

**VİTİLİGO HASTALARINDA MELANOGENEZ İLE İLİŞKİLİ BAZI
miRNA EKSPRESYON DÜZEYLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

DOKTORA TEZİ

ARŞ. GÖR. GURBET DOĞRU ÖZDEMİR

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

**TIBBİ BİYOLOJİ
ANABİLİM DALI**

**MERSİN
ARALIK 2018**

**VİTİLİGO HASTALARINDA MELANOGENEZ İLE İLİŞKİLİ BAZI
MİRNA EKSPRESYON DÜZEYLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

DOKTORA TEZİ

ARŞ. GÖR. GURBET DOĞRU ÖZDEMİR

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

**TIBBİ BİYOLOJİ
ANABİLİM DALI**

Danışman

Doç. Dr. Özlem İZCİ AY

**MERSİN
ARALIK 2018**

ONAY

Gurbet DOĞRU ÖZDEMİR tarafından Doç. Dr. Özlem İZCİ AY danışmanlığında "Viteligo Hastalarında Melanogenez ile ilişkili bazı miRNA Ekspresyon Düzeylerinin Araştırılması" başlıklı bu çalışmada aşağıda imzaları bulunan jüri üyeleri tarafından oy birliği ile Doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

Görevi	Ünvanı, Adı ve Soyadı	İmza
Başkan	Prof. Dr. Mehmet Emin ERDAL	
Üye	Prof. Dr. Davut ALPTEKİN	
Üye	Prof. Dr. H. Ümit LÜLEYAP	
Üye	Prof. Dr. İbrahim Ömer BARLAS	
Üye	Doç. Dr. Özlem İZCİ AY	

Yukarıdaki jüri kararı Sağlık Bilimleri Enstitüsünün 08.01.2019 tarih ve 2019/10 sayılı kararıyla onaylanmıştır.



Bu tezde kullanılan özgün bilgiler, şekil, tablo ve fotoğraflardan kaynak göstermeden alıntı yapmak 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunu hükümlerine aykırıdır.

ETİK BEYAN

Mersin Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim Yönetmeliğinde belirtilen kurallara uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada,

- Tez içindeki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Görsel, işitsel ve yaz tüm bilgi ve sonuçlar bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Baskılanın eserlerinden yararlanılması durumunda ilgili eserlere bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu,
- Atıfta bulunduğum eserlerin tümünü kaynak olarak kullandığımı,
- Kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı,
- Bu tezin herhangi bir bölümünü Mersin Üniversitesi veya başka bir üniversitede başka bir tez çalışması olarak sunmadığımı,
- Tezin tüm telif haklarını Mersin Üniversitesi'nce devrettiğimi beyan ederim.

ETHICAL DECLARATION

This thesis is prepared in accordance with the rules specified in Mersin University Graduate Education Regulation and I declare to comply with the following conditions:

- I have obtained all the information and the documents of the thesis in accordance with the academic rules.
- I presented all the visual, auditory and written information and results in accordance with scientific ethics.
- I refer in accordance with the norms of scientific works about the case of exploitation of others' works. I used all of the referred works as the references.
- I did not do any tampering in the used data.
- I did not present any part of this thesis another thesis at Mersin University or another university.
- I transfer all copyrights of this thesis to the Mersin University.

18 Aralık 2018/ December 18th,2018

İmza

Gurbet DOĞRU ÖZDEMİR

ÖZET

Vitiligo Hastalarında Melanogenez ile ilişkili bazı miRNA Ekspresyon Düzeylerinin Araştırılması

Vitiligo, epidermisten melanositlerin kaybı ile karakterize edilmiş, kronik, depigmente bir hastalıktır. Genel populasyonun yaklaşık %0,5-1'inde görülmektedir. Kadınlar ve erkekler hastalıktan eşit olarak etkilenmekte ve hastalık her yaşta gelişebilmektedir. Hastalığın etiyolojisi tam olarak bilinmemektedir. Fakat hastalığın temel patogenezi olan melanositlerin kaybını açıklamak üzere ortaya farklı hipotezler sürülmüştür. Otoimmün teori, vitiligonun patogeneziyi açıklayan en güçlü teoridir. miRNA'lar, hedef mRNA'ların translasyonel inhibisyonunu ve transkripsiyonel degradasyonunu sağlayan kodlamayan RNA'ların bir sınıfıdır. Birçok araştırma, miRNA'ların deri hastalıkları dahil olmak üzere çeşitli insan hastalıklarının patogeneziinde ayrıca doğuştan gelen ve adaptif bağışıklık sisteminin düzenlenmesi dahil olmak üzere birçok fizyolojik ve patolojik hücrel süreçte önemli rol oynadığı gösterilmiştir. Bu nedenle deri hastalıklarının patogeneziine katılan miRNA moleküllerinin klinik olarak tanı ve tedavide hem de tıroptik ajanlar ve biyobelirteç olabilmeleri bakımından ilgi çekicidir. Çalışmaya Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Dermatoloji Anabilim Dalı'nda vitiligo tanısı alan 56 hasta dahil edildi. Lezyonların Wood ışığı incelemesi ile vitiligo tanısı kesinleştirildi. Çalışmaya kontrol grubu olarak 56 birey dahil edildi. Bu çalışmada melanogenez yolağında görevli genleri hedefleyen 8 miRNA molekülünün (hsa-miR-3163, hsa-miR-6783-3p, hsa-miR-1343-3, hsa-miR-4696, hsa-miR-5197-3p, hsa-miR-3680-3p) ekspresyon düzeyleri hasta ve kontrol bireylerin kan örneklerinden belirlendi. Seçilen miRNA'lar, Real-time PCR'da karşılaştırmalı $\Delta\Delta CT$ yöntemi kullanılarak analiz edildi. Moleküler analizden elde edilen veriler *Mann-Whitney U* ve *Kruskal-Wallis* testleri kullanılarak istatistiksel olarak değerlendirildi. Değerlendirme sonucunda hasta ve kontrol bireyler arasında hsa-miR-4495 ve hsa-miR-6824 genlerinin ekspresyon düzeyleri bakımından istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulundu. Bu veriler, *BCL2* genini hedefleyen hsa-miR-4495'i ve *TYR* genini hedefleyen hsa-miR-6824'ün vitiligo patogeneziinde rol oynayabileceğini göstermektedir.

Anahtar kelimeler: Vitiligo, Real-time PCR, miRNA ekspresyonu, melanogenez, TYR, BCL2

Danışman: Doç. Dr. Özlem İZCİ AY, Mersin Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, Mersin.

ABSTRACT

Investigation of some miRNA Expression Levels Associated with Melanogenesis in Vitiligo Patients

Vitiligo is an acquired chronic, depigmenting disorder characterized by the loss of melanocytes from the epidermis. It affects about 0,5-1% of the general population. Males and females are equally affected and it can develop at any age. The etiology of the disease is still not clear. Different hypotheses are concerning to explain this melanocyte activity loss. Autoimmune theory is the strongest theory in explaining the pathogenesis of the vitiligo. miRNAs are a class of noncoding small RNAs that provide translational inhibition and posttranscriptional degradation of target mRNAs. A lot of researches have paid attention to the possibility that miRNAs play a role in the pathogenesis of various human disorders including skin diseases and have a major impact on several physiological and pathological cellular processes including modulation of the innate and the adaptive immune system. Accordingly, there is emerging evidence for the clinical potential of miRNAs as both biomarkers and possible therapeutic targets in skin diseases. In this study 56 patients diagnosed as vitiligo in the Department of Dermatology, Mersin University Faculty of Medicine were included in the study. After a detailed history and a careful physical examination of each patient involved in the study, the diagnose was confirmed by a Wood lamp examination. 56 individuals were included in the study as a control group. In this study, the expression levels of 8 candidate miRNAs (hsa-miR-3163, hsa-miR-6783-3p, hsa-miR-1343-3, hsa-miR-4696, hsa-miR-5197-3p, hsa-miR-3680-3p) targeted genes playing role melanogenesis pathway in blood samples of vitiligo patients were determined. Selected miRNAs were analyzed by using comparative $\Delta\Delta CT$ method in Real-Time PCR. Data obtained from molecular analyze were statistically evaluated by using *Mann-Whitney U test and Kruskal-Wallis test*. As a result of the evaluation, there was a statistically significant relationship between the expression levels of hsa-miR-4495 and hsa-miR-6824 genes between vitiligo patients and controls ($p < 0.05$). These data show that hsa-miR-6824 targeting the *TYR* gene and hsa-miR-4495 targeting *BCL2* gene may play a role in the pathogenesis of vitiligo.

Key Words: Vitiligo, melanogenesis, miRNA expression, Real-Time PCR, TYR, BCL2

Advisor: Assoc. Prof. Ozlem IZCI AY, Mersin University, Medical Faculty, Medical Biology Department, Mersin.

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim boyunca, bilgi ve deneyimlerini paylaşarak akademik anlamda yetişmemde büyük katkısı olan ve her anlamda desteğini benden esirgemeyen, bilgi birikimimi artıran, karşılaştığım zorluklar karşısında başa çıkmamda yardımcı olan, asistanı olmaktan büyük onur duyduğum danışman hocam sevgili Doç.Dr. Özlem İZCİ AY'a sabrı ve anlayışı için teşekkür ederim.

Doktora tez çalışmamın tüm aşamalarında karşılaştığım zorluklarda benden akademik desteğini esirgemeyen, Anabilim Dalı Başkanımız, Prof. Dr. M. Emin ERDAL'a teşekkür ederim. Anabilim dalımızın değerli hocaları; Prof. Dr. İ. Ömer BARLAS'a, Dr.Öğr. Üyesi Mustafa Ertan AY'a doktora eğitimim boyunca yaptıkları akademik katkılarından dolayı teşekkür ederim. Ayrıca tez izleme komitemde yer alan ve fikirleriyle tezime katkı sunan Prof. Dr. Yasemin KAÇAR'a teşekkür ederim.

Tezimde yer alan hasta ve kontrol gruplarının oluşturularak periferik kan örneklerinin toplanmasında çalışmamıza destek veren ME. Ü. Tıp Fakültesi Dermatoloji Ana Bilim Dalı'nda görev yapmakta olan Prof. Dr. Ümit TURSEN'e, tezimin istatistikleri ve bulguların değerlendirilmesi konusundaki yardımlarından dolayı Biyoistatistik Anabilim Dalı Arş. Gör. Merve TÜRKEGÜN'e teşekkür ederim.

Akademik eğitimime ilk başladığım günden beri, desteğini benden esirgemeyen, hayatımı birleştirmekten onur duyduğum sevgili eşim Özden ÖZDEMİR ve Aileme gösterdikleri sevgi ve anlayış için teşekkür ediyorum.

Doktora tez çalışmam, Mersin Üniversitesi Rektörlüğü Bilimsel Araştırma Projeler Birimi tarafından **2012-TP3-1204** kodlu proje olarak desteklenmiştir. İlgilerinden dolayı teşekkür ederim.

ONAY.....	ii
ETİK BEYAN.....	iii
ÖZET.....	iv
ABSTRACT.....	v
TEŞEKKÜR.....	vi
İÇİNDEKİLER.....	vii
TABLOLAR DİZİNİ.....	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	x
KISALTMALAR ve SİMGELER.....	xii
1. GİRİŞ.....	1
2. KAYNAK ARAŞTIRMALARI.....	4
2.1.Tarihçe.....	5
2.2. Vitiligo Hastalığının Epidemiyolojisi.....	5
2.3. Vitiligo Hastalığının Sınıflandırması.....	6
2.3.1. Segmental olmayan vitiligo (Non segmental vitiligo-NSV).....	7
2.3.2. Segmental vitiligo (SV).....	10
2.3.3. Nordlund'a göre Vitiligo Hastalığının Sınıflandırılması.....	10
2.3.4. Koga Sınıflandırmasına göre Vitiligo.....	11
2.4. Epidermisin Yapısı ve İşlevi.....	11
2.5. Melanozom Organelleri.....	12
2.6. Melanosit kök hücre (McSC)'ler ve Lokalizasyonu.....	13
2.7. Melaninlerin Keşfi ve Yapısı.....	14
2.8. Melaninlerin Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri.....	15
2.9. Melanosit Oluşum Mekanizması (Melanogenez).....	18
2.10. Moleküler Melanogenez Mekanizması.....	22
2.11.Vitiligo Hastalığının Etiyopatogenezi.....	28
2.11.1. Otoimmün Hipotez.....	28
2.11.2. Adezyon Defekt Hipotezi.....	32
2.11.3. Biyokimyasal Hipotez.....	34
2.12. Vitiligo Hastalığı ve Genetik Çalışmalar.....	37
2.13. Mikro RNA (miRNA).....	42
2.13.1. Mikro RNA'ların isimlendirilmesi.....	44
2.13.2. Mikro RNA (miRNA)'ların Biyogenezi.....	44
2.13.2.1. Klasik miRNA Biyogenez Yolu.....	44
2.13.2.2. Klasik olmayan miRNA Biyogenez Yolu.....	46
2.13.2.3.miRNA'ların Deri Hastalıklarıyla İlişkisi.....	47
3. MATERYAL ve YÖNTEM.....	50
3.1. Kullanılan Araçlar- Gereçler, Kimyasallar ve Sarf Malzemeler.....	50
3.1.1. Kullanılan Araç ve Gereçler.....	50
3.1.2. Kullanılan Kimyasallar ve Sarf Malzemeler.....	51
3.2. Hasta ve Kontrol Gruplarının Oluşturulması.....	51
3.3. Periferik Kandan RNA Eldesi.....	52
3.4. Ekspresyon Analizi Yapılacak Vitiligo Hastalığı ile İlişkili miRNA 'ların Seçilmesi.....	52
3.5. Real-Time PCR ile Mikro RNA Ekspresyon Analizine Yönelik Primer ve Prob Dizaynı.....	53
3.6. RNA ürünlerinden cDNA Eldesi.....	57
3.6.1. Real-Time PCR ile Ekspresyon Analizi.....	58
3.6.2. PCR Ürünlerinin Saptanması.....	58
3.6.3. Veri Analizi.....	59
3.7. İstatistiksel Analiz.....	60
4. BULGULAR ve TARTIŞMA.....	61

4.1. Hasta- Kontrol Grubunun Yaş ve Cinsiyet bakımından Değerlendirilmesi.....	61
4.1.1. Hasta Grubu	61
4.1.2. Kontrol Grubu	61
4.2. Hasta ve Kontrol gruplarının Ekspresyon Verilerinin Analizi.....	62
4.2.1. hsa-miR-3163 Ekspresyonunun Değerlendirilmesi	64
4.2.2. hsa-miR-6783 Ekspresyonunun Değerlendirilmesi	65
4.2.3. hsa-miR-1343-3p Ekspresyonunun Değerlendirilmesi.....	66
4.2.4. hsa-miR-4696 Ekspresyonunun Değerlendirilmesi	66
4.2.5. hsa-miR-6824 Ekspresyonunun Değerlendirilmesi	67
4.2.6. hsa-miR-5197-3p Ekspresyonunun Değerlendirilmesi.....	68
4.2.7. hsa-miR-4495 Ekspresyonunun Değerlendirilmesi	68
4.2.8. hsa-miR-3680 Ekspresyonunun Değerlendirilmesi	69
5. SONUÇ ve ÖNERİLER.....	85
KAYNAKLAR	87
ÖZGEÇMİŞ.....	97



Tablo 2.1. Vitiligo'nun sınıflandırılması.....	7
Tablo 2.2. Memelilerde melanogenez mekanizmasının basamakları	20
Tablo 2.3. GWAS ve Bağlantı Analizleri ile belirlenmiş vitiligoya yatkınlık lokusları	40
Tablo 3.1. Vitiligo hastalığında melanogenezde kritik rollere sahip genler ve bu genleri en yüksek skorlara hedefleyen miRNA'lar.....	53
Tablo 3.2. miRNA RT-PCR (Reverse Transcription PCR) ve Real-Time PCR primer prob dizileri	56
Tablo 4.1. Hasta ve kontrol grubundaki kadın ve erkek bireylerin yaş ortalaması	61
Tablo 4.2. Hasta ve kontrol gruplarının cinsiyet bakımından değerlendirilmesi	62
Tablo 4.3. Hasta ve kontrol gruplarına göre ilgili miRNA'ların ekspresyon düzeyleri ($2^{-\Delta\Delta CT}$), minimum, maksimum ve p değerleri	63

Şekil 2.1. Non segmental Vitiligo ve çeşitleri	9
Şekil 2.2. Segmental Vitiligo ve çeşitleri.	10
Şekil 2.3. Keratinositlerin ve melanositlerin yapısal ilişkisi.	12
Şekil 2.4. Farklı etnik gruplarda melanozom yapısı ve dağılımı.....	13
Şekil 2.5. Melanin pigment sentezi	16
Şekil 2.6: Melanozom organelinde Feomelanin ve ömelaninin oluşumu	18
Şekil 2.7: Tirozinazın yapısı.....	19
Şekil 2.8. Melanin pigmentinin yaygın biyosentez yolağı.....	21
Şekil 2.9. Melanogenez mekanizmasının sinyal yolağı anahtar moleküllerin şematik gösterimi	23
Şekil 2.10. Vitiligo hastalarında otoimmün hastalıklar	30
Şekil 2.11. Vitiligoda melanosit yıkımında düzenleyici T hücrelerinin rolü.....	31
Şekil 2.12. Bazal membran üzerindeki epidermis ve dermis tabakaları arasında lokalize olan melanositler	33
Şekil 2.13. Melanin sentez yolağında çeşitli basamaklarla reaktif oksijen türlerinin (ROS) oluşumu	35
Şekil 2.14. Minör yaralanma sonrası NSV vitiligo patogenezi.....	37
Şekil 2.15. Vitiligo patogenezinde genlerin, çevrenin ve bağışıklık sisteminin etkileşimi	38
Şekil 2.16. MikroRNA'ların genomik lokalizasyonu	43
Şekil 2.17. miRNA biyogenezinin kanonik yolunun şematik gösterimi	46
Şekil 2.18. İnflamatuvar cilt hastalıklarının patogenezinde rol oynayan deregüle miRNA'lar ...	49
Şekil 3.1. Kök-halka yapısındaki pri-miRNA dizileri üzerinde yerleşik olgun miRNA dizileri ...	54
Şekil 3.2. Real Time PCR'da endojen kontrol olarak kullanılan hsa-miR-26b-5p ekspresyon eğrisi	60
Şekil 4.1. Hasta ve Kontrol gruplarına ait hsa-miR-3163, hsa-miR-6783-3p, hsa-miR-1343-3p, hsa-miR-4696, hsa-miR-6824, hsa-miR-5197-3p, hsa-miR-4495 ve hsa-miR-3680-3p'nin ekspresyon düzeylerinin grafiksel gösterimi	64
Şekil 4.2: Hasta ve Kontrol grubunun hsa-miR-3163'e ait ekspresyon düzeyinin grafiksel gösterimi	65
Şekil 4.3: Hasta ve Kontrol grubunun hsa-miR-6783-3p'ye ait ekspresyon düzeyinin grafiksel gösterimi	65
Şekil 4.4. Hasta ve Kontrol grubunun hsa-miR-1343-3p'ye ait ekspresyon düzey grafiği düzeyinin grafiksel gösterimi	66

Şekil 4.5. Hasta ve Kontrol grubunun hsa-miR-4696'ya ait ekspresyon düzeyinin grafiksel gösterimi	67
Şekil 4.6. Hasta ve Kontrol grubunun hsa-miR-6824'e ait ekspresyon düzeyinin grafiksel gösterimi	67
Şekil 4.7. Hasta ve Kontrol grubunun hsa-miR-5197-3p'ye ait ekspresyon düzeyinin grafiksel gösterimi	68
Şekil 4.8. Hasta ve Kontrol grubunun hsa-miR-4495-3p'ye ait ekspresyon düzeyinin grafiksel gösterimi	69
Şekil 4.9. Hasta ve Kontrol grubunun hsa-miR-3680-3p'ye ait ekspresyon düzeyinin grafiksel gösterimi	69



KISALTMALAR ve SİMGELER

ACD	Alerjik Kontakt Dermatit
ACTH	Adrenokortikotropik hormon
AD	Atopik Dermatit
AGO	Argounate Protein
AGRP	Agouti ilişkili protein
APC	Antijen sunan hücreler
ASIP	Agouti sinyal protein
BCL2	B-hücre Lenfoma 2
BFGF	Bazik fibroblast büyüme faktörü
Cdk4	Siklin Bağımlı Kinaz 4
Cdk6	Siklin Bağımlı Kinaz 6
COMT	Katekol-O-Metil Transferaz
CREB	CAMP Cevap Element Bağlayıcı Protein
CTGF	Bağ Dokusu Büyüme Faktörü
CSA	Kompleks segregasyon analizleri
CTCL	Kutanöz T hücre Lenfoma
Cyr61	Sistein bakımından zengin protein 61
CXCL10	C-X-C Motif kemokin ligand 10
DCT	Dopakrom tautomeraz
DDR1	Diskoidin Domain Reseptör Tirozin Kinaz 1
DGCR8	Di George Syndrome Critical Region Gene 8
DHI	Dihidroksiindol
DHICA	Dihidroksiindol karboksilik asit
DKK1	Dikkopf 1 WNT Sinyal Yolak İnhibitörü
DNA	Deoksiribonükleik Asit
EDN1	Endotelin 1
EPR	Elektron paramanyetik rezonans
EZR	Ezrin
G6PD	Glukoz-6-Fosfat Dehidrojenaz
HLA	İnsan Lökosit Antijen
H ₂ O ₂	Hidrojen peroksit
Hsp 70	Isı şok proteini 70
ICAM-1	İntrasellüler adezyon molekülü-1
IFITM1	İnterferon indüklü transmembran Protein 1

IFN- γ	İnterferon gama
IL-1	İnterlökin-1
IL1 β	İnterlökin 1 Beta
IL20RB	İnterlökin 20 reseptör alt ünite beta
IL22RA2	İnterlökin 22 reseptör alt ünite 2
IRF1	İnterferon düzenleyici faktör 1
LAMP-1	Lizozom İlişkili Membran Proteini-1
L-DOPA	L-Dihidroksifenilalanine
LEF1	Lenfoid Enhancer Bağlayıcı Faktör 1
MAO-A	Monoamin oksidaz A
MAPK	Mitojen ile aktive edilmiş protein kinaz
MART1	T hücrelerince tanınan melanom anijen 1
MC1R	Melanokortin 1 reseptörü
McSC	Melanosit kök hücreler
MDM1	Mdm1 Nüklear Protein
MITF	Mikroftalmi ile ilişkili transkripsiyon faktörü
MHC I	Major Histocompatibility Kompleks I
MHC II	Major Histocompatibility Kompleks II
miRNA	Mikro RNA
mRNA	Messenger RNA
MRP	Melanogenez ilişkili protein
MSH	Melanosit Uyarıcı Hormon
NADPH	Nükleotid Adenin Dinükleotit Fosfat Hidrojenaz
NALP1	NLR Ailesi Pirin Domaini İçeren Gen 1
NK	Doğal katil hücreler
NLRP1	NLR ailesi Pirin domain içeren molekül 1
NOS	Nitrik oksit sentaz
NOV	Nefroblastoma geni
NSV	Non Segmental Vitiligo
OCA3	Okülokütan albinizm tip 3
PAX3	Paired Box 3
PDGFRA	Trombosit kökenli büyüme faktör reseptörü alfa-poliipeptid
PKC-b	Protein kinaz C-b
Pmel17	Premelanozomal protein 17
POMC	Pro-opiomelanokortin
POLH	DNA Polimeraz Eta

PTPN22	Protein Tirozin fosfataz Reseptör olmayan Tip 22
PUVA	Psoralen ve UVA
Rab7	Ras onkogen aile üyesi 7
ROS	Reaktif Oksijen Türleri
SCF	Kök hücre faktörü
SDC	Sindekan Bağlayıcı Protein
SERP1	Stres ilişkili Endoplazmik Retikulum Protein 1
SIRT1	Sirtuin 1
SOCS1	Sitokin sinyal iletimi baskılayıcısı 1
SOD	Süperoksit dismutaz
SOX10	Sry ilişkili <i>HMG-Box</i> 10
SV	Segmental Vitiligo
TARBP2	Trans-Activation Responsive RNA Binding Protein 2
TFEB	E kutu transkripsiyon faktörü
TFEC	EC transkripsiyon faktörü
TGF	Transforme büyüme faktörü
TGFβ1	Transforme büyüme faktörü β1
TLR	Toll-Like Reseptör
TNF	Tümör nekroz faktör
TRBP	TAR RNA bağlayıcı protein
TRPM1	Geçici Reseptör Potansiyel Katyon Kanal alt aile M Üyesi 1
TYR	Tirozinaz
TYRP1	Tirozinaz ilişkili Protein 1
TYRP2	Tirozinaz ilişkili Protein 2
RISC	RNA-indüklü sessizleştirme kompleksi
RPE	Retinal pigment epitel hücreleri
USF1	Upstream Transkripsiyon Faktörü 1
3'-UTR	3'-Translasyonu Yapılmayan Bölge
UV	Ultraviyole
VARP	Ankirin-tekrar-içeren protein
VCAM-1	Vasküler adezyon molekülü-1
XPO5	Eksportin 5
°C	Santigrat derece
μg	Mikrogram
μl	Mikrolitre
ng	Nanogram

1. GİRİŞ

Vitiligo, klinik olarak epidermal melanositlerin kaybından dolayı deride beyaz lekelerle karakterize edinsel bir cilt hastalığıdır. Dünya nüfusunda yaklaşık %0,5-1'lik bir prevalansa sahiptir. Vitiligolu hastaların yaklaşık yarısında hastalık 20 yaşından önce ortaya çıkabilmektedir. Her iki cinsiyet de hastalıktan eşit olarak etkilenmekte ve hastalığın cilt tipine veya ırkına göre görülme oranlarında belirgin bir farklılık olmamaktadır. Deri ve saç foliküllerinin depigmentasyonu, vitiligonun klinik ayırt edici özelliğidir. Hastalık genellikle zaman içinde sayı ve boyut olarak artan beyaz, simetrik yama şeklindeki lekeler ile sonuçlanır. Lekeler genellikle yüz ve ekstremiteler gibi görünen vücut bölgelerinde görülür. Vitiligo'nun klinik formları segmental vitiligo (SV) ve segmental olmayan (Non Segmental Vitiligo-NSV) olmak üzere iki ana alt tipte sınıflandırılmaktadır. NSV lezyonların bilateral dağılımıyla karakterize iken SV genellikle unilateral-vücudun bir tek bölgesini içerir. NSV, hastalığın en yaygın şeklidir (vakaların %85 ila %90'ını oluşturur). NSV lezyonları sıklıkla vücudun her iki tarafında görülür, simetrik ve genellikle ilerler. NSV'nin bir özelliği, Köbner fenomeni olarak adlandırılan, travmatize olmuş ciltte vitiligo gelişmesidir ki bu durum hastalık aktivitesini değerlendirmek için değerli bir klinik faktördür. Ciltteki tutulumun yanı sıra, saç tutulumu sonraki aşamalarda ortaya çıkabilmektedir. NSV çocukluk döneminde başlayabilir, ancak çocukluk çağından sonraki dönemde hastalığın başlangıcı daha yaygın görülmektedir. SV'da lezyonların tek taraflı tutulumu vardır ve bir veya birkaç dermatomla eşleştiği düşünülen (bir spinal veya kranyal sinirde duyu lifleri tarafından sinir sistemine bağlanan cilt bölgeleri) veya "Blaschko" çizgilerinin (cildin hücresel bileşenlerinin dorso-ventral embriyonik gelişimini takip eden çizgiler) belirlediği alanlara karşılık gelen bir dağılım paterni gösterir. SV genellikle çocukluk çağında başlar. Hızlı bir başlangıcı vardır ancak genellikle 1-2 yıl sonra stabilize olur. SV'de lezyonlar genellikle yüz bölgesinde görülür. Lökotriki (*Leukotrichia*-saçın pigment kaybından dolayı meydana gelen beyazlık) de genellikle vitiligo başlangıcından hemen sonra ortaya çıkar (1,2). Vitiligo, genetik ve çevresel faktörler ile metabolik ve immün değişikliklerle birlikte patogenezi tam olarak anlaşılamamış kompleks bir hastalıktır. Günümüzde hala vitiligonun kesin etiyolojisi belirsiz kalmaktadır, ancak enfeksiyonlar, stres, nöral anormallikler, melatonin reseptör disfonksiyonu, bozulmuş melanosit migrasyonu ve genetik yatkınlık dahil olmak üzere hastalığın gelişiminde birçok faktör rol oynamaktadır. Defektli melanosit rejenerasyonuna ve/veya proliferasyona yol açan anormallikler primer hasarın melanositlerde meydana geldiğini göstermektedir. Bununla birlikte, sessiz inflamasyon ve hücre ile humoral bağışıklığın içinde olduğu otoimmüitenin, özellikle hastalığın ilerleyici fazı sırasında önemli bir rolünün olduğu gösterilmiştir. İmmün ve immün olmayan mekanizmaların bu kompleks hastalığın patogenezi tam olarak açıklayamadığından genetik yatkınlığı olan hastalarda biyokimyasal, çevresel ve immünolojik faktörlerin ve bu faktörlerin yer

aldığı mekanizmaların kombinasyonuyla vitiligo patofizyolojisini açıklayabileceği önerilmiştir. Vitiligo patogenezinde immün cevabın rolü, hastalığın tedavisinde mevcut ilaç geliştirmeyele ilgili terapötik etkileri nedeniyle özellikle vurgulanmaktadır (3, 4).

MikroRNA'lar (miRNA), keşfedildiklerinde fonksiyonları tam olarak bilinmeyen 19-22 veya 19-24 nükleotidlik kodlanmayan RNA molekülleridir. miRNA'lar protein kodlayıcı genlerin ekspresyonunu post-transkripsiyonel düzeyde, mesajcı RNA (mRNA) destabilizasyonu veya translasyonel baskılama ile veya her iki mekanizmanın bir kombinasyonunu yönlendirerek düzenleyen küçük kodlayıcı olmayan RNA'lardır. miRNA'lar gen ekspresyonunu kontrolünü hedef mRNA'nın komplementer dizilerinin 3' transle-edilmeyen bölgelerine (3' *Untranslated region*-UTR) bağlanarak düzenlerler. miRNA'ların ve bunların hedef mRNA'larının etkileşimi, esas olarak miRNA "seed" (öz) olarak adlandırılan miRNA'nın 5' bölgesindeki 2 ila 7 nükleotidlik bölge aracılığıyla gerçekleşir. miRNA'lar, bir hücre tipi içinde aynı anda yüzlerce hedef mRNA'yı baskılayarak biyolojik fonksiyonları düzenleyebilirler. İnsanlardaki genlerin %30'undan fazlası miRNA'lar tarafından düzenlenmektedir. Gen ekspresyonunun düzenlenmesi yoluyla, miRNA'lar farklılaşma, proliferasyon, organ gelişimi, apoptoz, stres, sinyal iletimi, karsinogenez dahil olmak üzere birçok biyolojik süreçte yer alır. miRNA'ların ekspresyon düzeylerindeki değişiklikler, başta birçok kanser türünde olmak üzere; psoriasis ve romatoid artrit gibi inflamatuvar ve immünolojik bozukluklar dahil çeşitli birçok hastalığın patogenezinde rol oynadığı gösterilmiştir. Bu nedenle miRNA'lar, tanı ve tedavide önemli potansiyel hedefleri temsil eder. Son zamanlarda yapılan birçok çalışma miRNA moleküllerinin cildin morfogenezini ve homeostazını düzenlediğini ve miRNA dereglasyonunun çeşitli cilt hastalıklarıyla ilişkili, hatta hastalığa neden olduklarını göstermiştir. Profillemeye çalışmaları, fizyolojik (örneğin keratinosit farklılaşması) ve patolojik süreçlerle (örneğin psoriasis, melanoma) ilişkili farklı şekilde düzenlenmiş miRNA'lar belirlemiştir. Bu veriler daha ileri çalışmalar için önemli bir potansiyele sahiptir. Cildin kolay erişilebilir olmasından dolayı, miRNA aktivitesini taklit eden veya düzenleyen maddelerin topikal olarak verilmesine yönelik etkili ve güvenli tedavi yöntemleri ortaya çıktığında, miRNA bazlı tedavilerin ilk olarak cilt hastalıkları olacağını tahmin etmek zor olmayacaktır (5).

Vitiligo genellikle kozmetik bir problem olarak düşünülse de hastanın psikolojik durumu üzerine olumsuz etkisi göz önünde bulundurulmalıdır. Vitiligo, hastaların yalnızca psikolojik sağlığını değil özellikle kişilerarası sosyal ilişkiler ve düşük yaşam kalitesine neden olmasından dolayı hastalarda derin duygusal sıkıntılara neden olabilmektedir ve bu bakımdan önemli sayılmaktadır. Hastalığın patogenezinde rol oynayan moleküler genetik temelli çalışmalar, hastalığın tanı ve tedavisine yönelik tıropatik çalışmalara katkı sağlaması ve yol gösterici olmasından dolayı çok önemlidir. Gen ifadesinin anahtar düzenleyici molekülleri olan miRNA'ların deri hastalıkları dahil birçok hastalığın tahmininde, tanısında, prognozu ve tedaviye yanıtta bir belirteç olabileceği gösterilmiştir. Bu nedenle bu çalışmadaki amacımız temel klinik

özelliği melanin pigmentlerinin kaybı olan vitiligo hastalığında, melanosit oluşum yolağı olan melanogenez mekanizmasında anahtar rollere sahip genleri hedefleyen miRNA'ların, periferik kan örneklerinden ifade düzeylerinin araştırılmasıdır. Yaptığımız bu çalışmanın miRNA ve deri hastalıklarıyla ilişkisinin araştırıldığı alana katkı sağlayacağını düşünmekteyiz.



2. KAYNAK ARAŞTIRMALARI

Vitiligo, derideki melanositlerin seçici olarak tahrip edilmesiyle sonuçlanan edinsel kronik depigmentasyon hastalığıdır. Celsus, milattan önce (M.Ö.) 2. yüzyılda Latin medikal klasığı *De Medicina*'da vitiligo terimini ilk kez kullanmıştır. Vitiligo hastalığının adının kusur veya leke anlamındaki Latin "*vitium*" kelimesinden veya buzağı anlamına gelen "*vitellus*" kelimesinden türediğine inanılmaktadır. Tipik vitiligo lezyonları, pul pul olmayan farklı büyüklükteki süt beyazı, lekeler olarak tanımlanabilir. 2012 tarihli *Vitiligo Global Issues Consensus Conference*'a göre vitiligo, segmental ve segmental olmayan vitiligo olmak üzere iki ana formda sınıflandırılabilir. Bu öngörülemez hastalığın en yaygın şekli olan segmental olmayan vitiligo (NSV), simetrik ve bilateral beyaz lekelerle karakterizedir. Genelleştirilmiş, akrofasiyal ve evrensel tipler de dahil olmak üzere, hepsi bilateral bir dağılım gösteren farklı klinik alt tipler tarif edilmiştir. Segmental vitiligo (SV) ise segmental olmayan vitiligoya göre daha az görülür ve genellikle vücutta tek taraflı dağılım gösterir (6). Hastalığın tüm tiplerinde genel olarak, deride melanosit kaybından dolayı ciltte ve bazen mukozada beyaz lekeler şeklinde görülen ve hastada bu lezyonların görüldüğü bölgelerden sıklıkla vücudun başka bölgelerine ilerlediği kompleks bir hastalıktır. Sadece ciltte değil melanositleri içeren saç, göz gibi diğer bölge ve internal organlar da etkileyebilmektedir (7).

Vitiligo hastalığının genetik olarak poligenik/multifaktöryel bir şekilde aktarıldığı düşünülmektedir. Hastalığın etiopatogenezi tartışma konusu olup, otoimmün (AI) nedenler, oksidatif stres ve/veya sempatik nörojenik bozuklukların hastalığa neden olabileceği düşünülmektedir. Tiroid disfonksiyonu, artrit, diabetes mellitus, alopesi areata ve romatizmal hastalıklar gibi otoimmünitenin de neden olduğu multifaktöryel hastalıklarla da ilişkili olduğu görülmüştür. Genelleştirilmiş vitiligo, en yaygın klinik tablodur ve genellikle yüz ve akral bölgeleri içerir. Hastalığın seyri önceden tahmin edilemez ve tedaviye verilen cevap değişir *Köbner fenomeni* (travma sonrası hastalığa ait lezyonların ortaya çıkması olayı) yaygındır. Vitiligo, kronik kalıcı bozukluktur; spontan repigmentasyon nadirdir. Birçok hasta, vitiligo hastalığı hakkında yeterli bilgiye sahip olmamakta; yapılan bir anket çalışmasında hastaların %51,3'ünün, vitiligonun kötü tıbbi bakımdan kaynaklandığına, %30'unun kişisel hayat tarzları ve davranışlarının rol oynadığına, %25'inin diyetten, %21,3'nün psikolojik nedenler ve %20'sinin ise kirlilik gibi çevresel koşullardan kaynaklandığına inandıkları saptanmıştır (V3). Bu nedenle hipopigmente lezyonlar hastalar üzerinde sadece fizyolojik-kozmetik etkilere değil, psikososyal etkilere de sahiptir ve hastaların yaşamları üzerinde büyük bir psikosomatik etki oluşturabilmektedir. Vitiligo hastalığının genel toplum üzerinde hastalığı anlama ve hastalığa olan tutumlarının araştırıldığı bir ankette ise; ankete katılanların %33'ü vitiligo'nun bulaşıcı olduğunu ya da bilmediğini göstermiştir. Ayrıca anket sonuçlarına göre vitiligo hastalığının %0,4

oranında bulaşıcı, %40,5 oranında kalıtsal, %41,2 oranında otoimmün ve %22,5 oranında hijyen eksikliğinden kaynaklandığı düşünülmektedir. İngiltere'de hasta destek grubu tarafından gerçekleştirilen büyük çaplı başka bir araştırma, katılımcıların çoğunun vitiligo hakkında tıbbi olmayan kaynaklardan bilgi aldığını göstermiş ve destek grubundan %83, internetten %25 ve sadece %12,5'unun dermatologlardan bilgi aldığını göstermiştir (8).

2.1.Tarihçe

Vitiligoya benzer bir hastalıkla ilgili en eski belgelere M.Ö. 1500'de Hindu kutsal yazıtlarında, "*Kilasa*" adındaki eski Mısır papirüslerinde rastlanmıştır. Bir diğer kaynak olan Leviticus XIII'te, Zoraat veya Tzaraat terimleri kullanılmış bu terimler ise Klasik İbranicede "beyaz lekeler" anlamına gelmekteydi. Ancak bu bahsedilen hastalığın, gerçekten vitiligo olup olmadığı konusu tam olarak bilinmemektedir. Latin bir terim olan "vitiligo" terimi, klasik tez "*De Medicina*" içinde Celsus tarafından ilk yüzyılda kullanılmıştır. Kelimenin latince kökü benzer anlama gelen *Vitellius* ve *vituli* kelimeleri ile beyaz buzağılarda görülen yamalar, akromik, hipokrom lezyonlar ve kusur veya defekt, bozukluk anlamına gelen *vitium* kelimesinden türetilmiştir. On dokuzuncu yüzyılda, Brocq ve Kaposi, lezyonların sınırlarında akromia ve hiperpigmentasyon gibi klinik özellikleri ile histopatolojisini ilk defa tanımlayan kişiler arasındadır. Kaposi, epidermisin bazal tabaka hücrelerinde pigment granüllerinin yokluğunu bildirmiştir (9,10).

2.2. Vitiligo Hastalığının Epidemiyolojisi

Vitiligo en yaygın görülen depigmentasyon hastalığıdır. En büyük epidemiyolojik çalışma, 1977'de Danimarka'da Bornholm adasında yapılmış ve vitiligonun nüfusun %0,3'ünü etkilediği bildirilmiştir. Vitiligo hastalığının dünya genelindeki prevalansı %0,5-1'dir ve Hindistan'da %8,8 gibi yüksek oranlarda da seyredabilmekte, bu nedenle, gerçek oran tam olarak tahmin edilememektedir. Bu yüksek değer, kimyasal olarak indüklenen depigmentasyonlu olguların eklenmesinden veya bu verilerin vitiligolu hastaların prevalansından kaynaklanabileceği düşünülmektedir. Fransız Batı Hint Adalarının siyahi nüfustaki tahmini vitiligo prevalansı, açık tenli insanlar için kabul edilen verilere çok benzer veya biraz daha düşüktür. Genel olarak, en yüksek insidans Hindistan'da (%8,8'e kadar) görülmekte bunu Meksika (%2,6-%4) ve Japonya (%1,68) ülkeleri izlemektedir (6,11). Birçok yayın, en yaygın hipopigmente hastalık olan vitiligo hastalığının dünya çapında %0,5 ila 1 prevalansa sahip olduğuna ilişkin bir tahminde bulunsa da bu tahmin kültürel ve sosyal farklılıklara göre değişebilmektedir. Kültürel ve sosyal nedenlere bağlı olarak hastalığın vücudun görünür bölgelerinde daha fazla lekeler şeklinde olduğu koyu

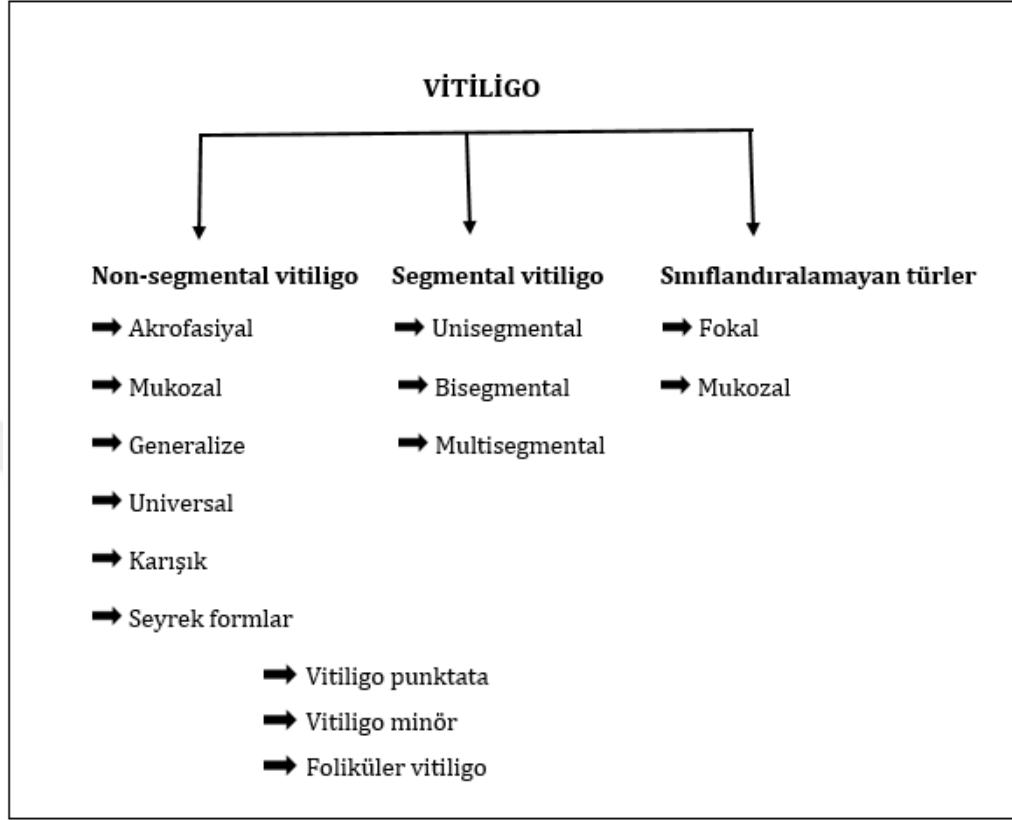
renge sahip bireylerde bu hastalık, açık tenli bireylere göre daha belirgindir. Bu nedenle bu bölgelerde yaşayan koyu tenli hasta bireylerin diğer ülkelere göre doktora başvurma oranları daha yüksektir. Bu nedenle prevalans, tahmin edilen oranlardan daha yüksek bir oranda olabilmektedir. Örneğin hastalığın prevalansının koyu bireylerin çoğunlukta olduğu Hindistan'da %8,8 gibi oranlarda seyrettiği bildirilmiştir (12, 13)

Vitiligo, cilt ve müköz membranlarda edinilmiş bir bozukluk olup, iyi tanımlanmış, melanositlerin seçici tahribinden dolayı sekonder olarak gerçekleşen pigment eksikliği ve lekelerle karakterize bir hastalıktır. Vakalar doğumdan sonraki 6 hafta gibi erken bir tarihte bildirilmiş olup olguların yarısında neredeyse 20 yaşından önce (10-30 yaşları arası) görülmektedir. Hastalık herhangi bir yaşta ortaya çıkabilmekte iken en erken vakalar doğumdan sonraki 6 hafta gibi erken bir tarihte bildirilmiştir. Cinsiyet oranı kadınlar ve erkekler arasında eşit olarak görülmekte; cilt tipine göre ortaya çıkış oranlarında fark bulunmamaktadır. Genellikle asemptomatiktir. Bu hastalık sadece deride lezyonlar şeklinde görülmekte ayrıca genel olarak bağışıklık sistemi ile ilişkili olarak sendromların gelişimini de tetikleme potansiyeline sahiptir (14-16). Hastalığa sahip bireyler ve aileleri, tiroidit, tip 1 diyabet, pernisiyöz anemi, addison hastalığı ve alopesi areata gibi diğer otoimmün hastalıklar için, normal kişilere göre daha yüksek risk altındadır (17,18).

2.3. Vitiligo Hastalığının Sınıflandırması

Vitiligo hastalığının tipik lezyonları farklı büyüklükteki süt beyazı ve pul pul olmayan lekeler olarak tanımlanabilir. 2012'de yapılan Uluslararası *Global Issues Consensus Conference*'a göre vitiligo segmental vitiligo ve segmental olmayan vitiligo olmak üzere iki ana formda sınıflandırılmaktadır yine aynı konferansa göre hastalık çeşitli klinik formlarına göre aşağıdaki kategorilere ayrılabilir (6, 19).

Tablo 2.1: Vitiligo'nun Sınıflandırılması (Vitiligonun Nomenklatürü/Sınıflandırılması: Vitiligo Global Issues Consensus Conference – 2012) (19).



2.3.1. Segmental Olmayan Vitiligo (Non segmental vitiligo-NSV)

Non-Segmental Vitiligo, farklı boyutlardaki depigmente lekelerle karakterizedir. Birkaç santimetre çapında, sıklıkla simetrik dağılım eğilimi ile vücudun her iki tarafını da kapsar. Hastalığın ilerlemesi sırasında, özellikle UV temasından sonra koyu tenli bireylerde hiperpigmente lezyonlu sınırlar görülebilmektedir. Kafa derisi ve diğer saçlı bölgelerin tutulumu gri veya beyaz tüylerle ortaya görülebilmekte fakat segmental vitiligonun aksine, vücut tüyleri genellikle korunurak pigmente kalmaktadır. Saç dökülmesi hastalık ilerlemesi ile ortaya çıkabilmektedir. Nadir formların yanı sıra akrofasiyel, mukozal, yaygın veya evrensel ve karışık türleri NSV'nin içerisinde sınıflandırılmaktadır (Şekil 2.1-A).

a. Generalize veya yaygın vitiligo: Lekeler/yamalar genellikle simetrik; öncelikli olarak el, parmak, yüz ve travmaya maruz kalan bölgelerin herhangi bir parçasını etkileyebilir (Şekil 2.1-B)

b. Universal vitiligo: Vücudun bölgesel olarak en geniş yüzeyini (vücut yüzeyinin %80-90'ı) etkileyen ve yetişkinlikte en yaygın görülen türdür. Universal vitiligo, vücudun neredeyse tamamen depigmentasyonuna karşılık gelir. Bu terim sıklıkla lekelerin cilt, vücut kıllarının ve bazen oral/genital mukozaların pigmentasyonunu içeren tüm vücut yüzeyine ilerlediğinde kullanılır. Saç derisinde saç dökülmesi de yaygındır. Bununla birlikte vitiligo, hastalığın başında kafa derisinin pubik ve aksiller bölgelerinde görülebilir. Güneşe maruz kalan bölgelerde küçük perifoliküler şekilde devam edebilir (Şekil 2.1-C ve D).

c. Akrofasiyal vitiligo: Akrofasiyal vitiligo'da, ilgili alanlar genellikle yüz, baş, eller ve ayaklar ile sınırlıdır. Ayırıcı özelliği distal parmakların ve yüz deliklerinin depigmentasyonudur. Daha sonra diğer vücut bölgelerini de içerebilir ve tipik generalize vitiligo ile sonuçlanır (Şekil 2.1-F).

d. Mukozal vitiligo: Tipik olarak oral (dudaklar, diş eti) /veya genital mukozanın tutulumunu ifade eder. Ayrıca, akrofasiyal, yaygın veya evrensel türdeki hastalarda mukozal yüzeyler de etkilenebilir; Sadece bir mukozal bölge içerdiğinde sınıflandırılmayan grup içerisine dahil edilebilmektedir.

e. Karışık vitiligo: segmental ve segmental olmayan vitiligo'nun eş zamanlı tutulumu olarak tanımlanabilir. Çoğunlukla, segmental vitiligo şeklinde görülür (Şekil 2.1-E)

f. Seyrek türler: Vitiligo punktata, vitiligo minör ve foliküler vitiligodur. Bu türler ayrıca sınıflandırılmaz olarak kabul edilmektedir. Aşağıdaki üç alt grubu içermektedir.

1) Vitiligo punktata: Lezyonlar, vücudun herhangi bir bölgesini içeren 1 ila 1.5 mm'lik konfeti şeklindeki lekeler dağınık veya perifoliküler olarak görülebilir. (Şekil 2.1-F).

2) Vitiligo minör: Nadiren görülen bir türdür. Hastalık genellikle koyu tenli bireylerde sınırlı olarak görülür. 'Minör' terimi, hastalığın kısıtlı bir yüzey alanına sınırlanması yerine, pigmentasyonun kısmi olmasına atıfta bulunmaktadır. Gerçek vitiligo ile olan ilişkisi, patoloji ve konvansiyonel vitiligonun lekeler ile bir arada bulunmasından kaynaklanmaktadır (Şekil 2.1-G).

3) Foliküler vitiligo: Genç siyah bir hastada primer olarak sınırlı cilt tutulumu şeklinde rapor edilmiş olup, saç ve kıl foliküllerinde melanosit kaybı ile birlikte görülen genelleştirilmiş ya da yaygın vitiligonun bir türünü ifade eder (Şekil 2.1-H) (6,12)



A. Non segmental vitiligo (12)



B. Generalize vitiligo (6)



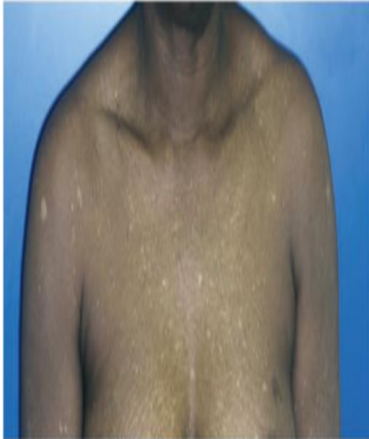
C. Universal vitiligo (6)



D) Universal vitiligo (6)



E) Karışık vitiligo (6)



F) Akrofasiyal vitiligo (12)



G) Vitiligo minör (12)



H) Foliküler vitiligo (12)

Şekil 2.1. Non segmental vitiligo ve çeşitleri. A: Non segmental vitiligo **B:** Generalize, **C:** Universal vitiligo **D:** Universal vitiligo, **E:** Karışık vitiligo **F:** Akrofasiyal vitiligo, **G:** Vitiligo minör, **H:** Foliküler vitiligo (6,12)

2.3.2. Segmental Vitiligo (SV)

Bir, iki veya çoklu segmentleri etkileyebilir (Şekil 2.2-A). Tek bölüme dayalı form en yaygın olanıdır ve bir veya daha fazla sayıda vücudun bir tarafında beyaz lekeler, genellikle vücudun orta hattında yerleşiktir. Ayrıca leke oluşumunun hızlı başlangıcının yanı sıra vücut kıllarının (*Leukotrichia*- pigment kaybından dolayı meydana gelen beyazlık) tutulumu da vardır. Unisegmental vitiligo, SV'nin en yaygın şeklidir ve vücudun bir tarafında dağılan bir veya daha fazla beyaz pigmentli lekenin varlığına işaret eder genellikle vücudun orta hattında tutulum görülmektedir (bazı lezyonlar orta hattı kısmen geçebilir) (Şekil 2.2-B). Bilateral segmental vitiligo, daha az yaygın olarak, iki veya daha fazla segmenti etkileyebilir (Şekil 2.2-C) (7, 12,19).



A. Segmental vitiligo



B. Unisegmental vitiligo



C. Bisegmental vitiligo

Şekil 2.2: Segmental vitiligo ve çeşitleri. A. Segmental vitiligo B: Unisegmental, C: Bisegmental vitiligo (12).

2.3.3. Nordlund'a göre Vitiligo Hastalığının Sınıflandırılması

Nordlund, lezyonların büyüklüğü ve vücuttaki dağılımına dayanan bir klinik sınıflandırma oluşturmuştur. Vitiligo lokalize, genelleştirilmiş ve evrensel vitiligo olmak üzere üç farklı grupta sınıflandırılmıştır.

1) Lokalize vitiligo; Fokal (bir bölgede bir veya daha fazla yama, segmental bir desende değil) ve segmental (dermatomal dağılımda bir veya daha fazla leke) olmak üzere 2 tiptir.

2) Generalize vitiligo; akrofasial (yüz ve distal ekstremiteleri etkilemektedir), vulgaris (tipik bölgelerdeki lezyonların simetrik dağılımı ile en yaygın görülen çeşit) ve karışık (segmental artı vulgaris veya akrofasial) olmak üzere 3 tiptir.

3) Universal vitiligo; vücudun %80'den fazlasının depigmentasyonunun görüldüğü tiptir. (20)

2.3.4. Koga Sınıflandırmasına Göre Vitiligo

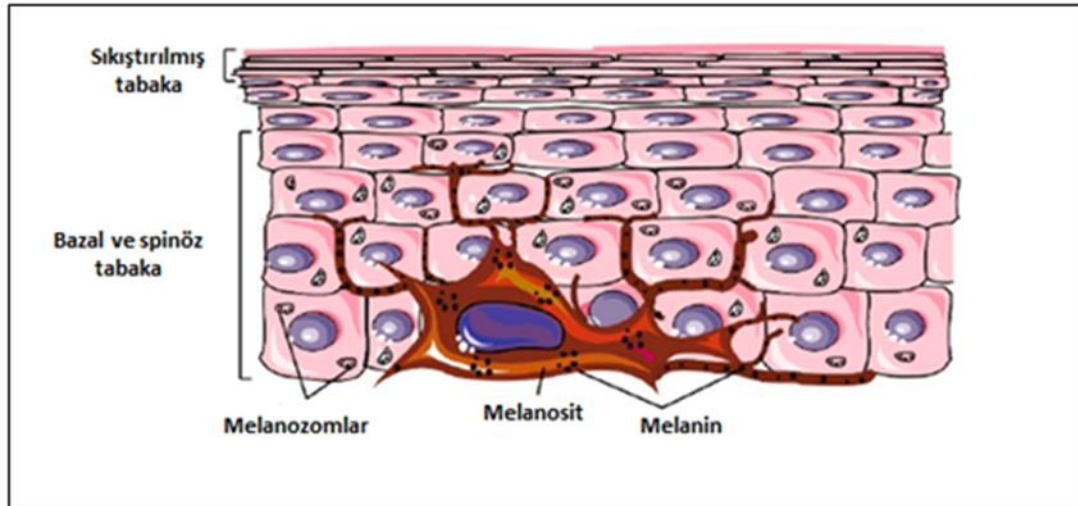
Koga sınıflandırmasına göre vitiligo non segmentalis (tip A) ve vitiligo segmentalis (tip B) olmak üzere 2 tipe ayrılır.

Non segmentalis (Tip A): Yaygın görülen bir tiptir. Uzun süren ve *Köbner fenomeni* ile ilişkili olan ve genellikle *Sutton nevus*, tiroid, Juvenil diabetes mellitus, Pernisiyöz anemi ve Addison hastalığı gibi otoimmün hastalıklarla birlikte görülen vitiligo tipidir.

Vitiligo Segmentalis (Tip B): Nadir ve dermatomal dağılımına sahip vitiligo çeşididir. Hızlı başlamasından sonra genellikle stabil bir özellik gösterir (21,22).

2.4.Epiderminin Yapısı ve İşlevi

Epiderminin en önemli rolü cildi bakteri maruziyeti gibi virüsler, kimyasal maddeler, UV ışını, iyonlaştırıcı radyasyon, elektromanyetik dalgalar, fiziksel, termal ve mekanik yaralanmalar (ör., bariyer fonksiyonu) gibi birçok çevresel stresten korumaktır. Keratinositler epiderminin çoğunu oluşturur, farklılaşmaya (yani keratinizasyon) uğrar ve deri üzerinde ölü bir yüzey tabakası oluşturur (bu tabaka "keratinize edilmiş tabaka" veya "kornifiye tabaka" olarak adlandırılır). Keratinositlerin fonksiyonu, bariyer fonksiyonunun düzenlenmesinde rol alan keratin ve filagrin üretmektir. Epiderminin yenilenmesi, keratinositlerin proliferasyonu ve farklılaşmasıyla gerçekleşmektedir. Epidermal homeostazis, esas olarak keratinositlerin proliferasyonu ve farklılaşması arasındaki dengeye bağlıdır. Memeli melanositleri bazal tabakaya yerleşik olup keratinize değildirler ve melanin pigmentleri üretirler. Cildin melanositleri, melanin pigmentlerini aktardıkları keratinositler (bir melanosit yaklaşık 36 keratinosit tarafından çevrelenmiştir (Şekil 2.3). İnsan derisinde, keratinositleri ve melanositleri içeren epidermal melanin, epiderminin pigmentasyonu ve homeostazisini düzenlemede kilit role sahiptir. Çoğu epidermal melanosit, kıl foliküllerine göç eder ve tüylü hayvanlarda genel vücutta ciltte matris melanositlerini kolonize eder. Kulak, burun, ayak ve kuyruğun tüysüz derisi olan hayvanlarda ve yetişkin insan derisinde (kafa derisi, koltuk altı ve kasık cildi hariç), melanosit hücreleri bulunmaktadır.



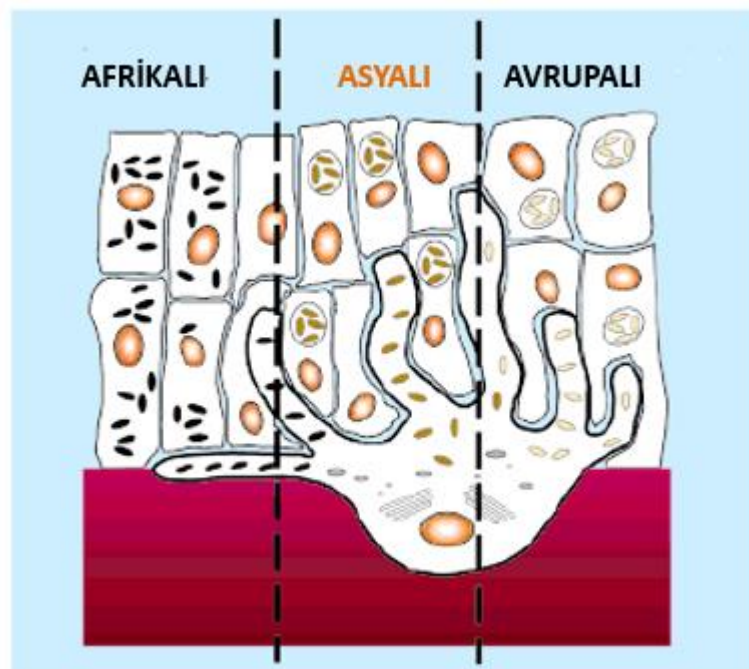
Şekil 2.3. Keratinositlerin ve melanositlerin yapısal ilişkisi. Dendritik melanosit, cildin alt tabakasında bulunur ve melanin üretir. Melanozomlardaki melanin pigmentleri keratinositlere aktarılır (24).

Epidermal melanositlerden elde edilen saç folikülü melanositleri oldukça dendritiktir ve saç matrisini kolonize eder. Saç matriksi, melanositleri çevreleyen keratinositlere olgun melanozomları (melanin içeren organelleri) salgılar. Saç matriksi melanositleri epidermal melanositlerden farklıdır. Saç matrisi melanositleri, epidermal melanositlerden daha büyüktür, daha uzun dendritlere sahiptir ve daha az keratinosit ile etkileşime girer. Olgun kıl foliküllerinde melanositler ve keratinositler arasında fonksiyonel bir melanin ünitesi kurulmuştur. Melanositler dermal papillaya yakın saç matrisinin bazal tabakasında bulunur ve bazal membrana dayanır (23,24)

2.5. Melanozom Organelleri

Melanin, melanozom olarak bilinen özel bir hücre içi organelde çok adımlı bir biyokimyasal yolla sentezlenir. Melanin öncüllerinin sentezi ve polimerizasyonu, burada posttranslasyonel glikozilasyonun karakteristik paternine sahip tirozinazın bulunduğu özelleşmiş melanozomal organellerinde gerçekleşir. Melanozom olgunlaşması dört aşamaya ayrılır: içinde melanin olmayan olgunlaşmamış premelanozomlar evre I ve II, melanin içeren melanozomlar evre III ve IV 'te oluşur. Gelişmekte olan ömelanozom birinci evrede küresel bir vakuoldür; endoplazmik retikulumdan türetilen elipsoidal bir organel içine uzanır. Melanozom organeli, melanositik hücrenin dendritik süreçleri yoluyla, kutanöz dokuda çevresindeki keratinositlere ve kıl foliküllerine salınır veya alternatif olarak, gözün melanositleri tarafından tutulur. Cilt üzerinde yapılan yapısal çalışmalarda gösterildiği gibi, etnik grupların melanozom niteliklerinde kolayca fark edilen farklar vardır. Melanosit sayısı esasen sabit olmasına rağmen, sayı, boyut ve melanozomların keratinositlerde dağılım şekli değişmektedir. Ömelanin içeren

melanozomlar (ömelanozomlar), elips şeklindedir ve intraluminal fibrillerdeki pigmentler boylamasına birikirken, feomelanin içeren melanozomlar (feomelanozomlar) küresel, sarı fazda bulunan multiveziküler cisimcikler içinde granüller halinde melanositlerde birikirler. Böylece, melanin sentezindeki farklılıklar melanozom morfolojisindeki farklılıklara karşılık gelir. Genel olarak, daha derin pigmentli cilt, elipsoidal ve yoğun melanotik olan sayısız tekli büyük melanozomal parçacıkları içerir. Daha hafif pigmentasyon, zara bağlı gruplarda kümelenen daha küçük ve daha az yoğun melanozomlarla ilişkilidir. Siyah Afrika cildindeki melanozomlar **0.8 µm'den büyük** iken Asya ve Kafkas melanozomları **ortalama 0.8 µm'den küçüktür**. Bu gruplar içinde melanozom boyutlarında da farklılıklar da mevcuttur. Melanozomların türü ve dağılımlarındaki farklılıklar doğumda oluşmaktadır (Şekil 2.4) (25, 26).



Şekil 2.4. Farklı etnik gruplarda melanozom yapısı ve dağılımı. Keratinosit hücreleri ile birlikte tek bir deri melanosit hücresinin yerleşimi üç bölüme ayrılır. Afrika popülasyonunda, melanozomlar tekil yoğun pigmentli parçacıklar halinde kalırken Asya ve Avrupalılardaki melanozomlar, farklı cilt komplekslerini oluşturan zara bağlı organellerde kümelenir (26).

2.6. Melanosit kök hücre (McSC)'ler ve Lokalizasyonu

Melanosit kök hücreleri (McSC) ise ilk olarak saç folikülünde tanımlanmıştır. Melanoblastlar embriyogenez sırasında embriyonik olarak 14.5'nci günde henüz gelişmiş olan saç foliküllerine (Hair Follicle-HF) girmeye başlar. Melanositlerin prekürsör hücreleri olan melanoblastlar embriyogenezin 9.5-10.5'nci günlerinde nöral krest hücrelerinden oluşurlar. Daha sonra ventral hat boyunca ilerleyerek dermise oradan da embriyogenezin 12.5-13.5 günlerinde epidermise gelerek prolifer olup vücudun diğer bölgelerine dağılırlar. Saç matrisinde lokalize olan farklılaşmış melanositler ve HF'lerin çıkıntılı bölgesinde kolonize olan McSC'ler

olmak üzere iki popülasyona ayrılırlar. Bu olayın nasıl düzenlendiği henüz bilinmemektedir. İnsan derisinde, melanositler interfoliküler epidermiste bulunmakta iken yetişkin fare derisinde melanositler sadece HF'lerde bulunur. McSC'ler pigmentli değildirler ve "kalabalık niş (bulge niche)" olarak bilinen kalıcı HF'nin alt kısmında bulunan sessiz hücrelerdir. Anagen fazının başlangıcında HF oluşumunun aktif fazında McSC'ler proliferer olur ve melanosit progenitör hücreleri oluşur. Melanosit progenitörleri daha sonra, komşu keratinositler yoluyla melanozomlara transfer edilen ve melanin üretiminden sorumlu pigment içeren uygun melanositleri oluşturmak üzere farklılaşırlar (27).

2.7. Melaninlerin Keşfi ve Yapısı

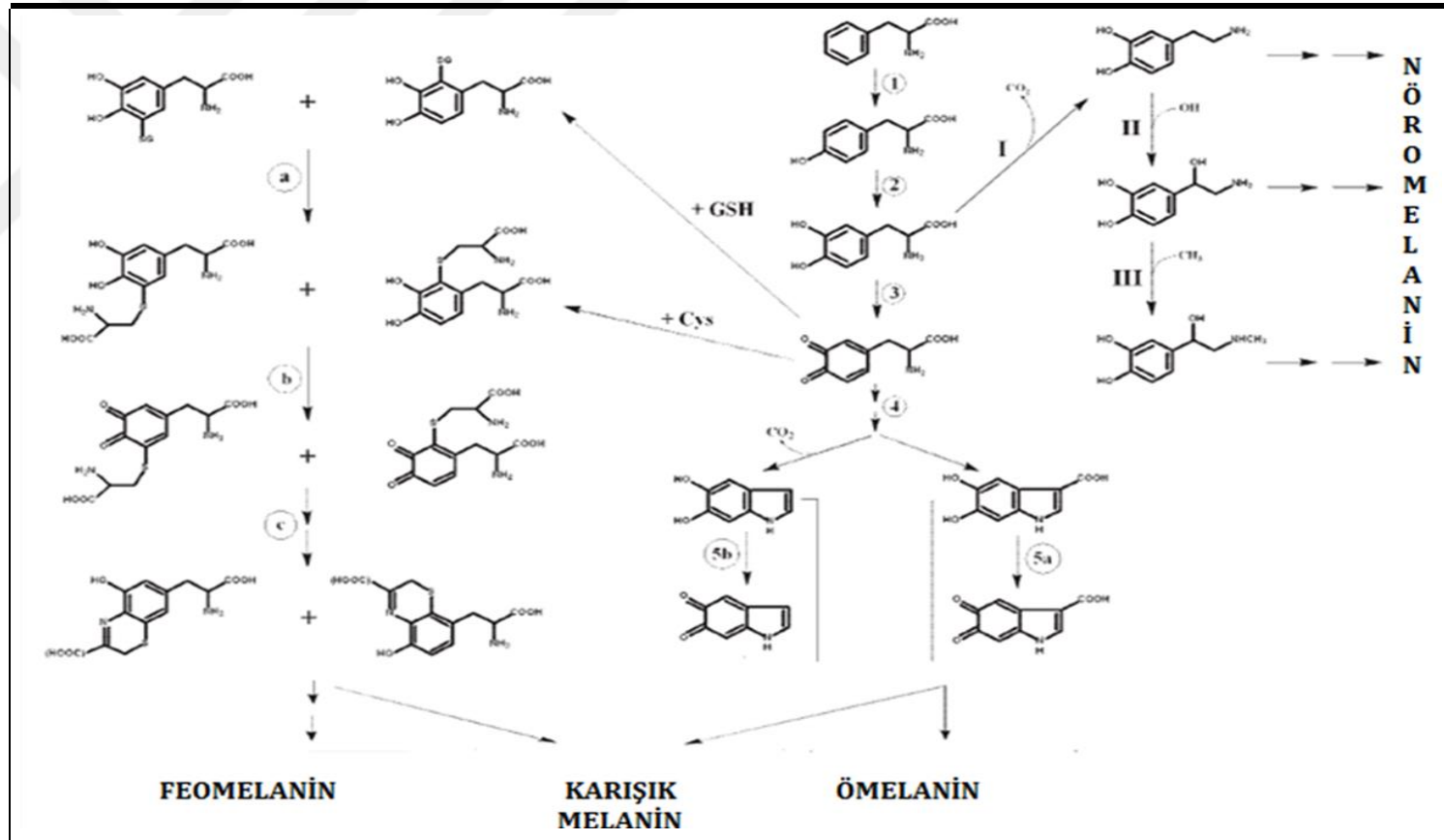
"Melanin" adı, antik Yunanda karanlık anlamına gelen "*melanos*" kelimesinden gelmektedir. Pigmentasyonla ilgili ilk ayrıntılı yazılı açıklama ise Yunanistan'da Heredot'tan gelmektedir. Milattan önce 1550'de firavun, *Ebers* papirüslerinde cilt rengini etkileyen bazı hastalıkları tarif etmiştir. Borovansky'ye göre, *melanos* terimi muhtemelen 1840'ta İsveçli kimyager Berzelius tarafından göz zarlarından ekstrakte edilen koyu renk pigmentini adlandırmak için kullanılmıştır. (28,29). Cildin melanogenez adı verilen melanosit oluşum mekanizması, primer olarak melanin üretiminden ve dağıtımından sorumlu epidermal birimler olan ve keratinositlerle çevrili melanosit hücreleri aracılığıyla gerçekleşir ve bu mekanizma kapalı bir parakrin sistem ile düzenlenir. Melanin pigmenti cilt, saç ve göz renginin birincil belirleyicisidir. İnsanlarda fenotipik bir özellik tanımlamanın yanı sıra, UV ışınlarını emme kabiliyetine sahip olması nedeniyle, fotokorunumda kritik bir role sahiptir. *Fitzpatrick* sistemi, cilt pigmentasyon fenotiplerini ayırt etmek için en yaygın kullanılan sistemdir. UV'ye maruz kaldıktan sonra eritema ve edinilmiş pigmentlemeyi derecelendirerek altı fototipi (I-VI) karakterize eder. Yapısal pigmentasyon genetik olarak belirlenmiş melanin seviyesini yansıtır ve çeşitli düzenleyici faktörlerle değiştirilebilir. Bu faktörler **intrinsik etmenler** (keratinositler ve fibroblastlar, endokrin, inflamatuvar ve nöronal hücreler tarafından salınan moleküller, Melanosit sitümüle edici hormon (MSH), Agouti sinyal proteini (ASP), Endotelin 1 (EDN1), Dikkopf 1 WNT Sinyal Yolak İnhibitörü 1 (DKK1), çeşitli büyüme faktörleri, sitokinler) veya **ekstrinsik etmenler** (UV ve ilaçlar) olabilmektedir (30,31).

Görünür pigment melanositler ve biyopolimer olan melanin, enzimatik yollarla derinin dermis ve epiderminin birleşiminde bulunan dendritik hücreler tarafından sentezlenir. Embriyonik gelişme esnasında melanosit öncül hücreleri (melanoblastlar) nöral krestten deriye, kıl follikülleri ve gözün üveasına göç ederek doğrudan bu renk özelliklerinden sorumludurlar. Pigmentasyonun genetik temelini anlamak için melanositik hücrede ifade edilen gen ürünlerinin moleküler mekanizmalarının anlaşılması ve pigmenti emen keratinositlerle olan hücresel etkileşimi bilmek gereklidir. Klasik genetik çalışmalar, koyu ve açık renkli insanlar arasındaki

evliliklerin pigmentasyonun ara renklerine sahip bireylerin meydana gelmesiyle sonuçlanmaktadır. Fakat normal varyasyona sahip pigmentasyonun moleküler temeli hakkında henüz yeteri kadar bilgi bulunmamaktadır. Saç ve ciltteki melanositler aynı embriyonik kaynaktan çıkmasına rağmen rengi etkileyen genler farklı kombinasyonların (açık ten-koyu renkli saç, koyu ten-açık renkli saç gibi) oluşmasına neden olarak, bağımsız şekilde ifade edilebilir. Pigmentasyon fenotipinin modifikasyonuna yol açan çevresel ve yaşla ilgili faktörlerin etkisi pigmentasyonda görevli genlerin ve mekanizmaların genetik analizini araştırırken göz önünde bulundurulması gereken değişkenlerdir. İnsan genetiği çalışmalarının aksine, karşılaştırmalı genomik yaklaşımdan (*Comparative genomic approach*) insan pigmentasyonu hakkında çok şey öğrenilmiştir. Mutant farelerin farklı deri renkleri mendel analizine tabi tutulacak ilk özelliklerden bazıları olup, bu renk mutasyonlarının altında yatan genlerin 30'undan fazlası moleküler klonlanmış ve birçoğunun insan hastalık fenotipine karşılık geldiği bulunmuştur (32).

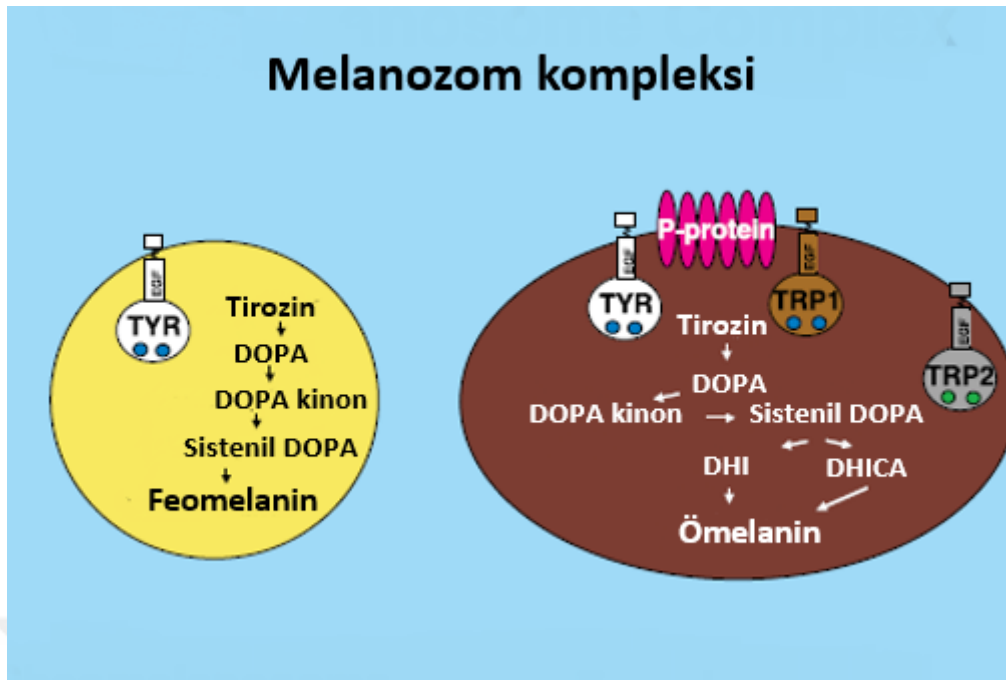
2.8. Melaninlerin Fiziksel ve Kimyasal özellikleri

Melanin, tirozinden sentezlenen, yüksek molekül ağırlıklı son derece yoğun ve çözünmeyen bir kromofordur. L-tirozin'in karmaşık çok basamaklı dönüşümlerinin son ürünleri olan melaninler, polimorfik ve çok fonksiyonlu biyopolimerler olup, **ömelanin, feomelanin, nöromelanin** ve **karişik melanin pigmenti gibi** çeşitleri mevcuttur. Melanin biyosentezi L-fenilalaninin L-tirozine hidroksilasyonundan ya da direkt olarak L-dihidroksifenilalanine (L-DOPA) hidroksile edilen L-tirozinden başlatılabilir. L-DOPA, ayrı yollarla hareket eden hem melaninlerin hem de katekolaminlerin öncüsü olarak hizmet eder. Bir sonraki adım, L-DOPA'nın dopakinon'a oksidasyonu hem ömelanojenik hem de feomelanojenik yollar için ortaktır. Ömelanogenez, dopakinonun lökodopakroma daha fazla dönüştürülmesini ve ardından ömelanini oluşturmak için polimerizasyona tabi tutulan dihidroksiindol (DHI) ve DHI karboksilik asit (DHICA) ara ürünlerinin üretimi ile bir dizi oksidasyon reaksiyonunu içerir. Katekolaminlerin L-DOPA ve sırasıyla, dopamin, nörepinefrin ve epinefrin üretmeleri için enzimatik dekarboksilasyon, hidroksilasyon ve metilasyon gerekir. *In vitro* olarak, bu katekolaminlerin hepsi birkaç oksidasyon/indirgeme reaksiyonu yoluyla potansiyel olarak nöromelanine dönüşebilir; *in vivo* olarak sadece dopamin ve sisteinildopamin pigmentin birincil öncülleri olarak görev yapabilir (Şekil 2.5) (29,33).



Şekil 2.5. Melanin pigment sentezi. GSH, glutatyon; Cys, sistein. 1: Feninalanin hidroksilasyonu; 2: Tirozin hidroksilasyonu (Tirozinaz ile); 3: DOPA oksidasyonu (tirozinaz veya metal katyonlar ile); 4: Dopakrom tautomerizasyonu (DCT/Tyrp2 veya metal katyonlar ile); 5a: DHICA oksidasyonu (Tyrep1 veya peroksidaz ile); 5b: DHI oksidasyonu (tirozinaz veya peroksidaz ile); a: Glutatyondopanin hidrolizi (glutamiltranspeptidaz ile); b: Sistenildopanin oksidasyonu (peroksidaz ile); c: Sistenildopakinsonun intramoleküler dönüşümü (peroksidaz ile kolaylaştırılabilir); I: DOPA dekarboksilasyonu (AAD ile); II: Dopamin hidroksilasyonu (DBH ile); III: Nörepinefrin metilasyonu (PNMT ile) (33)

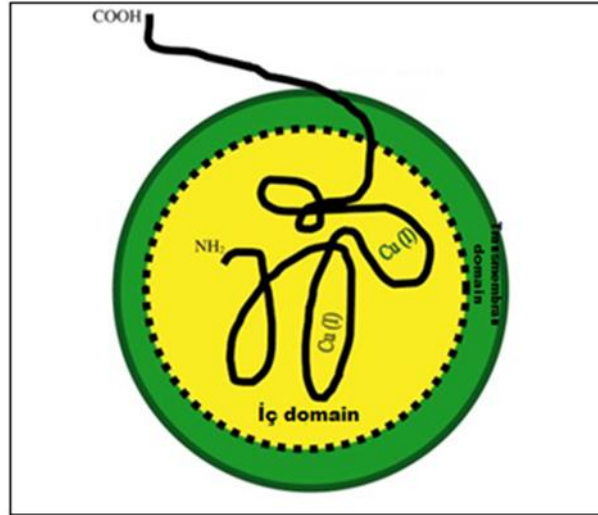
Melanin pigmentleri, karbon-karbon bağları (C-C) ile birbirine bağlı birkaç birimin ortaklaşa düzenlenimine sahiptir. Bu pigment moleküllerin yapısal özellikleri ile kimyasal bileşimleri birbirinden farklıdır. **Ömelaninler**, çapraz bağlı, koyu kahverengi ile siyah, çözünmeyen azotlu pigmenttir. Bu pigment çoğunlukla cilt pigmentasyonundan sorumludur, ancak saçlarda da bulunur. Ömelaninler semikinon birimlerine sahip polimorf nitrojenik biyopolimerlerdir (ağırlıklı olarak DHI ve DHICA kopolimerleri), çoğu çözücüde çözünmez ve kovalent bağlarla proteinlerle sıkı bir şekilde ilişkilidirler ve yüksek karboksil grubu içeriği ile kolaylaştırılmış reaksiyonlarda katyonları, anyonları ve poliaminleri tersine bağlayabilme özelliğine sahip polianyonlar gibi davranırlar. Ömelaninlerin yapısındaki semikinon birimleri, ömelanin oksijen radikallerine ve diğer kimyasal redoks sistemlerine karşı hem indirgeyici hem de oksitleyici özelliklere sahip redüksiyon pigmenti olarak görev almasını sağlarlar. Ömelanin'in aksine, **feomelaninler** benzotiazin bir omurgasına sahiptir ve sarı ile kırmızımsı-kahverengi renkte alkali çözünür bir kromofor olup dopakinon glutatyon veya sistein ile sisteinil dopa oluşturmak üzere birleşmektedir. Feomelanin proteinlere sıkıca bağlıdır, *in vivo* olarak azot ve kükürt içeren (C/N ve C/S oranlarında yüksek değişkenlik gösteren) bir kromoprotein yapısındadır. Feomelaninler ayrıca ilaçlar ve kimyasallar için bağlayıcı bir madde olarak da hareket edebilir (Şekil 2.6.) Nöromelaninler, aminokromlardan ve noradrenalinokromlardan oluşan makropolimerlerdir. Diğer melaninlere benzer şekilde nöromelaninler, kararlı paramanyetik özelliklere sahip kahverengi/siyah pigmenttirler, organik solventlerde çözünmez, hidrojen peroksitle ağartılmakta ve gümüş lekesi ile etiketlenmektedir. Nöromelaninler hem de feomelaninlerin karışık özelliklerine sahiptirler, metalleri şelatlandırır ve birkaç inorganik ve organik bileşikle etkileşime girerler (33).



Şekil 2.6. Melanozom organelinde Feomelanin ve ömelaninin oluşumu (26).

2.9. Melanosit Oluşum Mekanizması (Melanogenez)

Melanogenez, melanozom organellerinde meydana gelen melanin sentezinden sorumlu olan biyokimyasal bir yoldur. Melanozom organelleri ise, melanositlerin membrana bağlı bir intrasitoplazmik organeldir ve melanositin endoplazmik retikulumundan kaynaklanır. Melanozom gelişimi sırasında, tirozinaz (TYR), tirozinaz ile ilişkili protein 1 ve 2 (TYRP1 ve TYRP2) olmak üzere üç melanojenik metalloenzim önemli rol oynar. Bu üç enzimden TYR, melanogenez için en kritik ve en önemli enzimdir. Memeli tirozinaz, 60-75 kDa moleküler kütlesi olan 511 amino asitten oluşan, iki fonksiyonlu, bakır-bağımlı bir glikoproteindir. Tirozinaz aktif bölgesinde bulunan bakır atomları katalitik aktivitenin en önemli ögesidir. Karbon monoksit, siyanür, salisilaldoksamin ve etiltiokarbonat gibi ajanlar, bakırı şelatlayarak dolaylı olarak tirozinaz aktivitesini inhibe eder ve oksijen bağlama özelliğini ortadan kaldırır. Tirozinaz sentezi *Rare* endoplazmik retikulum (RER) ribozomlarında oluşur. Tirozinaz melanozomların içinde bulunan bir iç bölge, bir transmembran bölge ve melanositlerin sitoplazmalarına uzanan bir sitoplazmik bölge olmak üzere yapısal olarak üç bölgeye ayrılmıştır (Şekil 2.7.).



Şekil 2.7. Tirozinazın yapısı. Tirozinaz melanozomların içinde bulunan bir iç domain, bir transmembran domain ve melanositlerin sitoplazmalarına uzanan bir sitoplazmik bölge olmak üzere yapısal olarak üç bölgeye ayrılmıştır (34).

Tirozinaz bakır bağlama bölgesinin %90'ından fazlası iç bölgede lokalizedir. İç bölgenin sadece melanozomda melanin oluşumuna sağlayan neredeyse tüm katalitik aktiviteyi içerdiği gösterilmiştir. Tirozinazın transmembran ve sitoplazmik bölgeleri, melanosit sitoplazmasında bulunan 30 amino asit kuyruklu, kısa amino asit sekanslarından oluşur. Sitoplazmik bölge, melanojenik fonksiyon ve tirozinazın hücresel trafiği için kritik önem taşır. RER'den Golgi kompleksi yoluyla melanozoma taşınmayı kolaylaştırır. Protein kinaz C-b (PKC-b), tirozinaz aktivasyonu için gerekli olan bir sinyal iletim enzimidir. PKC-b, melanozomal membranda tirozinaz ile birlikte bulunur ve sitoplazmik bölgenin C-terminalindeki serin kalıntılarını fosforilleyerek tirozinazı aktive eder. Memeli melanogenezindeki basamaklar Tablo 2.2'de listelenmiştir (34).

Tablo 2.2: Memelilerde melanogenez mekanizmasının basamakları (34).

1. Basamak	Nöral krest hücrelerinden melanoblastların göçü
2. Basamak	Melanoblastların melanositlere farklılaşması
3. Basamak	Melanozom matriks oluşumu
4. Basamak	Tirozinaz ilişkili proteinler, melanozomal matris bileşenleri ve tirozinaz gibi melanojenik genler indüklenir.
5. Basamak	Tirozinazın posttranslasyonel işlenmesi ve glikozilasyonu
6. Basamak	Vesiküllerin melanozom oluşturmak için füzyonu ve melanogenezin başlatılması
7. Basamak	Tirozinaz aktivitesinin kontrolü
8. Basamak	Tirozinazla ilişkili proteinlerin aktivitesinin kontrolü
9. Basamak	Biyosentez sonrası tirozinaz modifikasyonu
10. Basamak	Melanin pigmentinin modifikasyonu
11. Basamak	Keratinositlere melanozom transferi
12. Basamak	Melanozom degradasyonu
13. Basamak	Degrade hücrelerle birlikte melaninin atılması

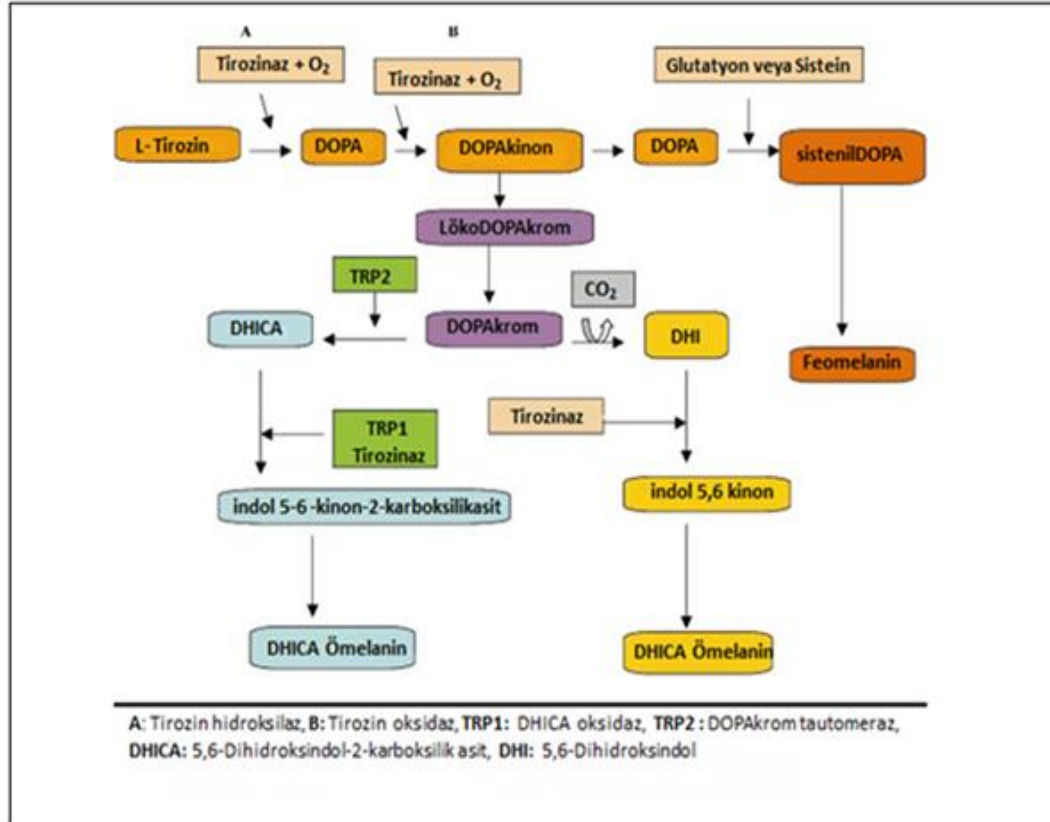
Melanin üretildiğinde, melanozomlar komşu keratinositlere aktarılır. Melanozomların bozulması keratinositler içerisinde bulunan lizozomal asit hidrolazın etkisiyle oluşur. Bozulmuş melanozomlar daha sonra *stratum corneum* tabakasından (Keratinli tabaka: Deride ölü ve dökülen hücrelerden oluşan epidermis tabakasının en üst kısmı) atılır.

Melanositlerin ürettiği melanin miktarını ve kalitesini kontrol ettiği bilinen bazı faktörler UVR, α -melanosit uyaran hormon (α -MSH) ve Agouti sinyal proteinini (ASP) içerir. Bu faktörler esas olarak genlerin ekspresyonunu düzenlerler ve melanozomal enzimleri kodlayarak ömelanin/feomelanin oluşumunda anahtar rol oynarlar. İnsanlarda ve farelerde α -MSH ve ASP arasındaki etkileşimlerin, ömelanin veya feomelanin üretiminde kritik olduğu bilinmektedir. α -MSH, ömelanin sentezinde görev alırken ASP, feomelanin sentezinde görev alır. α -MSH, melanositlerde yüksek seviyede eksprese olan melanokortin 1 reseptörü (MCR-1) olarak da bilinen MSH reseptörü (MSH-R) tarafından düzenlenir. ASP, MSH-R için α -MSH'nin bir antagonisti olarak görev görür. MSH-R melanositlerle eksprese edilir ve pigmentasyon için bir kontrol noktası olarak düşünülür. MSH-R, monosit, endotel hücreleri ve keratinositler gibi diğer hücrelerde de bulunur (34).

Tirozinaz, melanin pigment sentezi için biyosentetik yolda melaninin ilk dönüşüm aşamasını katalize eder (şekil 2.7). L-tirozin amino asiti, melaninin metabolik öncüsüdür. İlk olarak, L-tirozin dihidroksifenilalanin (L-DOPA) oluşturmak üzere hidroksillenir. Ardından, L-DOPA, L-dopakinona okside edilir. L-Dopakinon reaktif bir ara madde olup ya ömelanin ya da

feomelanine işlenir. Tirol yok olduğunda, ömelanin üretilir. Glutasyon, sistein ve tioredoksin gibi tiyollerin, kinon ara maddeleri ile reaksiyona girme eğilimi yüksektir ve melanin pigment sentezini ömelaninden (kahverengi/siyah) feomelanine (kırmızı/sarı) çevirirler. Tirol bileşiklerinin yokluğunda, dopakinon kendiliğinden dopakrom üretmek üzere dönüşüme uğrar. TYRP2, aynı zamanda, dopakrom tautomeraz olarak da adlandırılır ve dopakromun 5,6-dihidroksiindol-2-karboksilik asit (DHICA) olarak adlandırılan daha stabil bir ara maddeye tautomerleştirilmesini katalize eder. Ayrıca, dopakromun spontan dekarboksilasyonu da meydana gelebilir ki bu durum 5,6-dihidroksi indol (DHI) oluşumuna yol açar. TYRP1 ve TYR, sırasıyla DHICA'nın, farelerde ve insanlarda, indolkinon 5,6-kinon-2-karboksilik asit, karboksillenmiş bir indolkinon dönüşümünü katalize eder (Şekil 2.8) (28, 34).

Melonogenezde reaktif kinon türleri meydana gelir ki bu durum melanin üreten hücreler için tehlike oluşturmaktadır. Kinonlar, indirgeme durumlarına bağlı olarak çok reaktif olan elektrofilik bileşiklerdir. Kinonlar, semikinonu oluşturmak için NADPH sitokrom P450 redüktaz ile bir elektron indirgeme işleminden geçebilir. Kinonlar, semikinondan daha az reaktif bir tür olan hidrokinonu oluşturmak için NAD(P)H kinon oksido redüktaz ile iki elektron indirgenebilir. Elektron paramanyetik rezonans (EPR) çalışmaları, ömelanin içinde semikinon radikallerinin varlığı için kanıt sağlamıştır (34).



Şekil 2.8. Melanin pigmentinin yaygın biyosentez yolağı (34)

2.10. Moleküler Melanogenez mekanizması

Melanosit hücre hattından, melanositlerin diferansiyasyonu, proliferasyonu ve yaşamının düzenlenmesinde; Paired Box 3 (*PAX3*), Sry ilişkili *HMG-Box 10* (*SOX10*), CAMP Cevap Element Bağlayıcı Protein (*CREB*), Lenfoid Enhancer Bağlayıcı Faktör 1 (*LEF1*) ve Mikroftalmi ile ilişkili transkripsiyon faktörü geni (*MITF*), majör rol oynarlar. *LEF1*, Wnt sinyal yoluna katılan bir transkripsiyon faktörüdür. Melanositlerde, *MITF* üzerindeki etkilerini iki yoldan uygulayan bir pigmentasyon düzenleyicisi olarak işlev görür: **İlk olarak** *LEF1*, *MITF* transkripsiyonunun bir aktivatörüdür. **İkincisi**, *MITF* kendi promotörünü *LEF1* ile birlikte çalıştırabilir. *MITF* ve *LEF1*'in etkileşimi Dopakrom tautomeraz (*DCT*)'ın ifadesinin düzenlenmesinde rol oynar. Upstream Transkripsiyon Faktörü 1 (*USF1*) benzer şekilde b-HLH-zip ailesine ait bir transkripsiyon faktörüdür. Melanositlerde, 38 kDa MAP kinaz (p38, ERK1/2) tarafından fosforile edildiğinde, tirozinaz (*TYR*) promotörüne bağlanır ve transkripsiyonu aktive ederek pigmentasyonu düzenler. *DCT* geni de *USF1* bağlama elementini içerir. cAMP, fosfoinositid 3-kinaz/70 kDa ribozomal protein S6 kinazı (PI3K/p70 (S6) K) yolu üzerinde önleyici bir etkiye sahiptir. Bu şekilde İnsanlarda melanogenez farklı ve kompleks yollar tarafından düzenlenmektedir. Melanogenez, *TYR*, *TYRP1* ve *TYRP2* enzimleri ile bağlantılı bir dizi hücre içi sinyal yolu ile düzenlenir. *MITF*, promoter bölgelerine M kutusundan bağlanır ve bu yolla *TYR*, *TYRP1* ve *TYRP2*'nin ekspresyonunu düzenleyerek, melanositlerdeki melanogenezi düzenler. Melanosit *master* geni olan *MITF*'nin ekspresyonu *PAX3*, *SOX10*, *LEF1* ve *CREB* genlerince düzenlenir. *MITF* geni transkribe olduğu zaman c-KİT sinyal yolağının ERK-kinaz tarafından downstream aktivasyonu ile fosforile edilir. *MITF*'nin aktivasyonu mitf-p30 transaktivasyon kompleksinin stabilizasyonu ile sonuçlanır. *DCT*, *TYR*, *TYRP1*'i içeren hedef genlerin ekspresyonlarını uyararak kendi transkripsiyonel aktivitesini upregüle eder. c-KİT sinyal iletimi ayrıca melanositlerin yaşam süresini belirleyen antiapoptotik molekül *BCL2*'nin ekspresyonunu da uyarır. Melanokortin sinyal yolağının aktivasyonu ile cAMP konsantrasyonu artarak *CREB* aktivasyonuna neden olur. Aktive edilen *CREB* doğrudan *MITF* geninin promotöründeki cAMP response elementine bağlanarak çeşitli genlerin ekspresyonunu başlatır. Wnt sinyal yolağında melanosit gelişiminde gerekli olup; yolağın aktivasyonu *MITF* geni gibi melanosit farklılaşmasında rol alan downstream hedef genlerin transaktivasyonuna neden olan β -katenin/LEF kompleksinin stabilizasyonu ile sonuçlanır. Bunun aksine TGF β 'nin keratinosit ekspresyonu melanogenezi baskılar. TGF β sinyal iletiminin aktivasyonu SMAD moleküllerinin fosforillenmesiyle *PAX3*'ün ve *MITF*'nin baskılanmasına böylece melanosit aktivasyonunun bloklanmasına neden olur (Şekil 2.9) (35, 36).

dönem sağrlığın gözlenmesi gibi defektlere sahip olmaktadırlar. Fare *Mitf* loküsü ve onun insanlardaki karşılığı *MITF*, DNA bağlama ve dimer formasyonu için gerekli olan bir temel heliks-ilmek-sarmal-lösün fermuar (bHLH-LZ) yapısı içerir (38). Melanin sentezinin düzenlenmesinde, *MITF* genini içeren üç yaygın sinyal yolağı bulunmaktadır. **Birincisi cAMP-bağımlı sinyal yolağıdır.** Melanokortin 1 reseptörü (MC1R), melanositlerde melanin üretiminin anahtar kontrolörüdür ve α -melanosit uyarıcı hormon (α -MSH) MC1R'in pozitif düzenleyicisi iken agouti sinyal proteini (ASP) ise negatif düzenleyicisidir. α -MSH, MC1R'yi uyardıktan sonra, adenil siklaz (AC) aktive olur ve bu durum cAMP'nin üretilmesi ile sonuçlanır. cAMP protein kinaz A'yı (PKA) aktive eder ki bu da *MITF* gen ekspresyonunu, cAMP yanıt elementi bağlayıcı proteinin (CREB) fosforilasyonu yoluyla aktive eder. Sonuç olarak, *MITF*; *TYR*, *TYRP1* ve *TYRP2*'nin promotör bölgelerinde bulunan M ve E-kutuları ile etkileşimlerle, melanogenez ile ilişkili proteinleri (MRP) kodlayan önemli pigment genlerinin transkripsiyonunu düzenler. α -MSH'ye ek olarak, β -MSH ve adrenokortikotropik hormon gibi diğer Pro-opiomelanokortin (POMC)'den türetilmiş peptidler de aynı şekilde melanogenez uyarır. **İkincisi; WNT veya β -katenin yolağıdır.** WNT'ler, özellikle melanositler gibi nöral krest hücrelerinde embriyonik gelişimde önemli işlevlere sahip olan sistein açısından zengin salgılanmış glikoproteinlerdir. Bu yolda WNT, G-protein-bağı reseptöre (*Frizzled* denir) bağlanır ve glikojen sentaz kinaz-3b'nin inaktivasyonuna yol açar. β -katenin birikimi ve nükleusa geçişi sonucu LEF ve T-hücre faktörü için kompleks oluşturarak *MITF* geninin ifadesini artırır. Nükleer β -katenin düzeyinin artışı da melanogenez uyarıcı *MITF* ifadesini arttırmaktadır. **Üçüncü yolak ERK sinyal yolağıdır.** Mitojen ile aktive edilmiş protein kinazların dahil olduğu sinyal iletimi Mitojen ile aktive edilmiş protein kinaz (MAPK) molekülü dahil olmak üzere birçok proteini içerir. Sinyal, Ras'ın; B-raf kinazı aktive etmesiyle daha sonra sırasıyla MAP kinazın, ERK1 ve ERK2'yi aktive ederek hücre yüzeyindeki reseptöre bağlanmasıyla başlar. MAP kinazlar; *MITF*'yi fosforilleyerek *MITF*'nin ubikuitinlenmesine ve yıkımına yol açar. Böylece Melanogenez ilişkili protein (MRP) genlerini ifadelenmesinde rol alan önemli bir transkripsiyon düzenleyicisi olan *MITF* geni susturulur. Bu şekilde Ras onkogenin aktivasyonu, normal ve malign melanositlerde melanogenez i inhibe eder (39).

Sry ilişkili HMG-Box gen 10 (SOX10), nükleer transkripsiyon faktörlerinin Sry ilişkili HMB-box (Sox) süper gen ailesinin bir üyesidir. SOX10 proteini, sitogenetik olarak 22q13.1'de bulunan *SOX10* geni tarafından kodlanır. Bu gen, embriyonik gelişim sırasında doku ve organların oluşumunda kritik bir rol oynayarak yaygın olarak embriyogenez sırasında ifade edilen ve gelişimi düzenleyen önemli moleküllerden biridir. Nöral krest, periferik sinir sistemi ve melanositik hücre gelişimi için önemli rol oynayan *SOX10*, insanlar, fareler ve diğer hayvanlarda ifade edilen nükleostoplazmik bir mekik proteini görevi görür. Kalın bağırsakta (enterik sinirler) ve melanositlerde sinirlerin oluşması için gereklidir. *SOX10* geni, melanositler, göğüs dokusu, kraniyal gangliyon, dorsal kök gangliyonu ve otik vezikül olmak üzere farklı dokularında yaygın

olarak ifade edilir. Ayrıca melanom, meme karsinomu, gliomalar ve schwannomlar gibi malign tümörlerde de ifade edilen önemli bir markır genidir (40). SOX ailesi, orijinal üyenin adını taşıyan yaklaşık 20 transkripsiyon faktöründen oluşur. Memelilerde, SOX proteinlerinin A, B1, B2 ve C-H olmak üzere farklı grupları vardır. Melanogenezin gelişimsel düzenleyicileri olarak görev alan ve SOXE grubuna dahil olan *SOX9* ve *SOX10*'dur. Bu aile üyelerinin hepsi yapılarında benzer *High mobility group*-HMG domainini taşımaktadırlar. Bu HMG domainleri aracılığıyla SOX gen ailesi diğer yüksek mobiliteli grup box proteinleri gibi diziye son derece özgü bir şekilde DNA'ya bağlanırlar (41).

Tirozinazlar, çeşitli prokaryotlarda olduğu kadar bitkilerde, mantarlarda, eklembacaklılarda ve memeliler gibi birçok türde bulunan bakır içeren enzimlerdir. Tirozinazlar, memelilerde cilt ve saç renginde melanin oluşumundan sorumlu olan ana enzimlerdir. Tirozinaz, moleküler oksijeni kullanarak, monofenollerin ortohidroksilasyonu (monofenolaz veya kresolaz aktivitesi ve o-difenollerin (difenolaz veya katekolaz aktivitesi) ilgili kinonlara oksidasyonu olmak üzere iki ardışık enzimatik reaksiyon gerçekleştirir. Reaktif kinonlar daha sonra kendiliğinden melaninlere polimerize olurlar. Küçük fenolik moleküllerin yanı sıra peptit ve proteinlerdeki tirozin kalıntılarını okside etmeleri nedeniyle, tirozinazlar biyoteknolojide biyoremidasyon, boya üretimi ve biyopolimer çapraz bağlanma gibi birçok uygulama da kullanılmaktadırlar. Tirozinazlar, katekol oksidazlar (CO) ile birlikte "tip-3 bakır" ailesine aittir. Tip-3 bakır (Cu) proteinleri; tirozinazlar, katekol oksidazlar ve hemosiyaninleri (artropodlar ve yumuşakçaların oksijen taşıyan proteinleri) içeren geniş bir fonksiyonel protein ailesinden oluşur. Bu proteinlerin aktif merkezleri her biri, oksijenin bir peroksi konfigürasyonunda bağlandığı üç histidin kalıntısı ile koordine edilen iki Cu atomundan oluşur. Tirozinazın genel yapısı: Bir merkezi alan, N terminal alanı ve C-terminal alan olmak üzere üç bölgeden oluşur. Altı tane korunan histidin kalıntısından oluşan merkezi bölge CuA ve CuB oksitleyici iyonları içerir (42). Melanositlerin çevresindeki keratinositlere dağıtılması amacıyla depolandığı organeller olan melanozomlar, olgunlaşmak ve melanin üretecek düzeye gelebilmek için bir takım spesifik enzim ve yapısal proteinleri gerektirir. *TYR*, *TYRP1*, *TYRP2*, melanin miktar ve kalitesini etkileyen kritik moleküller arasında yer alırken, Premelanozomal protein 17 (Pmel17) ve T hücrelerince tanınan melanom anijen 1 (MART1) kritik yapısal proteinlerdir. Heterotetramerik Adaptör Protein kompleksleri-3 (AP-3), Lizozomal organel kompleksinin biyogenezi 1 (BLOC-1) ve Okülökutanöz albinizm tip 2 (OCA2) ise melanozomların sınıflandırılmasında ve hücresel trafiğinde önemli rol oynamaktadır. Melanin üretimi, bir dizi sinyalleme sistemi ve tirozin kinaz reseptörü olan KIT Proto-Onkogen Reseptör Tirozin Kinaz, Kök hücre faktörü (SCF) ligandı ve MITF'de dahil olmak üzere transkripsiyon faktörleri tarafından başlatılır ve düzenlenir. Genetik, biyokimyasal ve farmakolojik çalışmalar, Melanokortin 1 reseptörün (MC1R)'den gelen sinyalin melanogenezi yönlendiren ana faktör olduğunu ortaya koymuştur. MC1R'den Melanokortin 5

Reseptör (MC5R)'ye kadar olan sınıf, G-proteinine bağlı reseptörlerin bir alt grubunun üyesidir. Ömelanin sentezi, MC1R agonistleri α -Melanosit stimüle edici hormon (α -MSH) ve Adrenokortikotropik hormon (ACTH) aracılığıyla stimüle edilirken, feomelanin sentezi Agonis stimüle edici protein (ASP) vasıtasıyla stimüle edilir. α -MSH, yerel parakrin düzenlenmesine izin veren hipofiz bezi ve epidermal keratinositler tarafından üretilen pro-opiomelanokortin (POMC) adı verilen bir öncül proteinden ayrılır. SCF-KIT reseptör tirozin kinaz yolu, α -MSH-MCR1 sinyal yolağıyla birlikte, MITF transkripsiyon faktörünün aktivasyonu yoluyla melanosit pigmentasyonu ve gelişimine katılır. Melanojenik moleküler yolları yöneten transkripsiyonel ve posttranskripsiyonel mekanizmalar belirsiz olmasına rağmen transkripsiyonel uyarılma esas olarak birkaç melanojenik genin *MITF* tarafından cAMP'ye bağlı aktivasyonu yoluyla sağlanır. *MITF* geni ise, MAPK-ERK sinyal yolağı aracılığıyla fosforile edilir. *TYR* geninde spesifik bir sekans, *MITF* geninin hedefi olup tirozinazın upregülasyonunu sağlar. Forskolin gibi hücre içi cAMP düzeyini yükselten maddeler, tirozinaz mRNA'sının eşzamanlı bir indüksiyonu olmadan MITF protein düzeyinin artışına neden olur. Bu veri, MITF protein indüksiyonu için transkripsiyon sonrası düzenleyici mekanizmaların gerekli olduğunu göstermiştir (43).

Tirozinaz ile ilişkili proteinler (TRPs), çeşitli dizi homolojileri paylaşan bir $\text{Cu}^{++}/\text{Zn}^{++}$ metalloenzim ailesine aittir. Bu aile üyeleri, melanositlerde ifade edilir ve çoğunlukla melanozomlar denilen özel organellerde lokalize edilirler. TRP'ler ömelaninler ve feomelaninler olmak üzere iki tür pigmentin oluşumunda anahtar rol oynarlar. TRP'ler TYR, tirozin ilişkili protein 1 ve 2 (TYRP1, TYRP2) olmak üzere 3 üyeyi içerirler. İnsanlarda *TYRP1* geni 9p23 kromozomal bölgede lokalizedir. Orijinal olarak gp75 olarak adlandırılan *TYRP1*'in olgun formu, endoplazmik retikulumda (ER) üretilen ve golgiden melanozom organellerine taşınan 75 kDa bir transmembran glikoproteindir. Hem *TYR* hem de *TYRP1/gp75'in* intrasellüler olarak ayrılması, melanozomların biyogeneğinde önemli bir role sahip olan Ras onkogen aile üyesi 7, 32 ve 38 (*Rab7*, *Rab38* ve *Rab32*) genlerini ifade eden perinükleer veziküller ile elde edilir; gerekli olan ankirin-tekrar-içeren protein (Varp) *Rab32/38* kompleksine spesifik bağlanarak *TYRP1/gp75'in* uygun melanozomal lokalizasyonunu sağlar. *Tyrp1* hem melanozomlarda hem de melanosit ve melanom hücrelerinin yüzeyinde ifade edilir. Flow sitometrisi ile tanımlandığı gibi TYRP1 proteini hem normal hem de malignant melanositlerde en bol bulunan glikoprotein olarak tanımlanmaktadır. Melanin üretiminde ilk adımdan sorumlu olan temel enzim TYR aktivitesinin düzenlenmesinde *TYRP1/gp75* geninin rolüne bakıldığında çalışmalar *in vivo* olarak bir heterodimer oluşturabildiklerinden *TYRP1/gp75'in*, *TYR* geninin stabilize edilmesinde ve intrasellüler trafiğinde stabilizasyonunun korunmasında rolü olabileceğini önermektedir. Yapılan diğer çalışmalar bu gözlemleri onaylar sonuç vermiştir. *TYRP1/gp75* kompleksinin ifade düzeyinin azalması, *TYR* aktivitesini olumsuz olarak etkilediği görülmüştür. İnsan melanom hücreleri, *TYRP1* cDNA'sı taşıyan bir retroviral vektörle transfekte edildiğinde, proteinin yeniden

oluşumu TYR aktivitesini uyararak melanogenezi başlatmıştır. *TYRP1/gp75*'in oksidatif streste rolüne bakıldığında ise; *TYRP1/gp75*'in anormal sentezi ve işlenmesi ve onun melanogenezi ile ilişkili bir şaperon olan kalneksin ile etkileşimi, oksidatif strese karşı artan duyarlılık sağladığından dolayı vitiligoda melanositlerin erken hücre ölümlerinden sorumlu olabilmektedir. Yapılan bir çalışma da ise oksidatif strese karşı melanosit koruması sağladığını göstermiştir. Melanositlerde *TYRP1* 'in varsayılan önemli rolünün birkaç dolaylı kanıtı gösterilmiştir: **1)** pigmenter bozukluklarla ilişkisi: Kahverengi lokustaki mutasyonlar farelerde deri rengi varyasyonlarına bağlıdır. Benzer şekilde, *TYRP1* mutasyonları insanlarda otozomal resesif geçiş gösteren okülokütan albinizm tip 3 (*OCA3*) denilen bir albinizm formundan sorumludur, **2)** diğer pigmente bağlı olmayan etkiler: *TYRP1*'deki mutasyonların, fare melanosit kültürlerinde hücre proliferasyonu ve melanozomal matürasyonu bozduğu gösterilmiştir, **3)** Melanositlerdeki tirozinaz protein ifadesi etnik kökene göre farklılık göstermemiştir, ancak hafif pigmentli Meksika, Çin ve Avrupa deri tipleri ile karşılaştırıldığında koyu pigmentli Afrika ve Hint cilt tiplerinde *TYRP1* proteini önemli ölçüde artmıştır (44,45).

B hücre lenfoma 2 (BCL2) gen ailesi üyesi olan ve 18q kromozomal bölgede lokalize olan (**BCL2**), B hücreli lenfomada, t(14;18) kromozomal translokasyonunda keşfedildiği için *BCL2* adını almıştır (46). Biyolojik olaylardaki temel önemi nedeniyle programlanmış hücre ölümü oldukça kompleks bir yoldur. Apoptozun düzenlenmesinde rol oynayan önemli bir protein grubu *BCL2* ailesidir. Bugüne kadar, 25'in üzerinde *BCL2* aile üyesi tanımlanmıştır. Bunlar genel olarak apoptozu aktif eden ve apoptozu inhibe eden moleküller olarak iki sınıfa ayrılmaktadırlar. Pro ve anti-apoptotik aile üyelerinin miktarının dokuya özgü ifade düzeylerinin kontrolü yapılır. Bugüne kadar belirlenen 25 *BCL2* aile üyesi, BH1, BH2, BH3, BH4 domain bölgelerinden en az birisini içerirler. Aile üyeleri yapı ve fonksiyonlarına göre 3 grup altında sınıflandırılırlar. **1)** Yapılarında BH1-BH4 domainleri bulunduran *BCL2*, *Bcl-XL*, *Mcl-1*, *A1* (*Bfl-1*), *Boo*, *Bcl-w*'yi içeren antiapoptotik üyeler. Bunların hepsi anti-hücre ölüm aktivitesi gösterir ve bazı üyelerin belirgin bir BH4 domain bölgesi içermemesine rağmen, özellikle dört bölgede, *Bcl-2* homolojisi (BH) 1 ile BH4 arasında sekans homolojisini paylaşırlar. **2)** *Bax*, *Bak*, *Bad*, *Mtd* (*Bok*), *Diva* gibi molekülleri içeren ve yapılarında BH1, BH2, BH3 domainleri bulunan proapoptotik üyelerdir. BH4 domaini içermemelerine rağmen bazı üyeleri BH4 homolojisi gösterirler, **3)** "*BH3-Only* proteinler" denilen ve *Bik*, *Bid*, *Bim*, *BMF*, *NOXA*, *PUMA*, *Hrk* (*DP5*), *Blk*, *Bnip3*, *Bnip3L*'yi içeren ve yapılarında yalnızca BH3 homoloji sekansları bulunan moleküllerdir (47). c-KIT sinyal iletimi melanositlerin yaşam süresini belirleyen antiapoptotik molekül *BCL2*'nin ifadesinde uyarır. Melanokortin sinyal yolağının aktivasyonu ile cAMP konsantrasyonu artarak CREB aktivasyonuna neden olur. Aktive edilen CREB doğrudan *MITF* geninin promotöründeki cAMP response elementine bağlanarak çeşitli genlerin ifadesini başlatır. *MITF*, antiapoptotik faktör *BCL2*'nin ifadenmesini artırır; melanositlerde *MITF* geninin delesyonu, bu hücrelerde geniş bir apoptozise neden olur (36).

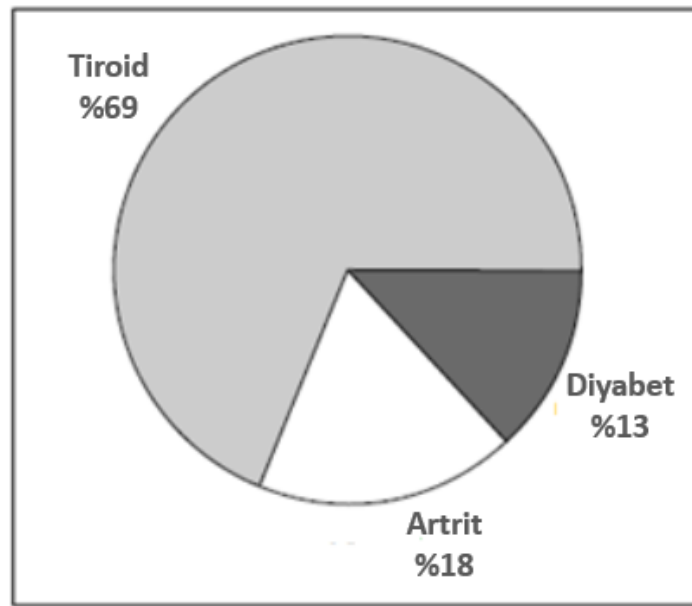
2.11.Vitiligo Hastalığının Etiyopatogenezi

Vitiligo, kronik, edinilmiş bir pigmentasyon bozukluğu olup dünya nüfusunun yaklaşık %0,5-1'ini etkileyen cilt hastalığıdır. Hastalık, ciltteki melanositlerin tahribinden kaynaklanan ve deride iyi sınırlanmış hipopigmente, asemptomatik lekelerle karakterizedir. Hastalıktan daha çok kadınlar şikayetçi olmasına rağmen, her iki cinsiyet de eşit derecede etkilenmektedir. Ailesel geçiş yaygın değildir. Vitiligonun multifaktöriyel poligenik kalıtımında diğer otoimmün hastalıklardaki gibi mendelyan olmayan kalıtım şekli görülmektedir. Vitiligonun etiyolojisi tam olarak aydınlatılamamasına ve çeşitli teorilerin geliştirilmesine rağmen, otoimmün hipotez, ortaya atılan hipotezler arasında en kabul gören hipotez olmaya devam etmektedir (8). Yapısal ve immünohistolojik çalışmalar, vitiligo lezyonlarında melanosit pigmentinin yokluğunu göstermektedir. Pigment hücrelerinin kaybına yol açan mekanizmalar henüz tam olarak anlaşılamamıştır. Melanositler nekroz veya muhtemelen apoptoz ile tahrip olmaktadır. Son yıllardaki veriler, melanositlerin transepidermal eliminasyonunu önermektedir. Vitiligo patogenezi ile ilgili çeşitli teoriler ileri sürülmüş olmasına rağmen en çok üzerinde durulan hipotezler olan; Otoimmün hipotez, adezyon defekt hipotezi, otositotoksik hipotez ve nöral disfonksiyon hipotezleri olup; hala güncelliğini korumaktadır. Bu hipotezler arasında, son yıllarda yapılan çalışmalar vitiligonun patogenezinde otoimmün hipotezini destekleyen güçlü kanıtlar olduğunu göstermiştir (48). Addison hastalığı, hipotiroidi, pernisiyöz anemi ve sistemik lupus eritematozus gibi otoimmün hastalıklar ile olan ilişki; majör histokompatibilite kompleksi (*Major Histocompatibility Kompleks II*-MHC II) antijenlerinin ve diğer otoimmün duyarlılık genlerinin bazı allellerinin varlığı, vitiligolu hastaların serumunda organa spesifik antikorların (anti-ANA, anti-gastrik parietal hücreler) saptanması otoimmün hipotezi desteklemektedir. Topikal immün baskılayıcı tedaviye olumlu tepki ile birlikte (topikal steroidler ve takrolimus); hayvan modellerinde yapılan çalışmalar, özellikle oto-reaktif T hücrelerinin gösterilmesinde immün hücrelerin katılımı ve melanositlerde farklı antijenlere karşı antikorların varlığı, otoimmün hipotezi birçok açıdan desteklemektedir (49).

2.11.1.Otoimmün hipotez

Vitiligo patogenezinin çeşitli immün sistem hastalıkları ile birlikte görülmesi etiyolojide otoimmün bozuklukların da hastalığın patogenezinde rol oynayabileceğini düşüncesini güçlendirmiştir. Günümüzde yapılan araştırmalar, yaygın olarak birkaç faktörün sinerjik ya da bağımsız olarak melanositlerin kaybolmasına neden olabileceği teorisi üzerinde durmaktadır. Vitiligonun ortaya çıkma aşamasında, deriye fiziksel travma, duygusal stresler ve endojen sinirsel faktörlerin, metabolitlerin veya hormonlardaki fonksiyonel tetikleyicileri melanositlerde

oksidatif strese neden olduğu bilinmektedir. Bu etkilerden herhangi birinde ısı-şok proteini 70 (Hsp 70) ve melanosit antijenlerinin aktif olarak salgılandığı görülmüştür. Bağışıklık aktivasyonu aşamasında, bu "tehlike" sinyalleri, antijen sunan dendritik hücrelerin aktivasyonunu ve antimelanosit otoreaktif sitotoksik T lenfositlerinin deride toplanmasına neden olmaktadır (50). İlginç bir şekilde, bazı hastalarda deride depigmentasyondan hemen önce kaşıntı rapor edilmiş, bu da aktif hastalıkta mast hücreleri tarafından histamin ve diğer enflamatuvar düzenleyicilerin salınımını işaret etmektedir. Melanositler MHC I ve MHC II moleküllerini, intrasellüler adezyon molekül-1 (ICAM-1), vasküler adezyon molekül-2 (VCAM-1) gibi adezyon moleküllerini, interlökin (Interleukin-IL) IL-1, -6, -8 gibi sitokinleri ve transforme büyüme faktörü $\beta 1$ (TGF $\beta 1$) gibi büyüme faktörlerini de salgılamaktadır. Ayrıca, melanositler sadece fagositoz değil antijenleri de işleyebilme ve antijenik peptitleri T hücrelerine sunabilme özelliklerine de sahiptirler. *Mycobacterium leprae*'nin 65-kd ısı şok proteinine antijenik peptitleri sunan melanositler; sadece T hücresi proliferasyonunu indükleyemediğinden bu sitotoksik T hücrelerinin hedefi haline gelir. Bu çalışmalar melanositlerin bir çeşit profesyonel olmayan antijen sunan hücreler (APC) olduğunu göstermekte ve vitiligoda melanositlerin otoimmün yıkımına farklı bir bakış açısı sağlamaktadır. Steroidler ve UV ışını gibi immünosüpresif repigmentasyon tedavi yöntemlerinin, hastalarda yararlı etki sağlaması, indirek olarak otoimmün patogenezi desteklemektedir. Vitiligonun Hashimoto tiroiditi başta olmak üzere, diğer otoimmün hastalıklar arasındaki ilişkisi, immün faktörlerin vitiligo hastalığına neden olabileceğini desteklenmektedir. Vitiligo hastaları arasında Hashimoto tiroiditi insidansı genel popülasyona göre 2,5 kat artmıştır (51, 52). Otoimmünitenin bazı segmental olmayan vitiligo hastalarında birlikte görülmesi, bu hastaların Psoralen ve UVA (PUVA) ve topikal- oral kortikosteroidler gibi immünsüpresif tedavilere olumlu cevap vermeleri, özellikle hastalarda ve aile bireylerinde lupus eritematozus, sedef hastalığı, alopesi areata, halo nevüs ve otoimmün tiroid gibi otoimmün hastalıklarla sıklıkla birlikte görülmesi, otoimmün hipotezini güçlendirmektedir (Şekil 2.10) (53).

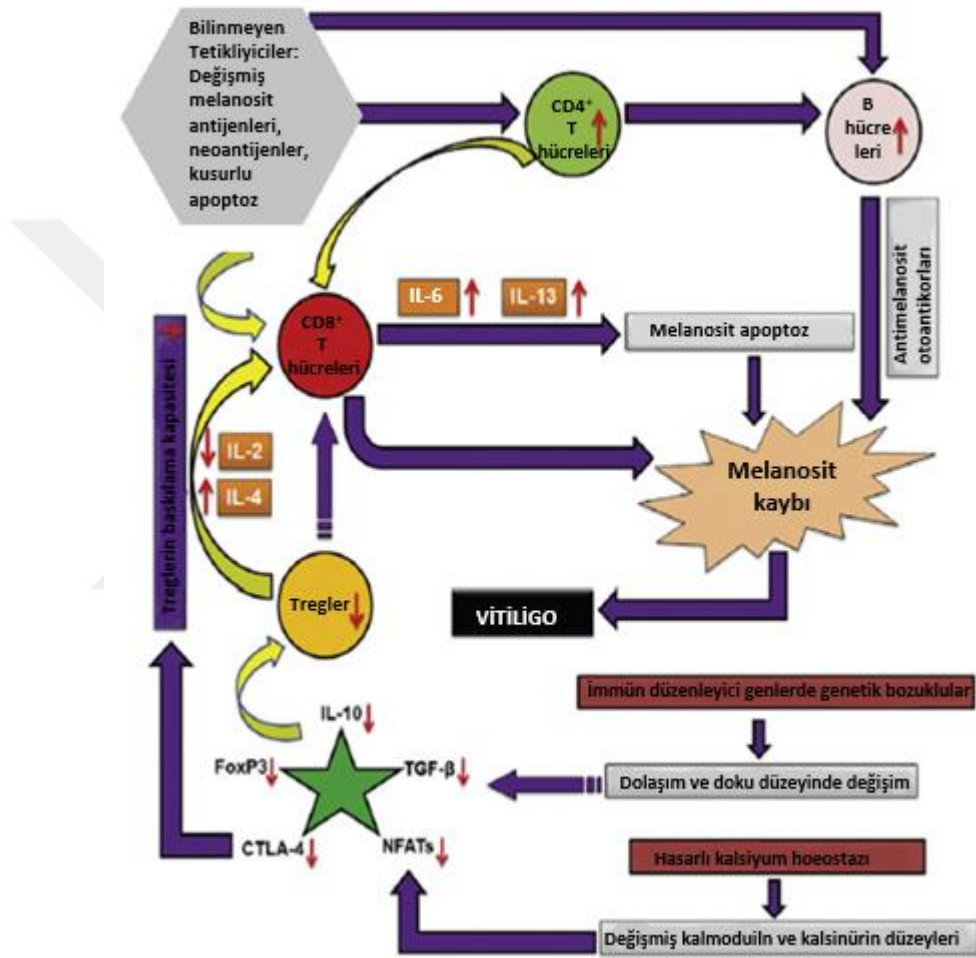


Şekil 2.10. Vitiligo hastalarındaki otoimmün hastalıklar. Diğer otoimmün hastalıklara sahip olan vitiligo hastalarının yaklaşık üçte biri arasında hastalık prevalansı. Vitiligo hastalarında otoimmün tiroidin görülme prevalansı, diğer otoimmün hastalıklara göre yaygındır. Belirtilenler dışındaki hastalıklar, sedef hastalığı ve Raynaud hastalığıdır ve düşük frekanslarda görülürler (52).

Bu bağlamda, sistemik kortikosteroidlerle yapılan tedavinin, vitiligolu hastalarda melanositlere karşı antikor aracılı sitotoksiteyi azalttığı saptanmıştır. Buna ek olarak, iki büyük epidemiyolojik çalışmada vitiligonun, özellikle tiroid hastalığına sahip bireylerde, otoimmün komorbiditelerin farklı yaygınlık oranları bulmuştur; Çinlilerde %7,7, Kafkasyalılarda %20 daha yaygın olarak görüldüğü gözlenmiştir. Vitiligo hastalığının patogenezinde anormal humoral ve hücrel bağışıklık eşlik etmektedir. Özellikle immünglobulinlerden IgG sınıfı, *anti-tirozinaz* ilişkili protein 1 ve 2, serum serin otoantikorların yüksek seviyeleri, hastaların %5-10'unda görülmesine rağmen vitiligo patogenezinde anti-melanosit antikorlarının rolü belirsizliğini korumaktadır. Bunların varlığının keratinosit ve melanosit hasarlarında sekonder faktörler olabileceği öne sürülmüştür (9, 52).

Antijene spesifik yapılan çalışmalarda ise, vitiligo'da melanositlerin CD8+ T hücre aracılı yıkımının gerçekleştiği gösterilmiştir. Melanositlere özgü öldürme kapasitesine sahip CD8+ T hücreleri, sağlıklı kontrollere kıyasla vitiligolu hastaların kanlarında artmakta ve bu artışın hastalığın aktivitesi ile ilişkili olduğunu göstermektedir. Vitiligolu hastalardan elde edilen deri biyopsi örneklerinde T hücrelerinin infiltrasyonu rapor edilmiş ve epidermisteki ölmekte olan melanositlerin yanında CD8+ T hücreleri bulunmuştur (54). Harris ve arkadaşları, melanositlere spesifik CD8+ T hücreleri kullanarak; epidermal depigmentasyonu indüklenen, vitiligolu bir adaptif transfer fare modelini kullanarak vitiligo lezyonlarının yayılımında merkezi bir rol oynayan, interferon gama (IFN- γ) 'nın önemli rol oynadığını keşfetmişlerdir. Depigmentasyonun

ciltte otoreaktif CD8+ T hücrelerinin birikimi, tirozinaz transkriptinin kaybı ve lokal IFN- γ üretimiyle gerçekleştiğini ayrıca spesifik olarak, IFN- γ 'nın CD8+ T hücreleri tarafından epidermal ve foliküler doku istilasını düzenleyen bir kemokin olan C-X-C Motif kemokin Ligand 10 (CXCL10) ekspresyonunda artışa neden olduğunu göstermiştir (İnsanlarda görülen vitiligo hastalığına benzer olarak farelerin depigmente cilt histolojisinde epidermiste yamalı bir mononükleer ve epidermisin tek hücreli infiltrasyonu görülmektedir) (Şekil 2.11) (55).



Şekil 2.11. Vitiligoda melanosit yıkımında düzenleyici T hücrelerinin rolü. Vitiligoda potansiyel Treg hücre defektlerinin melanosit kaybına neden olabileceğinin şematik gösterimi. Özellikle timusta pozitif veya negatif seçimde Treg hücrelerinin periferel dengesizliğine neden olabilen azalmış Treg hücre sayısından dolayı veya anormal Treg hücre gelişimine ve fonksiyonuna yol açan genetik yatkınlık, artmış sayıda otoreaktif CD8+ ve CD4+ T hücrelerini baskılamada başarısız olur. CD8+ T hücrelerindeki artış melanositleri granzim B veya perforin yolağından yok edebilir veya IL-6 ve IL-13 gibi sitokinlerle apoptoz yoluyla melanosit kaybına neden olur (50).

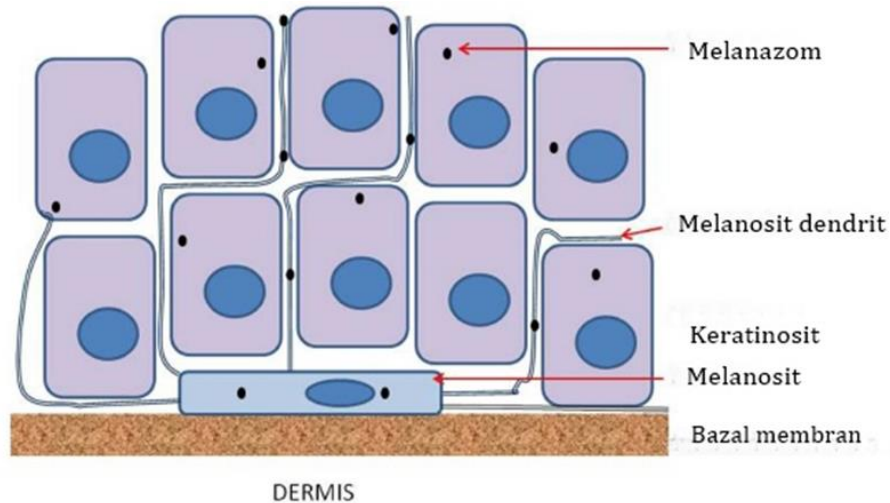
Melanositler hücrel strese girdikleri zaman doğuştan gelen bağışıklık sistemini harekete geçiren inflamatuvar sinyalleri serbest bırakırlar ki, bu olay hastalığı başlatan tetikleyici mekanizma olarak düşünülebilir. Yapılan çalışmalar, bazı vitiligolu hastaların lezyonlarında, doğal öldürücü hücreler (NK) ve inflamatuvar dendritik hücrelerin dahil olduğu doğal bağışıklık hücrelerinin anormal aktivasyona sahip olduğunu bildirmiştir. Bu durum da doğuştan gelen bağışıklık sisteminin hastalığın patogenezinde rol oynadığını göstermektedir. Antijen sunan hücreler lenf nodlarını drene ederek melanosit antijenlerini T hücrelerine sunar ve aktive eder, böylece hücrel stres ve adaptif T-hücre yanıtlarının başlamasını sağlarlar. Ayrıca doğuştan gelen bağışıklık sistemi hücreleri, lokal olarak, doğrudan melanositleri öldüren otoreaktif T hücrelerini aktive eden sitokinleri de salgılayabilir (56).

Literatürde vitiligo hastalarının serumlarında az ya da çok miktarda spesifik otoantikorların olduğunu gösteren çalışmalar mevcuttur. Bu otoantikorlar normal bireylerde veya diğer cilt hastalıkları olan hastalarda nadirdir ve pigment dışı hücre antijenlerine (ortak doku antijenlerine), sitoplazmik pigment hücre antijenlerine ve pigment hücre yüzey antijenlerine karşı antikorlarla ilgilidir. Bu yüzey antikorları ve melanositlerin sitoplazmik antijenleri araştırmacılar arasında özel ilgi uyandırmış; immünopresipitasyon, indirekt immüno Floresans, immüno blotlama ve konvensiyonel ELISA'yı içeren yöntemlerle tespit edilmiştir. Bunların işlevleri kompleman bağımlı sitotoksiste, antikor bağımlı hücrel sitotoksiste ve pasif transfer deneylerle araştırılmıştır. Birkaç spesifik otoantijen saptanmıştır. Cui ve diğerleri tarafından tespit edilen hiçbir antijen yokken yaygın olarak bulunan melanosit antikorları, vitrin 40 (VIT 40), insan lökosit antijeni 1 sınıf I (HLA class I) moleküllerle ilişkili veya sıkı bağlanmışlardır. Melanozomlarda lokalize olan ve melanin sentezi ile ilgili temel enzimler TYRP1 ve TYRP2 de son zamanlarda otoantijenlerle ilişkilendirilmiştir. Bununla birlikte, antikor aracılı yıkım, hedef antijenlerin zar ifade etmesini gerektirir. İlginç bir şekilde, TYRP1'in melanositlerin ve melanoma hücrelerinin hücre yüzeyi üzerinde sentezlendiği görülmüştür; bu da in vivo melanosit yıkımı için bir hedefi temsil etmektedir (57,58).

2.11.2. Adezyon Defekt Hipotezi

Vitiligo cildin depigmentasyona uğramış bölgelerinde melanositlerin kademeli olarak kaybıyla karakterizedir. İntrinsik ve ekstrinsik mekanizmalar vitiligo etiyolojisinde hala tartışılmaktadır (59). Melanositler dermisi epidermisten ayıran ve milimetre başına yaklaşık bin hücre yoğunluğunda olan bir fibröz protein tabakasıdır. Bu yoğunluğun miktarı yaşam boyunca devam etmektedir. Cilt tabakası melanosit, keratinosit, langerhans adacıkları ve içerisinde kan damarlarının, sinir hücrelerinin, adipositlerin, makrofajların ve fibroblastların bulunduğu dermis tabakasından oluşmaktadır (Şekil 2.12). Üç epidermal hücre tipi ve birçok dermal hücre

tipleri *Toll-Like-Reseptör* (TLR)'yi eksprese ederek konakçı bağışıklıkta patojenlerin tanınmasını sağlar. Bazal membrandaki melanositler melanini sentezleme ve veziküller (melanozomlar) aracılığıyla epidermis içindeki keratinositlere taşıma fonksiyonu da vardır, böylece UV ışığından kaynaklanan hasardan epidermisi korumaktadırlar (60). Melanositler keratinositlere kıyasla zayıf olarak taban zarına bağlanır. Melanositlerin yapışması, yayılması ve migrasyonuna integrinler aracılık ederken, melanositler ve keratinositler arasındaki etkileşimler kaderinler ile yapılmaktadır. Melanositlerin adhezyonu endotelin-1'in düzeyiyle ilişkilidir. E-kaderin insan melanositinin keratinositlere yapışmasını sağlayan aracı moleküldür. Melanosit; dendritlerin adezyon, migrasyon ve melanozom transferinde önemli role sahiptir (61). Epidermal melanositler genellikle epidermisin bazal katmanına entegre olurlar fakat melanositik transplantasyon, sodyum lauril sülfatın topikal uygulanması, melanositik hücrelerin UV ışınlarına maruz bırakılması ve HaCaT epidermal hücrel hatlarıyla yapılan çalışmalarla gösterildiği gibi melanosit hücreleri çeşitli klinik ve deneysel koşullarda bazal yerleşimlerinden ayrılabilirler (62). 2003'te Gauthier ve ark. NSV'nin travma nedeniyle etkilenen melanositlerin kronik bir şekilde ayrılmasından, özellikle de sağlıklı cildin mekanik olarak sürtünmesinden kaynaklanabileceğini öne sürerek "*melanocytorrhagy teorii*" olarak adlandırılan bir hipotezi ortaya atmışlardır (63). Cario-Andre ve arkadaşları *in vitro* bir çalışmada, NSV'de melanositlerin, yeniden yapılandırılmış bir epidermisdeki yapışmalarını vitiligo keratinosit ortamının bir arttırıcı etkisi ile sınırlandıran intrinsik bir defektinin olduğunu ortaya koyduğunu öne sürmüşlerdir (61).



Şekil 2.12. Bazal membran üzerindeki epidermis ve dermis tabakaları arasında lokalize olan melanositler (60)

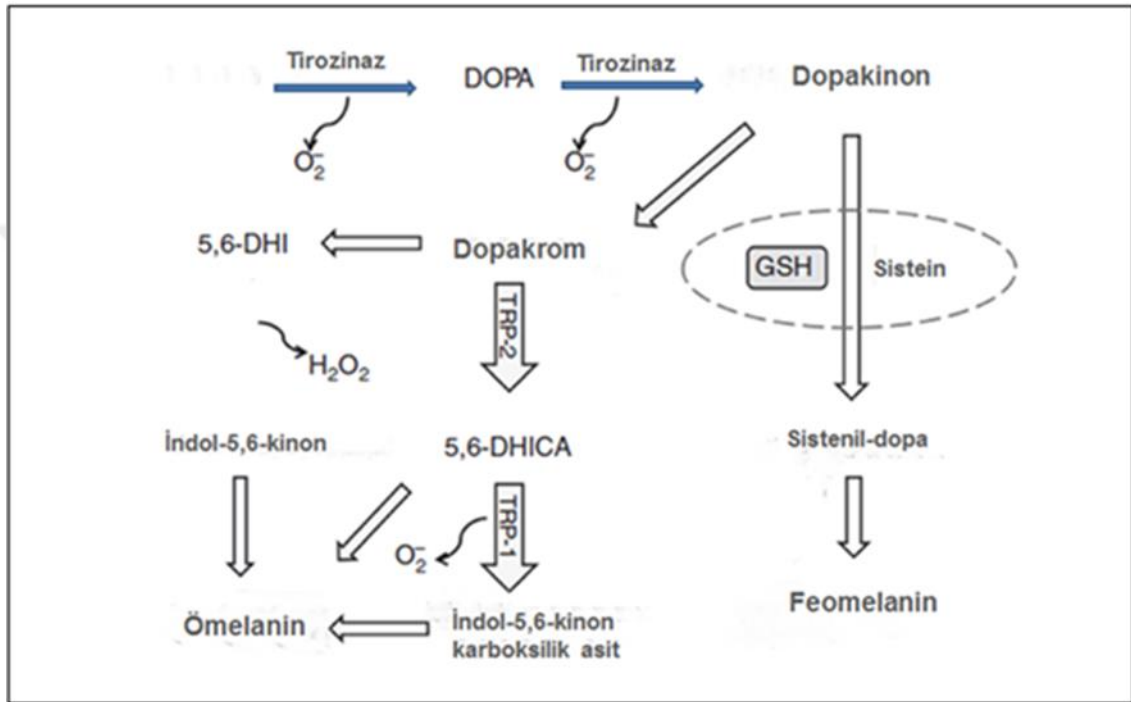
Generalize vitiligonun alt grubundaki (ortak, akrofasiyal ve evrensel tipleri içeren) vitiligo türlerine sahip hastalarla yapılan deneysel çalışmada etkilenmemiş cildin mekanik sürtünmesinden sonra melanositlerin ayrıldığı görülmüştür. Bu gözlem, segmental olmayan

viteligo'da "*melanocytorrhagic*" (melanositlerin kronik yapışma ve transepidermal kaybı) adı verilen ve primer bir bozukluk olduğu düşünülen yeni bir hipotezin ortaya atılmasına yol açmıştır. Bu durum sonucunda muhtemelen melanositlerin sürtünmeye ve olasılıkla diğer stres türlerine tepkisi değişmekte ve sonrasında bu da hücre ayrılmasına, sonuçta akut bir şekilde melanositlerin (çoğu hastada lezyonların aniden görülmesi nedeniyle) transepidermal kaybına neden olmaktadır (9). Yukarıdaki bulguların bir sonucu olarak, melanosit kaybını açıklamak için bazı adezyon proteinleri araştırılmıştır. Sistein bakımından zengin protein 61 (Cyr61), Bağ dokusu büyüme faktörü (CTGF) ve aşırı eksprese nefroblastoma geni (NOV) üç üyesinin baş harflerinden adını alan CCN ailesi proteinleri; hücre büyümesi, adezyon, migrasyon, anjiyogenez ve hücre dışı matriksin düzenlenmesi de dahil olmak üzere çeşitli biyolojik fonksiyonlara aracılık eden, ekstrasellüler matriks yerleşimlerini düzenlenmesini sağlayan sinyal molekülleridir. CCN aile üyesi genlerinin değiştirilmiş ekspresyonu, fibrotik bozukluklar ve tümörler de dahil olmak üzere birçok bozukluk ile ilişkilidir. Diskoidin domain reseptör tirozin kinaz 1 (DDR1), birkaç kolajen tarafından aktive edilen transmembran tirozin kinaz reseptörüdür. Ekstrasellüler matriks CCN3/NOV'ye bağımlı hücrenin tip IV kollajene yapışmasına aracılık etmektedir. Le Poole ve ark., bir hücre dışı matris molekülü tenaskinin vitiligo hastalarında arttığını, böylece melanosit yapışmasını azaltabileceğini vurgulamışlardır. Melanositlerin bazal cilde yapışmasında rol oynayan bir molekül olan DDR1'in ekspresyon düzeyinin vitiligo hastaların lezyonlu bölgelerinde azaldığı gösterilmiştir. Buna ek olarak, vitiligo'nun sadece melanositleri değil, aynı zamanda tüm epidermisi de etkileyen bir hastalık olduğu öne sürülmüştür. 2006 yılında, Fukunaga-Kalabis ve ark. melanositlerin bazal tabakaya bağlanmasının kısmen CCN3'ün kontrolü altındaki tip IV kolajen reseptör DDR1 ve CCN3 moleküllerinin fonksiyon kaybının melanositlerin ayrılmasına neden olduğunu bildirmişlerdir (64,65).

2.11.3.Biyokimyasal Hipotez

Cildin hücrel homeostazı; süperoksit anyon (O_2^-), hidroksil radikalleri (OH), hidrojen peroksit (H_2O_2), peroksinitrit anyon ($OONO^-$) ve nitrik oksit (NO), gibi endojen ve eksojen reaktif oksijen türlerine (ROS) karşı savunma mekanizmaları tarafından korunmaktadır. Bu savunma mekanizmalarında, süperoksit dismutaz, malondialdehit, katalaz, glutatyon redüktaz, glutatyon peroksidaz, glutatyon-S-transferaz, tioredoksin redüktaz, tioredoksin peroksidaz ve metiyonin sülfoksit redüktaz A ve B gibi enzimleri görev yapmaktadır. Ayrıca glutatyon ve tioredoksin (T), lipoik asit, vitamin C (askorbik asit) ve E (alfa-tokoferol), bazı amino asitler (metiyonin ve triptofan), selenyum ve 6 ve 7-tetrahidrobiopterinler gibi küçük moleküller ayrıca ciltte antioksidanlar gibi davranmaktadırlar (66). Melanin sentezi oksidatif reaksiyonlara ve melanositleri oksidatif strese maruz bırakan O_2 ve H_2O_2 üretimini içerir. Melanozomlarda melanin sentezinin sınırlanması diğer hücrel bileşenleri oksidatif hasardan korur. Melanin

sentezinde kontrol enzimi olarak görev yapan tirozinaz; tirozini dopaya ve dopayı da oksitleyerek tioller veya amino grupları gibi nükleofilik bileşiklerle reaksiyona girebilen özel bir ortokinon olan dopakinon'a oksitler. Tirozinazın katalitik aktivitesi, O_2 'nin oluşumuyla sonuçlanır. Dopakinon, bir redoks değişimi yoluyla dopakroma dönüştürülür. Spontan dekarboksilasyon sonrasında, dopakrom TYRP2 tarafından tautomerleştirildikten sonra indol kinona okside olan dihidroksiindol karboksilik asit (5,6-DHICA) üreten dihidroksiindol (5,6-DHI) üretir. 5,6-DHICA daha sonra karşılık gelen kinona dönüştürülür (Şekil 2.13). (67).

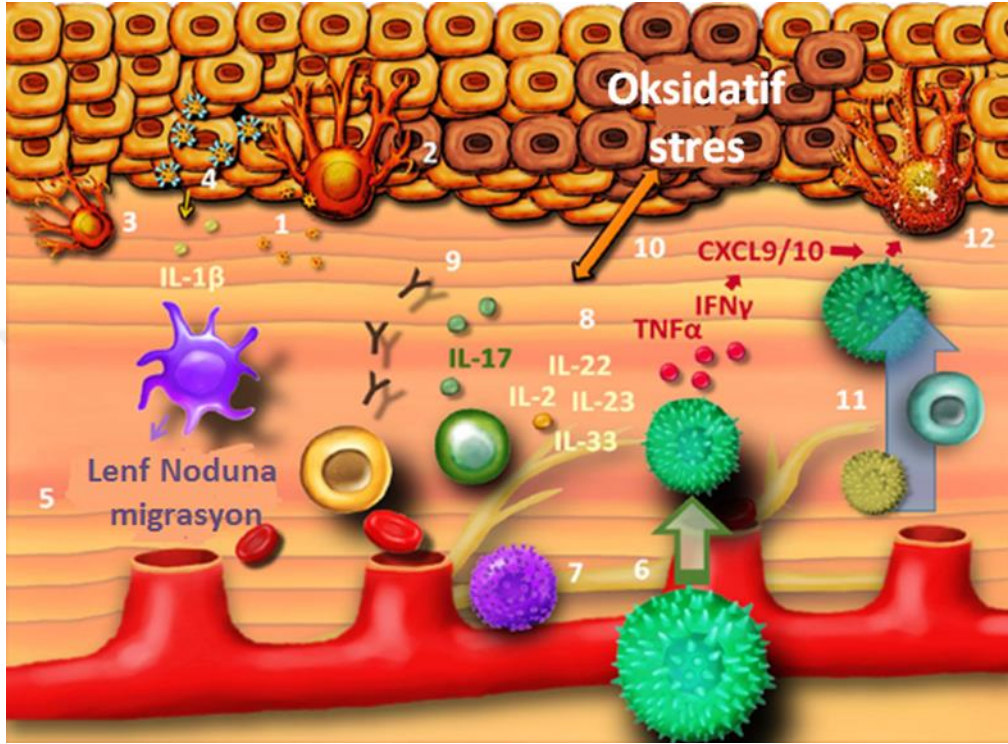


Şekil 2.13. Melanin sentez yolağında çeşitli basamaklarla reaktif oksijen türlerinin (ROS) oluşumu (67).

Oksidatif stres, ROS oluşum hızının hücre kaldırma kapasitesini aştığında meydana gelmektedir. Çok sayıda endojen epidermal ROS kaynağı tespit edilmiştir. Büyüme faktörlerinin, hücrelerde ROS üretmesini sağladığı rapor edilmiş ve vitiligo hastaların cildinde tümör nekroz faktör (TNF), bazik fibroblast büyüme faktörü (bFGF), IL-6 ve IL-1 gibi büyüme faktörlerinin yüksek düzeyi görülmüştür (66). Vitiligolu hastaların kanlarında okside stres belirteçlerinin artmış miktarı (süperoksit dismutaz, malondialdehit, reaktif oksijen türleri) ve antioksidatif mekanizmaların (katalaz, glutatyon) çalışmadığıyla ilgili veriler literatürde büyük oranlarda bulunmaktadır. Bu durumun sonraki aşamalarda immün aracılı melanosit yıkımıyla sonuçlanacağı öne sürülmüştür. Ne yazık ki, antioksidanların vitiligoda kullanımında sınırlı başarıya ulaşılmıştır. Vitiligo hastalığında oksidatif stresin hastalığın tam olarak nedeni veya inflamatuvar cevabın bir yan etkisi olup olmadığı henüz açıklığa kavuşturulmamıştır. Bununla birlikte, yapılan *in vitro* çalışmalarda melanositler, oksidatif strese karşı artmış bir duyarlılık

göstererek hücrel ölümle sonuçlanmaktadır (Şekil 2.14) (68). Vitiligo'nun, katekolaminler, kinonlar ve reaktif oksijen türleri gibi toksik metabolitlerin üretilmesine yol açan ve melanosit hasarına neden olan metabolik yoldaki işlev bozukluğundan kaynaklanabileceği hipotezi yaygın bir şekilde araştırılmıştır. Oksidatif stresin melanositlerin hasarında rol oynadığı, vitiligolu hastaların epidermisinde oksidan/antioksidan sistemler arasında bir dengesizlik olduğuna dair kanıtlarla desteklenmektedir (9). Vitiligo hastalarının lezyonlarındaki melanositlerin kültürde oksidatif strese duyarlılıklarında artış gösterdiği ortaya çıkmıştır. Schallreuter ve ark. vitiligolu hastaların epidermislerinde, *in vivo* $10^{-3}M$ üzerinde bir H_2O_2 konsantrasyonu oluşabildiğini gözlemlemiştir. Vitiligolu hastaların epidermisinde monoamin oksidaz A'nın (MAO-A) artışı, Nikotinamid Adenin Dinükleotid Fosfat Oksidaz (NADPH)-oksidazın artmış aktivitesi, (6R)-L-eritro 5,6,7,8-tetrahidrobiopterin (6-BH4) sentezi/geri dönüşüm/düzenlenmesinde dengesizlik gibi endojen H_2O_2 üretiminin olası kaynakları belirlenmiştir. Etkilenen hastaların epidermisinde gözlenen artmış 6-BH4 üretiminin muhtemel sonuçlarından biri, L-fenilalanin'den L-tirozin üretmekten sorumlu fenilalanin hidroksilaz enziminin inhibisyonudur ki bu da düşük tirozin seviyelerine neden olur. Bu durum da melanin sentez mekanizmasında hasara yol açar. Lezyonlu ciltte redoks dengesinde bir değişikliğin melanosit hasarına ve hipopigmente lekelere neden olabileceği düşünülmektedir. Nitekim, süperoksit dismutaz (SOD) aktivitesindeki bir artış birkaç araştırma tarafından bildirilmiştir. Bununla birlikte, birincisi, nitrik oksit sentaz (NOS) ve NADPH oksidaz aktivitelerinde artış; ikinci olarak, katekolamin üretimini artırarak doğrudan ve dolaylı bir sitotoksik etkiye neden olan MAO-A'da ki bir artış lezyonel ciltte H_2O_2 düzeyindeki artışın çeşitli nedenleri olabilir. MAO-A nöradrenalinini degrade eden enzim olup katekolaminin oksidasyonundan bir reaksiyon ürünü olarak H_2O_2 oluşumunu sağlar. Bu durum zihinsel stresin vitiligolu hastalarda hipotalamik-pituiter-adrenal eksenini aktive ederek lezyonların oluşumunu açıklayabilir (9,69-71). Ayrıca yapılan bazı çalışmalar hastalığın başlangıcındaki hastalarda, kronik hastalara göre plazma ve üriner monoaminlerin ve metabolitlerinin belirgin olarak daha yüksek olduğunu göstermiştir. Vitiligolu hastaların epidermisindeki, katekolamin düzeyleri ve MAO-A ve/veya katekol-O-metil transferaz (COMT) aktivitesindeki artışlar, hastalığın evresinden bağımsız olarak bulunmuştur (43). Lokal ve sistemik yüksek H_2O_2 seviyeleri, kalsiyum homeostazını değiştirerek melanositlerde tirozinin amino asit öncülü olan L-fenilalaninin alımını durdurabilir. Buna ek olarak, ROS, etkin melanogenez mekanizmasının devamını sağlayan ve önemli rol oynayan proopiomelanokortin türevli biyoaktif peptidler adrenokortikotropik hormon (ACTH) ve alfa melanosit stimüle edici hormonu (α -MSH) okside ve inhibe edebilir. Bu moleküllerin salınımları, tirozinaz ve tirozinaz ile ilişkili proteinler *TRP1* ve *TRP2* (veya dopakrom tautomeraz, DCT) gibi melanin sentezinde rol alan anahtar genlerin ekspresyonuna yol açan bir hücre içi sinyal dizisini aktive eder. Melanin pigmentleri tirozinaz ve ilgili proteinleriyle melanosit içinde üretilir. Son zamanlarda, kalneksin ve lizozom ilişkili membran proteini-1

(LAMP-1)'in de tirozinaz ile etkileşim yoluyla melanogeneze rol aldığı gösterilmiştir. Tirozinaz ve *TYRP2*'nin fonksiyonu tam olarak belirlenmiştir, ancak *TYRP1*'in biyolojik rolü halen tartışmalıdır ve insanlarda iyi bilinmemektedir. Fareler ile yapılan deneysel çalışmalarda, *TYRP1* mutasyonu, DHICA oksidaz olarak işlev yaparak kahverengi renk pigmentinin oluşumunda genin ifadesini etkilemektedir (71-73).

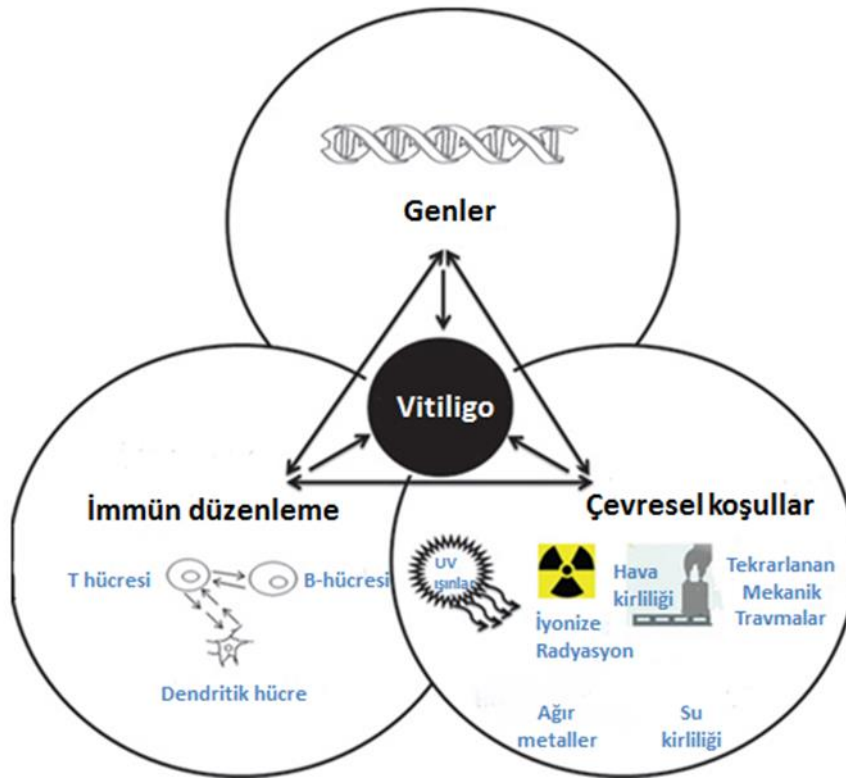


Şekil 2.14. Minör yaralanma sonrası NSV vitiligo patogenezi. Minör yaralanmadan sonra hasara bağlı olarak moleküller salınması (1) ve oksidatif stres artar (2). Melanositler adezyon özelliklerini kaybederler (3) ve inflamazomlar aktive olur (4). Bu proinflamatuar sinyal, antijenin işlenmesine yol açar ve lenf nodlarının drenajında dendritik hücre sunumunu gerçekleştirir (5). Spesifik sitotoksik T hücreleri ciltte oluşur (6). Azalan düzenleyici T hücre aktivitesi sonucu (7), lenfositler inflammatuar sitokinler (8) ve otoantikorlar üretirler (9). Oksidatif stresle sitokinler bağışık yanıtı arttıran karşılıklı bir uyarıyı stimüle eder (10). Sitotoksik T hücrelerini deriye doğru toplanmasını sağlayan bir kemokin gradiyenti oluşur (11). Bu, melanositlerin (12) C-X-C motifli kemokin ligandı (CXCL), interferon (IFN), interleukin, tümör nekroz faktörünün (TNF) immün sistem temelli yok edilmesini sağlar (68).

2.12. Vitiligo Hastalığı ve Genetik Çalışmalar

İnsan hastalıklarının çoğu, genetik varyasyonlar ile çevresel faktörler arasındaki etkileşimden kaynaklanır. Genetik faktörlerin asıl katkısını belirlemek, etiyopatogenezi kompleks olan hastalıkları değerlendiren genetik çalışmaların ilk adımıdır. Genel olarak, kompleks hastalıkların genetik bileşenlerinin incelenmesi; ailesel vakalarda pedigrî analizi, monozigot (MZ) ve dizigotik (DZ) ikizlerde konkordans oranları ile karşılaştırmalı çalışmalar ve kompleks segregasyon analizleri (CSA) gibi gözlemsel çalışmalarla başlar. Bununla birlikte, bu çalışmalar

hastalığa neden olan söz konusu genetik faktörün tam olarak ne olduğunu, ilgili genlerin yeri ve kimliği hakkında bilgi sağlayamamaktadır. Bu nedenle hastalığın patogenezinde rol alan moleküler genetik belirteçlerin ortaya çıkarılması için bağlantı ve ilişki analizlerinin yapılması gerekmektedir (9). Vitiligo hastalığında melanosit kaybının tek bir dominant geçişle ortaya çıkması muhtemel görünmemektedir ve genetik, çevresel, biyokimyasal, immünolojik mekanizmalar arasında meydana gelen kompleks etkileşimlerin hastalığın ortaya çıkmasında gerekli çevreyi oluşturma olasılığı yüksek görünmektedir (Şekil 2.15) (74).



Şekil 2.15. Vitiligo patogenezinde genlerin, çevrenin ve bağışıklık sisteminin etkileşimi. Genlerin, çevre ve bağışıklık sistemi ile etkileşimi vitiligo hastalığına neden olur. Çevresel tetikleyicilerin etkisi altındaki duyarlı genler: çeşitli çevresel kaynaklardan (UV ve iyonlaştırıcı radyasyon, hava ve su kirliliği, ağır metaller vs.) ROS üretimi ve tekrarlanan mekanik travmalar otoimmüniteye neden olan anormal immünolojik yanıtlara (yani hücreyel ve humoral bağışıklık tepkisi) neden olabilir (74).

Vitiligo, saç ve derideki melanositlerin seçici olarak tahrip edilmesiyle ortaya çıkan, poligenik veya multifaktöriyel kalıtım şekli gösterebilen yaygın bir depigmentatif hastalıktır. Vitiligo hastalığının hastaların yakın akrabalarında daha yaygın olarak görülmesi, hastalığın patogenezinde kalıtımın etki derecesine dair kanıt sağlamıştır. Vitiligo genel popülasyonda yaklaşık %1 oranında görülmesine rağmen bir hastanın kardeşinin hastalığa yakalanma riski %6, tek yumurta ikizleri için ise oran %23'tür. Ayrıca araştırmalar, vitiligo hastalığında aile öyküsünün hastaların %6.25-38'inde var olduğunu göstermektedir. (75,76). Hastalığın

patogenezinde genetik etmenlerin rolü, bağlantı ve ilişki çalışmaları yoluyla tespit edilmiş fakat tekrarlı yapılan çoklu çalışmalarda NLR ailesi pirin domaini içeren gen 1 (NALP1) ve bazı HLA alelleri gibi sadece birkaç gen/lokusun hastalıkta görüldüğü gösterilmiştir. Vitiligo gibi patogenezi kompleks hastalıklarda ve farklı popülasyonlarda hastalığa yatkınlık varyantların keşfi için bir seri *Genome Wide Association Study* (GWAS) çalışmaları yapılmıştır (77). Vitiligonun ailesel yatkınlığını araştıran çalışmalara 1933 yılı gibi erken bir tarihte rastlanılmaktadır (78). Ailesel geçişte, genetik ve çevresel etmenlerin etkisini ortaya çıkarmak amacıyla birçok ülkede ve çeşitli etnik popülasyonlarda vitiligo ile ilgili epidemiyolojik araştırmalar yapılmıştır. Bu çalışmalar vitiligo etyolojisinin altında yatan herhangi bir çevresel faktör belirleyemediğinden hastalığın oluşumunda genetik bir katılımı desteklemektedir. Klinik olarak, vitiligonun küçük bir kısmı otozomal dominant veya resesif kalıtım şeklinde geçebilmektedir. Bununla birlikte birçok olguda, vitiligo ailevi öyküsü olmadan sporadik bir şekilde meydana gelmektedir. Dolayısıyla, vitiligo genetik modelinin belirlenmesine ilişkin çalışmalar çelişkili sonuçlar vermektedir. Bunlar, tamamlanmamış penetrans ile otozomal dominant tek lokus, otozomal resesif ve %72,4 oranında kalıtım ile çoklu faktörlerdir (79).

Ciltteki melanokortin sistemi; lokal pigmentasyon, bağışıklık, epidermal, adneksiyal ve vasküler yapı ile cilt fonksiyonunu stabilize eder ve iç homeostazın korunmasını sağlar. Vitiligoda gen ekspresyon çalışmaları, çeşitli immünmodulasyon, melanogenez, melanositlerin gelişimi-düzenlenmesinde görevli genlerin ekspresyon patternlerinin değişimlerini analiz etmek için yapılmaktadır. Reimann ve arkadaşları, vitiligo hastaların deri ve periferik kan mononükleer hücrelerinde melanogenez ve melanositlerin gelişimi, migrasyonu, yaşam/apoptoz mekanizmalarının düzenlenmesinde rol alan IL-10 ailesi ve reseptör altbirimlerinin (IL20RB, IL22RA2, IL26, IL-28A, IL-28B, IL29, IL28RA), Mdm1 Nüklear Protein (MDM1), İnterferon alfa 1 (IFNA1), interferon beta 1 (IFNBI), interferon gama (IFNG) ve ICAM1'in mRNA ekspresyon analizlerinin vitiligo patogeneziyle olan ilişkisini analiz etmişler ve interlökin 20 reseptör alt ünite beta (IL20RB), interlökin 22 reseptör alt ünite 2 (IL22RA2), *IL-28A* ve *IL28RA*'nın vitiligo hastalarında kontrollere göre ekspresyon düzeylerinin artmış olduğunu göstermişlerdir (80,81). Bağışıklık sisteminin düzenlenmesinde görev alan düzenleyici genlerin bir alt kümesi, vitiligo hastalığına yatkınlıkla ilişkili bulunmuştur. T-hücresi reseptörü (örn., CD44, CD80), T-hücresi reseptör sinyali (örn., SLA, PTPN22, UBASH3A, CLNK), T hücresi aktivasyonu (örn., IKZF4, IL2RA, BTNL2, FOXP3), doğal immün yanıt (IFIH1, TICAM1) ve kemokin veya sitokin reseptörleri (örneğin, CXCR5, CCR6, SH2B3) genom çapında ilişkilendirme çalışmalarında vitiligo ile ilişkili bulunmuştur. Melanositler ayrıca vitiligo gelişimiyle ilgili farklı genler taşırlar. Bu genlerin birçoğu otoantijenler olarak görev yapan ve anti-melanosit immün tepkisinin gelişmesini kolaylaştıran proteinleri veya enzimleri kodlar (ör., TYR, PMEL, MC1R, OCA2). Diğerleri ise melanositlerin gelişimi ve hayatta kalması (örn., ZMIZ1), oksidatif stres sırasında hücre ölümü

(örn., RNASET2) ve apoptozu (ör., FGFR10P) düzenlemekle ilgilidir. Apoptozu düzenleyen diğer genler (örn., RERE, CASP7) veya bağışıklığa bağlı apoptozda görev alan genler de (örn., GZMB) de vitiligo ile ilişkili bulunmuştur (68,82). Bugüne kadar, vitiligo duyarlılığında etkili olduğu düşünülen ya da kanıtlanmış olan yaklaşık 36 lokus tanımlanmıştır. Bu lokusların çoğu olası biyolojik aday genleri içerdikleri veya bu aday genlerin yakınında olması bakımından önemlidir. Bu genlerin yaklaşık %90'ı immün düzenleyici proteinleri kodlarken yaklaşık %10'u hem melanosite özgü immün yanıtı uyaran, hem de immün tanıma ve hücre ölümünde hedef olarak hareket eden otoantijenler (ya da HLA sınıf I ve sınıf II moleküllerini bağışıklık sistemine sunan otoantijenler) olarak işlev gören melanosit proteinlerini kodlarlar. Vitiligo hastalığının patogenezinde rol alan yollar ve sistemlerde birlikte görev alan bu proteinler, yoğun bir immün düzenleyici ağ oluşturur. Ayrıca DNA sekanslama ve fonksiyonel analizler, TYR, HLA-A, NLR ailesi Pirin domain içeren molekül 1 (NLRP1) ve granzim B (GZMB) genleri için belirgin varyasyonlar tespit ederek, hastalığın patogenezinde bu proteinlerin oynadığı rollerin daha iyi anlaşılmasını sağlamışlardır (Tablo 2.3) (83).

Tablo 2.3: GWAS ve bağlantı analizler ile belirlenmiş vitiligoya yatkınlık lokusları (83)

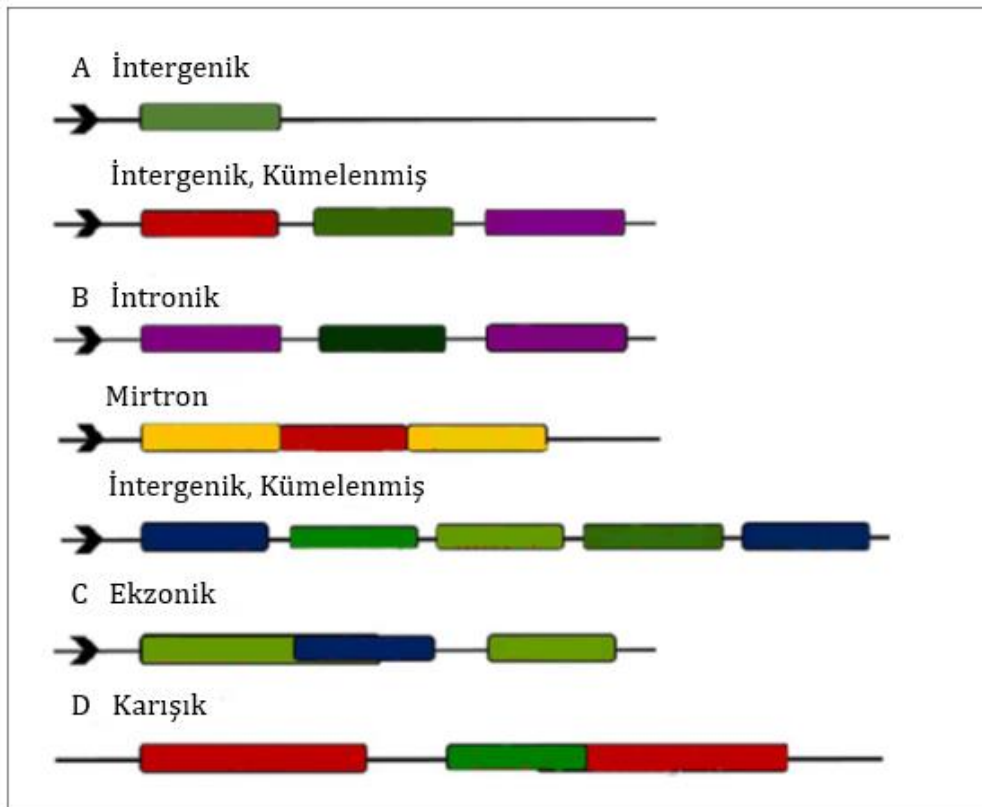
Kromozom	Aday gen	Populasyon	Protein	İşlevi
1p13.2	PTPN22	C	LYP protein tirozin fosfataz	Thücre sinyal iletiminin Düzenlenmesi
1p31.3	FOXD3C	C	Forkhead box D3	Melanoblast farklılaşmasında Nöral krestlerin farklılaşması
1p36.23	RERE	C	Atrofin-1-benzeri protein İzofomu b	Lenfoid transkripsiyonel ko-represör
2q24.2	IFIH1	C	İnterferon indüklü RNA Helikaz	Antiviral immün yanıt
2q33.2	CTLA4	C	Sitotoksik T-lenfosit ilişkili 4	CD80 ve CD86 ile etkileşim Yoluyla T hücre inhibisyonu
3p13	FOXP1	C	Forkhead kutusu D3	B-hücresinin transkripsiyon Regülatörü, Thücresi monosit Gelişimi
3q13.33	CD80	C	B-hücresi aktivasyon Antijeni B17	B, T ve dendrit hücreleri Tarafından T hücresi hazırlığı CTLA4'le etkileşim
3q28	LPP	C	LIM domain alanı	Transkripsiyonel ko-aktivatör?
4p16.1	CLNK	C	Mast hücresi immüno-Reseptör sinyal	İmmünoresptör sinyalinin pozitif regülatörü
5q22.1	TSLP	C	Timik stromal lenfopoietin Proteini	Deri dendritik (Langerhans) hücre olgunlaşmasının Sitokin düzenleyicisi

6p22.1	HLA-A	C	Lökosit antijen A α -zincir	Peptit antijen sunumu
6p22.1	HLA-B-C	C	Lökosit antijen B α -zincir	Peptit antijen sunumu
6q15	BACH2	C	BTB ve CNC homolojisi 1 Ana lösin fermuar	B hücre transkripsiyonel baskılama
6q27	CCR6	C	Kemokin C-C motifi Reseptörü 6	B, T ve dendritik hücre farklılaşması
6q27	SMOC2	C	SPARC ilişkili modüler Kalsiyum bağlama protein	Hücre dışı hücre matris etkileşimlerini düzenlenmesi
8q24.22	TG/SLA	C	Tiroglobulin, Src benzeri Adaptör izoformu c	B, T ve dendritik hücrelerde antijen reseptör sinyal iletimi
10p15.1	IL2RA	A, C	İnterlökin 2 reseptör α Zincir	İnterlökin 2 aracılı T hücre aktivasyonu
10q25.3	CASP7	A	Kaspaz 7	Apoptotik protein
11p13	CD44	C	CD44 antijen	T hücre düzenlenimi
11q14.3	TYR	C	Tirozinaz	Melanin biyosentetik enzimi
12q13.2	IKZF4	A, C	İkaros çinko parmak Protein, alt familya 1A,4	T hücre transkripsiyonel Düzenleyicisi
12q24.12	SH2B3	C	LNK adaptör	T ve B hücre gelişimi
14q12	GZMB	C	Granzim B	CTL indüklü yardımcı T Hücre apoptozu
15q12-13.1	OCA2	C	Okülökütanöz Albinizm	Melanozomal membran Taşıyıcısı
16q24.3	MCR1	C	Melanokortin-1 reseptör	Melanogenez düzenlenmesi
17p13.2	NLRP1	C	NLR ailesi, Pirin domain İçeren molekül 1	NLRP 1 inflamazom yoluyla IL-1 β immün yanıtı
19p13.3	TICAM1	C	TLR adaptör protein 1	Antiviral immün yanıt
21q22.3	UBASH3A	C	Ubikuitin ilişkili SH3domain İçeren molekül	Thücre sinyal iletimi Apoptoz
22q12.1	XBP1	A, C	X-kutu bağlayıcı protein 1	MHC II ekspresyonunun Düzenlenmesi
22q12.3	C1QTNF6	A, C	C1q ve tümör nekroz faktör ilişkili protein 1	Işık indüklü apoptoza immün yanıt
22q13.2	TOB2	C	ERBB2 dönüştürücü	Hücre döngüsü inhibitörü

2.13. Mikro RNA (miRNA)

Son yıllarda moleküler biyolojideki en önemli gelişmelerinden biri, yaklaşık 18-25 nükleotid uzunluğundaki küçük kodlanmayan RNA'lar olan mikroRNA'ların (miRNA) keşfi olmuştur. miRNA 'lar kısa, tek iplikli, kodlanmayan basit organizmalardan insanlara kadar birçok ökaryot canlıda tanımlanan kodlanmayan RNA ailesidir. Yüzlerce miRNA'nın binlerce insan geninin ifadesini düzenlediği tahmin edilmektedir (84,85). miRNA 'lar memeli genomun %1-3'ünü oluşturmaktadır. Genomik organizasyona göre miRNA genleri, intergenik ve intragenik miRNA genleri olarak da tanımlanabilmektedir. İntergenik miRNA'lar, promotör, transkript dizisi ve terminatör üniteleri dahil olmak üzere bağımsız transkripsiyon ünitelerine sahiptir. İntergenik miRNA'lar, intronik veya ekzonik bölgeler içinde başka transkripsiyon birimleri (konakçı genler) içinde yer alır. İntronik miRNA'lar, konakçı genlerin intronlarında ve hem protein kodlayıcı hem de kodlayıcı olmayan RNA'larında bulunabilir. miRNA genleri kodlayan veya kodlamayan genlerin intronları içinde, kodlamayan bölgelerin ekzon bölgelerinde veya intergenik bölgelerde bulunabilmektedir. Çoğu miRNA geni tek başına ve kendi promotörünün kontrolü altında ifade edilirken, diğer miRNA genleri kümeler halinde bulunur ve birlikte ifade olabilirler (Şekil 2.16) (86). miRNA'lar gen ifadesi kontrolünü genlere ait haberci RNA (mRNA)'larının translasyonunu baskılayarak ya da 3'UTR bölgesine bağlanarak nükleolitik yıkımlarını indüklerler. Bu işlev, miRNA baz sekanslarının (genellikle 5' ucunda) mRNA üzerindeki kısmen veya tamamen tamamlayıcı bölgelere hem kodlanan hem de kodlanmayan bölgelerde, çoğunlukla 3'ucunda bağlanmasıyla olur. Birçoğunun işlevi bilinmemekle birlikte, insanlarda 800'den fazla miRNA keşfedilmiştir. İnsan genomunun en az üçte birinin hatta insan protein kodlayan genlerin %60'ından fazlasının miRNA'lar tarafından düzenlendiğine dair kanıtlar vardır. Gen ifadesinin düzenlenmesinin yanı sıra, miRNA'lar farklılaşma, proliferasyon, apoptoz ve stres de dahil olmak üzere birçok önemli biyolojik sürece katılırlar (87,88). İlk kez 1990'ların başında *Caenorhabditis elegans*'da keşfedilmiş, larval gelişimde rol alan bir gen olarak *lin-4* olarak adlandırılmıştır. 2000 yılında Reinhart ve arkadaşları tarafından yine *Caenorhabditis elegans*'da 22 nükleotid uzunluğunda, *let-7* olarak adlandırılan, canlının geç larval dönemden yetişkin hücre fazına geçişi düzenleyen bir mikroRNA keşfedilmiştir. Her bir miRNA yüzlerce farklı mRNA'yı hedefleyebilir ve insan genomunda ifade edilen 1000-1500 farklı miRNA'nın protein kodlayan genlerin %50'sinden fazlasının ifadesini baskılama kapasitesine sahip olduğu bildirilmiştir. Embriyogenez, organogenez, hücresel gelişme, çoğalma ve farklılaşma, metabolizma ve homeostazda dahil birçok fizyolojik süreçte yer alan 1900'den fazla miRNA molekülü bildirilmiştir (89-92). Hücresel biyolojinin neredeyse tüm mekanizmalarında, miRNA kılavuzluğunda gen düzenlemesinin etkileri göz önüne alındığında, miRNA seviyelerinin sıkı bir şekilde kontrol edildiği ve bu kontrol kaybının kanser dahil çeşitli hastalıklara yol açabileceği bildirilmiştir. miRNA düzeyini-miktarını yöneten ilk ve en önemli aşamalardan biri pri-miRNA

transkripsiyonunun düzenlenmesidir. Protein kodlayan genlerin intronları içerisinde kodlanan miRNA'ların transkripsiyonu, çoğunlukla konakçı genin promotörü tarafından yönlendirilir ve mRNA ve miRNA ifadesinin kuvvetli bir korelasyonuna yol açar. Bununla birlikte, promotör bölgelerine karakteristik bir yöntem olan kromatin işaretleme analizinde (*Analysis of Chromatin Signatures*), intronik miRNA'ların yaklaşık üçte biri için, konakçı geninden ayrı bir düzenleme yapılmasına olanak tanıyan ilave promotörler tespit etmiştir. İntergenik miRNA'lar; histon işaretleri, CpG adaları, transkripsiyon faktörüne bağlanma alanları gibi Polimeraz II aracılı transkripsiyonla sıkça ilişkilendirilen tüm özellikleri taşıyan özel promoterlere sahiptir. Kümelenmiş miRNA'lar bir promotörü paylaşır ve uzun pri-miRNA'ların bir parçası olarak koordine edilir. Promotörlar vasıtasıyla, pri-miRNA transkripsiyonu, transkripsiyon faktörlerinin bağlanmasıyla kuvvetli şekilde düzenlenebilir. Örneğin bir tümör süpresör geni olan p53'ün; *BCL2* ve siklin bağımlı kinaz 4 ve 6 (Cdk4 ve 6) gibi hücrenin çoğalması ve sağ kalımında önemli faktörleri baskılayan miR-34 aile üyelerinin transkripsiyonunu upregüle ettiği gösterilmiştir (93, 94).



Şekil 2.16. MikroRNA'ların genomik lokalizasyonu. (A) İntergenik miRNA'lar bilinen transkripsiyon ünitelerinden farklı genomik bölgelerde bulunur. Bu miRNA'lar kendi promotörleri (siyah ok ucu) veya polisistronikler ile monokistronik (üst kısım) olabilir; burada birkaç miRNA, birincil transkript kümeleri olarak kopyalanır (alt kısım); (B) intronik miRNA'lar, hem protein kodlayan hem de kodlamayan genlerin intronlarında bulunur; (C) ekzonik miRNA'lar, yukarıdaki tiplerin her ikisinden çok daha nadirdir ve sıklıkla intronlarında bulunur; (D) Karışık.

bir ekzon ve kodlayıcı olmayan bir genin intronuyla örtüşür ve (D) intergenik ve intragenik bölgelerde yer alan karışık miRNA'lar (94).

2.13.1. Mikro RNA'ların İsimlendirilmesi

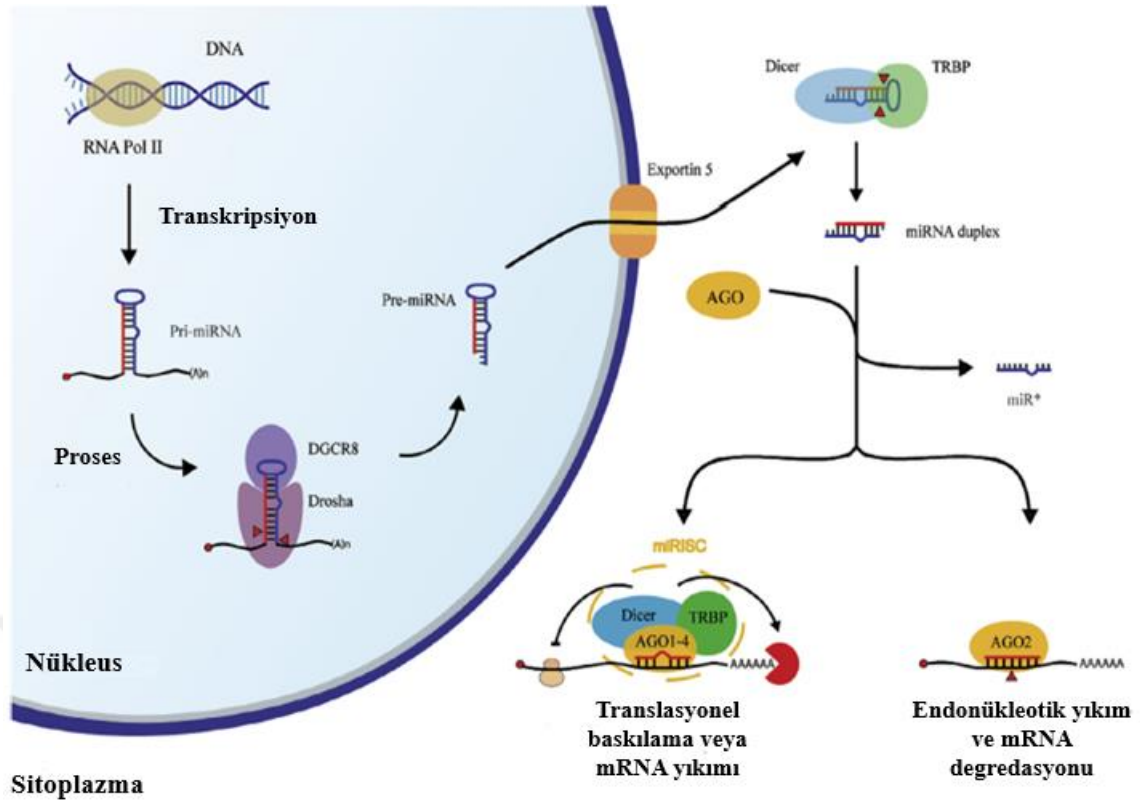
miRNA'lar, mRNA'lara baz eşleştirmesi yaparak, gen ifadesini transkripsiyonel olarak düzenleyen evrimsel olarak korunan küçük kodlayıcı olmayan RNA molekülleridir. Bugüne kadar 150'den fazla miRNA keşfedilmiştir. Çok sayıda protein, genlerle kodlandığından dolayı doğru lokasyon, gen lokusları, transkript ürünleri arasında ayırım yapmak önemlidir. Buna paralel olarak, miRNA'lar için özel bir isimlendirme metodu vardır. Olgun miRNA dizileri veritabanında genellikle **“miR”** olarak belirtilirken; daha uzun bir birincil transkripti (öncü saç tokaları ‘mir’ veya pri-mir) ile kesip çıkarılabilen karakteristik bir *stem-loop* dizisi pre-miRNA olarak adlandırılır. “miR” kısaltma isminden sonra ise rakam yer alır. Rakamlar bulunuş sırasına göre sıralanır. Örneğin; fare mir-352'den sonra yayınlanmış olan miRNA, mir-353 sayısını alır. miRNA'lar dizileri açısından yakından ilişkili olduklarında, onları ayırmak için sayı ve harf şeklinde ekler verilir (ör. mir-33 veya mir-4990). miRNA'lar adlandırılırken, insanlar (*Homo sapiens*) "hsa" harfleri (ör. hsa-mir-367), sıçan (*Rattus norvegicus*) için "rno" (ör. Rno-mir-1), goriller için ggo (ör. ggo-mir-155) kısaltması kullanılır. Eğer iki farklı lokus aynı olgun ürünleri üretiyorsa, tam adın ardından ek numara verilir. Örneğin, ggo-mir-515-1 ve ggo-mir-515-2 aynı nihai mikroRNA ürününü üretir: ggo-miR-515. (95,96)

2.13.2. Mikro RNA (miRNA)'ların Biyogenezi

2.13.2.1. Klasik miRNA Biyogenezi Yolu

miRNA ilk olarak *Caenorhabditis elegans*'ta tanımlanmış ancak daha sonra yapılan çalışmalarla birlikte bitkiler ve hayvanlarda da bulunduğu gösterilmiştir. Bu buluş moleküler biyolojinin merkezi dogması olan “DNA'nın proteine dönüştürülen RNA'ya transkribe edilir” üzerindeki görüşü değiştirmiştir. miRNA, bağımsız transkripsiyon birimleri olarak veya başka genlerin intronlarında veya ekzonlarında bulunan miRNA genleri olarak kopyalanabilir. İntronik miRNA, memelilerde miRNA transkriptlerinin çoğunu oluşturur, farklı promotorlar tarafından konakçı genomdan bağımsız olarak kontrol edilir. miRNA biyogenezi yolu hayvanlarda karakterize edilmiştir. İlk olarak nükleusta ve daha sonra da sitoplazmada ~22 nükleotid uzunluğunda olgun tek sarmal miRNA'lar üretmek için gerçekleşen iki ayrı işlemi içeren oldukça kompleks bir olaydır. Genel olarak, intergenik bölgelerde olduğu kadar diğer genlerin ekzonlarında veya intronlarında da bulunabilen miRNA genleri, RNA polimeraz II ile transkribe edilir (Polimeraz III transkripsiyonu örnekleri olmasına rağmen) ve 100-1000 nükleotid uzunluğunda ortalama bir pri-miRNA öncüsü elde edilir. Bu pri-miRNA transkriptleri sıklıkla

kesime uğrar, yapılarına cap başlığı eklenir, poliadenillenerek işlenir ve birden çok miRNA geni için dizileri kodlayabilir. Nükleusta RNase-III tipi endonükleaz Drosha ile birlikte DiGeorge sendrom kritik bölge geni 8 (DGCR8: *Drosophila*'da PASHA, *Caenorhabditis elegans*'ta PASH-1 adını almaktadır) ve DEAD box RNA helikazlar p68/DDX5, p72/DDX17 gibi kofaktörlerden oluşan Drosha mikroişlemci kompleksi pri-miRNA içindeki kök ilemekli sekonder yapıları tanıyarak pre-miRNA'lar olarak adlandırılan ~70 nükleotidlik prekürsör saç tokası şeklindeki öncüllerin eksizyonu ve salınımını sağlar. Son bulgular mikroprosesör aktivitesinin internal olarak düzenlendiğini ve DGCR8 'in Drosha proteinini stabilizasyonunu sağladığını, Drosha molekülünde, DGCR8'i parçalayabildiğini göstermiştir. Bazı pre-miRNA'lar, kesim mekanizmaları sonucunda çok kısa intronlar şeklinde üretilir (mirtronlar) ve Drosha-DGCR8 basamağını atlayabilir. Sonraki aşamada bu prekürsör öncül pre-miRNA'ları özellikle tanıyan Exportin-5/Ran-GTP kompleksi tarafından çekirdekte sitoplazmaya yollanır. Sitoplazmada pre-miRNA'lar, bir RNase-III tipi bir enzim olan Dicer ve kofaktörü olan memeli TAR RNA bağlayıcı protein (TRBP) ve potansiyel olarak Argonaute proteini (AGO) ile bağlanarak ~22 nükleotitlik miRNA-miRNA dubleks meydana gelir. miRNA dubleksinin yalnızca bir ipliği "rehber iplikçik" olarak görev yapar. Genellikle termodinamik olarak en az stabil olan 5' terminalinde bulunan iplikçik RNA helikaz proteinleri DEAD kutusu RNA helikaz p68/DDX5 gibi RNA helikaz proteinleri yardımıyla büyük bir çoklu protein miRNA ribonükleoprotein kompleksine (miRNP, ayrıca miRISC kompleksi olarak da adlandırılır) yüklenerek ve hedef gen ekspresyonunu düzenlemeye hazırlanır. miRNA-miRNA dubleksinin "yolcu (passenger)" ipliği, miRNP kompleksinden çıkarılır ve yıkıma uğrar (Şekil 2.17)(97,98).



Şekil 2.17. miRNA biyogenezinin kanonik yolunun şematik gösterimi (98).

2.13.2.2. Klasik olmayan miRNA Biyogenez Yolu

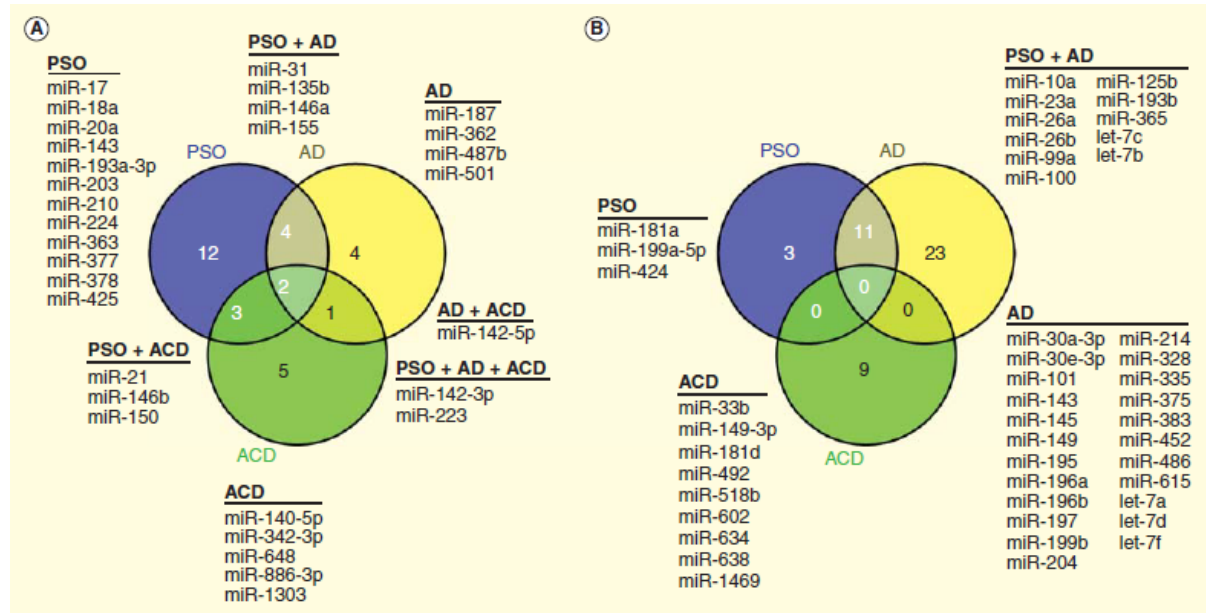
miRNA'nın klasik biyogenez yolu tanımlandığı halde, son bulgular, miRNA'nın biyogenezindeki doğal varyasyonların hücrelerdeki RNA düzenlenmesini daha da kompleks bir hale getirdiğini göstermiştir. miRNA biyogenezinde birkaç Drosha'dan bağımsız biyogenez mekanizması bildirilmiştir. Bunlar arasında, orijinal olarak *Drosophila melanogaster* ve *C. elegans*'da tanımlanan ve memelilerde de olduğu belirlenen, kesip-çıkarılarak elde edilen, miRNA'ların yeni bir sınıfı olan mirtronların varlığından söz edilmektedir. Biyogenez, Drosha/DGCR8 mikroişlemci kompleksini atlayan pre-miRNA'lar saç tokası yapısını oluşturmak için, saç tokası yapısını oluşturma potansiyeline sahip kısa intronların çıkarılmasını içerir. Mirtronlar hem ekleme hemde ekzonükleaz aktivitesiyle parçalama-çıkarma özelliklerine sahip yapılardır. Bundan dolayı Drosha bağımsız yolak, kesip çıkarma mekanizmasını gerektirmeyebilir. Örneğin, iki miRNA, miR-320 ve miR-484, Drosha/DGCR8 tanıma motiflerinden yoksun kısa premiRNA benzeri yapılar olarak aktarılır ve bunun yerine doğrudan Dicer tarafından işlenir. Alternatif olarak, miRNA'lar, Dicer substratlarını oluşturan pre-miRNA benzeri saç tokası yapılarını taşıyan küçük nükleolar RNA'lardan (snoRNA'lar) Drosha bağımsız mekanizmalarla işlenebilmektedir. Bu snoRNA'lar, ribonükleoproteinleri ile birlikte aktif haldedir ve tüm kopyaların olgun miRNA'lar halinde işlenmediğini düşündürmektedir. Transfer RNA (tRNA) benzeri yapılar hem endojen memeli RNA'larından hem de mürin γ -herpesvirus

68'den (MHV68) kaynaklanan olgun miRNA'ları türetebilmektedir. Memelilerdeki bazı miRNA'ların, tRNA yapısından sadece Dicer tarafından işlenir gibi görünürken, MHV68 miRNA'lar Dicer tarafından işleme tabi tutulmadan tRNaseZ tarafından işlenir. Son olarak, 21-22 nükleotidlik endojen siRNA molekülüleri, öncelikli olarak birden çok genden köken alabilir. Örneğin, aynı gen ya da homolog bir promotörden üretilen antisens transkript (>100-nt) bir mRNA ile hibridize olabilir. Bilinmeyen moleküler mekanizmalar tarafından Dicer molekülü ile işlenen RNAi yapısında çoklu küçük RNA'lar oluşturulur. İnverte (tersine döndürülmüş) saç tokaları, klasik Drosha substratlarından çok daha uzun olabilir ve aktif endo-siRNA'lar üretmek üzere işlenebilir. miR-451, Argonaute 2, RISC katalitik komponent 2 (AGO2) molekülü tarafından tanınmadan önce Drosha tarafından işlenir ve olgun miRNA'yı serbest bırakmak için pre-miRNA'yı ilmek bölgesi içinden parçalamaktadır. Bazı miRNA'ların tRNA'ların 3' ucundan meydana geldiği tahmin edilmektedir. Çoğu durumda bu atipik-klasik olmayan miRNA biyogenez yollarının işlevsel önemi bilinmemekte fakat son yıllarda, insan mRNA'larının yaklaşık %1- %2'sini oluşturan mirtronların araştırılmasında artan bir ilgi vardır (99, 100, 101).

2.13.2.3.miRNA'ların Deri Hastalıklarıyla İlişkisi

İnsan derisi, patojenlerin istilasının önlenmesi, su kaybının düzenlenmesi, alerjenlere ve tahriş edici maddelere karşı korunmasının sağlanması görevlerini gören, internal ve eksternal çevre arasında etkili bir bariyer oluşturan kompleks immünolojik bir organdır. Yapısal olarak, insan derisi, epidermis ve dermis olmak üzere iki tabakaya sahiptir; bu tabakaların her ikisi de bariyer işlevini sürdürmek için karmaşık bir ağda etkileşime giren, farklı hücre gruplarından oluşmaktadır. Bu hücre tabakaları arasına yerleşik, doğuştan adaptif bağışıklık sistemi ile etkileşimde önemli rol oynayan infiltrate hücreler bulunmaktadır. Çeşitli inflamatuvar cilt hastalıklarının altında yatan mekanizmaların aydınlatılması amacıyla kapsamlı araştırmalar yapılmasına rağmen bu hastalıklara neden olan moleküler mekanizmalar hala belirsizliğini korumaktadır. İnflamatuvar deri hastalıklarının birçoğu çeşitli genetik ve çevresel faktörlerden etkilenmektedir ve bu gibi hastalıkların oluşum mekanizmalarında görev alan bir dizi farklı molekül önerilmiştir. Bunların arasında, küçük düzenleyici kodlanmayan RNA molekülüleri olan miRNA'ların hem normal deri hem de hastalıklı deride çeşitli hücresel süreçlerde yer aldığı gösterilmiştir. miRNA'lar kodlandığı hedef genin ifade düzeyini değiştirerek, *in vitro* hücre proliferasyonu ve hücre gelişimi, *in vivo* immün yanıt ve karsinogenez de dahil olmak üzere birçok hücresel aktivitede rol oynamaktadırlar. Birçok araştırmada, miRNA'ların cilt hastalıkları da dahil olmak üzere çeşitli insan hastalıklarının patogenezinde rol oynama ihtimali vurgulanmaktadır. Bir dizi çalışmada, kanda "cell-free" ortamda dolaşan miRNA'ların varlığı gösterilmiş bunun üzerine 2008'de, hücre içi miRNA düzenlemesinin mekanizmaları sorgulanmaya başlanmıştır.

Plazma ve serumda bulunan miRNA'ların, yüksek seviyelerde ki RNaz enzimlerinin varlığına rağmen, mRNA'lara kıyasla, belirgin şekilde daha stabil olduğu bulunmuştur. miRNA stabilitesinin, ekzozomlar veya dolaşım vezikülleri olarak adlandırılan mikroveziküller tarafından sağlandığı düşünülmektedir. miRNA'ların sadece kanda değil tükürük, anne sütü, beyin omurilik sıvısı ve idrar da dahil olmak üzere çeşitli diğer vücut sıvılarında da bulunduğu tespit edilmiştir. Bu nedenle hücre dışı miRNA düzeylerinin, özellikle serum miRNA düzeylerinin insan hastalıklarında, özellikle de malign tümörlerde yeni biyolojik belirteç olabileceği düşünülmektedir. Özellikle, prostat ve akciğer kanseri olan hastalar için spesifik serum miRNA belirteçleri tanımlanmış ve dolaşımdaki serum miRNA'ların, yeni tanısal biyolojik belirteç olarak çeşitli hastalıklara karşı parmak izi niteliği taşıdıklarının kanıtı sağlanmıştır. miRNA'ların cilt gelişimi ve biyolojisinde önemli olduğuna dair ilk kanıt, bir epidermis-spesifik Dicer veya DGCR8 delesyonu taşıyan farelerin olgun miRNA'lar üretemediği, bunun sonucunda farelerde saç germ hücre gelişiminin hasara uğradığı böylece epidermin organizasyonunun bozulduğu gözlenmiştir. Bununla bağlantılı olarak, epidermis ve saç foliküllerinde birkaç miRNA'nın yüksek düzeyde ekspresyonunun, normal cilt gelişimi için de gerekli olduğu bulunmuştur. Günümüzde deride en çok çalışılan miRNA, ciltte, özellikle de epidermin üst-bazal katmanında eksprese olduğu belirlenen miR-203'dür. Yi ve arkadaşları miR-203 transgenik farelerin epitel dokularında yaptıkları çalışmada miR-203'ün *in vivo* ekspresyonunu değiştirmişlerdir. miR-203'ün hücre döngüsünden çıkışı indükleyerek ve epidermal farklılaşmayı teşvik ettiğini göstermişlerdir. Ayrıca ciltte kök hücre potansiyelinin devamının sağlanmasında kritik role sahip ve bir transkripsiyon faktörü olan Δ DNp63a, molekülünün miR-203 için korunmuş bir hedef olduğu gösterilmiştir. Memeli cilt gelişimi ve fonksiyonunun kontrolünde miRNA'ların önemini vurgulayan bu öncü çalışmaların ardından, miRNA'ların dermatolojide önemli ilgi konusu olmasını sağlamıştır. Son yapılan çeşitli araştırmalar, miRNA'ların Sedef Hastalığı, Atopik Dermatit (AD), Alerjik Kontakt Dermatit (ACD), Kutanöz T hücre Lenfoma (CTCL), habis melanoma, bazal ve skuamöz hücreli karsinom gibi farklı kutanöz hastalıkların patogenezinde rol oynadığını göstermiştir. (Şekil 2.18) (102-104). Vücut sıvılarında elde edilen miRNA ekspresyonunun çoğunluğunun, solid tümör dokularından kaynaklandığı belirlenmiştir. Bu miRNA'ların endojen RNaz aktivitesinden korunması, gelecekte kanser ve diğer hastalıkların tanı ve tedavisinde ekstraselüler biyolojik biyobelirteçler olarak kullanılabileceğini düşündürmektedir (92).



Şekil 2.18. İnflamatuvar cilt hastalıklarının patogeneğinde rol oynayan deregüle miRNA'lar. Ven diyagramlarında up-regüle (A) ve down-regüle (B) miRNA molekülleri. (AD: Atopik Dermotit, ACD: Alerjik Kontakt Dermatit, PSO: Psoriasis) (102).

Deri fonksiyonu ve morfogenezini, miRNA'lar dahil olmak üzere birçok molekülün düzenli çalışmasını gerektirmektedir. Bu nedenle, vitiligo dahil çeşitli deri lezyonlarını içeren birçok hastalığın moleküler patogeneğinde miRNA ekspresyonları önemlidir (105). Örneğin, son zamanlarda Atopik Dermatit'te hem tanı hem de hastalık aktivitesinin değerlendirilmesinde biyobelirteç olarak serum timüs ve aktivasyon-regüle kemokin (TARC) kullanılmaktadır. Klinik tanı koyarken; dermatofibrosarkomun, dermatofibromadan ayırılması bazı durumlarda çok zordur, ancak $\alpha 2(I)$ kollajen/PDGF-B zincir füzyon geninin saptanması tanı ayırımında yararlı olmaktadır. Bununla birlikte, vitiligo hastalığı dahil olmak üzere hala klinikte kullanılabilecek biyobelirteçlerin bulunmadığı birçok hastalık vardır. miRNA 'lar tedavide; az ifade edilen miRNA'lar, miRNA mimikleri kullanılarak , anormal şekilde fazla ifade edilen miRNA'lar ise miRNA inhibitörleri tarafından azaltılabilmektedir. Sonuç olarak, miRNA'lar hastalık patogenezinin aydınlatılması, teşhis, hastalık aktivitesinin değerlendirilmesi ve tedavi dahil olmak üzere çeşitli klinik uygulamalar için kullanılabilmeleri nedeniyle önemli moleküllerdir. Klinik kullanıma daha fazla katılabilmeleri için her bir hastalığın patogeneindeki miRNA'ların tanımlanarak ve miRNA'ların hedef genlerinin nasıl düzenlediğine dair mekanizmaların daha ayrıntılı olarak açığa kavuşturulmaya ihtiyacı vardır (106).

3. MATERYAL ve YÖNTEM

“Vitiligo hastalarında melanogenezele ilişkili bazı miRNA ekspresyon düzeylerinin araştırılması” adlı çalışmada, hasta ve kontrol gruplarının oluşturulması, Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Dermatoloji Anabilim Dalı tarafından gerçekleştirildi. Mersin Üniversitesi Rektörlüğü Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından **2012-TP3-1204** kodlu proje olarak desteklenen ve Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulu tarafından onaylanan çalışmamızın moleküler biyolojik analizleri Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Moleküler Genetik Laboratuvarı’nda yapıldı.

Çalışmada; hasta ve kontrol gruplarını oluşturan bireylerden 4-5 ml’lik venöz kan örneği RNA izolasyonu için, 1 ml %2 ‘lik etilendimetiltetraasetik asit (EDTA) içeren, 15 ml’lik santrifüj tüplerine alındı. RNA izolasyonu ve cDNA eldesine kadar -80°C de saklandı. Hastalardan alınacak periferik kan örneklerinden total RNA izolasyonu geleneksel guanidyum isotiyosiyonat/fenol kloroform izolasyon yöntemi kullanılarak yapıldı. Mikroftalmi ile ilişkili transkripsiyon faktörü (*MITF*), Sry ilişkili HMG-Box gen 10 (*SOX10*), Tirozinaz (*TYR*), Tirozinaz ilişkili Protein 1 (*TYRP1*) ve B hücre lenfoma geni 2 (*BCL2*) anahtar genlerinin www.mirdb.org mikroRNA veri tabanına göre en yüksek skorla hedefleyen miRNA’larının ekspresyon “**ABI Prism 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems)**” cihazı ve “SDS 2.0.3 software for allelic discrimination (Applied Biosystems)” programı kullanılarak gerçekleştirildi. Elde edilen ekspresyon verileri istatistiksel olarak değerlendirildi.

3.1. Kullanılan Araçlar- Gereçler, Kimyasallar ve Sarf Malzemeler

3.1.1. Kullanılan Araçlar-Gereçler

- Buzdolabı (Hotpoint Ariston, İngiltere)
- Derin Dondurucu (Arçelik, Türkiye)
- Etüv (Nüve EN-500, Türkiye)
- Hassas Terazî (ACJ 120-4M, Kern, Almanya)
- Mikropipet Seti (Thermo Electron Corporation, Almanya)
- Mikropipet Seti (Eppendorf, Almanya)
- Otoklav (OT 40 L, Nüve StreamArt, Türkiye)
- PCR (Veriti, Applied Biosystems, Almanya)
- Real-Time PCR (ABI 7500, Applied Biosystems, ABD)
- Santrifüj (NF-400, Nüve, Türkiye)
- Vorteks (VELP Scientifica, ABD)

3.1.2. Kullanılan Kimyasallar ve Sarf Malzemeler

- 5 X Hot Firepol® Probe QPCR Mix Plus (ROX) (08-14-00020, Solis Biodyne)
- 5x Reaksiyon tamponu RT-PCR
- dNTPs Mix 10mM (100 ul) (SNP010-10, SNP Biyoteknoloji, Türkiye)
- Etanol (1009712500, Merck Millipore Corporation, Almanya)
- İzopropanol (I9516, Sigma, ABD)
- Kloroform: İzooamilalkol (24:1) (X205, Amresco, ABD&Kanada)
- Microamp Real Time PCR Plate kaplama Filmi (4311971, Applied Biosystems, ABD)
- Microamp Real Time PCR Plate tutucu (N8010560, Applied Biosystem, ABD)
- Mikrosantrifüj Tüpü 1.5 ml'lik (Starlab, S1605-5500, Almanya)
- PCR tüpü 0,2 ml'lik (14-222-262, Axygen, ABD)
- Pipet ucu 0,5-10 µl'lik (T-300, Axygen, ABD)
- Pipet ucu 1-200 µl'lik (T-200-Y, Axygen, ABD)
- Pipet ucu 1-1000 µl'lik (T-1000-B, Axygen, ABD)
- Polipropilen Real Time PCR Plate (96'lık) (N8010560, Applied Biosystems, ABD)
- RevertAid Reverse Transcriptase, 5x Reaksiyon tamponu RT-PCR ile birlikte (200U/µl) (EP0442, Thermo Scientific, ABD)
- Ribolock RNase Inhibitor (40 U/µl) (EO0382, Thermo Scientific, ABD)
- Ribozol (N580, Amresco, ABD&Kanada)
- Steril Distile Su (Polifarma, Türkiye)

3.2. Hasta ve Kontrol Gruplarının Oluşturulması

Bu araştırma, T.C. Mersin Üniversitesi Rektörlüğü Klinik Araştırmalar Etik Kurulu tarafından değerlendirilmiş olup **09.07.2015 karar tarihi**, 13 No'lu toplantı **ve 2015/234 sayılı karar**la uygun bulunmuştur. Gönüllü hasta grubu Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Dermatoloji Anabilim Dalı'na başvuran ve takibi yapılan, vitiligo tanısı alan bireylerden oluşturuldu. Gönüllü kontrol grubu ise yine aynı kliniğe başvuran, kendisinde ve ailesinde vitiligo dahil herhangi bir dermatolojik hastalık tanısı olmayan, bireylerin seçilmesiyle oluşturuldu. Çalışmaya, 2010 ve 2016 yılları arasında Vitiligo tanısı alan 56 gönüllü hasta birey ile kontrol grubu olarak seçilen 56 gönüllü sağlıklı birey olmak üzere toplam 112 bireye ait RNA örneği izole edilerek dahil edildi. Çalışmaya katılmak isteyen gönüllü hasta ve sağlıklı bireylere, etik kurulda belirtilen yönergelerle uygun olarak hazırlanmış bilgilendirilmiş onam formu okutulup imzalatıldı. Hasta ve kontrol gruplarından elde edilen 4-5 ml periferik kan örneklerinden RNA

izolasyonu gerçekleştirilip, bu iki örneklem grubu üzerinde ekspresyon analizi yapıldı. Hasta ve kontrol örneklerine ait moleküler analizler Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Laboratuvarlarında gerçekleştirildi.

3.3. Periferik Kandan RNA Elde Eldesi

Periferik kandan RNA eldesi için asit guanidinyum-fenol kloroform (AGPC) yöntemi kullanıldı (107). Kontrol ve hasta gruplarına ait kan örnekleri, RNA elde edilene kadar -20°C'de saklandı. Örnekler oda ısısına getirildikten sonra RNA izolasyonu aşağıda belirtilen protokole göre yapıldı. Elde edilen RNA örneklerinden ekspresyon analizi için cDNA eldesi yapıldı.

1. Gönüllü hasta ve kontrol bireylere ait 500 µl EDTA'lı kan örneği 1,5 ml'lik mikrosantrifüj tüpüne transfer edildi. Üzerine 500 µl ribozol eklendi ve hemen vortekslenerek buz içinde 15 dakika inkübe edildi.
2. İnkübasyon sonrası üzerine 200 µl kloroform: izoamilalkol (24:1) eklendi (+4°C'de soğutulmuş) ve hemen vortekslendi.
3. Mikrosantrifüj tüpleri +4°C'de 10 dk. 14.000 rpm'de santrifüj edildi.
4. Santrifüjden sonra örnek üç faza ayrıldı. Üstteki açık sıvı fazda RNA, orta beyaz bulutumsu fazda DNA, alttaki kırmızı fenol fazda protein olmak üzere üç faz oluştu.
5. RNA içerikli üst açık sıvı faz, etiketli tüplere transfer edildi.
6. Sıvı fazın üzerine 500 µl hacimde izopropanol eklendi ve RNA'yı çöktürmek için 10 dakika oda ısısında inkübe edildi.
7. Tüpler +4°C'de 10 dk. 14.000 rpm'de santrifüj edildi.
8. Süpernatant, pelletin altüst olmamasına dikkat edilerek pipetle atıldı.
9. Pellet üzerine 1 ml hacimde %80'lik soğuk etanol ilave edilerek RNA yıkanması sağlandı. Daha sonra, tüpler +4°C'de 10 dk. 14.000 rpm'de santrifüj edildi.
10. Pipetle yine pellete dikkat edilerek süpernatant atıldı ve kuruması için 10-15 dk inkübe edildi. Etanolün kalmamasına dikkat edildi.
11. RNA pelletinin çözünmesi için üzerine 50 µl distile su ilave edildi. 15 sn kadar vorteks yapıldı ve oda sıcaklığında 10 dk. bekletildikten sonra tüpler -20°C'de saklandı.

3.4. Ekspresyon Analizi Yapılacak Vitiligo hastalığı ile İlişkili miRNA 'ların seçilmesi

Vitiligo hastalığında, melanogenez yolağında anahtar rollere sahip olan *MITF*, *SOX 10*, *TYR*, *TYRP1* ve *BCL2* genlerini hedefleyen miRNA'lar miRBase Release 21 (108), miRDataBase (109), TargetScan Release 7.0 (110) veri tabanları kullanılarak tespit edildi. Seçilen miRNA'ların

hedefledikleri genlerle eşleşme etkinliğini ortaya koyan değerler için microrna (111) veri tabanı kullanıldı. Analiz sonuçlarına göre; hsa-miR-3163 hedefi olan *MITF* geni ile eşleşme skoru %99, hsa-miR-6783-3p hedefi olan *SOX10* geni ile eşleşme skoru %91, hsa-miR-1343-3p hedefi olan *SOX10* geni eşleşme skoru %90, hsa-miR-4696 hedefi olan *TYR* geni ile eşleşme skoru %91, hsa-miR-6824 hedefi olan *TYR* geni ile eşleşme skoru %87, hsa-miR-5197-3p' nin hedefi olan *TYRP1* geni ile eşleşme skoru %95, hsa-miR-4495 hedefi olan *BCL2* geni ile eşleşme skoru %98, hsa-miR-3680-3p hedefi olan *BCL2* geni ile eşleşme skoru %98 olarak bulunmuştur (Tablo 3.1).

Tablo 3.1: Vitiligo hastalığında melanogenezde kritik rollere sahip genler ve bu genleri en yüksek skorlara hedefleyen miRNA'lar

NO	miRNA	Hedef Gen	Hedefleme Eşleşme Skoru
1	hsa-miR-3163	MITF (Mikroftalmi ilişkili transkripsiyon faktörü)	99
2	hsa-miR-6783-3p	SOX 10(SRY (sex determining region Y)-box 10)	91
3	hsa-miR-1343-3p	SOX 10(SRY (sex determining region Y)-box 10)	90
4	hsa-miR-4696	TYR (Tirozinaz)	91
5	hsa-miR-6824	TYR (Tirozinaz)	87
6	hsa-miR-5197-3p	TYRP1 (Tirozinaz ilişkili protein-1)	95
7	hsa-miR-4495	BCL2 (B-hüce KLL/Lenfoma 2)	98
8	hsa-miR-3680-3p	BCL2 (B-hüce KLL/Lenfoma 2)	97
9	miR-26b	Kontrol miR	

3.5. Real-Time PCR ile MikroRNA Ekspresyon Analizine Yönelik Primer ve Prob Dizaynı

Ulusal Biyoteknoloji Bilgi Enstitüsü (NCBI; National Institute of Biotechnology Information) ve miRDB (microRNA Target Prediction and Functional Study Database) veri tabanı programları kullanılarak mRNA dizileri elde edilen hsa-miR-3163, hsa-miR-1343, hsa-miR-6783-3p, hsa-miR-4696, hsa-miR-6824, hsa-miR-5197-3p hsa-miR-4495, hsa-miR-3680, endojen kontrol olarak seçilen hsa-miR-26b-5p genlerine ait ekspresyonları analiz etmek üzere bu miRNA'lara özgün kök-halka yapısındaki primer ve prob dizileri Primer Express 3.0 (Applied Biosystems) programı kullanılarak tasarlandı. Şekil 3.1'de kök-halka yapısındaki referans pri-miRNA dizileri gösterilmiş ve bir kol üzerindeki olgun miRNA dizileri pembe ile işaretlenmiştir.

a) hsa-miR-3163

```

u          a   c          cuuc
5' uccucaucuaauaaaaug ggg aguaagac   c
   ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
3' aggaguagauauuuuac ccc ucauucug   u
   a          c   a          uucc

```

b) hsa-miR-6783-3p

```

ccugu          a   -u   uc   aacc
5'   uagggga aagucc ga cggg   c
   ||||| ||||| ||||| |||||
3'   gucuccu uucggg cu gcc   a
   --gau          c          uc -u   cgac

```

c) hsa-miR-4696

```

          c   c          auu
5' caaagccacugcaaga ggaua ugucaucu   c
   ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
3' guuucggugacguuuu ccugu acaguaga   c
          a   a          aga

```

d) hsa-miR-1343

```

u   g   u   u   a   c   -u   ucu
5' gc ggc ucgg gc gggg gcgg cccggg gggcc   g
   || ||| |||| || |||| |||| ||||| |||||
3' cg ccg gguc cg ucuc cgcc ggggucc cccgg   c
   c   -   u   c   a   c   uc   ucu

```

e) hsa-miR-6824

```

gaggu gua          a   u          u   - uu
5'   gggg ggu gggccaggga gc c c
   |||| ||| ||||| ||||| |||
3'   cccc ccg ucuggucucu ug g a
   ga   a   u          c u uc

```

f) hsa-miR-5197

```

-          auuccaca   --au   - a   a   aa   a          uu
5' uauggg          gaca   gaguau c auggc ca cuc uucuugaau u
   ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
3' guacuc          cugu   cucgua g uacug gu gag aagaacuuga g
   u          -cacuua   aaau          a c   a   ca   -          cc

```

g) hsa-miR-4495

```

a          c          ugga
5' agaaauguaaa aggcuuuuugcucag   g
   ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
3' ucuuuacauuu uucgaaaaacgaguu   u
   g          a          uuau

```

h) hsa-miR-3680-3p

```

          g   uc   a   a   ug          u   aa
5' aaauuaaggagg ac   acuc cagg u   ugcaaa gc a
   ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
3' uuuaauuccucc ug   ugag gucc a   acguuu cg u
          g   ga   g   c   gu          u   gu

```

Şekil 3.1. Kök-halka yapısındaki pri-miRNA dizileri üzerinde yerleşik olgun miRNA dizileri **a)** hsa-miR-3163, **b)** hsa-miR-6783-3p, **c)** hsa-miR-4696, **d)** hsa-miR-1343, **e)** hsa-miR-6824 **f)** hsa-miR-5197, **g)** hsa-miR-4495, **h)** hsa-miR-3680

RNA izolasyonundan sonra elde edilen total RNA'lardan ilgili miRNA'lara özgü cDNA oluşturmak üzere gerekli Reverse Transcriptase (RT) primer dizileri ile ekspresyon analizi için gerekli primer ve prob dizileri "Metabion International AG, Martinsried/Deutschland" tarafından sentezlendi. İlgili primer ve problemlerin dizileri çizelge 3.2'de gösterilmiştir. Ekspresyon analizi için RT primerleri kök-halka yapısında tasarlandı. Her prob 5' ucunda FAM ile işaretlenmiş floresan ışıma yapabilen boya ve 3' ucunda ise bu ışımının gerçekleştiği dalga boyuna sahip ışığın yayılmasını engelleyen Black Hole Quencher™ (BHQ) adındaki "quencher" (soğurucu) kovalent bağ ile bağlanmıştır. Ayrıca sitozin nükleotid yerine sitozin analogu olan C-5 propinil-deoksiribo Sitozin (pdC) ilavesiyle prob tasarlanması sırasında floresan boya ile işaretli oligonükleotidin erime sıcaklığı (Temperature melting-T_m) artırılarak hedefe özgüllük korunmaya çalışılmıştır. Prob dizileri tasarlanırken ilgili miRNA'nın özgün olarak elde edilmesi ve ekspresyonunun ölçülebilmesi için sıkıştırılmış nükleik asit teknolojilerinden (Zip nucleic acids-ZNA) yararlanılmıştır (Tablo 3.2). ZNA problemler oligonükleotidler ile yapısındaki spremün ünitesi aracılığıyla bağlantı kurarak hedefe olan ilgileri artırılır. Böylece ZNA'ların erime sıcaklığı önemli derecede artmasıyla hedefe özgül olması artırılmış olur.

Tablo 3.2.miRNA RT-PCR (Reverse Transcription PCR) ve Real-Time PCR primer-prob dizileri

miRNA adı	*miRNA Gen No	**miRNA Nükleotit Dizi No	Primer prob dizileri
hsa-miR-26b-5p	407017	NR_029500.1	RT-5'-GTCGTATGCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTTCGCACTGCATACGACACCTAT-3'
			F-5'-GCCGCTTCAAGTAATTCAGG-3'
			PR-5'-FAM-TG(pdC)ATA(pdC)GA(pdC)A(pdC)CTATCC-ZNA4-BHQ-1-3'
hsa-miR-3163	100423029	NR_036121.1	RT-5'-GTCGTATGCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTTCGCACTGCATACGAC GTCTTA-3'
			F-5'-GCCGCTATAAAATGAGGGCAG-3'
			FAM-5'-TG(pdC)ATA(pdC)GA(pdC)GT(pdC)TTA-ZNA4-BHQ-1-3'
hsa-miR-6783-3p	102466734	NR_106841	RT- 5'-GTCGTATGCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTTCGCACTGCATACGACCTACAG-3'
			F- 5'- GCCGCTTCCTGGGCTT-3'
			PR-5'- FAM-TG(pdC)ATA(pdC)GACCTACAGAGG-ZNA4-BHQ-1-3'
hsa-miR-1343-3p	100616437	NR_039836	RT- 5'- GTCGTATGCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTTCGCACTGCATACGACGCGAGA-3'
			F- 5'- GCCGCCTCCTGGGG-3'
			PR-5'- FAM-TGCATACGACGCGAGA-ZNA4-BHQ-1-3'
hsa-miR-4696	100616402	NR_039845	RT- 5'- GTCGTATGCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTTCGCACTGCATACGACAGATGA-3'
			F-5'- GCCGCTGCAAGACGGATA-3'
			R-5'-PFAM-TG(pdC)ATA(pdC)GACAGATGACA-ZNA4-BHQ-1-3'
hsa-miR-6824	102465495	NR_106882	RT- 5'- GTCGTATGCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTTCGCACTGCATACGACTCCCTG-3'
			F- 5'- GCCGCGTAGGGGAGGTT-3'
			PR-5'- FAM-TG(pdC)ATA(pdC)GA(pdC)TCCCTG-ZNA4-BHQ-1-3'
hsa-miR-5197-3p	100846991	NR_049829	RT- 5'- GTCGTATGCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTTCGCACTGCATACGACATTCTGA-3'
			F-5'- GCCGCAAGAAGAGACTGAGTCA-3'
			PR-5'- FAM-TG(pdC)ATA(pdC)GA(pdC) ATTCGA-ZNA4-BHQ-1-3'
hsa-miR-4495	100616287	NR_039716	RT-5'- GTCGTATGCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTTCGCACTGCATACGACAGCAAA-3'
			F- 5'- GCCGCAATGTAAACAGGCTT-3'
			PR-5'- FAM-TG(pdC)ATA(pdC)GA(pdC)AGCAAA-ZNA4-BHQ-1-3'
hsa-miR-3680-3p	100500917	NR_037451	RT-5'- GTCGTATGCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTTCGCACTGCATACGACCCTACT-3'
			F-5'- GCCGCTTTTGCATGACCC-3'
			PR-5'- FAM-TG(pdC)ATA(pdC)GA(pdC) C(pdC)TA(pdC)T-ZNA4-BHQ-1-3'
*www.ncbi.nlm.nih.gov/gene, **http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP. Kısaltmalar: F: Forward, R: Reverse, PR: Prob, RT: Revers transkriptaz, pdC: propinil-deoksiribo Sitozin, ZNA4: Zip Nükleik Asit 4			

3.6. RNA ürünlerinden cDNA Eldesi

Hasta ve kontrol gurbunun periferik kan örneklerinden izole edilen RNA'ların kalite ve saflık derecesini belirlemek için seçilen örneklerin Mersin Üniversitesi İleri Teknoloji ve Araştırma Merkezi'nde (MEİTAM) The CapitalBio NanoQ™ mikro hacim spektrofotometresinde ölçümü yapıldı. Seçilen RNA'ların 260/280 nm de yapılan ölçümlerinin sonuçlarında, hasta ve kontrol grubu arasında yakın değerler bulundu. Ekspresyon analizi için, endojen kontrol olarak seçilen hsa-miR-26b-5p'den, ekspresyon düzeyleri belirlenecek sekiz miRNA'dan ve sağlıklı bireylerin RNA'larından oluşturulan havuzdan elde edilen referans kontrolünden cDNA'lar oluşturuldu. Revers-transkriptaz polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR) için her bir miRNA'ya özgü 50 nM kök-halka RT primer, 5xRT tamponu, 10 mM dNTP, 200 U/μL RevertAid Revers Transkriptaz, 40 U/μL RiboLock RNase Inhibitor ve distile su karışımı toplam 10 μl olacak şekilde hazırlandı. RNA izolasyonu sonucu elde edilen total RNA örneğinden 5 μl karışıma eklendi. 16°C'de 30 dk, 42°C'de 30 dk, 85°C'de 5 dk PCR koşullarında miRNA'lar özgül olarak cDNA'ya dönüştürüldü ve örnekler -20°C'de saklandı.

Bileşik	Hacim (μl)
5X RT tamponu	3
dNTPs karışımı (10mM)	1,5
MMV-RT (200U/μl)	0,25
Ribolock RNase Inhibitör (40 Unite/ μl)	0,1
RNA örneği	5
Nükleaz içermeyen H ₂ O	5
50 nM RT Primer	4
Reaksiyon toplamı	22,85*
* Her bir örnek için 10 μl kullanıldı.	

3.6.1. Real-Time PCR ile Ekspresyon Analizi

Gerçek zamanlı RT-PCR, gen ifadesini nicelleştirmek için güçlü bir araçtır ayrıca moleküler genetik çalışmaların da geniş bir uygulama alanı, özgünlük ve doğru kantitasyon imkanı sunar. Periferik kan örneklerinden RNA izolasyonu gerçekleştirildikten sonra hem hasta hem de kontrol grubunda Vitiligo hastalığında etkili *MITF*, *SOX 10*, *TYR*, *TYRP1* ve *BCL2* genlerini hedef alan olgun miRNA'lara ait ekspresyon miktarlarının ölçümü gerçekleştirildi. Ölçümler, total RNA'dan RT-PCR ile komplementer DNA (cDNA) eldesi sonrasında miRNA'ların olgun dizilerine özgü kök-halka yapısındaki primerler ve probalar kullanılarak Kantitatif Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Quantitative Real Time Polymerase Chain Reaction; qRT-PCR) yöntemi ile tespit edildi. Olgun miRNA'ların tanımlanmasını sağlayan sistem; kantitatif kök-halka RT-PCR (qRT-PCR) ve TaqMan analiz ikilisinden oluşmaktadır. Real Time PCR'da kullanılan TaqMan problemleri, çoğaltılmak istenen DNA'ya komplementer, floresan işaretli tek zincirli problemlerdir. Primerlerden daha uzun oligonükleotidlerdir. Genellikle 5' ucunda floresan işaretli moleküllü reporter (FAM) ve 3' ucunda da quencher (BHQ) içerirler. Uyarılan floresan moleküllerin enerji transferi, yakınındaki quencher molekülünden daha fazla olduğunda ışınım meydana gelir (FRET= Fluorescence Resonance Energy Transfer). Böylece reporter ve quencher moleküllerin yakınlığı ışınımı bastırır. TaqMan problemleri, PCR ürününün iç bölgesine bağlanacak şekilde dizayn edilir. Primerler işaretli moleküllü taşımazlar. Gen bölgesinin çoğaltımı sırasında primerler hedef nükleik asit dizisi bağlanma bölgeleri arasına yapışarak diziye bağlanırlar. Taq DNA polimeraz enzimi 5'→3' nükleaz aktivitesi ile FAM boyasını diziden ayırır. Serbest hale geçen FAM sinyali oluşturur. DNA zinciri sentezi uzadıkça ve her bir döngüde ürün miktarı artar, floresan ışınım da buna paralel olarak artmaya devam eder. Ürün miktarı arttıkça floresan miktarı hızla artar ve bu artış "real-time" cihazının monitöründen izlenebilir (112-114).

3.6.2. PCR Ürünlerinin Saptanması

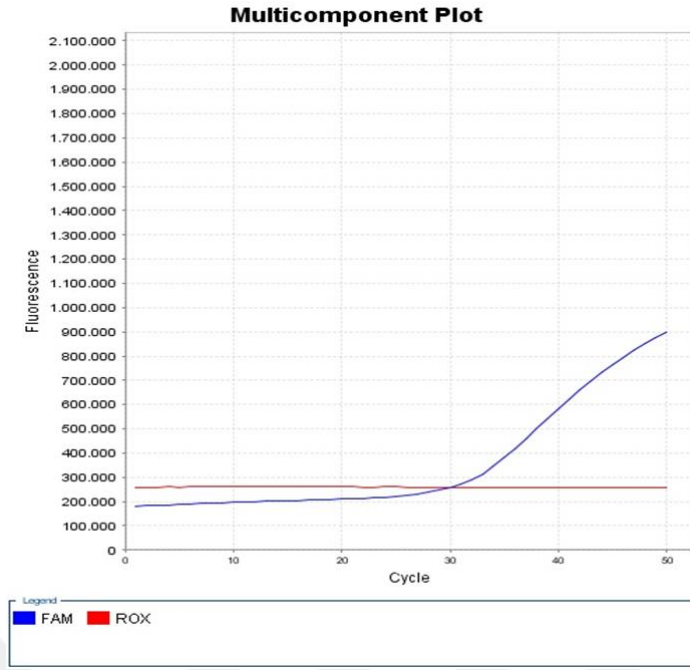
Real-time PCR; başlangıç miktarına göre oluşan, son PCR ürününün kantitasyonunun özgün, hassas ve diğer metodlara göre daha kolay tespit edilebildiği bir yöntemdir. İkinci aşamada, oluşturulan PCR ürünlerinin gerçek zamanlı ölçülmesi gerçekleştirilir. miRNA saptamasında floresan işaretli Taqman prob kullanıldı. 96 kuyucuklu plakanın her bir kuyucuğuna, aşağıda verilen miktarlarda hazırlanan karışımdan 20 µl konularak içerisine 5 µl özgül cDNA uygulandı. Daha sonra plakanın üzeri film ile hava kabarcığı kalmayacak şekilde kaplanarak ısı bloğuna yerleştirildi. Başlama evresinde 50°C'de 2 dk, 95°C'de 10 dk ve döngü evresinde 95°C'de 15 sn, 57°C'de 90 sn 50 döngü olacak şekilde Real-time PCR analizi gerçekleştirildi.

Bileşik	1x Real Time PCR (µl)
Master mix (Solis BioDyne)	12,5
Primer Universal (Metabion)	2,5
Primer Forward (Metabion)	2,5
Prob (Her bir miRNA için spesifik) (Metabion)	1*
H ₂ O	5
cDNA	5

* hsa-miR-3680-3p için prob miktarı 0,7 µl kullanıldı.

3.6.3. Veri Analizi

Gerçek zamanlı, niceliksel PCR deneylerinde elde edilen verileri analiz etmek için en sık kullanılan iki yöntem, mutlak (Absolute) kantitasyon ve göreceli (Relative) kantitasyon yöntemleridir. Mutlak kantitasyon, genellikle PCR sinyalinin standart bir eğri ile ilişkilendirilerek transkript kopya sayısını belirler. Göreceli kantitasyon ise bir tedavi grubundaki hedef transkriptin PCR sinyalinin, muamele edilmemiş bir kontrol gibi bir başka örneğe ait olan PCR sinyaliyle ilişkilendirir. $2^{-\Delta\Delta CT}$ yöntemi, gerçek zamanlı kantitatif PCR deneylerinden gen ekspresyonundaki göreceli değişiklikleri analiz etmenin kolay bir yoludur. Çalışmamızda da iki farklı örnekte bulunan (endojen kontrol ve hedef miRNA) miRNA miktarlarının pozitif kontrol örnekleriyle beraber karşılaştırılarak miRNA miktarındaki değişiklikler tespit edildi. miRNA ekspresyon düzeyindeki bu değişimler, SDS 2.0.6 yazılımı ile $\Delta\Delta CT$ değerleri kullanılarak belirlendi (Şekil 3.2). Daha sonra, $2^{-\Delta\Delta CT}$ değeri hesaplanarak verilerin normalizasyonu sağlandı.



Şekil 3.2. Real Time PCR'da endojen kontrol olarak kullanılan hsa-miR-26b-5p ekspresyon eğrisi. Kırmızı renkli yatay çizgi ROX (6-Karboksi-X-Rhodamin) pasif refereans boyasını, mavi renkli FAM eğrisi ise ekspresyon düzeyini göstermektedir.

3.7. İstatistiksel Analiz

Bu çalışmadan elde ettiğimiz verilerin istatistiksel analizleri, Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyoistatistik ve Tıbbi Bilişim Anabilim Dalı tarafından yapılmıştır. Ekspresyon düzeyleri için tanımlayıcı istatistiklerden ortalama $\pm$ standart sapma, medyan, 1. ve 3. yüzdalık (percentiles), minimum ve maksimum değerleri verildi. Yaş ve öykü kategorileri için tanımlayıcı istatistiklerden sayı ve yüzde oranlar verildi. Ekspresyon düzeyleri için Normal dağılıma uygunluk kontrolü **Shapiro-Wilk** testi ile yapıldı. Hasta-Kontrol ve cinsiyet gruplarında ekspresyon düzeyleri arasındaki farklılığı araştırmak için parametrik olmayan testlerden **Mann-Whitney U** testi, yaş ve öykü gruplarında ekspresyon düzeyleri arasındaki farklılığı araştırmak için ise parametrik olmayan testlerden **Kruskal-Wallis** Testi yapıldı. Hasta kontrol grupları arasındaki farklılıklar Box-plot grafikleri ile gösterildi. Tüm karşılaştırmalar için istatistik anlamlılık seviyesi $p < 0,05$ olarak alınmıştır.

4.BULGULAR ve TARTIŞMA

4.1. Hasta- Kontrol Grubunun Yaş ve Cinsiyet bakımından Değerlendirilmesi

Bu çalışmaya hasta grubunda gönüllü 56 birey, kontrol grubunda gönüllü 56 birey olmak üzere toplam 112 birey dahil edilmiştir. Hasta grubunda gönüllü 56 bireyin 26'sı erkek (%46,42), 30'u (%53,58) kadın olup yaş ortalamaları $31 \pm 18,8$ olarak hesaplandı. Kontrol grubunda gönüllü 56 bireyin 28'i erkek (%50), 28'i kadın (%50) olup yaş ortalamaları $30 \pm 11,09$ olarak hesaplandı. Gönüllü hasta grubundaki bireylerin yaş ortalaması ile gönüllü kontrol grubundaki bireylerin yaş ortalamaları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık gözlenmedi ($p > 0,05$).

Tablo 4.1. Hasta ve Kontrol grubundaki kadın ve erkek bireylerin yaş ortalaması (N=Birey sayısı)

Grup	YAŞ			
	Erkek		Kadın	
	N	Ort $\pm$ ss	N	Ort $\pm$ ss
Kontrol	28	28,6 $\pm$ 13,2	28	30 $\pm$ 11,9
Hasta	26	28,3 $\pm$ 20,3	30	31 $\pm$ 18,8

4.1.1. Hasta Grubu

Bu çalışmaya, 30 (%53,58) kadın, 26'i (%46,42) erkek olmak üzere toplam 56 gönüllü hasta birey dahil edildi. Yaş ortalamaları cinsiyet açısından değerlendirildiğinde kadın bireylerin yaş ortalaması $33,3 \pm 17,4$ iken, erkek bireylerin yaş ortalaması $28,3 \pm 20,3$ olarak hesaplanmıştır (Tablo 4.1). Çalışmaya dahil edilen ve değerlendirmeye alınan 56 gönüllü hasta bireye vitiligo tanısı, Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Dermatoloji Anabilim Dalı'nda ayrıntılı anamnez alınarak dikkatli bir fizik muayene ile yapıldı. Hastalardaki lezyonların *Wood* ışığı incelemesi ile vitiligo tanısı kesinleştirildi. Hastalar yaş, cinsiyet, vitiligo lezyonlarının klinik tipleri, hastalık başlangıç yaşı, hastalığın süresi, ailede vitiligo öyküsü, hastalık başlamadan önceki stres varlığı ayrıntılı bir şekilde sorgulandı. Bu bireylerin %54,9'unun aşırı stres altında olduğu, %19,6'nın stres altında olmadığı, %25,5'inin ise ailesinde genetik öykü olduğu saptandı. Gruplar cinsiyetler bakımından değerlendirildiğinde ise, hasta ve kontrol grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunmadı ($p > 0,05$) (Tablo 4.2).

4.1.2. Kontrol Grubu

Bu çalışmaya, 28'si (%50) kadın, 28'i (%50) erkek olmak üzere toplam 56 gönüllü kontrol birey dahil edildi. Yaş ortalamaları cinsiyet açısından değerlendirildiğinde kadın bireylerin yaş ortalaması $31,3 \pm 8,4$ iken, erkek bireylerin yaş ortalaması $28,6 \pm 13,2$ olarak

hesaplanmıştır (Tablo 4.1). Kontrol grubundaki erkek ve kadın bireylerin yaş ortalamaları arasındaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı bulundu ($p>0,05$). Gruplar cinsiyetler bakımından değerlendirildiğinde ise, hasta ve kontrol grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunmadı ($p>0,05$) (Tablo 4.2).

Tablo 4.2. Hasta ve Kontrol gruplarının cinsiyet bakımından değerlendirilmesi (N=birey sayısı).

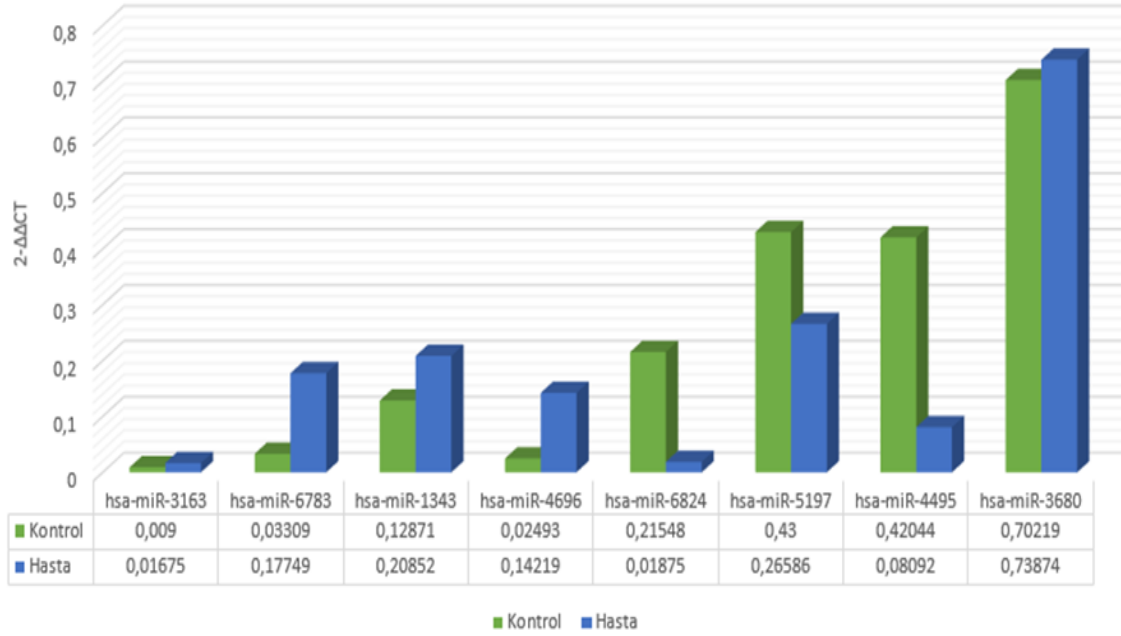
	Cinsiyet						
	Erkek		Kadın		Toplam		p
Grup	N	%	N	%	N	%	
Kontrol grubu	28	25	28	25	56	50	0,425
Hasta grubu	26	23,2	30	26,8	56	50	
Toplam	54	48,2	58	51,8	112	100	

4.2. Hasta ve Kontrol gruplarının Ekspresyon Verilerinin Analizi

Bu çalışmada deriye renk veren melanin pigmenti ve melanositlerin fonksiyon kaybı sonucu deride renk açılması ile karakterize bir pigmentasyon bozukluğu olan Vitiligo hastalığının patogeneziinde rol oynadığı düşünülen, melanosit oluşum yolağında anahtar görevi olan ilgili genleri yüksek skorla hedefleyen ve gen ekspresyonu düzeyinde bu ilgili genlerin regülasyonunu kontrol eden hsa-miR-3163, hsa-miR-6783-3p, hsa-miR-1343-3p, hsa-miR-4696, hsa-miR-6824, hsa-miR-5197-3p, hsa-miR-4495, hsa-miR-3680-3p miRNA'larının ekspresyon analizi Real-time PCR yöntemiyle kantitatif olarak analiz edilmiştir. miRNA'ların ekspresyon düzeyleri, hasta ve kontrol gruplarına göre değerlendirilerek p değerleri hesaplandı. Analizler süresince hasta ve kontrol grubundaki bazı bireylere ait ekspresyon düzeyleri ölçülemediğinden dolayı çalışmadan çıkarıldı. Sonuç olarak, hasta ve kontrol grupları arasında hsa-miR-3163, hsa-miR-1343, hsa-miR-6783-3p, hsa-miR-4696, hsa-miR-5197-3p ve hsa-miR-3680 ekspresyon düzeylerinde istatistiksel olarak bir fark gözlenmezken ($p>0,05$), **hsa-miR-6824 ve hsa-miR-4495**'in ekspresyon düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğu gözlemlendi ($p<0,05$) (Tablo 4.3) (Şekil 4.1).

Tablo 4.3. Hasta ve Kontrol gruplarına göre ilgili miRNA'ların ekspresyon düzeyleri ($2^{-\Delta\Delta CT}$), minimum, maksimum ve p değerleri (Q1=%25, Q3=%75).

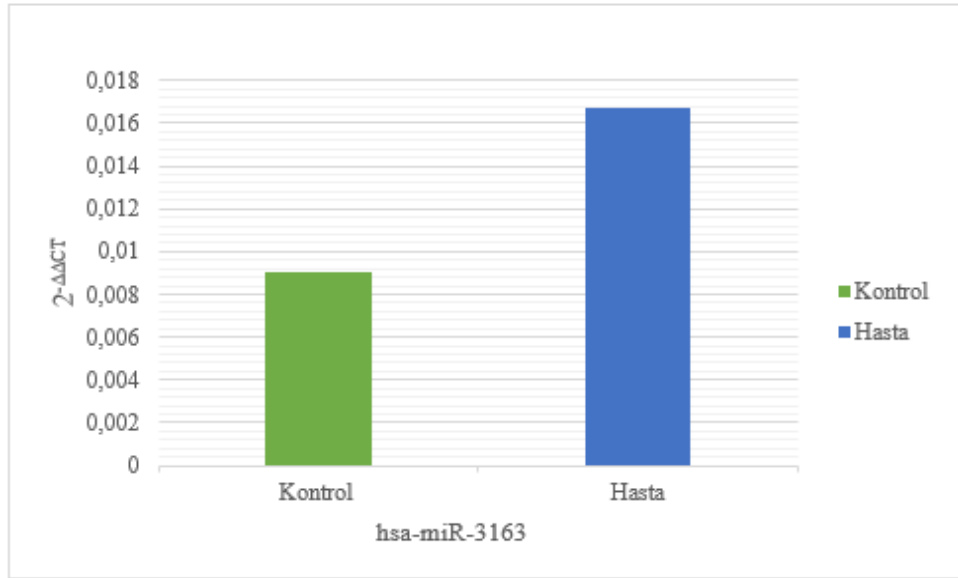
miRNA	Grup	N	Ekspresyon düzeyleri	(Min-Max)	[Q1-Q3]	p
<i>hsa-miR-3163</i>	Kontrol	56	0,00900	0,00001-4292,7089	[0,00102-0,06344]	0,145
	Hasta	54	0,01675	0,00016-15,86288	[0,00246-0,17174]	
<i>hsa-miR-6783-3p</i>	Kontrol	48	0,33009	0,00004-5,16670	[0,00180-0,80324]	0,082
	Hasta	50	0,17749	0,00004-1,68985	[0,00973-0,89631]	
<i>hsa-miR-1343-3p</i>	Kontrol	55	0,12871	0,00001-8,72848	[0,00369-1,30915]	0,903
	Hasta	50	0,20852	0,00000-45,60360	[0,00398-0,96710]	
<i>hsa-miR-4696</i>	Kontrol	52	0,02493	0,00000-899,58990	[0,00000-0,91676]	0,092
	Hasta	53	0,14219	0,00000-107,89147	[0,01012-1,27648]	
<i>hsa-miR-6824</i>	Kontrol	54	0,21548	0,00007-46,91320	[0,02226-0,98529]	0,001
	Hasta	56	0,01875	0,00004-1,68985	[0,00289-0,09245]	
<i>hsa-miR-5197-3p</i>	Kontrol	48	0,43000	0,00026-900,80859	[0,02399-2,71010]	0,972
	Hasta	52	0,26586	0,00088-747,07275	[0,03336-4,03849]	
<i>hsa-miR-4495</i>	Kontrol	55	0,42044	0,00001-33,43413	[0,04084-1,94027]	0,021
	Hasta	56	0,08092	0,00020-5,66184	[0,00673-0,74464]	
<i>hsa-miR-3680-3p</i>	Kontrol	56	0,70219	0,00014-108,07063	[0,051940-3,90063]	0,608
	Hasta	55	0,738740	0,00199-115,08300	[0,09730-4,36535]	



Şekil 4.1. Hasta ve Kontrol gruplarına ait hsa-miR-3163, hsa-miR-6783-3p, hsa-miR-1343-3p, hsa-miR-4696, hsa-miR-6824, hsa-miR-5197-3p, hsa-miR-4495 ve hsa-miR-3680-3p'nin ekspresyon düzeylerinin grafiksel gösterimi

4.2.1. hsa-miR-3163 Ekspresyonunun Değerlendirilmesi

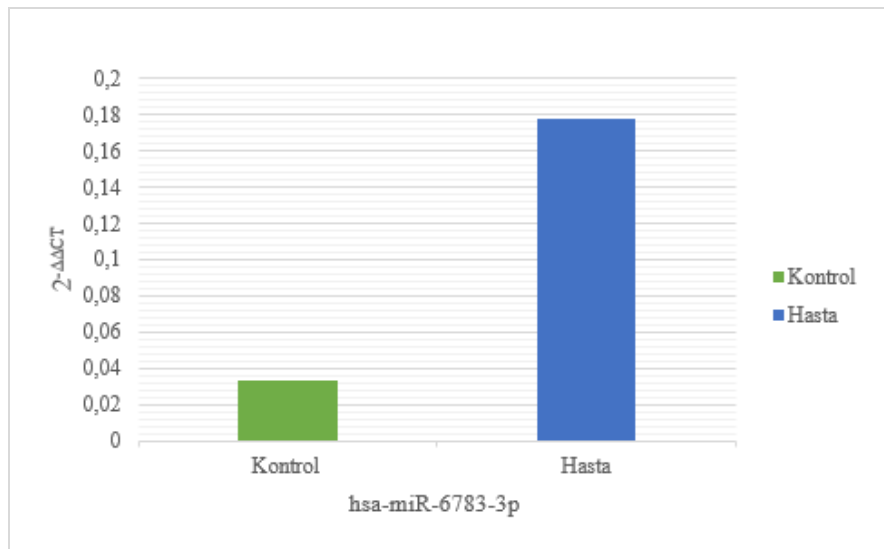
Hasta grubunda 54 birey, Kontrol grubunda ise 56 birey değerlendirilmeye alındı. Hasta grubunda $2^{-\Delta\Delta CT} = 0,01675$, Kontrol grubunda ekspresyon düzeyinin $2^{-\Delta\Delta CT} = 0,009$ olduğu gözlenirken; ekspresyon düzeyleri bakımından hasta grubunda kontrol grubuna göre ~1,8 kat artış olduğu bulundu (Tablo 4.3) (Şekil 4.2). Fakat bu artış kontrol ve hasta grubunda hsa-miR-3163'e ait ekspresyon düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ($p > 0,05$).



Şekil 4.2. Hasta ve Kontrol grubunun hsa-miR-3163'e ait ekspresyon düzeyinin grafiksel gösterimi (n hasta=54, n kontrol=56)

4.2.2. hsa-miR-6783 Ekspresyonunun Değerlendirilmesi

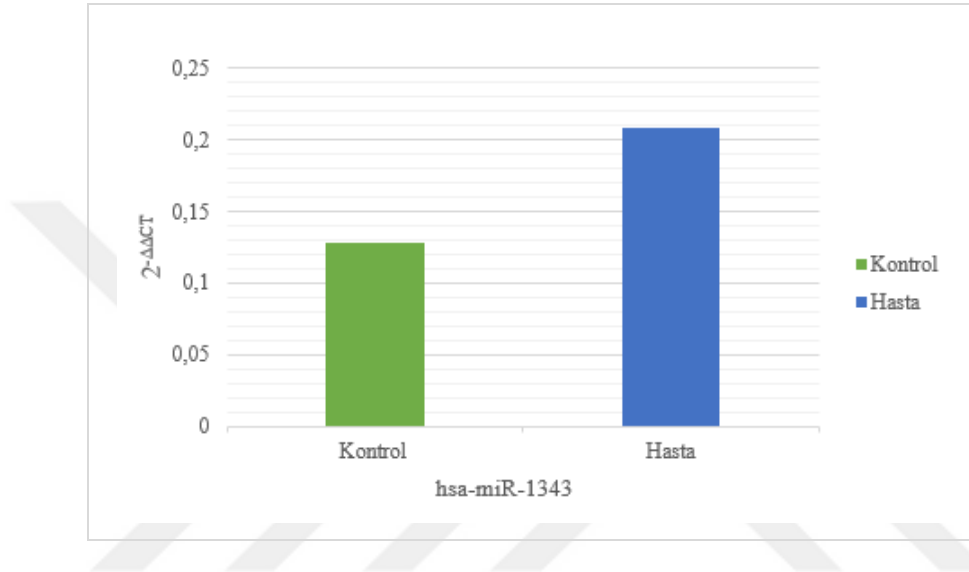
Hasta grubunda 50 birey, Kontrol grubunda ise 48 birey değerlendirilmeye alındı. Hasta grubunda $2^{-\Delta\Delta CT} = 0,17749$, Kontrol grubunda ekspresyon düzeyinin $2^{-\Delta\Delta CT} = 0,33009$ olduğu gözlenirken; ekspresyon düzeyleri bakımından hasta grubunda kontrol grubuna göre ~0,5 kat artış olduğu bulundu (Tablo 4.3) (Şekil 4.3). Fakat bu artış kontrol ve hasta grubunda hsa-miR-6783 ait ekspresyon düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ($p > 0,05$).



Şekil 4.3. Hasta ve Kontrol grubunun hsa-miR-6783-3p'ye ait ekspresyon düzeyinin grafiksel gösterimi (n hasta=50, n kontrol= 48)

4.2.3. hsa-miR-1343-3p Ekspresyonunun Değerlendirilmesi

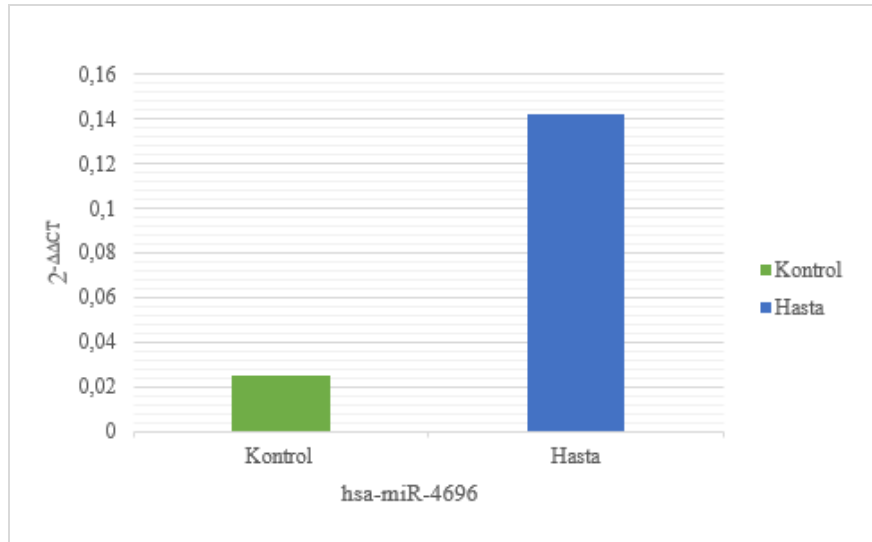
Hasta grubunda 50 birey, Kontrol grubunda ise 55 birey değerlendirilmeye alındı. Hasta grubunda $2^{-\Delta\Delta CT} = 0,20852$, Kontrol grubunda ekspresyon düzeyinin $2^{-\Delta\Delta CT} = 0,12871$ olduğu gözlenirken; ekspresyon düzeyleri bakımından hasta grubunda kontrol grubuna göre ~1,6 kat artış olduğu bulundu (Tablo 4.3) (Şekil 4.4). Fakat bu artış kontrol ve hasta grubunda hsa-miR-143-3p ait ekspresyon düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ($p > 0,05$).



Şekil 4.4. Hasta ve Kontrol grubunun hsa-miR-1343-3p'ye ait ekspresyon düzey grafiği düzeyinin grafiksel gösterimi (n hasta=50, n kontrol=55)

4.2.4. hsa-miR-4696 Ekspresyonunun Değerlendirilmesi

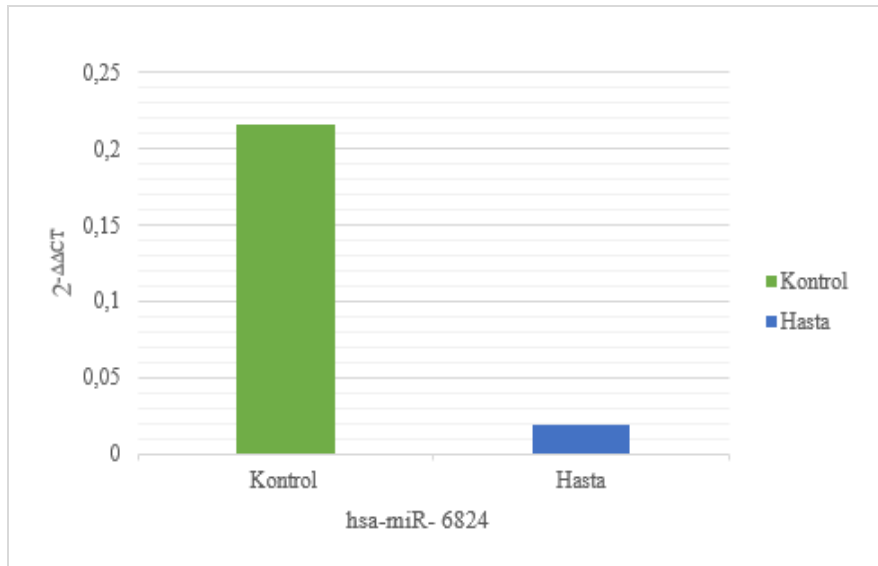
Hasta grubunda 53 birey, Kontrol grubunda ise 52 birey değerlendirilmeye alındı. Hasta grubunda $2^{-\Delta\Delta CT} = 0,14219$, Kontrol grubunda ekspresyon düzeyinin $2^{-\Delta\Delta CT} = 0,02493$ olduğu gözlenirken; ekspresyon düzeyleri bakımından hasta grubunda kontrol grubuna göre ~5,7 kat artış olduğu bulundu (Tablo 4.3) (Şekil 4.5). Fakat bu artış, kontrol ve hasta grubunda hsa-miR-4696-3p ait ekspresyon düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ($p > 0,05$).



Şekil 4.5. Hasta ve Kontrol grubunun hsa-miR-4696'ya ait ekspresyon düzeyinin grafiksel gösterimi (n hasta= 53, n kontrol= 52)

4.2.5. hsa-miR-6824 Ekspresyonunun Değerlendirilmesi

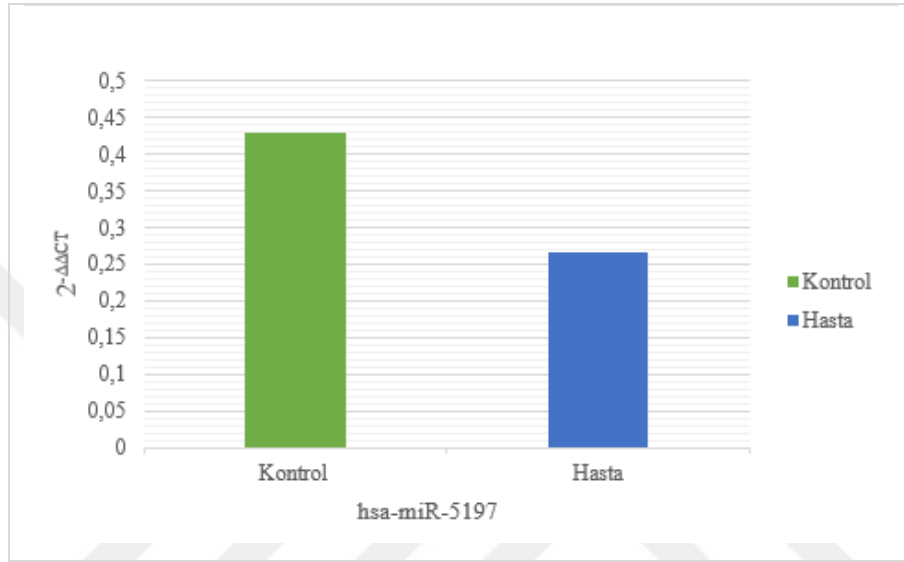
Hasta grubunda 56 birey, Kontrol grubunda ise 54 birey değerlendirilmeye alındı. Hasta grubunda $2^{-\Delta\Delta CT} = 0,01875$, Kontrol grubunda ekspresyon düzeyinin $2^{-\Delta\Delta CT} = 0,21548$, olduğu gözlenirken; ekspresyon düzeyleri bakımından hasta grubunda, kontrol grubun göre ~11,4 kat azalma olduğu bulundu (Tablo 4.3) (Şekil 4.6). Bu sonuç, **hasta ve kontrol grubunda hsa-miR-6824'e ait ekspresyon düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p < 0,05$)**.



Şekil 4.6. Hasta ve Kontrol grubunun hsa-miR-6824'e ait ekspresyon düzeyinin grafiksel gösterimi (n hasta=56, n kontrol=54)

4.2.6. hsa-miR-5197-3p Ekspresyonunun Değerlendirilmesi

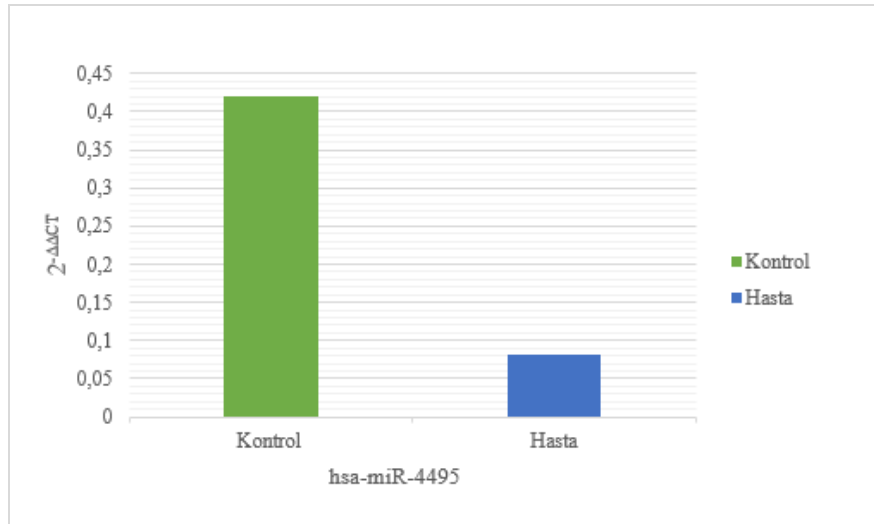
Hasta grubunda 52 birey, Kontrol grubunda ise 48 birey değerlendirilmeye alındı. Hasta grubunda $2^{-\Delta\Delta CT} = 0,26586$, Kontrol grubunda ekspresyon düzeyinin $2^{-\Delta\Delta CT} = 0,43000$ olduğu gözlenirken; ekspresyon düzeyleri bakımından hasta grubunda kontrol grubuna göre ~1,6 kat azalma olduğu bulundu (Tablo 4.3) (Şekil 4.7). Bu sonuç, kontrol ve hasta grubunda hsa-miR-5197-3p ait ekspresyon düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ($p > 0,05$).



Şekil 4.7. Hasta ve Kontrol grubunun hsa-miR-5197-3p'ye ait ekspresyon düzeyinin grafiksel gösterimi (n hasta=52, n kontrol=48)

4.2.7. hsa-miR-4495 Ekspresyonunun Değerlendirilmesi

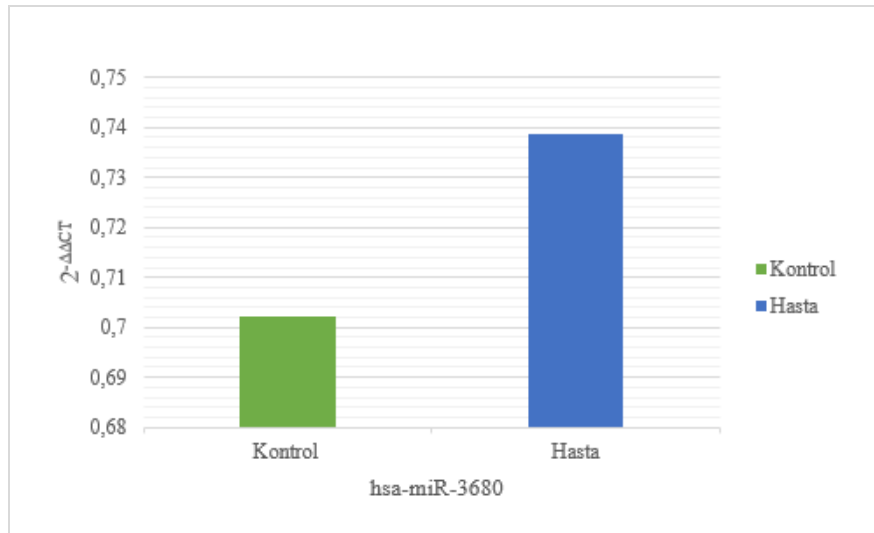
Hasta grubunda 56 birey, Kontrol grubunda ise 55 birey değerlendirilmeye alındı. Hasta grubunda $2^{-\Delta\Delta CT} = 0,08092$, Kontrol grubunda ekspresyon düzeyinin $2^{-\Delta\Delta CT} = 0,42044$ olduğu gözlenirken; ekspresyon düzeyleri bakımından hasta grubunda kontrol grubuna göre ~5,1 kat azalma olduğu bulundu (Tablo 4.3) (Şekil 4.8). Bu artış, **hasta ve kontrol grubunda hsa-miR-4495 ait ekspresyon düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bulundu** ($p < 0,05$).



Şekil 4.8. Hasta ve Kontrol grubunun hsa-miR-4495'e ait ekspresyon düzeyinin grafiksel gösterimi (n hasta=56, n kontrol=55)

4.2.8. hsa-miR-3680 Ekspresyonunun Değerlendirilmesi

Hasta grubunda 55 birey, Kontrol grubunda ise 56 birey değerlendirilmeye alındı. Hasta grubunda $2^{-\Delta\Delta CT} = 0,73874$, Kontrol grubunda ekspresyon düzeyinin $2^{-\Delta\Delta CT} = 0,70219$ olduğu gözlenirken; ekspresyon düzeyleri bakımından hasta grubunda kontrol grubuna göre ~1,05 kat artış olduğu bulundu (Tablo 4.3) (Şekil 4.9). Fakat bu artış kontrol ve hasta grubunda hsa-miR-3680 ait ekspresyon düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ($p > 0,05$).



Şekil 4.9. Hasta ve Kontrol grubunun hsa-miR-3680-3p'ye ait ekspresyon düzeyinin grafiksel gösterimi (n hasta=55, n kontrol=56)

Vitiligo metabolik ve immün sistemde değişiklikler ile birlikte genetik ve çevresel faktörlerle ilişkilendirilen kompleks bir hastalıktır. Melanosit yenilenmesine ve/veya çoğalmasına neden olan anomaliler birincil olarak melanositlerde bir hasarın olduğunu göstermektedir. Bununla birlikte, özellikle hastalığın ilerleyici fazı sırasında sessiz inflamasyon ve otoimmünitenin önemli rolü bulunmaktadır. İmmün mekanizmalar bu kompleks hastalığın nedenlerini yeterince açıklayamadığı için, otoimmünite, biyokimyasal nedenler ve çevresel faktörlerin genetik olarak yatkın hastalarda vitiligo patofizyolojisine katıldığı öne sürülmektedir. miRNA'lar hücre proliferasyonu, hücre gelişimi, bağışıklık cevap ve karsinogenez de dahil olmak üzere birçok hücresel aktiviteyi etkileyebilmektedir. miRNA'lar genellikle intrasellüler bir komponent olmasına rağmen; serum, idrar, tükürük ve süt gibi vücut sıvılarında da bulunabilmektedirler. Serumda tek başına bulunan miRNA'lar normal koşullar altında RNaz tarafından yok edilmekte fakat RNaz enzimi de dahil olmak üzere aşırı sıcaklık, yüksek pH veya donma-çözme döngüleri gibi bazı sert koşullardan korunmaları nedeniyle, aslında düşünüldenden daha stabil olduğu tespit edilmiştir (103). miRNA'ların endojen RNaz aktivitesinden korunması, gelecekte başta kanser olmak üzere diğer hastalıkların tanı ve tedavisinde ekstrasellüler biyobelirteçler olarak kullanılabileceğini göstermektedir. Bu nedenle çalışmamızda vitiligo hastalığının moleküler patogeneze etkisi olabileceği hipoteziyle, vitiligo hastalığına sahip bireylerin periferik kan örneklerinden melanogenezde anahtar rollere sahip genleri hedefleyen hsa-miR-3163, hsa-miR-6783-3p ve hsa-miR-1343-3p, hsa-miR-4696, hsa-miR-6824, hsa-miR-5197-3p, hsa-miR-4495 ve hsa-miR-3680-3p'nin ekspresyon analizleri gerçekleştirildi. Ekspresyon analiz sonuçları, kontrol grubuna ait bireylerin ekspresyon analiz sonuçlarıyla karşılaştırılarak istatistiksel olarak değerlendirildi. hsa-miR-3163, hsa-miR-1343, hsa-miR-6783-3p, hsa-miR-4696, hsa-miR-5197-3p ve hsa-miR-3680'nin ekspresyon düzeylerinde anlamlı bir fark bulunmazken ($p>0,05$); hsa-miR-6824 ve hsa-miR-4495'nin ekspresyon düzeylerinin hasta grubunda kontrol grubuna göre azaldığı görüldü ($p<0,05$).

hsa-miR-3163, Mikroftalmi ile ilişkili transkripsiyon faktörü (*MITF*) genini %99 oranında hedef alan miRNA olup, 11q13.2 kromozomal bölgede yerleşiktir. *MITF*, melanositlerin pigmentasyonu, proliferasyonu ve hayatta kalmasıyla ilgili olan *TYR* gen ekspresyonunun düzenlenmesinde yer alan en önemli transkripsiyon faktörüdür. Ayrıca antiapoptotik *BCL2* gen ekspresyonunu up-regüle etmektedir. *MITF* geninde meydana gelen delesyonların melanositlerin apoptoza gitmesine neden olduğu gösterilmiştir. Dolayısıyla *MITF* geni melanogenezde çok önemli rol oynamaktadır (115). Yaptığımız çalışmada *MITF* genini hedefleyen hsa-miR-3163'ün ekspresyon düzeyleri bakımından istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı ($p>0,05$).

Bhardwaj ve arkadaşları Vitiligo hastalarının immün komorbiditeye sahip olduğunu ve immünoşüpresif tedavilere olumlu yanıt verilmesi üzerine NSV hastalarının serumlarında epidermal sistemik sitokinlerin ile *MITF* geninin lezyonlu bölgelerindeki ekspresyon düzeyini

araştırmışlardır. 42 aktif ve 30 stabil NSV'li hasta ile kontrol grubu olarak 30 bireyin serum sitokin düzeylerini kontrol etmişlerdir. Lezyonlu ve normal cilt biyopsilerini Hematoksilen-Eozin boyamasına tabi tutmuşlardır. Serumdan sitokin analizlerini *ELISA* yöntemiyle yapmışlardır. İnflamatuvar sitokinlerin ve onların reseptörlerinin hem aktif hem de stabil NSV'li lezyonlu derideki mRNA ekspresyonunu kantitatif PCR ile değerlendirmişlerdir. *MITF* ve IL-17A, lezyonlu, perilezyonel ve normal cilt dokularında immüno-modifiye edilmiş. Hastalarda lezyonlu deride melanositler üzerindeki spesifik etkiyi kontrol etmek için, normal ve lezyonlu deri biyopsilerinde *MITF* ekspresyon düzeyini incelemişlerdir. Sonuç olarak aktif hastalarda, IL-17A, IL-1b ve TGF- β ekspresyonunda anlamlı artış gözlenirken, stabil hastalarda hiçbir değişiklik gözlenmemiş. Bu sitokinlerin arasında en belirgin artış IL-17A'da görülürken; hastaların lezyonlu ve perilezyonlu deri biyopsilerinde normal deri biyopsisine göre *MITF* ekspresyonunda azalma gözlemlenmiştir. Bu sitokinlerin ve *MITF*'nin lezyonlu derideki melanositik aktivitenin düzensizliğinde olası bir rol oynadığını ve bu nedenle aktif vitiligonun ilerlemesinden sorumlu olabileceğini öne sürmüşlerdir (116)

Rani ve arkadaşlarının vitiligolu hastaların lezyonlu deri biyopsilerinde fibroblast-derive faktör nörogulin 1 (NRG1)'in ekspresyon düzeyinin, melanosit düzenleyici genlerin ekspresyonu (*MITF*, *c-KIT*, *TYR*, *DCT*) üzerindeki etkisini araştırmışlardır. 10 vitiligolu hastanın lezyonlu ve normal deri biyopsileri ile kontrol grubu olarak 9 bireyin deri biyopsilerini alarak gen ekspresyon analizlerini qRT-PCR ile protein analizini ise immünohistokimya ile yapmışlardır. Ayrıca biyopsilerden kurdukları melanosit kültürlerini pasajlayarak 96 kuyucuklu plakaya (plate) almışlar ve NRG1'in farklı konsantrasyonlarıyla muamele etmişlerdir. Sonuç olarak Vitiligo hastalarının lezyonel derisinde NRG1 ekspresyonunun ve protein düzeyinin azalmış olduğunu belirlemişlerdir. Ayrıca NRG1'in farklı konsantrasyonlarıyla muamele edilmiş melanosit hücrelerinde lezyonlu deride azalmış ekspresyon düzeyinde olan *MITF*, *c-KIT*, *TYR*, *DCT* genlerinin ekspresyon düzeylerinde artış olduğunu saptamışlardır. Vitiligo hastalarının lezyonel derisinde NRG1'in daha düşük ekspresyonunun, melanosit büyümesini inhibe ettiğini bu nedenle NRG1'in düşük ekspresyonunun melanosit kaybı ve vitiligo patogenezi olası bir rol oynayabileceğini öne sürmüşlerdir (117).

Kingo ve arkadaşları intrasellüler melanogenez yollarındaki olası ekspresyonel değişimlerin vitiligo patogenezi üzerindeki etkilerini araştırmışlardır. Vitiligo hastalarının lezyonlu ve lezyonlu olmayan deri biyopsileri ile sağlıklı kontrol bireylerin deri biyopsi örneklerinden melanokortin sistemde görevli sekiz genin (*MITF*, *CREB1*, *p38*, *USF1*, *PIK3CB* (*PI3K*), *RPS6KB1*, *LEF1* and *BCL2*) ekspresyon analizlerini QRT-PCR yöntemiyle yapmışlardır. Sonuç olarak kontrol bireylerin deri örneklerine göre vitiligolu lezyonlu deride *MITF*, *LEF1*, *p38*, *PIK3CB* ve *RPS6KB1*'in ekspresyon düzeylerinin azaldığını saptamışlardır. Vitiligo hastalarının lezyonlu olmayan derilerinde *USF1* ve *BCL2* ekspresyonunun sağlıklı kontrollere göre daha

yüksek olduğu gösterilmiştir. Ayrıca vitiligo hastalarının lezyonlu ciltlerinde *MITF* ve *BCL2*'nin mRNA düzeyleri, lezyonlu olmayan cilt bölgelerine göre azalmış olduğunu göstermişlerdir (118).

Yapılan araştırmalar, *MITF* geninin ekspresyon düzeyinin vitiligolu hastaların lezyonlu deri biyopsilerinde, lezyonsuz ve sağlıklı deriye göre azaldığını göstermektedir. Yaptığımız çalışmada ekspresyon düzeyleri bakımından hasta grubunda kontrol grubuna göre ~1,8 kat artış olduğu bulundu. Fakat bu artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ($p>0,05$). Pigmentasyon mekanizmasının düzenlenmesinde cAMP/PKA en önemli sinyal yolağıdır. Melanokortin reseptörleri, hücre içi cAMP konsantrasyonunun yükselmesine neden olan adenilat siklazı (AC) aktive eder. Böylece cAMP, protein kinaz A'yı (PKA) aktive eder. PKA'nın aktivasyonu cAMP duyarlı element bağlayıcı protein 1'i (CREB1) fosforilleyerek aktive eder. CREB1'in fosforilasyonu *MITF* ekspresyon düzeyini artırır. Ayrıca *MITF*; *TYR*, *TYRP1* ve *DCT*'nin ekspresyon düzeylerinin pozitif bir düzenleyicisidir ve bu enzimlerin transkripsiyonunu artırır (39). Görüldüğü gibi *MITF* geni görev aldığı mekanizmalarda birden çok molekül ile etkileşime girerek fonksiyonunu yapmaktadır. Çalışmamızda hsa-miR-3163'ün hasta grubunun ekspresyon düzeyinde, kontrol grubuna göre ~1,8 kat artış olduğu görüldü. Hasta bireylerdeki hsa-miR-3163 ekspresyon düzeyindeki artış *MITF* gen ekspresyonunu baskılayarak genin ekspresyon düzeyini azaltmış olabilir. Yapılan çalışmalar vitiligolu hastalarda *MITF* geninin ekspresyon düzeyinin azaldığını göstermektedir. Bu sonuç yaptığımız çalışmayı destekler nitelikte olmaktadır. Çalışmamız *MITF* geninin ekspresyonunu kontrol eden diğer genlerin ve *MITF* genini hedefleyen diğer miRNA'ların ekspresyon düzeylerinin araştırılabileceğini göstermektedir. Bu sonuç ile vitiligo hastalığında hsa-miR-3163 ekspresyonunun literatüre katkı sağlayacağını düşünmekteyiz.

SOX10 genini %91 oranında hedef alan **hsa-miR-6783-3p**, 17q21.31 kromozomal bölgede lokalizedir. *SOX10* geni primer nöral krest hücrelerinin göçünde, kök hücre sağkalımında ve melanosit gelişimi ve fonksiyonunda ifade edilen önemli bir gendir. *SOX10*, melanositlerin farklılaşmasını ve terminal fenotipini almasını *MITF* transkripsiyon faktörünün ifadesini indükleyerek yapmaktadır. *SOX10* genindeki mutasyonlar, *Waardenburg-Shah sendromu tip IV* gibi hipopigmentasyon ile karakterize nöropatiler ile ilişkilidir. Ayrıca *SOX10* geninin yalnızca hipopigmentasyonla ilişkili hastalıklarda değil; tümörlerde, çoğu miyelom ve gliomlarda, malign periferik sinir kılıfı tümörlerinde, berrak hücreli sarkomda, invazif meme kanserlerinde ve tükrük adenoid kistik kanserlerinde de ifade edildiği gösterilmiştir (41). Hem gelişim sırasında hem de yetişkinlerde melanosit proliferasyonu, WNT/ β -Katenin yolağı, G-bağı Endotelin B reseptörü (EDNRB) ve ligandı Endotelin, tirozin kinaz reseptörü KIT ve ligandı KITL (KITL), Hepatosit büyüme faktörü (HGF) ve reseptörü MET, ayrıca *SOX10*, transkripsiyon faktörleri PAX3 ve BRN2 dahil olmak üzere çok sayıda molekül tarafından düzenlenir (118).

Blokziji ve arkadaşları vitiligo hastaları ve malignant melanom (MM) hasta serumlarında *SOX10* protein düzeyini *Proximity Ligation Assay (PLA)* yöntemiyle

araştırmışlardır. Çalışmaya 85 vitiligolu hasta, 110 MM'li hasta ve 85 sağlıklı kontrol bireyi dahil etmişlerdir. Sonuç olarak sağlıklı bireylerde SOX10 proteinine rastlanmazken; vitiligo ve MM'li hastaların dolaşımında belirgin derecede yüksek SOX10 protein seviyeleri saptamışlardır. Bu durumun vitiligo hastalarında ve MM'de görülen ve daha iyi prognozla ilişkili olduğu bildirilen vitiligo benzeri lezyonlarda melanositlerden SOX10 protein salınımının olabileceğini ve her iki hastalıktada görülen lezyonların benzer mekanizmalarla oluştuğunu öne sürmüşlerdir (119).

SOX10'un melanosit gelişimindeki rolü daha önceden spontan ve indüklenmiş *SOX10* mutant hayvanlarda çalışılmıştır. Melanosit spesifik *SOX10* nakavt fareleri kullanılarak yapılan *in vivo* çalışmada, *SOX10*'un postnatal melanosit sağkalımı ve melanosit kök hücre farklılaşması için gerekli olduğu bulunmuştur. Ayrıca, *SOX10*, melanoma inhibitör aktivitesi ile *MITF*, *p21WAF1*, *p27KIP2* ve *E2F1*'in ekspresyonunu etkileyerek melanomada invazyonun ve sağkalımın önemli bir düzenleyicisi olduğu gösterilmiştir. *SOX10*'un melanosit popülasyonunun gelişimi ve korunmasında karmaşık roller oynadığı kavramı desteklenmekte fakat *SOX10*'un melanosit proliferasyonundaki spesifik rolü hala tam olarak anlaşılamamıştır (120). Yaptığımız çalışmada *SOX10* genini %91 oranında hedefleyen hsa-miR-6783-3p ekspresyon düzeyleri bakımından hasta grubunda kontrol grubuna göre ~0,5 kat artış olduğu bulundu fakat bu artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ($p>0,05$). Bu durum hsa-miR-6783'ün *SOX10* genini baskılama yoluyla ekspresyonunu düzenlediği hipotezini düşündürmüştür. Çalışmamız hasta ve kontrol bireylerinden alınan kan örneklerinden serum SOX10 protein düzeylerine ve *SOX10* gen ekspresyonuna bakılarak desteklenebilir. Ayrıca lezyonlu ve lezyonsuz deri biyopsi örneklerinden ayrıntılı melanositik hücre kültür çalışmaları ile *SOX10* geni ve bu genle etkileşime giren diğer genlerin ekspresyonu ve geni hedefleyen diğer miRNA'ların ekspresyon düzeyine bakılabilir. *SOX10* genini %90 oranında hedefleyen **hsa-miR-1343-3p**, 11p1.3 kromozomal bölgede lokalizedir. Yaptığımız çalışmada *SOX10* genini hedefleyen hsa-miR-1343-3p'de hasta ve kontrol grubuna ait ekspresyon düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı. Fibrotik hastalıklar, inflamatuvar aktivasyondan kaynaklanan bağ dokusunun patolojik birikimi ile karakterize ve organ yetmezliği ile sonuçlanan bir hastalıktır. Fibrozisin nedenleri genellikle yaralanma, doku hasarı gibi fiziksel şiddet, genetik koşullar (örneğin kistik fibroz) ve çevresel faktörlerdir (örneğin radyasyon kaynaklı yaralanma). Doku fibrozisi, birçok yaygın hastalıkla ilişkili olup etkili bir şekilde tedavi edilememektedir. Fibroze eşlik eden karmaşık biyolojik süreçler, genellikle TGF- β sinyal iletim yolağını içeren anormal sinyal iletimini gerektirir. Bu sinyal iletimini bastırmaya yönelik mekanizma arayışında, miRNA'lar, TGF- β yolunun üyelerini veya bir bütün olarak yolu hedefleyebilen bir molekül sınıfı olarak ortaya çıkmıştır. miR-1343 TGF- β molekülünü hedefleyen ve sinyalin iletiminin baskılayıcısı olarak tanımlanmış ve bu durumun sonucu olarak, her iki kanonik TGF- β reseptörünün baskılanması ile fibrozis hastalığının ortaya çıkmasına neden olduğu gösterilmiştir (121). Stolzenburg ve arkadaşlarının

A549 akciğer epitelyal hücrelerinde yaptıkları çalışmada CRISPR/Cas9 aracılı delesyona uğramış miR-1343'ün, fibrozis ile ilişkili olan ve TGF- β yolağı efektörleri olduğu bilinen birçok işlev ve geni etkilediği göstermişlerdir. Ayrıca bu çalışmada hsa-miR-1343'ün hücreler tarafından çevrelenen ortama gönderilen ve uzak hedef hücreler tarafından absorbe edilebilen hücre ekzozom denilen hücre dışı kesecik içine yerleştirilebileceğini de göstermişlerdir. Ekzozomlar tarafından primer akciğer fibroblastlarına verilen hsa-miR-1343, TGF- β sinyalizasyonunu ve fibrozis belirteçlerini azaltmada ölçülebilir bir işleve sahip olduğu saptanmış. Bu sonuçlar, TGF- β sinyal ileti yolağının düzenlenmesinde hsa-miR-1343'ün rolünü vurgulamakta ve fibrotik hastalıkta terapötik olarak kullanılması düşünülmektedir (122).

SOX10 genini %90 oranında hedefleyen **hsa-miR-1343-3p** ekspresyon düzeyinin hasta grubunda kontrol grubuna göre ~1,6 kat artış olduğu bulundu. Fakat bu artış kontrol ve hasta grubunda hsa-miR-1343-3p'ye ait ekspresyon düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ($p>0,05$). Melanositler MHC I ve MHC II moleküllerini, ICAM-1, VCAM-1 gibi adezyon moleküllerini, IL-1, -6, -8 gibi sitokinleri ve TGF- β 1'i gibi transforme büyüme faktörlerini de salgılamaktadır. Ayrıca, melanositler sadece fagositoz değil antijenleri de işleyebilme ve antijenik peptitleri T hücrelerine sunabilme özelliklerine de sahiptirler. Bu çalışmalar melanositlerin bir çeşit profesyonel olmayan antijen sunan hücreler (APC) olduğunu göstermekte ve vitiligoda melanositlerin otoimmün yıkımına rolü olabileceğini göstermektedir (51). Yukarıdaki bilgiler ışığında **hsa-miR-1343-3p'ün** yalnızca *SOX10* genini değil, TGF- β 'yı da hedefleyen ve sinyal iletiminin baskılayıcısı olarak tanımlanmış bir miRNA olmasından dolayı, çalışmamızda kullandığımız örneklem grubunda TGF- β ekspresyonuna bakılabileceği düşüncesi doğmuştur. Ayrıca vitiligolu hastaların periferik kan ve lezyonlu-lezyonsuz doku biyopsilerinde *SOX10* ve *SOX10* ile ilişkili genlerin ekspresyon analizine bakılabilir. *SOX10* genini hedefleyen diğer miRNA'ların ekspresyon analizi yapılarak çalışmamızdaki miRNA ekspresyonları ile karşılaştırılabilir. Yaptığımız bu çalışmanın literatüre ve depigmentasyon hastalıklarının moleküler patogenezinin araştırıldığı çalışmalara katkı sağlayacağını düşünmekteyiz.

Melanogenez sinyal yollarında melanin pigmentinin oluşumunda TYR en önemli enzimdir. Enzimlerin çeşitli otoimmün bozukluklarda otoantijen oldukları bilinmektedir. Bu nedenle, vitiligo ve melanomlu hastalarda antitirozinaz antikorlarının saptanmasından sonra, TYR'nin inhibisyonunun, dermatolojik bozuklukların tedavisi için etkili tırotopotik bir ajan olabileceği vurgulanmaktadır (123). *TYR* genini %91 oranında hedefleyen ve 11q13.4 kromozomal bölgede lokalize olan **hsa-miR-4696'nin** hasta ve kontrol grubuna ait ekspresyon düzeyleri bakımından hasta grubunda kontrol grubuna göre ~5,7 kat artış olduğu bulundu. Fakat bu artış, istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ($p>0,05$). Vitiligolu hastalarda melanin üretimi sınırlı düzeyde ya da hiç olmamaktadır. hsa-miR-4696, *TYR* genini baskılayarak hastalarda melanin oluşumunu negatif yönde etkilemiş olabilir. *TYR* genini %87 oranında hedefleyen **hsa-**

miR-6824 3p21.31 kromozomal bölgede lokalizedir. Yaptığımız çalışmada mir-6824'ün hasta grubunun ekspresyon düzeyinde kontrol grubuna göre ~11,49 kat azalma olduğu ve bu sonucun istatistiksel olarak anlamlı olduğu bulundu ($p<0,05$). Yapılan çalışmalar Vitiligo hastalarında anti-melanosit antikollarının bulunduğunu göstermiştir. Vitiligo hastalarından alınan serum örneklerinde anti-tirozinaz antikolların bulunduğu gösterilmiş, ancak yine de bu ekstrasellüler proteinin neden antijenik hale geldiği ile ilgili mekanizmalar tam olarak net değildir. Yaptığımız çalışmada *TYR* genini hedefleyen hsa-miR-6824'ün ekspresyon düzeyinin, hasta kan örneklerinde kontrol grubuna göre azalmasının nedeni bu anti-tirozinaz antikolların varlığı olabilir. Ek çalışmalarla örneklem grubumuzdaki hasta ve kontrol bireylerin periferik kan örneklerinden anti-tirozinaz antikolların düzeyi belirlenerek sonucumuzla karşılaştırılabilir. Ayrıca vitiligolu hasta bireylerin kan örneklerinden yapılan çalışmalara paralel olarak doku biyopsileri alınarak *TYR* gen ekspresyonuna ve protein miktarına bakılarak aynı biyolojik materyallerden miRNA molekülünün olası fonksiyonlarının gösterilmesi için vitiligolu hasta bireylerin lezyonlu ve lezyonsuz deri bölgelerinden alınan biyopsi örneklerinden de ekspresyon düzeyleri ile karşılaştırılabileceğini düşündürmüştür. Ayrıca melanosit hücre kültür uygulamaları ile çalışmalar yapılarak ilgili miRNA ve hedeflediği genin ekspresyon düzeylerine bakılarak hsa-miR-6824'ün vitiligo hastalığının karakteristik özelliği olan melanosit kaybında nasıl bir rol üstlendiğinin araştırılabilir. Yapılan literatür taramalarında hsa-miR-4696-3p ve hsa-miR-6824 ile ilgili bir veriye rastlanmamış olup, yaptığımız bu çalışmanın vitiligo hastalığının miRNA'lar ile ilişkisinin araştırıldığı çalışmalara ve literatüre katkı sağlayacağını düşünmekteyiz.

Melanositlerde eksprese edilen *PAX3* geninin, *TYRP1* promotörünü bağlayabildiği ve aktivitesini upregüle edebildiği gösterilmiştir. Çalışmalar azalmış *TYRP1* aktivitesinin, *TYR* aktivitesini olumsuz etkilediğini göstermiştir. İnsan melanom hücrelerinin *TYRP1* cDNA taşıyan bir retroviral vektör ile transfekte edilmesiyle yapılan bir çalışmada ise proteinin yeniden ekspresyonunun, tirozinaz aktivitesini uyararak melanogenezini başlattığını göstermiştir. Ayrıca *TYRP1* mutasyonları insanda bir albinizm türü olan okülokütan albinizm tip 3 (OCA3)'ten sorumludur (124). *TYRP1* genini %95 oranında hedef alan ve 5q31.3 kromozomal bölgede lokalize olan **hsa-miR-5197-3p'nin** kontrol ve hasta gruplarına ait ekspresyon düzeyleri bakımından hasta grubunda kontrol grubuna göre ~1,6 kat azalma olduğu bulundu fakat bu azalma istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ($p>0,05$).

Kingo ve arkadaşlarının vitiligoda melanokortin sistemde görev alan genlerin ekspresyon analizini yaptıkları çalışmada 34 vitiligolu hasta ve sağlıklı kontrol birey çalışmaya dahil edilmiş. Hasta bireylerin lezyonlu ve lezyonsuz bölgelerinden ve kontrol bireylerden deri biyopsileri alınmış. QRT-PCR yöntemiyle POMC, MC1R-MC5R, Agouti sinyal protein (ASIP), agouti ilişkili protein (AGRP), *TYRP1* ve *DCT* ekspresyon düzeyine bakmışlar. Sonuç olarak lezyonlu deride POMC ekspresyonu, lezyonlu olmayan deriye göre daha düşük olduğu görülmüş. Vitiligo

hastalarında, Melanokortin reseptörlerinden MC1R ve MC4R'ün ekspresyonu sağlıklı bireylere kıyasla azalmış olduğu belirlenmiş. *TYRP1* ve *DCT* genlerinin, lezyonlu olmayan deri ve sağlıklı kontrollerin deri biyopsilerine kıyasla, lezyonlu deride az eksprese olduğunu göstermişlerdir (125). Yaptığımız çalışma sonucuna göre hsa-miR-5197-3p'nin kontrol ve hasta gruplarına ait ekspresyon düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı. Hasta grubunda *TYRP1* genini %95 oranında hedefleyen hsa-miR-5197-3p'nin ekspresyonunun hasta grubunda azalmış olmasının moleküler açıklaması daha ileri çalışmalar ile yapılabilir. Melanosit oluşum yolağında *TYR* ile birlikte önemli rol oynayan *TYRP1* gen ekspresyonunun vitiligo hasta lezyonlarında azalmış olduğu gösterilmiştir. Bu azalmanın olası nedenleri arasında geni hedefleyen diğer miRNA moleküllerinin ekspresyon düzeylerine de bakılabilir. Ayrıca melanogenezde *TYRP1* ile birlikte rol alan *DCT*, *PAX3* ve diğer genlerin periferik kandaki ekspresyon düzeyleri bakılabilir. Daha öncede belirttiğimiz gibi vitiligo hastalığına sahip bireylerden alınacak biyopsi örneklerinden hücre kültür çalışmaları ile doğrudan melanosit hücrelerinde eksprese olan genler ve hedefledikleri miRNA'ların ekspresyon düzeylerine daha geniş bir örneklem grubunda bakılarak çalışmamız desteklenebilir. Yaptığımız bu çalışma ile hsa-miR-5197 ile ilgili elde ettiğimiz bu sonucun literatüre ve bu alanda yapılacak olan katkı sağlayacağını düşünmekteyiz.

Yaptığımız çalışmada *BCL2* genini %98 oranında hedefleyen ve 12q23.1 kromozomal bölgede lokalize olan **hsa-miR-4495'in** ekspresyon düzeyi bakımından hasta grubunda kontrol grubuna göre ~5,19 kat azalma olduğu görüldü. Bu sonuç istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0,05$). Kingo ve arkadaşlarının intrasellüler melanogenez yollarındaki olası ekspresyonel değişimlerin vitiligo patogenezi üzerindeki etkilerini araştırdıkları çalışmada vitiligo hastalarının lezyonlu olmayan derilerinde *USF1* ve *BCL2* ekspresyonunun sağlıklı kontrollere göre daha yüksek olduğu gösterilmiştir. Ayrıca vitiligo hastalarının lezyonlu ciltlerinde *MITF* ve *BCL2*'nin mRNA düzeyleri, lezyonlu olmayan cilt bölgelerine göre azalmış olduğunu göstermişlerdir (118). Çalışmamızda antiapoptotik bir molekül olan *BCL2* genini hedefleyen hsa-miR-4495'in ekspresyonunun hasta grubunda kontrol grubuna göre azalmış olduğu saptandı. Vitiligoda *in vivo* melanosit apoptozunun otoreaktif T hücreleri veya makrofajlar tarafından indükleniyor olabileceğini ya da diğer hücre ölüm mekanizmaları aracılığıyla melanositlerin yıkımına neden olabileceğini düşürmüştür. Antijene spesifik yapılan çalışmalarda vitiligo'da melanositlerin CD8+ T hücre aracılı yıkımının gerçekleştiği gösterilmiştir. Melanositlere özgü öldürme kapasitesine sahip CD8+ T hücreleri, sağlıklı kontrollere kıyasla vitiligolu hastaların kanlarında artmakta ve bu artışın hastalığın aktivitesi ile ilişkili olduğunu göstermektedir. Vitiligolu hastalardan elde edilen deri biyopsi örneklerinde T hücrelerinin infiltrasyonu rapor edilmiş ve epidermisteki ölmekte olan melanositlerin yanında CD8+ T hücreleri bulunmuştur (54). Yaptığımız çalışmada ise *BCL2* genini hedefleyen **hsa-miR-4495'in** hastalarda kontrollere göre düşük düzeyde eksprese olduğu

görüldü. Vitiligo hastalığında melanositler T hücre aracılığıyla ya da diğer hücre ölüm mekanizmalarıyla elemine ediliyor olabilir. Vitiligo hastalarında melanosit hücrelerinin hangi hücre ölüm mekanizmasıyla elemine edildiği henüz tam olarak bilinmemekte bu nedenle çalışmamıza ek olarak hasta ve kontrol bireylerinin periferik kan ve doku biyopsi örneklerinden melanosit hücrelerin ölümünden sorumlu olabilecek diğer ölüm mekanizmalarında görev alan *genler* ve hedefledikleri miRNA ekspresyonlarına bakılarak sonuçlar karşılaştırılabilir.

Çalışmamızda vitiligo hastalığının moleküler patogenezinde rolü olabileceğini düşündüğümüz ve *BCL2* genini %97 oranında hedefleyen ve 16p12.2 kromozomal bölgede lokalize **hsa-miR-3680**'ye ait kontrol ve hasta grubunda ekspresyon düzeyleri bakımından, hasta grubunda kontrol grubuna göre ~1,05 kat artış olduğu bulundu. Fakat bu artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ($p>0,05$). Çalışmamız, vitiligolu hasta ve sağlıklı kontrol bireyleri arasında *BCL2* geninin ekspresyon düzeyine bakılarak desteklenebilir. Ayrıca daha ayrıntılı moleküler çalışmalara ile bu miRNA'nın olası görevi ve hedeflediği gen veya genlerin vitiligolu hastalardaki ekspresyon düzeyleri araştırılabilir.

Shi ve arkadaşlarının miRNA'ların NSV gelişimi sırasında melanositlerden, bağışıklık hücrelerinden ve diğer ilgili hücrelerden salındığını ve serumda bulunan bu miRNA moleküllerinin NSV için biyobelirteç olarak kullanılabileceği hipoteziyle yaptıkları çalışmada 10 NSV'li hastada ve 20 sağlıklı kontrol bireyde 31 serum miRNA ifade düzeyi profilleri incelenmiş. NSV'li hastalar ve sağlıklı kontroller arasında, üç miRNA'nın ekspresyon profillerine bakılarak NSV'de biyobelirteç olarak kullanılabileceklerini göstermiştir. **miR-16, miR-19b ve miR-720'in** serum düzeylerinin NSV'li hastalarda yüksek olduğunu, serum miR-574-3p'nin ise NSV lezyonlarının miktarıyla ilişkili olduğunu göstermişlerdir (126). Yine Shi ve arkadaşlarının farelerde vitiligoda serum miRNA ekspresyon profillerini araştırdıkları bir diğer çalışmada ise melanosit otoreaktif CD4⁺T hücrelerinin aktarıldığı Rekombinasyon aktivatörü 1 (Rag1)^{-/-} bir fare modeli kullanılmıştır. Vitiligo gelişmiş farelerde ve kontrol farelerinde serum miRNA ifadesi, TaqMan RT-PCR yöntemi kullanılarak profilendirilmiş ve sonuç olarak 20 serum miRNA'sının ifade düzeyinin kontrol farelerine kıyasla değiştiğini tespit etmişlerdir. Ekspresyon analizi yapılan miRNA'lar arasından miR-146'a, miR-191 ve miR-342-3p'nin ekspresyon düzeylerinde artış olduğu görülmüştür. Son çalışmalar, miR-146a'nın CD4 Treg ve NKT hücrelerinin işlevini düzenlediğini ve farelerde otoimmün hastalık gelişiminde rol oynadığı gösterilmiştir. miR-191 melanositlerin ve melanoma hücrelerinin proliferasyonuna veya hayatta kalmasına da katılır. Bu bulgular vitiligo hastalığının gelişimi sırasında serum miRNA'ların, esas olarak salınan otoreaktif *TYRP1* CD4⁺T hücreleri veya hasarlı melanositler tarafından serbest bırakılabileceğini ve bu miRNA'ların vitiligo hastalığının gelişimine dahil olabileceğini göstermiştir. Böylece bu çalışma ile serum miRNA'ların, vitiligo tanısında ve tedavisine yönelik biyobelirteç olarak kullanılabileceğini göstermişlerdir. Burada tanımlanan vitiligo ile ilişkili birçok miRNA'nın da

melanositlerle bağlantılı olduğu dikkate değerdir. Bu miRNA'ların, NSV gelişimi sırasında melanositin proliferasyonu veya apoptozunda rolü olabileceğini göstermektedir (127).

Oksidatif stres vitiligo patogenezinde kritik bir role sahiptir. Oksidatif stres oluşumunun, vitiligonun başlangıcında ve ilerlemesinde çok önemli bir rolü olduğu yapılan çalışmalarla uzun süredir kanıtlanmıştır. Melanin sentezi sırasında oluşan pro-oksidan durum nedeniyle, melanositler özellikle oksidatif strese karşı savunmasızdır. Vitiligoda, 6- ve 7-BH4 gibi toksik ara maddeler, indirgenmiş seviyelerle birlikte katekolamin birikimi ve hastaların epidermisinde katalaz ile diğer bazı antioksidan enzimlerin aktivitesi daha önceki çalışmalarda gösterilmiştir. Bu intraselüler metabolik bozukluklar ve hasarlı aktiviteye sahip intrinsik antioksidan savunmaları nedeniyle H₂O₂ ve diğer reaktif oksijen türlerinin melanositlerde birikmesiyle DNA hasarı, lipid ve protein peroksidasyonu gerçekleşir ve böylece melanositlerin homeostazı bozulur. Bununla birlikte, vitiligoda oksidatif strese bağlı melanosit ölümüne dahil olan spesifik moleküler mekanizma tam olarak açıklığa kavuşturulamadığından, vitiligoda antioksidan tedavisi için, yeni ilaç hedefinin keşfini de zorlaştırmaktadır. Hücre sağkalımının düzenlenmesinde miRNA'ların güçlü rolü göz önüne alındığında, miRNA moleküllerinin oluşumu ve fonksiyonları oksidatif stresten etkilenebilir. Bu varsayımla Shi ve arkadaşlarının miRNA'ların, melanositlerdeki yaşamsal genlerin ifadesini düzenleyerek vitiligo patogenezinin katılabileceği hipotezini öne sürmüşlerdir. Hipotezlerini test etmek için, ilk olarak vitiligo hastalarının miRNA'larındaki değişiklikleri tanımlamak için 50 hasta ve 50 kontrol bireyin serum örneklerinde bir mikroarray analizi yapılmış, sonuç olarak 24 miRNA arasından miR-25'in, vitiligolu hastaların serumlarında en yüksek düzeyde artış gösteren miRNA olduğunu göstermişlerdir. Bu sonucun hastalık aktivitesi ile anlamlı bir korelasyona sahip olduğunu ayrıca vitiligolu hastaların lezyonlu bölgelerindeki artışla uyumlu olduğunu da göstermişlerdir. Aşırı ifade düzeyine sahip miR-25, melanogenezde melanosit üretiminden sorumlu olan TYR aktivitesini inhibe etmiştir. Western Blot kullanarak, miR-25 mimik molekülü ile transfekte edilen melanositlerde TYR, TYRP1 ve TYRP2 protein düzeylerinin azaldığını gözlemlemişlerdir. Bu sonuçlar miR-25'in *TYR*, *TYRP1* ve *TYRP2* genlerinin ifadesini baskıladığını ve tirozinaz aktivitesini azalttığını; böylece melanin biyosentezini inhibe ettiğini göstermiştir. Yaptığımız çalışmada *TYR* genini hedefleyen hsa-miR-6824'ün hasta bireylerdeki ekspresyon düzeyinde kontrol bireylere göre azalma görüldü. Bu sonuç ile çalışmamızdaki hasta ve kontrol bireylerde TYR geninin ekspresyon düzeyine bakılarak sonuçlar karşılaştırılabilir. Shi ve arkadaşları yine aynı çalışmada miR-25'in melanositlerdeki fonksiyonunu açıklayabileceğinden, potansiyel hedeflerini taramak için *MiRanda*, *PICTAR5* ve *Targetscan* dahil olmak üzere üç biyoinformatik araç kullanmış ve melanosit sağkalımı ve işlevindeki ana rolünden dolayı *MITF* genini seçmişlerdir. miR-25 mimik molekülüyle transfekte edilen melanositlerdeki *MITF* seviyesine bakıldığında aşırı ifade edilen miR-25, mRNA seviyesinde değil protein seviyesinde *MITF* ifadesini azaltmıştır. *MITF*

mRNA'sının 3'UTR bölgelerinde tahmin edilen dizileri hedefleyerek miR-25 ile baskılanmış. MITF ifadesini doğrulamak için ise lüsiferaz roportör analizleri gerçekleştirmişlerdir. Bu amaçla, ortadaki miR-25 için varsayılan bir bağlanma alanına sahip olan 3'UTR'nin (1000 nükleotid) bir kısmı, roportör plazmidlere yerleştirilmiş ve MITF WT olarak adlandırılmıştır. Ayrıca, MITF, MUT adı verilen plazmidlerde eşleştirme sekansları içinde dört nükleotidi mutasyona uğratmışlardır. Tüm roportör plazmidler miR-25 mimikleri veya negatif kontrolü ile melanositlere ko-transfekte edilmiş ve lüsiferaz aktivitesi transfeksiyondan 48 saat sonra analiz edilmiştir. MITF WT ile transfekte edilen hücrelerde miR-25 lüsiferaz aktivitesini düşürmüştür. Bununla birlikte, miR-25 mimikleri MITF MUT'un roporter aktivitesini etkilemede başarısız olmuştur. Bu sonuçlar, miR-25'in mRNA'larının 3'UTR'sindeki tahmini hedef bölgelere bağlanarak MITF ifadesini doğrudan düzenlediğini göstermiştir. Azalmış MITF ifadesinin melanositlerdeki miR-25 etkisi için gerekli olup olmadığına bakılması amacıyla miR-25'i aşırı ifade eden melanositler 3'UTR bölgesi silinmiş MITF plazmidleri veya kontrol plazmidleri ile birlikte transfekte edilmiş ve H₂O₂ tedavisini takiben hücre apoptozunu değerlendirmek için Flow sitometrisi kullanılmış. *MITF* geninin yeniden girişi apoptotik hücrelerin yüzdesini azaltmış ve anti-apoptotik BCL2'nin down-regülasyonunu ve melanositlerde miR-25 tarafından indüklenen pro-apoptotik Bax, kaspaz 3 ve kaspaz 9'un up-regülasyonunu tersine çevirmiş. Shi ve arkadaşlarının yaptıkları bu çalışmalar sonuç olarak miR-25'in, melanosit sağkalımı ve fonksiyonunun bir ana düzenleyicisi olan *MITF* geninin ifadesini baskılayarak H₂O₂ ile indüklenen melanosit apoptozuna katıldığı kanıtlanmıştır. MITF'in antioksidan cevap için önemli bir transkripsiyon hedefi olan Apürinik/apirimidinik endonükleaz (APE1)'in miR-25 tarafından inhibe edildiği gösterilmiş. Ayrıca, miR-25'i aşırı ifade eden melanositlerde, iki antioksidan gen olan hem oksijenaz 1 (HO-1) ve Glutasyon peroksidad 1 (GPX1)'in down-regülasyonu da saptanmış. Bu bulgular miR-25'in MITF-APE1 yolunu inhibe ederek antioksidan yanıtı baskılayabildiğini ve böylece melanositlerin oksidatif strese bağlı yıkıma daha duyarlı hale gelebildiğini ortaya koymuştur (128).

Yapılan birçok çalışma, insanlarda salgılanan ve melanositlerin, bağışıklık hücrelerinin gelişimi ve fonksiyonları dahil olmak üzere, birçok fizyolojik ve gelişimsel süreçlerde büyük öneme sahip olan miRNA'ların, plazma, serum, tükürük, süt ve idrar dahil hücreler arasında transfer yapabildiklerini göstermektedir. Bu hücre dışı miRNA'ların kaynağı bilinmemektedir ancak Chen ve arkadaşlarına göre; a) kronik inflamasyona, hücre apoptozuna, nekroza veya doku yaralanmasına bağlı olarak hasarlı hücrelerden pasif kaçak sonucu b) hem normal hem de patolojik koşullarda hemen hemen tüm hücre tipleri tarafından ekzozomlar, mikroveziküller ve dökülme keseciklerinden aktif salgılama yoluyla serbest bırakılanlar olmak üzere farklı kaynakları vardır. Mansuri ve arkadaşlarının Vitiligo patogenezi sırasında melanositlerden, keratinositlerden ve komşu hücrelerinden elde edilen miRNA'ların tüm kan dolaşımında tespit edilebilir ve vitiligo için yeni biyobelirteçler olarak hizmet edebileceği hipoteziyle yaptıkları

çalışmada, vitiligo hastalarının ve kontrollerinin tam kanında önceden tanımlanan 38 deri miRNA'nın ifadesini araştırmak, farklı şekilde ifade edilen miRNA'ların potansiyel hedef genlerini tahmin etmek, hastalar ve kontrollerden deri, tam kan ve periferik kan mononükleer hücrelerinde (PBMC) potansiyel miRNA hedeflerinin transkript seviyelerini bakma amacıyla araştırma yapmışlardır. Tam kanda miRNA ifade profili, özelleştirilmiş TaqMan Düşük Yoğunluk Dizisi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Gerçek zamanlı PCR kullanarak hastalardan ve kontrollerden deri, tam kan ve PBMC'lerde ifade düzeylerini araştırmışlardır. Sonuç olarak, miR-1, miR-184, miR-328, miR-383 ve miR-577'nin deride benzer ifade modeline sahip olduklarını göstermiş, bu da vitiligo için varsayılan biyobelirteçler olabileceklerini düşündürmüştür. *In silico* hedef tahmininde miR-1'in hedeflediği genler *EDN1*, Glukoz-6-Fosfat Dehidrojenaz (*G6PD*), *HSP60*, *HSP70*, Stres ilişkili Endoplazmik Retikulum Protein 1 (*SERP1*), Sirtuin 1 (*SIRT1*) ve *TYR*; miR-184'in hedeflediği genler Ezrin (*EZR*) ve Lizozomal ilişkili Membran Protein 1 (*LAMP1*); miR-328'in hedeflediği genler, İnterlökin 1 Beta (*IL1β*), DNA Polimeraz Eta (*POLH*), Geçici Reseptör Potansiyel Katyon Kanal alt aile M Üyesi 1 (*TRPM1*); miR-383'in hedeflediği genler, *EDN1* ve *TYRP1* ve miR-577 Protein Tirozin fosfataz Reseptör olmayan Tip 22 (*PTPN22*) ve *TYRP1* genleridir. Bu çalışma oksidatif stres, otoimmünite ve ER stresine bağlı vitiligo patogenezinde rol oynayan miRNA gen ağının önemli rolü hakkında yeni bilgiler sunmaktadır (129).

TYR-TYRP1, melanin oluşumunda ROS üretimi yoluyla vitiligo hastalığının patogenezinde katılan ve melanin ara maddelerinin sentezinde kritik bir rol oynayan komplekstir. Cui ve arkadaşları miR-196a-2'deki tek nükleotid polimorfizmi (SNP), *TYRP1*'i etkileyerek, vitiligo riskini etkileyebileceğinden, aynı SNP'nin Vitiligo'daki *TYR* düzeyini düzenleyebileceği hipoteziyle yaptıkları çalışmada, miR-196a-2'de rs11614913'nin vitiligoda serum TYR düzeyi ile miR 196a-2'nin melanositlerdeki *TYR* gen ifadesi arasındaki potansiyel ilişkiyi araştırmışlardır. miR-196a-2, potansiyel olarak trombosit büyüme faktör reseptörü alfa-polipeptid (*PDGFRA*), *IL2* ve çeşitli oksidatif stres aracılı oküler hastalıkların muhtemel adayları olan mannoz bağlayıcı lektin (protein C) 2 (*MBL2*) gibi genleri hedef almaktadır. Melanositlerde melanin sentezinde önemli bir rol oynayan miR-196a-2'nin *TYRP1*'i hedeflediği de gösterilmiştir. Vitiligolu 116 hastada ve 116 kontrolde ELISA testi ile TYR düzeyi saptanmış. *TYRP1* ve *TYR*'nin PIG1 (normal melanosit hücre hattı) hücrelerinde ifade düzeyi, western blotting ile analiz edilmiş. Si-Tyr veya kontrol siRNA ile transfekte edilmiş PIG1 hücrelerindeki ROS seviyesi ve apoptoz oranı, flow sitometrisi ile test edilmiş. Sonuçlar, miR-196a-2'deki TT-TC genotipleri ve serumda daha yüksek TYR düzeyine sahip bireylerin, CC genotipine ve düşük TYR düzeyine sahip olanlara göre daha yüksek vitiligo riskine sahip olduklarını gösterilmiştir. Ayrıca, miR-196a-2'deki rs11614913 C aleli, *TYR*'in ifade edilmesi üzerindeki inhibitör etkisini arttırmış; bu, aşağı regülasyonun, melanositlerde hücre içi ROS seviyelerini ve apoptoz oranını başarıyla düşürdüğü gözlenmiştir.

Sonuç olarak, bu bulguların miR-196a-2 polimorfizmlerinin Tyr seviyeleri ve vitiligo'nun duyarlılığını etkilediğini saptamışlardır (130).

Mansuri ve arkadaşlarının deride ifade edilen miRNA'ları saptamak için kontrol bireylerden alınan deri biyopsileri ile NSV'li hastaların lezyonel ve lezyonel olmayan bölgelerinden alınan deri biyopsi örnekleri analiz edildiğinde; 38 miRNA'dan sağlıklı deriye kıyasla, NSV'li hastaların lezyonlu derilerinde 12 miRNA'nın ifadesinde istatistiksel olarak anlamlı bir artış olduğu görülmüş. miR-1'in, *G6PD* gen mRNA'sının UTR bölgesini hedeflediği bilinmektedir. Yaptıkları önceki çalışmada, kontrollerle karşılaştırıldığında, vitiligolu hastaların *G6PD* aktivitesinde azalma olduğu görülmüş. miR-1'in ifadesi, *HSP60* ve *HSP70* genlerinin mRNA'larını hedefleyerek apoptozla sonuçlanan oksidatif strese yanıt olarak artar. *HSP60* ve *HSP70*'in mRNA'larının diferansiyel ifadesi, vitiligolu hastalardan lezyonlu ve lezyonlu olmayan ciltte gözlenmiştir. Birlikte ele alındığında, bu sonuçlar miR-1'in oksidatif streste potansiyel bir role sahip olduğunu ve vitiligolu hastalarda melanosit yıkımına yol açtığını göstermektedir. miR-133b, IL-17A/F lokusunda yer alır ve T hücrelerinde düzenlenir. Vitiligo hastalarından lezyonlu deri ve serumlarında artmış IL-17 seviyeleri bildirilmiştir. Bu bulgu, NSV'li hastalarda lezyonlu deride miR-133b ifadesinin arttığını destekleyerek, vitiligo hastalığının patogeneğinde miR-133b'nin önemli bir rolü olduğunu düşündürmüştür. miR-211'in, kontrollere kıyasla NSV'li hastaların lezyonlu derisinde down regüle olduğu bulunmuştur. Bu çalışmada miR-135a, miR-9 ve miR-1'in NSV'li hastalarda kontrollere göre daha yüksek oranda ifade olduğu görülmüş. Ayrıca miR-135a, miR-183, miR-30a-3p ve miR-487'nin sağlıklı deriye kıyasla NSV'li hastaların lezyonlu ve lezyonlu olmayan deri biyopsi örneklerinde ifade düzeyleri anlamlı olarak artmıştır. miR-136, miR-296 ve miR-328'in lezyonel olmayan deride deride up-regüle olduğunu, ancak NSV'li hastalarda lezyonlu deride ve kontrol grubuna ait deri örneklerinde downregüle olduğunu gösterilmiş. Sonuç olarak bu 3 miRNA'nın vitiligo hastalığına yatkınlık ve hastalığın gelişimiyle ilişkili olabileceği gösterilmiştir. Vitiligolu aktif deride reaktif oksijen türlerinin bulunduğu daha önceki çalışmalarda kanıtlanmış olup, oksidatif stres mekanizmalarında rol alan miRNA moleküllerinin vitiligo hastalığına neden olan ana sebeplerden biri olarak düşünülmesi bakımından sonuçlar önemlidir (131).

Wang ve arkadaşlarının NSV'li hastaların PBMC'sindeki farklı miRNA ifade düzeyini analiz etmek ve timoszin a1 (Ta1)'in hastaların PBMC'sindeki miRNA profilini değiştirip değiştirmediği amacıyla yaptıkları çalışmada; miR-224-3p ve miR-4712-3p ifade düzeylerinin hasta grubunda kontrollere göre yüksek oranda; miR-3940-5p'nin ise düşük düzeyde ifade olduğunu bulmuşlardır. Ayrıca immün bir düzenleyici olan timoszin a1'in NSV'li hastalarının PBMC hücrelerinde miRNA ifade düzeyini değiştirdiğini göstermişler. Sonuç olarak miRNA'ların vitiligo hastalığında terapötik değerlendirme için yeni ilaç hedefi olarak kullanılabileceğine dair kanıt sağlamışlardır (132).

Deride aktive edilmiş anti melanosit T lenfositlerinin varlığı, hastalığın karakteristik özelliği olan depigmentasyona yol açan önemli immün mekanizmalardan biridir. T-hücre immünitesi melanositlerin tahribatına yol açmakta ve bu mekanizma segmental olmayan vitiligo patogeneğinde rol oynayan temel mekanizmalardan biri sayılmaktadır. Periferik kan lenfositlerinde vitiligo ile ilişkili birkaç miRNA tanımlanmış olmasına rağmen, miR-3940-5p'nin vitiligo patogeneindeki kritik rolü açık değildir. Bu nedenle Wang ve ark.'nın miR-3940-5p'nin down-regülasyonunun, insan kutanöz T hücre hatları üzerinde sitokin reseptörü IL-2R gama' yı hedeflediği hipoteziyle yaptıkları çalışmada, IL-2R sitokin reseptörünün, Th1 hücrelerinde özel olarak ifade edilen kritik bir düzenleyici olarak işlev gördüğünü göstermişlerdir. Ayrıca hayvan modellerinde IL-2R'nin aktivasyonunun, artmış Th1 hücre sayıları ve IL-2 seviyeleri ile immün yanıtı arttırdığı gösterilmiştir. Galadari ve arkadaşları ise çözünür interlökin-2 reseptörünün serum düzeylerinin, vitiligo hastalarında sağlıklı kontrollere göre anlamlı olarak daha yüksek olduğunu göstermiş, Wu Haibin ve arkadaşları vitiligo hastalarındaki lezyonlu beyaz renkteki deri dokusu sıvısında, IL-2R'nin ifade düzeyinin lezyonlu olmayan normal deri alanından daha yüksek olduğunu doğrulamışlardır. Wang ve arkadaşları yaptıkları bu çalışmanın sonucunda insan HuT78 hücrelerinde (HuT78 hücreleri, NSV lenfositlerindeki mikroRNA'nın ifade düzey modellerini simüle etmek için insan kutanöz T hücre hatlarından türetilen lentiviral vektörle enfekte olmuş hücreler olarak seçilmiştir.) miR-3940-5p'nin inhibisyonunun yüksek seviyelerde artan T hücre ve IL-2RG protein miktarının artmasına neden olduğu bulunmuştur. Bu sonuç miR-3940-5p inhibitörlerinin, IL-2RG'nin ifadesini indükleyerek T hücre birikimini ve proliferasyonunu destekleyebileceğini düşündürmesi bakımından önemlidir (133).

Spiegelman ve arkadaşları vitiligo hastalığında hücrel metabolizmanın kritik bir düzenleyicisi olan miR-211'in fonksiyonunu araştırmışlardır. Melanositlerde ifade edilen bir kalsiyum geçirgen katyon kanalı olan Melastatin 1'in intronik bölgesinden ifade edilen miR-211, Vitiligoda oksidatif fosforilasyon ve mitokondriyal enerji metabolizmasını düzenlemesinde rol alan önemli bir moleküldür. Melanositlerdeki miR-211'in fonksiyon kaybının melanosit hücrelerinde solunum fonksiyonunu düzenleyen hedef genlerin ifade düzeylerini değiştirdiği gösterilmiş. Aynı ekibin vitiligo hastalarının lezyonel bölgelerinden alınan biyopsi örneklerinden elde edilen immortalize hale getirilmiş PIG3V hücre hattı ile primer insan epidermal melanosit hücre hattı HEM-1'de miR-211'in ifade düzeyi kıyaslandığında melanin sentezi, hücre döngüsü ve immün cevapta rol alan sinyal yollarında görevli genlerin ifade edilme düzeyleri bakımından farklılığın en fazla olduğu hücrel prosesler olduğu ortaya çıkmıştır. Ayrıca bu hücrel mekanizmalarda görev alan *KIT*, *TYR*, *PMEL* ve melastatin 1 genlerinin ifade düzeylerinin vitiligo hücrelerinde önemli ölçüde azaldığı gösterilmiş. miR-211'in ifade fonksiyon kaybının vitiligo ile ilişkili olduğunu doğrulamak için, vitiligolu hastaların lezyonlu bölgesinden alınan biyopsi örnekleri kontrol grubundan alınan biyopsi örnekleri ile karşılaştırıldığında 11 vitiligolu

hastadan alınan biyopsi örneğinden 10'unda kontrol grubuna göre miRNA-211 ifadesini önemli ölçüde azaldığı gözlemlenmiştir. Bu çalışma ile miR-211'in melanosit biyolojisi ve vitiligo gelişimi için önemli olduğu vurgulanmıştır (134).

miRNA aracılı gen ifadesinin düzenlenmesinin otoimmün hastalıklarda önemli rol oynadığı birçok çalışmada gösterilmiştir. Bu nedenle Shang ve arkadaşlarının miRNA ifade düzeylerini potansiyel hedeflerini tahmin etmek amacıyla 5 vitiligolu hasta ve 5 kontrol bireyden alınan periferik kan örneklerinden yaptıkları çalışmada; örnekler miRNA array ile hibridize edilmiş. Toplam 100 (29 upregüle ve 71 downregüle) miRNA, Kantitatif RT-PCR validasyonundan sonra, 4 miRNA'nın (miR-1238-3p, miR-202-3p, miR-630 ve miR-766-3p), vitiligo hasta grubunda kontrollere göre ifade düzeylerinin anlamlı olarak daha düşük olduğu görülmüş. Daha önce yapılan çalışmalarda bu miRNA moleküllerinin olası fonksiyonları tanımlanmıştır. Birkaç çalışma, miR-202-3p'nin kolorektal ve mide kanserinde önemli ölçüde azaldığını ve bu miRNA'nın bir tümör baskılayıcı olarak işlev görebileceğini göstermektedir. miR-630'un biyolojik işlevi, birçok farklı düzenleyici ile etkileşime girerek farklı kanserlerde işlevi olan ve çoğunlukla invazyon, metastaz ve kanser hücresi büyümesinin inhibisyonunda görev almaktır (135). miR-766-3p SF2/P-AKT/P-ERK sinyallerinin regülasyonu yoluyla RCC ilerlemesini kontrol etmek için baskılayıcı olarak görev almaktadır (136).

Şahmatova ve arkadaşlarının vitiligo patogenezinde miRNA ifade düzeylerinin potansiyel rolünü araştırmak amacıyla yaptıkları çalışmada hücre çoğalması ve farklılaşmasında (miR-10a, miR-99b, miR-125a, miR-125b and miR-199a-3p), immün sistemde yanıtta (miR-146a, miR-146b, miR-155, miR-223 and miR-511), deri homeostazı (miR-203) ve melanogenezde (miR-145) fonksiyonları daha önce yapılan çalışmalarla kanıtlanmış olan 12 miRNA'nın 17 NSV'li hastanın lezyonlu ve lezyonsuz doku biyopsileri ile 17 kontrol bireyin doku biyopsilerinde qRT-PCR kullanılarak ifade düzeylerine bakmışlar; miR-99b, miR-125b, miR-145, miR-155 ve miR-199a-3p'nin vitiligolu hastaların derisinde düzensiz ifade olduğunu göstermişlerdir. Bu miRNA'lar arasında, vitiligolu hastaların lezyonlu deri biyopsilerinde miR 155'in artan ifadesi saptanmış. Kültüre edilmiş melanosit ve keratinosit hücrelerinde miR-155'in artan ifadesi ile indüklenen proinflamatuvar TNF-a, IFN-a, IFN-y ve IL-1 β sitokinlerinin vitiligo patogenezi ile ilişkili olduğu gösterilmiş. Aşırı ifade edilen miR-155, melanosit farklılaşmasını ve melanogenezde önemli rol oynadığı bilinen melanositlerde ve keratonositlerde *TYRP1*, *Tyrosine 3-Monooksijenaz/Triptofan 5-Monooksijenaz Akitasyon Protein Epsilon (YWHAE)*, *Sindekan BağlayıcıProtein (SDCBP)* ve *SOX10* gibi genlerin ifadesini inhibe etmiştir. Ayrıca miR-155'in artan ifade düzeyi, melanositler ve keratinositlerdeki interferon salınımı düzenlenmesinde rol oynayan Sitokin sinyal iletimi baskılayıcısı 1 (*SOCS1*), İnterferon düzenleyici faktör 1 (*IRF1*) ve İnterferon indüklü transmembran Protein 1 (*IFITM1*) genlerinin ifade düzeylerini değiştirdiği gösterilmiş. (137). Sonkoly ve arkadaşları tarafından miR-155'in, atopik dermatitli hastalardan alınan doku biyopsi

örneklerinde de esas olarak bağışıklık hücrelerinin varlığı nedeniyle aşırı ifade olduğu gösterilmiş (137). miR-155 proinflamatuvar miRNA olarak bilinir, diğer hedefler arasında sitokin sinyal iletimi baskılayıcısı (*SOCS1*)'nin baskılanmasını inhibe eder. Bu durum Janus kinaz sinyal yolağının (JAK-STAT) aktivasyonuna ve sonuç olarak tip I ve II interferonların salınmasına neden olur. miR-155'e ek olarak, çalışmada ifade düzeyleri bakımından düzensiz diğer miRNA'lar da vitiligo gelişimine katkıda bulunabilir. Örneğin, miR-125b, melanositlerdeki pigmentasyonun indüklenmesinden sonra down-regüle edilir ve miR-125b mimik moleküllerinin ifadesini inhibe ettiği gösterilmiş. miR-125b'ye benzer şekilde, kültüre edilmiş pigment hücrelerinde miR-145 ifade düzeyinin azaldığı gösterilmiştir (138).



5. SONUÇ VE ÖNERİLER

- Yaptığımız bu çalışmanın sonucunda *TYR* genini hedefleyen hsa-miR-6824 ve *BCL2* genini hedefleyen hsa-miR-4495'in ekspresyon düzeyleri açısından kontrol ve hasta grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğu gözlemlendi ($p < 0,05$). Her iki miRNA'nın ekspresyon düzeylerinin hasta bireylerde kontrollere göre azalmış olduğu saptandı. Çalışmamız bu iki miRNA'nın melanin pigmentinin oluşumunda anahtar gen olan *TYR* geni ve lezyonlu bölgelerde melanositlerin hücre ölümünde önemli rol oynayan ayrıca melanogenez mekanizmasında master gen olan *MITF* geni ile düzenlenen *BCL2* geninin ekspresyonel düzeylerini etkileyerek vitiligo hastalığının patogeneze katılabileceği fikrini ortaya koymaktadır.
- Çalışmamızda melanogenez mekanizmasında önemli rollere sahip *MITF*, *SOX 10*, *TYR*, *TYRP1* ve *BCL2* genlerini hedefleyen hsa-miR-3163, hsa-miR-1343, hsa-miR-6783-3p, hsa-miR-4696, hsa-miR-6824, hsa-miR-5197-3p hsa-miR-4495, hsa-miR-3680'in ekspresyon analizleri vitiligo hastalığına sahip bireyler ile kontrol bireylerden elde edilen periferik kan örneklerinden gerçekleştirildi. Melanogenez mekanizmasında önemli rol oynayan bu genlerin ekspresyon düzeyleri aynı şekilde hasta ve kontrol bireylerden alınacak periferik kandan örneklerinden bakılarak, hedefledikleri miRNA'ların ekspresyon düzeyleri ile karşılaştırılabilir.
- Yaptığımız çalışmaya 56 gönüllü vitiligolu hasta birey ile 56 gönüllü kontrol birey dahil edildi. Bu hasta ve kontrol örneklem sayısı çalışmamızdaki ilgili genler ile hedefledikleri miRNA'ların ekspresyon düzeyini istatistiksel olarak etkilemiş olabilir. Bu çalışmanın devamında daha geniş bir örneklem ile çalışılması önerilmektedir.
- Ayrıca çalışmamızdaki bu ilgili genlerin ve hedefledikleri miRNA'ların periferik kan örneklerindeki ekspresyon analizlerine ek olarak vitiligolu hasta bireyler ile kontrol bireylerden alınacak doku örneklerinde de bakılarak araştırılabilir. İlgili genler ve hedefledikleri miRNA'ların ekspresyon düzeyleri Vitiligolu hastaların lezyonlu ve lezyonsuz deri biyopsilerinde analiz edilerek ayrıca kontrol bireylerinden alınacak biyopsi örneklerindeki ekspresyon düzeyleri ile kıyaslanarak, genlerin ve hedefledikleri miRNA'ların vitiligo hastalığının patogenezeindeki rolü araştırılabilir. Böylece ilgili genlerin ve hedefledikleri miRNA'ların ifade düzeyleri ile vitiligo hastalığı arasındaki bağlantıların anlaşılmasına, hastalığın tanısı ve tedavisinde tıropatik ajanların bulunmasına katkı sağlayacağını düşünmekteyiz.
- Çalışmamızda özellikle hasta ve kontrol bireylerinin ekspresyon analizleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bulunan **hsa-miR-6824** ve **hsa-miR-4495**'in ve hedefledikleri genlerin vitiligolu hasta ve kontrol bireylerinden alınacak lezyonlu ve lezyonsuz doku biyopsilerinden hücre kültür uygulamaları ile, melanosit hücrelerindeki intrasellüler

ekspresyon analizlerinin yapılması vitiligo hastalığının moleküler mekanizmalarının aydınlatılması bakımından önerilmektedir.

- Protein kodlayıcı mRNA'ların üçte birinden fazlasının miRNA'lar tarafından düzenlendiği tahmin edilmektedir. Hücrel protein oluşumuyla sonuçlanan gen ifadesi miRNA aracılı transkripsiyon sonrası regülasyonu ile sağlanmaktadır. Dolayısıyla, miRNA'lar, immün yanıtın düzenlenmesi, insan gelişimi, insülin salgılanması, adiposit farklılaşması gibi birçok biyolojik yolda yer alan ve kanser başta olmak üzere çeşitli deri hastalıkları dahil birçok hastalığın patogeneğinde rol oynayan anahtar düzenleyici moleküllerdir. Yapılan çalışmalar miRNA'ların serum ve plazmada rezerve olduklarını, otoimmünitenin oluşmasında ve immün hücrelerinin gelişiminde rol aldığını göstermiştir. Bu nedenle miRNA'ların bir hastalığın tahmininde, tanısında, prognozu ve tedaviye yanıtta bir belirteç olabileceği gösterilmiştir. Bu bulgular ışığında çalışmamızda yer alan aday miRNA moleküllerinin ileriki çalışmalarla biyobelirteç sınıfına dahil olabileceğini göstermektedir.

KAYNAKLAR

- [1]. Guerra, L., Dellambra, E., Brescia, S., Raskovic, D. (2010). Vitiligo: pathogenetic hypotheses and targets for current therapies. *Current Drug Metabolism*, 11(5), 451-467.
- [2]. Taïeb, A., Picardo, M. (2009). Vitiligo. *New England Journal of Medicine*, 360(2), 160-169.
- [3]. Rezaei, N., Gavalas, N. G., Weetman, A. P., Kemp, E. H. (2007). Autoimmunity as an aetiological factor in vitiligo. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*, 21(7), 865-876.
- [4]. Boniface, K., Seneschal, J., Picardo, M., Taïeb, A. (2018). Vitiligo: focus on clinical aspects, immunopathogenesis, and therapy. *Clinical Reviews in Allergy & Immunology*, 54(1), 52-67.
- [5]. Schneider, M. R. (2012). MicroRNAs as novel players in skin development, homeostasis and disease. *British Journal of Dermatology*, 166(1), 22-28.
- [6]. Ezzedine K., Eleftheriadou V., Whitton M., Geel N. (2015). Vitiligo. Seminar.
- [7]. Hercogová, J., Schwartz, R. A., Lotti, T. M. (2012). Classification of vitiligo: a challenging endeavor. *Dermatologic Therapy*, 25, S10-S16.
- [8]. Cupertino, F., Niemeyer-Corbellini, J. P., Ramos-e-Silva, M. (2017). Psychosomatic aspects of vitiligo. *Clinics in Dermatology*, 35(3), 292-297.
- [9]. Tarlé, R. G., Nascimento, L. M. D., Mira, M. T., Castro, C. C. S. D. (2014). Vitiligo-part 1. *Anais Brasileiros de Dermatologia*, 89(3), 461-470.
- [10]. Demirbağ CB., Güngörmüş Z. (2012). Vitiligo. *Ankara Sağlık Hizmetleri Dergisi Cilt 11, Sayı 1*.
- [11]. Lotti, T., Zanardelli, M., D'Erme, A. M. (2014). Vitiligo: what's new in the psycho-neuro-endocrine-immune connection and related treatments. *Wiener Medizinische Wochenschrift*, 164(13-14), 278-285.
- [12]. Ezzedine, K., Lim, H. W., Suzuki, T., Katayama, I., Hamzavi, I., Lan, C. C. E., Parsad, D. (2012). Revised classification/nomenclature of vitiligo and related issues: the Vitiligo Global Issues Consensus Conference. *Pigment Cell & Melanoma Research*, 25(3), E1-E13.
- [13]. Whitton, M. E., Pinart, M., Batchelor, J., Lushey, C., Leonardi-Bee, J., González, U. (2010). Interventions for vitiligo. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, (1).
- [14]. Alikhan, A., Felsten, L. M., Daly, M., Petronic-Rosic, V. (2011). Vitiligo: a comprehensive overview: part I. Introduction, epidemiology, quality of life, diagnosis, differential diagnosis, associations, histopathology, etiology, and work-up. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 65(3), 473-491.
- [15]. Nguyen, C. M., Beroukhi, K., Danesh, M. J., Babikian, A., Koo, J. (2016). The psychosocial impact of acne, vitiligo, and psoriasis: a review. *Clinical, Cosmetic and Investigational Dermatology*, 9, 383.
- [16]. Kyriakis, K. P., Palamaras, I., Tsele, E., Michailides, C., Terzoudi, S. (2009). Case detection rates of vitiligo by gender and age. *International Journal of Dermatology*, 48(3), 328-329.

- [17]. Essien, K. I., Harris, J. E. (2014). Animal models of vitiligo: Matching the model to the question. *Dermatologica Sinica*, 32(4), 240-247.
- [18]. Ezzedine, K., Sheth, V., Rodrigues, M., Eleftheriadou, V., Harris, J. E., Hamzavi, I. H., Pandya, A. G. (2015). Vitiligo is not a cosmetic disease. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 73(5), 883-885.
- [19]. Faria, A. R., Tarlé, R. G., Dellatorre, G., Mira, M. T., Castro, C. C. S. D. (2014). Vitiligo-Part 2-classification, histopathology and treatment. *Anais brasileiros de Dermatologia*, 89(5), 784-790.
- [20]. Moretti S. Vitiligo. (2003). *Orphanet Encyclopedia*. 1-6. 2014; 99(7).
- [21]. Van Geel, N., Speeckaert, R., Taieb, A., Picardo, M., Böhm, M., Gawkrödger, D. J., Moretti, S. (2011). Koebner's phenomenon in vitiligo: European position paper. *Pigment Cell & Melanoma Research*, 24(3), 564-573.
- [22]. Sharma, A., Singh, S. K., Tonpay, S. D. (2012). Ethanomedicinal trends in Indian tradition for treatment of vitiligo. *Journal of Medicinal Plants Research*, 6(10), 1827-1833.
- [23]. Hirobe, T. (2014). Keratinocytes regulate the function of melanocytes. *Dermatologica Sinica*, 32(4), 200-204.
- [24]. Park, H. Y., Gilchrist, B. A. (1999). Signaling pathways mediating melanogenesis. *Cellular and Molecular Biology (Noisy-le-Grand, France)*, 45(7), 919-930.
- [25]. Hirobe, T. (2011). How are proliferation and differentiation of melanocytes regulated? *Pigment Cell & Melanoma Research*, 24(3), 462-478.
- [26]. Sturm, R. A., Box, N. F., Ramsay, M. (1998). Human pigmentation genetics: the difference is only skin deep. *Bioessays*, 20(9), 712-721.
- [27]. Li, A. (2014). The biology of melanocyte and melanocyte stem cell. *Acta Biochim Biophys Sin*, 46(4), 255-260.
- [28]. Li, J., Myelodysplastic syndrome hematopoietic stem cell. *Int. J. Cancer* 2013, 133, 525-533.
- [29]. Solano, F. (2014). Melanins: skin pigments and much more types, structural models, biological functions, and formation routes. *New Journal of Science*.
- [30]. Reimann, E., Kingo, K., Karelson, M., Reemann, P., Loite, U., Keermann, M., Köks, S. (2012). Expression profile of genes associated with the dopamine pathway in vitiligo skin biopsies and blood sera. *Dermatology*, 224(2), 168-176.
- [31]. Videira, I. F. D. S., Moura, D. F. L., Magina, S. (2013). Mechanisms regulating melanogenesis. *Anais Brasileiros de Dermatologia*, 88(1), 76-83.
- [32]. Sturm, R. A., Teasdale, R. D., Box, N. F. (2001). Human pigmentation genes: identification, structure and consequences of polymorphic variation. *Gene*, 277(1), 49-62.
- [33]. Slominski, A., Tobin, D. J., Shibahara, S., Wortsman, J. (2004). Melanin pigmentation in mammalian skin and its hormonal regulation. *Physiological Reviews*, 84(4), 1155-1228.

- [34]. Várkonyi, J., The Myelodysplastic Syndromes. Springer Dordrecht Heidelberg: New York, 2011; p1-p4.
- [35]. Kingo, K., Aunin, E., Karelson, M., Rätsep, R., Silm, H., Vasar, E., Köks, S. (2008). Expressional changes in the intracellular melanogenesis pathways and their possible role the pathogenesis of vitiligo. *Journal of Dermatological Science*, 52(1), 39-46.
- [36]. Osawa M. Melanocyte stem cells. StemBook [Internet]. Cambridge (MA): Harvard Stem Cell Institute; 2008. Jun 30. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK27071/?report=reader>.
- [37]. Ploper, D., De Robertis, E. M. (2015). The MITF family of transcription factors: Role in endolysosomal biogenesis, Wnt signaling, and oncogenesis. *Pharmacological Research*, 99, 36-43.
- [38]. Shibahara, S., Takeda, K., Yasumoto, K. I., Udono, T., Watanabe, K. I., Saito, H., Takahashi, K. (2001, November). Microphthalmia-associated transcription factor (MITF): multiplicity in structure, function, and regulation. In *Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings* (Vol. 6, No. 1, pp. 99-104).
- [39]. Pillaiyar, T., Manickam, M., Jung, S. H. (2015). Inhibitors of melanogenesis: a patent review (2009–2014). *Expert opinion on therapeutic patents*, 25(7), 775-788.
- [40]. Mohamed, A., Gonzalez, R. S., Lawson, D., Wang, J., Cohen, C. (2013). SOX10 expression in malignant melanoma, carcinoma, and normal tissues. *Applied Immunohistochemistry & Molecular Morphology*, 21(6), 506-510.
- [41]. Shin, J., Vincent, J. G., Cuda, J. D., Xu, H., Kang, S., Kim, J., Taube, J. M. (2012). Sox10 is expressed in primary melanocytic neoplasms of various histologies but not in fibrohistiocytic proliferations and histiocytoses. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 67(4), 717-726.
- [42]. Kanteev, M., Goldfeder, M., Fishman, A. (2015). Structure–function correlations in tyrosinases. *Protein Science*, 24(9), 1360-1369.
- [43]. Park, H. Y., Gilchrest, B. A. (1999). Signaling pathways mediating melanogenesis. *Cellular and molecular biology* (Noisy-le-Grand, France), 45(7), 919-930.
- [44]. Ghanem, G., Fabrice, J. (2011). Tyrosinase related protein 1 (TYRP1/gp75) in human cutaneous melanoma. *Molecular oncology*, 5(2), 150-155.
- [45]. Lu, H., Li, L., Watson, E. R., Williams, R. W., Geisert, E. E., Jablonski, M. M., Lu, L. (2011). Complex interactions of Tyrp1 in the eye. *Molecular vision*, 17, 2455.
- [46]. Plettenberg, A., Ballaun, C., Pammer, J., Mildner, M., Strunk, D., Weninger, W., Tschachler, E. (1995). Human melanocytes and melanoma cells constitutively express the Bcl-2 proto-oncogene in situ and in cell culture. *The American journal of pathology*, 146(3), 651.
- [47]. Tsujimoto, Y., Shimizu, S. (2000). Bcl-2 family: life-or-death switch. *FEBS letters*, 466(1), 6-10.

- [48]. Passeron, T., & Ortonne, J. P. (2005). Physiopathology and genetics of vitiligo. *Journal of Autoimmunity*, 25, 63-68.
- [49]. Sandoval-Cruz, M., García-Carrasco, M., Sánchez-Porras, R., Mendoza-Pinto, C., Jiménez-Hernández, M., Munguía-Realpozo, P., & Ruiz-Argüelles, A. (2011). Immunopathogenesis of vitiligo. *Autoimmunity Reviews*, 10(12), 762-765.
- [50]. Dwivedi, M., Kemp, E. H., Laddha, N. C., Mansuri, M. S., Weetman, A. P., Begum, R. (2015). Regulatory T cells in vitiligo: implications for pathogenesis and therapeutics. *Autoimmunity Reviews*, 14(1), 49-56.
- [51]. Van den Wijngaard, R., Wankowicz-Kalinska, A., Pals, S., Weening, J., Das, P. (2001). Autoimmune melanocyte destruction in vitiligo. *Laboratory Investigation*, 81(8), 1061.
- [52]. Le Poole, I. C., & Luiten, R. M. (2008). Autoimmune etiology of generalized vitiligo. In *Dermatologic Immunity* (Vol. 10, pp. 227-243). Karger Publishers.
- [53]. Richmond, J. M., Frisoli, M. L., Harris, J. E. (2013). Innate immune mechanisms in vitiligo: danger from within. *Current Opinion in Immunology*, 25(6), 676-682.
- [54]. Manga P., Elbuluk n., Orlow J.S. Recent advances in understanding vitiligo. (2016). *F1000Research* 2016, 5(F1000 Faculty Rev):2234.
- [55]. Harris, J. E., Harris, T. H., Weninger, W., Wherry, E. J., Hunter, C. A., Turka, L. A. (2012). A mouse model of vitiligo with focused epidermal depigmentation requires IFN- γ for autoreactive CD8+ T-cell accumulation in the skin. *Journal of Investigative Dermatology*, 132(7), 1869-1876.
- [56]. Rodrigues, M., Ezzedine, K., Hamzavi, I., Pandya, A. G., Harris, J. E., Vitiligo Working Group. (2017). New discoveries in the pathogenesis and classification of vitiligo. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 77(1), 1-13.
- [57]. Ongenae, K., Van Geel, N., Naeyaert, J. M. (2003). Evidence for an autoimmune pathogenesis of vitiligo. *Pigment Cell Research*, 16(2), 90-100.
- [58]. Naughton, G. K., Eisinger, M., Bystry, J. C. (1983). Detection of antibodies to melanocytes in vitiligo by specific immunoprecipitation. *Journal of Investigative Dermatology*, 81(6).
- [59]. Taieb, A. (2000). Intrinsic and extrinsic pathomechanisms in vitiligo. *Pigment Cell Research*, 13, 41-47.
- [60]. Baguley, B. C., Finlay, G. J., Kim, J. E. (2013). The role of the hippo pathway in melanocytes and melanoma. *Frontiers in Oncology*, 3, 123.
- [61]. Kumar, R., Parsad, D. (2012). Melanocytorrhagy and apoptosis in vitiligo: Connecting jigsaw pieces. *Indian Journal of Dermatology, Venereology, and Leprology*, 78(1), 19.
- [62]. Gauthier, Y., Cario-Andre, M., Lepreux, S., Pain, C., Taieb, A. (2003). Melanocyte detachment after skin friction in non lesional skin of patients with generalized vitiligo. *British Journal of Dermatology*, 148(1), 95-101.

- [63]. Gauthier, Y., Andre, M. C., Taïeb, A. (2003). A critical appraisal of vitiligo etiologic theories. Is melanocyte loss a melanocytorrhagy? *Pigment Cell Research*, 16(4), 322-332.
- [64]. Ricard, A. S., Pain, C., Daubos, A., Ezzedine, K., Lamrissi-Garcia, I., Bibeyran, A., Cario-André, M. (2012). Study of CCN3 (NOV) and DDR1 in normal melanocytes and vitiligo skin. *Experimental Dermatology*, 21(6), 411-416.
- [65]. Le Poole, I. C., Van den wijngaard, R. M. G. J., Westerhof, W., Das, P. K. (1997). Tenascin is overexpressed in vitiligo lesional skin and inhibits melanocyte adhesion. *British Journal of Dermatology*, 137(2), 171-178.
- [66]. Guerra, L., Dellambra, E., Brescia, S., Raskovic, D. (2010). Vitiligo: pathogenetic hypotheses and targets for current therapies. *Current Drug Metabolism*, 11(5), 451-467.
- [67]. Denat, L., Kadekaro, A. L., Marrot, L., Leachman, S. A., Abdel-Malek, Z. A. (2014). Melanocytes as instigators and victims of oxidative stress. *Journal of Investigative Dermatology*, 134(6), 1512-1518.
- [68]. Speeckaert, R., Van Geel, N. (2017). Vitiligo: an update on pathophysiology and treatment options. *American journal of Clinical Dermatology*, 18(6), 733-744.
- [69]. Shi, Q., Zhang, W., Guo, S., Jian, Z., Li, S., Li, K., ... & Li, C. (2016). Oxidative stress-induced overexpression of miR-25: the mechanism underlying the degeneration of melanocytes in vitiligo. *Cell Death and Differentiation*, 23(3), 496.
- [70]. Iannella, G., Greco, A., Didona, D., Didona, B., Granata, G., Manno, A., Magliulo, G. (2016). Vitiligo: pathogenesis, clinical variants and treatment approaches. *Autoimmunity Reviews*, 15(4), 335-343.
- [71]. Schallreuter, K. U., Elwary, S. M., Gibbons, N. C., Rokos, H., & Wood, J. M. (2004). Activation/deactivation of acetylcholinesterase by H₂O₂: more evidence for oxidative stress in vitiligo. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 315(2), 502-508.
- [72]. Jimbow, K., Chen, H., Park, J. S., Thomas, P. D. (2001). Increased sensitivity of melanocytes to oxidative stress and abnormal expression of tyrosinase-related protein in vitiligo. *British Journal of Dermatology*, 144(1), 55-65.
- [73]. Colucci, R., Dragoni, F., Moretti, S. (2015). Oxidative stress and immune system in vitiligo and thyroid diseases. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2015.
- [74]. Laddha, N. C., Dwivedi, M., Mansuri, M. S., Gani, A. R., Ansarullah, M., Ramachandran, A. V., Begum, R. (2013). Vitiligo: interplay between oxidative stress and immune system. *Experimental Dermatology*, 22(4), 245-250.
- [75] Rashighi, M., Harris, J. E. (2017). Vitiligo pathogenesis and emerging treatments. *Dermatologic Clinics*, 35(2), 257-265.
- [76]. Malhotra, N., Dytoc, M. (2013). The pathogenesis of vitiligo. *Journal of Cutaneous Medicine and Surgery*, 17(3), 153-172.

- [77]. Zhang, X. (2012). Genome-wide association study of skin complex diseases. *Journal of Dermatological Science*, 66(2), 89-97.
- [78]. Zhang, X. J., Liu, J. B., Gui, J. P., Li, M., Xiong, Q. G., Wu, H. B., Yang, J. (2004). Characteristics of genetic epidemiology and genetic models for vitiligo. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 51(3), 383-390.
- [79]. Zhang, X. J., Chen, J. J., Liu, J. B. (2005). The genetic concept of vitiligo. *Journal of Dermatological Science*, 39(3), 137-146.
- [80]. Allam, M., Riad, H. (2014). Concise review of recent studies in vitiligo. *Qatar Medical Journal*, 10.
- [81]. Reimann, E., Kingo, K., Karelson, M., Reemann, P., Loite, U., Sulakatko, H., Silm, H. (2012). The mRNA expression profile of cytokines connected to the regulation of melanocyte functioning in vitiligo skin biopsy samples and peripheral blood mononuclear cells. *Human immunology*, 73(4), 393-398.
- [82]. Shen, C., Gao, J., Sheng, Y., Dou, J., Zhou, F., Zheng, X., Sun, L. (2016). Genetic susceptibility to vitiligo: GWAS approaches for identifying vitiligo susceptibility genes and loci. *Frontiers in Genetics*, 7, 3.
- [83]. Spritz, R. A. (2013). Modern vitiligo genetics sheds new light on an ancient disease. *The Journal of Dermatology*, 40(5), 310-318.
- [84]. Ying, S. Y. (Ed.). (2008). *Current perspectives in microRNAs (miRNA)*. Springer Science & Business Media.
- [85]. Esmaeili, B., Rezaee, S. A. R., Layegh, P., Afshari, J. T., Dye, P., Karimiani, E. G., Rafatpanah, H. (2011). Expression of IL-17 and COX2 gene in peripheral blood leukocytes of vitiligo patients. *Iranian Journal of Allergy, Asthma and Immunology*, 10(2), 81-89.
- [86]. Schneider, M. R. (2012). MicroRNAs as novel players in skin development, homeostasis and disease. *British Journal of Dermatology*, 166(1), 22-28.
- [87]. Jain, S., Kapetanaki, M. G., Raghavachari, N., Woodhouse, K., Yu, G., Barge, S., Gladwin, M. T. (2013). Expression of regulatory platelet microRNAs in patients with sickle cell disease. *PLoS One*, 8(4), e60932.
- [88]. Munker, R., Calin, G. A. (2011). MicroRNA profiling in cancer. *Clinical Science*, 121(4), 141-158.
- [89]. Bartel, D. P. (2004). MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*, 116(2), 281-297.
- [90]. Hamfjord, J., Stangeland, A. M., Hughes, T., Skrede, M. L., Tveit, K. M., Ik Dahl, T., Kure, E. H. (2012). Differential expression of miRNAs in colorectal cancer: comparison of paired tumor tissue and adjacent normal mucosa using high-throughput sequencing. *PloS one*, 7(4), e34150.

- [91]. Zhou, Y., Frings, O., Branca, R. M., Boekel, J., le Sage, C., Fredlund, E., Orre, L. M. (2017). MicroRNAs with AAGUGC seed motif constitute an integral part of an oncogenic signaling network. *Oncogene*, 36(6), 731.
- [92]. Wang, J., Chen, J., Sen, S. (2016). MicroRNA as biomarkers and diagnostics. *Journal of Cellular Physiology*, 231(1), 25-30.
- [93]. Treiber, T., Treiber, N., Meister, G. (2012). Regulation of microRNA biogenesis and function. *Thrombosis and haemostasis*, 108(04), 605-610.
- [94]. Jiu, S., Zhu, X., Wang, J., Zhang, C., Mu, Q., Wang, C., & Fang, J. (2015). Genome-wide mapping and analysis of grapevine microRNAs and their potential target genes. *The Plant Genome*, 8(2).
- [95]. <https://www.news-medical.net/life-sciences/MicroRNA-Nomenclature.aspx>. Erişim tarihi: 25.08.2018
- [96]. Griffiths-Jones, S., Grocock, R. J., Van Dongen, S., Bateman, A., Enright, A. J. (2006). miRBase: microRNA sequences, targets and gene nomenclature. *Nucleic Acids Research*, 34(suppl_1), D140-D144.
- [97]. Breving, K., Esquela-Kerscher, A. (2010). The complexities of microRNA regulation: mirandering around the rules. *The international Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 42(8), 1316-1329.
- [98]. Saraiva, C., Esteves, M., Bernardino, L. (2017). MicroRNA: basic concepts and implications for regeneration and repair of neurodegenerative diseases. *Biochemical Pharmacology*, 141, 118-131.
- [99]. Curtis, H. J., Sibley, C. R., Wood, M. J. (2012). Mirtrons, an emerging class of atypical miRNA. *Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA*, 3(5), 617-632.
- [100]. Yang, J. S., Lai, E. C. (2011). Alternative miRNA biogenesis pathways and the interpretation of core miRNA pathway mutants. *Molecular Cell*, 43(6), 892-903.
- [101]. Yan, H., Bu, P. (2018). Non-coding RNAs in cancer stem cells. *Cancer letters*.
- [102]. Lovendorf, M. B., Skov, L. (2015). miRNAs in inflammatory skin diseases and their clinical implications. *Expert Review of Clinical Immunology*, 11(4), 467-477.
- [103]. Jinnin, M. (2014). Various applications of microRNAs in skin diseases. *Journal of Dermatological Science*, 74(1), 3-8.
- [104]. Yi, R., Poy, M. N., Stoffel, M., & Fuchs, E. (2008). A skin microRNA promotes differentiation by repressing 'stemness'. *Nature*, 452(7184), 225.
- [105]. Sand, M., Gambichler, T., Sand, D., Skrygan, M., Altmeyer, P., & Bechara, F. G. (2009). MicroRNAs and the skin: tiny players in the body's largest organ. *Journal of Dermatological Science*, 53(3), 169-175.

- [106]. Jinnin, M. (2014). Various applications of microRNAs in skin diseases. *Journal of Dermatological Science*, 74(1), 3-8.
- [107]. Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 1987;162(1):156-9.
- [108]. miRBase Release 21. Erişim: <http://www.mirbase.org>. Erişim tarihi: 25.09.2016.
- [109]. miRDataBase. Erişim: <http://mirdb.org/miRDB>. Erişim tarihi: 25.09.2016.
- [110]. TargetScan Release 7.0, Prediction of microRNA targets, Erişim: <http://www.targetscan.org>. Erişim tarihi: 25.09.2016.
- [111]. microrna, <http://www.microrna.org>. Erişim Tarihi: 26.09.2016.
- [112]. Morin, P. A., Saiz, R., & Monjazez, A. (1999). High-throughput single nucleotide polymorphism genotyping by fluorescent 5' exonuclease assay. *Biotechniques*, 27(3), 538-553.
- [113]. Schmittgen, T. D., & Livak, K. J. (2008). Analyzing real-time PCR data by the comparative C_T method. *Nature Protocols*, 3(6), 1101.
- [114]. Livak, K. J., Flood, S. J., Marmaro, J., Giusti, W., & Deetz, K. (1995). Oligonucleotides with fluorescent dyes at opposite ends provide a quenched probe system useful for detecting PCR product and nucleic acid hybridization. *Genome Research*, 4(6), 357-362.
- [115]. Tuerxuntayi, A., Liu, Y. Q., Tulake, A., Kabas, M., Eblimit, A., Aisa, H. A. (2014). Kaliziri extract upregulates tyrosinase, TRP-1, TRP-2 and MITF expression in murine B16 melanoma cells. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 14(1), 166.
- [116]. Bhardwaj, S., Rani, S., Srivastava, N., Kumar, R., & Parsad, D. (2017). Increased systemic and epidermal levels of IL-17A and IL-1 β promotes progression of non-segmental vitiligo. *Cytokine*, 91, 153-161.
- [117]. Rani, S., Kumari, U., Bhardwaj, S., Parsad, D., Sharma, V. L., Kumar, R. (2018). Decreased expression of neuregulin1 in the lesional skin of vitiligo patients. *International Journal of Dermatology*.
- [118]. Aunin, E., Kingo, K., Karelson, M., Rätsep, R., Silm, H., Vasar, E., Köks, S. (2008). Expressional changes in the intracellular melanogenesis pathways and their possible role the pathogenesis of vitiligo. *Journal of Dermatological Science*, 52(1), 39-46.
- [119]. Blokzijl, A., Chen, L. E., Gustafsdottir, S. M., Vuu, J., Ullenhag, G., Kämpe, O., Hedstrand, H. (2016). Elevated levels of SOX10 in serum from vitiligo and melanoma patients, analyzed by proximity ligation assay. *PloS one*, 11(4), e0154214. XU, L.; Yang, B.; Ai, J., MicroRNA transport: a new way in cell communication. *Journal of Cellular Physiology* **2013**, 228, (8), 1713-1719.
- [120]. Su, Z., Zheng, X., Zhang, X., Wang, Y., Zhu, S., Lu, F., Hou, L. (2017). Sox10 regulates skin melanocyte proliferation by activating the DNA replication licensing factor MCM5. *Journal of Dermatological Science*, 85(3), 216-225.
- [121]. Stolzenburg, L. R., Wachtel, S., Dang, H., & Harris, A. (2016). miR-1343 attenuates pathways of fibrosis by targeting the TGF- β receptors. *Biochemical Journal*, 473(3), 245-256.

- [122]. Stolzenburg, L. R., Harris, A. (2018). Microvesicle-mediated delivery of miR-1343: impact on markers of fibrosis. *Cell and Tissue Research*, 371(2), 325-338.
- [123]. Ramsden, C. A., Riley, P. A. (2014). Tyrosinase: the four oxidation states of the active site and their relevance to enzymatic activation, oxidation and inactivation. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 22(8), 2388-2395.
- [124]. Ghanem, G., Fabrice, J. (2011). Tyrosinase related protein 1 (TYRP1/gp75) in human cutaneous melanoma. *Molecular oncology*, 5(2), 150-155.
- [125]. Kingo, K., Aunin, E., Karelson, M., Philips, M. A., Rätsep, R., Silm, H., Koks, S. (2007). Gene expression analysis of melanocortin system in vitiligo. *Journal of Dermatological Science*, 48(2), 113-122.
- [126]. Shi, Y. L., Weiland, M., Li, J., Hamzavi, I., Henderson, M., Huggins, R. H., Lim, H. W. (2013). MicroRNA expression profiling identifies potential serum biomarkers for non-segmental vitiligo. *Pigment cell & Melanoma Research*, 26(3), 418-421.
- [127]. Shi, Y. L., Weiland, M., Lim, H. W., Mi, Q. S., Zhou, L. (2014). Serum mi RNA expression profiles change in autoimmune vitiligo in mice. *Experimental Dermatology*, 23(2), 140-142.
- [128]. Shi, Q., Zhang, W., Guo, S., Jian, Z., Li, S., Li, K., Li, C. (2016). Oxidative stress-induced overexpression of miR-25: the mechanism underlying the degeneration of melanocytes in vitiligo. *Cell Death and Differentiation*, 23(3), 496.
- [129]. Mansuri, M. S., Singh, M., Begum, R. (2016). miRNA signatures and transcriptional regulation of their target genes in vitiligo. *Journal of Dermatological Science*, 84(1), 50-58.
- [130]. Cui, T. T., Yi, X. L., Zhang, W. G., Wei, C., Zhou, F. B., Jian, Z., Li, K. (2015). miR-196a-2 rs11614913 polymorphism is associated with vitiligo by affecting heterodimeric molecular complexes of Tyr and Tyrp1. *Archives of Dermatological Research*, 307(8), 683-692.
- [131]. Mansuri, M. S., Singh, M., Dwivedi, M., Laddha, N. C., Marfatia, Y. S., Begum, R. (2014). Micro RNA profiling reveals differentially expressed micro RNA signatures from the skin of patients with nonsegmental vitiligo. *British Journal of Dermatology*, 171(5), 1263-1267.
- [132]. Wang, Y., Wang, K., Liang, J., Yang, H., Dang, N., Yang, X., Kong, Y. (2015). Differential expression analysis of mi RNA in peripheral blood mononuclear cells of patients with non-segmental vitiligo. *The Journal of Dermatology*, 42(2), 193-197.
- [133]. Wang, Y., Wang, K., Dang, N., Wang, L., Zhang, M. (2016). Downregulation of miR-3940-5p promotes T-cell activity by targeting the cytokine receptor IL-2R gamma on human cutaneous T-cell lines. *Immunobiology*, 221(12), 1378-1381.
- [134]. Spiegelman, V. S., Elcheva, I. A. (2017). Metabo-miR: miR-211 Regulates Mitochondrial Energy Metabolism in Vitiligo. *Journal of Investigative Dermatology*, 137(9), 1828-1830.
- [135]. Shang, Z., Li, H. (2017). Altered expression of four mi RNA (miR-1238-3p, miR-202-3p, miR-630 and miR-766-3p) and their potential targets in peripheral blood from vitiligo patients. *The Journal of Dermatology*, 44(10), 1138-1144.

[136]. Chen, C., Xue, S., Zhang, J., Chen, W., Gong, D., Zheng, J., Zheng, J. (2017). Dna-methylation-mediated repression of mir-766-3p promotes cell proliferation via targeting Sf2 expression in renal cell carcinoma. *International Journal of Cancer*, 141(9), 1867-1878.

[137]. Šahmatova, L., Tankov, S., Prans, E., Aab, A., Hermann, H., Reemann, P., Kingo, K. (2016). MicroRNA-155 is dysregulated in the skin of patients with vitiligo and inhibits melanogenesis-associated genes in melanocytes and keratinocytes. *Acta Dermato-Venereologica*, 96(6), 742-748

[138]. Sonkoly, E., Janson, P., Majuri, M. L., Savinko, T., Fyhrquist, N., Eidsmo, L., Stenvang, J. (2010). MiR-155 is overexpressed in patients with atopic dermatitis and modulates T-cell proliferative responses by targeting cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 126(3), 581-589.



ÖZGEÇMİŞ

Adı ve Soyadı : GURBET DOĞRU ÖZDEMİR

Doğum Tarihi : 21.06.1986

E-mail: gurbetdogru@mersin.edu.tr

Öğrenim Durumu:

Derece	Bölüm/Program	Üniversite	Yıl
Lisans	Biyoloji Bölümü	Mersin Üniversitesi	2004-2009
Yüksek Lisans	Tıbbi Biyoloji ve Genetik	Mersin Üniversitesi	2009-2012
Doktora	Tıbbi Biyoloji	Mersin Üniversitesi	2012-2018

Görevler:

Görev Ünvanı	Görev Yeri	Yıl
Arş.Gör.	Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı	2010-2018

ESERLER

Makaleler

1. **Dogru G.**, İzci Ay O., Erdal ME., Ay E., Tombak A., Karakas U. The Role of Certain Gene Polymorphisms Involved in the Apoptotic Pathways in Polycythemia Vera and Essential Thrombocytosis. Advances in Clinical and Experimental Medicine Adv Clin Exp Med. 2017 Aug;26(5):761-765. doi: 10.17219/acem/63087.
2. **Doğru G.**, Ay ME., Ay İÖ, Çevik K. Miyeloproliferatif Neoplazmlara (MPN) Moleküler Genetik Yaklaşım. Nobel Med 2017; 13(2): 12-21.
3. Karakas, U.; Ay, O.; Ay, M.; Wang, W.; Sungur, M.; Çevik, K.; **Dogru, G.**; Erdal, M. Regulating the Regulators in Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder: A Genetic Association Study of microRNA Biogenesis Pathways. MARY ANN LIEBERT INC, 2017, 21, 352-358.

Kitaplar:

Uluslararası- Kitapta Bölüm Yazma

1. Ay, M.; Doğru, G.; Çevik, K.; Ay, O. RESEARCHES ON SCIENCE AND ART in 21 ST CENTURY TURKEY, ISBN: 978-605-180-771-3, gece publishing, Baskı Sayısı: 1, Baskı Adet Sayısı: 500, 1548 Sayfa, İngilizce, Ankara, Türkiye, 2017.

Sözlü Sunumlar

1. Gurbet Dogru, Özlem Izci Ay, Ümit Tursen, Mustafa Ertan Ay, Kenan Cevik, Ümit Karakas, Didem Derici Yılmaz, Mehmet Emin Erdal. Effect of mir-3680, mir-4495, mir-6824 Expression Levels in Vitiligo. 2nd International Dermatology and Cosmetology Congress.2017/İstanbul, Türkiye
2. Gurbet Dogru, Özlem Izci Ay, Mustafa Ertan Ay, Merve Türkegün, Mehmet Emin Erdal, Ümit Tursen. Investigation of some miRNA Expression Levels Associated with Melanogenesis in Vitiligo Patients. 2nd International Dermatology and Cosmetology Congress. 2018/İstanbul, Türkiye

Ödüller

1. Gurbet Dogru, Özlem Izci Ay, Ümit Tursen, Mustafa Ertan Ay, Kenan Cevik, Ümit Karakas, Didem Derici Yılmaz, Mehmet Emin Erdal. Effect of mir-3680, mir-4495, mir-6824 Expression Levels in Vitiligo. 2nd International Dermatology and Cosmetology Congress.2017/ İstanbul, Türkiye (**BEST ABSTRACT AWARDS-1.lık Ödülü**)

Poster Bildirileri

Uluslararası bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitabında (*Proceedings*) basılan bildiriler

1. Yüksel, D.; AY, Ö.; AY, M.; Tezol, O.; **Doğru, G.**, Çevik K, Karakaş Ü, Çayan F, Buran İ, Erdal ME. The case of der(5)t(5;14)mat caused by adjacent I meiotic segregation in prenatal diagnosis. *ESGH-2016*, Abstract Book,602, Barcelona/İspanya, 2016.
2. Buran, İ; AY, M.; **Doğru, G.**; AY, Ö.; Karakaş, Ü., Çevik K, Yüksel D, Dilek U, Erdal ME. Aneuploidy findings on two different pregnancy loss materials from the same mother. *ESHG 2016*, Abstract Book, 582, Barcelona/İspanya, 2016.

Ulusal bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitabında (*Proceedings*) basılan bildiriler:

1. Tombak A., Ay ME., Erdal ME., **Doğru G.**, Tiftik EN., Söylemez F., Gürkan E., Semra Paydaş. Multiple Miyeloma, Kronik Lenfositik Lösemi ve Kronik Miyeloid Lösemide Vitamin D Reseptör gen Polimorfizmleri. 41. Ulusal Hematoloji Kongresi. 2015 Antalya/Türkiye
2. Ay Ö., Ay ME., Çayan FE., **Doğru G.**, Tekin S., Çevik K., Karakaş Ü., Erdal ME. Fetüste Trizomi 18 ile sonuçlanan Maternal Kökenli t(7,18) Olgusu. 13. Ulusal Tıbbi Biyoloji ve Genetik Kongresi (Uluslararası Katılımlı) 2013 Aydın/Türkiye
3. **Doğru G.**, Ay Ö., Tombak A., Tiftik EN., Erdal ME. Polisitemia Vera ve Esansiyel Trombositoz Hastalarında Apoptotik Yolakta Görevli Gen Polimorfizmlerinin Araştırılması. 18. Ulusal Hematoloji Kongresi 2012 Antalya/Türkiye
4. **Doğru G.**, Ay Ö., Tekin S., Dilek TU., Çayan FE., Sungur MA., Erdal ME. 105 Gebelik Kaybı Olgusunda Saptanan Sitogenetik Verilerin Değerlendirilmesi. 12. Ulusal Tıbbi Biyoloji ve Genetik Kongresi. 2011 Antalya/Türkiye. Türkiye Klinikleri J Med Sci 2011; 31(Suppl) (P201)
5. **Doğru G.**, Ay Ö., Tekin S., Şenli H., Dilek TU., Erdal ME. Prenatal Tanıda 2;8 Translokasyon Olgusu. 12. Ulusal Tıbbi Biyoloji ve Genetik Kongresi. 2011 Antalya/Türkiye. Türkiye Klinikleri J Med Sci 2011; 31(Suppl) (P201).
6. Karakaş Ü., Ay Ö., Ay ME., Tekin S., Dilek TU., Çayan F., Şenli H., **Doğru G.**, Erdal ME. Prenatal Tanıda Saptanan de novo Perisentrik İnversiyon 6 Olgusu. 12. Ulusal Tıbbi Biyoloji ve Genetik Kongresi. 2011 Antalya/Türkiye. Türkiye Klinikleri J Med Sci 2011; 31(Suppl) (P201)
7. Sürer S., Ay Ö., Ay ME., Çayan F., Dilek TU., Şenli H., **Doğru G.**, Erdal ME. Cytogenetic Evaluation. *in situ* Kültür Yöntemi ile 2200 Amniyosentez Materyalinin Sitogenetik Değerlendirilmesi. 12. Ulusal Tıbbi Biyoloji ve Genetik Kongresi. 2011 Antalya/Türkiye. Türkiye Klinikleri J Med Sci 2011; 31(Suppl) (S204-205)
8. Çevik K., Erdal ME., Ay Ö., Dilek TU., Çayan F., Tekin S., Şenli H., **Doğru G.**, Karakaş Ü., Erdal ME. Prenatal Tanıda Saptanan İnversiyon 12 Olgusu. 12. Ulusal Tıbbi Biyoloji ve Genetik Kongresi. 2011 Antalya/Türkiye. Türkiye Klinikleri J Med Sci 2011; 31(Suppl) (P205)

