



T.C.

ADYAMAN ÜNİVERSİTESİ

TIP FAKÜLTESİ

TIBBİ GENETİK ANABİLİM DALI

**ADYAMAN İLİNDE KORONER ARTER HASTALIĞININ
ERKEN TANISINDA KANDAKİ UZUN KODLAMAYAN
RNA'LAR (LncRNA'lar) (*MEG3*, *MALAT1*, *MIAT*, *MCM3AP-AS1*):
ERKEN BİYOBELİRTEÇ OLABİLİR Mİ?**

UZMANLIK TEZİ

DR. HAMİDE SAYGILI

DANIŞMAN

PROF. DR. HAYDAR BAĞIŞ

ADYAMAN - 2020



T.C.

ADYAMAN ÜNİVERSİTESİ

TIP FAKÜLTESİ

TİBBİ GENETİK ANABİLİM DALI

**ADYAMAN İLİNDE KORONER ARTER HASTALIĞININ
ERKEN TANISINDA KANDAKİ UZUN KODLAMAYAN
RNA'LAR (LncRNA'lar) (*MEG3, MALAT1, MIAT, MCM3AP-AS1*):
ERKEN BİYOBELİRTEÇ OLABİLİR Mİ?**

UZMANLIK TEZİ

DR. HAMİDE SAYGILI

DANIŞMAN

PROF. DR. HAYDAR BAĞIŞ

Bu çalışma Adıyaman Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi Başkanlığının TIPFTUP/2018-0001 sayılı kararı ile desteklenmiştir.

ADYAMAN – 2020

Prof. Dr. Haydar BAĞIŞ danışmanlığında Dr. Hamide SAYGILI tarafından yapılan “ Adıyaman İlinde Koroner Arter Hastalığının Erken Tanısında Kandaki Uzun Kodlamayan RNA’lar (LncRNA’lar) (*MEG3*, *MALAT1*, *MIAT*, *MCM3AP-AS1*): Erken Biyobelirteç Olabilir mi? ” başlıklı tez çalışması 22/06/2020 tarihinde yapılan tez savunma sınavı sonrası yapılan değerlendirme sonucu jürimiz tarafından Tıbbi Genetik Anabilim Dalı’nda TIPTA UZMANLIK TEZİ olarak kabul edilmiştir.

BAŞKAN Prof. Dr. Haydar BAĞIŞ

ÜYE Doç. Dr. Serdar TÜRKMEN

ÜYE Doç.Dr. Atıl BİŞGİN

Yukarıdaki imzaların adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylarım.

22/06/2020

Prof. Dr. Ali AYDIN

Adıyaman Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanı

TEŞEKKÜR

Tıbbi Genetik asistanlığım ve Tıpta Uzmanlık eğitimim sürecinde her türlü desteği sağlayan, beni hem iyi bir hekim hem de iyi bir araştırmacı olma konusunda her zaman teşvik eden değerli bilim insanı, anabilim dalı başkanımız ve tez danışmanım Prof. Dr. Haydar Bağış hocama şükranlarımı sunuyorum.

Tıbbi Genetik Anabilim Dalında birlikte çalıştığım Dr. Öğr. Üyesi M. Özgür Çevik, Dr. Özden Öztürk, Dr. Onur Recep Gündüz, Uzm. Dr. Büşra Eser Çavdartepe, laboratuvar teknikeri Yusuf Göksu ve poliklinik sekreteri Yusuf Yıldırım Bey'e destekleri için teşekkür ederim.

Tez çalışmalarımda destek veren ve önemli katkıları olan Kardiyoloji bölümünden Prof. Dr. Erdal Aktürk, anjiyografi ünitesinin sorumlu hemşiresi İlkay Eroğlu Hanım, tekniker Şahin Şahin, Cuma Pancar, Mustafa Arslan Bey ve anjiyo ünitesinin diğer çalışanlarına, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalından Doç. Dr. Önder Yumrutaş, Arş. Gör. Dr. İbrahim Bozgeyik Bey'e ve istatistik konularında destek olan Arş. Gör. Ebru Dumlupınar Hanıma yardımlarından dolayı çok teşekkür ederim.

Beni bugünlere getiren, her zaman destekleyen, ilk öğretmenim, kalbimin karşılığı, elini her daim üzerimde hissettiğim canım babacığım, çocuk ruhlu kızının her zaman yanında olan ve yardımını ile destekleyen canım anneciğime, hayatımı renklendiren biricik ablam Zeynep Ayrık'a ve torunu için her türlü fedakarlığı gösteren anneanneme minnettarım, emekleri için sonsuz teşekkürler.

Dr. Hamide Saygılı

İÇİNDEKİLER

ONAY SAYFASI	III
TEŞEKKÜR	IV
İÇİNDEKİLER	V
SİMGELER VE KISALTMALAR	VIII
ŞEKİLLER DİZİNİ	XII
TABLolar DİZİNİ	XIV
ÖZET	XV
SUMMARY	XVII
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. KORONER ARTER HASTALIĞI.....	3
2.1.1. Tanım ve Sınıflandırma.....	3
2.1.2. Epidemiyoloji.....	5
2.1.3. Etiyoloji.....	8
2.1.4. Genetik Nedenler	10
2.1.5 Tanı.....	13
2.1.6 Biyobelirteçler.....	15
2.2. UZUN KODLAMAYAN RNA (LncRNA).....	18
2.2.1 Tanım, tarihçe, sınıflandırma ve terminoloji.....	18
2.2.2. Uzun kodlamayan RNA oluşum ve fonksiyonları.....	25
2.2.3. Uzun Kodlamayan RNA'ların Hastalıklardaki Rolü.....	33
2.2.4. Kardiyovasküler sistem ve Uzun Kodlamayan RNA'lar	37

2.2.5. Uzun Kodlamayan RNA'ların Koroner Arter Hastalığındaki Rolü.....	39
2.2.6. LncRNA'ların Tanı, Prognoz ve Tedavide Kullanımı	43
2.2.7. LncRNA Profillendirme.....	45
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	48
3.1. ÇALIŞMA GRUBU.....	48
3.2. VERİ TOPLAMA ARAÇLARI.....	49
3.2.1. Kullanılan Cihaz ve Aletler.....	49
3.2.2. Kullanılan Sarf Malzemeleri ve Kimyasallar.....	50
3.3. YÖNTEMLER.....	51
3.3.1. Tam Kan Örneklerinin Toplanması ve Dondurulması.....	51
3.3.2. RNA İzolasyonu.....	51
3.3.3. cDNA Dönüşümü.....	53
3.3.4. qRT-PCR (Quantitative Real Time-PCR, Eş Zamanlı-PCR).....	55
3.4. VERİLERİN İSTATİSTİKSEL DEĞERLENDİRİLMESİ.....	58
4. BULGULAR.....	59
4.1. ÇALIŞMA GRUPLARININ GENEL ÖZELLİKLERİ.....	59
4.2. EKSPRESYON ANALİZİ BULGULARI.....	60
4.2.1. Çalışma Gruplarının LncRNA Ekspresyon Düzeylerinin Karşılaştırılması.....	60
4.2.2. Demografik Özelliklere ve Klinik Bulgulara Göre LncRNA Ekspresyon Düzeylerinin Karşılaştırılması.....	61
5. TARTIŞMA.....	70
6. SONUÇLAR.....	79
7. KAYNAKLAR.....	81

EKLER

EK 1. Genetik Çalışmalar için Bilgilendirilmiş Onam Formu



SİMGELER VE KISALTMALAR

ADAR:	Adenosine deaminase acting on RNA
AH:	Ailesel hiperkolesterolemi
AHA:	Amerikan Kalp Cemiyeti
AKS:	Akut Koroner Sendrom
AP:	Kararsız anjina (göğüs ağrısı)
APOB:	Apolipoprotein B geni
APOE:	Apolipoprotein E geni
ARH:	LDLR Adaptor Protein 1 geni
AS:	Antisense
ASO:	Antisense oligonükleotid
BNP:	B-tip natirüretik peptid
BTA:	Bilgisayarlı Tomografi Anjiyografi
cDNA:	Complementary (tamamlayıcı) DNA (Deoksiribo Nükleik Asit)
ceRNA:	Yarışmacı endojen RNA
circRNA:	Sirküler RNA
CT:	Cycle treshold (döngü eşiği)
cTnI:	Kardiyak troponin I
cTnT:	Kardiyak troponin T
CVAS:	Yaygın varyant ilişkilendirme çalışmaları

DALLY:	Disability Adjusted Life Year
DM:	Diabetes Mellitus
DMD:	Duchenne mskler distrofi
dNTP:	Deoksirbonkleotid trifosfat
DS:	Dnya Sağlık rgt
EKG:	Elektrokardiyografi
ESC:	Avrupa Kardiyoloji Cemiyeti
FDA:	Food and Drug Administration
FGF2:	Fiboblast growth factor 2
FPKM:	Fragments per kilobase per million mapped reads
GapmeR:	Yapay modifiye ribonkleotid monomerler
GBM:	Glioblastoma multiforme
GDF-15:	Growth/Differentiation factor 15
GEC:	Glioma ilişkili endotel hcreleri
GWAS:	Genom apında ilişkilendirme alışmaları
HAEC:	İnsan aort endotel hcesi
hnRNPK:	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K
HUDEP-2:	Human umbilical Cord Blood-Derived Erythroid Progenitor-2
HT:	Hipertansiyon
ICD:	Uluslararası hastalık sınıflandırması
İKA:	İnvaziv koroner anjiyografi
İKH:	İskemik Kalp Hastalığı
KABG:	Koroner arter bypass girişimi
KAH:	Koroner Arter Hastalığı

kB:	kilo baz (1000 adet nükleotid)
<i>KLF5</i> :	Kruppel Like factor 5
KVS:	Kardiyovasküler sistem
LDL:	Düşük molekül ağırlıklı lipoprotein
<i>LDLR</i> :	Low Density Lipoprotein Receptor
LincRNA:	Long intergenic non-coding RNA
lncRNA:	Long non-coding RNA
MI:	Miyokard enfaktüsü
miRNA:	Mikro Ribo Nükleik Asit
MRE:	miRNA responsive element
mRNA:	Messenger (haberci) RNA
mV:	Milivolt
NAT:	Natural antisense transcript
ncRNA:	Kodlama yapmayan RNA
NTproBNP:	Pro BNP'nin N terminal kısmı
PcG:	Polycomb-group protein
<i>PCSK9</i> :	Protein Convertase Subtilisin/Kexin Type 9
PKG:	Perkütan koroner girişim
PRC2:	Polycomb repressive complex 2
qRT-PCR:	Niceliksel eş zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu
RBP:	RNA bağlayıcı protein
RF/6A:	Retinal endotelyal hücre hattı
snRNA:	Small nuclear RNA
snoRNA:	Small nucleolar RNA

siRNA:	Small interfering RNA
STEMI:	ST elevasyonu miyokard enfarktüsü
SYBR:	Synergy Brands, Inc. (qRT-PCR işleminde kullanılan floresan işaretleme boyası ticari adı)
TAC:	Transverse aortic constriction
TE:	Transposable element
THP-1:	Acute monocytic leukemia derived cell
T-UCR:	Transcribed ultraconserved region
TÜİK:	Türkiye İstatistik Kurumu
tRNA:	Transfer RNA
USG:	Ultrasonografi
UTR:	Untranslated region
VEGFA:	Vascular Endothelial Growth Factor A
VEGFR 2:	Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 2
Xic:	X inaktivasyon merkezi
Xist:	X inactivation specific transcript
XKİ:	X kromozom inaktivasyonu

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1: Aterom formasyonu	3
Şekil 2.2: İskemik Kalp Hastalığına neden olan KAH tipleri.....	5
Şekil 2.3: Ateroskleroziste genetik varyasyon ve patofizyolojik yollar.....	12
Şekil 2.4: Kararlı Koroner Arter Hastalığı şüpheli hastalara tanısal değerlendirme.....	15
Şekil 2.5: Ökaryotik ncRNA keşiflerinin tarihsel şeması.....	19
Şekil 2.6: İnsan genomunda RNA alt tiplerinin dağılımı.....	21
Şekil 2.7: Kodlamayan RNA'ların sınıflandırılması.....	21
Şekil 2.8: İnsan ve fare lncRNA'larının uzunluk dağılımı.....	22
Şekil 2.9: Genomik lokalizasyonlarına göre lncRNA sınıflaması.....	23
Şekil 2.10: Genom çapında araştırmalarda lncRNA sınıflarının dağılımı.....	23
Şekil 2.11: İnsan monositlerinde lncRNA ekzonları ve kromozomal dağılımı.....	24
Şekil 2.12: lncRNA biyosentezi.....	26
Şekil 2.13: NAT çıkışma tipleri.....	27
Şekil 2.14: circRNA sentezi.....	27
Şekil 2.15: lncRNA'ların çeşitli moleküller ile etkileşimi.....	28
Şekil 2.16: lncRNA'ların moleküler fonksiyonları.....	29
Şekil 2.17: Genom düzeyinde lncRNA'ların düzenleyici mekanizmaları	30
Şekil 2.18: lncRNA gen ekspresyon düzenleme mekanizmaları.....	31
Şekil 2.19: lncRNA, miRNA ve TF etkileşimi.....	32
Şekil 2.20: lncRNA'ların biyolojik fonksiyonları.....	33
Şekil 2.21: Çeşitli kanserler ile ilişkili lncRNA'lar.....	35

Şekil 2.22: Memelilerde kardiyak gelişim.....	37
Şekil 2.23: Kardiyak hasar ve yeniden düzenleme ile ilişkili lncRNA'lar.....	38
Şekil 2.24: Hipertrofik kalp ve kalp yetmezliği süreçlerinde lncRNA'lar.....	39
Şekil 2.25: Ateroskleroziste rol alan lncRNA'lar.....	40
Şekil 2.26: Bazı önemli Anjiyo-lncRNA'ların fonksiyonel mekanizmaları.....	42
Şekil 2.27: qRT-PCR yönteminde kullanılan farklı kitlerin karşılaştırılması...	47
Şekil 3.1: Thermal Cycler Cihazı (SensoQuest).....	54
Şekil 3.2: Real-Time PCR amplifikasyon cihazı (Qiagen Rotor-Gene Q).....	56
Şekil 3.3: qRT-PCR amplifikasyonu sırasında floresan sinyal eğrilerinin görünümü.....	57
Şekil 4.1: lncRNA ifadelerinin gruplar arasında istatistiksel olarak karşılaştırılması.....	60
Şekil 4.2: <i>MEG3</i> ekspresyonunun demografik – klinik parametreler ile karşılaştırılması.....	61,62
Şekil 4.3: <i>MIAT</i> ekspresyonunun demografik – klinik parametreler ile karşılaştırılması.....	64,65
Şekil 4.4: <i>MALAT1</i> ekspresyonunun demografik – klinik parametreler ile karşılaştırılması.....	66,67
Şekil 4.5: <i>MCM3AP-AS1</i> ekspresyonunun demografik – klinik parametreler ile karşılaştırılması.....	68,69

TABLÖLER DİZİNİ

Tablo 2.1: Koroner Arter Hastalığı Geleneksel Risk Faktörleri.....	9
Tablo 2.2: Koroner Arter Hastalığı Yeni Risk Faktörleri.....	10
Tablo 2.3: KAH ile ilgili seçilmiş biyobelirteçler.....	17
Tablo 2.4: Başlıca ncRNA türleri ve işlevleri.....	20
Tablo 2.5: Hastalıklarda rol oynadığı gösterilen bazı lncRNA'lar.....	36
Tablo 2.6: lncRNA profili; Microarray ve RNA-Seq karşılaştırması.....	46
Tablo 3.1: Projede kullanılan Makine – Teçhizat listesi.....	49
Tablo 3.2: cDNA dönüşümü için kullanılan bileşenler ve miktarları.....	54
Tablo 3.3: Hedef lncRNA'lar ve ilişkili oldukları genler.....	55
Tablo 3.4: Hedef lncRNA primer dizileri.....	55
Tablo 3.5: qRT-PCR için kullanılan bileşenler ve miktarları.....	56
Tablo 3.6: qRT-PCR Tepkime Koşulları.....	57
Tablo 4.1: Çalışma gruplarının klinik ve demografik özellikleri.....	59
Tablo 4.2: Çalışma grupları arasında lncRNA ifade değişimlerinin tablo ile gösterimi.....	60
Tablo 4.3: <i>MEG3</i> ekspresyonunun demografik – klinik parametreler ile karşılaştırılması.....	63
Tablo 4.4: <i>MIAT</i> ekspresyonunun demografik – klinik parametreler ile karşılaştırılması.....	65
Tablo 4.5: <i>MALAT1</i> ekspresyonunun demografik – klinik parametreler ile karşılaştırılması.....	67
Tablo 4.6: <i>MCM3AP-AS1</i> ekspresyonunun demografik – klinik parametreler ile karşılaştırılması.....	69

ÖZET

Adıyaman İlinde Koroner Arter Hastalığının Erken Tanısında Kandaki Uzun Kodlamayan RNA'lar (LncRNA'lar) (*MEG3*, *MALAT1*, *MIAT*, *MCM3AP-AS1*): Erken Biyobelirteç Olabilir mi?

Dr. Hamide SAYGILI

Uzmanlık Tezi, Tıbbi Genetik Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Haydar BAĞIŞ

En yaygın kalp hastalığı formu olan ve ateroskleroz zemininde gelişen Koroner Arter Hastalığı (KAH), ülkemizde ve tüm dünyada ölüm nedenleri arasında birinci sırada yer almaktadır. KAH etiyolojisinde geleneksel ve yeni tanımlanmış risk faktörleri ile birlikte genetik temelli nedenlerde oldukça önemli rol oynamaktadır. Poligenik bir hastalık olan KAH patofizyolojisinde çevresel faktörler ve çok sayıda genin birlikte rol aldığı birçok yolak bulunmaktadır. Epigenetik faktörlerin KAH gelişimine katkıda bulunduğu ve önemli epigenetik düzenleyicilerden olan uzun kodlamayan RNA (lncRNA)'ların hastalık gelişiminde rol oynadığı gösterilmiştir. lncRNA'lar plazma ve diğer vücut sıvılarında stabil olmaları nedeni ile kardiyovasküler hastalıklarda özellikle KAH tanı ve prognozuna yönelik yeni bir biyobelirteç ve tedavi hedefi olarak araştırılmaya başlanmıştır. Çalışmamızda Adıyaman ilinde KAH şüphesi ile tanı veya tedavi amaçlı koroner anjiyografi yapılan olguların periferik tam kan örneklerinden lncRNA ekspresyon düzeyleri ölçüldü. Bu amaçla koroner anjiyografisi normal olan (<%50 darlık, non-obstrüktif) 45 olgu ve koroner arterlerinde kritik darlık saptanarak (>%50 darlık, obstrüktif) KAH tanısı alan 45 olgu olmak üzere toplam 90 olgu çalışmaya dahil edilmiştir. Periferik tam kan örneklerinden total RNA eldesi ve cDNA dönüşümü sonrasında *MEG3*, *MALAT1*, *MIAT* ve *MCM3AP-AS1* için kantitatif real time polimeraz zincir reaksiyonu (qRT-PCR) metodu ile lncRNA ekspresyon düzeyleri araştırıldı. $2^{-\Delta Ct}$ formülü kullanılarak

qRT-PCR sonuçları istatistiksel olarak analiz edildi. lncRNA ekspresyon düzeylerinin karşılaştırılmasında Mann Whitney U testi, demografik özellikler ve klinik bulgulara göre lncRNA ekspresyon ilişkisinin istatistiksel olarak değerlendirilmesinde χ^2 (ki-kare) testi kullanıldı. Araştırılan dört aday lncRNA arasındaki *MEG3*, *MIAT* için gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı ifade farklılıkları tespit edildi ($p < 0.02$ ve $p < 0.0003$). Ayrıca *MEG3* ekspresyon çalışmaları sonucu Diabetes Mellitus (DM) ve hipertansiyon (HT) aile öyküsü bulunmayan hastalarda ve erkek hastalarda istatistiksel anlamlı ifade farklılıkları bulundu. *MIAT* ekspresyon çalışmaları sonucu ise DM olmayan ve HT öyküsü bulunan hastalarda ve erkek hastalarda istatistiksel anlamlı ifade farklılıkları tespit edildi. Ekspresyon farklılıkları tespit edilen lncRNA'ların deneysel çalışmalarda ateroskleroz ve anjiyogenezde belirgin rolleri olan genleri (*MEG3* için *VEGFR2*, ve *NLRP3* geni ile *MIAT* için *VEGF* geni) hedefledikleri bilinmektedir. Hasta gruplarında farklı ekspresyon düzeylerini tespit ettiğimiz bu lncRNA'ların KAH patogenezinde rol alarak hastalık gelişimine katkı sağladığını ve bu hastalık için bir biyobelirteç adayı ve muhtemel tedavi hedefi olabileceğini düşünmekteyiz. Çalışma sonuçlarının KAH olgularının yönetiminde ve özellikle ateroskleroz ve anjiyogenez ile ilişkili mekanizmalara farklı bakış açısı ile katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

Anahtar kelimeler: Koroner arter hastalığı, lncRNA, aterosklerozis, anjiyogenezis, *MEG3*, *MIAT*

SUMMARY

In The Early Diagnosis of Coronary Artery Disease at Adiyaman Province, The Long Non-coding RNAs in the Blood (*MEG3*, *MALAT1*, *MIAT*, *MCM3AP-AS1*): Could It Be Early Biomarkers?

Hamide SAYGILI, M.D.

Speciality Thesis, Medical Genetics Department

Thesis Advisor: Prof. Haydar BAĞIŞ, DVM, PhD.

Coronary artery disease (CAD), which is the most common form of heart disease and which develops on the basis of atherosclerosis, ranks first among the causes of death in our country and in the whole world. Along with traditional and newly defined risk factors, genetic based reasons also play a very important role in CAD aetiology. Environmental factors and several pathways with a large number of genes play a role in the pathophysiology of CAD, which is a polygenic disease. It has been shown that epigenetic factors contribute to CAD development and long noncoding RNAs (lncRNA), which are important epigenetic regulators, play a role in disease development. lncRNAs have begun to be researched as a new biomarker and treatment target for the diagnosis and prognosis of cardiovascular diseases, especially CAD, due to their stability in plasma and other body fluids. In our study, lncRNA expression levels were measured from peripheral whole blood samples of cases that underwent coronary angiography for diagnostic or therapeutic purposes with a suspicion of CAD. For this purpose, a total of 90 cases, 45 cases whose coronary angiographies were normal (<50% constriction, non-obstructive) and 45 cases who were diagnosed with CAD after critical constriction (>50% constriction, obstructive) was found in their coronary arteries, were included in study. lncRNA expression levels were researched

by quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR) method for *MEG3*, *MALAT1*, *MIAT* and *MCM3AP-AS1* after total RNA acquisition and cDNA conversion from peripheral whole blood samples. qRT-PCR results were analyzed statistically by using $2^{-\Delta C_t}$ formula. Mann Whitney U test was used to compare lncRNA expression levels and χ^2 (Chi-square) test was used in the statistical assessment of lncRNA expression relationship according to demographic characteristics and clinical findings. Statistically significant expression differences were found between groups for *MEG3* and *MIAT*, which are among the four candidate lncRNA researched ($p < 0.02$ and $p < 0.0003$). In addition, statistically significant expression differences were found in patients who did not have DM, HT, family history and male patients as a result of *MEG3* expression studies. Statistically significant expression differences were also found in patients who did not have DM and those who had HT history and male patients as a result of *MIAT* expression studies. It is known that lncRNAs which are detected expression differences target to genes which have specific roles in atherosclerosis and angiogenesis (*VEGFR2* and *NLRP3* gene for *MEG3*, *VEGF* for *MIAT*) in experimental studies. We believe that these lncRNAs, which were detected different expression levels in patient groups, contributed to the development of disease by having a role in CAD pathogenesis and they may be a biomarker candidate for this disease and a possible treatment target. It is thought that the results of the study will contribute to the management of CAD cases and especially to mechanisms related with atherosclerosis and angiogenesis with a different perspective.

Keywords: Coronary artery disease, lncRNA, atherosclerosis, angiogenesis, *MEG3*, *MIAT*

1. GİRİŞ

Kodlamayan RNA'ların en büyük sınıfını oluşturan uzun kodlamayan RNA (lncRNA) 200 nükleotidden büyük, açık okuma çerçevesine sahip olmayan, çeşitli mekanizmalar ile gen ekspresyonunu düzenleyen RNA molekülüdür. Çok sayıda fizyolojik ve patolojik süreçlerde transkripsiyonel, post-transkripsiyonel ve epigenetik modifikasyonlar ile gen ekspresyonunu düzenlemektedir. lncRNA'ların büyüme, farklılaşma, embriyogenez, imprinting, anjiyogenez gibi birçok biyolojik süreçte anahtar düzenleyiciler olarak görev aldığı ve lncRNA'larda bulunan düzensizliklerin hücrel süreçleri etkileyerek hastalıkların gelişimi ve ilerlemesine katkı sağladığı gösterilmiştir. lncRNA başlıca araştırma alanlarını KAH, nörolojik hastalıklar, kanser ve çeşitli kompleks hastalıklar oluşturmaktadır. lncRNA ekspresyonunun dokuya özgü tarzda spesifik olması ve çeşitli biyolojik sınırlarda tespit edilebilmeleri, hastalıkların tanısı için uygun bir biyobelirteç ve yeni terapötik hedef olmalarına imkan sağlamaktadır. Bu nedenle günümüzde KAH dahil çeşitli hastalıklarda lncRNA araştırmaları büyük önem kazanmaya başlamıştır.

Aterosklerozis zemininde gelişen Koroner arter hastalığı (KAH) tüm dünyada morbidite ve mortalitenin majör nedenidir. KAH etiyopatogenezinde çok sayıda risk faktörü ve mekanizmanın bulunduğu tespit edilmiştir. KAH gelişiminde ateroskleroz dışında anjiyogenez etkileyen faktörlerinde önemli rol oynadığı bilinmektedir. Güncel araştırmalar lncRNA'ların KAH gelişim süreçlerinde potansiyel rolleri olduğunu göstermektedir. KAH ile ilgili çeşitli kan belirteçleri bulunmasına rağmen tanısal etkileri ve klinik önemlerinin yetersizliği nedeni ile yeni genetik tabanlı biyobelirteçlere ihtiyaç duyulmaktadır. lncRNA'ların KAH dahil birçok hastalığın patogenezine katılmaları ve vücut sıvılarında tespit edilmeleri, yeni ve etkili non-invaziv biyobelirteç adayları ve tedavi hedefi olmalarına imkan sağlamaktadır. Yapılan çalışmalar lncRNA'ların KAH tanısının belirlenmesinde duyarlı ve özgül yeni bir genetik tabanlı biyobelirteç ve etkili bir tedavi hedefi olarak kullanılma potansiyeli olduğunu göstermekte ve bu alanda çalışmalar devam etmektedir.

Sunulan tezde KAH olgularında rolü olabileceği ön görülen aday lncRNA'ların hasta ve kontrol grupları arasında ekspresyon düzeylerinin tespit edilmesi amaçlanmıştır. Çalışmamızda ateroskleroz (*NLRP3*) ve anjiyogenez (*VEGFR2*, *VEGF*, *KLF5*) süreçlerini etkileyen genler ile ilişkileri gösterilmiş lncRNA'ların (*MEG3*, *MALAT1*, *MIAT*, *MCM3AP-AS1*) hasta ve kontrol grupları arasındaki ekspresyon düzeylerinin karşılaştırılması hedeflenmiştir. Bu nedenle Adıyaman ilinde KAH nedeni ile tanı veya tedavi amaçlı koroner anjiyografi yapılan hastalarda önceden belirlediğimiz lncRNA'ların ekspresyon düzeylerinin Gerçek zamanlı – Polimeraz zincir reaksiyonu yöntemi ile ölçülmesi ve hasta ve kontrol grupları arasında lncRNA seviyelerinin istatistiksel olarak karşılaştırılması hedeflenmiştir. Daha önce literatürde kardiyovasküler hastalıklar ile ilişkisi gösterilmiş lncRNA'lar ile ilişkisi gösterilmemiş ancak benzer patofizyolojik yollar ile ilişkisi konfirme edilen aday lncRNA'lar çalışmaya dahil edilmiştir. Belirlenen lncRNA'ların hasta ve kontrol grupları arasındaki değişiminden yola çıkılarak hastalık etiopatogenezi ile ilişkili genetik tabanlı biyobelirteç ve tedaviye yönelik hedef moleküller tanımlamak amaçlanmıştır. Elde edilen sonuçların koroner arter hastalığının erken tanısı, takibi, prognozu ve/veya tedavisinde kullanılabilmesi böylece gelişebilecek komplikasyonların önlenmesi veya mortalitenin azalmasına katkı sağlaması hedeflenmiştir.

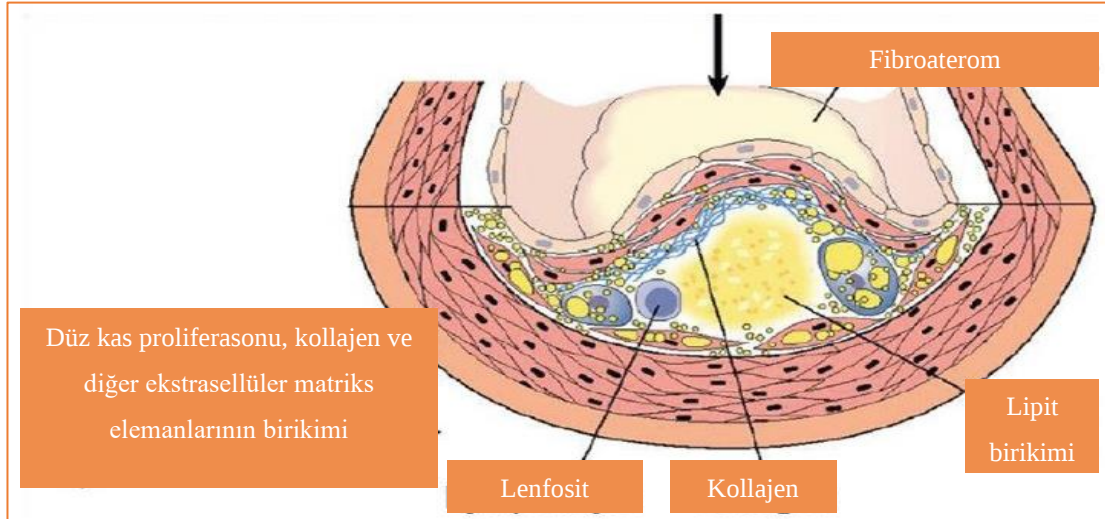
2. GENEL BİLGİLER

2.1. KORONER ARTER HASTALIĞI

2.1.1. Tanım ve Sınıflandırma

Koroner Arter Hastalığı (KAH) ateroskleroz zemininde gelişen aterom plak sonucu kalbi besleyen koroner arterlerin ilerleyici şekilde daralmasıyla karakterize kronik bir hastalıktır.

Ateroskleroz süreci yağlı çizgilenmeler, aterom formasyonu ve aterosklerotik plak formasyonu olarak üçe ayrılır. Aterosklerozun ilk bulgusu olan yağlı çizgilenmeler arter intimasında LDL (düşük yoğunluklu lipoprotein) kolesterolün birikmesi ve okside olması ile intimaya geçen T lenfosit ve monositlerin okside LDL'yi yüklenmesi sonucu oluşur. Bu 'yağlı çizgi' lezyonları genellikle yaşamın ilk dekatında aortada, ikinci dekatta koroner arterlerde, üçüncü ve dördüncü dekatta ise serebral arterlerde gözlenir [1]. Aktive olan endotel hücrelerinin sentezlediği sitokinler, düz kas hücrelerinin damar duvarına göç etmesine ve ekstrasellüler matrix sentezlemeleri sonucu fibröz başlık oluşturmalarına neden olur. Kollajenden zengin fibröz doku, düz kas hücreleri, makrofaj ve T lenfositlerin tamamı olgun aterosklerotik plağı oluşturur ve damarda çıkıntı yaparak kan akımının azalmasına yol açar [2].



Şekil 2.1: Aterom formasyonu [2].

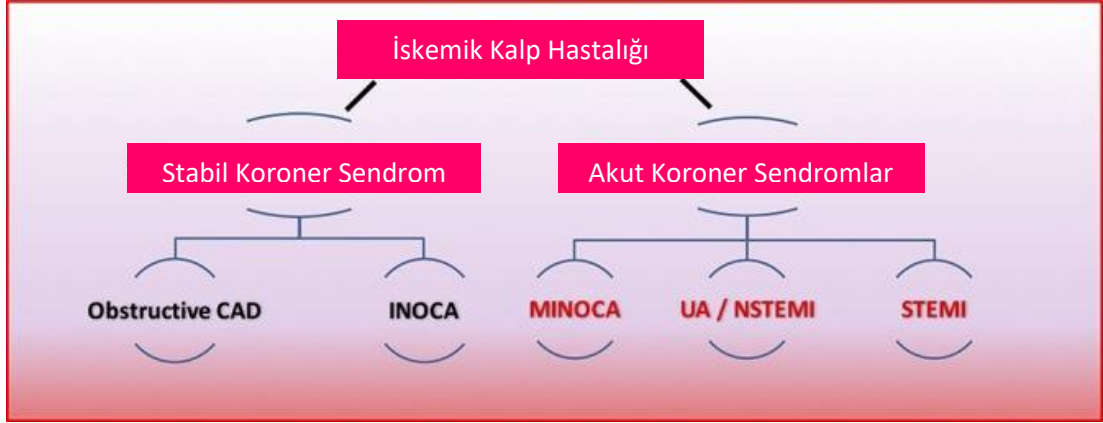
Angiografik olarak KAH obstrüktif ve non-obstrüktif olarak ikiye ayrılmaktadır. Non-obstrüktif KAH, anjinal semptomlara neden olmayan ve en az bir koroner arterde %20'den fazla ancak %70'den az veya sol ana koroner arterde %50'den az daralmayı ifade eder. Ayrıca major koroner arterlerde %20'den fazla ancak %50'den az daralma olarak da tanımlanabilmektedir. Koroner kan akımını anlamlı ölçüde azaltmayan yaygın aterosklerotik plaklarla karakterize olan bu durum anjiyografi yapılan hastaların yaklaşık %10-25'inde gözlenir [3].

Sıklıkla egzersizle ortaya çıkan nefes darlığı, tipik veya atipik göğüs ağrısına neden olan obstrüktif KAH ise sol ana koroner arterde %50'den fazla veya çapı 2 mm'den büyük epikardial arterlerde %70'den fazla darlığını ifade eder. Ancak bu tanım major koroner arterlerde %50'den fazla darlık olarak da genişletilebilmektedir. Obstrüktif KAH, koroner anjiyografi yapılan hastaların %23.8'inde gözlenmektedir [4].

Klinik olarak KAH asemptomatik olabilmektedir. Ancak hastalığın en yaygın belirtisi, genellikle egzersizle ortaya çıkan ve kontrol altına alınabilen kararlı göğüs ağrılarına neden olarak hastaların yaşam kalitesini etkileyen stabil anjina pektoris (AP). Stabil AP'nin koroner arter hastalarının %58'ini etkilediği tahmin edilmektedir [5].

KAH ateroskleroz süreci ile gelişen bir grup hastalığı tanımlar, aynı zamanda İskemik Kalp Hastalığı (İKH) olarak da isimlendirilir ve koroner arterlerde daralmanın neden olduğu kalp problemlerini ifade eder. KAH ve Akut Koroner Sendrom (AKS) terimleri birbirinin yerlerine kullanılsa da aynı değildir.

KAH'ın bir alt grubu olan Akut Koroner Sendromlar, genellikle aterosklerotik bir plağın rüptürü ve trombus oluşumu ile komplike hale gelmesi ve sonrasında gelişen vazokonstriksiyon ile koroner kan akımının ani ve kritik bir şekilde azalması nedeniyle yaşamı tehdit eden bir durumdur. AKS terimi STEMI (ST elevasyonlu MI (miyokard enfarktüsü), ST elevasyonsuz MI ve unstabil anjina pektoris içermektedir.



Şekil 2.2: İskemik Kalp Hastalığına neden olan **KAH** tipleri. **CAD**; Koroner Arter Hastalığı, **INOCA**; İskemi ve Non-obstrüktif Koroner Arter Hastalığı, **MINOCA**; Miyokard İnfarktüsü ile Non-obstrüktif Koroner Arter Hastalığı, **UA/NSTEMI**; Anstabil Angina Pektoris/ST Elevasyonsuz Miyokard İnfarktüsü, **STEMI**; ST Elevasyonlu Miyokard İnfarktüsü [6].

2.1.2 Epidemiyoloji

En yaygın kalp hastalığı formu olan KAH, tüm dünyada olduğu gibi ülkemizde de ölüm nedenleri arasında birinci sırada yer almaktadır. Dünyada ve Türkiye’de yapılan çok sayıda çalışmalar göstermiştir ki Kardiyovasküler Sistem (KVS) hastalıkları ve özellikle iskemik kalp hastalıkları hem klinik sonuçları hem de maliyet açısından en önemli hastalık grubunu oluşturmaktadır.

Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) 2016 yılı verilerine göre global ölümlerin %31’ini oluşturan ve ölüm nedenleri arasında birinci sırada yer alan KVS hastalıkları, her yıl 17.9 milyon insanın ölümüne neden olmaktadır. KVS hastalıklarına bağlı ölümlerin dörtte üçünden fazlası ise düşük ve orta gelirli ülkelerde meydana gelmektedir [7].

Amerikan Kalp Cemiyeti (AHA) 2019 verilerine göre global olarak 153.3 milyon insanın iskemik kalp hastalığına sahip olduğu ve 2030 yılına kadar 23.6 milyondan fazla insanın KVS hastalıkları nedeniyle hayatını kaybedeceği tahmin edilmektedir. Amerika’da her yedi ölümden birinin nedeni olarak koroner kalp hastalığı gösterilmektedir. 20 yaş ve üzeri Amerikan popülasyonunda koroner kalp hastalığı prevalansı %6.7, anjina prevalansı %3.6, MI prevalansı %3 olarak belirlen-

miş ve her kırk saniyede bir MI gerçekleştiği tespit edilmiştir. İnsidans çalışmalarına göre yıllık 720.000 yeni koroner olay ve 335.000 rekürren olay meydana geldiği tahmin edilmektedir. Yılda yaklaşık 605.000 yeni MI, 200.000 rekürren atak ve 170.000 sessiz MI geliştiği kabul edilmektedir [8].

Avrupa Kardiyoloji Cemiyeti (ESC) verilerine göre üye ülkelerde 83.5 milyon insan KVS hastalıklarına sahiptir. İskemik kalp hastalıkları bu olguların 29.4 milyonunu oluşturmakta ve hastalık prevalansının %4.3 olduğu tahmin edilmektedir. Yapılan çalışmalarda 1.7 milyon ölüme neden olan ve tüm ölümlerin %20'sini oluşturan iskemik kalp hastalıklarının, tek başına ölümün en sık nedeni olduğu tespit edilmiştir [9].

Türkiye İstatistik Kurumu (TÜİK)'nin uluslararası hastalıkları sınıflandırma tanı kodları **ICD-10** (International Classification of Disease version 10)'a göre hazırladığı 2018 yılı TÜİK ölüm nedeni istatistiklerinde %38.4 ile dolaşım sistemi hastalıkları birinci sırada yer almıştır. İyi huylu ve kötü huylu tümörlere bağlı ölümler %19,7 iken solunum sistemi hastalıkları ise %12.5 olarak belirlenmiştir. Dolaşım sistemi kaynaklı ölümlerin %39,7'si iskemik kalp hastalığından, %22.4'ü ise serebrovasküler hastalıklardan kaynaklanmıştır. İllere göre ölüm nedenleri incelendiğinde ise dolaşım sistemi hastalıklarına bağlı ölümlerin en yüksek olduğu ilk beş il sırasıyla Çorum (%48), Denizli (%47,2), Adana (%46,7), Çanakkale ve Afyonkarahisar (%46,2) olarak sıralanmıştır [10].

Sağlık Bakanlığı tarafından yapılan Ulusal Hastalık Yüğü Çalışması 2017 çalışmasına göre tüm yaş gruplarında en önemli hastalık yükünü başlıca iskemik kalp hastalıkları oluşturmaktadır. İlk 25 DALY (Disability Adjusted Life Year) kaybı nedeni olarak birinci sırada iskemik kalp hastalığı bulunmaktadır. 2000-2013 döneminde YLL (mortalite yükü)'ye neden olan en önemli hastalık olarak, toplam YLL'nin %14'ünü oluşturan iskemik kalp hastalığı gösterilmiştir [11].

Türk Kardiyoloji Derneği öncülüğünde yapılan TEKHARF (Türk Erişkinlerinde Kalp Hastalığı ve Risk Faktörleri) çalışmasının 2017 verilerine göre Türkiye’de erişkinlerde kalp hastalığı prevalansı %6.7 iken koroner kalp hastalığı prevalansı %3.8’dir. Kalp hastalığı prevalansı kadınlarda %7.3 erkeklerde ise % %6.2 olarak tespit edilmiştir. Koroner kalp hastalıklarına bağlı ölüm oranı %43 olarak belirlenmiş ve başlıca ölüm nedeni olduğu kabul edilmiştir. 2012 yılında ülkemizde toplam 420.000 koroner olayın 120.000’i rekürren olay, 180.000’i yeni akut koroner sendrom ve 120.000’i sessiz MI olarak tespit edilmiştir. Yılda 300 bin yeni ve yeniden koroner olay sonucu gelişen yıllık yaklaşık 95 bin ölüm, ani kalp krizi ve akut koroner sendrom nedeniyle bir yıllık mortalite %32 olarak belirlenmektedir. Bölgesel olarak bakıldığında ise ülkemizde kalp hastalığı Karadeniz ve Marmara bölgelerinde en yüksek oranlarda, Akdeniz ve İç Anadolu bölgelerinde ise en düşük oranlarda saptanmıştır. Yaş ayarlı koroner hastalık gelişmesi Akdeniz bölgesindeki erkekler ile Güneydoğu’lu kadınlarda anlamlı olarak yüksek bulunmuştur [12].

Türkiye Halk Sağlığı Kurumu tarafından yapılan Türkiye Kronik Hastalıklar ve Risk Faktörleri Sıklığı Çalışması 2013 verilerine göre Türkiye’de erkeklerin %6.4, kadınların %9.8’inde öykü ve Rose anketine göre AP varlığı tespit edilmiştir. Akut MI öyküsü erkeklerde %2,3 kadınlarda %1,1’dir. Beyana dayalı doktor tarafından tanı konulmuş koroner kalp hastalığı sıklığı erkeklerde %3,8 kadınlarda %2.3’tür. erkeklerde koroner kalp hastalığının en sık olduğu bölge %7.5 ile Batı Anadolu, kadınlarda ise Batı Karadeniz ve Orta Anadolu bölgeleri olduğu tespit edilmiştir [13].

KVS hastalıklarının en önemli belirleyicileri toplumsal, ekonomik ve kültürel değişimler sonucu oluşan kentleşme ve nüfusun yaşlanmasıdır. Bununla birlikte stres, yoksulluk ve kalıtsal faktörlerde önemlidir. KVS hastalıkları nedeniyle gerçekleşen ölüm oranları gelişmiş ülkelerde azalmakta iken gelişmekte olan ülkelere ise artmaktadır. Ancak beklenen yaşam süresinde uzama ile nüfusun yaşlanması sonucu gelişmiş ülkelere de kalp ve damar hastalığı sayısı artmakta ve hastalık yükü azalmamaktadır. Bu nedenle KAH ve AKS halen tüm dünyada önemini korumaya devam etmektedir.

2.1.3. Etiyoloji

KAH patofizyolojisinde başlıca ateroskleroz süreci olmakla birlikte çevresel faktörler ve genetik yapının da bu kompleks sürece katkıda bulunduğu bilinmektedir. Geçmişten bugüne kadar yapılan çok sayıda çalışmada KAH gelişimde oldukça fazla sayıda risk faktörü ve mekanizmanın bulunduğu tespit edilmiştir. Geleneksel ve yeni tanımlanan risk faktörlerinin yanı sıra genetik temelli çalışmalarda dahil edilerek KAH etiopatogenezinin değerlendirilmesi gerekmektedir.

2.1.3.1. Risk Faktörleri

KAH ile ilişkili risk faktörleri ilk olarak 1948 yılında Framingham Kalp Çalışması ile belirlenmiştir. KAH için bağımsız risk faktörü olan DM kadınlarda iki, erkeklerde dört kat risk artışına neden olmaktadır. TEKHARF çalışması ülkemizde en yaygın risk faktörünün sigara olduğunu ve riski üç kat artırdığını göstermiştir. Erkeklerde 55, kadınlarda 45 yaş üzerinde KAH riski artmaktadır. HT ise riski 2-3 kat artırdığı gösterilmiştir [14]. DSÖ verilerine göre KAH ve inme ile ilişkili 300'den fazla risk faktörü bulunmaktadır. Başlıca risk faktörü kriterleri: tüm toplumlarda sık görülmesi, bağımsız olarak hastalığa etkili olması ve tedavi ile veya kontrol altına alındığında hastalık riskini azaltması olarak tanımlanmıştır [15]. KAH gelişiminde başlıca rol oynayan geleneksel risk faktörleri Tablo 2.1'de gösterilmektedir.

Aile öyküsü KAH gelişimi için değiştirilemeyen risk faktörlerinden biridir. Prematür kardiyovasküler hastalıklar için aile öyküsü pozitif olanlarda risk artışı kadınlarda 1.7 kat, erkeklerde 2 kat olarak tahmin edilmektedir. [16]. Çokuluslu INTERHEART vaka-kontrol çalışmasına 12149 hasta ve 14467 kontrol katılmıştır ve mevcut çalışmada MI riski ile aile öyküsü arasındaki ilişki incelenmiştir. Araştırma sonucuna göre tek ebeveynde 50 yaşından sonra öykü olduğunda risk 1.67 iken tek ebeveynde 50 yaş öncesi öykü varsa risk 2.36'ya yükselmektedir. İki ebeveynde 50 yaşından sonra öykü varsa risk 2.90 iken iki ebeveynde öykü olmakla birlikte biri 50 yaşından önce ise risk 3.26'ya yükselmektedir. Her iki ebeveynde 50 yaş öncesi öykü varlığında ise riskin 6.56'ya yükseldiği gösterilmiştir [17].

Tablo 2.1: Koroner Arter Hastalığı Geleneksel Risk Faktörleri

Geleneksel Risk Faktörleri		
Değiştirilemeyen Risk Faktörleri	Başlıca Risk Faktörleri	İkincil Risk Faktörleri
İleri yaş (erkek >55 yaş, kadın>45 yaş)	Yüksek kan basıncı	Düşük sosyoekonomik düzey
Aile öyküsü	Anormal kan lipidleri (Total kolesterol, LDL ve trigliserit yüksekliği, HDL düşüklüğü)	Mental sağlık (depresyon artışı risk faktörü)
Cinsiyet (erkeklerde sık)	Sigara kullanımı	Psikososyal stres (A tipi kişilik)
Etnik yapı	Fiziksel inaktivite	Alkol kullanımı
	Obezite	Lipoprotein (a) yüksekliği
	Diabetes mellitus	Sol ventrikül hipertrofisi
	Sağlıksız beslenme (yüksek sature yağ tüketimi, azalmış sebze, meyve tüketimi)	Bazı tedavilerin kullanımı (oral kontraseptif/ hormon replasman terapisi)

KAH risk faktörlerinin birçoğu değiştirilebilir faktörlerdir ve tedavi ile kontrol altına alınabilmektedir. DSÖ verilerine göre Amerika ve birçok batı ülkesinde KAH'a bağlı ölümler önleme çalışmaları, tanı ve tedavi sayesinde azaltılmıştır. Bu başarı majör risk faktörleri olan sigara içiminin azalması, yüksek kan basıncının düşürülmesi ve serum kolesterol düzeyinin azaltılması ile sağlanmıştır. Birçok kılavuz, KVS hastalıkları için risk faktörlerine sahip asemptomatik kişilerin taranması ve tanımlanması gerektiğini önermektedir. Böylece KAH 'a bağlı ilk klinik olay veya tekrarlayıcı klinik olayların gelişimi ile hastalığa bağlı erken ölümlerin önüne geçilmekte ve yaşam süresi uzatılmaktadır.

Son 20 yılda kalp ve damar hastalıklarından kaynaklanan mortalite yüksek gelir düzeyindeki ülkelerde azalmaktadır. İngiltere'de 1981'den 2000 yılına kadar koroner kalp hastalığı riskinde belirgin bir düşüş olmuştur. Bu azalmanın %42'si tedavi ile ilişkilidir (%11'i ikincil önleme, %13 kalp yetmezliği tedavisi, %8 akut MI başlangıç tedavisi, %3 HT tedavisi). Geri kalan %58'lik düşüş tüm nüfusu kapsayan risk faktörlerini azaltmaya yönelik çalışmalar ile ilişkilendirilmiştir [18].

Yapılan çalışmalarda KAH gelişiminde birçok yeni faktörün rol oynadığı bildirilmektedir. KAH gelişimi ile ilişkili olduğu bildirilen bazı yeni risk faktörleri aşağıdaki tabloda gösterilmiştir.

Tablo 2.2: Koroner Arter Hastalığı Yeni Risk Faktörleri

Yeni Risk Faktörleri
Yüksek homosistein düzeyi
CRP yüksekliği
Enfeksiyon varlığı
Koagülasyon bozuklukları, tromboz durumları
Natriüretik peptitler (BNP ve pro-BNP yüksekliği)
Renal yetmezlik
İnflamasyon ve oksidatif stres

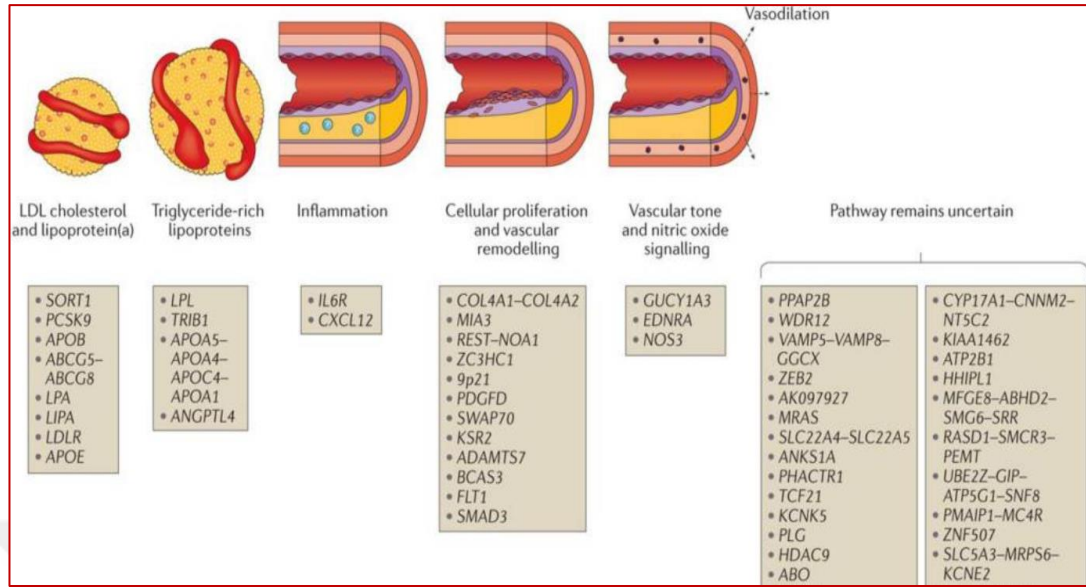
2.1.4. Genetik Nedenler

KAH genetik ve çevresel faktörlerin birlikte etkileşimi sonucu gelişen oldukça kompleks multifaktöriyel bir hastalıktır. Genom çapında ilişkilendirme çalışmaları (GWAS)’nda şimdiye kadar KAH riskini etkileyen 164’den fazla lokus tespit edilmiştir [19]. Yapılan çok sayıda çalışmalar KAH riskinin kalıtsal olduğunu göstermiştir. Ölümcül KAH için yakın akrabalarda riskin %50 olduğu tahmin edilmektedir. Genom çapında ilişkilendirme çalışmalarında da benzer şekilde KAH için kalıtım riski %40-50 olarak tahmin edilmiştir [20].

Ailesel Hiperkolesterolemi (AH) LDL kolesterol yüksekliği ile seyreden ve erken yaşta KAH gelişimine neden olan tek gen hastalıklarının en önemli grubudur. Plazmada artan kolesterol prematur ateroskleroza neden olarak KAH ve inme riskini artırmaktadır. AH ile ilişkili 4 gen tanımlanmıştır. Hastalığın en sık nedeni, LDL’nin hücre yüzeyine bağlanarak hücre içine kolesterol taşınımını sağlayan reseptör proteinini kodlayan *LDLR* (low density lipoprotein receptor) genindeki fonksiyon kaybettiren mutasyonlardır. Hastalığın otozomal semidominant kalıtım göstermesi nedeniyle *LDLR* gen dozajı önemlidir. Klinik bulgular homozigotlarda daha erken

yaşıta ortaya çıkmakta ve daha ciddi sonuçlara neden olmaktadır. Homozigot hastalarda KAH kliniği çocuklukta ortaya çıkmakta ve tedavi edilmezse üçüncü dekattan önce ölüm gerçekleşmektedir. Heterozigotlarda ise plazma kolesterol düzeyi kontrollere göre iki kat yüksek olmakla birlikte toplum sıklığı 500’de 1’dir. *LDLR* gen mutasyonları KAH riskini 4 kat artırmakta ve erken başlangıçlı KAH hastalarının %2’sini oluşturmaktadır. Genel popülasyonda plazma kolesterolü yüksek kişilerin %5’inde AH tanısı mevcuttur. Bu nedenle erken yaşıta MI gelişen ve kolesterol yüksekliği bulunan hastaların AH açısından araştırılması gerekmektedir. AH kliniğine daha nadir olarak *PCSK9* geninde fonksiyon kazandıran mutasyonlar, *APOB* geninde fonksiyon kaybettiren mutasyonlar ve otozomal resesif kalıtım gösteren *ARH* genindeki fonksiyon kaybettiren mutasyonlar da neden olmaktadır. Hastaların %15’inde ise genetik neden bilinmemektedir [21].

Poligenik bir hastalık olan KAH patofizyolojisinde çok sayıda gen ve çevresel faktörlerin birlikte rol oynadığı birçok yolak vardır. KAH tablosu oksidatif stres, folat-homosistein metabolizması, tromboz ve fibrinolitik sistemleri düzenleyen genlerin ortak etkisi ile ortaya çıkan lipit bozuklukları, endotelyal disfonksiyon, arteriyel inflamasyon, koagülasyon bozuklukları ve tromboz sonucunda ateroskleroz gelişimi ile oluşmaktadır [22]. KAH’ın genetik etiyolojisini aydınlatmak için tüm bu süreçlerle ilişkili olarak genom çapında ilişkilendirme çalışmaları ile yeni genetik yatkınlık nedenleri bulunmakta ve yeni lokuslar araştırılmaya devam etmektedir. Yaygın varyant ilişkilendirme çalışmaları (CVAS)’na göre 9p21 lokusundaki riskli allellerin her bir kopyası için KAH riskinin %30 arttığı tespit edilmiştir. 9p21 lokusu, popülasyona atfedilen en yüksek risk olması nedeniyle son derece önemlidir. Çalışmalar 9p21 varyantlarının kodlamayan RNA *ANRIL* (*Antisense noncoding RNA in the INK4 locus*)’ın ekspresyonunu değiştirdiğini, böylece hücre siklus regülasyonu ve proliferasyonu ile ilişkili iki siklin bağımlı kinaz inhibitörü olan *CDKN2A* ve *CDKN2B*’nin aktivitesinin değiştiği gösterilmiştir [20]. Çeşitli patofizyolojik süreçler ile ilişkili olarak KAH gelişiminde rol oynadığı bildirilen başlıca genler aşağıdaki şekilde gösterilmiştir.



Şekil: 2.3: Aterosklerozde genetik varyasyon ve patofizyolojik yollar [20].

Epigenetik; DNA dizisinde değişiklik olmaksızın gen ekspresyonunda değişimler olarak tanımlanmaktadır. Epigenetik faktörlerin diyet, çevre, yaşam tarzı gibi dış etkiler ile KVS hastalıklarına katkıda bulunduğu bildirilmiştir. Vasküler sistemin epigenetik mekanizmalar ile düzenlendiği gösterilmiştir. Çalışmalar epigenetik belirteçlerin damar gelişimi, endotel ve düz kas hücre farklılaşmasında önemli rolleri olduğunu göstermiştir. En iyi bilinen epigenetik mekanizmalar DNA metilasyonu, histon modifikasyonu, miRNA (micro RNA)'lar ve LncRNA (long non coding RNA)'lardır. LncRNA'ların ateroskleroz, hipertansiyon, vasküler retinopatiler ve tümör anjiyogenezi gibi vasküler hastalıklardaki etkileri olduğu bilinmektedir. LncRNA'ların epigenetik düzenleyici olarak önemli fonksiyonları olduğu ve KVS hastalıklarında rol oynayabileceği gösterilmiştir [22]. LncRNA'lar kromatin yeniden modelleme veya protein translasyonunu düzenleyerek farklı biyolojik süreçlerde çeşitli işlevlere sahiptirler ve gen ekspresyonunu epigenetik modifikasyonlar, alternatif kırılma, mRNA stabilitesi ve translasyonu gibi posttranskripsiyonel çeşitli mekanizmalarla düzenlemektedirler. Ayrıca proliferasyon, migrasyon, apoptoz ve gelişim gibi çeşitli hücresel olaylarda anahtar rol oynamaktadırlar. Yapılan çalışmalar LncRNA'ların ateroskleroz ile ilişkili olarak endotel hücreleri, damar düz kas hücreleri,

makrofajlar ve lipid metabolizmasının düzenlenmesinde yer aldığını ve KAH gelişiminde potansiyel rolleri olduğunu göstermektedir [23].

Yeni damar oluşumu şeklinde tanımlanan anjiogenez fizyolojik ve patolojik olaylara cevap olarak gelişmektedir. Anormal anjiyogenez kanser, ateroskleroz, hipertansiyon ve iskemik kalp hastalığı gibi çeşitli patolojik durumlar ile ilişkilidir. Güncel çalışmalar lncRNA'ların anjiogenez ve vasküler hastalıklarda önemli rolü olduğunu göstermiştir. Yapılan çalışmalarda *MALAT1* (Metastasis-associated lung adenocarcinoma transcript 1), *MANTIS*, *PUNISHER*, *MEG3* (Maternally expressed gene 3) ve *MIAT* (Myocardial infarction associated transcript) in vivo anjiogenezin önemli düzenleyicileri olarak gösterilmiş ve Angio-LncRNA (Anjiyogenez ve vasküler hastalığı düzenleyen LncRNA'lar) olarak isimlendirilmişlerdir [24].

LncRNA ekspresyonunun doku ve hastalığa spesifik olması, hem iyi bir biyo-belirteç hem de terapötik hedefler olmalarını sağlamaktadır. Tanımlanmış risk faktörleri ve yaşam tarzı değişikliklerine ek olarak, KAH etiopatogenezini oluşturan çeşitli patolojik yollarda ki genetik nedenlerin ortaya çıkarılması ile yeni gen terapilerinin geliştirilerek hastalığın önlenmesine katkı sağlanması beklenmektedir.

2.1.5. Tanı

2013 ESC Kararlı Koroner Arter Hastalığı Yönetimi Klavuzuna göre KAH tanı ve değerlendirmesi; belirgin dislipidemi, hiperglisemi veya diğer biyokimyasal risk faktörlerinin belirlenmesi ve stres testi veya koroner görüntüleme gibi özgül kardiyak incelemeleri kapsayan klinik değerlendirmeyi içerir. Miyokard iskemisi ile ilişkili AP özellikleri; ağrının yerleşimi, karakteri, süresi ve eforla veya diğer artırıcı veya rahatlatıcı faktörler ile ilişkisine göre dört kategoride incelenir. AP genellikle göğüste, sternum yanında hissedilir ancak epigastrium, çene altı ve her iki kola kadar yayılabilir. Sıkıntı hissi genellikle 10 dakikadan uzun sürmeyen sıklıkla baskı, daralma veya ağırlık şeklinde olmakla birlikte egzersiz ve duygusal stres ile ilişkilidir. Herhangi bir teste karar vermeden önce, hastanın genel sağlığı, eşlik eden hastalıkları ve YK (yaşam kalitesi) değerlendirilmelidir.

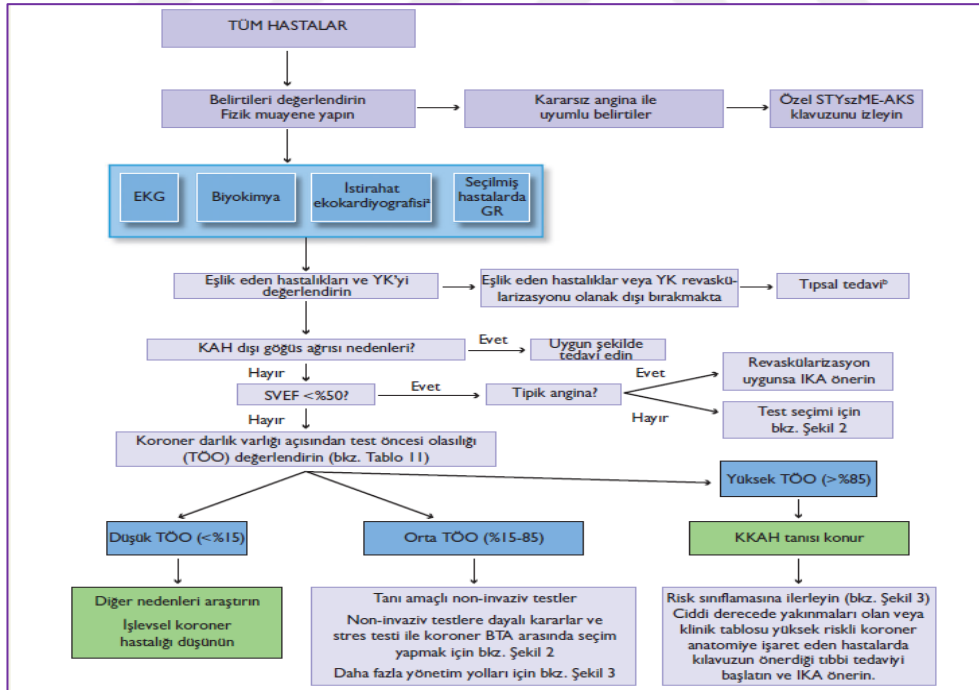
KAH'dan şüphelenilen hastalara tam kan sayımı, açlık plazma glikozu, HbA1C, tiroid hormon düzeyleri, lipit profili, böbrek fonksiyon testleri ve KAH klinik şüphesi varsa troponin T veya troponin I gibi temel biyokimyasal testler yapılmalıdır. KAH şüphesi olan tüm hastaların 12 derivasyonlu istirahat EKG (elektrokardiyografi)'sıkaydedilmelidir. İstirahat EKG'sinin normal olması iskemi tanısını dışlamaz ancak anormal repolarizasyon paternleri gibi KAH belirtilerini gösterebilir. Ayrıca göğüs ağrısı sırasında ve hemen sonrasında çekilen EKG her zaman yararlıdır. İstirahat ekokardiyografi (EKO) ve Doppler transtorasik EKO ile bölgesel duvar anomalilerinin tespiti KAH olasılığını artırır. Karotis USG (ultrasonografi) ile aterosklerotik plakların tespiti KAH şüphesini desteklemektedir.

Non-invaziv testlerin tanı amaçlı değerlendirilmesi için Bayes yaklaşımı gereklidir. Bu yaklaşım bir hasta için bireyselleştirilmiş test sonrası hastalık olasılığını oluşturmak için klinisyenin test öncesi hastalık tahminlerini TÖO [test öncesi olasılık] kullanmaktadır. TÖO hem hastalığın yaygınlığından hem de hastanın klinik özelliklerinden (KAH risk faktörleri) etkilenir. TÖO temel belirleyicileri yaş, cinsiyet ve belirtilerin şeklidir. Çalışma grubu TÖO <%15 olan hastalara test yapılmamasını önermektedir. TÖO (%15-85) olan hastalara ek tanısal testlerin yapılması önerilmektedir. TÖO > %85 olan hastalara non-invaziv testler yapılmaksızın doğrudan İKA (invaziv koroner anjiyografi) yapılması önerilmektedir. KAH için non-invaziv görüntüleme testlerinin %85 duyarlılık ve özgüllükleri vardır. Düşük sol ventrikül ejeksiyon fraksiyonu ve tipik anjinası olan hastalar yüksek kardiyovasküler olay riskine sahiptir ve direkt olarak İKA yapılması önerilmektedir.

İskemi tanısında kullanılan stres testlerinden olan Egzersiz EKG testi 12 derivasyonlu EKG izlemi ile yapılan koşu bandı testidir ve TÖO %15-65 arasında ve KAH'dan şüphelenilen hastalar için uygun bir test olarak değerlendirilmektedir. Pozitif test ölçütü olarak ST-segment çökmesinin 0.1 mV (milivolt) veya 1 mm olması kullanılmaktadır. Uygun seçilmiş hastalarda koroner BTA (bilgisayarlı tomografi anjiyografi) başka bir seçenektir. Miyokard perfüzyon sintigrafisi Teknesyum-99m radyofarmasötiki kullanılarak koşu bandı egzersiz testi ile yapılan tek foton emisyonlu bilgisayarlı tomografide (SPECT) sık kullanılır ve bölgesel kan akımını yansıtan

işaretleyici tutulumu görüntülenir. Bu teknikte geçici iskemik dilatasyon ve stres sonrası ejeksiyon fraksiyonunun (EF) azalması ciddi KAH için önemli bulgulardır. Stres Kardiyak manyetik rezonans testi iskeminin tetiklediği duvar hareket bozukluklarının tanısında kullanılan stres görüntüleme testlerindendir.

Koroner anatomiye değerlendiren non-invaziv teknikler bilgisayarlı tomografi (BT), koroner BTA, manyetik rezonans koroner anjiyografidir. Non invaziv testler büyük oranda KAH tanısını belirleyebildikleri için İKA nadiren gerekli olmaktadır. Stres görüntüleme teknikleri uygulanamayan, düşük EF'ye sahip hastalar ve yüksek TÖO ve ciddi semptomları olan veya yüksek riski düşündüren klinik özellikleri olan hastalarda erken dönemde direkt İKA yapmak, revaskülarizasyon potansiyeli olan lezyonları belirlemek için uygun olduğu belirtilmektedir. İnvaziv girişimleri reddeden, revaskülarizasyonu istemeyen, perkutan koroner girişim (PKG) veya koroner arter bypass girişimi (KABG) adayı olmayan veya revaskülarizasyonun fonksiyonel kapasiteyi veya yaşam kalitesini artırması beklenmeyen anjinalı hastalara İKA uygulanmaması önerilmektedir [25].



Şekil 2.4: Kararlı Koroner Arter Hastalığı şüpheli hastalara tanısal değerlendirme[25].

2.1.6. Biyobelirteçler

Çeşitli yayınlarda kardiyak biyobelirteçlerin KAH'lı bireyler için tanı ve prognoz açısından önemli potansiyelleri olduğu belirtilmektedir. İskemik kalp hastalarında dolaşımdaki biyobelirteçler miyokard hasarı, miyokard yeniden şekillenmesi, metabolik durum, vasküler enflamasyon ve oksidatif stres dahil farklı patofizyolojik süreçleri yansıtmaktadır.

Kardiyak troponin I (cTnI) ve kardiyak troponin T (cTnT) iskemik hasarın tanısında standart biyokimyasal testler haline gelmiştir. Kardiyak natriüretik peptidler ise miyokard stresinin standart biyobelirteçleridir. Miyokard iskemisi kardiyak natriüretik peptidlerin salınımına neden olmaktadır. Ayrıca bu peptidlerin konsantrasyonları iskemik bölgenin büyüklüğü ile ilişkilendirilmektedir. BNP (B-tipi natriüretik peptid) ve prohormon B-tipi natriüretik peptidin N-terminal kısmı (NT-proBNP) AKS'li hastalarda mortalite ile ilişkili güçlü prognostik bilgi sağlamaktadır. İnflamatuvar biyobelirteçlerden C-reaktif protein (CRP) yüksek plak yükü ile ilişkilendirilmiştir. Sekretuar fosfolipaz A2'nin (PLA2) makrofaj köpük hücre oluşumunu ve aterosklerotik lezyon boyutunu artırdığı ve iskemik kalp hastalığında prognostik değeri olduğu gösterilmiştir. Transforme büyüme faktörü (TGF) üyesi GDF-15 doku hasarının ardından enflamatuvar ve apoptotik sürece katılmakta ve oksidatif stres işareti olarak düşünülmektedir. GDF-15'in koroner kalp hastalığı mortalite tahmini için prognostik olduğu belirtilmektedir. Ancak tüm bu sonuçlara rağmen ESC son kılavuzu bu biyobelirteçlerin rutin kullanımını önermemektedir [26].

KAH erken tanısı için duyarlılığı ve özgüllüğü yüksek yeni biyobelirteçlerin keşfedilmesi gerekmektedir. Güncel çalışmalarda lncRNA'lar KAH ile ilişkili potansiyel genetik tabanlı biyobelirteçler olarak ilgi çekmektedir. Mikroarray temelli araştırmalarda KAH'lı hastaların plazmalarında CoroMarker (lncRNA AC100865.1) olarak isimlendirilen bir lncRNA bu hastalık için stabil, oldukça duyarlı ve özgül bir biyobelirteç olarak tespit edilmiştir. KAH erken tanısı, prognozu ve tedavisine yönelik lncRNA'lar ile ilgili çalışmalar halen devam etmektedir [27]

Miyokard hasarı	Miyokard Stres/Remodelling	Enflamatuar	Renal Belirteçler	Metabolik Belirteçler
hs-cTnI	BNP	hsCRP	Serum kreatinin	Homosistein
hs-cTnT	NT-proBNP	Lökosit sayısı	Serum cystatin-C	Adiponektin
	proANP	sST2	FGF-23	Lipoprotein (a)
	proADM	Neopterin		
	sST2	Lp-PLA2		
	GDF-15	(PAPP)A		
	Copeptin	IL-6		
	Pro-endothelin 1	Myeloperoksidaz		
		Pentraxin 3		

Tablo 2.3: KAH ile ilişkili seçilmiş biyobelirteçler [26].

2.2. UZUN KODLAMAYAN RNA (LncRNA)

2.2.1. Tanım, Tarihçe, Sınıflandırma ve Terminoloji

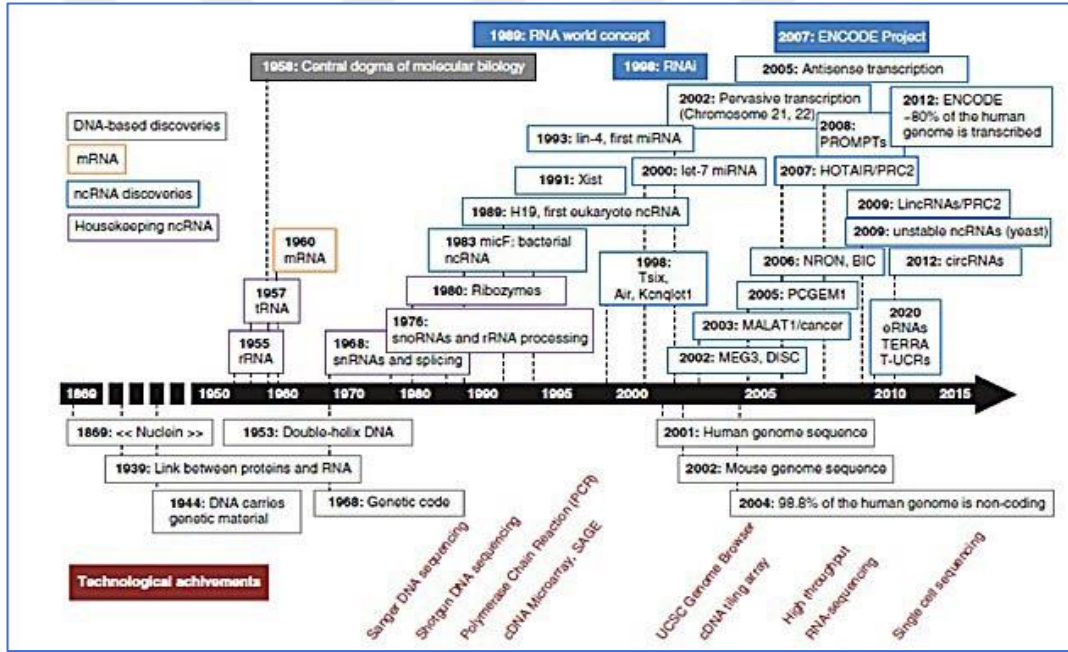
1990'lı yıllarda insan genom dizilemesinin başlangıcında beklenenden çok fazla sayıda transkript olduğu bildirilmiştir. Genomun %80'inin aktif olarak transkribe edildiği ancak kodlayıcı genlerin genomun %2'sinden daha az olduğu ve büyük kısmını kodlayıcı olmayan RNA genlerinin oluşturduğu tespit edilmiştir. Uzun süre sayıları oldukça fazla olan kodlamayan transkriptler 'junk/çöp' DNA veya transkripsiyonel gürültü olarak düşünülerek dikkate alınmamıştır. Fakat kodlamayan transkriptlerin önemli bir kısmının fonksiyonel olarak aktif RNA molekülleri olduğu gösterilmiştir. Kodlamayan genlerin sayısı türler arasında değişken olmakla birlikte bu genlerin fazlalığı organizmanın kompleksliği ile ilişkilendirilmekte ve bu durum ncRNA (non-coding RNA)'ların önemini göstermektedir [28, 29].

lncRNA'lar 200 nükleotidden uzun, açık okuma çerçevesine sahip olmayan bunun yanı sıra DNA, mRNA, protein ve miRNA ile etkileşerek çeşitli mekanizmalar ile epigenetik, transkripsiyonel, post transkripsiyonel ve translasyonel düzeyde gen ekspresyonunu düzenleyen moleküllerdir [30]. lncRNA dizileri protein kodlayan genlerin intronik veya intergenik bölgelerinde bulunabilmekte ve çoğunlukla RNA polimeraz II aracılığı ile sentezlenmektedir. Bazı lncRNA'lar mRNA'ya benzer şekilde alternatif kırılma, poliadenilasyon ve 5' şapka formasyonu göstermektedir. lncRNA'lar düzenleyici rollerine göre sinyal, tuzak, rehber ve iskele olarak fonksiyon görmektedir. lncRNA'ların transkripsiyon ve sonrası seviyelerde gen ekspresyonunun düzenleyici mekanizmalarında yer alarak, birçok biyolojik süreçte housekeeping fonksiyonları yerine getirdiği bildirilmiştir [31].

1980'lerde bilim insanları tarafından doku spesifik genleri ve ekspresyon paternlerini belirlemek için cDNA (complementary DNA) kütüphanelerinin görüntülenmesinde farklı hibridizasyon yöntemleri kullanılmıştır. Amaç kodlayıcı genler iken sonrasında RNA'nın kodlayıcı potansiyeline bakılmaksızın bir yaklaşım benimsenmiş ve böylece o zamanlar mRNA olarak sınıflandırılan ve ilk ökaryotik lncRNA olan *H19* 1989 yılında keşfedilmiştir. *H19* ekspresyonunun transgenik farelerde prenatal dönemde ölümcül olduğu gösterilmiştir. Böylece *H19* dozajının sıkı

bir şekilde kontrol edildiği ve embriyonik dönemde önemli olduğu bildirilmiştir [32].

X kromozom inaktivasyonu (XKİ) iki X kromozomuna sahip olan dişilerde bir X kromozomunun, gelişimin erken döneminde X inaktivasyon merkezi (Xic) olarak adlandırılan bir lokus aracılığı ile inaktive edilmesidir. 1990'ların başında bu lokusun *Xist* (X inactivation specific transcript) isimli bir uzun kodlamayan RNA eksprese ettiği keşfedilmiştir. Rastgele XKİ'ni başlatmak için inaktive olacak X (Xi) kromozomundan mono allelik bir yol ile *Xist* ekspresyonunun aktive edildiği ve *Xist*'in Xi üzerine yayılarak cis pozisyonunda gen susturmayı başlattığı tespit edilmiştir. *H19* ve *Xist* ile ilgili bu öncü çalışmalar, lncRNA'ların biyolojik anlamları ile ilişkili olarak protein kodlamayan genlerin fonksiyonları hakkında bilim insanlarının bakış açısını kökten değiştirmiştir. Bu nedenle lncRNA'ları tanımlama ve karakterize etmek için 2000'li yıllarda küresel bir çalışma başlamıştır [32].



Şekil 2.5: Ökaryotik ncRNA keşiflerinin tarihsel şeması [32].

Çeşitli epigenetik mekanizmalar ile gen ekspresyonu kontrol edilmektedir. DNA metilasyonu ve histon modifikasyonları gibi kovalent modifikasyonların aksine lncRNA'lar, mRNA degradasyonu ve kromatin yeniden düzenlenmesinde rol oynadıkları için nükleozom yeniden düzenlenmesinin en önemli kovalent olmayan epigenetik modifikasyonlarıdır [33].

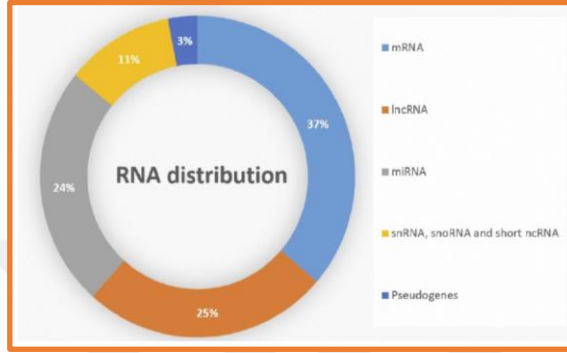
Bilinen ncRNA'ların çoğu hücrel farklılaşma, dozaj kompanzasyonu, genomik imprinting gibi biyolojik süreçlerde önemli bir role sahip olmakla birlikte kanser, Alzheimer hastalığı ve kardiyovasküler hastalık gibi çok sayıda kompleks hastalık ile güçlü bir şekilde ilişkilidir. Hastalık ile ilişkili tek nükleotid polimorfizimlerinin (SNP) %90'dan fazlasının genomun kodlamayan bölgelerinde veya kodlamayan RNA genlerinde bulunduğu bildirilmiştir. Bu nedenle hastalıkların altta yatan nedenlerini anlamak, daha iyi sağlık sonuçları ve daha etkili tedaviler geliştirmek için ncRNA türlerini ayırt etmek gereklidir [34, 35].

Genomda predominant olarak bulunan ncRNA'lar başlıca housekeeping ve düzenleyici ncRNA'lar olarak sınıflandırılır. Housekeeping ncRNA'lar sürekli eksprese edilir ve birçok hücrel süreçte anahtar düzenleyiciler olarak fonksiyon görmektedir. Bu grup ribozomal RNA (rRNA), transfer RNA (tRNA), small nuclear RNA (snRNA) ve small nucleolar RNA'yı (snoRNA) içermektedir [36].

Tablo 2.4: Başlıca ncRNA türleri ve işlevleri

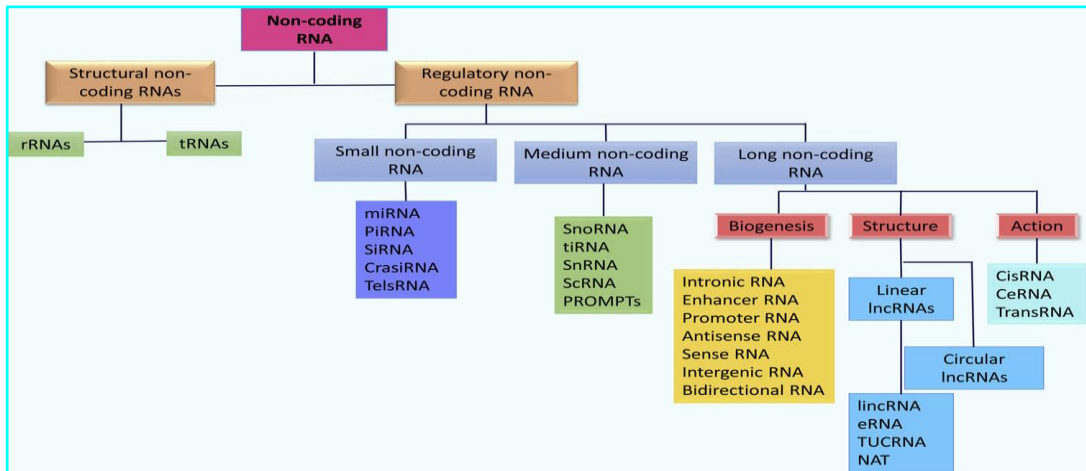
RNA Türü	İşlev
tRNA (Taşıyıcı RNA)	Protein sentezi için amino asit taşıyıcısı
rRNA (Ribozomal RNA)	Ribozomun yapısını oluşturur
snRNA (Küçük nükleer RNA)	mRNA splicing ile ilişkili
miRNA (Mikro RNA)	Hücrel homeostaz ve hastalıklarla ilişkili gen regülasyonu
piRNA (Piwi ilişkili RNA)	Transpozon kontrolü ve erkek germline genomik stabilite korunumu
siRNA (Küçük sessizleştirici RNA)	Transpozon kontrolü ve dişi germline genomik stabilite korunumu
snoRNA (Küçük nükleolar RNA)	rRNA'nın kimyasal modifikasyonu için temel rol oynar
circRNA (Sirküler RNA)	miRNA baskılanması
lncRNA (Uzun kodlamayan RNA)	Gelişim, farklılaşma ve çeşitli hastalıklar için kritik gen ekspresyon düzenleyicisi
lincRNA (Uzun intergenik kodlama yapmayan RNA)	Kromatin remodelling aracılığıyla transkripsiyon regülasyonu sağlar
tasiRNA (Trans-etken küçük sessizleştirici RNA)	Trans etkili mRNA regülasyonu aracılığıyla gen düzenlenmesi
tiRNA (tRNA derive stres ile uyarılmış RNA)	Stres durumlarında protein sentezi gibi hücrel süreçleri düzenler
tmRNA (Transfer-mesajcı RNA)	Takılı kalan ribozomların düzeltilmesi

Regülatuar ncRNA'lar küçük, orta ve uzun ncRNA olarak üç sınıfa ayrılmaktadır. Kısa ncRNA'lar 20-50 nt uzunlukta miRNA, siRNA, piRNA'yı içermektedir. Orta ncRNA'lar 50-200 nt uzunlukta ve uzun ncRNA'lar ise 200 nükleotidden büyük ve maksimum düzenleyici potansiye sahip geniş bir RNA sınıfıdır [31]. lncRNA'lar insan hücrelerindeki toplam RNA'ların yaklaşık %25'ini oluşturmaktadır (Şekil 2.3) [37].



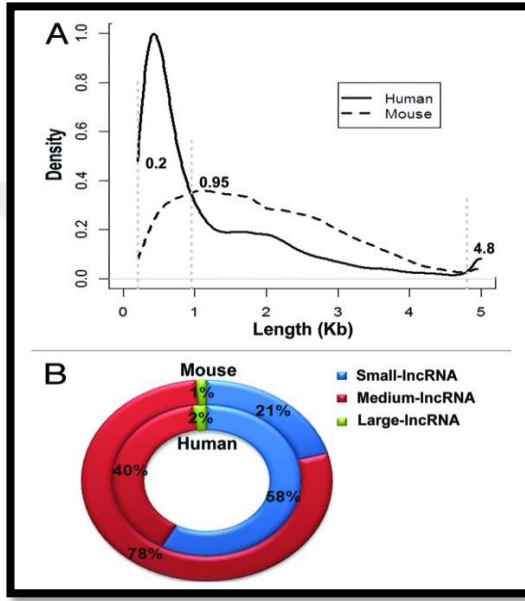
Şekil 2.6: İnsan genomunda RNA alt tiplerinin dağılımı [37].

lncRNA'lar yapı, biogenez ve fonksiyonlarına göre alt gruplara ayrılmakta ve enhancer, promoter, intronik ve intergenik bölge gibi farklı DNA elemanlarından sentezlenebilmektedir [31]. lncRNA'lar sirküler ve lineer olarak da ayrıca gruplandırılmaktadır. Sirküler RNA (circRNA) genlerin %10'undan fazlasında ters splicing sayesinde oluşturulur ve miRNA aktivite düzenleyicisi olarak majör bir role sahiptir. Sirküler RNA'lar intronik (ciRNA, tek bir intron içerir), ekzonik (circRNA, 1-3 ekzon içerir) veya ekzon intron komşuluğunda (ccRNA, bir intron ve ekzon içerir) bulunabilmektedir [34].



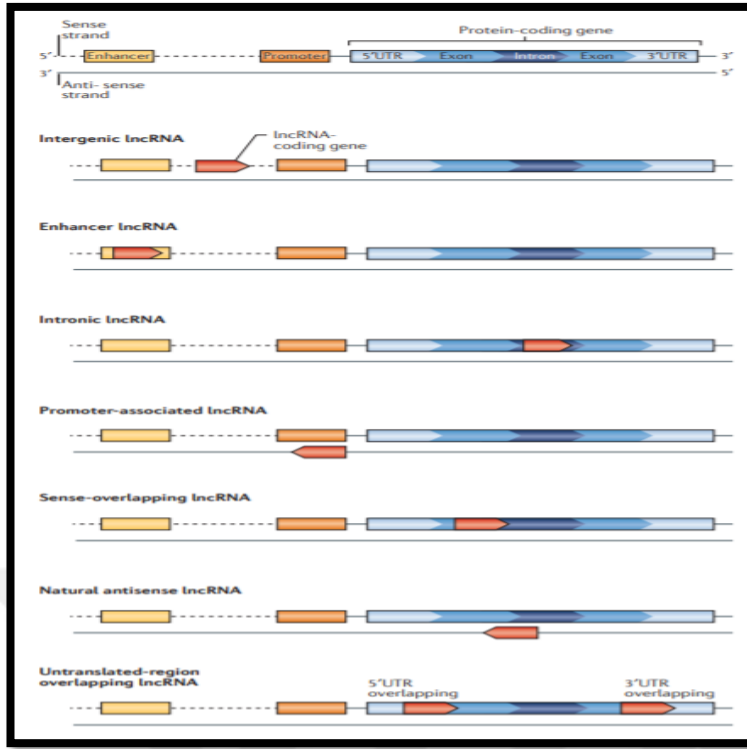
Şekil 2.7: Kodlamayan RNA'ların sınıflandırılması [31].

Kodlamayan RNA'lar arasında lncRNA'lar en yaygın ve fonksiyonel olarak farklı sınıflı oluşturmaktadır. LncRNA'lar hayvanlar, bitkiler, maya, virüs olmak üzere çok çeşitli türlerde gözlenmekte ancak türler arasında zayıf şekilde korunmaktadır. NONCODE v3.0 verileri lncRNA'ları uzunluk dağılımlarına göre küçük-lncRNA (200-950 nt), orta-lncRNA (950-4800 nt) ve büyük-lncRNA'lar (4800nt) olarak gruplandırmaktadır. İnsanda lncRNA'ların çoğu (%58) küçük-lncRNA'lardır (Şekil 2.8) [38].



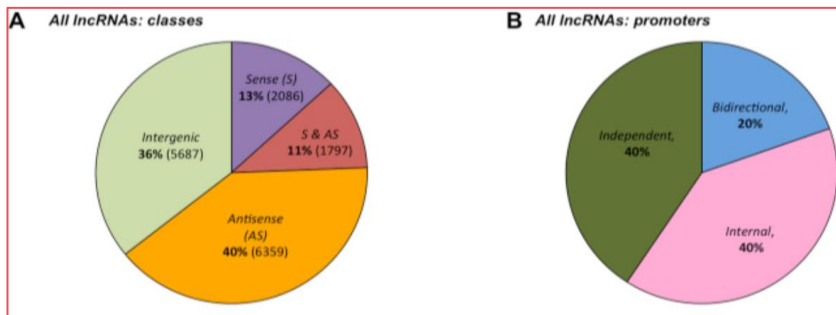
Şekil 2.8: İnsan ve farede lncRNA'ların uzunluk dağılımı

lncRNA'lar köken aldıkları genomik lokalizasyonlarına göre yedi kategoriye ayrılabilir. İntergenik lncRNA (lincRNA)'lar protein kodlayıcı genler arasındaki kodlamayan DNA dizilerinden üretilirken intronik lncRNA'lar protein kodlayan genlerin intronlarından transkribe olmaktadır. Enhancer lncRNA'lar enhancer bölgesinden, promoter ilişkili lncRNA'lar ise promotere yakın bölgede ve protein kodlayan transkriptte karşı yönde sentezlenir. Sense ve antisense lncRNA kodlayıcı genin sense ve antisense zincirinden sentezlenmekte ve bir veya birkaç intronik/ekzonik sense dizi ile overlap olabilmektedir. Untranslated-region overlapping lncRNA'lar ise sense zincirde, protein kodlayan genin 3' UTR (Untranslated Region) ve 5' UTR bölgesi ile çakışan DNA dizilerinden sentezlenmektedir (Şekil 2.9) [39].



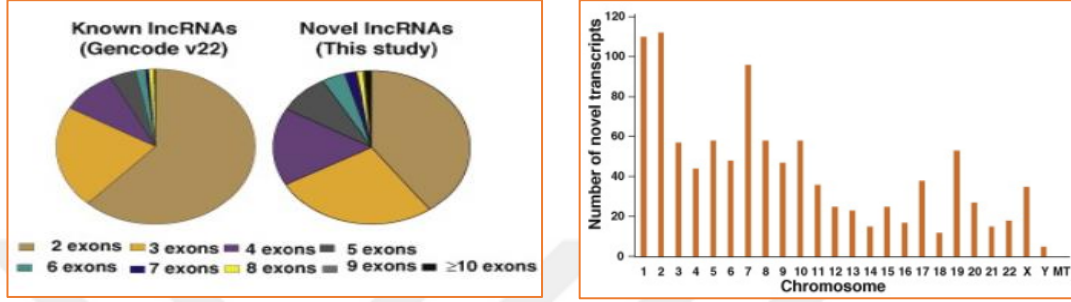
Şekil 2.9: Genomik lokalizasyonuna göre lncRNA sınıflandırması [39].

Promoter sınıflaması temelinde GENCODE aracılığı ile tanımlı tüm lncRNA'lar kategorize edilmiştir. İntragenik lncRNA'lar tüm lncRNA'ların %64'ünü oluşturmakta ve çoğu (%40) antisense lncRNA olarak sınıflandırılmaktadır. Sense lncRNA'lar %13'ünü oluşturmakta ve birçok komşu gen nedeniyle %11'i hem sense hem de antisense olarak gruplandırılmaktadır. İntergenik lncRNA'lar ise %36'sını oluşturmaktadır. lncRNA'lar farklı ve internal promoterden eşit oranda (%40) kopyalanmakta ve %20'si çift yönlü transkribe edilmektedir (Şekil 2.9) [40].



Şekil 2.10: Genom çapında araştırmalarda lncRNA sınıflarının dağılımı [40].

İnsan monosit hücrelerindeki lncRNA'ların kromozomal dağılımını araştırmak için yapılan bir çalışmada, dört sağlıklı bireyin saflaştırılmış monosit hücrelerinden yapılan derin dizileme ile elde edilen yeni lncRNA'lar ile GENCODE veri tabanında tanımlı lncRNA'lar birlikte değerlendirilmiştir. lncRNA'ların en fazla 1, 2, ve 7. kromozomlarda bulunduğu tespit edilmiştir. Bu durum ilgili kromozomların en büyük kromozomlar olması ile ilişkilendirilmiştir [41].



Şekil 2.11: İnsan monositlerinde lncRNA ekzon içeriği ve kromozomal dağılımı[41].

lncRNA'ların hücre içi lokalizasyonları, lncSLdb veri tabanı ile 11.000'den fazla lncRNA değerlendirilerek birikimlerine göre üç temel lokalizasyona (çekirdek, sitoplazma, çekirdek/sitoplazma) ve üç alt tipe (ribozom, kromozom ve nükleoplazma) ayrılmıştır. Bazı lncRNA'ların çekirdekte bazılarının ise sitoplazmada biriktiği gösterilmiştir. Bazılarının ise hem sitoplazma hem de çekirdekte bulunabilmektedir. Nükleer ekspresyon seviyesi sitoplazma ekspresyonunun 2 katından fazla ise nükleer birikimli, tersi durumda sitoplazma birikimli ve diğer durumlarda ise her iki bölümde birikimli olduğu kabul edilmektedir [42]. İnsanda lncRNA'ların %75'inin sitoplazmada lokalize olduğu bildirilmiştir [43].

Çeşitli veri tabanlarında lncRNA sayıları 2.000 ile 70.000 olarak ifade edilmektedir. NONCODE veritabanına (güncel versiyon v5.0) göre insanda 172.216 lncRNA transkripti ve 96.308 lncRNA geni tespit edilmiştir [44]. GENCODE veri tabanına (versiyon 31) göre insanda 19.975 protein kodlayan gen ve 17.904 lncRNA geni tespit edilmiştir [45]. DIANA-LncBASE veri tabanı deneysel olarak doğrulanmış en geniş sayıda lncRNA'yı içermekte ve lncRNA'ların en büyük veri deposudur. Ayrıca bilgisayar temelli tahminleri, primer veri depolarını ve literatür yorumlarını birleştiren tek veri tabanıdır. lncRNA'ların hücre ve doku spesifitesi ile ilgili bilgileri CHIPBase, DIANA-LncBase, lncRNAdb, Noncode v3.0 ve lncRNome veri tabanları

sağlamaktadır. DIANA-LncBase, lncRNAdb, lncRNA-Disease, Noncode v3.0 ve lncRNome gibi veri tabanlarının çoğu, hastalıklar ve lncRNA'lar arasındaki doğrulanmış ilişki hakkında bilgi sağlamaktadır [46].

lncRNA'lar bilinen fonksiyonlarına göre isimlendirilir. Her lncRNA'ya tanımlayıcı bir isim veya kısaltması olan bir gen sembolü verilir, örneğin *BANCR* kısaltması BRAF-activated non-protein coding RNA'dır. Tire kullanımı, kodlayıcı genlere antisense olarak isimlendirilen genler ile sınırlıdır. Örneğin *BACE1-AS* geni *BACE1* antisense RNA. Fonksiyonu bilinmeyen lncRNA genleri genomdaki durumuna göre isimlendirilmektedir. Örneğin proksimal bölgede protein kodlayan bir gen varsa lncRNA'lara kodlayıcı genin sembolü verilir ve uygun olan bir son ek eklenir; antisense (AS), intronic (IT) veya overlapping (OT). Protein kodlayan gen lokusları arasında bulunan uzun intergenik lncRNA'lara, ortak bir kök sembolü (*LINC*, 'long intergenic non-coding RNA') verilir. Çift yönlü promoter paylaşan lncRNA'lar antisense upstream (AU) olarak isimlendirilir. Ayrıca bir lncRNA geni, birden fazla sayıda kodlayıcı genlere uzanan transkriptler kodlarsa, lncRNA'nın 5' ucunda bulunan ilk kodlayıcı gen isim olarak kullanılır [47].

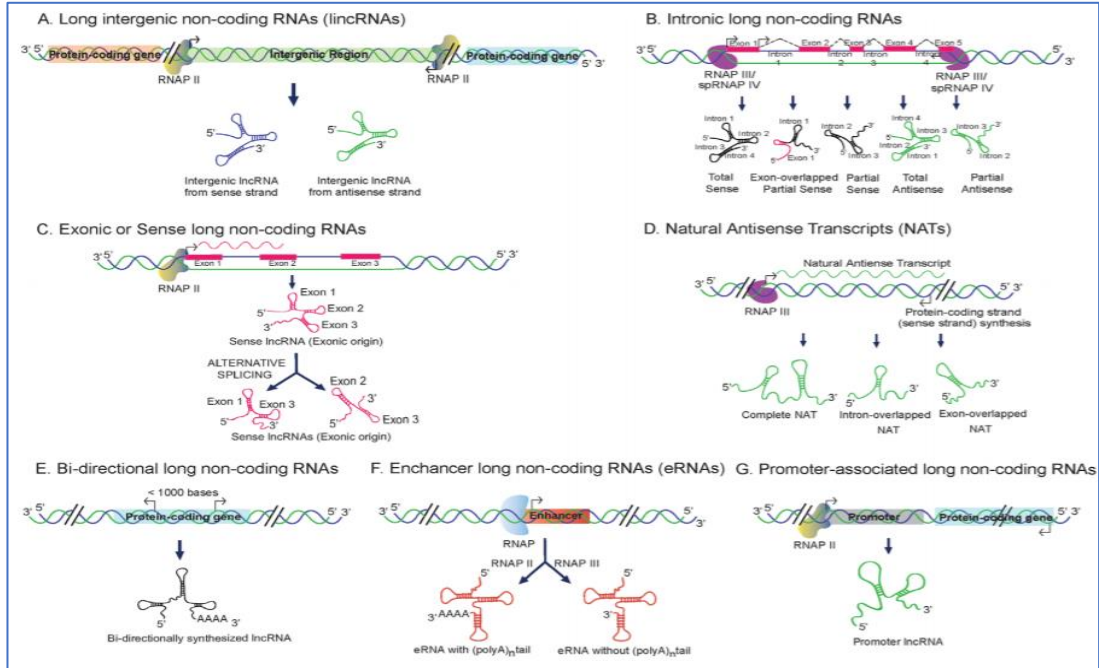
2.2.2. LncRNA Oluşumu, İşlev Mekanizmaları ve Fonksiyonel Roller

2.2.2.1 lncRNA'ların Oluşumu

Birçok lncRNA geni protein kodlayan genlere benzer şekilde RNAP II (RNA polimeraz II) aracılığıyla sentezlenir ancak bazı lncRNA'lar RNAP III ve spRNAP IV (single-polypeptide nuclear RNA polimeraz IV) tarafından da sentezlenebilmektedir. Normalde açık okuma çerçevesine sahip olmamalarına rağmen bazı lncRNA'ların protein kodladığı bildirilmiştir. LncRNA sentez süreci mRNA transkripsiyonu ile 5'cap, çoklu ekzonik yapı, 3' poliadenilasyon, normal veya alternatif splicing gibi birçok benzer özellik göstermektedir. LncRNA'lar spesifik dokularda düşük düzeylerde ve yarı ömrü 2 saatten az, 16 saatten fazla olabilecek şekilde değişken (ortalama 3,5 saat) zaman sınırlı tarzda eksprese edilmektedir [48]. lncRNA'ların sadece %10 tüm hücre serilerinde, önemli bir kısmı (%29) ise tek bir hücre serisinde tespit edilmektedir [49]. RNA dizileme çalışmaları lncRNA transkripsiyonunun bağımsız olduğunu ve komşu gen transkripsiyonunu etkilediğini göstermektedir.

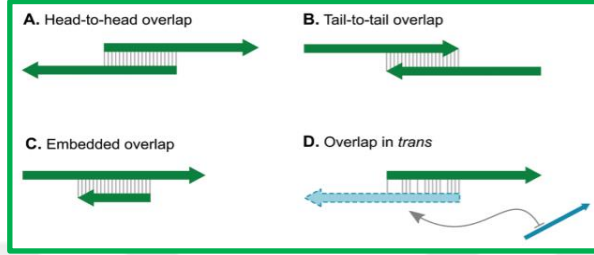
lncRNA kökeni halen tartışmalı olmakla beraber son çalışmalar matur lncRNA'ların üçte ikiden fazlasının transposable element (TE) içerdiğini göstermektedir. Bu nedenle birçok lncRNA'nın TE insersiyonu ile oluştuğu düşünülmektedir [50].

lncRNA'ların kopyalandığı genomik lokuslar transkripsiyon başlangıç bölgesine göre intron, ekzon, promoter, enhancer veya 3' ve 5' UTR bölgelerini içermektedir [48]. lincRNA (long intergenic non-coding RNA)'lar kodlayıcı genlerin arasındaki bölgelerden sentezlenmekte ve diğer ncRNA'ları üretebilmektedir. Örneğin *H19*'un birinci ekzonunun mir-675-3p ve miR-675-5p sentezlediği gösterilmiştir [51]. Kodlayıcı genlerin intronlarından köken alan intronik lncRNA'lar alternatif splicing ile oluşmakta ve bazı ekzonik dizileri içerebilmektedir. Ekzonik bölgelerden üretilen sense lncRNA'lar (kodlayan, 5'→3') ekzonik lncRNA olarak adlandırılır ve mRNA ile çakışmaktadır. Çift yönlü lncRNA'lar kodlayıcı genlerin başlangıç bölgelerine yakın (<1000 bp) bir mesafede ancak kodlayıcı genin karşı zincirinden sentezlenmektedir. Psödogenlerden sentezlenen psödo-lncRNA'lar, ultra korunmuş bölgelerden derive olan T-UCR (Transcribed ultraconserved region), enhancer bölgeden transkribe olan eRNA ve promoter dizilerden köken alan promoter lncRNA gibi birçok farklı lncRNA bulunmaktadır. Bazı lncRNA'ların ise mitokondrial genomdan üretildiği bildirilmiştir (Şekil 2.12) [48].



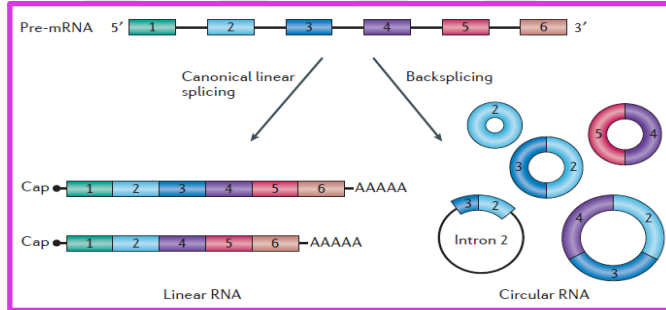
Şekil 2.12: lncRNA biyosentezi

NAT (natural antisense transcript) antisense zincirden köken alan sense RNA transkripsiyonunun tamamlayıcısıdır. Transkripsiyon başlangıç bölgesine göre cis-NAT sense zincir mRNA ile aynı zincirde iken trans-NAT ise sense zincir mRNA'dan farklı ve antisense zincirde (kalıp, 3' → 5') lokalizedir [52]. cis-NAT'lar karşı zincirdeki gen ile tam, kısmi, başa baş, kuyruk kuyruğa veya bütünleşik şekilde çakışabilmektedir (Şekil 2.8) [53].



Şekil 2.13: NAT çakışma tipleri.

Sirküler RNA'lar (circRNA) hem kodlayıcı genlerden hem de kodlayıcı olmayan bölgelerden sentezlenmektedir. circRNA'lar ters splicing süreci ile downstream 3' bölge ile upstream 5' bölge arasında kovalent bağ ile oluşturulmaktadır. Ayrıca circRNA'lar poli-A kuyruğu içermez ve intronlar ile beraber bir veya daha fazla ekzon içerebilmektedir (Şekil 2.9) [54].

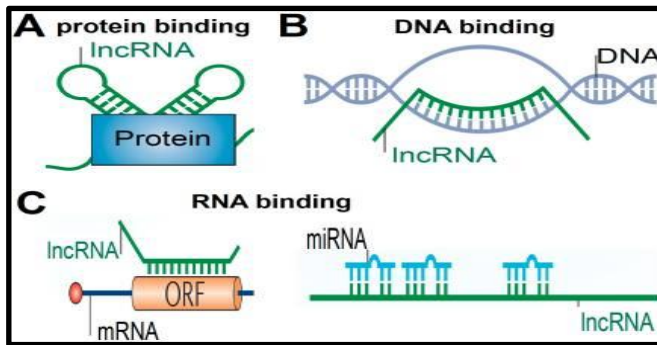


Şekil 2.14: circRNA sentezi

lncRNA'lar lokalizasyonlarına göre farklı düzenleyici mekanizmalara sahiptir. Sitoplazmik lncRNA'lar mRNA translasyonunu ve stabilitesini düzenlemektedir. Ayrıca miRNA ile etkileşerek mRNA ekspresyonunu etkilemektedir. Linc-MD1'in, miR-133 ve miR-135'i hedefleyen yarışmacı endojen RNA olarak myoblast farklılaşmasını düzenlediği ve Duchenne Musküler Distrofi (DMD)'de azaldığı bildirilmiştir [55]. Çekirdekte lokalize lncRNA'lar, gen ekspresyonunu inhibe veya aktive etmek için hedef gene bağlanarak TF'leri ve histon kompleksler aracılığı ile gen regülasyonu sağlamaktadır. Çekirdekte lokalize Xist, kromatin yapısını değiştirerek gen transkripsiyonunu etkilemektedir [52].

lncRNA'lar dokularda ve vücut sıvılarında mRNA'ya benzer stabilite gösterirken doku spesifiteleri mRNA'dan daha yüksektir. Kan, idrar ve mide sıvısı gibi çeşitli vücut sıvılarında tespit edilebilmeleri nedeni ile uygun bir klinik belirteçtir [56]. Sirküler biyobelirteçler olarak vücut sıvılarında tespit edilebilmeleri hastalıkların tanısı ve prognostik faktörleri olmalarını sağlamaktadır. lncRNA'lar çeşitli uyarıları yaymak için ekzozomlar veya diğer hücre dışı veziküller aracılığıyla taşınabilmektedir. Veziküllere yüklenen lncRNA'ların hormon benzeri fonksiyon görebileceği düşünülmektedir [57]. lncRNA'lar mRNA'dan daha fazla yapısal karmaşıklık göstermektedir. Fonksiyonlarını yerine getirmek için DNA, RNA veya proteinler ile etkileşime girdiği ve ikincil veya üçüncül yapılarının bu etkileşimlere aracılık ettiği bildirilmiştir. lncRNA'ların bu moleküller ile bağlandıkları alanlar fonksiyonel bölgelerini oluşturmaktadır. [58, 59].

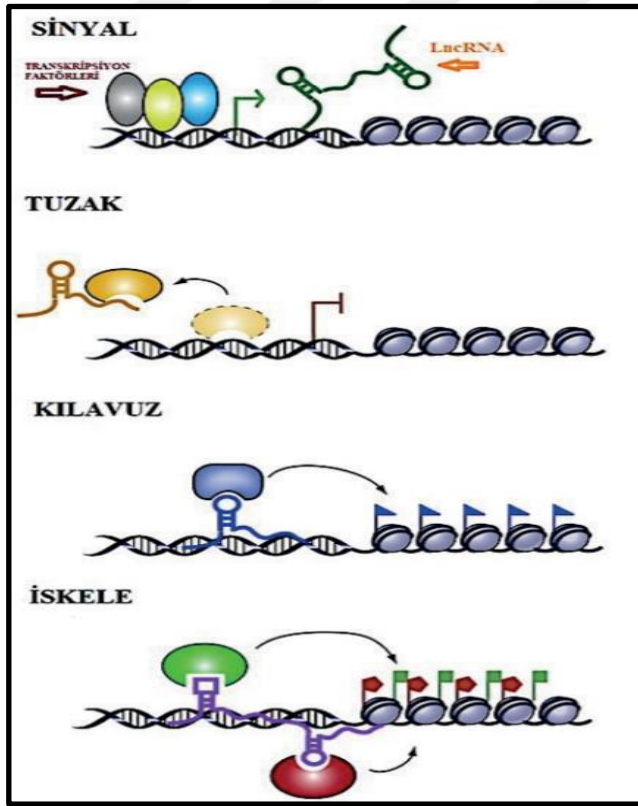
lncRNA'lar Şekil 2.15'de gösterildiği gibi DNA, RNA, proteinler aracılığı ile gen aktivasyonu veya baskılamasına neden olmaktadır. Ayrıca TF'leri ve kromatin modifiye edici kompleksler gibi proteinler ile etkileşerek gen ekspresyonunu etkilemek için moleküler iskele olarak işlev görebilmektedir. DNA ile tamamlayıcı etkileşimleri sonucu proteinleri, promoter gibi spesifik bölgelere yönlendirebilmekte veya DNA bölgelerine spesifik proteinlerin bağlanmasını önleyebilmektedir. Ayrıca lncRNA'ların mRNA gibi diğer RNA'lar ile baz çifti oluşturabildiği veya miRNA fonksiyonunu önlemek için endojen sünger gibi hareket edebildiği gösterilmiştir [60]. lncRNA fonksiyonlarının primer diziden daha çok korunan ve fonksiyonel olan sekonder yapı ile ilişkili olduğu ileri sürülmektedir. Örnek olarak GAS5'in sinyal veya tuzak olarak fonksiyon görmesinin, sekonder yapılar ve farklı ligandlara afinitesine bağlı olabileceği bildirilmiştir [61].



Şekil 2.15: lncRNA çeşitli moleküller ile etkileşimi [60].

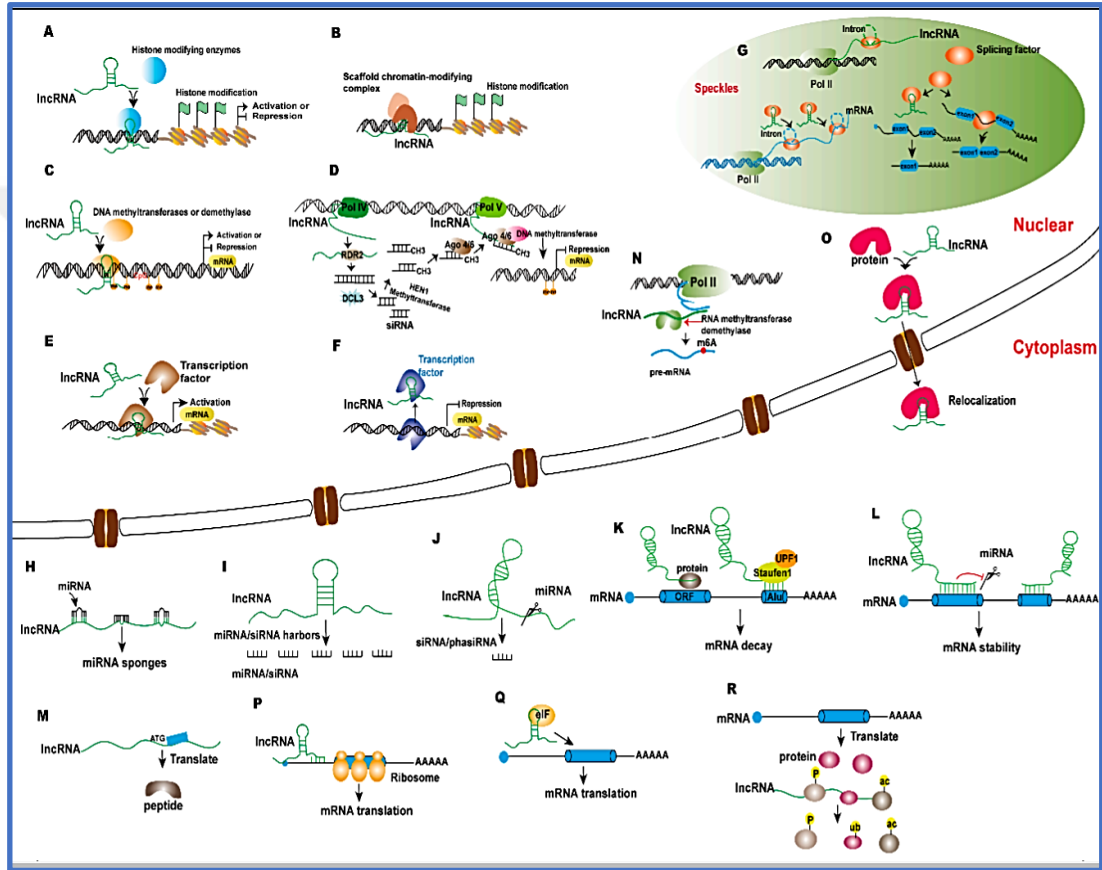
2.2.2.2. LncRNA'ların İşlev Mekanizmaları

LncRNA'lar farklı biyolojik süreçlerde transkripsiyonel, post-transkripsiyonel ve epigenetik modifikasyonlar ile gen ekspresyonunu düzenlemektedir. LncRNA'ların cis, trans ve antisense etkileşimler aracılığı ile gen ekspresyonunu düzenleyen birçok farklı mekanizması bulunmaktadır. Etki mekanizmalarının çoğu hala belirsiz olmasına rağmen bazıları açıklanmıştır [52]. LncRNA'lar başlıca sinyal, tuzak, klavuz ve iskele olarak işlev görmektedir (Şekil 2.16). Sinyal fonksiyona sahip LncRNA'lar gen düzenlenmesinin zamanını ve lokalizasyonunu belirlemekte ve gene özgü ifadeyi sağlamaktadır. Tuzak olarak fonksiyon gören LncRNA'lar çeşitli transkripsiyon faktörlerinin DNA'dan ayrılmasını sağlayan bir yem gibi hareket ederek hedef genleri negatif olarak düzenlemektedir. Klavuz fonksiyonuna sahip LncRNA'lar, kromatin düzenlenmesinde görevli enzimleri hedef genlere yönlendirmekte ve ilgili genlerin ifadesini yakındaki komşu genler için 'cis', uzak genler için 'trans' düzenleme ile etkilemektedir. Ribonükleoprotein kompleksler oluşturmak için çok sayıda proteini bir araya getirenler ise iskele olarak fonksiyon görmektedir [62].



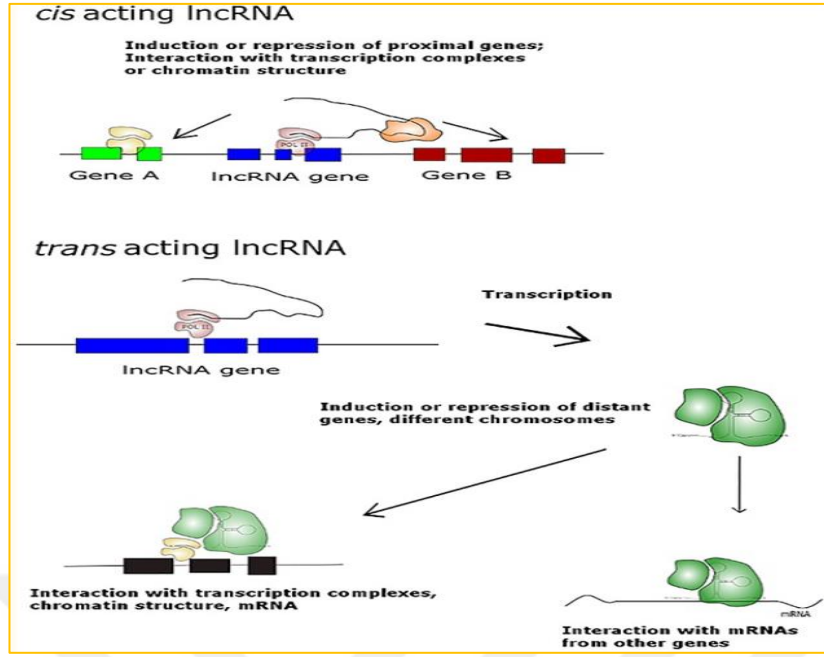
Şekil 2.16: LncRNA'ların moleküler fonksiyonları [62].

lncRNA'lar transkripsiyonel seviyede gen ekspresyonunu aktive veya inhibe ederek düzenlemektedir. Transkripsiyonu inhibe etmek için DNA-RNA stabil üçlü kompleksler oluşturmak üzere düzenleyici dizilere bağlanmaktadır. lncRNA'lar kodlayıcı genin upstream bölgesine yakın olduğunda, promoter bölgesine TF'lerinin bağlanmasını etkileyerek komşu genlerin ekspresyonlarını pozitif veya negatif olarak düzenleyebilmektedir. Ayrıca TF'lerin aktivitesini düzenleyen koaktivatör olarak çalışmakta ve TF, promoter ve polimeraz II enzimini direkt bağlayabilmektedir [52].



Şekil 2.17: Genom düzeyinde lncRNA'ların düzenleyici mekanizmaları [30].

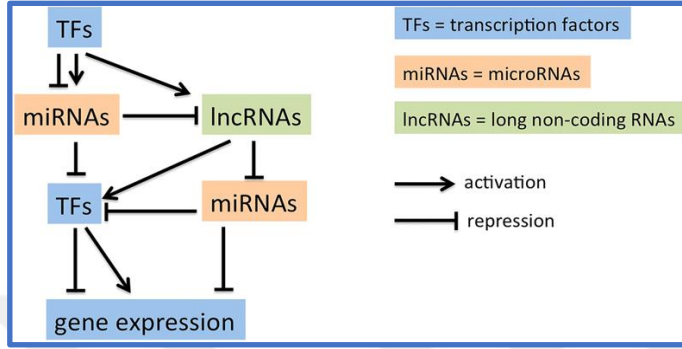
lncRNA'lar aynı kromozom üzerindeki proksimal genlerin ekspresyonunu artırmak veya azaltmak için cis pozisyonda hareket edebilmektedir (Şekil 2.18). Örneğin lncRNA *HOTTIP* (*HOXA* transcript at the distal tip) *HOXA* gen kümesinde bulunur ve aynı kümedeki diğer genlerin ekspresyonunu artırır. Ayrıca lncRNA'lar trans pozisyonda farklı kromozomlar üzerindeki genlerin ekspresyonunu baskılayıcı veya artırıcı etki gösterebilmektedir. *Six3OS* trans etkili lncRNA'dır ve retina gelişimini sağlayan TF *Six3* (Six homeobox 3) genini aktive ettiği gösterilmiştir [63].



Şekil 2.18: lncRNA gen ekspresyon düzenleme mekanizmaları [63].

lncRNA'ların komplementer dizileri aracılığı ile mRNA'nın transkripsiyon sonrası sürecini; mRNA'nın alternatif kırılması, mRNA kararlılığının sürdürülmesi veya mRNA degradasyonunu içeren farklı mekanizmalar ile düzenlediği bildirilmiştir. Staufen 1 (STAU1) ilişkili mRNA parçalanmasında lncRNA, hedef mRNA'ya 3' UTR bölgesinde bağlanarak mRNA'nın bozunmasını sağlamaktadır. ADAR (Adenosine deaminase acting on RNA) enzimi çift zincirli RNA'da adenosini inozine dönüştürmekte ve bu değişim RNA yapısını, kırılma şeklini etkileyerek RNA'nın düzenlenmesini sağlamaktadır. Çeşitli splicing faktörler ve hnRNP (heterogeneous nuclear ribonucleoprotein) ile etkileşerek alternatif splicing sürecini düzenlemektedir. Ayrıca protein fosforilasyonu, asetilasyonu ve ubiquitinasyonunda rol oynayarak protein aktivitesini etkileyebilmektedir. lncRNA'ların ADAR enzimi, splicing faktörler, Staufen 1 gibi RNA bağlayıcı proteinler aracılığı ile mRNA'nın translasyon sonrası aşamalarının hemen hemen tüm yönlerini düzenlediği gösterilmiştir. lncRNA ve mRNA ilişkisinin hedef mRNA stabilitesini ve translasyon verimini etkilediği, bazı lncRNA'ların mRNA translasyonunu azalttığı bazılarının ise artırdığı gösterilmiştir. Böylece lncRNA'ların RNA düzenlemesinin kontrolü aracılığıyla transkriptom ve proteomu çeşitlendirmeye yardımcı olduğu tahmin edilmektedir. lncRNA'lar MRE (miRNA responsive element) aracılığı ile miRNA'lara bağlanmakta ve miRNA'ları

direkt veya dolaylı olarak düzenleyebilmektedir. lncRNA'nın miRNA adsorbsiyonu için moleküler tuzak olarak çalışmasına sünger etkisi denilmektedir. lncRNA'lar miRNA ile ceRNA mekanizması oluşturarak hedef gen inhibisyonunu ortadan kaldırmakta ve miRNA blokörü olarak çalışabilmektedir [30, 52, 64]. Karşıt olarak miRNA'ların lncRNA'ları negatif olarak düzenlediği de gösterilmiştir [65].

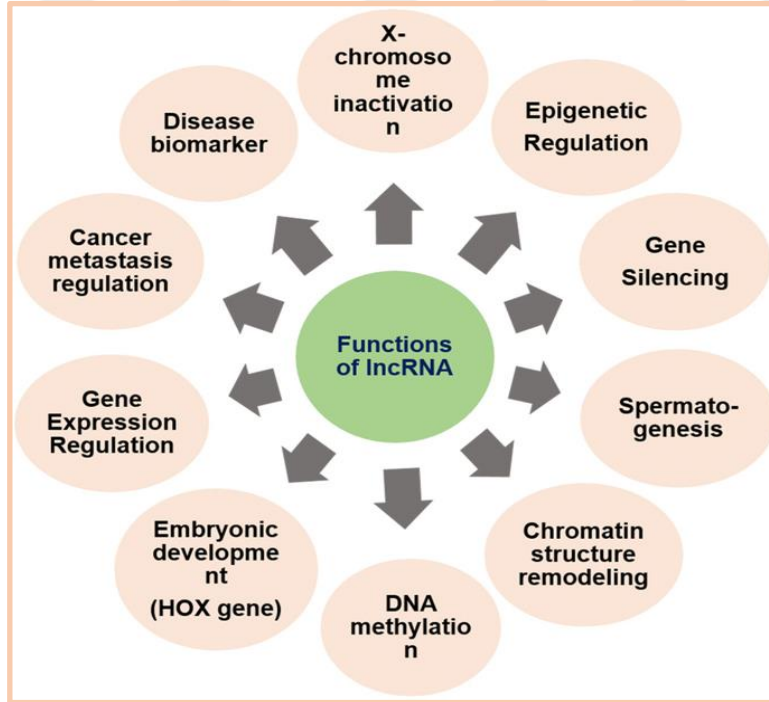


Şekil 2.19: lncRNA, miRNA ve TF etkileşimi [66].

lncRNA'lar DNA metilasyonu, histon modifikasyonu ve kromatin yeniden şekillenmesi aracılığı ile epigenetik düzenleyici role sahiptir. Bu amaçla histon metil transferaz, histon demetilaz, histon asetil transferaz (HAT), histon deasetilaz (HDAC) ve PRC2 ile etkileşerek transkripsiyonu düzenler. Ayrıca kromatin modifikasyonu ile ilişkili DNA dizilerini veya protein komplekslerini toplayarak cis veya trans olarak komşu genleri düzenlemektedir. lncRNA'ların kromatine direkt bağlanarak şeklini ve üç boyutlu yapısını değiştirebildiği bildirilmiştir. Ayrıca kromatin yapısını daha kararlı hale getirebileceği veya kromatin/nonhiston bağlanmasını kolaylaştırarak kromatin kümeleşmesini değiştirebileceği ileri sürülmektedir [30, 52]. lncRNA'ların yaklaşık %20'sinin PRC2 (polycomb repressive complex 2)'ye bağlandığı ve diğer lncRNA'ların ise farklı kromatin modifiye edici komplekslere bağlanarak gen ekspresyonunda değişikliklere neden olduğu bildirilmiştir [67]. Birçok nükleer lncRNA, kromatin modifiye edicileri spesifik genomik lokuslarına yönlendirerek fonksiyon göstermekte ve genelde heterokromatin ve transkripsiyonel represyona neden olmaktadır. Ancak Histone H3K4 metiltransferaz gibi kromatin değiştiricilerin takviyesi ile üç boyutlu kromatin yapısının değişimi ve spesifik enhancer bölgelerinin aktivasyonu aracılığı ile transkripsiyonel aktivasyonun gerçekleştirildiği de bildirilmiştir [68].

2.2.2.3. lncRNA'ların Fonksiyonel Roller

lncRNA'ların DNA, RNA ve diğer transkripsiyonel moleküller ile etkileşimi sonucu çeşitli biyolojik süreçlerde ve hastalıklarda çok yönlü işlevi olduğu bildirilmiştir (Şekil 2.20). Gen ekspresyonunun düzenlenmesi, gen susturma, ısı şok cevabı, imprinting ve embriyogenez gibi çok sayıda biyolojik olaylarda önemli role sahip oldukları gösterilmiştir. Ayrıca lncRNA mutasyonları virüs enfeksiyonları, kanser, nörodejeneratif hastalıklar dahil çok sayıda hastalık ile ilişkilendirilmiştir. lncRNA'lardaki herhangi bir düzensizliğin hücre proliferasyonu, apoptoz direnci, tümör baskılayıcılarından kaçma ve anjiyogenezi tetikleme gibi normal hücresel süreçleri etkilediği bildirilmiştir. Ancak bugüne kadar lncRNA'lar ile ilgili oldukça az sayıda araştırma yapılmıştır [69].



Şekil 2.20: lncRNA'ların biyolojik fonksiyonları [69].

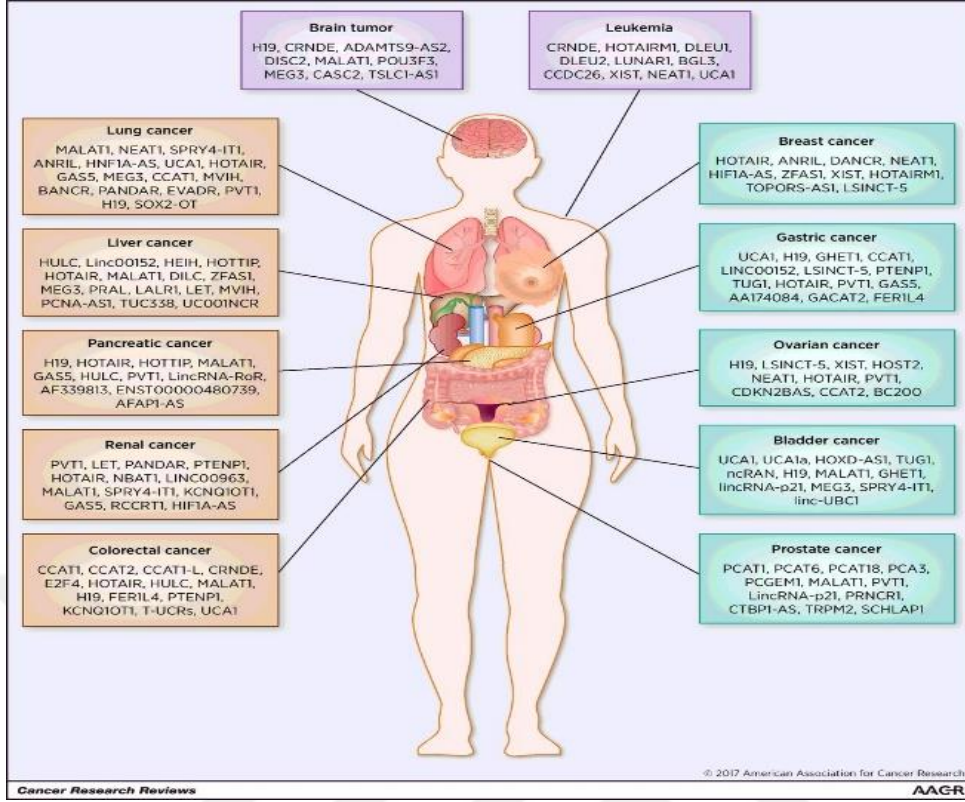
2.2.3: lncRNA'ların Hastalıklardaki Roller

Gen regülasyonundaki bozuklukların çeşitli hastalıklarla ilişkili olduğunun belirlenmesi lncRNA araştırmalarını önemli hale getirmektedir. lncRNA'lar çeşitli seviyelerde gen regülasyonunu düzenlemekte ve bu düzenleyici rolünün bozulması kompleks birçok hastalığın gelişimi ve ilerlemesine katkı sağlamaktadır.

lncRNA'lar çok sayıda fizyolojik ve patolojik süreçlerde yer almaktadır. Özellikle dizi ve üç boyutlu yapılarındaki anormallikler ile DNA ve protein arasındaki etkileşim ve ekspresyon seviyelerindeki anormalliklerin birçok hastalığın oluşumu ile yakından ilişkili olduğu tespit edilmiştir. Bu nedenle lncRNA'lar birçok hastalık için terapötik hedef ve biyobelirteç olarak önerilmektedir. Şimdiye kadar 270.044 lncRNA geni sınıflandırılmış ancak fonksiyon ve hastalık gelişimi üzerindeki etkileri açısından çok az sayıda transkriptin çalışıldığı bildirilmiştir. miRNA'lar ile ilgili kapsamlı çalışmalar yapılmış iken lncRNA çalışmaları oldukça sınırlıdır [70].

Tümör oluşumu genomik mutasyon, DNA hasarı, immun kaçış gibi birçok biyolojik süreç sonunda gelişmektedir. lncRNAlar bu süreçlerde transkripsiyonel düzenleyiciler olarak görev yapmaktadır. Ayrıca lncRNA'ların proliferasyon, apoptoz, angiogenez ve metastaz süreçlerini transkripsiyon ve sonrası seviyelerde düzenlediği bildirilmiştir [71]. Kanser gelişiminde lncRNA'lar önemli rol oynamakta ve tümör baskılayıcı veya onkogenik fonksiyonlar gösterebilmektedir. Örneğin *MEG3* normal beyin dokusunda yüksek oranda eksprese edilen ve gliomalarda down regüle edilen bir tümör baskılayıcı lncRNA'dır. *PCAT-1* (prostate cancer-associated ncRNA transkript 1) metastatik prostat kanserinde aşırı eksprese edilen ve *BRCA2* gen ekspresyonunu down regüle ederek hücre proliferasyonu indükleyen bir onkogenik lncRNA'dır. Genom çapında ilişkilendirme çalışmaları çeşitli kanser türleri ile ilişkili çok sayıda lncRNA tanımlamıştır. lncRNA'ların anormal ekspresyonlarının tümör oluşumu, metastazı ve kanser evresi ile yakından ilişkili olduğu belirlenmiştir. Çeşitli kanserler ile ilişkisi gösterilen lncRNA'lar Şekil 2.21'de gösterilmektedir. [72].

lncRNA'ların alt grubu olan T-UCR'lerin spesifik kanserlerde farklı eksprese edildiği gösterilmiştir. T-UCR'ler fragil bölgeler, HOX gen kümeleri, heterozigosite kaybının minimal bölgeleri gibi kanser ile ilişkili genomik bölgelerde bulunma eğilimindedir. UCR'lerde germline mutasyonlar ve delesyonların kronik lenfositik lösemi ve kolorektal kanserde kontrollerden üç kat sık olduğu gösterilmiştir [73].



Şekil 2.21: Çeşitli kanserler ile ilişkili lncRNA'lar [72].

lncRNA'lar epigenetik modifikasyonlar ile gen ekspresyonunu düzenlemektedir. İnsandaki HOX lokuslarında bulunan yüzlerce lncRNA, geçici veya bölgesel etkileri ile kromatine ulaşılabilirliği etkilemektedir. HOX lokuslarından orjin alan lncRNA *HOTAIR* (HOX Transcript Antisense Intergenic RNA) PcG (Polycomb-group protein) proteinine bağlanarak trans düzende HOXD lokusunun ekspresyonunu düzenlemektedir. *HOTAIR* meme, kolorektal ve hepatosellüler kanserlerde yüksek düzeyde eksprese olmakta ve meme kanseri metastazı için prediktör olarak kullanılmaktadır. lincRNA'lar hem komşu hem de uzaktaki genlerin ekspresyonlarını düzenleyebilmektedir. lincRNA-p21'nin DNA harabiyetine bağlı olarak p53 yolağının aşağısındaki genlerin ekspresyonlarını baskıladığı bildirilmiştir [33].

Nöronal gelişim boyunca beynin farklı bölgelerinde ve hücre alt tiplerinde çok sayıda lncRNA eksprese edildiği tespit edilmiştir. Bazı lncRNA'ların nöron hücre kaderi tayini, nöron-glia değişimi ve oligodendrosit olgunlaşmasına katıldığı belirlenmiştir. *Dlx1AS* (distal-less homeobox 1 antisense)'nin komşusu olduğu homeobox genlerin ekspresyonunu değiştirerek nöronal farklılaşmaya katıldığı gösteril-

miştir. lncRNA düzensizlikleri şizofreni, otizm spektrum bozukluğu, Parkinson ve Alzheimer hastalığı gibi çok sayıda nörolojik hastalık ile ilişkilendirilmiştir. *BACE1-AS* (BACE sekretase 1 antisense) 'in β amiloid üretimi ve amiloid plak oluşumundan sorumlu olduğu ve Alzheimer hastalığı ile yakından ilişkili olduğu bildirilmiştir [74].

lncRNA'ların nadir genetik hastalıklar ile de bağlantılı olduğu tespit edilmiştir. Kistik fibrozisli hastaların bronş epitelinde in vivo lncRNA ekspresyonunun bozulduğu gösterilmiştir. Balloy ve arkadaşları kistik fibrozisli epitel hücreleri ile kistik fibrozisi olmayan hücrelerde *Pseudomonas aeruginosa* enfeksiyonundan altı saat sonra farklı eksprese olan 26 lncRNA tanımlamıştır [75]. *HMI-lncRNA* kültüre edilmiş erişkin periferik kan kökenli eritroblastlarda, kord kanı kökenli eritroblastlara göre anlamlı olarak yüksek bulunmuştur. HUDEP-2 (Human Umbilical Cord Blood-Derived Erythroid Progenitor-2) hücrelerde *HMI-lncRNA* down regülasyonunun HbF ekspresyonunu artırdığının gösterilmesi ile orak hücre anemisi ve β talasemide HbF indüksiyonu için *HMI*'nin terapötik hedef olabileceği ileri sürülmüştür [66].

Kompleks hastalıklar çeşitli çevresel faktörler ile düşük penetranslı çok sayıda genetik varyantların kombinasyonu ile oluşan ve Mendeliyen kalıtım paternlerine uymayan multifaktöriyel hastalıklardır. KAH, otoimmün hastalıklar, nörolojik hastalıklar, kanserler ve birçok hastalık bu sınıflandırmaya katılmaktadır. lncRNA'ların çeşitli kompleks hastalıklarda düzensizleştiği ve hastalık gelişimi ve ilerlemesi ile yakından ilişkili olduğu bildirilmiştir [76].

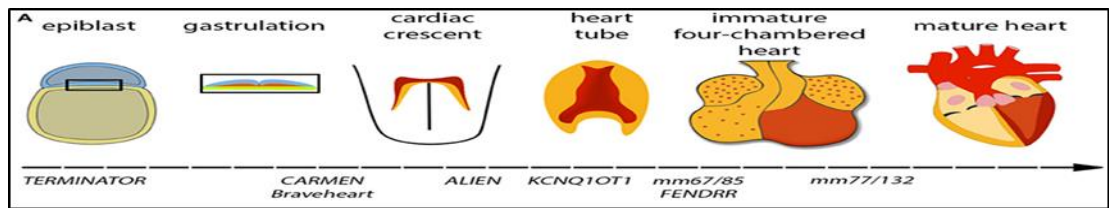
Tablo 2.5: Hastalıklarda rol oynadığı gösterilen bazı lncRNA'lar [76].

Hastalık	lncRNA	Hastalık	lncRNA
Akciğer kanseri	Linc-p21	Sküamoz Karsinoma	CUDR
Lösemi ve lenfoma	RMRP	Psöriazis	PRINS
Kolon kanseri	uc.73A	Angelman sendromu	Ube3a-as
Meme kanseri	Zfas1	Alzheimer hastalığı	BACE1-AS
Prostat kanseri	PTENP1	B hücreli lenfoma	BIC
Frajil X sendromu	ASFMR1	Otoimmün tiroid hastalığı	SAS-ZFAT
Osteosarkom	LOC285194	Spinocerebellar ataksi tip 8	ATXNSOS
Papiller tiroid ca	AK023948	Nöroblastom	ncRAN

2.2.4. Kardiyovasküler Sistem ve lncRNA'lar

Kardiyak hiyerarşi, memeli kalbini oluşturan çok sayıda özelleşmiş hücre tipi nedeni ile oldukça komplekstir. Tüm dünyada ölümün başlıca nedeni olan KVS hastalıklarının altta yatan etiyolojisinin daha iyi anlaşılması oldukça önemlidir. lncRNA düzensizliklerinin KAH dahil birçok KVS hastalığına neden olduğu gösterilmiştir. KVS hastalıkları ile ilişkili moleküler ve hücresel mekanizmalar günümüzde daha iyi anlaşılmış olmasına rağmen birçok bilmece çözülmeye devam etmektedir [77].

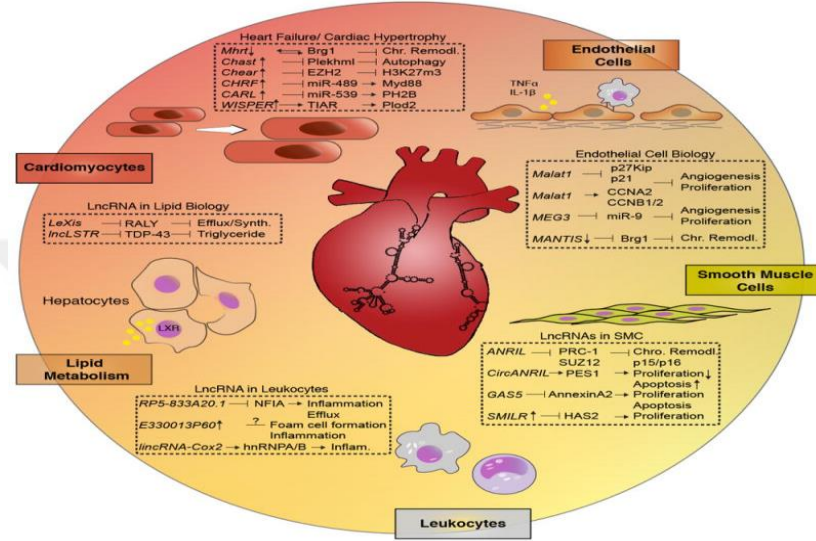
lncRNA'ların intrinsik transkripsiyonel regülasyonu hem gelişimsel süreçler hem de patolojik koşullar altında değişebilmektedir [78]. Kardiyak gelişim veya hastalık boyunca binlerce lncRNA'nın eksprese edildiği bildirilmesine karşın fonksiyonlarının araştırılması devam etmektedir. KVS oluşum ve işlevinin, kodlayıcı genler ile transkripsiyon faktörlerinin entegrasyonu ve lncRNA'ları da içeren düzinelerce kodlamayan genler ile ilişkili olduğu tespit edilmiştir. İnsan embriyonik kök hücreleri ve zebra balığı kullanılarak *TERMINATOR*, *ALIEN* ve *PUNISHER* isimli üç lncRNA karakterize edilmiştir. *TERMINATOR*'un kök hücrelerde embriyonik sağ kalım ve pluripotens için gerekli olduğu tespit edilmiştir. *ALIEN*'in mezodermal dokuya özgü olduğu ve fonksiyon kaybı sonucu damar düzeni ve kalp oluşumunun bozulduğu gösterilmiştir. *PUNISHER* ise mezodermal ve kardiyovasküler gelişimin farklı evrelerinde gerekli olduğu bildirilmiştir [77].



Şekil 2.22: Memelilerde kardiyak gelişim [77].

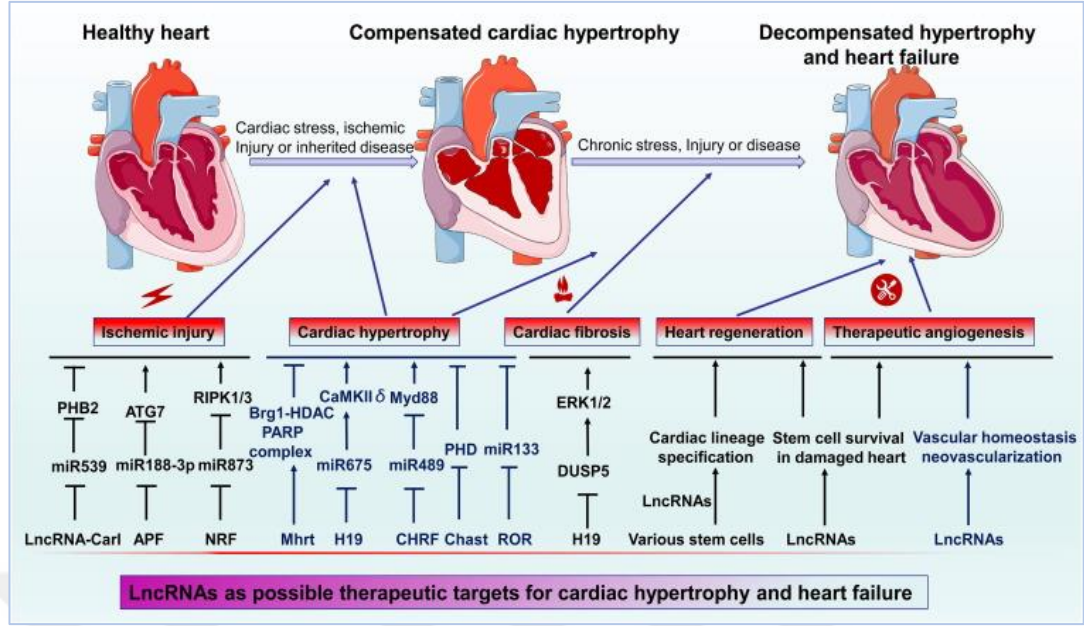
Diyabetik fare modellerinde LncRNA E330013p06'in makrofajlarda aşırı ekspresyonu ile inflamatuvar gen ekspresyonu ve köpük hücre oluşumunu indüklediği gösterilmiştir. KAH için bağımsız risk faktörü olarak tanımlanan 9q21.3 lokusu, lncRNA *ANRIL*'in son ekzonlarına komşudur ve çok sayıda SNP içermektedir [79]. *ANRIL* lineer formu artmış ateroskleroz riski ile ilişkili iken sirküler formunun

ribozom sentezini, vasküler hücrelerde apoptozis ve proliferasyonu düzenleyerek aterogeneze karşı koruyucu olduğu bildirilmiştir [80]. Han ve arkadaşlarının fare aortik daralma modelinde, lncRNA *Mhrt* (myosin heavy-chain associated RNA transcript)'nin kardiyak miyopatiyi tetikleyen *Brg1* (Brahma related gene 1) genini antagonize ettiği ve kardiyak hipertrofi ile kalp yetmezliğine karşı koruyucu olduğu bildirilmiştir [81].



Şekil 2.23: Kardiyak hasar ve yeniden düzenleme ile ilişkili lncRNA'lar [79].

lncRNA'ların kalp yetmezliği ile ilişkili iskemik hasar, kardiyak hipertrofi ve fibroze katıldığı, manipülasyonları ile hastalığın ilerlemesini azalttığı gösterilmiştir. lncRNA *NRF*'nin, *RIPK1/RIPK3* genlerinin neden olduğu kardiyomiyosit nekrozunu inhibe ederek miyokardiyal hasarı azaltan miR-873 süngerisi olarak işlev gördüğü bildirilmiştir. *NRF* inhibisyonunun iskemik kalp hastalığının tedavisinde yeni terapötik yöntem olabileceği düşünülmektedir. *H19*'un miR-675 aracılığı ile *CAMK2D* genini hedeflediği ve kardiyak hipertrofiyi geciktirdiği bildirilmiştir [82]. Viereck ve arkadaşları lncRNA *Chast* (cardiac hypertrophy-associated transcript) aşırı ekspresyonunun kardiyak hipertrofiye neden olduğunu ve spesifik oligonükleotid inhibitörler ile hedeflenerek TAC (Transverse aortic constriction) kaynaklı kardiyak hipertrofiyi azalttığını göstermiştir [83]. Kumarswamy ve arkadaşları MI sonrası mitokondrial lncRNA *LIPCAR* seviyesinin erken dönemde azaldığını, kalp yetmezliği geliştikten sonra arttığını ve kronik kalp yetmezliği gelişen hastalarda mortalite tahmininde kullanılabileceğini ileri sürmüşlerdir [84].



Şekil 2.24: Hipertrofik kalp ve Kalp yetmezliği süreçlerinde lncRNA'lar [82]

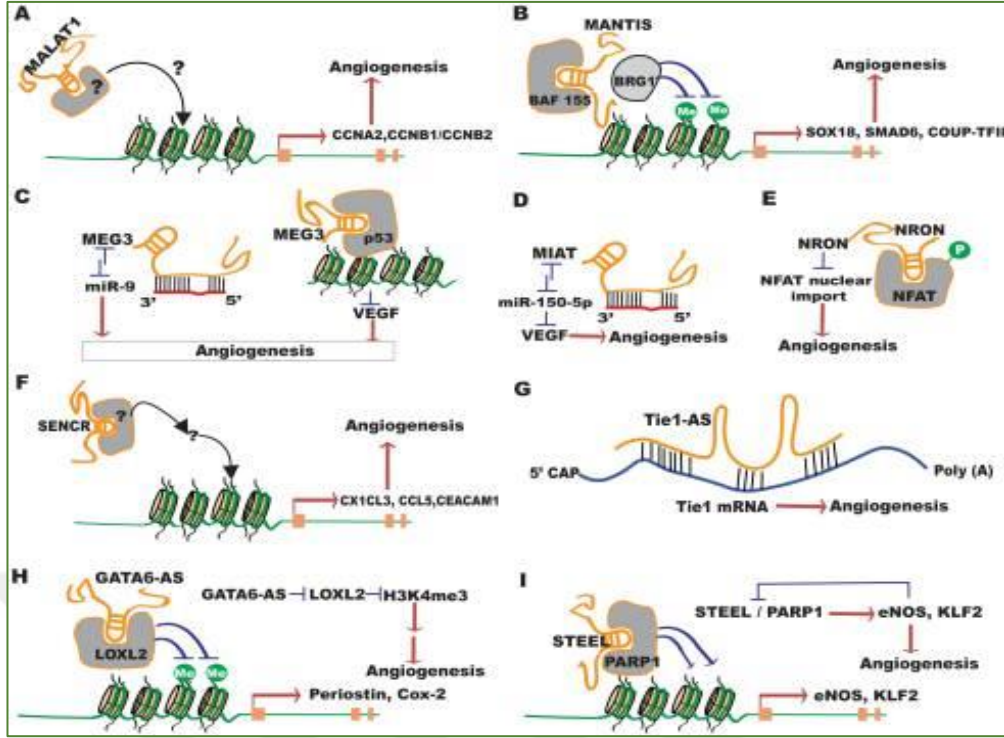
2.2.5. lncRNA'ların Koroner Arter Hastalığındaki Rolü

KAH dünya çapında ölümün en önemli nedeni ve toplumlar için önemli bir sosyoekonomik yüküdür. Hastalık oluşumu arter duvarındaki çok sayıda hücre tipleri arasındaki etkileşim ve değişimden kaynaklanmaktadır. KAH ile ilişkili çeşitli kan bulguları tanımlanmasına rağmen tanısal etkileri ve klinik önemlerinin yetersizliği nedeniyle yeni biyobelirteçlere ilgi artmaktadır. Birçok çalışma KAH gelişiminin lncRNA'lar ile ilişkili olduğunu göstermiştir. lncRNA'ların doku ve kandaki ekspresyon imzaları hastalık tanısı, prognozu ve tedavinin değerlendirilmesinde potansiyel rollerine işaret etmektedir. lncRNA'ların plazma ve diğer vücut sıvılarında stabil olmaları, hastalıklar için biyobelirteç olmalarına imkan sağlamaktadır [23].

Ateroskleroz çevresel ve genetik risk faktörlerini içeren, damar duvarında plak oluşumu ve inflamasyon ile karakterize kompleks bir hastalıktır. lncRNA'ların endotelde inflamasyon, hücre proliferasyonu, migrasyon ve apoptoz gibi çeşitli aterosklerotik süreçlerde rol oynadığı gösterilmiştir. Bugüne kadar KAH ile ilişkili olarak 30'dan fazla lncRNA karakterize edilmesine rağmen çok sayıda lncRNA ayrıntılı olarak araştırılmaya devam etmektedir [85].

koruyucu *APO-A1* gen ekspresyonunu in vivo ve in vitro negatif düzenlediği gösterilmiş ve terapötik hedef olabileceği önerilmiştir. KAH tanısı için yüksek duyarlılıkta bir biyobelirteç olan *CoroMarker*'ın, inflamatuvar süreçlerde önemli rol oynadığı ve down regülasyonu ile THP-1 (acute monocytic leukemia derived cell) monosit hücrelerinde proinflamatuvar sitokin salınımının azaldığı gösterilmiştir. KAH ile ilişkili lncRNA'ların fonksiyonlarının araştırılması ve mekanizmaların tespiti için daha fazla çalışma yapılması gerektiği vurgulanmaktadır [23].

Anjiyogenez ve vasküler hastalıklarda lncRNA'ların önemli rol oynadığı gösterilmiş ancak az sayıda araştırma yapılmıştır. *MALAT1*, *MANTIS*, *PUNISHER*, *MEG3*, *MIAT* ve *SENCR* angio-lncRNA'ları oluşturmaktadır. *MALAT1* knock down edilmesinin *VEGF* ve *FGF2* gen ekspresyonunu düzenleyerek tümör anjiyogenezini önemli ölçüde azalttığı tespit edilmiştir. *MALAT1*^{-/-} farelerde retinal vaskülarizasyonun azaldığı bildirilmiştir. *MEG3*'ün anjiyogenezi farklı mekanizmalar ile düzenleyebildiği ileri sürülmektedir. *MEG3* knockdown edilmesi ile *VEGFR2* ekspresyonunun engellenerek *VEGF*'nin indüklediği anjiyogenik filizlenmenin baskılandığı gösterilmiş ve *MEG3*'ün anjiyogenezde olumlu rolü olduğu tespit edilmiştir. Karşıt olarak *MEG3*'ün kapiller yapıların oluşumunu suprese ettiği ancak mir-9 transfeksiyonunun bu supresyonu kısmen ortadan kaldırdığı bildirilmiştir. Bu nedenle *MEG3*'ün miR-9 süngerı olarak işlev görebileceği düşünülmektedir. Sonuç olarak *MEG3*'ün anjiyogenez sürecine hem olumlu hem de olumsuz etkisi olduğu gösterilmiştir. *MIAT* genindeki tek nükleotid polimorfizimleri MI patogenezi ile ilişkilendirilmektedir. *MIAT* knock down edilmesi ile *VEGF* veya TNF- α tarafından indüklenen primitif damarsal ağ oluşumunun baskılandığı gösterilmiştir. *MIAT*'ın miR-150-5p için sünger fonksiyonu gördüğü ve miR-150-5p ilişkili *VEGF* baskısını azaltarak anjiogenezi düzenlediği bildirilmiştir. Mevcut çalışmalara rağmen anjiyogenez sürecinde lncRNA'ların regülasyonu büyük ölçüde açıklanamamıştır [24].



Şekil 2.26: Bazı önemli Anjiyo-lncRNA'ların fonksiyonel mekanizmaları [24].

lncRNA'ların MI patogenezinde de rol oynadığı tespit edilmiştir. Wu ve arkadaşları ratlarda MI sonrası 48 saat içinde enfarkte olmuş myokard zonunda kalp spesifik bir lncRNA olan *ZFAS1* (Zing Finger Antisense1)'in up regüle olduğunu ve haftalar sonra dramatik olarak azaldığını tespit etmiştir [87]. Gao ve arkadaşları sağlıklı kontrollerle kıyaslandığında MI hastalarında *HOTAIR* ekspresyonunun anlamlı olarak düşük bulunduğunu ortaya koymuştur. *HOTAIR* aşırı ekspresyonunun kısmen miR-1'i negatif düzenleyerek hipoksiyi azalttığı ve kardiyoprotektif olduğu bildirilmiştir [88]. lncRNA *FAF* (Fibroblast growth factor 9-associated factor) ekspresyonunun akut MI'lı ratların kardiyak dokularında azaldığı tespit edilmiştir. *FAF*'ın kardiyomiyositlerde iskemi ve hipoksi ile indüklenen apoptozu ortadan kaldıran *FGF9* (Fibroblast growth factor 9) genini pozitif düzenleyerek kardiyoprotektif olduğu gösterilmiştir. Ayrıca yeni lncRNA'lar araştırılmaya devam etmektedir. lncRNA'ların moleküler mekanizmalarının belirlenmesi için daha fazla araştırma yapılarak KAH tanısı, prognoz ve tedavisinde önemli fayda sağlaması beklenilmektedir [89].

2.2.6. lncRNA'ların Tanı, Prognoz ve Tedavide Kullanımı

lncRNA'ların keşfi, hastalıkların moleküler mekanizmasını belirlemenin yanı sıra çeşitli biyolojik sıvılarda tespit edilebilmeleri nedeni ile biyobelirteç ve terapötik hedef olmalarına imkan sağlamaktadır. lncRNA ekspresyonunun dokuya özgü tarzda spesifik olması nedeni ile çeşitli hastalıklarda lncRNA'ların düzensizliği gözlenmektedir. Örneğin çeşitli kanser dokularında lncRNA ekspresyon profilinin normal dokulardan farklılık gösterdiği tespit edilmiştir.

Ekzozomlar, birçok vücut sıvısında bulunan ve çok sayıda hücre tipi tarafından salınan hücre dışı veziküllerdir. Çeşitli çalışmalarda içeriğinde bulunan proteinler ve kodlayıcı olmayan nükleik asitlerin varlığı nedeni ile hastalık durumunu gösterebileceği ve biyobelirteç olarak işlev görebileceği belirtilmiştir. Hücre dışı lncRNA'lar RNAz'lara dirençlidir ve çoğunlukla hücre dışı veziküllerde bulunmaları nedeni ile biyobelirteç araştırmalarında dikkat çekmektedir [90].

Önemli bir RNA-bağlayıcı protein (RBP) olan heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K (hnRNPK)'nın lncRNA'lar ile etkileşime girdiği ve translasyon ve transkripsiyon gibi çeşitli yollarda yer alarak gen ekspresyonunu düzenlediği bildirilmiştir. Kanser gelişiminde hnRNPK'ların rol oynadığının tespit edilmesi nedeni ile ilişkili olduğu lncRNA'ların, kanser biyobelirteçi veya yeni terapötik hedef olarak değerlendirilmesi önerilmektedir [91].

Son yıllarda kanser hastalarının vücut sıvılarında hastalık ile ilişkili lncRNA'ların tespiti hastalık tanısında etkili bir yöntem olarak dikkat çekmektedir. Kanser tanı ve prognozunda, klasik biyopsilere kıyasla invaziv olmamaları ve daha iyi tolere edilmeleri nedeni ile dolaşımdaki lncRNA'ların kullanımı tercih edilmekte ve rutin kullanım için büyük avantaj sağlamaktadır. Kanser ilişkili lncRNA'ların tespitinin, sağlıklı insanları kanser hastalarından erken evrede ve yüksek hassasiyetle ayırt etmenin yanı sıra prognoz, metastaz riski ve rekürrens değerlendirilmesinde de kullanılabileceği önerilmektedir. Farklı kanserler için bazı lncRNA'ların mevcut biyobelirteçlerden daha yüksek tanı başarısı sağladığı gösterilmiştir. Örneğin *MALAT1*'in küçük hücreli dışı akciğer kanseri evre 1 hastalarının sağ kalımı için etkili

bir prognostik biyobelirteç olduğu gösterilmiştir. Prostat kanserli hastaların idrar örneklerinde *lncRNA PCA3* (prostate cancer antigen 3) ölçümünün, prostat kanseri tanısında yaygın kullanılan PSA (prostat spesifik antijen)'ya göre daha yüksek duyarlılık ve özgüllük ile tanı başarısı sağladığı tespit edilmiş ve FDA (Food and Drug Administration) tarafından prostat kanseri için biyobelirteç olarak onaylanmıştır [92].

lncRNA'ların kanserdeki rolleri göz önüne alındığında *lncRNA* temelli tedaviler ümit vericidir. ASO (Antisense oligonükleotid)'lar baz eşleşmesi yoluyla DNA-RNA yapısı oluşturabilmekte ve RNase-H-ilişkili RNA degradasyonunu başlatabilmektedir. ASO aracılığı ile *lncRNA*'ların hedeflenmesi kanser tedavisi için umut verici bir yaklaşımdır. Meme ve akciğer kanserinde *MALAT1*'in ASO aracılığı ile knock down edilmesinin tümör büyümesi ve metastazını anlamlı şekilde inhibe ettiği bildirilmiştir [71]. Fare modelinde mide kanserinde yüksek düzeyde eksprese edilen ve kötü prognoz ile ilişkilendirilen *GMAN* (gastic cancer metastasis-associated long non coding RNA)'ı hedefleyen bir CRISPR/Cas9 (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats/CRISPR-associated protein 9) verilmesinin gastrik kanser metastazını önemli ölçüde baskıladığı ve sağ kalımı iyileştirdiği gösterilmiştir [93].

lncRNA'lar hücre içi lokalizasyonlarına göre farklı fonksiyonlara sahip olması nedeni ile hedefleme stratejilerinde bu durumun dikkate alınması gerekmektedir. Örneğin SiRNA'lar başlıca sitoplazmada fonksiyon gösterdikleri için nükleusta lokalize *lncRNA*'lara daha az etkili olabilmektedir. GapmeR (chimeric antisense oligonucleotid)'ler nükleer transkriptleri hedefleyebildiği için in vivo *lncRNA*'ların farmakolojik susturulmasında kullanılan umut verici bir ASO sınıfıdır. *lncRNA* aşırı ekspresyonunu sağlamanın, susturmaya göre daha zor olduğu ve virüs aracılı dağıtım, nano partiküller veya RNA mimikleri gerektirdiği bildirilmiştir. Ayrıca antisense terapötiklerin doku veya hücre tipine spesifik olarak verilmesi, hedeflenen *lncRNA* düzenlemesinde oldukça önemlidir. Şimdiye kadar *lncRNA*'ları hedefleyen klinik çalışma yapılmamıştır. Ancak hayvan modellerinde terapötik GapmeR enjeksiyonu başarılı olmuştur. Çalışmalarda *lncRNA*'ları hedefleyen antisense ilaçların büyük potansiyeli olduğu ve bu terapötik müdahalenin kardiyak fonksiyonları belirgin iyileştirdiği vurgulanmaktadır [78].

Günümüzde lncRNA'ların terapötik uygulamalarının birkaç örneği mevcuttur. Transverse aortik daralma ile indüklenen kardiyak remodelling fare modelinde, GapmeR aracılığı ile susturulan *lncRNA CHAST* uygulaması ile belirgin yan etki olmadığı gösterilmiştir. MI'yı takiben kardiyak hücre ölümünü azaltmak için lncRNA *APF* down regülasyonu aracılığı ile apoptotik veya otofajik süreçlerin hedeflenebildiği bildirilmiştir [61].

LncRNA temelli tedavilerin geliştirilmesinde birtakım zorluklar bulunmaktadır. lncRNA'ların türler arasında zayıf korunmuş olması nedeni ile hayvan çalışmaları ve toksisite çalışmaları kliniğe uyarlanmadan önce dikkatli tasarlanmalı ve iyi analiz edilmelidir. Bu nedenle insana özgü dizilerin kullanıldığı insanlaştırılmış modeller veya organ kültürlerinin kullanılması önerilmektedir. mRNA ve miRNA'ların çoğu sitoplazmada lokalize iken lncRNA'ların önemli miktarda çekirdekte bulunması ve kolaylıkla ulaşılamayan kompleks yapılara daha fazla entegre olabilmesi, lncRNA'lara yönelik tedavi geliştirilmesini zorlaştırmaktadır [94]. lncRNA'ların kromatin yeniden düzenlenmesi, miRNA regülasyonu ve protein komplekslere bağlanma gibi çeşitli mekanizmalar ile gen ekspresyonunu düzenlemeleri, daha fazla hedef dışı ve daha az öngörülebilir etkilere neden olmaktadır. Ancak bu zorluklar aşılabılırsa hastalar için çok büyük faydaları olacağı vurgulanmaktadır [82].

2.2.7. lncRNA Profillendirme

lncRNA'lar farklı biyolojik süreçler ve hastalıklardaki rolleri nedeni ile birçok araştırmanın konusu olmuştur. Günümüzde tüm transkriptomda, transkript okuma yoğunlukları belirlenerek gen ekspresyon seviyelerini ölçen çalışmalar giderek popüler hale gelmektedir. lncRNA'lar mRNA'ya göre düşük düzeyde yani FPKM (fragments per kilobase per million mapped reads) değerlerine göre protein kodlayan genlerin yaklaşık 1/10 oranında eksprese edilmektedir. Düşük miktardaki RNA'lar RNA-Seq (RNA dizileme) ile güvenilir şekilde ölçülemez ve zenginleştirmeye ihtiyaç duyulmaktadır. Bu yöntem ile güçlü ifade edilen transkriptler genellikle %20 veya daha az bir hata ile güvenilir şekilde ölçülebilir. Pek çok gen ve transkriptleri tespit etmek için 100 milyon okuma yeterlidir fakat gen ekspresyon düzeylerinin çoğu (%72) için 500 milyon okuma gereklidir. Artmış okuma derinliği yüksek eksprese edilen transkriptlerin duyarlılığı üzerine etkili iken ekspresyonu az olan transkriptlerin görece

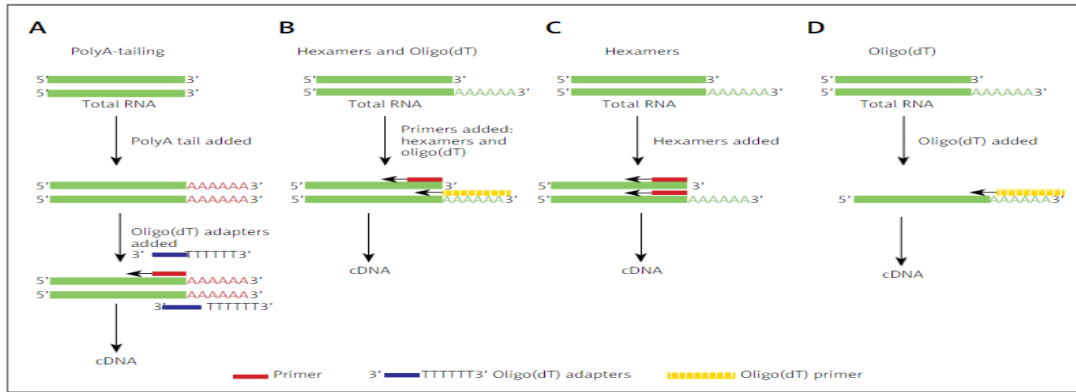
duyarlılığını deęiřtirmedięi bildirilmiřtir. Ayrıca dūřuk ekspresyon seviyelerine sahip transkriptler için standart sapma daha yūksektir. RNA-Seq’de transkriptlerin %7’si tūm okuma dizilerinin %75’ine hakim olmaktadır. Bu durum bazı dūřuk miktardaki lncRNA ekspresyon dūzeylerinin, pratik okuma derinliklerinde veya ultra derin okumalarda bile tam olarak ōlūlemeyeceęini gōstermektedir. Microarray yōntemi dūřuk miktarda RNA’lar için RNA-Seq’e gōre daha iyi bir yōntemdir. RNA-Seq ile 1.000-4.000 kadar lncRNA tespit edilebilirken Microarray aracılıęı ile yaklařık 7.000-12.000 lncRNA tespit edilebilmektedir. Bu nedenle Microarray teknolojisi RNA-Seq’e gōre birçok avantaja sahiptir ve sıklıkla tercih edilir. RNA-Seq yōnteminin cazip tarafından biri ise yeni transkriptleri keřfetmesidir. Microarray sadece bilinen dizilerin ekspresyonunu ōlerken RNA-Seq hem bilinen hem de bilinmeyen diziler ōzerinde çalıřmaktadır. Ancak RNA-Seq, immatur transkriptleri yanlıřlıkla yeni transkript olarak raporladıęı için matur bir teknoloji olmaktan uzaktır [95].

Microarray	RNA-Seq
Dūřuk miktarda RNA, dizi spesifik problemler ile hibridize edilir.	Yūsek miktar RNA okumaları dūřuk miktar RNA okumaları ile yer deęiřtirir ve dūřuk dūzey gen ekspresyonda doęruluk azalır.
Dūřuk miktarda bulunan lncRNA’lar için hassasiyet ve doęruluęu daha iyidir.	Dūřuk miktardaki RNA’lar için duyarlılık daha azdır.
Önemli bir lncRNA grubu olan antisense lncRNA’ları zincir spesifik olarak tespit eder	Tespit edemez
Yūsek dūzeyde ōrnek iřleme verimi ile būyūk ōrnekleri içeren arařtırmalar için ōnemlidir.	Bir seferde birak ōrneęi iřleyebilir ve gerekli zaman uzar.
Basit ve gūvenilir RNA sentez ve etiketleme yōntemidir.	Uсталık isteyen/ karmařık NGS kūtūphane hazırlama
Daha az yoęunlukta bilgisayar uęrařı ve biyoinformatik desteęe daha az ihtiyaç	Yoğun hesaplama ve biyoinformatik desteęe ihtiyaç var
En gūncel lncRNA koleksiyonları ve transkript varyant tasarımlarını kapsar	Yeni transkript tespiti sağlar ancak immatur RNA’lar yeni transkriptler olarak karıştırılabilir.
Kurulmuř bir sistem	Matur bir teknoloji değildir

Tablo 2.6: lncRNA ekspresyon profili; Microarray ve RNA-Seq karşılaştırma[95].

Eş Zamanlı Niceliksel Polimeraz Zincir Reaksiyon Metodu (qRT-PCR)

İdeal biyobelirteç özellikleri; kolay elde edilmesi, kaynak çeşitliliği, ölçüm yönteminin kolaylığıdır ve lncRNA'lar bu özellikleri karşılamaktadır. Düzenleyici RNA sınıfından olan lncRNA'lar yeni bir potansiyel biyobelirteçdir. lncRNA çalışması için birçok metod mevcut ancak en sık kullanılan SYBR-green boya ve TaqMan problemlere dayalı qRT-PCR'dır. qRT-PCR ve microarray metodları sadece bilinen lncRNA transkriptlerini tespit edebilmektedir. Ayrıca qRT-PCR yöntemi standart değildir. cDNA hazırlamak için i) poli-A kuyruğu ve adaptör bağlama adımları öncesinde random hekzamer primer, ii) random hekzamer primerler ve oligo(dT) karışımı, iii) sadece random hekzamer primerler, iv) sadece oligo(dT) içeren kitler ile farklı yöntemler kullanılabilir (Şekil 2.28). Araştırma grupları farklı primerler, referans genler ve amplifikasyon stratejileri kullanmakta ve bu durum bazen sonuçları kıyaslamayı imkansız hale getirmektedir. lncRNA ölçümünde zorlukların bazıları, uzunluk, CG içeriği ve molekül katlanması gibi moleküler yapı özelliklerini içermektedir. Saç tokası dükümleri gibi ikincil yapılar cDNA sentezi için sorunludur ve bu durumda lncRNA'nın gevşemesi için daha fazla ısıya ihtiyaç vardır. lncRNA'ların stabilitesi ve bütünlüğü qRT-PCR ölçümünde etkilidir. lncRNA'lar uzunluklarından dolayı daha az stabil ve kısa RNA'lara göre daha kolay degrade olmaktadır. Fakat bazı lncRNA'ların miRNA'lardan daha kararlı olduğu da bildirilmiştir. Degradasyon RNA yapısında değişikliklere ve RNA tespitini etkileyen kısa RNA moleküllerinin miktarının artmasına neden olarak qRT-PCR ölçümünü etkilemektedir. Ancak total RNA yüksek oranda degrade olsa bile incelenen RNA'ların çoğunun kararlı olduğu ve qRT-PCR ile ölçülebildiği gösterilmiştir [96].



Şekil 2.27: qRT-PCR yönteminde farklı kitlerinin karşılaştırılması [96].

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışma prospektif bir klinik çalışma olmakla birlikte Adıyaman Üniversitesi Tıp Fakültesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'nun 18/09/2018 tarih ve 2018/6-4 sayılı kararı ile etik kurul onayı (EK 1) alınarak Adıyaman Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik, Kardiyoloji ve Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalları ile ortaklaşa gerçekleştirilmiştir. Adıyaman Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi Başkanlığının TIPFTUP/2018-0001 sayılı kararı ile çalışma desteklenmiştir.

3.1. ÇALIŞMA GRUBU

T.C Sağlık Bakanlığı Adıyaman Üniversitesi Eğitim ve Araştırma Hastanesi Kardiyoloji Bölümüne Aralık 2018 – Şubat 2019 tarihleri arasında KAH ön tanısı ile kabul edilerek tanı ve tedavi amaçlı koroner anjiyografi yapılan olgulardan koroner anjiyografisi normal olan ($<50\%$ darlık, non obstrüktif) 45 olgu ile koroner arterlerinde kritik darlık ($>50\%$ darlık, obstrüktif) saptanarak KAH tanısı alan 45 olgu olmak üzere toplam 90 olgu çalışma kapsamına dahil edilmiştir.

Herhangi bir miyokard enfarktüsü, kardiyak revaskülarizasyon veya önceden bilinen KAH geçmişi olup stabil anjini olan hastalar, kardiyak enzimleri artmış hastalar, serebrovasküler hastalık öyküsüne sahip olgular, kalp yetmezliği, böbrek yetmezliği, hepatik hastalık, yeni veya tedavi edilmiş kanser tanısı alan hastalar ve ciddi akut enfeksiyonu veya aktif kronik inflamatuvar hastalığı bulunan hastalar çalışma dışında tutulmuştur.

Genetik çalışmalar için bilgilendirilmiş gönüllü olur formu (EK 2) her hasta için doldurulup imzalandıktan sonra çalışmaya katılmayı ve örnek vermeyi kabul eden hastalardan koroner anjiyografi işlemi sırasında iki adet EDTA'lı tüplere 3'er ml periferik kan örneği alınmıştır. Çalışmaya alınan hastaların yaş, cinsiyet gibi demografik özellikleri yanında KAH için bilinen risk faktörlerinden olan hipertansiyon, diabetes mellitus, hiperlipidemi, sigara ve aile öyküsü sorgulanarak bilgiler kaydedilmiştir. Koroner arter tutulumu olup olmamasına göre hastalar normal ve koroner arter hastası olmak üzere iki gruba ayrılarak sınıflandırılmıştır.

3.2. VERİ TOPLAMA ARAÇLARI

3.2.1. Kullanılan Cihaz ve Aletler

EDTA'lı tüplerde ki kan örneklerinin -86°'de depolanması, RNA izolasyonu, cDNA dönüşümü, Real Time ekspresyon çalışması ve verilerin istatistiksel analizi için çalışmada Tıbbi Genetik Anabilim Dalına bağlı Genetik Tanı Merkezi Laboratuvarlarında aşağıdaki tabloda bulunan cihazlar ve aletler kullanılmıştır.

Tablo 3.1: Projede Kullanılan Makine - Teçhizat listesi

Adı/Modeli	Projede Kullanım Amacı
Derin dondurucu (-86°C) / Operon	Periferik kan, serum, RNA, cDNA muhafazası
Rotor-Gene Q Real Time PCR cihazı / Qiagen	Gerçek zamanlı Amplifikasyon
Thermal Cycler (Isı döngüleyici) Cihazı / SensoQuet	Revers Transkripsiyon ile cDNA dönüşümü ve Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)
Buzdolabı (-20°C) / Vestel	Kit, solüsyon ve kimyasalları saklamak
Buzdolabı (+4°C) / Vestel	Kit, solüsyon ve kimyasalları saklamak
Güç Kaynakları / Necron, Esispower	Cihazlara güç sağlamak
Spektrofotometre / Thermo Scientific Nanodrop	Nükleik asit (RNA) konsantrasyon ve saflık ölçümü
Vortex / Pro	Santrifüj tüplerindeki sıvıları karıştırmak
Masaüstü Soğutmalı Santrifüj / Eppendorf – 5424 R	Çöktürme ve ayırma işlemi
Mikrosantrifüj / Hettich Zentrifugen	Çöktürme ve ayırma işlemi
UV Sterilizasyon Kabini / Cleaver	Steril ortam sağlamak
Sterilizatör / Electro-mag	Sterilizasyon
Laminar Air Flow / Nuair	Çalışma ortamının sterilizasyonu ve homojenliğini sağlamak
Ultra Saf Su Cihazı / Direct-Q	Solüsyonların hazırlanması ve yıkama işlemleri
Mikropipet setleri (1-10 µl, 10-100 µl ve 100-1000 µl) / Axygene, Isolab	Belirli miktarlardaki sıvıları aktarmak
Masa Üstü Bilgisayar / Exper	Analiz programının kullanımı ve verilerin kaydedilmesi
Renkli Yazıcı / Lexmark	Çıktı almak

3.2.2 Kullanılan Sarf Malzemeleri ve Kimyasallar

RNA izolasyonu, cDNA dönüşümü, Real Time ekspresyon çalışması için aşağıdaki sarf malzemeleri ve kimyasallar kullanılmıştır.

- Steril eldiven
- 3ml'lik vakumlu EDTA'lı tüpler
- 15 ml'lik steril (DNase, RNase free) falkon tüpleri
- 2 ml'lik steril toplama tüpleri (DNase, RNase free)
- Steril Filtreli Pipet Uçları (10-100-1000 µl'lik)
- GeneJET Stabilized and Fresh Whole Blood RNA Kit (Taze/Dondurulmuş tam kan RNA izolasyon kiti / Thermo Scientific LOT: 00776892)
 - GeneJET RNA saflaştırma kolonu: RNA'ların karışımdan toplanması
 - Lysis Buffer: Hücreleri endojen RNazlardan koruyan guanidin tiyosiyanat içeren bir tampon içinde parçalanması
 - Etanol: Silika membrana RNA bağlanmasını kolaylaştırmak için
 - DNase Master Mix: Genomik DNA'nın enzimatik olarak uzaklaştırılması
 - Wash Buffer 1 ve 2: Kirlilikleri ortadan kaldırıp RNA'ların saflığının artması ve saflaştırma kolonuna daha iyi yapışması
 - Beta merkaptotanol: Disülfid bağlarını kopararak proteinlerin uzaklaştırılması için
- RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (cDNA dönüşüm kiti / Thermo Scientific LOT: 0511812)
 - 5x Reaction Buffer: RNA'ların cDNA'ya seçici olarak dönüşümü için kullanılan tampon.
 - RiboLock RNase Inhibitor: RNA şablonlarını bozulmaya karşı korur.
 - 10nM dNTP mix: dNTP'leri içerir

- RevertAid Reverse Transcriptase: RNA kalıbından cDNA sentezi için gerekli bir rekombinat ters transkriptaz enzimidir.
- Random Hexamer Primer: cDNA sentezi için primer olarak görev yapmak üzere hedef DNA veya RNA üzerindeki random tamamlayıcı bölgelere bağlanan kısa oligonükleotitlerdir.
- RealQ Plus 2x Master Mix Green, Without ROX PCR Kit (Kantitatif Real Time ekspresyon kiti / Ampliqon. Cat. No: A323402)
- TEMPase Hot Start DNA Polymerase
- dNTP'leri ve green dye içeren optimize edilmiş tampon
- Strip Tüpler ve Başlıklar 0.1 ml'lik qRT-PCR tüpleri
- Özel Tasarlanmış Özgün Primerler (lncRNA primerleri / Prizma Laboratuvar)
 - MEG3
 - MALAT1
 - MIAT
 - MCM-3AP-AS1

3.3. YÖNTEMLER

Periferik kan örneklerinin -86°C'de saklanması, total RNA izolasyonu, cDNA dönüşümü ve real time ekspresyon analizi yöntemleri kullanılarak aşağıdaki çalışma basamakları sırasıyla izlenmiş ve 90 örnek için tüm protokoller uygulanarak veriler elde edilmiştir.

3.1.1. Periferik Kan Örneklerinin Depolanması

Çalışma grubundaki olgulardan iki adet EDTA'lı tüplere alınan periferik kan örnekleri soğuk zincir taşıma ile Adıyaman Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Tanı Merkezindeki laboratuvarlara süratle taşınarak 15 ml'lik steril falkon türlerine aktarılmıştır. Aktarım sonrası falkon tüpleri -86°C derin dondurucuda depolanmıştır.

3.3.2. RNA İzolasyonu

Dondurulmuş periferik kan örneklerinden total RNA izolasyonu için Thermo Scientific GeneJET stabilize edilmiş tam kan RNA kiti kullanıldı. Dondurulmuş tam kandan total RNA izolasyon çalışma protokolü şu şekilde yapıldı:

1. Örnekler -86°C'den çıkarılarak +4°C'de çözünmesi sağlandı.
2. Falcon tüplerinden 250 µl tam kan örneği alınarak 2ml'lik toplama tüplerine konuldu ve üzerine 250 µl Lysis Buffer eklenerek vortekslendi, homojen olması için tüp alt üst edilerek birkaç dakika oda sıcaklığında inkübe edildi.
3. Karışım üzerine 250 µl etanol eklenerek pipet/vorteks ile karıştırıldı.
4. Toplama tüpüne yerleştirilen GeneJET RNA saflaştırma kolonuna hazırlanan 750 µl'lik (kolona bir defada yüklenebilecek maksimum örnek miktarı 750 µl'dir) lizat aktararak 11.000 rpm'de 30 sn santrifüj edildi. Kolonun altındaki toplama tüpü içinde biriken solüsyonla birlikte atıldı ve yeni bir toplama tüpü yerleştirildi.
5. Saflaştırma kolonu üzerine 700 µl Wash Buffer 1 eklenerek 11.000 rpm'de 30 sn santrifüj edildi. Alttaki toplama tüpü atıldı ve yeni tüp yerleştirildi.
6. Saflaştırma kolonuna 700 µl Wash Buffer 2 eklenerek 11.000 rpm'de 1 dk santrifüj edildi. Santrifüj sonrası alttaki toplama tüpünde biriken sıvı döküldükten sonra tüp kolonun altına tekrar yerleştirilerek kullanıldı.
7. Genomik DNA'yı uzaklaştırmak ve daha saf RNA elde etmek için hazırlanan 100µl'lik DNase Master Mix saflaştırma kolonu üzerine eklenerek oda sıcaklığında 7 dk inkübe edildi.
8. Saflaştırma kolonuna 500 µl Wash Buffer 1 eklenerek 11.000 rpm'de 30 sn santrifüj edildi. Toplama tüpünde biriken sıvı dökülerek tüp tekrar kullanıldı.
9. Saflaştırma kolonuna 700 µl Wash Buffer 2 eklenerek 11.00 rpm'de 30 sn santrifüj edildi, toplama tüpünde biriken sıvı dökülerek tüp tekrar kullanıldı.
10. Saflaştırma kolonuna 500 µl Wash Buffer 2 eklenerek 11.000 rpm'de 1 dk santrifüj edildi. Alttaki toplama tüpü atılıp yenisi yerleştirilerek maksimum hızda (>14.000 rpm) 1 dk santrifüj edildi. Alttaki toplama tüpü atıldı ve saflaştırma kolonu 1,5 ml'lik RNase free mikro santrifüj tüpüne aktarıldı.
11. 19 µl RNaz içermeyen su saflaştırma kolonunun merkezine direkt olarak eklendi. 3 dk oda sıcaklığında beklendikten sonra maksimum hızda 1 dk santrifüj edildi.

12. RNA konsantrasyonunu artırmak için elde edilen elüsyon tekrar aynı saflaştırma kolonuna yüklenerek 3 dk oda sıcaklığında beklendikten sonra maksimum hızda 1 dk santrifüj edildi.
13. 1,5 ml'lik RNase free mikro santrifüj tüpü içinde biriken RNA'nın konsantrasyon ve saflığı Nanodrop Spektrofotometre cihazı ile ölçüldü.
14. Elde edilen total RNA'lar -86°C'de saklanmak üzere derin dondurucuya aktarıldı.

NOT: Periferik tam kan örneklerinden elde edilen RNA konsantrasyon ve saflığı hücre ve doku hatlarından elde edilen sonuçlara göre daha düşük değerlerde bulunmaktadır. Ancak bu konsantrasyon ve saflık dereceleri kantitatif real time ekspresyon çalışmaları için yeterli olmaktadır.

3.3.3 cDNA Dönüşümü

İzole edilen total RNA örneklerinden RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit kullanılarak cDNA (complementary DNA, tamamlayıcı DNA) dönüşümü gerçekleştirildi. cDNA dönüşümü ters transkriptaz enzimi, dNTP'ler ve random primerler kullanılarak real time ekspresyonunda kullanılabilecek şekilde kit içeriği aracılığıyla yapıldı. lncRNA'lar 5x Reaction tamponu ile reaksiyon sırasında dNTP (deoksiribonükleotid trifosfat)'ler ve random heksamer primerler eklenerek ters transkriptaz enzimi aracılığı ile cDNA'ya dönüştürülür. Oluşan cDNA daha sonra spesifik lncRNA ekspresyon profili için real-time PCR reaksiyonunda kullanılır.

cDNA dönüşümü aşağıdaki protokol izlenilerek yapıldı.

1. RNA soğuk blok üzerine alınarak çözünmeye bırakıldı.
2. Tüm kit içeriği ısı ve sıcaktan etkilenmemesi için karanlık ortamda kutu içinde ve bazı malzemeler kullanım talimatına uygun olarak buzdolabında -20°C'de saklandı. Sadece çalışma sırasında çıkarılarak oda sıcaklığında çözünmesi sağlandı.
3. Her bir örnek için Tablo 3.2'de belirtildiği gibi 5x Reaction tampodan 4 µl, RiboLock RNase inhibitörden 1 µl, 10 mM dNTP karışımından 2 µl, RevertAid ters transkriptaz enziminden 1 µl ve Random Hexamer primerden 1 µl olacak şekilde hesaplanarak ters transkriptaz reaksiyonu karışımı soğuk blok üzerinde hazırlandı.

4. Ters transkriptaz karışımına 11 µl RNA eklenerek pipetaj ile iyice karışması sağlandı. (Son hacim 20 µl oldu).

Tablo 3.2: cDNA dönüşümü için kullanılan bileşenler ve miktarları

Bileşenler	Tepkime Hacmi
5x Reaction Buffer	4 µl
RiboLock RNase Inhibitor	1 µl
10 mM dNTP mix	2 µl
RevertAid Reverse Transcriptase	1 µl
Random Hexamer Primer	1 µl
Kalıp RNA	11 µl
Total Hacim	20 µl

5. 25°C’de 5 dk inkübasyon

42°C’de 1 saat

4°C’de bekleme olacak şekilde PCR protokolü ayarlandı ve RNA örnekleri thermal cycler (Şekil 3.1) cihazına yüklendi.



Şekil 3.1: Thermal Cycler Cihazı (SensioQuest)

6. Cihazdan çıkarılan cDNA’lar kullanım ömürlerini uzatmak için - 86°C’de saklandı.

3.3.4. qRT-PCR (Quantitative Real-Time PCR, Eş Zamanlı-PCR)

Real-Time PCR reaksiyonu, RealQ Plus 2x Master Mix Green Without ROX kiti ve tasarlanmış spesifik primerler kullanılarak gerçekleştirildi. qRT-PCR için aşağıdaki işlemler yapıldı:

1. Çalışma örneklerinden ateroskleroz ve anjiyogenez sürecinde rolleri olduğu bilinen genlerle ilişkili lncRNA ekspresyonlarının ölçümü amacıyla *NLRP3* ve *VEGFR2* geni için *MEG3*, *VEGF* geni için *MALAT1* ve *MIAT* ve *KLF5* geni için *MCM3AP-AS1* lncRNA'ları seçildi.

Tablo 3.3: Hedef lncRNA'lar ve ilişkili oldukları genler

Hedef lncRNA	NONCODE ID	İlişki Kurulacak Gen
MEG3	NONHSAT039746.2	VEGFR2, NLRP3
MALAT1	NONHSAT229865.1	VEGF
MIAT	NONHSAT192181.1	VEGF
MCM3AP-AS1	NONHSAT083039.2	KLF5

2. Hedef lncRNA'lar seçildikten sonra ilgili lncRNA primerleri (Tablo 3.4) sipariş edildi. Real time ekspresyon çalışması öncesinde primerler kullanıma hazır hale getirildi. Hazırlanan primerler -20°C'de saklandı.

Tablo 3.4: Hedef lncRNA primer dizileri

Hedef lncRNA	Ürün Kodu	NONCODE ID	Primer dizisi
MEG3	52205	NONHSAT039746.2	5' ATCCGTCCACCTCCTTGCT 3'
MALAT1	52209	NONHSAT229865.1	5' GACGGAGGTTGAGATGAAGC 3'
MIAT	52214	NONHSAT192181.1	5' CAAAGAGCCCTCTGCACTAG 3'
MCM3AP-AS1	52215	NONHSAT083039.2	5' GCTGCTAATGGCAACACTGA 3'

3. Her bir örnek için tablo 3.5'de belirtildiği gibi Real-time ekspresyon çalışması için RealQ Plus 2x Master Mix Green'den 6,25 µl, spesifik forward ve reverse primerlerden 0,3 µl ve RNaz içermeyen sudan 4,65 µl olmak üzere örnek sayısı kadar hesaplanarak soğuk blok üzerinde reaksiyon karışımı hazırlandı. Her bir örnek için 0.1 ml'lik strip tüplerine 11,5 µl reaksiyon karışımı ve önceden hazırlanmış ilgili

cDNA'dan 1 µl eklenerek pipetaj yapıldı ve tüplerin kapakları kapatılarak reaksiyona hazır hale getirildi. Mevcut dört farklı lncRNA için tüm işlemler ayrı ayrı gerçekleştirildi.

Tablo 3.5: qRT-PCR için kullanılan bileşenler ve miktarları

Bileşenler	Hacim
RealQ Plus 2x Master Mix Green	6.25 µl
Spesifik Forward Primer	0.3 µl
Spesifik Reverse Primer	0.3 µl
RNaz içermeyen su	4.65 µl
cDNA	1 µl
Toplam Hacim	12,5 µl

4. Strip tüplerinde hazırlanan her bir örnek qRT-PCR Rotor Gene (Qiagen) cihazı motor diskindeki kuyucuklara sırası ile yerleştirildikten sonra Rotor-Gene Q Series Software 2.1.0 programında da örnek sıra numaralarına ilgili lncRNA ve örnek isimleri yazılarak kaydedildi.



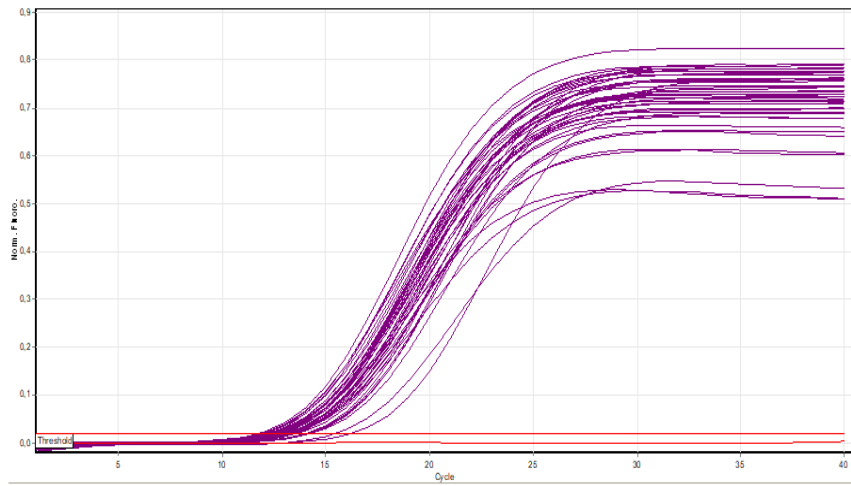
Şekil 3.2: Real-Time PCR amplifikasyon cihazı (Qiagen Rotor-Gene Q)

5. Real-time PCR işlemi için Tablo 3.6'da gösterildiği gibi qRT-PCR tepkime koşullarına göre program ayarları kaydedildi. 95°C'de 15 dakika süreyle başlangıç aktivasyon (Taq DNA Polimeraz aktivasyonu) aşamasından sonra 95°C'de denatürasyon, 61°C'de 30 saniye süreyle bağlanma, 72°C'de 30 saniye süreyle uzama (floresan ışımlar green kanalında bu aşamada toplanmaktadır) olacak şekilde 40 döngüde qRT-PCR işlemi bitirildi.

Tablo 3.6: qRT-PCR Tepkime Koşulları

Sıcaklık	Zaman
95°C	15 dk
95°C	20 sn (40 döngü)
61°C	30 sn (40 döngü)
72°C	30 sn (40 döngü)

6. qRT-PCR işlemi sonrasında CT (cycle threshold) (CT değerleri; Real-time PCR deneyinde floresan sinyal birikiminin tespit edilmesi için gereken minimum eşik değerinin geçildiği döngü sayısı olarak tanımlanır) değerleri her bir örnek için kontrol edildikten sonra verilerin istatistiksel değerlendirilmesine geçildi. Örneklerin yüklendiği her bir kuyucuk için floresan ışımaları ve hesaplanan CT değerleri tek tek incelendi. CT değerlerinin doğruluğunu göstermek için Erime Eğrisi (Melt Curve) analizi yapıldı. Primer çiftleşmesi veya spesifik olmayan PCR ürünleri çalışma sonuçlarından çıkarıldı. Negatif kontrollerin eğri oluşturup oluşturmadığına ve erime eğrisine bakıldı. Tekrar edilmesi gereken çalışmalar için qRT-PCR işlemi tekrar yapıldı. Tekrar deneyleri de tamamlandıktan sonra kontroller yapılarak tüm çalışmalar için threshold değerleri aynı olacak şekilde ayarlanarak nihai CT değerleri hesaplandı ve veriler analiz dosyasına kaydedildi.



Şekil 3.3: qRT-PCR amplifikasyonu sırasında floresan sinyal eğrilerinin görünümü

3.4. VERİLERİN İSTATİSTİKSEL DEĞERLENDİRİLMESİ

1. Real-time PCR çalışmaları tamamlandıktan sonra kaydedilen CT değerleri hasta ve kontrol grubu olmak üzere iki çalışma grubu için örnekler yan yana olacak şekilde gruplandırıldı ve her örnek için CT değerleri bir sütunda olacak şekilde tablo oluşturuldu. Hedef lncRNA'lar da satırlara yan yana olacak şekilde sıralandı ve tabloda her örnek için karşısına hedef lncRNA'nın CT değeri yazıldı. CT değeri için cut off değeri 35 olarak alındı. CT değeri 35 ve altı olan örneklerin eksprese olduğu kabul edildi. Hiç amplifikasyon eğrisi oluşturmeyen örnekler 'None' olarak belirtildi ve eksprese olmadığı kabul edildi. CT değeri 35 ve üzerinde olanlar ise cut off değerinin dışında kaldığından anlamsız olarak kabul edildi.

2. Ekspresyon analizi için $\Delta\Delta CT$ formülü kullanıldı. Bu metoda göre $2^{-\Delta\Delta CT}$ ($\Delta\Delta CT = CT(\text{hedef gen}) - CT(\text{referans gen})$) formülü ile referans ve hedef genin CT değerleri arasındaki katlı değişimler (fold change) hesaplandı.

3. Elde edilen değerlerin dağılımlarının analizi için Kolmogorov Smirnow ve Shapiro-Wilk normality testleri kullanılmıştır. İkili karşılaştırmalarda normal dağılım gösterenler için student t testi, normal dağılım göstermeyenler için non-parametrik Mann Whitney U testi kullanılmıştır.

4. Çalışma gruplarının demografik özellikleri ve klinik bulgularında (hipertansiyon, Diabetes mellitus, hiperlipidemi, sigara ve aile öyküsü) görülen değişkenleri karşılaştırmak için χ^2 (ki-kare) testi kullanıldı. İstatistiksel analiz için IBM SPSS Statistic 22 istatistik programı kullanıldı.

5. Çalışma grupları arasındaki lncRNA ekspresyon düzeylerinin karşılaştırılmasında ve grupların demografik özelliklerinin ve klinik bulgularının lncRNA ekspresyonları ile ilişkisinin istatistiksel olarak değerlendirilmesinde, değerler normal dağılım göstermediği için Mann Whitney U testi kullanıldı. Bu istatistiksel analizler için GraphPad Prism6 istatistik programı kullanıldı.

6. Tüm istatistiksel analizlerde çift yönlü $p < 0.05$, $p < 0.01$ veya $p < 0.001$ değerleri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

4.1. ÇALIŞMA GRUPLARININ GENEL ÖZELLİKLERİ

Çalışma grupları belirlenirken koroner anjiyografi sonucu normal olan (<%50 darlık, non-obstrüktif) 45 olgu ‘Kontrol grubu’, koroner arterlerinde kritik darlık saptanıp (≥ %50 darlık, obstrüktif) KAH tanısı olan 45 olgu ‘Hasta grubu’ olarak kabul edildi. Toplam 90 olgunun demografik özellikleri Tablo 4.1’de özetlenmiştir.

Tablo 4.1: Çalışma gruplarının klinik ve demografik özellikleri

Demografik özellikler	Kontrol		Hasta		p değeri (χ ² testi)
	n=45	% Frekans	n=45	% Frekans	
Yaş (ort±SS)	55.40±10.73		61.98±10.66		0.0045
Cinsiyet	Kadın	18 40,00	17 37,78		0.8288
	Erkek	27 60,00	28 62,22		
Diabetes Mellitus	Var	7 15,56	23 51,11		0.0003
	Yok	38 84,44	22 48,89		
Hipertansiyon	Var	15 33,33	24 53,33		0.0556
	Yok	30 66,67	21 46,67		
HiperLipidemi	Var	14 31,11	30 66,67		0.0005
	Yok	31 68,89	15 33,33		
Sigara Kullanımı	Evet	18 40,00	17 37,78		0.8288
	Hayır	27 60,00	28 62,22		
Aile Öyküsü	Evet	19 42,22	26 57,78		0.336
	Hayır	26 57,78	19 42,22		

Ort:ortalama, SS:Standart Sapma

Hasta ve kontrol grupları arasında demografik veriler karşılaştırıldığında, hastalığa yatkınlık oluşturan bazı risk faktörleri anlamlı farklılık göstermektedir. Bu karşılaştırmalar için χ² (ki-kare) testi kullanılmış ve test sonuçlarına göre, Diabetes Mellitus (p=0.0003) ve hiperlipidemi (p=0.0005) hasta grubunda anlamlı olarak daha yüksek bulunmuştur. Kontrol grubuna kıyasla hasta grubunda istatistiksel anlamlı olarak yaş ortalamasının arttığı ve 60 yaş üstünde hastalığın daha sık görüldüğü tespit edilmiştir (p=0.0045). Risk faktörleri arasında bulunan hipertansiyon, cinsiyet, sigara ve aile öyküsü gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (p=0.0556).

4.2. EKSPRESYON ANALİZİ BULGULARI

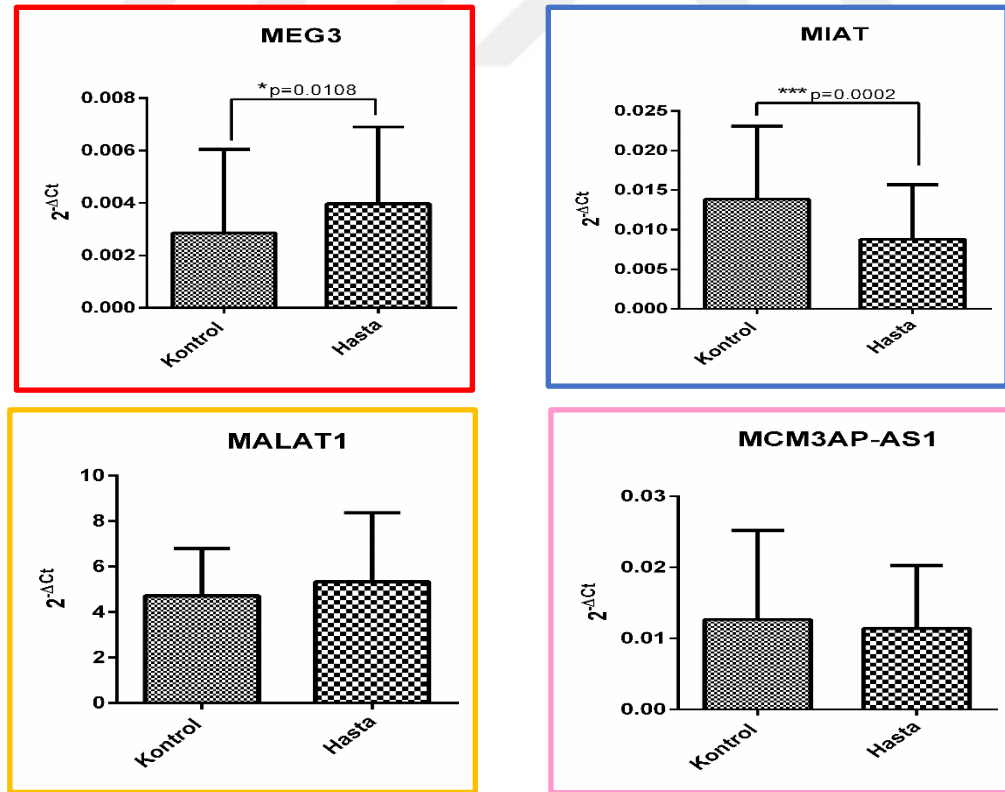
4.2.1. Çalışma Gruplarının lncRNA Ekspresyon Düzeylerinin Karşılaştırılması

$2^{-\Delta Ct}$ değerleri kullanılarak çalıştığımız lncRNA'ların ekspresyon seviyelerinin istatistiksel olarak karşılaştırılmaları aşağıda tablo ve grafik (Tablo 4.2 ve Şekil 4.1) olarak gösterilmektedir.

Tablo 4.2: Çalışma grupları arasında lncRNA ifade değişimlerinin tablo ile gösterimi.

lncRNA Adı	Kontrol (n=45)	Hasta (n=45)	p değeri
MIAT	0.0138±0.0092	0.00879±0.00688	0.0002
MALAT1	4.717±2.093	5.334±3.027	0.3138
MCM3AP-AS1	0.0126±0.0125	0.01142±0.0088	0.7587
MEG3	0.00285±0.0032	0.0039±0.0029	0.0108

Şekil 4.1: lncRNA ifadelerinin gruplar arasında istatistiksel olarak karşılaştırılması

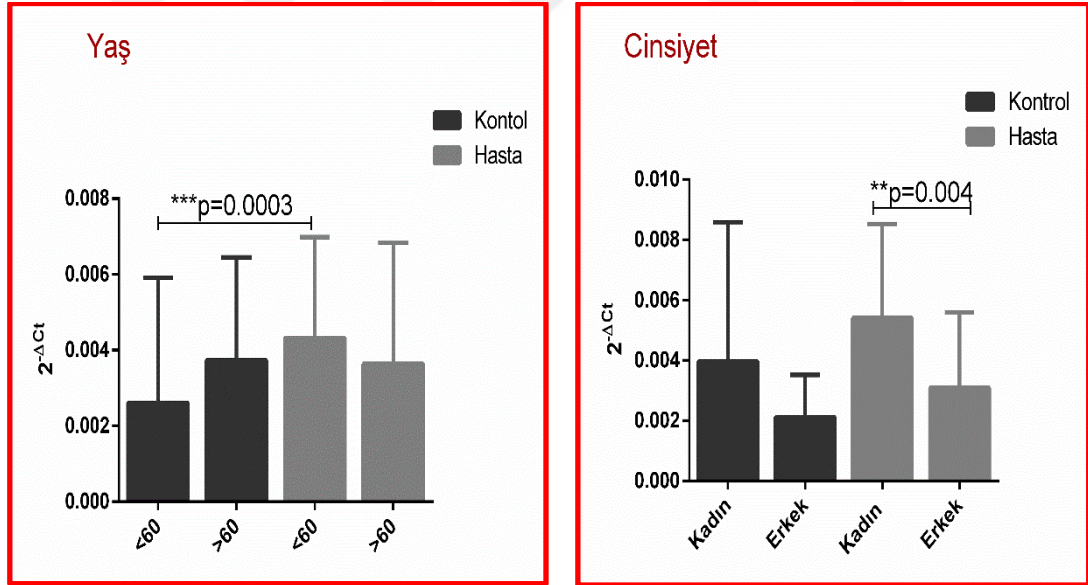


Çalışma gruplarından elde edilen değerler normal dağılım göstermediğinden istatistiksel analiz için non-parametrik Mann Whitney U testi kullanılmıştır. Test sonucuna göre *MEG3* ekspresyon düzeyi hasta grubunda kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksek bulunmuştur ($p=0.0108$). *MIAT* ekspresyon düzeyi ise hasta grubunda kontrol grubuna göre anlamlı olarak düşük bulunmuştur ($p=0,0002$). Sonuç olarak hasta ve kontrol gruplarındaki *MALAT1* ($p=0.3138$) ve *MCM3AP-AS1* ($p=0.7587$) ekspresyon düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık tespit edilmemiştir.

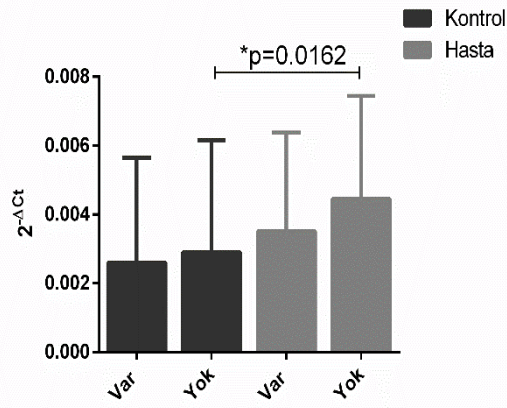
4.2.2. Demografik Özelliklere ve Klinik Bulgulara Göre lncRNA Ekspresyon Düzeylerinin Karşılaştırılması

Çalışma gruplarının demografik özelliklerine ve klinik bulgulara göre lncRNA ekspresyonları istatistiksel olarak incelenmiştir. Gruplar arasındaki ekspresyon düzeylerinin istatistiksel olarak karşılaştırmaları p değerleri ile aşağıdaki şekillerde (Şekil 4.2, Şekil 4.3, Şekil 4.4, Şekil 4.5) ve tablolarda (Tablo 4.3, Tablo 4.4, Tablo 4.5, Tablo 4.6) gösterilmektedir.

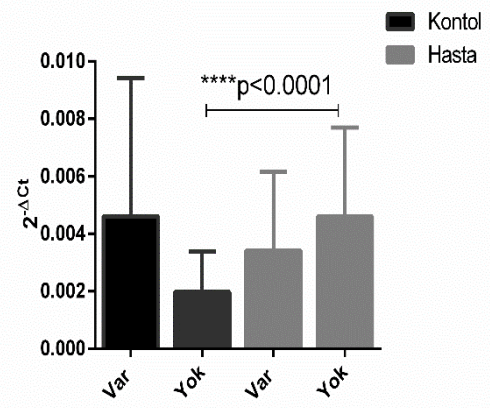
Şekil 4.2: *MEG3* ekspresyonunun demografik-klinik parametreler ile karşılaştırılması.



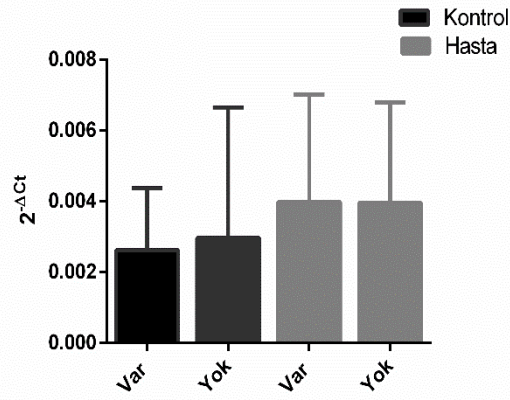
Diabetes Mellitus



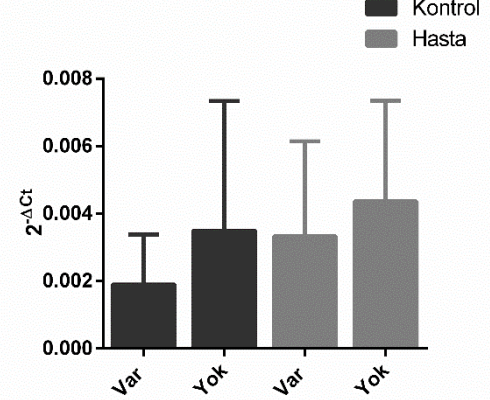
Hipertansiyon



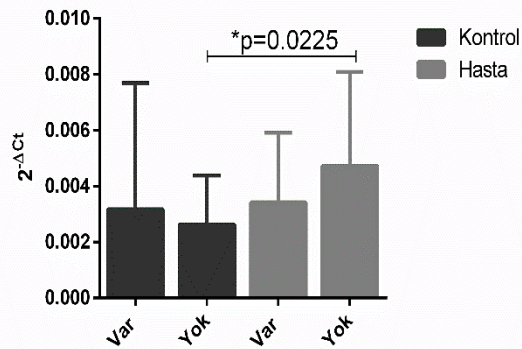
Hiperlipidemi



Sigara Kullanımı



Aile öyküsü



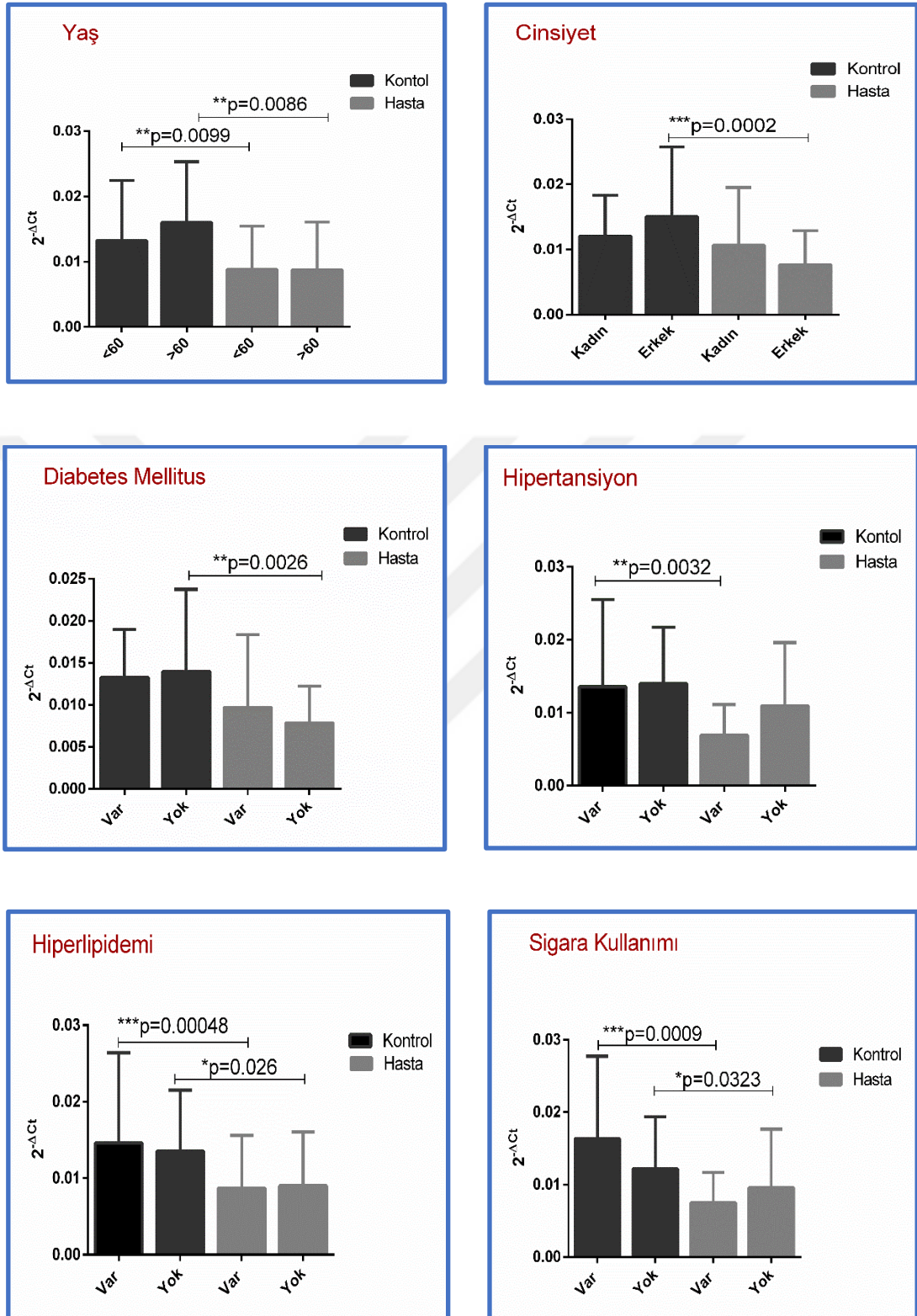
Tablo 4.3: *MEG3* ekspresyonunun demografik-klinik parametreler ile karşılaştırılması.

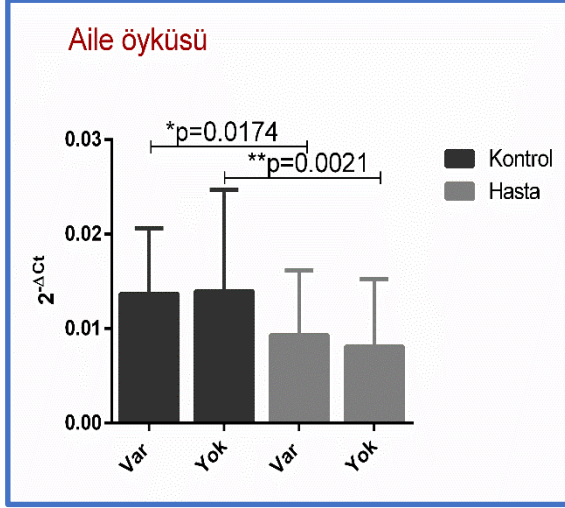
Demografik özellikler		Kontrol (n=45)			Hasta (n=45)			p değeri (kontrolle karşı hasta)*
		Delta (ort±SS)	Ct	p değeri	Delta (ort±SS)	Ct	p değeri	
Yaş	≤60	0.0026±0.0033		0.0991	0.0043±0.0026		0.2526	0.0003
	>60	0.0037±0.0027			0.0036±0.0032			0.7121
Cinsiyet	Kadın	0.003±0.0046		0.40	0.0054±0.0031		0.0040	0.0613
	Erkek	0.0021±0.0014			0.0031±0.0025			0.1551
Diabetes Mellitus	Var	0.0025±0.0030		0.5744	0.0035±0.0028		0.2819	0.2160
	Yok	0.0029±0.0032			0.0044±0.0029			0.0162
HiperTansiyon	Var	0.0046±0.0048		0.0549	0.0034±0.0027		0.0898	0.6552
	Yok	0.0019±0.0014			0.0046±0.0030			<0.0001
Hiperlipidemi	Var	0.0026±0.0017		0.5351	0.00397±0.0030		0.9308	0.1326
	Yok	0.00296±0.0036			0.00395±0.0028			0.1410
Sigara Kullanımı	Evet	0.00189±0.00148		0.1016	0.0033±0.0028		0.1561	0.1251
	Hayır	0.00349±0.0038			0.00436±0.0029			0.0903
Aile Öyküsü	Evet	0.00317±0.0045		0.246	0.00341±0.0025		0.2204	0.1150
	Hayır	0.00262±0.0017			0.00473±0.0035			0.0225

*p değeri kırmızı yazılmış olanlar istatistiksel olarak anlamlı değerlerdir. Ort:ortalama, SS:Standart Sapma

MEG3 ekspresyon düzeyi cinsiyet açısından değerlendirildiğinde hasta erkeklerde hasta kadınlara göre istatistiksel olarak daha düşük bulunmuştur ($p=0.0040$). *MEG3* ekspresyonu DM olmayan hastalarda DM olmayan kontrollere kıyasla ($p=0.0162$) ve HT olmayan hastalarda, HT olmayan kontrollere göre ($p<0.0001$) anlamlı olarak yüksek bulunmuştur. Benzer şekilde *MEG3* ekspresyonu aile öyküsü olmayan hastalarda, aile öyküsü olmayan kontrollere kıyasla anlamlı olarak yüksek bulunmuştur ($p=0.0225$).

Şekil 4.3: *MIAT* ekspresyonunun demografik-klinik parametreler ile karşılaştırılması.





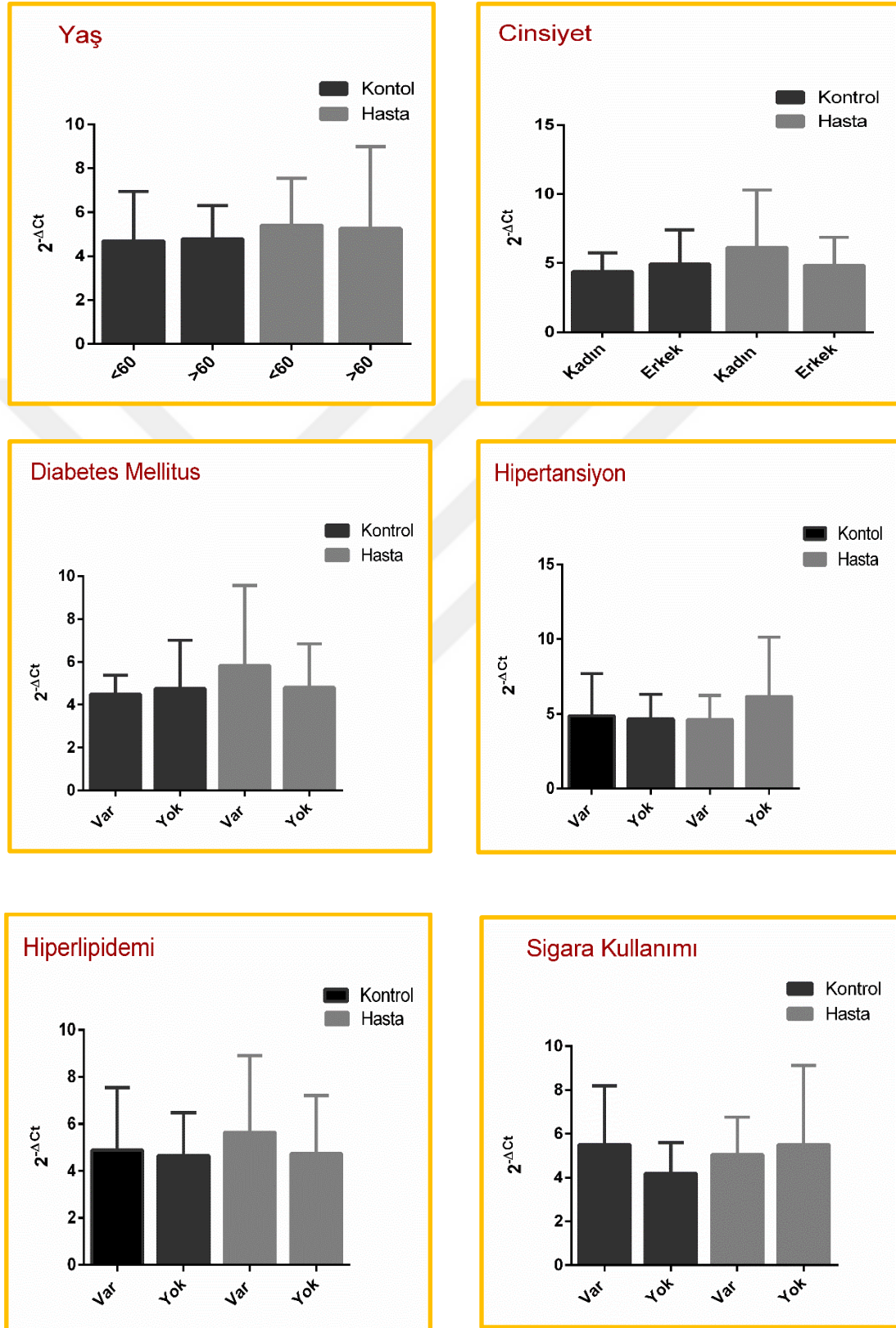
Tablo 4.4: MIAT ekspresyonunun demografik-klinik parametreler ile karşılaştırılması.

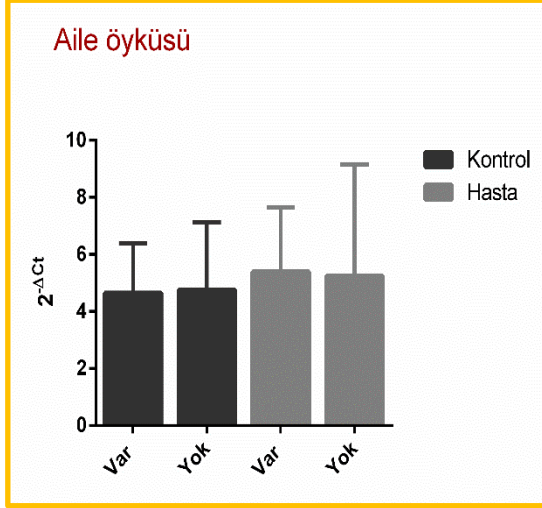
Demografik özellikler		Kontrol (n=45)		Hasta (n=45)		p değeri (kontrolle karşı hasta)*
		Delta Ct (ort±SS)	p değeri	Delta Ct (ort±SS)	p değeri	
Yaş	≤60	0.0132±0.0092	0.2616	0.0088±0.0066	0.4610	0.0099
	>60	0.0160±0.0093		0.0087±0.0072		0.0086
Cinsiyet	Kadın	0.012±0.006	0.540	0.1065±0.0088	0.4354	0.2423
	Erkek	0.015±0.010		0.0076±0.0052		0.0002
Diabetes Mellitus	Var	0.013±0.0057	0.7943	0.0096±0.0086	0.7907	0.0614
	Yok	0.0139±0.0097		0.0078±0.0044		0.0026
HiperTansiyon	Var	0.0135±0.012	0.3908	0.0069±0.0041	0.1427	0.0032
	Yok	0.0140±0.0077		0.0109±0.0086		0.0584
Hiperlipidemi	Var	0.0145±0.0118	0.8159	0.0086±0.0069	0.8106	0.00048
	Yok	0.0135±0.0079		0.0090±0.0070		0.026
Sigara Kullanımı	Var	0.0163±0.113	0.1765	0.0075±0.00417	0.9624	0.0009
	Yok	0.0121±0.0071		0.0095±0.0080		0.0323
Aile Öyküsü	Var	0.0136±0.0069	0.6704	0.0093±0.0068	0.4542	0.0174
	Yok	0.0139±0.0107		0.00809±0.0071		0.0021

*p değeri kırmızı yazılmış olanlar istatistiksel olarak anlamlı değerlerdir. Ort:ortalama, SS:Standart Sapma

MIAT ekspresyon düzeyi erkek hastalarda erkek kontrollere kıyasla anlamlı olarak düşük bulunmuştur ($p=0.0002$). Benzer şekilde MIAT ekspresyonu, DM olmayan hastalarda DM olmayan kontrollere kıyasla ($p=0.0026$) ve HT olan hastalarda HT olan kontrollere göre ($p=0.0032$) anlamlı olarak düşük bulunmuştur ($p=0.0026$). Ayrıca hastalık risk faktörlerinden olan hiperlipidemi, sigara ve aile öyküsü hasta grubunda kontrol grubuna kıyasla anlamlı olarak düşük tespit edilmiştir.

Şekil 4.4: *MALAT1* ekspresyonunun demografik-klinik parametreler ile karşılaştırılması.





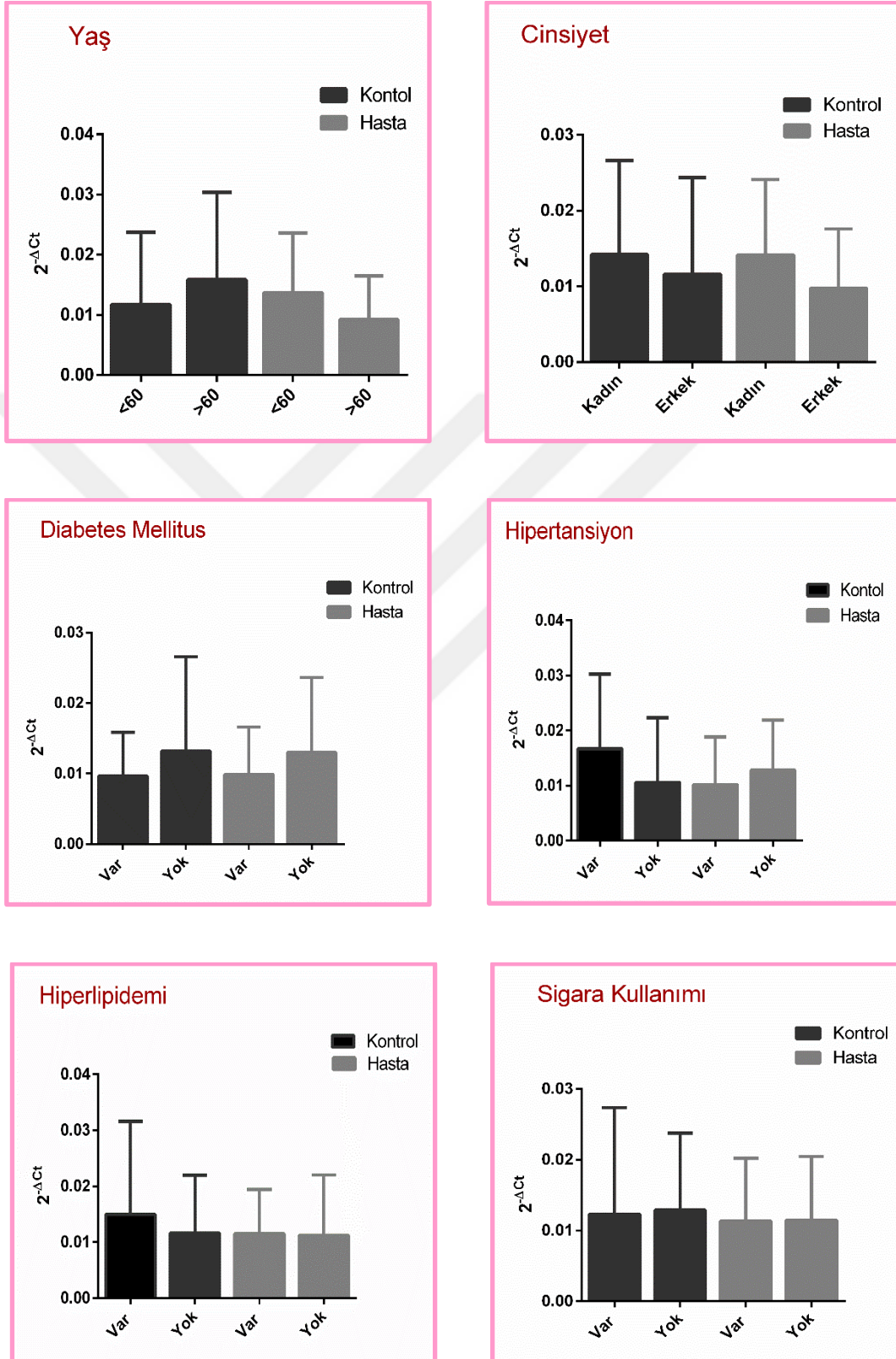
Tablo 4.5: *MALAT1* ekspresyonunun demografik-klinik parametreler ile karşılaştırılması.

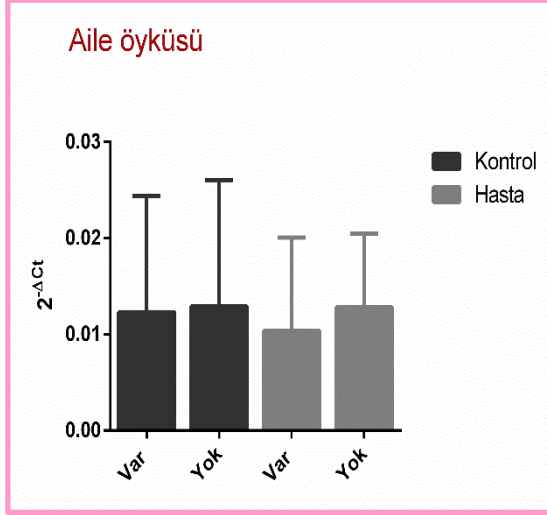
Demografik özellikler		Kontrol (n=45)		Hasta (n=45)		p değeri (kontrole karşı hasta)
		Delta Ct (ort±SS)	p değeri	Delta Ct (ort±SS)	p değeri	
Yaş	≤60	4.696±2.249	0.6538	5.411±2.132	0.2254	0.1133
	>60	4.791±1.517		5.260±3.73		0.6837
Cinsiyet	Kadın	4.393±1.354	0.7526	6.138±4.148	0.370	0.0768
	Erkek	4.933±2.468		4.846±2.022		0.9102
Diabetes Mellitus	Var	4.506±0.871	0.8870	5.833±3.726	0.5617	0.3692
	Yok	4.756±2.253		4.813±2.025		0.6399
HiperTansiyon	Var	4.875±2.815	0.844	4.61±1.628	0.1694	0.9999
	Yok	4.639±1.674		6.161±3.971		0.1237
Hiperlipidemi	Var	4.88±2.664	0.7213	5.636±3.266	0.2519	0.1934
	Yok	4.644±1.825		4.731±2.475		0.8127
Sigara Kullanımı	Evet	5.516±2.667	0.0752	5.046±1.717	0.8047	0.8512
	Hayır	4.185±1.423		5.509±3.620		0.1703
Aile Öyküsü	Evet	4.654±1.730	0.4218	5.396±2.257	0.2652	0.2853
	Hayır	4.763±2.356		5.520±3.913		0.8782

Ort:ortalama, SS:Standart Sapma

Hasta ve kontrol gruplarının demografik özelliklerine ve klinik bulgulara göre *MALAT1* ekspresyon düzeyinin karşılaştırılmasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir.

Şekil 4.5: *MCM3AP-AS1* ekspresyonunun demografik-klinik parametreler ile karşılaştırılması.





Tablo 4.6: *MCM3AP-AS1* ekspresyonunun demografik-klinik parametreler ile karşılaştırılması.

Demografik özellikler	Kontrol (n=45)		Hasta (n=45)		p değeri (kontrolle karşı hasta)
	Delta Ct (ort±SS)	p değeri	Delta Ct (ort±SS)	p değeri	
Yaş	≤60	0.0117±0.012	0.2523	0.0137±0.0098	0.1093
	>60	0.0158±0.0145	0.0092±0.0072	0.1047	
Cinsiyet	Kadın	0.014±0.0124	0.3669	0.014±0.0099	0.0809
	Erkek	0.0116±0.0127	0.0097±0.0078	0.5839	
Diabetes Mellitus	Var	0.0096±0.0061	0.6099	0.0099±0.0067	0.7225
	Yok	0.0132±0.0133	0.013±0.011	0.8702	
Hipertansiyon	Var	0.016±0.0135	0.1322	0.0101±0.0086	0.1917
	Yok	0.0106±0.0117	0.0128±0.009	0.2728	
Hiperlipidemi	Var	0.0149±0.0166	0.4775	0.0115±0.0079	0.4177
	Yok	0.0116±0.0103	0.0112±0.010	0.5696	
Sigara Kullanımı	Evet	0.0123±0.0150	0.5623	0.0113±0.0088	0.8892
	Hayır	0.0128±0.0108	0.0114±0.0089	0.5839	
Aile Öyküsü	Evet	0.0123±0.0120	0.6044	0.0103±0.00966	0.0867
	Hayır	0.0129±0.013	0.0128±0.0076	0.4979	

Ort:ortalama, SS:Standart Sapma

Hasta ve kontrol gruplarının demografik özelliklerine ve klinik bulgulara göre *MCM3AP-AS1* ekspresyon düzeyinin karşılaştırılmasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık gözlenmemiştir.

5. TARTIŞMA

KVS hastalıkları ve özellikle iskemik kalp hastalıklarının artan önemi ve teknolojiye yeni gelişmeler ile birlikte hastalıkların morbidite ve mortalitesini azaltmak için farklı yöntemlerin geliştirilmesine yönelik araştırmalar devam etmektedir.

KAH etiolojisinde geleneksel risk faktörlerinin yanı sıra genetik nedenler de önemli rol oynamaktadır. 21.004 İsveçli ikizi içeren çalışmada, dizigotik ikizlere göre monozigotik ikizlerde hem erkek hem kadınlar için KAH'a bağlı ölüm oranlarının daha yüksek olduğu bildirilmiştir. Ayrıca yaşlı hastalara kıyasla genç hastalarda daha fazla genetik etkiler gözlenmiştir. GWAS tarafından KAH için tanımlanan varyantların ortak özellikleri genomdaki pleiotropi ve intergenik veya intronik lokalizasyona sahip olmalarıdır. GWAS ile çok sayıda lokus belirlenirken, genlerin pleiotropik etkileri, genetik heterojenite ve subklinik fenotiplerin varlığı genetik risk faktörlerinin tespitini sınırlayan faktörlerdir [97].

KVS hastalıkları için dünya çapında yoğun araştırmalara rağmen KAH erken klinik tanısı ve tedavisinde çarpıcı bir gelişme sağlanamamıştır. lncRNA'lar hastalıklar üzerinde etkili birçok hücresel süreçlerin önemli düzenleyicileri ve çeşitli hastalıklar için yeni bir genetik tabanlı biyobelirteç olarak dikkat çekmektedir. Güncel çalışmalarda KVS hastalıklarının başlangıç ve ilerlemesinin düzenlenmesinde lncRNA'ların kritik rol aldıkları bildirilmiştir. Fei ve arkadaşlarının yaptığı meta analizde 30 çalışma taranarak lncRNA'ların kardiyovasküler hastalıklar için tanısal değeri incelenmiş ve orta derece duyarlı (%74) ve yüksek düzeyde özgül (%81) oldukları tespit edilmiştir. lncRNA'ların KVS hastalarını, kontrollerden %85 oranında ayırdığı ve böylece KVS hastalıkları için umut verici tanısal bir biyobelirteci temsil ettiği bildirilmiştir. Ayrıca hastalığın erken tanısında da hastaları kontrollerden ayırt ettiği gösterilmiştir [98].

KAH tanısı invaziv ve non invaziv yöntemleri içermektedir. Tanıda altın standart yöntem koroner anatomisinin görüntülenmesini sağlayan koroner anjiyografidir. Son veriler stenoza eşitenden ziyade darlıkların sayısı ve şiddetinin iskemi için önemli olduğunu göstermektedir. Ancak KAH tanısı için zorluklar halen

devam etmektedir [99]. Koroner anjiyografi ve spiral BT anjiyografi pahalı ve invaziv yöntem olmaları nedeni ile sadece yüksek riskli hastaların tanısında kullanılmaktadır. KAH sıklığının giderek artması nedeni ile patofizyolojisine yönelik yeni moleküler mekanizmaların tespit edilerek daha gelişmiş non invaziv tanı yöntemlerinin geliştirilmesine olan ihtiyaç artmaktadır [100].

Araştırmalar KAH klinik tanısı, prognostik belirteçi ve yeni tedavi edici hedeflerin sağlanması için lncRNA'ların aday olabileceğini ortaya koymaktadır [101]. lncRNA'ların doku ve kandaki ekspresyon imzaları hastalık tanısı, prognozu ve tedavinin değerlendirilmesinde potansiyel rollerine işaret etmektedir. lncRNA'ların plazma ve diğer vücut sıvılarında stabil olmaları, çeşitli hastalıklar için tanı ve prognostik faktör olmalarına imkan sağlamaktadır. Ancak KAH'da lncRNA fonksiyonlarının daha fazla araştırılması ve mekanizmalarının açıklanması gerektiği vurgulanmaktadır [23].

KVS hastalıklarının patogenezi ve tedavisinde hayati öneme sahip olan anjiogenezis yeni kan damarlarının oluşumu ile karakterize, fizyolojik ve patolojik olarak ikiye ayrılan oldukça kompleks bir süreçtir [102]. Ayrıca yüksek morbidite ve mortaliteye sahip KAH için popüler bir araştırma alanıdır [103]. Güncel çalışmalarda lncRNA'ların anjiogenezis ve vasküler hastalıklarda önemli rol oynadığı gösterilmesine rağmen KAH etiolojisinde oldukça önemli bu alan üzerinde lncRNA çalışmaları hala sınırlıdır [24].

Çalışmamızda KAH hastaları ve kontrol grubunda, anjiogenik lncRNA'lar ile hastalarının anjiyografik sonuçları arasındaki ilişkinin araştırılması için önceden belirlediğimiz dört lncRNA'nın ekspresyon düzeyleri tespit edilerek KVS hastalıkları ile ilişkisini incelemek amaçlanmıştır. Bu çalışma ile Adıyaman ilinde KAH tanı ve tedavisi için koroner anjiyografi yapılan hastalardan, koroner arterlerinde kritik darlık ($\geq$ %50 darlık, obstrüktif) saptanarak KAH tanısı alan 45 hasta ile anjiyografisi normal ($<$ %50 darlık, non-obstrüktif) olan 45 olgu olmak üzere toplam 90 olguya ulaşılarak lncRNA ekspresyon profilleri belirlenmiştir. Araştırmamızda analiz edilen lncRNA (*MEG3*, *MALAT1*, *MIAT* ve *MCM3AP-AS1*)'ların çalışma grupları arasında ekspresyon seviyeleri karşılaştırıldığında *MEG3* ve *MIAT* için istatistiksel olarak an-

lamalı ifade farklılıkları tespit edilmiştir. Ancak gruplar arasında *MALAT1* ve *MCM3AP-AS1* ekspresyon seviyeleri açısından anlamlı bir farklılık bulunmamıştır. Araştırma sonuçlarının kardiyovasküler patolojileri değerlendirmede ve özellikle anjiyogenez ve ateroskleroz ile ilişkili mekanizmalara yeni bir bakış açısı sağlayarak, KAH tanı ve tedavisine katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

Koroner arterlerinde kritik darlık saptanan olgular ‘Hasta Grubu’ ve koroner anjiyografisi normal olan olgular ‘Kontrol Grubu’ olarak kabul edildikten sonra çalışma grupları arasındaki farklılıklar istatistiksel olarak değerlendirilmiştir. Demografik özellikler ve klinik bulgulara göre çalışma grupları incelendiğinde Hasta ve Kontrol gruplarında, hastalığa yatkınlık oluşturan risk faktörlerinde anlamlı farklılıklar tespit edilmiştir. Kontrol grubuna kıyasla hasta grubunda yaş ortalamasının istatistiksel olarak anlamlı yüksek olduğu görülmektedir. Benzer şekilde DM ve hiperlipidemi hasta grubunda anlamlı olarak yüksek ($p<0.05$)’dir. Hipertansiyon, sigara ve aile öyküsü gruplar arasında benzer şekilde dağılım gösterdiği belirlenmiştir.

OMIM veri tabanına göre araştırdığımız maternal olarak eksprese edilen imprint bir gen olan *MEG3*, 14q32.2’de lokalize, 7 ekzonlu ve yaklaşık 12 kb (kilo baz)’dan oluşan nükleer bir lncRNA kodlamaktadır. Ayrıca *MEG3* geni on altı splice varyanta sahiptir [104]. *MEG3* knock-out fare beyninde, anjiyogenez yolağındaki *VEGFA* geni ile reseptörü olan *VEGFR2* gen ekspresyonunun ve kortikal mikro damar oluşumunun anlamlı olarak arttığı gösterilmiştir. Böylece *MEG3* fonksiyonlarından birinin anjiyogenezi inhibe etmek olduğu bildirilmiştir [105]. Aksine Wenchen ve arkadaşları *MEG3* knockdown edilmesinin *VEGFR2* ekspresyonunu azaltarak VEGF ile indüklenen anjiyogenezi suprese ettiğini bulmuştur. Ayrıca *MEG3* ekspresyonunun HUVEC (human umbilical vein endothelial cells)’de hipoksik durumlar altında HIF-1 α tarafından arttığını tespit etmişler [106]. Bu çelişkili bulgular anjiyogenesis ile ilişkili *MEG3* fonksiyonlarının doku spesifik olduğunu düşündürmektedir. Chao ve arkadaşları *MEG3*’ün anjiyogeneze pozitif katkı sağlayan miR-9’u suprese ederek endotel hücrelerinde proliferasyonu ve anjiyogenezi inhibe ettiğini göstermiştir [107]. Böylece çeşitli çalışmalarda *MEG3*’ün farklı birçok mekanizmalar aracılığı ile anjiyogenesis üzerinde hem pozitif hem de negatif etkisi olduğu gösterilmiştir. Bizim çalışmamızda hasta grubunda anlamlı olarak yüksek düzeyde eksprese olan *MEG3*’ün

VEGFR2 gen supresyonu ve miR-9 ile etkileşimi sonucu anjiogenezi negatif etkileyerek KAH gelişimine katkı sağladığını tahmin etmekteyiz. Ancak bu tahminin literatür ve deneysel veriler ile desteklenmesi lazım. Ziheng ve arkadaşları *MEG3*'ün, miR-21 supresyonu aracılığı ile endotel hücre proliferasyonunu inhibe ettiği ve KAH dokularında kontrollere kıyasla down regüle olduğunu göstermiştir [108]. Karşıt olarak Hongchun ve arkadaşları farelerde MI sonrası hasarlı kalp dokusunda *MEG3* ekspresyonunun up-regüle olduğunu tespit etmiş. Hipoksik durumlarda *MEG3* ekspresyonunun direk up-regüle olduğu ve RNA bağlayıcı protein FUS (fused in sarcoma)'a bağlanarak rodent kardiyomiyositlerinde apoptozu sağladığını ortaya çıkarmışlar [109]. Literatürde piropitozun, ateroskleroz ilerleme sürecinde kritik rol oynadığı gösterilmiş ve Young ve arkadaşları *MEG3*'ün HAEC (Human aortic endothelial cells)'de piropitozu artırdığını tespit etmiştir. Yüksek yağlı diyet verilen ApoE^{-/-} knock-out farelerin endotelinde *MEG3* ekspresyonunun arttığı, melatoninin ise *MEG3* ekspresyonunu azalttığı gösterilmiştir. *MEG3*'ün *NLRP3* gen ekspresyonu ve endotel hücre piropitozunu artırmak için tamamlayıcı dizileri aracılığı ile miR-223'ün fonksiyonlarını azaltan endojen sünger olarak fonksiyon gördüğü bildirilmiştir. *MEG3* aşırı ekspresyonunun, melatoninin indüklediği *NLRP3*, Caspase-1, IL-1 β ve IL-18 down regülasyonunu tersine çevirdiği gösterilmiştir. Böylece *MEG3* aşırı ekspresyonunun, piropitoz üzerinde melatoninin inhibitör etkisini ortadan kaldırdığı gösterilmiş ve melatonin replasmanının piropitoz ile ilişkili aterosklerozun tedavisinde kullanılabileceği ileri sürülmüştür [110]. Ayrıca LncTarD veritabanında *MEG3*'ün ateroskleroz ile ilişkili olarak up regüle olduğu gösterilmiştir [111]. Bulgularımız literatür ile uyumludur ve hasta grubumuzda anlamlı olarak yüksek eksprese olan *MEG3*'ün piropitoz üzerinden ateroskleroz gelişimini artırdığını ve ekspresyon düzeyinin ateroskleroz ciddiyeti ile ilişkili olduğunu ileri sürmekteyiz. Tüm bu verilerden *MEG3* disregülasyonunun hem VEGFR2 ve miR-9 aracılığı ile anjiogenezi olumsuz etkilemesi hem de *NLRP3*/miR-223 aksı aracılığı ile piropitozu artırmasından dolayı KAH gelişimi için bir neden olabileceğini vurgulamak istiyoruz. Sonuç olarak hasta grubunda anlamlı olarak yüksek eksprese olan *MEG3*'ün direkt olarak KAH ciddiyeti ile ilişkili olduğunu düşünmekteyiz. Bu nedenle *MEG3*'ün KAH için aday biyobelirteç ve terapötik hedef olduğuna karar vermekteyiz. *MEG3* ekspres-

yonu cinsiyet açısından hasta erkeklerde hasta kadınlara göre anlamlı olarak düşük bulunmuştur. Çalışmamızda aile öyküsü, DM ve hipertansiyon öyküsü bulunmayan hastalarda kontrollere kıyasla *MEG3* ekspresyonunda istatistiksel olarak anlamlı ifade farklılıkları görülmektedir. Bu ifade farklılıkları *MEG3*'ün ilgili risk faktörlerine yönelik mekanizmalar ile de ilişkili olabileceğini düşündürmektedir. Çalışmamız sonucunda hasta grubunda up-regüle olan *MEG3*'ün KAH patogenezinin katılarak hastalık gelişiminde rolü olabileceği, bir biyobelirteç ve tedavi hedefi olarak kullanılabileceğini önermekteyiz.

OMIM veri tabanına göre *MIAT* geni 22q12.1'de lokalize, 5 ekzonlu ve yaklaşık 9 kb büyüklüğünde dört farklı splice varyanta sahip nükleer tutulan bir lncRNA kodlamaktadır [112]. *MIAT* artışı, anormal endotel hücre proliferasyonu ve göçü ile ilişkilendirilmiştir. *MIAT* knock down edilmesinin in vitro endotel hücre proliferasyonu, migrasyonu ve tüp oluşumunu inhibe ettiği gösterilmiştir. *MIAT* up-regülasyonunun, miR-150-5p süngerisi olarak fonksiyon gördüğü ve miR-150-5p'nin *VEGF* ekspresyonu üzerindeki baskısını hafifleterek *VEGF* ekspresyonunu artırdığı tespit edilmiştir. Diğer taraftan diyabeti olmayan ratların vitreus kavitesine miR-150-5p mimik enjeksiyonu sonucu *MIAT* ekspresyonunda belirgin azalma olduğu gösterilmiştir. Böylece miR-150-5p'nin in vivo *MIAT* ekspresyonunu negatif olarak düzenlediği bildirilmiştir [113]. Popülasyonumuzda *MIAT* ve miR-150-5p arasındaki etkileşimin hem *MIAT* hem de dolaylı olarak *VEGF* ekspresyonunu azalttığını düşünmekteyiz. Literatürde KAH ile anjiyogenezis arasında çift yönlü ilişki olduğu açıklanmıştır. Aterosklerotik plak içinde gelişen anjiyogenezisin plak rüptürüne ve akut koroner sendroma neden olduğu bildirilmiştir [114]. Ancak artmış *VEGF*-1 düzeylerinin KAH hastalarında daha iyi bir prognoz sağladığı ileri sürülmüştür [115]. Buna uygun olarak çalışmamızın sonucunda hasta grubunda düşük düzeyde eksprese olan *MIAT*'ın *VEGF* ekspresyonunu artırması sonucu anjiyogenezise pozitif katkı sağlayarak KAH gelişiminde koruyucu etkiye sahip olabileceğini tahmin etmekteyiz. *MIAT* azalışının ise anjiyogenez üzerinde olumsuz etkisi olabileceğini ve böylece KAH patogenezinin katkı sağlayabileceğini öngörmekteyiz. Serdal ve arkadaşları aterosklerotik damarlarda, aterosklerotik olmayan damarlara göre *MIAT* ekspresyonunu yüksek bulmuştur [116]. Eman ve arkadaşları özellikle önceden iske-

mik kardiyak olay öyküsü pozitif hastalarda *MIAT* ekspresyonunu anlamlı yüksek tespit etmiştir [117]. Aksine Melanie ve arkadaşları MI hastaları ve kontroller arasında *MIAT* ekspresyon düzeyini benzer tespit etmiştir. Ancak ST yükselmesi olmayan MI hastalarına kıyasla ST yükselmeli MI hastalarında anlamlı olarak düşük bulmuştur [118]. Nobuaki ve arkadaşları *MIAT* transkriptlerindeki tek nükleotid polimorfizimlerinin (SNP) *MIAT* ekspresyon düzeyi üzerinde muhtemel etkisi olduğunu ve miyokard infarktüsüne yatkınlık oluşturduğunu göstermiştir. Ayrıca mevcut bilgiler ile *MIAT* fonksiyonlarını tam olarak açığa çıkarmanın zor olduğu bildirilmiştir [119]. Bu nedenle hasta grubumuzda *MIAT* ekspresyonunun anlamlı düşük bulunmasını, literatürde *MIAT* transkriptlerinde bulunan SNP'lerin *MIAT* ekspresyon düzeyini değiştirdiğinin gösterilmesi ile de açıklayabiliriz. Bunun yanı sıra biyolojik örneklerde *MIAT* ekspresyon düzeyi ve kimyasal kararlılığının net olarak doğrulanmadığı bildirilmiştir. *MIAT* üzerine yapılan araştırmaların hala erken aşamada olduğu ve klinik uygulamaya geçilmesi için bazı önemli konuların çözülmesi gerektiği vurgulanmaktadır. *MIAT*'ın upstream ve downstream düzenleyici mekanizmalarının dikkate alınması ve altta yatan mekanizmaların önceki mekanizmalar ile birleştirilmesi gerektiği bildirilmiştir [120]. Literatürde KAH patogenezi ile ilişkili *MIAT* fonksiyonlarına yönelik çalışmalar yetersiz olduğundan daha fazla araştırılma yapılması gerektiği açıktır. Ayrıca *MIAT* fonksiyonları tam olarak bilinmediği için çalışmalar arasında farklı sonuçların bulunması muhtemeldir. Tüm bu nedenlerden dolayı hasta grubumuzda *MIAT* ekspresyonunu anlamlı düşük bulduğumuzu açıklamaktayız. Literatürde *MIAT* ekspresyon artışı KAH patogenezi ile ilişkilendirilse de popülasyonumuzda anlamlı düşük eksprese olmasının KAH gelişimine katkı sağladığına inanmaktayız.

OMIM veri tabanına göre *MALAT1* geni 11q13.1'de lokalize, 1 ekzonlu ve yaklaşık 8 kb büyüklüğünde bir lncRNA kodlamaktadır [121]. *MALAT1* aynı zamanda NEAT2 (nuclear-enriched abundant transcript 2) olarak bilinir ve majör olarak nükleusta lokalizedir. *MALAT1*'in endotel hücresinde eksprese olduğu ve vasküler gelişimde düzenleyici olduğu gösterilmiştir. *MALAT1* knock out farelerde retinal damarlanmanın geciktiği ve endotel hücre proliferasyonunun anlamlı olarak azaldığı bildirilmiştir. *MALAT1* susturulması ile kan akımının ve kapiller yoğunluğun

azaldığı ve anormal damar filizlenmesine neden olduğu gösterilmiştir. *MALAT1* susturulması sonucu hücre canlılığında azalma ve apoptotik yüzde artışı gözlenmiştir. *MALAT1* knockdown ile *VEGF* veya *TNF- α* indüklediği RF/6A (retinal endothelial cell line) hücrelerde migrasyon ve tüp oluşumunun bloke olduğu, sonuçta damar bozukluğunun azaldığı gösterilmiştir. Ayrıca MI hastalarında kontrollere kıyasla *MALAT1* ekspresyonunun yüksek olduğu tespit edilmiş ve MI komplikasyonu olarak sol ventrikül disfonksiyonu tahmininde anlamlı olduğu gösterilmiştir [122]. Aksine Serdal ve arkadaşları aterosklerotik plaklarda *MALAT1* ekspresyonunu düşük saptamış ve ekspresyon düzeylerinin yaş ile ters orantılı olduğunu bildirmiştir [116]. Genom çapında ilişkilendirme çalışmalarında KAH riski ile ilişkili SNP'ler bildirilmiştir. Weina ve arkadaşları *MALAT1* SNP'leri ile KAH riski arasında ilişki olduğunu göstermiştir [123]. Farklı olarak Eman ve arkadaşları kalp yetmezliği öyküsü olan KAH hastalarında *MALAT1* ekspresyonunda anlamlı farklılık tespit etmiştir. Koroner anjiyografi yapılan hastaların yarısında *MALAT1* ekspresyonunun up regüle olduğunu ancak hasta ve kontrol grubu arasında ekspresyonun benzer olduğunu belirlemişler. Önceden kardiyak iskemik olay öyküsü pozitif hastalarda *MALAT1* ekspresyonunun belirgin şekilde daha yüksek olduğunu bulmuşlar. Ayrıca *MALAT1*'in KAH'da nedensel rolünün hala bilinmediğine dikkat çekilmiştir [117]. Çalışmamızda literatüre benzer olarak hasta grubunda *MALAT1* ekspresyonu görece yüksek bulunmuştur. Ancak hasta ve kontrol grupları arasında *MALAT1* ekspresyonu açısından istatistiksel olarak anlamlı farklılık tespit edilmemiştir. Ayrıca klinik bulgular ve demografik veriler açısından da farklılık bulunmamıştır. Literatürde önceden kardiyak iskemik öyküsü pozitif hastalarda *MALAT1* ekspresyonunun anlamlı yüksek olduğu vurgulanmakta ancak bizim popülasyonumuzda böyle hastalar mevcut olmadığı için anlamlı ilişki bulmadığımızı düşünmekteyiz. Literatürde belirtildiği gibi KAH patogenezinde *MALAT1*'in rolü net değildir ve bizim çalışmamızda da anlamlı bir ilişki gösterilmemiştir. Bu nedenle KAH patogenezinde *MALAT1*'in nedensel rolünün olup olmadığına dair daha fazla araştırma yapılması gerektiğini düşünmekteyiz.

Ensembl veri tabanına göre *MCM3AP-AS1*, 21q22.3'de lokalize, 4 ekzonlu, yaklaşık 3 kb büyüklüğünde ve 15 farklı splice varyanta sahip antisense lncRNA kodlamaktadır [124]. *MCM3AP-AS1*'in tümör hücreleri malign davranışının düzenlenmesine katıldığı ve çeşitli kanserlerde anormal eksprese edildiği bildirilmiştir. Chuqing ve arkadaşları GEC (Glioma-associated endothelial cells)'de *MCM3AP-AS1*'in yüksek, miR-211'in düşük düzeyde eksprese edildiğini göstermiştir. Böylece miR-211'in direk olarak *MCM3AP-AS1*'i hedeflediği ve ikisi arasında karşılıklı baskılama olduğu doğrulanmıştır. Ayrıca *MCM3AP-AS1* knockdown edilmesi ile miR-211 ekspresyonunun arttığı ve miR-211'in anjiyogeneizde düzenleyici rolü olan *KLF5* gen ekspresyonunu inhibe ettiği gösterilmiştir. *MCM3AP-AS1*'in knockdown edilmesinin GEC hücre canlılığı, migrasyonu ve tüp oluşumunu bloke ettiği ve in vitro GBM (Glioblastoma) anjiyogenezinin inhibisyonunda rol aldığı bildirilmiştir. Sonuç olarak *MCM3AP-AS1*'in GBM anjiyogeneze katıldığı ve onkogen olarak hareket ettiği gösterilmiştir [125]. Xuemei ve arkadaşları akciğer kanserinde *MCM3AP-AS1* ekspresyonunun arttığını tespit etmiştir. *MCM3AP-AS1*'in miR-340-5p süngerı gibi işlev görerek anjiyogenezi artırdığı ve *KPNA4* gen ekspresyonunu up regüle ederek anjiyogenezi hızlandırdığı bildirilmiş. *MCM3AP-AS1* depleksiyonunun akciğer kanser hücrelerinde proliferasyon, migrasyon ve anjiyogenezi baskıladığı gösterilmiştir [126]. Çeşitli kanserlerde anjiyogenez süreci ile ilişkili olan *MCM3AP-AS1*'in KAH ile ilişkisi literatürde daha önce hiç araştırılmamıştır. Çalışmamızda hasta ve kontrol grubu arasında hem ekspresyon düzeyi hem de demografik veriler ve klinik bulgular açısından *MCM3AP-AS1* ekspresyonunda anlamlı farklılık tespit edilmemiş. Bu nedenle *MCM3AP-AS1*'in KAH patogenezi ile ilişkili olmadığı sonucuna varmaktayız. Sonuç olarak çalışmamızda gruplar arasında *MEG3* ve *MIAT* ekspresyon farklılıklarının KAH patogeneziyi açıklamaya yönelik yardımcı olabileceğini, yeni bir biyobelirteç ve tedavi hedefi olarak yol gösterebileceğini öngörmekteyiz.

Kardiyovasküler patolojilerde lncRNA'ların kapsamlı fonksiyonel karakterizasyonu için hem moleküler hem de hücresel düzeyde daha fazla çalışma yapılması gerekmektedir. Birkaç RNA-Seq deneyleri yapılmış ve birçok potansiyel aday belirlenmiş olsa da çok azı karakterize edilmiştir [61]. lncRNA araştırmalarında,

vaka sayılarının yetersizliği, cinsiyet, yaş ve diğer kardiyovasküler risk faktörlerinin çeşitliliği gibi heterojen durumların varlığı, bu moleküllerin biyobelirteç olarak değerlendirilebilmesi için kısıtlılık oluşturmaktadır. lncRNA gen ürünlerinin farklı birçok transkript varyantlarının olması ve bunların farklı işlevlerinin olma ihtimali, çok hızlı yıkılmaları, ifade düzeylerinin az olması da araştırma sınırlılıkları arasındadır. Tüm bu kısıtlamaların aşılması için büyük gruplar ve çok merkezli çalışmalara ihtiyaç vardır. Literatürde yeterli sayıda araştırma olmamasına rağmen lncRNA'ların özellikle ateroskleroz ile ilişkili KAH dahil birçok hastalığın tanı ve takibinde kullanılabilecek yeni ve etkili biyobelirteç adayı olarak değerlendirilebileceği öngörülmektedir [62].

Çalışmamızın önemli sonuçlarının yanı sıra bazı kısıtlılıkları da mevcuttur. Çalışmamızda kontrol grubu, koroner anjiyografi sonucu koroner arterlerinde kardiyak fonksiyonları etkilemeyecek düzeyde darlık saptanan veya hiç darlık bulunmayan hastalardan oluşmaktadır. Bunun nedeni koroner arterlerdeki tıkanıklığın altın standart yöntem olan koroner anjiyografi ile tespit edilmesi ve anjiogenez sürecine yönelik etkili bir araştırma yapabilmektir. Ancak tamamen sağlıklı gönüllülerden oluşan kontrol grubu da oluşturularak hedef lncRNA'ların ekspresyonunda anlamlı farklılık olup olmadığı araştırılmalıdır. Çalışmamız görece küçük bir popülasyonu içermektedir ve bu ekspresyon çalışmasının daha anlamlı olması için daha büyük çalışma gruplarında tekrar edilmelidir. Ayrıca tespit edilen ekspresyon farklılıkları hedef gen veya RNA düzeyinde doğrulanmalıdır.

Sonuç olarak çalışmamızda hedeflediğimiz gibi KAH olgularında anlamlı ekspresyon farklılıkları olan lncRNA'ları göstermiş olduk. Gruplar arasında farklı ekspresyon paterni ile disregüle olduğunu tespit ettiğimiz *MEG3* ve *MIAT*'ın ateroskleroz ve anjiogenezde önemli rollere sahip genleri (VEGF, VEGFR2, NLRP3) hedeflediği bilinmektedir. Ancak çalışma sonuçlarımızın özellikle anjiogenez ve ateroskleroz ile ilişkili mekanizmaları farklı bakış açısı ile değerlendirerek KAH patogenezi açıklamaya yardımcı olacağını ve hastalığın yönetimine katkı sağlayacağını düşünmekteyiz. Bununla birlikte KAH gelişiminde rolleri olduğunu tespit ettiğimiz *MEG* ve *MIAT*'ın hastalığa yönelik potansiyel aday biyobelirteç ve tedavi hedefi olabileceklerini önermekteyiz.

6. SONUÇLAR

Koroner Arter Hastalığı gelişiminde rol oynayan lncRNA'ları araştırdığımız çalışmamızda;

1. *MEG3* için yapılan ekspresyon çalışmaları sonucunda koroner arterlerinde kritik darlık olan hasta grubu ile koroner arterlerinde darlık olmayan kontrol grubu arasında ($p<0.0108$) istatistiksel olarak anlamlı ifade farklılıkları tespit edilmiştir.
2. *MEG3* için yapılan ekspresyon çalışmaları sonucunda erkek cinsiyette, diabetes mellitus olmayanlar ile hipertansiyon ve aile öyküsü bulunmayanlarda, koroner arterlerinde darlık olmayan gruba göre koroner arterlerinde kritik darlık saptanan hasta grupları arasında istatistiksel anlamlı ifade farklılıkları tespit edilmiştir ($p<0.0040$, $p<0.0162$, $p<0.0001$, $p<0.0225$).
3. *MIAT* için yapılan ekspresyon çalışmaları sonucunda koroner arterlerinde darlık olmayan kontrol grubu ile koroner arterlerinde kritik darlık bulunan hasta grupları arasında ($p<0.0002$) istatistiksel anlamlı ifade farklılığı bulunmuştur.
4. *MIAT* için yapılan ekspresyon çalışmaları sonucunda erkek cinsiyette, diabetes mellitus olmayan ve hipertansiyon bulunanlarda, koroner arterlerinde darlık bulunmayan kontrol grubuna kıyasla koroner arterlerinde kritik darlık saptanan hasta grupları arasında istatistiksel anlamlı ifade farklılıkları tespit edilmiştir ($p<0.002$, $p<0.0026$, $p<0.0032$).
5. *MALAT1* için yapılan ekspresyon çalışmaları sonucunda koroner arterlerinde kritik darlık saptanan hasta grubu ile koroner arterlerinde darlık bulunmayan kontrol grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı ifade farklılıkları bulunmamıştır.
6. *MCM3AP-AS1* için yapılan ekspresyon çalışmaları sonucunda koroner arterlerinde kritik darlık saptanan hasta grubu ile koroner arterlerinde darlık bulunmayan kontrol grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı ifade farklılıkları tespit edilmemiştir.

Son olarak istatistiksel anlamlı ifade farklılıkları tespit edilen bu lncRNA ekspresyon çalışmasının daha büyük hasta ve kontrol grupları ile tekrar edilmesi gerekmektedir. Ayrıca tespit edilen ekspresyon farklılıkları hedef gen veya RNA düzeyinde çalışmalar yapılarak doğrulanmalıdır. Hedef gen-lncRNA ilişkisinden yola çıkılarak KAH için biyobelirteç ve tedavi hedefi olarak kullanılabilme imkanları araştırılmalıdır.



7. KAYNAKLAR

1. AJ, L., *Atherosclerosis*. Nature, 2000. **407**: p. 233–241
2. Rafieian-Kopaei, M., et al., *Atherosclerosis: process, indicators, risk factors and new hopes*. Int J Prev Med, 2014. **5**(8): p. 927-46.
3. Maddox, T.M., et al., *Nonobstructive coronary artery disease and risk of myocardial infarction*. Jama, 2014. **312**(17): p. 1754-63.
4. Costa Filho, F.F., et al., *Efficacy of Patient Selection for Diagnostic Coronary Angiography in Suspected Coronary Artery Disease*. Arq Bras Cardiol, 2015. **105**(5): p. 466-71.
5. Salazar, C.A., et al., *Ranolazine for stable angina pectoris*. Cochrane Database Syst Rev, 2017. **2**: p. Cd011747.
6. Berry, C., *Stable Coronary Syndromes: The Case for Consolidating the Nomenclature of Stable Ischemic Heart Disease*. Circulation, 2017. **136**(5): p. 437-439.
7. World Health Organisation. *Detail/ Cardiovascular diseases (CVDs)*. 17 May 2017; Available from: [https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-\(cvds\)](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-(cvds)).
8. Benjamin, E.J., et al., *Heart Disease and Stroke Statistics-2018 Update: A Report From the American Heart Association*. Circulation, 2018. **137**(12): p. e67-e492.
9. Timmis, A., et al., *European Society of Cardiology: Cardiovascular Disease Statistics 2017*. Eur Heart J, 2018. **39**(7): p. 508-579.
10. *Türkiye İstatistik Kurumu 2018 verileri. TÜİK Ölüm Nedeni İstatistikleri 2018*. 26 Nisan 2019.
11. *Ulusal Hastalık Yüğü Çalışması Sonuçları ve Çözüm Önerileri 18 Nisan 2017*. 18 Nisan 2017.
12. ONAT, A., G. CAN, and H. YÜKSEL, *TEKHARF 2017 Tıp Dünyasının Kronik Hastalıklara Yaklaşımına Öncülük*. Ed. Onat A. 2017. Logos Yayıncılık. İstanbul.
13. Ünal, B., et al., *Türkiye kronik hastalıklar ve risk faktörleri sıklığı çalışması*. Ankara: Sağlık Bakanlığı, 2013.
14. TAVLI, T. and N. PEKEL, *Koroner arter hastalığında risk faktörleri*. Türkiye Klinikleri Cardiology-Special Topics, 2011. **4**(2): p. 16-20.
15. Mackay, J. and G.A. Mensah, *The atlas of heart disease and stroke*. 2004: World Health Organization.
16. Fiskå, B.S., *Family history of coronary heart disease as a risk factor for developing coronary heart disease—a literature study Family history of coronary heart disease as a risk factor for developing coronary heart disease—a literature study*. 2015.
17. Chow, C.K., et al., *Parental history and myocardial infarction risk across the world: the INTERHEART Study*. 2011, Journal of the American College of Cardiology.
18. Bakanlığı, T.S. and H.S. Kurumu, *Türkiye Kalp ve Damar Hastalıkları Önleme ve Kontrol Programı*, 988. 2015, Ankara.
19. Schunkert, H., et al., *Genetics of coronary artery disease in the light of genome-wide association studies*. Clin Res Cardiol, 2018. **107**(Suppl 2): p. 2-9.

20. Khera, A.V. and S. Kathiresan, *Genetics of coronary artery disease: discovery, biology and clinical translation*. Nat Rev Genet, 2017. **18**(6): p. 331-344.
21. Nussbaum, R.L., R.R. McInnes, and H.F. Willard, *The Molecular, Biochemical, and Cellular Basis of Genetic Disease* Eight ed. Thompson & Thompson genetics in medicine. Vol. 1. 2015: Elsevier Health Sciences. 226-230.
22. Sılan, F. and Ö. Özdemir, *Kardiyovasküler Sistem Hastalıklarına Genetik Yaklaşım*. Tıbbi Genetik ve Klinik Uygulamaları, ed. M. Dundar. Vol. 2. 2016. 935-954.
23. Zhang, Y., et al., *MicroRNAs or Long Noncoding RNAs in Diagnosis and Prognosis of Coronary Artery Disease*. Aging Dis, 2019. **10**(2): p. 353-366.
24. Yu, B. and S. Wang, *Angio-LncRs: LncRNAs that regulate angiogenesis and vascular disease*. Theranostics, 2018. **8**(13): p. 3654-3675.
25. Arter, A.K.D.E.K.K. and H.Y.G. Grubu, *Q 2013 ESC Kararlı Koroner Arter Hastalığı Yönetimi Kılavuzu*. 2013.
26. Omland, T. and H.D. White, *State of the art: blood biomarkers for risk stratification in patients with stable ischemic heart disease*. Clinical chemistry, 2017. **63**(1): p. 165-176.
27. Viereck, J. and T. Thum, *Circulating noncoding RNAs as biomarkers of cardiovascular disease and injury*. Circulation research, 2017. **120**(2): p. 381-399.
28. Uchida, S. and S. Dimmeler, *Long noncoding RNAs in cardiovascular diseases*. Circ Res, 2015. **116**(4): p. 737-50.
29. Li, J. and C. Liu, *Coding or noncoding, the converging concepts of RNAs*. Frontiers in genetics, 2019. **10**: p. 496.
30. Zhang, X. and W. Wang, *Mechanisms and Functions of Long Non-Coding RNAs at Multiple Regulatory Levels*. 2019. **20**(22).
31. Dahariya, S., et al., *Long non-coding RNA: Classification, biogenesis and functions in blood cells*. Molecular immunology, 2019. **112**: p. 82-92.
32. Jarroux, J., A. Morillon, and M. Pinskaya, *History, discovery, and classification of lncRNAs, in Long Non Coding RNA Biology*. 2017, Springer. p. 1-46.
33. Artan, S., *Epigenetik*. 1 ed. Tıbbi Genetik ve Klinik Uygulamaları, ed. M. Dünder. Vol. 1. 2016. 179-221.
34. Amin, N., A. McGrath, and Y.-P.P. Chen, *Evaluation of deep learning in non-coding RNA classification*. Nature Machine Intelligence, 2019. **1**(5): p. 246.
35. Hrdlickova, B., et al., *Genetic variation in the non-coding genome: Involvement of micro-RNAs and long non-coding RNAs in disease*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease, 2014. **1842**(10): p. 1910-1922.
36. Losko, M., J. Kotlinowski, and J. Jura, *Long noncoding RNAs in metabolic syndrome related disorders*. Mediators of inflammation, 2016. **2016**.
37. Flippot, R., et al., *Cancer subtypes classification using long non-coding RNA*. Oncotarget, 2016. **7**(33): p. 54082.
38. Ma, L., V.B. Bajic, and Z. Zhang, *On the classification of long non-coding RNAs*. RNA biology, 2013. **10**(6): p. 924-933.

39. Tang, Y., et al., *The role of long non-coding RNAs in rheumatic diseases*. Nature Reviews Rheumatology, 2017. **13**(11): p. 657.
40. Goyal, A., et al., *Challenges of CRISPR/Cas9 applications for long non-coding RNA genes*. Nucleic acids research, 2017. **45**(3): p. e12-e12.
41. Mirsafian, H., et al., *Long non-coding RNA expression in primary human monocytes*. Genomics, 2016. **108**(1): p. 37-45.
42. Wen, X., et al., *lncSLdb: a resource for long non-coding RNA subcellular localization*. Database, 2018. **2018**.
43. Benoit Bouvrette, L.P., et al., *CeFra-seq reveals broad asymmetric mRNA and noncoding RNA distribution profiles in Drosophila and human cells*. Rna, 2018. **24**(1): p. 98-113.
44. <http://www.noncode.org/analysis.php>.
45. <https://www.gencodegenes.org/human/stats.html>.
46. Fritah, S., S.P. Niclou, and F. Azuaje, *Databases for lncRNAs: a comparative evaluation of emerging tools*. 2014. **20**(11): p. 1655-65.
47. Wright, M.W., *A short guide to long non-coding RNA gene nomenclature*. Hum Genomics, 2014. **8**: p. 7.
48. Khandelwal, A., et al., *Long non-coding RNA: A new paradigm for lung cancer*. Molecular carcinogenesis, 2015. **54**(11): p. 1235-1251.
49. Djebali, S., et al., *Landscape of transcription in human cells*. Nature, 2012. **489**(7414): p. 101-108.
50. Sriyothi, L., et al., *Roles of Non-Coding RNAs in Transcriptional Regulation*. Transcriptional and Post-transcriptional Regulation, 2018: p. 55.
51. Matouk, I., et al., *The increasing complexity of the oncofetal h19 gene locus: functional dissection and therapeutic intervention*. International journal of molecular sciences, 2013. **14**(2): p. 4298-4316.
52. Li, Z., et al., *Regulatory Mechanism and Application of lncRNAs in Poultry*, in *Poultry*. 2019, IntechOpen.
53. Rosikiewicz, W. and I. Makalowska, *Biological functions of natural antisense transcripts*. Acta Biochimica Polonica, 2016. **63**(4): p. 665-673.
54. Szabo, L. and J. Salzman, *Detecting circular RNAs: bioinformatic and experimental challenges*. Nature Reviews Genetics, 2016. **17**(11): p. 679.
55. Cesana, M., et al., *A long noncoding RNA controls muscle differentiation by functioning as a competing endogenous RNA*. Cell, 2011. **147**(2): p. 358-369.
56. Lu, T., et al., *Potential clinical application of lncRNAs in non-small cell lung cancer*. OncoTargets and therapy, 2018. **11**: p. 8045.
57. Pardini, B., et al., *Noncoding RNAs in Extracellular Fluids as Cancer Biomarkers: The New Frontier of Liquid Biopsies*. Cancers, 2019. **11**(8): p. 1170.
58. Blythe, A.J., A.H. Fox, and C.S. Bond, *The ins and outs of lncRNA structure: How, why and what comes next?* Biochim Biophys Acta, 2016. **1859**(1): p. 46-58.
59. Bhartiya, D. and V. Scaria, *Genomic variations in non-coding RNAs: structure, function and regulation*. Genomics, 2016. **107**(2-3): p. 59-68.
60. Archer, K., et al., *Long Non-Coding RNAs as Master Regulators in Cardiovascular Diseases*. Int J Mol Sci, 2015. **16**(10): p. 23651-67.

61. Gomes, C.P., et al., *The function and therapeutic potential of long non-coding RNAs in cardiovascular development and disease*. Molecular Therapy-Nucleic Acids, 2017. **8**: p. 494-507.
62. Şentürk, H. and E. Komurcu-Bayrak, *Kardiyovasküler Hastalıklarda Uzun Kodlamayan RNA'lar ve Sirküler RNA'ların Önemi*. Sağlık Bilimlerinde İleri Araştırmalar Dergisi. **2**(3): p. 115-125.
63. Vieira, A., D. Dogini, and I. Lopes-Cendes, *Role of non-coding RNAs in non-aging-related neurological disorders*. Brazilian Journal of Medical and Biological Research, 2018. **51**(8).
64. Yang, G., X. Lu, and L. Yuan, *LncRNA: a link between RNA and cancer*. Biochim Biophys Acta, 2014. **1839**(11): p. 1097-109.
65. Huang, Y., *The novel regulatory role of lnc RNA-mi RNA-mRNA axis in cardiovascular diseases*. Journal of cellular and molecular medicine, 2018. **22**(12): p. 5768-5775.
66. Finotti, A., et al., *MicroRNAs and long non-coding RNAs in genetic diseases*. Molecular diagnosis & therapy, 2019. **23**(2): p. 155-171.
67. Khalil, A.M., et al., *Many human large intergenic noncoding RNAs associate with chromatin-modifying complexes and affect gene expression*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(28): p. 11667-72.
68. Fatica, A. and I. Bozzoni, *Long non-coding RNAs: new players in cell differentiation and development*. Nat Rev Genet, 2014. **15**(1): p. 7-21.
69. Dhanoa, J.K., et al., *Long non-coding RNA: its evolutionary relics and biological implications in mammals: a review*. Journal of animal science and technology, 2018. **60**(1): p. 25.
70. Zhang, X., et al., *The role of long noncoding RNA in major human disease*. Bioorganic chemistry, 2019: p. 103214.
71. Jiang, M.-C., et al., *Emerging roles of lncRNA in cancer and therapeutic opportunities*. American Journal of Cancer Research, 2019. **9**(7): p. 1354.
72. Bhan, A., M. Soleimani, and S.S. Mandal, *Long Noncoding RNA and Cancer: A New Paradigm*. Cancer Res, 2017. **77**(15): p. 3965-3981.
73. Esteller, M., *Non-coding RNAs in human disease*. Nat Rev Genet, 2011. **12**(12): p. 861-74.
74. Li, L., et al., *Long non-coding RNA in neuronal development and neurological disorders*. Frontiers in genetics, 2018. **9**.
75. Balloy, V., et al., *Bronchial epithelial cells from cystic fibrosis patients express a specific long non-coding RNA signature upon Pseudomonas aeruginosa infection*. Frontiers in cellular and infection microbiology, 2017. **7**: p. 218.
76. Li, J., Z. Xuan, and C. Liu, *Long non-coding RNAs and complex human diseases*. International journal of molecular sciences, 2013. **14**(9): p. 18790-18808.
77. Frank, S., et al., *A lncRNA perspective into (re) building the heart*. Frontiers in cell and developmental biology, 2016. **4**: p. 128.
78. Hobuß, L., C. Bär, and T. Thum, *Long Non-coding RNAs: At the Heart of Cardiac Dysfunction?* Frontiers in physiology, 2019. **10**.
79. Haemmig, S., et al., *Long noncoding RNAs in cardiovascular disease, diagnosis, and therapy*. Curr Opin Cardiol, 2017. **32**(6): p. 776-783.

80. Holdt, L.M., et al., *Circular non-coding RNA ANRIL modulates ribosomal RNA maturation and atherosclerosis in humans*. Nature communications, 2016. **7**(1): p. 1-14.
81. Han, P., et al., *A long noncoding RNA protects the heart from pathological hypertrophy*. Nature, 2014. **514**(7520): p. 102-106.
82. Han, D., Q. Gao, and F. Cao, *Long noncoding RNAs (LncRNAs) - The dawning of a new treatment for cardiac hypertrophy and heart failure*. Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis, 2017. **1863**(8): p. 2078-2084.
83. Viereck, J., et al., *Long noncoding RNA Chast promotes cardiac remodeling*. Science translational medicine, 2016. **8**(326): p. 326ra22-326ra22.
84. Kumarswamy, R., et al., *Circulating long noncoding RNA, LIPCAR, predicts survival in patients with heart failure*. Circulation research, 2014. **114**(10): p. 1569-1575.
85. Turner, A.W., et al., *Multi-omics approaches to study long non-coding RNA function in atherosclerosis*. Frontiers in cardiovascular medicine, 2019. **6**.
86. Li, H., H. Zhu, and J. Ge, *Long Noncoding RNA: Recent Updates in Atherosclerosis*. Int J Biol Sci, 2016. **12**(7): p. 898-910.
87. Wu, T., et al., *Knockdown of long non-coding RNA-ZFAS1 protects cardiomyocytes against acute myocardial infarction via anti-apoptosis by regulating miR-150/CRP*. Journal of cellular biochemistry, 2017. **118**(10): p. 3281-3289.
88. Gao, L., et al., *Circulating long noncoding RNA HOTAIR is an essential mediator of acute myocardial infarction*. Cellular Physiology and Biochemistry, 2017. **44**(4): p. 1497-1508.
89. Chen, C., et al., *The roles of long noncoding RNAs in myocardial pathophysiology*. Bioscience reports, 2019. **39**(11).
90. Kelemen, E., et al., *Exosomal long non-coding RNAs as biomarkers in human diseases*. Ejifcc, 2019. **30**(2): p. 224.
91. Xu, Y., et al., *New Insights into the Interplay between Non-Coding RNAs and RNA-Binding Protein HnRNPK in Regulating Cellular Functions*. Cells, 2019. **8**(1): p. 62.
92. Bolha, L., M. Ravnik-Glavač, and D. Glavač, *Long noncoding RNAs as biomarkers in cancer*. Disease markers, 2017. **2017**.
93. Zhuo, W., et al., *Long noncoding RNA GMAN, up-regulated in gastric cancer tissues, is associated with metastasis in patients and promotes translation of Ephrin A1 by competitively binding GMAN-AS*. Gastroenterology, 2019. **156**(3): p. 676-691. e11.
94. Lucas, T., A. Bonauer, and S. Dimmeler, *RNA therapeutics in cardiovascular disease*. Circulation research, 2018. **123**(2): p. 205-220.
95. *LncRNA Arrays: Better than RNA-seq for LncRNA Expression Profiling*. <https://www.arraystar.com/reviews/lncrna-arrays-better-than-rna-seq-for-lncrna-expression-profiling/>.
96. Kolenda, T., et al., *Quantification of long non-coding RNAs using qRT-PCR: comparison of different cDNA synthesis methods and RNA stability*. Archives of Medical Science, 2019. **15**(1).

97. Pranavchand, R. and B.M. Reddy, *Current status of understanding of the genetic etiology of coronary heart disease*. J Postgrad Med, 2013. **59**(1): p. 30-41.
98. Luo, F., et al., *Diagnostic potential of circulating LncRNAs in human cardiovascular disease: a meta-analysis*. Biosci Rep, 2018. **38**(6).
99. Nelson, A.J., M. Ardissino, and P.J. Psaltis, *Current approach to the diagnosis of atherosclerotic coronary artery disease: more questions than answers*. 2019. **10**: p. 2040622319884819.
100. Yang, Y., et al., *Plasma long non-coding RNA, CoroMarker, a novel biomarker for diagnosis of coronary artery disease*. Clin Sci (Lond), 2015. **129**(8): p. 675-85.
101. Miao, L. and R.X. Yin, *A novel lncRNA-miRNA-mRNA triple network identifies lncRNA TWF1 as an important regulator of miRNA and gene expression in coronary artery disease*. 2019. **16**: p. 39.
102. Liao, Y.-Y., et al., *New progress in angiogenesis therapy of cardiovascular disease by ultrasound targeted microbubble destruction*. BioMed research international, 2014. **2014**.
103. Potz, B.A., et al., *Novel molecular targets for coronary angiogenesis and ischemic heart disease*. Coron Artery Dis, 2017. **28**(7): p. 605-613.
104. *Elektronik veritabanı:*
<https://www.omim.org/entry/605636?search=MEG3&highlight=meg3>.
09/07/2017: OMIM.
105. Zhou, Y., X. Zhang, and A. Klibanski, *MEG3 noncoding RNA: a tumor suppressor*. J Mol Endocrinol, 2012. **48**(3): p. R45-53.
106. Ruan, W., et al., *Knockdown of long noncoding RNA MEG3 impairs VEGF-stimulated endothelial sprouting angiogenesis via modulating VEGFR2 expression in human umbilical vein endothelial cells*. Gene, 2018. **649**: p. 32-39.
107. He, C., et al., *Long Noncoding RNA MEG3 Negatively Regulates Proliferation and Angiogenesis in Vascular Endothelial Cells*. DNA Cell Biol, 2017. **36**(6): p. 475-481.
108. Wu, Z., et al., *Long noncoding RNA MEG3 suppressed endothelial cell proliferation and migration through regulating miR-21*. Am J Transl Res, 2017. **9**(7): p. 3326-3335.
109. Wu, H., et al., *Long noncoding RNA Meg3 regulates cardiomyocyte apoptosis in myocardial infarction*. Gene therapy, 2018. **25**(8): p. 511-523.
110. Zhang, Y., et al., *Melatonin prevents endothelial cell pyroptosis via regulation of long noncoding RNA MEG3/miR-223/NLRP3 axis*. 2018. **64**(2).
111. *Elektronik veritabanı: LncTarD*
<http://biocc.hrbmu.edu.cn/LncTarD/DetailSearch?rid=RID01027>.
112. *Elektronik veritabanı: OMIM*
<https://www.omim.org/entry/611082?search=MIAT&highlight=miat>.
6/5/2007.
113. Yan, B., et al., *lncRNA-MIAT regulates microvascular dysfunction by functioning as a competing endogenous RNA*. Circulation research, 2015. **116**(7): p. 1143-1156.

114. Wu, W., et al., *The Role of Angiogenesis in Coronary Artery Disease: A Double-Edged Sword: Intraplaque Angiogenesis in Physiopathology and Therapeutic Angiogenesis for Treatment*. Curr Pharm Des, 2018. **24**(4): p. 451-464.
115. Berezin, A., *Predictive role of circulating vascular endothelial growth factor-1 in patients with cardiovascular diseases*. J Dis Markers, 2014. **1**(3): p. 6.
116. Arslan, S., et al., *Long non-coding RNAs in the atherosclerotic plaque*. Atherosclerosis, 2017. **266**: p. 176-181.
117. Toraih, E.A., et al., *Association of long non-coding RNA MIAT and MALAT1 expression profiles in peripheral blood of coronary artery disease patients with previous cardiac events*. 2019. **42**(3): p. 509-518.
118. Vausort, M., D.R. Wagner, and Y. Devaux, *Long noncoding RNAs in patients with acute myocardial infarction*. Circ Res, 2014. **115**(7): p. 668-77.
119. Ishii, N., et al., *Identification of a novel non-coding RNA, MIAT, that confers risk of myocardial infarction*. J Hum Genet, 2006. **51**(12): p. 1087-99.
120. Sun, C., et al., *Long non-coding RNA MIAT in development and disease: a new player in an old game*. J Biomed Sci, 2018. **25**(1): p. 23.
121. Elektronik veri tabanı: OMIM
<https://www.omim.org/entry/607924?search=MALAT1&highlight=malat1>. 07/06/2016.
122. Zhang, X., M.H. Hamblin, and K.J. Yin, *The long noncoding RNA Malat1: Its physiological and pathophysiological functions*. RNA Biol, 2017. **14**(12): p. 1705-1714.
123. Hu, W., et al., *LncRNA MALAT1 gene polymorphisms in coronary artery disease: a case-control study in a Chinese population*. 2019. **39**(3).
124. Elektronik veri tabanı: Ensembl
https://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Gene/Summary?db=core;g=ENSG00000215424;r=21:46229196-46259390. January 2020.
125. Yang, C., et al., *The Effect of MCM3AP-AS1/miR-211/KLF5/AGGF1 Axis Regulating Glioblastoma Angiogenesis*. Front Mol Neurosci, 2017. **10**: p. 437.
126. Li, X., M. Yu, and C. Yang, *YY1-mediated overexpression of long noncoding RNA MCM3AP-AS1 accelerates angiogenesis and progression in lung cancer by targeting miR-340-5p/KPNA4 axis*. J Cell Biochem, 2020. **121**(3): p. 2258-2267.



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

Karar Tarihi	Toplantı Sayısı	Karar Sayısı
18/09/2018	6	2018/ 6-4

Adıyaman Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığı Öğretim Üyesi Prof.Dr. Haydar BAĞIŞ'ın sorumluluğunda yapılması tasarlanan "Adıyaman İlinde Koroner Arter Hastalığının Erken Tanısında Kandaki Uzun Kodlamayan RNA'lar (LncRNA'lar) (MEG3, MALAT1, MIAT, MCM3AP-AS1): Erken Biyobelirteç Olabilir mi?" adlı proje için hazırlanmış olan ve 07/09/2018 tarihinde sunulan Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar İçin Başvuru Formu ile ilgili belgeler araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş, araştırmanın yürürlükte olan ilgili yasal düzenlemelere uyularak yürütülmesi ve sonuçlandırılması koşulu ile gerçekleştirilmesinde etik sakınca bulunmadığına ve Etik Kurul kararının başvuru sahibine iletilmesine toplantıya katılan Etik Kurul Üyeleri'nin oy birliği ile karar verilmiştir.

(Proje Araştırmacısı)
Prof. Dr. Haydar BAĞIŞ
Başkan

Prof. Dr. Gülşur TARHAN
Üye

Doç. Dr. Fatih ÜÇKARDEŞ
Üye

Dr.Öğr.Üyesi Hüseyin KAFADAR
Üye

Doç. Dr. Mehmet TEKİN
Üye

Katılmadı
Dr.Öğr.Üyesi Serdar OLT
Üye

Dr.Öğr.Üyesi Ali PARLAR
Üye

Dr.Öğr.Üyesi Mehmet BÜLBÜL
Üye

Katılmadı
Dr.Öğr.Üyesi Muhittin ÖNDERCI
Üye

Katılmadı
Doç. Dr. Ali ŞİMŞEK
Üye

Doç. Dr. Mahmut KOPARALI
Üye

GENETİK ÇALIŞMALAR İÇİN BİLGİLENDİRİLMİŞ ONAM FORMU

LÜTFEN DİKKATLİCE OKUYUNUZ!

Bu çalışmaya katılmak üzere davet edilmiş bulunmaktasınız. Bu çalışmada yer almayı kabul etmeden önce çalışmanın ne amaçla yapılmak istendiğini anlamanız ve kararınızı bu bilgilendirme sonrası özgürce vermeniz gerekmektedir. Sizin için hazırlanmış bu bilgilendirmeyi lütfen dikkatlice okuyunuz ve sorularınıza açık yanıtlar isteyiniz.

Kalp ve damar hastalıklarının genetik (kalıtsal) nedenlerini bulmak üzere yeni bir araştırma yapmaktayız. Araştırmanın ismi “**Adıyaman İlinde Koroner Arter Hastalığının Erken Tanısında Kandaki Uzun Kodlamayan RNA’lar (LncRNA’lar) (MEG3, MALAT1, MIAT, MCM3AP-AS1): Erken Biyobelirteç Olabilir mi?**” dir.

Sizin de bu araştırmaya katılmanızı öneriyoruz. Ancak hemen ifade etmek gerekir ki bu araştırmaya katılıp katılmamakta serbestsiniz. Çalışmaya katılım gönüllülük esasına dayanır. Kararınızı vermeden önce araştırma hakkında sizi bilgilendirmek istiyoruz. Bu bilgileri okuyup anladıktan sonra araştırmaya katılmak isterseniz formu imzalayınız.

Araştırmaya davet edilmenizin nedeni sizde/ailenizin bir üyesinde koroner arter hastalığının bulunmuş olmasıdır. Adıyaman Üniversitesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı bu hastalığın nedenlerini ortaya çıkarmak amacıyla bir araştırma gerçekleştirecektir. Sizin de bu çalışmaya katılmanız araştırmanın başarısı için önemlidir. Araştırmaya katılacak hasta gönüllü sayısı toplamı 90’dır.

Muayene esnasında sizden biyokimyasal ve genetik analizler için kan alınacak ve bulgular kaydedilecektir. Bu kayıtlar ilerde tekrar incelenerek doğru tanı konulmasına yardımcı olacaktır. Bu kayıtlar kimliğiniz belirtilmeden bilimsel nitelikte yayınlarda kullanılabilir. Bu amaçların dışında bu kayıtlar kullanılmayacak ve başkalarına verilmeyecektir.

Bu çalışmayı yapabilmemiz için kolunuzdan 5-10 ml (1-2 tüp) kadar kan almamız gerekmektedir. Bu kandan genetik materyal (DNA ve RNA) elde edilecektir. Bu aşamada başarısız olduğunda bir kez daha kan vermeniz istenebilir.

Bu çalışmaya katılmak için sizden herhangi bir ücret istenmeyecektir. Çalışmaya katıldığınız için size herhangi bir ödeme yapılmayacaktır.

Kan alınması sırasında oluşabilecek riskler: Kan alma işlemi ile ilgili riskler arasında bayılma, ağrı ve/veya kan alma bölgesinde morarma sayılabilir. Ender durumlarda ise iğne deliğinin yerinde enfeksiyon ya da küçük bir kan pıhtısı olabilir. Olası bir soruna karşı gerekli tedbirler tarafımızdan alınacaktır.

Yapılacak genetik testin getirebileceği olası riskler: Genetik bilginin kullanılmasına bağlı olarak sosyal, ekonomik ve psikolojik sorunlar ortaya çıkabilir. Size ait genetik bilginin gizli kalacağına dair elimizden geleni yapacağız. Ancak hemen belirtmemiz

gerekir ki; yaptığımız testler sizin veya ailenizin bir ferдинin ileriki bir zamanda bu genetik hastalıktan etkilenebileceğini ortaya çıkarabilir. Bu bilginin kötü yönde kullanılması sizi ekonomik ve sosyal yönden etkileyebileceği gibi, böyle bir hastalığa sahip olduğunuzu öğrenmeniz sizi psikolojik yönden de etkileyebilir. Sizin anormal bir gen taşıdığınızı saptadığımızda bulgularımızı herhangi bir ücret talep etmeden size bildireceğiz. Ancak böylesi bir bilgiyi öğrenmeyi reddetmek her zaman hakkınızdır. Hemen belirtmeliyiz ki; bu bilgiyi sizin dışınızda birisi ile paylaşmamız sadece sizin izninizle olacaktır. Genetik testlerin önemli bir riski de bu testler sonucunda anne ya da babanın biyolojik kimliğinin de saptanmasıdır. Bu durumlarda gizlilik ilkesine bağlı kalınacaktır.

Yukarıda sayılanlar böylesi bir analizde yaşanabilecek potansiyel risklerdir. Ancak bunlardan en az oranda zarar görmeyi sağlamak için elimizden geleni yapacağız. Çalışmanın devamı sırasında ortaya çıkabilecek sorun ve riskler katılımcının/hastanın kendisi ya da sorumlusuna iletilecektir.

Yapılacak genetik testin getireceği olası yararlar: Böyle bir analiz ilgili genetik hastalığın nedeninin öğrenilmesinde yararlı olacaktır. Şu anda bu çalışmanın hemen size veya yakınlarınıza bir fayda olarak dönüp dönmeyeceğini bilmiyoruz. Ancak ilgili hastalığın temelinde yatan nedenlerin öğrenilmesi ileride ilgili hastalıktan etkilenmiş bireylere fayda sağlayacaktır.

Bu çalışmaya katılmayı reddedebilirsiniz. Bu araştırmaya katılmak tamamen isteğe bağlıdır ve reddettiğiniz takdirde size uygulanan tedavide herhangi bir değişiklik olmayacaktır. Yine çalışmanın herhangi bir aşamasında onayınızı çekmek hakkına da sahipsiniz. Eğer örneğinizin imha edilmesine karar vererseniz, bu isteğinizden önce üretilmiş her türlü veri ve yapılmış analiz ortadan kaldırılmayacak ama daha fazla analiz yapılmayacaktır. Aksi takdirde, saklama süresinin sonunda örneğin imha edilmesinden destekleyici/araştırmacı sorumludur.

Kan Örneklerinin Saklanması

Bu bilimsel araştırma sırasında alınan kan örneklerinin tamamı kullanılmayıp bir bölümü benzeri araştırmalarda kullanılmak üzere saklanabilir.

(Katılımcının/Hastanın Beyanı)

Sayın Doç. Dr. Erdal AKTÜRK tarafından Adıyaman Üniversitesi Tıp Fakültesi Kardiyoloji Anabilim Dalında tıbbi bir araştırma yapılacağı belirtilerek bu araştırma ile ilgili yukarıdaki bilgiler bana aktarıldı. Bu bilgilerden sonra böyle bir araştırmaya “katılımcı” (gönüllü) olarak davet edildim.

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

Projenin yürütülmesi sırasında herhangi bir sebep göstermeden araştırmadan çekilebilirim. Ancak araştırmacıları zor durumda bırakmamak için araştırmadan

çekileceğimi önceden bildirmemin uygun olacağının bilincindeyim. Ayrıca tıbbi durumuma herhangi bir zarar verilmemesi koşuluyla araştırmacı tarafından araştırma dışı tutulabilirim. Araştırma için yapılacak harcamalarla ilgili herhangi bir parasal sorumluluk altına girmiyorum. Bana da bir ödeme yapılmayacaktır.

İster doğrudan ister dolaylı olsun araştırma uygulamasından kaynaklanan nedenlerle meydana gelebilecek herhangi bir sağlık sorununun ortaya çıkması halinde, her türlü tıbbi müdahalenin sağlanacağı konusunda gerekli güvence verildi. (Bu tıbbi müdahalelerle ilgili olarak da parasal bir yük altına girmeyeceğim). Araştırma sırasında bir sağlık sorunu ile karşılaştığımda; herhangi bir saatte Doç. Dr. Erdal AKTÜRK'e ulaşabileceğimi ve kendisini arayabileceğimi biliyorum. Bu araştırmaya katılmak zorunda değilim ve katılmayabilirim. Araştırmaya katılmam konusunda zorlayıcı bir davranışla karşılaşmış değilim. Eğer katılmayı reddedersem, bu durumun tıbbi bakıma ve hekim ile olan ilişkiye herhangi bir zarar getirmeyeceğini de biliyorum.

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

Bu formun imzalı ve tarihli bir kopyası bana verildi.

GÖNÜLLÜNÜN		İMZASI
ADI & SOYADI		
ADRESİ		
TEL		
TARİH		

VELAYET VEYA VESAYET ALTINDA BULUNANLAR İÇİN VELİ VEYA VASİNİN		İMZASI
ADI & SOYADI		
ADRESİ		
TEL		
TARİH		

ARAŞTIRMA EKİBİ DIŞINDAN YETKİN BİR HEKİM		İMZASI
ADI & SOYADI		
TARİH		

ÖZGEÇMİŞ

1. **Adı Soyadı: Hamide SAYGILI**
2. **Doğum Tarihi:**
3. **Unvanı: Araştırma Görevlisi Doktor**
4. **Öğrenim Durumu: Yüksek Lisans**

Derece	Alan	Üniversite	Yıl
Lisans			
Y. Lisans	Tıp Fakültesi	Kırıkkale Üniversitesi	2006-2012
Tıpta Uzmanlık	Tıbbi Genetik	Adıyaman Üniversitesi	2016-2020

5. **Akademik Unvanlar:**

Arş Gör. Dr. Tarihi :

6. **Yayınlar**

6.1. Uluslararası hakemli dergilerde yayınlanan makaleler (SCI & SSCI & Arts and Humanities)

6.2. Uluslararası diğer hakemli dergilerde yayınlanan makaleler

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

6.4. Yazılan uluslararası kitaplar veya kitaplarda bölümler

6.5. Ulusal hakemli dergilerde yayınlanan makaleler

Z. B. RAMAZANOĞLU, Ö. GÜNAL, H. SAYGILI, A. ATİLLA & S. S. KILIÇ, Ateş ve Trombositopeni Ayırıcı Tanısında Endemik Bir Hastalık: Q ateşi , Journal of Contemporary Medicine, 2016, 2667-7180, 6, 1, 167.

6.6. Ulusal bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitabında basılan bildiriler

H. BAĞIŞ, H. SAYGILI, Ö. ÖZTÜRK, H. ALMIŞ & M. Ö. ÇEVİK, Monozigotik İkiz Olguda Kraniosinosis Nedeni; Crouzon Sendromu, Poster Sunumu, V.

ULUSLARARASI KATILIMLI ERCİYES TIP GENETİK GÜNLERİ
KONGRESİ, 20 Şubat 2020, 22 Şubat 2020, 1300-056X/2147-2092, 31, 3, 80.

Ö. ÖZTÜRK, H. SAYGILI, I. BIÇAKÇIOĞLU, M. Ö. ÇEVİK & H. BAĞIŞ, Novel
RAB3GAP1 mutation causing Warburg Micro syndrome in Turkish girl, Sözlü
Sunum, V. ULUSLARARASI KATILIMLI ERCİYES TIP GENETİK
GÜNLERİ, 20 Şubat 2020, 22 Şubat 2020, 1300-056X/2147-2092, 30, 3, 33.

H. BAĞIŞ, H. SAYGILI, İ. KÖKÇAM, Ö. ÖZTÜRK, H. TAŞLIDERE & M. Ö.
ÇEVİK, Nörofibromatozis Tip1 Nadir Formu: 17q11.2 Mikrodelesyon Sendromu,
Poster Sunumu, ERCİYES TIP GENETİK GÜNLERİ 2019, 21 Şubat 2019, 23
Kasım 2019, 1 - 65.

Ö. ÖZTÜRK, H. SAYGILI, S. BOLU, M. Ö. ÇEVİK, B. TAŞKIN, H. TAŞLIDERE
& H. BAĞIŞ, Cornelia de Lange Syndrome with a novel NIPBL mutation and a
10q11.22- q11.23 Deletion, Sözlü Sunum, ERCİYES TIP GENETİK GÜNLERİ
2019, 21 Şubat 2019, 23 Şubat 2019, 1 - 65.

H. SAYGILI, H. AYDIN, Ö. ÖZTÜRK, M. Ö. ÇEVİK, H. TAŞLIDERE & H. BAĞIŞ,
KLEEFSTRA SENDROMU (9q34.3 MICRODELETION SYNDROME) OLGU
SUNUMU, Poster Sunumu, ERCİYES TIP GENETİK GÜNLERİ 2019, 21 Şubat
2019, 23 Şubat 2019, 1 - 65.

H. BAĞIŞ, H. SAYGILI, H. AYDIN & Ö. ÖZTÜRK, ATAİK TELENJEKTAZİ:
OLGU SUNUMU, Poster Sunumu, XIII. ULUSAL TIBBİ GENETİK
KONGRESİ, 07 Kasım 2018, 11 Kasım 2018, 30, 1, 1 - 113.

C. C. AKSOY, Ö. F. KARAÇORLU, P. Ö. ÇUBUK, F. M. ERDEM, H. SAYGILI,
Ö. ÖZTÜRK & H. BAĞIŞ, ATİPİK MOZAİK TRİZOMİ 9:
47,XX,+9[26]/45,X[24] KARYOTİPE SAHİP OLGU SUNUMU, Poster Sunumu,
XIII. ULUSAL TIBBİ GENETİK KONGRESİ, 07 Kasım 2018, 11 Kasım 2018,
30, 1, 1 - 113.

H. SAYGILI, H. AYDIN, Ö. ÖZTÜRK & H. BAĞIŞ, COHEN SENDROMU;
VPS13B GENİNDE YENİ BİR MUTASYON, Poster Sunumu, XIII. ULUSAL
TIBBİ GENETİK KONGRESİ, 07 Kasım 2018, 11 Kasım 2018, 30, 1, 1 - 113.

- H. SAYGILI, Ö. ÖZTÜRK, S. BOLU, Ö. F. KARAÇORLU & H. BAĞIŞ, FENOTİPTEN GENOTİPE: CORNELIA DE LANGE SENDROMU, Poster Sunumu, XIII. ULUSAL TIBBİ GENETİK KONGRESİ, 07 Kasım 2018, 11 Kasım 2018, 30, 1, 1 - 113.
- A. ERKUŞLİ, Ö. F. KARAÇORLU, T. A. DUMAN, P. Ö. ÇUBUK, H. SAYGILI & H. BAĞIŞ, MATERNAL t(4;10)(q28;p15) RESİPROKAL TRANSLOKASYON KAYNAKLI 10p15.3 MİKRODELESYONA SAHİP OLGU SUNUMU, Poster Sunumu, XIII. ULUSAL TIBBİ GENETİK KONGRESİ, 07 Kasım 2018, 11 Kasım 2018, 30, 1, 1 - 113.
- E. Y. ÇIRAK, Ö. F. KARAÇORLU, P. Ö. ÇUBUK, H. SAYGILI, Ö. ÖZTÜRK & H. BAĞIŞ, MENTAL RETARDASYON: DE NOVO DENGESİZ RESİPROKAL TRANSLOKASYONLU OLGU SUNUMU, Poster Sunumu, XIII. ULUSAL TIBBİ GENETİK KONGRESİ, 07 Kasım 2018, 11 Kasım 2018, 30, 1, 1 - 113.
- M. Ö. ÇEVİK, Ö. ÖZTÜRK, H. AYDIN, H. SAYGILI & H. BAĞIŞ, SMİTH-MAGENİS SENDROMU TANILI BİR OLGU, Sözlü Sunum, XIII. ULUSAL TIBBİ GENETİK DERNEĞİ, 07 Kasım 2018, 11 Kasım 2018, 30, 1, 1 - 113.
- H. BAĞIŞ, H. SAYGILI, S. BOLU, Ö. F. KARAÇORLU, Ö. ÖZTÜRK & M. Ö. ÇEVİK, Gnas Geninde Mutasyonu Olan Psödohipoparatiroidizm Tipla Vaka Sunumu, Poster Sunumu, Erciyes Tıp Genetik Günleri 2018, 08 Mart 2018, 11 Mart 2018.
- H. SAYGILI, S. BOLU, Ö. ÖZTÜRK, M. Ö. ÇEVİK & H. BAĞIŞ, Otoimmün Poliendokrinopati Sendromu Tip1 İle İlişkili Otoimmün Regulator (AIRE) Gen Varyantı, Poster Sunumu, Erciyes Tıp Genetik Günleri 2018, 08 Mart 2018, 10 Mart 2018.
- H. BAĞIŞ, H. SAYGILI, Ö. F. KARAÇORLU, M. Ö. ÇEVİK & N. ÇETİNER, Wolfhirschhorn Sendromlu Bir Olgu, Poster Sunumu, Erciyes Tıp Genetik Günleri 2017, 11 Mayıs 2017, 13 Mayıs 2017.
- H. BAĞIŞ, H. SAYGILI, Ö. F. KARAÇORLU & M. S. TABAK, Waardenburg Sendromu Tip1: Pax3 Geninde Yeni Bir Mutasyon, Poster Sunumu, Erciyes Tıp Genetik Günleri 2017, 11 Mayıs 2017, 11 Mayıs 2017.

H. BAĞIŞ, İ. GÜNEY, Ö. F. KARAÇORLU & H. SAYGILI, Marfan Sendromu: Fbn1 Geninde Yeni Bir Mutasyon Ve Kardiyak Bulguları Ön Planda Olan Olgu Sunumu, Poster Sunumu, Xii. Ulusal Tıbbi Genetik Kongresi 2016, 05 Ekim 2016, 09 Ekim 2016.

H. SAYGILI, H. BAĞIŞ, İ. GÜNEY, Ö. F. KARAÇORLU & D. ÇOLAK, Tanatoforik Displazi Tip1: Yenidoğan Döneminde Klinik Ve Genetik Tanı Alan Bir Olgu Sunumu, Poster Sunumu, Xii. Ulusal Tıbbi Genetik Kongresi 2016, 05 Ekim 2016, 09 Ekim 2016.

6.7. Diğer yayınlar

7. Projeler

ADİYAMAN İLİNDE KORONER ARTER HASTALIĞININ ERKEN TANISINDA KANDAKİ UZUN KODLAMAYAN RNA'LAR (LncRNA'lar) (*MEG3*, *MALAT1*, *MIAT*, *MCM3AP-AS1*): ERKEN BİYOBELİRTEÇ OLABİLİR Mİ?

Proje Yürütücüsü: Prof. Dr. Haydar BAĞIŞ

Araştırmacı 1: Arş. Gör. Dr. Hamide SAYGILI

Araştırmacı 2: Prof. Dr. Erdal AKTÜRK

Araştırmacı 3: Doç. Dr. Önder YUMRUTAŞ

<http://buyuksehirhaberi.com/asavis/olum-nedeni-istatistikleri-2018-/4953>