLU'na,

Tez çalışmamda değerli önerileri ve katkıları için sayın jüri üyeleri Prof. Dr. Çetin KOCAEFE, Prof. Dr. Didem Dayangaç ERDEN, Doç. Dr. Pelin MUTLU ve Doç. Dr. Burcu Balcı HAYTA'ya,

Tez çalışmamda kullandığım programlar için göstermiş oldukları emek ve ayırmış oldukları değerli vakit için sayın Prof. Dr. Çetin KOCAEFE, Dr. Öğr. Üyesi İdil YET, Dr. Öğr. Üyesi Yeliz Z. AKKAYA ULUM, Dr. Zeliha Gözde TURAN ve Arş. Gör. Tayfun Hilmi Akbaba'ya,

Akademik hayatımda eğitim sürecime katkılarından dolayı Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'ndaki tüm değerli hocalarım ve öğrencilerine,

Yüksek lisans dönemimde hayatıma giren, bana küçücük kalbiyle en büyük motivasyonu veren canım gonzalesim DENVER'a,

Tüm eğitim hayatım boyunca beni destekleyen, bana inanan, bugünlere gelmemde katkıları olan değerli hocalarıma,

Yüksek lisans dönemim boyunca benden desteklerini ve sevgilerini esirgemeyen tüm arkadaşlarıma,

Akademik hayatım süresince yaşadığım tüm zorluklara rağmen bana bu yolda inanan, her koşulda destek olan, aramızdaki mesafeye rağmen kendilerini bana her zaman bir adım ötemde hissettiren, canlarım annem Aliye ve babam Turan USTABAŞ'a,

En içten duygularıyla teşekkür ediyorum.

ÖZET

Ustabaş, G., Otoinflamatuvar Hastalıklarda Rolü Olan mRNA ve miRNA Moleküllerinin Meta-analizi. Hacettepe Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Biyoloji Yüksek Lisans Tezi, Ankara, 2022. Otoinflamatuvar hastalıklar, doğal bağışıklık sisteminin etkilenmesi sonucunda inflamasyon yanıtlarının arttığı bir hastalık grubudur. Bu hastalıklar genetik özellikleri açısından monogenik ve poligenik olarak gruplandırılabilir. Bu hastalıklar içerisinde tez kapsamında incelenen; PFAPA poligenik olarak, AAA, CAPS, TRAPS, MKD hastalıkları ise farklı genlerde oluşan mutasyonlar sonucunda ortaya çıkmaktadır, ancak bu hastalıklarda görülen benzer fenotip, benzer yolların ve moleküllerin etkilendiğini düşündürmektedir. Literatürde otoinflamatuvar hastalıklar ile ilişkili omik temelli çalışmalar mevcuttur. Tez kapsamında, bu verilerin birlikte değerlendirilmesi amaçlanmış, mRNA ve miRNA temelli omik çalışmaların mikrodizin veri setleri R (4.0.5), BRB-ArrayTools ve MeV gibi programlar kullanılarak analiz edilmiştir. İfadesi değişen genler, DAVID ve InnateDB programlarıyla analiz edilerek inflamasyonla ilişkili olanlar belirlenmiştir. Sonrasında, bu hastalıklarda ortak olarak ifadesi değişen mRNA'lar, ifadesi değişen miRNA'ların hedef genleri olabileceğinden, veri setlerinden elde edilen mRNA ve miRNA'ların bağlanma olasılıkları TargetScan veri tabanı kullanılarak gösterilmiştir. Son aşamada, anlamlı olarak ifadesi değişen mRNA ve miRNA'ların hedeflediği proteinler tanımlanmış, bu proteinlerin arasındaki protein-protein ilişkileri STRING analizleri ile belirlenmiştir. Analizler sonucunda, inflamasyon açısından önemli proteinler olan STAT1, NAIP, FAS, MAPK14 proteinleri öne çıkmış ve seçilen hastalıklara sebep olan genlerin kodladığı proteinler ile ilişkisi oldukları gösterilmiştir. Elde edilen bu ön bilgiler, seçilen hastalıklarda ortak moleküllerin patogenezi etkilediği hipotezini desteklemiş, bu bulguların laboratuvar ortamında incelenmesi önem kazanmıştır. Bu tez, otoinflamatuvar hastalıklarda inflamasyona sebep olan yolların aydınlatılarak hastalıkların daha iyi sınıflandırılması ve uzun vadede tedavi hedefi olabilecek moleküllerin belirlenmesine yönelik önemli katkılar sağlayabilecektir.

Anahtar Kelimeler: Otoinflamatuvar hastalık, inflamasyon, mRNA, miRNA, biyoinformatik

ABSTRACT

Ustabaş, G., Meta-analysis of mRNA and miRNA Molecules in Autoinflammatory Diseases. Hacettepe University, Graduate School of Health Sciences, M.Sc. Thesis in Medical Biology, Ankara, 2022. Autoinflammatory diseases are the group of diseases in which inflammatory responses are increased as a result of the innate immune system being affected. These diseases can be grouped as monogenic and polygenic in terms of their genetic characteristics. Among the autoinflammatory diseases examined within the scope of the thesis; PFAPA is polygenic and AAA, CAPS, TRAPS, MKD diseases are caused by mutations in different genes, but the similar phenotype seen in these diseases suggests that similar pathways and molecules are affected. In the literature, there are omic-based studies in which autoinflammatory diseases are included. Within the scope of this thesis, it was aimed to evaluate these data together, and microarray data sets of mRNA and miRNA-based omic studies were analyzed using programs such as R (4.0.5), BRB-ArrayTools and MeV. Differentially expressed genes were analyzed using DAVID program and InnateDB database and those related to inflammation were determined. Then, the binding possibilities of differentially expressed common mRNAs in these diseases and miRNAs obtained from data sets were shown using the TargetScan database. Finally, the proteins targeted by differentially expressed mRNAs and miRNAs significantly were identified and the protein-protein relationships between these proteins were determined by STRING analysis. As a result of the analyzes, STAT1, NAIP, FAS, MAPK14 proteins, which are important proteins in terms of inflammation, were mainly demonstrated and it was shown that they were interacted with the proteins encoded by the genes that cause the selected diseases. This preliminary data supported the hypothesis that common molecules affect the pathogenesis in selected diseases, and it became important to examine these findings in the laboratory. This thesis will make important contributions to the better classification of diseases by elucidating the pathways that cause inflammation in autoinflammatory diseases and to the identification of molecules that may be the target of treatment in the long term.

Keywords: Autoinflammatory disease, inflammation, mRNA, miRNA, bioinformatics

İÇİNDEKİLER

ONAY SAYFASI	iii
YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI	iv
ETİK BEYAN	v
TEŞEKKÜR	vi
ÖZET	vii
ABSTRACT	viii
İÇİNDEKİLER	ix
SİMGELER VE KISALTMALAR	xii
ŞEKİLLER	xiv
TABLolar	xvi
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	5
2.1. Otoinflamatuvar Hastalıklar	5
2.1.1. Ailevi Akdeniz Ateşi (AAA)	6
2.1.2. Kriopyrin ilişkili Periyodik Sendrom (CAPS)	6
2.1.3. TNF Reseptör ilişkili Periyodik Sendrom (TRAPS)	7
2.1.4. Mevalonat Kinaz Eksikliği (MKD)	7
2.1.5. Periyodik Ateş, Aftöz Stomatit, Farenjit ve Adenit (PFAPA) Sendromu	8

2.2. Otoinflamatuvar Hastalıklar ile İlişkili Yüksek Ölçekli Analizler	8
2.2.1. mRNA Analizleri	9
2.3. Otoinflamatuvar Hastalıklarda miRNA Araştırmaları	12
2.4. mRNA ve miRNA Araştırmalarında Kullanılan Biyoinformatik Araçlar	15
2.4.1. Gene Expression Omnibus (GEO)	16
2.4.2. R Programı	16
2.4.3. Biyometrik Araştırma Programı (Biometric Research Program, BRB- <i>ArrayTools</i>)	17
2.4.4. Multiexperiment Viewer (MeV)	19
2.4.5. miRNA'ların Hedef Genlerinin Belirlenmesi	19
2.5. Protein-protein İlişkilerinin Gösterilmesinde Kullanılan Biyoinformatik Araçlar	21
2.6. Amaç	22
3. BİREYLER VE YÖNTEMLER	24
3.1. Bireyler	25
3.2. Yöntemler	27
3.2.1. Ham Veri Analizi	27
3.2.2. R Programı ile Ham Veri Analizi	27
3.2.3. BRB- <i>ArrayTools</i> ile Ham Veri Analizi	29
3.2.4. MeV ile Ham Veri Analizi	30
3.2.5. mRNA Yolak Analizi ve miRNA Hedef Genlerinin Belirlenmesi	30
3.2.6. STRING ile Protein ve Protein-Protein İlişkilerinin Belirlenmesi	32

4. BULGULAR	34
4.1. R Programı ile Ham Veri Analizi	34
4.2. BRB-ArrayTools ile Ham Veri Analizi	43
4.3. MeV ile Ham Veri Analizi	46
4.4. mRNA Yolak Analizi ve miRNA Hedef Genlerinin Belirlenmesi	46
4.5. miRNA-hedef mRNA İlişkisinin Belirlendiği mRNA'ların Kodladığı Proteinlerin Protein-Protein İlişkilerinin STRING Veri Tabanı ile Gösterilmesi	50
5. TARTIŞMA	53
6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER	59
7. KAYNAKLAR	61
8. EKLER	
EK-1 Tez çalışması ile ilgili Etik Kurul İzni	
EK-2 Tez Orijinallik Ekran Görüntüsü	
EK-3 Dijital Makbuz	
9. ÖZGEÇMİŞ	

SİMGELER VE KISALTMALAR

AAA	Ailevi Akdeniz Ateşi
Ago	Argonat
CAPS	Kriyopyrin İlişkili Periyodik Sendrom
cDNA	Komplementer DNA
CINCA	<i>Chronic Infantile Neurological-cutaneous Articular</i>
CRP	C-reaktif Protein
DGCR8	DiGeorge sendrom kritik bölge geni 8
DIRA	<i>Deficiency of IL-1 receptor antagonist</i>
DITRA	<i>Deficiency of IL-36 receptor antagonist</i>
ESH	Eritrosit Sedimentasyon Hızı
FCAS	<i>Familial Cold Autoinflammatory Syndrome</i>
FDR	<i>False Discovery Rate</i>
GEO	<i>Gene Expression Omnibus</i>
IL1β	İnterlökin 1 Beta
iPSC	Pluripotent kök hücreleri
MEFV	<i>MEditerranean FeVer</i>
MeV	<i>Multiexperiment Viewer</i>
miRISC	miRNA-indükleyici susturma kompleksi
miRNA	mikroRNA
MKD	Mevalonat Kinaz Eksikliği
MVK	Mevalonat Kinaz
MWS	<i>Muckle-Wells Syndrome</i>

NLRP3	<i>NLR family pyrin domain containing 3</i>
NOMID	<i>Neonatal-Onset Multisystem Inflammatory Disease</i>
ORF	Açık okuma çerçevesi
PAPA	<i>Pyogenic Arthritis, Pyoderma gangrenosum and Acne</i>
PFAPA	Periyodik Aftöz Stomatit, Farenjit ve Adenit
Pro-IL-1β	Pro-interlökin-1 beta
RISC	RNA-indükleyici susturma kompleksi
RNP	Ribonükleoprotein
SAA	Serum Amiloid A
SAM	<i>Significance Analysis of Microarray</i>
SoJIA	<i>Systemic Onset Juvenile Idiopathic Arthritis</i>
TRAPS	TNF-Reseptör İlişkili Periyodik Sendrom
TRBP	Transaktivasyona duyarlı RNA bağlayıcı protein
UTR	Kodlanmayan Bölge

ŞEKİLLER

Şekil	Sayfa
2.1. Otoinflamatuvar hastalıkların genetik özellikleri açısından dağılımı.	5
2.2. Literatürde yer alan otoinflamatuvar hastalıklara ait veri setleri.	9
2.3. miRNA'ların gen ifadesi üzerine etkisi.	23
3.1. Tez çalışmasına ait iş akışı.	24
3.2. Omik veri setlerinden tez çalışması kapsamında seçilenler.	25
3.3. R programı ile ifadesi değişen genlerin tanımlanması.	28
3.4. BRB-ArrayTools ile ifadesi değişen genlerin tanımlanması.	29
3.5. DAVID programı ile gerçekleştirilen yolak analizi.	31
3.6. İfadesi değişen genleri hedefleyen miRNA'ların TargetScan ile analizi.	32
4.1. Ön işlemeden geçen GSE17732 (a) ve GSE43553 (b) veri setlerinin box plot grafikleri.	34
4.2. GSE17732 (a) ve GSE43553(b) veri setlerinde gerçekleştirilen Temel Bileşenler Analizi.	37
4.3. Hastalık düzeyindeki analizler için GSE17732 (a) ve GSE43553 (b) veri setlerine uygulanan ANOVA ve Post Hoc testleri.	38
4.4. GSE17732 (a) ve GSE43553 (b) veri setlerindeki gen sayılarının histogram grafiği ile gösterimi.	39
4.5. GSE17732 (a) ve GSE43553 (b) veri setlerindeki genlerin kat değişimlerini gösteren histogram grafikleri.	41
4.6. R (4.0.5) programı ile analiz sonucunda GSE17732 ve GSE43553 veri setlerindeki hasta ve kontrol bireyler arasında ifade farklılığı saptanan ortak genler.	43
4.7. MeV analizi sonucunda veri setlerinde ifadesi değişen miRNA'lar.	46
4.8. DAVID ile ifadesi değişen genlerin ortak yolak analizleri.	47
4.9. İfadesi artan/azalan miRNA'lar ve ifadesi azalan/artan genler.	49

- 4.10.** BRB-ArrayTools analizi sonucunda çıkan ifadesi değişen inflamasyonla ilişkili genlerden miRNA'ların hedeflemediği genler (a) ve ifadesi değişen inflamasyonla ilişkili bulunan genlerden hiçbirini hedeflemeyen miRNA'lar (b). 50
- 4.11.** İfadesi azalan miRNA'ların hedeflediği ifadesi artan genlerin kodladığı proteinler ve protein-protein ilişkileri. 51
- 4.12.** İfadesi artan miRNA'ların hedeflediği-ifadesi azalan genin kodladığı MEF2C proteini ve protein-protein ilişkileri. 51
- 4.13.** *MEFV*, *NLRP3*, *TNFRSF1A*, *MVK* tarafından kodlanan proteinler ile protein-protein ilişkileri. 52

TABLULAR

Tablo	Sayfa
3.1. Veri setlerine ait grupların birey sayıları.	26
3.2. miRNA veri setlerine ait AAA hastaları ve sağlıklı kontrol grubu sayıları.	30
4.3. En az üç hastalık grubu arasında inflamasyonla ilişkisi belirlenmiş, ifadesi değişen, ortak genlere sahip veri setlerinin tablosu.	44
4.4. DAVID programı ile bulunan inflamasyonla ilişkili yollar ve bu yollarda görev alan genler.	48

1. GİRİŞ

Otoinflamatuvar hastalıklar aşırı inflamasyonla karakterize olup doğal immün hücreleri ve moleküllerinin etkilenmesi sonucunda inflamasyon yanıtlarının arttığı bir hastalık grubudur. Genelde belirtileri çocukluk çağında başlamaktadır. Tipik olarak ateş, döküntü, lenfadenopati, serozal membranlar, iç kulak, göz, kas-iskelet ve gastrointestinal sistemin inflamatuvar lezyonları ile ortaya çıkmaktadır [1]. Tanı koyarken öncelikle klinik bulgular değerlendirilmektedir. Ardından genetik testler ile teyit edilebilmektedir. Genetik testler için birinci ön koşul sistemik inflamasyonu kanıtlayan C reaktif protein (CRP), eritrosit sedimentasyon hızı (ESH) ve serum amiloid A (SAA) düzeylerinin ölçülmesidir. İkinci koşul olarak da klinik bulgular ile ilişkili monogenik bir hastalığın varlığı ve hastalıktan sorumlu olabilecek genin biliniyor olması gerekmektedir [2].

Otoinflamatuvar hastalıklar, monogenik ve poligenik özellik taşıyabilmektedirler. Klinik ve moleküler özellikleri, hastalıkları kendi aralarında gruplandırmamıza olanak sağlar. Monogenik formlarında otozomal resesif geçişli ailevi Akdeniz ateşi (AAA, MIM #249100), Mevalonat Kinaz Eksikliği (MKD, MIM #251170) ve otozomal dominant geçişli Kriyopyrin ilişkili Periyodik Sendrom (CAPS; *Familial Cold Autoinflammatory Syndrome*, FCAS, MIM #120100, *Muckle-Wells Syndrome*, MWS, MIM #191900, *Neonatal-Onset Multisystem Inflammatory Disease*, NOMID, MIM #607115 veya *Chronic Infantile Neurological-cutaneous Articular*, CINCA, MIM #607115), TNF Reseptör ilişkili Periyodik Sendrom (TRAPS, MIM #142680) iyi bilinen hastalıklar arasında yer almaktadır [3].

Birçok otoinflamatuvar hastalık, inflamazomları oluşturan proteinlerin kodlandığı genlerdeki mutasyonlarla meydana gelmektedir [4]. AAA hastalığı, pyrin inflamazom kompleksi için temel bir protein olan pyrin proteinini kodlayan *Mediterranean fever (MEFV)* geninde meydana gelen mutasyonlar sonucunda ortaya çıkmaktadır. CAPS, kriyopyrin proteinini kodlayan *NLR family pyrin domain containing 3 (NLRP3)* genindeki mutasyonlarla tanımlanırken, *NLRP3*'te meydana gelen mutasyonlar NLRP3 inflamazomunun aşırı aktivasyonuna sebep olmaktadır. MKD

hastalığında, mevalonat kinaz (MVK) genindeki mutasyonlar sonucu nonsterol izoproneidlerin ve ürünlerinin azalması, kaspaz 1 aktivasyonu ile interlökin-1 beta (IL-1 β) üretiminde artışa yol açmaktadır [5]. İnflamazomlar çeşitli yollarla aktive olabilmektedirler. İnflamazom aktive olduğunda prokaspaz-1 kaspaz-1'e, pro-interlökin-1 beta (pro-IL-1 β) aktif formu olan IL-1 β 'ya dönüşmektedir [4]. Sonuç olarak doğal immün sistem hücreleri sitokinler üretilip salgılayarak inflamasyonu başlatmaktadır. Bu mekanizma, otoinflamatuvar hastalıkların tedavisinde IL-1 β blokajı yapan tedavileri önemli kılmaktadır. AAA, CAPS, TRAPS ve MKD hastalıkları IL-1 β bağımlı bir hastalık grubu olup, inflamazomu doğrudan veya IL-1 β 'nın aktivasyonundaki yollarını etkilemektedirler [5,6]. Bu hastalıklar, IL-1 β bloke edici tedavilere önemli ölçüde yanıt vermektedir [7]. IL-1 β 'nin inhibisyonu birçok otoinflamatuvar hastalıkta iyi bir tedavi seçeneği olmasına rağmen, hepsi için uygun görülmemektedir [8].

Bu hastalıkların yanı sıra, monogenik otoinflamatuvar hastalıklardan iyi bilinen otozomal resesif geçişli olanlar; İnterlökin-1 Reseptör Antagonisti Eksikliği (*Deficiency of IL-1 receptor antagonist*, DIRA), İnterlökin-36 Reseptör Antagonisti Eksikliği (*Deficiency of IL-36 receptor antagonist*, DITRA), Majeed sendromu ve otozomal dominant kalıtıma sahip Piyojenik Steril Artrit, Piyoderma Gangrenozum, Akne (*Pyogenic Arthritis, Pyoderma gangrenosum and Acne*, PAPA) Sendromu, Ailevi Soğuk Otoinflamatuvar Sendrom 2 (*Familial cold autoinflammatory syndrome 2*, FCAS2) ve Blau Sendromu olup Infevers veri tabanında otoinflamatuvar hastalıklara ilişkin 48 gen tanımlanmıştır [9].

Poligenik formda görülen otoinflamatuvar hastalıklar; Periyodik ateş, aftöz stomatit, farenjit ve adenit (*periodic fever, aphthous stomatitis, pharyngitis and adenitis*, PFAPA) sendromu, Behçet Hastalığı, Sistemik başlangıçlı juvenil idiyopatik artrit (*Systemic Onset Juvenile Idiopathic Arthritis*, SoJIA) vb.dir. Sistemik inflamasyon ve klinik özelliklerin yanında tekrarlayan ateş epizodlarıyla karakterize edilmektedirler [4]. Bunların arasından PFAPA başta olmak üzere bazı hastalıklar, monogenik

otoinflamatuvar hastalıklarla patofizyolojik veya fenotipik benzerliklere sahip olup, multifaktöriyel hastalıklar arasında sınıflandırılmaktadır.

Otoinflamatuvar hastalıklar ile ilişkili bugüne kadar hem genetik temellerini hem de etkilenen moleküler yolları anlamaya yönelik birçok araştırma yapılmıştır. Son yıllarda genombilim alanında kullanılan teknolojilerin de gelişmesiyle yüksek ölçekli analizleri içeren otoinflamatuvar hastalık araştırmaları dikkati çekmektedir [10]. Bu araştırmalar içerisinde özellikle mRNA ve miRNA temelli omik çalışmalar bu hastalıklarda etkilenen diğer genlerin belirlenmesi ve yolların anlaşılması açısından önem taşımaktadır. Büyük verilerin elde edildiği bu tip araştırmalarda sınırlı bir hasta sayısı veya hastalık tipi ile analizlerin yapıldığı görülmüş olup bu verilerin biyoinformatik olarak 'meta-analiz' yaklaşımı ile hepsinin birlikte analiz edilmesinin bu hastalıklarda ortak olarak etkilenen yolların belirlenmesi açısından önemli veriler sunabileceği anlaşılmaktadır.

Bu bilgiler ışığında tez kapsamında otoinflamatuvar hastalıklar arasından fenotip açısından benzerlikler içermeleri nedeniyle seçilmiş olan; AAA, CAPS, TRAPS, MKD ve PFAPA hastalıklarında bugüne kadar yapılmış olan mRNA ve miRNA temelli omik çalışmaların mikrodizin veri setleri R (4.0.5), *BRB-ArrayTools* ve MeV gibi programlar kullanılarak analiz edilmiştir. İfadesi değişen genlerin ortak yolları DAVID veri tabanı üzerinden analiz edilmiş ayrıca inflamasyonla ilişkilerine InnateDB veri tabanı kullanılarak bakılmıştır (<http://www.innatedb.com>). Bu hastalıklarda ortak olarak ifadesi değişen inflamasyonla ilişkili mRNA'lar, yine bu hastalıklarda ifadesi değişen miRNA'ların hedef genleri olabileceğinden, veri setlerinden elde edilen mRNA ve miRNA'lar bağlanma olasılıkları için TargetScan veri tabanı kullanılarak analiz edilmiştir. Analizler sonucunda anlamlı olarak ifadesi değişen inflamasyonla ilişkili mRNA ve miRNA'ların hedeflediği proteinler tanımlanmış, bu proteinlerin arasındaki protein-protein ilişkileri, STRING analizleri ile gösterilmiştir. Bu analizler sonucunda; AAA, CAPS, TRAPS, MKD ve PFAPA otoinflamatuvar hastalıklarına sebep olan primer genler farklı olsa da, bu hastalıklarda etkilenen inflamatuvar yollarda önemli olabilecek ortak mRNA'ların, miRNA'ların ve hedef aldıkları proteinlerin ve bunların

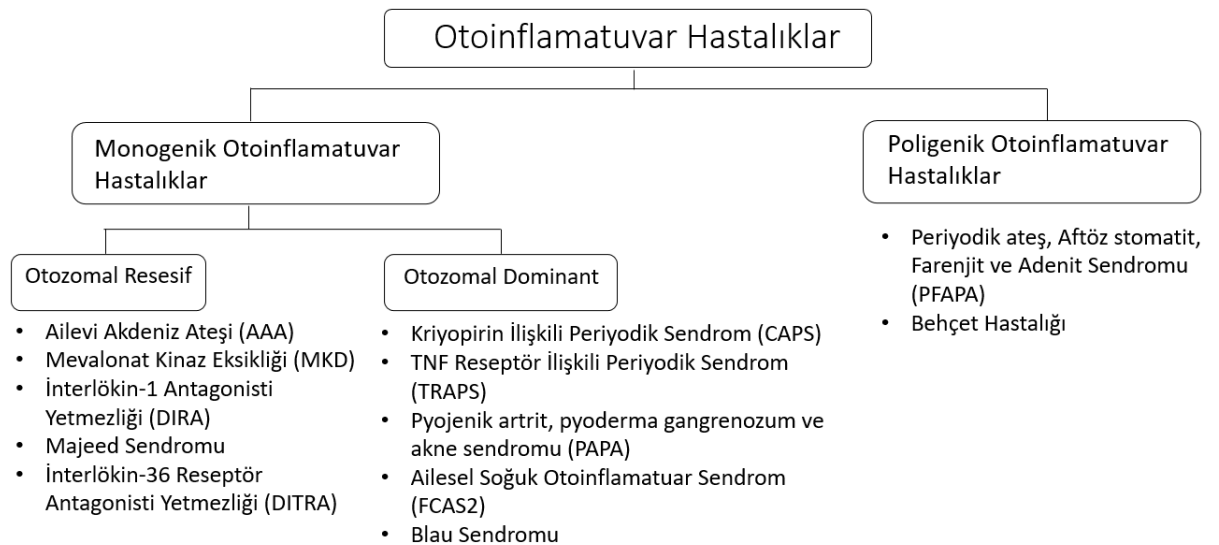
protein-protein ilişkilerinin biyoinformatik araçlar yardımı ile aydınlatılması amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Otoinflamatuvar Hastalıklar

Otoinflamatuvar hastalıklar ilk olarak McDermott ve ark. tarafından 1999 yılında tanımlanmıştır. İlk tanımından bugüne kadar, doğal bağışıklık sisteminin farklı bölümlerini etkileyen otoinflamatuvar hastalıklarla ilişkili 30'dan fazla gen tanımlanmıştır. Bu hastalık grubu için birincil tanımlayıcı kriter, otoantikörlerin veya antijene özgü T hücrelerinin eksikliğinde gelişen bir sistemik inflamasyondur. Ateşin yanı sıra karın, eklem ve kutanöz bulgular görülmekte olup bunlar klinik tanıyı zorlaştırmaktadır [2].

Bu hastalık grubu genetik özellikler açısından monogenik ve poligenik olmak üzere iki başlık altında gruplandırılmaktadır. Poligenik otoinflamatuvar hastalıklar birçok faktörün etkisi altında olabilmektedir. Multifaktöriyel özellikler açısından daha kompleks bir hastalık alt grubunu oluşturmaktadır. Monogenik otoinflamatuvar hastalıkların çoğunda sorumlu genler, ilgili genlerin ürünleri olan proteinler ve yer aldıkları yollar aydınlatılmış olsa da halen moleküler patogeneze ilişkin soru işaretleri bulunmaktadır [5]. Otoinflamatuvar hastalıklardan en iyi bilinenleri genetik özelliklerine göre gruplandırılarak Şekil 2.1'de verilmiştir.



Şekil 2.1: Otoinflamatuvar hastalıkların genetik özellikleri açısından dağılımı.

2.1.1. Ailevi Akdeniz Ateşi (AAA)

Bu hastalık grubu içerisinde ilk defa geni tanımlanmış, en yaygın otoinflamatuvar hastalık otozomal resesif geçişli ailevi Akdeniz ateşi'dir. Pyrin proteinini kodlayan *MEFV* geninde meydana gelen mutasyonlarla tanımlanmaktadır. Mutant pyrin, kaspaz-1 aktivasyonu beraberinde artan IL-1 β üretimiyle inflamasyona sebep olmaktadır. Pyrin, pyrin inflamazom kompleksi için temel bir proteindir. Birçok çalışmada pyrinin, önemli hücresel yollardan apoptoz, hücre iskeleti dinamiği, sinyal iletimi ve inflamasyon ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. Tekrarlayan ateş atakları, karın ağrısı, göğüs ağrısı ve artrit ile karakterizedir. Hastalığın bilinen en iyi tedavisi günlük kolşisin uygulamasıdır. Kolşisin, AAA hastalığı tedavisinin yanında bazı inflamatuvar hastalıkların tedavisinde de kullanılmaktadır. *MEFV* geninin ilk olarak tanımlanmasından bu yana, çoğu çalışma M694V mutasyonunun ciddi bir fenotip ile ilişkili olduğunu göstermektedir. Özellikle M694V mutasyonu veya ekzon 10 üzerindeki 680-694 pozisyonundaki mutasyona uğramış alellerden ikisini (homozigotlar veya bileşik heterozigotlar) taşıyan AAA hastaları, daha şiddetli bir hastalığa sahip olma riski altında düşünülmelidir. Semptomları göstermeyen, iki patojenik mutasyonu olan AAA bireylerinde, amiloid A (AA) amiloidoz için ülke, aile öyküsü ve sürekli olarak yükselen inflamatuvar belirteçler, özellikle serum amiloid A (SAA) proteini gibi risk faktörleri varsa, yakın takip başlatılmalı ve tedavi dikkate alınmalıdır [5,10].

2.1.2. Kriyopyrin ilişkili Periyodik Sendrom (CAPS)

Kriyopyrin proteinini kodlayan *NLRP3* genindeki mutasyonlarla tanımlanmakta olan otozomal dominant kalıtım modeline sahip bir hastalıktır. *NLRP3*'te meydana gelen mutasyonlar *NLRP3* inflamazomunun aşırı aktivasyonuna sebep olmaktadır. Bu da pro-IL-1 β 'nin, kaspaz-1 aktivasyonu ile artan IL-1 β üretimiyle sonuçlanmaktadır. Hastalarda görülen yaygın semptomlar ateş, ürtikerde döküntü, kas-iskelet sistemi semptomları, yüksek seviyelerde akut faz reaktanları ve konjunktivittir. Tedavinin temeli anti-IL-1 β ilaçlarına dayanmaktadır [5].

Yaygın bilinen otoinflamatuar hastalıklar arasından CAPS, klinik spektrumu geniş olmakla birlikte üç farklı hastalık formundan oluşmaktadır. Bunlardan en hafif olanı Ailesel Soğuk Otoinflamatuar Sendrom (FCAS, MIM #120100), orta formu Muckle-Wells Sendromu (MWS, MIM #191900) ve en şiddetli formu Kronik İnfantil Nörolojik Kutanöz ve Eklem Sendromu (CINCA, MIM #607115) veya Neonatalonset Multisistemik İnflamatuar Bozukluk (NOMID, MIM #607115) şeklinde bilinmektedir. Daha önce bağımsız olarak tanımlanmış bu üç hastalık NLRP3 mutasyonu ile ilişkilendirilmiş ve genetik olarak gruplandırılmıştır [6].

2.1.3. TNF Reseptör İlişkili Periyodik Sendrom (TRAPS)

TNF Reseptör İlişkili Periyodik Sendrom, otozomal dominant geçişli bir hastalık olup tümör nekroz faktör reseptör süper aile üyesi 1A (*TNFRSF1A*) genindeki mutasyonlarla tanımlanmaktadır. Meydana gelen mutasyonlar sonucunda TNFR1'in (TNF- α reseptör 1) yanlış katlanması ve anormal oligomerizasyonu, TNF bağlanmasında azalma, TNF ile indüklenen apoptozda azalma ortaya çıkabilmektedir. TNFR1 agregatlarının birikmesi, TRAPS ilişkili nükleer faktör kappa B'nin (NF- κ B) indüklenmesine neden olmaktadır. Bu sebeple aşırı IL-1 β salgılanması tetiklenerek, kronik inflamasyon meydana gelmektedir. Tanısında kas romatizması, migratuvar döküntü, peritonite neden olmayan karın ağrısı ve ateş nöbetleri belirleyicidir. Ataklar devamlı veya sürekli olup haftalarca sürebilmektedir. Tedavisinde yüksek doz kortikosteroidler ve interlökin-1 (IL-1) reseptör antagonisti uygulanmaktadır [5].

2.1.4. Mevalonat Kinaz Eksikliği (MKD)

Mevalonat Kinaz Eksikliği, Mevalonat Kinaz (*MVK*) geninde meydana gelen mutasyonların sebep olduğu otozomal resesif kalıtım modeline sahip bir hastalıktır. MVK geninin kodladığı MVK enzimi, kolesterol ve izopren biyosentezinde yer almaktadır. MVK genindeki mutasyonlar sonucu nonsterol izoprenoidlerin ve ürünlerinin azalması, GTPaz'ların ektopik aktivasyonu yanında kaspaz-1 aktivasyonu ile IL-1 β üretiminde artışa yol açmaktadır. Tekrarlayan ateş ataklarının yanı sıra hastalarda lenf bezi büyümesi, karın ağrısı, ishal, kusma, kas-iskelet sistemi semptomları, artrit, baş ağrısı gibi semptomlar görülebilmektedir. Tedavisinde IL-1 β

bloke edici ajanlar ve TNF bloke edici ajanlar kullanılmaktadır. Mevalonik asit yükselmesi, hastaların ateşli döneminde tanı için önemlidir. Hastalığın diğer adı HIDS (Hiperİmmünglobulin D Sendromu) olmakla birlikte, serum IgD ölçümünün duyarlılığı (sensitivite) ve özgüllüğü (spesifite) kullanışlı bir tanı testi için yeterli olmadığından, HIDS adlandırması yerine MVK eksikliği daha uygun görülmektedir. Bununla birlikte, tam mevalonat kinaz eksikliği, mevalonik asidüri adı verilen daha şiddetli bir hastalığa neden olmaktadır. Mevalonik asidüri olan çocuklar mevalonat kinaz eksikliğine benzer inflamatuvar ataklar sergilerken, aynı zamanda büyüme geriliği, dismorfi ve ciddi nörolojik bozukluklar geliştirmektedirler [5,6].

2.1.5. Periyodik Ateş, Aftöz Stomatit, Farenjit ve Adenit (PFAPA) Sendromu

Periyodik ateş, aftöz stomatit, farenjit ve adenit (periodic fever, aphthous stomatitis, pharyngitis and adenitis, PFAPA) sendromu ilk defa 1987 yılında, çocukluk dönemindeki en yaygın periyodik ateş sendromlarından biri olarak tanımlanmıştır. Patogenez üzerine yapılmış çalışmalar, ilk olarak doğal immün sistemin inflamazomlar aracılığıyla aktive edildiğini ve ardından T hücresi aracılı adaptif bir immün yanıtın geldiğini göstermektedir. Etyopatogenezi bilinmemektedir. Düzenli olarak ortaya çıkan ateşli farenjit atakları, oral aftöz lezyonlar ve genişlemiş servikal lenf düğümleri ile karakterizedir. Atak sıklığını azaltmak için simetidin, kolşisin ve tonsillektomi gibi farklı tedaviler ile IL-1 β inhibitörleri gibi yeni seçenekler vardır [11].

2.2. Otoinflamatuvar Hastalıklar ile İlişkili Yüksek Ölçekli Analizler

Genel olarak hastalıkların moleküler temellerini araştırmak için gen ifadesinin analiz edildiği yüksek ölçekli çalışmalar yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu çalışmaların çoğu hasta ve sağlıklı gruplar arasında tüm genom bazında değişen ifadeye sahip olan genleri tanımlamayı amaçlamaktadır [12]. Transkriptom ifadesi, bir hücre veya dokudaki tüm gen transkriptlerini belli bir zamanda ifade etmek amacıyla kullanılmaktadır. Son teknolojik gelişmeler transkriptomun incelenmesini sağlayarak, bağışıklık aracılı hastalıkları destekleyen hücresel ve moleküler olayları karakterize etmek için imkanlar sunmaktadır [13,14].

Tez kapsamında seçilen monogenik ve poligenik otoinflamatuvar hastalıklara ilişkin bugüne kadar yapılmış mRNA ve miRNA temelli omik çalışmalar mevcuttur (Şekil 2.2).

Accession no	Denei tipi	Organizma	Hastalık	Platform	Örnek tipi
GSE17732	mRNA mikrodizin	<i>Homo sapiens</i>	PFAPA, AAA, TRAPS, CAPS	Affymetrix Human Genome U133A 2.0 Array	Kan
GSE43553	mRNA mikrodizin	<i>Homo sapiens</i>	CAPS, MKD, TRAPS, PAPA	Affymetrix Human Genome U133A 2.0 Array	Periferik Kan Mononükleer Hücre (PBMC)
GSE97075	mRNA mikrodizin	<i>Homo sapiens</i>	MKD	Illumina HumanHT-12 V4.0	Kan
GSE104282	RNA-seq	<i>Homo sapiens</i>	MKD	Illumina HiSeq 2000	Monosit
GSE98163	mRNA mikrodizin	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	MKD	Agilent-016322 Yeast	Maya V2
GSE58959	mRNA mikrodizin	<i>Homo sapiens</i>	NLRP3 inflamazom (CAPS)	Affymetrix Human Gene 1.0	THP-1
GSE38626	mRNA mikrodizin	<i>Homo sapiens</i>	CAPS-NOMID	Agilent-028004 SurePrint G3 Human	İndüklenmiş Pluripotent Kök Hücre (iPSC), makrofaj Glomerül
GSE43928	mRNA mikrodizin	<i>Mus musculus</i>	TRAPS	Affymetrix Mouse Genome 430 2.0 Array	Kan
GSE40561	mRNA mikrodizin	<i>Homo sapiens</i>	MKD, CAPS	Illumina HumanHT-12 V3.0	Dermal Fibroblast
GSE109363	miRNA TaqMan Dizin	<i>Homo sapiens</i>	TRAPS	Human Array MicroRNA Card A v2	Periferik Kan Mononükleer Hücre (PBMC)
GSE111311	miRNA mikrodizin	<i>Homo sapiens</i>	AAA	Nanostring(NS_H_MIR_V3A)	

Şekil 2.2. Literatürde yer alan otoinflamatuvar hastalıklara ait veri setleri.

2.2.1. mRNA Analizleri

Çeşitli stratejiler uygulanarak gen ifade analizleri yapılabilmektedir. Geleneksel yöntemleri arasında *Northern* blot, Revers-Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PCR), gen ekspresyonunun sıralı analizi (SAGE) ve DNA mikrodizinleri bulunmaktadır. *Northern* blot analizi, RNA'yı boyuta göre ayırmak için elektroforez kullanan düşük bir verimli yöntemidir. Spesifik olmayan hibridizasyon nedeniyle düşük hassasiyete sahiptir. RT-PCR, RNA moleküllerinin retrovirüslerden izole edilen Revers transkriptaz enzimi yardımıyla komplementer DNA (cDNA) sentezini gerçekleştirilmesi sonucu, gen ekspresyonu analizlerinin yapılabildiği hızlı ve hassas bir yöntemdir. SAGE, cDNA'nın 3p ucunda biyotin etiketli cDNA oluşturmayı içeren bir gen ekspresyon profili oluşturma yöntemidir. Spesifik transkriptleri benzersiz bir şekilde tanımlayabilen 14 veya 21 bp'lik kısa dizi etiketleri, kısıtlama enzimleri (NLA III) kullanılarak çıkarılmaktadır. Bu yöntem, transkript miktarının doğrudan ölçülmesine ve birden çok örnek arasındaki karşılaştırmaya izin vermektedir. Günümüzde yaygın olarak kullanılan ve tez kapsamında analizleri yapılacak olan DNA

mikrodizin teknolojisi ise, bilinen veya varsayılan transkriptlerin RNA ekspresyon seviyelerinin aynı anda ölçülmesine izin vermekte olup, gen ekspresyon profilini karakterize etmek için geliştirilmiştir. DNA mikrodizin teknolojisinin ortaya çıkışı, çeşitli hücre tipleri ve hastalık fenotiplerinin genlerin ifadesi açısından kapsamlı karakterizasyonunu ve/veya karşılaştırılmasını sağlamıştır. Bilinen mRNA'ların daha pratik olarak taranması için mRNA mikrodizinleri seçilebilirken, hem bilinen hem de bilinmeyen mRNA'ların analizi için RNA dizileme (RNA-Seq) platformları seçilebilmektedir. Öncelikle son yıllarda dizileme teknolojilerinde yaşanan ilerlemenin sonucunda geliştirilen; RNA-Seq, bir hücrenin transkriptomu hakkında bilgi sağlarken hem bilinen hem de bilinmeyen RNA moleküllerinin analizine imkan vermesi açısından öne çıkmaktadır [15]. RNA analizlerinde başlangıç için biyolojik materyal tam kan, plazma veya serum olabilmektedir. Diğer yandan, hücre hatları veya primer hücreler, hastalık patogenezi ile ilişkili mRNA'ların saptanması için kullanılabilir [16].

Otoinflamatuvar hastalıklarla ilişkili olarak literatürde yer alan mRNA analiz çalışmalarından GSE17732 numaralı veri setinde, PFAPA hastalarına ait kan hücrelerinde AAA, TRAPS, CAPS hastalıklarıyla karşılaştırmalı olarak mRNA'ların ekspresyon seviyeleri için mikrodizin analizi gerçekleştirilmiştir. Çalışmada bulunan veriler, serum sitokinleri ve gen ekspresyonu seviyesinde PFAPA ve diğer otoinflamatuvar hastalıklar (AAA, CAPS, TRAPS) arasında önemli ayrımlar çizerek, PFAPA tanısı ve hastalığın patofizyolojisi için katkıda bulunabilecek biyobelirteçler önermektedir [17]. GSE104282 numaralı veri setinde, kontroller ve MKD hastalarının monositlerinde, inflamasyonun tetiklendiği hücrelerde transkriptomik analizi RNA dizileme ile elde edilmiştir. RNA-seq analizi sonucunda, mevalonat kinaz eksikliğine bağlı olan HIDS hastalarından elde edilen monositlerin *trained* bağışıklık fenotipi sergilediği gösterilmiştir. [18]. GSE109363 veri setinde, TRAPS hastalarına ait dermal fibroblastları kontrollerle karşılaştırmalı olarak miRNA'ların kat değişiklikleri TaqMan Low-Density Array Card ile analiz edilmiştir. TRAPS hastalarında, miR-146a ve miR-155'in aşağı regülasyonunun yanında, *T50M*, *C472* ve *C8R* genotiplerinde gözlenen pro-inflamatuvar fenotipe katkıda bulunan küresel miRNA düzensizliğinin varlığı

gösterildi [19]. GSE58959 veri setinde, THP-1 hücre hattında NLRP3 inflamazom aktivasyonuna yanıt veren genlerin mRNA ekspresyon profilleri mikrodizin ile analiz edilmiştir. Moleküler ağ analizi ile, hücresel gelişim ve ölümden yer alan karmaşık bir NLRP3 inflamazom aktivasyonuna duyarlı genler ve transkripsiyon faktörleri olan *AP-1*, *NR4A* ve *EGR*'nin merkez olarak görev aldığı bağışıklık ve inflamatuvar yanıtlar belirlenmiştir [20]. GSE43553 veri setinde, CAPS hastalarına ait periferik kan mononükleer hücrelerinde MKD, TRAPS ve PAPA hastalıklarıyla karşılaştırmalı olarak mRNA ekspresyon profillerinin mikrodizin ile analizi yapılmıştır. Çalışmada farklı şekilde eksprese edilmiş genler, hem doğal hem de adaptif bağışıklık yanıtlarının düzenlenmesinde yer alan transkriptleri ve oksidatif stres, apoptoz gibi diğer hücresel süreçleri içerdiği bulunmuştur [21]. GSE40561 numaralı veri setinde CINCA, MWS, MKD, HOIL eksikliği hastalarında mRNA ekspresyonu mikrodizin analiziyle gerçekleştirilmiştir [22]. GSE43928 veri setinde, TRAPS hastalığına ilişkin olarak farelerde glomerüller üzerinde mRNA ekspresyon profilleri mikrodizin ile analiz edilmiştir. TNFR'ye özgü inflamatuvar yanıtları incelemek için intrinsik glomerüler hücrelerde, in vitro TNF maruziyetinden sonra vahşi tip ve TNFR eksik farelerden izole edilen bozulmamış glomerül üzerinde mikrodizin gen ekspresyonu gerçekleştirilmiştir [23]. GSE38626 veri setinde, Neonatal Başlangıçlı Multisistemik İnflamatuvar ve CAPS hastalığına (CINCA/NOMID) ait indüklenmiş pluripotent kök hücrelerinde (iPSC) ve makrofajlarda mRNA ekspresyon profilleri karşılaştırmalı olarak mikrodizin ile analiz edilmiştir [24]. GSE111311 numaralı veri setinde, AAA hastaları ve sağlıklı kontroller arasında periferik kan mononükleer hücrelerinden miRNA ekspresyon profili mikrodizin ile elde edilmiştir. AAA hastaları ve sağlıklı kontroller arasında diferansiyel ekspresyonu olan 7 miRNA belirlenmiştir [25]. GSE98163 numaralı veri setinde, *ERG12* geni (MVK geninin *Saccharomyces cerevisiae* mayasında ortologu) ile Mevalonat Kinaz Eksikliği arasındaki ilişkinin anlaşılması için *ERG12* enziminin aktivitesinin düştüğü durumda mRNA ekspresyon profilleri mikrodizin ile analiz edilmiştir. Mevcut çalışma, bu mayayı, hastalığın gelişimindeki *ERG12* geninin (MVK) rolünü analiz etmek için biyolojik bir model olarak kullanmayı amaçlamaktadır [26]. GSE97075 numaralı veri setinde, MKD hastaları arasında kanakinumab tedavisinin

etkinliğini ve güvenliğini değerlendirmek için mRNA ekspresyon profilleri mikrodizin ile analiz edilmiştir [27].

Bu çalışmalarda dikkati çeken, bazılarında hastalık kontrolü kullanılarak karşılaştırma yapılmış olsa da, ilgili veriler sadece analiz edildikleri hastalıklar çerçevesinde değerlendirilmiştir. Bu hastalıklarda inflamazom aktivasyonu sürecinin benzer şekilde gerçekleştiği bilinmektedir. Dolayısıyla, inflamatuvar yolda, IL-1 β cevabı gibi ortak olarak görülen basamaklar için bu hastalıklardan elde edilen verilerin birlikte değerlendirilmesi önem taşımaktadır.

2.3. Otoinflamatuvar Hastalıklarda miRNA Araştırmaları

miRNA'lar, transkripsiyon sonrası genlerin ekspresyonunu düzenleyen, yaklaşık 22 nükleotid uzunluğunda, küçük, kodlayıcı olmayan RNA molekülleridir. Her miRNA, çok sayıda geni hedefleme potansiyelinde olup, bir miRNA ailesi için bu sayı ortalama 500 civarındadır. Deneysel olarak doğrulanmış olan biyoinformatik analizler sonucu tek bir genin 3'UTR ucunun birkaç farklı miRNA tarafından hedeflendiği öngörülmüştür [28].

miRNA'ların oluşum süreci iki basamaktan meydana gelmektedir. İlk olarak hücre çekirdeğinde RNA Polimeraz II tarafından baş (cap) ve poli A kuyruğuna sahip, birincil miRNA (pri-miRNA) transkriptleri oluşmaktadır. Daha sonra DiGeorge sendrom kritik bölge geni 8 (DGCR8)-Drosha enzim kompleksi ile pri-miRNA'ların kırılması sonucu yaklaşık 70 nükleotid uzunluğunda saç tokası (*hairpin*) yapısındaki öncül miRNA (pre-miRNA) meydana gelmektedir. Bu oluşan pre-miRNA'lar, exportin 5 proteini ile çekirdekte sitoplazmaya taşınmaktadır. Sitoplazmada bulunan transaktivasyona duyarlı RNA bağlayıcı protein (TRBP) ile kompleks olan Dicer aracılığıyla kesilerek olgun miRNA ve tamamlayıcısını içeren RNA dubleksiyi meydana gelmektedir. Bir kolu olgun miRNA olarak devam ederken işlemler sırasında diğeri bozulmaktadır. Kalan olgun miRNA, Argonat (Ago) proteinlerini içeren miRNA-indükleyici susturma kompleksi (miRISC) adlı ribonükleoprotein (RNP) komplekslerine veya RNA-indükleyici susturma komplekslerine (RISC) dahil edilmektedir. Bu kompleks içerisinde miRNA'da yer alan yaklaşık 8 nükleotitlik 'çekirdek dizisi'

aracılığıyla miRNA-mRNA bağlantısı kurulmaktadır. miRNA'nın, hedef mRNA'nın 3' kodlanmayan bölgesine (UTR) spesifik bir biçimde bağlanması sonucu post transkripsiyonel düzenleme gerçekleşmektedir. Genellikle 3'UTR bölgesine bağlansalar da miRNA'lar 5'UTR bölgesine veya açık okuma çerçevesine (ORF) de bağlanabilmekte olup gen ekspresyonunu düzenleyebilmektedirler [29].

Yapılan araştırmalarda miRNA'ların eksozomlar veya mikropartiküller içinde paketlenilebileceğini, daha sonra hücrelerden çevre dokuya veya dolaşıma salınabileceğini göstermiş bulunmaktadır [30]. Zira bağlı veya lipide bağlı hücre dışı miRNA'lar oldukça stabil olmakla birlikte kan, tükürük, bronş salgıları, idrar ve anne sütü dahil neredeyse tüm vücut sıvılarında tespit edilebilmektedirler. Bu özellikler göz önüne alındığında, miRNA'lar belirli hastalıkların teşhisi, prognozu ve tedavi yanıtlarının izlenmesi için potansiyel klinik biyobelirteçlerdir. Diğer yandan miRNA'lar tedavi için de yüksek potansiyel sergilemektedirler. İnflamatuvar hastalıklar, kanser, kardiyovasküler ve metabolik hastalıklar, hepatit C enfeksiyonu ve fibrozis gibi birçok hastalıkta tedavi yaklaşımları ile ilgili miRNA çalışmaları ile başarılı sonuçlar elde edilmiştir [16].

miRNA'lar, kanser patogenezinde, bağışıklık yanıtlarında, otoinflamatuvar ve otoimmün hastalıkların patogenezinde yer alan çok sayıda gen ve yolağın yeni moleküler düzenleyicileri olarak ortaya çıkmıştır [31]. B ve T hücrelerinin gelişimi ve farklılaşması, monositlerin ve nötrofillerin proliferasyonu, antikör aktivasyonu ve inflamatuvar düzenleyicilerin salınımı ile ilgili yollarda çok sayıda miRNA tanımlanmıştır [32].

İnflamatuvar süreçlerin düzenlenmesinde miRNA'ların da rol oynayabileceği birçok çalışma tarafından gösterilmiştir. Literatürde yer alan çalışmaların bazılarında AAA patogenezinin epigenetik bir mekanizma olarak miRNA'lar ile ilişkili olabileceği gösterilmiştir. AAA hastalığında miRNA'ların rolünü araştırmak için yapılmış bir çalışmada *MEFV* geni susturulmuş insan pre-monositik (THP-1) hücre hattı, miR-4520a ekspresyonunda önemli bir artış göstermiştir [33]. Diğer bir çalışmada, inflamatuvar sitokin üretiminin bir baskılayıcısı olan miR-204-3p'nin atak süresi

boyunca AAA hastalarının serumunda azaldığı bulunmuştur [34]. Wada ve arkadaşları tarafından AAA atakları sırasında dolaşımdaki miRNA düzeylerinin değiştiği AAA hastalarında gösterilmiştir [35]. Hacettepe Üniversitesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'nda tamamlanmış miRNA çalışmaları da mevcuttur. Bunlardan birisi "Tübitak 1001: Ailevi Akdeniz Ateşi Patogenezinde MEFV Gen İfadesinin Düzenlenmesinde Rol Oynayan miRNA'ların Belirlenmesi" başlıklı 214S106 numaralı projedir. Buradaki örneklem grubunda daha ağır ve hafif fenotipe sahip AAA hastaları sağlıklı kontrollerle karşılaştırılmış ve buradan inflamasyonla ilişkili miRNA'lar bulunmuştur. Diğer bir proje olan "ERARE: Otoinflamatuvar Hastalıklarda Kişiselleştirilmiş Moleküler Tıp İçin Klinik ve Deneysel Çalışma: Modifiye Edici Faktörlerin Rolü (Era-Net Projesi ERARE-Tübitak)" başlıklı 315S096 numaralı projede, AAA hastaları sayı olarak daha fazla tutularak, MKD ve CAPS hastaları ile beraber tanımlanmamış otoinflamatuvar hastalık örneği dahil edilmiştir. Elde edilen sonuçlar üzerinden inflamasyonla ilişkili miRNA'lara odaklanılmıştır.

Yapılan araştırmalarda CAPS hastalığında da miRNA'lar aracılığıyla epigenetik düzenlemenin varlığı keşfedilebilmektedir. Bauernfeind ve arkadaşları, miR-223'ün NLRP3 inflamazomunun kritik bir düzenleyicisi olduğunu göstermiştir. Bu çalışmada araştırmacılar tarafından, NLRP3'ün 3' UTR içindeki korunmuş bir bağlanma bölgesi aracılığıyla miR-223'ün NLRP3 ekspresyonunu baskılayarak NLRP3 inflamatuvar aktivitesini azalttığı belirlenmiştir [36]. Aubert ve arkadaşları, Muckle-Wells Sendromu (MWS) ve Neonatal Başlangıçlı Multisistem İnflamatuvar Hastalık (NOMID) hastalarından alınan deri biyopsilerini hem lezyonsuz hem de normal deri örnekleriyle karşılaştırmışlardır. miR-29c ve miR-103-2 lezyonlarda önemli ölçüde aşağı regüle olurken, miR-9-1, miR-199a-2, miR-203 ve miR-320a yukarı regüle edilmiştir [37].

AAA ve CAPS hastalıklarının yanında TRAPS hastalığı ile ilişkili olarak da miRNA'lar rapor edilmiştir. Lucherini ve arkadaşları, TRAPS hastalarında miRNA'ları analiz etmiş ve seviyelerini hastalık aktivitesi ve hastalık şiddeti parametreleriyle ilişkilendirmiştir. Tedavi edilmemiş TRAPS hastalarında miR-92a-3p ve miR-150-3p ekspresyonlarının önemli ölçüde azaldığını göstermişlerdir [38]. Farklı bir çalışmada,

TRAPS hastalarından alınıp LPS ile uyarılan monositler, inflamatuvar yanıtın düzenlenmesinde ve NF-KB aktivasyonunda yer alan miRNA-155, miRNA-146 ve miRNA-21'in artan regülasyonunu göstermiştir [39].

2.4. mRNA ve miRNA Araştırmalarında Kullanılan Biyoinformatik Araçlar

Biyoinformatik, tıbbi veya biyolojik verileri elde etmek, depolamak, görselleştirmek ve yorumlamak için hesaplama araçları yaklaşımlarının araştırılmasını, geliştirilmesini veya uygulanmasını içermektedir. Bu alan gelişip genişledikçe genomik sekanslama ve mikrodizin çipleri olarak yeni teknolojiler tarafından üretilen muazzam miktarda veri artışı gerçekleşmiştir. Mikrodizin teknolojisi, mekanik, kimya, DNA davranışı, mikroakışkanlar, enzimoloji, optik ve biyoinformatik gibi çok sayıda teknoloji ve araştırma alanının karmaşık bir karışımıdır. Mikrodizin, genellikle sağlıklı ve hastalıklı dokulardaki gen ifadesi farklılıklarını meydana çıkarmak için tüm genlerin eş zamanlı ifadelerini belirlemede kullanılmaktadır. Bu teknoloji genom çapında olası çalışmalarda, genomların fonksiyonel ek açıklamasına katkıda bulunmuş olup birçok hastalığın altta yatan mekanizmalarına ışık tutmuştur. Gen ekspresyonu izleme ve tek nükleotid polimorfizm tespiti, mikrodizinlerin en yaygın uygulamalarındandır [40].

Çalışmalarda mRNA ve miRNA'ları değerlendirebilmek için gözetilen en önemli iki etken biyolojik örnek tipi ve deneysel yaklaşımdır. Hastalık patogenezi ile ilgili mRNA ve miRNA'ların tespiti için en sık olarak, doku, hücre hatları veya primer hücreler kullanılabilir. Mikrodizin yönteminin uygulanmasını takiben, önemli ölçüde farklı eksprese edilen mRNA ve miRNA'ları, bunlarla ilgili yolları tanımlamak için biyoinformatik analizler yapılmaktadır. Bu analizler farklı stratejiler kullanılarak gerçekleştirilmektedir [16]. Bu analizlerin yapılabilmesi için tüm mikrodizin verileri belirli bir dosya biçiminde saklanmaktadır. Bu dosyaların yapısı platforma bağlı olarak farklılıklar göstermektedir (*Affymetrix, Illumina* vb.) [41]. Bu kapsamda en iyi bilinen ve tez kapsamında kullanılan veri tabanları ve programlar aşağıda anlatılmıştır (Gene Expression Omnibus (GEO), R programı, Biyometrik Araştırma Programı (BRB-*ArrayTools*), Multiexperiment Viewer (MeV), TargetScan, DAVID, STRING).

2.4.1. Gene Expression Omnibus (GEO)

Mikrodizin analizlerinin diğere araştırmacılar tarafından gerek ham datası gerek işlenmiş datası ile çeşitli formatlarda yüklenebildiği veri tabanlarından biri Gen Ekspresyonu Omnibus (GEO; <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>), bir diğeri ise Dizin Ekspres'tir (Array Express). GEO ve Array Express veri tabanlarında halka açık bir şekilde toplamda bir milyondan fazla örnek için veri bulunmaktadır. Tüm veriler çeşitli formatlarda ücretsiz olarak indirilebilmektedir. Kullanıcıların verileri analiz etmesini ve görselleştirmesini sağlamak adına GEO, çeşitli internet tabanlı araçlar sunmaktadır. Bunlardan birisi olan GEO2R, kullanıcıların diferansiyel gen ekspresyonunu tanımlamaya ve görselleştirmeye yardımcı olmak için kullanıcıların GEO verilerinin R tabanlı analizlerini yapmalarını sağlayan basit bir arayüz sunmaktadır [42].

2.4.2. R Programı

R programlama dili, 1990'ların ortalarındaki başlangıcından bu yana istatistik, biyoloji, fizik, matematik, kimya, ekonomi, jeoloji ve tıp dahil olmak üzere çeşitli alanlarda araştırma için temel bir hesaplama aracına dönüşmüştür. R dilinin temel özelliklerinden birisi, yeni başlayanların bile anlamlı grafikler üretebilmesini sağlayabilmesidir. Zaman geçtikçe biyoinformatik alanında çalışmalarını sürdüren R kullanıcıları için daha farklı bir projeye ihtiyaç duyulduğu anlaşılmıştır. 2001 yılında hem istatistikçiler hem de hesaplamalı biyologlar tarafından kullanılabilen biyolojik verilerin analizi için R araçları oluşturma ve geliştirme hedefi ile biyokondüktör (*BioConductor*) başlatılmıştır. Biyokondüktör, biyoinformatik alanında açık kaynak kodlu yazılımlar sunan, 3000'den fazla paket barındıran, araştırmacılara genomik veri kaynaklarının ve analiz araçlarının sunulduğu bir R ortamıdır (<https://www.BioConductor.org/pactages/release/biocviews.html>) [43].

Biyokondüktör ayrıca çok sayıda mikrodizin veri kümesini araştırmacılara sunmaktadır. Mikrodizin verileri üzerinde R ortamında gerekli işlemlerin yapılabilmesi için, bu dosyaların nasıl okunabileceğini ortaya koymak önemlidir. Biyokondüktör tarafından sunulan veri kümelerini R ortamında kullanabilmek üzere bazı hazır veri kümeleri bulunmaktadır. Mikrodizin araştırmalarında elde edilen veri kümesi çeşitli

aşamalardan geçmekte ve değişime uğramaktadır. *Affymetrix*, mikrodizin analizlerinin basamaklarında farklı dosya türleri kullanmakta olup bunlardan ilki görüntü dosyasıdır. Bu dosyalardan, nitelik çıkarımı işlemi gerçekleştirilmektedir. Böylece .CEL uzantılı olan CEL dosyaları olarak bilinen ham veriye ulaşılır. Ham veri elde edildiğinde veri analizleri için henüz kullanıma uygun değildir. Ham mikrodizin verisine sahip *Affymetrix*, *Illumina* gibi platformlardan elde edilen ham verinin R ve Biyokondüktör ortamında okutulması, her bir platform için farklı başlangıç analizlerinin yapılmasını gerektirmektedir [41].

2.4.3. Biyometrik Araştırma Programı (Biometric Research Program, BRB-ArrayTools)

Biyometrik Araştırma Programı (BRB-ArrayTools), Ulusal Kanser Enstitüsü Biyometrik Araştırma kolunun biyoistatistikçileri tarafından geliştirilmiş, gen ekspresyon verilerinin mikrodizin analizleri için kapsamlı bir istatistiksel analiz programıdır. Kullanıcı arayüzü olarak excel kullanılmakta olup, 1000'den fazla diziye ve 100.000 prob setine sahip projeler üzerinde çalışabilmektedir. BRB-ArrayTools 500'den fazla hakemli makalede yayınlanmıştır [44, 45].

BRB-ArrayTools, paketlerini Microsoft Excel'e eklentiler olarak yüklemektedir. Kurulumu esnasında, Excel menü çubuğunda bir *ArrayTools* menüsü oluşmaktadır. Ardından BRB-ArrayTools ile gerçekleşecek tüm kullanıcı etkileşimleri menü öğelerinin seçimi ile başlatılan menü ve iletişim kutuları aracılığıyla yapılır. Yapılan analizlerin çoğu, Excel fonksiyonları tarafından gerçekleştirilemeyecek kadar yoğun veri içermektedir. Bu sebeple hesaplama işlemleri için arka planda çalışan R programlama dili kullanılmaktadır [44].

Bu program, kullanıcılara etkili bir analiz stratejisi için araştırmanın spesifik hedeflerine göre uyarlanması gerektiğini desteklemektedir (Simon ve ark. 2003a). Bu hedefler; sınıf karşılaştırması, sınıf tahmini veya sınıf keşfi kategorilerine dahil edilebilmektedir. Diğer yandan, prob set ekspresyonu, normalizasyon ve kalite kontrol endekslerinin hesaplanması dahil olmak üzere çeşitli ön işleme adımları

gerçekleştirmektedir. *Affymetrix* ve *Illumina* platformlarına ait veriler için gerekli paketler Biyokondüktör yazılımı kullanılarak indirilebilmektedir (Gentleman ve Carey, 2002). Böylece, analizlerde biyokondüktör fonksiyonlarının doğrudan kullanımı için gerekli olan R programlama, bu dile aşina olmayan kullanıcılar için kullanılabilir hale gelmektedir [44]. Diğer yandan *BRB-ArrayTools*, *Affymetrix* ve *Illumina* gibi popüler platformlar için kolaylıkla içe aktarım sağlama özelliğine sahiptir. Bu platformlardan biri olan *Affymetrix*'in ekspresyon verileri, ham .CEL dosyalarıyla işlenmiş problemler olarak içe aktarılabilir. Ayrıca Ulusal Biyomedikal Teknoloji Merkezi (NCBI) tarafından tutulan GEO arşivindeki tüm gen ekspresyonu verileri ve ilişkili klinik, patolojik ek açıklamalar için de otomatik içe aktarıma sahiptir [44]. Programa “Veri İçe Aktarma Sihirbazı” ile aktarım sağlarken *Affymetrix* .CEL dosyalarının işlenmesinde, prob set özetlerini hesaplamak için *MAS5.0*, *RMA*, ve *GC-RMA* analiz yöntemlerinden biriyle devam edilmektedir. Bu yöntemlerin tümü, .CEL dosyalarını okumak ve ilgili prob set özetlerini hesaplamak için Biyokondüktör paketlerini kullanmaktadır. *MAS5.0* prob seti özetleri, Biyokondüktör'den '*SimpleAffy*' kitaplığındaki *JustMAS* fonksiyonunu kullanan .CEL dosyalarından hesaplanmaktadır. Algoritma, *Affymetrix*'in 'İstatistiksel Algoritmalar Referans Kılavuzu'nda tarif edildiği şekilde uygulanmaktadır. *RMA* prob seti özetleri “*affy*” paketi kullanılarak hesaplanmaktadır. “*RMA*” yöntemi, Mükemmel Eşleşme (*Perfect Match*, PM) verilerinde bir arka plan düzeltmesi kullanan üç adımlı bir yaklaşım olarak özetlenmektedir. Daha sonra bir *quantile* normalizasyon uygulamakta ve son olarak *Tukey median polish* algoritmasını kullanarak prob seti bilgisini özetlemektedir [46]. Literatürdeki bir çalışma sonucunda, diferansiyel ekspresyonun tespitinde *RMA*'nın daha büyük duyarlılığının ve özgüllüğünün ön plana çıktığı, bu sebeple *Affymetrix* *Genechip* teknolojisini kullanan araştırmacılar için faydalı bir gelişme sağlayacağı belirtilmiştir [47]. *GC-RMA* prob seti özetleri, Biyokondüktör'deki “*gcrma*” paketi kullanılarak hesaplanmaktadır. *GC-RMA* yöntemi, gürültü ve spesifik olmayan bağlanma içeren *Affymetrix* verileri için arka plan yoğunluklarını ayarlar. *GCRMA* fonksiyonu, aynı normalleştirme ve özetleme yöntemini kullanan *RMA* gibi, arka planı ayarlanmış prob yoğunluklarını, ifade miktarlarına dönüştürmektedir. *Illumina* ifade

verileri için, “Veri İçe Aktarma Sihirbazı” kullanılarak programa aktarım sağlamak mümkündür. Biyokondüktör’de bulunan “Lumi” paketi aracılığıyla analizlere devam edilebilmektedir [46].

Bu tez kapsamında *Affymetrix*, *Illumina* ve *Nanostring* platformlarına ait veri setlerinin tümünde hastalık grubu ve sağlıklı kontrol grubu karşılaştırılmak üzere, sınıf karşılaştırması kategorisinde yer alan “Dizi grupları arasındaki sınıf karşılaştırması” uygulanmıştır. Bu karşılaştırma, her bir gen için ayrı ayrı t-testi hesaplaması yapmaktadır. Bu test, ortalama farklılıklarda beklenen varyasyona göre sınıflar arasındaki ortalama log oranlarındaki (veya log-yoğunlukları) farklılıkların karşılaştırılmasına dayanmaktadır.

2.4.4. Multiexperiment Viewer (MeV)

MeV, tek veya çoklu deneylerden kümeleme, görselleştirme, sınıflandırma, istatistiksel analiz ve biyolojik tema keşfi için karmaşık algoritmalar içeren çok yönlü bir mikrodizin veri analizi aracıdır [48]. Verileri yüklemek için en yaygın format, hem ekspresyon değerleri hem de Entrezgene ID veya *Affymetrix* prob kimlikleri gibi ek açıklama verilerini içeren basit bir metin dosyasıdır. Buna ek olarak, GEO, ArrayExpress indirmeleri ve diğerleri gibi çeşitli kaynaklardan dosyaları okuyabilen birçok özel dosya yükleyicisi içermektedir. Veriler yüklendikten sonra, kullandığı non-parametrik test ile normal dağılım olmadığını varsaymakta olan *Significance Analysis of Microarray* (SAM) analizi yapılmaktadır. Bu analiz sonucunda, mikrodizin çalışmaları için *False Discovery Rate* (FDR) değeri 0.10’un altında kalan miRNA’lar ile ısı haritası, çok satırlı ekspresyon değerleri grafiği ve metin tabanlı bir tablo görünümü de dahil olmak üzere birkaç temel görüntüleyicide görüntüleme sağlanabilmektedir [49].

2.4.5. miRNA’ların Hedef Genlerinin Belirlenmesi

Her miRNA'nın birden fazla gen hedefi vardır. Diğer yandan her gen birden fazla miRNA tarafından hedeflenmektedir. Bu nedenle, miRNA ve hedef gen arasındaki ilişkinin doğru açıklanabilmesi her zaman kolay olmamaktadır. miRNA-

hedef gen ilişkisini belirlemeye yönelik olarak öncelikle biyoinformatik araçlardan faydalanılmaktadır. Bu araçlar hem dizi bilgisi hem de literatürde var olan deney sonuçlarına göre, ilgilendiğimiz miRNA ve hedef geninin olası ilişkisine yönelik bir skor elde etmemize olanak sağlar. Biyoinformatik araçlar ile, sonradan yapılması beklenen deneysel validasyon için etkili bir miRNA-hedef gen etkileşimi belirlenmiş olur. Aday hedef gen/ler ile ilgili olarak elde edilen bilgi doğrultusunda, miRNA'ların hem normal fizyolojik süreçlerde hem de hastalıkta rol oynadığı mekanizmaların/yolakların açıklanması mümkün olabilmektedir. Bu bağlamda, miRNA-mRNA etkileşimi tanımada farklı yaklaşımları kullanan araçlar geliştirilmiştir. Bunlardan bazıları; miRWalk, miRNET, miRDB, miRSystem, miRSearch, TargetScan'dir. miRWalk, deneysel olarak doğrulanmış, tahmini miRNA-hedef gen etkileşimlerinin erişilebilir, büyük ve ücretsiz bir arşivini sağlamaktadır. Genin tüm dizisi içindeki miRNA bağlanma yerleri, içerisinde bulundurduğu 12 farklı veri tabanında (PICTAR2, MicroT4, miRMap, miRDB, PITA, miRNAMap, miRWalk, miRBridge, RNA22, miRanda, RNAhybrid ve Targetscan) miRNA-hedef gen verileri ile birlikte doğrulanmıştır. miRNET, literatürde yer alan mevcut bilgilerle validasyonu gerçekleştirilmiş miRNA'lar için hedef genleri analiz edebilen, kullanımı kolay, web tabanlı bir platformdur. miRDB, miRNA-hedef gen bağlanması ile ilişkili ortak özellikleri tanımlamak için makine öğrenme yöntemleri kullanmakta olup, içerisinde yer alan veriler binlerce miRNA-hedef etkileşimi analiz edilerek geliştirilen bir biyoinformatik araç ile bulunmuştur. miRSystem, miRNA ve hedef gen arasındaki ilişkiyi bulmak için 7 miRNA programını (Miranda, Pictar, Diana, Mirbridge, RNA22, PITA ve TargetScan) bir araya getirmektedir. miRSearch, spesifik gen transkriptlerini hedefleyen miRNA'ları hızlı bir şekilde tanımlamaya izin veren bir veri tabanıdır. Doğrulanmış ve tahmin edilen miRNA'ları tanımlamak için gelişmiş çapraz referans sistemi kullanmaktadır [49,50].

Tez kapsamında kullanılan ve hedef gen tespiti açısından ilk algoritma olan TargetScan, omurgalılarda miRNA hedeflerini tahmin etmek için kullanılan, 2003 yılında Bartel'in grubu tarafından geliştirilmiştir [51]. 2003 yılından bu yana, eşleşme tahminlerinin doğruluğunu iyileştirmek adına yeni sürümler ve ek algoritmalarla geliştirilmeye devam edilmiştir (TargetScans, TargetScan tercihen korunmuş

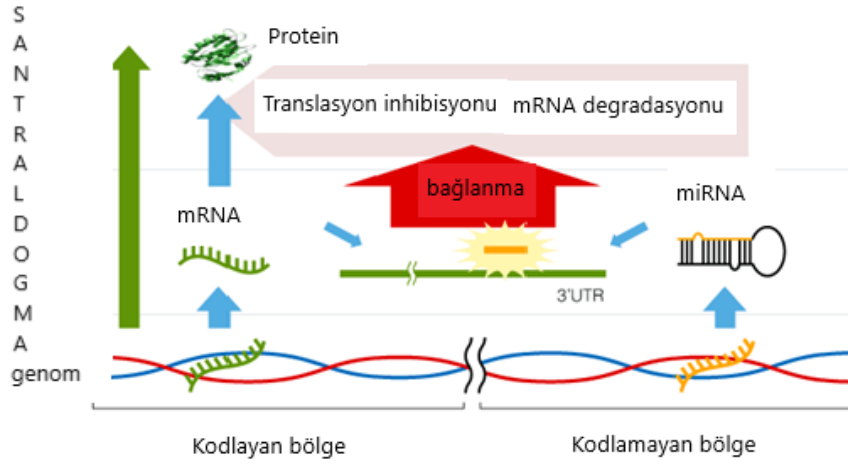
hedefleme (P_{CT}), TargetScan bağlamı+ skor). Bu web tabanlı araçların gen sembolü ve/veya türe özgü miRNA adı olmak üzere iki arama seçeneği bulunmaktadır. Araştırma esnasında gen sembolüne göre sonuçlar farklı transkriptler ile gösterilmektedir. Her transkript için, miRNA'ların hedefleme olasılığı daha yüksek ve daha düşük olan bölgelerle görüntülenmektedir. Bu olasılık, her miRNA adayı için tüm algoritmalar ve parametreler (bölge türü, bağlam ++ skoru, bağlam ++ skoru yüzdelik dilim, ağırlıklı bağlam ++ skoru, korunmuş zincir uzunluğu ve P_{CT}) dahil edilerek tahmin edilmektedir. Bununla birlikte, bir miRNA'nın adını ararken, sonuçlar hedef genleri spesifik transkripte göre göstermektedir [49].

2.5. Protein-protein ilişkilerinin Gösterilmesinde Kullanılan Biyoinformatik Araçlar

Protein ağları çıkarılması, proteomik ve diğer yüksek verimli teknolojilerden elde edilen protein veya gen listelerini analiz etmek ve birbirleri arasındaki ilişkileri görselleştirmek için popüler bir araç haline gelmiştir. Bu tür ağların en popüler kaynaklarından biri, hem fiziksel etkileşimleri hem de güven puanları içeren güvenilirliklerini ölçen, fonksiyonel ilişkiler dahil olmak üzere 2000'den fazla organizma için bilinen ve tahmin edilen protein-protein ilişkileri verileri sağlayan STRING veri tabanıdır. İnternet arayüzü, ağ analizi ve görselleştirme açısından sınırlı esneklik sağlarken esas olarak küçük ağların denetlenmesi için tasarlanmıştır. Diğer yandan *Cytoscape* yazılımı, büyük ağlarla çalışmak için çok daha uygundur ve ek verilerin ağ analizi, içe aktarımı ve görüntülenmesi açısından daha fazla seçenek sunmaktadır. Bir *Cytoscape* uygulaması olan *StringApp*, her iki kaynağı da aynı iş akışına dahil etmek için ilişkili veri tabanlarından verileri entegre etmektedir. Uygulama, STRING ağlarının *Cytoscape*'e aktarılmasını kolaylaştırmakta olup, STRING'e ait görünümü ve birçok özelliği korumaktadır (<http://apps.cytoscape.org/apps/stringapp>) [52]. Literatürde yer alan çalışmalardan memeli sirkadiyen kalp pili üzerinde yapılan araştırmalarda mikrodizin verilerinin ağ analizi için *StringApp* kullanılmıştır [53].

2.6. Amaç

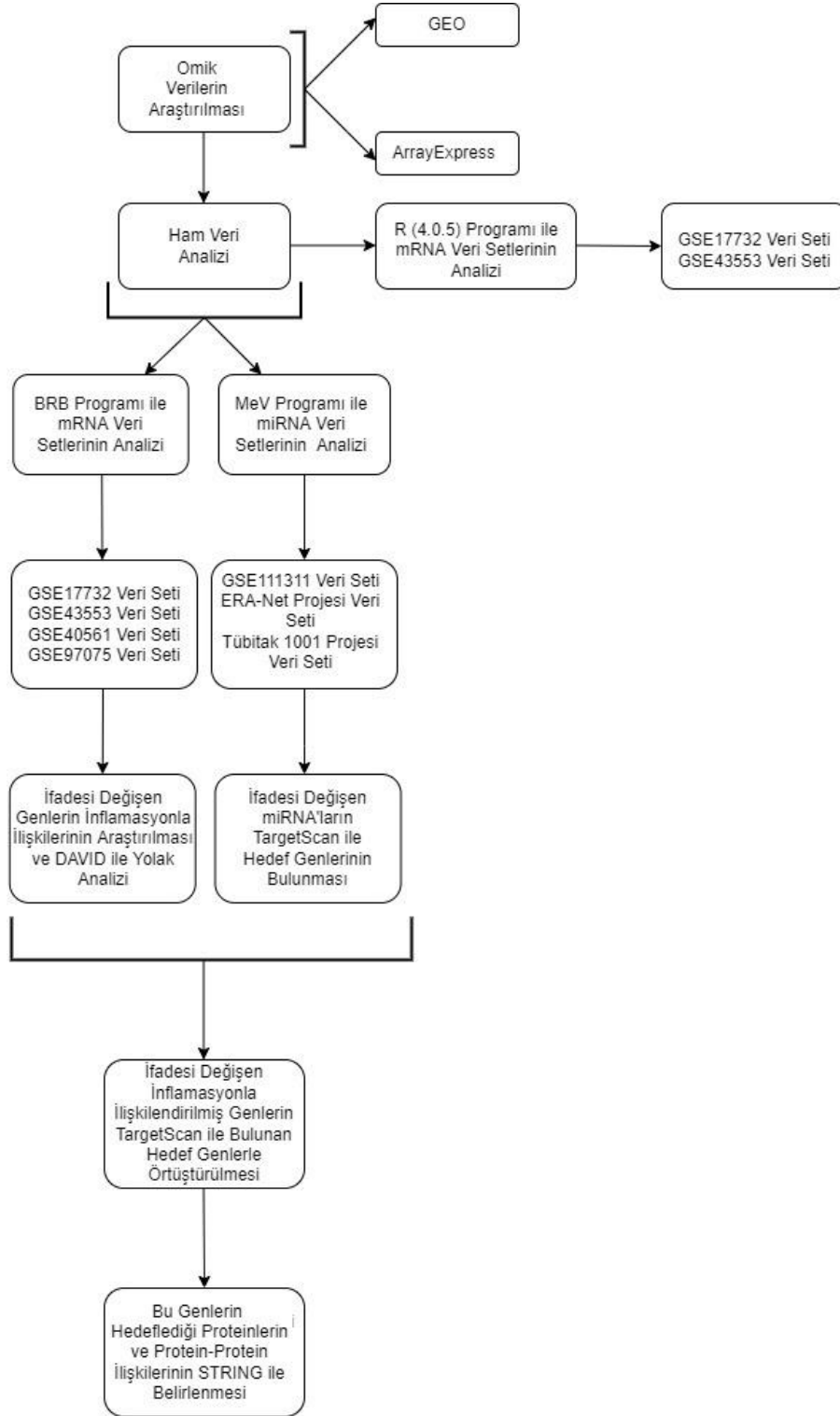
Bu bilgiler ışığında, tezin hipotezi; inflamasyon ile ilişkili benzer patogenezin görüldüğü, AAA, CAPS, TRAPS, MKD ve PFAPA otoinflamatuvar hastalıklarına sebep olan genler farklı olsa da, bu hastalıklarda etkilenen inflamatuvar yollaklarda ortak olarak önemli olabilecek mRNA'lar, miRNA'lar ve proteinlerin etki edebileceğidir. miRNA'lar epigenetik olarak hedef mRNA'lara etki etmekte ve sonuçta gen ifadesini değiştirmektedir (Şekil 2.3). Dolayısıyla bu hipotezi test etmeye yönelik olarak amacımız; bu hastalıklarla ilişkili olarak literatürde farklı gruplar tarafından yüksek ölçekli teknolojilerin kullanılmasıyla elde edilmiş veri setlerinin incelenmesi sonucunda, inflamasyon ile ilişkili yollaklarda farklı hastalıklarda ortak olarak etkilenmiş olan mRNA ve miRNA'ların belirlenmesi ve bu moleküller arasındaki olası miRNA-hedef gen ilişkisinin kurulması ile bu mRNA'lar tarafından kodlanan proteinlerin belirlenerek ilgili hastalıklar açısından öneminin ortaya konmasıdır. Bu tez çalışması kapsamında, otoinflamatuvar hastalıklar arasından moleküler patogenezleri açısından çok yakın benzerlik gösteren hastalık grupları seçilmiştir. Bu amaçla önerilen tez çalışmasında; öncelikli olarak biyoinformatik programların geri planında çalışan, R (4.0.5) programı ile iki veri seti için ön analizler yapılmış, sonrasında tüm veri setleri arasından benzer örnek tipi ve platforma sahip olan mRNA verileri *BRB-ArrayTools* programı ile miRNA verileri ise MeV programı ile analiz edilmiştir. İfadesi değişen mRNA'ların inflamasyonla ilişkisi InnateDB veri tabanı ve DAVID programı ile yolak analizleri yapılarak doğrulanmıştır. İfadesi veri setlerinde ortak olarak değişen inflamasyonla ilişkili mRNA'ları hedefleyen miRNA'lar, veri setlerinde değişen miRNA'lar arasından TargetScan veri tabanı ile bu moleküller arasındaki olası miRNA-hedef gen ilişkisinin analizi ile seçilmiş, yapılan bu meta-analiz ile öne çıkan mRNA'ların kodladıkları proteinler belirlenmiş, son olarak proteinlerin protein-protein ilişkileri STRING veri tabanı ile gösterilmiştir.



Şekil 2.3. miRNA'ların gen ifadesi üzerine etkisi [54].

3. BİREYLER VE YÖNTEMLER

Tez çalışmasına ait iş akış planı aşağıda verilmiştir (Şekil 3.1).



Şekil 3.1. Tez çalışmasına ait iş akışı.

3.1. Bireyler

Çalışmaya dahil edilen literatürdeki mRNA ve miRNA veri setlerinde, AAA, CAPS, TRAPS, MKD ve PFAPA hastalıklarının klinik bulguları ile seyreden, 43 AAA, 33 CAPS, 29 TRAPS, 58 MKD, 6 PFAPA hastası ve bu hastalıklara dair herhangi bir hastalık öyküsü bulunmayan 117 sağlıklı bireye (Tablo 3.1) ait ham veriler *Affymetrix Human Genome U133A 2.0 Array*, *Illumina HumanHT-12 V3.0*, *Illumina HumanHT-12 V4.0*, *Nanostring(NS_H_MIR_V3A)*, *Affymetrix 2.0* ve *Affymetrix 4.0* platformlarıyla elde edilmiştir. İlgili veri setlerine ait özellikler (hastalık, platform, örnek tipi vb) tabloda verilmiştir (Şekil 3.2).

Accession no	Denei tipi	Organizma	Hastalık	Platform	Örnek tipi
GSE17732	mRNA mikrodizin	<i>Homo sapiens</i>	PFAPA, AAA, TRAPS, CAPS	<i>Affymetrix Human Genome U133A 2.0 Array</i>	Kan
GSE43553	mRNA mikrodizin	<i>Homo sapiens</i>	CAPS, MKD, TRAPS	<i>Affymetrix Human Genome U133A 2.0 Array</i>	Periferik Kan Mononükleer Hücre (PBMC)
GSE40561	mRNA mikrodizin	<i>Homo sapiens</i>	MKD, CAPS	<i>Illumina HumanHT-12 V3.0</i>	Kan
GSE97075	mRNA mikrodizin	<i>Homo sapiens</i>	MKD	<i>Illumina HumanHT-12 V4.0</i>	Kan
GSE111311	miRNA mikrodizin	<i>Homo sapiens</i>	AAA	<i>Nanostring(NS_H_MIR_V3A)</i>	Periferik Kan Mononükleer Hücre (PBMC)
214S106*	miRNA mikrodizin	<i>Homo sapiens</i>	AAA	<i>Affymetrix 2.0</i>	Kan
315S096*	miRNA mikrodizin	<i>Homo sapiens</i>	AAA	<i>Affymetrix 4.0</i>	Kan

Şekil 3.2. Omik veri setlerinden tez çalışması kapsamında seçilenler.

Önceden bölümümüzde yapılmış olan iki projenin ilgili veri setleri GEO veri tabanına yüklenemediğinden tabloda proje numaraları verilmiş olup tam isimleri aşağıda açıklanmıştır.

*Tübitak 1001- 214S106: Ailevi Akdeniz Ateşi Patogenezinde MEFV Gen İfadesinin Düzenlenmesinde Rol Oynayan miRNA'ların Belirlenmesi (TÜBİTAK Projesi 1001)

*ERARE- 315S096: Otoinflamatuvar Hastalıklarda Kişiselleştirilmiş Moleküler Tıp İçin Klinik ve Deneysel Çalışma: Modifiye Edici Faktörlerin Rolü (Era-Net Projesi ERARE-Tübitak)

GSE17732 veri setinde, 12 PFAPA, 2 AAA, 3 CAPS, 1 TRAPS hastası ve 6 sağlıklı kontrol birey bulunmaktadır. Ancak PFAPA dışındaki diğer hastalıklara ait bireyler ataklı olduğundan 12 PFAPA hastası arasından 6 ataksız birey çalışmaya dahil

edilmemiştir. Diğer yandan 1 TRAPS hastası olduğu için analiz edilememiştir. Geriye kalan bireylere ait veriler çalışmaya dahil edilmiştir [17].

GSE43553 veri setindeki 29 TRAPS, 23 CAPS, 8 MKD hastası ve 34 sağlıklı kontrol bireylerine ait veriler çalışmaya dahil edilmiştir [21].

GSE40561 veri setinde bulunan 7 CAPS, 2 MKD hastası ve 41 sağlıklı kontrol bireylerine ait veriler çalışmaya dahil edilmiştir [22].

GSE97075 veri setindeki 48 MKD hastası ve 15 sağlıklı kontrol bireylerine ait veriler çalışmaya dahil edilmiştir [27].

GSE111311 veri setindeki 10 AAA hastası ve 9 sağlıklı 26 kontrol bireylerine ait veriler çalışmaya dahil edilmiştir [25].

315S096 veri setindeki 19 AAA hastası ve 6 sağlıklı kontrol bireylerine ait veriler çalışmaya dahil edilmiştir.

214S106 veri setindeki 12 AAA hastası ve 6 sağlıklı kontrol bireylerine ait veriler çalışmaya dahil edilmiştir.

Tablo 3.1. Veri setlerine ait grupların birey sayıları.

Deney tipi (mikrodizin)	Gruplar Veri Setleri	AAA	CAPS	MKD	TRAPS	PFAPA	Sağlıklı Kontrol
		mRNA	GSE17732	2	3	-	-
mRNA	GSE43553	-	23	8	29	-	34
mRNA	GSE40561	-	7	2	-	-	41
mRNA	GSE97075	-	-	48	-	-	15
miRNA	GSE111311	10	-	-	-	-	9
miRNA	214S106	12	-	-	-	-	6
miRNA	315S096	19	-	-	-	-	6

3.2. Yöntemler

3.2.1. Ham Veri Analizi

GEO veri tabanında bulunan,

GSE17732 veri setindeki, *Affymetrix Human Genome U133A 2.0 Array*,

GSE43553 veri setindeki, *Affymetrix Human Genome U133A 2.0 Array* platformuna ait ham veri dosyaları, R programı ve *BRB-ArrayTools* programı kullanılarak analiz edilmiştir.

GSE40561 veri setindeki, *Illumina HumanHT-12 V3.0*,

GSE97075 veri setindeki, *Illumina HumanHT-12 V4.0* platformuna ait ham veri dosyaları, *BRB-ArrayTools* programı kullanılarak analiz edilmiştir.

GSE111311 veri setindeki, *Nanostring(NS_H_MIR_V3A)* platformuna ait ham veri dosyaları, *MeV 4.9.0 – Multiple Experiment Viewer* kullanılarak analiz edilmiştir.

315S096 ve 214S106 projelerine ait veriler, *MeV 4.9.0 – Multiple Experiment Viewer* kullanılarak analiz edilmiştir.

3.2.2. R Programı ile Ham Veri Analizi

GSE17732 ve GSE43553 veri setlerindeki *Affymetrix Human Genome U133A 2.0 Array* platformuna ait .CEL uzantılı ham veriler GEO veri tabanından indirildi. CEL dosyaları R (4.0.5) programında *ReadAffy* fonksiyonu ile okutuldu. Toplamda 22277 prob set elde edildi. Verilerin analize hazır hale gelmesi için arka plan düzeltme, normalizasyon, *perfect match* (PM) düzeltme ve özetleme olmak üzere dört aşamadan oluşan bir ön işlemeden geçirmek amaçlı *expresso* fonksiyonu kullanıldı. *getBM* fonksiyonu ile *Affymetrix* prob set ID'leri, Ensembl gen ID'lere dönüştürüldü. Kalan prob set sayısı 11397 oldu. Ardından Temel Bileşenler Analizi (PCA) yapıldı. Böylece veri setlerinde bulunan yüksek boyutlu verilerdeki temel özellikler yakalanarak daha az sayıda değişkenle gösterildi. Veri setlerindeki hastalık grupları ile sağlıklı kontrol gruplarının ortalamaları arasındaki farkları test etmek için ANOVA testi

yapıldı. Devamında hangi iki grup arasında ne kadar fark olduğunu öğrenmek için Post-hoc test yapıldı. Tüm aşamalar her iki veri seti için de (GSE17732 ve GSE43553) ortak olarak gerçekleştirildi. Veri setlerindeki tüm hastalık gruplarını ayrı ayrı sağlıklı kontrol grubuyla karşılaştırmak için t testi uygulandı. Ardından genlerdeki anlamlılıkları ve kat değişimlerini gösteren histogram grafikleri çizildi (p değeri $<0,05$).

R programı üzerinde çalışırken, bir diziyi bir değişkene atamamız gerekebilmektedir. GSE17732 veri setindeki her hastalık grubunun kontrol grubuyla karşılaştırılması yapılarak, ifadesi değişen genler *all_foldchange* değişkenine atanan `data.frame(foldchange_FMF_vs_control, foldchange_CAPS_vs_control, foldchange_TRAPS_vs_control, foldchange_HPF_vs_control, foldchange_flare_vs_nonflare, foldchange_flare_vs_control, foldchange_nonflare_vs_control)` dizisi ile her gene özgü olan ENSEMBL numaralarına ilgili değerleri karşılık gelecek şekilde tanımlandı. İfadesi 1.5 kat üzeri artan ve azalan genler saptandı (Şekil 3.3).

```

RStudio
File Edit Code View Plots Session Build Debug Profile Tools Help
308 all_PFAPA = subset(GSE17732_uniqueprobe[,1:12])
309
321:64 (Top Level)
Console Terminal
C:/Users/po/Desktop/R/GSE17732/
ENSG0000027656 0.80982114 0.50916698 0.7194495 0.64443213 0.005583838
ENSG00000196735 -1.412748538 -1.14566998 ENSG00000196735
ENSG00000131002 -0.625902870 0.16939373 ENSG00000131002
ENSG00000132932 -1.222407826 -0.06870759 ENSG00000132932
ENSG00000079691 -1.490406165 -0.36225727 ENSG00000079691
ENSG00000100376 -0.505815817 -0.33683189 ENSG00000100376
ENSG00000119969 -1.045247451 -0.55255095 ENSG00000119969
ENSG00000154027 -1.649005333 -0.11923493 ENSG00000154027
> all_foldchange = data.frame(foldchange_FMF_vs_control, foldchange_CAPS_vs_control, foldchange_TRAPS_vs_control, foldchange_HPF_vs_control, foldchange_flare_vs_nonflare, foldchange_flare_vs_control, foldchange_nonflare_vs_control)
> all_lfc = all_foldchange %>% mutate(ENSEMBL = rownames(all_foldchange))
> head(all_lfc)
  foldchange_FMF_vs_control foldchange_CAPS_vs_control foldchange_TRAPS_vs_control foldchange_HPF_vs_control foldchange_flare_vs_nonflare
ENSG0000027656 0.80982114 0.50916698 0.7194495 0.64443213 0.005583838
ENSG00000129824 -3.95113793 4.34141967 -3.8569348 0.21084139 -0.366060400
ENSG00000121741 -0.19353436 0.30245900 -0.2907473 0.03826016 -0.202873722
ENSG00000032742 0.16036877 -0.08380255 -0.2821345 -0.03546743 -0.488241207
ENSG00000173141 -0.01609385 -0.08266161 -0.1573033 -0.07291265 -0.186236059
ENSG00000155304 -0.48097433 0.91068172 -0.7407581 0.17155640 -0.173825928
  foldchange_flare_vs_control foldchange_nonflare_vs_control ENSEMBL
ENSG0000027656 -0.131080328 -0.1366642 ENSG0000027656
ENSG00000129824 0.008486919 0.3745473 ENSG00000129824
ENSG00000121741 -0.249773721 -0.0469000 ENSG00000121741
ENSG00000032742 -0.374865029 0.1133762 ENSG00000032742
ENSG00000173141 -0.319661352 -0.1334253 ENSG00000173141
ENSG00000155304 -0.358449264 -0.1846233 ENSG00000155304

```

Şekil 3.3. R programı ile ifadesi değişen genlerin tanımlanması.

3.2.3. BRB-ArrayTools ile Ham Veri Analizi

mRNA veri setlerinin tamamında BRB-ArrayTools programı kullanılarak analizler gerçekleştirildi ve kontrol gruplarıyla kıyaslanan hastalık gruplarında ifadesi 1.5 kat ve üzeri artan veya azalan genler tespit edildi (p değeri <0,05). Tüm mRNA veri setleri (GSE17732, GSE43553, GSE40561, GSE97075) arasında da ortak mRNA'lar tanımlandı. Veri setleri arasında ifadesi 1.5 kat ve üzeri artan ya da azalan mRNA'lar saptandı.

BRB-ArrayTools, normalizasyon işlemlerinden gen ifade analiz tablosuna kadar arka planda R programı çalıştırarak kullanıcıya sunduğu filtrelemelerle basit bir arayüz sunmaktadır. Bir excel dosyası üzerinden başlayan analiz, programın yönlendirmeleri doğrultusunda gen ifadesi değerlerine, seçilen hastalık ve kontrol grubu sütunlarında yer vererek, filtrelenmiş olan değerlerle (p değeri<0.05 veya yanlış keşif oranı, FDR) her prob setin karşılığında olan kat değişimlerini tanımladığı bir tablo vererek tarayıcı üzerinden sonlandırmaktadır (Şekil 3.4).

Description of the problem:

Number of classes: 2
 Number of genes that passed filtering criteria: 20706
 Type of univariate test used: Two-sample T-test
 Class variable : DISEASE
 Random variance model for univariate tests: OFF
 Nominal significance level of each univariate test: 0.05

Genes which are differentially expressed among classes:

Number of genes significant at 0.05 level of the univariate test: 1292
 Table 1 - Sorted by p-value of the univariate test.
 Class 1: *FAMF* (12 samples); Class 2: *kontrol* (6 samples).
 The first 1292 genes are significant at the nominal 0.05 level of the univariate test

	Parametric p-value	FDR	Geom mean of intensities in class 1	Geom mean of intensities in class 2	Fold-change
1	3.1e-06	0.0507	6.87	3.62	1.9
2	2.88e-05	0.0507	7657.82	2688.92	2.85
3	3.18e-05	0.0507	7337.18	2478.31	2.96
4	3.34e-05	0.0507	7422.38	2546.88	2.91
5	3.65e-05	0.0507	7422.84	2638.22	2.81
6	4.19e-05	0.0507	7497.78	2572.5	2.91
7	4.47e-05	0.0507	7563.43	2608.59	2.9
8	4.49e-05	0.0507	7320.25	2499.1	2.93
9	4.64e-05	0.0507	7417.87	2564.66	2.89
10	4.65e-05	0.0507	7219	2523.83	2.86
11	4.72e-05	0.0507	7016.21	2364.7	2.97
12	4.73e-05	0.0507	7512.71	2560.54	2.93
13	4.87e-05	0.0507	7465.55	2598.21	2.87
14	4.9e-05	0.0507	7381.07	2545.81	2.9
15	5.01e-05	0.0507	7254.57	2537.98	2.86
16	5.04e-05	0.0507	7479.13	2629.66	2.84
17	5.08e-05	0.0507	7424.99	2591.36	2.87
18	5.27e-05	0.0507	7478.66	2582.04	2.9

Şekil 3.4. BRB-ArrayTools ile ifadesi değişen genlerin tanımlanması.

3.2.4. MeV ile Ham Veri Analizi

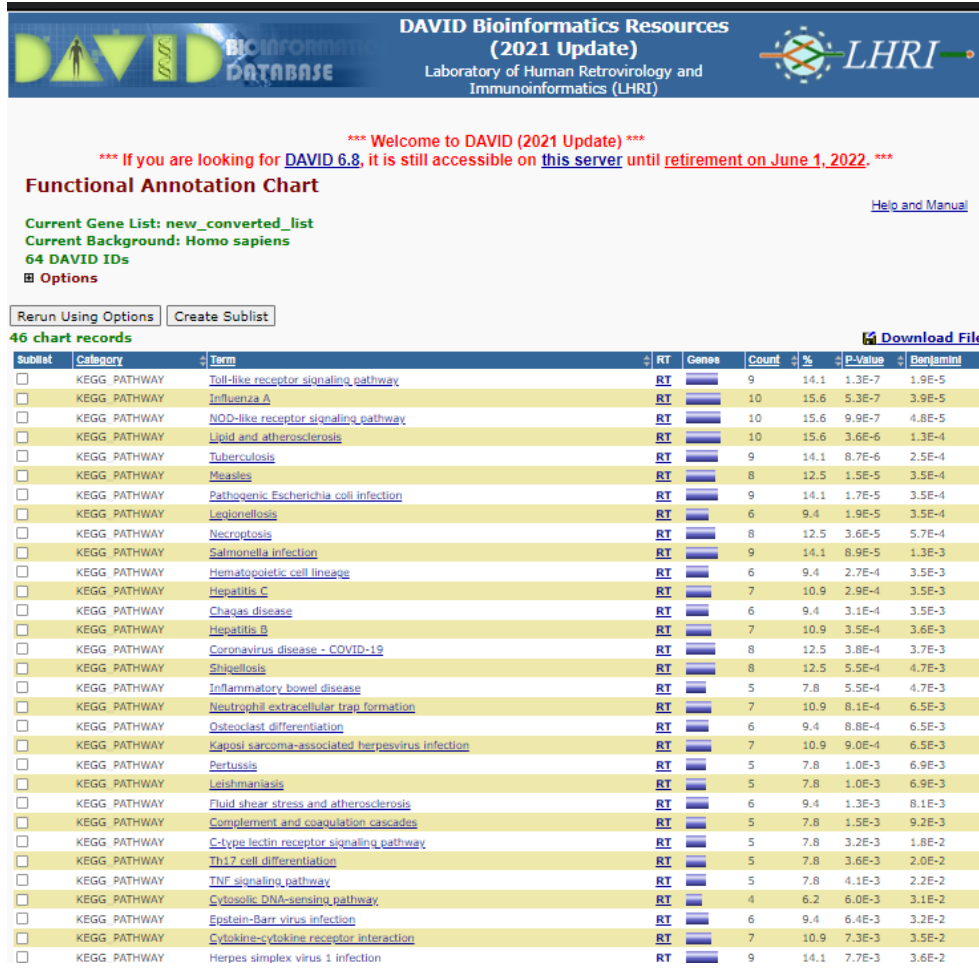
miRNA veri setlerinin tamamında (Tablo 3.2) *MeV 4.9.0 – Multiple Experiment Viewer* programı kullanılarak *SAM (Significance Analysis of Microarrays)* analizi gerçekleştirildi. GSE111311, 214S106 ve 315S096 veri setlerinde ifadesi 2 kat ve üzeri artan veya azalan miRNA'lar tespit edildi (FDR<0.10).

Tablo 3.2. miRNA veri setlerine ait AAA hastaları ve sağlıklı kontrol grubu sayıları.

Bireyler Veri Setleri	AAA Hastaları	Sağlıklı Kontrol
GSE111311	10	9
214S106	12	6
315S096	19	6

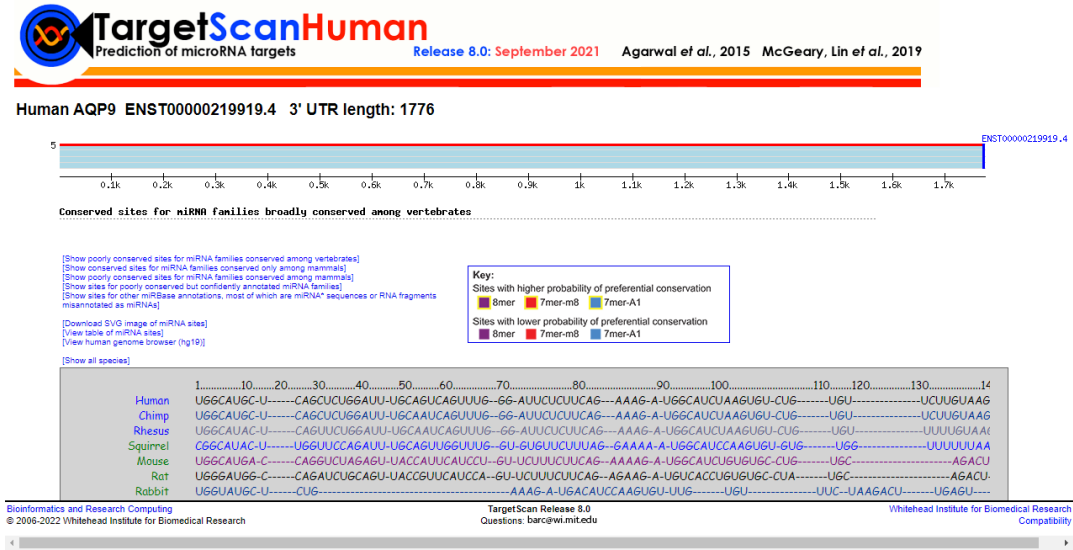
3.2.5.mRNA Yolak Analizi ve miRNA Hedef Genlerinin Belirlenmesi

mRNA veri setlerinde yapılan analizler sonucunda hasta ve sağlıklı bireyler arasında ifade farklılığı saptanan, veri setleri arasında ortak olarak tanımlanan mRNA'lar için Açıklama, Görselleştirme ve Entegre Keşif Veri Tabanı (*The Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery, DAVID*) kullanılarak ortak yolak analizleri gerçekleştirildi. DAVID, birden fazla geni aynı anda analiz etme imkanı veren, entegre platformlardan biridir. İçerisinde yer alan veri tabanlarından *KEGG Pathway* sayesinde analiz edilen genlerin arasındaki bağlantılar ilgili yolağın istatistiksel değerleri ile (p değeri veya Benjamini) daha da güçlendirilmektedir (Şekil 3.5).



Şekil 3.5. DAVID programı ile gerçekleştirilen yolak analizi.

miRNA veri setlerinde yapılan MeV analizleri sonucunda hasta ve sağlıklı bireyler arasında ifade farklılığı saptanan (artan veya azalan) miRNA'lar tanımlandı. Bu miRNA'lar arasından, TargetScan kullanılarak, BRB-ArrayTools analizleri sonucunda ifadesi değişen genleri hedefleyen miRNA'lar tespit edildi. TargetScan veri tabanı üzerinde ilerlerken miRNA'lar için korunmuşluk düzeyi belirtilen kısımlardan biri, omurgalılar arasında korunan miRNA aileleri için korunmuş alanları göstermekteyken, bir diğeri sadece memeliler arasında korunan miRNA aileleri için korunmuş alanları göstermektedir. Bu kısımın birlikte ilerlemek yapılan analiz sonuçlarını daha güçlü kılmaktadır (Şekil 3.6).



Şekil 3.6. İfadesi değişen genleri hedefleyen miRNA'ların TargetScan ile analizi.

3.2.6. STRING ile Protein ve Protein-Protein İlişkilerinin Belirlenmesi

BRB-ArrayTools ve MeV analizleri sonucunda ifadesi değişen mRNA ve miRNA'ların hedeflediği proteinler, protein-protein ilişkileri STRING veri tabanı ile araştırılmıştır. İlgili gen grubunun girişi yapıldıktan sonra ortaya çıkan ağ görüntüsündeki her düğüm (node) tek başına protein kodlayan bir gen lokusu tarafından üretilen tüm proteinleri temsil ederken, her iki node arasındaki çizgiler (edge) proteinler arasındaki ilişkileri temsil etmektedir. Bu ilişkiler, proteinlerin ortak olarak paylaştıkları bir göreve katkıda buldukları anlamına gelmektedir. Böylece protein-protein ilişkileri spesifik ve anlamlı olmaktadır. Aralarındaki bu ortaklık, fiziksel olarak birbirlerine bağlayıcı olduklarını düşündürmemelidir. Proteinler arasındaki her bir çizgi, rengine göre anlam ifade etmektedir. Bilinen etkileşimleri temsil eden renklerden pembe çizgi; bağlantının deneysel olarak belirlendiğini, mavi çizgi; bağlantının veri tabanlarından elde edildiğini ifade etmektedir. Tahmin edilen etkileşimleri temsil eden renklerden yeşil çizgi; genomda birbirine yakın yerleşimde olan genlerin kodladığı protein çalışmalarını, kırmızı çizgi; füzyon varlığını, lacivert çizgi; genlerin türler arasında birlikte ortaya çıkmasını ifade etmektedir. Diğer kısımda yer alan sarı çizgi; literatürde geçenleri, siyah çizgi; birlikte ifade olan genleri temsil

etmektedir. Aralarında herhangi bir bağlantı bulunamamış, bağımsız proteinler herhangi bir çizgi ile gösterilmeksizin sadece node olarak gösterilmektedir [55].

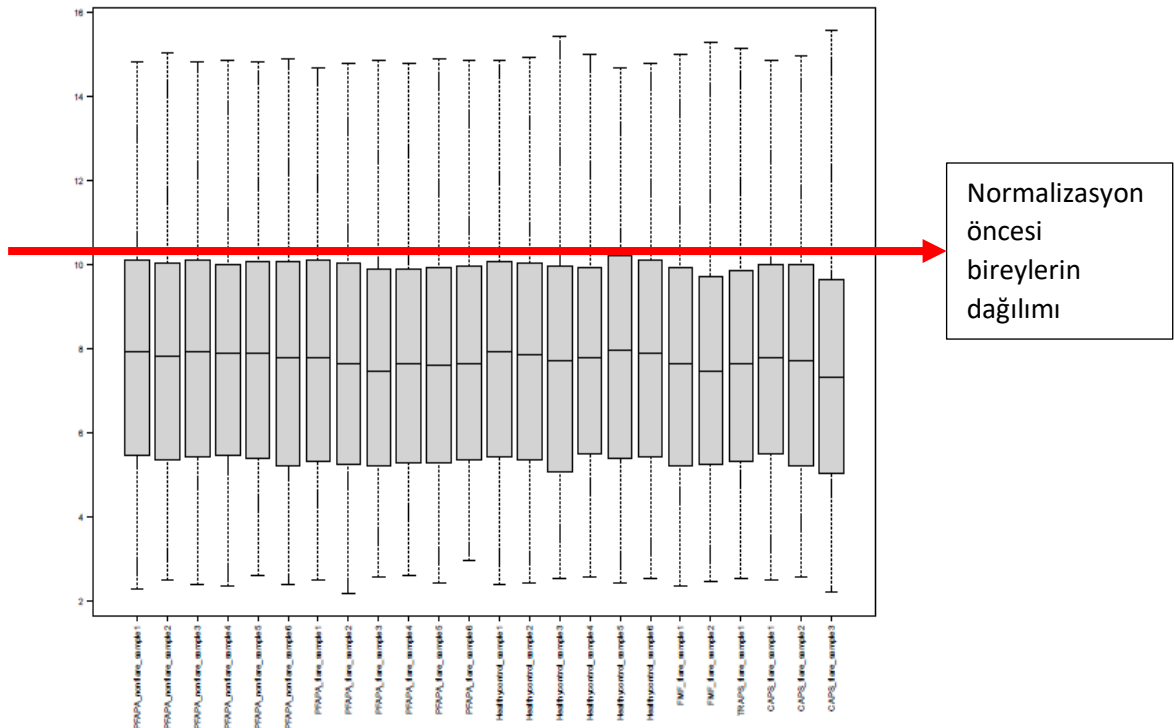
4. BULGULAR

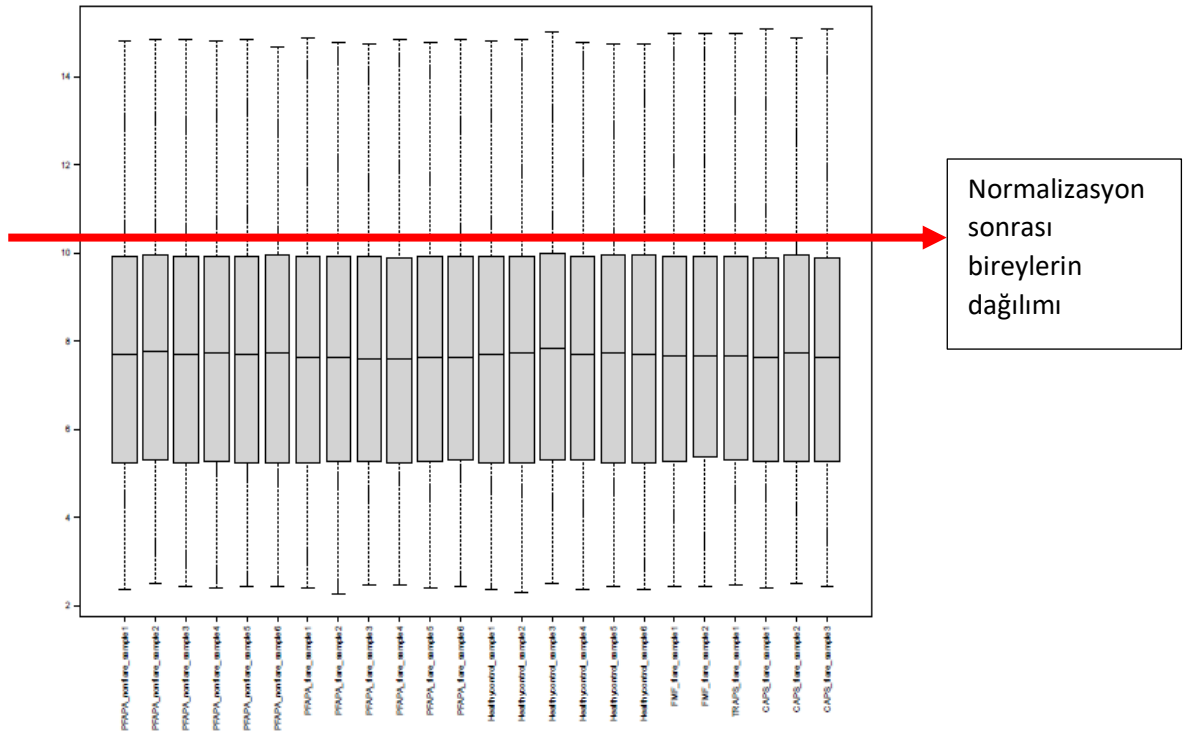
Tez çalışması kapsamında mRNA veri setlerindeki ham veriler *BRB-ArrayTools*, miRNA veri setlerindeki ham veriler ise MeV programı ile analiz edilmiştir. Biyoinformatik programların geri planında çalışan, R programını öğrenmek ve karşılaştırma yapmak amacıyla iki mRNA veri seti ayrıca R programı ile analiz edilmiştir.

4.1. R Programı ile Ham Veri Analizi

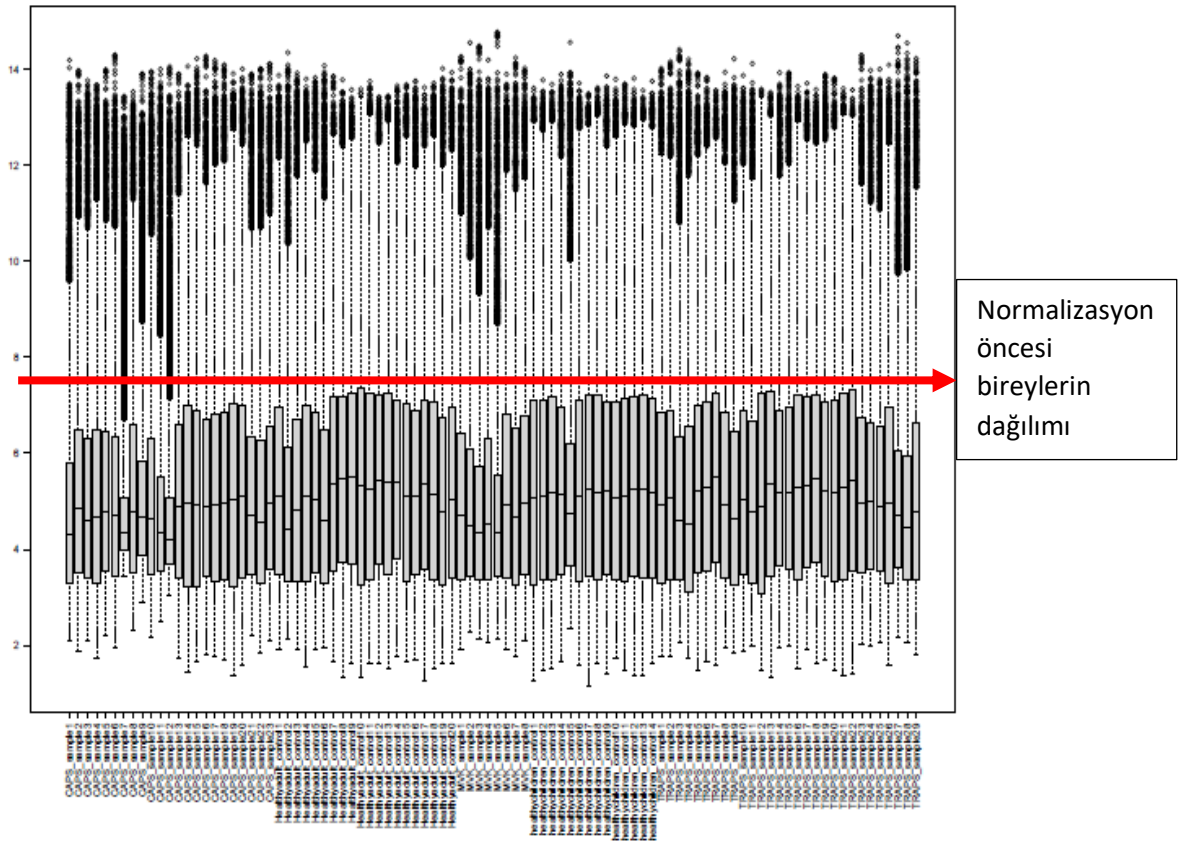
GSE17732 ve GSE43553 veri setlerindeki ham veriler analize hazır hale getirmek amacıyla ön işlemeden geçirilmiştir. Bu aşamada veri setlerinde yer alan örneklerde herhangi bir sapma olup olmadığını görselleştirmek adına normalizasyon öncesi ve sonrası box plot grafikleri çizilmiştir (Şekil 4.1).

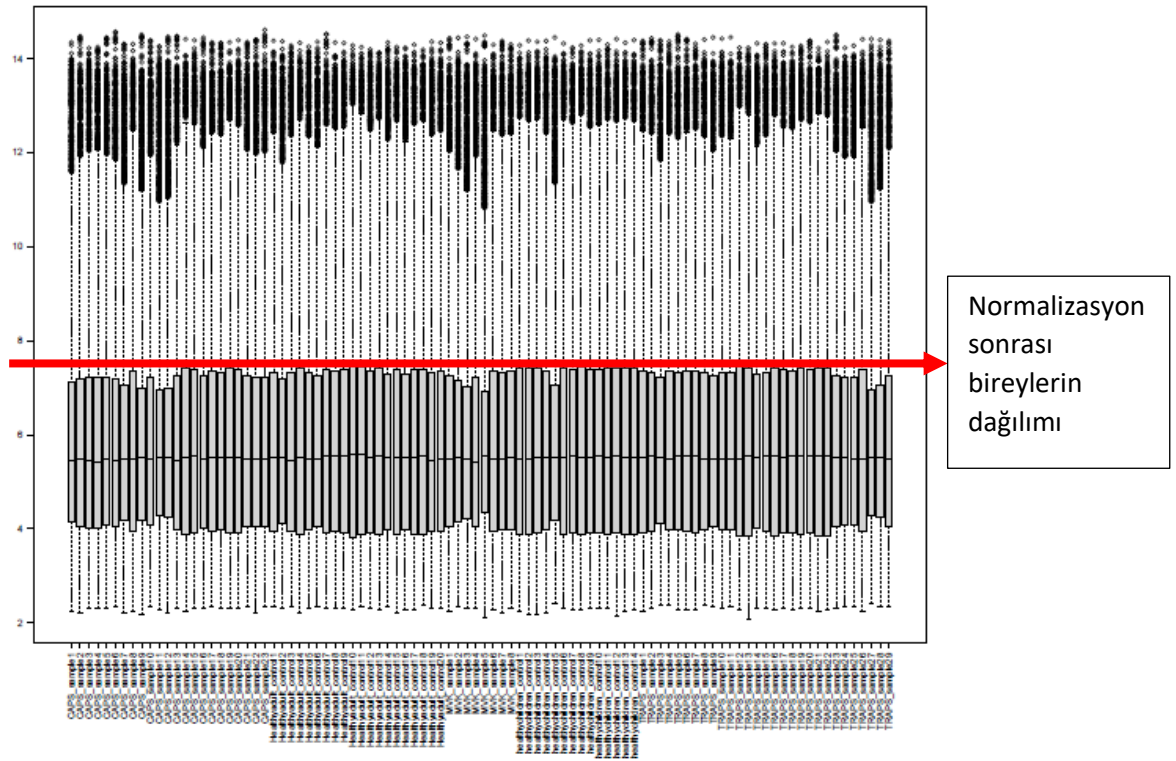
a) GSE17732 veri setine ait normalizasyon öncesi ve sonrası box plot grafikleri.





b) GSE43553 veri setine ait normalizasyon öncesi ve sonrası box plot grafikleri.

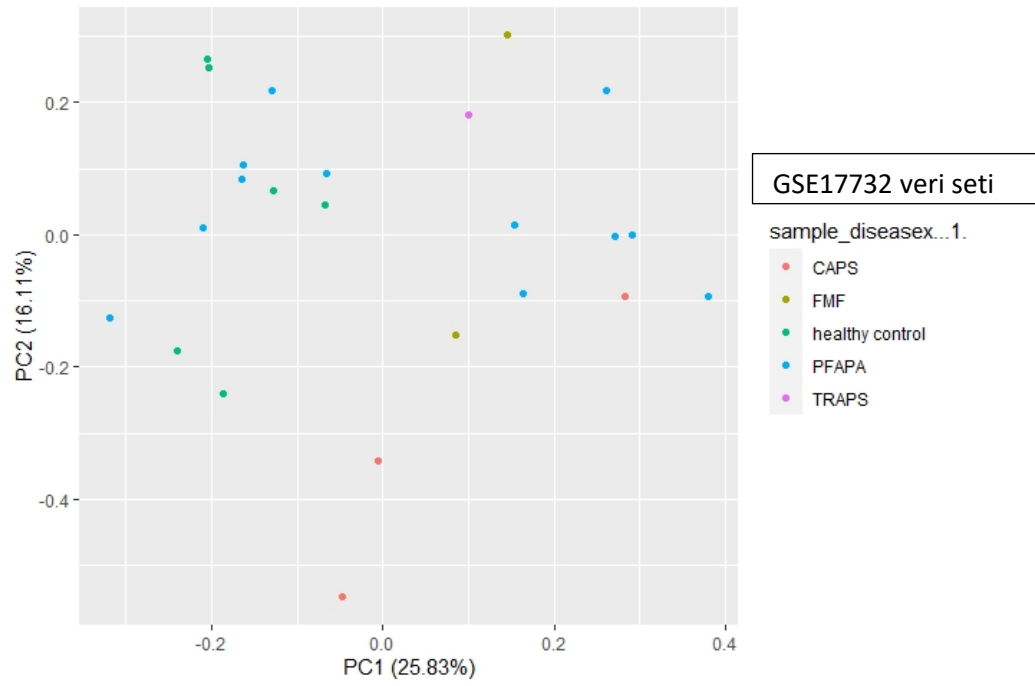




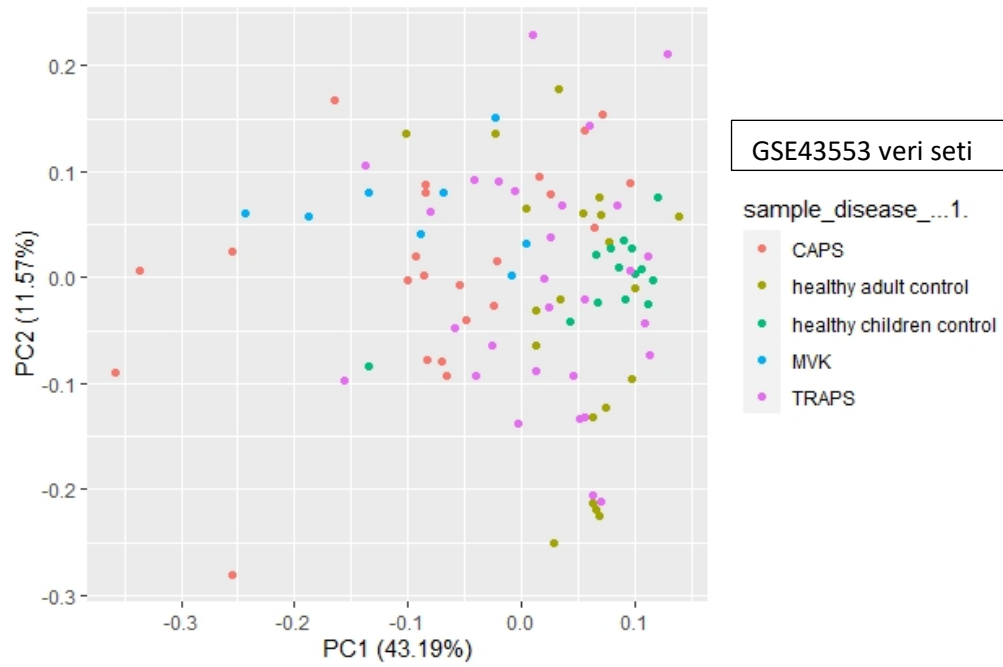
Şekil 4.1. Ön işlemeden geçen GSE17732 (a) ve GSE43553 (b) veri setlerinin box plot grafikleri.

Veri setlerinde yapılan ön işleme sonucunda herhangi bir uyumsuzluk saptanmamıştır. Her iki veri seti için, gruplar arasındaki benzerlik ve farklılıkları yakalayabilmek adına Temel Bileşenler Analizi (PCA) yapılmıştır. Buradaki temel bileşenler birer vektör olup, boyut düzleminde veri noktaları arasındaki değişkenliğin ne kadarını açıklayabildiklerini göstermektedir. PC1 verinin en büyük kısmını tek başına ifade edebilen, PC2 ondan bağımsız farklı bir boyutta başka bir kısmını ifade edebilen vektörlerdir. Tez kapsamında seçilen, benzer yolaklarda ortak genlerin etkilenmesi sonucu ortaya çıkan hastalık gruplarında çok net bir ayırım yapılamamaktadır (Şekil 4.2).

a)

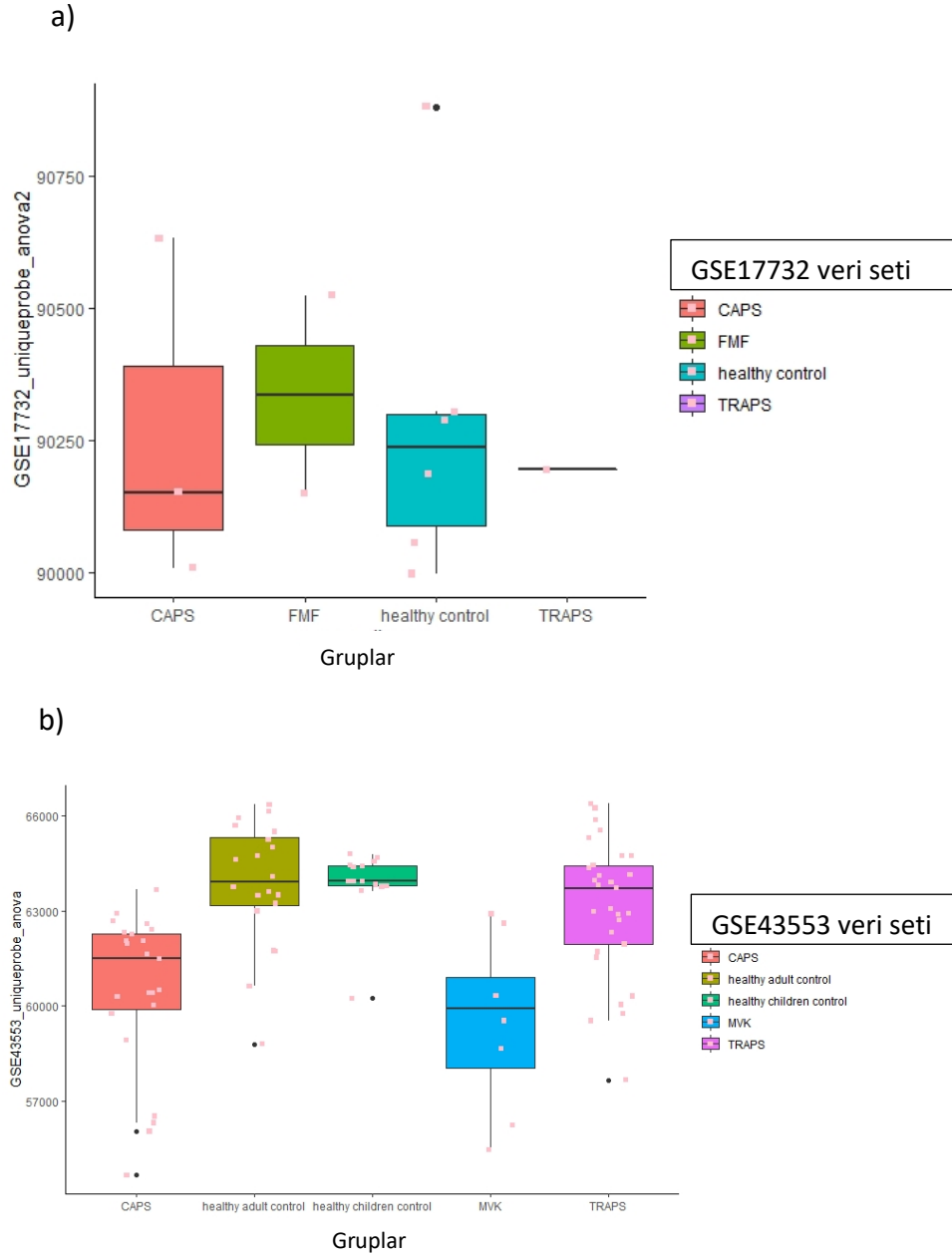


b)



Şekil 4.2. GSE17732 (a) ve GSE43553 (b) veri setlerinde gerçekleştirilen Temel Bileşenler Analizi.

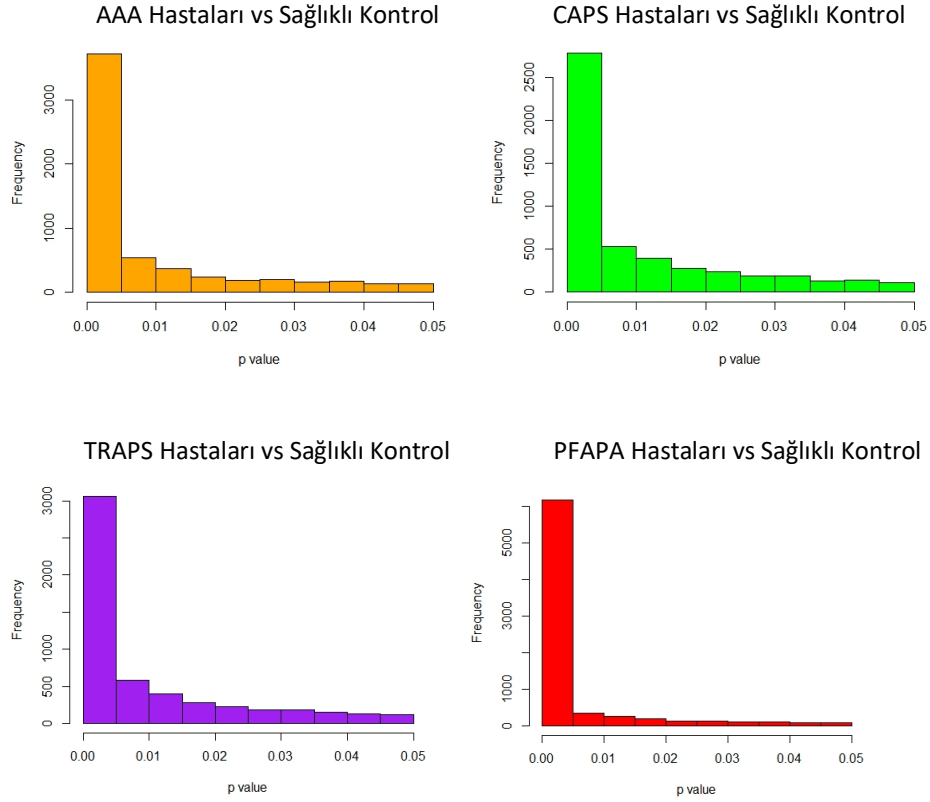
Veri setlerinde analiz öncesi yapılan ön çalışmaların ardından hastalık düzeyinde analiz yapmak için veri setlerindeki hastalık grupları ile sağlıklı kontrol gruplarının ortalamaları arasındaki farkları test eden ANOVA testi yapıldı. Devamında hangi iki grup arasında ne kadar fark olduğunu öğrenmek için Post-hoc testi yapıldı (Şekil 4.3).



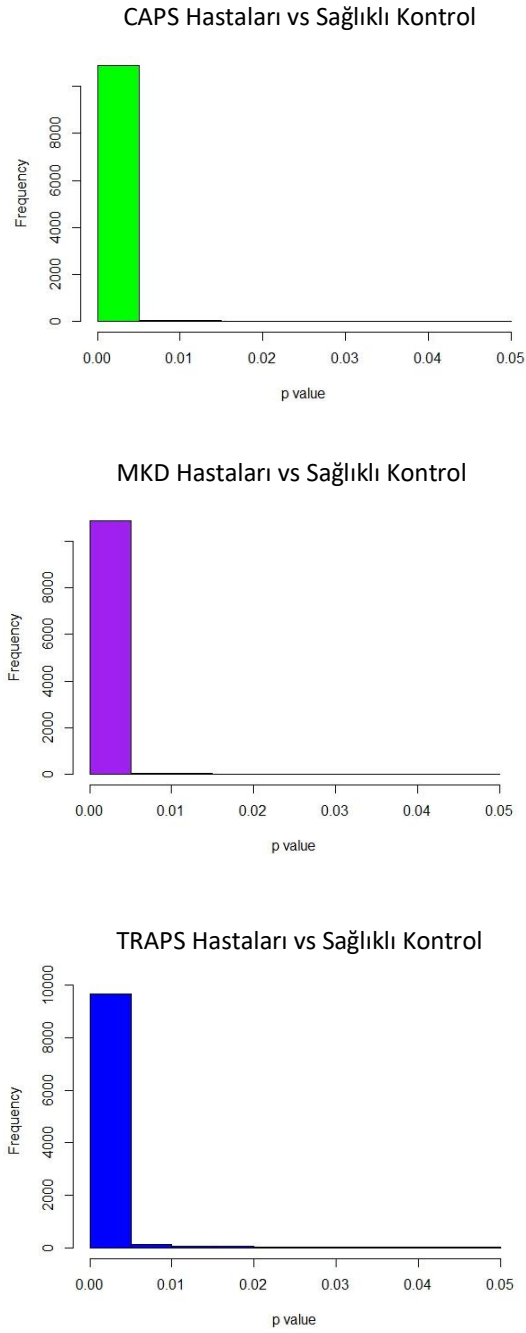
Şekil 4.3. Hastalık düzeyindeki analizler için GSE17732 (a) ve GSE43553 (b) veri setlerine uygulanan ANOVA ve Post Hoc testleri.

GSE17732 ve GSE43553 veri setlerinde gen düzeyinde analizlere devam edildi. Mikrodizin sonucu ifadeleri tespit edilen genlerin sayısı çıkartılıp histogram grafikleri ile gösterildi (Şekil 4.4).

a)



b)



Şekil 4.4. GSE17732 (a) ve GSE43553 (b) veri setlerindeki gen sayılarının histogram grafiği ile gösterimi.

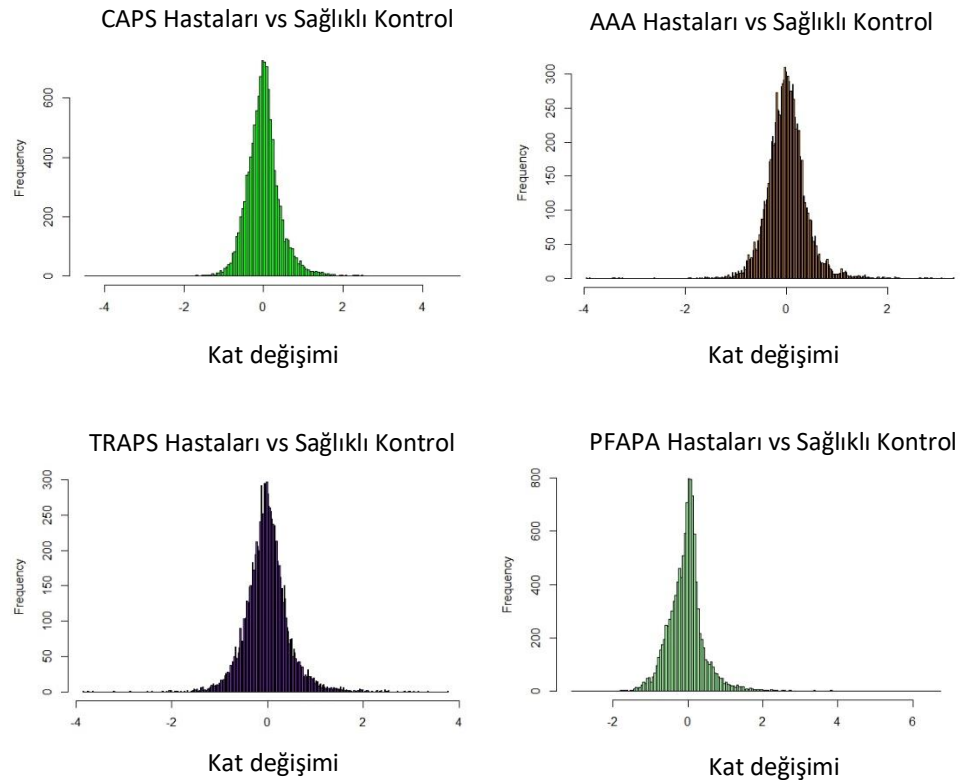
GSE17732 veri setinde AAA hastalarında sağlıklı kontrol bireyelerine göre 5840 gen, CAPS hastalarında sağlıklı kontrol bireyelerine göre 4961 gen, TRAPS hastalarında

sağlıklı kontrol bireylerine göre 5335 gen, PFAPA hastalarında sağlıklı kontrol bireylerine göre 7668 gen belirlendi (Şekil 4.4.a).

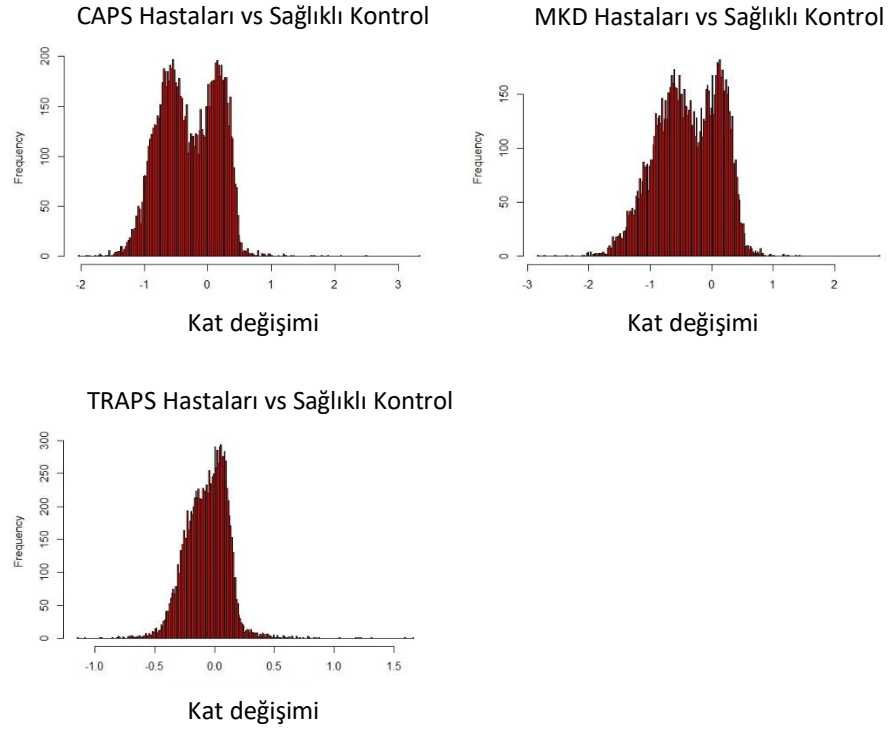
GSE43553 veri setinde CAPS hastalarında sağlıklı kontrol bireylerine göre 11044 gen, MKD hastalarında sağlıklı kontrol bireylerine göre 11040 gen, TRAPS hastalarında sağlıklı kontrol bireylerine göre 10185 gen belirlendi (Şekil 4.4.b).

GSE17732 ve GSE43553 veri setlerindeki genlerin kat değişimlerinin hangi aralıklarda olduğunu gösteren histogram grafikleri çizildi (Şekil 4.5). Bütün log oranları kat artışı bazında değerlendirildi ve kat değişimi sınırı belirlenmiş oldu. Grafiklere baktığımızda, kat artışının 2 belirlenecek olması devamındaki analizlerde gen sayısının düşmesine sebep olabilirdi. Bu sebeple, 1.5 kat değişimi dikkate alınarak analizlere devam edildi.

a)



b)



Şekil 4.5. GSE17732 (a) ve GSE43553 (b) veri setlerindeki genlerin kat değışimlerini gösteren histogram grafikleri.

GSE17732 ve GSE43553 veri setlerindeki hastalık gruplarına ait hasta ve sağlıklı kontrol bireyler arasında ortak olarak ifade farklılığı gösteren genler R programı ile analiz edildi. P değeri < 0,05 ve 1.5 kat üzeri artan/azalan genler tanımlandı (Şekil 4.6).

Veri Setleri	GSE17732 FMF	GSE17732 CAPS	GSE17732 PFAPA	GSE17732 TRAPS	GSE43553 CAPS	GSE43553 TRAPS	GSE43553 MKD
Genler							
RPS4Y1	x	x	x	x	x	x	x
DDX3Y	x	x		x	X		x
KDM5D	x	x		x	x		x
GMPR				x	x	x	
SLC4A1				x	x	x	
SELENBP1				x	x		
IFI44			x		x		
FAS	x	x	x				x
EIF1AY	x		x			x	x
LINS				x	x		

Şekil 4.6. R (4.0.5) programı ile analiz sonucunda GSE17732 ve GSE43553 veri setlerindeki hasta ve kontrol bireyler arasında ifade farklılığı saptanan ortak genler.

4.2.BRB-ArrayTools ile Ham Veri Analizi

mRNA veri setleri arasından GSE17732, GSE43553, GSE40561 ve GSE97075 hem örnek tipi hem platform benzerliği açısından analiz yapılmaya uygun bulunmuş olup bu veri setlerine ait olan tüm ham verilerin analizleri BRB-ArrayTools programı kullanılarak gerçekleştirildi. GSE17732 ve GSE43553 veri setlerinin elde edildiği *Affymetrix* platformundan farklı olarak, GSE40561 ve GSE97075 veri setlerinin *Illumina* platformuyla elde edilmiş olması sorun olmamış, BRB-ArrayTools programının uygulama özellikleri sayesinde tüm mRNA veri setlerinin analizi yapılabilmektedir. Tüm mRNA veri setlerinde hasta ve sağlıklı kontrol gruplarının kıyaslanması sonucu ifadesi 1.5 kat ve üzeri artan veya azalan ortak genler tanımlanmıştır (p değeri $<0,05$). Bunların arasından inflamasyonla ilişkisi bulunan genler ile analizlere devam edilmiştir (Tablo 4.3).

Tablo 4.3. En az üç hastalık grubu arasında inflamasyonla ilişkisi belirlenmiş, ifadesi değişen, ortak genlere sahip veri setlerinin tablosu.

GENLER	17732-CAPS	17732-FMF	17732-PFAPA	40561-CAPS	97075-MKD
ABI1	3.22		1.68	2.49	
ADM	3.08	5.34		2.22	
AIM2	3.17	3.7		1.68	
AKIRIN2	1.74	1.92	2.05		
ARG1	5.76	3		3.61	
BID	1.98	3.37	1.8		
BMX		3.49	1.94	2.12	
C1RL	1.94	3.48	2.66	1.51	
CASP1	4.97	6.71	10.37		
CASP4	3.3	3.63		2.16	
CD55	3.91	1.61	5.04		
CD59	10.41	10.65	9.33	2.2	
CEACAM1		7.03	10.54	5.18	
CFLAR	5.11	13.08	28.12		
CR1	10.74	6.63	6.1	8.04	
CSF2RB	1.6		1.72	1.7	
CXCR1		1.65	1.73		-1.74
DUSP1	1.82	1.84	1.57		
EIF2AK2	1.8	3.25	3.76	1.57	
FAS	13.35	13.5	9.65	3.56	
FFAR2	2.66	2.65	2.03	1.66	
FPR2	4.82	3.86	2.56	1.79	
GK	16.39	12.62	6.15	3.57	
HP	6.79	12.32		4.46	
IFIH1	1.9	2.12	1.8		
IFIT2		2.96	1.92	1.56	
IFIT3		3.15	2.78	1.98	
IFITM3	1.51		2.18	1.67	
IL13RA1	2.57	11.16	8.57		
IL1B	4.64	5.66	4.79		
IL1R2	4.91	1.81			-1.65
IL4R	1.62		1.76	1.51	
IRAK3	4.76	4.44	1.8		
IRF7	1.88	2.18	2.61		
MAFF	3.4	6.7	1.56		
MAPK14	8.84	12.16	3.19	7.6	
MEF2A	4.42		3.78	2	
MEF2C	-1.92	-1.69	-1.67		

<i>MKNK1</i>	2	1.82	2.03		
<i>MR1</i>	1.68	4.65	8.01		
<i>NAIP</i>	5.24	8.25	5.09	3.65	
<i>NAMPT</i>	4.76		3.25	3.99	
<i>NFE2L2</i>	1.81	1.75	2.18		
<i>NFIL3</i>	2.59	4.36	1.99	1.73	
<i>PLAUR</i>	3.77	6.61	5.18	3.3	
<i>PLSCR1</i>	9.05	5.76		2.78	
<i>PPP3R1</i>	1.76	1.67	1.6		
<i>PRKAR1A</i>	3.25	1.52	1.63		
<i>S100A12</i>	2.39	2.25	1.79	1.76	
<i>SERPING1</i>		6.89	3.09	2.13	
<i>SIRPA</i>		1.93	1.54		-1.61
<i>SLC11A1</i>	3.6	1.9	1.66	2.27	
<i>SOCS3</i>	2.11	2.94	2.15		
<i>SP110</i>		3.38	8.54	1.63	
<i>SRPK1</i>	5.38	6.1	4.72	1.66	
<i>STAT1</i>		1.65	12.7	1.58	
<i>TLR1</i>	1.85	1.81	2.21		
<i>TLR4</i>	1.87	1.66	1.85	1.59	
<i>TLR5</i>	4	7.48		1.83	
<i>TLR6</i>	2.68	2.24	1.83		
<i>TLR8</i>	2.63	2.49	2.5	1.68	
<i>TREM1</i>	1.69	1.62		1.55	-1.91
<i>TRIM5</i>		1.56	1.75	2.65	
<i>UBE2D1</i>	7.63	2.36	1.87		
<i>VASP</i>		1.83	1.55	2.47	

4.3. MeV ile Ham Veri Analizi

miRNA veri setlerinin tamamında (GSE111311, 214S106, 315S096) ve MeV 4.9.0 – *Multiple Experiment Viewer* programı kullanılarak AAA hastaları ve kontrol grupları karşılaştırıldı. Bu veri setleri içerisinde dahil edilen hastaların tamamı tedavi alan hastalardır. Bu hastalarda klinik ciddiyete göre kolşisin, anakinra, sertolizumab, etanercept, kanakinumab ilaçları ile bir veya ikili kombinasyon şeklinde tedavi yapılmaktadır. SAM (*Significance Analysis of Microarrays*) analizi gerçekleştirildi, ardından ifadesi 2 kat ve üzeri artan veya azalan miRNA'lar tespit edildi (FDR<0.10) (Şekil 4.7).

Veri Setleri	GSE111311	214S106	315S096
Bireyler	10 AAA Hastası 9 Sağlıklı Kontrol	12 AAA Hastası 6 Sağlıklı Kontrol	19 AAA Hastası 6 Sağlıklı Kontrol
miRNA'lar	hsa-miR-4454	hsa-miR-30e-3p	hsa-miR-1254
	hsa-miR-7975	hsa-miR-30e-5p	hsa-miR-19b
	hsa-miR-144-3p	hsa-miR-197-3p	hsa-miR-151b
	hsa-miR-92a-3p	hsa-miR-197-5p	hsa-miR-1263
		hsa-miR-1308	hsa-miR-455-3p

Şekil 4.7. MeV analizi sonucunda veri setlerinde ifadesi değişen miRNA'lar.

4.4. mRNA Yolak Analizi ve miRNA Hedef Genlerinin Belirlenmesi

BRB-ArrayTools sonucunda ifadesi değişen genler DAVID programı ile analiz edilerek ortak yolak analizleri yapılmış olup, InnateDB veri tabanında inflamasyonla ilişkileri doğrulananlar ile analize devam edilmiştir. Kategori olarak KEGG *Pathway* seçilmiş olup, *P Value* sütununda p değeri<0.05 anlamlılık sıralamasına göre seçilmiştir. Ortak bulunan genlerin yoğunluğu *Genes* başlıklı sütun altında belirtilmiştir (Şekil 4.8).

46 chart records [Download File](#)

Sublist	Category	Term	RT	Gene	Count	%	P-Value	Benjamini
<input type="checkbox"/>	KEGG PATHWAY	Toll-like receptor signaling pathway	RT		9	14.1	1.3E-7	1.9E-5
<input type="checkbox"/>	KEGG PATHWAY	Influenza A	RT		10	15.6	5.3E-7	3.9E-5
<input type="checkbox"/>	KEGG PATHWAY	NOD-like receptor signaling pathway	RT		10	15.6	9.9E-7	4.8E-5
<input type="checkbox"/>	KEGG PATHWAY	Lipid and atherosclerosis	RT		10	15.6	3.6E-6	1.3E-4
<input type="checkbox"/>	KEGG PATHWAY	Tuberculosis	RT		9	14.1	8.7E-6	2.5E-4
<input type="checkbox"/>	KEGG PATHWAY	Measles	RT		8	12.5	1.5E-5	3.5E-4
<input type="checkbox"/>	KEGG PATHWAY	Pathogenic Escherichia coli infection	RT		9	14.1	1.7E-5	3.5E-4
<input type="checkbox"/>	KEGG PATHWAY	Legionellosis	RT		6	9.4	1.9E-5	3.5E-4
<input type="checkbox"/>	KEGG PATHWAY	Necroptosis	RT		8	12.5	3.6E-5	5.7E-4
<input type="checkbox"/>	KEGG PATHWAY	Salmonella infection	RT		9	14.1	8.9E-5	1.3E-3
<input type="checkbox"/>	KEGG PATHWAY	Hematopoietic cell lineage	RT		6	9.4	2.7E-4	3.5E-3
<input type="checkbox"/>	KEGG PATHWAY	Hepatitis C	RT		7	10.9	2.9E-4	3.5E-3
<input type="checkbox"/>	KEGG PATHWAY	Chagas disease	RT		6	9.4	3.1E-4	3.5E-3
<input type="checkbox"/>	KEGG PATHWAY	Hepatitis B	RT		7	10.9	3.5E-4	3.6E-3
<input type="checkbox"/>	KEGG PATHWAY	Coronavirus disease - COVID-19	RT		8	12.5	3.8E-4	3.7E-3
<input type="checkbox"/>	KEGG PATHWAY	Shigellosis	RT		8	12.5	5.5E-4	4.7E-3
<input type="checkbox"/>	KEGG PATHWAY	Inflammatory bowel disease	RT		5	7.8	5.5E-4	4.7E-3
<input type="checkbox"/>	KEGG PATHWAY	Neutrophil extracellular trap formation	RT		7	10.9	8.1E-4	6.5E-3
<input type="checkbox"/>	KEGG PATHWAY	Osteoclast differentiation	RT		6	9.4	8.8E-4	6.5E-3
<input type="checkbox"/>	KEGG PATHWAY	Kaposi sarcoma-associated herpesvirus infection	RT		7	10.9	9.0E-4	6.5E-3
<input type="checkbox"/>	KEGG PATHWAY	Pertussis	RT		5	7.8	1.0E-3	6.9E-3
<input type="checkbox"/>	KEGG PATHWAY	Leishmaniasis	RT		5	7.8	1.0E-3	6.9E-3
<input type="checkbox"/>	KEGG PATHWAY	Fluid shear stress and atherosclerosis	RT		6	9.4	1.3E-3	8.1E-3
<input type="checkbox"/>	KEGG PATHWAY	Complement and coagulation cascades	RT		5	7.8	1.5E-3	9.2E-3
<input type="checkbox"/>	KEGG PATHWAY	C-type lectin receptor signaling pathway	RT		5	7.8	3.2E-3	1.8E-2
<input type="checkbox"/>	KEGG PATHWAY	Th17 cell differentiation	RT		5	7.8	3.6E-3	2.0E-2
<input type="checkbox"/>	KEGG PATHWAY	TNF signaling pathway	RT		5	7.8	4.1E-3	2.2E-2
<input type="checkbox"/>	KEGG PATHWAY	Cytosolic DNA-sensing pathway	RT		4	6.2	6.0E-3	3.1E-2
<input type="checkbox"/>	KEGG PATHWAY	Epstein-Barr virus infection	RT		6	9.4	6.4E-3	3.2E-2
<input type="checkbox"/>	KEGG PATHWAY	Cytokine-cytokine receptor interaction	RT		7	10.9	7.3E-3	3.5E-2
<input type="checkbox"/>	KEGG PATHWAY	Herpes simplex virus 1 infection	RT		9	14.1	7.7E-3	3.6E-2

Şekil 4.8. DAVID ile ifadesi değişen genlerin ortak yolak analizleri.

DAVID programı ile bulunan yolaklar arasından inflamasyonla doğrudan ilişkili olup bu yolaklarda görev alan genler tespit edilmiştir (Tablo 4.4). Ayrıca bu genlerin inflamasyonla ilişkisi InnateDB veri tabanı ile doğrulanmıştır.

Tablo 4.4. DAVID programı ile bulunan inflamasyonla ilişkili yollar ve bu yollarda görev alan genler.

KEGG Pathway	Genler
Toll-benzeri Reseptör Sinyal Yolağı (<i>Toll-like receptor signaling pathway</i>)	<i>TLR1, TLR6, TLR5, TLR7/8, TLR4, IRF7, STAT1, IL1B, MAPK14</i>
NOD-benzeri Reseptör Sinyal Yolağı (<i>NOD-like receptor signaling pathway</i>)	<i>NAMPT, IRF3/7, NAIP, CASP1, AIM2, IL1B, STAT1/2, CASP4, TLR4, MAPK14</i>
İnflamatuvar Bağırsak Hastalığı (<i>Inflammatory bowel disease</i>)	<i>IL1B, IL4R, STAT1, TLR4, TLR5</i>
Nötrofil Hücre Dışı Tuzak Oluşumu (<i>Neutrophil extracellular trap formation</i>)	<i>CASP1, CASP4, CR1, FPR2, MAPK14, TLR4, TLR8</i>
Th17 Hücre Farklılaşması (<i>Th17 cell differentiation</i>)	<i>IL1B, IL4R, STAT1, MAPK14, PPP3R1</i>
TNF Sinyal Yolağı (<i>TNF signaling pathway</i>)	<i>CFLAR, FAS, IL1B, MAPK14, SOCS3</i>
MAPK Sinyal Yolağı (<i>MAPK signaling pathway</i>)	<i>FAS, MKNK1, DUSP1, IL1B, MAPK14, MEF2C, PPP3R1</i>
Sitokin-sitokin Reseptör İnteraksiyonu (<i>Cytokine-cytokine receptor interaction</i>)	<i>CXCR1, FAS, CSF2RB, IL1B, IL1R2, IL13RA1, IL4R</i>
JAK-STAT Sinyal Yolağı (<i>JAK-STAT signaling pathway</i>)	<i>CSF2RB, IL13RA1, IL4R, STAT1, SOCS3</i>
Th1 ve Th2 Hücre Farklılaşması (<i>Th1 and Th2 cell differentiation</i>)	<i>IL4R, MAPK14, PPP3R1, STAT1</i>
Apoptozis (<i>Apoptosis</i>)	<i>BID, CFLAR, FAS, CSF2RB</i>
Kompleman ve Koagülasyon Kaskadları (<i>Complement and coagulation cascades</i>)	<i>CD55, CD59, CR1, PLAUR, SERPING1</i>
Prolaktin Sinyal Yolağı (<i>Prolactin signaling pathway</i>)	<i>MAPK14, STAT1, SOCS3</i>
Sitozolik DNA-algılama Yolağı (<i>Cytosolic DNA-sensing pathway</i>)	<i>AIM2, CASP1, IRF7, IL1B</i>
C-tipi Lektin Reseptörü Sinyal Yolağı (<i>C-type lectin receptor signaling pathway</i>)	<i>CASP1, IL1B, MAPK14, PPP3R1, STAT1</i>

BRB-ArrayTools sonucunda ifadesi değişen, inflamasyonla ilişkili mRNA'lar, miRNA veri setlerinden bulunan ifadesi değişen miRNA'ların hedef genleri olarak TargetScan veri tabanı ile tanımlanmıştır. Analizler sonucunda ifadesi değişen miRNA-hedef mRNA ilişkisinin belirlenmesi için, ifadesi azalan miRNA-ifadesi artan gen ve ifadesi artan miRNA-ifadesi azalan gen bağlantısı kurulmuştur (şekil 4.9).

a) İfadesi azalan miRNA'lar ve ifadesi artan genler

Genler (+) \ miRNA (-)	hsa-miR-92a-3p	hsa-miR-197-3p	hsa-miR-197-5p	hsa-miR-1254
CD59	x	x		x
CSF2RB	x			x
DUSP1	x			
NAMPT	x			
SERPING1	x	x	x	
CR1		x		x
FAS		x		
FPR2		x	x	
IL13RA1		x		
MAPK14		x	x	x
MKNK1		x		x
NAIP		x		
STAT1		x		x

b) İfadesi artan miRNA'lar ve ifadesi azalan genler

Gen (-) \ miRNA (+)	hsa-miR-144-3p	hsa-miR-7975	hsa-miR-30e-3p	hsa-miR-30e-5p
MEF2C	x	x	x	x

şekil 4.9. İfadesi artan/azalan miRNA'lar ve ifadesi azalan/artan genler.

BRB-ArrayTools analizi sonucunda en az üç hastalık grubu arasında ifadesi değişen inflamasyonla ilişkili bulunan genlerden, MeV analizi sonucunda çıkan miRNA'ların hedef genleri olmayanlar ve bu miRNA'lardan ifadesi değişen inflamasyonla ilişkili bulunan genlerden hiçbirini hedeflemeyenler ayrıca belirlenmiştir (şekil 4.10).

a)

Hedeflenmeyen Genler		
<i>CASP1</i>	<i>IL1B</i>	<i>TLR4</i>
<i>AIM2</i>	<i>CASP4</i>	<i>TLR5</i>
<i>TLR1</i>	<i>CFLAR</i>	<i>TLR6</i>
<i>CXCR1</i>	<i>IL1R2</i>	<i>TLR8</i>
<i>CD55</i>	<i>IL4R</i>	<i>SOCS3</i>
<i>PPP3R1</i>	<i>IRF7</i>	<i>PLAUR</i>

b)

Hedeflemeyen miRNA
hsa-miR-1308
hsa-miR-19b
hsa-miR-4454
hsa-miR-151b
hsa-miR-1263
hsa-miR-455-3p

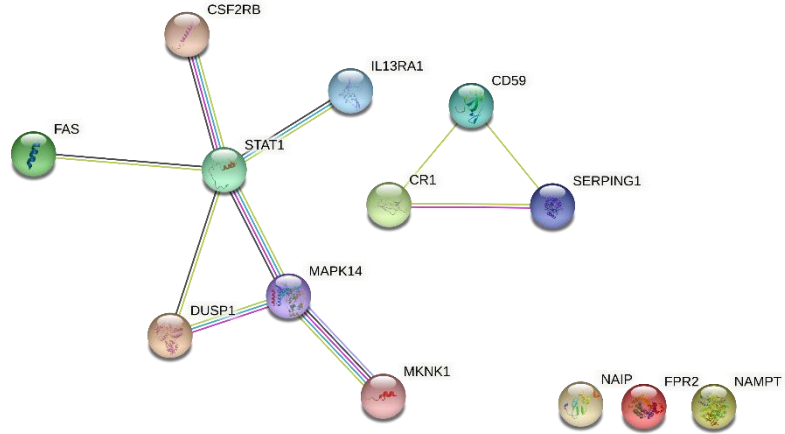
Şekil 4.10. BRB-ArrayTools analizi sonucunda çıkan ifadesi değişen inflamasyonla ilişkili genlerden miRNA'ların hedeflemediği genler (a) ve ifadesi değişen inflamasyonla ilişkili bulunan genlerden hiçbirini hedeflemeyen miRNA'lar (b).

4.5. miRNA-hedef mRNA ilişkisinin Belirlendiği mRNA'ların Kodladığı

Proteinlerin Protein-Protein İlişkilerinin STRING Veri Tabanı ile Gösterilmesi

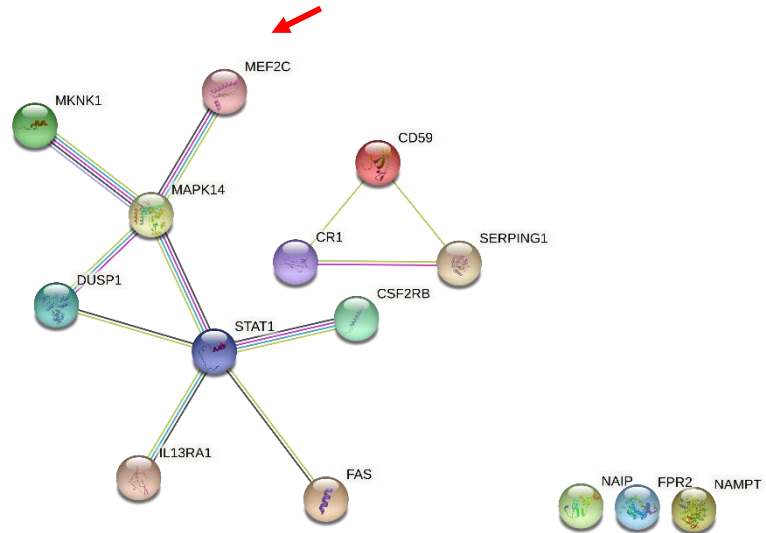
BRB-ArrayTools ve MeV analizleri sonrasında ifadesi değişen miRNA'ların mRNA'ların kodladığı proteinlerin aralarındaki protein-protein etkileşimleri STRING veri tabanı ile araştırılmıştır. Ortaya çıkan ağ görüntüsünde, diğer proteinlerle en çok etkileşime girmiş STAT1 olup, MAPK14 ve CSF2RB proteinleri ile arasında çıkan pembe çizginin temsiliyle deneysel olarak ispatlanmıştır. STAT1 proteininin, MAPK14, FAS, CSF2RB, IL13RA1, DUSP1 proteinleriyle bağlantısı sarı çizginin temsiliyle literatürden kanıtlanmıştır. Deneysel olarak bağlantısı gösterilmiş olan proteinler, MKNK1 ve MAPK14, DUSP1 VE MAPK14, CR1 ve SERPING1'dir. Aralarındaki bağlantının mavi çizginin temsiliyle veri tabanından ispatlandığı proteinler ise, MAPK14 ve STAT1, MKNK1 ve MAPK14, DUSP1 VE MAPK14, STAT1 ve IL13RA1, STAT1 ve CSF2RB'dir. Bağlantı çizgisi sarı ile gösterilmiş literatürde geçen diğer proteinler, MKNK1 ve MAPK14, DUSP1 VE MAPK14, CR1 ve CD59, SERPING1 ve CD59, CR1 ve SERPING1'dir. Aralarındaki bağlantı çizgisi siyah olup, birlikte ifade olan genleri temsil eden proteinler, STAT1 ve IL13RA1, STAT1 ve DUSP1, STAT1 ve CSF2RB, STAT1 ve FAS'tır.

Diğer yandan, FPR2, NAIP ve NAMPT proteinleri hiçbir proteinle bağlantılı bulunmamıştır (Şekil 4.11).



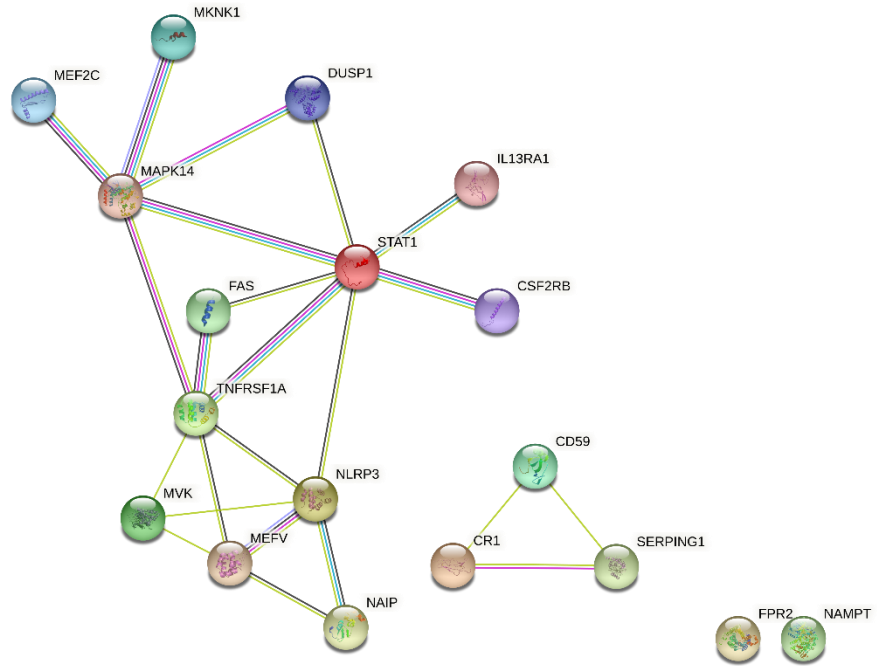
Şekil 4.11. İfadesi azalan miRNA'ların hedeflediği ifadesi artan genlerin kodladığı proteinler ve protein-protein ilişkileri.

İfadesi artan miRNA'ların hedeflediği-ifadesi azalan genlerin kodladığı MEF2C proteininin diğer proteinlerle etkileşimi ağ görüntüsünde belirtilmiştir (Şekil 4.12). MEF2C ve MAPK14 proteinlerinin ilişkisi, pembe çizgiyle deneysel olarak, sarı çizgiyle literatürde, mavi çizgiyle veri tabanından bulunduğu temsil edilmiştir. Birbirleriyle bağlantısı bulunmamış proteinler ise NAIP, FPR2 ve NAMPT'tır.



Şekil 4.12. İfadesi artan miRNA'ların hedeflediği-ifadesi azalan genin kodladığı MEF2C proteini ve protein-protein ilişkileri.

Tez kapsamında seçilmiş olan hastalıklara sebep olan genler (*MEFV*, *NLRP3*, *TNFRSF1A*, *MVK*) tarafından kodlanan proteinler ile miRNA-mRNA analizlerimiz ile öne çıkan proteinlerin Şekil 4.12’de gösterilen protein ilişkileri yine STRING aracılığıyla araştırılmıştır (Şekil 4.13).



Şekil 4.13. *MEFV*, *NLRP3*, *TNFRSF1A*, *MVK* tarafından kodlanan proteinler ile protein-protein ilişkileri.

TNFRSF1A ve STAT1, TNFRSF1A ve MAPK14, TNFRSF1A ve FAS proteinleri arasındaki deneysel ispatlanma pembe çizgi ile belirtilmiştir. MEFV ve NAIP, NLRP3 ve NAIP, NLRP3 ve STAT1, TNFRSF1A ve STAT1, TNFRSF1A ve MAPK14, TNFRSF1A ve FAS arasındaki sarı çizgiler literatürde ispatlandıklarını belirtmiştir.

5. TARTIŞMA

“Otoinflamatuvar hastalık” adı 1999 yılında McDermott ve arkadaşları tarafından önerilmiştir. Bu hastalık grubu, bağışıklık yanıtının her aşamasında meydana gelebilecek düzenlemelerden kaynaklanmaktadır. Doğal bağışıklık yanıtı, organizmayı tehdit eden veya yok eden eksojen ve endojen tehlikelerden korumak için gelişmiştir. Bağışıklık yanıtının amacı, tehlikenin kaynağını ortadan kaldırmak ve doku fonksiyonunu, homeostazı yeniden sağlamaktır. Doğal bağışıklık sistemi, eksojen ve endojen moleküler birimleri tanıyan sınırlı sayıda reseptör kullanmaktadır. Ana hücre tipleri monositler, makrofajlar ve nötrofillerdir. İlgili yolak aktive edildiğinde, bağışıklık hücrelerini dokulara almak ve doku savunmasını koordine etmek için proinflamatuvar sitokinlerin ve kemokinlerin üretimi başlamaktadır. Aktif kaspaz-1, temel sitokinlerin salgılanması gibi bağışıklık tepkisini ve inflamasyonu düzenlemek için çok çeşitli hücresel olayları katalize edebilmektedir. Kaspaz-1'in pro-IL-1 β 'yi biyoaktif formu olan IL-1 β 'ye dönüştürme yeteneği tanımlanmıştır. Biyoaktif form IL-1 β , sitoplazmadan kan dolaşımına salınmaktadır. [2,6].

Yapılan çalışmalar sonucunda, çoğu otoinflamatuvar hastalığın tek genlerdeki mutasyonlarla güçlü bir genetik arka plana sahip olduğu belirlenmiştir. Bunların arasından en iyi bilinen, moleküler mekanizmalarına bağlı olarak inflamazomopatiler veya IL-1 β -aktivasyon sendromları olan AAA, CAPS, MKD, ve bir protein-katlanma bozukluğu olan TRAPS hastalıkları esas olarak deriyi, mukozayı, kasları, eklemleri ve sindirim sistemini etkileyen klinik belirtileriyle ilişkili olarak ani ateş atakları ile kendini gösteren, tekrarlayan sistemik inflamasyon atakları ile karakterizedirler [2]. Bununla birlikte, çevresel etkinin fenotipi modüle ettiği poligenik veya çok faktörlü otoinflamatuvar hastalıklar da tanımlanmıştır. PFAPA gibi çok faktörlü hastalıklar için patogeneze hala bilinmemektedir, ancak terapötik kanıtlarla da desteklenen immünolojik mekanizmaları değerlendirmeyi amaçlayan çalışmalar, PFAPA sendromunu ilişkilendiren birçok çevresel tetikleyiciye yanıt olarak anormal bir IL-1 salımını vurgulamıştır [56]. Bu tez çalışması, inflamasyon ile ilişkili benzer bir moleküler patogenezin görüldüğü AAA, CAPS, TRAPS, MKD ve PFAPA otoinflamatuvar hastalıklarını omik yaklaşımlar doğrultusunda bir arada değerlendirerek, bu

hastalıklarda etkilenen inflamatuvar yolaklarda önemli olabilecek ortak mRNA'lar, miRNA'lar ve hedef aldıkları proteinlerin araştırılmasını hedeflemektedir. Bu kapsamda çalışmaya dahil edilen mRNA ve miRNA veri setlerinden, AAA, CAPS, TRAPS, MKD ve PFAPA hastalıklarının klinik bulguları ile seyreden, toplamda 43 AAA, 33 CAPS, 29 TRAPS, 58 MKD, 6 PFAPA hastası ve bu hastalıklara dair herhangi bir hastalık öyküsü bulunmayan 117 sağlıklı bireye ait ham verilere sahip GSE17732, GSE43553, GSE40561, GSE97075 veri setleri, TÜBİTAK projelerinde (214S106, 315S096) yer alan hasta ve kontrol gruplarını içermektedir. Çalışma kapsamında seçilen veri setlerinde platform ve örnek tipi benzerlikleri göz önünde tutulup, platform türünün *Affymetrix* veya *Illumina*, örnek tipinin tam kan veya periferik kan mononükleer hücre olmasına dikkat edilmiştir. Böylece analiz sonuçlarının daha homojen çıkması sağlanmıştır.

Tez kapsamında yapılan çalışmaların ilk aşamasında, platform ortaklığına ve benzer örnek tiplerine sahip olmalarından dolayı literatürde yer alan GSE17732 ve GSE43553 veri setleriyle R programı kullanılarak başlanmasına karar verilmiştir. Böylece bir veri setine ait ham verilerinin programa okutulması, analize hazır hale getirebilmek için uygulanması gereken ön işlem basamakları, histogram, box plot grafiklerinin çizilmesi, PCA uygulanması, hastalık grubu düzeyinde ANOVA ve Post-hoc testlerinin uygulanması ve son olarak gen ekspresyon analizlerinin uygun kodlarını yazıp R programında çalıştırılması öğrenilmiştir.

Tezin ikinci aşamasında, GSE17732 ve GSE43553 veri setlerine ait *Affymetrix* platformundan farklı olarak, GSE40561 ve GSE97075 veri setlerinin *Illumina* platformuyla çalışılmasına imkan veren *BRB-ArrayTools* programı sayesinde tüm mRNA veri setlerinin analizlerine tek program ile devam edilmiştir. Hasta ve sağlıklı kontrol gruplarının kıyaslanması sonucu ifadesi 1.5 kat ve üzeri artan veya 1.5 kat ve üzeri azalan ortak genler tanımlanmıştır (p değeri <0,05). GSE111311, 315S096 ve 214S106 miRNA veri setlerinde ise *MeV 4.9.0 – Multiple Experiment Viewer* programı kullanılarak hastalık ve kontrol grupları karşılaştırılmıştır. *SAM (Significance Analysis of Microarrays)* analizi gerçekleştirilip, ardından ifadesi 2 kat ve üzeri artan veya azalan miRNA'lar tespit edilmiştir (FDR<0.10).

Tezin üçüncü aşamasında, *BRB-ArrayTools* analizi sonucunda ifadesi değişen genlerin DAVID programında ortak yolak analizleri yapılmış ve inflamasyonla ilişkileri InnateDB veri tabanı ile araştırılmıştır. Yolak analizleri sonucunda inflamasyonla ilişkili olduğu saptanan genlerin, sadece AAA hastaları için yapılan MeV analizleri sonucunda ifadesi değişen miRNA'ların hedef genleri olup olmadığı TargetScan veri tabanı ile araştırılmıştır. Analizi gerçekleştirilen miRNA veri setlerinin tamamında sadece AAA hastaları ile kontrol grubu arasında karşılaştırılma yapılması bu analizler açısından sınırlayıcı bir durum olarak karşımıza çıkmaktadır. Ancak seçilen otoinflamatuvar hastalıklar içerisinde AAA hastalığının daha sık görülmesi nedeniyle bu hastalıkta uygun miRNA veri setlerine ulaşılabilmektedir. Bu analizler neticesinde ifadesi artan hsa-miR-144-3p, hsa-miR-4454, hsa-miR-7975, hsa-miR-30e-3p hsa-miR-30e-5p'nin hedefinde olan ifadesi azalan *MEF2C* geni ve ifadesi azalan hsa-miR-92a-3p, hsa-miR-197-3p, hsa-miR-197-5p, hsa-miR-1254'ün hedefindeki ifadesi artan *STAT1*, *CD59*, *CSF2RB*, *DUSP1*, *NAMPT*, *SERPING1*, *CR1*, *FAS*, *FPR2*, *IL13RA1*, *MAPK14*, *MKNK1* ve *NAIP* genleri tespit edilmiştir.

Tezin son aşamasında, ifadesi değişen miRNA'ların hedeflediği mRNA'ların kodladığı proteinler ve protein-protein ilişkileri *STRING* veri tabanı üzerinden araştırılmıştır. İfadesi azalan miRNA'lar-ifadesi artan genler eşleştirmesi sonucunda GSE17732 veri setinde AAA, GSE17732 veri setinde PFAPA ve GSE40561 veri setinde CAPS hastalık gruplarında ortak olarak ifadesi artan, öne çıkan genlerden biri *STAT1* olmuştur. *STAT1*, Janus kinaz/sinyal dönüştürücüsünün ve transkripsiyon sinyal yolağının (JAK/STAT) aktivatörünün temel bir bileşenidir. Bu yolak, çeşitli sitokinler ve büyüme faktörleri için önemli bir sinyal yolağıdır. Aktivasyonu, bağışıklık yanıtındaki hücre proliferasyonu, farklılaşma, göç ve apoptoz gibi geniş hücresel fonksiyonları uyarılmaktadır [57]. Literatürdeki bir çalışmada, *STAT1*'in fosforilasyonunun artmasıyla NLRP3 inflamazom aktivitesini baskıladığı, böylece kaspaz-1'e bağlı IL-1 β olgunlaşmasını önlediği gösterilmiştir [58]. Diğer bir transkriptom analizi çalışması, akut tümör nekroz faktör (TNF) stimülasyonunun, mononükleer kemokinlerin ekspresyonunu seçici olarak arttıran bir interferon düzenleyici faktör-1 (IRF1)-interferon-beta (IFN- β)-interferon-alfa/beta reseptörü (IFNAR)-*STAT1* düzenleyici

yolağıyla endotelial hücrelerde güçlü bir interferon (IFN) tip I yanıtı indüklediğini ortaya koymuştur [59]. GSE1773 veri setinde CAPS, AAA ve PFAPA, GSE40561 veri setinde CAPS hastalık gruplarında ortak olarak ifadesi artan genlerden bir diğeri olan *NAIP*, inflamazomları aktive eden Nükleotit bağlama ve oligomerizasyon alanı (Nod)-benzeri reseptörlerden (NLRs) biridir [60]. Tez kapsamında seçilen hastalıklara sebep olan genlerin kodladığı proteinleri dahil edildiği STRING analizi sonuçları incelendiğinde, protein-protein ilişkileri açısından *NAIP*'in, yalnızca *MEFV* ve *NLRP3* ile bağlantılı olduğu görülmektedir. AAA hastalığına sebep olan *MEFV* genindeki mutasyonlarla ilişkilendirilen pyrin inflamazomu, diğeryandan CAPS hastalığı için *NLRP3*'te meydana gelen mutasyonlar ile ilişkilendirilen *NLRP3* inflamazomu düşünülürse, gösterilen bu ilişkinin *NAIP* proteininin bu hastalıklara etkisi açısından önemli olabileceği fikrini güçlendirmektedir. GSE1773 veri setinde CAPS, AAA ve PFAPA, GSE40561 veri setinde CAPS hastalık gruplarında ortak olarak ifadesi artan bir diğergen *FAS* olup, protein-protein ilişkilerinde tez kapsamında seçilen hastalıklardan sadece *TNFRSF1A* ile bağlantısı bulunmuştur. *TNFRSF1A*, insanlarda 29 protein içeren ve TNF ailesinin bir veya daha fazla sitokiniyle etkileşime giren TNF reseptörlerinin süper ailesine aittir. Apoptozu başlatan hücre dışı sinyal yolları, transmembran reseptör aracılı etkileşimleri içerir. Bunlar arasında TNF reseptör geni süper ailesinin üyesi olan *TNFRSF1A*'nın yanında ölüm reseptörlerinden *FAS* dahil olmak üzere çeşitli üyeleri tanımlanmıştır [61]. Hücre ölümü regülasyonundaki rolünün yanı sıra, bu reseptörlere ligand bağlanması, NF- κ B inflamatuvar yolağını veya kaspaz aracılı sinyalleme aktif etmek için rolü olan bir membran kompleksinin oluşumuna yol açar [62]. GSE1773 veri setinde CAPS, AAA ve PFAPA, GSE40561 veri setinde CAPS hastalık gruplarında ortak olarak ifadesi artan *MAPK14* geni, tez kapsamında seçilen hastalıklardan sadece *TNFRSF1A* ile bağlantılı bulunmuştur. Doğal bağışıklıkta yer alan mitojenle aktive olan protein kinaz (MAPK) süper ailesinin dört alt grubundan biri olan p38 kinazların üyelerinden *MAPK14* (p38a), çeşitli transkripsiyon faktörlerinin aktivasyonunu düzenler [63]. Başka bir çalışmada, kanakinumab ile tedavinin başlamasından önce ve sonra TRAPS hastaları ve sağlıklı kontrollerin transkriptomu karşılaştırılmıştır. Tedaviden önce, TRAPS hastalarında sağlıklı kontrollere kıyasla

TNFRSF1A, *IL-1 β* , *MAPK14* ve *NFKB1*'nin gen ekspresyonu tespit edilmiştir. Bununla birlikte, kanakinumab tedavisinden 15 gün sonra gen ekspresyonu tamamen normalleştirilmiş olup, *MAPK14*'ün TRAPS patogenezinde önemli bir rol oynadığı gösterilmiştir [62]. Protein ağında yer alan diğer proteinler (MKNK1, DUSP1, IL13RA1, CSF2RB, CR1, CD59, SERPING1) literatürde otoinflamatuar hastalıklarla doğrudan ilişkili bulunamamıştır. Literatürde inflamasyon ile ilişkisi diğer hastalık gruplarıyla tespit edilen protein-protein etkileşimi bulunan MAPK14 ve STAT1'dir. Yapılan çalışmada JAK/STAT ailesi genlerinin ekspresyonu, MAPK14 ile önemli ölçüde ilişkilendirilmiştir; oksidatif fosforilasyon, interferon-alfa (IFN α) yanıtı ve PI3K-Akt-mTOR sinyalleşmesi vb. aktivasyonlara katılmaktadır [64]. İlişkisi tespit edilen diğer iki protein STAT1 ve CSF2RB olup Romatoid Artrit hastalarının tanımlanmasında literatürdeki transkriptom bazlı bir çalışmada JAK/STAT'a bağlı bir gen düzenleyicide bu iki protein ilişkili bulunmuştur [65]. Literatürde yer alan lökosit sayısı varyasyonunu araştıran bir çalışmada, *IL13RA1* ve *STAT1* ifadesi azalan olarak bulunmuş olup KEGG *Pathway* üzerinden sırasıyla sitokin-sitokin reseptör interaksiyon yolağı ve kemokin sinyal yolağında bulunmuşlardır [66].

Bu tez kapsamında elde edilen sonuçlar birlikte değerlendirildiğinde, inflamasyon ile ilişkili benzer patogenezin görüldüğü, AAA, CAPS, TRAPS, MKD ve PFAPA otoinflamatuar hastalıklarında ortak yolların etkilendiği fikri desteklenmiştir. Analizler sırasında, özellikle mRNA analizlerinde farklı zamanlarda yapılmış olan, farklı hastalıkları ve hastaları içeren, değişik platformların kullanıldığı veri setleri incelenmiş ve tüm bu farklılıklara rağmen ortak olarak değişen inflamasyonla ilişkili mRNA'lar ve bunların miRNA veri setleri içerisinde değişen miRNA'lar ile bağlantı kurabileceği tespit edilebilmiştir. Bu moleküllerin inflamasyonda görev alan proteinleri kodladığı ve bu proteinlerin protein-protein ilişkilerinin gösterilmesi ise bu hastalıkların moleküler temelleri açısından önemli olabilecek aday proteinleri belirlememizi sağlamıştır. Bu bilgiler ışığında; tamamen biyoinformatik araçlar kullanılarak elde edilen, aday mRNA'lar, miRNA'lar ve mRNA'lar tarafından kodlanan proteinler üzerine ıslak laboratuvar da ileri analizler yapılarak ilgili hastalıklar açısından miRNA'ların hedef aldığı genler ile bu yollarda mRNA'ları nasıl düzenlediği ve protein-protein etkileşimlerinin hücrel

düzeyde incelenmesi önem kazanmıştır. Tez kapsamında elde edilen bu ön bilgiler, benzer fenotipin görüldüğü; AAA, CAPS, TRAPS, MKD, PFAPA ve diğer otoinflamatuvar hastalıklar için yeni bir bakış açısı ile literatüre önemli bir katkı sunmuş olacak, uzun vadede ise bu hastalıklar için yeni tanı ve tedavi yöntemlerinin geliştirilmesine katkı sağlayabilecektir.

6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

6.1. Sonuçlar

- R programında yapılan analizler sonucunda GSE17732 ve GSE43553 veri setleri içerisinde 10 gen (*RPS4Y1*, *DDX3Y*, *KDM5D*, *GMPT*, *SLC4A1*, *SELENBP1*, *IFI44*, *FAS*, *EIF1AY*, *LINS*), ortak olarak 1.5 kat ve üzeri artan/azalan genler olarak bulunmuştur.
- BRB-ArrayTools programı ile GSE17732, GSE43553, GSE40561 ve GSE97075 veri setlerindeki ham veriler analiz edilmiştir. Hastalık grupları arasında en az üç tanesinde ortak olarak yer alan, ifadesi 1.5 kat ve üzeri artan/azalan 226 gen tespit edilmiştir.
- Ortak olarak ifadesi değişen 226 gen içerisinde DAVID programı ile yapılan yolak analizleri ve InnateDB veri tabanı ile inflamasyonla ilişkisi doğrulanmış 64 gen belirlenmiştir.
- Seçilen hastalıklarla ilişkili miRNA verileri (GSE111311 veri seti, 214S106 ve 315S096). MeV programı ile analiz edilmiştir. Bu analizler sonucunda ifadesi 2 kat azalan 5 miRNA (*hsa-miR-92a-3p*, *hsa-miR-197-3p*, *hsa-miR-197-5p*, *hsa-miR-1254*, *hsa-miR-1308*), ifadesi 2 kat artan 9 miRNA (*hsa-miR-144-3p*, *hsa-miR-4454*, *hsa-miR-7975*, *hsa-miR-30e-3p*, *hsa-miR-30e-5p*, *hsa-miR-151b*, *hsa-miR-1263*, *hsamiR-455-3p*, *hsa-miR-19b*) tespit edilmiştir.
- MeV analizi sonucunda çıkan miRNA'ların, BRB-ArrayTools analizi sonucunda inflamasyonla ilişkisi doğrulanmış genler arasından hedefledikleri 14 gen (*CD59*, *CSF2RB*, *DUSP1*, *NAMPT*, *SERPING1*, *CR1*, *FAS*, *FPR2*, *IL13RA1*, *MAPK14*, *MKNK1*, *NAIP*, *STAT1* ve *MEF2C*) tespiti yapılmıştır.
- Analizler sonucunda elde edilen genlerin ve miRNA'ların hedeflediği proteinler ve protein-protein ilişkileri STRING veri tabanında araştırılmıştır. STAT1, diğer proteinlerle yüksek oranda bağlantılı olarak bulunmuştur.
- Tez kapsamında seçilen hastalıklara sebep olan MEFV, NLRP3, TNFRSF1A ve MVK proteinlerinin analiz sonuçlarından çıkan diğer proteinlerden NAIP, STAT1, MAPK14, FAS ile doğrudan ilişkileri tespit edilmiştir.

6.2. Öneriler

- Tüm veri setleri birden fazla biyoinformatik program ile analiz edilerek karşılaştırma yapılabilir.
- Diğer otoinflamatuvar hastalıkların da gruplandırılarak dahil edilmesiyle benzer analizler tekrar edilebilir.
- Dahil edilen poligenik otoinflamatuvar hastalık sayısı arttırılabilir. Böylece poligenik hastalıkları da kendi aralarında gruplayarak monogenik hastalıklar ile karşılaştırılması daha seçici olarak yapılabilecektir.
- MeV analizi sonucunda çıkan miRNA'ların ve BRB-ArrayTools analizi sonucunda ortaya çıkan mRNA'ların kendi otoinflamatuvar hastalık grubu örneklerimizde RT-PCR ile validasyonları yapılabilir. Deneysel olarak öne çıkan mRNA'lar tarafından kodlanan proteinlerin, hastalara ait dokularda veya hücre kültürü ortamında; *Western blot*, ELISA gibi yöntemlerle miktar analizleri, immün-boyama, immün çöktürme gibi yöntemler ile protein-protein etkileşimleri araştırılabilir.

7. KAYNAKLAR

1. Sullivan, K, Stiehm, R, Editörler. IL-1 mediated autoinflammatory diseases: the “classic” hereditary recurrent fever syndromes and the inflammasomopathies, Stiehm’s Immune Deficiencies 2nd ed. Academic Press; 2020.
2. Krainer J, Siebenhandl S, Weinhäusel A. Systemic autoinflammatory diseases. *J Autoimmun.* 2020;109:102421.
3. Ozen S, Bilginer Y. A clinical guide to autoinflammatory diseases: familial Mediterranean fever and next-of-kin. *Nat Rev Rheumatol.* 2014;10(3):135-147.
4. Moll M, Kuemmerle-Deschner JB. Inflammasome and cytokine blocking strategies in autoinflammatory disorders. *Clin Immunol.* 2013;147(3):242-275.
5. Sag E, Bilginer Y, Ozen S. Autoinflammatory diseases with periodic fevers. *Curr Rheumatol Rep.* 2017;19(7):41.
6. Georgin-Lavialle S, Fayand A, Rodrigues F, Bachmeyer C, Savey L, Grateau G. Autoinflammatory diseases: state of the art. *Presse Med.* 2019;48(1 Pt 2):e25-e48.
7. Sanchez GA, de Jesus AA, Goldbach-Mansky R. Monogenic autoinflammatory diseases: disorders of amplified danger sensing and cytokine dysregulation. *Rheum Dis Clin North Am.* 2013;39(4):701-734.
8. Simon, A, Stoffels, M, Editörler. The concept of autoinflammatory diseases. The autoimmune diseases. 5th Ed. Academic Press; 2014.
9. Infervers: an online database for autoinflammatory mutations [Internet]. 2022 [Erişim Tarihi 20 Temmuz 2022]. Erişim Adresi: <https://infervers.umai-montpellier.fr/web/>
10. Ozen S, Kone-Paut I, Gül A. Colchicine resistance and intolerance in familial mediterranean fever: definition, causes, and alternative treatments. *Semin Arthritis Rheum.* 2017;47(1):115-120.

11. Batu ED, Batu HB. Recurrence of periodic fever, aphthous stomatitis, pharyngitis, and cervical adenitis (PFAPA) syndrome after tonsillectomy: case-based review. *Rheumatol Int.* 2019;39(6):1099-1105.
12. Xiao H, Bartoszek K, Lio' P. Multi-omic analysis of signalling factors in inflammatory comorbidities. *BMC Bioinformatics.* 2018;19(Suppl 15):439.
13. Kolobkov DS, Sviridova DA, Abilev SK, Kuzovlev AN, Salnikova LE. Genes and diseases: insights from transcriptomics studies. *Genes* 2022; 13:1168.
14. de Jong E, Bosco A. Unlocking immune-mediated disease mechanisms with transcriptomics. *Biochemical Society Transactions.* 2021;49;705–714.
15. Teo ZL, Savas P, Loi S. Gene Expression Analysis: current methods. *Molecular Pathology in Cancer Research.* New York: Springer;2016.
16. Balci-Peynircioglu B, Akkaya-Ulum YZ, Akbaba TH, Tavukcuoglu Z. Potential of miRNAs to predict and treat inflammation from the perspective of familial mediterranean fever. *Inflamm. Res.* 2019;68(11):905–913.
17. Stojanov S, Lapidus S, Chitkara P, Feder, H., Salazar JC, Fleisher TA, ve ark. Periodic fever, aphthous stomatitis, pharyngitis, and adenitis (PFAPA) is a disorder of innate immunity and Th1 activation responsive to IL-1 blockade. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2011;108(17):7148-7153.
18. Bekkering S, Arts R, Novakovic B, Kourtzelis I, van der Heijden C, Li Y, Popa C, ve ark. Metabolic induction of trained immunity through the mevalonate pathway. *cell.* 2018;172(1-2):135-146.e9.
19. Harrison SR, Scambler T, Oubussad L, Wong C, Wittmann M, McDermott MF, ve ark. Inositol-requiring enzyme 1-mediated downregulation of microrna (mir)-146a and mir-155 in primary dermal fibroblasts across three TNFRSF1A mutations results in hyperresponsiveness to lipopolysaccharide. *Front Immunol.* 2018;9:173.
20. Kawana N, Yamamoto Y, Kino Y, Satoh J. Molecular network of NLRP3 inflammasome activation-responsive genes in a human monocyte cell line. *Austin J Clin Immunol* 2014;1(4):10.

21. Balow JE Jr, Ryan JG, Chae JJ, Booty MG, Bulua A, Stone D, ve ark. Microarray-based gene expression profiling in patients with cryopyrin-associated periodic syndromes defines a disease-related signature and IL-1-responsive transcripts. *Ann Rheum Dis*. 2013;72(6):1064-1070.
22. Boisson B, Laplantine E, Prando C, Giliani S, Israelsson E, Xu Z, ve ark. Immunodeficiency, autoinflammation and amylopectinosis in humans with inherited HOIL-1 and LUBAC deficiency. *Nat Immunol*. 2012;13(12):1178-1186.
23. Taubitz A, Schwarz M, Eltrich N, Lindenmeyer MT, Vielhauer V. Distinct contributions of TNF receptor 1 and 2 to TNF-induced glomerular inflammation in mice. *PLoS One*. 2013;8(7):e68167.
24. Tanaka T, Takahashi K, Yamane M, Tomida S, Nakamura S, Oshima K, ve ark. Induced pluripotent stem cells from CINCA syndrome patients as a model for dissecting somatic mosaicism and drug discovery. *Blood*. 2012;120(6):1299-1308.
25. Amarilyo G, Pillar N, Ben-Zvi I, Weissglas-Volkov, D., Zalcmán, J., Harel, L., ve ark. Analysis of microRNAs in familial Mediterranean fever. *PLoS One*. 2018;13(5):e0197829.
26. Arostegui JI, Anton J, Calvo I, Robles A et al. Open-Label, Phase II Study to Assess the Efficacy and Safety of Canakinumab Treatment in Active Hyperimmunoglobulinemia D With Periodic Fever Syndrome. *Arthritis Rheumatol* 2017 Aug;69(8):1679-1688. PMID: 28482144
27. Arostegui JI, Anton J, Calvo I, Robles, A., Iglesias, E., López-Montesinos, ve ark. Open-label, phase II study to assess the efficacy and safety of canakinumab treatment in active hyperimmunoglobulinemia d with periodic fever syndrome. *Arthritis Rheumatol*. 2017;69(8):1679-1688.
28. Garzon R, Marcucci G, Croce CM. Targeting microRNAs in cancer: rationale, strategies and challenges. *Nat Rev Drug Discov*. 2010;9(10):775-789.

29. Filipowicz W, Bhattacharyya SN, Sonenberg N. Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight?. *Nat Rev Genet.* 2008;9(2):102-114.
30. Valadi H, Ekström K, Bossios A, Sjöstrand M, Lee JJ, Lötvall JO. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat Cell Biol.* 2007;9(6):654-659.
31. Singh RP, Massachi I, Manickavel S, Singh S, Rao NP, Hasan S, ve ark. The role of miRNA in inflammation and autoimmunity. *Autoimmun Rev.* 2013;12(12):1160-1165.
32. Lindsay MA. microRNAs and the immune response. *Trends Immunol.* 2008;29(7):343-351.
33. Latsoudis H, Mashreghi MF, Grün JR, Chang HD, Stuhlmüller B, Repa A, ve ark. Differential expression of miR-4520a associated with pyrin mutations in familial Mediterranean fever (FMF). *J Cell Physiol.* 2017;232(6):1326-1336.
34. Koga T, Migita K, Sato T, Sato S, Umeda M, Nonaka F, ve ark. MicroRNA-204-3p inhibits lipopolysaccharide-induced cytokines in familial Mediterranean fever via the phosphoinositide 3-kinase γ pathway. *Rheumatology (Oxford).* 2018;57(4):718-726.
35. Wada T, Toma T, Matsuda Y, Yachie A, Itami S, Taguchi Y, ve ark. Microarray analysis of circulating microRNAs in familial Mediterranean fever. *Mod Rheumatol.* 2017;27(6):1040-1046.
36. Bauernfeind F, Rieger A, Schildberg FA, Knolle PA, Schmid-Burgk JL, Hornung V. NLRP3 inflammasome activity is negatively controlled by miR-223. *J Immunol.* 2012;189(8):4175-4181.
37. Aubert P, Suárez-Fariñas M, Mitsui H, Johnson-Huang LM, Harden JL, Pierson KC, ve ark Homeostatic tissue responses in skin biopsies from NOMID patients with constitutive overproduction of IL-1 β . *PLoS One.* 2012;7(11):e49408.
38. Lucherini OM, Obici L, Ferracin M, Fulci V, McDermott MF, Merlini G, et al. First report of circulating microRNAs in tumour necrosis factor receptor-associated periodic syndrome (TRAPS). *PLoS One.* 2013;8(9):e73443.

39. Borghini S, Ferrera D, Prigione I, Fiore M, Ferraris C, Mirisola V, et al. Gene expression profile in TNF receptor-associated periodic syndrome reveals constitutively enhanced pathways and new players in the underlying inflammation. *Clin Exp Rheumatol*. 2016;34(6 Suppl 102):S121-S128.
40. Akalin PK. Introduction to bioinformatics. *Mol Nutr Food Res*. 2006;50(7):610-619.
41. Özkan Y, Selçukcan Erol Ç. Biyoformatik DNA mikrodizi veri madenciliği. 1st ed. İstanbul: Papatya Yayıncılık Eğitim; 2015.
42. Barrett T, Wilhite SE, Ledoux P, Evangelista C, Kim IF, Tomashevsky M, ve ark. NCBI GEO: archive for functional genomics data sets--update. *Nucleic Acids Res*. 2013;41(Database issue):D991-D995.
43. Giorgi FM, Ceraolo C, Mercatelli D. The R language: an engine for bioinformatics and data science. *life (Basel)*. 2022;12(5):648.
44. Simon R, Lam A, Li MC, Ngan M, Menenzes S, Zhao Y. Analysis of gene expression data using BRB-ArrayTools. *Cancer Inform*. 2007;3:11-17.
45. Zhao Y, Simon R. BRB-ArrayTools Data Archive for human cancer gene expression: a unique and efficient data sharing resource. *Cancer Inform*. 2008;6:9-15.
46. BRB-Array Tools Version 4.5, User's Manual [Internet].2022 [Erişim Tarihi 1 Temmuz 2022]. Erişim adresi: https://brb.nci.nih.gov/new_updates/Manual_v4_5_0.pdf
47. Irizarry RA, Bolstad BM, Collin F, Cope LM, Hobbs B, Speed TP. Summaries of affymetrix genechip probe level data. *Nucleic Acids Res*. 2003;31(4):e15. doi:10.1093/nar/gng015
48. Ochs MF, Casagrande JT, Davuluri RV. Biomedical informatics for cancer research-MeV: MultiExperiment Viewer. New York: Springer; 2010.

49. Riffo-Campos ÁL, Riquelme I, Brebi-Mieville P. Tools for sequence-based miRNA target prediction: what to choose?. *Int J Mol Sci.* 2016;17(12):1987.
50. miRNA (microRNA) database and target prediction tool index [Internet]. 2022 [Erişim tarihi 20 Temmuz 2022]. Erişim Adresi: <https://www.abcam.com/kits/microrna-database-and-target-predictor-resources>
51. Lewis BP, Shih IH, Jones-Rhoades MW, Bartel DP, Burge CB. Prediction of mammalian microRNA targets. *Cell.* 2003;115(7):787-798.
52. Doncheva NT, Morris JH, Gorodkin J, Jensen LJ. Cytoscape stringapp: network analysis and visualization of proteomics data. *J Proteome Res.* 2019;18(2):623-632.
53. Brown LA, Williams J, Taylor L, Thomson RJ, Nolan PM, Foster RG, ve ark. Meta-analysis of transcriptomic datasets identifies genes enriched in the mammalian circadian pacemaker. *Nucleic Acids Res.* 2017;45(17):9860-9873.
54. Integrated analysis of miRNA and mRNA [Internet]. 2022 [Erişim Tarihi 20 Temmuz 2022]. Erişim Adresi: https://www.3d-gene.com/en/service/analysis/ana_004.html
55. Starting Point [Internet]. 2022 [Erişim Tarihi 22 Temmuz 2022]. Erişim Adresi: http://version10.string-db.org/help/getting_started/
56. Cantarini L, Vitale A, Sicignano LL, Emmi G, Verrecchia E, Patisso I, ve ark. Diagnostic criteria for adult-onset periodic fever, aphthous stomatitis, pharyngitis, and cervical adenitis (pfapa) syndrome. *Front Immunol.* 2017;8:1018.
57. Carapito R, Carapito C, Morlon A, Paul N, Vaca Jacome AS, Alsaleh G, ve ark. Multi-OMICS analyses unveil STAT1 as a potential modifier gene in mevalonate kinase deficiency. *Ann Rheum Dis.* 2018;77(11):1675-1687.
58. Wang T, Nowrangi D, Yu L, Lu T, Tang J, Han B, ve ark. Activation of dopamine D1 receptor decreased NLRP3-mediated inflammation in intracerebral hemorrhage mice. *J Neuroinflammation.* 2018;15(1):2.

59. Venkatesh D, Hernandez T, Rosetti F, Batal I, Cullere X, Lusinskas FW et al. Endothelial TNF receptor 2 induces IRF1 transcription factor-dependent interferon- β autocrine signaling to promote monocyte recruitment. *Immunity*. 2013;38(5):1025-1037.
60. Kim YK, Shin JS, Nahm MH. NOD-Like receptors in infection, immunity, and diseases. *Yonsei Med J*. 2016;57(1):5-14.
61. Teocchi MA, D'Souza-Li L. Apoptosis through Death Receptors in Temporal Lobe Epilepsy-Associated Hippocampal Sclerosis. *Mediators Inflamm*. 2016;2016:8290562.
62. Cudrici C, Deutch N, Aksentijevich I. Revisiting TNF Receptor-Associated Periodic Syndrome (TRAPS): Current Perspectives. *Int J Mol Sci*. 2020;21(9):3263.
63. Umasuthan N, Bathige SD, Noh JK, Lee J. Gene structure, molecular characterization and transcriptional expression of two p38 isoforms (MAPK11 and MAPK14) from rock bream (*Oplegnathus fasciatus*). *Fish Shellfish Immunol*. 2015;47(1):331-343.
64. Guo C, Gao YY, Ju QQ, Wang M, Zhang CX, Gong M, et al. MAPK14 over-expression is a transcriptomic feature of polycythemia vera and correlates with adverse clinical outcomes. *J Transl Med*. 2021;19(1):233.
65. Woetzel D, Huber R, Kupfer P, Pohlers D, Pfaff M, Driesch D, et al. Identification of rheumatoid arthritis and osteoarthritis patients by transcriptome-based rule set generation. *Arthritis Res Ther*. 2014;16(2):R84.
66. Adetula AA, Liu X, Tran Thi TN, Bhuiyan AA, Du X, Zhu M, et al. Transcriptional profiling of leucocyte count variation from porcine peripheral blood reveals differential gene expression. *Biomed Res Int*. 2018;2018:1496536.

8. EKLER

EK-1. Tez çalışması ile ilgili Etik Kurul İzni



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

Sayı : 10969557-506

Konu :

ARAŞTIRMA PROJESİ DEĞERLENDİRME RAPORU

Toplantı Tarihi : 02 MART 2021 SALI
Toplantı No : 2021/05
Proje No : GÖ 21/299 (Değerlendirme Tarihi: 02.03.2021)
Karar No : 2021/05-33

Üniversitemiz Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı öğretim üyelerinden Prof. Dr. Banu PEYNİRCİOĞLU'nun sorumlu araştırmacı olduğu, Arş. Gör. Tayfun Hilmi AKBAĞA ile birlikte çalışacakları ve Gizem USTABAŞ'ın yüksek lisans tezi olan, GÖ 21/299 kayıt numaralı, "*Otoinflamatuar Hastalıklarda Rolü Olan miRNA ve miRNA Moleküllerinin Meta-Analizi*" başlıklı proje önerisi araştırmanın gerekece, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş olup, 03 Mart 2021 -03 Mart 2022 tarihleri arasında gerçekleştirilmek 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 ERBAYDAR	(Üye)
2. Prof. Dr. G. Burça AYDIN	(Üye)	8. Doç. Dr. Betül Çelebi SALTIN	(Üye)
3. Prof. Dr. M. Özgür UYANIK	(Üye)	9. Doç. Dr. Haide Güneş DENİZ	(Üye)
4. Prof. Dr. Ayşe Kin İŞLER	(Üye)	10. Dr. Öğr. Üyesi Müge DEMİR İZİMLİ	(Üye)
5. Doç. Dr. H. Tuna Çak EŞER	(Üye)	11. Arş. Senap MİRALIOĞLU	(Üye)
6. Doç. Dr. Can Ebru KURT	(Üye)		

EK-2. Tez Orijinallik Ekran Görüntüsü

TEZİN TAM BAŞLIĞI: Otoinflamatuvar Hastalıklarda Rolü Olan mRNA ve miRNA Moleküllerinin Meta-analizi

ÖĞRENCİNİN ADI SOYADI: GİZEM USTABAŞ

DOSYANIN TOPLAM SAYFASI: 88

OTOİNFLAMATUVAR HASTALIKLARDA ROLÜ OLAN mRNA VE miRNA MOLEKÜLLERİNİN META-ANALİZİ

ORIGINALITY REPORT

10%

SIMILARITY INDEX

9%

INTERNET SOURCES

3%

PUBLICATIONS

3%

STUDENT PAPERS

PRIMARY SOURCES

1	www.openaccess.hacettepe.edu.tr:8080 Internet Source	2%
2	www.bezelyedergi.net Internet Source	2%
3	Submitted to Hacettepe University Student Paper	1%
4	openaccess.hacettepe.edu.tr:8080 Internet Source	1%
5	dergipark.org.tr Internet Source	<1%
6	www.krccp-ksn.org Internet Source	<1%
7	Nursel Dilek, Ümit Ukşal. "Dermatological Manifestations of Autoinflammatory Diseases in Children", Turkish Journal of Dermatology / Türk Dermatoloji Dergisi, 2014 Publication	<1%
8	docplayer.net Internet Source	<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: **Gizem Ustabas**
Assignment title: **gizem tez 2**
Submission title: **gizem tez**
File name: **Tez_Gizem_Ustabas_22.09.2022.pdf**
File size: **2.39M**
Page count: **88**
Word count: **14,328**
Character count: **95,765**
Submission date: **22-Sep-2022 04:48PM (UTC+0300)**
Submission ID: **1906195090**



9. ÖZGEÇMİŞ