

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

**AİLEVİ AKDENİZ ATEŞİ (AAA) HASTALIĞINDA
BELİRLenen ADAY
miRNA'LARIN DOLAŞIMDAKİ VARLIĞININ
EKSOZOMLAR ÜZERİNDEN ARAŞTIRILMASI**

Zeynep TAVUKÇUOĞLU

Tıbbi Biyoloji Programı

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**ANKARA
2018**

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

**AİLEVİ AKDENİZ ATEŞİ (AAA) HASTALIĞINDA
BELİRLENEN ADAY
miRNA'LARIN DOLAŞIMDAKİ VARLIĞININ
EKSOZOMLAR ÜZERİNDEN ARAŞTIRILMASI**

Zeynep TAVUKÇUOĞLU

Tıbbi Biyoloji Programı

YÜKSEK LİSANS TEZİ

TEZ DANIŞMANI

Doç.Dr. Banu PEYNİRCİOĞLU

**ANKARA
2018**

ONAY SAYFASI

Ailevi Akdeniz Ateşi (AAA) Hastalığında Belirlenen Aday miRNA'ların Dolaşımdaki

Varlığının Eksozomlar Üzerinden Araştırılması

Öğrenci: Zeynep TAVUKÇUOĞLU

Danışman: Doç. Dr. Banu PEYNİRCİOĞLU

Bu tez çalışması 21/11/2018 tarihinde jürimiz tarafından "Tıbbi Biyoloji Programı" nda yüksek lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı:

Prof. Dr. Serap DÖKMECİ
Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji A.D.



Tez Danışmanı:

Doç. Dr. Banu PEYNİRCİOĞLU
Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji A.D.



Üye:

Prof. Dr. Petek KORKUSUZ
Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji A.D.



Üye:

Doç. Dr. Burcu HAYTA
Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji A.D.



Üye:

Doç. Dr. Bala GÜR DEDEOĞLU
Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü



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

06 Aralık 2018


Prof. Dr. Diclehan Orhan
Enstitü Müdürü

YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI

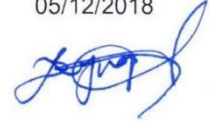
Enstitü tarafından onaylanan lisansüstü tezimin/raporumun tamamını veya herhangi bir kısmını, basılı (kağıt) ve elektronik formatta arşivleme ve aşağıda verilen koşullarla kullanıma açma iznini Hacettepe Üniversitesine verdiğimi bildiririm. Bu izinle Üniversiteye verilen kullanım hakları dışındaki tüm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

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

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

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

05/12/2018



Zeynep TAVUKÇUOĞLU

ⁱ“**Lisansüstü Tezlerin Elektronik Ortamda Toplanması, Düzenlenmesi ve Erişime Açılmasına İlişkin Yönerge**”

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

* Tez **danışmanın** önerisi ve **enstitü anabilim dalının** uygun görüşü üzerine **enstitü** veya **fakülte yönetim kurulu** tarafından karar verilir.

ETİK BEYAN

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

Zeynep TAVUKÇUOĞLU

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim süresince bana yol gösteren ve her zaman destek olan değerli hocam ve danışmanım Doç. Dr. Banu Peynircioğlu'na,

Tez çalışmamı okuyarak değerli yorumlarını benimle paylaşan tez jüri üyeleri Prof. Dr. Serap Dökmeci'ye, Prof. Dr. Petek Korkusuz'a, Doç. Dr. Burcu Hayta'ya ve Doç. Dr. Bala Gür Dedeoğlu'na,

Eğitimimde büyük katkıları olan Tıbbi Biyoloji A.D.'nin değerli hocalarına ve birçoğu artık kardeşten öte olan çalışma arkadaşlarıma,

Bana her zaman güç veren ve daima arkamda olduklarını hissettiğim canım aileme,

En içten teşekkürlerimi sunarım.

ÖZET

Tavukçuoğlu, Z., Ailevi Akdeniz Ateşi (AAA) Hastalığında Belirlenen Aday miRNA'ların Dolaşımdaki Varlığının Eksozomlar Üzerinden Araştırılması, Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyoloji Yüksek Lisans Tezi, Ankara, 2018. Ailevi Akdeniz Ateşi (AAA) otozomal resesif kalıtım modeline sahip bir hastalıktır ve monogenik bir hastalık olmasına rağmen fenotipik heterojenite görülmektedir. Epigenetik faktörlerden biri olan kodlamayan RNA'lardan mikroRNA (miRNA)'ların, bu heterojeniteye sebep olan etkenlerden biri olabileceği düşünülmektedir. Eksozomlar; miRNA, lipid, protein gibi birçok önemli molekülü taşıyan önemli nanovesiküllerdir ve değişik vücut sıvılarında bulundukları bilinmektedir. Bu tez çalışmasında, AAA hastalığında eksozomal miRNA'ların araştırılması hedeflenmiştir. Bu amaçla, hem pediatrik hem de erişkin hasta gruplarında M694V/M694V AAA hastaları, sağlıklı kontroller ve diğer sistemik otoinflamatuvar hastalığa sahip bireylerden üç çalışma grubu oluşturulmuştur. Bu bireylerin plazma ve serum örneklerinden eksozom izolasyonu yapılarak, eksozom karakterizasyonu için geçirimli elektron mikroskobu (*Transmission Electron Microscopy*- TEM) ve akım sitometrisi (*Flow cytometry*- FC) kullanılmıştır. TEM analizinde, eksozomlar fosfotungstik asit (PTA) boyama ajanı ile başarılı bir şekilde görüntülenebilmiş olup, akım sitometri kullanılarak, CD63 ve CD81 yüzey belirteçleri ile yapılan analiz sonucunda plazmadan %68,1, serumdan ise %53,3 oranında eksozom ayrıştırılabildiği görülmüştür. Eksozomlardan RNA izolasyonu yapılarak kantitatif gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (*quantitative real time-polymerase chain reaction*- qRT-PCR) ile belirlenen miRNA'ların ifadesi karşılaştırılmıştır. Bunun sonucunda, miR-197-3p, miR-20a-5p, miR-374b-5p, miR-30e-3p, miR-186-5p ve miR-29c-3p'nin eksozomlarda taşındığı gösterilmiş olup, bunlardan miR-197-3p, miR-20a-5p, miR-374b-5p'nin sistemik otoinflamatuvar hasta gruplarında değişken ifadeye sahip olduğu görülmüştür. Dolaşımdaki varlığı gösterilen, hasta ve kontrol gruplarında ifade açısından farklılığı olan bu miRNA'lar, ileride sistemik otoinflamatuvar hastalıkların tanı ve tedavisinde biyobelirteç olma özelliğine sahip olabileceklerdir.

Anahtar Kelimeler: Ailevi Akdeniz Ateşi (AAA), eksozom, miRNA, qRT-PCR

Bu tez, Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir (Proje Numarası: THD-2017-16316).

ABSTRACT

Tavukcuoglu, Z., Investigation Of Candidate Exosomal miRNAs In The Circulation In Familial Mediterranean Fever (FMF) Disease, Hacettepe University Institute of Health Sciences Medical Biology Programme Master of Science Thesis, Ankara, 2018. Familial Mediterranean Fever (FMF) is inherited in an autosomal recessive manner. FMF is a monogenic disease however, phenotypic heterogeneity can be seen in different patient groups. Epigenetic factors including miRNAs might be a reason behind this heterogeneity. Exosomes are nanovesicles which are the carriers of many important molecules such as microRNAs, lipids, proteins and they can be found in many biofluids. The aim of this thesis is to determine the different exosomal miRNA signatures in FMF disease. For this purpose, three study groups (healthy control group, M694V/M694V homozygote FMF patient group and another systemic autoinflammatory disease group) were constituted for both adult and pediatric patients. After performing exosome isolation from plasma and serum samples of these individuals, characterization of exosomes was done with Transmission Electron Microscopy (TEM) and Flow Cytometry (FC). In TEM analysis, exosomes were visualized successfully with phosphotungstic acid (PTA). In FC analysis, exosome populations from plasma (68.1%) and serum (53.3%) were assessed through CD63 and CD81 surface markers. miRNAs were isolated from exosomes and the expression analysis of candidate miRNAs was done using qRT-PCR. It was shown that miR-197-3p, miR-20a-5p, miR-374b-5p, miR-30e-3p, miR-186-5p, miR-29c-3p were carried through exosomes and miR-197-3p, miR-20a-5p, miR-374b-5p were found to have differential expression pattern in systemic autoinflammatory disease patient groups. These miRNAs, which are shown to be circulating through exosomes and have varying expression levels between the patient and control groups, may be considered as biomarkers in the diagnosis and treatment of systemic autoinflammatory diseases in the future.

Key words: Familial Mediterranean Fever (FMF), exosome, miRNA, qRT-PCR

This thesis was supported by Hacettepe University Scientific Research Coordination Unit (Project Number: THD-2017-16316).

İÇİNDEKİLER

ONAY SAYFASI	iii
YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI	iv
ETİK BEYAN	v
TEŞEKKÜR	vi
ÖZET	vii
ABSTRACT	viii
İÇİNDEKİLER	ix
SİMGELER VE KISALTMALAR	xii
ŞEKİLLER	xiv
TABLOLAR	xvi
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Sistemik Otoinflamatuvar Hastalıklar	3
2.1.1. Ailevi Akdeniz Ateşi	4
2.2. Epigenetik ve AAA	5
2.3. miRNA'lar	6
2.3.1. AAA Hastalığında miRNA'lar	7
2.3.2. Ekstraselüler miRNA'lar	9
2.4. Eksozomlar	11
2.4.1. Eksozomların Biyogenezi ve Moleküler Kompozisyonu	13
2.4.3. Aday Biyobelirteç Olarak Eksozomlar ve Eksozomal miRNA'lar	17
2.4.4. Tedavi Molekülü Olarak Eksozomlar	18
3. GEREÇ VE YÖNTEMLER	23
3.1. Gereçler	23
3.1.1. Total Kandan Serum ve Plazma İzolasyonu	23
3.1.2. Serum ve Plazmadan Eksozom İzolasyonu	23
3.1.3. Eksozomların TEM ile Karakterizasyonu	23
3.1.4. Eksozomların Akım Sitometri İle Karakterizasyonu	23
3.1.5. Eksozomlardan miRNA İzolasyonu	24
3.1.6. cDNA Sentezi	24
3.1.7. qRT-PCR	24

3.2. Yöntemler	25
3.2.1. Çalışma Grubunun Oluşturulması	25
3.2.2. Total Kandan Serum ve Plazma İzolasyonu	28
3.2.3. Serum ve Plazmadan Eksozom İzolasyonu	28
3.2.4. Eksozomların TEM İle Karakterizasyonu	30
3.2.5. Eksozomların Akım Sitometri İle Karakterizasyonu	30
3.2.6. Eksozomlardan RNA İzolasyonu	31
3.2.7. cDNA Sentezi	32
3.2.8. qRT-PCR:	37
3.2.9. Verilerin Değerlendirilmesi ve İstatistik Analizler	39
4. BULGULAR	40
4.1. TEM	40
4.1.1. Serumdan Elde Edilen Eksozomların TEM İle İncelenmesi	40
4.1.2. Plazmadan Elde Edilen Eksozomların TEM İle İncelenmesi	42
4.2. Akım Sitometrisi	44
4.2.1. Kapılama Stratejisi	44
4.2.2. Serumdan Elde Edilen Eksozomların Akım Sitometri İle Analizi	45
4.2.3. Plazmadan Elde Edilen Eksozomların Akım Sitometri İle Analizi	46
4.3. Eksozomdan İzole Edilmiş RNA'ların Konsantrasyon ve Safılıkları	48
4.4. qRT-PCR:	52
4.4.1. Erişkin Grupta miR-197-3p İfade Analizi	53
4.4.2. Erişkin Grupta miR-20a-5p İfade Analizi	54
4.4.3. Pediatrik Grupta miR-197-3p İfade Analizi	55
4.4.4. Pediatrik Grupta miR-20a-5p İfade Analizi	56
4.4.5. Pediatrik Grupta miR-374b-5p İfade Analizi	57
4.4.6. Pediatrik Grupta miR-30e-3p İfade Analizi	58
4.4.7. Pediatrik Grupta miR-186-5p İfade Analizi	59
4.4.8. Pediatrik Grupta miR-29c-3p İfade Analizi	60
5. TARTIŞMA	61
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	66
6.1. Sonuçlar	66
6.2. Öneriler	67

7. KAYNAKLAR

68

8. EKLER

EK-1. Tez Çalışması İle İlgili Etik Kurul İzni

EK-2. Orjinallik Ekran Çıktısı

EK-3. Dijital Makbuz

9. ÖZGEÇMİŞ

SİMGELER VE KISALTMALAR

3' UTR	<i>3'-Untranslated Region</i>
AAA	Ailevi Akdeniz Ateşi
AGO	Argonat
AIDAI	Otoinflamatuvar Hastalık Aktivite İndeksleri
BSA	Dana Serum Albümini
CAPS	Kriopyrin-İlişkili Periyodik Sendrom
CBC	Tam Kan Sayımı
cDNA	Komplementer DNA
CINCA	Kronik İnfanitil Nörolojik Kütanöz Artiküler Sendrom
CRP	C-Reaktif Proteini
DEPC	Dietil Pirokarbonat
dk	Dakika
ECmiRNA	Ekstraselüler mikroRNA
ESR	Eritrosit Sedimentasyon Hızı
FC	Akım Sitometri
FCAS	Ailesel Soğuk Otoinflamatuvar Sendromu
g	<i>Gravity</i>
HDL	<i>High-Density Lipoprotein</i>
HIDS	Hiperimünoglobulinemi D Sendromu
IL-1	İnterlökin 1
IL-1β	İnterlökin 1- Beta
kg	Kilogram
lncRNA	<i>Long Non-Coding RNA</i>
LPS	Lipopolisakkarit
M	Molar
MEFV	<i>Mediterranean Fever</i>
miRISC	miRNA ile İndüklenen Susturum Kompleksi
miRNA	mikroRNA
MKD	Mevalonat Kinaz Eksikliği
ml	Mililitre
MS	Multipl Skleroz

mTOR	Rapamisinin Memeli Hedefi
MVB	<i>Multivesiküler Body</i>
MWS	<i>Muckle–Wells</i> Sendromu
ng	Nanogram
NLRP3	Nod Benzeri Reseptör Proteini 3
nm	Nanometre
°C	Santigrat Derece
OsmO₄	Osmiyum Tetroksit
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PI3Kγ	Fosfoinosit 3-Kinaz Gamma
piRNA	Piwi Etkileşimli RNA
PTA	Fosfotungstik Asit
qRT-PCR	<i>Quantitative Real Time- Polymerase Chain Reaction</i>
RHEB	Beyinde Ras Homoloji Kazanılmış
RNAi	RNA İnterferans
RU	<i>Relative Unit</i>
SAA	Serum Amiloid A
SAID	Sistemik Otoinflamatuvar Hastalıklar
siRNA	Susturucu RNA
SLE	Sistemik Lupus Eritematozus
TEM	Geçirimli Elektron Mikroskobu
TLR4	Toll Benzeri Reseptör 4
TNF	Tümör Nekrozis Faktör
TRAPS	TNF Reseptör İlişkili Periyodik Sendrom
UA	Üranil Asetat
μl	Mikrolitre

ŞEKİLLER

Şekil	Sayfa
2.1. Ekstraselüler miRNA'ların biyogenezi ve dış ortama salınım mekanizmaları.	11
2.2. Bugüne kadar eksozomlar ve eksozomal miRNA'lar ile ilişkilendirilmiş vücut sıvıları.	13
2.3. Eksozomların biyogenezi.	14
2.4. Eksozomların moleküler kompozisyonu.	15
2.5. Doğal olarak veya modifiye edilerek oluşan eksozomların tedavi amaçlı kullanımları.	20
2.6. Eksozom karakterizasyonu için uygulanan deney planı.	22
2.7. Erişkin ve pediatrik gruplardaki miRNA ifade analizleri için uygulanan deney planı.	22
4.1. Serumdan elde edilen eksozomların x120.000 büyütme altında görüntüsü.	40
4.2. Serumdan elde edilen eksozomların x250.000 büyütme altında görüntüsü.	41
4.3. Serumdan elde edilen eksozomların x60.000 (a) ve x120.000 (b ve c) büyütme altında görüntüsü.	42
4.4. Plazmadan elde edilen eksozomların x120.000 büyütme altında görüntüsü.	43
4.5. Plazmadan elde edilen eksozomların x200.000 büyütme altında görüntüsü.	43
4.6. Kapılama stratejisi (a) Kırmızı bölge, boncuklara bağlı eksozomları; mavi bölge boncuklara bağlı olmayan eksozomları; gri bölge ise agregatları göstermektedir. (b) Boncuklara bağlı olan ve olmayan eksozom popülasyonlarının gösterildiği yoğunluk grafiği (density plot).	44
4.7. Serumdan taze izole edilmiş eksozomların sadece CD63 (a) ve sadece CD81 (b) yüzey belirtecini gösterme yüzdesi.	45

4.8.	Serumdan taze izole edilmiş (a) ve daha önceden izole edilerek -80 °C’de bekletilmiş olan (b) eksozomların CD63 ve CD81 yüzey belirteçlerini birlikte gösterme yüzdesi.	46
4.9.	Plazmadan taze izole edilmiş eksozomların sadece CD63 (a) ve sadece CD81 (b) yüzey belirtecini gösterme yüzdesi.	47
4.10.	Plazmadan taze izole edilmiş (a) ve daha önceden izole edilerek -80 °C’de bekletilmiş olan (b) eksozomların CD63 ve CD81 yüzey belirteçlerini birlikte gösterme yüzdesi.	47
4.11.	Erişkin bireylerin serumdan (a) ve plazmadan (b) elde edilen eksozomlarda miR-197-3p için yapılmış ifade analizi.	53
4.12.	Erişkin bireylerin serumdan (a) ve plazmadan (b) elde edilen eksozomlarında miR-20a-5p için yapılmış ifade analizi.	54
4.13.	Pediyatrik bireylere ait eksozomlarda miR-197-3p için yapılmış ifade analizi.	55
4.14.	Pediyatrik bireylere ait eksozomlarda miR-20a-5p için yapılmış ifade analizi.	56
4.15.	Pediyatrik bireylere ait eksozomlarda miR-374b-5p için yapılmış ifade analizi.	57
4.16.	Pediyatrik bireylere ait eksozomlarda miR-30e-3p için yapılmış ifade analizi.	58
4.17.	Pediyatrik bireylere ait eksozomlarda miR-186-5p için yapılmış ifade analizi.	59
4.18.	Pediyatrik bireylere ait eksozomlarda miR-29c-3p için yapılmış ifade analizi.	60

TABLÖLAR

Tablo		Sayfa
3.1.	Çalışmaya katılan erişkin AAA hastalarının klinik bilgileri.	26
3.2.	Çalışmaya katılan pediatrik AAA ve SAID hastalarının klinik bilgileri.	27
4.1.	Erişkin bireylerde, serumdan elde edilip eksozomlardan izole edilmiş RNA'ların konsantrasyonları ve saflıkları.	49
4.2.	Erişkin bireylerde, plazmadan elde edilip eksozomlardan izole edilmiş RNA'ların konsantrasyonları ve saflıkları.	50
4.3.	Pediatrik bireylerde, serumdan elde edilip eksozomlardan izole edilmiş RNA'ların konsantrasyonları ve saflıkları.	51

1. GİRİŞ

AAA otozomal resesif olarak kalıtılan otoinflamatuvar bir hastalıktır. Hastalarda kendini 2-3 gün süren tekrarlayıcı yüksek ateş ve abdominal ağrılarla gösterir. Genel anlamda, nadir hastalıklar grubu içerisinde tanımlanan AAA hastalığının, Türkiye’de görülme sıklığı yüksektir. AAA monogenik bir hastalık olmasına rağmen hasta bireylerde fenotip her zaman aynı olmamaktadır. Klinik olarak AAA özelliği gösteren fakat yalnızca tek alelinde mutasyon bulunan hasta bireyler ya da aynı tip mutasyona sahip olmasına rağmen farklı klinik özellikler gösteren hastaların varlığı AAA hastalığı patogenezinde epigenetik mekanizmaların önemli rol oynayabileceğini düşündürmektedir. En önemli epigenetik mekanizmalar histon modifikasyonları, DNA metilasyonu ve kodlanmayan RNA’lardır. Bu mekanizmaların içinde kodlanmayan RNA’lardan miRNA’lar ise son yıllarda birçok hastalığın patogeneziyle ilişkili olarak karşımıza çıkmaktadır. miRNA’lar gen ifadesinin düzenlenmesini sağlayan, 21-23 nükleotit uzunluğunda, tek iplikli ve protein kodlamayan RNA molekülleridir. miRNA’lar genelde hücresel olmakla beraber, ekstraselüler formları da mevcuttur ve birçok vücut sıvısında bulunurlar. Hücresel miRNA’lar hızlı bir şekilde degrade olurken ekstraselüler ya da diğer bir isimle dolaşımdaki miRNA’lar daha stabil ve RNaz aktivitesine karşı dayanıklıdır. Bu miRNA’lardan eksozomlarla taşınan eksozomal miRNA’lar özgül işlevlerini yapabilmek için eksozomlara yüklenir ve hedef hücrelere gönderilirler. Eksozomlar, 30-120 nm arasında değişen boyutlara sahip, hücre-hücre iletişimi, immün regülasyon, sinyal iletimi, genetik materyalin aktarımı ve daha birçok farklı biyolojik yolağı regüle edebilen, dolaşımdaki nanovesiküllerdir ve birçok vücut sıvısında bulunabilirler.

miRNA’lar ile ilişkili olarak, grubumuzun içinde yer aldığı; TÜBİTAK 1001 (Ailevi Akdeniz Ateşi Patogenezinde *MEFV* Gen İfadesinin Düzenlenmesinde Rol Oynayan miRNA’ların Belirlenmesi) ve ERA-NET (Otoinflamatuvar Hastalıklarda (Tanımlanmış ve Tanımlanmamış) Kişiselleştirilmiş Moleküler Tıp İçin Klinik ve Deneysel Çalışma: Modifiye edici (*‘Modifier’*) Faktörlerin Rolü) projelerinde AAA hastalığı ile ilişkili miRNA’lar araştırılmaktadır. Bu iki projede, AAA patogenezinde inflamatuvar yolaklarda etki gösterdiği saptanan belirli miRNA’lar tespit edilmiştir. Erişkin bireylerde miR-197-3p ve miR-20a-5p’nin kontrol bireyler ve kötü gidişli AAA hastaları arasında değişken ifadeleri olduğu saptanmış ve yapılan fonksiyonel

analizler sonrası AAA hastalığının patogeneğinde etkili oldukları bildirilmişti (1). Bu nedenle, miR-197-3p ve miR-20a-5p tez kapsamındaki çalışmalara dahil edilmiştir. Pediatrik hastalarda yapılan mikrodizin, qRT-PCR ve biyoinformatik çalışmaları sonrasında ise, inflamatuvar yollarda etki gösterdiği saptanan miRNA'lar (miR-374b-5p, miR-30e-3p, miR-186-5p, miR-29c-3p, miR-25-5p ve miR-329-3p) belirlenmiş ve tez çalışmasına dahil edilmiştir (Yayınlanmamış Veri). Bu tez kapsamında; AAA hastaları, diğer sistemik otoinflamatuvar hastalıklara sahip bireyler (CAPS, HIDS vb.) ve kontrol bireylerden oluşan  grupta belirlenen miRNA'ların eksozomlardaki varlığı araştırılarak kontrol ve hasta grupları arasındaki ifade farklılıkları belirlendi.



2. GENEL BİLGİLER

2.1. Sistemik Otoinflamatuvar Hastalıklar

Sistemik otoinflamatuvar hastalıklar, doğal bağışıklık sistemindeki bozukluklar sonucu ortaya çıkan ve sistemik inflamasyon atakları ile karakterize olan hastalıklar grubudur. Genelde monogenik olarak kalıtılırlar ve kendilerini tekrarlayan ateş atakları ile gösterirler. İnflamasyonun sebebi hastalarda etkilenen genlere ve mutasyonlara göre değişebilmekte, fakat hastaların akut faz reaktantlarında her zaman artış görülmektedir. Laboratuvar testleri ile eritrosit sedimentasyon hızı (ESR), C-reaktif protein (CRP) ve serum amiloid A (SAA) değerleri ölçülebilmekte ve hastada inflamasyon olup olmadığı daha net olarak anlaşılabilmektedir (2).

Nadir görülen sistemik otoinflamatuvar hastalıklar arasında, kriyopyrin-ilişkili periyodik sendrom (CAPS), tümör nekrozis faktör (TNF) reseptör ilişkili periyodik sendrom (TRAPS), mevalonat kinaz eksikliği/hiper IgD sendromu (MKD/HIDS) ve AAA gibi hastalıklar vardır.

Tanımlanmış bir mutasyon olmadığı durumda bu hastalıkların tanısını koymak zor olabilmektedir. Genetik test olmadan, yalnızca klinik semptomlardan çıkarım yapmak gerekmekte ve benzer fenotip gösteren hastalık grupları arasında bu ayrım net olarak yapılamamaktadır.

CAPS, nadir görülen ve otozomal dominant olarak kalıtılan hastalıklar grubudur. Bu gruba, Ailesel Soğuk Otoinflamatuvar Sendromu (FCAS), *Muckle–Wells* Sendromu (MWS) ve Kronik İnfantil Nörolojik Kütanöz Artiküler Sendrom (CINCA) denen üç farklı hastalık dahildir. Bu hastalıklar, *NLRP3* genindeki mutasyonlar nedeniyle oluşur. Mutant kriyopyrin proteini, inflamazomu devamlı aktif halde tutar ve fazla miktarda IL-1 β salınımı görülür. Bu salınım da hastalarda ateş, yorgunluk, kas-iskelet sistemi bozuklukları, kızarıklık, döküntü olarak kendini gösterir. Tedavi olarak, genelde IL-1 inhibitörleri kullanılır. Hastaların bir kısmındaki mosaizm tespit edilebilirken, yaklaşık %40'ındaki (CINCA grubundaki en ağır fenotipteki hastalar) mutasyonlar hala bulunamamıştır (3).

TRAPS, nadir görülen, otozomal dominant olarak kalıtılan bir hastalıktır. Etkilenen gen, TNF'yi kodlayan *TNFRSF1A* genidir ve hastalarda tekrarlayan yüksek ateş görülür. Klinik bulguları AAA'ya çok benzemekle beraber, ataklar daha uzun

sürekli olur ve tedavi molekülü olarak kolşisin etki etmez. TNF’i bloke eden etanercept gibi ilaçlar dışında IL-1 β ’yı hedef alan ilaçlar da kullanılmaktadır. Hastalığın şiddeti mutasyona bağlı olarak kişiden kişiye değişmektedir. TRAPS için en önemli nokta, hastalarda amiloidoz gelişmeden tanıyı koyabilmektir (4).

MKD/HIDS, nadir görülen ve otozomal resesif olarak kalıtılan hastalıklar grubudur. *MVK* geninin kodladığı *MVK* enzimi izopren ve kolesterol sentezinden sorumludur. Hastalık spektrumunda üç fenotip görülür: hiperimmünglobulinemi D, periyodik ateş ve mevalonik asidüri. Mevalonat kinaz aktivitesinde azalmaya bağlı olarak hiperimmünglobulinemi D gelişir, tamamen eksik olduğunda ise hastalığın en ağır formu olan mevalonik asidüri görülür. HIDS için tam bir tedavi yöntemi bilinmemekle beraber, tanı koyarken genetik test yerine laboratuvar testi yapılması tercih edilir (2).

Dünyada ve Türkiye’de en sık görülen sistemik otoinflamatuvar hastalık AAA hastalığıdır.

2.1.1. Ailevi Akdeniz Ateşi

AAA, otozomal resesif olarak kalıtılan monogenik ve otoinflamatuvar bir hastalıktır. Hastaların klinik semptomları arasında tekrarlayıcı yüksek ateş, serozit, eklem ve abdominal ağrıları vardır (5). AAA hastalığı nadir hastalıklar grubu içerisinde tanımlanmasına rağmen Yahudi, Ermeni ve Arap toplumlarında hastalığın görülme sıklığı 1/250-1/1000 olarak kayıtlara geçmiştir (6). Türkiye’de görülme sıklığı ise 1/1073 olarak bilinmektedir (7).

AAA hastalığı 16. kromozomun kısa kolunda (16p13.3) yer alan, 3505 nükleotid içeren ve 10 ekzondan oluşan *MEFV* genindeki mutasyonlar sonucu meydana gelmektedir (8). *MEFV* geninin 1, 2, 3, 5, 9 ve 10. ekzonlarında çeşitli mutasyonlar bulunmuş olmakla birlikte, mutasyonlar açısından en zengin ekzonlar 2 ve 10. ekzonlardır. *MEFV* geninde en sık görülen mutasyonlar için Türkiye’deki allel frekansları, M694V için %51,4, M680I için %14,4, V726A için %8,6 ve E148Q için %3,5 ‘dur (9). Bu dört mutasyondan, E148Q mutasyonu 2.ekzonda oluşmaktadır ancak diğerleri 10.ekzonda görülmektedir (10). Bu mutasyonlardan M694V mutasyonu homozigot olduğu durumda hastalarda böbrek tutulumu görülebilmekte ve en ağır fenotip olan amiloidoz ortaya çıkabilmektedir (11).

MEFV genini kodlayan protein Pyrin olarak isimlendirilip, daha çok nötrofil ve makrofajlarda ifadesi görülür. Pyrin proteininin doğal bağışıklık sisteminin regülasyonundan sorumlu olduğu bilinmektedir. Bu proteinin mutant olduğu durumlarda, kaspaz-1 devamlı aktif kalır, buna bağlı olarak sürekli IL-1 β salınımı gerçekleşir ve aşırı inflamatuvar cevap oluşur (11).

AAA hastalığının tedavisi 1972'den beri kolşisin ilacı ile sağlanmaktadır. Kolşisinin tedavi açısından etki mekanizması hala tam olarak aydınlatılamamış olsa da, tubulin monomerlerine bağlanarak mikrotübüllerin uzamasını engellediği ve polimer oluşumunu bu şekilde durdurduğu bilinmektedir. Atakları önleyebilmesi açısından önemli olan bu ilacın kullanımında hastadan hastaya doz miktarları değişebilmektedir. Bununla beraber, bu ilaca karşı bazı hastalar direnç geliştirebilmektedirler. Bu nedenle, günümüzde, kolşisine alternatif olarak IL-1 inhibitörleri de tedavi amaçlı kullanılabilmektedirler (5).

AAA monogenik bir hastalık olmasına rağmen hasta bireylerde fenotip her zaman aynı olmamaktadır. Örneğin, klinik olarak AAA özelliği gösteren fakat yalnızca tek alelinde mutasyon bulunan hasta bireyler ya da aynı tip mutasyona sahip olmasına rağmen farklı klinik özellikler gösteren hastaların varlığı AAA hastalığı patogenezinde epigenetik mekanizmaların önemli rol oynayabileceğini düşündürmektedir (12, 13).

2.2. Epigenetik ve AAA

Epigenetik, DNA dizisinde herhangi bir değişiklik olmadan gen ifadesinin değişmesi olarak tanımlanabilir. Epigenetik mekanizmalar, transkripsiyon faktörleri ve sinyal yolları ile bağlantı halindedirler ve bu durum onların dışardan gelen ekstraselüler (çevreden gelen) sinyalleri algılayarak genom ile bu sinyaller arasında köprü görevi görmesini sağlar. Epigenetik mekanizmalar, histon modifikasyonları, DNA metilasyonu ve kodlamayan RNA'lardır (14). DNA metilasyonu, CpG adacıklarındaki sitozinin 5.C pozisyonundan metillenmesidir. DNA metiltransferazların katalizör olarak görev aldığı bu olay, transkripsiyonel susturmanın en önemli öğelerinden biridir (15). Histon modifikasyonları, histon proteinlerinin asetillenerek, fosforlanarak, metillenerek, ubiquitinlenerek ya da başka kimyasal modifikasyonlardan geçerek kromatin yapısını ve bu sayede gen ekspresyonunu

değiştirmeleridir (16). Kodlamayan RNA'lar ise DNA'dan transkribe olan ama proteine çevrilmeyen RNA'lardır. piRNA'lar, lncRNA'lar, miRNA'lar bu gruba dahildir ve gen ekspresyonunun regülasyonunda görev alırlar (17).

AAA hastalığında epigenetik faktörlerin rolü olabileceğine dair son yıllarda birçok çalışma yapılmıştır. Örneğin, aynı atadan gelen ama Türkiye ve Almanya gibi iki farklı coğrafyada yaşamış bireylerle yapılan bir çalışmada çevre faktörünün fenotipik varyasyonu %12 oranında etkileyebileceği kaydedilmiştir (18). Bununla beraber, 2010 yılında Ermeni toplumunda geniş bir kohort ile çalışılmış ve 1299 AAA hastasının genotipleri ve klinik semptomları detaylı olarak analiz edilmiştir. Bu analiz sonucunda, önemli bir yüzdeye sahip heterozigot bireylerin ağır fenotip grubu içerisinde yer aldıkları tespit edilmiş ve bu duruma epigenetik faktörlerin sebep olabileceği düşünülmüştür (12). DNA metilasyonu ve AAA arasındaki ilişkiyi gösteren bir çalışma 2011 yılında yapılmıştır ve bu çalışmada, hasta ve kontrol bireyler arasındaki metilasyon seviyeleri karşılaştırılmıştır. Buna göre, metilasyon seviyesi AAA hastalarında daha fazla, *MEFV* geni ekspresyonu ise daha düşük olarak bulunmuştur (19). Epigenetik faktörler arasından kodlamayan RNA'lardan en iyi bilinen ve en çok çalışılanı ise miRNA'lardır ve farklı birçok hastalıkta önemli regülatör moleküller olarak karşımıza çıkmaktadırlar (20).

2.3. miRNA'lar

Kodlanmayan RNA'lardan miRNA'lar gen ifadesinin düzenlenmesini sağlayan, 21-23 nükleotit uzunluğunda olan, tek iplikli ve protein kodlamayan RNA molekülleridir. miRNA öncelikle RNA Polimeraz II enzimiyle pri-miRNA formuyla çekirdekte sentezlenir, *Drosha* ve *DCGR8* alt ünitesinin kompleks oluşturmasıyla pri-miRNA parçalanır ve pre-miRNA'ya dönüşür. *Exportin 5* aracılığıyla pre-miRNA çekirdekten sitoplazmaya geçer ve burada *Dicer* enzimleriyle işlenerek miRNA ile uyarılan susturum kompleksini (*miRNA-induced silencing complex*) oluşturur. Bu kompleks ise daha sonra hedef mRNA molekülüne bağlanarak baskılama işlemini gerçekleştirir (21). Tek bir miRNA insan genomunda birçok gene bağlanabilmekte ve ifade düzeylerini etkileyebilmektedir (22).

miRNA'lar genelde hedef mRNA'nın 3' UTR bölgesindeki özgül yerlere bağlanarak post-transkripsiyonel düzeyde gen ekspresyonunu düzenlerler.

miRNA'ların 5'UTR, kodlayan diziler ve promötör bölgeler ile interaksyonları gösterilmiş olsa da, işlevlerini genelde 3'UTR bölgesi üzerinden gerçekleştirirler. miRNA-mRNA interaksyonu ya mRNA degradasyonunu başlatır ya da protein sentezini baskılar. mRNA'ların üzerindeki hedef bölgelerin çoğunluğu miRNA'lar ile kısmi baz uyumluluğu gösterir. Buna bağlı olarak, bir miRNA 100'e yakın farklı mRNA molekülünü hedefleyebilir ve farklı miRNA'lar aynı mRNA üzerinde birçok bağlanma noktasına sahip olabilir (23).

Olgun miRNA'nın ismini miRNA dizisinin yönü belirlemektedir. Olgunlaşmamış *stem loop* yapısından oluşan, 5'-3' yönündeki miRNA dizisi için 5p kısaltması kullanılırken, 3'-5' yönündeki miRNA dizisi için 3p kısaltması kullanılır (23).

miRNA'ların insan genlerinin yaklaşık %30'unu negatif bir şekilde regüle ettiği bilinmektedir. Bununla beraber, gelişim, çoğalma, farklılaşma, immün reaksiyon, apoptoz, tümör genez, sinyal iletimi ve organ gelişimi gibi birçok farklı biyolojik olayda önemli rolleri oldukları anlaşılan miRNA'lar, hatalı regülasyonları nedeniyle farklı hastalık gruplarıyla ilişkilendirilmişlerdir. Farklı kanser tiplerinde, diyabette, kardiyovasküler ve böbrek hastalıklarında karşımıza çıkan miRNA'ların hem tanı hem de tedavi amaçlı araştırmaları yapılmaktadır (24).

2.3.1. AAA Hastalığında miRNA'lar

miRNA'ların birçok hastalığın patogenezinde dikkati çekmesi ile AAA hastalığında da son iki yılda bu konu ile ilişkili araştırmalar artmıştır. 2017 yılında yapılan bir çalışmaya göre, AAA hastaları *MEFV* mutasyonlarına göre alt gruplara ayrıldı; bu gruplar, ekzon 10 mutasyonuna sahip AAA hastaları (A grubu), ekzon 3 mutasyonuna sahip AAA hastaları (B grubu) ve iki ekzonda da mutasyonu olmayan AAA hastaları (C grubu) olarak tanımlandı. Yapılan mikrodizin analizleri sonrası, A ile B grubu arasında 24, A ile C grubu arasında 30, B ile C grubu arasında ise 25 farklı miRNA'nın ekspresyon farklılıkları tanımlanmıştır. Bu bulgular, ileride AAA hastalığının alt gruplarını belirlemede yararlı olabilecek biyobelirteç çalışmalarına öncü olabilecektir (25).

Aynı yıl yapılan başka bir çalışmada ise, insan miyelomiyositik hücrelerinde *MEFV* geni baskılanmış ve mikrodizin analizine gidilmiştir. Bu analizle beraber

yapılan biyoinformatik çalışmalar sonrasında miR-4520a'nın otofaji ile ilgili olan RHEB/mTOR sinyal yolağında rol alıyor olabileceğini tespit etmişlerdir. Hedef geninin ise *RHEB* geni olduğunu lusiferaz aktivite deneyi ile gösterdikten sonra, yapılan qRT-PCR deneyleriyle bu miRNA'nın ifadesinin özellikle kötü gidişli AAA hastalarında anlamlı bir şekilde arttığını göstermişlerdir (26).

Geçtiğimiz yıl ise bu konuda 5 çalışma yayımlanmıştır. Çalışmalardan birinde, literatürden otoinflamatuar hastalıklarla ilişkili olabilecek 15 adet miRNA seçilerek qRT-PCR deneyleri yapılmış, hasta ve kontroller arasında anlamlı olarak ifade farklılığı gösteren miRNA'lar belirlenmiştir. Bu miRNA'lardan 11 tanesinin kontrol bireylerle karşılaştırıldığında ifadelerinin anlamlı bir şekilde azaldığı tespit edilmiştir. Kolşisin alan/almayan hastalar kendi içlerinde değerlendirildiğinde ise, 5 miRNA'nın (miR-132, miR-15a, miR-181a, miR-23b, miR-26a) ifadesinin kolşisin alan hastalarda anlamlı bir şekilde arttığı, farklı 5 miRNA'nın (miR-146a, miR-15a, miR-16, miR-26a, miR-34a) ifadesinin ise yine kolşisin alan hastalarda anlamlı bir şekilde azaldığı belirlenmiştir (27). Yayımlanan bir diğer çalışmada ise atak halinde olan ve olmayan hastalara ait serum örnekleri kullanılarak mikrodizin analizine gidilmiş ve miR-204-3p'nin ifadesinin ataklı AAA hastalarında azaldığı bulunmuştur. Lipopolisakkarit (LPS) indüklenmesiyle miR-204-3p'nin ifadesi makrofajlarda (THP-1 hücre hattında) bastırılmış ve Toll benzeri reseptör 4 (*Toll-Like Reseptör 4- TLR4*) yolağıyla aktive olan sitokinlerin üretimi indüklenerek kantitasyon çalışmaları yapılmıştır. Yapılan biyoinformatik ve lusiferaz aktivite deneyi sonuçlarına göre ise, miR-204-3p'nin fosfoinosit 3-kinaz gamma (PI3K γ) sinyal yolağında etkili bir miRNA olduğu ortaya çıkmıştır. Sonuç olarak, serumda bulunan miR-204-3p'nin AAA hastalığında potansiyel bir biyobelirteç olarak kullanılabileceği ayrıca sitokin üretimini PI3K γ yolağı üzerinden bastırabilen bir molekül olduğu için tedavi hedefi de olabileceği belirtilmiştir (28). Amarilyo ve ark.'larının yaptığı bir çalışmada, 10 adet M694V homozigot AAA hastası ve 10 adet kontrol bireyden alınan periferik kan örneklerinden RNA izolasyonu yapılmış, sonrasında ise *NanoString nCounter* teknolojisi kullanılarak 798 olgun insan miRNA'nın ifadesi profillenmiştir. Buna göre, hastalarda kontrollere göre 4 miRNA'nın (miR-144-3p, miR-21-5p, miR-4454 ve miR-451a) ifadesinin arttığı, 3 miRNA'nın (miR-107, let-7d-5p ve miR-148b-3p) ifadesinin ise anlamlı bir şekilde azaldığı tespit edilmiştir (29).

Bu çalışmalar dışında, grubumuz da AAA hastalığı patogenezi miRNA'ların olası etkilerini araştırmayı hedeflemiştir. Bu amaçla, kötü gidişli 6 AAA hastası ve 6 kontrol birey ile mikrodizin ve biyoinformatik çalışmaları yapılmıştır. Sonuç olarak, miR-20a-5p'nin ifadesinin hastalarda arttığı ve miR-197-3p'nin hastalarda ifadesinin azaldığı görülmüştür (1). İki farklı hücre hattıyla yapılan fonksiyonel analizler sonrası, miR-20a-5p ve miR-197-3p'nin anti-inflamatuvar bir etki mekanizmasına sahip olduğu anlaşılmıştır. Ayrıca, miR-197-3p için lusiferaz aktivite deneyleri de tamamlanmış ve bu miRNA'nın hedef geninin *IL1R1* olduğu tespit edilmiştir (yayınlanmamış veri).

2.3.2. Ekstraselüler miRNA'lar

miRNA'lar genelde hücrelerden salınmakla beraber, hücre dışı salınan formları da mevcuttur ve bu formlar birçok vücut sıvısında bulunabilirler. Hücresel miRNA'lar hızlı bir şekilde degrade olurken ekstraselüler ya da diğer bir isimle dolaşımdaki miRNA'lar (ECmiRNA) daha stabil ve RNaz aktivitesine karşı daha dayanıklıdır. Vücut sıvılarındaki ECmiRNA'lar yüksek ya da düşük pH, birçok kere yapılan don-çöz ya da kaynama olayları gibi zorlu koşullar karşısında stabil kalmışlardır. Aynı koşullar altında, hücresel miRNA'lar hemen degrade olmaktadır. ECmiRNA'lar; eksozomlarla, Ago protein kompleksleriyle, mikrovessiküllerle, *High-Density Lipoprotein (HDL)* ile ya da apoptotik cisimciklerle dış ortama salınabilirler. Ago2 proteini *RNA-induced silencing complex* 'in temel elemanlarından biridir ve mRNA'nın translasyonunun regülasyonundan sorumludur. 2011 yılında iki bağımsız çalışma grubu tarafından ECmiRNA'ların %90'ının Ago protein ailesiyle taşındığı, ancak bu birleşmenin özgül olmadığı ve hücrelerin ölümü ile ortaya çıkan fizyolojik bir aktivite sonucu olduğu rapor edilmiştir (30).

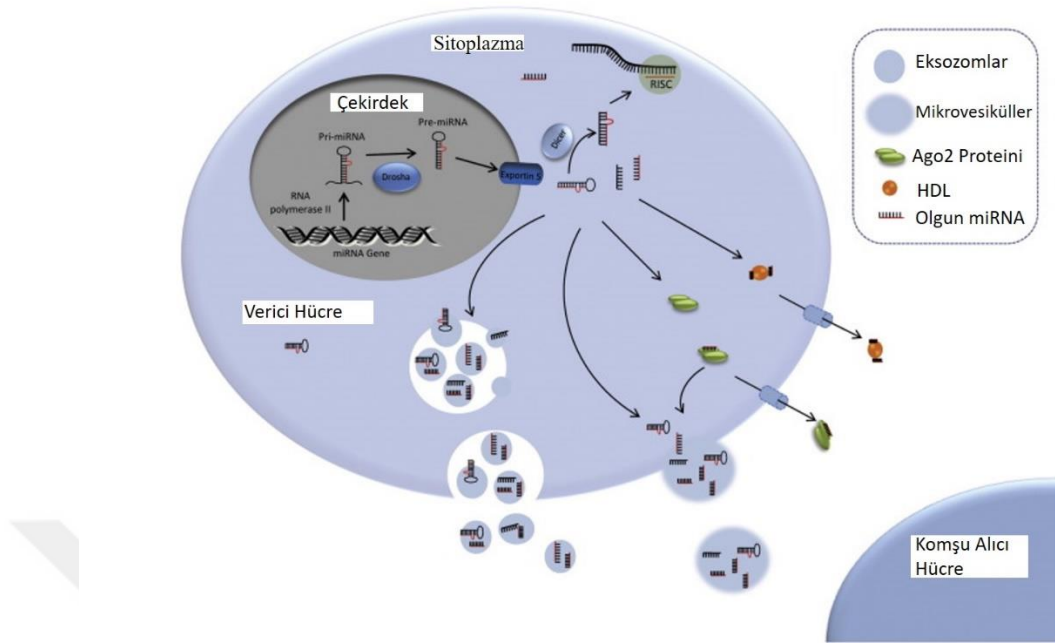
Mikrovessiküller, diğer adlarıyla eksozomlar ya da mikropartiküller, eksozom benzeri nanovesiküllerdir ama büyüklükleri, salınım ve biyogenez mekanizmaları gibi temel özellikleri bakımından eksozomlardan farklılık gösterirler. Çapları 100-1000 nm arasında değişmekle beraber, eksozomlara göre morfolojik yapıları daha heterojendir. Ayrıca, eksozomların aksine (endositik yolda içe doğru çıkıntı, Şekil 2.3.) direkt olarak plazma membranından dışarıya doğru çıkıntı yaparak serbest kalırlar. Kanser hücreleri de dahil olmak üzere birçok hücre tipi, mikrovessikülleri ekstraselüler ortama

salgılamaktadır. Eksozomlar gibi, mikrovessiküller de miRNA'ları içlerinde koruyucu bir şekilde taşıyabilmektedirler. Birçok farklı hastalık mekanizması için mikrovessiküllerle çalışmalar yürütülmüş ve bu vessiküllerin önemli biyolojik yollarda etkili olabileceği ortaya konulmuştur (31).

ECmiRNA'lar aynı zamanda lipoproteinler ile ekstraselüler ortama salınmaktadırlar. Lipoproteinler, çeşitli lipidler ve proteinlerden oluşmakla beraber, steroidlerin, trigliserollerin, kolesterol ve yağda çözünen vitaminlerin karaciğerden periferel dokulara taşınmasında görevlidirler. Lipoproteinler, yüksek orandaki çözünürlükleri ve suda çözünmeyen moleküllere olan yüksek afiniteleri sebebiyle, nükleik asitleri taşıyabilir ve hatta gen iletim ajanı olarak bile kullanılabilirler. Lipoproteinlerden özellikle HDL ile taşınan miRNA'ların farklı patolojik durumlara karşı özgün ekspresyon paternleri oluşturabileceği bildirilmiştir. Ancak, miRNA'ların aktif ve seçici olarak HDL'lere yüklenerek verici hücrelerden alıcı hücrelere taşındığını kanıtlamak pek mümkün olmamaktadır (31).

Apoptotik cisimcikler ise bilinen en büyük ekstraselüler vessiküllerdir. Çapları 1 ila 5 µm arasında değişmekle birlikte, gerekli olmayan hücrelerin ortadan kaldırılmasını sağlayan ve en önemli hücresel olaylardan biri olan apoptoz sürecinin sonlarına doğru salınımları gerçekleşir. Diğer ekstraselüler vessiküller gibi, onlar da çeşitli moleküllerin (örneğin, miRNA'lar, mRNA'lar ve DNA parçacıkları) taşınmasını sağlayabilirler. Ancak, apoptotik cisimciklere yüklenen miRNA'lar, ölen hücrelerin yan ürünleridir. Bu durumda, miRNA'ların apoptotik cisimcikler içersine alınmasının seçici ve özgün bir şekilde yapıp yapılmadığı soru işaretini korumakta ve konu hakkında daha fazla araştırmayı gerektirmektedir (31).

Bu bilgilere göre, ECmiRNA'ların Ago protein kompleksleriyle ya da apoptotik cisimciklerle salınımları genelde özgül olmamakla beraber, bu miRNA'lar hücrelerdeki fizyolojik aktivitelerin sonucu olarak bu yapılarla taşınmaktadırlar. Mikrovessikül ya da HDL aracılı taşınabilen ekstraselüler miRNA'lar da bulunmakla beraber, ECmiRNA çalışmaları daha çok eksozomlar üzerine yoğunlaşmıştır. Bunun nedeni ise eksozomal miRNA'ların önemli bir kısmının özgül fonksiyonlarını yapabilmek için eksozomlara yüklenmekte ve hedef hücrelere gönderilmekte olmalarıdır (31).



Şekil 2.1. Ekstraselüler miRNA’ların biyogenezi ve dış ortama salınım mekanizmaları (31).

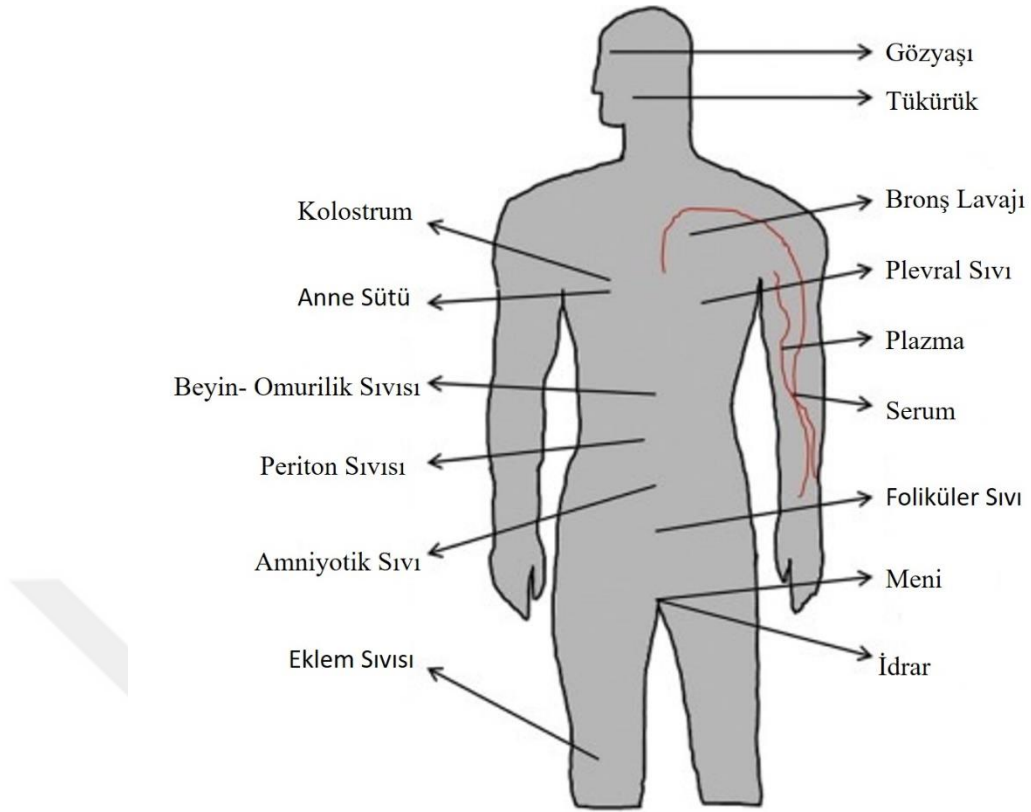
2.4. Eksozomlar

Eksozomlar, 30-120 nm arasında değişen boyutlara sahip, hücre-hücre iletişimi, immün sistemin regülasyonu, sinyal iletimi, genetik materyalin aktarımı ve daha birçok farklı biyolojik yolağı regüle edebilen, dolaşımdaki nanovesiküllerdir. Eksozomlar plazma, serum, idrar, eklem sıvısı gibi birçok vücut sıvısında bulunabilirler (31) (Şekil 2.2). Bu vesiküller; protein, lipid, miRNA ve mRNA gibi önemli molekülleri taşıyarak, hücreler arası interaksyonda aracı olarak görev alırlar. 2007 yılında Valadi ve arkadaşları tarafından gösterildiği üzere, eksozomlar donör hücreden alıcı hücreye degrade olmadan mRNA ve miRNA’yı taşıyabilmekte ve bu taşınan RNA molekülleri alıcı hücrede protein üretimini ya da gen ifadesini değiştirebilmekte yani gittiği bölgede fonksiyonel olabilmektedir. Bu öncü çalışmada, fare ve insan mast hücre hatlarından eksozom eldesi yapılarak içlerinde RNA olduğunun tespiti yapılmış ve mikrodizin çalışmalarına gidilmiştir. Bu analizlerde, verici hücrede ifadesi olmayan genlere ait yeni mRNA’lar keşfedilmiştir. Bulunan RNA moleküllerinin hücre hatlarına transferinin mümkün olduğu *in vitro translation*

yöntemiyle gösterilmiştir. Ayrıca, RNA için kalite kontrolü yapılırken miRNA gibi küçük RNA moleküllerine de rastlanmıştır. Bu miRNA'ları tanımlamak için miRCURY LNA Dizin sistemi uygulanmış ve 121 adet miRNA'nın eksozomlarda taşındığı gösterilmiştir. Bu miRNA'lardan bir kısmının eksozomlarda hücreye göre daha fazla ifadesinin olduğu anlaşılmış ve bu yüzden bazı miRNA'ların özgül olarak eksozomlara yüklenip işlevlerini gerçekleştirdikleri öne sürülmüştür (32).

Eksozomların köken aldıkları ve hedefledikleri hücreler *in vivo* çalışmaları için belirleyici faktör olmasına rağmen eksozomlar dolaşıma salındığı zaman bu sorunun cevabını bulmak zorlaşmaktadır. Verici hücre miRNA içeriği ile eksozomal miRNA içeriği karşılaştırılarak eksozomların hangi hücrelerden köken aldığı çalışabilmekte ancak bu yaklaşım da çok başarılı olamamaktadır (33).

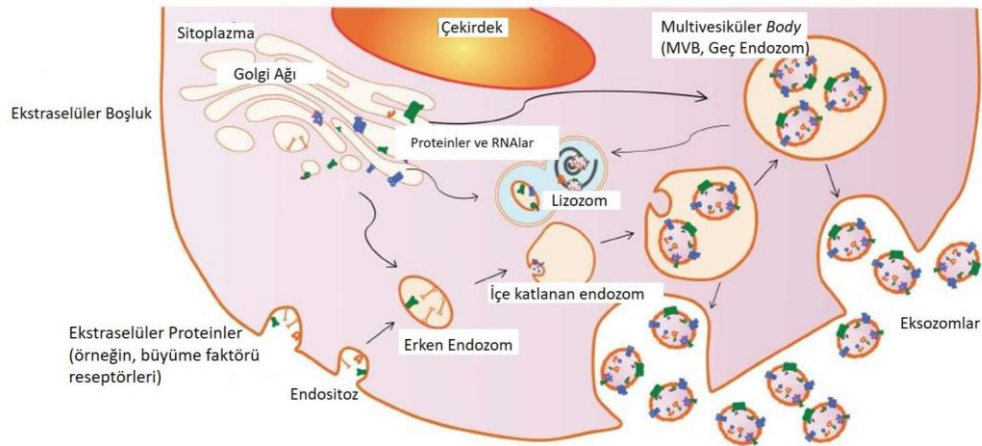
Eksozomları bu kadar özel yapan kısım aslında taşıdıkları miRNA molekülleridir. Bu yüzden, yaşanan zorluklara rağmen eksozomal miRNA'ların gittikleri alıcı hücrelerde fonksiyonel olmaları 2012 yılında dendritik hücreden elde edilen eksozomlar aracılığıyla da gösterilmiştir. GFP-bağlı proteinler eksozomlara inkorpore edilmiş ve bu eksozomların hem yakın bölgelerdeki dendritik hücrelere hem de antijen spesifik- CD4⁺ T hücrelerine gittiği gösterilmiştir. Ayrıca, özel bir görüntüleme sistemi ile (spektroflorimetri, floresan *time-lapse* ve immüno-elektron mikroskop teknikleri birleştirilmiştir.), dendritik hücreler arası eksozomal transfer incelenmiş ve eksozomların hedef dendritik hücre ile birleşimi ve eksozomal içeriğin dendritik hücre sitozolüne salınımı görüntülenmiştir. Alıcı dendritik hücrelerdeki mRNA'ların baskılanmış olması ise eksozomal miRNA'ların fonksiyonel olduklarını göstermiştir (34, 35).



Şekil 2.2. Bugüne kadar eksozomlar ve eksozomal miRNA'lar ile ilişkilendirilmiş vücut sıvıları (31).

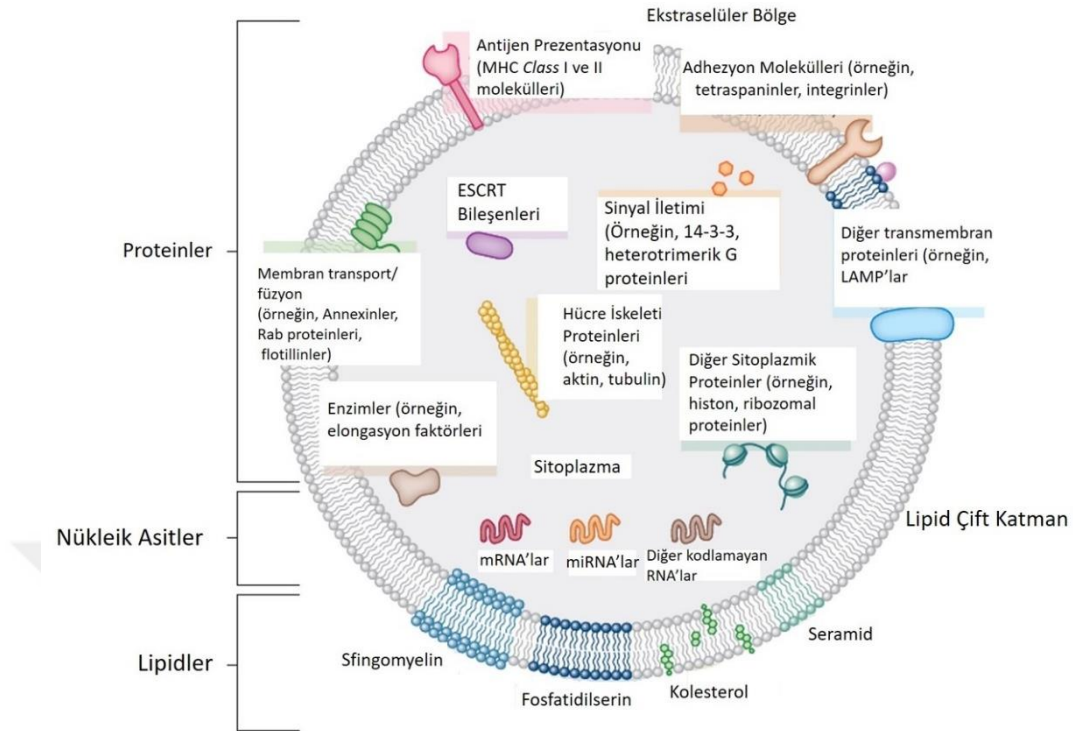
2.4.1. Eksozomların Biyogenezi ve Moleküler Kompozisyonu

Eksozomların biyogenezi plazma membranında bir cebin oluşması ordan içe doğru bir çıkıntı ile endozomların oluşması ile başlar. Erken endozom zarının kendi içinde kıvrılmasıyla ise çok kesecikli yapılar yani *multivesiküler body*'ler (MVB) oluşur. Bu çok-kesecikli geç endozom, hücre zarı ile birleşip içerisindeki kargoyu eksositoz ile dış ortama verirse eksozomlar salınmış olurlar (Şekil 2.3). Eğer geç endozomal yapı lizozom ile birleşirse, biyolojik süreç degradasyonla sonuçlanır. Bu yüzden eksozomlar, oluşum mekanizmaları bakımından plazma membranından direkt koparak ayrılan diğer ekstraselüler vesiküllerden farklıdırlar (36).



Şekil 2.3. Eksozomların biyogenezi (37).

Eksozomlar, endozomal bir orijinden geldikleri için tetraspaninler (CD9, CD63, CD81 and CD82), hücre zarı taşınmasında ve birleşmesinde gerekli Annexin, Rab ve flotillin proteinleri, MVB biyogenezi için gerekli Alix ve TSG101 proteinleri ve Hsc70, Hsp90 gibi *heat shock* proteinlerinden oluşur. Bu vesiküller ayrıca aktin, tubulin gibi hücre iskeleti proteinlerini ve GAPDH, pürivat kinaz gibi metabolik enzimleri bünyelerinde barındırırlar. Bununla beraber, eksozomal membran kolesterol, sphingolipid, seramid ve gliserolfosfolipid gibi uzun ve doymuş yağ asidi grubu *lipid raft* moleküllerince zengindir. Ayrıca, antijen sunan hücrelerden elde edilen eksozomlar (dendritik hücre gibi) yüzeylerinde majör histokompatibilite kompleksi I ve II'yi ifade edebilirler (36).



Şekil 2.4. Eksozomların moleküler kompozisyonu (38).

2.4.2. Eksozomların İzolasyonu ve Karakterizasyonu

Eksozomların izolasyonunda belirlenmiş ortak bir protokol olmayıp bu amaçla beş farklı yaklaşım izlenmektedir. Bu yöntemler, ultrasantrifüj, ultrafiltrasyon, immün afinite, presipitasyon ve yoğunluk aşamalı (*density-gradient*) çöktürmedir. Ultrasantrifüj, hala en iyi yöntem olarak bilinmekte ve sıklıkla uygulanmaktadır. Bu yöntemde, farklı santrifüj merkezkaç kuvvetleriyle art arda santrifüj döngüleri uygulanır ve eksozomlar büyüklük ve yoğunluklarına göre örnekteki diğer moleküllerden ayrılır. İzolasyon için, fazla miktarda başlangıç materyali gerekir. Ultrafiltrasyonda ise, klasik filtrasyon yöntemlerine benzer şekilde moleküler ağırlığı bilinen farklı nanomembranlar kullanılır. Ultrasantrifüjden daha kısa sürmesine rağmen, membranlar tıkanabilmekte ve bu da örnek kaybına yol açabilmektedir. İmmün afinite yönteminde ise eksozomlarda sık bulunan yüzey belirteçleri (CD63, CD81 gibi) hedef alınarak tasarlanan antikör fikse manyetik boncuklar söz konusudur. Bu yöntem pahalı olmakla birlikte, eksozom eldesi genelde azdır. Presipitasyon

yönteminde, eksozomlar PEG bazlı bir hidrofilik polimer yardımıyla düşük hızlı santrifüjde çöktürülür. Hızlı ve çok etkili bir yöntem olmasına rağmen, birlikte çökebilen ve eksozom olmayan kontaminantlar sorun teşkil edebilmektedir. Yoğunluk aşamalı çöktürmede ise, ultrasantrifüjün yanında değişen yoğunluklu süroz tabakası da kullanılır ve eksozomların büyüklük ayrımı bu yöntem sayesinde daha özgül olabilir (39, 40).

Eksozomlar büyüklüklerine, morfolojilerine, konsantrasyonlarına ve moleküler kompozisyonlarına göre karakterize edilebilir. En sık kullanılan yöntemler, TEM, akım sitometri ya da *Western Blot* yöntemleridir. Ancak, her geçen gün gelişen teknolojiyle birlikte yeni karakterizasyon yöntemleri de eksozomlar için kullanılabilmektedir. Bu teknolojilere örnek olarak, *Dynamic light scattering (DLS)*, *Nanoparticle tracking analysis (NTA)*, *Atomic force microscopy (AFM)* verilebilir. TEM yönteminde, eksozomlar morfolojilerine ve büyüklüklerine göre karakterize edilir. Eksozomların çapları çok küçük olduğu için, konvansiyonel ışık mikroskoplarıyla görüntüleme alınamamaktadır. Elektronların kısa dalga boyları sayesinde, eksozomlara özgün *cup-shaped* morfoloji gözlemlenebilir. Akım sitometri yönteminde, eksozomlar yüzey belirteçlerine göre sınıflandırılabilir. Ancak, çoğu akım sitometri cihazının algılayabildiği büyüklük aralığı limitlidir. Eksozomlara özel akım sitometri cihazları günümüzde üretilmeye başlanmıştır ancak konvansiyonel cihazlarda da bu vesikülleri karakterize edebilmek mümkündür. Bunun için, büyüklüğü bilinen özel lateks boncuklar kullanılıp eksozomların onlara bağlanması sağlanabilmektedir. *Western Blot* yönteminde ise eksozomlardan protein eldesi yapılır ve en sık gözlenen protein belirteçlerine bakılır. Eksozomal olmadığı bilinen başka proteinlere de bakılarak, yöntem geliştirilebilir. NTA yöntemi, basit olarak bir lazer ve hassas kameralı mikroskop sistemi içerir ve sıvı içindeki partiküllerin *Brownian* (bir sıvı içindeki partiküllerin diğer atom ya da moleküllere çarpmasından doğan rastgele hareketler) hareketine göre ölçümünü yapar. Bu yöntem sayesinde, tam büyüklük belirlenebilir ve özel antikorlar kullanılırsa floresan sinyalden kantitasyonu da yapılabilir. AFM yönteminde, yüzey çubuk benzeri düzenek ucundaki oldukça ince bir iğneyle taranır ve yüzey topografisi 3D olarak yüksek rezolüsyonda görüntülenebilir. DLS yönteminde, lazer ışını yardımıyla dağılan ışığın yoğunluğu zamana bağlı olarak ölçülür ve eksozom büyüklüğü belirlenebilir (41).

2.4.3. Aday Biyobelirteç Olarak Eksozomlar ve Eksozomal miRNA'lar

Eksozomlar taşıdıkları moleküller ve hücre-hücre interaksyonunu sağlayan aracı vesiküller oldukları için, farklı hastalıklarda aday biyobelirteç olarak öne çıkmışlardır. Eksozomlar, RNA bakımından oldukça zengindir. Yapılan bir *deep sequencing* çalışmasında, en dominant RNA türünün 4 ile 40 nükleotit arasında değişen boyutlarıyla miRNA'lar olduğu belirlenmiştir (42). Özellikle, taşıdıkları miRNA'ların donör hücreden alıcı hücreye geçtiklerinde, stabil ve fonksiyonel olmaları ve bu sayede hedef genlerin ekspresyonunu değiştirebilmeleri eksozomları çok değerli vesiküller haline getirmiştir. Bu amaçla, kanserden böbrek hastalıklarına kadar ulaşan geniş bir spektrumda eksozomal miRNA'ların prognostik ve diyagnostik amaçlarla kullanılabilmesi için çalışmalar yapılmıştır (43, 44).

Son yıllarda, likit biyopsi denilen kansere önceden teşhis koymaya, hastalar için en etkili tedavi yöntemini bulmaya ya da kanserin geri dönüp dönmediğini anlamaya yönelik bir kan testi geliştirilmiştir. Likit biyopsi işlemi için; eksozomlar, dolaşımdaki tümör hücreleri ya da tümör DNA'sı kullanılabilir (45). Yapılacak analizler için eksozomları kullanmak daha avantajlıdır çünkü, eksozomların konsantrasyonu dolaşımdaki tümör hücrelerine göre daha fazladır ve bu yüzden daha kolay zenginleştirilebilirler (40). Eksozomları likit biyopside kullanmak invaziv olmayan bir yöntem olduğu için de tercih edilmektedir (46).

Otoimmün ve otoinflamatuar hastalıklarda da eksozomal miRNA'lar ile yapılan çalışmalar son yıllarda karşımıza çıkmaktadır. Örneğin, 2015 yılında yayınlanan bir çalışmada, sistemik lupus eritematozus (SLE) hastaları ile çalışılmış ve hastaların idrar örneklerinden eksozom izole edilmiştir, daha sonra ise bu eksozomlardan miRNA elde edilmiştir. Yapılan qRT-PCR analizleriyle literatürden seçilen miR302d, miR-335, miR-200c ve miR-146a'nın eksozomlar aracılığıyla taşındığı ve özellikle miR-146a'nın SLE hastalığının patogenezinde etkili olabileceği ve ileride SLE için biyobelirteç olarak kullanılabileceği belirtilmiştir (47). Başka bir örnek ise çocuklardaki koroner kalp rahatsızlığının en bilinen sebeplerinden biri olan ve otoinflamatuar bir hastalık olan Kawasaki hastalığıdır. Bu rahatsızlığın günümüzde bile etkili bir diagnostik biyobelirteci bulunmamaktadır. Bu amaçla yapılmış ve 2017 yılının Mart ayında yayınlanmış bir çalışmada serumdan elde edilen eksozomlar kullanılarak RNA izolasyonu gerçekleştirilmiş, yapılan mikrodizin analizi

ve qRT-PCR analizleriyle 4 adet miRNA diğer febril hastalıklar ile Kawasaki hastalığını ve sağlıklı bireylerle Kawasaki hastalığına sahip olan bireyleri birbirinden ayırt etmede aday biyobelirteç olarak öne çıkabilmiştir (48). Aynı şekilde 2017 yılında yayınlanan başka bir çalışmada kompleks ve tanısı zor olan bir hastalık olan multipl skleroz (MS) hastalığının üzerinde durulmuş ve hem MS hastalarını hem de sağlıklı kontrolleri içeren genel bir eksozom transkriptom profillemesi çalışması yapılmıştır. Bu çalışmada, 4 adet eksozomal miRNA'nın iki grup arasında ekspresyon seviyelerinde gösterdikleri belirgin farklılıklar ile öne çıktığı ve tanı koymada yardımcı olabilecekleri belirtilmiştir (49).

2018 yılında yapılan bir çalışmada, 3 romatoid artrit hastası ve 3 kontrol bireyin serum örnekleri kullanılarak spesifik eksozomal miRNA profilleri mikrodizin tekniği ile analiz edilmiş ve kantitatif gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu ile validasyonları yapılmıştır. 20 adet eksozom enkapsüle miRNA kontroller ve hastalar arasında tanımlanmış, bunlar arasında miR-6089'un ise hastalarda anlamlı bir şekilde azaldığı tespit edilmiştir. Yapılan fonksiyonel çalışmalar sonrası eksozomal miR-6089'un LPS/TLR4 (Lipopolisakkarit/ Toll benzeri reseptör 4) sinyal yolağında etkili olduğu ve TLR4'ün direkt hedef gen olduğu anlaşılmıştır. Bu miRNA'nın, gelecekte daha kapsamlı çalışmalarla desteklenerek romatoid artrit hastalığında biyobelirteç olarak kullanılması mümkün olabilecektir (50).

2.4.4. Tedavi Molekülü Olarak Eksozomlar

Gen tedavisi (gen replasmanı) eksik ya da hatalı olan genin, hastanın hücrelerine ya da dokusuna geri kazandırılmasını hedefler ve araştırmacılar tarafından viral ya da viral olmayan vektörler kullanılarak bu yönde çalışmalar yapılmaktadır. Adenovirüsler, lentivirüsler, Herpes virüsleri gibi virüs çeşitleri modifiye bir şekilde viral vektör olarak kullanılmaktadırlar. Viral olmayan vektörler arasında ise lipozomlar ve nanopartiküller gösterilebilir. Bu vektörlerin kullanımı zaman zaman etkili olmakla birlikte, immün cevapların oluşmasına, mutagenез oluşumuna ve genlerin ancak sınırlı bir kapasiteyle transfer edilmesi gibi sorunlara yol açabilmektedir (51).

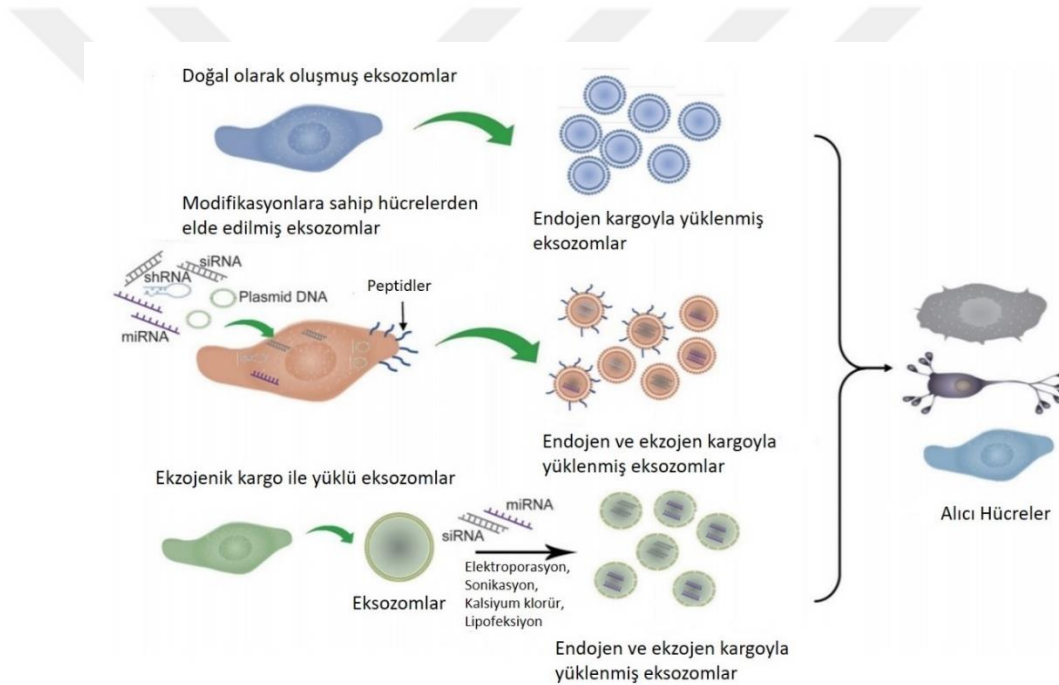
RNA interferans (RNAi) yöntemi ise kısa, çift-zincirli RNA molekülleri kullanarak, ilgili genin diziye özgül bir şekilde susturulmasını hedefler. Bunun için

genelde siRNA molekülü tercih edilir. İletimi sağlamak amacıyla yumuşak/organik nanopartiküller ya da sert/inorganik nanopartiküller seçilebilir. Genelde, sert/inorganik olanlar çözünürlüğü kontrol edebilmek için bir polimerle kaplı olurlar. Yumuşak/organik nanopartiküllere en iyi örnek lipozomlar ve polimer nanopartiküllerken, sert/inorganik olanlara nanotüpler ve manyetik nanopartiküller örnek olarak verilebilir (52). *In vivo* olarak siRNA iletimini kliniğe uyarlamada aşılması gereken birtakım zorluklar bulunmaktadır. Bunlar arasında, siRNA'ların stabilitelerini koruyamamaları, istenmeyen bölgelerde oluşan gen ifadesinin inhibisyonu ve bağışıklık sisteminin bu molekülleri tanıyamaması bulunmaktadır. siRNA'lar çıplak halde bulundukları zaman hemen degrade olurlar ve siRNA'ların yarı ömürleri 30 dakikadan kısadır. Bu yüzden, onları koruyucu özellikleri olan ve iyi dizayn edilmiş bir iletim mekanizmasına ihtiyaç vardır (53).

Günümüzde, hem gen tedavisi hem de RNAi yöntemi için eksozomlar. İmmün modülasyonu sağlayabilmeleri, önemli molekülleri doğal olarak taşıyabilmeleri ve hücre-hücre interaksiyonunda görevli olmaları eksozomların tedavi amaçlı kullanımlarını akla getirmektedir. Bu vesiküller oluştuğu (doğal) halleriyle, modifikasyonlara sahip hücrelerden elde edilmiş ya da ekzojenik bir kargoyla yüklenmiş halleriyle kullanılabilirler (Şekil 2.5.). Doğal haliyle, embriyonik kök hücreden elde edilmiş eksozomların intramiyokardiyal enjeksiyon yoluyla kardiyosit hücrelerine verilmesi sonucu komşu hücre popülasyonlarında koruyucu bir etki görüldüğü ve deneyin yapıldığı fare modelinde miyokard enfarktüsü sonrası kardiyak fonksiyonların düzeldiği not edilmiştir. İkinci bir method olarak ise modifikasyonlara (örneğin, transfeksiyon) sahip hücrelerden elde edilmiş eksozomal miRNA'lar ve proteinler alıcı hücrelere tedavi amacıyla verilebilir. Örneğin, GE11 peptid DNA'sı taşıyan plazmidler ile transfekte edilmiş (siRNA ya da miRNA ile) HEK293 hücrelerinden elde edilen eksozomlar tümör hücrelerini hedefleyerek tümör büyümesini durdurucu etki gösterebilirler. Üçüncü bir method olarak ise ekzojenik RNA'ların eksozomlara elektroporasyon, sonikasyon, kalsiyum klorür ya da lipofeksiyon yöntemlerini kullanarak direkt olarak yüklenmesi verilebilir. Nöronları hedefleyen ve peptid kodlayan bir plazmid ile transfekte edilmiş dendritik hücrelerden elde edilmiş saf eksozomlar siRNA ile elektroporasyon yöntemi kullanılarak yüklendikten sonra, bu eksozomların beyindeki nöronlara gittiği ve herhangi bir

immün cevaba yol açmadan buradaki bazı özgül genleri *knock-down* ettiği bildirilmiştir (54).

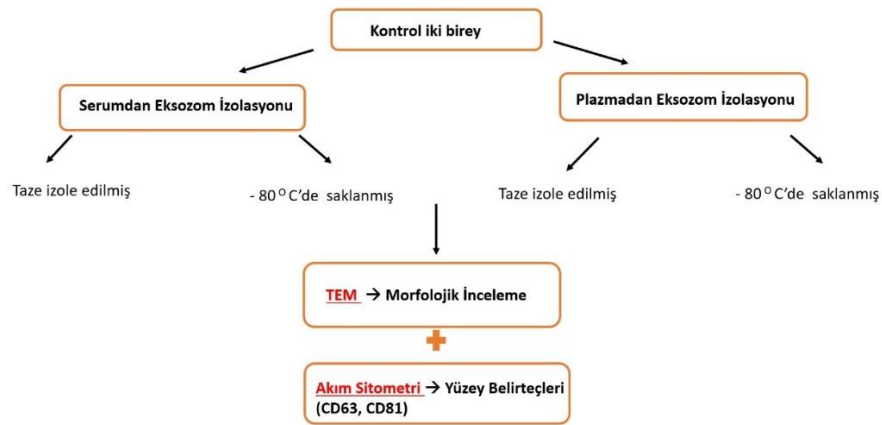
Eksozomların tedavi amaçlı olarak bu üç farklı yöntemle kullanılması dışında (Şekil 2.5.), *eksozom mimetics* denilen yeni bir teknolojik kavram son yıllarda ortaya çıkmış ve çok daha fazla sayıda eksozom üretebilmenin kapıları bu yeni method sayesinde aralanmıştır. Hücrelerin iyice sıkılması (*cell extrusion*) (monosit/makrofajların güçlü ve ard arda bir şekilde 10-, 5-, ve 1- μm 'lik filtrelerden geçmeleri), fazla miktarda nanovesikül üretimini sağlamıştır. Bu yolla elde edilen eksozomlara doksorubisin yüklenerek tümör hücreleri hedeflenmiş ve anti-tümör etkiler gözlemlenebilmiştir (54).



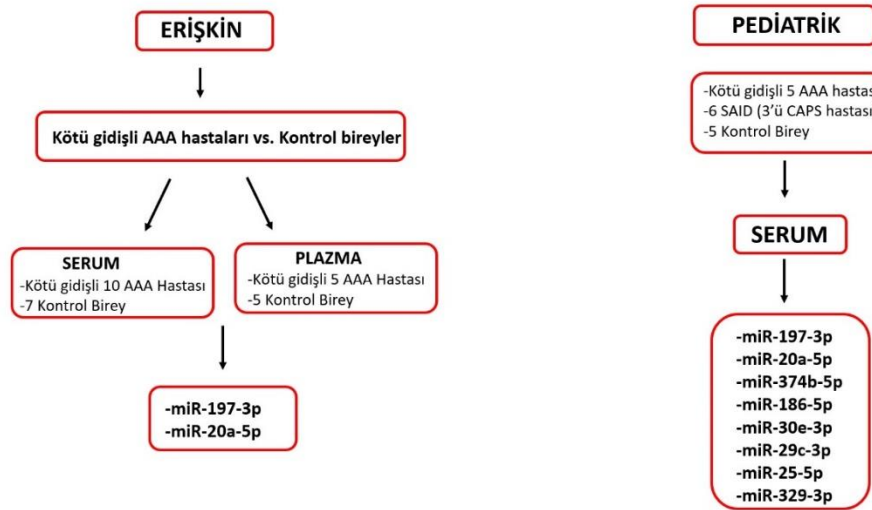
Şekil 2.5. Doğal olarak veya modifiye edilerek oluşan eksozomların tedavi amaçlı kullanımları (54).

Tez kapsamında, sistemik otoinflamatuar hastalıklarda önceki projelerimiz aracılığıyla belirlenen miRNA'lar eksozomlar açısından incelenmiştir.

Bu amaç için, Hacettepe Üniversitesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurul Onayı ile (Tarih: 13.06.2017, Karar no: GO 17/513 -11) (Ek-1) üç çalışma grubu oluşturulmuştur. Pediatrik grup için; M694V/M694V homozigot AAA hastaları, sağlıklı kontroller ve diğer sistemik otoinflamatuar hastalığa sahip bireylerden oluşan çalışma grubu oluşturulmuştur. Erişkin grup için; M694V/M694V homozigot AAA hastaları ve sağlıklı kontrollerden oluşan çalışma grubu oluşturulmuştur. Erişkin grup için CAPS, TRAPS gibi hastalıklara sahip bireylere ait örnekler bulunamadığı için SAID grubu oluşturulamamıştır. Pediatrik grupta sadece serum örnekleri biyobankalandığı için plazma örnekleri ile çalışılmamıştır. Erişkin gruptaki bireylerden, plazma ve serum örnekleri toplanarak eksozom izolasyonu yapılmıştır. Eksozomların karakterizasyonu için iki kontrol bireyin plazma ve serum örnekleri ile çalışılarak TEM ve akım sitometri teknikleri kullanılmıştır. Bu teknikler aracılığıyla, iki biyolojik materyal eksozom yoğunlukları açısından karşılaştırılabilmiştir. TEM tekniğinde farklı boyama ajanları kullanılarak eksozomlar morfolojik olarak incelenmiştir. Akım sitometri tekniğinde ise eksozomlarda sık kullanılan CD63 ve CD81 yüzey belirteçleri ile eksozom popülasyonları analiz edilmiştir (Şekil 2.6.). Karakterizasyon işlemi sonrası, erişkin (serum ve plazma) ve pediatrik (sadece serum) bireylerin eksozomlarından RNA izole edilmiş ve qRT-PCR deneyleri yapılmıştır. Belirlenen 8 adet miRNA'nın (miR-197-3p, miR-20a-5p, miR-374b-5p, miR-30e-3p, miR-186-5p, miR-29c-3p, miR-25-5p ve miR-329-3p) ifade seviyeleri, erişkin ve pediatrik hasta gruplarında analiz edilmiştir (Şekil 2.7.).



Şekil 2.6. Eksozom karakterizasyonu için uygulanan deney planı.



Şekil 2.7. Erişkin ve pediatrik gruplardaki miRNA ifade analizleri için uygulanan deney planı.

Tez sonucunda elde edilen bulguların değerlendirilmesi ile,

- Eksozom izolasyonu araştırmalarında en sık kullanılan biyolojik sıvılar olan serum ve plazmanın farkının ortaya konması,
- Daha önceki araştırmalarımızda bulmuş olduğumuz miRNA'ların eksozomlarda taşındığının gösterilmesi,
- Dolaşımdaki varlığı gösterilen; hasta ve kontrol gruplarında ifade açısından farklılığı olan miRNA'ların belirlenmesi ile sistemik bir etkinin görüldüğü AAA hastalığı açısından literatüre önemli katkılarının sağlanması öngörülmektedir.

3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

3.1. Gereçler

3.1.1. Total Kandan Serum ve Plazma İzolasyonu

- Sitratlı ve jelli (vakumlu) tüpler (*BD Vacutainer*)

3.1.2. Serum ve Plazmadan Eksozom İzolasyonu

- *miRCURY™ Exosome Isolation Kit – Serum and plasma*

3.1.3. Eksozomların TEM ile Karakterizasyonu

- Formvar/karbon kaplı *grid*
- Osmiyum tetroksit (%1 w/v)
- Fosfotungstik asit $H_3PW_{12}O_{40}$ (%2 w/v)
- Üranil asetat (25 gr, *Dihydrate, Depleted Uranium*)
- 0,1 M (X + Y) tamponu:

-X solüsyonu (stok):

* $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$: 35,60 gr

* Distile su: 1000 ml

-Y solüsyonu (stok):

* $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$: 31,20 gr

* Distile su: 1000 ml

0,1 M (X + Y) için → 800 ml X solüsyonu + 200 ml Y solüsyonu + 1000 ml distile su

- Parafilm

3.1.4. Eksozomların Akım Sitometri İle Karakterizasyonu

- APC anti- insan CD81 (TAPA-1) (BioLegend)
- APC fare IgG1, κ izotip kontrol (BioLegend)
- PE anti- insan CD63 (BioLegend)
- PE fare IgG1, κ izotip kontrol (BioLegend)

- Aldehit- sülfat kaplı lateks boncuklar (*Bead*), %4 w/v, 4 µm (ThermoFisher Scientific)
- 1M glisin
- %0,5 BSA/PBS

3.1.5. Eksozomlardan miRNA İzolasyonu

- *miRCURY™ RNA Isolation Kit – Biofluids*
- İzopropanol (AppliChem)
- Proteinaz K

3.1.6. cDNA Sentezi

- *TaqMan® MicroRNA Reverse Transcription Kit (ABI)*
- *TaqMan® Advanced miRNA cDNA Synthesis Kit*

3.1.7. qRT-PCR

- *TaqMan® MicroRNA Assays (ABI)* primerleri (miR-20a, miR-197, RNU48, U6)
- *TaqMan® Universal PCR Master Mix, no AmpErase® UNG (ABI) Kit*
- *TaqMan® Fast Advanced Master Mix*
- *TaqMan® Advanced miRNA Assays* (miR-186-5p, miR-25-5p, miR-29c-3p, miR-329-3p, miR-374b-5p, miR-30e-3p)

3.2. Yöntemler

3.2.1. Çalışma Grubunun Oluşturulması

Bu tez çalışması kapsamında, Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Erişkin Romatoloji Bölümü ve Hacettepe Üniversitesi İhsan Doğramacı Çocuk Hastanesi Pediatri Anabilim Dalı Romatoloji Bölümü'nden kan örnekleri toplanmıştır. Tez kapsamında yapılacak çalışmalar için, Hacettepe Üniversitesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu onayı alınmıştır (Tarih: 13.06.2017, Karar no: GO 17/513 -11). (Bkz. Ek-1) Çalışmaya katılan erişkin kötü gidişli 10 AAA hastasının klinik bilgileri Tablo 4.1'de özetlenmiştir. Çalışmaya katılan pediatrik kötü gidişli 5 AAA hastasının ve 6 SAID'in ise klinik bilgileri Tablo 4.2'de özetlenmiştir. Kontrol grupları herhangi bir inflamatuvar hastalığı olmayan bireylerden seçilmiştir. Erişkin ve pediatrik grup için ayrı çalışma grupları oluşturulmuştur. Erişkin grup için 24-30 yaş aralığındaki, pediatrik grup için 9-15 yaş aralığındaki bireyler kullanılmıştır. Erişkin grup için CAPS, TRAPS gibi hastalıklara sahip bireylere ait örnekler bulunamadığı için SAID grubu oluşturulamamıştır. Her iki grup için de referans CRP (C-Reaktif Protein) değeri 0-0,8 mg/dL olarak alınmıştır. Ayrıca, Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Erişkin Romatoloji Bölümü ve Hacettepe Üniversitesi İhsan Doğramacı Çocuk Hastanesi Pediatri Anabilim Dalı Romatoloji Bölümü tarafından hastaların yaşları, tanı aldıkları yaşlar, kullandıkları ilaçlar (dozlarıyla birlikte) ve otoinflamatuvar hastalık aktivite indeksleri (AIDAI) not edilmiştir ve çalışma grupları buna göre oluşturulmuştur. Otoinflamatuvar hastalık aktivite indeksleri (AIDAI), otoinflamatuvar hastalıklarda hastalık aktivitesinin değerlendirilmesi için kullanılan ve 13 maddeden oluşan bir skordur. Bu maddeler; ateş, tüm semptomlar, karın ağrısı, bulantı/kusma, ishal, baş ağrısı, göğüs ağrısı, ağrılı lenf nodları, artralji veya miyalji, eklemlerde şişlik, göz bulguları, cilt döküntüsü ve ağrının geçmesidir (55).

Tablo 3.1. Çalışmaya katılan erişkin AAA hastalarının klinik bilgileri.

Hasta Kodu	Mutasyon	Yaş	Tam Yaşı	İlaç	İlaç dozu	CRP (C-Reaktif Protein) Değerleri (mg/dL)
BPU	M694V/M694V	32	21	Kolşisin	3 x 0.5 mg	0,735
MK	M694V/M694V	28	2	1) Kolşisin 2) Kanakinumab	1) 2 x 0.5 mg 2) 150 mg/ay	0,212
LZ	M694V/M694V	54	40	Kolşisin	2 x 1 mg	0,617
MU	M694V/M694V	21	9	Kolşisin	3 x 0.5 mg	0,356
KS	M694V/M694V	30	9	Kolşisin	2 x 1 mg	0,168
YO	M694V/M694V	18	7	Kolşisin	2 x 1 mg	0,53
FH	M694V/M694V	28	27	Kolşisin	3 x 0.5 mg	0,617
NK	M694V/M694V	41	31	Kolşisin	2 x 1 mg	0,676
EK2	M694V/M694V	19	5	Kolşisin	3 x 0.5 mg	0,598
OA	M694V/M694V	29	28	Kolşisin	2 x 0.5 mg	0,145

Tablo 3.2. Çalışmaya katılan pediatrik AAA ve SAID hastalarının klinik bilgileri.

Hasta Kodu	Mutasyon	Yaş	Tanı Yaşı	İlaç	İlaç dozu	CRP (C-Reaktif Protein) Değerleri (mg/dL)	Otoinflamatuvar hastalık aktivite indeksi (AIDAI)
ZBA	M694V/M694V	7	2	Kolşisin Kanakinumab	1x1 tablet (0.05 mg/kg/gün) 3 mg/kg/3 ay (1x30 mg/3 ay)	0,429	-
FŞ	M694V/M694V	19	8	Kolşisin	2x2 tablet (0.02 mg/kg/gün)	0,437	-
ÖB	M694V/M694V	16	2	Kolşisin	3x1 tablet (0.03 mg/kg/gün)	<<0,1	92
ŞK	M694V/M694V	16	3	Kolşisin	3x1 (0.03 mg/kg/gün)	0,17	83
GD	M694V/M694V	13	1,5	Kolşisin Kanakinumab	3x1 0.03 mg/kg/gün 2 mg/kg/3 ay (1x90 mg/3 ay)	0,17	78
NA	-/-(SAID) CAPS	10	2 ay	Kanakinumab	2 mg/kg/2 ay (1x50 mg/2 ay)	0,48	92
CU	-/-(SAID) Tanımlanmamış	19	5	Kolşisin Azatiopürin	1x1 (0.01 mg/kg/gün) 1 mg/kg/gün(1x50 mg/gün)	0,52	99
YPG	-/-(SAID) CAPS	7	1 ay	Kanakinumab	3 mg/kg/2 ay (1x60 mg)	0,41	83
ZSÇ	-/-(SAID) HIDS	7	3	Kanakinumab	4 mg/kg/2 ay (1x80 mg/2 ay)	0,619	72
CC	-/-(SAID) Tanımlanmamış	20	-	-	-	0,41	75
EU	-/-(SAID) CAPS	10	1 ay	Kanakinumab Prednizolon	5 mg/kg/ay (1x100 mg/ ay 0,5 mg/kg/gün (1x5 mg)	0,815	-

3.2.2. Total Kandan Serum ve Plazma İzolasyonu

Serum

- Jelli tüp içine alınan kanlar 45 dk oda sıcaklığında bekletildi.
- Tüpler, +4 °C’de ve 4000 rpm’de 10 dk santrifüj edildi.
- Üstte kalan süpernatant kriyoprezervasyon tüplerine 500 µl olacak şekilde alikotlandı.
- Örneklerin yarısı -80 °C’de, yarısı sıvı azotta saklandı.

Plazma

- Sitratlı tüp içerisine alınan kanlara, bekletilmeden +4 °C’de ve 1500 x g’de 10 dk santrifüj yapıldı.
- Üstte kalan süpernatant kriyoprezervasyon tüplerine 500 µl olacak şekilde alikotlandı.
- Örneklerin yarısı -80 °C’de, yarısı sıvı azotta saklandı.

3.2.3. Serum ve Plazmadan Eksozom İzolasyonu

0,5 ml Serumdan Eksozom İzolasyonu

- 0,6 ml serum, hücre debrisinden kurtulmak için 10.000 x g’de ve 5 dk boyunca santrifüj yapıldı.
- 0,5 ml süpernatant yeni bir reaksiyon vialine alındı.
- Üzerine 200 µl presipitasyon tamponu A eklendi ve iyice karıştırmak için yaklaşık 5 saniye boyunca vortekslendi.
- Örnekler, +4 °C’de ve bütün gece inkübasyona bırakıldı.
- Ertesi gün, 1500 x g’de ve oda sıcaklığında 30 dk boyunca santrifüj yapıldı.
- Üstte kalan süpernatanın tamamı uzaklaştırıldı ve eksozom pelleti 270 µl resüspansiyon tamponu ile çözündürüldü.
- Eksozom örnekleri -80 °C’de saklandı.

0,5 ml Plazmadan Eksozom İzolasyonu

- 6 µl thrombin 0,6 ml plazmaya eklendi, karıştırıldı ve 5 dk boyunca oda sıcaklığında inkübe edildi.
- 0,6 ml plazma, 10.000 x g'de ve 5 dk boyunca santrifüj yapıldı.
- 0,5 ml süpernatant yeni bir reaksiyon vialine alındı.
- Üzerine 200 µl presipitasyon tamponu A eklendi ve iyice karıştırmak için yaklaşık 5 saniye boyunca vortekslendi.
- Örnekler, +4 °C'de ve bütün gece inkübasyona bırakıldı.
- Ertesi gün, 500 x g'de ve oda sıcaklığında 5 dk boyunca santrifüj yapıldı.
- Üstte kalan süpernatantın tamamı uzaklaştırıldı ve eksozom pelleti 270 µl Resüspansiyon Tamponu ile çözündürüldü.
- Eksozom örnekleri -80 °C'de saklandı.

1,4 ml Serumdan Eksozom İzolasyonu

- 1,5 ml serum, hücre debrisinden kurtulmak için 10.000 x g'de ve 5 dk boyunca santrifüj edildi.
- 1,4 ml süpernatant 2 ml'lik yeni bir reaksiyon vialine alındı.
- Üzerine 560 µl presipitasyon tamponu A eklenir ve iyice karıştırmak için yaklaşık 5 saniye boyunca vortekslendi.
- Örnekler, +4 °C'de ve bütün gece inkübasyona bırakıldı.
- Ertesi gün, 1500 x g'de ve oda sıcaklığında 30 dk boyunca santrifüj yapıldı.
- Üstte kalan süpernatantın tamamı uzaklaştırıldı ve eksozom pelleti 240 µl resüspansiyon tamponu ile çözündürüldü.
- Eksozom örnekleri -80 °C'de saklandı.

1,4 ml Plazmadan Eksozom İzolasyonu

- 17 µl thrombin 1,7 ml plazmaya eklenir, karıştırılır ve 5 dk boyunca oda sıcaklığında inkübe edildi.
- Örnekler, 10.000 x g'de ve 5 dk boyunca santrifüj yapıldı.
- 1,4 ml süpernatant 2 ml'lik yeni bir reaksiyon vialine alındı.

- Üzerine 560 µl presipitasyon tamponu A eklendi ve iyice karıştırmak için yaklaşık 5 saniye boyunca vortekslendi.
- Örnekler, +4 °C'de ve bütün gece inkübasyona bırakıldı.
- Ertesi gün, 500 x g'de ve oda sıcaklığında 5 dk boyunca örnekler santrifüj edildi.
- Üstte kalan süpernatanın tamamı uzaklaştırıldı ve eksozom pelleti 240 µl resüspanسیون tamponu ile çözündürüldü.
- Eksozom örnekleri -80 °C'de saklandı.

3.2.4. Eksozomların TEM İle Karakterizasyonu

- 270 µl (X+Y) tamponu içinde çözündürülmüş eksozom pelletinden *grid*lere 5 µl olacak şekilde konuldu.
- Eksozom pelleti *grid*in yüzeyine iyice işleyene kadar (pelleti çok kurutmadan) yaklaşık 15 dk boyunca beklendi.
- 1-2 µl (*grid*in yüzeyini kaplayacak kadar) %2 osmiyum tetroksit (OsmO₄) ile *grid*ler karanlıkta 60 dk boyunca inkübe edildi. Ayrıca, herhangi bir fiksatif ajan olmadan sadece boyanarak incelenen *grid* örnekleri de oluşturuldu. Bu örnekler, %2 OsmO₄ ile muamele edilmeden direkt boyama işlemine tabi tutuldular.
- Bütün *grid*ler, parafilm üzerinde oluşturulmuş (X+Y) tampon damlacıklarında 3 kere 1 dk boyunca yıkandı. Daha sonra 1 kere 1 dk boyunca distile suda yıkandı (bütün yıkamalar oda sıcaklığında gerçekleştirildi).
- Yıkama işleminden sonra, bazı *grid*ler 10 dk boyunca parafilm üzerinde oluşturulmuş %2 PTA damlacıklarının üzerinde boyandı.
- Diğer *grid*ler ise 15 dk boyunca ve karanlık ortamda parafilm üzerinde oluşturulmuş üranil asetat (UA) damlacıklarının üzerinde boyandı.
- Bütün *grid*ler, 3 kere 1 dk boyunca distile suda yıkandı.
- *Grid*ler özel cımbızlarıyla alındı, kenarları kurutma kağıdı serili petriye geçirilerek iyice kurutuldu.
- JEOL JEM-1400 elektron mikroskobu altında örnekler incelendi.

3.2.5. Eksozomların Akım Sitometri İle Karakterizasyonu

- 10 µl %4 (w/v) aldehit- sülfat kaplı lateks boncuklar 50 µl resüspanse edilmiş eksozom örnekleriyle karıştırıldı (taze izole edilmiş plazma ve serumdan ya da daha önce izole edilmiş plazma ve serumdan elde edilen).
- Örnekler, +4 °C'de ve bütün gece *rotator* üzerinde (yavaşça karıştırarak) inkübasyona bırakıldı.
- Ertesi gün, 60 µl 2M'lık glisin tüplere kondu (son koşulda 1M elde edebilmek için) ve 30 dk +4 °C'de inkübe edildi.
- 20.000 x g'de santrifüj yapılarak 2 kere 10 dk boyunca %5 BSA/PBS ile yıkama yapıldı.
- Son santrifüjden sonra, %5 BSA/PBS tamamen uzaklaştırılır ve 10 µl antikor ile boyama işlemi serum ve plazmadan elde edilen eksozomlar için ayrı ayrı gerçekleştirildi. (30 dk boyunca, karanlıkta ve +4 °C'de)
 - Sadece APC anti- insan CD81 (TAPA-1)
 - Sadece APC fare IgG1, κ izotip kontrol
 - Sadece PE anti- insan CD63
 - Sadece PE fare IgG1, κ izotip kontrol
 - APC fare IgG1, κ izotip kontrol + PE fare IgG1, κ izotip kontrol
 - APC anti- insan CD81 (TAPA-1) + PE anti- insan CD63
- Örnekler, BD FACS ARIA II cihazında okutuldu ve *FlowJo Software*'de analiz edildi.

3.2.6. Eksozomlardan RNA İzolasyonu

- İzolasyona başlamadan önce, eksozom örnekleri 3000 x g'de, oda sıcaklığında ve 5 dk boyunca santrifüj yapıldı.
- Süpernatanın 200 µl'si yeni bir tübe transfer edildi ve üzerine 20 µl proteinaz K eklenerek 10 dk 37 °C'de inkübe edildi.
- 60 µl lizis solüsyonu eklendi, 5 saniye vortekslendi ve 3 dk boyunca oda sıcaklığında inkübe edildi.
- 20 µl protein presipitasyon solüsyonu eklendi, 5 saniye vortekslendi ve 1 dk boyunca oda sıcaklığında inkübe edildi.
- Örnekler, 3 dk boyunca 11.000 x g'de santrifüj yapıldı.

- Temiz süpernatant yeni bir tübe aktarıldı, 270 µl izopropanol eklendi ve 5 saniye vortekslendi.
- *microRNA Mini Spin Column*'lar koleksiyon tüplerine yerleştirildi, örnekler bu kolonlara yüklendi ve 2 dk oda sıcaklığında inkübe edildi.
- 30 saniye boyunca 11.000 x g'de sentrifüj yapıldı, üstte kalan sıvı uzaklaştırıldı ve kolonlar koleksiyon tüplerine yerleştirildi
- 50 µl rDNAse kolondaki membranın üstüne direkt konuldu ve 15 dk oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı.
- 100 µl yıkama tamponu 1 kolonun üstüne eklendi, 30 saniye boyunca 11.000 x g'de sentrifüj yapıldı, üstte kalan sıvı uzaklaştırıldı ve kolonlar koleksiyon tüplerine yerleştirildi.
- 700 µl yıkama tamponu 2 kolonun üstüne eklendi, 30 saniye boyunca 11.000 x g'de sentrifüj yapıldı, üstte kalan sıvı uzaklaştırıldı ve kolonlar koleksiyon tüplerine yerleştirildi.
- 250 µl yıkama tamponu 2 kolonun üstüne eklendi, 2 dk boyunca 11.000 x g'de sentrifüj yapıldı, üstte kalan sıvı uzaklaştırıldı ve kolonlar 1,5 ml'lik ependorf tüplere yerleştirildi.
- Elüsyon işlemi iki aşamada gerçekleştirildi. Önce, 20 µl DEPC'li su 1,5 ml'lik ependorf tüplerin içindeki kolonlara eklendi, 2 dk beklendi ve 2 dk boyunca 11.000 x g'de sentrifüj yapıldı.
- Sonra, 10 µl DEPC'li su 1,5 ml'lik ependorf tüplerin içindeki kolonlara eklendi, 2 dk beklendi ve 2 dk boyunca 11.000 x g'de sentrifüj yapıldı.
- RNA konsantrasyonları *NanoDrop ND-1000* ile ölçüldü ve RNA'lar kullanılıncaya kadar -80 °C'de saklandı.

3.2.7. cDNA Sentezi

TaqMan Universal Master Mix ile

RNA'lar 5ng/uL olacak şekilde dilue edildikten sonra *TaqMan® MicroRNA Reverse Transcription Kit (ABI)* kullanılarak cDNA sentezi yapıldı. cDNA çevirimi için seçilen miRNA'lar ve referans olan U6 primeri ile primer havuzu hazırlandı. Ardından, 10x RT tamponu, RNAz inhibitörü, 100 mM ddNTP, *Reverse Transcriptase*

(50 U/ μ l), RT-primer havuzu, DEPC'li su ve RNA (5 ng) kullanılarak reaksiyon karışımı hazırlandı. Reaksiyon koşullarına uygun bir şekilde örnekler PZR makinesine yerleştirildi.

Primer Havuzu	5X-20X (μl)
U6	10 μ l
miR-20a	10 μ l
miR-197	10 μ l
TE tamponu (DEPC'li su ile)	950 μ l
Toplam hacim	1000 μ l

RT reaksiyonu	1 rxn (μl)
10xRT tamponu	1,5 μ l
RNAz inhibitörü	0,19 μ l
100 mM ddNTP	0,30 μ l
<i>Reverse Transcriptase</i> (50 U/ μ l)	2 μ l
RT-primer havuzu	6 μ l
Su (DEPC)	3,01 μ l
Toplam <i>master mix</i>	13 μ l
RNA (5 ng)	2 μ l
Toplam hacim:	15 μ l

Reaksiyon Koşulları

16°C 30 dk

42°C 30 dk

85°C 5 dk

4°C ∞

TaqMan Fast Advanced Master Mix İle

Poly(A) Kuyruğunun Takılması

a) Alttaki protokol takip edilerek hazırlanacak örnek sayısına göre karışım hazırlandı.

Bileşenler	Hacim
10x Poly (A) tamponu	0.5 µl
ATP	0.5 µl
Poly (A) enzimi	0.3 µl
RNaz içermeyen su	1.7 µl
Toplam	3.0 µl

b) 5 ng/µl olacak şekilde dilüsyonu hazırlanmış miRNA örnekleri PCR tüplerine konuldu.

c) PZR makinesine yerleştirilen örnekler aşağıdaki koşullarda inkübe edildi ve adaptör ligasyon aşamasına hazır edildi.

Aşama	Sıcaklık	Zaman
Poliadenilasyon	37 °C	45 dk
Durma reaksiyonu	65 °C	10 dk
<i>Hold</i>	4 °C	<i>Hold</i>

Adaptör Ligasyon Reaksiyonu

a) Aşağıdaki protokole göre karışım hazırlandı.

Bileşen	Hacim
5x DNA ligaz tamponu	3 µl
%50 PEG 8000	4,5 µl
25x ligasyon adaptörü	0,6 µl
RNA ligaz	1,5 µl
RNaz içermeyen su	0,4 µl
Toplam	10 µl

b) Poly (A) kuyruk reaksiyonunun ürünü PZR cihazından alındıktan hemen sonra her bir tüpe karışım dağıtıldı.

c) PZR makinesine yerleştirilen örnekler aşağıdaki koşullarda inkübe edildi ve *reverse transcription (RT)* reaksiyonuna hazır edildi.

Aşama	Sıcaklık	Zaman
Ligasyon	16 °C	60 dk
<i>Hold</i>	4 °C	<i>Hold</i>

Reverse Transcription (RT) Reaksiyonu:

a) Aşağıdaki protokole göre karışım hazırlandı.

Bileşen	Hacim
5x RT tamponu	6 µl
dNTP karışımı (her birine 25 mM olacak şekilde)	1,2 µl
20x <i>Universal</i> RT primer	1,5 µl
10x RT enzim karışımı	3 µl
RNaz içermeyen su	3,3 µl
Toplam	15 µl

b) Adaptör ligasyon reaksiyonunun ürünü PZR cihazından alındıktan hemen sonra karışım her bir tüpte toplamda 30 µl olacak şekilde dağıtıldı.

c) PZR makinesine yerleştirilen örnekler aşağıdaki koşullarda inkübe edildi ve miR-Amp reaksiyonuna hazır edildi.

Aşama	Sıcaklık	Zaman
<i>Reverse Transcription</i>	42 °C	15 dk
<i>Stop</i> reaksiyonu	85 °C	5 dk
<i>Hold</i>	4 °	<i>Hold</i>

miR-Amp Reaksiyonu

a) 1,5 ml'lik mikrosantrifüj tüpüne aşağıdaki protokole göre karışım hazırlandı.

Bileşen	Hacim
2x miR-Amp master mix	25 µl
20x miR-Amp primer mix	2,5 µl
RNaz içermeyen su	17,5 µl
Toplam	45 µl

b) Örnek sayısına göre, miR-Amp reaksiyon karışımı hazırlandıktan sonra, karışım için kısa bir vorteks ve santrifüj aşaması yapıldı.

c) RT reaksiyon ürününden 5 µl alınarak miR-Amp reaksiyon örnekleri hazırlandı.

d) PZR makinesine yerleştirilen örnekler aşağıdaki koşullarda inkübe edildi.

Aşama	Sıcaklık	Zaman	Siklus
Enzim Aktivasyonu	95 °C	5 dk	1
Denatürasyon	95 °C	3 saniye	14
Anneal/Extend	60 °C	30 saniye	
Stop Reaksiyonu	99 °C	10 dk	1
Hold	4 °C	Hold	1

3.2.8. qRT-PCR:

TaqMan Universal Master Mix ile

cDNA çevirimin ardından miR-20a, miR-197 ve U6'ya uygun *TaqMan® MicroRNA Assays (ABI)* primerleri ile *TaqMan® Universal PCR Master Mix, no AmpErase® UNG (ABI)* kiti kullanılarak amplifikasyon gerçekleştirildi.

Reaksiyon Koşulları:

50°C 2 dk

95°C 10 dk

95°C 15 sn

60°C 1 dk, 40 döngü

PCR reaksiyonu	1 rxn
Taqman microRNA Assay (20X)	1 µl
TaqMan 2x Universal PCR Master Mix	10 µl
Su	7,5 µl

Total master mix: 18,5 µl

cDNA: 1.5 µl

Toplam Hacim: 20 µl

TaqMan Fast Advanced Master Mix İle

a) Kitin içerisinde bulunan *TaqMan® Fast Advanced Master Mix* bileşeni yavaşça çalkalandı ve 1.5 mL'lik mikrosantrifüj tüpüne, bileşenler aşağıdaki belirtilen oranlarda eklenerek PZR reaksiyon karışımı hazırlandı.

Bileşenler	Hacim
<i>TaqMan® Fast Advanced Master Mix (2X)</i>	10 µL
<i>TaqMan® Advanced miRNA Assay (20X)</i>	1 µL
RNaz İçermeyen Su	4 µL
Toplam PZR reaksiyonu	15 µL

b) PZR reaksiyon karışımını iyice karıştırmak ve hava kabarcıklarını ortadan kaldırmak amacıyla karışım vortekslendi ve daha sonra santrifüjlendi.

c) Hazırlanan PZR reaksiyon karışımından 15 µL reaksiyon plakasındaki her bir kuyucuğa aktarıldı.

d) Reaksiyon plakasının her bir kuyucuğuna 5 µL seyreltilmiş cDNA kalıbı eklendi. Eklenen cDNA ile birlikte reaksiyon tabakasının her bir kuyucuğunda toplam hacim 20 µL oldu.

e) Reaksiyon plakası, yapışkan bir örtü ile sızdırmaz hale getirildi, sonra vorteks yardımıyla iyice karıştırılıp, santrifüjlendi.

Gerçek zamanlı PCR Kurulumu ve Çalıştırılması

a) Hazırlanan reaksiyon plakası *BioRad iQ5 Multicolor Real Time PCR* cihazına yüklendi.

b) PZR reaksiyon koşulları aşağıdaki gibi ayarlandı.

Aşamalar	Sıcaklık	Süre	Döngü Sayısı
Enzim aktivasyonu	95 ° C	20 saniye	1
Denatürasyon	95 ° C	1 saniye	40
<i>Annealing/Uzama</i>	60 ° C	20 saniye	

c) Reaksiyon plakası için uygun reaksiyon hacmi 20 µL olarak ayarlandı.

3.2.9. Verilerin Değerlendirilmesi ve İstatistik Analizler

Deneylerde FAM floresan boyası kullanıldı ve ifade değişimleri $2^{-\Delta\Delta C_t}$ yöntemi ile hesaplandı. Hesaplanan kat değişimleri için *GraphPad Prism 5.0* kullanılarak istatistiksel analiz yapıldı. Kat değişimlerinin anlamlılığının belirlenebilmesi için *Mann-Whitney U testi* yapıldı ve gözlem sayısı az olduğu için p değeri 0,10'dan küçük olanlar istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. U6 snRNA ifadesi bütün miRNA'lar için referans gen olarak kullanıldı.

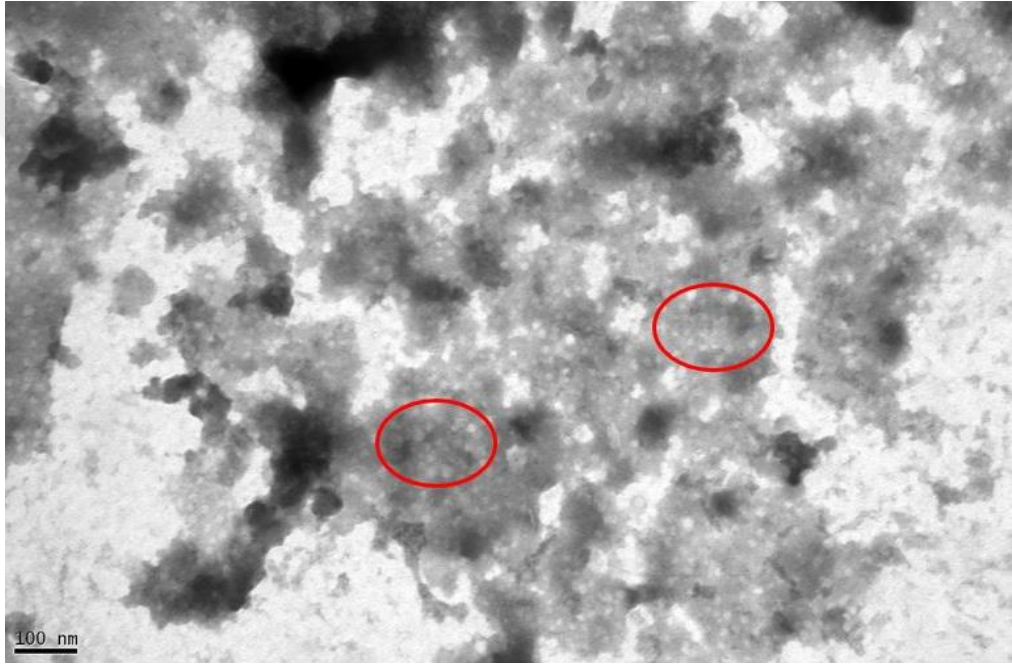


4. BULGULAR

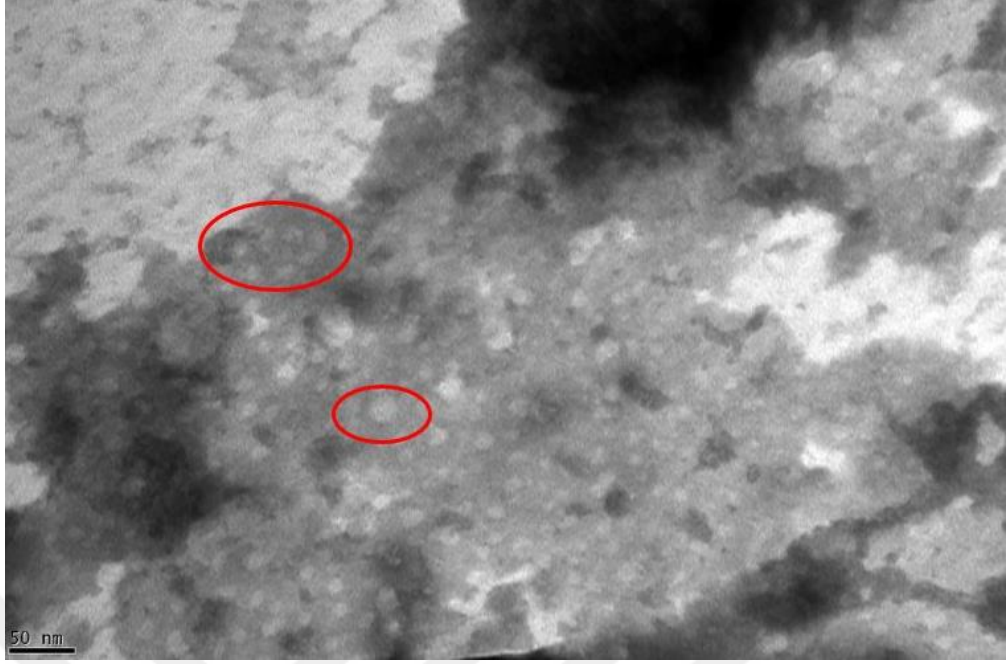
4.1. TEM

4.1.1. Serumdan Elde Edilen Eksozomların TEM İle İncelenmesi

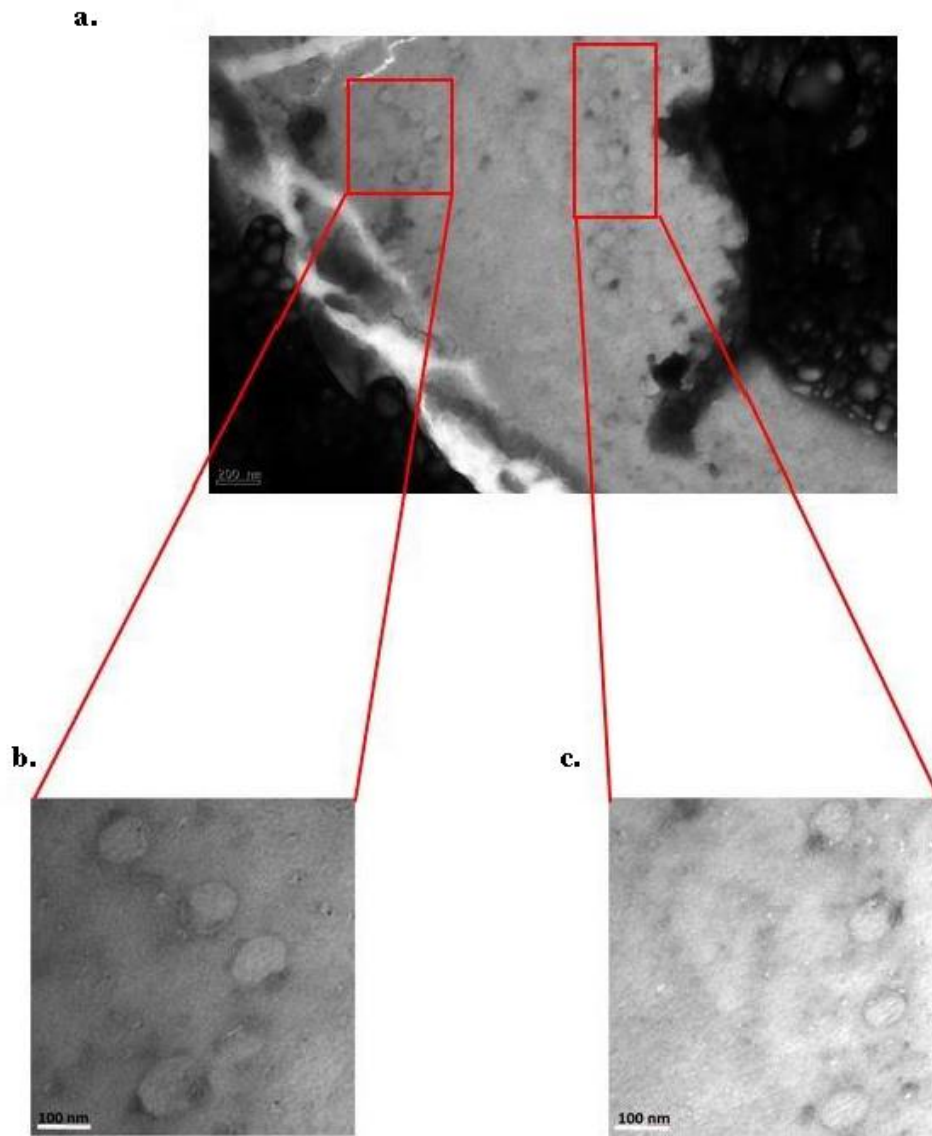
Serumdan elde edilen eksozomların TEM’de analizi için %2 OsmO₄ fiksasyon ajanı olarak kullanılırken, UA ve %2 PTA boyama ajanı olarak kullanılmıştır. İncelemeler, farklı büyütmeler altında TEM kullanılarak yapılmıştır.



Şekil 4.1. Serumdan elde edilen eksozomların x120.000 büyütme altında görüntüsü (Daire içine alınan bölgeler örnek eksozom vesiküllerini göstermektedir. Fiksasyon: %2 OsmO₄, boyama: %2 PTA).



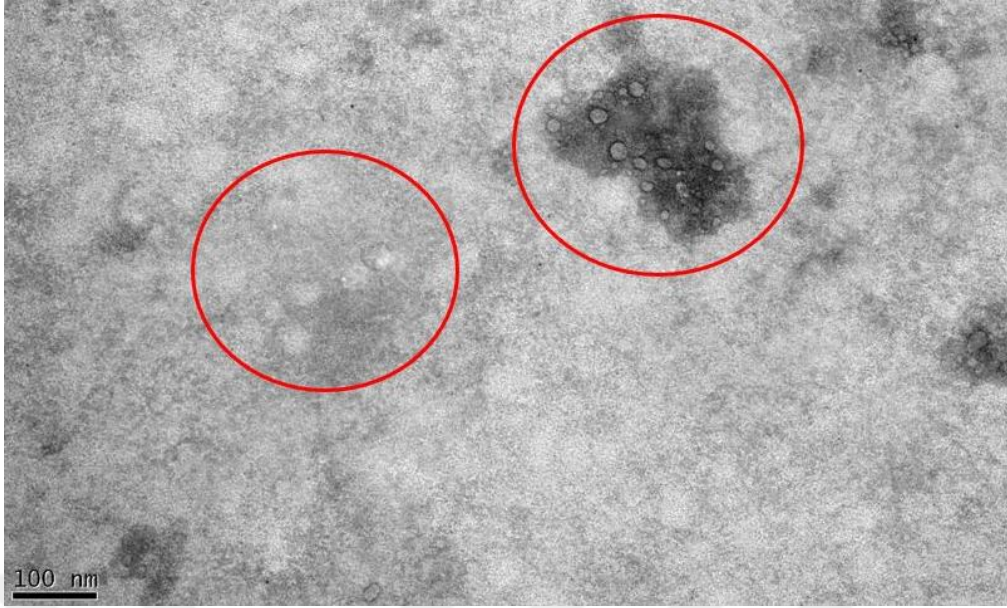
Şekil 4.2. Serumdan elde edilen eksozomların x250.000 büyütme altında görüntüsü (Daire içine alınan bölgeler örnek eksozom vesiküllerini göstermektedir. Fiksasyon: %2 OsmO4, boyama: %2 PTA).



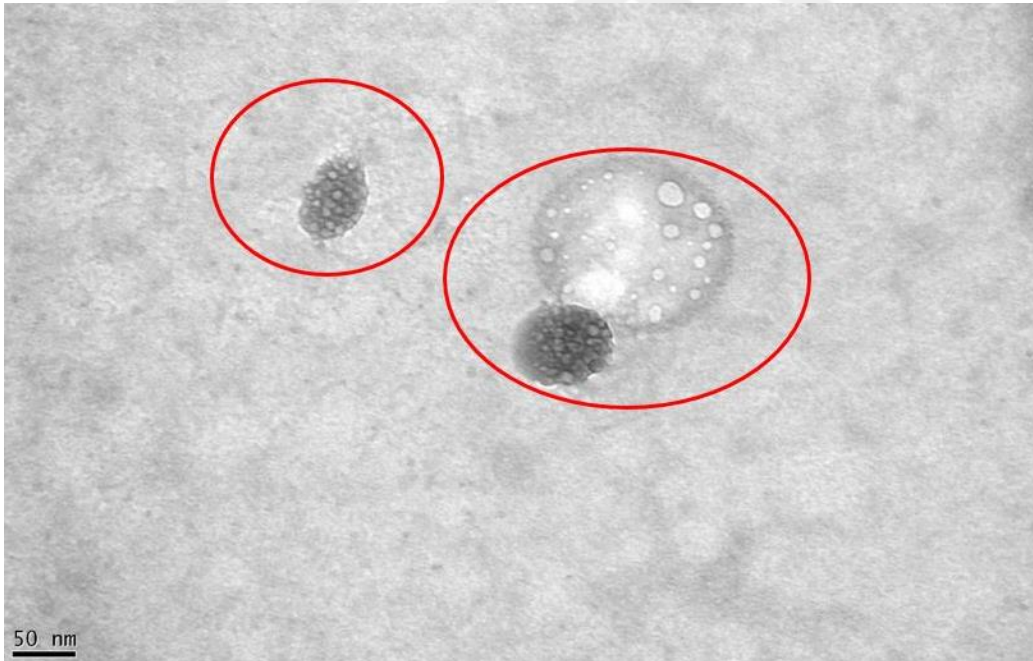
Şekil 4.3. Serumdan elde edilen eksozomların x60.000 (a) ve x120.000 (b ve c) büyütme altında görüntüsü (Fiksasyon: %2 OsmO₄, boyama: UA).

4.1.2. Plazmadan Elde Edilen Eksozomların TEM İle İncelenmesi

Plazmadan elde edilen eksozomların TEM’de analizi için %2 OsmO₄ fiksasyon ajanı olarak, %2 PTA ise boyama ajanı olarak kullanılmıştır. Ayrıca, fiksasyon yapılmadan direkt boyamaya tabi tutulmuş örnekler de incelenmiştir. İncelemeler, farklı büyütmeler altında TEM kullanılarak yapılmıştır.



Şekil 4.4. Plazmadan elde edilen eksozomların x120.000 büyütme altında görüntüsü (Daire içine alınan bölgeler örnek eksozom vesiküllerini göstermektedir. Fiksasyon: -, boyama: %2 PTA).



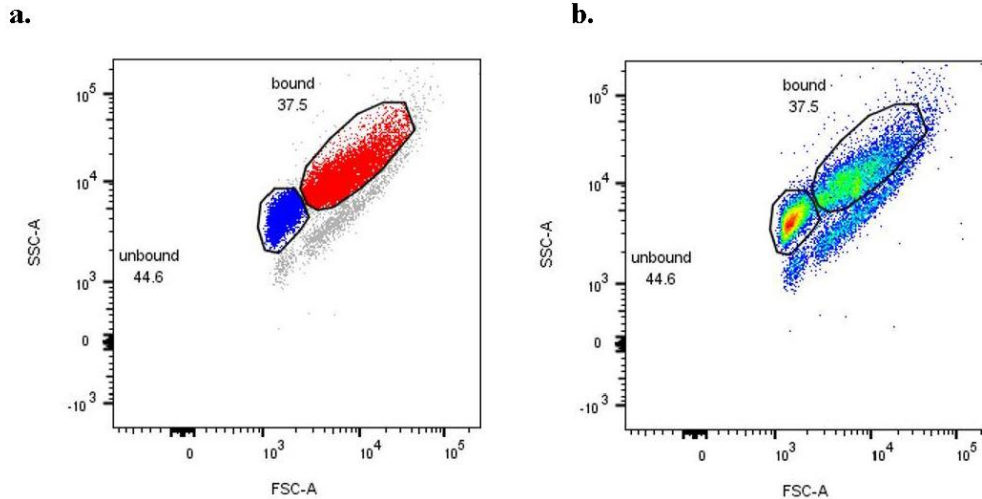
Şekil 4.5. Plazmadan elde edilen eksozomların x200.000 büyütme altında görüntüsü (Daire içine alınan bölgeler örnek eksozom vesiküllerini göstermektedir. Fiksasyon: -, boyama: %2 PTA).

4.2. Akım Sitometrisi

4.2.1. Kapılama Stratejisi

Akım sitometri yöntemi kullanılarak ilgili antikorlarla boyanmış örnekler için kapılama stratejisi oluşturuldu. Kapılama, ortak karakteristik özellikleri olan hücre popülasyonlarının (büyüklük, granüler yapı vb.) grafiksel bir sınırlama içerisine alınması ve sadece ilgilenilen örneğin akım sitometri analizi için kullanılması açısından önemlidir. Bu deney sisteminde, tüm eksozom örnekleri 4 μ m'lik aldehit-sülfat kaplı lateks boncuklara bağlandı. Kapılama analizi için izotip kontroller (APC fare IgG1, PE fare IgG1) kullanıldı. Ayrıca, izotip kontroller, arka plandan gelen gürültüye (*noise*) bağlı sinyallerin spesifik antikor sinyallerinden ayrımını sağlamaktadır.

Buna göre, %37,5'lük bir popülasyon kapılama bölgesinin içerisinde yer alırken, %44,6'luk bir popülasyon ise kapılama bölgesinin dışarısında kaldığı belirlendi. Bu popülasyon, eksozomların tutunmamış olduğu boş boncukları göstermekteydi ve eksozom taşımamaktaydı. Kalan %17,9'lük popülasyon ise üstünde kapılama agregatı olmayan grubu gösterdiği için mevcut kapılamanın dışında bırakıldı (Şekil 4.6.).



Şekil 4.6. Kapılama stratejisi (a) Kırmızı bölge, boncuklara bağlı eksozomları; mavi bölge boncuklara bağlı olmayan eksozomları; gri bölge ise agregatları göstermektedir. (b) Boncuklara bağlı olan ve olmayan eksozom popülasyonlarının gösterildiği yoğunluk grafiği (density plot).

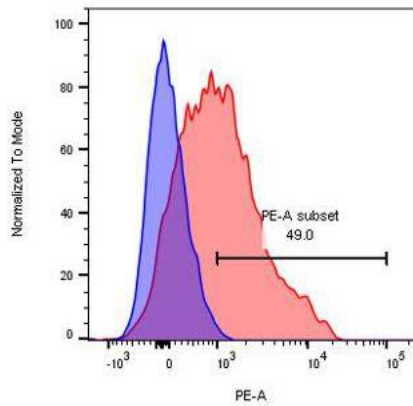
4.2.2. Serumdan Elde Edilen Eksozomların Akım Sitometri İle Analizi

Analiz için, serumdan hem taze izole edilmiş hem de daha önce izole edilerek -80 °C 'de yaklaşık 2 ay süre ile saklanmış eksozom örnekleri kullanıldı. Yalnızca CD63 pozitif, yalnızca CD81 pozitif ve hem CD63 hem de CD81 pozitif popülasyonların yüzdeleri ayrı ayrı belirlendi.

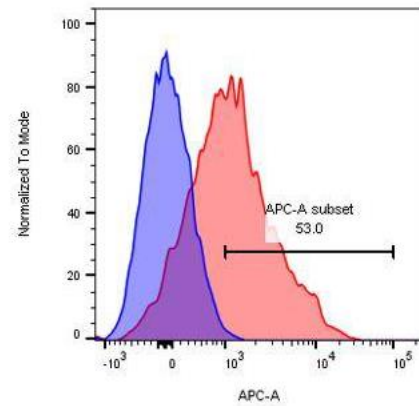
Buna göre, serumdan elde edilip taze izole edilmiş eksozomlarda %49,0 oranında sadece CD63 pozitif popülasyon tespit edilmiştir. Sadece CD81 pozitif popülasyon ise %53,0 olarak tespit edilmiştir (Şekil 4.7.).

Serumdan elde edilip, taze izole edilmiş eksozomlarda %53,3 oranında hem CD63 hem de CD81 pozitif popülasyonu tespit edilmiştir. Serumdan elde edilip, izolasyon sonrası yaklaşık 2 ay süre ile -80 °C 'de saklanan eksozomlarda ise %42,5 oranında hem CD63 hem de CD81 pozitif popülasyon tespit edilmiştir (Şekil 4.8.).

a.

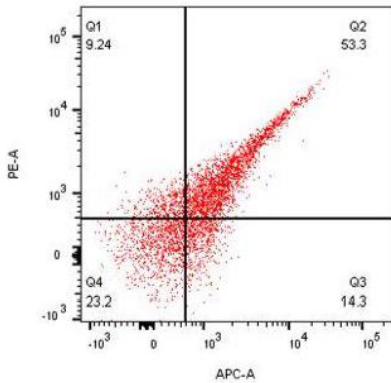


b.

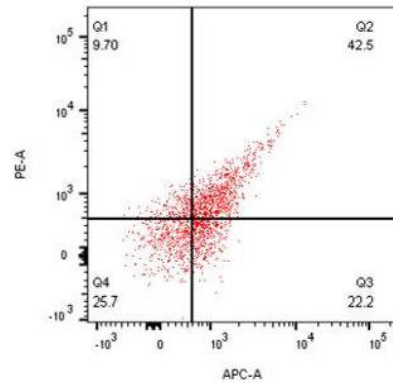


Şekil 4.7. Serumdan taze izole edilmiş eksozomların sadece CD63 (a) ve sadece CD81 (b) yüzey belirtecini gösterme yüzdesi (Mavi alan izotip kontrolleri, kırmızı alan ise spesifik bağlanmanın olduğu bölgeyi işaret etmektedir).

a.



b.



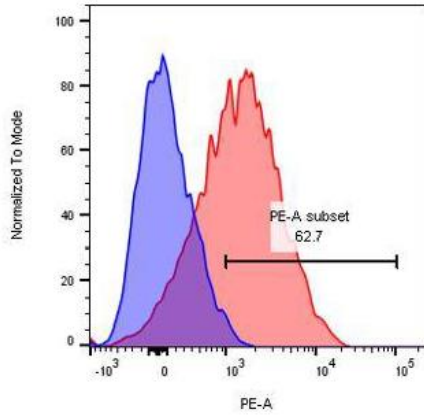
Şekil 4.8. Serumdan taze izole edilmiş (a) ve daha önceden izole edilerek -80 °C’de bekletilmiş olan (b) eksozomların CD63 ve CD81 yüzey belirteçlerini birlikte gösterme yüzdesi (Q1: Sadece CD63 pozitif, Q2: CD63 ve CD81 pozitif, Q3: Sadece CD81 pozitif, Q4: CD63 ve CD81 negatif).

4.2.3. Plazmadan Elde Edilen Eksozomların Akım Sitometri İle Analizi

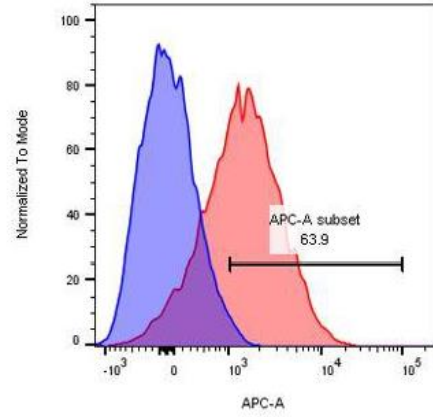
Analiz için, plazmadan hem taze izole edilmiş hem de daha önce izole edilmiş eksozomlar kullanıldı. Yalnızca CD63 pozitif, yalnızca CD81 pozitif ve hem CD63 hem de CD81 pozitif popülasyonların yüzdeleri ayrı ayrı belirlendi. Plazmadan elde edilen taze izole edilmiş eksozomlarda %62,7 oranında sadece CD63 pozitif popülasyon tespit edilmiştir. Sadece CD81 pozitif popülasyon ise %63,9 olarak tespit edilmiştir (Şekil 4.9.).

Plazmadan elde edilen taze izole edilmiş eksozomlarda %68,1 oranında hem CD63 hem de CD81 pozitif popülasyon tespit edilmiştir. Plazmadan elde edilip izolasyon sonrası yaklaşık 2 ay süre ile -80 °C ‘de saklanan eksozomlarda ise %57,6 oranında hem CD63 hem de CD81 pozitif popülasyon tespit edilmiştir (Şekil 4.10.).

a.

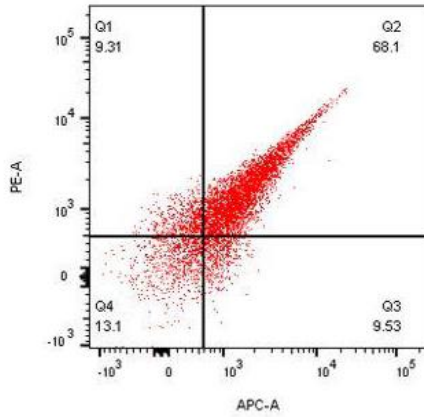


b.

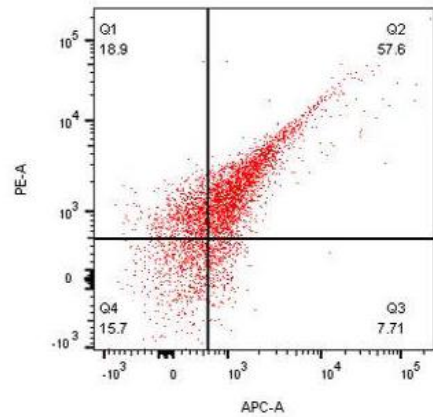


Şekil 4.9. Plazmadan taze izole edilmiş eksozomların sadece CD63 (a) ve sadece CD81 (b) yüzey belirtecini gösterme yüzdesi (Mavi alan izotip kontrolleri, kırmızı alan ise spesifik bağlanmanın olduğu bölgeyi işaret etmektedir).

a.



b.



Şekil 4.10. Plazmadan taze izole edilmiş (a) ve daha önceden izole edilerek -80 °C’de bekletilmiş olan (b) eksozomların CD63 ve CD81 yüzey belirteçlerini birlikte gösterme yüzdesi (Q1: Sadece CD63 pozitif, Q2: CD63 ve CD81 pozitif, Q3: Sadece CD81 pozitif, Q4: CD63 ve CD81 negatif).

4.3. Eksozomdan İzole Edilmiş RNA'ların Konsantrasyon ve Safılıkları

Serumdan elde edilmiş eksozomlardan yapılan RNA izolasyonu için hem pediatrik grup hem de erişkin grup kullanıldı. Plazmadan elde edilmiş eksozomlardan yapılan RNA izolasyonu için ise sadece erişkin grup kullanıldı. İzole edilen RNA'ların konsantrasyonları ve safılıkları *NanoDrop ND-1000* spektrofotometrik ölçüm cihazında tayin edilmiştir.

Eksozom izolasyonu sırasında 0,5 ml plazma/serum ya da 1,5 ml serum/plazma kullanılarak yapılan izolasyon sonuçları birbiriyle karşılaştırıldığında RNA saflığı ve konsantrasyonu açısından anlamlı bir fark görülmemiştir. Bu nedenle, eksozom izolasyonu için esas olarak 0,5 ml serum veya plazma başlangıç materyali olarak kullanılmıştır.

Tablo 4.1. Erişkin bireylerde, serumdan elde edilip eksozomlardan izole edilmiş RNA'ların konsantrasyonları ve saflıkları.

Çalışmaya Katılan Bireyler	Grup	RNA Konsantrasyonları (ng/µl)	A 260/280	A 260/230
EK1	Kontrol	4,57	1,01	0,11
ATA	Kontrol	6,18	0,78	0,13
EA	Kontrol	3,69	0,96	0,23
ŞÜ	Kontrol	5,24	1,04	0,17
ZT	Kontrol	2,30	1,06	0,68
ZÇ	Kontrol	4,28	1,18	0,31
BKB	Kontrol	6,72	1,66	0,30
NK	M694V/M694V	5,85	0,94	0,16
FH	M694V/M694V	6,64	1,07	0,23
EK2	M694V/M694V	5,92	1,01	0,15
BPÜ	M694V/M694V	5,16	0,89	0,15
YO	M694V/M694V	6,80	1,22	0,16
MU	M694V/M694V	6,26	1,05	0,18
OA	M694V/M694V	6,88	1,40	0,27
LZ	M694V/M694V	2,50	1,19	0,78
MK	M694V/M694V	4,98	1,45	0,28
KS	M694V/M694V	9,53	1,10	0,22

Tablo 4.2. Erişkin bireylerde, plazmadan elde edilip eksozomlardan izole edilmiş RNA'ların konsantrasyonları ve safılıkları.

Çalışmaya Katılan Bireyler	Grup	RNA Konsantrasyonları (ng/µl)	A 260/280	A 260/230
NK	M694V/M694V	20,93	1,39	0,32
EK2	M694V/M694V	16,17	1,26	0,24
FH	M694V/M694V	10,97	1,17	0,18
BPÜ	M694V/M694V	12,01	1,17	0,23
KS	M694V/M694V	13,77	1,26	0,28
EA	Kontrol	10,47	1,21	0,25
BKB	Kontrol	11,60	1,30	0,26
EK1	Kontrol	15,65	1,37	0,26
ATA	Kontrol	11,64	1,16	0,27
ZÇ	Kontrol	10,69	1,18	0,21

Tablo 4.3. Pediatrik bireylerde, serumdan elde edilip eksozomlardan izole edilmiş RNA'ların konsantrasyonları ve saflıkları.

Çalışmaya Katılan Bireyler	Grup	RNA Konsantrasyonları (ng/μl)	A 260/280	A 260/230
ZBA	M694V/M694V	13,10	1,32	0,20
ÖB	M694V/M694V	14,50	1,27	0,22
ŞK	M694V/M694V	18,20	1,35	0,25
FŞ	M694V/M694V	5,80	1,09	0,19
GD	M694V/M694V	21,80	1,30	0,27
BÖ	Kontrol	4,90	1,10	0,20
DAE	Kontrol	6,20	1,23	0,14
SEÇ	Kontrol	6,50	1,22	0,24
GCÇ	Kontrol	14,50	1,39	0,24
AIY	Kontrol	7,20	1,23	0,25
EU	CAPS (tanımlanmış SAID)	5,50	1,37	0,18
NA	CAPS (tanımlanmış SAID)	4,59	1,07	0,12
YPG	CAPS (tanımlanmış SAID)	4,42	1,16	0,17
ZSÇ	HIDS (tanımlanmış SAID)	5,74	1,08	0,16
CC	Tanımlanmamış SAID	6,46	1,20	0,19
CU	Tanımlanmamış SAID	11,50	1,22	0,25

4.4. qRT-PCR:

miRNA'lar ile ilişkili olarak, grubumuzun içinde yer aldığı; TÜBİTAK 1001 (Ailevi Akdeniz Ateşi Patogenezinde *MEFV* Gen İfadesinin Düzenlenmesinde Rol Oynayan miRNA'ların Belirlenmesi) ve ERA-NET (Otoinflamatuvar Hastalıklarda Kişiselleştirilmiş Moleküler Tıp İçin Klinik ve Deneysel Çalışma: Modifiye edici Faktörlerin Rolü) projeleri kapsamında önemli bulgular elde edilmiştir. Bu iki projede, AAA patogenezinde inflamatuvar yolaklarda etki gösterdiği düşünülen belirli miRNA'lar tespit edilmiştir. TÜBİTAK 1001 projemizde, erişkin bireylerde miR-197-3p ve miR-20a-5p'nin kontrol bireyler ve kötü gidişli AAA hastaları arasında değişken ifadeleri olduğu saptanmış ve yapılan fonksiyonel analizler sonrası inflamasyon mekanizmasında etkili oldukları bildirilmiştir (1). ERA-NET projesinde ise pediatrik hastalarla çalışılmış ve yapılan mikrodizin, qRT-PCR ve biyoinformatik çalışmaları sonrasında inflamatuvar yolaklarda etki gösterdiği saptanan miRNA'lar; miR-374b-5p, miR-30e-3p, miR-186-5p, miR-29c-3p, miR-25-5p ve miR-329-3p olarak belirlenmiştir (Yayınlanmamış Veri). Bu tez çalışmasında daha önceki araştırmalarımızda bulmuş olduğumuz bu miRNA'ların eksozomlardaki varlığı araştırılmıştır.

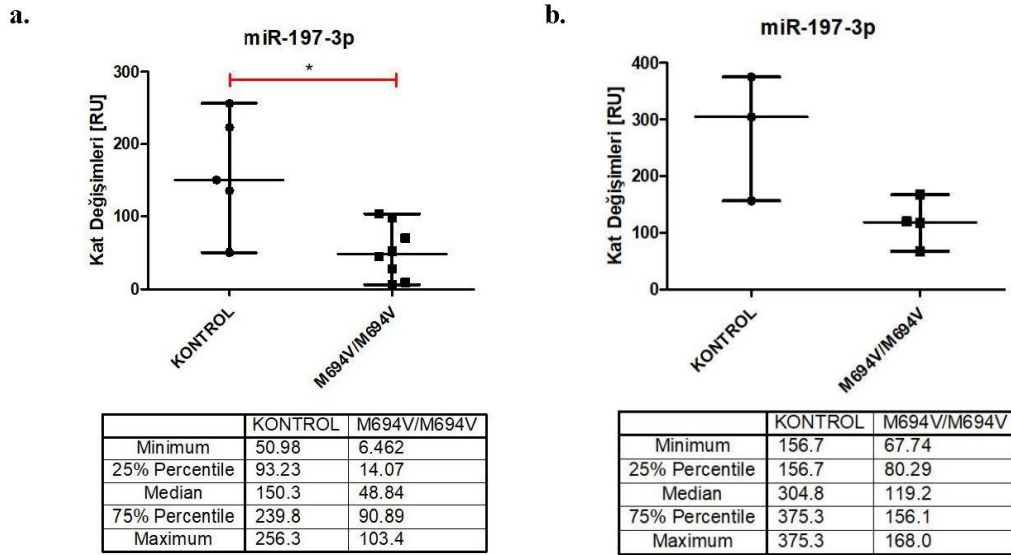
Erişkin grupta plazma ve serumdan elde edilen eksozomlarda miR-197-3p ve miR-20a-5p ifade seviyeleri, kontrol bireyler ve kötü gidişli AAA hastaları arasında qRT-PCR sonrası göreceli kantitasyon yöntemi ($\Delta\Delta C_t$ yöntemi) ile karşılaştırılmıştır. Önceki projemiz doğrultusunda fonksiyonel analizleri detaylı olarak yapılan (1) ve anti-inflamatuvar özellikleri gösterilen miR-197-3p ve miR-20a-5p hem pediatrik hem de erişkin grupta çalışılmıştır. Bu amaçla, serumdan elde edilen eksozomal miRNA analizleri kötü gidişli 10 AAA hastası ve 7 kontrol birey ile plazmadan elde edilen eksozomal miRNA analizleri ise kötü gidişli 5 AAA hastası ve 5 kontrol birey ile yapılmıştır.

Pediatrik grupta ise serumdan elde edilen eksozomlarda miR-197-3p ve miR-20a-5p ile birlikte, daha önce inflamatuvar yolaklarda görev aldığı tespit edilmiş miR-374b-5p, miR-30e-3p, miR-186-5p, miR-29c-3p, miR-25-5p ve miR-329-3p'nin ifade seviyeleri beş farklı karşılaştırma ile analiz edilmiştir (Şekil 2.7.). Bu karşılaştırmalar; kötü gidişli AAA hastalarının kontrollere göre, SAID'lerin kontrollere göre,

SAİD'lerin kötü gidişli AAA hastalarına göre, CAPS hastalarının kontrollere göre ve CAPS hastalarının kötü gidişli AAA hastalarına göre olacak şekilde yapılmıştır. miR-374b-5p, miR-30e-3p, miR-186-5p, miR-29c-3p, miR-25-5p ve miR-329-3p miRNA'ları diğer projemizde sadece pediatrik grupta çalışılmış olduğu için tez kapsamında yine sadece pediatrik hastalar ile ifade analizleri yapılmıştır. Bu amaçla, serumdan elde edilen eksozomal miRNA analizleri kötü gidişli 5 AAA hastası, 6 SAİD (3'Ü CAPS hastası) ve 5 kontrol birey ile yapılmıştır.

4.4.1. Erişkin Grupta miR-197-3p İfade Analizi

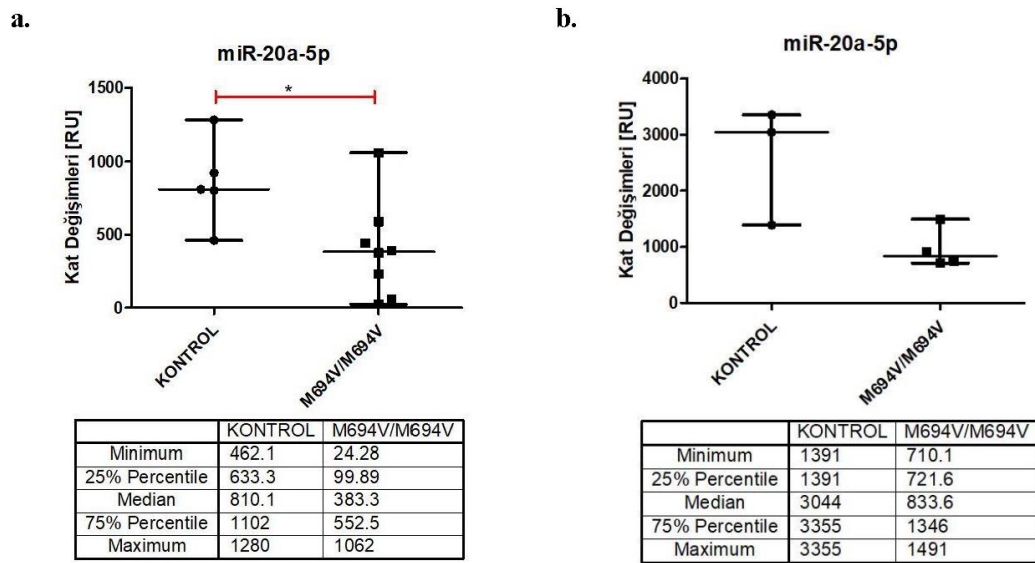
Erişkin bireylerin serumdan elde edilen eksozomlarında miR-197-3p için yapılan qRT-PCR analizlerine göre kötü gidişli AAA hastalarında kontrol bireylere göre anlamlı olarak 3,16 kat azalış görülmüştür ($p = 0,02$). Erişkin bireylerin plazmadan elde edilen eksozomlarında yapılan qRT-PCR analizlerine göre ise kötü gidişli AAA hastalarında kontrol bireylere göre 2,35 kat azalış görülmüştür ($p = 0,11$) (Şekil 4.11.).



Şekil 4.11. Erişkin bireylerin serumdan (a) ve plazmadan (b) elde edilen eksozomlarda miR-197-3p için yapılmış ifade analizi (Mann-Whitney U test sonuçları * $P < 0,10$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$.).

4.4.2. Erişkin Grupta miR-20a-5p İfade Analizi

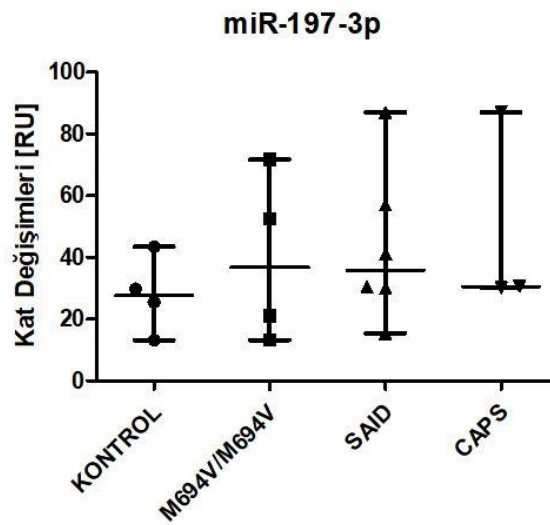
Erişkin bireylerin serumdan elde edilen eksozomlarında miR-20a-5p için yapılan qRT-PCR analizlerine göre kötü gidişli AAA hastalarında kontrol bireylere göre anlamlı olarak 2,16 kat azalış görülmüştür ($p = 0,03$). Erişkin bireylerin plazmadan elde edilen eksozomlarında yapılan qRT-PCR analizlerine göre ise kötü gidişli AAA hastalarında kontrol bireylere göre 2,69 kat azalış görülmüştür ($p = 0,11$) (Şekil 4.12.).



Şekil 4.12. Erişkin bireylerin serumdan (a) ve plazmadan (b) elde edilen eksozomlarında miR-20a-5p için yapılmış ifade analizi (Mann-Whitney U test sonuçları * $P < 0,10$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$.).

4.4.3. Pediatrik Grupta miR-197-3p İfade Analizi

Pediatric bireylerin serumdan elde edilen eksozomlarında miR-197-3p için yapılan qRT-PCR analizlerine göre kötü gidişli AAA hastalarında kontrol bireylere göre 1,42 kat artış görülürken ($p=0,69$), SAID'lerde kontrol bireylere göre 1,56 kat artış görülmüştür ($p=0,26$). SAID'lerde kötü gidişli AAA hastalarına göre 1,10 kat artış tespit edilirken ($p=0,76$), CAPS hastalarında; kontrollere göre 3,41 kat artış ($p=0,23$), kötü gidişli AAA hastalarına göre 1,24 kat artış görülmüştür ($p=0,63$) (Şekil 4.13.)

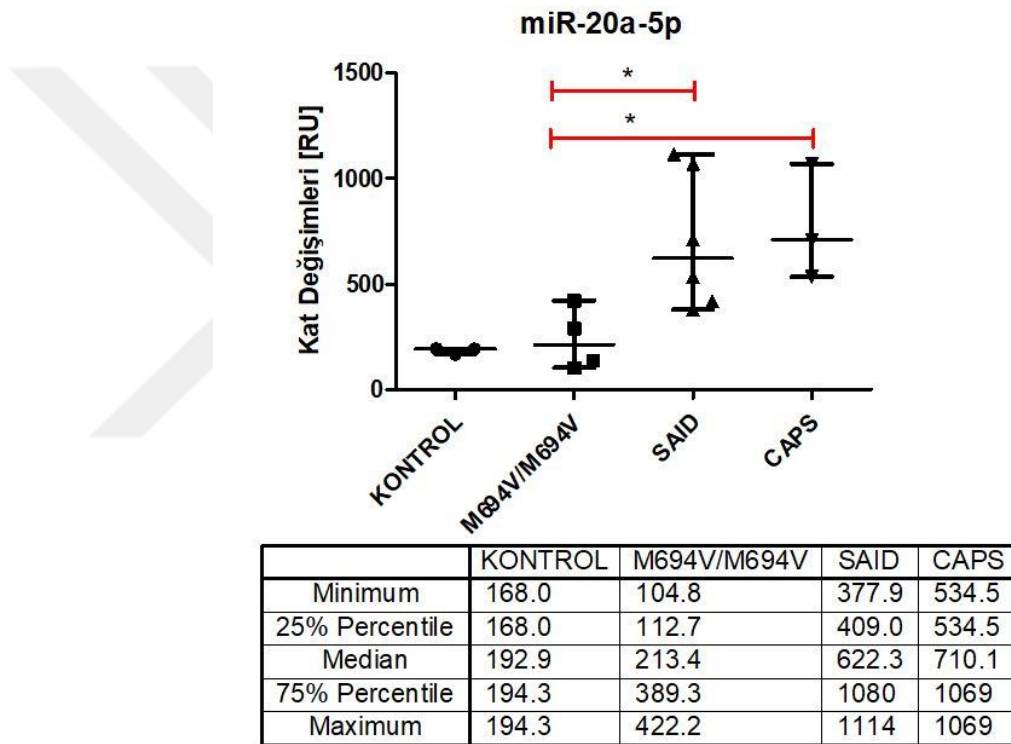


	KONTROL	M694V/M694V	SAID	CAPS
Minimum	13.10	13.20	15.37	30.10
25% Percentile	16.20	15.14	26.42	30.10
Median	27.59	36.71	35.82	30.53
75% Percentile	40.02	66.81	64.46	86.94
Maximum	43.47	71.60	86.94	86.94

Şekil 4.13. Pediatric bireylere ait eksozomlarda miR-197-3p için yapılmış ifade analizi (Mann-Whitney U test sonuçları * $P < 0,10$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$.).

4.4.4. Pediatrik Grupta miR-20a-5p İfade Analizi

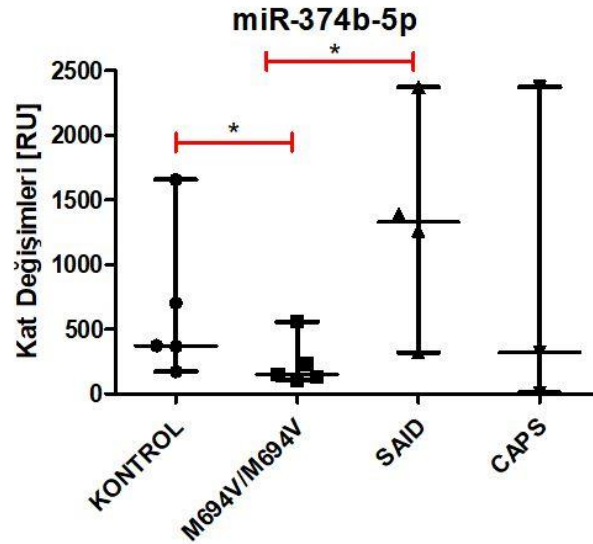
Pediatric bireylerin serumdan elde edilen eksozomlarında miR-20a-5p için yapılan qRT-PCR analizlerine göre kötü gidişli AAA hastalarında kontrol bireylere göre 1,61 kat azalış görülmüştür ($p = 0,69$). SAID’lerde kontrol bireylere göre 1,84 kat azalış görülürken ($p = 0,11$), SAID’lerde kötü gidişli AAA hastalarına göre anlamlı olarak 3,43 kat artış görülmüştür ($p = 0,02$). CAPS hastalarında; kontrollere göre 4,17 kat artış ($p=0,10$) kötü gidişli AAA hastalarına göre anlamlı olarak 3,75 kat artış görülmüştür ($p = 0,04$) (Şekil 4.14.).



Şekil 4.14. Pediatric bireylere ait eksozomlarda miR-20a-5p için yapılmış ifade analizi (Mann-Whitney U test sonuçları * $P < 0,10$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$.).

4.4.5. Pediatrik Grupta miR-374b-5p İfade Analizi

Pediatrik bireylerin serumdan elde edilen eksozomlarında miR-374b-5p için yapılan qRT-PCR analizlerine göre kötü gidişli AAA hastalarında kontrol bireylere göre 2,78 kat azalış görülmüştür ($p = 0,09$). SAID’lerde kontrol bireylere göre 2,05 kat artış görülürken ($p = 0,41$), SAID’lerde kötü gidişli AAA hastalarına göre 5,70 kat anlamlı artış görülmüştür ($p = 0,03$). CAPS hastalarında; kontrollere göre 1,38 kat artış ($p = 0,79$), kötü gidişli AAA hastalarına göre 3,84 kat artış tespit edilmiştir ($p = 0,79$) (Şekil 4.15.).

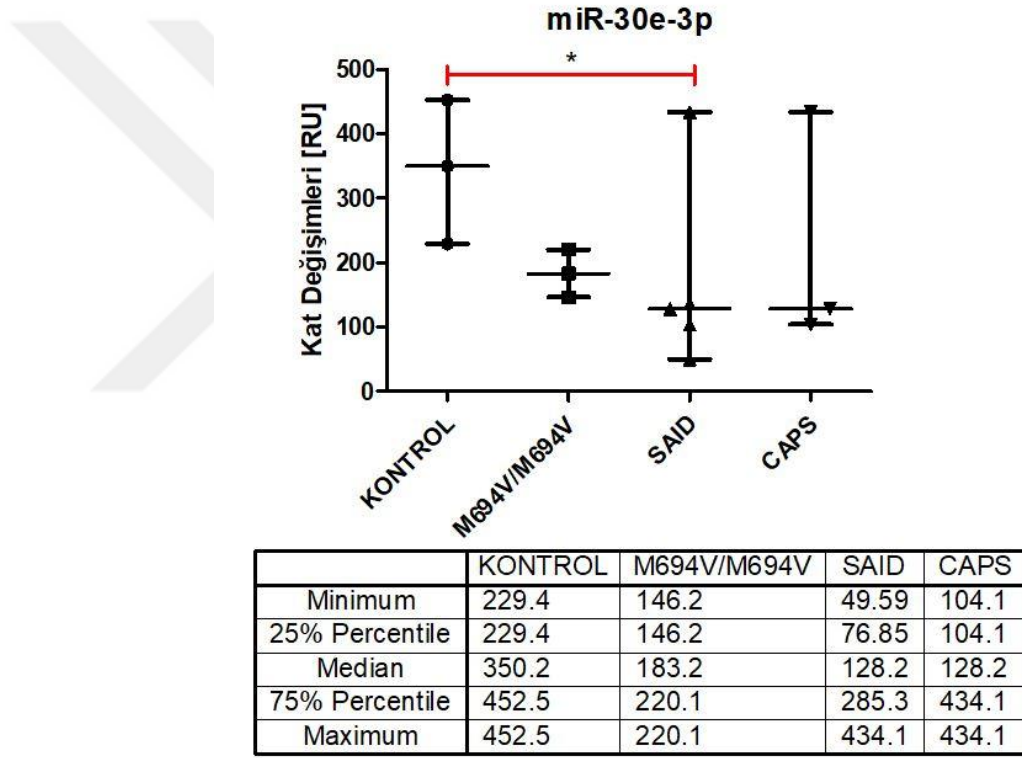


	KONTROL	M694V/M694V	SAID	CAPS
Minimum	172.7	107.8	320.0	7.071
25% Percentile	268.9	118.9	555.6	7.071
Median	372.7	148.3	1327	320.0
75% Percentile	1177	393.3	2127	2372
Maximum	1654	557.2	2372	2372

Şekil 4.15. Pediatrik bireylere ait eksozomlarda miR-374b-5p için yapılmış ifade analizi (Mann-Whitney U test sonuçları * $P < 0,10$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$.).

4.4.6. Pediatrik Grupta miR-30e-3p İfade Analizi

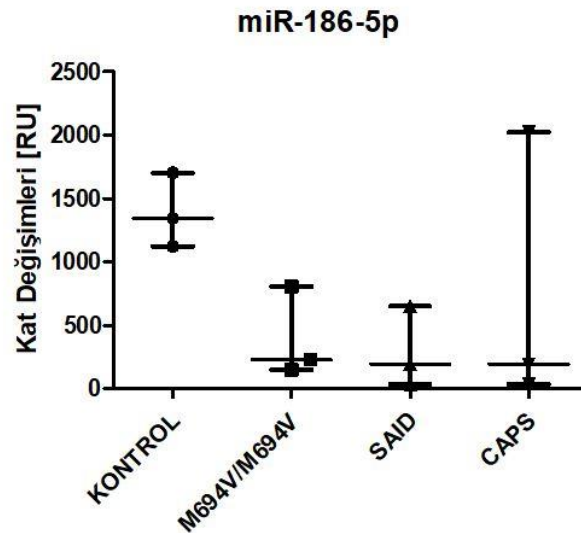
Pediatric bireylerin serumdan elde edilen eksozomlarında miR-30e-3p için yapılan qRT-PCR analizlerine göre kötü gidişli AAA hastalarında kontrol bireylere göre 1,88 kat azalış görülmüştür ($p = 0,10$). SAID'lerde kontrol bireylere göre 2,51 kat azalış görülürken ($p = 0,06$), SAID'lerde kötü gidişli AAA hastalarına göre 1,07 kat azalış görülmüştür ($p = 0,25$). CAPS hastalarında; kontrollere göre 1,55 kat azalış ($p = 0,40$), kötü gidişli AAA hastalarına göre 1,21 kat artış görülmüştür ($p = 0,70$) (Şekil 4.16.).



Şekil 4.16. Pediatric bireylere ait eksozomlarda miR-30e-3p için yapılmış ifade analizi (Mann-Whitney U test sonuçları * $P < 0,10$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$.).

4.4.7. Pediatrik Grupta miR-186-5p İfade Analizi

Pediatrik bireylerin serumdan elde edilen eksozomlarında miR-186-5p için yapılan qRT-PCR analizlerine göre kötü gidişli AAA hastalarında kontrol bireylere göre 3,53 kat azalış görülmüştür ($p = 0,10$). SAID’lerde kontrol bireylere göre 4,75 kat azalış görülmürken ($p = 0,10$), SAID’lerde kötü gidişli AAA hastalarına göre 1,35 kat azalış görülmüştür ($p = 0,70$). CAPS hastalarında; kontrollere göre 1,85 kat azalış ($p=0,70$), kötü gidişli AAA hastalarına göre 1,91 kat artış görülmüştür ($p = 1,00$) (Şekil 4.17.).

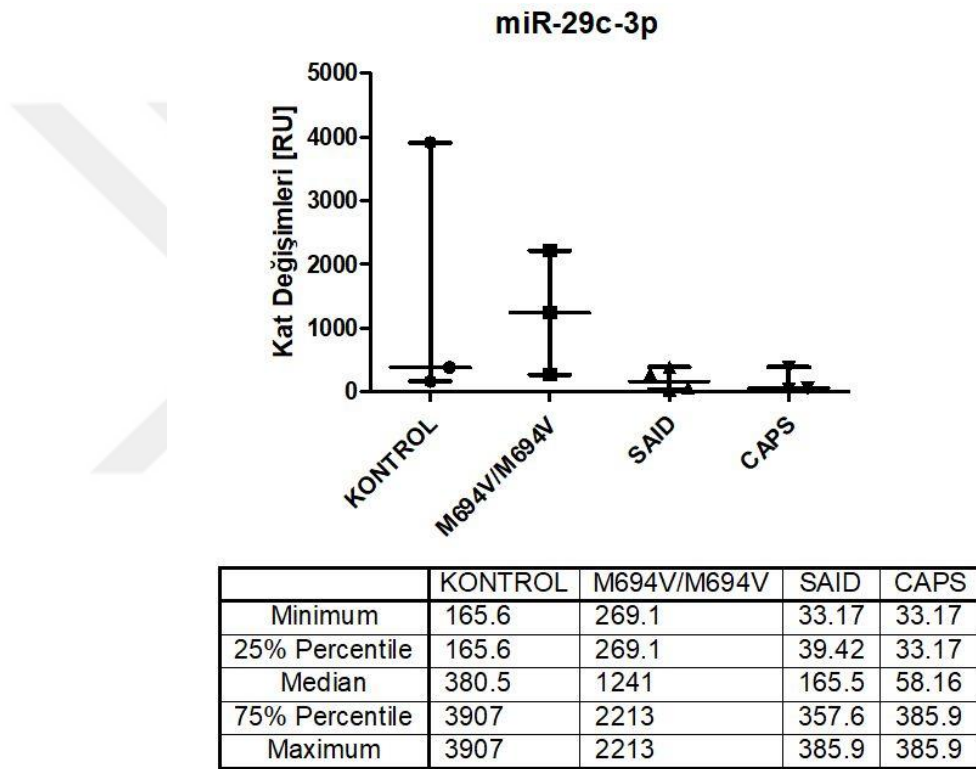


	KONTROL	M694V/M694V	SAID	CAPS
Minimum	1122	148.3	35.31	35.31
25% Percentile	1122	148.3	35.31	35.31
Median	1344	227.8	192.9	192.9
75% Percentile	1701	804.5	648.9	2023
Maximum	1701	804.5	648.9	2023

Şekil 4.17. Pediatrik bireylere ait eksozomlarda miR-186-5p için yapılmış ifade analizi (Mann-Whitney U test sonuçları * $P < 0,10$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$.).

4.4.8. Pediatrik Grupta miR-29c-3p İfade Analizi

Pediatrik bireylerin serumdan elde edilen eksozomlarında miR-29c-3p için yapılan qRT-PCR analizlerine göre kötü gidişli AAA hastalarında kontrol bireylere göre 1,20 kat azalış görülmüştür ($p = 1,00$). SAID'lerde kontrol bireylere göre 7,92 kat azalış görülürken ($p = 0,40$), SAID'lerde kötü gidişli AAA hastalarına göre 6,62 kat azalış görülmüştür ($p = 0,23$). CAPS hastalarında; kontrollere göre 9,33 kat azalış ($p=0,40$), kötü gidişli AAA hastalarına göre 7,80 kat azalış görülmüştür ($p = 0,20$) (Şekil 4.18.).



Şekil 4.18. Pediatrik bireylere ait eksozomlarda miR-29c-3p için yapılmış ifade analizi (Mann-Whitney U test sonuçları * $P < 0,10$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$.).

5. TARTIŞMA

AAA hastalığı monogenik kalıtım modeline sahip bir hastalık olmasına rağmen, hastalarda görülen genotip ve fenotip uyumsuzluğu akıllara epigenetik mekanizmaları getirmiştir. Bu mekanizmalardan, hastalık patogenezi içinde en sık tanımlanmış olanı ise miRNA'lardır. miRNA'ların ifadesinde görülen değişiklikler birçok biyolojik yolağı etkilemekte ve özellikle kanser gibi hastalıklarda bu regülasyon önemli olabilmektedir. miRNA'lar; 20-22 nükleotid uzunluğunda, hücre dışına da salgılanabilen kodlamayan RNA molekülleridir. Ekstraselüler yapılar içerisinde özellikle eksozomal miRNA'lar son yıllarda hem terapötik hedef, hem de biyobelirteç amaçlı kullanılabilme potansiyelleriyle ön plana çıkmaktadır.

Eksozomlar serum, plazma, idrar, anne sütü gibi birçok vücut sıvısında bulunabilen, hücre-hücre interaksyonunda önemli nanovesiküllerdir. İlk keşfedildikleri yıllarda sadece moleküllerin hücre dışına atılabilmesi için oluşan vesiküler yapılar olarak düşünölmelerine rağmen, son yıllarda hastalık mekanizmalarını etkileyebilme özellikleriyle daha sık çalışılmaya başlanmışlardır. Eksozomlar lipid, protein, miRNA gibi önemli molekülleri bünyelerinde barındırmaları ve onları köken aldıkları hücreden uzak mesafelere taşıyabilmeleri nedeniyle hücreler arası iletişimi sağlamakta ve aynı zamanda bu şekilde hastalık patogenezi içinde etkili olmaktadır.

miRNA'ların birçok hastalık mekanizmasında ön plana çıkmış olmaları ve regülasyon süreçlerinde daha çok üst yolaklarda bulunmaları erken evrede biyobelirteç olarak kullanımlarını gündeme getirmektedir. miRNA'lar ile yapılan araştırmaların birçok avantajı bulunmaktadır ve her geçen gün *probe* dizaynlarındaki hassaslığın ve özgüllüğün artması ile miRNA analizleri biraz daha gelişmekte ve kolaylaşmaktadır. Örneğin, miRNA'lar kullanılarak yapılan çalışmalar (oligonükleotid mikrodizaynlar ve *deep sequencing* analizleri) proteomik tekniklere göre daha kolay olmakla beraber çoğunlukla yüksek çıktılı sonuçlar da vermektedir. Başka bir avantaj ise miRNA'ların çok düşük konsantrasyonlarda bile qRT-PCR teknikleriyle analizlerinin yapılabilmesi olmasıdır. Analizlerinin kolay olmasının yanında, miRNA'lar diğer RNA moleküllerine göre zor koşullara karşı daha dayanıklıdır ve kolay kolay degrade olmazlar. Bu özellik de diyagnostik biyobelirteç olarak kullanımları açısından onları

cazip kılan diğer bir etmendir. miRNA'lar hücrel ve ekstraselüler olarak salınabilmektedirler. Hücre dışına salınan miRNA'lardan eksozomal miRNA'lar ise çift katmanlı lipid bir membranla kaplı bir vesikül içerisinde taşındıkları için, dolaşımında serbest olarak bulunan miRNA'lardan daha stabildirler (56).

Tez kapsamında yapılan deneyler teknik olarak değerlendirilecek olursa, eksozom karakterizasyonuna ilişkin optimizasyon deneyleri ve plazma/serum kaynaklı örneklerin karşılaştırılması açısından literatüre katkı sağlayacak bulgular elde edilmiştir. TEM tekniği ile hem plazmadan hem de serumdan izole edilen eksozomların morfolojik analizleri yapılmıştır. Serumdan elde edilen eksozomların TEM altında daha net görülebildiği ancak iki biyolojik sıvının da eksozom çalışmaları için uygun olabildiği görülmüştür. Akım sitometri tekniği ile plazmanın (%68,1), seruma (%53,3) göre daha fazla eksozom popülasyonu içerdiği gözlenmiştir. Ayrıca, bekletilmeden izole edilmiş plazma ve serumda bulunan eksozom örnekleri ile izolasyon sonrası -80 °C'de yaklaşık 2 ay süre ile saklanmış olan eksozom örnekleri karşılaştırılmış ve bekletilmeden izole edilen örneklerin daha fazla oranda eksozom içerdiği görülmüştür. Plazmadan bekletilmeden izole edilen eksozomların oranı %68,1 iken, -80 °C'de saklanmış olan plazma eksozomlarının oranı %57,6 olarak bulunmuştur (Şekil 4.10.). Serumdan bekletilmeden izole edilen eksozomların oranı %53,3 iken, -80 °C'de saklanmış olan serum eksozomlarının oranı %42,5 olarak bulunmuştur (Şekil 4.8.).

Plazma ve serumdan elde edilen eksozom ve eksozomal miRNA konsantrasyonları karşılaştırılmış ve plazmanın daha iyi sonuçlar verdiği gözlemlenmiştir (Tablo 4.2.). Bununla beraber, iki biyolojik sıvının da eksozom çalışmalarında kullanılabileceği ve etkili sonuçlar alınabileceği bu tez çalışmasıyla da gösterilmiş ve literatür bilgisini desteklemiştir (57). Plazmanın seruma göre daha yoğun bir biyolojik sıvı olmasının (içinde fibrinojen gibi pıhtılaşma faktörleri içerir), alınan daha iyi sonuçların bir açıklaması olabileceği düşünülmektedir.

Bu tez çalışması kapsamında, önceki çalışmalarımızda hem erişkin hem de pediatrik bireylerde total kanda tanımlanmış ve AAA hastalığı mekanizmasından sorumlu olabilecek miRNA'ların eksozomlar aracılığıyla taşınıp taşınmadığı araştırılmış ve hasta/kontrol arasındaki değişen ifade seviyeleri anlaşılmaya çalışılmıştır. En sık çalışılan biyolojik materyal olan plazma ve serumla çalışılmış ve

eksozom popülasyonlarındaki farklar araştırılmıştır. Erişkin ve pediatrik bireyler için belirlenen ayrı miRNA gruplarına, kötü gidişli AAA hastaları, kontroller ve başka sistemik otoinflamatuvar hastalığa sahip bireylerden toplanan plazma ve serum örneklerinden elde edilen eksozomlarda bakılmıştır.

İki farklı projenin bulguları ışığında, miR-197-3p, miR-20a-5p, miR-374b-5p, miR-30e-3p, miR-186-5p, miR-29c-3p, miR-25-5p ve miR-329-3p tez kapsamında değerlendirilecek miRNA'lar olarak belirlenmişti. Bu miRNA'lar *ExoCarta* olarak isimlendirilen bir veritabanı ile kontrol edilmiştir. Bu veritabanı, hem yayınlanmış hem de yayınlanmamış çalışmalar ile birçok organizmada ve biyolojik materyalde eksozomlar aracılığıyla tanımlanmış lipid, protein, mRNA, miRNA bilgilerinin görülebildiği bir programdır. Örneğin, analizini yaptığımız miRNA'lardan miR-197-3p'nin iki ayrı çalışma aracılığıyla hem plazmada hem de kolorektal kanser hücrelerinden elde edilen eksozomlarda gösterildiği görülmüştür. İki çalışmada da *deep sequencing* tekniği kullanılmış ve qRT-PCR miRNA'ları tanımlama methodu olarak kullanılmıştır (58, 59). Ayrıca, miR-329-3p dışındaki analiz ettiğimiz miRNA'ların farklı biyolojik sıvılarda ve farklı çalışmalarda eksozomlar ile ilişkilendirildiği görülmüştür (58, 60).

AAA hastalığı gastrointestinal, kardiyovasküler, ya da kas-iskelet sistemlerinin etkilenebildiği yani vücudun farklı bölgelerinin (böbrek, eklemler gibi) aynı anda tutulum gösterebildiği bir hastalıktır (11). Hastalıkta etkilenen gen *MEFV* geni, bu genin kodladığı protein ise Pyrin proteindir. Pyrin ise genelde monosit ve nötrofillerde ifade olmaktadır ancak hastalarda birden fazla dokunun etkileniyor olması eksozomlar aracılığıyla taşınan miRNA'ların hastalık patogenezi etkileyebileceğini düşündürmekteydi. Bu tez çalışması kapsamında elde edilen sonuçlar ile seçilen otoinflamatuvar hastalıklar ve Türk toplumunda sık görülen bir otoinflamatuvar hastalık olan AAA'da hastalık patogenezi etkili olabilecek miRNA'ların eksozomlardaki varlığı ilk defa gösterilmiştir.

Erişkin bireylerde miR-197-3p'nin ifadesinin kötü gidişli AAA hastalarında anlamlı bir şekilde azaldığı gösterilmişti (1). Hedef geninin de tespit edilmiş olduğu (*IL1R1* geni) miR-197-3p, yapılan fonksiyonel analizlerle de geliştirilmiş ve bu miRNA'nın AAA patogenezi anti-inflamatuvar bir etki mekanizmasına sahip olduğu yargısına varılmıştı (yayınlanmamış veri). Bu tez çalışmasında ise, miR-197-

3p için uyumlu sonuçlar elde edilmiştir. Sistemik bir etkinin görüldüğü AAA hastalığında, anti-inflamatuvar etkisi olduğu bilinen bir miRNA'nın (miR-197-3p) ifadesinin hem total kanda hem de eksozomal olarak azalması hastalık patogenezinin etkisini artırmaktadır. miR-20a-5p'nin ise kötü gidişli AAA hastalarında kontrollere göre anlamlı bir şekilde arttığı gözlemlenmişti. miR-20a-5p'nin inflamasyonu baskılayıcı özellikte fakat hastalarda artış gösteriyor olması ise, inflamatuvar süreçte daha geç bir evrede baskılama açısından önemli olabileceğini düşündürmüştü (yayınlanmamış veri). Fonksiyonel çalışmalar sonrası anti-inflamatuvar etki mekanizmasına sahip olduğu anlaşılan miR-20a-5p'nin hastalardaki ifadesi total kanda artmıştı. Bu tez çalışmasında, miR-20a-5p'nin ifadesi kötü gidişli AAA hastalarında azaldı. Hastaların miR-20a-5p ifadesinin, total kanda artıp eksozomlarında azalıyor olması ise bu miRNA'nın daha ekstraselüler bir etki mekanizması olabileceğini düşündürmektedir. miR-20a-5p'nin hedef geninin bulunarak daha kapsamlı analizlere gidilmesi ve bu ifade farklılığının daha detaylı olarak anlaşılması gerekmektedir.

Pediyatrik bireylerde yapılan eksozomal miRNA çalışmaları önceki sonuçlarımızla karşılaştırılarak benzer ve farklı bulunan veriler anlaşılmasına çalışılmıştır. Önceki bulgularımızda, miR-197-3p'nin ifadesi, kötü gidişli AAA hastalarında kontrol bireylere göre azalmıştı ama bu azalış anlamlı değildi. Bu tez sonucunda ise, miR-197-3p için pediyatrik bireylerde hasta ve kontroller arasında ifade düzeyinde fazla bir fark olmadığı görülmüştür. miR-20a-5p için ise önceki projemizdeki mikrodizin ve biyoinformatik çalışmalar sonucunda fark görülmemiş, ancak inflamatuvar yollarda görevli olduğu düşünülerek çalışmalara dahil edilmişti. Bu tez kapsamında, miR-20a-5p'nin ifadesinin SAID'lerde kötü gidişli AAA hastalarına göre anlamlı bir şekilde arttığı görülmüştür. SAID'ler çok heterojen bir grup olduğu için, aynı analiz CAPS hastaları ve kötü gidişli AAA hastaları için de tekrarlanmış ve yine anlamlı bir artışa rastlanmıştır. Bu miRNA için, özellikle CAPS hastalarında kötü gidişli AAA hastalarına göre anlamlı bir artış saptanması büyük önem taşımaktadır. Özellikle, klinikte tanı koyarken zorlanılan AAA dışındaki benzer otoinflamatuvar hastalık grupları içerisinde olan CAPS hastalığı daha az invaziv bir şekilde bu miRNA aracılığıyla tespit edilebilir ve bu hastalık için bir aday biyobelirteç molekülü bu tez kapsamında bulunmuş olabilir. Proje kapsamında yapılan deneylerde;

miR-374b-5p'nin ifadesi kötü gidişli AAA hastalarında kontrollere göre azalmış, SAID'lere göre artmıştı. Tez kapsamında yapılan deneylerde, miR-374b-5p'nin ifadesi kötü gidişli AAA hastalarında kontrollere göre anlamlı bir şekilde azalmıştır. SAID'lerde ise miR-374b-5p'nin ifadesi kötü gidişli AAA hastalarına göre anlamlı bir şekilde artmıştır. Önceki bulgularımızda, miR-30e-3p'nin ifadesi SAID'lerde kontrollere göre azalmıştı ve tez kapsamında yapılan çalışmalarda benzer azalış paterni anlamlı bir şekilde gözlemlenmiştir.

Bu tez çalışmasının sonuçları diğer araştırmalarımız ile birlikte düşünüldüğünde, işlevsel olarak da çalışılmış olan miR-197-3p'nin AAA hastalığı patogenezinde, miR-20a-5p'nin ise özellikle sistemik otoinflamatuvar hastalık grubundan CAPS hastalığında etkili olabileceği, diğer miRNA'lardan miR-374b-5p'nin ve miR-30e-3p'nin ise inflamasyon mekanizmasında daha genel bir etkiye sahip olduğu düşünülmüştür. Ayrıca, daha önce AAA hastalığında ya da SAID'lerde tanımlanmamış olan miR-197-3p, miR-20a-5p, miR-374b-5p ve miR-30e-3p'nin ilk defa eksozomlarda bu tez aracılığıyla gösterilmiş olması inflamasyon mekanizmasının daha iyi aydınlatılması açısından ileride önemli olabilecektir. Ancak, bu miRNA'ların tanı ya da tedavi amaçlı potansiyellerinin belirlenmesi için hasta ve kontrol sayılarının artırılarak analizlerin tekrarlanması gerekmektedir.

Eksozomlar aracılığı taşıyan miRNA'ların uzak hedeflere de gidebileceği ve orada da fonksiyonel aktivitelerini sürdürebilecekleri kanıtlanmıştır (32). Bütün bu sonuçlar birlikte değerlendirildiğinde, ifade seviyelerindeki analizleri tamamlanmış bu miRNA'ların eksozomlar aracılığıyla dolaşımda uzak yerleri de etkileyebileceği, sadece inflamasyona sebep olan monosit ya da nötrofillerle sınırlı kalmayacağı unutulmamalıdır. AAA, CAPS, TRAPS gibi sistemik etkinin görüldüğü otoinflamatuvar hastalıklar için, eksozomal miRNA'ların hastalıkların patogenezinde olası etkileri daha iyi anlaşılması ve araştırılması gereken önemli konular arasında gelmektedir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

6.1. Sonuçlar

- İnsan serum ve plazmasından elde edilen eksozomlar iki farklı methodolojiyle (TEM ve akım sitometri) karakterize edilebilmiştir.
- Plazmanın (%68,1), seruma göre (%53,3) daha yüksek oranda eksozom popülasyonu taşıdığı ancak TEM analizinde serum ve plazmadan elde edilen eksozomlar arasında yoğunluk açısından belirgin bir farklılık olmadığı görülmüştür.
- Serum ve plazmadan daha önce izole edilmiş ve -80 °C 'de saklanan eksozomların (%42,5, %57,6), taze izole edilmiş olanlara göre (%53,3, %68,1) oranının düşük olduğu ancak anlamlı bir farklılığın olmadığı tespit edilmiştir.
- Bireyler arasında eksozomdan elde edilen RNA konsantrasyonları oldukça farklılık göstermiştir. Plazmadan elde edilen eksozomların RNA konsantrasyonlarının, serumdan elde edilen eksozomların RNA konsantrasyonlarına göre daha fazla olduğu görülmüştür (plazmadan elde edilen eksozomların RNA konsantrasyonları ortalama 13,39 ng/μl iken serumdan elde edilen eksozomların ortalama konsantrasyonu 7,47 ng/μl idi).
- Erişkin bireylerde miR-197-3p, miR-20a-5p ve U6 snRNA moleküllerinin eksozomlar aracılığıyla taşındığı, pediatrik bireylerde ise miR-197-3p, miR-20a-5p, miR-374b-5p, miR-30e-3p, miR-186-5p, miR-29c-3p ve U6 snRNA 'nın eksozomlar aracılığıyla taşındığı tespit edilmiştir.
- miRNA analizlerinde genelde referans olarak kullanılan RNU48 molekülünün (61), hem erişkin hem de pediatrik bireylerde eksozomlar aracılığıyla taşınmadığı tespit edilmiştir. Ayrıca, hem erişkin hem de pediatrik bireylerde, önceki projemizde inflamatuvar yollarda görevli olabileceği tespit edilmiş miR-25-5p ve miR-329-3p'nin eksozomlarda taşınmadığı anlaşılmıştır.
- Erişkin kötü gidişli AAA hastalarının, serumdan elde edilen eksozomlarında miR-197-3p'nin ifadesinin anlamlı bir şekilde 3,16 kat azaldığı (p=0,02), plazmadan elde edilen eksozomlarında ise miR-197-3p'nin ifadesinin 2,35 kat azaldığı ama anlamlı olmadığı görülmüştür (p=0,11). Ayrıca, erişkin kötü gidişli AAA hastalarının, serumdan elde edilen eksozomlarında miR-20a-

5p'nin ifadesinin anlamlı bir şekilde 2,16 kat azaldığı ($p=0,03$), plazmadan elde edilen eksozomlarında ise miR-20a-5p'nin ifadesinin 2,69 kat azaldığı ama anlamlı olmadığı görülmüştür ($p=0,11$).

- Pediatrik SAID'lerde kötü gidişli AAA hastalarına göre serumdan elde edilen eksozomlarda miR-20a-5p'nin ifadesinin anlamlı bir şekilde 3,43 kat arttığı görülmüştür ($p=0,02$). Ayrıca, CAPS hastalarında da kötü gidişli AAA hastalarına göre, serumdan elde edilen eksozomlarda miR-20a-5p'nin ifadesinin anlamlı bir şekilde 3,75 kat arttığı görülmüştür ($p=0,04$).
- Pediatrik kötü gidişli AAA hastalarının serumdan elde edilen eksozomlarında miR-374b-5p'nin ifadesinin anlamlı bir şekilde 2,78 kat azaldığı görülmüştür ($p=0,09$). Ayrıca, pediatrik SAID'lerde kötü gidişli AAA hastalarına göre serumdan elde edilen eksozomlarda miR-374b-5p'nin ifadesinin anlamlı bir şekilde 5,70 kat arttığı görülmüştür ($p=0,03$).
- Pediatrik SAID'lerin serumdan elde edilen eksozomlarında miR-30e-3p'nin ifadesinin anlamlı bir şekilde 2,51 kat azaldığı görülmüştür ($p=0,06$).

6.2. Öneriler

- Daha fazla sayıda kötü gidişli AAA hastası, farklı otoinflamatuvar hasta gruplarına sahip bireyler çalışmaya dahil edilip aynı deneyler tekrar edilmeye çalışılabilir. Ayrıca, U6 snRNA dışında başka bir referans gen daha kullanılarak ekspresyon seviyeleri bir kere daha normalize edilebilir.
- İdrar gibi daha az invaziv biyolojik sıvılardan da eksozom eldesi yapılmaya çalışılabilir ve aynı miRNA'lar bu eksozomlar üzerinde de test edilebilir.
- Hasta ve kontrol bireylerin gösterdikleri farklı eksozomal miRNA profilleri dışında lipid ve protein seviyeleri de inceleyebilir ve yeni aday biyobelirteçler belirlenebilir.
- Belirlenen miRNA'ların hedef genlerinin bulunarak işlevsel analizlerinin yapılması ve etkiledikleri inflamatuvar yolların aydınlatılması düşünülebilir.
- Eksozomlarla taşınan miRNA'ların komşu bölgelere taşınabileceği ama bu miRNA'lar için daha uzak yerlerin hedeflenebileceği de unutulmamalı ve bu miRNA'ların ifadelerinin neden arttığı ya da neden azaldığı bu bağlamda değerlendirilip çalışılmalıdır.

7. KAYNAKLAR

1. Akkaya-Ulum YZ, Balci-Peynircioglu B, Karadag O, Eroglu FK, Kalyoncu U, Kiraz S, et al. Alteration of the microRNA expression profile in familial Mediterranean fever patients. *Clin Exp Rheumatol*. 2017 Nov-Dec;35 Suppl 108(6):90-94.
2. Sag E, Bilginer Y, Ozen S. Autoinflammatory diseases with periodic fevers. *Current rheumatology reports*. 2017;19(7):41.
3. Kuemmerle-Deschner JB, editor CAPS—pathogenesis, presentation and treatment of an autoinflammatory disease. *Seminars in immunopathology*; 2015: Springer.
4. Menon SG, Efthimiou P. Tumor necrosis factor-associated periodic syndrome in adults. *Rheumatology international*. 2017;1-9.
5. Özen S, Batu E, Demir S. Familial Mediterranean fever: Recent developments in pathogenesis and new recommendations for management. *Front Immunol* 2017; 8: 253. 2017.
6. Rawashdeh M, Majeed H. Familial Mediterranean fever in Arab children: the high prevalence and gene frequency. *European journal of pediatrics*. 1996;155(7):540- 4.
7. Ozen S, Karaaslan Y, Ozdemir O, Saatci U, Bakkaloglu A, Koroglu E, et al. Prevalence of juvenile chronic arthritis and familial Mediterranean fever in Turkey: a field study. *The Journal of rheumatology*. 1998;25(12):2445-9.
8. Rigante D. Autoinflammatory syndromes behind the scenes of recurrent fevers in children. *Medical Science Monitor*. 2009;15(8):RA179-RA87.
9. Turkish F. Familial mediterranean fever (FMF) in Turkey. *Medicine*. 2005;84(1):1-11.
10. Touitou I. The spectrum of familial Mediterranean fever (FMF) mutations. *European Journal of Human Genetics*. 2001;9(7):473.11. Sarı İ, Birlik M, Kasifoğlu T. Familial Mediterranean fever: an updated review. *European journal of rheumatology*. 2014;1(1):21.
12. Moradian MM, Sarkisian T, Ajrapetyan H, Avanesian N. Genotype–phenotype studies in a large cohort of Armenian patients with familial Mediterranean fever suggest clinical disease with heterozygous MEFV mutations. *Journal of human genetics*. 2010;55(6):389.
13. Marek-Yagel D, Berkun Y, Padeh S, Abu A, Reznik-Wolf H, Livneh A, et al. Clinical disease among patients heterozygous for familial Mediterranean fever. *Arthritis & Rheumatism: Official Journal of the American College of Rheumatology*. 2009;60(6):1862-6.
14. Álvarez-Errico D, Vento-Tormo R, Ballestar E. Genetic and epigenetic determinants in autoinflammatory diseases. *Frontiers in immunology*. 2017;8:318.

15. Jin B, Li Y, Robertson KD. DNA methylation: superior or subordinate in the epigenetic hierarchy? *Genes & cancer*. 2011;2(6):607-17.
16. Bannister AJ, Kouzarides T. Regulation of chromatin by histone modifications. *Cell research*. 2011;21(3):381.
17. Collins LJ, Schönfeld B, Chen XS. The epigenetics of non-coding RNA. *Handbook of Epigenetics*: Elsevier; 2011. p. 49-61.
18. Ben-Zvi I, Brandt B, Berkun Y, Lidar M, Livneh A. The relative contribution of environmental and genetic factors to phenotypic variation in familial Mediterranean fever (FMF). *Gene*. 2012;491(2):260-3.
19. Kirectepe AK, Kasapcopur O, Arisoy N, Erdem GC, Hatemi G, Ozdogan H, et al. Analysis of MEFV exon methylation and expression patterns in familial Mediterranean fever. *BMC medical genetics*. 2011;12(1):105.
20. Ardekani AM, Naeini MM. The role of microRNAs in human diseases. *Avicenna journal of medical biotechnology*. 2010;2(4):161.
21. Lam JK, Chow MY, Zhang Y, Leung SW. siRNA versus miRNA as therapeutics for gene silencing. *Molecular Therapy-Nucleic Acids*. 2015;4.
22. Garzon R, Marcucci G, Croce CM. Targeting microRNAs in cancer: rationale, strategies and challenges. *Nature reviews Drug discovery*. 2010;9(10):775.
23. O'Brien J, Hayder H, Zayed Y, Peng C. Overview of microRNA biogenesis, mechanisms of actions, and circulation. *Frontiers in endocrinology*. 2018;9:402.
24. Paul P, Chakraborty A, Sarkar D, Langthasa M, Rahman M, Bari M, et al. Interplay between miRNAs and human diseases. *Journal of cellular physiology*. 2018;233(3):2007-18.
25. Wada T, Toma T, Matsuda Y, Yachie A, Itami S, Taguchi Y, et al. Microarray analysis of circulating microRNAs in familial Mediterranean fever. *Modern rheumatology*. 2017;27(6):1040-6.
26. Latsoudis H, Mashreghi MF, Grün JR, Chang HD, Stuhlmüller B, Repa A, et al. Differential Expression of miR-4520a Associated With Pyrin Mutations in Familial Mediterranean Fever (FMF). *Journal of cellular physiology*. 2017;232(6):1326-36.
27. Hortu HO, Karaca E, Sozeri B, Gulez N, Makay B, Gunduz C, et al. Evaluation of the effects of miRNAs in familial Mediterranean fever. *Clinical rheumatology*. 2018:1-9.
28. Koga T, Migita K, Sato T, Sato S, Umeda M, Nonaka F, et al. MicroRNA-204-3p inhibits lipopolysaccharide-induced cytokines in familial Mediterranean fever via the phosphoinositide 3-kinase γ pathway. *Rheumatology*. 2017;57(4):718-26.
29. Amarilyo G, Pillar N, Ben-Zvi I, Weissglas-Volkov D, Zalcman J, Harel L, et al. Analysis of microRNAs in familial Mediterranean fever. *PloS one*. 2018;13(5):e0197829.
30. Turchinovich A, Weiz L, Burwinkel B. Extracellular miRNAs: the mystery of their origin and function. *Trends in biochemical sciences*. 2012;37(11):460-5.

31. Sohel MH. Extracellular/circulating microRNAs: release mechanisms, functions and challenges. *Achievements in the Life Sciences*. 2016;10(2):175-86.
32. Valadi H, Ekström K, Bossios A, Sjöstrand M, Lee JJ, Lötvall JO. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nature cell biology*. 2007;9(6):654.
33. Kimura K, Hohjoh H, Yamamura T. The Role for Exosomal microRNAs in Disruption of Regulatory T Cell Homeostasis in Multiple Sclerosis. *Journal of experimental neuroscience*. 2018;12:1179069518764892.
34. Stoorvogel W. Functional transfer of microRNA by exosomes. *Blood*. 2012;119(3):646-8.
35. Montecalvo A, Larregina AT, Shufesky WJ, Stolz DB, Sullivan ML, Karlsson JM, et al. Mechanism of transfer of functional microRNAs between mouse dendritic cells via exosomes. *Blood*. 2012;119(3):756-66.
36. Gupta A, Pulliam L. Exosomes as mediators of neuroinflammation. *Journal of neuroinflammation*. 2014;11(1):68.
37. Zhang B, Yin Y, Lai RC, Lim SK. Immunotherapeutic potential of extracellular vesicles. *Frontiers in immunology*. 2014;5:518.
38. Colombo M, Raposo G, Théry C. Biogenesis, secretion, and intercellular interactions of exosomes and other extracellular vesicles. *Annual review of cell and developmental biology*. 2014;30:255-89.
39. Li P, Kaslan M, Lee SH, Yao J, Gao Z. Progress in exosome isolation techniques. *Theranostics*. 2017;7(3):789.
40. Zhang M, Jin K, Gao L, Zhang Z, Li F, Zhou F, et al. Methods and Technologies for Exosome Isolation and Characterization. *Small Methods*. 2018:1800021.
41. Szatanek R, Baj-Krzyworzeka M, Zimoch J, Lekka M, Siedlar M, Baran J. The methods of choice for extracellular vesicles (EVs) characterization. *International journal of molecular sciences*. 2017;18(6):1153.
42. Hannafon BN, Ding W-Q. Intercellular communication by exosome-derived microRNAs in cancer. *International journal of molecular sciences*. 2013;14(7):14240-69.
43. Hüttenhofer A, Mayer G. *Circulating miRNAs as biomarkers of kidney disease*. Oxford University Press; 2016.
44. hind A, Wilson C. Exosomal miRNAs as cancer biomarkers and therapeutic targets. *Journal of extracellular vesicles*. 2016;5(1):31292.
45. Arneth B. Update on the types and usage of liquid biopsies in the clinical setting: a systematic review. *BMC cancer*. 2018;18(1):527.
46. Halvaei S, Daryani S, Eslami-S Z, Samadi T, Jafarbeik-Iravani N, Bakhshayesh TO, et al. Exosomes in cancer liquid biopsy: a focus on breast cancer. *Molecular Therapy-Nucleic Acids*. 2018;10:131-41.

47. Perez-Hernandez J, Forner MJ, Pinto C, Chaves FJ, Cortes R, Redon J. Increased urinary exosomal microRNAs in patients with systemic lupus erythematosus. *PLoS One*. 2015;10(9):e0138618.
48. Jia H-L, Liu C-W, Zhang L, Xu W-J, Gao X-J, Bai J, et al. Sets of serum exosomal microRNAs as candidate diagnostic biomarkers for Kawasaki disease. *Scientific reports*. 2017;7:44706.
49. Selmaj I, Cichalewska M, Namiecinska M, Galazka G, Horzelski W, Selmaj KW, et al. Global exosome transcriptome profiling reveals biomarkers for multiple sclerosis. *Annals of neurology*. 2017;81(5):703-17.
50. Xu D, Song M, Chai C, Wang J, Jin C, Wang X, et al. Exosome-encapsulated miR-6089 regulates inflammatory response via targeting TLR4. *Journal of cellular physiology*. 2018.
51. Darband SG, Mirza-Aghazadeh-Attari M, Kaviani M, Mihanfar A, Sadighparvar S, Yousefi B, et al. Exosomes: natural nanoparticles as bio shuttles for RNAi delivery. *Journal of Controlled Release*. 2018.
52. Tatiparti K, Sau S, Kashaw SK, Iyer AK. siRNA delivery strategies: a comprehensive review of recent developments. *Nanomaterials*. 2017;7(4):77.
53. Maheshwari R, Tekade M, Gondaliya P, Kalia K, D'Emanuele A, Tekade RK. Recent advances in exosome-based nanovehicles as RNA interference therapeutic carriers. *Nanomedicine*. 2017;12(21):2653-75.
54. Li S-p, Lin Z-x, Jiang X-y, Yu X-y. Exosomal cargo-loading and synthetic exosome-mimics as potential therapeutic tools. *Acta pharmacologica Sinica*. 2018.
55. Piram M, Frenkel J, Gattorno M, Ozen S, Lachmann HJ, Goldbach-Mansky R, et al. A preliminary score for the assessment of disease activity in hereditary recurrent fevers: results from the AIDAI (Auto-Inflammatory Diseases Activity Index) Consensus Conference. *Annals of the rheumatic diseases*. 2011;70(2):309- 14.
56. Giza DE, Vasilescu C, Calin GA. Key principles of miRNA involvement in human diseases. *Discoveries*. 2014;2(4):e34.
57. Cortez MA, Calin GA. MicroRNA identification in plasma and serum: a new tool to diagnose and monitor diseases. *Expert opinion on biological therapy*. 2009;9(6):703-11.
58. Huang X, Yuan T, Tschannen M, Sun Z, Jacob H, Du M, et al. Characterization of human plasma-derived exosomal RNAs by deep sequencing. *BMC genomics*. 013;14(1):319.
59. Ji H, Chen M, Greening DW, He W, Rai A, Zhang W, et al. Deep sequencing of RNA from three different extracellular vesicle (EV) subtypes released from the human LIM1863 colon cancer cell line uncovers distinct miRNA-enrichment signatures. *PloS one*. 2014;9(10):e110314.
60. Taylor DD, Gercel-Taylor C. MicroRNA signatures of tumor-derived exosomes as diagnostic biomarkers of ovarian cancer. *Gynecologic oncology*. 2008;110(1):13-21.

61. Schwarzenbach H, da Silva AM, Calin G, Pantel K. Data normalization strategies for microRNA quantification. *Clinical chemistry*. 2015:clinchem. 2015.239459.



8. EKLER

EK-1. Tez Çalışması İle İlgili Etik Kurul İzni



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

Sayı : 16969557-1152

Konu : ARAŞTIRMA PROJESİ DEĞERLENDİRME RAPORU

Toplantı Tarihi : 13 HAZİRAN 2017 SALI
Toplantı No : 2017/15
Proje No : GO 17/513 (Değerlendirme Tarihi: 13.06.2017)
Karar No : GO 17/513- 11

Üniversitemiz Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı öğretim üyelerinden Doç. Dr. Banu PEYNİRCİOĞLU' nun sorumlu araştırmacı olduğu, Prof. Dr. Seza ÖZEN, Doç. Dr. Umur KALYONCU, Dr. Alper SARI, Dr. Selcan DEMİR, Uzm. Bio. Yeliz Z. Akkaya ULUM, Tayfun Hilmi AKBABA ile birlikte çalışacakları ve Zeynep TAVUKÇUOĞLU' nun yüksek lisans tezi olan, GO 17/513 kayıt numaralı, "*Ailevi Akdeniz Ateşi (AAA) Hastalığında Belirlenen Aday miRNA'ların Dolaşımdaki Varlığının Eksozomlar Üzerinden Araştırılması*" başlıklı proje önerisi araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş olup, etik açıdan uygun bulunmuştur.

- | | |
|---|--|
| 1. Prof. Dr. Nurten AKARSU (Başkan) | 10 Prof. Dr. Oya Nuran EMİROĞLU (Üye) |
| 2. Prof. Dr. Sevdâ F. MÜFTÜOĞLU (Üye) | 11 Yrd. Doç. Dr. Özay GÖKÖZ (Üye) |
| 3. Prof. Dr. M. Yılmaz SARA (Üye) | 12. Doç. Dr. Gözde GİRGIN (Üye) |
| 4. Prof. Dr. Necdet SAGLAM (Üye) | 13. Doç. Dr. Fatma Visal OKUR (Üye) |
| 5. Prof. Dr. Hatice Doğan BUZOĞLU (Üye) | 14. Doç. Dr. Can Ebru KURT (Üye) |
| 6. Prof. Dr. R. Köksal ÖZGÜL (Üye) | 15. Yrd. Doç. Dr. H. Hüsrev TURNAGÖL (Üye) |
| İZİNLİ | İZİNLİ |
| 7. Prof. Dr. Ayşe Lale DOĞAN (Üye) | 16. Öğr. Gör. Dr. Müge DEMİR (Üye) |
| 8. Prof. Dr. Elmas Ebru YALCIN (Üye) | 17. Öğr. Gör. Dr. Meltem ŞENGEL (Üye) |
| İZİNLİ | İZİNLİ |
| 9. Prof. Dr. Mintaze Kerem GÜNEL (Üye) | 18. Av. Meltem ONURLU (Üye) |

EK-2. Orjinallik Ekran Çıktısı

Ailevi Akdeniz Ateşi (AAA) Hastalığında Belirlenen Aday miRNA'ların Dolaşımdaki Varlığının Eksozomlar Üzerinden Araştırılması

ORIGINALITY REPORT

8%

SIMILARITY INDEX

3%

INTERNET SOURCES

5%

PUBLICATIONS

4%

STUDENT PAPERS

PRIMARY SOURCES

1

Submitted to Hacettepe University

Student Paper

2%

2

Yu Shi, Peng Ye, Xinghua Long. "Differential Expression Profiles of the Transcriptome in Breast Cancer Cell Lines Revealed by Next Generation Sequencing", Cellular Physiology and Biochemistry, 2017

Publication

1%

3

duepublico.uni-duisburg-essen.de

Internet Source

1%

4

Antonietta Tarallo, Annamaria Carissimo, Francesca Gatto, Edoardo Nusco et al. "microRNAs as biomarkers in Pompe disease", Genetics in Medicine, 2018

Publication

1%

5

Douglas F. Dluzen, Nicole Noren Hooten, Michele K. Evans. "Extracellular RNA in aging", Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA, 2017

<1%

EK-3. Dijital Makbuz



Digital Receipt

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

The first page of your submissions is displayed below.

Submission author: Zeynep Tavukcuoglu
Assignment title: Tez
Submission title: Ailevi Akdeniz Ateşi (AAA) Hastalığ...
File name: ZEYNEP_TAVUKCUOGLU_TEZ_0...
File size: 16.67M
Page count: 87
Word count: 4,438
Character count: 21,453
Submission date: 05-Dec-2018 03:55PM (UTC+0300)
Submission ID: 1051107797



9. ÖZGEÇMİŞ

I- Bireysel Bilgiler

Adı-Soyadı: Zeynep TAVUKÇUOĞLU

Doğum Yeri ve Tarihi: Bursa / 09.11.1993

Uyruğu: T.C.

İletişim Adresi ve Telefonu: Ahmet Yesevi Mah. Isırgan Sk. Geçitpark Sit. A/25

Nilüfer/BURSA +90 541 200 37 13

II- Eğitim Bilgileri

2016 – Yüksek Lisans, Tıbbi Biyoloji Ana Bilim Dalı

Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Ankara

2011 – 2016 Lisans, Biyolojik Bilimler Bölümü

Orta Doğu Teknik Üniversitesi, Ankara

III- Bilimsel Faaliyetler

Ekim 2016- Kasım 2018 Tübitak Projesi : “Otoinflamatuvar Hastalıklarda (Tanımlanmış ve Tanımlanmamış) Kişiselleştirilmiş Moleküler Tıp İçin Klinik ve Deneysel Çalışma: Modifiye edici (‘Modifier’) Faktörlerin Rolü” (315S096) – Yardımcı Araştırmacı

Aralık 2017 – Aralık 2018 Hacettepe Üniversitesi BAP Projesi “Ailevi Akdeniz Ateşi (AAA) Hastalığında Belirlenen Aday miRNA’ların Dolaşımdaki Varlığının Eksozomlar Üzerinden Araştırılması” (16316) - Yardımcı araştırmacı

Kasım 2016 – Kasım 2017 – Tübitak Projesi "Ailevi Akdeniz ateşi patogeneğinde *MEFV* gen ifadesinin düzenlenmesinde rol oynayan miRNA’ların belirlenmesi" (214S106)- Proje Bursiyeri

Şubat 2016- Temmuz 2016- ERASMUS Programı

University of Chemistry and Technology, Prag, ÇEKYA

Haziran 2015- Ağustos 2015 – Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji
ABD - Stajyer

IV- Akademik Yayınlar

Tavukçuoğlu Z, Balcı Peynircioğlu B. Enfeksiyon Hastalıklarında, Tanı ve Tedavi Yaklaşımları Açısından Eksozomlar. Yılmaz N, editör. Enfeksiyon Hastalıklarının Patogenezi ve Tanısında Eksozomların Rolü: Tanı Ve Tedavide Yeni Yaklaşımlar. Ankara: Türkiye Klinikleri; 2018. p. 33-9.

Zeynep Tavukcuoglu, Yeliz Z. Akkaya-Ulum, Nilgun Yersal, Tayfun Hilmi Akbaba, Utku Horzum, Gunes Esendagli, Petek Korkusuz, Banu Balci-Peynircioglu, “Characterization of Circulating Exosomes and Analysis of Exosomal microRNAs”, MolBiyKon 2018, İzmir, Turkey. 5-8 Eylül 2018 (Poster)

Zeynep Tavukcuoglu, Yeliz Z. Akkaya-Ulum, Nilgun Yersal, Tayfun Hilmi Akbaba, Gozde Kubra Yardimci, Omer Karadag, Petek Korkusuz, Banu Balci-Peynircioglu, “The Existence Of Exosomal miRNAs In The Circulation In Familial Mediterranean Fever (FMF) Patients”, EMBL Sempozyumu “The Complex Life of RNA”, Heidelberg, Almanya. 3 - 6 Ekim 2018 (Poster)

Akkaya Ulum Z.Y., Akbaba T.H., **Tavukçuoğlu Z.**, Özen S., Peynircioğlu B., "miRNAs as Possible Modulators in the Pathogenesis of Systemic Auto Inflammatory Diseases", 3rd Danube Conference on Epigenetics - FEBS 2018, Budapeşte, Macaristan, 9-12 Ekim 2018, pp.52-52 (Poster)