



**T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**



YÜKSEK LİSANS TEZİ

PREEKLAMPTİK GEBELERİN MATERNAL PLAZMALARINDA DOLAŞAN MİKRORNA'LARIN KANTİTATİF ANALİZİ

Didem ALTINDİREK

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Moleküler Biyoloji ve Genetik Programı

**DANIŞMAN
Doç. Dr. Tuba GÜNEL**

Aralık, 2016

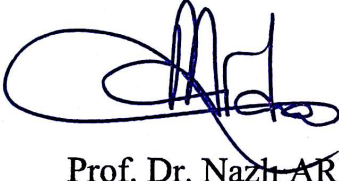
İSTANBUL

Bu çalışma 21.12.2016 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı Moleküler Biyoloji ve Genetik Programında Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Jürisi:

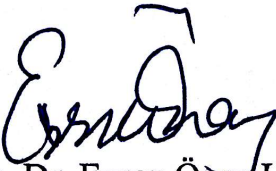
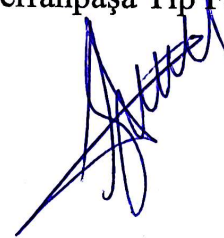


Doç. Dr. Tuba GÜNEL (Danışman)
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi



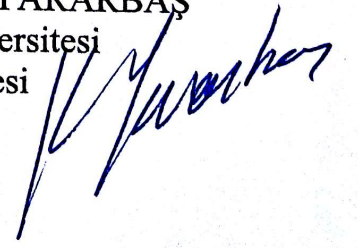
Prof. Dr. Nazlı ARDA
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi

Prof. Dr. Ali BENİAN
İstanbul Üniversitesi
Cerrahpaşa Tıp Fakültesi



Doç. Dr. Evren Öner UÇAR
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi

Yrd. Doç. Dr. Kanay YARARBAŞ
Acıbadem Üniversitesi
Tıp Fakültesi



20.04.2016 tarihli resmi gazetede yayımlanan Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin 9/2 ve 22/2 maddeleri gereğince; Bu Lisansüstü teze, İstanbul Üniversitesi'nin abonesi olduğu intihal yazılım programı kullanılarak Fen Bilimleri Enstitüsü'nün belirlemiş olduğu ölçütlere uygun rapor alınmıştır.

Bu çalışma İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yürütücü Sekreterliğinin 25666 numaralı ve TUBİTAK 114S038 numaralı projeleri ile desteklenmiştir.

ÖNSÖZ

Yüksek lisans eğitimim boyunca bilgi, birikim ve sabrını benden esirgemeyen danışman hocam sevgili Doç.Dr. Tuba GÜNEL'e,

Çalışma hayatım süresince bana sunduğu manevi ve motive edici desteğinden ötürü sevgili hocam Prof.Dr. Uğur ÖZBEK'e,

Hasta materyallerinin sağlanmasındaki emeklerinden dolayı Prof.Dr. Ali BENİAN'a,

Tez sürecim boyunca yardımını esirgemeyen, her umutsuzluğa düştüğümde beni motive eden sevgili Dr. Mohammad Kazem HOSSEINI'ye,

Deney sürecindeki yardımları için sevgili Uzm.Mol.Bio.Ece GÜMÜŞOĞLU ve Mol.Bio. İsmail DÖLEKÇAP'a,

Hem dostluğu hem bilimsel katkı ve yardımları için müteşekkir olduğum sevgili dostlarım Dr. Yücel ERBİLGİN ve Dr.Elif UĞUREL'e

Bu stresli süreçte beni varlıklarıyla ödüllendiren, her zorluk çektiğimde cesaretlendiren, anlayış ve neşeleriyle hep yanımda olan sevgili dostlarım Lab.Tek.Gizem HASANOĞULLARI, Dr.Dilek Sever KAYA ve Uzm.Bio.Esin SERBEST'e

Bu çalışmayı kendi teziymişçesine sahiplenerek, teknik tüm sıkıntılarımı çözen, vaktini ayıran sevgili Uzm.Bio.Ümit KINA'ya,

Tez yazma sürecinde beni geç saatlere kadar sabırla dinleyen, manevi desteğini hep yanımda hissettiğim sevgili Dr. Çağrı GÜLEÇ'e,

Benden maddi ve manevi desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen, sabır ve anlayışla hayat boyu yanımda olan, canım annem, babam ve kardeşime sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Aralık 2016

Didem ALTINDİREK

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ÖNSÖZ.....	i
İÇİNDEKİLER	ii
ŞEKİL LİSTESİ.....	v
TABLO LİSTESİ	viii
SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ	ix
ÖZET.....	xi
SUMMARY	xiii
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL KISIMLAR	3
2.1. HİPERTANSİF GEBELİKLER	3
2.1.1. Preeklampsia	4
2.1.1.1. Preeklampside Risk Faktörleri.....	5
2.1.1.2. Preeklampsia Patogenezi	5
2.2. EPİGENETİK DEĞİŞİKLİKLER VE PREEKLAMPSİ	8
2.3. KODLAMA YAPMAYAN RNA’LAR (“NON-CODING RNAS”).....	9
2.3.1. Küçük RNA’lar (“Small RNAs”)	10
2.4. MİKORNA’LAR	10
2.4.1. mikroRNA Biyogenezi	12
2.4.2. miRNA’ların Hedef mRNA’yı Tanıması.....	14
2.4.3. miRNA’ların Fonksiyonu	14
2.5. DOLAŞIMDA BULUNAN MİRNA’LAR (“CIRCULATING MIRNAS”)	15
2.5.1. Preeklampsia Hastalığında Dolaşımda Bulunan miRNA’lar.....	17
2.6. MİRNA VE HEDEF MRNA İLİŞKİSİNİ BELİRLEMeye YÖNELİK GELİŞTİRİLEN <i>IN SILICO</i> ARAÇLAR	18
2.7. HSA-MİR-1183	20
2.8. HSA-MİR-1183’ÜN ADAY HEDEF GENLERİ	21
2.9. GERÇEK ZAMANLI POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU (“RT-QPZR”)...22	
2.10. MİRNA VE HEDEF GENLER ARASINDAKİ KORELASYON İLİŞKİSİ.....22	
2.11. “ROC” EĞRİSİ ANALİZLERİ.....23	

3. MALZEME VE YÖNTEM	24
3.1.ÇALIŞMA GRUBU	24
3.2. KULLANILAN MALZEME VE KİTLER	24
3.3. KULLANILAN KİMYASALLAR	25
3.4. KULLANILAN CİHAZLAR	25
3.5. YÖNTEM	25
3.5.1. Maternal Plazma'dan Total RNA İzolasyonu	25
3.5.1.1. “Spike-in” sentetik RNA Kullanımı.....	25
3.5.1.2. mikroRNA Tayini için Maternal Plazmadan Total RNA İzolasyonu.....	26
3.5.1.3. mikroRNA ve RNA Örneklerinde Miktar ve Kalite Tayini	27
3.5.2. hsa-mir-1183 Ekspresyonunun Belirlenmesi	29
3.5.2.1. “Stem-loop” Ters Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu (“Stem-loop RT-PZR”)	29
3.5.2.2. Stem-loop RT ile cDNA Sentezi	30
3.5.2.3. Kantitatif Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Gerçek Zamanlı PZR)	32
3.5.2.4. Gerçek Zamanlı PZR Reaksiyonunun Hazırlanması.....	32
3.5.3. Hedef mRNA’ların Tespiti.....	33
3.5.3.1. Ağ Tabanlı Yöntemler ile “in silico” Hedef mRNA Tespiti	33
3.5.4. Hedef mRNA’ların Ekspresyonlarının Belirlenmesi	38
3.5.4.1. cDNA Sentezi.....	38
3.5.4.2. XRN2 ve CHURC1 Ekspresyonu için “RT-qPZR”	39
3.5.5. İstatiksel Analiz.....	42
4. BULGULAR	43
4.1. MİKORNA VE RNA ÖRNEKLERİNDE MİKTAR VE KALİTE TAYİNİ.....	43
4.2. HSA-MİR-1183 EKSPRESYONUNUN BELİRLENMESİ.....	44
4.3. HEDEF MRNA EKSPRESYONLARININ BELİRLENMESİ	46
4.3.1. Preeklampsi Hastalarında XRN2 (“5’-3’ exoribonuclease 2”) Ekspresyonu .	47
4.3.2. Preeklampsi Hastalarında CHURC1 (“Churchill domain containing 1”) Ekspresyonu	47
4.4. HEDEF MRNA’LAR VE HSA-MİR-1183 ARASINDAKİ KORELASYON İLİŞKİSİ	48
4.4.1. has-mir-1183 ve XRN2 Ekspresyonları Arasındaki Korelasyon.....	49
4.4.2. hsa-mir-1183 ve CHURC1 Ekspresyonları Arasındaki Korelasyon.....	49
4.5. “ROC” EĞRİSİ ANALİZLERİ.....	50
4.5.1. hsa-mir-1183 için “ROC” Analizi.....	50

4.5.2. <i>XRN2</i> Hedef Geninin “ROC” Analizi	51
4.5.3. <i>CHURC1</i> Hedef Geninin “ROC” Analizi	52
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	54
KAYNAKLAR	59
EKLER.....	70
EK 1.	70
EK 2.	71
ÖZGEÇMİŞ.....	75

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa No

Şekil 2.1: Preeklampside spiral arterlerin fizyolojik dönüşümünün yetersizliği (Moffett-King, 2002).	7
Şekil 2.2: Genomik yerleşimlerine göre miRNA'lar gen içi ("intragenic") ve gen arası ("intergenic") lokalize olabilir. Gen içi miRNA'lar intronik ve ekzonik olmak üzere iki türdür. miRNA'lar ev sahipliğinde oldukları genlerle ("host genes") genellikle aynı iplik ("strand") üzerinde yer alırlar (Hinske, 2009). ...	11
Şekil 2.3: miRNA biyogenezi ve işlenmesi (Winter ve diğ., 2009).	13
Şekil 2.4: A: miRNA molekülünün hedef mRNA'yı tanıması. B: Hedef mRNA'nın baskılanma mekanizmaları (Liu ve diğ., 2008).	14
Şekil 2.5: Dolaşımda bulunan miRNA'ların hücre dışı alanda birlikte yer aldığı yapılar gösterilmiştir (Turchinovich ve diğ., 2013).	16
Şekil 2.6: hsa-mir-1183'ün insan genomundaki lokalizasyonu.	20
Şekil 2.7: hsa-mir-1183'ün "host gene" i olan <i>SP4</i> geni.	20
Şekil 2.8: <i>XRN2</i> geninin insan genomundaki lokalizasyonu.	21
Şekil 2.9: <i>CHURC1</i> geninin insan genomundaki lokalizasyonu.	21
Şekil 2.10: Taqman® MGB probun yapısı.	22
Şekil 3.1: Biyoanalizör uygulamasının aşamaları.	27
Şekil 3.2: "Agilent Small RNA Chip" görüntüsü.	27
Şekil 3.3: Biyoanalizörde "ladder" ların elektroferogram ve jel görünümü.	28
Şekil 3.4: Küçük RNA ve mikroRNA'ların elektroferogram görüntüsü.	28
Şekil 3.5: "Stem-loop RT-PZR" yöntemi ile cDNA eldesi ve Gerçek Zamanlı PZR ile mikroRNA kantitasyonu (Varkonyi-Gasic ve diğ., 2007).	30
Şekil 3.6: hsa-mir-1183'ün hedeflediği <i>XRN2</i> mRNA'sının web görüntüsü (miRanda).	34
Şekil 3.7: hsa-mir-1183'ün hedeflediği <i>CHURC1</i> mRNA'sının web görüntüsü (miRanda).	34

Şekil 3.8: hsa-mir-1183'ün hedeflediği XRN2 mRNA'sının web görüntüsü (TargetScan).....	35
Şekil 3.9: hsa-mir-1183'ün hedeflediği XRN2 mRNA'sının web görüntüsü (miRDB).	35
Şekil 3.10: hsa-mir-1183'ün hedeflediği XRN2 mRNA'sının web görüntüsü (DIANA-microT-CDS).....	36
Şekil 3.11: hsa-mir-1183'ün hedeflediği XRN2 mRNA'sının web görüntüsü (PITA).	36
Şekil 3.12: hsa-mir-1183'ün hedeflediği CHURC1 mRNA'sının web görüntüsü (PITA).	37
Şekil 3.13: XRN2'nin 3'UTR bölgesi (kırmızı renkli) ve hsa-mir-1183 (yeşil renkli) oluşturabileceği dupeks modeli ve minimum serbest enerji (mfe) miktarı verilmiştir.	37
Şekil 3.14: CHURC1'in 3'UTR bölgesi (kırmızı renkli) ve hsa-mir-1183 (yeşil renkli) oluşturabileceği dupeks modeli ve minimum serbest enerji (mfe) miktarı verilmiştir.	38
Şekil 3.15: “UPL” problarda 9-mer'lik dizilerin görülme sıklığı.....	40
Şekil 3.16: XRN2 hedef transkriptine bağlanacak UPL Prob32 ve primer dizileri.	41
Şekil 3.17: CHURC1 hedef transkriptine bağlanacak UPL Prob80 ve primer dizileri.	41
Şekil 4.1: Bir hastaya ait mikroRNA örneğinin biyoanalizör cihazındaki ölçüm sonucu. Kullanılan çip örnek içinde bulunan tüm küçük RNA konsantrasyonunu ve mikroRNA'ların bu konsantrasyon içindeki yüzde değerini verir. (Bu örnekte tüm küçük RNA'lar içindeki mikroRNA oranı %64 ve konsantrasyonu 601.7 pg/µl'dir).	44
Şekil 4.2: hsa-mir-1183'ün RT-qPZR'deki termal profili ve Ct değerlerini gösteren amplifikasyon eğrisi.	45
Şekil 4.3: Preeklampsi hasta grubu ve kontrol örneklerindeki hsa-mir-1183'ün ekspresyon seviyeleri. ****p=<0.0001, “Mann-Whitney test”).....	46
Şekil 4.4: Preeklampsi hasta grubu ve kontrol örneklerindeki XRN2 geni ekspresyon seviyeleri (p= 0.4671, “Mann-Whitney test”).....	48
Şekil 4.5: Preeklampsi hasta grubu ve kontrol örneklerindeki CHURC1 geni ekspresyon seviyeleri. ****p=<0.0001, “Mann-Whitney test”).....	49
Şekil 4.6: Preeklampsi hastaları ve sağlıklı gebelerdeki XRN2 ve hsa-miR-1183 değerleri arasındaki korelasyon ilişkisi. (p=0.4949, “Pearson test”).....	50

Şekil 4.7: Preeklampsi hastaları ve sağlıklı gebelerdeki <i>CHURC1</i> ve hsa-miR-1183 ekspresyon değerleri arasındaki korelasyon ilişkisi (p=0,6092, “Pearson test”).	51
Şekil 4.8: hsa-mir-1183 için “ROC” analizi (%95 güven aralığında, p<0.0001).	51
Şekil 4.9: <i>XRN2</i> geni için “ROC” analizi (%95 güven aralığında, p=0.4514).	52
Şekil 4.10: <i>CHURC1</i> geni için “ROC” analizi (%95 güven aralığında, p=0.0002).	53
Şekil 4.11: hsa-mir-1183, <i>XRN2</i> ve <i>CHURC1</i> genleri için “ROC” analizi bir arada gösterilmiştir.	54

TABLO LİSTESİ

Sayfa No

Tablo 2.1: Gebelikteki hipertansif hastalıklar (Roberts ve Redman, 1993).....	4
Tablo 2.2: PE plasentalarında anlatımları farklılaşmış genler için “KEGG*” yolakları (Brew ve diğ., 2016).	7
Tablo 2.3: Küçük RNA’ların sınıflandırılması (Malone ve Hannon, 2009; Kim, 2005).	10
Tablo 2.4: hsa-mir-1183’ün miRBase veritabanındaki erişim ve dizi bilgisi.	20
Tablo 3.1: mikroRNA spesifik cDNA sentezinde kullanılan reaksiyon karışımı.	31
Tablo 3.2: cDNA PZR termal döngüsü.	31
Tablo 3.3: mikroRNA Gerçek Zamanlı PZR’de kullanılan reaksiyon karışımı.	32
Tablo 3.4: Gerçek Zamanlı PZR termal döngüsü.	32
Tablo 3.5: miRNA – hedef mRNA tahmininde kullanılan ağ tabanlı araçlar.	33
Tablo 3.6: cDNA reaksiyon karışımındaki bileşenler ve miktarları.	38
Tablo 3.7: cDNA PZR termal döngüsü.	39
Tablo 3.8: Gerçek Zamanlı PZR’de kullanılan reaksiyon karışımı.	41
Tablo 4.1: Preeklampsi ve kontrol plazma mikroRNA örneklerinin kalite ve kantite sonuçları.	43
Tablo 4.2: Maternal plazmada anlatımı anlamlı şekilde değişen hsa-mir-1183’ün RT-qPZR sonucu.	45
Tablo 4.3: Maternal plazmada anlatımı anlamlı şekilde değişen <i>CHURC1</i> ’in RT-qPZR sonucu.	48

SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ

Simgeler	Açıklama
----------	----------

dk	: dakika
µl	: mikrolitre
mM	: milimolar
sn	: saniye

Kısaltmalar	Açıklama
-------------	----------

3'UTR	: 3' transle edilmemiş bölge
AGO	: Argonat proteinleri
AGO2	: Argonaute 2
AUC	: Area Under Curve (Eğri Altında Kalan Alan)
BMP	: Bone Morphogenetic Protein
cDNA	: Komplementer DNA
CDS	: Coding DNA Sequence
cf-miRNA	: cell free mikroRNA
cf-RNA	: cell free RNA
CHURC1	: Churchill Domain Containing 1
CORIN	: corin, serin peptidase
CXCR4	: C-X-C Motif Chemokine Receptor 4
EGF	: Epidermal Growth Factor
EGFR	: Epidermal Growth Factor Receptor
FGF	: Fibroblast Growth Factor
hsa	: <i>homo sapiens</i>
KD	: Kat Değişimi
miRNA	: MikroRNA
MFE	: Minimum Free Energy
MGB	: Minor Groove Binder
MRE	: miRNA Response Elements
mRNA	: Messenger RNA

NFQ	: Nonfluorescent quencher (Floresan işaretli olmayan susturucu)
PE	: Preeklampsi
PBMC	: Peripheral Blood Mononuclear Cell
RISC	: RNA Induced Silencing Complex
RNA	: Ribonükleik asit
ROC	: Receiver Operating Characteristic (İşlem Karakteristik Eğrisi)
XRN2	: 5'-3' exoribonuclease 2

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

PREEKLAMPTİK GEBELERİN MATERNAL PLAZMALARINDA

DOLAŞAN MİKRORNA'LARIN KANTİTATİF ANALİZİ

Didem ALTINDİREK

İstanbul Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Danışman : Doç. Dr. Tuba GÜNEL

Preeklamps (PE), dünyadaki gebeliklerin %2-8'ini etkileyen, maternal ve fetal mortalite ve morbiditeye yol açan ciddi bir gebelik dönemi hastalığıdır. Doğumun indüklenmesi tek çözüm yoludur. Obstetrikteki en önemli hedeflerden biri, PE riski artmış olan hastaları tanımlayabilmektir. Günümüzde, hastalığın teşhisi için serumda belirli protein belirteçleri kullanılmaktadır fakat bunlar etkili ayırım gücünden yoksundur.

MikroRNA'lar insan genomundaki ekspresyonun yaklaşık %30'unu regüle etmekte ve tüm temel hücresel süreçlerde yer almaktadır. Maternal plazmada dolaşımda bulunan miRNA ve RNA'lar (cell-free miRNA, cell-free RNA) geçtiğimiz on yıllarda tanımlanmış ve bu moleküllerin hücre sıvısında RNazlardan kaçarak stabilitesini koruduğu gösterilmiştir. Bu serbest moleküller plasentanın trofoblastlarından kökenlenir ve maternal dolaşıma katılırlar. Gebeliklerde potansiyel non-invaziv biyobelirteçler olarak değerlendirilmektedirler.

Grubumuzun PE hastalarında yaptığı mikrodizin çalışmasında, hsa-mir-1183 anlatımı değişiklik gösteren miRNA'lar içinde yer almıştır. Bu çalışmada, PE hastaları ve sağlıklı gebelerde maternal plazmada bulunan hsa-mir-1183 ekspresyonunun incelenmesi, bu molekülün aday hedef genlerinin *in silico* araçlar ile belirlenerek ekspresyonlarının araştırılması amaçlanmıştır. Hsa-mir-1183 ve aday hedef genlerin ekspresyonu 31'i PE 25'i sağlıklı gebe olmak üzere toplam 56 gönüllü gebenin plazma örneğinde RT-qPCR metoduyla incelenmiştir. Sentetik *cel-mir-39* molekülü normalizasyon için kullanılmıştır.

Hsa-mir-1183 ekspresyonu, PE hastalarında sağlıklı gebelere kıyasla anlamlı derecede artmıştır ($p=0.0068$). Aday hedef genler olarak seçilen *XRN2* ve *CHURC1*'in ekspresyon profilleri incelenmiş; *XRN2* ekspresyonunun anlamlı bir değişiklik göstermediği fakat *CHURC1*'in PE hastalarında sağlıklı gebelere kıyasla anlamlı derecede azalmış ekspresyonu gösterilmiştir ($p<0.0001$). hsa-mir-1183 ve *CHURC1* arasındaki ters korelasyon ilişkisi, bu mikroRNA'nın *CHURC1* gen ifadesini regüle ettiği fikrini doğurmuştur.

Bu çalışma ile ilk kez, maternal plazmada serbest halde bulunan *CHURC1*'in preeklampsisi hastalığının patogeneğinde görev aldığı ve hsa-mir-1183'ün *CHURC1* üzerinden fonksiyon göstererek hastalığın patogeneğinde rol oynayabileceği gösterilmiştir. İleriki çalışmalarda, bu miRNA-mRNA etkileşimini fonksiyonel çalışmalarla doğrulanması ve daha geniş hasta kohortlarında bu biyobelirteçlerin test edilmesi gerekmektedir.

Aralık 2016, 90 sayfa.

Anahtar kelimeler: preeklampsisi, maternal plazma, miR-1183, *CHURC1*, biyobelirteç

SUMMARY

M.Sc. THESIS

QUANTITATIVE ANALYSIS OF CIRCULATING MICRORNAS IN MATERNAL PLASMA OF PREECLAMPTIC PREGNANTS

Didem ALTINDIREK

İstanbul University

Institute of Graduate Studies in Science and Engineering

Department of Molecular Biology and Genetics

Supervisor : Assoc. Prof. Dr. Tuba GUNEL

Preeclampsia (PE) is a serious pregnancy disorder affects 2-8% pregnancies worldwide and leads to maternal and fetal mortality and morbidity. The only solution is the termination of the pregnancy. Identification of patients with an increased risk for PE is one of the most important goals in obstetrics. Currently, testing for this disorder includes protein markers in serum but they are lack of sufficient discrimination.

MicroRNAs regulate the expression of nearly 30% of all the human genes and participate in all fundamental cell processes. Circulating RNA and microRNAs (cff-RNA, cff-miRNA) were reported in recent decades in maternal plasma of pregnant women and they could be stabilized through its protection from degradation in plasma. They are originated from trophoblasts of placenta and released into maternal circulation. They are considered as potential noninvasive biomarkers in pregnancies.

According to our previous microarray study; hsa-mir-1183 was in some of differentially expressed microRNAs in preeclamptic pregnancies. This project's aim is to identify expression profile of hsa-mir-1183 and investigate its candidate target genes by *in silico* target identification tools and profiled these target genes expressions in maternal plasma. We measured expression levels of hsa-mir-1183 and its candidate target genes in 56 samples collected from 31 PE and 25 normal-term cases by RT-qPCR. Spike-in *cel-mir-*

39 was used for normalization. The relative expression of hsa-mir-1183 was significantly increased in patients compare to healthy pregnancies ($p=0.0068$). Expression levels of *XRN2* and *CHURC1*, which were selected as target genes of our microRNA, were measured. *XRN2* expression did not change significantly but *CHURC1* expression was dramatically decreased in PE samples compare to healthy pregnancies ($p<0.0001$). An inverse correlation between hsa-mir-1183 and *CHURC1* expression was shown that our miRNA might regulate *CHURC1* expression.

In this study, for the first time it is shown that circulating *CHURC1* can ben involved in preeclampsia pathogenesis and circulating hsa-mir-1183 could contribute to disease pathology functioning through regulating *CHURC1*. Future studies need to confirm this miRNA-mRNA relation via functional studies and these biomarkers need to be tested in larger cohorts.

December 2016, 90 pages.

Keywords: preeclampsia, maternal plasma, mir-1183, *CHURC1*, biomarker

1. GİRİŞ

Gebelik, anne ve fetus arasındaki etkileşimlerin anatomik ve fizyolojik düzeylerde gerçekleştiği karmaşık bir süreçtir. Fetusun sağlıklı gelişebilmesi için tam ve doğru bir plasental gelişim gereklidir. Plasental gelişimin sağlıklı olabilmesi için doğru ve eş zamanlı şekilde hücre proliferasyonunun, hücre farklılaşmasının ve invazyonunun gerçekleşmesi gereklidir.

Gebelik süresince gelişen hipertansif hastalıklar tüm gebelik dönemi hastalıklarının %6-8'ini oluşturur (Report of the National High Blood Pressure Education Program, 2000). Preeklampsi (PE) de bu hipertansif hastalıklar içinde yer alan, hem anne hem fetus için öldürücü ve/veya hasar bırakıcı etkileri olan gebeliğe özgü bir komplikasyondur. Preeklampsi, gebeliğin başlangıcında kan basıncı normal olan bir kadında 20. gebelik haftasından sonra 6 saat arayla en az iki ölçümde 140 mmHg veya daha yüksek sistolik kan basıncı ve 90 mmHg veya daha yüksek diastolik kan basıncı varlığı ve kan basıncı yüksekliğine eşlik eden proteinüri şeklinde tanımlanır. (Report of the National High Blood Pressure Education Program, 2000). Fetusta ise intrauterin gelişme geriliği ve amniyotik sıvıda azalma gözlemlenir (Sibai ve diğ., 2005).

Preeklampsinin patogenezi birçok metabolik ve hücrel değişikliğı içerir. Bunlar arasında; plasental iskemi, endotelial fonksiyon bozukluğu, değişmiş nitrik oksit ve yağ metabolizması bozuklukları, lökosit aktivasyonu ve insülin direncini de içeren değişiklikler ve generalize vazospazm gösterilmiştir (Sibai, 2003).

Gelişmiş ülkelerde preeklampsi halen en önemli maternal mortalite ve morbidite nedenidir. Yüksek mortalite ve morbiditesine rağmen preeklampsi gelişimini öngörebilecek güvenilir bir tarama testi yoktur. Preeklampsi tanısı koymaya yardımcı olmak üzere araştırmalar, hastalığın patogenezinde rol oynayan aday genleri bulma, metilasyon profillerini çıkarma ve genom boyu assosiasyon çalışmalarıyla hastalıkla ilişkili olduğu düşünülen SNP (tek nükleotit varyasyonları) keşfi üzerine yoğunlaşmıştır (Papazoglou ve diğ., 2004; Maruyama ve diğ., 2004; Mutze ve diğ., 2008; Medica ve diğ., 2007; van Dijk ve diğ., 2005).

Yapılan genetik çalışmaların yanında, epigenetik değişimler içinde yer alan mikroRNA'ların, transkriptomun büyük bir kısmını regüle edici fonksiyon gösterdiği açıklanmıştır. İnsanda 2000'in üzerinde olgun mikroRNA tanımlanmış ve bu küçük, 20-25 nükleotitten oluşan RNA dizilerinin gelişimden farklılaşmaya, sinyal iletiminden kanser oluşumuna kadar birçok biyolojik olayda görev aldığı gösterilmiştir (Neilson ve diğ., 2007; Li ve Kowdley, 2012). Plasenta gelişiminde ve gebeliğe özgü bazı hastalıklarda ekspresyon düzeyleri, metilasyon profilleri, SNP içeriği gibi birçok genetik farklılık gösteren mikroRNA ekspresyonlarının bulunduğu çalışmalar mevcuttur (Zhao ve diğ., 2013).

Geçtiğimiz on yılda yapılan birçok klinik, biyokimyasal ve genetik çalışmaya rağmen preeklampsinin etyopatogenezi tam olarak aydınlığa kavuşturulamamıştır. Bu yüzden preeklampsinin etkin bir tedavisi yoktur ve doğumun indüklenmesi tek tedavi yöntemidir.

Bu tez çalışmasında, preeklampsisi hastalığının gelişmesinde etkinliği olduğu düşünülen mikroRNA ve aday hedef genleri mercek altına alınmıştır. Günel ve diğ. tarafından preeklampsisi hastalığının mikroRNA profillendirmesinin yapıldığı mikrodizin çalışmasında kontrol grubuna kıyasla yüksek ekspresyonu olduğu gösterilen hsa-mir-1183 ve aday hedef genleri ile preeklampsisi hastalığı arasındaki ilişki incelenmiştir. hsa-mir-1183'ün ekspresyon profili hasta ve kontrol örneklem grubunda Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) yöntemiyle tespit edilmiştir. Çalışmanın ilerleyen aşamasında, hsa-mir-1183'ün hedef genleri arasında olduğu düşünülen, ağ tabanlı metotlarla analizleri yapılan iki aday gen seçilmiş (*XRN2* ve *CHURC1*) tir. Bu genler, *XRN2* ("5'-3' exoribonuclease 2") (HGNC:12836) ve *CHURC1* ("Churchill domain containing 1") (HGNC:20099) dir. Bu genlerin hem preeklampstik hem sağlıklı gebelerde ekspresyon düzeyleri belirlenerek hedef genlerdeki ekspresyon düzeylerinin hsa-mir-1183 ekspresyonuyla olan korelasyonları incelenmiştir.

Bu tez çalışması, gebelik dönemi açısından oldukça büyük bir risk faktörü olan preeklampsisi hastalığının tanı ve tedavisine yönelik geliştirilecek non-invaziv yöntemlere bir basamak oluşturmaları açısından önemlidir. Hastalığa özgü aday biyobelirteç olarak analizleri yapılan mikroRNA ve aday genlerin, ileride yapılacak bilimsel çalışmalarla desteklenmesi, hastalığın moleküler mekanizmasını açıklama ve tanısını koymaya bizleri bir adım daha yaklaştıracaktır.

2. GENEL KISIMLAR

2.1. HİPERTANSİF GEBELİKLER

Hipertansiyon, gebelik sürecinde görülen en yaygın hastalıktır. Tüm gebeliklerin yaklaşık %10'unda hipertansif hastalıklar gözlemlenir (Duley, 2009). Bu süreçte hipertansiyon tanısı alan gebelerin yaklaşık %70'i ilerleyen süreçte gestasyonel (geçici) hipertansiyon ya da preeklampsi hastalığı ile karşılaşmaktadır.

2006 yılında Dünya Sağlık Örgütü verilerine dayandırılarak yapılan çalışmada, dünya genelindeki anne ölümlerinin sebep ve sıklığı gösterilmiş, anne ölüm nedenleriyle bölgeler arası farklılıklar kıyaslanmıştır. Çalışmada ülkeler, Afrika, Asya, Latin Amerika ve Karayipler ve Gelişmiş ülkeler (Avrupa, Kuzey Amerika, Avustralya, Japonya, Yeni Zelanda) olmak üzere 5 gruba ayrılmıştır. Çalışmanın sonuçlarına göre; kanama, Afrika ve Asya kıtasındaki anne ölümlerinin en sık nedenidir (sırasıyla %33,9 ve %30,8). Sepsis bu iki kıtada anne ölüm nedenleri arasında 2. sırayı almaktadır (sırasıyla %16,7 ve %12,5). Hipertansif hastalıklar, Latin Amerika ve Karayipler'de anne ölüm nedenleri arasında ilk sıraya yerleşmektedir (%25,7). Latin Amerika kıtasında ilginç olan bir nokta, kürtaj nedenli anne ölümlerinin diğer tüm gruplardan daha yüksek oranda görülmesidir (%12). Gelişmiş ülkelerde ise anne ölümlerinin ilk nedeni anestezi ya da sezeryan sonrası komplikasyonlar gibi diğer direkt etkiler alırken (%21,3), hipertansif hastalıklar sebepli ölümler %16,1'lik oranıyla ikinci sırada yer almaktadır (Khan ve diğ., 2006).

Dünya ortalamasına baktığımızda ise anne ölümlerinin %16 sı hipertansif gebelikler nedeniyle gerçekleşmekte, kanama ve enfeksiyondan sonra hipertansif sebepli ölümler anne ve bebek ölümlerinde üçüncü sırada gelmektedir (WHO, 2005).

Gebelikteki hipertansif hastalıklar yaygın olarak 3 ana grup içerisinde incelenir. Bu hastalıklar **Tablo 2.1.**'de gösterilmiştir.

Tablo 2.1: Gebelikteki hipertansif hastalıklar (Roberts ve Redman, 1993).

Kronik hipertansiyon	gebelik öncesi dönemde de hipertansiyonu olduğu bilinmesi ya da gebeliğin 20.haftasından önce kan basıncının 140/90 mm Hg den büyük olması
Preeklampsi/eklampsi	- gebeliğin 20.haftasından sonra kan basıncının 140/90mm Hg den büyük olması -proteinuri (>3 gr/günde) - ödem
Gestasyonel hipertansiyon	gebeliğin 20.haftasından sonra preeklampsi bulgularının proteinuri olmaksızın görülmesi

2.1.1. Preeklampsi

Gebelik sürecinde intrauterin ortamın anahtar düzenleyici organı plasentadır. Placenta, metabolik, immün ve endokrin organ olarak işlev görür. Anne ve fetus arasındaki gaz, besin, hormon, immunoglobulin ve atık ürünlerin taşınmasına olanak verir ve bu gelişimsel homeostazinin düzenlenmesini sağlar (Carter, 2012). Preeklampsi, gebeliğe özgü ve plasental kaynaklı bir hastalıktır. Bundan 30 yıl öncesine kadar hastalığın sporadik olduğu düşünülüyordu fakat sonraki yıllarda, hastalığın temelini ve oluşma mekanizmasını açıklamaya çalışan birçok çalışmada, oksidatif stres, inflamasyon, immünolojik maladaptasyon ve birçok genetik faktörün preeklampsi oluşturma etkisine sahip olduğu gösterildi (Lindheimer ve Umans, 2006).

Preeklampsi, öncesinde normotansif olan gebede, gebelik döneminin 20. haftasından sonra başlayan hipertansiyon, proteinuri ve ödemi ifade eder. Tüm dünyadaki gebeliklerin %2-8'ini etkilemektedir (Duley, 2009). Yaygın endotelial hasar ve vazospazm ile karakterizedir.

2.1.1.1. Preeklampside Risk Faktörleri

Preeklampsiyi oluşturan risk faktörleri arasında; hiç çocuk doğurmamış olma, çoklu gebelik, maternal yaşı <20 veya >35 olması, kronik hipertansiyon, önceki gebeliklerde preeklampsii öyküsünün bulunması, düşük sosyo-ekonomik düzey, diyabet ve genetik faktörler gösterilebilir (Duckitt ve Harrington, 2005). Hem maternal karakteristiklerin hem de önceki aile/kişisel öyküsünün dikkate alınarak, preeklampsii gelişimini tahmin etmeye odaklanan çalışmalar en iyi %37 oranında başarı sağlamakta, bu testlerin yanlış pozitiflik oranı da %5-10 arasında değişmektedir (Poon ve diğ., 2010; North ve diğ., 2011).

Gebeliğinde preeklampsii gelişimi gözlenen bir anne ileriki yaşamında başka birçok hastalık için de risk grubunda yer alır. Özellikler, maternal endotelyal hasar sonrasında da yıllarca devam edebilir ve preeklampsiden etkilenen kadınlar kardiyovasküler rahatsızlıklar için risk grubunda yer alabilir (Mutter ve Karumanchi, 2008). Chambers ve diğ. tarafından yapılan çalışmada, daha önce preeklampsii öyküsü bulunan kadınların brakial arter reaktivitesi üzerine yapılan Doppler incelemesinde, gebelikten 3 yıl sonra, anormal arteriyel genişleme gözlemlenmiştir (Chambers ve diğ., 2001).

Preeklampsii gelişiminin risk faktörleri arasında ailesel yatkınlık olduğunu gösteren birçok çalışma da yapılmıştır. Bu çalışmalar Amerika, İskoçya, İzlanda ve Avustralya'da yapılmış ve gebelik döneminde preeklampsii gelişen kadınların birinci derece akrabalarında 2 ila 5 kat preeklampsii gelişme riski olduğunu göstermiştir (Sutherland ve diğ., 1981; Arngimsson ve diğ., 1990; Cincotta ve Brennecke, 1998).

2.1.1.2. Preeklampsii Patogenezi

Preeklampsinin tek ve kesin tedavisinin doğumun indüklenerek plasentanın çıkarılması olması ve molar gebeliklerde fetal doku olmamasına rağmen sıklıkla preeklampsii öyküsünün bulunması nedeniyle, plaseenta dokusunun preeklampsii patogeneziinde anahtar rol oynadığı kabul edilmektedir (Mutter ve Karumanchi, 2008).

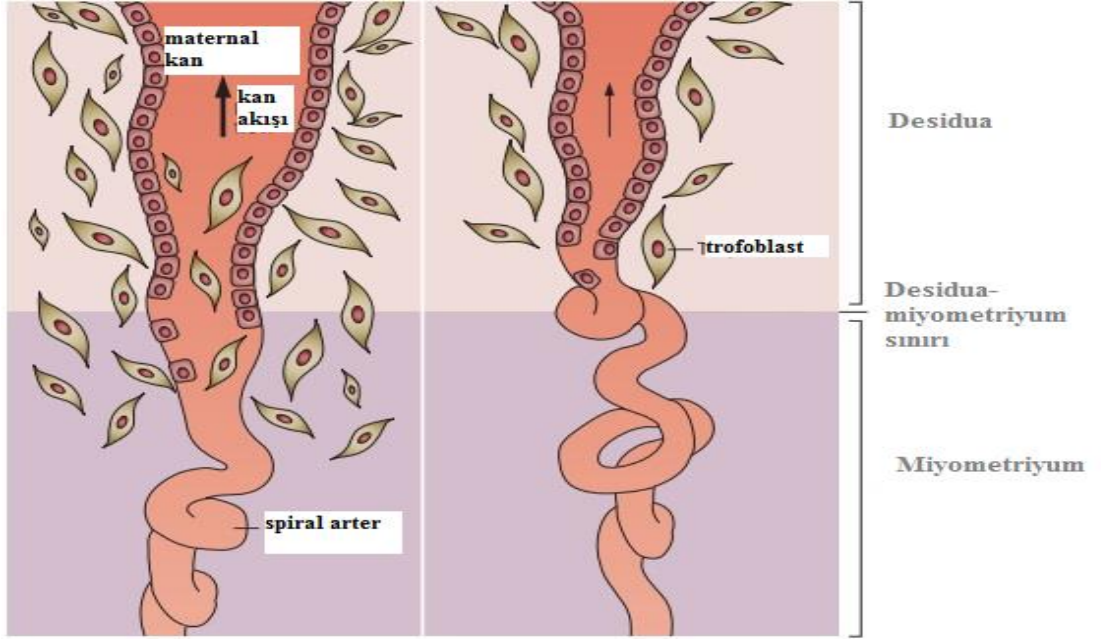
1972 yılında Brosens ve diğ., intrauterin gelişme geriliği (IUGR) ve preeklampsia hastalarının plasenta örneklerinde, azalmış trofoblast invazyonu ve uteroplazental damarlarda gebeliğe özgü değişiklik olmadığını gözlemlemiştir (Brosens ve diğ., 1972). O günden bu yana endovasküler trofoblast invazyonu plasental / gebeliğe özgü hastalıkların çalışılmasında odak noktasını oluşturmaktadır. Kabul edilen hipoteze göre, preeklampsinin gelişimi 2 evreye ayrılmaktadır. İlk evre zayıf plasantasyon, ikinci evre ise maternal semptomların ortaya çıkmaya başlaması ile karakterizedir (Roberts ve Hubel, 2009).

İmplantasyon ve onu takip eden trofoblast invazyonu sırasında, fetal trofoblast hücreleri ve maternal uterin dokuları (endometriyum ve miyometriyum) birbirleriyle çok yakın bir ilişki içine girerler. Bu sayede oluşan bölge “maternofetal junctional zone” olarak adlandırılır ve burada plasentaya yapışan parçalar intervilloz boşluğun tabanını oluşturan bazal plaka (“basal plate”) adını alır. Diğer parçalar ise uterin duvarına yapışıktır ve plasental yatak (“placental bed”) denilen yapıyı oluşturur. Normal gestasyon sürecinde trofoblastik invazyon görülürken preeklampside bu durum yetersizdir (Kaufmann ve diğ., 2003).

Preeklampsia gözlenen plasentalardaki ortak özellik plasentanın yetersiz perfüzyonudur. Bu azalmış perfüzyonun nedeni, başarısız vasküler yeniden şekillenmedir (“failed vascular remodeling”). Gebelik öncesi spiral arterler küçük ebatta iken normal gebelik süresince yeniden şekillenme (“remodeling”) sonucu belirgin bir hal alarak genişlerler. Normal gebeliğin 16.haftasından itibaren spiral arterlerin çapı 4-6 kat artar ve arterlerdeki akım direnci azaltılarak anne-fetus arasındaki besin, gaz alışverişi sağlanır. Gözlemlenen bu spiral arter yeniden şekillenmesi preeklampside meydana gelmez. Preeklampside yüzeysel bir yeniden şekillenme vardır, spiral arterlerin kalınlığı normal gebeliklere kıyasla %40 oranında daha düşüktür (**Şekil 2.1**). Dolayısıyla bu durum, plasental iskemi ve yetersiz plasantasyona yol açar (Wilson ve diğ., 2003; Pijnenborg ve diğ., 2006).

Plasentadaki bu değişimler plasental kan dolaşımını azaltarak salınan biyokimyasal moleküllerin artışına, bu durum da endotel hücre hasarına neden olur (Poston, 2006). Ayrıca spiral arterlerin şekillenmesindeki problemler nedeniyle ortaya çıkan hipoksi, plasentada oksidatif stresin oluşmasına, sitokin ve büyüme faktörleri salınımında bozukluğa yol açar. Serbest radikaller de trofoblast hücrelerinde artan apoptoza neden

olur. Trofoblastlarda meydana gelen apoptoz maternal dolaşıma mikro ve nanopartiküllerin salınımı ile sonuçlanır (Huppertz ve diğ., 2006).



Şekil 2.1: Preeklampside spiral arterlerin fizyolojik dönüşümünün yetersizliği (Moffett-King, 2002).

Brew ve diğ. tarafından 2016 yılında preeklampsisi hasta ve kontrol gruplarında gen ekspresyonlarının incelendiği bir meta-analiz çalışması yapılmıştır. Bu çalışmada 12 mikrodizin veri setinden elde edilen toplam 167 plasenta örneğindeki farklılaşmış gen ekspresyon profilleri incelenmiş ve bu genlerin yolak analizleri yapılmıştır. 88 gende farklılaşmış ekspresyon profili tespit edilmiş ve bu genlerin yolak analizleri sonucunda PE’de en çok etkilenen yolaklardan bir kısmı **Tablo 2.2**’de gösterilmiştir (Brew ve diğ., 2016).

Tablo 2.2: PE plasentalarında anlatımları farklılaşmış genler için “KEGG” yolakları (Brew ve diğ., 2016).

Yolak Adı	
Wnt sinyal yolağı	T hücre reseptör sinyal yolağı
Melanoma	ErbB sinyal yolağı
TGF- β sinyal yolağı	Apoptoz
PPAR sinyal yolağı	Primer immun yetersizlik
Hedgehog sinyal yolağı	VEGF sinyal yolağı
RNA degradasyonu	Ökaryotlarda ribosom sentezi

*KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes

2.2. EPİGENETİK DEĞİŞİKLİKLER ve PREEKLAMPSİ

Epigenetik terimi ilk kez 1942 yılında Waddington tarafından her hücrede aynı DNA koduna sahip olmamıza rağmen, beyin ve pankreasta ifade edilen proteinlerin farklılık gösterdiğini açıklamak için kullanılmıştır. Epigenetik kelimesi, “epi” ön ekiyle sağlanan, “genetiğin yanı sıra” anlamına gelmektedir. Waddington’a göre, gelişim esnasında DNA dizisinden farklı olan mekanizmalar bu değişikliği sağlamada görev almaktadır. Fakat sonraki yıllarda yapılan çalışmalar, bu değişikliklerin sadece gelişim esnasında olmadığı, erişkin yaşamda da sürekli genom içi epigenetik düzenlenmelerin devam ettiğini göstermiştir (Kouzarides, 2007).

Epigenetik düzenlenmeler oldukça dengelidir, kalıtlılabilir ve bu dengeli özelliğine rağmen geri çevrilebilir özellik gösterir. Yani çevresel koşulların değişmesi ya da ilaç, spor, sigara gibi dış müdahalelerle gen ekspresyonunun kontrol edilmesi mümkündür. Ayrıca bu özellikler kalıtım yoluyla sonraki nesillere aktarılabilir (Delcuve ve diğ., 2009).

Birçok hastalık epigenetik düzenlenmedeki farklılıklarla ilişkilendirilmiştir. Frajil X sendromu, X kromozomunda bulunan *FMR1* genindeki CGG üçlü tekrar bölgelerinin uzaması ve hipermetilasyonu ile karakterizedir. Prader-Willi ve Angelman sendromları ise anormal “imprinting” ile ilişkilidir (Robertson, 2005). Diğer hastalıklarda, örneğin tip2 diyabet ya da kardiyovasküler hastalıklar gibi, erken dönemde fetusun uterin ya mikroçevresinden epigenetik bilgisini aldığı, kötü beslenme, sigara kullanımı, ya da yüksek sodyum içerikli beslenme gibi faktörler sonucunda, hastalığın epigenetik özelliklerini içermesine rağmen sonraki dönemlerde hastalıklar görünür hale gelebilir (Tremblay ve Hamet, 2008). Epigenetik düzenlenmeler ayrıca şizofreni, bağımlılık ve depresyon gibi birçok psikiyatrik hastalıkta da tanımlanmıştır (Tsankova ve diğ., 2007).

Preeklampsinin araştırma konularından birini de hastalığın epigenetik temeli oluşturur. Genom dizisinde herhangi bir değişikliğe yol açmayan fakat önemli patofizyolojik olayları tetikleyen bu değişiklikler gebelik sürecinde olan birçok hasta gebede çalışılmıştır (van Dijk ve diğ., 2010; Macura ve Sliwa, 2015; Ye ve diğ., 2016).

Epigenetik bir diğer düzenlenme de “genomik imprinting”dir. Genomda birçok korunmuş bölgede genler “imprint” yani “damgalı” olarak kalıtılır. Bu durumda bahsi geçen gen, ya

anne ya da babadan gelen tek bir alellin ekspresyon göstermesi şeklinde bulunur. Preeklampside “genomik imprinting” ile ilişkili genler kimi çalışmalarda gösterilmiş ve fare plasentalarında fonksiyonel çalışmaları yapılmıştır (Hatada ve Mukai, 1995; Yu ve diğ., 2009).

Epigenetik modifikasyonlar içerisinde DNA metilasyonu ve histon modifikasyonları önemli yer tutar. Bu değişiklikler, epigenetik mekanizmaların “doğrudan” gen ifadesini kontrol eden mekanizmaları olarak bilinir. “dolaylı” yoldan gen ifadesini kontrol eden mekanizmalarda ise kodlama yapmayan RNA’lar özellikle miRNA’lar, siRNA’lar önemli yer tutar.

2.3. KODLAMA YAPMAYAN RNA’LAR (“NON-CODING RNAs”)

Bir organizmadaki her hücre tamamen aynı genetik koda sahip olmasına rağmen doku ve organ farklılaşmaları gerçekleşmektedir. Bu farklılaşmanın nedeni sahip olunan genlerin her hücre ve dokuda farklı ekspresyon göstermeleridir. Ökaryotik organizmalardaki birçok gen baskılanmış ya da susturulmuştur, bazı durumlarda ise genlerin mRNA moleküllerine transkripsiyonu olur fakat protein sentezi için gerekli translasyon işlemi gerçekleşmez. İnsan genomunun önemli bir bölümü RNA’ya çevrilmesine rağmen sadece % 2-3’ü protein kodlayan gen dizilerinden oluşur. Hücrede proteine çevrilmeyen RNA molekülleri, “kodlanmayan RNA’lar” (“non-coding RNAs”, ncRNA’lar) olarak adlandırılır (Mattick ve Makunin, 2006).

Kodlama yapmayan RNA molekülleri genel olarak üç grupta toplanır. Birinci grup, yaşamsal (“housekeeping”) RNA’lar adını verdiğimiz ve hücrede protein sentezi başta olmak üzere birçok metabolik süreçte yer alan ribozomal ve taşıyıcı RNA’lardır. İkinci grup, uzun kodlanmayan RNA’lar (“lncRNA”) olarak isimlendirilen ve çok yakın zamanda sayılarının binlerce olduğu saptanan moleküllerdir. Üçüncü grup ise, geçtiğimiz 20 yılda keşfedilen ve protein kodlayan genleri düzenleyen mikroRNA’lar olarak adlandırılan küçük ((Li ve Kowdley, 2012; Zhao ve diğ., 2013) RNA molekülleridir (Mattick, 2009).

2.3.1. Küçük RNA'lar ("Small RNAs")

Ökaryotik gen ekspresyonunu düzenleyici olan post-transkripsiyonel (transkripsiyon sonrası) aşamada küçük RNA'lar da görev alır. Birçok küçük, kodlama yapmayan fakat genomda farklı düzenlemelerde görev aldığı ortaya çıkan RNA grubu vardır. Bu gruplar **Tablo 2.3**'de özetlenmiştir.

Tablo 2.3: Küçük RNA'ların sınıflandırılması (Malone ve Hannon, 2009; Kim, 2005).

Sınıf	Uzunluk (baz sayısı)	İşlev
mikroRNA (miRNA)	19-25	Translasyonel baskılama, gen aktivasyonu
"Small interfering RNA" (siRNA)	19-21	Hedef mRNA yıkımı
"Trans-acting siRNA" ("Ta-siRNA")	21-22	mRNA yıkımı
"Small-scan RNA" ("ScnRNA")	~28	DNA eliminasyonu
"Repeat-associated RNA" ("rasiRNA")	24-27	Transkripsiyonel baskılama
"Piwi-interactin RNA" ("piRNA")	26-31	Germ hücrelerinde transpozon kontrolü
Transfer RNA ("tRNA")	75-95	Translasyon

2.4. MİKRORNA'LAR

Kritik hücre fonksiyonları proteinler tarafından yerine getirilir. Proteinleri oluşturacak olan bilgi DNA üzerinde bölgesel olarak dağılmış bulunan genler içinde saklanmaktadır. Proteini oluşturma sürecinde DNA üzerindeki genlerde bulunan bilginin RNA Polimeraz enzimi tarafından okunup geçici bir ara molekül olan mRNA (mesajcı RNA)'ya dönüştürülmesi gerekmektedir. mRNA'da yer alan bu bilginin önce, aminoasitleri oluşturan 3 nükleotidlik dizilere buradan da protein moleküllerine dönüşümü sağlanır.

1993 yılında Lee ve diğ. *C.elegans* 'ta lin-4 geninin protein kodlamadığını, aksine küçük bir RNA molekülünün lin-4'ün protein seviyesine müdahale ettiğini gösterdiler (Lee ve diğ., 1993). Bu keşiften yaklaşık yedi yıl sonra Pasquinelli ve diğ., insan dahil birçok

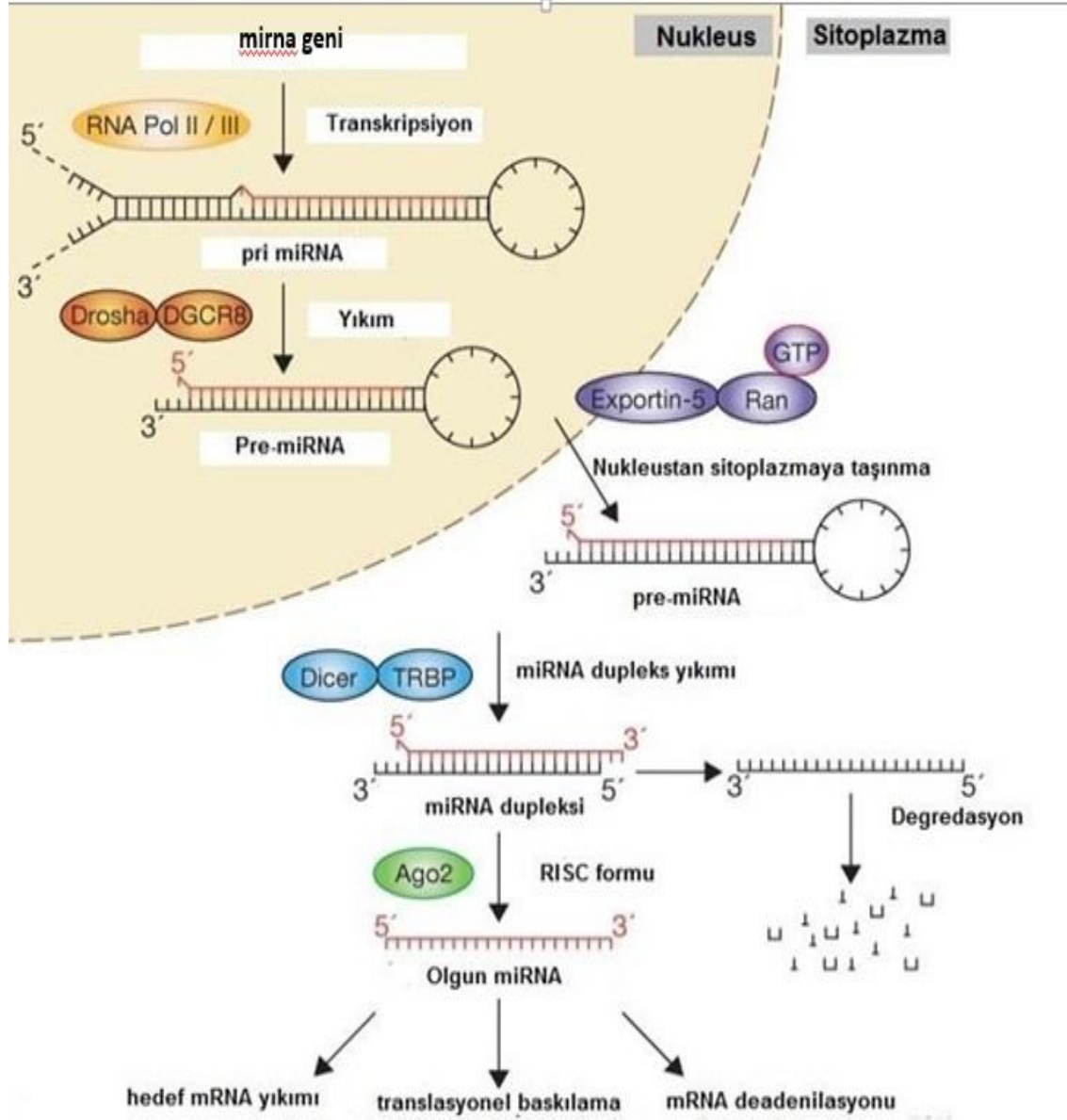
2.4.1. mikroRNA Biyogenezi

Çoğu miRNA geni RNA Polimeraz II tarafından transkribe edilir (Lee ve diğ., 2004). Az bir kısmı ise RNA Polimeraz III tarafından transkribe edilir ve bunların çoğunlukla Alu elemanları içinde yer almakla birlikte intronik olanları da vardır (Borchert ve diğ., 2006). Ortaya çıkan transkripsiyon ürünleri primer miRNA (pri-miRNA) olarak adlandırılır ve baz uzunluğu olarak binlerce nükleotid uzunluğunda olabilen çeşitlilikte bulunabilir.

miRNA'lar birbirini takip eden üç basamak sonunda olgunlaşırlar. İlk basamakta miRNA genlerinden öncül transkriptin (pri-miRNA) genellikle RNA Polimeraz II tarafından transkripsiyonu gerçekleşir, ikinci basamakta pri-miRNA'lar nukleusta kırılarak prekürsör miRNA'ya (pre-miRNA) dönüştürülür, son basamakta ise sitoplazmada olgun ve fonksiyonel miRNA oluşumu gerçekleştirilir (Kwak ve diğ., 2010). miRNA kodlayan genlerin DNA zincirlerinden RNA Polimeraz II enzimi tarafından pri-miRNA sentezlenir. Pri-miRNA'lar 50-3000 nükleotid uzunluğunda, "poli A" ve şapka ("cap") yapısına sahip, ilmik şeklinde bulunurlar. Nukleusta bulunan pri-miRNA, RNAaz III ailesinden "Drosha" enzimi ve kofaktörü olan "microprocessor complex subunit" "DGCR8 ("DiGeorge syndrome chromosomal region 8") / Pasha" tarafından pre-miRNA moleküllerine dönüştürülür (Yeom ve diğ., 2006). Pre-miRNA'lar yaklaşık 70 nükleotid uzunluğundadır. Pre-miRNA molekülleri "Exportin-5" ve "RAN-GTP" ("RAs-related nuclear protein") aracılığıyla sitoplazmaya taşınır. Sonrasında "RAN-GTP", hidrolize olarak "RAN-GDP" molekülüne dönüşür ve pre-miRNA "Exportin-5"ten ayrılır. Serbest kalan pre-miRNA'nın sitoplazmada yine bir RNAaz III enzimi olan "Dicer" enzimi ile kesilerek 18-22 nükleotid uzunluğundaki çift zincirli miRNA dupleksine dönüşümü gerçekleştirilir. "Dicer" enzimi aynı zamanda "RISC" kompleksi ("RNA-induced silencing complex") oluşumunu başlatır. miRNA dupleksinden sadece rehber ("guide") zincir RISC kompleksine dahil olur ve bu kompleks içinde Ago proteiniyle etkileşime girer. Rehber ("guide") miRNA ile birlikte olan "RISC" kompleksi, "miRISC" kompleksi olarak adlandırılır (Şekil 2.3). Rehber zincir sonrasında dizi komplementerliği ile hedefine bağlanır. Hedef mRNA'nın yıkımına ya da translasyonel baskılanmaya neden olur (Ladomery ve diğ., 2011; Liu ve diğ., 2008).

Klasik miRNA biyogenez yolağına ilave olarak, pre-miRNA/intronlar ("mirtronlar") son yıllarda Drosophila, C.elegans ve memeli türlerinde yapılan çalışmalarda tanımlanmıştır.

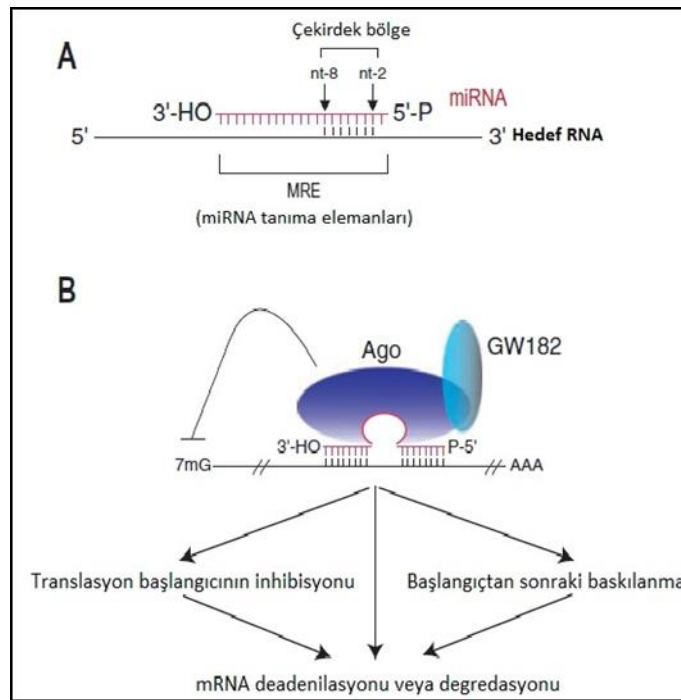
Mirtronlar, belirli intronlardan ayrılmış ve 5' ucunda bulunan monofosfat, 3' ucunda ise 2-nt hidroksil ile saç tokası yapısını alarak pre-miRNA'ları taklit eden yapılardır. Bu yapılar aynı birer miRNA gibi miRNA biyogenez yolağına girerler (Okamura ve diğ., 2007). Bu keşif, yapısal olarak pre-miRNA molekülüyle benzerlik gösteren herhangi bir RNA molekülünün, klasik miRNA biyogenez yolağına girerek fonksiyonel bir miRNA oluşturma potansiyeline sahip olduğunu göstermektedir (Liu ve diğ., 2008).



Şekil 2.3: miRNA biyogenezi ve işlenmesi (Winter ve diğ., 2009).

2.4.2. miRNA'ların Hedef mRNA'yı Tanıması

miRNA'lar, hedef mRNA'larının genellikle 3'-UTR bölgelerinde bulunan miRNA tanıma elemanları ("MRE, miRNA response elements") ile baz eşleşmesi yaparlar ve bağlandıkları Ago proteinlerini mRNA hedeflerine bırakırlar. Bunun sonucu olarak hedef mRNA, ya translasyonel olarak baskılanır ya da endonükleolitik olarak kırılır. Kabul edilen görüşe göre, hedef mRNA molekülüyle yüksek komplementerlik mRNA'nın kırılma ile degradasyonuna, düşük komplementerlik ise translasyonel baskılanmaya neden olur (Wahid ve diğ., 2010). Hedef mRNA'yı tanımadaki en önemli belirleyen, çekirdek bölgesi ("seed region") olarak tarif edilen, miRNA'nın 5' proksimal bölgesinin mRNA ile olan mükemmel ya da mükemmel yakın komplementerliğidir (Şekil 2.4).



Şekil 2.4: A: miRNA molekülünün hedef mRNA'yı tanıması. B: Hedef mRNA'nın baskılanma mekanizmaları (Liu ve diğ., 2008).

2.4.3. miRNA'ların Fonksiyonu

Bu çalışma yapıldığı sırada, herkese açık bir veritabanı olan "mirBase"de (www.mirbase.org) tanımlanmış olan miRNA miktarı 28.000 sayısını bulmuş idi. Bu

miRNA'lar hayvan, bitki ve virüslerde bulunmaktadır. Günümüzdeki yeni nesil dizileme ("NGS") teknolojilerinin kullanılmaya başlamasıyla da yeni birçok miRNA tanımlanmaktadır.

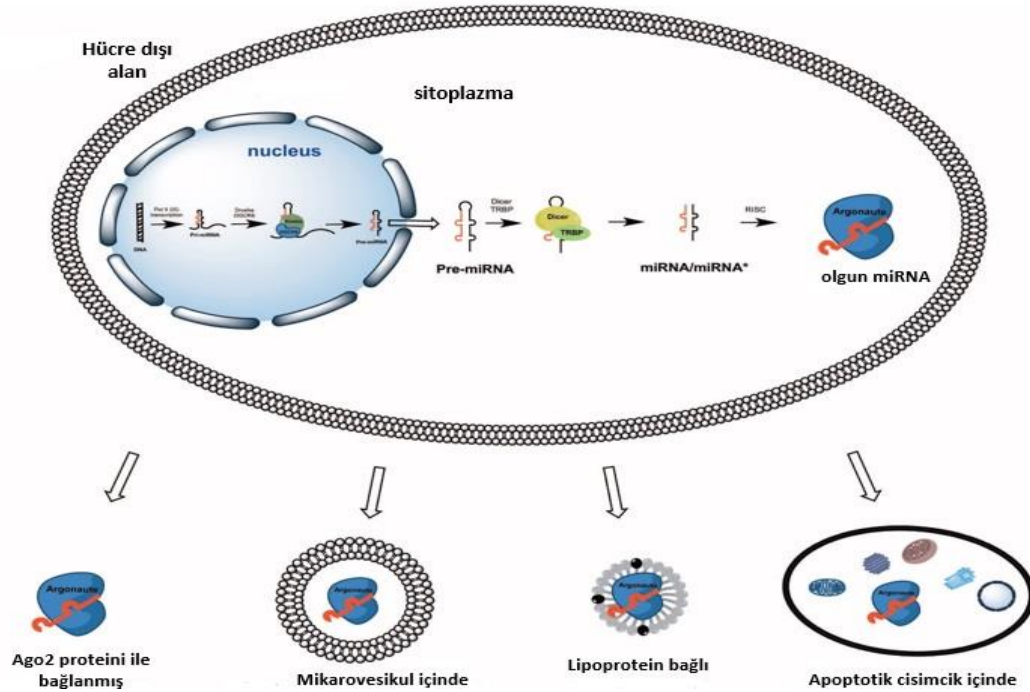
Bir mRNA birden çok miRNA tarafından düzenlenebilir, aynı şekilde her miRNA da birden fazla hatta yüzlerce mRNA'yı düzenleme özelliğine sahiptir. Bu durum pratikte, yaşamsal tüm biyolojik süreçlerin miRNA-bağımlı düzenlenmeye tabii olduğu anlamına gelir (Vidigal ve Ventura, 2015). Bir diğer deyişle, miRNA'ların biyolojik fonksiyonları oldukça geniş kapsamlıdır. miRNA'lar hem hayvan hem bitkilerde normal gelişim ve fizyolojiden sorumludur. Bitkilerde çiçeklenme gelişimi ve zamanlaması, yaprak paterninin belirlenmesi, damar gelişimi ve fertilitede görevli olduğunu gösteren çalışmalar mevcuttur (Chen, 2009; Jones-Rhoades ve diğ., 2006). Hayvanlarda ise kalp, kas-iskelet gelişimi, stres cevabının verilmesi, hücre proliferasyonunun kontrolü ve apoptozda rolleri saptanmıştır (da Costa Martins ve diğ., 2010; Zhang, 2009). Aynı zamanda birçok hastalık miRNA düzenlenmesiyle ilişkilendirilmiş, hedef mRNA moleküllerine bağlı olarak, miRNA'ların kanserde hem onkogen hem de tümör baskılayıcı etkileri olduğu belirlenmiştir (Ruan ve diğ., 2009). miRNA ekspresyon profillerinin değişiminin, gebeliğe özgü hastalıklar ile ilişkisi tanımlanmış, plasenta ve maternal plazma, miRNA ekspresyonlarının incelendiği dokular olarak öne çıkmıştır (Chen ve Wang, 2013; Xu ve diğ., 2014).

2.5. DOLAŞIMDA BULUNAN miRNA'LAR ("CIRCULATING MIRNAS")

Dolaşımda bulunan miRNA'lar, aralarında plazma ve serumun da olduğu birçok hücre dışı sıvıda tanımlanmıştır. İlk kez Lawrie ve diğ. tarafından 2008 yılında serumda bulunan miRNA'lar güvenilir bir şekilde tespit edilmiştir (Lawrie ve diğ., 2008). Sonraki yıllarda Weber ve diğ. aralarında plazma, idrar, tükürük, gözyaşı gibi sıvıların bulunduğu 12 farklı vücut sıvısında miRNA ekspresyonlarını tespit etmişlerdir (Weber ve diğ., 2010). Hücre dışı sıvı ortamlarında, özellikle kanda bulunan yüksek RNaz aktivitesine karşı dolaşımda bulunan miRNA'ların stabilitesini koruduğu gözlenmiştir. Ayrıca mRNAların aksine dolaşımda bulunan miRNA'lar oda sıcaklığında bulunma ya da dondurma/çözme işlemlerine karşı da uzun süre stabilitelerini korurlar (Mitchell ve diğ., 2008). Dolaşımda

bulunan serbest miRNA'ların RNaz aktivitesinden nasıl kurtulduğuna dair çeşitli hipotezler ortaya atılmıştır. Bunlardan ilki, miRNA'ların kısa uzunlukta ve kúçük molekúller olduğu için RNaz aktivitesinden kurtulduğu yönündedir, bu varsayım plazma sıvısına sentetik miRNA'ların eklenip, yıkıldıklarının gösterilmesi yoluyla yanlışlanmıştır (Mitchell ve diğ., 2008). İlk geğerli önerme Valadi ve diğ. tarafından yapılmış, dolaşımda bulunan serbest miRNA'ların, 40-100 nm boyutlarında, çift lipit tabakayla çevrili, eksozom denilen yapılar içinde bulunduğu gösterilmiştir (Valadi ve diğ., 2007). Serbest miRNA'ların sadece eksozom ya da mikrovėsikúllerde bulunmadığı, Ago2 ("argonaute2") komplekslerine bağlı bir şekilde de bulunduğunu Arroyo ve diğ. 2011 yılında göstermiştir (Arroyo ve diğ., 2011). Bunun yanında hücre dışında serbest halde bulunan miRNA'ların lipoproteinlerle ilişkili olduğu da gösterilmiştir (Vickers ve diğ., 2011) (şekil 2.5).

Tüm bu buluşlar dolaşımda bulunan serbest miRNA'ların non-invaziv tanıda efektif olarak kullanılabileceği görüşünü doğurmuştur.



şekil 2.5: Dolaşımda bulunan miRNA'ların hücre dışı alanda birlikte yer aldığı yapılar gösterilmiştir (Turchinovich ve diğ., 2013).

2.5.1. Preeklampsia Hastalığında Dolaşımda Bulunan miRNA'lar

Dolaşımda bulunan serbest miRNA'ların kaynağı olarak öncelikle plasentanın trofoblast katmanı gösterilmektedir. Yapılan çalışmalara göre placentada ekspresyon gösteren miRNA'lar plasentasyonda trofoblast çoğalması, sinyalizasyon ve invazyon mekanizmasında etkilidir. Placentada ekspresyonu bulunan mikroRNA'ların belirlenmesi ilk olarak Barad ve diğ. tarafından 2004 yılında yapılmıştır. Mikrodizin temelli yaklaşım kullanarak plasentanın da aralarında bulunduğu beş insan dokusunda miRNA ifadelerini saptamış ve plasentanın miRNA ekspresyonu açısından zengin içeriğe sahip bir doku olduğunu göstermişlerdir (Barad ve diğ., 2004). Preeklampsia hastalarının plasentalarında ekspresyon farklılığı gösteren miRNA'lar ise ilk kez Pineles ve diğ. tarafından 2007 yılında gösterilmiştir. Bu çalışmada placentada ekspresyonu bulunan 157 miRNA'nın ifade düzeyleri "RT-qPCR" ile incelenmiş, mir-182 ve mir-210'un preeklampsia hastalarındaki artmış ekspresyon profili kontrol grubuna kıyaslanarak gösterilmiştir (Pineles ve diğ., 2007). Mir-210'un preeklampsia hastalarında artmış ekspresyonu Gunel ve diğ. tarafından yapılan çalışmada da gösterilmiştir (Gunel ve diğ., 2011). Daha sonra Roman ve diğ. mikrodizin ("mikroarray") temelli yöntemle, yine placentada 836 miRNA'nın preeklampsia hastaları ve kontrol grubundaki değişen ekspresyonlarını incelemiş, 38 miRNA'nın azalmış 53 miRNA'nın ise artmış ekspresyonlarını saptamıştır (Roman ve diğ., 2008).

Gebe kadınların maternal plazmalarında serbest dolaşan nükleik asitlerin (cffNA) bulunması non-invaziv prenatal tanı testlerinde yeni bir çıkış açmıştır. Lo ve diğ. tarafından 1997 yılında yapılan araştırmada gebe kadınların plazmalarında fetusa ait serbest DNA keşif edilmiştir (Lo ve diğ., 1997). Fetal DNA'nın anne plazmasında tespiti, fetüs Rh'nın belirlenmesi, cinsiyet tespiti ve β -talasemi çalışmalarında gösterilmiştir. Ayrıca fetus kaynaklı mRNA transkript düzeyinin kantifiye edilmesi preeklampsia ve fetal anöploidilerde gösterilmiştir (Chim ve diğ., 2008). Wu ve diğ. ise ilk kez preeklampsia hastalarının maternal plazmalarında serbest dolaşan miRNA ekspresyon profillerini mikrodizin yöntemiyle göstermişlerdir (Wu ve diğ., 2012).

2.6. MİRNA ve HEDEF MRNA İLİŞKİSİNİ BELİRLEMeye YÖNELİK GELİŞTİRİLEN *IN SILICO* ARAÇLAR

Ağ tabanlı hedef belirleme yöntemlerinin çoğunluğu mükemmel çekirdek (“seed”) komplementerliğini esas alır. miRNA moleküllerinin 5’ ucunda yer alan çekirdek bölgesi korunmuş Watson-Crick baz eşleşmesi prensibine göre tahminde bulunur (Lewis ve diğ., 2003). Fakat çekirdek dizilerinin eşleşmesi her zaman baskılama mekanizması için yeterli değildir, mRNA’nın 3’-UTR’ında herhangi bir hekzamerin rastgele meydana gelme olasılığı fazla olduğu için, mükemmel çekirdek eşleşmesinin sadece kendisi, miRNA regülasyonunu tahmin etmede efektif olamaz görüşü öne çıkmıştır (Grimson ve diğ., 2007). Bu kısıtlılığa alternatif olarak, miRNA-mRNA ilişkisini belirleyen tahmin araçları günümüzde, çekirdek komplementerliğine ilaveten, termodinamik kararlılık, evrimsel korunmuşluk ve bağlanma bölgesinin yapısal olarak kolaylıkla ulaşılabilirliği gibi özellikleri tahmini belirlemede göz önüne almaktadır (Oulas ve diğ., 2015).

Bu çalışmada kullanılan ağ tabanlı *in silico* araçlar ve algoritmaları aşağıdaki gibi özetlenmiştir:

miRanda: Bu program 2003 yılında Enright ve diğ. tarafından geliştirilmiş, ağırlıklı dinamik programlama algoritmasını kullanarak optimum dizi komplementerliğini esas alır (Enright ve diğ., 2003). Fakat mükemmel çekirdek komplementerliğini gözetmez ve G:U “wobble” (“non-canonic”) bağlanmasına da izin verir. Ayrıca Betel ve diğ. tarafından geliştirilen, mirSVR (mir“support vector regression”) algoritması ile birlikte çalışarak skarlama ve miRNA molekülünün hedef mRNA ile olan eşleşmesinde korunmuşluk ve ikincil yapıların ulaşılabilirliğini göz önüne alır. Bu programa www.microrna.org sayfasından ulaşılabilir (John ve diğ., 2004; Betel ve diğ., 2008; Betel ve diğ., 2010).

TargetScan (“Release 7.1”): Bu program, her bir miRNA’nın çekirdek bölgesinin dizisi ile eşleşme yapabilecek olası hedef mRNA’lardaki korunmuş 6mer, 7mer ve 8 mer’lik dizileri araştırır (Lewis ve diğ., 2005). Memelilerde, yapılan tahminlerin sıralaması, kümülatif olarak ağırlıklarındırılmış (“cumulative weighted”) CS

(“context++ score”) skorunun hesaplanması yolu ile olur (Agarwal ve diğ., 2015). Bu programa www.targetscan.org sayfasından ulaşılabilir.

mirDB: Bu program aralarında insanın da olduğu 5 farklı türde (insan, fare, sıçan, köpek ve tavuk) miRNA-mRNA etkileşimlerini tahmin eder. “MirTarget” adlı biyoinformatik aracından elde ettiği binlerce miRNA-mRNA etkileşiminde makine öğrenmesi (“machine learning”) metodunu kullanarak ortak özellikleri tanımlar (Wong ve Wang, 2015; Wang, 2016). Bu programa www.mirDB.org sayfasından ulaşılabilir.

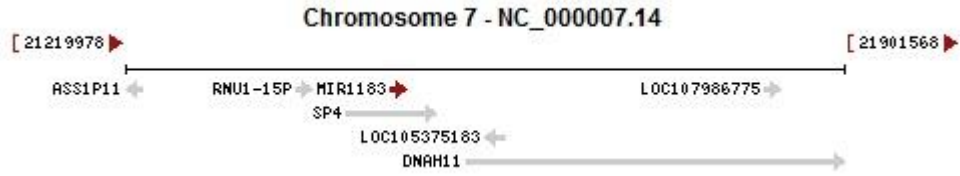
DIANA-microT-CTS: miRNA’da bulunan çekirdek bölgesinin hedef diziye bağlanırken mükemmel komplementerlikte olması şartını aramaz. mRNAlar üzerinden yer alan miRNA tanıma bölgeleri (“MRE”) genellikle 3’UTR ‘dadır fakat kodlayan bölgelerde de “MRE” lerin bulunduğu gösterilmiştir. Bu program da hem 3’UTR hem de “CDS” (“coding DNA sequence”) bölgelerinde bulunan “MRE” bölgelerini tanıyarak hedef tahmininde bulunur (Paraskevopoulou ve diğ., 2013; Reczko ve diğ., 2012). Bu programa www.diana.imis.athena-innovation.gr sayfasından ulaşılabilir.

PITA: miRNA’nın hedef mRNA’sını regüle etmede “target-accessibility” (hedefe ulaşılabilirlik) kavramının kritik bir role sahip olduğunu tanımlar. miRNA-hedef etkileşiminde ortaya çıkacak olan serbest enerji miktarına göre bir sıralama oluşturur. miRNA-hedef etkileşimi dupleks oluşturacak şekilde meydana geldiğinde ortaya çıkan serbest enerji miktarıyla, bu dupleks oluşmadığında ortaya çıkan enerji maliyeti arasındaki farkı alır ve farkın büyüklüğüne göre tahmin sıralaması yapar (Kertesz ve diğ., 2007). Bu programa www.genie.weizmann.ac.il sayfasından ulaşılabilir.

RNAHybrid: Bu program miRNA-hedef mRNA duplekslerinin eşleşmesinde sekonder yapı tahminini ve minimum serbest enerji (MFE, “minimum free energy”) hesaplamasını kullanır. Enerji anlamında optimal şekilde eşleşme sağlanmasını öngörerek, molekül içi dallanma yapılarını sınırlandırır (Rehmsmeier ve diğ., 2004). Bu programa www.bibiserv2.cebitec.uni-bielefeld.de/rnahybrid sayfasından ulaşılabilir.

2.7. HSA-MİR-1183

İnsanda bulunan mir-1183, 7. kromozomun uzun kolunda 7p15.3 bölgesinde lokalize, intronik bir miRNA'dır (Şekil 2.6). miRBase erişim ve “mature” dizi bilgisi **Tablo 2.4**'de verilmiştir. Bu miRNA'nın fonksiyonuna dair literatürde sınırlı sayıda çalışma mevcuttur.

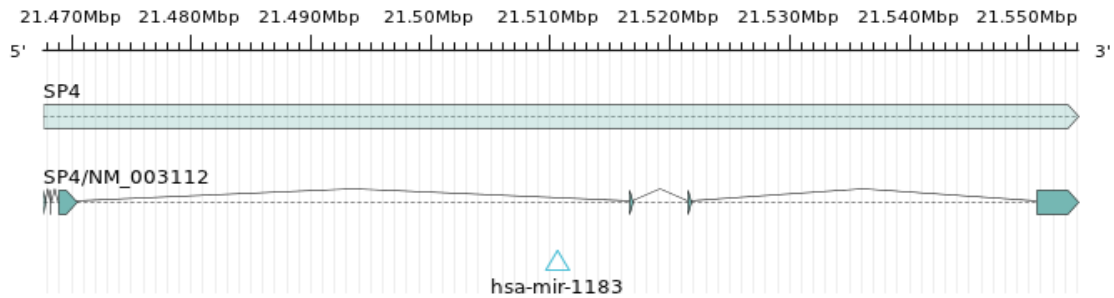


Şekil 2.6: hsa-mir-1183'ün insan genomundaki lokalizasyonu.

Tablo 2.4: hsa-mir-1183'ün miRBase veritabanındaki erişim ve dizi bilgisi.

	miRBase erişimi	Olgun dizi (5'-3')
hsa-mir-1183	MIMAT0005828	CACUGUAGGUGAUGGUGAGAGUGGGCA

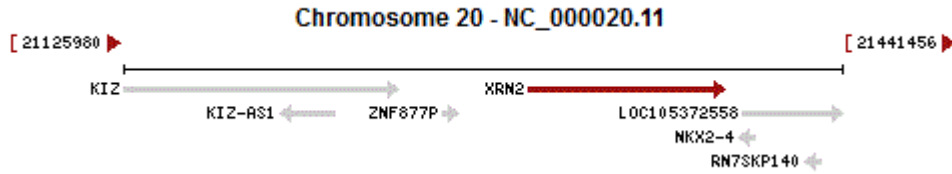
hsa-mir-1183'e ev sahipliği yapan gen, “host gene”, SP4 genidir (Şekil 2.7). Bu gen bir transkripsiyon faktörü olarak görev yapar. Birçok genin GC promotor bölgesine bağlanarak işlevini yürütür. Bu genin bipolar hastalığı ve şizofreni ile ilişkilendirilmiş çalışmaları mevcuttur (Pinacho ve diğ., 2015).



Şekil 2.7: hsa-mir-1183'ün “host gene” i olan SP4 geni.

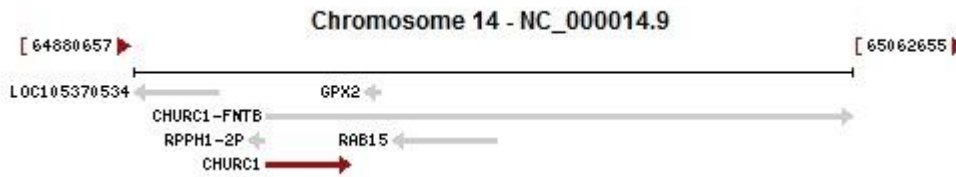
2.8. HSA-MİR-1183'ün ADAY HEDEF GENLERİ

Aday genlerden biri olan *XRN2* (“5’-3’ exoribonuclease 2”) geni (NM_012255), insan genomunun 20. kromozomunun 20p11.22 bölgesinde lokalize, 32 ekzonlu bir gendir (Şekil 2.8). 5’-3’ yönde işlev gören bir ekzoribonükleazdır. Evrimsel olarak tüm ökaryotlarda korunmuştur. Tek iplikli RNA molekülünü 5’ucundan tanıyarak yıkımını gerçekleştirir. Transkripsiyonun sonlandırılmasında RNA Polimeraz II ile birlikte görev alır. Poly-A bağımlı terminasyonda görev alan transkripsiyon sonlandırıcı faktörlerden biridir (Kuehner ve diğ., 2011; West ve diğ., 2004).



Şekil 2.8: *XRN2* geninin insan genomundaki lokalizasyonu

CHURC1 (“Churchill domain containing 1”) geni (NM_145165), insan genomunda 14. kromozomun 14q23.3 bölgesinde lokalize ve 4 ekzonludur (Şekil 2.9). Gastrulasyon aşamasında kritik bir role sahiptir. Bu genin ürünü bir çinko parmak transkripsiyonel aktivator olarak görev yapar. Model organizma olarak kullanılan Zebra balığı’nda yapılan çalışmalar bu genin FGF (fibroblast büyüme faktörü) ve BMP (“bone morphogenetic protein”) sinyal iletiminde görevli olduğunu göstermiştir (Taibi ve diğ., 2013; Londin ve diğ., 2007).



Şekil 2.9: *CHURC1* geninin insan genomundaki lokalizasyonu.

2.9. GERÇEK ZAMANLI POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU (“RT-QPZR”)

Gerçek Zamanlı PZR, amplifikasyonun, cihaza bağlı bir bilgisayar ekranından eş zamanlı olarak izlenilebilen, floresan işaretleyicilerin kullanıldığı ve alınan floresan yoğunluğunun, amplifikasyon ürünü ile doğru orantılı olarak arttığı bir yöntemdir. Bu teknikte, hedef diziye özgün proplar kullanılabildiği gibi, özgün olmayan floresan işaretleyiciler (SYBR Green vb.) de kullanılabilmektedir.

Bu çalışmada Taqman® MGB prob kullanılmıştır. Bu prob, hidroliz prob temelli bağlanma gerçekleştirir. Probun 5’ ucunda FAM adlı fluoresin bağlıdır. 3’ ucunda ise MGB (“minor groove binder”) bulunur (Şekil 2.10). Probun bu özelliği sayesinde erime sıcaklığı (T_m) prob uzunluğunu arttırmadan yükseltilebilir. Bu sayede de daha kısa proplar tasarlamak mümkündür (Afonina ve diğ., 1997; Kutuyavin ve diğ., 1997). Ayrıca probun 3’ ucunda floresan olmayan NFQ (“nonfluorescent quencher”) denilen susturucu bulunur.



Şekil 2.10: Taqman® MGB probun yapısı.

2.10. miRNA ve HEDEF GENLER ARASINDAKİ KORELASYON İLİŞKİSİ

Korelasyon iki rassal değişken arasındaki ilişkinin yönünü ve gücünü belirlemeye yarayan istatistiksel bir metottur. Korelasyon hesaplamasında öne çıkan 2 yöntem bulunmaktadır.

1. “Pearson çarpım-moment korelasyon katsayısı” (Pearson, 1896). “Pearson” korelasyonu örneklerin birbiriyle doğrusal bir ilişkisinin olduğu durumlarda kullanılır.

2. “Spearman’ın sıralama korelasyon katsayısı” (Spearman, 1987). “Spearman” korelasyonu örnekler arasında tekdüze (“monotonic”) bir ilişki olduğu varsayımı üzerine dayanır. Ayrıca sıralı ve kesin değerlerini bildiğimiz örnekler dışında kademeli olarak derecelendirilebilecek verilere de uygulanabilir.

Korelasyon katsayısı (r) -1 ile +1 arasında bir değere sahiptir. $r=+1$ pozitif yönde tam bir doğrusal bağlantıyı, $r=-1$ ise negatif yönde tam bir doğrusal bağlantı olduğunu belirtir. $r=0$ ise iki değişken arasında hiç doğrusal bağlantı bulunmaz.

2.11. “ROC” EĞRİSİ ANALİZLERİ

“ROC” Eğrisi analizleri tıp özelinde, hasta ve sağlıklı bireyleri ayırt etmede kullanılan, değişkenlere ne ölçüde güvenebileceğimizi gösteren bir istatistik metodudur. Testlerin seçicilik ve duyarlılıklarını ölçmede kullanılır (DeLong ve diğ., 1988).

“ROC” eğrisinin oluşturacağı koordinat sisteminde, X ekseninde yanlış pozitiflik (1-seçicilik), Y ekseninde ise testin gerçek pozitif değeri (duyarlılık) yer alır. Her kesim noktasındaki doğru pozitif ve yanlış pozitif karşılık gelen noktalar birleştirilerek “ROC” eğrisi çizilir.

ROC eğrisinin altında kalan alan AUC (“Area Under Curve”) olarak tariflenir. “AUC” değeri en büyük “1” değerini alabilir. $AUC=1$ olduğunda pozitifler mükemmel bir şekilde negatiflerden ayrılmış demektir. “AUC” değerinin pratik olarak alabileceği en küçük değer ise “0.50”dir. Hastalarla sağlıklı kontroller tamamen şansa bağlı olarak ayırt edilirse bu durum ortaya çıkar.

3. MALZEME VE YÖNTEM

3.1.Çalışma Grubu

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi, Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı, İstanbul Üniversitesi, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı ve Medicus Sağlık Merkezi kliniklerine gebe takibi amacıyla üçüncü trimesterlarda başvuran preeklampitik ve normal seyirli gebeler üzerinde yapılmıştır. MikroRNA çalışması sırasında 18 hasta 15 kontrol, hedef gen çalışmaları sırasında ise 13 hasta 11 kontrol olmak üzere, toplam 31 preeklampsi ve 26 sağlıklı gebe örneği kullanılmıştır. Preeklampsi tanısı alan gebeler hasta grubunu, normal seyirli gebeler ise kontrol grubunu oluşturmuştur. Çalışma, İstanbul Tıp Fakültesi Yerel Etik Kurul tarafından 16.04.2012 tarihli ve 2118 sayılı etik kurul onayı alınarak yapılmıştır (EK.1). Çalışmaya gönüllü olarak katılmayı kabul eden hasta ve kontrol gruplarında yer alan kişilere bilgilendirilmiş gönüllü olur ve gönüllü onay formu okutularak gerekli bilgilendirme yapılmıştır (EK.2).

3.2. Kullanılan Malzeme ve Kitler

- miRVANA mikroRNA İzolasyon Kiti (“ThermoFisher Scientific”)
- Taqman MicroRNA Revers Transkripsiyon Kiti (“ThermoFisher Scientific”)
- Taqman MicroRNA Assay (“ThermoFisher Scientific”)
- Taqman Universal PCR Master Mix (“ThermoFisher Scientific”)
- miRNeasy Serum/Plasma Kit (“Qiagen”)
- Bioanalyzer Small RNA Chip/Reagent (“Agilent”)
- M-MLV Reverse Transkriptaz (“ThermoFisher Scientific”)
- RNase Inhibitor (“Fermentas”)
- dNTP (“Invitrogen”)
- Sentetik *C.elegans*-mir-39 (“Qiagen”)

3.3. Kullanılan Kimyasallar

- Fenol-kloroform
- Etil Alkol
- Qiazol

3.4. Kullanılan Cihazlar

- PZR Cihazı (“Agilent”)
- Real-time PZR Cihazı (“Stratagene”, “LC480 Roche”)
- Masaüstü mini santrifüj (“Beckmann Coulter”)
- Biyoanalizör (“Agilent”)
- Nanodrop spektrofotometre (“Thermo”)
- Heat block (“Eppendorf”)
- Otomatik Pipetler (“Eppendorf”)
- Buzdolabı ve derin dondurucular

3.5. YÖNTEM

3.5.1. Maternal Plazma’dan Total RNA İzolasyonu

Bu aşamada, “ThermoFisher Scientific” firmasının üretmiş olduğu mirVana mikroRNA izolasyon kiti kullanıldı ve üreticinin önermiş olduğu protokol izlendi.

3.5.1.1. “Spike-in” sentetik RNA Kullanımı

Literatürde plazma ve serum sıvıları için tanımlı endojen mikroRNA kontrolü bulunmamaktadır. Bu sebeple, “spike-in” kontroller serum ve plazmadaki RNaz aktivitesini ölçmede ve elimine etmede kullanılır (Li ve Kowdley, 2012).

Normalizasyon hesaplamalarında kullanılmak üzere sentetik olarak üretilmiş mikroRNA dizileri izolasyon aşaması sırasında her bir örneğe eklenir. Bu aşamada “*cel-miR-39*” sentetik dizileri kullanılır. Bu sentetik mikroRNAlar literatürde “spike-in” kontrol olarak tanımlanmıştır. Hem plazma hem de serum sıvısı protein ve lipid içeriği bakımından örnekten örneğe çok çeşitlilik göstermektedir ve bu durum hem RNA izolasyon aşamasının verimini etkiler hem de PZR aşamasında potansiyel bir inhibitör olarak etkinlik gösterir. Bu sebeple, örnekler arası dalgalanmayı dengelemek için insanda

bulunmayan ve başka organizmalardan elde edilen (örneğin *C.elegans*) sentetik mikroRNA'lar izolasyon aşamasının başlangıç basamağında her bir örneğe eklenir.

3.5.1.2. mikroRNA Tayini için Maternal Plazmadan Total RNA İzolasyonu

1. -80°C'de saklanan plazma örneklerinin buz üzerinde erimesi beklenir. 500µl plazma alınarak 1.000µl liziz tamponu eklenir ve oda sıcaklığında 5dk. beklenir.
2. Her örneğe 3,5µl sentetik mikroRNA dizileri ("*cel-mir-39*") eklenir. ("Qiagen" firmasının önerdiği konsantrasyonda)
3. Ulaşılan toplam hacim kadar fenol-kloroform karışımı eklenir, 30-60 sn. vortekslenir. Homojen bir karışım elde edildiğinde 10.000^xg'de 5dk. santrifüj edilir.
4. Santrifüj işlemi sonrası faz ayrımı gerçekleşir. Altta kalan protein-lipit içerikli organik faz kısmına dokunmamaya özen göstererek yukarı taraftaki aköz faz toplanır. Bu aşamada net bir ayırım olmazsa santrifüj aşaması tekrar edilir.
5. Elde edilen total hacmin 1,25 katı kadar %100 etanol oda sıcaklığında, karışıma eklenir.
6. Her örneğe ait olan ayrı toplama tüplerine filtreler yerleştirilir. Bir defada 700µl hacim koyulabilir ve ardından 8.000^xg'de 30 sn. santrifüj yapılır. Altta kalan sıvı atılır ve işlem tüm örnek aktarılıp bitene kadar devam eder.
7. 700µl "wash buffer 1" eklenir ve 8.000^xg'de 30 sn. santrifüj yapılır. Altta kalan sıvı atılır.
8. 500µl "wash buffer 2/3" eklenir ve 8.000^xg'de 30 sn. santrifüj yapılır. Altta kalan sıvı atılır. Bu işlem 2 kez tekrarlanır.
9. Toplama tüpü içindeki filtre boş olarak 10.000^xg'de 1 dk. santrifüj edilir. Yeni, temiz bir tüpe filtre yerleştirilir.
10. Öncesinde 95°C'ye ısıtılmış olan nükleazlardan arındırılmış olan tampon, filtreye dokunmamaya özen göstererek 40µl hacimde her örneğe eklenir. 1-2 dk. oda sıcaklığında beklenir. Maksimum hızda 1 dk. santrifüj edilir.
11. Filtre çıkarılır ve mikroRNA içeren total RNA'lar -20°C'de bir sonraki kullanım basamağına dek saklanır.

3.5.1.3. mikroRNA ve RNA Örneklerinde Miktar ve Kalite Tayini

İzole edilen total RNA'lar öncelikle spektrofotometrik ölçüm yapan “Nanodrop” cihazında incelendi. Ölçüm “NanoDrop” cihazının nükleik asit programında gerçekleştirildi. İlk önce, RNA'ların çözündürüldüğü tampon olan RNaz içermeyen su kör olarak okutuldu. Daha sonra ölçümü yapılacak RNA'dan 1 µl cihaza eklendi ve bağlı olduğu bilgisayar yardımı ile 260 nm ve 280 nm dalga boylarındaki absorbansları alındı ve konsantrasyonları kaydedildi. Sonrasında “total RNA” içindeki mikroRNA'ların kantitasyonu biyoanalizör cihazı ile incelendi ve kit uygulaması gerçekleştirilerek, hem örnek kantitasyonu hem de niteliği tayin edildi (Şekil 3.1).



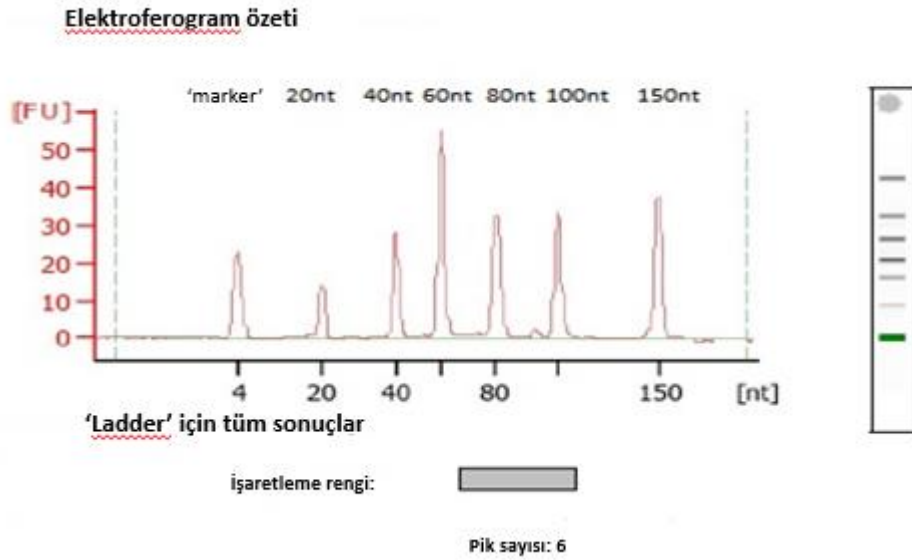
Şekil 3.1: Biyoanalizör uygulamasının aşamaları.

Biyoanalizör cihazı hassasiyeti yüksek ve güvenilir ölçüme olanak verir. Bu çalışmada maternal plazma örneklerinde “Agilent Small RNA Chip” kullanıldı (Şekil 3.2). Bu kit 6-150 nükleotit uzunluğundaki nükleotitlerin ölçümünü yapabilmektedir. Bu aralıktaki 10 ila 40 nükleotitlik kısım mikroRNA'ları içerir.



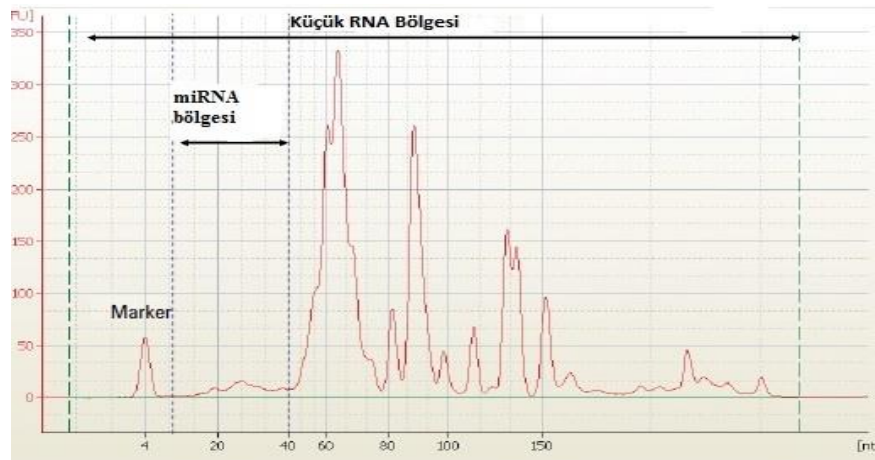
Şekil 3.2: “Agilent Small RNA Chip” görüntüsü.

Cihaz, “ladder” ve ilgilendiğimiz bölgeleri içeren küçük RNA parçacıklarını göstermektedir. Biyoanalizör sonuçlarını yorumlamaya geçmeden önce kalite kontrol aşamasında “ladder” ların doğru yürüdüğü kontrol edilir. Doğru bir “ladder” görüntüsünde 1 “marker” görüntüsüne ilaveten 6 RNA piki bulunmalıdır (Şekil 3.3).



Şekil 3.3: Biyoanalizörde “ladder” ların elektroferogram ve jel görünümü.

“Ladder” ların kontrolü yapıp doğru çalıştığına emin olduktan sonra yürütülen her bir örneğin analizlerine geçilir. Şekil 3.4’de gösterildiği gibi küçük RNA analiz bölgesindeki 0-150 nükleotitlik kısım tüm küçük (“small”) RNA ları, 10-40 nükleotitlik kısım ise mikroRNA bölgesini ifade eder.



Şekil 3.4: Küçük RNA ve mikroRNA’ların elektroferogram görüntüsü.

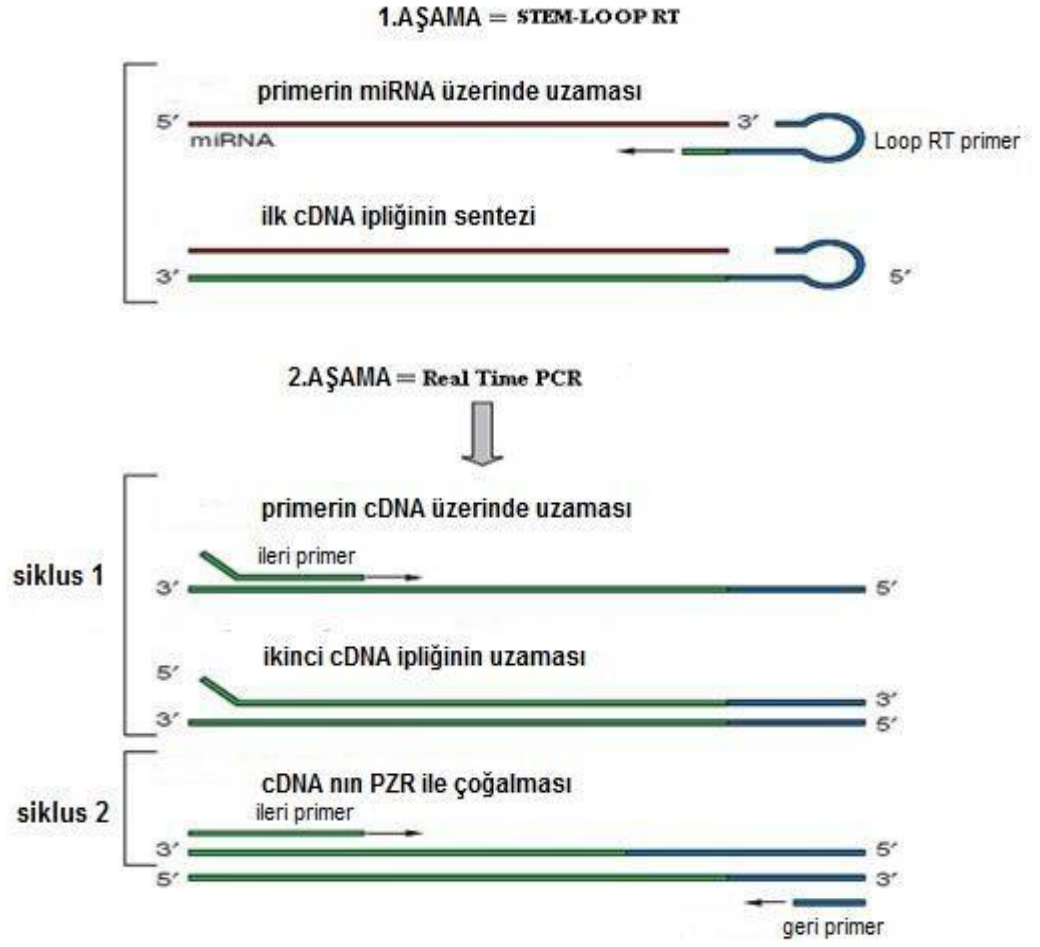
3.5.2. hsa-mir-1183 Ekspresyonunun Belirlenmesi

3.5.2.1. “Stem-loop” Ters Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu (“Stem-loop RT-PZR”)

Genomdaki mikroRNA transkript sayısı az olmamakla birlikte, mikroRNA’ları doğru ve hassas şekilde tespit etmek kısa baz dizilerine sahip olmalarından dolayı oldukça zordur. Bu amaçla, mikroRNA miktarını belirlemede yeni bir yöntem olan ‘Stem-Loop’ Ters Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu hassas bir şekilde mikroRNA gen ekspresyon profilinin tespitine imkan sağlar. “Stem-loop RT-PZR”, olgun mikroRNA’lara özgüdür ve ilgili mikroRNA’lar arasındaki bir nükleotidlik farkı bile ayırt edebilir (Chen ve diğ., 2005).

Teknik 2 aşamada gerçekleştirilir;

- 1- Ters Transkriptaz (“RT”) aşaması: hedeflediğimiz mikroRNA’ya özgü “stem-loop RT primerleri”, hedef mikroRNA molekülüne hibridize olur ve “reverse transkriptaz” enzimi sayesinde cDNA sentez işlemini gerçekleştirir.
- 2- Gerçek Zamanlı PZR aşaması: “RT” ürününden (cDNA), mikroRNA’ya özgü “forward primer” ve “universal reverse primer” kullanılarak ilgili bölgenin amplifiye olması sağlanır (**Şekil 3.5**).



Şekil 3.5: “Stem-loop RT-PZR” yöntemi ile cDNA eldesi ve Gerçek Zamanlı PZR ile mikroRNA kantitasyonu (Varkonyi-Gasic ve diğ., 2007).

3.5.2.2. Stem-loop RT ile cDNA Sentezi

Bu çalışmada “Taqman MicroRNA Revers Transkripsiyon Kiti” kullanıldı. Hedef hsa-mir-1183’e özgü “stem-loop 5X primerler” ile reaksiyon gerçekleştirildi. Konsantrasyonları “Nanodrop” ve Biyoanalizör ile tespit edilen mikroRNA içeren total RNA örneklerinden 5 µl kullanıldı. cDNA sentezinde kullanılan reaksiyon çözeltisi **Tablo 3.1**’de açıklandığı gibi hazırlandı.

Tablo 3.1: mikroRNA spesifik cDNA sentezinde kullanılan reaksiyon karışımı.

Reaksiyon karışımı	Miktar (1 örnek için)
“100 mM dNTP”	0.15µl
“10x Reverse Transcription Buffer”	1.5µl
“MultiScribe™Reverse Transcriptase”	1.00µl
“RNase Inhibitor”	0.19µl
“Nuklease free dH ₂ O”	4.16µl
Toplam hacim	7µl

Her reaksiyon tüpüne 7 µl hazırlanan reaksiyon karışımından eklendi. İzole edilen “total RNA”lardan her tüpe 5 µl ve “5X RT primer”den her örnek için 3 µl eklendi. Toplam hacim 15µl’dir.

Reaksiyon karışımı hazırlandıktan sonra **Tablo 3.2**’de koşulları belirtilen PZR termal döngüsü çalıştırıldı.

Tablo 3.2: cDNA PZR termal döngüsü.

Aşama	Süre	Sıcaklık
Bekleme	30dk	16°C
Bekleme	30dk	42°C
Bekleme	5dk	85°C
Bekleme	∞	4°C

cDNA aşaması hsa-mir-1183 ve “cel-mir-39” için ayrı ayrı hazırlandı. Çünkü her ikisinde kullanılan diziye özgü “stem-loop primerler” farklıdır. Dolayısıyla aynı cDNA basamaklarını içeren işlemler, normalizasyon için kullanılacak olan “cel-mir-39” için de gerçekleştirildi. Reaksiyon sonrası örnekler, Gerçek Zamanlı PZR uygulamasına kadar -20°C’de bekletildi.

3.5.2.3. *Kantitatif Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Gerçek Zamanlı PZR)*

Kantitatif Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu için hsa-mir-1183 ve “cel-mir-39”ün ekspresyonlarının tespit edilmesinde “Taqman MicroRNA Assay” ve “Taqman Universal PCR Master Mix” kullanılmıştır. Üreticinin önerdiği protokole uyulmuştur.

3.5.2.4. *Gerçek Zamanlı PZR Reaksiyonunun Hazırlanması*

Gerçek Zamanlı PZR reaksiyonu için kullanılan “Taqman MicroRNA Assay” (20x) hedef mikroRNA için spesifik prob ve primer dizilerini içerir. PZR reaksiyonu karışımı miktarları **Tablo 3.3**'de belirtilmiştir.

Tablo 3.3: mikroRNA Gerçek Zamanlı PZR’de kullanılan reaksiyon karışımı.

Bileşenler	Miktar (1 örnek için)
“Taqman Small RNA Assay (20x)”	1µl
“Taqman Universal PCR Master Mix (2x)”	10µl
“Nuklease free dH ₂ O”	7,67µl
cDNA örneği	1,33µl
Toplam hacim	20µl

Hazırlanan Gerçek Zamanlı PZR örnekleri “Stratagene” ve “Lightcycler 480 Real-time PZR” cihazlarında **Tablo 3.4**'de gösterilen koşullarda çalışıldı.

Tablo 3.4: Gerçek Zamanlı PZR termal döngüsü.

Aşama			Süre	Sıcaklık
Enzim Aktivasyonu			10 dk	95°C
PZR	40 döngü	Denatürasyon	15 sn	95°C
		Bağlanma	60 sn	60°C

3.5.3. Hedef mRNA'ların Tespiti

3.5.3.1. Ağ Tabanlı Yöntemler ile “in silico” Hedef mRNA Tespiti

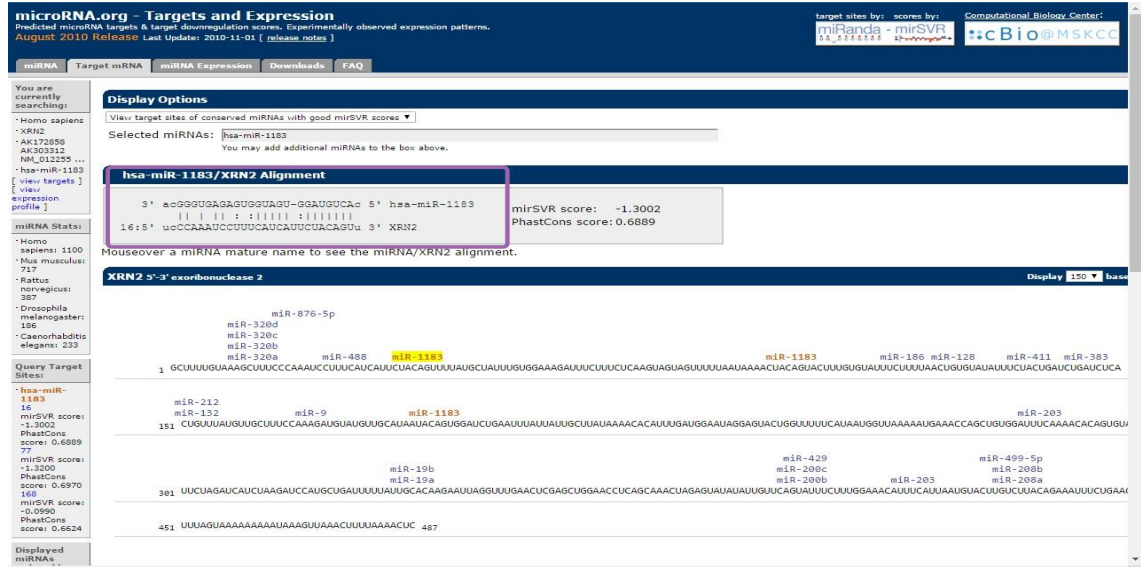
Bu çalışmada hsa-mir-1183'ün hedef mRNA'larını saptamada **Tablo 3.5**'te belirtilen bilgisayar program ve algoritmalarından yararlanılmıştır.

Tablo 3.5: miRNA – hedef mRNA tahmininde kullanılan ağ tabanlı araçlar.

Program	Web sayfası	Geliştiren
miRanda	www.microrna.org	(Betel ve diğ., 2008)
TargetScan	www.targetscan.org	(Lewis ve diğ., 2003)
mirDB	www.mirdb.org	(Wong ve Wang, 2015)
DIANA-microT-CDS	http://diana.imis.athenainnovation.gr/DianaTools/	(Paraskevopoulou ve diğ., 2013; Reczko ve diğ., 2012)
PITA	https://genie.weizmann.ac.il/pubs/mir07/mir07_prediction.html	(Kertesz ve diğ., 2007)
RNAHybrid	www.bibiserv2.cebitec.uni-bielefeld.de/rnahybrid	(Rehmsmeier ve diğ., 2004)

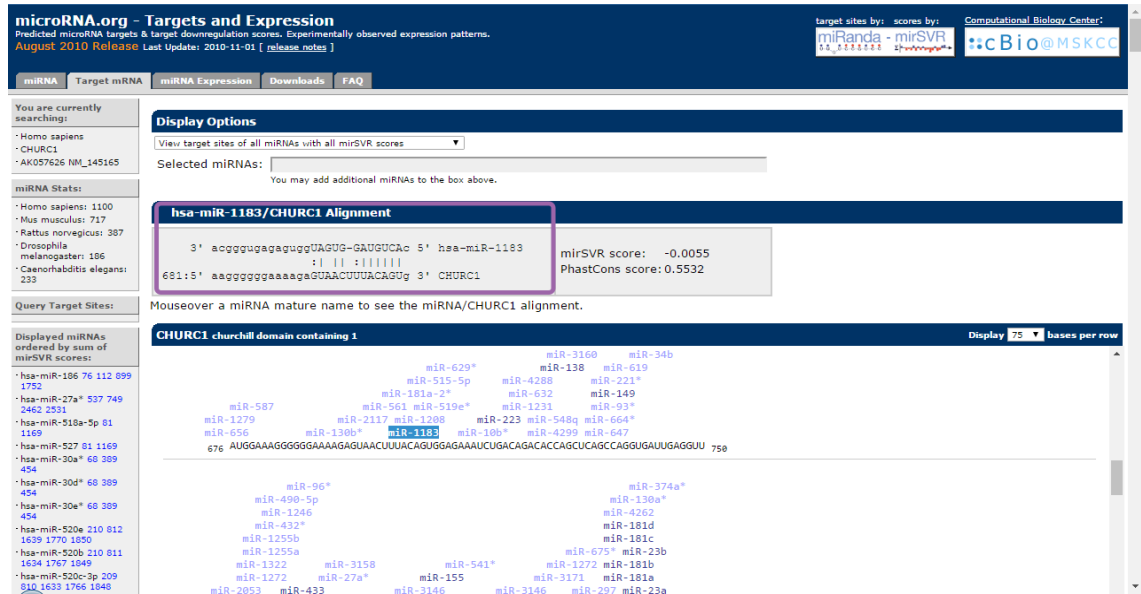
Programlar arasında ortak olarak belirlenen mRNA'lar ve programlardan elde edilen skor değerleri göz önüne alınarak hsa-mir-1183'ün hedeflediği tahmin edilen ***XRN2*** (“5'-3' exoribonuclease 2”) ve ***CHURC1*** (“Churchill domain containing 1”) aday hedef genler olarak seçildi.

miRanda programından yararlanılarak hsa-mir-1183'ün hedeflediği *XRN2* geninin seçimi yapılmış ve Şekil 3.6'da gösterilmiştir.



Şekil 3.6: hsa-mir-1183'ün hedeflediği *XRN2* mRNA'sının web görüntüsü (miRanda).

miRanda programından yararlanılarak hsa-mir-1183'ün hedeflediği *CHURC1* geninin seçimi yapılmış ve Şekil 3.7'de gösterilmiştir.



Şekil 3.7: hsa-mir-1183'ün hedeflediği *CHURC1* mRNA'sının web görüntüsü (miRanda).

TargetScan programından yararlanılarak hsa-mir-1183'ün hedeflediği *XRN2* geninin seçimi yapılmış ve Şekil 3.8'de gösterilmiştir.

TargetScanHuman
Prediction of microRNA targets
Release 7.1: June 2016
Agarwal et al., 2015

Human | miR-1183
3539 transcripts with sites, containing a total of 4617 sites.
Table sorted by cumulative weighted context++ score
The table shows at most one transcript per gene, selected for being the most prevalent, based on 3P-seq tags (or the one with the longest 3' UTR, in case of a tie).
[Download table]

Target gene	Representative transcript	Gene name	Number of 3P-seq tags supporting UTR + 5'	Link to sites in UTRs	Site counts					Representative miRNA	Cumulative weighted context++ score	Total context++ score
					total	8mer	7mer-m8	7mer-A1	6mer sites			
XRN2	ENST00000377191.3	5'-3' exonuclease 2	48	Sites in UTR	2	1	1	0	1	hsa-miR-1183	-0.92	-0.93
BX255923.1	ENST00000354995.3	HDCMB45P: Uncharacterized protein	5	Sites in UTR	2	1	0	1	1	hsa-miR-1183	-0.79	-0.79
MYH8	ENST00000403437.2	myosin, heavy chain 8, skeletal muscle, perinatal	5	Sites in UTR	1	1	0	0	0	hsa-miR-1183	-0.66	-0.66
SUMO4	ENST00000326689.4	small ubiquitin-like modifier 4	5	Sites in UTR	1	1	0	0	0	hsa-miR-1183	-0.65	-0.65
CCDC11	ENST00000398545.4	coiled-coil domain containing 11	5	Sites in UTR	1	1	0	0	0	hsa-miR-1183	-0.63	-0.63
EMC2	ENST00000220853.3	ER membrane protein complex subunit 2	756	Sites in UTR	1	1	0	0	1	hsa-miR-1183	-0.63	-0.67
CNN3	ENST00000370206.4	calponin 3, acidic	4490	Sites in UTR	1	1	0	0	1	hsa-miR-1183	-0.63	-0.63
TTC40	ENST00000368585.3	tetratricopeptide repeat domain 40	5	Sites in UTR	2	1	0	1	0	hsa-miR-1183	-0.61	-0.61
CGA	ENST00000369582.2	glycoprotein hormones, alpha polypeptide	38	Sites in UTR	1	1	0	0	0	hsa-miR-1183	-0.61	-0.61
CXCL11	ENST00000306621.3	chemokine (C-X-C motif) ligand 11	5	Sites in UTR	1	1	0	0	2	hsa-miR-1183	-0.59	-0.59
SMPX	ENST00000379494.3	small muscle protein, X-linked	19	Sites in UTR	1	1	0	0	0	hsa-miR-1183	-0.58	-0.58
NETO1	ENST00000327305.6	neuropilin (NRP) and tolloid (TLL)-like 1	5	Sites in UTR	2	1	1	0	0	hsa-miR-1183	-0.56	-0.57
FUT1	ENST00000310160.3	fucosyltransferase 1 (galactoside 2-alpha-L-fucosyltransferase, H blood group)	17	Sites in UTR	2	1	0	1	1	hsa-miR-1183	-0.55	-0.55
NTF3	ENST00000423158.3	neurotrophin 3	154	Sites in UTR	1	1	0	0	0	hsa-miR-1183	-0.55	-0.55

Bioinformatics and Research Computing
© 2006-2016 Whitehead Institute for Biomedical Research

TargetScan Release 7.1
Questions: wibr-bioinformatics@wi.mit.edu

Whitehead Institute for Biomedical Research
Compatibility

Şekil 3.8: hsa-mir-1183'ün hedeflediği *XRN2* mRNA'sının web görüntüsü (TargetScan).

miRDB programından yararlanılarak hsa-mir-1183'ün hedeflediği *XRN2* geninin seçimi yapılmış ve Şekil 3.9'da gösterilmiştir.

miRDB

MicroRNA and Target Gene Description:

miRNA Name	hsa-miR-1183	miRNA Sequence	CACUGAGGUGAUGGUGAGAGUGGGCA
Target Score	87	Seed Location	36, 95
NCBI Gene ID	22803	GenBank Accession	NM_012255
Gene Symbol	XRN2	3' UTR Length	501
Gene Description	5'-3' exonuclease 2		

3' UTR Sequence

```

1  GCTTTTGTAA AGCTTTCCCA AATCCTTCA TCATTCTACA GTTTATGCT ATTTGTGGAA
61 AGATTCTTTT CTCAGTAGT AGTTTAAAT AAACTACAG TACTTTGTGT ATTCTTTTAA
121 ACTGTGTATA TTTCTACTGA TCTGATCTCA CTGTTTATGT TGCTTTCCAA AGATGTATGT
181 TGCATAATAC AGTGGATCTG AATTATATT TGCTTATAAA ACACATTGGA TGGATAGGGA
241 GTACTGTTT TTCAATATGG TTAATAATGA AACCACTGT GGATTTCAAA ACACAGTGTG
301 TTCTAGATCA TCTAAGATCC ATGCTGATT TTATTGCACA AGAATTAGGT TTGAAGTCGA
361 GCTGGAACCT CAGCAAACTA GAGTATATAT TGTTGAGTAT TTCTTTGGAA ACATTTCATT
421 AATGACTTGT TCTTACAGAA ATTTCTGAAC TTATGTAATA AAAATAAAG TTAACCTTTT
481 AAAACTCAAA AAAAAAATA A

```

Şekil 3.9: hsa-mir-1183'ün hedeflediği *XRN2* mRNA'sının web görüntüsü (miRDB).

DIANA-microT-CDS programından yararlanılarak hsa-mir-1183'ün hedeflediği *XRN2* geninin seçimi yapılmış ve **Şekil 3.10**'da gösterilmiştir.

DIANA TOOLS

Software » MicroT-CDS

Username:

Password:

☐ Remember me next time

Login

[Forgot your password?](#)

• [Sign up for free!](#)
• [or take a tour](#)

Available features for registered users:

- Download databases
- History
- Bookmarks

Login is not required to access the site!

HOME SOFTWARE PUBLICATIONS CONTACT

Search: hsa-mir-1183

Results: 728 targets for miRNAs hsa-mir-1183. Threshold is set to 0.7.

Ensembl Gene Id	miRNA name	miTG score	Also Predicted
1 ENSG00000101972 (STAG2)	hsa-mir-1183	0.997	☐
2 ENSG00000088930 XRN2	hsa-mir-1183	0.996	☐
3 ENSG00000056097 (ZFR)	hsa-mir-1183	0.996	☐
4 ENSG0000001629 (ANKIB1)	hsa-mir-1183	0.995	☐

Gene details

miRNA details

PubMed links: [miRNA](#) | [gene](#) | [both](#)

UCSC graphic

Region	Binding Type	Transcript position	Score	Conservation
UTR3	7mer	14-42	0.0509112803110228	5
UTR3	7mer	73-101	0.028221902098172	7
UTR3	7mer	165-193	0.0141721970492004	9
UTR3	6mer	269-297	0.00689207739993527	6

Şekil 3.10: hsa-mir-1183'ün hedeflediği *XRN2* mRNA'sının web görüntüsü (DIANA-microT-CDS).

PITA programından yararlanılarak hsa-mir-1183'ün hedeflediği *XRN2* geninin seçimi yapılmış ve **Şekil 3.11**'de gösterilmiştir.

Sites Predictions

Organism	RefSeq	Gene Name	microRNA	Position	Seed	dGduplex	dGopen	ddG	Conservation
Human	NM_012255	XRN2	hsa-miR-1183	43	7:0:0	-25.5	-4.41	-21.08	0.98
Human	NM_012255	XRN2	hsa-miR-1183	102	7:0:0	-14.03	-12.95	-1.07	1
Human	NM_012255	XRN2	hsa-miR-1183	194	6:0:0	-16.76	-17.69	0.93	1

Targets Predictions

Organism	RefSeq	Gene Name	microRNA	Sites	Score
Human	NM_012255	XRN2	hsa-miR-1183	3	-21.08

[Click here to submit another search.](#)

Şekil 3.11: hsa-mir-1183'ün hedeflediği *XRN2* mRNA'sının web görüntüsü (PITA).

PITA programından yararlanılarak hsa-mir-1183'ün hedeflediği *CHURC1* geninin seçimi yapılmış ve **Şekil 3.12**'de gösterilmiştir.

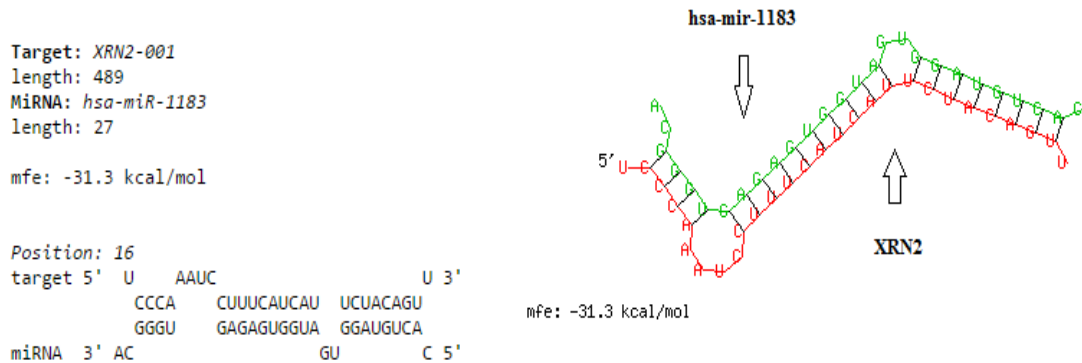
Sites Predictions									
Organism	RefSeq	Gene Name	microRNA	Position	Seed	dGduplex	dGopen	ddG	Conservation
Human	NM_145165	CHURC1	hsa-miR-1183	1113	6:0:0	-13.2	-5.64	-7.55	0.42
Human	NM_145165	CHURC1	hsa-miR-1183	708	6:0:0	-9.31	-11.75	2.44	0.0061

Targets Predictions					
Organism	RefSeq	Gene Name	microRNA	Sites	Score
Human	NM_145165	CHURC1	hsa-miR-1183	2	-7.55

Click [here](#) to submit another search.

Şekil 3.12: hsa-mir-1183'ün hedeflediği *CHURC1* mRNA'sının web görüntüsü (PITA).

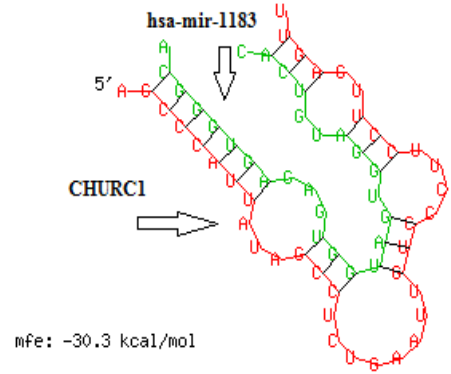
miRNA ve hedef gen mRNA'larının oluşturabileceği heterodupleksler RNAHybrid programı ile saptandı ve minimum serbest enerjileri hesaplandı. hsa-mir-1183/XRN2 heterodupleksinde ortaya çıkan serbest enerji -31.3kcal/mol'dür (**Şekil 3.13**). hsa-mir-1183/CHURC1 heterodupleksinde ise -30.3 kcal/mol serbest enerji hesaplanmıştır (**Şekil 3.14**).



Şekil 3.13: XRN2'nin 3'UTR bölgesi (kırmızı renkli) ve hsa-mir-1183 (yeşil renkli) oluşturabileceği dupleks modeli ve minimum serbest enerji (mfe) miktarı verilmiştir.

Target: *CHURC1-001*
length: 3138
MiRNA: *hsa-mir-1183*
length: 27
mfe: -30.3 kcal/mol
p-value: 1.000000e+00

Position: 2481
target 5' A AUA UCUGAAUU CCUU UG U 3'
GCCCAUU GCC GUC CCU AGU
CGGGUGA UGG UAG GGA UCA
miRNA 3' A GAG U UG C 5'



Şekil 3.14: *CHURC1*'in 3'UTR bölgesi (kırmızı renkli) ve *hsa-mir-1183* (yeşil renkli) oluşturabileceği dupleks modeli ve minimum serbest enerji (mfe) miktarı verilmiştir.

3.5.4. Hedef mRNA'ların Ekspresyonlarının Belirlenmesi

3.5.4.1. cDNA Sentezi

Hedef genlerin ekspresyonları belirlenirken cDNA sentez aşamasında kullanılacak her RNA örneğinden 5 µl alınarak 65°C'de 10 dk. bekletildi. Ardından örnekler buza alındı ve **Tablo 3.6**'da detayları verilen reaksiyon karışımı hazırlandı.

Tablo 3.6: cDNA reaksiyon karışımındaki bileşenler ve miktarları.

Bileşenler	Final konsantrasyon	cDNA reaksiyon karışımı
"5x M-MLV buffer" ("Invitrogen")	1,9x	380 µl
0,1 mM DTT ("Invitrogen")	1,9mM	19 µl
"25mm dNTP mix" ("Invitrogen")	1,9mM	76 µl
5mg/ml pdN6 ("Roche")	0,2mg	40 µl
dH2O		372 µl
Toplam Hacim		887 µL

887 µl'lik cDNA reaksiyon karışımı 285 µl lik 3 adet alikoda ayrılıp -20°C de saklandı. Kullanım esnasında alikotlardan biri alınarak üzerine 18µl "M-MLV RT" ("Invitrogen") ve 9 µl "RNase Inhibitor" ("Fermentas") eklendi. Hazırlanmış olan cDNA sentez karışımı RNA örneklerine 5 µl olacak şekilde dağıtıldı. Toplam cDNA hacmi 10µl oldu. cDNA

sentezi reaksiyonu için gerekli PZR koşulları **Tablo 3.7**'de verilmiştir (Gerard ve diğ., 2002).

Tablo 3.7: cDNA PZR termal döngüsü.

Aşama	Süre	Sıcaklık
Bekleme	10dk	65°C
Bekleme	120dk	37°C
Bekleme	5dk	65°C
Bekleme	∞	4°C

3.5.4.2. *XRN2* ve *CHURC1* Ekspresyonu için “RT-qPZR”

Hedef mRNA ekspresyonları belirlenirken hidroliz prob çalışma prensibine dayanan “UPL” (“Universal Probe Library”) problemleri kullanılmıştır. “UPL” hidroliz problemleri DNA’ya komplementer olan ve floresan boya ile işaretlenmiş tek zincirli yapılardır. Probun 5' ucunda floresan işaretli boya (“FAM”) 3' ucunda ise susturucu boya bulunur. “UPL” problemleri 8-9 nükleotidlik seçici dizilere sahiptir. Probun seçiciliğini ve erime sıcaklığını (T_m) optimum düzeyde sağlamak için “LNA” (“Locked Nucleic Acids”) denilen DNA nükleotid analog dizileri her “UPL” proba birleşik bir yapı oluşturur. Sonuç olarak oluşturulan “UPL” prob dizileri transkriptomda en yaygın karşılaşılan dizilere göre ayarlanır ve istenilen transkriptomdaki tüm transkriptleri optimal düzeyde kapsar (**Şekil 3.15**).



Şekil 3.15: “UPL” problemlerde 9-mer’lik dizilerin görülme sıklığı.

Prob hedef DNA’ya bağlanma durumunda floresan sinyal ölçümü düşüktür. Amplifikasyon başladıktan sonra, primer bağlanma bölgeleri arasında bulunan hidroliz problemler hedef diziye bağlanır. Probun bağlı olduğu bölgeye gelindiğinde Taq DNA Polimeraz enzimi 5'→3' nükleaz aktivitesi ile “FAM”ı probdan ayırır. Serbest hale geçen “FAM” sinyal oluşturur. Her bir P Z R döngüsünde ürün amplifikasyonu oldukça floresan salınımı da bu artışa bağlı olarak devam eder.

Bu çalışmada *XRN2* hedef geni için “UPL32”, *CHURC1* geni için ise “UPL80” no’lu problemler kullanılmıştır. Prob ve primer dizaynları, aşağıda linki verilen (<https://lifescience.roche.com/shop/CategoryDisplay?catalogId=10001&tab=Assay+Design+Center&identifier=Universal+Probe+Library&langId=-1>) “UPL Assay Design Center” sayfasından, hedef genlerin dizileri “input” dizisi şeklinde sisteme yüklenerek belirlenmiştir. Belirlenen “input” dizileri “Ensembl Genome Browser” ve “National Center for Biotechnology Information (NCBI)” veri tabanlarından uygun transkript seçilerek belirlenmiştir. Her iki gene ait prob ve primer dizileri **Şekil 3.16** ve **Şekil 3.17**’de gösterilmiştir.

ENST00000377191.3|ENSG00000088930.6 XRN2-001 5'-3' exoribonuclease 2 [Source:HGNC Symbol;Acc:12836]

Assay rank 1

Use probe **#32** (cat. no. 04687655001)

Primer	Length	Position	Tm	%GC	Sequence
Left	21	2725 - 2745	59	48	agcagcaaaggtttgacagag
Right	18	2774 - 2791	60	56	gtttgcagcatccgggttc
Amplicon (67 nt)					
agcagcaaaggtttgacagagggcgttggggctgaacctctgctcccatggaaccggatgctgcaaac					

Şekil 3.16: XRN2 hedef transkriptine bağlanacak UPL Prob32 ve primer dizileri.

NM_145165.3 Homo sapiens churchill domain containing 1 (CHURC1), transcript variant 1, mRNA

Assay rank 1

Use probe **#80** (cat. no. 04689038001)

Primer	Length	Position	Tm	%GC	Sequence
Left	20	110 - 129	60	55	ggacattccctgttgactgc
Right	22	207 - 228	59	45	tgcacagcctgtaaagttcagt
Amplicon (119 nt)					
ggacattccctgttgactgcgtcgcatgtgtggcgactgtgtggagaaggaatatcccaaccgggtaataacctgctggagaatgga					
tcttttactgaactttacaggctgtgca					

Şekil 3.17: CHURC1 hedef transkriptine bağlanacak UPL Prob80 ve primer dizileri.

Hedef gen ekspresyonlarının belirlenmesinde referans (“housekeeping”) gen olarak *GAPDH* (“glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase”) geni kullanılmıştır.

Gerçek Zamanlı PZR (“RT-qPZR”) aşamasında kullanılan reaksiyon karışımı **Tablo 3.8**’de gösterildiği gibidir. Bu karışıma 2 µl cDNA örneği eklenerek toplam hacim 10 µl olacak şekilde çalışılmıştır.

Tablo 3.8: Gerçek Zamanlı PZR’de kullanılan reaksiyon karışımı.

Reaksiyon Karışımı	Hacim
İleri ve geri primerlerden (5uM)	1 µl
UPL prob (0.5uM)	0,2 µl
LightCycler480 prob reaksiyon karışımı (5X)	5 µl
RNaz içermeyen distile su	1,8 µl
cDNA	2 µl
Toplam	10 µl

Hazırlanan bu karışım ve cDNA örnekleri LightCycler 480 (“Roche”) cihazına uygun, “96 well plate” lere yüklendi. İnkübasyon 95°C de 10 dk., amplifikasyon 95°C de 15 sn. ve 60°C de 1 dk. 40 döngü olarak gerçekleştirildi.

3.5.5. İstatiksel Analiz

Preeklampsi hastalarının ve kontrol grubunu oluşturan gebelerin mikroRNA ve hedef gen ekspresyon seviyeleri “RT-qPCR” cihazından elde edilen Ct değerlerine göre delta-delta Ct ($\Delta\Delta Ct$) methoduyla Microsoft Office 2010’da hesaplandı. Elde edilen verilerin “Graphpad Prism version 6.0” programı ile istatiksel analizleri yapıldı.

Hem mikroRNA hem mRNA ekspresyon düzeyleri gruplar arasında rölatif olarak karşılaştırıldı. Ekspresyon verileri Gauss dağılımına uymadığı için non-parametrik istatiksel bir metot olan “Mann-Whitney test” ile değerlendirildi. $p<0.05$ istatiksel olarak anlamlı kabul edildi.

hsa-mir-1183 ve hedef genlerinin korelasyon analizleri “Pearson testi” ile değerlendirildi. Bu testte $p<0.05$ istatiksel olarak anlamlı kabul edildi.

“ROC” eğrisi analizleri bu çalışmada, hasta ve sağlıklı bireyleri doğru olarak ayırt etmede kullanıldı, değişkenlere ne ölçüde güvenebileceğimizi gösteren bir istatistik metodu olarak seçildi. “ROC” eğrisi analizleri, %95 güven aralığında gerçekleştirildi. Analiz sonucunda “ROC” eğrisi altında kalan alan (“AUC”) hesaplanarak, $p<0.05$ istatiksel olarak anlamlı kabul edildi. Tüm istatiksel hesaplamalar ve grafikler “Graphpad Prism version 6.0” programında yapıldı.

4. BULGULAR

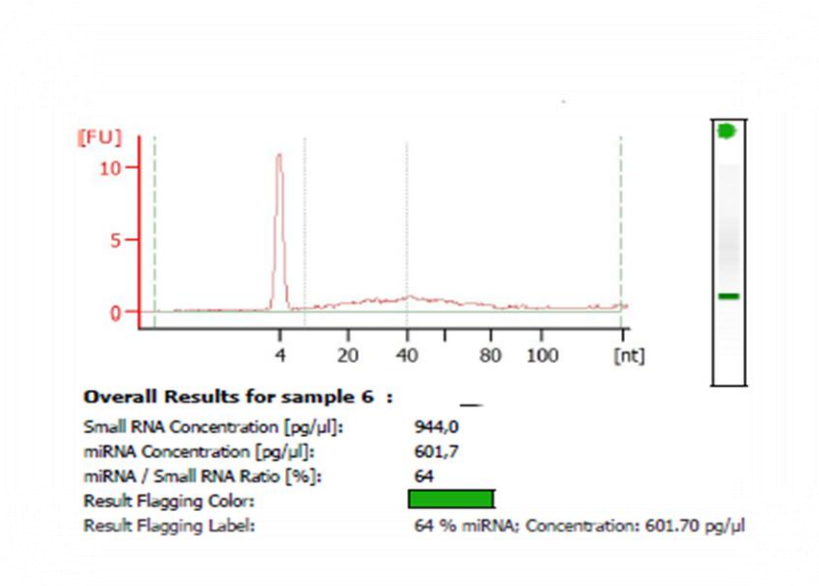
4.1. mikroRNA VE RNA ÖRNEKLERİNDE MİKTAR VE KALİTE TAYİNİ

Maternal plazmadan elde edilen mikroRNA örneklerinin ilk değerlendirmesi “NanoDrop” spektrofotometre (“Thermo Scientific”) cihazında yapıldı. Mikrolitrede bulunan konsantrasyonları ve 260, 280 nm dalga boyundaki absorbands değerleri **Tablo 4.1**’de gösterilmiştir.

Tablo 4.1: Preeklampsi ve kontrol plazma mikroRNA örneklerinin kalite ve kantitite sonuçları.

PREEKLAMPSİ			KONTROL		
Örnek No	ng/µl	260/280	Örnek No	ng/µl	260/280
1	13,5	1,49	1	4,9	1,30
2	16	1,51	2	5,9	1,16
3	9,2	1,51	3	7,8	0,88
4	7,2	1,01	4	13,5	1,33
5	5,7	1,03	5	9,2	0,92
6	4,8	1,06	6	4,6	1,09
7	3,5	1,49	7	17,5	1,48
8	3,2	1,37	8	8,2	1,74
9	9,4	0,95	9	16	1,30
10	7,1	1,62	10	14,2	1,43
11	3,3	1,47	11	9,9	0,79
12	13,2	1,51	12	7,8	0,72
13	4,7	1,31	13	16,5	1,03
14	5,8	0,91	14	7,9	0,83
15	4	0,95	15	9,4	0,93
16	7,7	1,43	16	Elde edilemedi	*
17	11,2	1,51	17	Elde edilemedi	*
18	9,5	1,23	18	Elde edilemedi	*

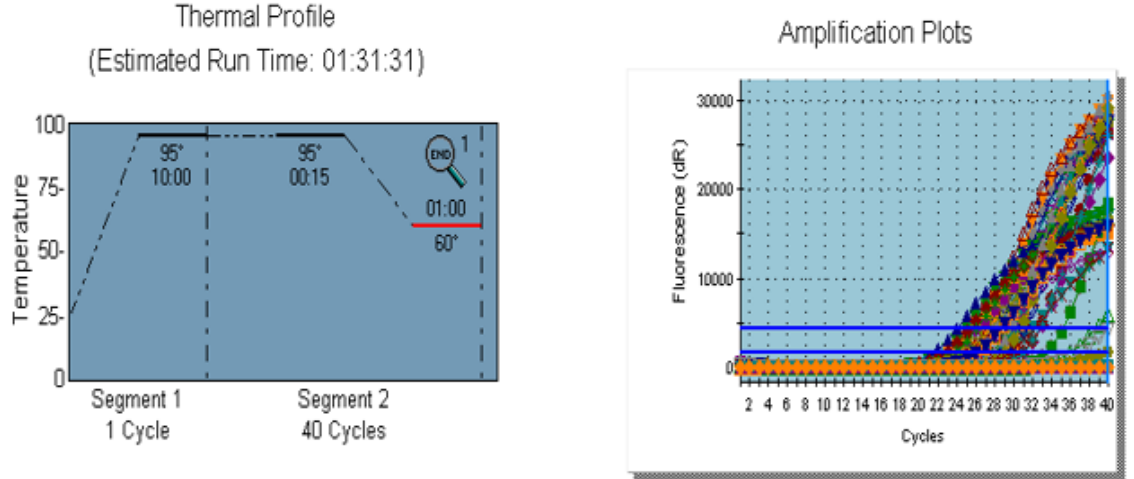
Maternal plazmada dolaşımda bulunan mikroRNA'ların düşük konsantrasyonda var olması beklenen bir durumdur. Dolayısıyla hücre içinde bulunmayan bu mikroRNA'ların daha hassas bir yöntem olan biyoanalizör ("Agilent") cihazı ile kalite tayini yapılmıştır (Şekil 4.1). Örnekler incelenirken yöntem kısmında anlatılan kriterler dikkate alınmış ve kriterlere uymayan örnekler çalışmaya dahil edilmemiştir.



Şekil 4.1: Bir hastaya ait mikroRNA örneğinin biyoanalizör cihazındaki ölçüm sonucu. Kullanılan çip örnek içinde bulunan tüm küçük RNA konsantrasyonunu ve mikroRNA'ların bu konsantrasyon içindeki yüzde değerini verir (bu örnekte tüm küçük RNA'lar içindeki mikroRNA oranı %64 ve konsantrasyonu 601.7 pg/μl'dir).

4.2. HSA-MİR-1183 EKSPRESYONUNUN BELİRLENMESİ

Preeklampsi hastaları ve kontrol grubunu oluşturan sağlıklı gebe örneklerinde hsa-mir-1183 ekspresyonunun belirlenebilmesi için mir-1183 için spesifik "stem-loop primer" ve "Taqman prob" kullanıldı. Örnekler arası normalizasyonu sağlamak için "*cel-mir-39*" sentetik mikroRNA kullanıldı. Örneklerle ait Ct değerleri "Stratagene" cihazında otomatik olarak belirlendi (Şekil 4.2). hsa-mir-1183 ekspresyon düzeyi delta-delta Ct ($\Delta\Delta Ct$) metoduna göre hesaplandı (Livak ve Schmittgen, 2001).



Şekil 4.2: hsa-mir-1183'ün RT-qPCR'deki termal profili ve Ct değerlerini gösteren amplifikasyon eğrisi.

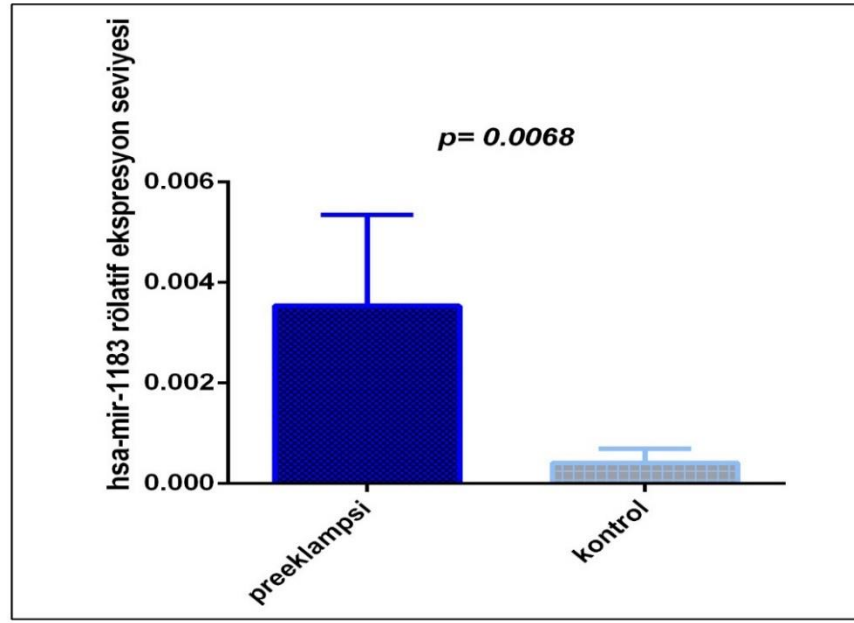
hsa-mir-1183 ekspresyonu için hesaplanan kat değişimi 5,62 olarak hesaplanmış ve p değeri ile birlikte gösterilmiştir (**Tablo 4.2**).

Tablo 4.2: Maternal plazmada anlatımı anlamlı şekilde değişen hsa-mir-1183'ün RT-qPCR sonucu.

miRNA Adı	Ekspresyon	KD*	p Değeri
hsa-mir-1183	Artan	5.62	0.0068

*KD: Kat değişimi

hsa-mir-1183'ün ekspresyon düzeyi preeklampsi hastalarında sağlıklı gebelere oranla daha yüksek bulundu. Bu fark non-parametrik “Mann-Whitney testi” ile değerlendirildiğinde istatistiksel olarak yüksek anlamlılık olduğu görüldü ($p=0.0068$) (**Şekil 4.3**).



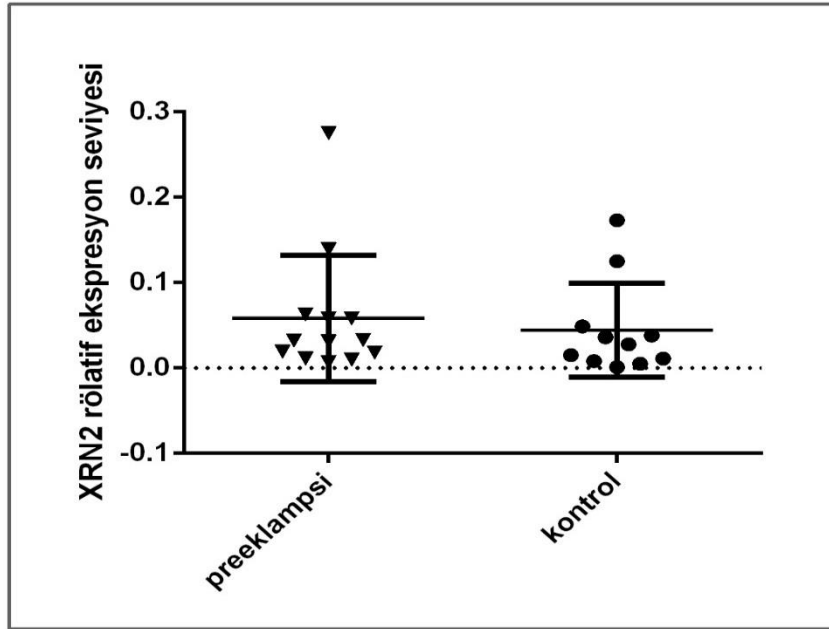
Şekil 4.3: Preeklampsi hasta grubu ve kontrol örneklerindeki rölatif hsa-mir-1183' n ekspresyon seviyesi. "Mann-Whitney test").

4.3. HEDEF mRNA EKSPRESYONLARININ BELİRLENMESİ

Ağ tabanlı yöntemler kullanılarak hsa-mir-1183' n hedeflediği tahmin edilen mRNA'lar belirlendi. Farklı algoritmalarda ortak olarak bulunan, yüksek komplementerlik gösteren ve bugüne dek literatürde preeklampsi hastalığı ile ili kilendirilmemi  olan *XRN2* ("5'-3' exoribonuclease 2") ve *CHURC1* ("Curlin domain containing 1") genleri hedef genler olarak seçilmiştir. *XRN2* ve *CHURC1* gen ekspresyon düzeylerinin belirlenmesi için farklı bir hasta ve kontrol grubu kullanıldı.

4.3.1. Preeklampsia Hastalarında *XRN2* (“5’-3’ exoribonuclease 2”) Ekspresyonu

XRN2 ekspresyonunun belirlenmesine yönelik yapılan “RT-qPCR” çalışmasında referans (“housekeeping”) gen olarak GAPDH (“glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase”) kullanıldı. *XRN2* ekspresyonunun düzeyi $\Delta\Delta Ct$ yöntemine göre hesaplandı (Livak ve Schmittgen, 2001). *XRN2* genine ait ekspresyon seviyeleri, preeklampsia ve sağlıklı gebe örneklerinde non-parametrik “Mann-Whitney test” ile değerlendirildiğinde, sağlıklı gebelerde ekspresyon seviyesi istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı (Şekil 4.4).



Şekil 4.4: Preeklampsia hasta grubu ve kontrol örneklerindeki rölatif *XRN2* geni ekspresyon seviyesi ($p = 0.4671$, “Mann-Whitney test”).

4.3.2. Preeklampsia Hastalarında *CHURC1* (“Churchill domain containing 1”) Ekspresyonu

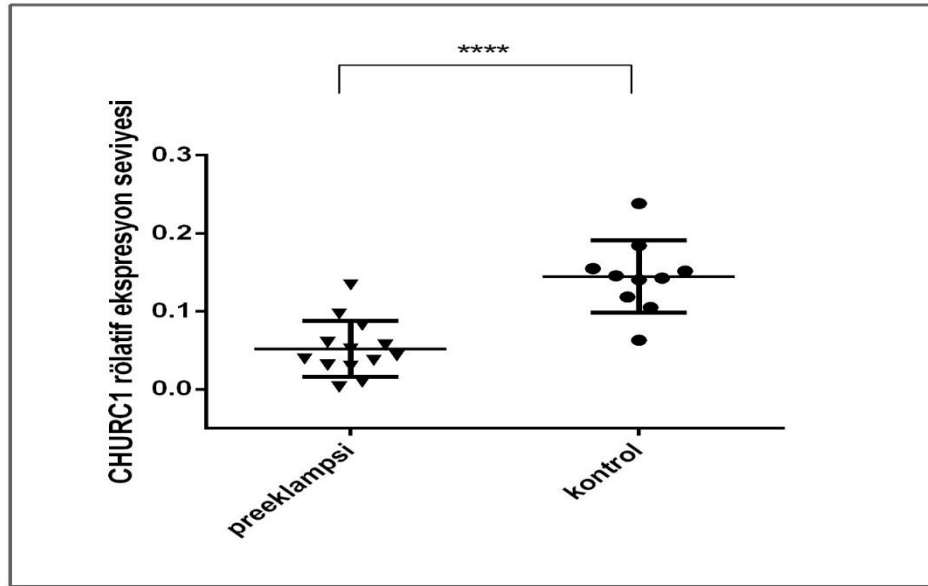
CHURC1 ekspresyonunun belirlenmesine yönelik yapılan “RT-qPCR” çalışmasında referans (“housekeeping”) gen olarak GAPDH (“glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase”) kullanıldı. *CHURC1* ekspresyonunun düzeyi $\Delta\Delta Ct$ yöntemine göre hesaplandı (Livak ve Schmittgen, 2001). Bu gene ait ekspresyondaki kat değişimi ve p değeri **Tablo 4.3**’de verilmiştir.

Tablo 4.3: Maternal plazmada anlatımı anlamlı şekilde değişen *CHURC1*'in RT-qPZR sonucu.

Gen Adı	Ekspresyon	KD*	p Değeri
CHURC1	Azalan	-3.64	<0.0001

*KD: Kat değişimi

CHURC1 genine ait ekspresyon seviyeleri, preeklampsi ve sağlıklı gebe örneklerinde non-parametrik “Mann-Whitney test” ile değerlendirildiğinde, preeklampsi hastalarında ekspresyon seviyesinin sağlıklı gebelere kıyasla anlamlı düzeyde azaldığı tespit edildi ($p<0.0001$) (Şekil 4.5).

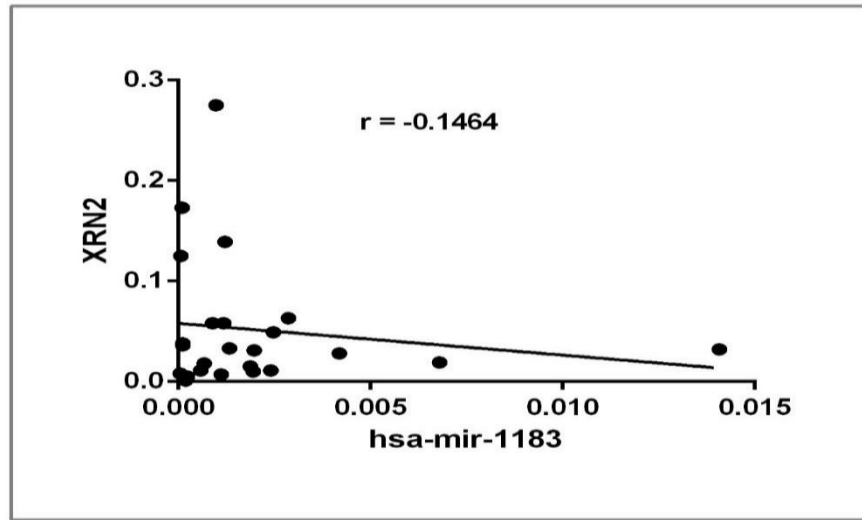
**Şekil 4.5:** Preeklampsi hasta grubu ve kontrol örneklerindeki *CHURC1* geni rölafif ekspresyon seviyesi (**** $p<0.0001$, “Mann-Whitney test”).

4.4. HEDEF mRNA’LAR VE hsa-mir-1183 ARASINDAKİ KORELASYON İLİŞKİSİ

Değişkenler arasındaki ilişkinin tekdüze (“monotonic”) olmadığı varsayımından hareketle “Pearson” korelasyonu kullanılmıştır.

4.4.1. has-mir-1183 ve *XRN2* Ekspresyonları Arasındaki Korelasyon

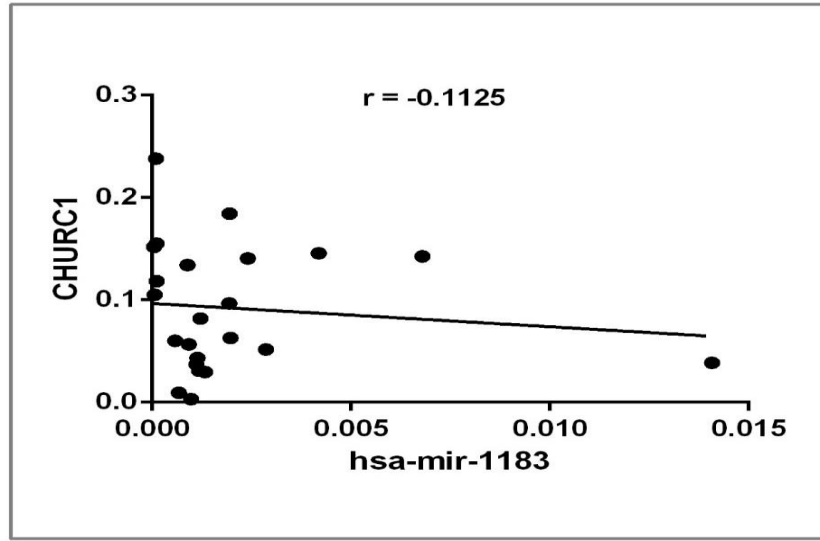
hsa-mir-1183'ün hedeflediği tahmin edilen *XRN2* geninde ekspresyon düzeyleri ile hsa-mir-1183 ekspresyon düzeyleri arasındaki bağlantı “Pearson” korelasyon testiyle değerlendirildi. Tüm hasta ve sağlıklı kontrollerdeki *XRN2* ve hsa-mir-1183 ekspresyonlarının ters yönde ($r = -0.1464$) korelasyon gösterdiği fakat %95 güven aralığında istatistiksel olarak anlamlı olmadığı tespit edildi ($p=0.4949$) (Şekil 4.6).



Şekil 4.6: Preeklampsi hastaları ve sağlıklı gebelerdeki *XRN2* ve hsa-miR-1183 ekspresyon değerleri arasındaki negatif korelasyon ilişkisi. ($p=0.4949$, “Pearson test”).

4.4.2. hsa-mir-1183 ve *CHURC1* Ekspresyonları Arasındaki Korelasyon

hsa-mir-1183 ve hsa-mir-1183'ün hedefi olarak seçilen *CHURC1* genlerinin ekspresyon düzeyleri arasındaki korelasyon ilişkisi “Pearson” korelasyonu ile değerlendirildi. Tüm hasta ve sağlıklı kontrollerdeki *CHURC1* ve hsa-mir-1183 ekspresyonlarının ters yönde ($r = -0.1125$) korelasyon gösterdiği buna karşın %95 güven aralığında istatistiksel olarak anlamlı olmadığı tespit edildi ($p=0,6092$) (Şekil 4.7).

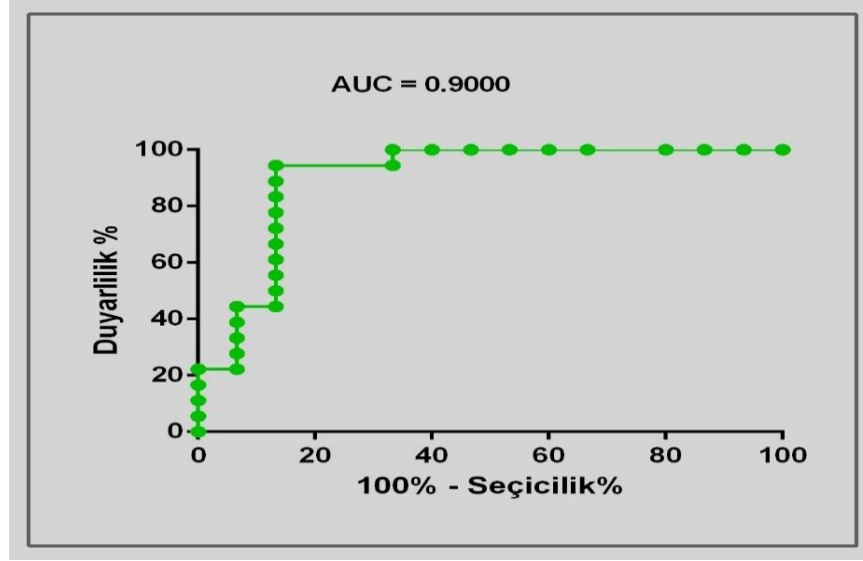


Şekil 4.7: Preeklampsi hastaları ve sağlıklı gebelerdeki *CHURC1* ve *hsa-miR-1183* ekspresyon değerleri arasındaki korelasyon ilişkisi ($p=0,6092$, “Pearson test”).

4.5. “ROC” EĞRİSİ ANALİZLERİ

4.5.1. *hsa-mir-1183* için “ROC” Analizi

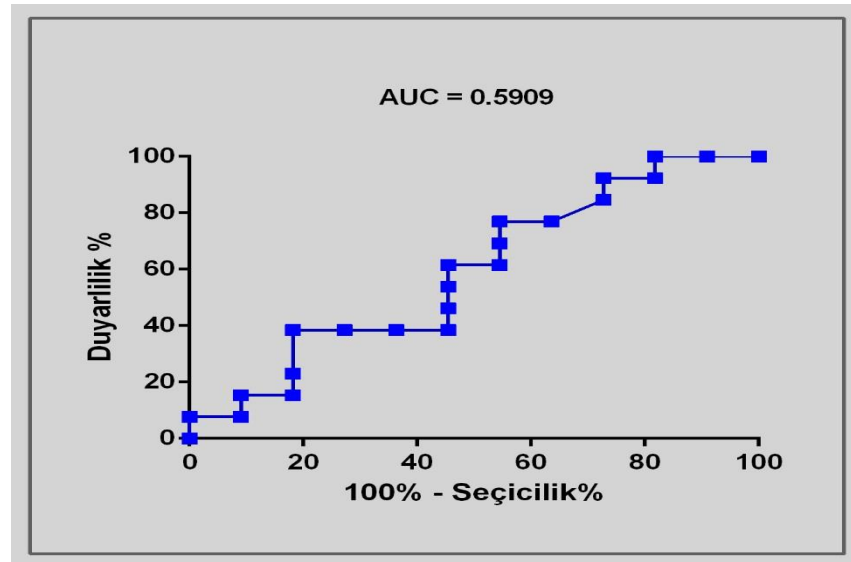
Preeklampsi hastaları ve sağlıklı kontrol örnekleri, *hsa-mir-1183* biyobelirteci açısından doğru ayırım yaparak değerlendirilebilir mi sorusundan hareketle “ROC” analizi yapılmıştır. Analiz sonucunda, eğrinin altında kalan alan (“AUC”) 0.9000 gibi yüksek bir değer çıkmış ve ayırım istatistiksel olarak oldukça anlamlı bulunmuştur ($p<0.0001$) (Şekil 4.8).



Şekil 4.8: hsa-mir-1183 için “ROC” analizi (%95 güven aralığında, $p < 0.0001$).

4.5.2. *XRN2* Hedef Geninin “ROC” Analizi

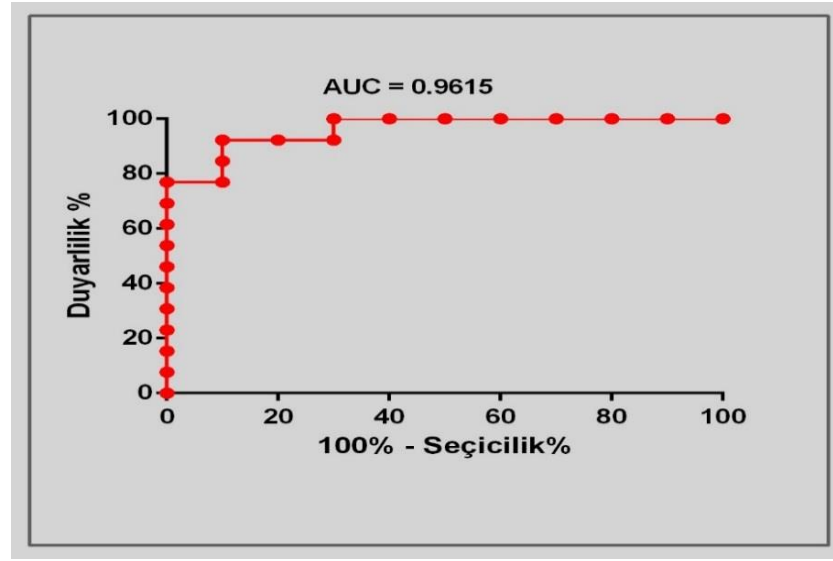
Preeklampsi hastaları ve sağlıklı kontrol örnekleri, *XRN2* biyobelirteci açısından doğru ayırım yaparak değerlendirilebilir mi sorusundan hareketle “ROC” analizi yapılmıştır. Analiz sonucu eğrinin altında kalan alan (“AUC”) 0.5909’dur. Bu biyobelirteç açısından yapılan ayırım istatistiksel olarak anlamlı bulunamamıştır ($p=0.4514$) (Şekil 4.9).



Şekil 4.9: *XRN2* geni için “ROC” analizi (%95 güven aralığında, $p=0.4514$).

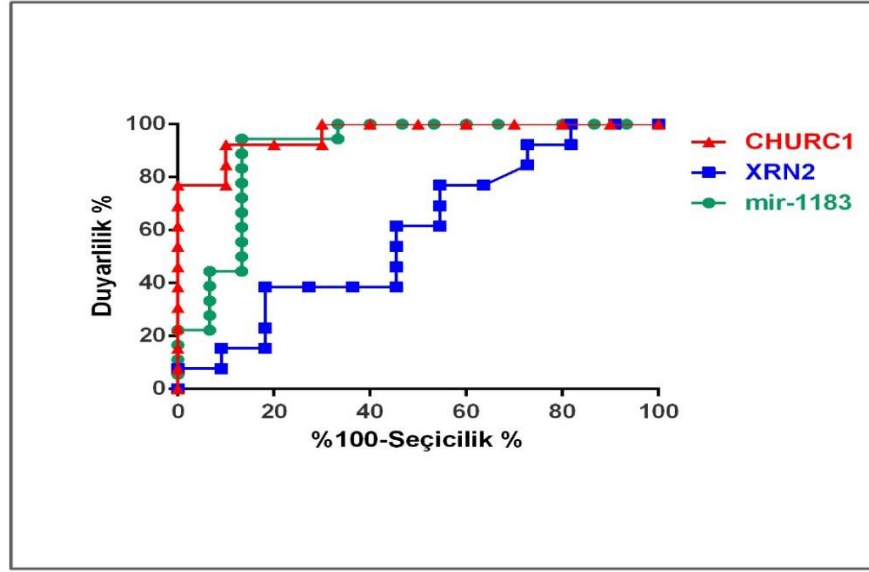
4.5.3. *CHURC1* Hedef Geninin “ROC” Analizi

Preeklampsi hastaları ve sağlıklı kontrol örnekleri, *CHURC1* biyobelirteci açısından doğru ayırım yaparak değerlendirilebilir mi sorusundan hareketle “ROC” analizi yapılmıştır. Analiz sonucu eğrinin altında kalan alan (“AUC”) 0.9615’dir. Bu değer, testin bu biyobelirteç açısından oldukça yüksek bir ayırım gücüne sahip olduğunu gösterir ve istatistiksel olarak oldukça anlamlı bulunmuştur ($p=0.0002$) (Şekil 4.10).



Şekil 4.10: *CHURC1* geni için “ROC” analizi (%95 güven aralığında, $p=0.0002$).

Bu çalışma kapsamında preeklampsi hastaları ve kontrol grubu olarak kullanılan sağlıklı gebe örneklerinde çalışılan mir-1183 ve aday hedef genleri *XRN2* ve *CHURC1*’in “ROC” analiz eğrileri toplu olarak Şekil 4.11’de gösterilmiştir. Bu sonuçlar, hastaları kontrollerden ayırt etmede *CHURC1*’in oldukça yüksek bir duyarlılığa sahip olduğunu, has-mir-1183’ün de istatistiksel olarak da anlamlı bir şekilde doğru pozitif örnekleri yanlış pozitiflerden ayırabildiğini göstermektedir. Hem hsa-mir-1183 hem de *CHURC1* PE tanısı için biyobelirteç olarak kullanılmak üzere, örneklem grubumuzda, önemli kanıtlar sunmaktadır.



Şekil 4.11: hsa-mir-1183, XRN2 ve CHURC1 genleri için “ROC” analizi bir arada gösterilmiştir.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Preeklampsi, gebeliğin 20. haftasından sonra ortaya çıkan, etiyolojisi ve patogenezi henüz net olarak açıklanamayan, gebeliğe özgü multisistemik bir hastalıktır. Maternal mortalite ve morbiditenin, fetal gelişme geriliğinin önde gelen nedenlerinden biridir. Gebelik sürecinde plasenta gelişimi ve fonksiyonunda rol oynayan genlerin ekspresyonları epigenetik düzenlemeler; DNA metilasyonu, kromatin histon modifikasyonu ve kodlanmayan düzenleyici RNA'lar aracılığı ile gerçekleştirilmektedir (Uuskula ve diğ., 2012).

MikroRNA'lar translasyonun inhibisyonu, mRNA'nın yıkımı ve nadiren post transkripsiyonel olarak genlerin aktifleşmesinde görev alırlar (Vasudevan, 2012). Yapılan çalışmalarda miRNA'ların gebelik dönemi süresince plasenta tarafından da üretildiği gösterilmiştir. Plasenta tarafından eksprese edilen miRNA'lar plasenta gelişimi ile ilişkili sinyal yollarında rol alırken, bozulan miRNA ekspresyonu hipoksi gibi patolojilerle ilişkili bulunmuştur (Ji ve diğ., 2013; Donker ve diğ., 2007). Dolaşımda bulunan serbest miRNA ekspresyon profilinin gebelikle ilişkili birçok komplikasyonda değişmesi, bu moleküllerin birer biyobelirteç olarak kullanılabileceği savını ortaya koymuştur (Chim ve diğ., 2008; Mouillet ve diğ., 2015).

Yapılan mikrodizin çalışmamız sonucunda preeklampsi hastalığı ile ilişkili olabileceği düşünülen miRNA'lardan hsa-mir-1183 geni hedef olarak seçilmiştir. Bu tez çalışması kapsamında öncelikle, preeklampsi hastaları ve sağlıklı gebelerin maternal plazma örneklerinde serbest dolaşan hsa-mir-1183 ekspresyon düzeyleri RT-qPCR yöntemi kullanılarak belirlenmiştir. Ekspresyon analizleri sonucunda, maternal plazmada serbest dolaşan hsa-mir-1183'ün PE hastalarındaki ekspresyonunun sağlıklı gebelere oranla anlamlı derecede yüksek olduğu belirlenmiştir (**Şekil 4.3**). Yapılan literatür araştırmasında hsa-mir-1183 ile ilişkili sınırlı sayıda çalışmaya rastlanmıştır. 2015 yılında Li ve diğ. tarafından yapılan ve 50 romatizmal kalp hastası, 50 kontrol örneğinin dahil edildiği çalışmada, plazma örneklerine ait miRNA mikrodizin verileri karşılaştırılmış ve romatizmal kalp hastalığına sekonder pulmoner hipertansiyonun eşlik ettiği hastalarda artmış hsa-mir-1183 ekspresyonu tespit edilmiştir. Hsa-mir-1183'in hedefi olabilecek genleri belirlemek için yapılan ağ tabanlı tahmin analizleri sonucunda ise, *CXCR4* ("C-X-C chemokine receptor 4"), *EGF* ("epidermal growth factor"), and *EGFR* ("epidermal

growth factor receptor”) genleri olası hsa-mir-1183’ün hedefi olarak tanımlanmıştır (Li ve diğ., 2015). Liao ve diğ. tarafından yapılan başka bir çalışmada, ROCK2 (“Rho-associated kinases2”) geninin 3’UTR bölgesinde tanımlanan rs978906 polimorfizm varlığının hsa-mir-1183’ün ROCK2 ye bağlanmasını engelleyerek damar sertliğine (“arterial stiffness”) yol açtığı gösterilmiştir. Çalışmanın *in vivo* ayağında, hsa-mir-1183 ekspresyonu baskılandığında, Rock2 ekspresyonunun arttığı belirlenmiştir. Bu doğrultuda, ROCK2 ilişkili kardiyovasküler hastalıklarda terapötik amaçlı olarak hsa-mir-1183 ekspresyon düzeyinin arttırılabileceği öne sürülmüştür (Liao ve diğ., 2015). Ark ve diğ. tarafından yapılan bir diğer çalışmada, preeklampitik gebelerde ROCK2 gen ekspresyonu çalışılmış ve kontrollere kıyasla artmış ekspresyon belirlenmiştir. Gene bu çalışmada ROCK2’nin sinsitiyotrofoblastlarda lokalize olduğu gösterilerek preeklampsisi hastalığında rho/rho kinaz yolağının çalışılmasının hastalığın patogenezine ışık tutabileceği tartışılmıştır (Ark ve diğ., 2005). Hem literatür hem de çalışma bulgularımız, artmış hsa-mir-1183 ekspresyonunun preeklampsisi hastalığının gelişmesinde rol oynayabileceğini desteklemektedir.

Bir miRNA’nın birden çok hedef geni regüle edebildiği bilinmektedir. hsa-mir-1183 ekspresyonunun preeklampsilerde artmış olarak bulunmasının ardından, çalışmamızın ikinci aşamasında hsa-mir-1183’in hedefi olabilecek genler ağ tabanlı araçlar (miRanda, TargetScan, mirDB, Diana-microT-CDS, PITA, RNAHybrid) kullanılarak analiz edilmiştir. *in silico* analizler sonucunda *XRN2* ve *CHURC1* genleri hsa-mir-1183’nin aday hedefleri olarak seçilmiştir. Kontrol ve preeklampsisi örnekleri *XRN2* ve *CHURC1* ekspresyonları açısından karşılaştırıldığında, *XRN2* ekspresyonu açısından anlamlı bir fark belirlenmez iken preeklampsilerde *CHURC1* gen ekspresyonunun anlamlı düzeyde azaldığı tespit edilmiştir.

Hsa-mir-1183’ün aday hedef genlerinden biri olan ve bu çalışma kapsamında incelenen *XRN2* gen ekspresyon farklılığı, PE ve kontrol grubunda istatistiksel anlamlılık göstermemiştir ($p=0.4671$) (Şekil 4.4). Yapılan korelasyon analizinde de bu bulgumuza paralel olarak istatistiksel anlamlılık bulunamamıştır (Şekil 4.6). Chatterjee ve diğ. tarafından *C.elegans*’ta olgun miRNA’ların degradasyonunda görevli olarak tanımlanmıştır (Chatterjee ve Grosshans, 2009). Kim ve diğ. tarafından yapılan bir diğer çalışmada, preeklampitik gebelerin periferik kanlarında ekspresyonu değişen genler mikrodizin (“microarray”) yöntemiyle çalışılmış, *XRN2* geni mikrodizin çalışma

sonuçlarına göre “down-regüle” bulunmuştur. Fakat RT-qPZR ile bu genin validasyonu yapılmamıştır (Kim ve diğ., 2014). Çalışmamızda bu şekilde bir “down regülasyon” bulgusu saptayamadık.

miRNA’ların genel olarak hedef mRNA’larına bağlanıp translasyonlarını baskıladığı bilindiğinden, hedef mRNA’ları ile ters orantılı bir ekspresyon ilişkisinin olduğu kabul edilmektedir (Jacobsen ve diğ., 2013). Bu çalışmadan elde edilen veriler ışığında, preeklampsi hastalarında *CHURC1* ekspresyon seviyesinin hsa-mir-1183 ekspresyon düzeyi ile ters ilişkili olduğu gösterilmiştir. *CHURC1* gen ekspresyonu PE örneklerinde kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde azalmıştır ($p < 0.0001$) (Şekil 4.5). Bu bulgumuza paralel olarak, yapılan korelasyon analizlerinde istatistiksel olarak anlamlı bulunmamasına karşın *CHURC1* ekspresyonu ile hsa-mir-1183 arasında negatif yönlü bir korelasyon olduğu gösterilmiştir (Şekil 4.7). Örnek sayısının azlığı nedeni ile saptanan bu ters ilişki istatistiksel anlamlılığa ulaşmamış olabilir. Bu bulgular, hsa-mir-1183’ün *CHURC1* mRNA’sına bağlanarak translasyonunu baskıladığını düşündürmektedir. Bu hipotezin konfirme edilebilmesi için fonksiyonel çalışmalar yapılarak tartışılması gerekmektedir.

CHURC1 geni bir çinko parmak protein ürünü sentezler ve literatürde embriyogenez sırasında gastrulasyon ve nöral indüksiyon ile ilişkilendirilmiştir. Çinko parmak proteinler, aralarında gelişim, farklılaşma ve tümör baskılanmasının bulunduğu birçok hücrel aktivitede görev alır. *CHURC1* geninin ürünü olan protein, bir transkripsiyonel aktivatör gibi hareket ederek, mezodermin FGF (“fibroblast growth factor”) tarafından indüklenmesini baskılar. FGF sinyallerinin, hücreleri TGF- β ailesinden BMP sinyal yolağına hassas hale getirdiği gösterilmiştir (Sheng ve diğ., 2003). BMP proteinleri birçok hücrel süreçte rol oynar ve memeli gelişimi ve üreme fonksiyonlarının düzenlenmesinde önemlidir. BMP ligandları tip 1 ve tip 2 olmak üzere, 2 farklı serin/treonin kinaz reseptörü üzerinden sinyal aktivitesini gerçekleştirir. *BMPR2* genindeki mutasyonların, primer pulmoner hipertansiyona yol açtığı Lane ve diğ. tarafından gösterilerek, vaskülojeniz sürecindeki BMP sinyalizasyonunun etkisi vurgulanmıştır (International ve diğ., 2000). Beppu ve diğ. tarafından yapılan bir diğer çalışmada, farelerde *BMPR2* homozigot “null” mutantların yaşamla bağdaşmadığı ve gastrulasyon sürecinde öldüğü gözlenmiştir (Beppu ve diğ., 2000). Nagashima ve diğ. bu bulgulardan hareketle, *BMPR2* geni açısından “conditional knock out” (“cKO”) fareler kullanarak *BMPR2*’nin gebelikteki rolünü incelemeye almışlardır. Bu “cKO” fareler gebelik döneminin başlangıcında normal bir

implantasyon geçirmiş, maternal ve fetal gelişimleri de normal devam etmiştir. Buna karşın gebelik döneminin ortalarında fetal gelişme geriliği ve plasental abrupsiyon gözlemlenmiştir. Böylece, BMPR2 aracılı sinyal iletiminin gebelik dönemindeki majör yolaklardan biri olduğu gösterilmiştir (Nagashima ve diğ., 2013). Preeklampsia plasental abrupsiyon için en büyük risk faktörüdür (Odendaal ve diğ., 2000) ve bu durum yaygın trofoblast apoptozu ile ilişkilidir (DiFederico ve diğ., 1999). Nagashima ve diğ.'nin aynı çalışmasında, daha önce preeklampsia ile ilişkisi bilinen CORIN ("corin, serine peptidase") geninin, BMPR2 "cKO" farelerde kontrollere oranla azalmış eksprese olduğu mRNA ve protein düzeyinde gösterilmiştir. Bu bulgular, BMP sinyalinin direkt ya da indirekt yolla CORIN ekspresyonunu regüle ettiği, trofoblast invazyonunun kontrolünü sağladığı ve preeklampsiaye karşı hücreleri koruduğu sonucunu doğurmaktadır (Nagashima ve diğ., 2013). Bu çalışmalardan hareketle, *CHURC1* geninin FGF aracılığıyla BMP sinyal yolağını regüle edebileceği ve BMP sinyalinin preeklampsia patogeneziyle ilişkili olabileceği yorumunu yapmaktayız.

Tez bulgularımıza paralel olarak, Sun ve diğ. tarafından yapılan mikrodizin ve RT-qPCR çalışmasında, preeklampsia hastalarının PBMC ("peripheral blood mononuclear cell") örneklerinde kontrollere oranla azalmış düzeyde *CHURC1* ekspresyonu tespit edilmiştir (Sun ve diğ., 2009).

Çalışmamızda ekspresyon profilleri incelenen hsa-mir-1183, *XRN2* ve *CHURC1* biyobelirteç olarak kullanılma gücü açısından "ROC" eğrisi analizlerine tabii tutulmuştur. "ROC" eğrisi testin ayırt etme gücünün belirlenmesinde etkin bir istatistiki metottur. Bu eğrinin altında kalan alan (AUC) ne kadar büyük ise hastalığın tahmin edilmesinde test o kadar yüksek tahmin gücüne sahip demektir. Hsa-mir-1183 için %95 güven aralığında istatistiksel olarak test oldukça anlamlı bulunmuş ($p < 0.0001$), AUC ise 0.90 gibi yüksek bir değerde tanımlanmıştır (**Şekil 4.8**). *XRN2* geni ekspresyon profilindeki düşük anlamsal farklılıkla paralel şekilde "ROC" eğrisinde anlamlı bir ayırım gücü gösterememiş ($p = 0.4514$), AUC değeri de 0.5909 gibi düşük bir değer çıkmıştır (**Şekil 4.9**). *CHURC1* geni için %95 güven aralığında yapılan "ROC" analizi bu molekülün biyobelirteç olarak kullanımında oldukça büyük bir etkinliğe sahip olduğunu göstermektedir. *CHURC1* geni için AUC değeri 0,9615 ve $p = 0.0002$ bulunmuştur (**Şekil 4.10**).

Sonuç olarak;

- i. Literatürde daha önce maternal plazmada serbest dolaşan miRNA'ların varlığı tanımlanmış ve bu çalışma ile hücre dışı miRNA'ların maternal plazmada detekte edilebildiği gösterilmiştir.
- ii. Maternal plazmada serbest dolaşan hsa-mir-1183'ün artan ekspresyonunun preeklampsisi hastalığı ile ilişki olabileceği gösterilmiştir.
- iii. Hsa-mir-1183'ün etki mekanizması olarak, preeklampsisi patogenezinde rolü olan hedef genlerin düzenlenmelerini değiştirerek hastalığın gelişimine katkıda bulunabileceği gösterilmiştir. Bu hedef genlerden olan *CHURC1* preeklampsisi örneklem grubunda düşük ekspresyon göstermiştir.
- iv. Hsa-mir-1183 ve *CHURC1* geninin ekspresyonlarının preeklampsisi hastalarında ters korelasyon gösterdiği ve *CHURC1* gen ifadesini hsa-mir-1183'ün regüle edebileceği gösterilmiştir.
- v. Hem hsa-mir-1183 hem de *CHURC1* PE'de biyobelirteç olarak kullanılmaya aday moleküllerdir.
- vi. *CHURC1* gen ifadesini FGF ve BMP aracılı sinyal yolları üzerinden gösterebileceği, bu yolların preeklampsisi ileriki çalışmalarda araştırılabileceği fikri doğmuştur.
- vii. Bu biyobelirteçlerin preeklampsisi hastalığında çalışılması ve olası rollerinin gösterilmesi, diğer hipertansif gebeliklerin mekanizmalarının aydınlatılmasında önemli olacaktır.

KAYNAKLAR

- Afonina, I. 1997, Efficient priming of pcr with short oligonucleotides conjugated to a minor groove binder. *Nucleic acids research*; **25**(13): 2657-2660.
- Agarwal, V. 2015, Predicting effective microrna target sites in mammalian mrnas. *Elife*; **4**.
- Ark, M. 2005, Rho-associated protein kinase ii (rock ii) expression in normal and preeclamptic human placentas. *Placenta*; **26**(1): 81-84.
- Arngrimsson, R. 1990, Genetic and familial predisposition to eclampsia and pre-eclampsia in a defined population. *British journal of obstetrics and gynaecology*; **97**(9): 762-769.
- Arroyo, JD. 2011, Argonaute2 complexes carry a population of circulating micrnas independent of vesicles in human plasma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*; **108**(12): 5003-5008.
- Barad, O. 2004, Microrna expression detected by oligonucleotide microarrays: System establishment and expression profiling in human tissues. *Genome Res*; **14**(12): 2486-2494.
- Betel, D. 2010, Comprehensive modeling of microrna targets predicts functional non-conserved and non-canonical sites. *Genome Biol*; **11**(8): R90.
- Betel, D. 2008, The microrna.Org resource: Targets and expression. *Nucleic acids research*; **36**(Database issue): D149-153.
- Beppu, H. 2000, Bmp type ii receptor is required for gastrulation and early development of mouse embryos. *Dev Biol*; **221**(1): 249-258.
- Borchert, GM. 2006, Rna polymerase iii transcribes human micrnas. *Nat Struct Mol Biol*; **13**(12): 1097-1101.
- Brew, O. 2016, Comparison of normal and pre-eclamptic placental gene expression: A systematic review with meta-analysis. *PloS one*; **11**(8): e0161504.

- Brosens, IA. 1972, The role of the spiral arteries in the pathogenesis of preeclampsia. *Obstet Gynecol Annu*; **1**: 177-191.
- Carter, AM. 2012, Evolution of placental function in mammals: The molecular basis of gas and nutrient transfer, hormone secretion, and immune responses. *Physiol Rev*; **92**(4): 1543-1576.
- Chambers, JC. 2001, Association of maternal endothelial dysfunction with preeclampsia. *JAMA*; **285**(12): 1607-1612.
- Chatterjee, S, Grosshans, H. 2009, Active turnover modulates mature microRNA activity in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*; 461(7263): 546-549.
- Chen, C. 2005, Real-time quantification of microRNAs by stem-loop rt-pcr. *Nucleic acids research*; **33**(20): e179.
- Chen, DB, Wang, W. 2013, Human placental microRNAs and preeclampsia. *Biology of reproduction*; **88**(5): 130.
- Chen, X. 2009, Small RNAs and their roles in plant development. *Annu Rev Cell Dev Biol*; **25**: 21-44.
- Chim, SS. 2008, Detection and characterization of placental microRNAs in maternal plasma. *Clinical chemistry*; **54**(3): 482-490.
- Cincotta, RB, Brennecke, SP. 1998, Family history of pre-eclampsia as a predictor for pre-eclampsia in primigravidae. *International journal of gynaecology and obstetrics: the official organ of the International Federation of Gynaecology and Obstetrics*; **60**(1): 23-27.
- da Costa Martins, PA. 2010, MicroRNA regulation in cardiovascular disease. *Curr Drug Targets*; **11**(8): 900-906.
- Delcuve, GP. 2009, Epigenetic control. *J Cell Physiol*; **219**(2): 243-250.
- DeLong, ER. 1988, Comparing the areas under two or more correlated receiver operating characteristic curves: A nonparametric approach. *Biometrics*; **44**(3): 837-845.
- DiFederico, E. 1999, Preeclampsia is associated with widespread apoptosis of placental cytotrophoblasts within the uterine wall. *Am J Pathol*; 155(1): 293-301.

- Donker, RB. 2007, The expression of argonaute2 and related microrna biogenesis proteins in normal and hypoxic trophoblasts. *Molecular human reproduction*; **13**(4): 273-279.
- Duckitt, K, Harrington, D. 2005, Risk factors for pre-eclampsia at antenatal booking: Systematic review of controlled studies. *BMJ*; **330**(7491): 565.
- Duley, L. 2009, The global impact of pre-eclampsia and eclampsia. *Semin Perinatol*; **33**(3): 130-137.
- Enright, AJ. 2003, Microrna targets in drosophila. *Genome Biol*; **5**(1): R1.
- Gerard, GF. 2002, The role of template-primer in protection of reverse transcriptase from thermal inactivation. *Nucleic acids research*; **30**(14): 3118-3129.
- Grimson, A. 2007, Microrna targeting specificity in mammals: Determinants beyond seed pairing. *Mol Cell*; **27**(1): 91-105.
- Gunel, T. 2011, Serum microrna expression in pregnancies with preeclampsia. *Genetics and molecular research : GMR*; **10**(4): 4034-4040.
- Hatada, I, Mukai, T. 1995, Genomic imprinting of p57kip2, a cyclin-dependent kinase inhibitor, in mouse. *Nat Genet*; **11**(2): 204-206.
- Hinske, LC. 2009, *Silencing the host - the role of intronic micrnas* [Master of Science]: Department of Health Sciences and Technology, Massachusetts Institute of Technology.
- Huppertz, B. 2006, Apoptosis and its role in the trophoblast. *American journal of obstetrics and gynecology*; **195**(1): 29-39.
- International, PPHC. 2000, Heterozygous germline mutations in bmpr2, encoding a tgfbeta receptor, cause familial primary pulmonary hypertension. *Nat Genet*; **26**(1): 81-84.
- Jacobsen, A. 2013, Analysis of microrna-target interactions across diverse cancer types. *Nat Struct Mol Biol*; **20**(11): 1325-1332.
- Ji, L. 2013, Placental trophoblast cell differentiation: Physiological regulation and pathological relevance to preeclampsia. *Mol Aspects Med*; **34**(5): 981-1023.
- John, B. 2004, Human microrna targets. *PLoS Biol*; **2**(11): e363.

- Jones-Rhoades, MW. 2006, Micrnas and their regulatory roles in plants. *Annu Rev Plant Biol*; **57**: 19-53.
- Kaufmann, P. 2003, Endovascular trophoblast invasion: Implications for the pathogenesis of intrauterine growth retardation and preeclampsia. *Biology of reproduction*; **69**(1): 1-7.
- Kertesz, M. 2007, The role of site accessibility in micrna target recognition. *Nat Genet*; **39**(10): 1278-1284.
- Khan, KS. 2006, Who analysis of causes of maternal death: A systematic review. *Lancet (London, England)*; **367**(9516): 1066-1074.
- Kim, VN. 2005, Small rnas: Classification, biogenesis, and function. *Mol Cells*; **19**(1): 1-15.
- Kim, J, Park, H., Shim, S., Cha, D., 2014, Microarray analysis of altered gene expression in peripheral blood of patients with severe preeclampsia: A case control study. *AIJCSR*.
- Kouzarides, T. 2007, Chromatin modifications and their function. *Cell*; **128**(4): 693-705.
- Kuehner, JN. 2011, Unravelling the means to an end: Rna polymerase ii transcription termination. *Nat Rev Mol Cell Biol*; **12**(5): 283-294.
- Kutyavin, IV. 1997, Oligonucleotides with conjugated dihydropyrroloindole tripeptides: Base composition and backbone effects on hybridization. *Nucleic acids research*; **25**(18): 3718-3723.
- Kwak, PB. 2010, The micrna pathway and cancer. *Cancer Sci*; **101**(11): 2309-2315.
- Ladomery, MR. 2011, Micrnas: Their discovery, biogenesis, function and potential use as biomarkers in non-invasive prenatal diagnostics. *Int J Mol Epidemiol Genet*; **2**(3): 253-260.
- Lagos-Quintana, M. 2001, Identification of novel genes coding for small expressed rnas. *Science*; **294**(5543): 853-858.
- Lawrie, CH. 2008, Detection of elevated levels of tumour-associated micrnas in serum of patients with diffuse large b-cell lymphoma. *British Journal of Haematology*; **141**(5): 672-675.
- Lee, RC. 1993, The c. *Elegans* heterochronic gene lin-4 encodes small rnas with antisense complementarity to lin-14. *Cell*; **75**(5): 843-854.

- Lee, Y. 2004, MicroRNA genes are transcribed by rna polymerase ii. *EMBO J*; **23**(20): 4051-4060.
- Lewis, BP. 2005, Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell*; **120**(1): 15-20.
- Lewis, BP. 2003, Prediction of mammalian microRNA targets. *Cell*; **115**(7): 787-798.
- Li, N. 2015, Detection of differentially expressed microRNAs in rheumatic heart disease: Mir-1183 and mir-1299 as potential diagnostic biomarkers. *Biomed Res Int*; **2015**: 524519.
- Li, Y, Kowdley, KV. 2012, Method for microRNA isolation from clinical serum samples. *Anal Biochem*; **431**(1): 69-75.
- Li, Y, Kowdley, KV. 2012, MicroRNAs in common human diseases. *Genomics, proteomics & bioinformatics*; **10**(5): 246-253.
- Liao, YC. 2015, Two functional polymorphisms of rock2 enhance arterial stiffening through inhibiting its activity and expression. *Journal of molecular and cellular cardiology*; **79**: 180-186.
- Lindheimer, MD, Umans, JG. 2006, Explaining and predicting preeclampsia. *N Engl J Med*; **355**(10): 1056-1058.
- Liu, X. 2008, MicroRNAs: Biogenesis and molecular functions. *Brain pathology (Zurich, Switzerland)*; **18**(1): 113-121.
- Livak, KJ, Schmittgen, TD. 2001, Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative pcr and the 2(-delta delta c(t)) method. *Methods*; **25**(4): 402-408.
- Lo, YM. 1997, Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum. *Lancet (London, England)*; **350**(9076): 485-487.
- Londin, ER. 2007, Expression and regulation of the zinc finger transcription factor churchill during zebrafish development. *Gene expression patterns : GEP*; **7**(6): 645-650.
- Macura, B, Sliwa, L. 2015, [epigenetics in the placenta, the current knowledge and future clinical perspectives]. *Przegląd lekarski*; **72**(11): 673-676.

- Malone, CD, Hannon, GJ. 2009, Small rnas as guardians of the genome. *Cell*; **136**(4): 656-668.
- Mattick, JS. 2009, The genetic signatures of noncoding rnas. *PLoS Genet*; **5**(4): e1000459.
- Mattick, JS, Makunin, IV. 2006, Non-coding rna. *Hum Mol Genet*; **15 Spec No 1**: R17-29.
- Maruyama, A. 2004, Association study using single nucleotide polymorphisms in the estrogen receptor beta (esr2) gene for preeclampsia. *Hypertension research : official journal of the Japanese Society of Hypertension*; **27**(12): 903-909.
- Medica, I. 2007, Genetic polymorphisms in vasoactive genes and preeclampsia: A meta-analysis. *European journal of obstetrics, gynecology, and reproductive biology*; **131**(2): 115-126.
- Mitchell, PS. 2008, Circulating micrnas as stable blood-based markers for cancer detection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*; **105**(30): 10513-10518.
- Moffett-King, A. 2002, Natural killer cells and pregnancy. *Nat Rev Immunol*; **2**(9): 656-663.
- Mouillet, JF. 2015, Micrnas in placental health and disease. *American journal of obstetrics and gynecology*; **213**(4 Suppl): S163-172.
- Mutter, WP, Karumanchi, SA. 2008, Molecular mechanisms of preeclampsia. *Microvascular research*; **75**(1): 1-8.
- Mutze, S. 2008, Genes and the preeclampsia syndrome. *Journal of perinatal medicine*; **36**(1): 38-58.
- Nagashima, T. 2013, Bmpr2 is required for postimplantation uterine function and pregnancy maintenance. *J Clin Invest*; **123**(6): 2539-2550.
- Neilson, JR. 2007, Dynamic regulation of mirna expression in ordered stages of cellular development. *Genes & development*; **21**(5): 578-589.
- NIH. 2000, *Working group report on high blood pressure in pregnancy*. National Heart, Lung and Blood Institute.
- North, RA. 2011, Clinical risk prediction for pre-eclampsia in nulliparous women: Development of model in international prospective cohort. *BMJ*; **342**: d1875.

- Odendaal, HJ. 2000, Risk factors for and perinatal mortality of abruptio placentae in patients hospitalised for early onset severe pre-eclampsia - a case controlled study. *J Obstet Gynaecol*; **20**(4): 358-364.
- Okamura, K. 2007, The mirtron pathway generates microRNA-class regulatory RNAs in drosophila. *Cell*; **130**(1): 89-100.
- Oulas, A. 2015, Prediction of miRNA targets. *Methods Mol Biol*; **1269**: 207-229.
- Papazoglou, D. 2004, Vascular endothelial growth factor gene polymorphisms and pre-eclampsia. *Molecular human reproduction*; **10**(5): 321-324.
- Paraskevopoulou, MD. 2013, Diana-microT web server v5.0: Service integration into miRNA functional analysis workflows. *Nucleic acids research*; **41**(Web Server issue): W169-173.
- Pasquinelli, AE. 2000, Conservation of the sequence and temporal expression of let-7 heterochronic regulatory RNA. *Nature*; **408**(6808): 86-89.
- Pearson, K. 1896, Mathematical contributions to the theory of evolution. Iii. Regression, heredity, and panmixia. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series A, Containing Papers of a Mathematical or Physical Character*; **187**: 253-318.
- Pijnenborg, R. 2006, The uterine spiral arteries in human pregnancy: Facts and controversies. *Placenta*; **27**(9-10): 939-958.
- Pinacho, R. 2015, Transcription factor Sp4 phosphorylation is altered in the postmortem cerebellum of bipolar disorder and schizophrenia subjects. *European neuropsychopharmacology : the journal of the European College of Neuropsychopharmacology*; **25**(10): 1650-1660.
- Pineles, BL. 2007, Distinct subsets of microRNAs are expressed differentially in the human placentas of patients with preeclampsia. *American journal of obstetrics and gynecology*; **196**(3): 261.e261-266.
- Place, RF. 2008, MicroRNA-373 induces expression of genes with complementary promoter sequences. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*; **105**(5): 1608-1613.
- Poon, LC. 2010, Maternal risk factors for hypertensive disorders in pregnancy: A multivariate approach. *J Hum Hypertens*; **24**(2): 104-110.

- Poston, L. 2006, Endothelial dysfunction in pre-eclampsia. *Pharmacol Rep*; **58 Suppl**: 69-74.
- Reczko, M. 2012, Functional microRNA targets in protein coding sequences. *Bioinformatics (Oxford, England)*; **28**(6): 771-776.
- Rehmsmeier, M. 2004, Fast and effective prediction of microRNA/target duplexes. *RNA (New York, N.Y.)*; **10**(10): 1507-1517.
- Roberts, JM, Hubel, CA. 2009, The two stage model of preeclampsia: Variations on the theme. *Placenta*; **30 Suppl A**: S32-37.
- Roberts, JM, Redman, CW. 1993, Pre-eclampsia: More than pregnancy-induced hypertension. *Lancet (London, England)*; **341**(8858): 1447-1451.
- Robertson, KD. 2005, DNA methylation and human disease. *Nat Rev Genet*; **6**(8): 597-610.
- Roman, A. 237: MicroRNA expression in placenta of patients with preeclampsia. *American Journal of Obstetrics & Gynecology*; **199**(6): S78.
- Ruan, K. 2009, MicroRNAs: Novel regulators in the hallmarks of human cancer. *Cancer Lett*; **285**(2): 116-126.
- Sheng, G. 2003, Churchill, a zinc finger transcriptional activator, regulates the transition between gastrulation and neurulation. *Cell*; **115**(5): 603-613.
- Sibai, B. 2005, Pre-eclampsia. *The Lancet*; **365**(9461): 785-799.
- Sibai, BM. 2003, Diagnosis and management of gestational hypertension and preeclampsia. *Obstet Gynecol*; **102**(1): 181-192.
- Spearman, C. 1987, The proof and measurement of association between two things. By c. Spearman, 1904. *The American journal of psychology*; **100**(3-4): 441-471.
- Sun, CJ. 2009, Gene expression profiling of maternal blood in early onset severe preeclampsia: Identification of novel biomarkers. *Journal of perinatal medicine*; **37**(6): 609-616.

- Sutherland, A. 1981, The incidence of severe pre-eclampsia amongst mothers and mothers-in-law of pre-eclamptics and controls. *British journal of obstetrics and gynaecology*; **88**(8): 785-791.
- Taibi, A. 2013, Zebrafish *churchill* regulates developmental gene expression and cell migration. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists*; **242**(6): 614-621.
- Tremblay, J, Hamet, P. 2008, Impact of genetic and epigenetic factors from early life to later disease. *Metabolism*; **57 Suppl 2**: S27-31.
- Tsankova, N. 2007, Epigenetic regulation in psychiatric disorders. *Nat Rev Neurosci*; **8**(5): 355-367.
- Turchinovich, A. 2013, Circulating mirnas: Cell-cell communication function? *Frontiers in genetics*; **4**: 119.
- Uuskula, L. 2012, Mid-gestational gene expression profile in placenta and link to pregnancy complications. *PloS one*; **7**(11): e49248.
- Valadi, H. 2007, Exosome-mediated transfer of mrnas and micrornas is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat Cell Biol*; **9**(6): 654-659.
- van Dijk, M. 2010, Differential methylation of *stox1* in human placenta. *Epigenetics*; **5**(8): 736-742.
- van Dijk, M. 2005, Maternal segregation of the dutch preeclampsia locus at 10q22 with a new member of the winged helix gene family. *Nat Genet*; **37**(5): 514-519.
- Varkonyi-Gasic, E. 2007, Protocol: A highly sensitive rt-pcr method for detection and quantification of micrornas. *Plant Methods*; **3**: 12.
- Vasudevan, S. 2012, Posttranscriptional upregulation by micrornas. *Wiley interdisciplinary reviews. RNA*; **3**(3): 311-330.
- Vickers, KC. 2011, Micrornas are transported in plasma and delivered to recipient cells by high-density lipoproteins. *Nat Cell Biol*; **13**(4): 423-433.
- Vidigal, JA, Ventura, A. 2015, The biological functions of mirnas: Lessons from in vivo studies. *Trends Cell Biol*; **25**(3): 137-147.

- Wahid, F. 2010, Micrnas: Synthesis, mechanism, function, and recent clinical trials. *Biochim Biophys Acta*; **1803**(11): 1231-1243.
- Wang, X. 2016, Improving microrna target prediction by modeling with unambiguously identified microrna-target pairs from clip-ligation studies. *Bioinformatics (Oxford, England)*; **32**(9): 1316-1322.
- Weber, JA. 2010, The microrna spectrum in 12 body fluids. *Clinical chemistry*; **56**(11): 1733-1741.
- West, S. 2004, Human 5' --> 3' exonuclease xrn2 promotes transcription termination at co-transcriptional cleavage sites. *Nature*; **432**(7016): 522-525.
- WHO. 2005, The world heart report 2005: Make every mother and child count.
- Wilson, ML. 2003, Molecular epidemiology of preeclampsia. *Obstetrical & gynecological survey*; **58**(1): 39-66.
- Winter, J. 2009, Many roads to maturity: Microrna biogenesis pathways and their regulation. *Nat Cell Biol*; **11**(3): 228-234.
- Wong, N, Wang, X. 2015, Mirdb: An online resource for microrna target prediction and functional annotations. *Nucleic acids research*; **43**(Database issue): D146-152.
- Wu, L. 2012, Circulating micrnas are elevated in plasma from severe preeclamptic pregnancies. *Reproduction (Cambridge, England)*; **143**(3): 389-397.
- Xu, P. 2014, Variations of micrnas in human placentas and plasma from preeclamptic pregnancy. *Hypertension*; **63**(6): 1276-1284.
- Ye, W. 2016, Preeclampsia is associated with decreased methylation of the gna12 promoter. *Annals of human genetics*; **80**(1): 7-10.
- Yeom, KH. 2006, Characterization of dgcr8/pasha, the essential cofactor for drosha in primary mirna processing. *Nucleic acids research*; **34**(16): 4622-4629.
- Yu, J. 2006, Human microrna clusters: Genomic organization and expression profile in leukemia cell lines. *Biochem Biophys Res Commun*; **349**(1): 59-68.
- Yu, L. 2009, The h19 gene imprinting in normal pregnancy and pre-eclampsia. *Placenta*; **30**(5): 443-447.

- Zhang, C. 2009, Novel functions for small rna molecules. *Curr Opin Mol Ther*; **11**(6): 641-651.
- Zhao, Z. 2013, Diagnostic potential for mirnas as biomarkers for pregnancy-specific diseases. *Clinical biochemistry*; **46**(10-11): 953-960.

EKLER

EK 1.

T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ
KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU

Sayı : 1264
Konu : Yrd. Doç. Dr. Tuba GÜNEL hk,

Tarih : 07.08.2012

İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞI'NA

İlgili : İ.Ü. Fen Fakültesinin 16/04/2012 gün ve 2118 sayılı yazısı

Sorumlu araştırmacılığını İstanbul Üniversitesi Fen Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü Öğretim Üyesi Yard. Doç. Dr. Tuba GÜNEL'in üstlendiği 2012/983-1111 dosya numaralı "Pre-eklempatik gebelerin maternal plazmalarında serbest dolaşan mikroRNA'ların kantitatif analizi" başlıklı çalışma kurulumuzun 15.06.2012 tarihli 11 sayılı toplantısında etik yönden uygun bulunmuş olup, tutanaklar ekte sunulmuştur.

Tutanakların İstanbul Üniversitesi Fen Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü Öğretim Üyesi Yard. Doç. Dr. Tuba GÜNEL'e iletilmesi hususunda gereğinin yapılmasını arz ederim.

Prof. Dr. A. Yağız ÜRESİN
İstanbul Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar
Etik Kurul Başkanı

Eki: Tutanak

EK 2.**BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU****I-Araştırmayla İlgili Bilgi Verilmesi:**

Araştırmanın Adı: “Pre-eklamptik Gebelerin Maternal Plazmalarında Serbest Dolaşan MikroRNA’ların Kantitatif Analizi”

Araştırmanın amacı: Preeklampsia hastalığının oluşum nedenleri araştırılıp, tedavi ve takipte yardımcı olabilecek yeni molekül ve tedavi yöntemlerine ulaşılması amaçlanmaktadır.

Yapılacak işlemin tanımı: Bu araştırma genetik tetkiklere dayalı bir araştırma olup Preeklampsia hastası ve sağlıklı gebelerden enjektör yardımıyla 10 ml periferik kan alınmasını takiben kandan genetik materyal (RNA) izole edilecektir. Hasta ve sağlıklıların genetik materyali (RNA) araştırma kapsamında bulunan hedef mikroRNA’ların maternal plazmadaki ekspresyonunun belirlenmesi açısından araştırılacaktır. Ekspresyonların belirlenmesinde Gerçek Zamanlı PZR yöntemi kullanılacaktır. Alınan periferik kan örneğinizden RNA materyaliniz izole edilerek saklanacak, oluşturulan bu bankada kişi isimleri kullanılmayacak, örnekler numaralı olarak korunacaktır. Bu çalışma İstanbul Üniversitesi Fen Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü’nde gerçekleştirilecektir.

Araştırmanın süresi: Araştırma kapsamında yapılacak olan çalışmanın süresi 12 aydır.

Araştırmaya Katılan Gönüllü Sayısı: Preeklampsia tanısı almış 20 gönüllü ve sağlıklı 20 gönüllü katılacaktır.

Araştırmanın Gönüllüler Üzerindeki Olası Etkileri:

Hasta ve sağlıklı gönüllülerden alınacak periferik kandan izole edilecek genetik materyal ile çalışılacak olması, gönüllü için bir risk oluşturmamaktadır. Kan alımı sırasında enjektör ile gönüllünün koluna girişim söz konusudur fakat bu işlem steril koşullarda gerçekleştirileceğinden olası bir enfeksiyon beklenmemektedir.

Araştırmada İzlenecek Yöntem: Alınan kan örneğinden RNA materyaliniz izole edilerek saklanacaktır. Oluşturulan bu bankada kişi isimleri kullanılmayacak, örnekler numaralı olarak korunacaktır.

Araştırmanın Bilime ve Tıbbı Katkıları:

Bu araştırma projesi kapsamında preeklampsi hastası ve sağlıklı gönüllülerdeki maternal plazmada serbest dolaşan MikroRNAlar'ın hastalık üzerine olası etkilerinin araştırılması ve hastalığın patogeneğinde rol oynayan genetik mekanizmaların açığa çıkartılması amaçlanmaktadır.

II-Gönüllünün Haklarıyla İlgili Bilgi Verilmesi

- 1.Araştırma süresince sizden 1 defaya mahsus kan alınacaktır ve bunun dışında invaziv bir işlem gerçekleştirilmeyecektir.
2. Çalışma sonucunda tedaviye yönelik bir cevap elde edilemeyebilir.
- 3.Kişisel ve tıbbi bilgileriniz işyeri, eğitim kurumu ve sigorta şirketi gibi üçüncü şahıslara aktarılmayacaktır.
- 4.Araştırma sırasında genetik test sonuçlarının sizi ve ailenizi psikolojik veya diğer bir yönden etkileyeceğini düşünmeniz durumunda, araştırmadan isteğiniz üzere ayrılabilirsiniz.
5. Bu çalışmada sizden maddi bir beklentimiz olmadığı gibi size maddi bir katkısı da olmayacaktır.
- 6.Bu çalışmaya katılmayı reddedebilirsiniz. Bu talebiniz, gelecekteki takip ve tedaviniz üzerine olumsuz etkisi olmayacaktır.
7. Gönüllü rızasına bakılmaksızın araştırmacı tarafından araştırma harici bırakılabilirsiniz.

KATILIMCININ/HASTANIN BEYANI

Sayın Dr.....tarafından İ.Ü. Fen Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik bölümünde tıbbi bir araştırma yapılacağı belirtilerek bu araştırma ile ilgili yukarıdaki bilgiler bana aktarıldı. Bu bilgilerden sonra böyle bir araştırmaya “katılımcı” (denek) olarak davet edildim.

Eğer bu araştırmaya katılırsam hekim ile aramda kalması gereken bana ait bilgilerin gizliliğine bu araştırma sırasında da büyük özen ve saygı ile yaklaşılacağına inanıyorum. Araştırma sonuçlarının eğitim ve bilimsel amaçlarla kullanımı sırasında kişisel bilgilerimin ihtimamla korunacağı konusunda bana yeterli güven verildi.

Projenin yürütülmesi sırasında herhangi bir sebep göstermeden araştırmadan çekilebilirim. (Ancak araştırmacıları zor durumda bırakmamak için araştırmadan çekileceğimi önceden bildirmemim uygun olacağının bilincindeyim) Ayrıca tıbbi durumuma herhangi bir zarar verilmemesi koşuluyla araştırmacı tarafından araştırma dışı da tutulabilirim.

Araştırma için yapılacak harcamalarla ilgili herhangi bir parasal sorumluluk altına girmiyorum. Bana da bir ödeme yapılmayacaktır.

İster doğrudan, ister dolaylı olsun araştırma uygulamasından kaynaklanan nedenlerle meydana gelebilecek herhangi bir sağlık sorununun ortaya çıkması halinde, her türlü tıbbi müdahalenin sağlanacağı konusunda gerekli güvence verildi. (Bu tıbbi müdahalelerle ilgili olarak da parasal bir yük altına girmeyeceğim).

Araştırma sırasında bir sağlık sorunu ile karşılaştığımda; herhangi bir saatte, Yrd.Doç.Dr. Tuba Günel, 0212 455 57 00 / 15473 telefondan ve İ.Ü.Fen Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik bölümü adresinden ulaşabileceğimi biliyorum.

Bu araştırmaya katılmak zorunda değilim ve katılmayabilirim. Araştırmaya katılmam konusunda zorlayıcı bir davranışla karşılaşmış değilim. Eğer katılmayı reddedersem, bu durumun tıbbi bakımına ve hekim ile olan ilişkiye herhangi bir zarar getirmeyeceğini de biliyorum.

Bana yapılan tüm açıklamaları ayrıntılarıyla anlamış bulunmaktayım. Kendi başıma belli bir düşünme süresi sonunda adı geçen bu araştırma projesinde “katılımcı” (denek) olarak yer alma kararını aldım. Bu konuda yapılan daveti büyük bir memnuniyet ve gönüllülük içerisinde kabul ediyorum.

İmzalı bu form kağıdının bir kopyası bana verilecektir.

GÖNÜLLÜ ONAY FORMU

Yukarıda gönüllüye araştırmadan önce verilmesi gereken bilgileri gösteren metni okudum. Bunlar hakkında bana yazılı ve sözlü açıklamalar yapıldı. Bu koşullarla söz konusu klinik araştırmaya kendi rızamla hiçbir baskı ve zorlama olmaksızın katılmayı kabul ediyorum.

Gönüllünün Adı-soyadı, İmzası, Adresi (varsa telefon no., faks no,...)

Velayet veya vesayet altında bulunanlar için veli veya vasinin Adı-soyadı, İmzası, Adresi (varsa telefon no., faks no,...)

Açıklamaları yapan araştırmacının Adı-soyadı, İmzası

Rıza alma işlemine başından sonuna kadar tanıklık eden kuruluş görevlisinin Adı-soyadı, İmzası, Görevi

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler	
Adı Soyadı	Didem ALTINDİREK
Doğum Yeri	Ankara1
Doğum Tarihi	17.03.1981
Uyruğu	☒ T.C. ☐ Diğer:
Telefon	535 682 30 92
E-Posta Adresi	didemaltindirek@gmail.com
Web Adresi	



Eğitim Bilgileri	
Lisans	
Üniversite	İstanbul Üniversitesi
Fakülte	Fen Fakültesi
Bölümü	Biyoloji
Mezuniyet Yılı	2009

Yüksek Lisans	
Üniversite	İstanbul Üniversitesi
Enstitü Adı	Fen Bilimleri Enstitüsü
Anabilim Dalı	Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı
Programı	Moleküler Biyoloji ve Genetik Programı
Mezuniyet Tarihi	2016

Makale ve Bildiriler
Bento C.,2014, Genetic Basis of Congenital Erythrocytosis: Mutation Update and Online Databases, Human Mutation, vol.35, pp.15-26.