

TOBB EKONOMİ VE TEKNOLOJİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**NONKETOTİK HİPERGLİSİNEMİ HASTALARINDA GENOTİP-FENOTİP
İLİŞKİSİNİN DEĞERLENDİRİLMESİNDE ETKİN MİKRORNA'LARIN
BELİRLENMESİ**

DOKTORA TEZİ

Harun BAYRAK

Moleküler Tıp Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Dr. Öğr. Üyesi Parisa SHARAFI

NİSAN 2025



Sağlık Bilimleri Enstitüsü Onayı

.....
Prof. Dr. Ediz DEMİRPENÇE
Müdür

Bu tezin Doktora derecesinin tüm gereksinimlerini sağladığını onaylarım.

.....
Prof. Dr. Julide Sedef GÖÇMEN
Anabilim Dalı Başkanı

TOBB ETÜ, Sağlık Bilimleri Enstitüsü'nün 195217003 numaralı Doktora Öğrencisi **Harun BAYRAK** 'ın ilgili yönetmeliklerin belirlediği gerekli tüm şartları yerine getirdikten sonra hazırladığı "**NONKETOTİK HİPERGLİSİNEMİ HASTALARINDA GENOTİP-FENOTİP İLİŞKİSİNİN DEĞERLENDİRİLMESİNDE ETKİN MİKRORNA'LARIN BELİRLENMESİ**" başlıklı tezi **07.04.2025** tarihinde imzaları olan jüri tarafından kabul edilmiştir.

Tez Danışmanı : **Dr. Öğretim Üyesi Parisa SHARAFI**
TOBB Ekonomi ve Teknoloji Üniversitesi

Eş Danışman : **Prof. Dr. Mustafa KILIÇ**
Sağlık Bilimleri Üniversitesi

Jüri Üyeleri : **Prof. Dr. Ediz DEMİRPENÇE (Başkan)**
TOBB Ekonomi ve Teknoloji Üniversitesi

Prof. Dr. Asuman SUNGUROĞLU
Ankara Üniversitesi

Prof. Dr. Esra KILIÇ
Sağlık Bilimleri Üniversitesi

Doç. Dr. Pelin TELKOPARAN AKILLILAR
Gazi Üniversitesi



TEZ BİLDİRİMİ

Tez içindeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edilerek sunulduğunu, alıntı yapılan kaynaklara eksiksiz atıf yapıldığını, referansların tam olarak belirtildiğini ve ayrıca bu tezin TOBB ETÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlandığını bildiririm.

Harun BAYRAK



ÖZET

Doktora Tezi

NONKETOTİK HİPERGLİSİNEMİ HASTALARINDA GENOTİP-FENOTİP İLİŞKİSİNİN DEĞERLENDİRİLMESİNDE ETKİN MİKRORNA'LARIN BELİRLENMESİ

Harun BAYRAK

TOBB Ekonomi ve Teknoloji Üniversitesi
Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Moleküler Tıp Anabilim Dalı

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Parisa SHARAFI

Tarih: Nisan 2025

Nonketotik hiperglisinemi (NKH), glisin ensefalopatisi olarak bilinen otozomal resesif (OR) geçişli bir amino asit metabolizma bozukluğudur. Glisin yıkımında rol alan enzim bozukluğu sonucu klinik bulgular ortaya çıkar. Glisin parçalayıcı enzim kompleksindeki bozukluktan dolayı glisin vücutta birikir. NKH glisin parçalayıcı enzim sistemindeki dört enzimden herhangi birinin (P, T, H ve L proteinleri) eksikliği ile oluşabilir. Glisin, yıkım ürünlerine parçalanamazsa vücutta birikir ve toksik etkileri ortaya çıkar. NKH'nin prognozunu değiştirecek uygun bir tedavi metodu henüz kesin olmamakla birlikte, mevcut tedavilerde vücutta glisin birikiminin önlenmesi ve atılması hedeflenmektedir. NKH'ye neden olan glisin parçalayıcı enzimdeki dört proteinden herhangi birindeki değişikliklerden kaynaklanan biyokimyasal patoloji iyi anlaşılmıştır ancak literatürde henüz genotip-fenotip ilişkisi bulunmamaktadır. MikroRNA'lar (miRNA) gen ifadesinin transkripsiyon ve transkripsiyon sonrası düzenleyicileri olarak fonksiyon gösteren, küçük kodlanmayan RNA'lardır. Düzenleyici rolleri nedeniyle hastalıklarda tanı ve tedavi bakımından yeni bakış açıları sağlayabilirler. Hastalıkla ilişkili miRNA'ları ve ilgili hedeflerini belirlemek, hastalığa

yeni moleküler bakış açısı sağlayarak yeni terapötik stratejilerin tasarlanmasını sağlar. Literatürde pek çok kalıtsal metabolik hastalık için miRNA çalışması yapılmış olmasına rağmen daha önce NKH miRNA ilişkisini inceleyen bir araştırma bulunmamaktadır. Bu tez çalışmasında, NKH hastalığı ve miRNA'lar ile ilgili daha önce elde ettiğimiz bilgi birikimimizi kullanarak NKH'deki miRNA'ların rolünü araştırmayı amaçlıyoruz. Bu tez çalışmasının amacı NKH'de miRNA'ların ifadesinin hasta ve kontrol grubu arasında karşılaştırılmasıdır. Çalışmada NKH hastaları ve sağlıklı bireylerden oluşan kontrol grubuna ait kandan izole edilen miRNA'lar karşılaştırılıp büyük ölçekli miRNA profillemesi gerçekleştirildi. Elde edilen miRNA'ların ifadesi analiz edilerek ve elde edilen sonuçlara göre kontrol ve hasta grubu arasında ifadesi önemli derecede farklılık gösteren miRNA'lar seçilerek RT-qPCR analizi ile doğrulandı.

Çalışmamızda NKH ile ilişkili olduğu biyoinformatik yöntemlerle belirlenen 16 miRNA RT-qPCR ile hastalarda ve kontrol grubunda doğrulanmıştır. RT-qPCR verileri sonucunda hsa-miR-4503 için hem sekans analizi hem de RT-qPCR sonuçları birbiri ile uyumluydu ve sonuçlar istatistiksel olarak anlamlıydı. Çalışmamız literatürdeki ilk NKH-miRNA çalışmasıdır ve çalışma sonucunda iki adet miRNA'nın NKH ile ilişkili olabileceği RT-qPCR metodu ile doğrulanarak gösterilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Nonketotik hiperglisinemi, Glisin, Epilepsi, Hipotoni, Gelişim geriliği, miRNA, *GLDC*, *AMT*, *GCSH*, *GCSL*.

ABSTRACT

Doctor of Philosophy

DETERMINATION OF EFFECTIVE MICRORNAS IN THE EVALUATION OF
GENOTYPE-PHENOTYPE RELATIONSHIP IN NONKETOTIC
HYPERGLYCAEMIA PATIENTS

Harun BAYRAK

TOBB University of Economics and Technology
Institute of Health Sciences
Molecular Medicine Science Programme

Supervisor: Asst. Prof. Parisa SHARAFI

Date: April 2025

Nonketotic hyperglycinemia (NKH), also known as glycine encephalopathy, is an autosomal recessive (AR) inherited amino acid metabolism disorder. Clinical manifestations arise due to an enzymatic defect involved in glycine degradation. As a result of a defect in the glycine cleavage enzyme complex, glycine accumulates in the body. NKH can occur due to a deficiency in any of the four enzymes in the glycine cleavage enzyme system (P, T, H, and L proteins). If glycine cannot be broken down into its degradation products, it accumulates in the body, leading to toxic effects. While a definitive treatment method to alter the prognosis of NKH is not yet available, current therapies aim to prevent and eliminate glycine accumulation in the body. Although the biochemical pathology resulting from alterations in any of the four proteins of the glycine cleavage enzyme causing NKH is well understood, no genotype-phenotype correlation has yet been identified in the literature.

MicroRNAs (miRNAs) are small non-coding RNAs that function as regulators of gene expression at the transcriptional and post-transcriptional levels. Due to their regulatory roles, they can provide new perspectives in the diagnosis and treatment of diseases.

Identifying disease-associated miRNAs and their respective targets offers a molecular understanding of the disease and paves the way for the design of novel therapeutic strategies. Although numerous miRNA studies have been conducted on inherited metabolic diseases, no prior research has investigated the relationship between NKH and miRNAs.

In this thesis, we aim to investigate the role of miRNAs in NKH by leveraging our prior knowledge of NKH and miRNAs. The objective of this study is to compare the expression of miRNAs in NKH patients and a control group. miRNAs isolated from the blood of NKH patients and healthy individuals in the control group were compared, and large-scale miRNA profiling was conducted. The expression of identified miRNAs was analyzed, and those showing significant expression differences between the control and patient groups were validated using RT-qPCR analysis.

In our study, 16 miRNAs identified through bioinformatics methods and associated with NKH were validated in patients and the control group using RT-qPCR. Based on RT-qPCR data, both the sequence analysis and RT-qPCR results for hsa-miR-4503 was consistent, and the results were statistically significant. Our study represents the first NKH-miRNA study in the literature, demonstrating that two miRNAs may be associated with NKH and validating these findings using the RT-qPCR method.

Keywords: Nonketotic hyperglycinemia, Glycine, Epilepsia, Hypotonia, Developmental delay, miRNA, *GLDC*, *AMT*, *GCSH*, *GCSL*.

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim ve tezim süresince bilgi ve deneyimleri ile bana her zaman yol gösteren, hem mesleki açıdan hem de kişisel olarak yardımını hiçbir zaman benden esirgemeyen, mesai saatleri dışında, hafta sonu demeden her zaman yanımda olan, geç saatlere kadar benim yanımdan ayrılmayan ve laboratuvarında her daim yol göstericim olan aynı zamanda yakın bir arkadaş gibi her zaman ilgisini ve alakasını eksik etmeyen değerli hocam Dr. Öğr. Üy. Parisa SHARAFI, pediatri eğitimim sırasında tanıştığım değerli ağabeyim, kıymetli hocam, bilgi birikimi ile bana her zaman önder olan, emeklerini her zaman hayatım boyunca unutamayağım sevgili ustam kıymetli Prof. Dr. Mustafa KILIÇ'a ve TOBB ETÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü Moleküler Tıp Anabilim Dalında başta Prof. Dr. Ediz DEMİRPENÇE, Prof. Dr. Kamer KILINÇ'a, çalışmam sırasında bana her türlü desteği veren, her türlü yakınlığı gösteren sevgili hocam Prof. Dr. Julide Sedef GÖÇMEN'e, çalışmamın verilerinin yorumlanmasında yardımları olan doktor adayı Şeyma DEMİR'e, yandal eğitimim sırasında her türlü bilgi birikimini ve tecrübesini benimle paylaşan, her zaman yol gösterici ve önder olan sevgili hocam Prof. Dr. Leyla TÜMER'e, çocuk metabolizma hastalıkları ve çocuk genetik hastalıklarında ufkumu aydınlatan saygıdeğer hocam Prof. Dr. Fatih Süheyl EZGÜ'ye, hekimliğim sırasında her türlü fedakarlığı yapan, bütüm sorularımı içtenlikle cevaplayan ve bilgi birikimini her zaman benimle paylaşan sevgili hocam Prof. Dr. İlyas OKUR ve Doç. Dr. Aslı İNCİ'ye, doktora eğitimim sırasında her daim yanımda olan TOBB ETÜ ailesine, yardım ve desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen sevgili Duygu DÜZEL ve Ahmet Ersin MEYDAN'a teşekkürlerimi borç bilirim. Bugüne kadar eğitimime katkıda bulunan, iyi bir insan, iyi bir vatandaş olarak yetişmemi sağlayan diğer tüm hocalarıma ve sevgili anneme, babama, kardeşlerime, her zaman desteğini benden esirgemeyen her daim yanımda olan sevgili eşim Dr. Şükran BAYRAK'a ve güldüğünde o gün bütün yorgunluğumu unutturana, varlığı ile

beni her daim mutlu eden minik kızım Elif Umay BAYRAK'a teşekkür ederim.
Çalışmaya katılan tüm hastalara ve ailelerine teşekkür ederim.



İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET	vii
ABSTRACT	ix
TEŞEKKÜR	xi
İÇİNDEKİLER	xiii
ŞEKİL LİSTESİ	xv
ÇİZELGE LİSTESİ	xvii
KISALTMALAR	xix
SİMGE LİSTESİ	xxi
1. GENEL BİLGİLER	1
1.1 Nonketotik Hiperglisinemi Hastalığı.....	2
1.2 Nonketotik Hiperglisinemi Hastalığının Genetik Temeli	5
1.3 NKH’de Tanı Yöntemleri.....	6
1.3.1 Klinik bulgular	6
1.3.2 Laboratuvar bulguları.....	6
1.3.3 Beyin manyetik rezonans görüntüleme (MRG)	7
1.3.4 Beyin manyetik rezonans spektroskopisi (MRS).....	7
1.4 NKH Tanısal Testleri	7
1.4.1 NKH’de moleküler genetik testler	8
1.5 NKH Klinik Semptomları	9
1.6 NKH Takip ve Tedavisi	10
1.7 NKH Prognozu	12
1.8 MikroRNA (miRNA) Genel Bilgiler	12
1.8.1 miRNA sentezi	15
1.8.2 miRNA hücresel rolleri ve fonksiyonları	17
1.8.3 miRNA, kalıtsal metabolik hastalıklar ve NKH	18
1.8.4 miRNA ve tedavi olanakları	23
1.8.5 miRNA’larda güncel tedaviler	24
1.9 miRNA Hastalık İlişkisinin Belirlenmesi	28
2. MATERYAL VE METOT	31
2.1 Hasta Grupları	31
2.2 Örnek Temini	32
2.3 RNA İzolasyonu	33
2.4 Yüksek Ölçekli RNA Dizileme Analizi	34
2.4.1 Yüksek ölçekli RNA dizileme analizi metod.....	34
2.4.2 Transkriptom sekans analizi.....	34
2.4.3 Kümeleme ve sekanslama	35
2.4.4 Veri analizi	35
2.4.5 Bilinen miRNA dizisi hizalama	35
2.4.6 Yeni miRNA tahmini	36
2.4.7 miRNA miktarının belirlenmesi.....	36

2.4.8 Diferansiyel olarak ifade edilmiş genlerin GO ve KEGG ile analizi	36
2.5 Biyoinformatik Analiz	37
2.6 cDNA Sentezi ve Real Time qPCR Analizi	41
2.7 Analiz Sonuçlarını Değerlendirme	42
3. BULGULAR	45
3.1 Hasta Verilerinin Sonuçları ve Genetik Analizleri	45
3.2 Küçük RNA Dizileme Verilerinin Genel Görünümü	45
3.3 Bilinen miRNA'ların Analizi	53
3.3.1 Farklı miRNA'ların tarama ve tanımlanması	53
3.3.2 Farklı miRNA aday hedef genlerinin zenginlik analizi	55
3.3.3 Aday miRNA'ların KEGG ve GO zenginlik analizi	58
3.4 Bilinmeyen (Novel) miRNA'ların Analizi	61
3.5 Belirlenen Aday miRNA'ların RT-qPCR Analizleri	61
4. TARTIŞMA	73
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	81
KAYNAKLAR	85
EKLER	97
ÖZGEÇMİŞ	101

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

Şekil 1.1 : Glisin parçalayıcı enzim kompleksi (glisin yıkım sistemi).	4
Şekil 1.2 : Glisin metabolizması. Kısaltmalar: 3PGA: 3-fosfogliserat, THF: Tetrahidrofolat, NH ₃ : Amonyak, CO ₂ : Karbondioksit.....	4
Şekil 1.3 : Santral dogma, miRNA'ların ve eksojen faktörlerin önemi.....	14
Şekil 1.4 : miRNA sentez mekanizması (BioRender.com'da 7 Ekim 2024 tarihinde oluşturulmuştur).	17
Şekil 1.5 : miRNA izolasyon, proliferasyon ve tahmin basamakları.	18
Şekil 1.6 : miRNA'nın mRNA üzerindeki etki mekanizmaları.	24
Şekil 2.1 : A) Bireylerden alınan numuneler ile RNA sekanslama ve biyoinformatik analiz basamakları, B) NKH ilişkili aday miRNA'ların belirlenmesi için fonksiyonel çalışma basamakları.	40
Şekil 3.1 : RNA sekans analizi verileri okuma uzunluklarının dağılımı.....	48
Şekil 3.2 : <i>AMT</i> homozigot ve heterozigot bireylerde ilişkili miRNA sayısı.	51
Şekil 3.3 : <i>GLDC</i> homozigot ve heterozigot bireylerde miRNA sayısı.	52
Şekil 3.4 : RNA sekans analizi hasta, heterozigot ve kontrol grubu arasındaki korelasyon verileri.....	54
Şekil 3.5 : KEGG (A) ve GLAD4U (B) hsa-miR-671-3p yolak analiz verisi.	56
Şekil 3.6 : Sekans analizinde <i>AMT</i> ve <i>GLDC</i> geni hasta ve heterozigot bireylerde korele olan miRNA'lar.....	58
Şekil 3.7 : P1 ve C1 arasındaki zenginleştirilmiş GO (A), KEGG (B) diyagramı.....	60



ÇİZELGE LİSTESİ

Sayfa

Çizelge 1.1 : Glisin parçalayıcı sistemi komponentleri.	5
Çizelge 1.2 : Nonketotik hiperglisemi’de BOS ve plazma glisin konsantrasyonu [ortanca (en düşük-en yüksek) değerler].	6
Çizelge 1.3 : Klasik NKH’de kullanılan moleküler genetik testler.	9
Çizelge 1.4 : Kalıtsal metabolizma hastalıklarında miRNA’lar ile ilgili çalışmalar. .	22
Çizelge 1.5 : Faz çalışması devam eden/tamamlanmış miRNA’lar.	29
Çizelge 2.1 : <i>AMT</i> geni ilişkili PubChem kaynaklı yolak isimlendirmeleri.	37
Çizelge 2.2 : <i>GLDC</i> geni ilişkili PubChem kaynaklı yolak isimlendirmeleri.	38
Çizelge 2.3 : cDNA sentez protokolü.	41
Çizelge 2.4 : cDNA sentez reaksiyon şartları.	41
Çizelge 2.5 : U6 Primeri LOT: 20103903-5 (Qiagen, ALMANYA) için protokolü.	42
Çizelge 2.6 : RT-qPCR reaksiyon şartları.	42
Çizelge 3.1 : NKH hastaları klinik, laboratuvar ve görüntüleme bulguları.	46
Çizelge 3.2 : NKH hastaları, heterozigot bireyler ve kontrol gruplarının epidemiyolojik ve genetik verileri.	47
Çizelge 3.3 : Küçük RNA dizilemesi, kalite analizi, filtreleme ve hizalama adımlarıyla üretilen verilerin istatistikleri.	49
Çizelge 3.4 : Sekans verilerinde hasta, heterozigot gruplarda kontrol grubuna göre anlamli farklılık gösteren miRNA’lar.	50
Çizelge 3.5 : Sekans analizi veri dağılımı.	53
Çizelge 3.6 : Hasta ve taşıyıcı bireylerin kontrol grubuna göre değişen miRNA sayıları.	55
Çizelge 3.7 : Biyoinformatik analizler sonucu NKH yolağı ile ilişkili olan ve doğrudan <i>AMT</i> ve <i>GLDC</i> mRNA’larına bağlanabilen aday NKH ilişkili miRNA’lar.	59
Çizelge 3.8 : Biyoinformatik analiz sonrası NKH ilişkili olduğu belirlenen onbir bilinen miRNA.	62
Çizelge 3.9 : NKH hastaların kontrol grubuna göre RT-qPCR $2^{-\Delta\Delta CT}$ verileri (Kontrol grubu 1 olarak kabul edilmiştir).	65
Çizelge 3.10 : NKH taşıyıcı bireylerde kontrol grubuna göre RT-qPCR $2^{-\Delta\Delta CT}$ verileri. (Kontrol grubu 1 olarak kabul edilmiştir).	66
Çizelge 3.11 : NKH hastaların ve taşıyıcı bireylerin RT-qPCR sonuçların ortalamaları ve standard deviyasyonları.	69
Çizelge 3.12 : NKH hastalarında sekans ve RT-qPCR sonuçları istatistiksel analiz değerleri.	70



KISALTMALAR

3PGA	: 3-fosfogliserat
ABD	: Amerika Birleşik Devletleri
Ago	: Argonaute
ALS	: Amiyotrofik lateral skleroz
ASO	: Antisens oligonükleotid
BOS	: Beyin omurilik sıvısı
<i>C. elegans</i>	: <i>Caenorhabditis elegans</i>
CDS	: Coding Sequence
dsRNA	: Double-stranded RNA
DTR	: Derin tendon refleksi
EEG	: Elektroensefalografi
ENCODE	: Encyclopedia of DNA elements
GO	: Gen ontology
HCV	: Hepatit C virus
HD	: Huntington disease
KEGG	: Kyoto encyclopedia of genes and genomes
KLL	: Kronik lenfositik lösemi
LDL	: Low- density lipoprotein
LNA	: Locked nükleik asit
miRNA	: MikroRNA
MRG	: Manyetik rezonans görüntüleme
MSUD	: Maple syrup urine disease
ncRNA	: Non-coding RNA
NKH	: Nonketotik hiperglisinemi
NMDA	: N-metil-D-aspartik asit
NPC	: Niemann-Pick tip C
OD	: Otozomal dominant kalıtım
OR	: Otozomal resesif kalıtım
OXPHOS	: Oxidative phosphorylation
PDH	: Pirüvat dehidrogenaz
PEG	: Perkütan gastroenterotomi
piRNA	: PIWI-interacting RNA
pre-miRNA	: Precursor-miRNA
pri-miRNA	: Primary-miRNA
RISC	: RNA-induced silencing complex
RNA	: Ribonükleik asit
RNAi	: RNA interferans
THF	: Tetrahidrofolat
XL	: X'e bağlı kalıtım



SİMGE LİSTESİ

Bu çalışmada kullanılmış olan simgeler açıklamaları ile birlikte aşağıda sunulmuştur.

Simgeler	Açıklama
%	Yüzde
°C	Santigrat derece
μmol	Mikromol
μl	Mikrolitre
C ₁	Karbon atomu
CO ₂	Karbondioksit
dk	Dakika
g	Gravity
kg	Kilogram
mg	Miligram
mmol	Milimol
ng	Nanogram
L	Litre
NH ₃	Amonyum
sn	Saniye
V	Volt



1. GENEL BİLGİLER

Nonketotik hiperglisinemi (NKH), glisin yıkımında rol alan ‘glisin parçalayıcı enzim’ (glycine cleavage enzyme) kompleksi veya ‘glisin yıkım’ sistemindeki aktivite eksikliğine bağlı olarak gelişen otozomal resesif (OR) geçişli bir metabolik hastalıktır. Glisin kan, idrar, beyin omurilik sıvısı (BOS) ve diğer vücut sıvılarında birikir. Bu hastalıkta glisin beyinde biriktiği için ‘glisin ensefalopatisi’ olarak da anılır [1,2].

NKH, glisin parçalayıcı enzim sistemindeki dört enzimden herhangi birinin (P, T, H ve L proteinleri) eksikliği ile oluşur. Bu enzimatik bozukluk OR geçiş gösteren genetik bir hastalıktır. Glisin, yıkım ürünlerine parçalanamazsa vücutta birikir ve toksik etkileri ortaya çıkar. NKH’de ilk bulgular genellikle doğumda ya da ilk haftalarda meydana gelir. Glisinin beyin sapı ve medulla spinalisde inhibitör etkisi ile hipotoni, apne, hıçkırık atakları; beyinde eksitator etkisi ile nöbet, zihinsel gerilik ve çeşitli serebral disfonksiyon bulguları oluşur [3]. Beyindeki eksitator etki, nöronların aktivasyonunu artırır ve glutamat gibi uyarıcı nörotransmitterlerin aracılığıyla sinaptik iletimi kolaylaştırarak etki eder. Eksitasyon; öğrenme, hafıza ve hareket gibi birçok beyin fonksiyonu için gereklidir. Ancak, aşırı eksitasyon nörotoksisiteye yol açar ve nörodejeneratif hastalıkların patofizyolojisinde rol alır. Bu nedenle, eksitator ve inhibitör sistemler arasındaki denge, sağlıklı bir beyin fonksiyonu için kritik öneme sahiptir.

NKH’nin kesin tanısı, lenfositlerde ya da karaciğer biyopsi örneklerinde enzim aktivitesinin ölçümü ya da moleküler genetik analiz yöntemleri ile genetik değişikliğin saptanması ile konulur [2]. Doğru tanı, hastanın öyküsünün dikkatli yorumlanmasına, iyi bir nörolojik muayene ve güvenilir laboratuvar bulgularına bağlıdır. Genellikle NKH’de BOS/plazma glisin oranı 0,08’in üzerindedir ve normal oran <0,02 (bazı kaynaklarda <0,04) olarak kabul edilmektedir. Ancak BOS’da hücre saptanması durumunda yalancı pozitiflik olabilir [4]. NKH’nin prognozunu değiştirecek uygun bir tedavi metodu henüz kesin olmamakla birlikte, mevcut tedavilerde vücutta glisin birikiminin önlenmesi ve atılması hedeflenmektedir. Bunun için; proteinden kısıtlı beslenme, oral sodyum benzoat ile glisin fazlasının atılması, folinik asit, piridoksin

gibi vitamin desteği ile glisin parçalayıcı enzim kompleksinin aktivasyonu ve dekstrometorfan ile glisin ekzotoksitesisi sınırlandırılmaya çalışılır [4,5].

Tanımlayıcı nitelikte olan bu çalışmada, Sağlık Bilimleri Üniversitesi Ankara Dr. Sami Ulus Kadın Doğum, Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Eğitim ve Araştırma Hastanesi'ne başvuran ve izlemde 'Nonketotik hiperglisinemi' kesin tanısı ile izlenen hasta popülasyonu incelenmiştir.

1.1 Nonketotik Hiperglisinemi Hastalığı

NKH, diğer adıyla glisin ensefalopatisi, OR geçişli bir aminoasit metabolizma bozukluğu olarak tanımlanır. Bu hastalık, glisinin yıkımında görev alan glisin parçalayıcı enzim kompleksi veya glisin yıkım sistemindeki aktivite eksikliğinden kaynaklanır. NKH, temel olarak iki ana grupta sınıflandırılır: klasik NKH ve variant NKH. Klasik NKH, genellikle *GLDC*, *AMT*, *GCSH* ve *GCSL* genlerinde meydana gelen mutasyonlardan kaynaklanır. Bu form, klinik belirtilerine göre ağır ve hafif olmak üzere ikiye ayrılır. Ağır formda psikomotor gelişim ciddi şekilde etkilenir, tedaviye dirençli epilepsi gözlenir ve gelişim basamaklarında neredeyse hiç ilerleme olmaz. Hafif formda ise psikomotor gelişim daha iyi bir seyir izler; ancak dikkat eksikliği, hiperaktivite, kore ve epizodik letarji gibi belirtiler görülebilir. 'Variant NKH', daha önce 'atipik NKH' olarak bilinen bir alt gruptur ve lipoat sentezi ile transportunda görev alan *LIAS*, *BOLA3*, *NFUI*, *GLRX5*, *ISCA2*, *IBA57*, *LIPT1* ve *LIPT2* gibi genlerdeki mutasyonlarla ilişkilidir. 'Variant NKH'de klasik formun belirtilerine ek olarak lökoensefalopati, optik atrofi, kardiyomiyopati ve laktik asidoz atakları gibi mitokondropati bulguları eşlik edebilir. NKH, başlangıç yaşına göre üç alt gruba ayrılır: neonatal (<2 hafta), infantil (2 hafta- 3 ay) ve geç başlangıçlı (>3 ay). Neonatal dönemdeki klasik NKH vakalarının %85'i ağır fenotipte, %15'i hafif fenotipte görülürken, infantil başlangıçlı klasik NKH vakalarının yarısı ağır, diğer yarısı hafif fenotipte seyreder. Geç başlangıçlı vakaların tamamı hafif fenotipte izlenir. Neonatal başlangıçlı klasik NKH, klinik olarak en ciddi seyirli tiptir. Doğumdan sonraki ilk günlerde emmeme, hipotoni, letarji ve apne gibi semptomlarla başlar ve hızla komaya ilerleyebilir. Bu form sıklıkla ölümlü sonuçlanır [1,2].

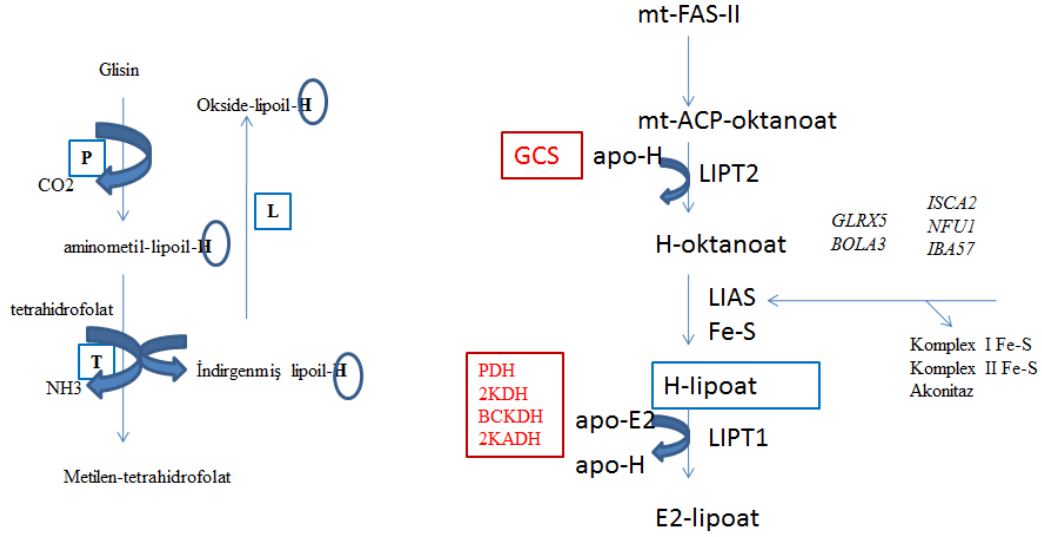
Dünyada NKH görülme sıklığının yaklaşık 250.000 canlı doğumda bir olduğu tahmin edilmektedir [3]. Bu nadir hastalığın sıklığı, belirli bölgelerde yapılan araştırmalarla daha ayrıntılı olarak incelenmiştir. Örneğin, kuzey Finlandiya, NKH'nin en yüksek

oranda tespit edildiği bölge olup, burada görülme sıklığı 12.000 canlı doğumda bir olarak rapor edilmiştir. Genel olarak Finlandiya’da ise bu oran 55.000 canlı doğumda bir olarak bildirilmiştir [4]. Avustralya’da yapılan genetik bir çalışmada sekiz yıl boyunca izlenen 733.527 bebeğin dokuzunda NKH tespit edilmiştir. Bu bebeklerin üçünde, yaşamın ilk 72 saati içinde glisin seviyelerinin yüksek olduğu belirlenmiştir [5]. Ülkemizde ise NKH prevalansı veya insidansını değerlendiren bir çalışma bulunmamaktadır. NKH nadir bir hastalık olup, görülme sıklığı farklı etnik gruplar arasında değişiklik gösterebilmektedir [6,7].

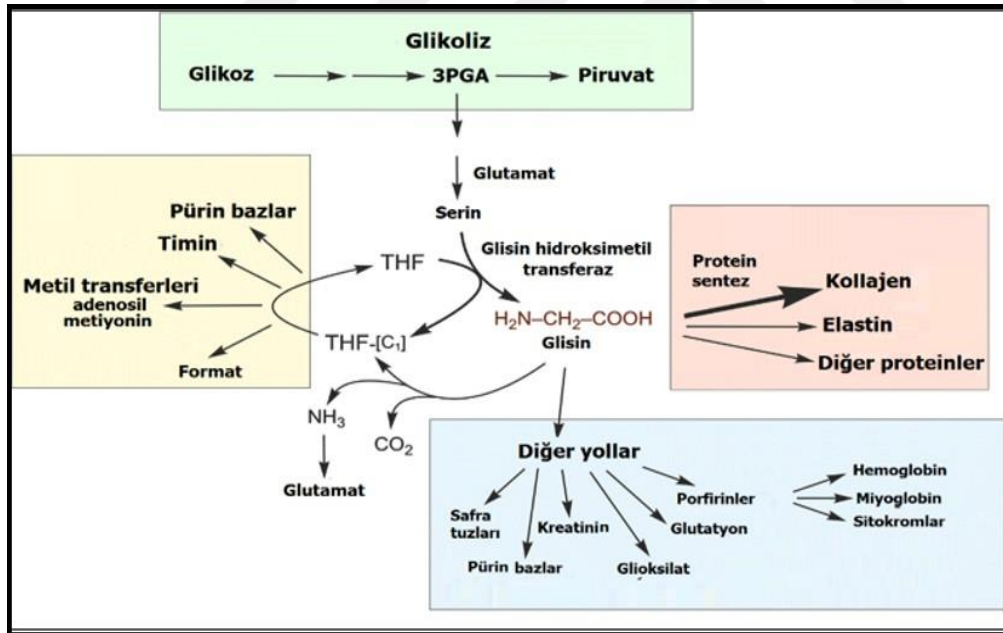
NKH, metabolik blokaj nedeniyle biriken toksik metabolitlerle karakterize bir hastalıktır. Bu durum, mitokondriyal glisin parçalayıcı enzim kompleksindeki aktivite eksikliğinden kaynaklanır. Bu kompleks, piridoksal fosfat bağımlı P proteini (*GLDC* geni), tetrahidrofolat gerektiren T proteini (*AMT* geni), enzime hidrojen taşıyan H proteini (*GCSH* geni) ve lipoamid dehidrogenaz olan L proteini (*GCSL* veya *DLD* geni) gibi dört spesifik proteinden oluşur [2] (Şekil 1.1). Kompleksin proteinlerinden herhangi birindeki veya kofaktörlerindeki eksiklik ya da aktivite kaybı, dokularda glisin yıkımını engeller. Bunun sonucunda özellikle beyin dokusunda biriken glisin, toksik etkiler yaratarak hastalığın klinik belirtilerine yol açar [8]. BOS glisin seviyelerinin belirgin şekilde arttığı görülür [1]. Glisin, vücuttaki en basit yapıli aminoasitlerden biridir ve non-esansiyel bir aminoasit olarak sentezlenebilir. Birçok proteinin yapısında yer alır ve vücuda alınan glisinin yaklaşık yarısı protein sentezinde kullanılır. Bu süreç genellikle serin ve treonin aminoasitleri aracılığıyla gerçekleşir. Glisin, özellikle beyinde bir nörotransmitter olarak görev yapmasının yanı sıra çeşitli biyokimyasal reaksiyonlarda önemli bir rol oynar [9] (Şekil 1.2).

Glisin, beyinde çeşitli bölgelerde hem eksitator hem de inhibitör etkiler gösterebilir. Korteks, serebellum ve bazal ganglionlarda, N-metil-D-aspartik asit (NMDA) reseptörleri aracılığıyla eksitator; beyin sapı ve medulla spinaliste ise glisin reseptörleri üzerinden inhibitör etkiler meydana getirir. Glisinin inhibitör etkisi, glisin reseptörlerinde klor kanallarını açarak hücre membranını hiperpolarize etmesiyle gerçekleşir. Bu reseptör, striknin tarafından inhibe edilebilir. Bununla birlikte, hayvan deneyleri göstermiştir ki glisin reseptörleri erken beyin gelişimi sırasında, GABAa reseptörlerine benzer şekilde eksitator bir rol üstlenir [11,12]. Eksitator etkisini, NMDA reseptörleri yoluyla glutamatın eksitator etkisini artırarak gösteren glisin, aşırı aktivite durumunda glutamatın ekzotoksik etkisiyle nöronal hücre ölümüne yol

açabilir. Bu durum, yenidoğan döneminde NKH tanısı konan bebeklerde NMDA reseptörlerinin etkisiyle dirençli nöbetlerin görülmesine neden olur. Bu bulgu, glisin merkezi sinir sistemindeki eksitator ve nörotoksik etkilerini açıklamaktadır [9,13].



Şekil 1.1 : Glisin parçalayıcı enzim kompleksi (glisin yıkım sistemi) [10].



Şekil 1.2 : Glisin metabolizması. Kısaltmalar: 3PGA: 3-fosfogliserat, THF: Tetrahidrofolat, NH₃: Amonyak, CO₂: Karbondioksit [9].

Glisinin beyin sapı ve medulla spinalisteki inhibitör etkisi ise hipotoni, apne ve hıçkırık gibi semptomlarla sonuçlanır. Glisinin yıkımında mitokondriyal glisin parçalayıcı enzim kompleksi temel bir rol oynar. Bu enzim kompleksi, glisini

karbondioksit (CO₂), amonyak (NH₃) ve karbon atomuna (C₁) parçalayarak metabolize eder. Glisin, vücudun önemli bir karbon atomu sağlayıcısıdır ve tetrahidrofolat yardımıyla serin-hidroksimetil transferaz enzimi aracılığıyla serin-glisin dönüşümünde görev alır. Bu dönüşüm, glisin sentezinin ana kaynağıdır. Bu nedenle, diyetle alınan glisinin NKH tedavisindeki etkisi oldukça sınırlıdır. Ayrıca glisin; pürin, glutatyon ve porfirin gibi moleküllerin yapısında bulunur. Glisin parçalayıcı enzim kompleksi, karaciğerde, plasentadaki sinsityotroblastlarda ve beyinde glisin metabolizmasında aktif bir rol oynar [12].

1.2 Nonketotik Hiperglisinemi Hastalığının Genetik Temeli

Glisin parçalayıcı enzim, mitokondride bulunan ve dört protein kompleksinden oluşan bir enzimdir (Çizelge 1.1). Bu dört proteinden biri, *GLDC* geni tarafından kodlanan piridoksal fosfat bağımlı P-proteini (glisin dekarboksilaz) iken, diğeri *AMT* geni tarafından kodlanan tetrahidrofolat bağımlı T-proteini (aminometil transferaz) olarak bilinir. *GCSH* geni tarafından kodlanan lipoik asit hidrojen taşıyıcı H-proteini ve *GCSL (DLD)* geni tarafından kodlanan NAD bağımlı lipoamid dehidrogenaz L-proteini de bu kompleksi oluşturan diğer proteinlerdir. Klasik NKH, *GLDC* ve *AMT* genlerinde oluşan mutasyonlarla ilişkilendirilirken, ‘variant NKH’ ise *LIAS*, *BOLA3*, *GLRX5*, *NFUI*, *ISCA2*, *IBA57*, *LIPT1* ve *LIPT2* genlerindeki mutasyonlardan kaynaklanmaktadır. Ancak, H-proteinini kodlayan *GCSH* ve L-proteinini kodlayan *GCSL (DLD)* genlerinde bugüne kadar anlamlı bir mutasyon rapor edilmemiştir. Otuz hastayı içeren bir çalışmada, klasik NKH vakalarının %87’sinde genetik mutasyonların P-proteininde bulunduğu saptanmıştır [14].

Çizelge 1.1 : Glisin parçalayıcı sistemi komponentleri [3].

Komponentler	Kısaltma	Gen	Ekzon Sayısı	Aminoasit Sayısı	Kromozom
Glisin dekarboksilaz	P-protein	<i>GLDC</i>	25	1020 aa	9p24
Aminometil transferaz	T-protein	<i>AMT</i>	9	403 aa	3q21
Hidrojen taşıyıcı protein	H-protein	<i>GCSH</i>	5	173 aa	16q24
Dihidrolipoamid dehidrogenaz	L-protein	<i>GCSL</i>	14	509 aa	7q31

1.3 NKH'de Tanı Yöntemleri

Glisin parçalayıcı enzim sisteminin bileşenlerini kodlayan *GLDC* ve *AMT* genlerindeki biallelik patojenik varyantlar veya muhtemelen üçüncü bir gen olan *GCSH*'deki olası patojenik varyantlar nedeniyle klasik NKH, aşağıda belirtilen klinik, laboratuvar ve nörolojik belirtileri gösteren bireylerde değerlendirilmelidir [15].

1.3.1 Klinik bulgular

Yenidoğanlarda hipotoni, apne, aşırı uyku hali, koma ve elektroensefalografide (EEG) burst supresyon paterninin varlığı görülür. Bebeklerde aşırı uyku eğilimi, kas tonusunda azalma, nöbetler, yetersiz beslenme ve gelişim basamaklarında gecikmeler olur. Çocuklarda gelişimsel ilerlemede gerilik, kolik ya da kolik dışı hiperaktivite ve belirti dönemlerinde kötüleşmeler izlenir. Özellikle hiperaktivite, gelişimsel gerilik, nöbetler ve/veya bunlardan herhangi biriyle birlikte izole edilmiş yüksek plazma glisin seviyeleri olan bireyler olduğu gözlenir [15].

1.3.2 Laboratuvar bulguları

Plazma ve BOS'da eş zamanlı yapılan kantitatif aminoasit analizinde izole edilmiş yüksek glisin seviyelerinin bir kombinasyonu ve artmış BOS/plazma glisin oranı, NKH ihtimalini artırır. Ancak, tanının kesinleşmesi için doğrulayıcı testlerin yapılması gereklidir (Çizelge 1.2). Artmış BOS/plazma glisin oranı, özellikle BOS'daki glisin seviyelerinin yükseldiği durumlarda tanı açısından belirleyicidir. İdrar organik asit analizinin genellikle normal sonuçlanması beklenir. Ancak, birden fazla açığlisin esterinde hafif artışlar gözlemlenebilir [16].

Çizelge 1.2 : Nonketotik hiperglisemi'de BOS ve plazma glisin konsantrasyonu [ortanca (en düşük-en yüksek) değerler] [16].

	NKH Fenotipi		Normal Seviyeler (µmol/L)
	Şiddetli (µmol/L)	Zayıf (µmol/L)	
BOS glisin konsantrasyonu	228 (40-510)	99 (41-230)	<20
Plazma glisin konsantrasyonu	1133 (342-2363)	822 (342-1590)	125-450
BOS/plazma glisin oranı	0.22 (0.09-0.45)	0.13 (0.04-0.22)	≤0.02

1.3.3 Beyin manyetik rezonans görüntüleme (MRG)

NKH tanısı alan bireylerde, yaşamın ilk üç ayında görülen klinik belirtilerle birlikte, difüzyon ağırlıklı görüntülemelerde tutarlı anormallikler rapor edilmiştir. Tanı konan tüm bebeklerde, internal kapsülün arka bölümü, ön beyin sapı, arka tegmental yollar ve serebellumda difüzyon kısıtlaması tespit edilmiştir [16, 17]. Bu alt bölgelerdeki difüzyon kısıtlaması üç aylık dönemin ardından azalırken, genellikle motor kortekse doğru ilerler. 3 ila 14 ay arasında supratentoryal beyaz maddede yaygın bir difüzyon kısıtlaması gözlenmesi olağandır. Korpus kallozumda kısmi atrofi ve incelmeye görülebilir. Bebeklerde genişlemiş retroserebellar kistik alanlarla birlikte hidrosefali oluşumu meydana gelebilir. Atrofi, ağır formdaki NKH'li bireylerde ileri yaşlarda sıkça görülürken, hafif formdaki bireylerde genellikle izlenmez [16].

1.3.4 Beyin manyetik rezonans spektroskopisi (MRS)

Kısa eko zamanında (TE = 35 ms) yapılan beyin MRS'de, 3,55 ppm'deki glisin sinyali myoinositol ile örtüşmektedir. Ancak, ara eko zamanında (TE = 135 ms), glisin sinyali 3,6 ppm'de herhangi bir çakışma olmaksızın tespit edilebilir. Ağır form NKH'li hastaların çoğunda belirgin bir glisin piki bulunurken, hafif form NKH'de glisin piki daha zayıf olduğundan tespiti daha zordur [17, 18].

1.4 NKH Tanısal Testleri

NKH'nin kesin tanısı, lenfositlerde veya karaciğer biyopsisi örneklerinde enzim aktivitesinin ölçülmesi ya da genetik mutasyonun veya değişikliğin moleküler düzeyde gösterilmesiyle konulur [2]. Bunun yanı sıra, glisin değişim reaksiyon testi (glycine exchange assay), P ve H proteinlerinin T protein aktivitesine bağımlı olmadan kombine işlevselliğini değerlendirmek için kullanılabilir [15]. Bu testte, P veya H protein kusurlarında reaksiyon eksikliği görülürken, T protein kusurlarında reaksiyon normal seyreder. Ayrıca, C₁₃-Glisin nefes testi, NKH hastalarında C₁₃-CO₂ seviyelerinin azaldığını ortaya koymaktadır [18]. Laboratuvar tanısı, plazma ve BOS glisin seviyelerinin ölçümüyle başlar. Bu analizler eş zamanlı olarak yapılmalı ve BOS örneğinin kanla kontamine olmamasına dikkat edilmelidir, çünkü kontaminasyon aminoasit sonuçlarını etkileyebilir. BOS/plazma glisin oranının >0,08 olması NKH için tanı koydurucudur. Daha hafif etkilenmiş hastalarda bu oran genellikle 0,04-0,1 arasında değişir. Bu nedenle 0,04-0,08 arası bir oran, 'ara değer' olarak değerlendirilir.

Artmış BOS/plazma glisin oranı özellikle BOS glisin seviyesinin belirgin şekilde yükseldiği durumlarda anlamlıdır. BOS'un kan veya serumla kontamine olduğu durumlarda, örneğin travmatik bir lomber ponksiyon sırasında, BOS glisin ve BOS/plazma glisin oranları yükselmiş olarak ölçülebilir. Bu durumu BOS protein düzeylerinin artışı gösterebilir. Plazma ve BOS glisin seviyelerindeki artış ve yüksek BOS/plazma glisin oranı, valproat tedavisinin bir sonucu olarak da ortaya çıkabilir. İlginç bir şekilde, valproat tedavisinde yalnızca BOS glisin seviyelerinin yükseldiği durumlar da gözlenebilir. Valproat, bu etkisini glisin parçalayıcı enzim aktivitesini azaltarak yapar. Propiyonik asidemi ve metilmalonik asidemi gibi organik asidemiler, karaciğerde glisin parçalayıcı enzim aktivitesini düşürerek hiperglisinemiye yol açabilir. Metabolik asidoz varlığında da glisin parçalayıcı enzim aktivitesinde azalma meydana gelir. Ek olarak, dallı zincirli aminoasitlerin çeşitli metabolitleri de bu enzimin aktivitesini baskılayabilir. Nadir durumlarda, hafif NKH vakalarında BOS glisin oranı normal aralıklarda kalabilir. 'Variant NKH' hastalarının çoğunda plazma ve BOS glisin seviyeleri hafif düzeyde artar. Bunun yanı sıra, plazma alanin, serum laktat, pirüvat ve idrar organik asit analizinde 2-ketoglutarat düzeylerinde artış görülebilir. *NFUI* gen mutasyonu olan bireylerde ayrıca 2-aminoadipik asit ve 2-ketoadipik asit düzeyleri de yükselebilir. Enzim analizlerinde, glisin parçalayıcı enzim aktivitesindeki azalmaya ek olarak pirüvat dehidrogenaz (PDH) aktivitesinde düşüş ve demir-sülfür kümesi sentez bozuklukları (*NFUI*, *ISCA2*, *IBA57*, *BOLA3*) nedeniyle OXPHOS (oksidatif fosforilasyon) zincirinin kompleks 1 ve 2 aktivitelerinde azalma görülebilir. NKH tanısında altın standart yöntem, karaciğerdeki glisin parçalayıcı enzim kompleksi ve bileşenlerinin aktivitesini ölçmektir. Eksik proteinin tanımlanması, ilişkili gendeki mutasyon analizini mümkün kılar. Mutasyonun belirlenmesi, tanıyı desteklemenin yanı sıra genetik danışma ve prenatal tanı süreçlerinde de büyük önem taşır. EEG ve diğer görüntüleme yöntemleri genellikle spesifik anormallikler göstermediğinden, 'variant NKH' tanısına sınırlı katkı sağlar. Beyin MRS, glisin konsantrasyonunu girişimsel olmayan bir yöntemle değerlendirmek için kullanılabilir [19].

1.4.1 NKH'de moleküler genetik testler

Glisin parçalayıcı enzime katılan genlerde yapılan mutasyon analizi, NKH tanısında en kesin yöntemdir. Prenatal tanı amacıyla, ailesel mutasyon tespit edildikten sonra ilgili gendeki mutasyon analizine başvurulabilir. Ayrıca, glisin parçalayıcı enzim

aktivitesi, karaciğer veya plasenta dokularından ölçülebilir. Ancak, bu enzimatik analiz yöntemi ailede mutasyonun bilinmediği durumlarda prenatal tanı için kullanılabilse de, %1 oranında yalancı negatif sonuç verebileceği için tercih edilmesi önerilmez [15]. *GLDC* ve *AMT* genleri, biallelik patojenik varyantların neden olduğu klasik NKH ile ilişkili iki ana gendir (Çizelge 1.3). Öte yandan, *GCSH* genine ait iki homozigot varyant taşıyan bireyler bildirilmiş olmasına rağmen, bu değişikliklerin patojenitesine dair henüz yeterli kanıt bulunmamaktadır. *GCSH* geninde mutasyon tespit edilen başka bir NKH vakası ise bugüne kadar tanımlanmamıştır [15].

Çizelge 1.3 : Klasik NKH’de kullanılan moleküler genetik testler [16].

Gen	NKH’deki Patojen Varyantların Oranı	Tespit Edilebilen Patojen Varyantların Genetik Analiz Metoduna Göre Oranları	
		Dizi analizi	Gen hedefli delesyon / duplikasyon analizi
<i>AMT</i>	%20	>%99	Bilinmiyor
<i>GLDC</i>	%80	%80	%20

1.5 NKH Klinik Semptomları

NKH klinik bulguları, glisin parçalayıcı enzim kompleksindeki defektin tam veya kısmi olmasına bağlı olarak değişiklik gösterir. En sık görülen form olan neonatal NKH, genellikle yaşamın ilk birkaç gününde (6 saat-8 gün) ortaya çıkar. Yenidoğanların üçte ikisinde semptomlar ilk 48 saat içinde başlar. Klinik belirtiler arasında beslenme zorluğu, emmeme, letarji, nöbet, hipotoni, apne, stupor, koma ve ölüm yer alır. Glisinin zarar verici etkileri, nörotransmitter olarak oynadığı rolle ilişkilidir. Solunum üzerinde inhibitör etkisi ile baskılayıcı bir etki göstererek hipotoni ve güçsüzlük oluştururken, eksitator etkisi ile nöbetlere neden olur. Nöbetler genellikle myoklonik tipte ya da hıçkırık şeklinde görülür ve hıçkırık, NKH için belirleyici bir klinik bulgu olarak kabul edilir [20]. Çoğu vakada mekanik ventilasyon desteği gereklidir. Yenidoğan döneminde vakaların en az %90’ında anormal EEG bulguları saptanır. EEG’de genellikle burst supresyon paterni izlenir. Bu patern, NKH’de sık görülen bir EEG özelliğidir ve erken myoklonik ensefalopati ile benzerlik taşır [15,20]. Klasik NKH’de klinik çizelge genellikle ağır seyirlidir ve vakaların %30-35’i yenidoğan döneminde kaybedilir. Hayatta kalanların büyük bir kısmında ciddi nörogelişimsel gerilik ve nöbetler görülür [8].

Glisin, zararlı etkisini nöronal gelişimi bozarak ve miyelin yıkımına yol açarak gösterir. Bu süreç, miyelin dokuda vakuolizasyon ve kayıplara neden olur. Beyindeki amino asitlerin anormal artışı, protein sentezinin bozulmasına ve dolayısıyla miyelin sentezinde aksamalara yol açar. Beyin görüntülemelerinde hipomiyelinizasyona bağlı anormal beyaz cevher yapıları ve korpus kallozum hipoplazisi ya da agenezisi sıklıkla görülür. Korpus kallozum anomalileri, beyin MR görüntüleme ile en iyi şekilde tespit edilir ve NKH tanısı alan yenidoğanların yaklaşık %50'sinde görülür. Daha nadir olarak serebral kortikal atrofiye rastlanabilir [21]. Difüzyon ağırlıklı beyin MR görüntüleme, hipomiyelinizasyona bağlı beyaz cevher kaybı nedeniyle beyin sapı, serebral pedinküller ve internal kapsülün posterior kısmında sinyal artışı izlenir. Beyin MR spektrometride (MRS), beyindeki glisin seviyesinin belirgin şekilde arttığı gözlemlenir. Bu bulgu, glisin parçalayıcı enzim kompleksindeki enzimatik bir defektin varlığını işaret eder [21].

1.6 NKH Takip ve Tedavisi

Önem, birinci trimesterde koryon villus örnekleme ile sağlanabilir. Bu testte glisin parçalayıcı enzim aktivitesinin azalması ya da yokluğu tanıyı doğrular. Erken tanı, yenidoğan döneminde tedavi imkanı sunar ve nörodejenerasyonun erken evrede engellenmesini sağlar. NKH tedavisinin üç ana hedefi vardır: dokulardaki glisin seviyelerini düşürmek, nöbetleri kontrol altına almak ve NMDA reseptörünün neden olduğu toksisiteyi azaltmaktır. Klasik NKH tedavisinde ilk adım, 250-750 mg/kg/gün (3-6 doz) sodyum benzoat ile plazma glisin seviyelerini azaltmaktır. Sodyum benzoat, glisin ile bir amid bağı oluşturarak hippurik asit meydana getirir ve bu bileşik idrarla atılır. Sodyum benzoat, plazma glisin seviyesini düşürmekle birlikte BOS glisin seviyesinde genellikle etkili değildir. Ancak, yüksek dozlarda sodyum benzoat BOS glisin seviyesini ve nöbet sıklığını azaltabilir; bu durum literatürde beyin MRS ile de desteklenmiştir [22]. Hafif form NKH vakalarında 250-500 mg/kg/gün, ağır form NKH vakalarında ise 500-750 mg/kg/gün doz uygulanabilir. Tedavi sırasında plazma glisin düzeyinin düzenli olarak kontrol edilmesi gereklidir (hedef ≤ 300 $\mu\text{mol/L}$). Glisin seviyesi düştüğünde, sodyum benzoat düzeyleri de takip edilmelidir (toksik olmayan seviye $\leq 2,5$ mmol/L). Sodyum benzoat tedavisinde, bir saat sonra plazma glisin seviyesi ölçülerek bir düşüş beklenir. Yan etkileri arasında tadının kötü olması nedeniyle uyumsuzluk yer alabilir; bu durum nazogastrik sonda kullanımını

gerektirebilir. Gastrit ve özofajit gibi yan etkiler de ortaya çıkabilir, bu nedenle proton pompası inhibitörleri ile birlikte kullanılması önerilir. Yüksek doz sodyum benzoat alımı bulantı, kusma, letarji, koma, nöbetler, hipokalsemi, asidoz, hipernatremi, hipokalemi, karnitin eksikliği ve ölüm gibi toksisite belirtilerine yol açabilir. Bu nedenle karnitin desteği sağlanmalıdır. 750 mg/kg/gün üzerindeki dozlarda böbrek yetmezliği riski artabilir. Ağır form NKH hastaları, glisin ve serin kısıtlı özel bir diyetten yarar sağlayabilir. Sodyum benzoat nöbet sıklığını azaltır ve uyanıklığı artırır, ancak ağır form NKH’de nörolojik gelişim üzerine etkisi sınırlıdır [23]. Hamosh ve çalışma arkadaşları, erken dönemde başlanan sodyum benzoat (ilk doz 500 mg/kg/gün, sonra 750 mg/kg/gün) ve dekstrometorfan tedavisinde hem olumlu hem de başarısız sonuçlar bildirmiştir. Tedaviye verilen yanıtların değişkenliği, hastalığın genetik heterojenitesine işaret eder. NKH’li hastaların çoğu yaşamın ilk haftasında kaybedilirken, bu dönemi atlatanlarda ciddi zihinsel gerilik gelişir [24].

Eksitator aminoasit antagonistleri arasında en yaygın kullanılanlar dekstrometorfan ve ketamindir. Dekstrometorfan, NMDA reseptöründeki glutamat bağlanma yerini bloke ederek nöbetleri azaltır ve uyanıklığı artırır. Günlük 3-15 mg/kg dozunda etkili olabilir. Hafif form NKH’de erken başlanan tedavi, kognitif gelişimde olumlu sonuçlar sağlar ve dikkat artışı ile okul başarısını iyileştirir. Ancak ağır form NKH’de daha az etkili veya etkisizdir. Ayrıca, öksürüğü azaltması nedeniyle tekrarlayan pnömonilere neden olabileceği bildirilmiştir. Ketamin, oral yolla yenidoğanlarda 15 mg/kg/gün, infantlarda ise 9 mg/kg/gün (1-32 mg/kg/gün) olarak uygulanabilir ve hafif NKH’de kognitif fonksiyonların düzelmesine katkı sağlayabilir. Ketaminle intravenöz olarak (8 mg/kg/gün, dört doz) nörolojik semptomlar ve EEG’de kısmi iyileşme gözlemlenmiştir. Sodyum benzoat, dekstrometorfan ve ketojenik diyetle nöbet sıklığında azalma sağlandığı rapor edilmiştir. Striknin, glisinin merkezi sinir sistemindeki etkilerini hedef alır. Glisin reseptöründe inhibitör etkisini gösterir ancak NMDA reseptörüne etkisizdir. Bu nedenle tedavide yeterli yanıt alınamaz. Bazı apneik yenidoğanlarda ekstübasyon oranlarını artırdığı bildirilmiştir [25]. Benzodiazepinler, GABA reseptörünü aktive ederek nöbetlerin sıklığını azaltabilir ancak nörolojik gelişime etkisi bulunmamaktadır. Yenidoğanlarda miyoklonik nöbetler için en etkili tedavilerden biri benzodiazepinlerdir (klonazepam, klobazam). Çocuklarda levitirasetam, topiramet ve fenobarbital sıkça kullanılır. Felbamat, dirençli nöbetlerde etkili olabilir ancak yan etkileri nedeniyle kullanımı sınırlıdır. Vigabatrin, GABA artışı

nedeniyle ağır form NKH hastalarında ani kötüleşmeye yol açabilir ve bu nedenle kullanılmamalıdır. Valproik asit ise NKH tedavisinde kontrendikedir; bu ilaç, plazma ve BOS glisin seviyelerini artırır ve ensefalopatiye neden olabilir [26].

Ketojenik diyet tedavisi, plazma ve BOS glisin seviyelerini düşürebilir, nöbetleri azaltabilir ve hastalarda dikkat süresini artırabilir. Ancak EEG üzerindeki etkisi çeşitli olup, hipsiaritmi tamamen düzelmemiştir. Hiperaktivite ve davranış problemleri için psikoterapiler faydalı olabilir. Skolyoz ve kalça çıkığı için önleyici tedbirler alınmalıdır. İleri dönemde solunum yetmezliği ve tekrarlayan akciğer enfeksiyonları için destek tedavisi önemlidir. *GLDC* ve *AMT* gen mutasyonları olan hastalar, piridoksin ve folinik asit tedavisinden fayda görebilir. Ancak lipoat sentez bozuklukları ile ilişkili vakalarda bu tedaviler etkisizdir ve sodyum benzoat ya da dekstrometorfan fayda sağlamaz [27].

1.7 NKH Prognozu

NKH'de kötü prognozu işaret eden başlıca faktörler arasında, yüksek BOS glisin seviyesi ($>230 \mu\text{mol/L}$) ve beyin MR görüntülemelerinde malformasyonların bulunması yer alır. Hafif form NKH için olumlu prognoz göstergeleri arasında düşük BOS/plazma glisin oranı ($<0,08$), hastalığın geç başlangıçlı olması (≥ 4 ay) ve epilepsinin bulunmaması sayılabilir. Sık tekrarlayan hıçkırık, EEG'de burst supresyon paterni ve hipsiaritmi, kötü prognozu işaret eden bulgular arasında değerlendirilebilir. Klasik NKH'de genotip-fenotip ilişkisi göz önüne alındığında, rezidüel enzim aktivitesinin varlığı iyi bir prognoz göstergesi olarak kabul edilir. Rezidüel aktivitesi bulunmayan iki mutasyonun varlığı her zaman ağır form NKH'yi işaret ederken, mutasyonlardan birinin enzimde kısmi rezidüel aktiviteye yol açması hafif form NKH ile ilişkilendirilir. İki mutasyonun da rezidüel enzim aktivitesine neden olduğu durumlar ise genellikle en iyi nörokognitif sonuçlarla ilişkilidir. Ağır form NKH'de yaşam süresi birkaç ay ile iki dekad arasında değişirken, hafif formlarda yaşam süresi genellikle daha uzundur [1].

1.8 MikroRNA (miRNA) Genel Bilgiler

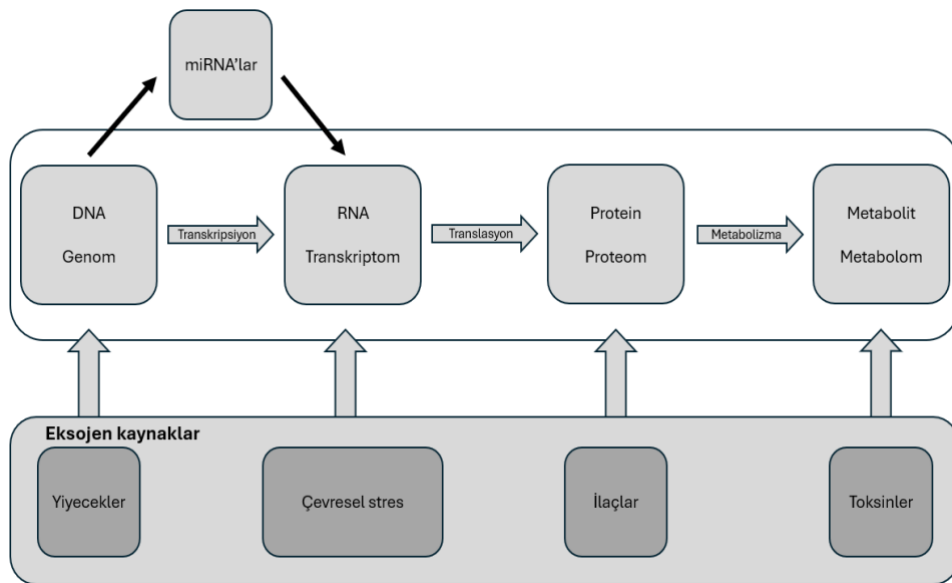
Genetik materyalin ifade edilen kısımlarını (ekzon) ve transkripsiyonun düzenlenmesi ile kontrol altına almak amacıyla birden fazla RNA türü evrimleşmiştir. Argonaute

(Ago) ailesi proteinleriyle olan ilişkili bu RNA'lar 3 grupta değerlendirilir. Bunlar siRNA, PIWI etkileşimli RNA (piRNA) ve miRNA'dır [28]. miRNA'lar, tipik olarak yaklaşık 19-25 nükleotid uzunluğunda, saç tokası şeklinde, DNA'dan üretilen kısa kodlanmayan RNA molekülleri olup, çeşitli türlerin genomlarında doğal olarak kodlanmıştır. Hem transkripsiyonel, hem de post-transkripsiyonel düzeylerdeki hedef mRNA'larının gen ifadesini düzenlemede kilit roller oynarlar [29]. Gen ifadesini düzenleyerek mesajcı RNA (mRNA) stabilitesini ve translasyonunu etkileyerek hücrenel diferansiyasyon, proliferasyon, anjiyogenez ve apoptoz gibi geniş bir biyolojik süreç yelpazesine etki ederler. İlk kez 1993 yılında miRNA'lar birbirinden bağımsız olan iki çalışmada, *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*)'ta gen ifadesinin post-transkripsiyonel düzenleyicisi olarak keşfedilmiştir [30]. Embriyonik gelişimin uygun zamanlama ile ilerlemesi için *lin-4* isimli protein kodlamayan bir genin işlevinin gerekli olduğu gösterilmiştir. Lee ve ark. yapılan çalışmalarda bu hipotezin gerçekliği kanıtlanmış ve *lin-4*'ün bir antisens RNA-RNA etkileşimiyle *lin-14* mRNA'nın 3' UTR bağlanarak *lin-14* gen ifadesini negatif olarak kontrol ettiği gösterilmiştir [31]. *lin-4* artık miRNA olarak isimlendirilen ribonükleik asit (RNA) grubunun kurucu üyesi olarak sınıflandırılmaktadır. Bu keşifler, çeşitli organizmalarda farklı miRNA'ların keşfiyle sonuçlanmaya başlamıştır [32]. miRNA'ların post transkripsiyonel düzenleyici rolleri mRNA'nın 3' UTR bölgesine miRNA'nın bağlanmasıyla gerçekleşir ancak miRNA'ların 5' UTR bölgeleri, ekzon dizileri ve gen promotörleri gibi bölgelerle de etkileşime girdiği bildirilmiştir [33].

RNA interferansının (RNAi) keşfinden sonra miRNA'lar ilgi odağı haline gelmiştir. Çalışmalarda bakteriler, ökaryotlar ve bütün hayvan sistemlerinde miRNA'lar belirlenmiş ve bazı miRNA'ların türler arasında oldukça korunmuş bölgeleri olduğu gösterilmiştir [34, 35]. miRNA'lar, sayısız protein kodlayan RNA'yı bağlama ve ifadelerini değiştirme yetenekleri nedeniyle genomun ana düzenleyicileri olarak kabul edilirler [36]. Bu nedenle, tek bir miRNA, hedef mRNA'lara bağlanma yetenekleri nedeniyle potansiyel olarak farklı mRNA'ları düzenleyebilir [37]. Biyoinformatik analizler, tek bir miRNA'nın çeşitli fonksiyonlara sahip, transkripsiyon faktörleri, reseptörler ve daha fazlası gibi 200'den fazla farklı gen hedefine potansiyel olarak bağlanabileceğini göstermektedir [38].

Genomun %1-2'lik kısmında ekzonların olduğu bilinmesine rağmen, miRNA genleri memeli, sinek ve solucan genlerinin sadece %1-2'sini oluşturmaktadır. miRNA'lar

çeşitli dokularda, ve farklı gelişimsel aşamalarda farklı ifade desenleri sergilerler. Şu anda insan hücrelerinde yaklaşık 2588 olgun insan miRNA'sı bulunduğu tahmin edilmektedir ve her birinin benzersiz bir zamanlama ve doku bağımlı ifade deseni vardır [39]. Bu miRNA'ların, insan gen ifadesinin %60'ından fazlasını kontrol ettikleri tahmin edilmektedir ve çeşitli fizyolojik süreçlerdeki önemli düzenleyici rollerini göstermektedir. Tek bir miRNA'nın birden fazla genden sorumlu olabilmesi nedeniyle, birçok miRNA işlevsiz hale geldiğinde birçok hastalığın gelişimine neden olabilir [40]. miRNA'larla ilgili ilk çalışmalarda insan genomunda yaklaşık 250 miRNA'nın varlığı tespit edilmiştir [41]. Fakat, güncel miRNA veri tabanlarında 271 canlı türünde 38589 hairpin prekürsörü ve 48860 olgun miRNA'nın gen ifadesi bulunmaktadır [42]. Günümüzde yeni miRNA'lar keşfedilmekte ve yeni gen düzenlemeler tanımlanmaktadır. DNA Elemanlarının Ansiklopedisi (ENCODE) projesi ile genomun geri kalan kısmının, proteinlere çevrilmese de, yaygın bir şekilde kodlamayan RNA'lara (ncRNA'lar) transkribe edildiğini ve bu RNA'ların gelişim ve hücre fizyolojisi süreçlerinde gen ifadesini düzenlemede rol oynadığını ortaya koymuştur [43]. En çok çalışılan ncRNA sınıflarından biri, miRNA'lar olup, transkriptomun ana düzenleyicileri olarak ortaya çıkmıştır. Metabolitler de tıpkı RNA'lar gibi bilgi akışındaki adımlarla bağlantılı moleküler mekanizmaların substratları ve ürünleridirler. Hücre mekanizmasındaki moleküler modülasyon oldukça karmaşık ve birbiri ile ilişki içerisindedir. Çevresel stres, diyet, ilaçlar, toksinler ve diğer ekzojen kaynaklardan gelen uyarılar konakçı organizmanın her aşamasına etki edebilir ve bu etki genomu, transkriptomu, proteomu ve metabolomu etkileyebilir [44] (Şekil 1.3).



Şekil 1.3 : Santral dogma, miRNA'ların ve eksojen faktörlerin önemi.

1.8.1 miRNA sentezi

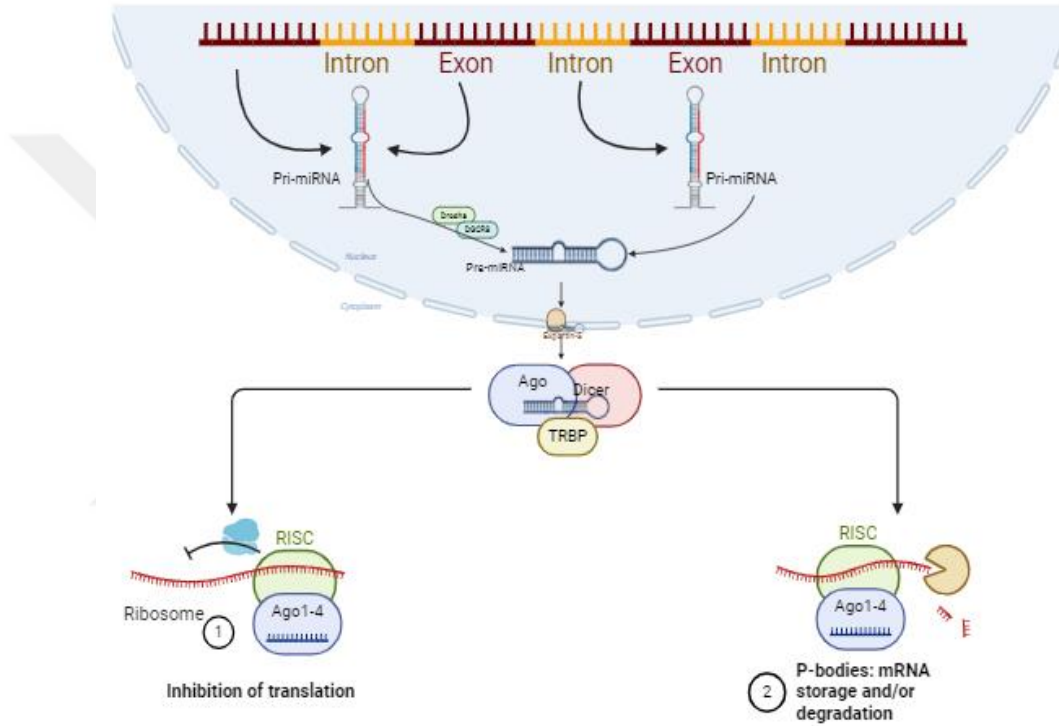
miRNA'ların, mRNA üzerinde düzenleyici rolleri mevcuttur ancak tek bir miRNA'nın hücredeki öneminin belirlenmesi zor olmuştur. Belirli miRNA'ların bastırılması veya aşırı ifadesi ile miRNA işlevlerini araştıran çalışmalar, bazen işlev kaybı modellerinden elde edilen bulgularla çelişebilecek veriler üretmiştir [45]. Örneğin; *C. elegans*'ta yapılan çalışmalar, sistemik miRNA silinmelerini içeren, miRNA'ların normal gelişim veya canlılığın bireysel olarak gerekli olduğunu öne süren çalışmalar, miRNA'ların yalnızca %10'undan azının normal gelişim ve canlılık için gerekli olduğunu öne sürmektedir ve bu durum farelerde de benzer sonuçlar vermiştir [46]. RNAi diziye özgü olan bir gen susturma işlemidir ve post transkripsiyonel bir süreçtir. Bu işlem, çift zincirli RNA'ların oluşmasıyla (dsRNA) başlatılır. RNAi mekanizması miRNA ile gerçekleşmesinin avantajı hücrelerin kendi içerisinde gen düzenlenmesini sağlayabilmesidir. miRNA'lar saç tokası şeklinde katlanıp dsRNA'yı oluşturarak RNAi mekanizmasını başlatmaktadırlar [47]. Çoğu miRNA, hücrede genoma dağılmış haldedir ancak bazı miRNA'lar kümeler halinde bulunmaktadır ve beraber transkripsiyona uğramaktadırlar. Memeli miRNA'ları öncelikle pri-miRNA (primer-miRNA) olarak bilinen 80 nt'lik bir dizinin sap-ilmek (stem-loop) yapısındaki parçası olarak transkribe edilir. miRNA öncülleri genomun farklı bölgelerinde kümelenmiş haldedir, çoğunlukla genler arası (intergenik) bölgelerde bulunur. İnsan miRNA'larının çoğu tek başına bulunurken, hsa-miR-15a ve hsa-miR-16-1 gibi bazıları birlikte bulunmaktadır. Hedef mRNA ile eşleşmesi için miRNA'ların 5'ucunda tanıma-eşleşme (tohum dizisi) bölgeleri bulunmaktadır. Post-transkripsiyonel aşamada miRNA'lar, tohum dizisi bölgeleri ile, hedef mRNA'ların 3' UTR bölgesindeki miRNA tanıyıcı kısımlara eşleşme yapar [48]. miRNA kontrollü gen düzenlemesinin, hedef mRNA'ların 3'UTR üzerinde etkili olduğu iyi bilinmektedir, bazı miRNA'lar nadiren kodonların yakınında veya protein kodlama dizisi (CDS) içinde non-kanonik bağlanma sergiler [49]. Bununla birlikte, hedef mRNA'nın 3'UTR'sine bağlanma, miRNA hedef bölgelerinin tahmini için ana kriter olarak kalmaktadır ve genellikle stop kodonundan yaklaşık 15 nükleotid uzaklıktaki bölgeye daha seçici ve etkilidirler [50].

miRNA'lar iki farklı aşamada üretilir; önce nükleer kesim, sonra sitoplazmik kesim gerçekleşir. Bu iki adımın ilkinde miRNA geni, pri-miRNA'yı oluşturmak için transkribe olur. Pri-miRNA'da 5'-7-metilguanozin şapka ve 3' poli (A) kuyruğu

bulunur. Bu sayede miRNA'ların RNA polimeraz II tarafından transkribe edilirler. RNA polimeraz II'nin aracılık ettiği transkripsiyondan sonra saç tokası yapısında uzun bir miRNA (pri-miRNA) oluşturulur [51]. RNAase III enzimi Drosha ve onun kofaktörü DiGeorge kritik sendrom bölgesi 8'den (DGCR8, Pasha) oluşan mikroşlemci, saç tokasını keser. Sonuç olarak 60-70 nükleotidlik pre-miRNA oluşturulur. Bu süreç nükleer kesim olarak bilinmektedir. Pre-miRNA'da iki nükleotitlik serbest 3' uzantısı bulunur ve Ran/GTP/Exportin 5 (Exportin 5 nükleositoloplazmik taşıma faktörü proteinlerinden olan karyoferin ailesinin üyesidir) kompleksi ile çekirdek dışına taşınır [52]. Çekirdekten sitoplazmaya exportin 5 (XPO5) tarafından taşındıktan sonra, öncü saç tokasının sitoplazmaya transferine aracılık eder ve burada Dicer (RNAase III enzimi) tarafından 21–24 nükleotidlik dubleks miRNA formuna dönüştürülür. Dicer; helikaz, bir PAZ domaini, çift sarmal tanıyan RNA bağlama domaini ve bir RNA III domaini bölümlerine sahiptir. PAZ domaini 3' UTR bölgesini tanımaktadır PAZ domaini, miRNA'nın 3' ucunda iki nükleotid tespit ettiğinde, Dicer enzimi, pre-miRNA ile birleşir. Olgun miRNA ipliği RNA kaynaklı susturma kompleksi (RNA-induced silencing complex-RISC)'de bulunan Ago proteinine yüklenir ve birleşir. Eksik bir baz çifti olduğunda miRNA, RISC ile etkileşime girerek translasyonu baskılar veya mRNA'yı bozar. Bu süreç sitoplazmik kesim olarak bilinmektedir [53]. İnsanda, dört tane Argonaute proteini (Ago 1-4) etrafında merkezi bir şekilde birleşmiş sekiz sınıf RISC vardır. Bu dört proteinden sadece Ago 2 proteini gen susturulmasında işlev görür ve mRNA'nın kesilmesini katalizler. Etkin hale geçmiş olan RISC, olgun miRNA ipliği ve hedef mRNA'nın 3'UTR bölgesi arasında Watson-Crick baz eşleşmesiyle hedef mRNA'ya bağlanmayı sağlamaktadır [54] (Şekil 1.4).

Yapılan *in vitro* çalışmalarda Ago proteinlerinin bir kısmının endonükleaz aktivitesinin görülmesi onlara 'slicers' denmesine yol açmıştır. *Drosophila*'da Ago1 ve Ago2 slicer aktivitesi bulunurken insanda ise yalnızca Ago2 slicer aktivitesi görülmektedir. Ago1 miRNA-guided bölünmede görev alırken Ago2 de bu fonksiyon siRNA'lar tarafından yönetilmektedir [55]. Ago protein ailesi hem transkripsiyon hem de post-transkripsiyon döneminde gen susturma sürecinin içerisine yer almaktadır. Ago proteinleri, hedeflenen spesifik RNA'ların ya degradasyon ya da translasyonun inhibisyonu yoluyla baskılanmasını miRNA'lar ya da siRNA'lar aracılığıyla yapabilir. Memelilerde miRNA'lar veya siRNA'lar Ago proteinlerinin RNA'yı parçaladığı

tamamlayıcı hedef bölgelerine kaynaklı susturma kompleksinin (RISC), yönlendirilmesine aracılık eder. RISC'in yüklenmesinde RNA dubleksinin genellikle 5' ucuna bağlanır. 5' ucu termodinamik açıdan kararlı değildir. Bu "asimetri kuralı" olarak bilinir. 5' ucunda daha az kararlı baz eşleşmesinin olması miRNA zinciri "kılavuz" olarak seçilir; 5' ucu daha kararlı olan "yolcu" miRNA'lar ise parçalanır. RISC, protein kodlayan hedef mRNA'ları translasyonunu engelleyerek durdurur veya keserek parçalar ve baskılar. Hedef mRNA kesildikten sonra miRNA bozulmadan kalarak başka mRNA'ların tanınmasını veya yıkılmasını sağlamaktadır [56- 62].

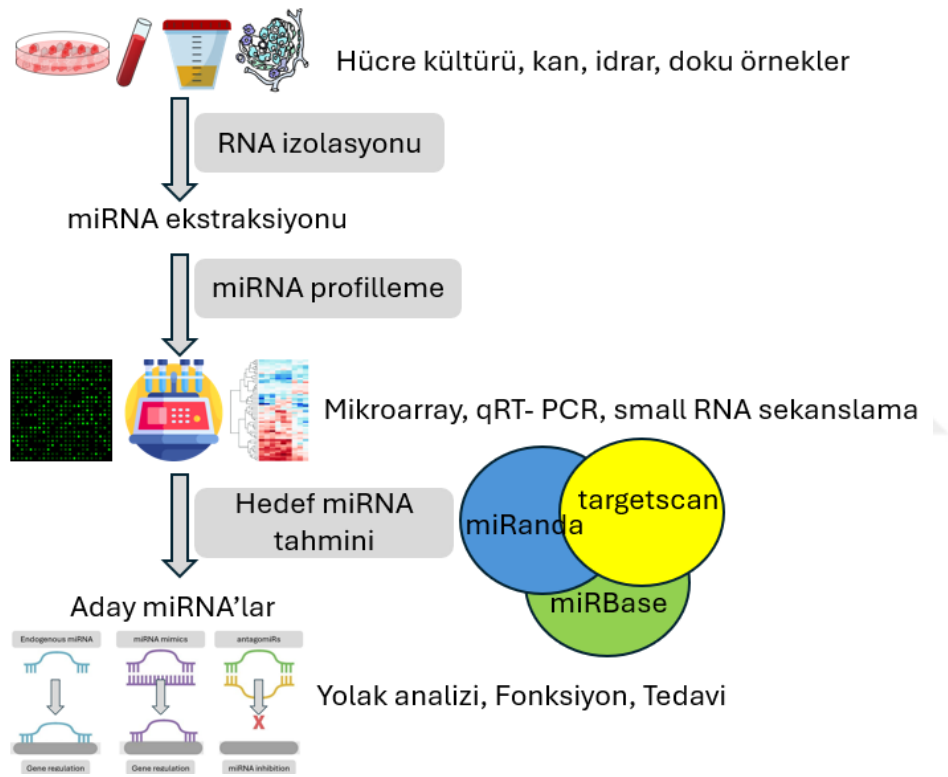


Şekil 1.4 : miRNA sentez mekanizması (BioRender.com'da 7 Ekim 2024 tarihinde oluşturulmuştur).

1.8.2 miRNA hücresel rolleri ve fonksiyonları

Moleküler biyolojinin temelinde yatan dogmanın "tek gen, tek protein" görüşü insan genomunun büyük bir bölümünü işlevsiz kılmasına rağmen, günümüzde transkripsiyonun çok daha karmaşık olduğu, işlevsiz olarak tanımlanan genomun %98'lik kısmının uzantılarının gen aktivitesinin üzerinde önemli etkilere sahip olduğu ortaya çıkmıştır. Tanımlanan bu kodlanmayan RNA'ların hastalık süreçlerinde yeni bir alan açması klinik araştırmalar üzerinde yol gösterici olmuştur. miRNA'ların keşfi, çeşitli hastalıklardaki rollerinin belirlenmesi konusunda büyük ilgi görmesine sebep olmuştur. miRNA'lar önemli hücresel süreçlere (sinyal iletim yolları, apoptoz,

metabolizma, farklılaşma gibi) biyolojik mekanizmalar ile dahil olarak etki gösterirler. Bu mekanizmaların keşfedilmesi ile vücuttaki çeşitli sistemlerde gerçekleştirilen miRNA çalışmaları hız kazanmıştır [63]. miRNA alanındaki araştırmaların çoğu, düzensiz miRNA'ların ve belirli bir hastalığın mekaniksel ilişkisinin anlaşılmasına odaklanmıştır. Bu araştırmalar, patofizyolojide doğrudan veya dolaylı rol oynayabilecek spesifik hedef mRNA'lara odaklanmakta ve miRNA'ların biyobelirteç olarak klinik yararlılığını araştırmaktadır. Metodoloji iyi bir şekilde kurulmuş olup, farklı analitik platformları kapsamakta ve çeşitli biyoinformatik, *in vitro* ve *in vivo* araçları kullanmaktadır [64] (Şekil 1.5).



Şekil 1.5 : miRNA izolasyon, proliferasyon ve tahmin basamakları.

1.8.3 miRNA, kalıtsal metabolik hastalıklar ve NKH

miRNA çalışmaları pekçok hastalıkta çalışılmaktadır fakat literatürde en çok çalışılan alan kanserdir. miRNA genlerinin %50'den daha fazlası, kanserle ilişkili amplifikasyon, delesyon ve translokasyon bölgelerinde yer alır. miRNA'ların anormal ifadesinin kanserde rol oynadığını gösteren pek çok kanıt bulunmaktadır. miRNA'ların değiştirilmiş ifadesi, birçok hastalığın patogenezinde elde edilen ek bir moleküler mekanizma olarak ortaya çıkmıştır ve doğal bağışıklık, otoimmünite ve otoimmün

hastalıklar, viral enfeksiyonlar, akut hepatit, depresyon, anksiyete, Alzheimer hastalığı, Huntington hastalığı (HD), metabolik ve kardiyovasküler hastalıklar, diyabet ve birçok kanser türünü içerir. Sonuç olarak, bu miRNA'lar bir patolojik durumun varlığını gösterebilirken, aynı zamanda patolojik durumunun evresi, ilerlemesi veya genetik ilişkileri hakkında da bilgi sağlayabilir [65- 70]. Devam eden araştırmalar, kanserde miRNA biyosentezi ve anormal ifadeyi yönlendiren moleküler mekanizmalar hakkında yeni bilgiler ortaya çıkarmaya devam etmektedir. Örneğin, genetik silinmeler veya amplifikasyonlar, miRNA genomik lokuslarının epigenetik metilasyonu ve transkripsiyon faktörleri tarafından birincil miRNA'ların (pri-miRNA) düzenlenmesini etkileyen değişiklikler gibi çeşitli faktörlerin, miRNA ifadesinde ve fonksiyonunda sayısız kanser türünde değişikliklere yol açtığı geniş bir kabul görmektedir. Tek bir miRNA yüzlerce mRNA'yı hedefleyebildiği için ortaya çıkan anormal miRNA ifadeleri kanserle ilgili sinyal yolları üstünde büyük etkisi olan çok sayıda transkripti etkileyebilir. 2005 yılında Lin He ve ark., miRNA gen kümesinin ifadesindeki artışın biyolojik önemini araştırmak için, B hücre lenfomalı bir fare modeli oluşturmuştur. Transgenik fareler, kontrol grubundaki farelerle karşılaştırılmış. Bu farelerde kanser gelişme oranının belirgin olarak arttığı (%30'dan %100'e) görülmüştür. Bu çalışma ile ifadesi değişen spesifik miRNA genleri kanserin başlamasına ve ilerlemesine katkıda buldukları gösterilmiştir [71]. miRNA ifadesindeki değişikliklerin hastalıklar üzerinde etkili olduğu ve bu durumun hastalıkların tanısında, takibinde ve hatta tedavisinde kullanılabileceği fikrini düşündürmüştür. Sonuç olarak, tek bir miRNA, benzer hücresel süreçler ve yollarla ilişkili hedefleri düzenleyebilir ve bu da hücresel yanıtı artırarak hastalık fenotiplerinde görülen bozulmuş hücresel fonksiyonları geri kazandırmak için miRNA'ları güçlü terapötikler haline getirebilir. Tersine, belirli bir mRNA; aynı anda veya bağlamsal bir şekilde, bir dizi miRNA'nın hedefi olabilir, bu da ortak bir baskılama etkisine yol açabilir [72, 73]. miRNA'ların önümüzdeki günlerde daha sık tanı ve tedavide kullanılacağı düşünülmektedir. miR-21 meme kanseri, miR-210 paraganglioma, miR-214 prostat kanseri, miR-221 hepatoselüler kanser (HCC), miR-451a akciğer kanseri, miR34a melanom, miR-122 hepatit C virus enfeksiyonu (HCV), miR-155 kronik lenfositik lösemi (KLL), miR-21 hipertansiyon, miR455-3p Alzheimer hastalığı gibi hastalıkların tanı ve tedavisinde yol göstericidir [74- 76]. Bu durum bizlere metabolik hastalıklarda miRNA'ların daha sık kullanılabileceğini düşündürmektedir. miRNA'ların metabolik olarak dokuların fizyolojik durumunu düzenledikleri, glikoz

ve lipid metabolizmasına katıldıkları bilindiği için, diyabet hastalığı ve diğer metabolik hastalıklarda umut verici biyobelirteçler olduğu düşünülmektedir [77]. Kalıtsal metabolik hastalık-miRNA ilişkisi ile ilgili çalışmalar literatürde oldukça az sayıda olmasına rağmen son yıllarda sıklığında artış görülmektedir. Kalıtsal metabolik hastalık-miRNA ilişkili ilk çalışma 2005 yılında akçaağaç şurubu idrar hastalığı (maple syrup urine disease, MSUD) ile miR-29b ilişkisi incelenmiş. miR-29b'nin dallı zincirli alfa ketoasit dehidrojenaz enzim kompleksi hedefi olduğu gösterilmiştir [78]. Bir tür lizozomal depo hastalığı olan Niemann-Pick tip C'de (NPC) miR-196a, miR-196b ve miR-296'da anlamlı artış gösterilmiş, hastalık tanı ve tedavisinde kullanılabileceği bildirilmiştir [79]. Metilmalonik asidemide oluşan metilmalonatın indüklediği santral sinir sistemi hasarını, miR-9-1 nöronal apoptozisi baskılayarak azaltmaktadır. miR-9-1'in metilmalonik asidemi tanı ve tedavi takibinde biyobelirteç olarak kullanılabileceği gösterilmiştir [80]. Başka bir çalışmada tirozinemi tip-1 hastalarından izole edilen lenfosit ve serumda miRNA profillemesi yapılmış ve hsa-miR-15a, hsa-miR-1225-3p ve hsa-miR-1228'in tirozinemi tip-1 hastalığında bozulmuş olan fumarilasetoasetat hidroksilaz enziminin mRNA'ları ile etkileşebileceğini göstermişlerdir [81]. Ailesel hiperkolesterolemide miR-27a'nın tanı ve tedavide kullanılabileceği gösterilmiştir. Başka bir çalışmada ailesel hiperkolesterolemide, miRNA gibi benzer etkiye sahip siRNA bazlı kolesterol düşürücü bir ajan olan inclisiran'ın faz 2 çalışmaları tamamlanmış ve low-density lipoprotein (LDL) seviyesinde kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde azalma görülmüştür. miRNA'ların ailesel hiperkolesterolemide yeni bir tedavi metodu olabileceği düşünülmektedir [82- 84]. Bir lizozomal depo hastalığı olan Gaucher hastalığında bozulan glukoserebrosidaz enziminin düzenlenmesinde miR-127-5p, miR-16-5p ve miR-195-5p'nin rol oynadığı gösterilmiş ve Gaucher hastalığı tanı ve tedavisinde etkili olabileceği bildirilmiştir [85]. Hiperürisemi ile giden ve bir metabolik hastalık olan Lesch-Nyhan sendromunda miR-181a ve miR-17 ailesinin tanıda kullanılabileceği belirtilmiştir [86].

Son yıllarda glikojen depo hastalığı, multipl sülfataz eksikliği, MELAS sendromu, propiyonik asidemi, Fabry hastalığı ve pek çok metabolik hastalığa yönelik yapılan miRNA çalışmalarında potansiyel tanı ve tedavide kullanılabilecek miRNA'lar belirlenmiştir. Son yıllarda kalıtsal metabolik hastalık miRNA çalışmaları giderek artmaktadır [78- 97] (Çizelge 1.4). Genetik geçişli olan ve biriken toksik metabolitler

ile hücre patogenezi bozan hastalıklarda miRNA'ların tanı ve tedavideki rolleri giderek artmaktadır. Kan, tükürük, idrar, BOS ve süt dahil olmak üzere çeşitli vücut sıvılarında miRNA'lar kararlı bir şekilde bulunmaktadır. Mikroveziküllerde veya eksozomlarda bulunan miRNA'lar, hedef hücrelerin reseptörleri tarafından hücre içine alınabilir, böylece hücre dışı haberciler olarak görev yapabilirler [98, 99]. Bu şekilde miRNA'ların, hormonlar ve diğer sinyal moleküllerininkine benzer biyolojik işlevlere sahip olabileceği düşünülmektedir. Bununla birlikte, nispeten az sayıda miRNA-hedef etkileşiminin fenotipe tespit edilebilir katkılar yapması muhtemeldir [100]. Dolaşımdaki miRNA'ların biyobelirteç olarak kullanımları sayesinde; hızlı müdahale için bir hastalığın erken evrelerini tespit etmek, böylece patolojiyi önlemek, iyileştirmek veya yavaşlatmak, benzer etiyojilere sahip patolojileri ayırt etmek, prognozu tahmin etmek ve tedaviye yanıtın izlenmesinde faydalı olacağı düşünülmektedir [101].

miRNA'ların ifadelerinin düzenlenmesi hem akademiden hem de endüstriden büyük ilgi görmektedir ve kilit bir araştırma alanı olarak durmaktadır. Bu odak, hastalık biyolojisini anlamaya ve onların tanısal biyobelirteçler olarak potansiyel uygulamalarını keşfetmeye kadar uzanmaktadır. Ayrıca, miRNA'lar potansiyel ilaç hedefleri veya terapötik ajanlar olarak kullanılması son yıllarda ilgi çekmektedir. miRNA'lar, çeşitli biyolojik ve gelişimsel süreçleri etkileyen güçlü genetik düzenleyiciler olarak geniş bir şekilde tanınırken, aynı zamanda çeşitli hastalıkların patogenezi de kilit bir rol oynamaktadırlar. Son zamanlarda Diener ve arkadaşları tarafından detaylı olarak tartışıldığı gibi, miRNA tabanlı terapötik yaklaşımlar için önemli zorluklar, miRNA'ların yüzden fazla gen ve yolak üzerindeki çok çeşitli etkilerinden kaynaklanmaktadır. Bu zorluk, tek bir miRNA'nın birçok hedef genle etkileşerek bütün hücrel yolakları düzenleme yeteneğinden kaynaklanmaktadır. Bu nedenle, terapötik amaçlar için aday miRNAların kapsamlı bir fonksiyonel karakterizasyonu önemlidir. Bu karakterizasyon, bir miRNA'nın gerçek bir miRNA olarak doğrulanması, miRNA hedef tahmin algoritmalarının geliştirilmesi ve büyük miktarda miRNA hedefinin etkin bir şekilde doğrulanmasını sağlayan deneysel stratejilerin uygulanması gibi bir dizi sorunun üstesinden gelmeyi içerir [102].

Çizelge 1.4 : Kalıtsal metabolizma hastalıklarında miRNA'lar ile ilgili çalışmalar.

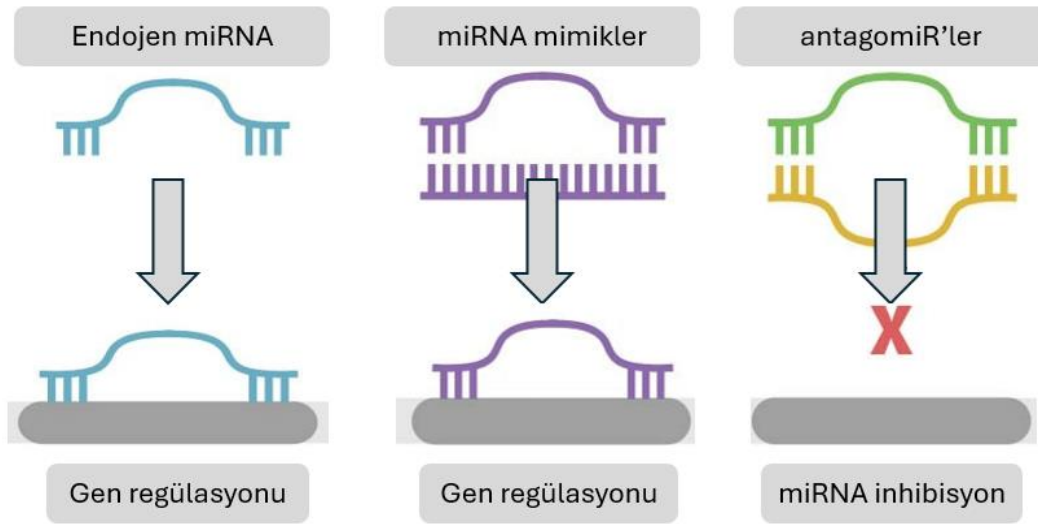
Metabolizmanın Doğuştan Gelen Bozukluklarının Sınıflandırılması	Hastalık	Çalışma Türü	İlgili miRNA'lar	Kaynak
İntoksikasyon Tipi	Akçağaç Şurubu İdrar Hastalığı	Fonksiyonel çalışmalar	miR-29b	[78]
İntoksikasyon Tipi	Tirozinemi Tip I	miRNA profillemeye	miR-15a, miR-1225-3p, miR-1228	[81]
İntoksikasyon Tipi	Lesch-Nyhan Hastalığı	miRNA profillemeye ve fonksiyonel çalışmalar	miR-181a, miR-17 ailesi	[86]
İntoksikasyon Tipi	Metilmalonik Asidemi	miRNA profillemeye ve fonksiyonel çalışmalar	miR-9-1	[80]
İntoksikasyon Tipi	Propiyonik Asidemi	miRNA profillemeye ve fonksiyonel çalışmalar	miR-34a-5p, miR-338-3p, miR-350	[91]
İntoksikasyon Tipi	Ailesel Hiperkolesterolemi	miRNA profillemeye	miR-27a	[82- 84]
İntoksikasyon Tipi	Hiperhomosisteinemi	miRNA profillemeye ve fonksiyonel çalışmalar	miR-20b-5p	[96]
İntoksikasyon Tipi	Fenilketonüri	miRNA profillemeye ve fonksiyonel çalışmalar	miR-217-5p, miR-218-1-3p, miR-1231-3p	[97]
Enerji Eksikliği Tipi	Glikojen Depolama Hastalığı	miRNA profillemeye	miR-34a, miR-224, miR-424, miR-452, miR-455-5p	[88]
Enerji Eksikliği Tipi	MELAS Sendromu	miRNA profillemeye ve fonksiyonel çalışmalar	miR-9	[90]
Enerji Eksikliği Tipi	Karnitin Palmitoiltransferaz II (CPT2) Eksikliği	miRNA profillemeye	miR-let7d, miR-23a, miR-146a, miR-181a2, miR-550-1,2, miR-566	[92]
Enerji Eksikliği Tipi	Glikojen Depolama Hastalığı Tip 1a	miRNA profillemeye	miR-122-5p, miR-145-5p, miR-324-5p, miR-342, miR-376c-3p, miR-454-3p, miR-483-5p	[87]
Kompleks Moleküller Tipi	Niemann-Pick C	miRNA profillemeye	miR-196a, miR-196b, miR-296	[79]
Kompleks Moleküller Tipi	Gaucher Hastalığı	miRNA profillemeye	miR-16-5p, miR-127-5p, miR-195-5p	[85]
Kompleks Moleküller Tipi	Çoklu Sülfataz Eksikliği	Terapötik modülasyon	miR-95	[89]
Kompleks Moleküller Tipi	Fabry Hastalığı	miRNA profillemeye	miR-126-3p, miR-199a-5p, miR-423-5p, miR-451a	[93]
Kompleks Moleküller Tipi	GM2 Gangliosidoz	miRNA profillemeye	miR-19a, miR-33, miR-34a, miR-124, miR-128	[94]
Kompleks Moleküller Tipi	Mukopolisakkaridoz (MPS) Tip I	miRNA profillemeye ve fonksiyonel çalışmalar	miR-143	[95]

1.8.4 miRNA ve tedavi olanakları

Tek bir miRNA sadece bir tüm yolağı ve çok sayıda mRNA hedefini düzenlemekle kalmaz, aynı zamanda her mRNA'da birden fazla miRNA tarafından hedef alınabilir. miRNA'ların geniş düzenleyici etkisinin, mükemmel eşleşme olmaksızın bile hedef mRNA'lara bağlanma yeteneklerinden kaynaklandığı öne sürülmüştür. Bu özellik, bir miRNA'nın benzer hücrel süreçlere dahil olan çok sayıda hedefi düzenlemesine olanak tanır, böylece hücrel yanıtı artırır. Tek bir miRNA'nın birçok geni inhibe etmesi mümkün olsa da, her gen üzerindeki etkisi genellikle orta şiddettedir, ve birden çok miRNA bir genin ifadesini düzenleyebilir, bu da hücrel yanıtı daha da artırır. Tek bir miRNA'nın, her biri çeşitli işlevlere sahip 200 kadar hedef mRNA'ya bağlanma potansiyeli olduğundan, bir miRNA veya miRNA kümesi aracılığıyla bütün sinyal yolları tek bir miRNA tarafından düzenlenebilir. Ancak, miRNAların birden çok genin düzenlenmesindeki rolü ve gen ağlardaki geniş etkileri, miRNA terapötikleri için önemli zorluklar oluşturur. Bu nedenle, miRNA tabanlı terapötiklerin başarılı bir şekilde geliştirilmesi, her bir miRNA'nın moleküler etkilerinin kapsamlı bir şekilde işlevsel karakterizasyonunu ve doğrulamasını gerektirir. Her bir miRNA'nın işlevsel karakterizasyonu; gerçek bir miRNA olarak hastalıkla ilgili olup olmadığının doğrulanması, miRNA hedef tahmin algoritmalarının iyileştirilmesi ve ilgili ön klinik modellerdeki amaçlanan hedefler üzerindeki etkilerinin deneysel olarak doğrulanması gibi birkaç temel adımı gerektirir. Bu sayede belirlenen miRNA ilgili hastalıkta tedavi ajanı olarak kullanılabilir. RNA hedefli tedavi ajanları, miRNA benzeri moleküllerin işlevlerini artırıp ya da azaltarak, bir miRNA'nın ifadesinde değişiklik yapar ve miRNA'nın hedefleri ile etkileşimini inhibe etmek için kullanılır. Son yıllarda yapılan çalışmalar ile miRNA'lar başta kanser olmak üzere pek çok hastalığın tanı ve tedavisinde etkili olarak kullanılmaktadır ve günümüzde yeni miRNA bazlı tedavi metotları giderek artmaktadır. FDA tarafından onay almış bir miRNA tedavisi yoktur ancak faz çalışmaları devam etmekte olan miRNA bazlı tedavi ajanları bulunmaktadır. Kanser, viral enfeksiyon, nörodejeneratif hastalık, lipit bozukluğu gibi pek çok hastalıkta miRNA çalışmaları devam etmektedir [103]. miRNA terapötikleri, vücuttaki belirli endojen miRNA'ların aktivitesini hedefleyen ve modüle eden bir tür RNA tabanlı terapötiktir. Çünkü miRNA'lar sağlıklı ve patolojik koşullar altında gen ifadesini düzenlemede kritik bir rol oynarlar, belirli miRNA'ları hedefleyerek ve manipüle ederek, miRNA terapötikleri çeşitli hastalıkları tedavi etmeyi amaçlar, bu da

miRNA ifade kalıplarını onararak (miRNA taklitleri) veya düzelterek (antagomir veya antimiR) gerçekleşir. Literatürde tartışıldığı gibi, miRNA terapötiklerinin keşfi ve geliştirilmesi yolculuğu, hedef belirleme ve hasta örneklerinin analizi yoluyla miRNA keşfi ile başlar.

miRNA taklitleri, karşılık gelen miRNA dizisine uygun olan sentetik çift sarmallı küçük RNA molekülleridir ve bu nedenle hastalıklarda kaybedilen miRNA ifadesini yeniden sağlamayı amaçlarlar. Buna karşılık, antagomiR'ler tek sarmalıdır ve ilk nesil antisens oligonükleotidler (ASO'ler) temel alınarak tasarlanmıştır. AntagomiR'ler, mRNA'ları hedefleyen ve 'locked' nükleik asitler (LNA'lar) ile modifiye edilen antisens oligonükleotidlerdir. Bu sentetik küçük RNA molekülleri, inhibe edilmek istenen miRNA'ya komplementer bir diziye sahiptir ve bu miRNA'nın işlevini güçlü bir şekilde bağlanarak engellerler. AntagomiR'ler, yapısal olarak ASO'lere benzerdir. AntagomiR'ler, hedeflenen miRNA'nın olgun sarmalına doğrudan bağlanacak şekilde tasarlanmıştır ve böylece işlevsel bir blokaj oluşturur. İster miRNA taklitleri olsun, ister antagomiR'ler olsun bir hastalığın tedavisinde kullanılırken hedeflenen amaç, belirlenen miRNA'nın sağlıklı gruptakine benzer düzeyde tutulmasıdır [104] (Şekil 1.6).



Şekil 1.6 : miRNA'nın mRNA üzerindeki etki mekanizmaları.

1.8.5 miRNA'larda güncel tedaviler

miRNA tabanlı tedavilerin geliştirilmesi, miRNAların keşfinden bu yana kısa sürede hızla ilerlemiştir. Bazı başarılı faz I denemeleri ve devam eden faz II denemeleriyle birlikte klinik uygulamaya geçmiştir. İlk klinik gelişme, HCV tedavisinde kullanılan

LNA miravirsen (SPC3649) adlı 15 nükleotidlik bir antagomiR etkili tedavi prensibidir. Bu tedavi, sistemik olarak verilen miR-122'ye karşı olan bu oligonükleotidin karaciğerde doğal olarak birikmesinden yararlanır. Miravirsen, HCV hastalarında viremiyi azaltmada önemli bir etki göstermiştir, bu da birçok faz II klinik denemeye yol açmıştır (NCT01200420, NCT01872936, NCT02031133, NCT02508090) [105, 106]. Lademirsan (RG-012), bir antagomiR-21 tedavisidir. Alport sendromunun (fibrotik böbrek hastalığı) tedavisi için Regulus Therapeutics tarafından geliştirilmiştir. miR-21'in Alport sendromunda ifadesinin arttığı gösterilmiştir. Preklinik çalışmalar, anti-miR-21'in böbrek fibrozisinin ilerleme hızını azaltarak böbrek yetmezliğini önemli ölçüde hafiflettiğini göstermiştir. Rubel ve ark. yaptıkları çalışmada antagomiR-21 ile tedavi edilen Alport sendromlu farelerde proteinürinin azaldığını ve kronik böbrek yetmezliğine gidişin yavaşladığını bildirmişlerdir [107]. Lademirsan ile tedavi edilen Alport sendromlu hastalarda böbrek fonksiyonlarındaki azalma oranında anlamlı bir iyileşmenin gözlenmediği bildirilmiştir (NCT02855268, NCT03373786). RGLS4326, miR-17 ailesinin tohum dizisine tam uyum sağlayan bir ASO'dur. RGLS4326, OD polikistik böbrek hastalığında (ODPKBH) miR-17 ailesinin patolojik fonksiyonlarını inhibe etmek üzere özel olarak geliştirilmiştir [108]. AMT-162, mutant *SOD1* formuna spesifik geliştirilen bir antagomiR'dir, amiyotrofik lateral skleroz (ALS) tedavisinde alternatif tedavi yöntemidir. Maymunlarda, anti-SOD1 miRNA içeren adeno-associated virüs rh10'un intratekal infüzyonu (AAV-miR-SOD1), *SOD1* mRNA'sını parçalayarak spinal kordda *SOD1* genin ifadesini baskılar. AAV-miR-SOD1 infüzyonunun ALS'ye neden olan *SOD1* mutasyonlarına sahip iki hastada güvenliğini test edilmiş, ALS hastalığı ve *SOD1*'i hedefleyen bir miRNA kodlayan adeno associated virüs ile tek bir intratekal infüzyon uygulanarak tedavi edilmiştir. Hastalıkta, tedavi edilmemiş *SOD1* ile ilişkili ALS'li hastalardaki ve sağlıklı kontrol grubundaki karşılık gelen seviyelerde mutant *SOD1* ifadesini daha düşük bulunmuştur [109, 110]. OD geçişli bir başka hastalık olan HD'de miRNA tedavileri faz II aşamasındadır. HD için klinik geliştirme aşamasında olan bu tedavilerin çoğu, huntingtin (*HTT*) transkriptinin belirli bölgelerini hedefleyen ASO'ler kullanılarak gerçekleştirilir ve bu şekilde *HTT* mRNA ve protein ifadesi azaltılır. Bu tedavi yaklaşımı, hücre dışı hedeflenmemiş etkiler olmaksızın *in vitro* modellerde ve küçük ve büyük hayvan çalışmalarında etkinlik ve güvenilirlik göstermiştir ve klinik araştırmaya geçişi desteklemektedir [111- 113]. Alport sendromu, ODPKBH, ALS, HD gibi OD hastalıklarda mutant aleli baskılayarak

hasarlı mRNA ifadesini azaltmak ve sağlam alelin ifade profilini artırmak alternatif bir miRNA tedavi stratejisidir. Benzer yaklaşımlar ailesel hiperkolesterolemi (*LDLR*, *PCSK9*, *APOE*), glukoz transport bozuklukları (*GLUD1*, *GCK*, *HNF1A*), aminoasit metabolizma bozuklukları (*HWKS*, *SPTLC*, *IDH2*, *P5CS*, *SPG9A*, *GRIN*), nöroferritinopatiler (*FTL*), mitokondriyal hastalıklar (*CYCS*, *PPOX*, *DNM1L*, *GDAP1*, *OPA3*), vezikül transport bozuklukları (*VAMP2*, *DNAJC6*, *DNAJC10*, *SCNA*, *LRRK2*, *SYN2*, *STX1B*), nükleik asit metabolizma bozuklukları (*NUDT15*, *UMOD*, *IMPDH*, *AICDA*), ‘hem halkası’ sentez bozuklukları (*UROD*, *HMBS*, *POX*, *PPOX*), mineral metabolizma bozuklukları (*CNNM2*, *KCNA1*, *FXRD2*), fosfolipid metabolizma bozuklukları (*PIK3R1*, *PTEN*, *FIG4*, *ITPR1*) ve daha pek çok metabolik hastalık için tedavi stratejisi olarak kullanılabilir. Literatürde pekçok hiperkolesterolemi-miRNA çalışması mevcuttur ve bu çalışmalar metabolik hastalıkların miRNA tedavileri için umut vaat edici durumdadır. Li ve ark. yaptıkları çalışmada, miR-148a-3p’nin mutant *LDLR* aktivitesini baskılayarak hiperlipidemi tedavisinde kullanılabileceğini bildirmişlerdir [114].

Kanser tedavisinde miRNA taklitçilerine dayalı en ileri ilaç MRX34’tür (Mirna Therapeutics). MRX34 nanopartiküllerle tedavi edilen farelerdeki tümörlerde miR-34 birikimi ve belirgin tümör regresyonu gözlenmiştir. MRX34, 2013 yılında primer karaciğer kanseri, küçük hücreli akciğer kanseri, lenfoma, melanom, multipl miyelom veya böbrek hücreli karsinomlu hastalarda çok merkezli bir faz I tedavi denemesine girmiştir. Tümör baskılayıcı miR-34a’nın, çeşitli onkogenik yollara ve tümörün bağışıklıktan kaçışında rol alan genlere yayılan 30’dan fazla onkogenin ifadesini azalttığı gösterilmiştir; ancak, ifade sıklığı birçok kanser türünde sıkça kaybolur veya azalır [115, 116]. Remlarsen (MRG-201), fibrozisi inhibe ettiği gösterilen miR-29’u hedefleyen ve aktive eden bir antagomiR’dir. Keloid ve skleroderma tedavileri için faz II denemesinde çalışmalar mevcuttur. Amaç, cilt içindeki ekstrasellüler matriks ve fibroplazinin ifadesini bastırmaktır (NCT02603224, NCT03601052). Remlarsen, skar oluşumunda rol alan kollajen ve diğer proteinlerin ifadesini azaltarak fibrozisi baskılamaktadır [117]. Cobomarsen (MRG-106), Miragen Therapeutics tarafından miR-155’in aktivitesini inhibe etmeyi amaçlayan bir LNA tabanlı antagomiR olarak geliştirilmiştir. miR-155’in yükseldiği birçok lenfoma alt türünde, ayrıca diffüz büyük B-hücreli lenfomada etkilidir. Kutanoz T-hücreli lenfoma (CTCL), KLL, diffüz büyük B-hücreli lenfoma ve mycosis fungoides gibi belirli kanserleri tedavi etmek için

yapılmaktadır. Faz I denemesi tamamlanmış olmasına rağmen, faz II çalışması sonlandırılmıştır (NCT03713320) [118]. MesomiR-1, plevral mezotelyoma hastalarında miR-16 taklitleridir ve kapsüllenmiş halinin güvenilirliği ve etkinliği test edilmiştir. miR-16 plevral mezotelyoma ve küçük hücreli olmayan akciğer kanseri hastaları için tedavide faz I çalışması yapılmıştır (NCT02369198). miR-16, plevral mezotelyomada tümör baskılayıcı olarak rol oynar [119]. Pekçok miRNA tedavi ajanları klinik çalışmalarda kullanılmaya başlanmıştır. Fakat henüz faz III aşamasına geçen bir miRNA tedavi ajanı bulunmamaktadır (Çizelge 1.5). miRNA ifadesinde değişen seviyeler birçok kanserle ilişkilendirildiğinden, tümör baskılayıcı miRNA'ların işlevini geri kazandırmak için miRNA taklitlerinin aşırı ifade edilmesi veya tanıtılması, böylece nispeten normal fizyolojik seviyelere veya işlevlere geri dönülmesi veya aşırı ifade edilen onkogenik miRNA'ların antagomiR'ler veya miRNA süngerleri ile inhibe edilmesi kanserde miRNA terapötiklerinin iki ana stratejisini temsil eder. Bu tedavilerin hedefi 'gain-of function' kazanan genleri mRNA düzeyinde susturmak ve genlerin ifade profillerini sağlıklı grup ile benzer düzeyde hedeflemektir. Kalıtsal metabolik hastalıklarda, fosfotidilserin sentetaz 1 (*PTDSSI*), glutamin sentetaz yüksek aktivitesi (*GLS*), ornitin dekarboksilaz süperaktivite sendromu (*ODCI*), XL protoporfiri (*ALAS2*), ferroportin metabolizma bozukluğu (*SLC40A1*), hiperürisemiye neden olan fosforibozil pirofosfat sentetaz (*PRPS1*) aktivitesi artışı gibi metabolik hastalıklara yönelik belirlenen miRNA'lar tedavi ajanı olarak kullanılabilir. Yapılan çalışmalar umut verici olsa da, ilk sonuçlar miRNA tabanlı tedavilerin tüm hastalarda etkili olmayabileceğini göstermektedir ve tedaviye yanıt gösterme olasılığı en yüksek olan hastaları seçmek büyük bir zorluk olacaktır.

miRNA profillerindeki değişme sadece hastalıklarla ilgili değildir. Yaş, gelişim, beslenme, enfeksiyon, kullanılan ilaçlar, ve birçok çevresel koşuldan etkilendiği düşünülmektedir. Bu durum miRNA'nın ifadesindeki değişikliğin esas nedeninin belirlenmesini zorlaştırmaktadır [120-124]. Kalıtsal metabolik hastalıkların çoğu klinik olarak sınıflandırıldığında başlıca üç gruba ayrılır. Bu üç grup, hastalığın başlangıç yaşı ve patolojik olan rezidüel proteinin aktivitesindeki azalma ile ilişkidir. Klinik sınıflamada; ağır tip (infantil tip), orta tip (jüvenil tip) ve hafif tip (late onset veya erişkin tip) olarak yapılan sınıflamada ilgili rezidüel enzim aktivitesi genellikle ağır tipte %0-5, orta tipte %5-15 ve hafif tipte %15-25/50 düzeyindedir. Aynı hastalık ve aynı gendeki mutasyon, farklı yaşlarda ve farklı fenotipte klinik bulgulara neden

olabilmektedir. Kalıtsal metabolik hastalıkların çoğunda bu durumun nedeni tam olarak bilinmemektedir ve bu klinik farklılığın rezidüel enzim aktivitesindeki azalma olduğu söylenmektedir [125- 129]. miRNA'ların yaş ile değişen profilleri rezidüel enzim aktivitesini etkileyebilir ve hastalıkların klinik sınıflamasına, hastalığın başlangıç yaşına etki ediyor olabilir. Kalıtsal metabolik hastalıklardaki önemli sorulardan birinin cevabı miRNA'larda saklı olabilir. Birçok hastalıkta, miRNA'nın anormal bir şekilde ifade edildiği göz önüne alındığında, bunlar potansiyel biyobelirteçler, terapötik hedefler ve terapötikler olarak ortaya çıkmıştır. Ancak, her miRNA'nın birden fazla hedefi düzenlediği ve her hedefin birden fazla miRNA tarafından düzenlendiği görüldüğünden, miRNA terapötiklerinin hassasiyeti, özgüllüğü, seçiciliği ve ilişkili olmayan gendeki hedef etkileriyle ilgili birçok sorun bulunmaktadır, bu durum istenmeyen toksisiteye yol açmakta ve tedavide miRNA'ların kullanımlarını sınırlamaktadır. miRNAların bu özellikleri, onları güçlü bir tedavi aracı olarak konumlandırırsa da, klinik çalışmalarda gözlenen yan etkileri yönetmede önemli bir zorluk oluşturur. Zhang ve ark. yaptıkları çalışmada; miRNA terapötiklerinin oluşturduğu olumsuz etkilerin geniş kapsamlı miRNA etkilerine bağlanabileceğini önermiştir [130]. Şu anda, miRNA terapötiklerinin çoğu ön klinik veya erken insan klinik denemelerinin başlangıç aşamalarında; bu nedenle, diğer miRNA terapötiklerinin insan klinik denemelerinde toksisite veya yan etki açısından nasıl performans göstereceği beklenmektedir. Literatürde pek çok kalıtsal metabolik hastalıkla ilgili miRNA çalışması yapılmış olmasına rağmen daha önce NKH-miRNA ilişkisini inceleyen bir araştırma bulunmamaktadır. Bu tez çalışmasında, NKH hastalığı ve miRNA'lar ile ilgili daha önce elde ettiğimiz bilgi birikimimizi kullanarak NKH'deki miRNA'ların rolünü araştırmak hedeflenmiştir.

1.9 miRNA Hastalık İlişkisinin Belirlenmesi

Aday miRNA'ların fonksiyonları, biyoinformatik analiz ve/veya *in vitro* deneyler yoluyla değerlendirilebilir ve daha sonra prelinik hayvan modellerinde test edilmeden önce ilerleyebilir. Ayrıca, her bir miRNA ile ilişkilendirilmiş hedeflerin tahmin edilmesi için birçok veritabanı ve algoritma geliştirilmiştir. Birçok hesaplama aracı miRNA-gen etkileşimlerini tahmin etmek için mevcuttur. Başlangıçta, TargetScan veya miRanda gibi tek bir miRNA için hedef tahmin eden algoritmalar geliştirilmiştir. TargetScan gibi algoritmalar, mRNA bağlanması için esas olan tohum dizisi bölgelerine dayanarak miRNA hedeflerini tahmin eder.

Çizelge 1.5 : Faz çalışması devam eden/tamamlanmış miRNA'lar.

İsim	Terapötik Ajan	Hedef Hastalık	Faz	Klinik Deneme NCT Numarası	Durum
Miravirsen (SPC3649)	AntagomiR-122	Hepatit C	I/II	NCT02031133 NCT01872936 NCT01200420 NCT02508090	Tamamlandı
Lademirsen (RG-012)	AntagomiR-21	Alport Sendromu	I/II	NCT02855268 NCT03373786	Tamamlandı
RG-125/AZD4076	AntagomiR -103/107	Diyabet, Alkol Dışı Yağlı Karaciğer Hastalığı	I/II	NCT02826525 NCT02612662	Tamamlandı
Cobomarsen (MRG-106)	AntagomiR -155	Kutane T Hücre Lenfoması, Mikozis Fungoides	I/II	NCT03713320 NCT02580552	Sonlandırıldı
MRG-110	AntagomiR -92a	Anjiyogenez/İskemi	I	NCT03603431	Tamamlandı
Remlarsen (MRG-201)	miR-29 taklidi	Skleroderma, Keloid	I/II	NCT02603224 NCT03601052	Tamamlandı
MesomiR-1	miR-16 taklidi	Mezotelyoma, Küçük Hücreli Olmayan Akciğer Kanseri	I	NCT02369198	Tamamlandı
CDR132L	AntagomiR -132	Miyokard İnfarktüsü	II	NCT05350969	Aktif
RGLS4326	AntagomiR -17	OD Polikistik Böbrek Hastalığı	I	NCT04536688	Tamamlandı
MRX34	miR-34 taklidi	Çoklu Solid Tümörler	I	NCT01829971	Sonlandırıldı
AMT-130	rAAV5-miHTT	Huntington Hastalığı	I/II	NCT04120493 NCT05243017	Katılım Aşamasında
AMT-162	Yapay-miRNA (anti-SOD1)	Amyotrofik Lateral Skleroz	I/II	NCT06100276	Katılım Aşamasında Değil

TargetScan, bugüne kadar miRBase'de belgelenmiş neredeyse tüm miRNA dizilerini kapsar. Bu araçlar, miRNA'ların genler üzerindeki etkilerini modellemek ve doğrulamak için temel oluştururlar. Ancak, gerçek hedefleri tahmin etmede özgünlük veya duyarlılıkları eksiktir. miRNAların genler ve yollar üzerindeki karşılıklı etkilerini modellemek için daha kapsamlı analiz araçları geliştirilmiştir. Bu analiz araçları, tahmin edilmiş ve doğrulanmış hedeflerle birlikte ifade verileri ve/veya dizileme bilgilerini kullanarak etkileşim ağları oluştururlar. Örneğin; miRNet, miRNA-gen etkileşimlerini göstermek için istatistiksel analiz sağlar ve miRNA-ilişkili hastalık etkileşim ağlarını keşfetmeye yardımcı olur. Hedef tahminlerinin önceden spesifikliğini artırmak için, yolak veritabanları dahil edilebilir. Çünkü miRNA hedef genleri tüm yolakları düzenleyebilir, işlevsel biyokimyasal ağlarda hangi varsayılan hedef genlerin zenginleştirildiği hakkındaki bilgilerin entegrasyonu, hedef tahminlerinin doğrulama oranlarını önemli ölçüde artırır. Son olarak, miRNAların hedef genlerle veya tam tersi şekilde sistemik analizi için, hem doğrulanmış hem de tahmin edilen hedefler, hedef yolakları ve diğer bilgilerin entegrasyonu için araçlar geliştirilmiştir. Örneğin; miRTargetLink2 bu miRNA gen ilişkilerini miRPathDB veya mirDIP gibi veritabanlarını kullanır. Hedef tahminlerinin işlevsel etkilerinin spesifikliğini artırmak için, bu araçlar genellikle mevcut uygulama programlama arayüzlerini kullanır, böylece miRNAlar ve etkileşim grafiğinde bulunan hedef genlerin in silico yolak analizleri için web hizmetlerine ve çevrimiçi araçlara erişir. Yüksek tahminli taramalar ve hedef gen tahmini için biyoinformatik araçlardaki ilerlemeler, miRNAların çalışılmasını ve olası hedeflerinin ve biyolojik yolaklarının tahmin edilmesini önemli ölçüde kolaylaştırmıştır.

Bu tez çalışmasının amacı NKH'de miRNA'ların ifadesinin hasta ve kontrol grubu arasında karşılaştırılmasıdır. Çalışmada NKH hastaları ve sağlıklı bireylerden oluşan kontrol grubuna ait kanlardan izole edilen miRNA'lar karşılaştırılıp büyük ölçekli miRNA profillemesi gerçekleştirilmiştir. Elde edilen miRNA'ların ifadesi analiz edilerek ve elde edilen sonuçlara göre kontrol ve hasta grubu arasında ifadesi önemli derecede farklılık gösteren miRNA'lar seçilerek RT-qPCR analizi ile doğrulanmıştır. Çalışmada, NKH ilişkili olduğunu doğruladığımız miRNA'lar bu hastalığın tanısında ve tedavisinde alternatif bir yöntem olarak kullanılabileceğini düşünmekteyiz.

2. MATERYAL VE METOT

2.1 Hasta Grupları

Bu tez çalışmasında; 2013 yılında Brezilya'da güncellenmiş Helsinki Deklarasyonu kararlarına, Hasta Hakları Yönetmeliğine ve İyi Klinik Uygulamalar Kurallarına uygun olarak planlanmış ve TC Sağlık Bakanlığı, Sağlık Bilimleri Üniversitesi Dr. Sami Ulus Kadın Doğum, Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Çocuk Metabolizma Hastalıkları Ünitesi'ne başvuran klinik, radyolojik, biyokimyasal ve moleküler genetik analizler ile NKH tanısı olarak izlenen beş NKH hastası (iki *AMT* ve üç *GLDC* genlerindeki mutasyonlar için homozigot/birleşik heterozigot olan) ile üç *AMT* ve dört *GLDC* geni heterozigot olan taşıyıcıların yakınlarından alınan aydınlatılmış onam formu doğrultusunda elde edilmiş örnekler incelenmiştir. Kontrol grubu olarak; hastalar ile aynı yaş ve cinsiyetteki sağlıklı kişilerden alınmış olan örnekler aydınlatılmış onamları alınarak incelenmiştir. Altı sağlıklı birey kontrol grubu olarak belirlenmiştir.

NKH tanısı ile takip edilen hastaların; cinsiyeti, ebeveynler arası akraba evliliği, hastalık bulgularının başlangıç yaşı, BOS/plazma glisin oranı, klinik bulguları, mortalite, beyin MR görüntüleme ve MRS bulguları, EEG bulguları kaydedilmiştir. Sağlıklı grup, NKH semptomlarını göstermeyen, muayene ve analizler sonucunda NKH olmayan hastalardan oluşmaktadır.

Çalışmamıza yönelik veri analizi için gerekli en az hasta sayısını belirleyen bir güç analizi; hastalığın oldukça nadir ve mortalitesinin yüksek olmasından dolayı yapılamamaktadır. Kontrol grubunun çalışmaya dahil edilme kriterleri arasında; çocuğun ve ebeveynlerinin çalışmaya katılmaya istekli olması; katılımcının klinik, radyolojik, biyokimyasal ve/veya moleküler genetik analiz ile NKH tanısının olmaması; katılımcının 0-18 yaş arasında olması; ebeveynden çalışmaya katılım için sözlü ve yazılı onam alınmış olması; NKH tanısı ile çalışmaya dahil edilen hastaların yaş ve cinsiyetleri aynı yaş ve cinsiyette olması bulunmaktadır. Çalışmaya dahil edilmeme kriterleri arasında; çocuğun ve/veya ebeveynlerinin çalışmaya katılmaya

istekli olmaması; katılımcının 0-18 yaş arasında olmaması; ebeveynden çalışmaya katılım için sözlü ve yazılı onam vermemiş olması bulunmaktadır.

Hastalardan yaş, cinsiyet, alınan örneklerin türü vb. bilgiler elde edilmiştir. Bu tür nitel bilgiler bir “Excel” dosyasında listelenip çizelge haline getirilmiştir. Ancak çalışmadaki tüm hastalar birer numarayla kodlanmış ve bu hasta dokularından elde edilecek tüm nitel ve nicel veriler bu kodlamalar ile kaydedilmiştir. Alınan örneklerden ise yapılacak analizlere bağlı olarak elde edilecek sayısal bilgiler hem tutulan laboratuvar notlarında hem de kullanılacak istatistik programında (SPSS İstatistikleri, Sürüm 22.0) kayıt altına alınmıştır. Hastalardan alınan örnekler ve örneklerden elde edilen biyolojik materyallerin arta kalanları uygun şartlar altında -80°C dolaplarda ve azot tankında saklanmıştır.

Deneyler sona erdikten sonra artakalan örnekler -80°C’de uygun şartlar altında 10 yıl boyunca TOBB ETÜ Tıp Fakültesi Morfoloji Laboratuvarında saklanıp daha sonra uygun şekilde imha edilecektir.

2.2 Örnek Temini

Hastalardan Çocuk Metabolizma Hastalıkları Ünitesine başvuran NKH tanılı hastalardan ve NKH şüphesi olan yeni tanılı hastalardan kontrol için alınan kan örnekleri NKH tanısının doğruluğu ve prognozu için hastanemizde rutin olarak çalışılmaktadır. Toplanan örnekler en geç 4 saat içerisinde TOBB ETÜ Tıp Fakültesi Morfoloji laboratuvarlarına gönderilmiş ve aşağıda belirtildiği gibi işlem yapılmıştır. Kan örnekleri her hastadan EDTA içeren iki mor tüpte beşer mL olarak alınmıştır. Örnekler laboratuvara geldiğinde bir örnekten hemen RNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Diğer tüpteki örnek ise 1200xg’de 20 dk oda sıcaklığında santrifüj edilmiş ve plazma kısmı yeni bir tüpe aktarılarak tekrar 1200xg’de 20 dk santrifüj edilmiştir. Daha sonra kullanmak üzere örnekler 1 mL’lik tüpler içerisinde küçük miktarlara bölünerek -20°C’de dondurulmuştur.

Çalışma planında tüm hastalardan, heterozigot ve sağlıklı bireylerden tam kan, serum ve idrar örnekleri toplandı. Ancak serum ve idrar örneklerden izole edilen total RNA’ların konsantrasyonları ve saflıkları RNA sekans analizi için uygun kalitede değildi. Bu nedenle sekanslama işlemine alınmadılar. Çalışmamıza sadece topladığımız tam kan örnekleri ile devam edildi.

2.3 RNA İzolasyonu

RNA izolasyonu için NucleoSpin miRNA Plasma 50 preparat Kit LOT: 2302-001 REF: 740981.50 (MACHEREY-NAGEL GmbH & Co., Düren, GERMANY) kullanılmıştır. İlk NucleoSpin® miRNA Plazma prosedürüne başlamadan önce, yıkama tamponu MW2 (Konsantre) 25 mL'ye 100 mL %96–100 etanol eklenmiştir. RNase içermeyen bir şişe rDNase (liyofilize) için 3 mL reaksiyon tamponu eklenmiştir. RNase-free rDNase: rDNase için belirtilen reaksiyon tampon hacmini (3 mL) rDNase şişesine eklenmiş ve oda sıcaklığında 1 dk inkübe edilmiştir. rDNase'yi tamamen çözmek için flakon hafifçe döndürülmüştür. RNA izolasyonu sırasında; 300 µL örneğe 90 µL tampon MLP eklenmiş ve 5 s vortekslenmiştir. Oda sıcaklığında (18–25 °C) 3 dk inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası 30 µL tampon MPP eklenmiş ve 5 sn vortekslenmiştir. Proteini çöktürmek için 11.000 xg'de 3 dk santrifüjlenmiştir. Berrak süpernatant (üst faz) yeni bir toplama tüpüne (2 mL, kapak) aktarılmıştır. 400 µL izopropanol eklenmiş ve 5 sn vortekslenmiştir. NucleoSpin® miRNA kolonunu toplama tüpüne (2 mL) yerleştirilmiş ve numune kolona yüklenmiştir. Oda sıcaklığında (18–25 °C) 2 dk inkübe edilmiştir. 11.000 xg'de 30 sn santrifüjlenmiştir. Alt kısmı atılmış ve kolon tekrar toplama tüpüne yerleştirilmiştir (300 µL'den fazla plazma/serum kullanılmışsa, tüm numune kolona yüklenene kadar bu adım tekrarlanmıştır). Birinci yıkama NucleoSpin® miRNA kolonuna 700 µL tampon MW2 eklenmiş, 11.000 xg'de 30 sn santrifüjlenmiştir. Alt kısmı atılmış ve kolon tekrar toplama tüpüne yerleştirilmiştir (Opsiyonel). İkinci yıkama için NucleoSpin® miRNA kolonuna 250 µL tampon MW2 eklenmiş, 11.000 xg'de 2 dk santrifüjlenmiştir. Alt kısmı atmak gerekli değildir (Opsiyonel). DNA'yı uzaklaştırmak için, 25 µL rDNase doğrudan NucleoSpin® miRNA kolonunun silis zarına eklenmiştir. Kapağı kapatılmış ve oda sıcaklığında (18-25 °C) 15 dk inkübe edilmiştir. Birinci yıkama için NucleoSpin® miRNA kolonuna 100 µL tampon MW1 eklenmiş, 11.000 xg'de 30 sn santrifüjlenmiştir. Alt kısmı atılmış ve kolonu tekrar toplama tüpüne yerleştirilmiştir. İkinci yıkama için NucleoSpin® miRNA kolonuna 700 µL tampon MW2 eklenmiş, 11.000 xg'de 30 sn santrifüjlenmiştir. Alt kısmı atılmış ve kolon tekrar toplama tüpüne yerleştirilmiştir. 3. yıkama da NucleoSpin® miRNA kolonuna 250 µL tampon MW2 eklenmiştir. Membranı tamamen kurutmak için 11.000 xg'de 2 dk santrifüjlenmiştir. NucleoSpin® miRNA kolonu yeni bir toplama tüpüne (1,5 mL) yerleştirilmiştir. 30 µL RNase içermeyen H₂O doğrudan kolonun silika membranına eklenmiştir. Oda

sıcaklığında (18–25 °C) 1 dk inkübe edilmiştir. Kapağı kapatılmış ve 1 dk 11.000 xg'de santrifüjlenmiştir. İzole edilen RNA örneği tüpün filtre kağıdında toplanmış ve analiz yapmak üzere -80°C'de saklanmıştır.

2.4 Yüksek Ölçekli RNA Dizileme Analizi

Çalışmamızda yüksek ölçekli RNA dizileme analizi hizmet alımı ile BMLabosis BM Lab. Sist. Ltd. Şti. (Ankara, Türkiye) firmasında yapılmıştır. RNA'ların saflığı, NanoPhotometerVR spektrofotometresi [IMPLEN, Amerika Birleşik Devletleri (ABD)] ile test edilmiştir. RNA'ların bütünlüğü, Agilent Bioanalyzer 2100 sistemi (Agilent Technologies, ABD) ile RNA nano 6000 test kiti kullanılarak değerlendirilmiş ve RNA bütünlük numarası (RIN) değeri 4.0 ile 6.0 arasında tespit edilmiştir. Saflığı, konsantrasyonu ve bütünlüğü uygun olan örnekler small RNA sekans analizi gerçekleştirilmiştir. Yüksek ölçekli RNA dizileme analizi P1, P2, P3, T1, T2, T3, T4, T5 ve C1 bireylere yapılmıştır. C1 (kontrol) örneği için altı kontrol örneğinden havuz yapılmıştır. P4, P5, T6 ve T7 sekans analizine dahil edilememiştir. Yüksek ölçekli RNA dizileme analizi sayesinde, kodlanmayan RNA'ları içeren öngörülemeyen miRNA profili analiz edilebilmektedir. Bu amaçla hastalardan alınan örneklerin toplam miRNA profillerini araştırmak ve bunların analizi için yüksek ölçekli RNA dizileme yöntemi kullanılmıştır.

2.4.1 Yüksek ölçekli RNA dizileme analizi metod

RNA saflığı NanoPhotometer spektrofotometre ile ölçüldü. RNA konsantrasyonu hesaplandı. Hesaplama için Qubit RNA assay Kit 2.0 flurometer kullanıldı. RNA sağlamlığı, bütünlüğü için RNA Nano 6000 Assay Kit kullanıldı. Saflığı, konsantrasyonu ve bütünlüğü uygun olan örnekler small RNA sekans analizi gerçekleştirildi. Amaç; miRNA'ların miktarını, dizisini ve varsa novel miRNA'lar belirlemektir.

2.4.2 Transkriptom sekans analizi

Toplam miktarı 3 mikrogram olan total RNA örneğinden small RNA kütüphanesi hazırlandı. Sekans kütüphanesi için NEBNext Multiplex Small RNA Library Prep Set (Illumina, NEB, ABD) üretici tavsiyelerine uygun olarak kullanıldı. Kısaca; NEB 3' SR adaptörü doğrudan spesifik 3' miRNA, siRNA ve piRNA uçlarına bağlanmıştır. 3'

ligasyon reaksiyonu sonrası, SR RT Primer 3' SR adaptörünün fazlası hibritlenmiş ve tek sarmallı DNA adaptörü çift sarmallı bir DNA molekülüne dönüştürülmüştür. Bu adım, adaptör-dimer oluşumunu önlemek için önemlidir ve sonraki ligasyon adımında 5' SR adaptörüne bağlanmayı önler. 5' adaptörler miRNA, siRNA ve piRNA 5' uçlarına bağlanırlar ve sonrasında ilk sarmal cDNA, M-MuLV Reverse Transkriptaz (RNaz H-) kullanılarak sentezlenirler. PCR amplifikasyonu, LongAmp Taq 2X master miks için SR primeri ve indeks primeri kullanılarak yapılmıştır. PCR ürünleri %8 poliakrilamid jel (100V, 80 dk) üzerinde saflaştırılmıştır. 140-160 bp'ye karşılık gelen DNA fragmanları (small noncoding RNA ve 3' ve 5' adaptörlerinin toplam uzunluğu) tespit edilmiş ve 8 µL elüsyon tamponunda çözülmüştür. Son olarak, DNA yüksek hassasiyetli çipler kullanılarak Agilent Bioanalyzer 2100 sisteminde kütüphane kalitesi değerlendirilmiştir.

2.4.3 Kümeleme ve sekanslama

İndeks kodlu numunelerin kümelenmesi, üreticinin talimatlarına göre TruSeq SR cluster kiti v3-cBot-HS (İllumina) kullanılarak bir cBot cluster kenerasyon sisteminde yapılmıştır. Küme oluşturma işleminden sonra, kütüphane hazırlıkları Illumina HiSeq 2500/200 platformunda sekanslanmış ve tek iplikli 50bp okumalar ile oluşturulmuştur.

2.4.4 Veri analizi

Fastq formatındaki ham veriler (ham okumalar) ilk olarak in-house olarak işlenmiş. Bu adımda; ham veriden adaptör içeren okumalar, ploy-N içeren okumalar ve düşük kaliteli okumalar çıkarılmış ve temiz okuma (clean reads) elde edilmiştir. Daha sonra, temiz okumalardan taramaya kadar belirli bir uzunluk aralığı seçilmiş ve sonraki analizler, yüksek kalitede tüm temiz verilere dayandırılmıştır. Small RNA parçaları, referans dizi üzerindeki ifadesini ve bozulmalarını analiz etmek için Bowtie v2.2.3 tarafından referans dizisine eşlenmiştir [131].

2.4.5 Bilinen miRNA dizisi hizalama

Bilinen miRNA'yı aramak için haritalanmış small RNA etiketleri kullanılmış. miRBase21.0 veri tabanı referans olarak kullanılmış, modifiye yazılım mirdeep2.0.0.5 ve srna-tools-cli potansiyel miRNA'yı elde etmek ve ikincil yapıları belirlemek için kullanılmıştır [132]. Protein kodlayan genlerden, tekrar dizilerinden, rRNA, tRNA, snRNA ve snoRNA'dan kaynaklanan etiketleri çıkarmak için small RNA etiketleri,

RepeatMasker, Rfam veri tabanına veya belirtilen türlerin kendisinden bu tür verilerle eşlenmiştir. miRNA'nın hedef geninin tahmini insan için miranda tarafından yapılmıştır [133].

2.4.6 Yeni miRNA tahmini

miRNA öncüsünün hairpin yapısının özelliği, yeni miRNA'yı tahmin etmek için kullanılabilir. Mevcut yazılım miREvo v1.1 ve mirdeep2, ikincil yapıyı, dicer bölünme bölgesini ve önceki adımlarda açıklanmayan small RNA etiketlerinin minimum serbest enerjisini keşfederek yeni miRNA'yı tahmin etmek için entegre edilmiştir [132, 134].

2.4.7 miRNA miktarının belirlenmesi

miRNA ifade seviyeleri, aşağıdaki kriterler aracılığıyla TPM (1 milyondaki transkript) ile tahmin edildi [135]. Normalleştirme formülü: Normalleştirilmiş ifade= (eşlenmiş okuma sayısı/toplam okuma) x1.000.000

DESeq2 R paketi kullanılarak iki koşulun/grubun (koşul başına iki biyolojik kopya) diferansiyel ifade analizi yapılmıştır. DESeq2 ile gen ifade verilerinde diferansiyel ifadelerini belirlemek için negatif binominal dağılımına dayalı bir model kullanarak istatistiksel analizi yapılmıştır.

2.4.8 Diferansiyel olarak ifade edilmiş genlerin GO ve KEGG ile analizi

GO ve KEGG zenginlik analizinin üç önemli amacı vardır. 1) Moleküler biyolojinin anahtar rolündeki alt gruplarını tanımlamak için kontrol edilebilen, yapılandırılmış sözlük gruplarını oluşturmak. 2) GO ve KEGG terimlerini biyolojik veri tabanlarındaki genlerin atıflandırılması için uygulamak. 3) GO ve KEGG atıflandırma veri setlerini kullanılmak için geliştirilen yazılım araçlarına erişimi sağlayan merkezi genel bir kaynağı sunmak. Bütün gen ürünleri üç süreç prensibiyle tanımlanır. Bunlar; moleküler proses, biyolojik proses ve hücrenel bileşenlerdir.

Diferansiyel olarak ifade edilen genlerin fonksiyon zenginleştirme analizi, Gen Ontology (GO), Kyoto Genler ve Genomlar Ansiklopedisi (KEGG) ve Reactome yolu analizi dahil olmak üzere clusterProfiler R paketi tarafından uygulanmıştır.

2.5 Biyoinformatik Analiz

NKH ile ilişkili yollar, PubMed ve PMC veritabanlarında 'Pathways from PubChem' kullanılarak belirlenmiştir (Çizelge 2.1 ve 2.2). Amaç, NKH hastalık genlerini hedefleyen miRNA'ları tespit etmektir.

Çizelge 2.1 : *AMT* geni ilişkili PubChem kaynaklı yolak isimlendirmeleri.

İsmlendirme	Kategori	Database
Metabolism	Pathway	Reactome
Amino acid and derivative metabolism	Pathway	Reactome
Glyoxylate metabolism and glycine degradation	Pathway	Reactome
Glycine degradation	Pathway	Reactome
Glycine cleavage	Pathway	BioCyc
One-carbon metabolism	Metabolic Process	WikiPathways
Trans-sulfuration, one-carbon metabolism and related pathways		WikiPathways
Glycine and Serine Metabolism	Metabolic	PathBank
Ammonia Recycling	Metabolic	PathBank
Dimethylglycine Dehydrogenase Deficiency	Disease	PathBank
Dihydropyrimidine Dehydrogenase Deficiency	Disease	PathBank
Sarcosinemia	Disease	PathBank
Non-Ketotic Hyperglycinemia	Disease	PathBank
Hyperglycinemia, Non-Ketotic	Disease	PathBank
Glycine Encephalopathy	Disease	PathBank
3-Phosphoglycerate Dehydrogenase Deficiency	Disease	PathBank
Folate metabolism (Folate metabolism)	Pathway	INOH
Metabolic Epileptic Disorders		WikiPathways
Glycine biosynthesis II	Pathway	BioCyc
Glycine cleavage	Pathway	BioCyc
Metabolic pathways	Pathway	KEGG
Inborn Errors Metabolism	Disease	GLAD4U
Metabolic Diseases	Disease	GLAD4U
Nutritional and Metabolic Diseases	Disease	GLAD4U

miRWalk, mirDB, TargetScan, Mirtarbase, miranda gibi miRNA tahmin araçları; KEGG, Panther, Reactome, Wikipathway gibi yol analiz araçları; Disgenet, GLAD4U ve OMIM gibi hastalık analiz araçları kullanılmıştır. Hastalık ve ilgili yollarla anlamlı korelasyon gösteren miRNA'lar tespit edilmiştir. Belirlenen miRNA'ların doğruluğunu artırmak amacıyla, en az iki tahmin aracında belirtilen miRNA'lar listeye alınmıştır. Ayrıca, belirlenen miRNA'lar yol-miRNA ve hastalık-miRNA ilişkisini doğrulamak için analiz edilmiş ve *AMT* ve *GLDC* mRNA'larına bağlanma bölgeleri belirlenmiştir.

Çizelge 2.2 : *GLDC* geni ilişkili PubChem kaynaklı yolak isimlendirmeleri.

İsimlendirme	Kategori	Database
Metabolism	Pathway	Reactome
Amino acid and derivative metabolism	Pathway	Reactome
Glyoxylate metabolism and glycine degradation	Pathway	Reactome
Glycine degradation	Pathway	Reactome
Glycine cleavage	Pathway	BioCyc
Glycine and Serine Metabolism	Metabolic	PathBank
Ammonia Recycling	Metabolic	PathBank
Dimethylglycine Dehydrogenase Deficiency	Disease	PathBank
Dihydropyrimidine Dehydrogenase Deficiency	Disease	PathBank
Sarcosinemia	Disease	PathBank
Non-Ketotic Hyperglycinemia	Disease	PathBank
Hyperglycinemia, Non-Ketotic	Disease	PathBank
Glycine Encephalopathy	Disease	PathBank
3-Phosphoglycerate Dehydrogenase Deficiency	Disease	PathBank
Glycine and Serine metabolism	Pathway	INOH
Metabolic Epileptic Disorders		WikiPathways
Glycine biosynthesis II	Pathway	BioCyc
Glycine cleavage	Pathway	BioCyc
Metabolic pathways	Pathway	KEGG
Inborn Errors Metabolism	Disease	GLAD4U
Metabolic Diseases	Disease	GLAD4U
Nutritional and Metabolic Diseases	Disease	GLAD4U

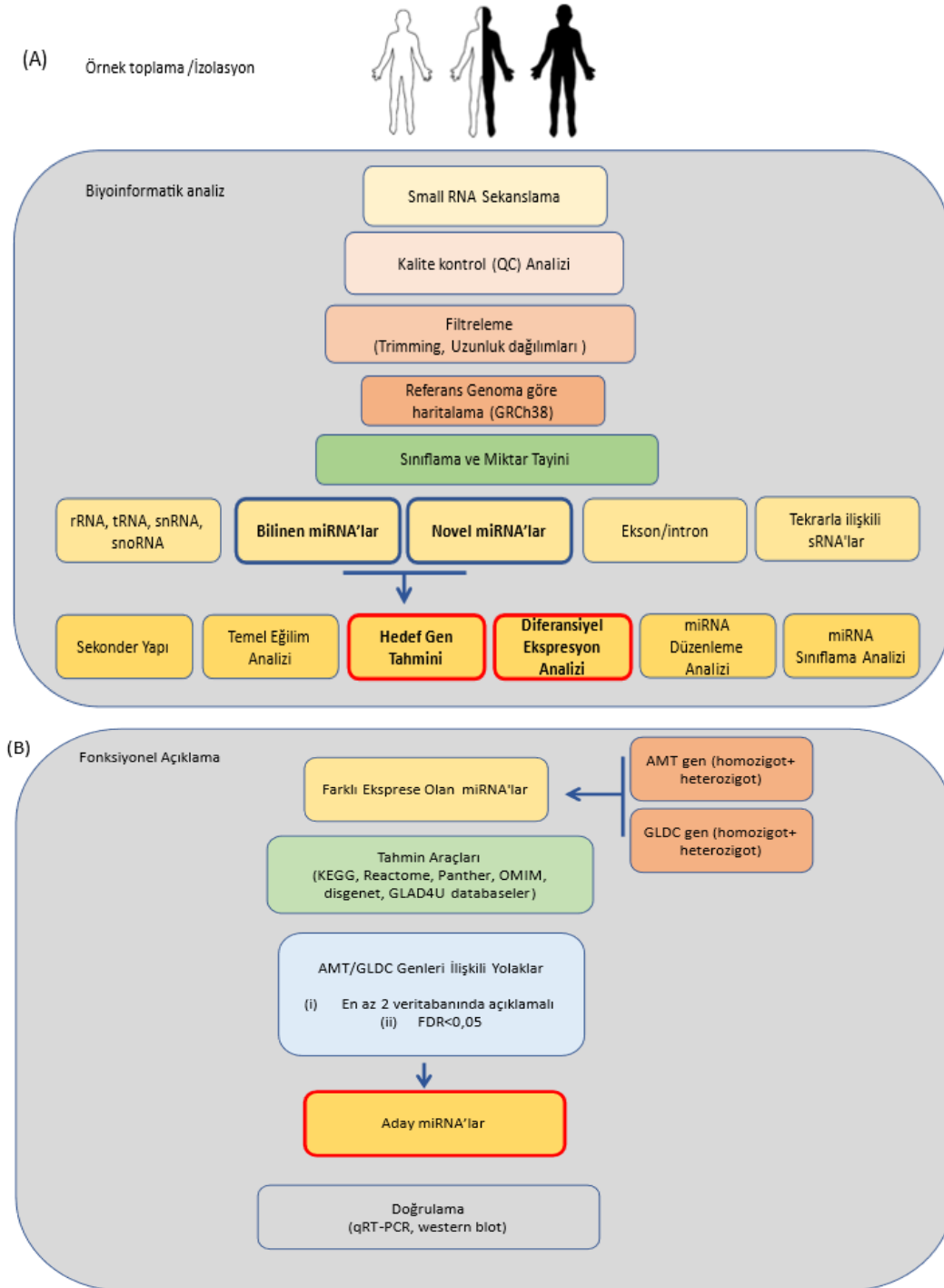
miRNA'ların işlevleri, hedef mRNA'larının gen zenginleştirme analizi ile belirlenmiştir. NKH hastalığı için hastalığın genlerini (*AMT*, *GLDC*, *GCSH* genleri) hedefleyen miRNA'ların belirlenmesi amaçlanmıştır. miRNA tahmin aracı olarak 'miRWalk', yolak analiz aracı olarak ise 'webgestalt' kullanılmıştır. Takip edilmesi istenen basamaklar aşağıdaki gibidir; miRWalk 'disease' kısmından NKH/Glisin ensefalopatisi seçilip ilgili miRNA'lar excel dosyasına aktarılmıştır. miRWalk 'genes' kısmından NKH'de yer alan *AMT*, *GLDC*, *SLC6A9* ve *GCSL* genlerini hedefleyen miRNA'lar belirlenerek 'venny' de çakıştırılmış ve dört geni de hedefleyebilecek miRNA'ların listesi elde edilmiştir. Seçenekleri artırmak için en az iki genin ortak olduğu miRNA'lar da seçilir. miRNA'lar belirlendikten sonra en az iki tahmin aracında ortak olacak şekilde birer kademe azaltarak miRNA'lar filtrelenmiş ve excel dosyası oluşturulur. Filtrelemeler miRWalk'tan yapılır. Önce miRWalk, Targetscan, Mirtarbase ve miRdb'de ortak olan miRNA'lar seçilir ve seçilen miRNA'lar miRWalk 'miRNAs' kısmına yazılır ve hedef genler bulunmuş olur. Hedef genler excel dosyasına aktarılır. Elde edilen hedef genler webgestalt'a yüklenerek yolak analizi yapılmıştır. miRWalk'ta glisin ensefalopatisini hedefleyen miRNA'lar bulunmuş ve

NKH 3'UTR miRNA, NKH 5'UTR miRNA'lar ve NKH miRNA CDS dosyalarında miRNA'ların genlerini hedefledikleri pozisyonlarına göre 3 farklı excel dosyası oluşturularak düzenlenmiştir. miRNA'lar ikinci adımda belirtildiği gibi belirlenerek 'NKH ortak miRNA'lar' adında bir excel dosyası oluşturulmuştur. Daha sonra belirlenen miRNA'lar ile yolak analizinin yapılması planlanmıştır. İkinci adımda tüm tool'larda ortak miRNA bulunmadığından miRWalk hariç en az iki tool'da ortak olan miRNA'larla çalışmaya başlanmasına karar verilmiş ve bu doğrultuda 12 miRNA belirlenmiştir. Yolak analiz sonuçlarına göre filtrenin kademeli olarak azaltılması ve yeni miRNA'ların bulunması planlanmıştır. Belirlenen miRNA'lar belirlendikten ve yolak analizleri yapıldıktan sonra mutlaka çalışmaya uygunluğunun belirlenmesi için literatürden taranmıştır. Yolak analizi için iki farklı yol izlenmiştir. Webgestalt tool'unda 'pathway' kısmı kullanılarak KEGG, Panther, Reactome, Wikipathway yolları ayrı ayrı değerlendirilmiştir. İkinci yol için 'disease' kısmı kullanılarak Disgenet, GLAD4U ve OMIM databaseleri incelenmiştir. miRNA'ların hedefleri miRWalk'ta 3'UTR, 5'UTR ve CDS şeklinde indirip hazırlandığından yolak analizleri 3'UTR, 5'UTR ve CDS için ayrı ayrı incelenmiştir. Yolak analizi yapılırken miRNA hedef genlerinin; Glisin ve glisin degradasyonu ile ilgili yollara ve *AMT*, *GLDC*, *GCSL* ve *SLC6A9* genleri hedefleyip hedeflemediğine, NKH'yi ve NKH genlerini hedefleyip hedeflemediğine, NKH'ye yakın bir metabolizma hastalığına ve NKH genlerini hedefleyip hedeflemediğine dikkat edilmiştir.

Yolak analizinde; 'glycine, serine and threonine metabolism', 'one carbon pool by folate', 'inborn errors of metabolism', 'metabolic diseases', 'genetic diseases', 'glyoxylate metabolism and glycine degradation' anahtar sözcükleri kullanılarak NKH yolağı ile ilişkili miRNA'lar belirlenmiştir. *AMT*, *GCSL*, *GLDC*, *SLC6A9* genlerini hedefleyen miRNA'lar teker teker bulunmuş ve 'venny' de karşılaştırılarak dört geni hedefleyen miRNA'lar belirlenmiştir.

Dört geni de hedefleyebilecek 788 miRNA belirlenmiştir. Ancak bu miRNA'lar en az iki miRNA tahmin aracında ortak olarak bulunan 11 miRNA elde edilmiştir. Elde edilen 11 miRNA'nın yolak analizi yapılmıştır. Yolak analizinde içerisinde 'glycine, serine and threonine metabolism', 'one carbon pool by folate', 'inborn errors of metabolism', 'metabolic diseases', 'genetic diseases', 'glyoxylate metabolism and glycine degradation' anahtar sözcükleri kullanılarak NKH yolağı ile ilişkili miRNA'ların olduğu belirlenmiştir. Daha sonra belirlenen 11 bilinen aday miRNA'ya

ve beş novel miRNA'ya primerler tasarlanmıştır. NKH hastaları, heterozigot bireyler ve kontrol gruplarında aday miRNA ilişkili primerler ile RT-qPCR yapılarak belirlenen 15 miRNA'nın doğruluğu kontrol edilmiştir. Çalışmamızın akış şeması şekil 2.1'de özetlenmiştir.



Şekil 2.1 : A) Bireylerden alınan numuneler ile RNA sekanslama ve biyoinformatik analiz basamakları, B) NKH ilişkili aday miRNA'ların belirlenmesi için fonksiyonel çalışma basamakları.

2.6 cDNA Sentezi ve Real Time qPCR Analizi

Örneklerden elde edilen RNA'lar cDNA'ya dönüştürülmüştür. cDNA sentezi için miRCURY LNA RT Kit Cat No: 3399340 LOT: 76901020 (Qiagen, ALMANYA) kiti kullanılmıştır. Reaksiyona başlamadan önce; UniSp6 (U6) RNA spike-in'i 80 µl nükleaz içermeyen su vortekslenmiş, 20-30 dk buzda bekletilmiştir (tamamen çözünmesi için). Alikotlanarak -30- -15°C arasında saklanmıştır. Reaksiyon 20 µl'lik PCR tüplerine hazırlanmıştır. RT-qPCR sentezi için miRNA RT-qPCR miRCURY LNA SYBR Green PCR Kit (200) Cat No: 339345 LOT: 7690968 (Qiagen, ALMANYA) kiti kullanılmıştır (Çizelge 2.3). Primerler önce hafifçe vortekslenip santrifüjlendikten sonra üzerine 220 µl nükleazsız su eklenmiş ve oda sıcaklığında 20 dk inkübe edilmiştir. cDNA'lar 1:60 oranında seyreltilmiştir. RT-qPCR sentezi için her bir RNA örneği, RNaz içermeyen su kullanarak 5 ng/µl'ye seyreltilmiştir. Ters transkripsiyon reaksiyonlarını hazırlanmış ve buz üzerinde tutulmuştur. 42°C'de 60 dk boyunca inkübe edilmiş, 95°C'de 5 dk boyunca inkübe ederek ters transkriptaz inaktive edilmiştir (Çizelge 2.4). Örnekler 4°C'de soğutulmuş ve -80°C'de saklanmıştır.

Çizelge 2.3 : cDNA sentez protokolü.

5X miRCURY RT reaksiyon tamponu	2 µl
Nükleaz içermeyen su	4,5 µl
10X miRCURY RT enzyme karışımı	1 µl
RNA spike-in (opsiyonel)	0,5 µl
Template RNA (5 ng/uL)	2 µl
Toplam hacim	10 µl

Çizelge 2.4 : cDNA sentez reaksiyon şartları.

Adım	Süre (dk)	Sıcaklık (°C)
Ters transkripsiyon	60	42
Reaksiyon inaktivasyonu	5	95
Saklama	Sonsuz	4

Sentezlenen cDNA'lar 1:60 oranında RNAaz içermeyen su ekleyerek seyreltilmiştir. Kite verilen solüsyon ve talimatlara göre "SYBR Green master miks" ile bir reaksiyon karışımı hazırlanmıştır (Çizelge 2.5). Bu karışım PCR tüplerine dağıtılmış ve oda sıcaklığında santrifüj edilmiştir. PCR tüpleri gerçek zamanlı PCR cihazına

yerleştirilmiş ve program başlatılmıştır. Reaksiyon, 95°C'de 2 dk süreyle bir başlangıç adımı ardından, 10 sn süreyle 95°C'de ve 1 dk süreyle 56°C'de 45 döngüde gerçekleştirilmiştir (Çizelge 2.6).

Çizelge 2.5 : U6 Primeri LOT: 20103903-5 (Qiagen, ALMANYA) için protokolü.

2X miRCURY SYBR Green Miks	5 µl
Resuspended PCR Primer Miks	1 µl
cDNA Template (1:15)	4 µl
Total hacim	10 µl

Çizelge 2.6 : RT-qPCR reaksiyon şartları.

Adım	Süre	Sıcaklık (°C)
PCR başlangıç ısı aktivasyonu	2 dk	95
2 adımlı döngü (45 döngü)		
• Denatürasyon	10 sn	95
• Uzatma	1 dk	56
• Soğuma	5 dk	40

Veriler, taban çizgisini uyarlamak için otomatik karşılaştırmalı eşik (Ct) ayarı ile analiz edilmiştir. miRNA ifadesini belirlemek için $2^{-\Delta\Delta CT}$ yöntemi kullanılmıştır.

2.7 Analiz Sonuçlarını Değerlendirme

İstatistiksel değerlendirme Statistical Package for Social Sciences (SPSS) for Windows 20 (IBM SPSS Inc., Chicago, IL) programı kullanılarak yapılmıştır. Sürekli değişkenlerin normal dağılıma uygunluğu Shapiro-Wilk testi ile değerlendirilmiş, normal dağılıma bağlı olarak tanımlayıcı istatistiklerin gösteriminde ortalama±standart sapma veya ortanca (ÇAG – Çeyreklikler Arası Genişlik) kullanılmıştır. Kategorik değişkenler sayı ve yüzde olarak verilmiştir. Çalışma gruplarını karşılaştırmak için parametrik test varsayımlarına göre t testi veya Mann-Whitney testi uygulanmıştır. Kategorik verilerin kıyaslanmasında; çapraz çizelgeler oluşturulmuş ve Ki-Kare ve/veya Fisher'in Kesin Ki-Kare testi kullanılarak gruplar karşılaştırılmıştır. Değişkenler arasındaki ilişkileri araştırmak için korelasyon analizi uygulanmıştır.

Tüm istatistiksel analizler $\alpha = 0,05$ Tip I hata düzeyi ile yapılmış ve istatistiksel kararlarda $p < 0,05$ değeri anlamlı farklılığın göstergesi olarak kabul edilmiştir.





3. BULGULAR

3.1 Hasta Verilerinin Sonuçları ve Genetik Analizleri

Çalışmaya dahil edilen her beş NKH hastasının akraba evlilikleri, klinik bulguları, güncel durumları, laboratuvar ve görüntüleme bulguları detaylı olarak çizelge 3.1’de, epidemiyolojik ve genetik verileri ise çizelge 3.2’de belirtilmiştir.

3.2 Küçük RNA Dizileme Verilerinin Genel Görünümü

Bu çalışmada, örnekler P1, P2, P3, T1, T2, T3, T4, T5 ve C1 olarak toplanmış, dizilenmiş ve analiz edilmiştir. C1 olan kontrol örneği için toplam altı sağlıklı bireyin izole edilen RNA’ları havuzlanmıştır. Dokuz kan örneğinin okuma uzunluklarının dağılımı Şekil 3.1’de gösterilmektedir. Ham okuma uzunluğu 50 nükleotid (nt) olup, adaptörler ve her iki uçtaki (5’ ve 3’) rastgele 4 bazın kırılmasından sonra okuma uzunluğu 0 nt ile 42 nt arasında değişmiştir. Kütüphane hazırlama aşamasında boyut seçimi yapılmadan, her bir örnek için okuma uzunluğu dağılımında dört tepe noktası oluşmuştur. Yapısal özelliklerine göre, miRNA’ların ana tepe noktasının 22 nt civarında olduğu görülmüştür. Bir RNA molekülünün tespit edilip edilmediğini belirlemek için okuma sayısı eşik değeri 5 olarak belirlenmiş (≥ 5 tespit edildi, < 5 tespit edilmedi).

Toplam küçük RNA okumalarının çoğunluğunu miRNA’lar oluşturmaktadır. En düşük okuma sayısına sahip olan P2, 4 milyonun üzerinde okuma içermektedir. Toplam okuma (119.949.992) oluşturulmuş ve 2.067.676 eşsiz okuma yapılmıştır. Düşük kaliteli okumalar kaldırıldıktan sonra, küçük RNA’ların (18-35 nt) uzunluk dağılımı, tüm gruplarda temiz ve eşsiz okumalar arasında 22 nt uzunluğunun en bol sınıf olduğunu göstermiştir. NKH hastalığının moleküler mekanizmalarını anlamak için dokuz cDNA kütüphanesi dizilenmiştir. Bu temiz okumalar, insan genomuna (hg38) %98,59’un üzerinde haritalanma oranlarıyla hizalanmıştır (Çizelge 3.3).

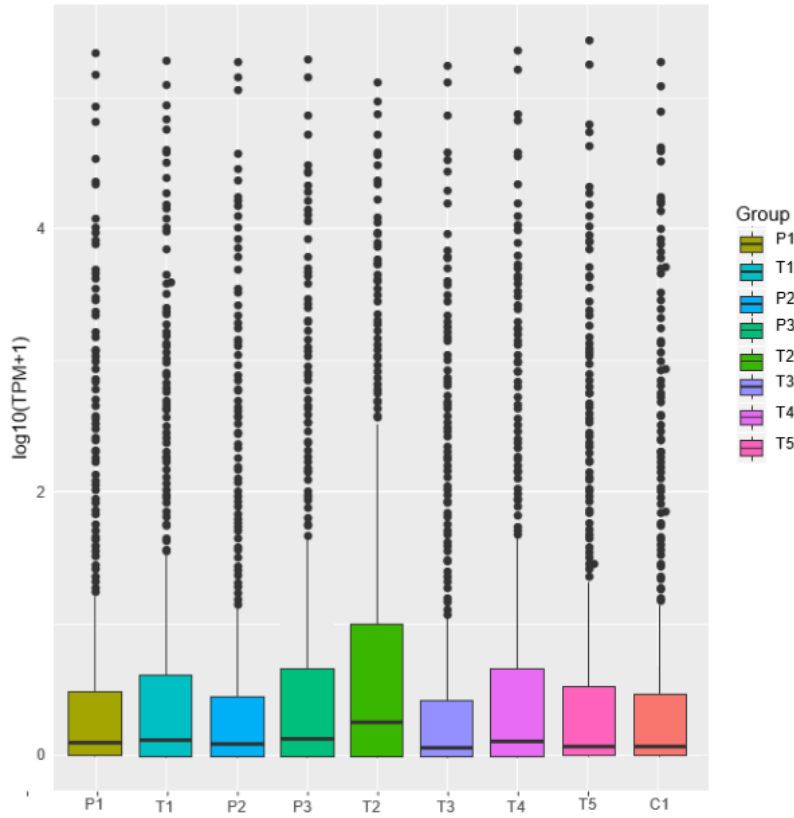
Çizelge 3.1: NKH hastaları klinik, laboratuvar ve görüntüleme bulguları.

Hasta	P1	P2	P3	P4	P5
Akrabalık	+	+	+	+	-
Klinik Bulgular	Emme Zayıflığı, Hipotoni, Mikrosefali, Gelişim Geriliği, Nöbet, Artmış DTR, Patolojik Refleksler	Emme Zayıflığı, Hipotoni, Nöbet, Hıçkırık, Gelişim Geriliği, Artmış DTR, Mekanik Ventilasyon, Gerektiren Solunum Sıkıntısı	Emme Zayıflığı, Nöbet, Hipotoni, Gelişim Geriliği	Emme Zayıflığı, Nöbet, Hipotoni, Mikrosefali, Gelişim Geriliği	Emme Zayıflığı, Nöbet, Hipotoni, Mikrosefali, Gelişim Geriliği, Artmış DTR, Yutma Disfonksiyonu Gastrostomi
Klinik Sonuç	Exitus (50 Ay), Epilepsi, Gelişim Geriliği, Mikrosefali	Exitus (79 Ay), Epilepsi, Gelişim Geriliği	Gelişim Geriliği, Epilepsi	Gelişim Geriliği, Epilepsi	Gelişim Geriliği, Epilepsi
BOS Glisin Seviyesi (N <20 µmol/L)	71,2	175	400,4	116,9	NA
Plazma Glisin Seviyesi (N: 125–450 µmol/L)	499	1910	1690	688	791
BOS/Plazma Glisin Oranı (N≤0.02)	0,14	0,09	0,23	0.17	NA
Kraniyal MRI Bulguları	Korpus Kallozum Disgenezi, Ventriküler Dilatasyon, Vermian Hipoplazi	Yaygın Hipomiyelinasyon	Korpus Kallozum Disgenezi Yaygın Hipomiyelinasyon	Yaygın Hipomiyelinasyon Bilateral Hipokampal Atrofi	Korpus Kallozum Disgenezi Ventriküler Dilatasyon Mega Sisterna Magna
Kraniyal MRS Bulguları (Glisin pik)	Normal (Tedavi öncesi örnek alınmadı)	+	NA	+	NA
EEG Bulguları	Multifokal Epileptik Aktivite, Hipsaritmi	Multifokal Epileptik Aktivite	Hipsaritmi, Burst Suppresyon Paterni	Multifokal Epileptik Aktivite, Burst Suppresyon Paterni	Multifokal Epileptik Aktivite Burst Suppresyon Paterni Serebral Disfonksiyon

Not: Örnekler eş zamanlı olarak alınmıştır. P1 ve P2, daha önceki çalışmamızda bildirilmiştir [136]. Kısaltmalar: +: evet, BOS: Beyin Omurilik Sıvısı, MRI: Manyetik Rezonans Görüntüleme, MRS: Manyetik Rezonans Spektroskopisi, EEG: Elektroensefalografi, DTR: Derin tendon refleksleri, NA: mevcut değil.

Çizelge 3.2: NKH hastaları, heterozigot bireyler ve kontrol gruplarının epidemiyolojik ve genetik verileri.

Hasta	Cinsiyet	Yaş	Zigosite	Gen	Mutasyon	RefSeq
P1	E	4	Homozigot	<i>AMT</i>	c.631G>A, p.E211K	NM_000481.4
P2	K	7	Homozigot	<i>GLDC</i>	c.2237A>G, p.D746G	NM_000170.3
P3	E	1	Homozigot	<i>GLDC</i>	c.2714T>A, p.V905E	NM_000170.3
P4	K	6	Homozigot	<i>GLDC</i>	c.1382G>A, p.R461Q	NM_000170.3
P5	K	16	Birleşik heterozigot	<i>AMT</i>	c.15_18delAAGT, p.s6Wfs*89; c.452_456delAAGATTTGGCCCTCA	NM_000481.4
T1	E	9	Heterozigot	<i>AMT</i>	c.452_466delAAGATTTGGCCCTCA	NM_000481.4
T2	K	20	Heterozigot	<i>GLDC</i>	c.2714T>A, p.V905E	NM_000170.3
T3	K	7	Heterozigot	<i>GLDC</i>	c.2640T>G, p.D880E	NM_000170.3
T4	K	28	Heterozigot	<i>GLDC</i>	c.1382G>A, p.R461Q	NM_000170.3
T5	E	30	Heterozigot	<i>GLDC</i>	c.1382G>A, p.R461Q	NM_000170.3
T6	K	36	Heterozigot	<i>AMT</i>	c.452_466delAAGATTTGGCCCTCA	NM_000481.4
T7	E	39	Heterozigot	<i>AMT</i>	c.15_18delAAGT, p.s6Wfs*89	NM_000481.4



Şekil 3.1 : RNA sekans analizi verileri okuma uzunluklarının dağılımı.

Bu sonuçlar, RNA-seq yönteminin hg38 genomundan küçük RNA'ların önemli bir kısmını yakaladığını göstermektedir. NKH hastası, heterozigot ve kontrol grupları arasında gen ifadesinin farklı analizini yapmak için RNA-seq okumalarını normalleştirmede FPKM (ekzon modelinin kilobazı başına milyon fragman) değerleri kullanılmış; bu normalleştirme $|\log_2(\text{kat değişim})| \geq 1$ ve q-değeri $< 0,05$ kriterlerine dayandırılmıştır.

Çalışmada 1532 matur miRNA belirlenmiş, miRNA'ların dizisi, genomdaki pozisyonu, bireylerdeki okuma sayısı, bireyler arası ifade farklılıkları analiz edilmiş ve NKH hastalığı ile ilişkili miRNA'lar belirlenmiştir. Çalışmamızda sekans verileri mutasyon tipine göre gruplandırılmış ve hastalar ile kontrol grubu arasında ifade farkı anlamlı olan ve biyoinformatik olarak NKH yolağı ile ilişkili olan miRNA'lar belirlenmiştir (Çizelge 3.4).

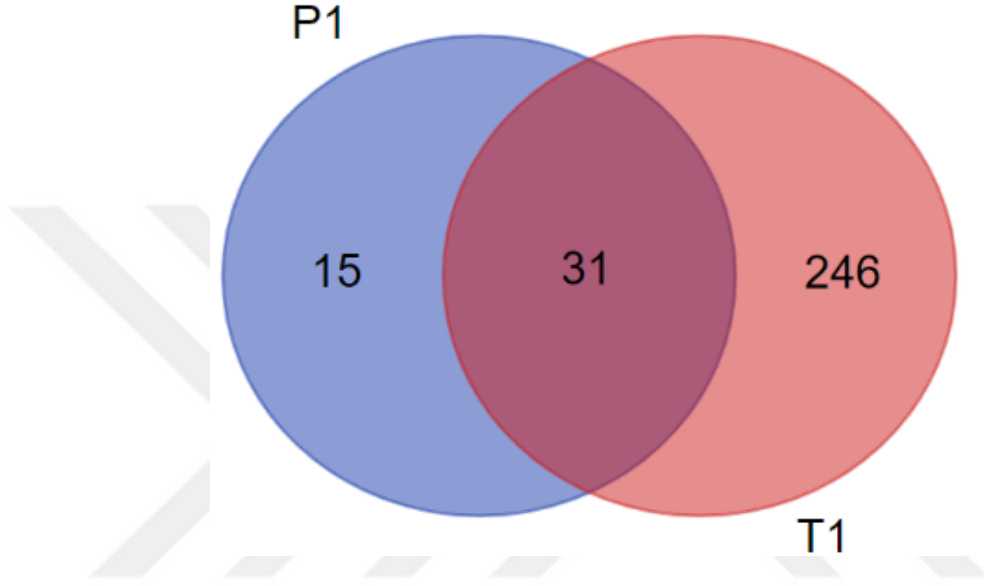
Çizelge 3.1 : Küçük RNA dizilemesi, kalite analizi, filtreleme ve hizalama adımlarıyla üretilen verilerin istatistikleri.

Hasta	Toplam Okuma	Q30	GC İçeriği	N% > 10%	Temiz Okuma	Toplam sRNA	Uniq Okuma	Haritalanan sRNA	"+" Mapped sRNA	"-" Mapped sRNA
C1	21.681.438	%97,85	49,77%	31 (%0,00)	21.595.191 (%99,60)	20.706.053	238.816	20.513.295 (%99,07)	11.818.480 (%57,08)	8.694.815 (%41,99)
P1	12.823.409	%97,70	49,21%	139 (%0,00)	12.757.643 (%99,49)	12.642.888	139.539	12.493.372 (%98,82)	6.612.285 (%52,30)	5.881.087 (%46,52)
P2	4.466.868	%97,85	51,35%	5 (%0,00)	4.441.713 (%99,44)	4.412.125	74.601	4.358.537 (%98,79)	2.521.018 (%57,14)	1.837.519 (%41,65)
P3	14.068.258	%98,50	51,28%	0 (%0,00)	13.917.888 (%98,93)	13.728.353	196.003	13.535.582 (%98,60)	9.990.698 (%72,77)	3.544.884 (%25,82)
T1	15.468.800	%96,07	48,97%	0 (%0,00)	15.249.918 (%98,59)	14.977.782	436.356	14.590.799 (%97,42)	8.382.119 (%55,96)	6.208.680 (%41,45)
T2	12.206.124	%98,56	50,28%	0 (%0,00)	12.117.776 (%99,28)	11.910.770	283.493	11.600.037 (%97,39)	8.762.296 (%73,57)	2.837.741 (%23,83)
T3	19.665.683	%97,84	50,20%	0 (%0,00)	19.580.882 (%99,57)	19.294.418	216.899	19.067.735 (%98,83)	11.819.571 (%61,26)	7.248.164 (%37,57)
T4	11.638.318	%98,62	50,43%	0 (%0,00)	11.524.567 (%99,02)	11.432.590	254.519	11.118.834 (%97,26)	7.154.579 (%62,58)	3.964.255 (%34,68)
T5	11.018.381	%97,69	49,94%	0 (%0,00)	10.955.043 (%99,43)	10.845.013	227.45	10.630.529 (%98,02)	6.685.572 (%61,65)	3.944.957 (%36,38)

Çizelge 3.2 : Sekans verilerinde hasta, heterozigot gruplarda kontrol grubuna göre anlamlı farklılık gösteren miRNA'lar.

miRNA	Mature miRNA Sekans Dizisi	mfe	Pozisyon	Okuma Sayıları									
				C1	P1	P2	P3	T1	T2	T3	T4	T5	
hsa-miR-133a-3p	5'- UUU GGU CCC CUU CAA CCA GCU G -3'	-	-	12	16	16	63	43	52	29	94	16	
hsa-miR-152-5p	5'- AGG UUC UGU GAU ACA CUC CGA CU -3'	-	-	2	1	5	19	9	25	0	13	3	
hsa-miR-219b-5p	5'- AGA UGU CCA GCC ACA AUU CUC G -3'	-	-	12	4	0	12	0	18	25	7	10	
hsa-miR-433-3p	5'- AUC AUG AUG GGC UCC UCG GUG U -3'	-	-	15	7	12	42	82	462	7	23	4	
hsa-miR-504-5p	5'- AGA CCC UGG UCU GCA CUC UAU C -3'	-	-	8	4	8	19	11	94	25	44	13	
hsa-miR-627-5p	5'- GUG AGU CUC UAA GAA AAG AGG A -3'	-	-	49	19	3	2	1	6	10	4	4	
hsa-miR-671-3p	5'- UCC GGU UCU CAG GGC UCC ACC -3'	-	-	16	26	4	15	91	46	31	5	14	
hsa-miR-4503	5'- UUU AAG CAG GAA AUA GAA UUU A -3'	-	-	33	0	2	3	14	1	38	3	6	
hsa-miR-4669	5'- UGU GUC CGG GAA GUG GAG GAG G -3'	-	-	0	30	7	0	10	5	55	8	10	
hsa-miR-4707-3p	5'- AGC CCG CCC CAG CCG AGG UUC U -3'	-	-	35	0	17	0	9	9	0	8	12	
hsa-miR-5189-3p	5'- UGC CAA CCG UCA GAG CCC AGA -3'	-	-	24	14	0	3	1	3	9	1	0	
novel_62	5'- uug aga uac uga cua guc ugg u -3'	-18.00	6:26322846..26322914:+	206	0	17	18	0	9	197	94	83	
novel_278	5'- gug ugu gca ccu gug ucu guc -3'	-39.20	19:18284683..18284742:+	20	27	2	1	29	4	17	10	7	
novel_363	5'- uca gac uac cua aaU gag cac u -3'	-46.60	2:101309449..101309536:+	4	15	0	2	15	1	8	1	0	
novel_480	5'- ucc cca acc ccu gcc cgc aga -3'	-30.00	19:10828978..10829037:+	21	5	1	5	0	0	6	0	0	
novel_662	5'- ccc cac ugc uaa auu uga cug gcu u -3'	-29.00	2:88229571..88229663:-	10	17	7	16	37	20	18	9	4	

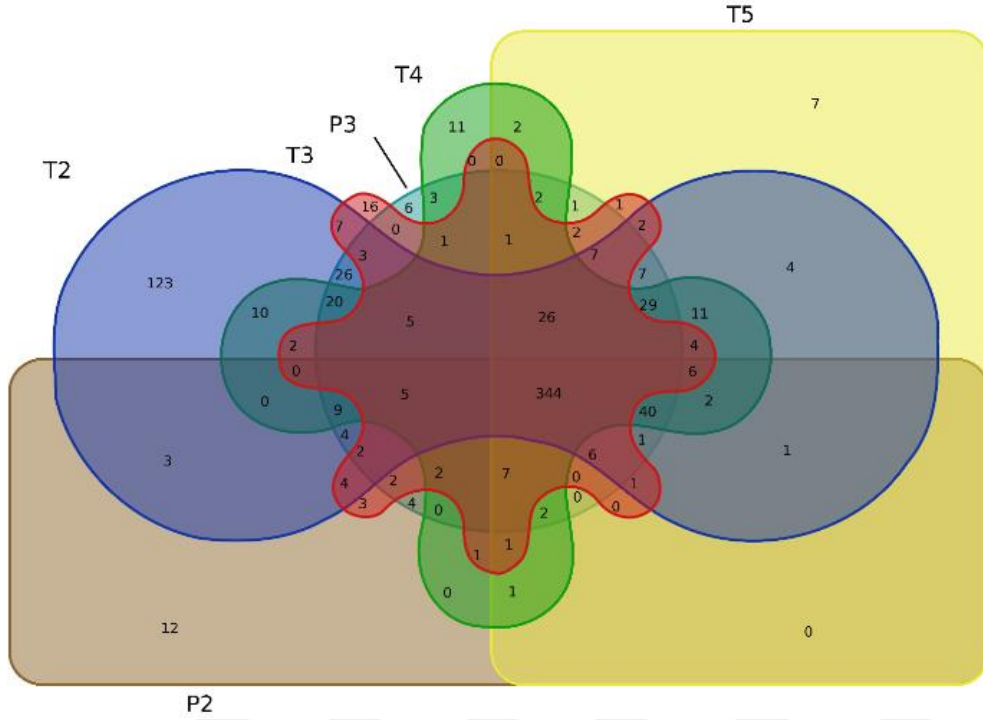
Her bir grupta paylaşılan ortak miRNA'ların artmış ifadesi ve azalmış ifadesini incelemek amacıyla, kontrol grubuna göre ifadeleri anlamlı şekilde değişen miRNA'ların bir venn diyagramı oluşturulmuştur. P1 (*AMT* homozigot), T1 (*AMT* heterozigot) arasında toplam 440 miRNA ortaktır ve 440 miRNA'dan 31 adedinin C1'de ifade edilmediği tespit edilmiştir. hsa-miR-4669 NKH yolağı ile ilişkili bulunmuştur (Şekil 3.2).



Şekil 3.2 : *AMT* homozigot ve heterozigot bireylerde ilişkili miRNA sayısı.

Aynı şekilde P2 (*GLDC* homozigot), P3 (*GLDC* homozigot) arasında 428 miRNA ortaktır ve 38 adet miRNA'nın C1'de ifade edilmediği tespit edilmiştir. *GLDC* heterozigot bireyler (T2, T3, T4, T5) arasında toplamda 380 ortak miRNA mevcuttu ve 14 tane miRNA C1'de ifade edilmediği tespit edilmiştir. *GLDC* homozigot ve *GLDC* heterozigot mutasyonuna sahip bireylerde 344 adet ortak miRNA bulunmuş ve bu bireylerde bulunan 344 miRNA C1'e göre kıyaslandığında üç adet miRNA'nın C1'de ifade edilmediği, kalan 341 miRNA'nın bütün gruplarda ifade edildiği tespit edilmiştir. hsa-miR-133a-3p, hsa-miR-504-5p ve hsa-miR-3117-3p C1'e göre *GLDC* geninde mutasyon taşıyan bireylerde ifade edilmekte, C1'de edilmemektedir. Bu üç miRNA'dan hsa-miR-133a-3p ve hsa-miR-504-5p NKH yolağı ile ilişkili bulunmuştur. *GLDC* mutasyonu (homozigot ve heterozigot) olan bireylerin ifade edilen 341 miRNA C1 ile ortak ve üç miRNA kontrol grubuna göre *GLDC*

homozigot ve heterozigot grupta kontrol grubuna göre farklılık göstermiştir. Bu üç miRNA'dan iki tanesi NKH yoluyla ilgili bulunmuştur (Şekil 3.3).



Şekil 3.3 : *GLDC* homozigot ve heterozigot bireylerde miRNA sayısı.

C1'e göre farklılık gösteren *AMT* ve *GLDC* genlerinde ifade edilen miRNA'lar ve homozigot hastalar ile heterozigot mutasyonu olanlar arasındaki miRNA'lar yolak analizinde değerlendirilmiştir. Çalışmamızda NKH yoluyla ilgili olan 11 miRNA'dan üç tanesi (miR-4669, hsa-miR-133a-3p ve hsa-miR-504-5p) doğrudan hasta ve taşıyıcı gruplarda ifade edilen ve kontrol grubunda ifadesini istatistiksel olarak anlamlı görülmeyen miRNA'lardır. Diğer altı miRNA hasta ve taşıyıcı bireylerin ayrı ayrı kontrol grubu ile karşılaştırılması sonrası kontrol grubuna göre anlamlı ifade farklılığı gösteren ve yolak analizlerinde NKH ilişkili olduğu belirtilen miRNA'lardır. *GLDC* mutasyonu olan (homozigot ve heterozigot) bireylerde ayrı ayrı C1'e göre anlamlı farklılıkları belirlendikten sonra gruplar arasında 10 ortak miRNA tespit edilmiş, fakat belirlenen miRNA'larda yapılan yolak analizinde NKH ilişkili bir yolak belirlenmemiştir.

3.3 Bilinen miRNA'ların Analizi

Her bir örnekte eşleşen miRNA'ların detaylarını elde etmek için yukarıda belirtilen okumalar referans dizisine eşleştirilmiş ve miRBase'deki belirli dizilim aralıkları ile karşılaştırılmıştır. Bu karşılaştırmalar, eşleşen bilinen miRNA'ların ikincil yapısını, dizisini, uzunluğunu ve mevcut durumda miRNA'nın kaç kez tekrarlandığına dair bilgileri içermektedir. miRNA, öncülünden olgun bir forma dönüştüğünde, bu süreç dicer sindirimi ile tamamlanır. Kesim yerinin özgülüğü, miRNA'nın olgun dizisinin ilk bazını belirler. Bu nedenle, farklı uzunluktaki miRNA'ların ilk baz dağılımı, miRNA'ların baz dağılımı istatistiklerine ek olarak da gerçekleştirilmiştir. Çizelgede görüldüğü üzere, T1'deki miRNA okuma sayısı en yüksek olup 436.356'dır; P2'deki miRNA okuma sayısı en az olup 74.601'dir (Çizelge 3.5).

Çizelge 3.3 : Sekans analizi veri dağılımı.

Hasta	Toplam Okuma	Toplam Baz (bp)	Uniq Okuma	Uniq Baz (bp)
C1	20.706.053	451.440.885	238.816	5.333.144
P1	12.642.888	277.225.664	139.539	3.242.150
P2	4.412.125	98.480.527	74.601	1.783.348
P3	13.728.353	373.117.731	196.003	4.886.101
T1	14.977.782	357.450.009	436.356	10.381.436
T2	11.910.770	318.140.061	283.493	6.864.290
T3	19.294.418	428.661.227	216.899	4.984.022
T4	11.432.590	285.624.680	254.519	6.339.391
T5	10.845.013	268.930.213	227.450	5.555.092

3.3.1 Farklı miRNA'ların tarama ve tanımlanması

Deneysel sonuçların güvenilirliğini test etmek ve örnek seçiminde duyarlılığı artırmak için örnekler arasında gen ifade seviyelerinin korelasyon analizi gerçekleştirilmiştir. Şekilde, Pearson korelasyon katsayısının karesi R^2 , 0,476 ile 1 arasında yer alarak örnekler arasındaki ifade desenlerinin benzerliğinin yüksek olduğunu göstermektedir (Şekil 3.4).

Farklı miRNA'lar, ifade seviyelerindeki istatistiksel değişikliklerine ve düzeltilmiş anlamlılık seviyelerine (padj/q değeri) dayanarak taranmıştır ve her bir homozigot ve heterozigot birey kontrol grubuna göre karşılaştırılmıştır.



Şekil 3.4 : RNA sekans analizi hasta, heterozigot ve kontrol grubu arasındaki korelasyon verileri.

P1 ve C1 gruplarında, 20 farklı miRNA’da artmış ifade profili elde edilmiş, 26 farklı miRNA’da ise azalmış ifade elde edilmiştir. T1 ve C1 gruplarında, 145 farklı miRNA’da artmış ifade profili elde edilmiş, 132 farklı miRNA’da azalma elde edilmiştir. P2 ve C1 gruplarında, 49 farklı miRNA’da artış, 99 farklı miRNA’da azalma elde edilmiştir. P3 ve C1 gruplarında ise, 141 farklı miRNA’da artış elde edilmiş, 149 farklı miRNA’da azalma elde edilmiştir. T2 ve C1 gruplarında, 265 farklı miRNA’da artış görülmüş, 228 farklı miRNA’da azalma elde edilmiştir. T3 ve C1 gruplarında ise, 62 farklı miRNA’da artış görülmüş, 54 farklı miRNA’da azalmış ifade profili elde edilmiştir. T4 ve C1 gruplarında, 160 farklı miRNA’da artış elde edilmiş, 114 farklı miRNA’da azalma görülmüştür. T5 ve C1 gruplarında ise, 66 farklı miRNA’da artış elde edilmiş, 99 farklı miRNA’da azalma elde edilmiştir (Çizelge 3.6).

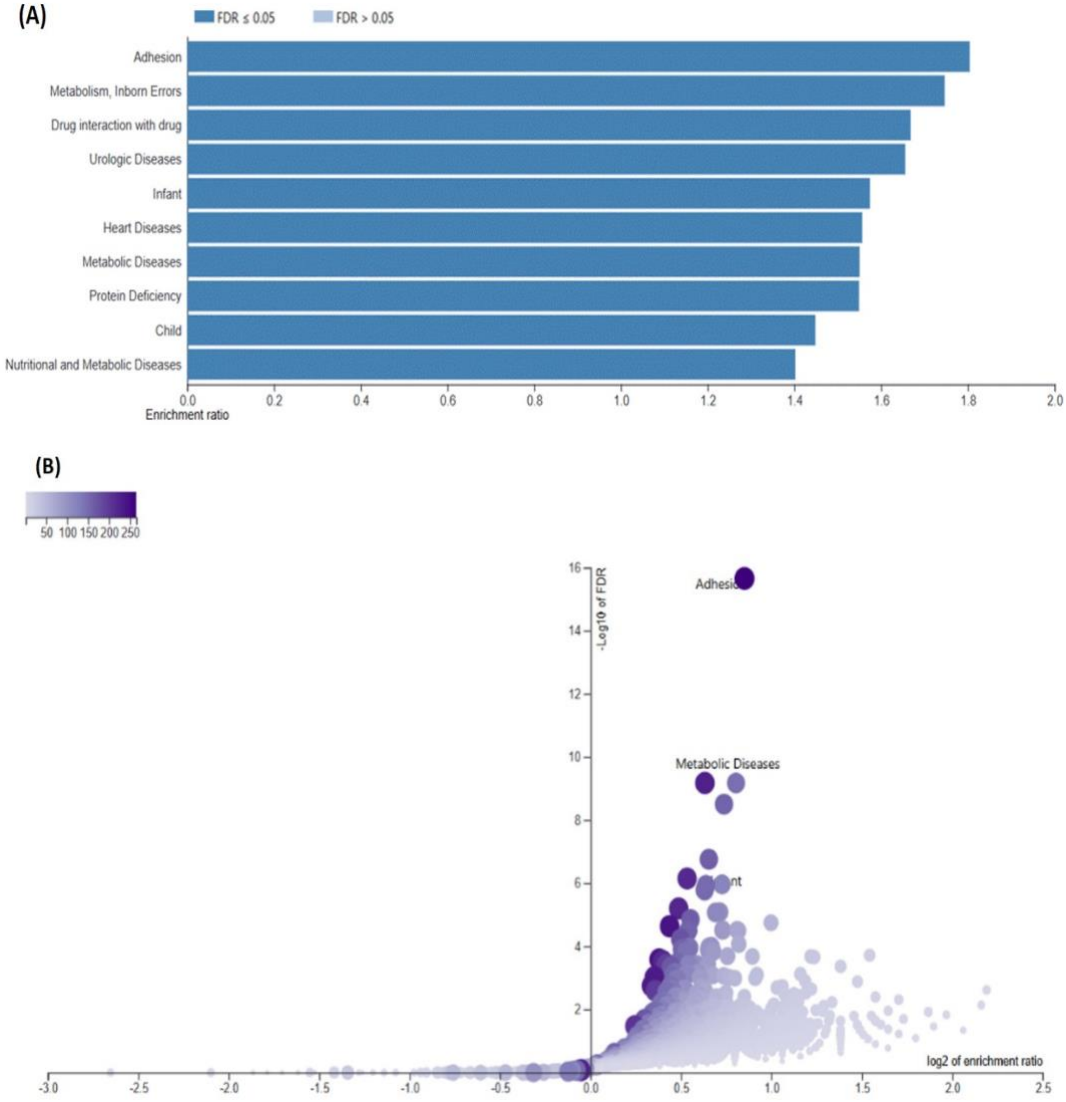
Çizelge 3.4 : Hasta ve taşıyıcı bireylerin kontrol grubuna göre değişen miRNA sayıları.

Grup	Farklı miRNA'lar	Artmış ifadeli miRNA'lar	Azalmış ifadeli miRNA'lar	Padj/q value
P1 vs C1	46	20	26	<0,05
T1 vs C1	277	145	132	<0,05
P2 vs C1	148	49	99	<0,05
P3 vs C1	290	141	149	<0,05
T2 vs C1	493	265	228	<0,05
T3 vs C1	116	62	54	<0,05
T4 vs C1	274	160	114	<0,05
T5 vs C1	165	66	99	<0,05

3.3.2 Farklı miRNA aday hedef genlerinin zenginlik analizi

Diferansiyel olarak ifade edilen genlerin biyolojik ve işlevsel sonuçlarını incelemek için, aşırı ifade edilen genler WebGestalt paketinde gen-hastalık, gen-mirna, mirna-hastalık, mirna-yolak ilişkileri ile ayrı ayrı değerlendirilmiştir [137]. Yolak analizinde Pubmed ve PMC'de NKH ilişkili yolaklarda tanımlanan terimler aranmıştır. Hasta, heterozigot ve kontrol grubunda ifadeleri anlamlı derece farklılık gösteren 788 miRNA belirlenmiş ve en az iki miRNA tahmin aracında ortak olarak bulunan 11 bilinen miRNA elde edilmiştir. Yolak analizi sonrasında ilişkili miRNA'larda en çok karşılaşılan terim, 'metabolic pathways' ve 'Inborn Errors of Metabolism' terimleri olmuştur. Bu terimlerin en çok karşılaşıldığı analiz veritabanı KEGG ve GLAD4U olmuştur. hsa-miR-671-3p için üç farklı yolak ve hastalık analizi veritabanında da ilişkili sonuçlara ulaşılmıştır. hsa-miR-671-3p'nin NKH ilişkili genler ile en çok ilişkili olduğu bölge CDS bölgesidir. Fakat hsa-miR-671-3p, *AMT* ve *GLDC* mRNA'larına doğrudan bağlanan bir miRNA değildir (Şekil 3.5).

hsa-miR-4669 için iki farklı veritabanında doğrulama yapılmıştır. GLAD4U 'metabolic diseases' ile ilişkili bulunmuş, belirlenen hastalık-miRNA ilişkisinin hsa-miR-4669'nin CDS bölgesi üzerinde olduğu tespit edilmiştir. hsa-miR-4669 CDS bölgesi üzerinden *AMT* VE *GLDC*'ye doğrudan bağlanmamaktadır fakat 3'UTR ve 5'UTR bölgelerinde *AMT* ve *GLDC* mRNA'larına bağlandığı alanlar bulunmaktadır.



Şekil 3.5 : KEGG (A) ve GLAD4U (B) hsa-miR-671-3p yolak analiz verisi.

hsa-miR-219b-5p, hastalık ilişkili veritabanlarında ‘inborn errors of metabolism’ ve ‘metabolic diseases’ ile ilişkili bulunmuştur. NKH ile ilişkili olan miRNA bölgesi CDS’dir. Çalışmamızda bu miRNA *GLDC* mutasyonu olan hastalarda ve heterozigot grupta kontrol grubuna göre anlamlı derece artmıştır. Ayrıca *AMT* mRNA’sına da CDS bölgesi üzerinden doğrudan bağlanmaktadır.

hsa-miR-133a-3p; hem yolak-miRNA, hem de hastalık-miRNA analizlerinde anlamlı şekilde NKH ilişkili bulunan miRNA’lardan birisidir. Anlamlı bulunan bütün yolak analizleri CDS bölgesindedir. hsa-miR-133a-3p, doğrudan *AMT* ve *GLDC* mRNA’larına bağlanmamaktadır.

hsa-miR-433-3p; hem yolak-miRNA, hem de hastalık-miRNA analizlerinde 'metabolic diseases' ve 'metabolic pathways' ile ilişkili bulunmuştur. Anlamlı bulunan bütün yolak analizleri CDS bölgesindedir. hsa-miR-433-3p, doğrudan *AMT* ve *GLDC* mRNA'larına bağlanmamaktadır.

hsa-miR-504-5p, hastalık ilişkili veritabanlarında 'brain diseases' ve 'metabolic pathways' ilişkili bulunmuştur. Yolak analizinde ilişkili olduğu miRNA bölgesi CDS'dir. Çalışmamızda bu miRNA *GLDC* mutasyonu olan hastalarda ve heterozigot grupta kontrol grubuna göre anlamlı derece artış olmuştur. Ayrıca *AMT* mRNA'sına da CDS bölgesi üzerinden doğrudan bağlanmaktadır.

hsa-miR-152-5p, hastalık ve yolak analizinde 'inborn errors of metabolism' ve 'metabolic pathways' yolakları ile ilişkilidir. hsa-miR-152-5p, *GLDC* mutasyonu olanlarda kontrol grubuna göre CDS bölgesi üzerinden anlamlı derecede artmış şekilde ifade edilmiştir. Ayrıca *AMT* mRNA'sına da CDS bölgesi üzerinden doğrudan bağlanmaktadır.

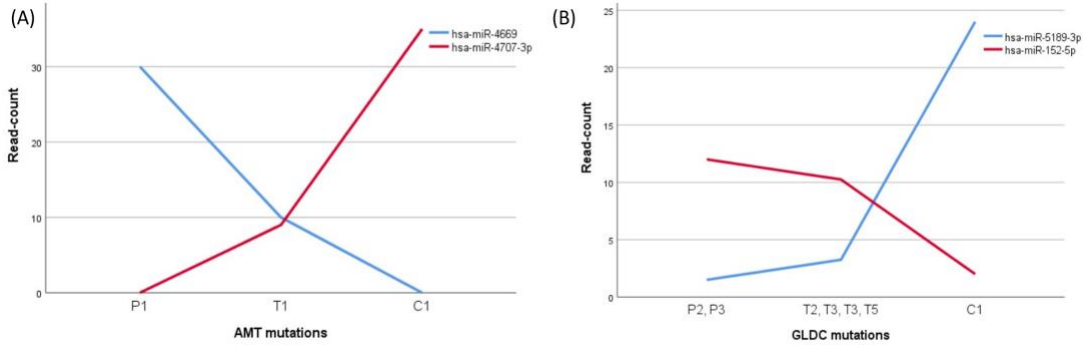
hsa-miR-4707-3p, hastalık ve yolak analizinde 'inborn errors of amino acid metabolism' ve 'metabolic pathways' ile ilişkili bulunmuştur. hsa-miR-4707-3p, *AMT* mutasyonu olan hastalarda ve heterozigot grupta kontrol grubuna göre azalmıştır. Bu miRNA *AMT* ve *GLDC* mRNA'larına doğrudan bağlanmamaktadır.

hsa-miR-5189-3p, 'metabolic pathways', 'metabolic diseases', 'inborn errors of metabolism', 'nutrition and metabolic diseases' yolakları ile ilişkili bulunmuştur. Bu miRNA'da *GLDC* geninde mutasyon olan grupta sağlıklı gruba göre azalma olmuştur. Ayrıca hsa-miR-5189-3p, *AMT* mRNA'sına CDS bölgesinden doğrudan bağlanmaktadır.

Gruplar arasında farklı ifadelene gösteren miRNA'ları elde ettikten sonra, miRNA ile hedef genleri arasındaki ilişkiye göre, her grup için farklı ifadeleme gösteren miRNA'ların hedef gen setine GO ve KEGG zenginlik analizi gerçekleştirilmiştir.

Homozigot ve heterozigot mutasyonu olan bireyler, kontrol grubuna göre kıyaslandığında NKH ilişkili olan 11 bilinen miRNA ifade profillerine göre değerlendirildiğinde, *AMT* geninde mutasyonu olanlarda hsa-miR-4707-3p'nin azalmış, hsa-miR-4669'nin artmış ifadesi olduğu görülmüştür. Aynı şekilde *GLDC* geninde mutasyonu olanlarda hsa-miR-5189-3p'nin azalmış, hsa-miR-152-5p'nin

artmış ifadesi olduğu görülmüştür. Onbir miRNA'nın dört tanesinde (hsa-miR-4707-3p, hsa-miR-4669, hsa-miR-5189-3p, hsa-miR-152-5p) NKH hastaları, heterozigot bireyler ve kontrol grubu arasında belirgin kolerasyon gösterilmiştir (Şekil 3.6).



Şekil 3.6 : Sekans analizinde *AMT* ve *GLDC* geni hasta ve heterozigot bireylerde korele olan miRNA'lar.

Çalışmamızda literatürde bilinen 11 miRNA'dan beş tanesinin doğrudan *AMT* ve *GLDC* genlerine bağlandığı belirlenmiştir (Çizelge 3.7). Bu beş miRNA'nın hem yolak analizinde hem de doğrudan *AMT* ve *GLDC* mRNA'larına bağlanmaları nedeniyle NKH ile doğrudan ilişkili olan miRNA'lar olduğu düşünülmüştür. hsa-miR-4669, hem *AMT* hem de *GLDC* mRNA'larına doğrudan bağlanabilmektedir.

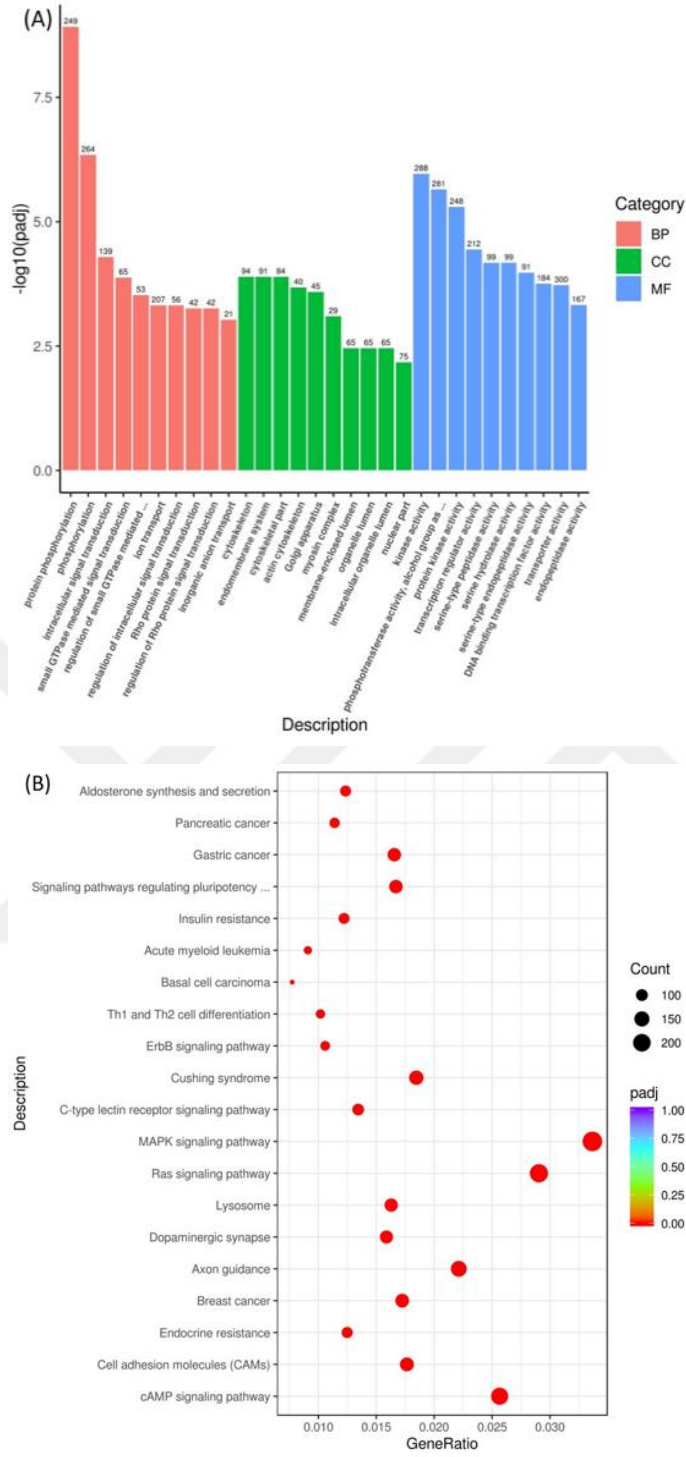
3.3.3 Aday miRNA'ların KEGG ve GO zenginlik analizi

KEGG diyagramlarında "GeneRatio", bir KEGG yolunda veya kategorisinde, işaretlenen genlerin sayısının, o yol veya kategori içindeki toplam gen sayısına oranını ifade eder. Bu oran, yolun zenginleştirme analizinde, incelenen veri setindeki genlerin, belirli bir yol veya kategori ile ne kadar ilişkili olduğunu göstermeye yardımcı olur. Yüksek bir GeneRatio, yolun veya kategorinin veri setinde önemli bir rol oynadığını işaret eder. GO diyagramında 'BP', 'CC' ve 'MF', sırasıyla 'Biyolojik Proses' (Biological Process), 'Hücre Bileşeni' (Cellular Component) ve 'Moleküler Fonksiyon' (Molecular Function) anlamına gelir. Bu terimler, genlerin ve proteinlerin farklı düzeylerdeki işlevlerini ve etkileşimlerini sınıflandırmak için kullanılır. BP, bir organizmada veya hücrede gerçekleşen olayları tanımlar. CC, hücredeki yapısal organizasyonu ifade eder. MF ise moleküler düzeydeki aktivite ve görevleri kapsar.

Çizelge 3.5 : Biyoinformatik analizler sonucu NKH yolağı ile ilişkili olan ve doğrudan *AMT* ve *GLDC* mRNA'larına bağlanabilen aday NKH ilişkili miRNA'lar.

miRNA	hsa-miR-4669	hsa-miR-4669	hsa-miR-152-5p	hsa-miR-219b-5p	hsa-miR-504-5p	hsa-miR-5189-3p
Refseq	NM_000170	NM_000481	NM_000481	NM_000481	NM_000481	NM_000481
Gen	<i>GLDC</i>	<i>AMT</i>	<i>AMT</i>	<i>AMT</i>	<i>AMT</i>	<i>AMT</i>
Dizi	#CTCCAGG CCGGGCGC AG#	#CTCTTCCA CATTCCCA #	#GGTTGGA GACATTGC AGAGCTA#	#GAGAGTC TAGTGGTT GGAGACAT TG#	#GGTGGCG TTTGC GGG TTGGAGTC TGCCAGTG CAGTACCG GGACAGTC A#	#TGTGGGC CTGGAGGT GTTGGA#
Başlangıç	127	1789	328	317	169	529
Bitiş	144	1805	350	342	217	550
Bağlanma	10	10	10	10	10	10

AMT geninde homozigot ve heterozigot mutasyonu olan bireyleri, kontrol grubuna göre sırasıyla 'biyolojik proses' (GO:0016310, P1 264/3311, T1 380/5608 gen), 'moleküler proses' (GO:0005215, P1 300/5292, T1 445/8776 gen) ve hücrel bileşenler (GO:0005856, P1 94/2163, T1 137/3819 gen) açısından en çok ilişkili GO terimleri olmuştur. Aynı şekilde *GLDC* geninde homozigot (P2, P3) ve heterozigot (T2, T3, T4, T5) mutasyonu olan bireylerin kontrol grubuna göre sırasıyla 'biyolojik proses' (GO:0016310), 'moleküler proses' (GO:0005215) ve hücrel bileşenler (GO:0012505) açısından en çok ilişkili GO terimleri olmuştur. P1 ve T1 bireylerinin kontrol grubuna göre KEGG yolak analizi verilerinde, hsa04010 (P1 248/7367, 404/14391 gen) 'MAPK signaling pathway' en çok ilişkili yolaktır. *GLDC* geninde homozigot (P2, P3) ve heterozigot (T2, T3, T4, T5) mutasyonu olan bireylerin kontrol grubuna göre KEGG yolak analizi verilerinde, hsa04145 (P2 441/14837, P3 265/9180, T2 472/16373, T3 367/11537, T4 435/14590, T5 369/12313 gen) 'fagozom yolağı' grupları arasında en çok ilişkili yolaktır. Farklı olarak ifade edilen miRNA'ların hedef genlerinin GO gen fonksiyon sınıflandırması (A), aday genlerin KEGG zenginleşmesiyle ilişkili sinyal yollarının nokta diyagramı (B)'de gösterilmiştir (Şekil 3.7).



Şekil 3.7 : P1 ve C1 arasındaki zenginleştirilmiş GO (A), KEGG (B) diyagramı.

Hasta ve taşıyıcı bireylerdeki miRNA ifade verileri kontrol grubuna göre karşılaştırıldığında belirgin ifade farklılığı gösteren miRNA'ların ortak yolak analizlerinde NKH ilişkili olan yolaklar en çok ilişkili olan on yolak arasında belirtilmemiştir. İfade profilleri kontrol grubuna göre farklılık gösteren ve yolak

analizlerinde en az iki yolak analizinde anlamlı ilişki bulunan miRNA'ların GO analizleri de NKH yolakları ile ilişkili olduğunu göstermiştir.

miRNA sekans analizi sonucu hsa-miR-133a-3p, hsa-miR-152-5p, hsa-miR-219b-5p, hsa-miR-433-3p, hsa-miR-504-5p, hsa-miR-627-5p, hsa-miR-671-3p, hsa-miR-4503, hsa-miR-4669, hsa-miR-4707-3p ve hsa-miR-5189-3p miRNA'ları kontrol grubuna göre *AMT* ve *GLDC* mutasyonu olan bireylerde anlamlı derecede farklılık göstermiştir. Aynı şekilde miRNA sekans analizi ile beş yeni (novel) miRNA'nın kontrol grubuna göre *AMT* ve *GLDC* mutasyonu olan bireylerde anlamlı derecede farklılık gösterdiğini belirlenmiştir. Bu novel miRNA'lar novel_62, novel_278, novel_363, novel_480 ve novel_662'dir. Çalışmamızda biyoinformatik analizler sonucu en az iki farklı 'tool'da NKH ilişkili olduğu bilinen 11 adet bilinen miRNA ve beş adet novel miRNA belirlenmiştir. Belirlenen miRNA'ların bağlandıkları genler belirlenmiş, NKH ilişkili olan *AMT* ve *GLDC* genlerine bağlandıkları bölgeler gösterilmiştir (Çizelge 3.8).

3.4 Bilinmeyen (Novel) miRNA'ların Analizi

Çalışmada 1532 matur miRNA analiz edilmiştir. Bu miRNA'ların 1437 tanesi bilinen 95 tanesi novel miRNA'dır. Novel miRNA'lar sekans analizi verilerinde hasta ve kontrol grup arasındaki ifade miktarları karşılaştırılarak iki grup arasında anlamlı farklılık olan beş novel miRNA çalışmaya dahil edilmiştir

3.5 Belirlenen Aday miRNA'ların RT-qPCR Analizleri

NKH hastalarındaki sekans analizi sonucu belirlenen 16 miRNA (11 bilinen miRNA ve beş novel miRNA) ifadeleri, kontrol grubuna göre daha yüksek veya daha düşük olan miRNA'ların ifadeleri her bir NKH hastası ve kontrol grup için RT-qPCR ile doğrulandı. Bu işlem ticari olarak satın alınan ve optimizasyonu yapıldı miRNA analiz kitlerine ait uygun protokoller kullanılarak sekanslama sonucu belirlenen miRNA'lara uygun primerler kullanılarak RT-qPCR ile ölçüldü. Toplam beş hasta, yedi heterozigot birey ve altı kontrol grubuna RT-qPCR analizi yapıldı, kontrol grubu (C1-6) örneklerinde ortalama Ct değeri istatistik hesapmalarda kullanılmak için belirlendi.

Çizelge 3.6 : Biyoinformatik analiz sonrası NKH ilişkili olduğu belirlenen onbir bilinen miRNA.

miRNA	Artmış/ Azalmış ifade profili	Fonksiyonel Database	Yolak	Hastalık Database	Hastalık	Gen	FDR
hsa-miR-133a-3p	Artmış	KEGG	Metabolik	GLAD4U	Kalıtsal metabolik hastalık	<i>AMT</i> <i>GLDC</i>	<0,05
hsa-miR-152-5p	Artmış	KEGG	Metabolik	GLAD4U	Kalıtsal metabolik hastalık	<i>GLDC</i>	<0,05
hsa-miR-219b-5p	Artmış			GLAD4U Disgenet	Kalıtsal metabolik hastalık Metabolik	<i>GLDC</i>	<0,05
hsa-miR-433-3p	Artmış	KEGG	Metabolik	GLAD4U	Metabolik	<i>GLDC</i>	<0,05
hsa-miR-504-5p	Artmış	KEGG	Metabolik	GLAD4U	Beyin	<i>GLDC</i>	<0,05
hsa-miR-627-5p	Azalmış			GLAD4U	Metabolik Kalıtsal metabolik hastalık	<i>GLDC</i>	<0,05
hsa-miR-671-3p	Artmış	KEGG Reactome	Metabolik Glioksalat metabolizması ve glisin degregasyonu	GLAD4U	Kalıtsal metabolik hastalık Metabolik Beslenme ve metabolik	<i>AMT</i>	<0,05
hsa-miR-4503	Azalmış	Panther Wikipathway	Serin glisin biyosentezi			<i>AMT</i> <i>GLDC</i>	<0,05
hsa-miR-4669	Artmış	Panther	Serin glisin biyosentezi	GLAD4U	Metabolik	<i>AMT</i>	<0,05
hsa-miR-4707-3p	Azalmış	KEGG	Metabolik	Disgenet	Kalıtsal aminoasit metabolizması	<i>AMT</i>	<0,05
hsa-miR-5189-3p	Azalmış	Wikipathway KEGG	One-karbon metabolizması Metabolik	GLAD4U	Kalıtsal metabolik hastalık Metabolik Beslenme ve metabolik	<i>GLDC</i>	<0,05

45. döngüden sonra pik veren miRNA'ların Ct değerleri 45 olarak kabul edildi. U6 miRNA, PCR reaksiyonunda internal kontrol olarak kullanıldı. U6 plazma seviyelerinin belirli koşullar altında değişiklik gösterebildiğine dair kanıtlar bulundu [138]. Altı kontrol grubu için ortalama U6 değerleri birbirine yakındı ve ortalama Ct değeri hesaplandı.

Kontrol grubundaki ortalamalar üzerinden hasta ve heterozigot bireylerdeki CT hesaplaması yapıldı ve $2^{-\Delta\Delta CT}$ belirlendi (Çizelge 3.9 ve 3.10). NKH hastaları ve kontrol grup arasındaki miRNA ifadeleri arasındaki farklar analiz edildi ve belirlenen aday miRNA'ların NKH hastalığında biyobelirteç olarak kullanılmaları araştırıldı. NKH ilişkili olduğu belirlenen 16 miRNA'nın (11 bilinen ve beş novel) RT-qPCR ile 'housekeeping' gen (U6)'ya göre ifade paterni ve sekans verilerine göre doğruluğu karşılaştırıldı. Kontrol grubuna göre birin üzerinde $2^{-\Delta\Delta CT}$ değeri olan miRNA'lar artmış, birin altında olanlar azalmış ifade olarak belirlendi. Sonuçlar sekans verileri ile karşılaştırılarak değerlendirildi. Belirlenen miRNA'ların fonksiyonları ve NKH'deki sinyal yolları ile ilişkisi araştırılıp fenotipe olan etkisi belirlenmeye çalışıldı. 16 miRNA'nın ifade profili sekans verileri ile karşılaştırıldı. hsa-miR-133a-3p, sekans analizi ve biyoinformatik analizlerde NKH yolağı ile en çok ilişkili olduğu görülen aday miRNA'lardandı. Sekans verisinde *AMT* mutasyonu olan hastada artış görüldü, aynı şekilde RT-qPCR'da da P1 ve P5'de ifade profili arttı. Fakat *AMT* mutasyonu olan hastalar ve kontrol grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık mevcut değildi. hsa-miR-152-5p RT-qPCR'da Tm değerleri arasında uygunluk görülmedi ve NKH hastaları ve heterozigot bireylerin çoğunda ifade edilmedi, ifadesi olanlar da 45. döngüden sonra ifade edildi. hsa-miR-152-5p için tekrar primer tasarımı yapıp yeniden hastalarda değerlendirilmesi planlandı. Mevcut sonuçlar ile RT-qPCR verileri anlamlı kabul edilmedi. hsa-miR-219b-5p sekans analizinde *AMT* mutasyonu olan bireylerde azalmış ifade profili görüldü. Fakat sekans analizinde P5 ve T7'de miRNA ifadesi arttı. RT-qPCR verilerinde hasta ve kontrol grubunda anlamlı bir ifade farklılığı görülmedi. hsa-miR-433-3p *AMT* mutasyonu olan bireylerde RT-qPCR verileri anlamlı değildi. *GLDC* mutasyonu olan bireylerde artmış ve azalmış ifade profili sonuçları mevcuttu. P4, T4 ve T5 bireylerde belirgin artmış miRNA ifadesi gösterildi fakat sonuçlar sekans analizi verileri ile uyumlu değildi. hsa-miR-504-5p bütün hasta ve heterozigot bireylerde kontrol grubuna göre azalmış bulundu. RT-qPCR verilerinde

bütün örneklerdeki azalma dikkat çekiciydi fakat aynı benzerlik sekans analizinde görülmedi. hsa-miR-504-5p, NKH hastalığı için yapılan yolak analizinde glisin yolağı ile ilişkili bulundu. Fakat sekans verisinde hastalar, heterozigot bireyler ve kontrol grubunda anlamlı bir istatistiksel fark mevcut değildi. hsa-miR-627-5p, sekans analizinde bütün bireylerde azalmış ifade profili yönündeydi. Sekans analizindeki ifade farklılığı P2 hariç *GLDC* mutasyonu içeren bütün bireylerde mevcuttu. Aynı şekilde RT-qPCR verileri de *GLDC* mutasyonu olan P2, P3 ve T2’de azalma gösterdi. Farklılık istatistiksel olarak anlamlıydı ($p < 0,05$). Fakat *GLDC* mutasyonu olan diğer bireylerde azalmış ifade profili değil artmış ifade profili izlendi. Bu durumun çevresel etkiler ile ilişkili olabileceği düşünüldü. *GLDC* c.2714T>A (p.V90E) mutasyonu olan bireylerde hem sekans analizinde hem de RT-qPCR’da aynı sonuçlar elde edildi ve sonuçlar istatistiksel olarak anlamlıydı. *GLDC* c.2714T>A (p.V90E) mutasyonu olan bireylerde hsa-miR-627-5p’nin ilişkili olduğunu düşünüldü. hsa-miR-671-3p, sekans analizinde *AMT* mutasyonu olan bireylerde azalmıştı. Fakat RT-qPCR sonuçlarında gen ve mutasyon ile ilişkili anlamlı bir sonuç elde edilemedi.

hsa-miR-4503, biyoinformatik analizlerde NKH yolağı ile belirgin ilişkisi gösterilen diğer bir aday miRNA’ydı. Aynı şekilde sekans analizinde de hem *AMT* hem de *GLDC* homozigot mutasyonu olan NKH hastalarında istatistiksel olarak anlamlı azalma mevcuttu. RT-qPCR verilerinde de *GLDC* homozigot mutasyonu olan bireylerde istatistiksel olarak anlamlı azalma görüldü ($p < 0,05$). Bu aday miRNA’nın NKH ile kuvvetli derecede ilişkili olduğunu düşündürmektedir.

hsa-miR-4669, sekans analizinde kontrol grubunda ölçülemeyecek kadar düşük sonuç elde edildi. Sekans analizindeki ifade profilinin hasta ve heterozigot bireylerde kontrol grubuna göre azalmış olduğu görüldü. Fakat RT-qPCR verilerinde sonuçlar tam tersiydi. Hem sekans analizinde hem de sonuçlar istatistiksel olarak anlamlılık göstermesine rağmen sekans analizinde artmış ifade profili, RT-qPCR analizinde azalma yönünde anlamlılık mevcuttu. Çevresel koşulların etkisi ile uyumsuz sonuçların oluştuğu düşünüldü.

Çizelge 3.7 : NKH hastaların kontrol grubuna göre RT-qPCR $2^{-\Delta\Delta CT}$ verileri (Kontrol grubu 1 olarak kabul edilmiştir).

	P1	P2	P3	P4	P5
	Homozigot (<i>AMT</i> , c.631G>A, p.E211K)	Homozigot (<i>GLDC</i> , c.2237A>G, p.D746G)	Homozigot (<i>GLDC</i> , c.2714T>A, p.V90E)	Homozigot (<i>GLDC</i> , c.1382 G>A, p.R461Q)	Birleşik heterozigot (<i>AMT</i> , c.15_18delAAGT (p.S6Wfs*89), c.452_466delAAGATTTGGCCCTCA)
miR-133a	7,57	0,32	4,47	16,91	3,32
miR-152	17,51	0,02	0,04	1,47	127487,83
miR-219	1,44	2,27	1,57	163,14	44,02
miR-433	0,16	0,03	0,06	4,89	2,41
miR-504	0,99	0,18	0,02	18,90	2,81
miR-627	0,62	0,25	0,32	29,45	3,92
miR-671	0,65	0,10	0,02	18,90	3,10
miR-4503	0,16	0,00	0,00	0,54	0,30
miR-4669	0,80	0,00	0,06	0,01	0,24
miR- 4707	0,90	0,57	0,00	3,92	2,69
miR-5189	0,62	0,56	0,09	11,47	0,00
miR-N62	1,75	0,17	0,11	2,81	5,03
miR-N278	1,18	0,27	0,08	3,92	5,50
miR-N363	1,09	0,20	0,13	5,94	3,27
miR-N490	3,01	0,16	0,22	6,95	2,69
miR-N662	5,82	0,63	0,88	4,56	6,06

Çizelge 3.10 : NKH taşıyıcı bireylerde kontrol grubuna göre RT-qPCR $2^{-\Delta\Delta CT}$ verileri. (Kontrol grubu 1 olarak kabul edilmiştir.)

	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7
	<i>AMT</i> , c.452_466del AAGATTTGGCCCTCA	<i>GLDC</i> , c.2714T>A, p.V90E	<i>GLDC</i> , c.2640T>G, p.D880E	<i>GLDC</i> , c.1382G>A, p.R461Q	<i>GLDC</i> , c.1382G>A, p.R461Q	<i>AMT</i> , c.452_466del AAGATTTGGCCCTCA	<i>AMT</i> , c.15_18del AAGT, p. S6Wfs*89
miR-133a	5,94	0,05	1,57	69,07	3,53	0,54	0,14
miR-152	7,01	0,02	2,93	2,13	867,07	0,22	645474,24
miR-219	0,09	1,06	13,27	178,53	28,44	0,43	25,11
miR-433	1,84	0,28	1,16	13,55	23,92	0,31	0,76
miR-504	4,23	0,72	18,13	82,14	219,79	2,77	34598729248,15
miR-627	0,05	0,15	3,61	0,51	3,58	0,48	1,53
miR-671	2,79	0,20	1,06	8,82	2,16	0,34	0,93
miR-4503	0,00	0,03	34,30	1184,45	134,36	256,00	206,50
miR-4669	10,48	0,00	5,21	20,25	31,12	0,01	0,56
miR-4707	1,36	0,07	0,36	20,53	14,12	0,16	0,14
miR-5189	0,96	0,01	0,55	5,62	1,08	0,00	0,00
miR-N62	6,59	0,30	1,06	9,25	4,44	0,88	1,55
miR-N278	9,45	0,05	0,88	6,87	4,69	0,97	0,83
miR-N363	9,92	0,20	1,14	11,88	6,50	0,62	0,71
miR-N490	22,44	0,12	0,88	8,10	1,68	0,59	0,13
miR-N662	15,89	0,25	4,63	21,86	5,74	1,01	0,95

hsa-miR-4707-3p sekans analizinde bütün bireylerde azalma mevcuttu. P3'teki azalma istatistiksel olarak anlamlıydı. Aynı şekilde RT-qPCR verilerinde de aynı mutasyonu taşıyan P3 ve T2 bireylerde de belirgin azalmış ifade profili görüldü. *GLDC* c.2714T>A (p.V90E) mutasyonu olan bireylerde hsa-miR-4707-3p'nin ilişkili olduğu düşünüldü. hsa-miR-5189-3p, sekans analizinde bütün bireylerde azalma görüldü. *AMT* ve *GLDC* geninde heterozigot mutasyonu taşıyanlardaki azalmış ifade profili istatistiksel olarak anlamlıydı. Fakat RT-qPCR verilerinde anlamlı bir sonuç mevcut değildi.

miR novel_62, sekans analizinde *AMT* mutasyonu olan bireylerde belirgin azalma görüldü. Aynı şekilde *GLDC* homozigot bireylerde de azalmış ifade profili istatistiksel olarak anlamlıydı. Fakat azalma *AMT* ve *GLDC* mutasyonu olan bireylerde RT-qPCR ile gösterilemedi. novel_278 sekans analizinde *AMT* mutasyonlu bireylerde artmış ifade profili, *GLDC* mutasyonu olan bireylerde azalmıştı. P3 hastasında *GLDC* mutasyonunda novel_278 miktarı anlamlı biçimde azalmıştı. Aynı şekilde RT-qPCR'da da *GLDC* c.2714T>A (p.V90E) mutasyonu olan bireylerde hem sekans analizinde hem de RT-qPCR'da aynı sonuçlar elde edildi ve sonuçlar istatistiksel olarak anlamlıydı. Fakat diğer bireylerde korelasyon görülmedi. novel_363 sekans verisinde *AMT* mutasyonunda anlamlı farklılık mevcuttu fakat RT-qPCR'da korelasyon görülmedi. novel_480 sekans analizinde bütün bireylerde azalmış ifade profili mevcuttu. Fakat RT-qPCR analizinde korelasyon görülmedi. novel_662 sekans analizinde *AMT* mutasyonu olan bireylerde artmış ifade profili görüldü. Aynı sonuçlar RT-qPCR'da da görüldü fakat RT-qPCR analizinde korelasyon görülmedi (Çizelge 3.11). Çalışmamızda hsa-miR-4503 hem sekans analizinde, hem de PCR verilerinde *AMT* mutasyonu olan bütün bireylerde istatistiksel olarak anlamlı şekilde azaldı ve NKH hastalığı ile ilişkili bir miRNA olduğu düşünüldü. hsa-miR-627-5p, hsa-miR-4707-3p ve novel_278, hem sekans analizinde hem de RT-qPCR verilerinde *GLDC* c.2714T>A (p.V90E) mutasyonu olan bireylerde korelasyon göstermiştir. Bu üç miRNA'nın benzer sonuçlarının olması mutasyon spesifik bir etki olabilir. Aynı mutasyona sahip bireylerde çalışmaların tekrar edilmesi yol gösterici olacaktır.

Çalışmamızda hsa-miR-4503 hem sekans analizinde hem de PCR verilerinde *AMT* mutasyonu olan bütün bireylerde istatistiksel olarak anlamlı şekilde azalmış bulundu.

NKH hastalığı ile ilişkili bir miRNA olduğu düşünüldü. hsa-miR-627-5p, hsa-miR-4707-3p ve novel_278, hem sekans analizinde hem de RT-qPCR verilerinde GLDC c.2714T>A (p.V90E) mutasyonu olan bireylerde korelasyon göstermiştir. Bu 3 miRNA'nın benzer sonuçlarının olması mutasyon spesifik bir etki olabilir. Aynı mutasyona sahip bireylerde çalışmaların tekrar edilmesi yol gösterici olacaktır.

Kontrol grubunda $2^{-\Delta\Delta CT}$ analizi 1 olduğu için hasta ve heterozigot bireylerde, kontrol grubuna göre analiz edilen RT-qPCR $2^{-\Delta\Delta CT}$ verileri karşılaştırıldığında sonuçların değerlerinde anlamlı bir farklılık olmadığı görüldü (Çizelge 3.12).

miR-133a-3p ve miR-152-5p, *AMT* homozigot mutasyonu olan hastalarda artmış ifade profili olduğu görüldü. Aynı şekilde sekans analizinde de artış saptandı. *GLDC* homozigot mutasyonu olan hastalarda benzer sonuçlar yoktu. Fakat heterozigot olan bireylerde benzer uyum görülmedi. miR-219b-5p, bütün hastalarda artmıştı ve benzer sonuçlar sekans analizinde de mevcuttu. miR-433-3p, miR-504-5p, miR-627-5p, miR-671-3p ve miR-4707-3p sonuçlarında homozigot hastalar arasında anlamlı bir uyum yoktu. *AMT* ve *GLDC* homozigot mutasyonu olan hastaların P1, P2 ve P3'te azalmış, P4 ve P5'de artmış ifade profili görüldü.

miR-4503'de bütün homozigot hastalarda azalmış ifade profili dikkat çekti. Sekans analizinde de benzer sonuçlar mevcuttu ve kontrol grubuna göre karşılaştırıldığında miR-4503'de anlamlı farklılık gözlemlendi. miR-4503'ün NKH ile ilişkili bir miRNA olabileceği düşünüldü. miR-4669'da bütün hastalarda azalma görüldü fakat miR-4669 sekans analizinde artmış ifadesi dikkat çekti. miR-4669'un RT-qPCR ve sekans analizi verilerindeki farklılığı için daha geniş hasta grubu ile verilerin tekrarlanması gerektiği düşünülmektedir.

miR-4707-3p'nin *AMT* homozigot hastalarda azalmış ifade profili dikkat çekti, sekans analizinde de miR-4707-3p'nin azalmış ifadesi görülmektedir. Fakat RT-qPCR ve sekans analizi verileri uyumlu olmasına rağmen iki grup arasında istatistiksel bir farklılık mevcut değildi. *AMT* homozigot hastaların hepsinde miR-novel_62, miR-novel_278, miR-novel_363, miR-novel_480 ve miR-novel_662'da artmış ifade profili görüldü. Fakat *GLDC* mutasyonu olan hastalarda uyumlu bir sonuç yoktu, P2 ve P3'te azalma, P4'de artış görüldü. Heterozigot bireyler arasında da anlamlı bir korelasyon mevcut değildi.

Çizelge 3.11 : NKH hastaların ve taşıyıcı bireylerin RT-qPCR sonuçların ortalamaları ve standard deviyasyonları.

	P - GLDC		P - AMT		T - GLDC		T - AMT	
	Ortalama	STDEV	Ortalama	STDEV	Ortalama	STDEV	Ortalama	STDEV
miR-133a	7,23	8,64	5,44	3,01	18,55	33,71	2,21	3,24
miR-152	0,51	0,83	63752,67	90135,13	218,04	432,69	215160,49	372662,64
miR-219	55,66	93,08	22,73	30,10	55,33	82,89	8,54	14,35
miR-433	1,66	2,80	1,29	1,59	9,73	11,23	0,97	0,79
miR-504	6,36	10,85	1,90	1,29	80,19	99,43	11532909751,72	19975585643,02
miR-627	10,01	16,83	2,27	2,33	1,96	1,89	0,69	0,76
miR-671	6,34	10,88	1,87	1,73	3,06	3,92	1,35	1,28
miR-4503	0,18	0,31	0,23	0,10	338,28	566,98	154,17	135,78
miR-4669	0,02	0,03	0,52	0,40	14,15	14,21	3,68	5,90
miR- 4707	1,50	2,12	1,79	1,27	8,77	10,22	0,55	0,70
miR-5189	4,04	6,44	0,31	0,44	1,81	2,57	0,32	0,55
miR-N62	1,03	1,54	3,39	2,32	3,76	4,08	3,00	3,12
miR-N278	1,42	2,16	3,34	3,06	3,12	3,21	3,75	4,94
miR-N363	2,09	3,33	2,18	1,54	4,93	5,40	3,75	5,34
miR-N490	2,44	3,91	2,85	0,22	2,70	3,66	7,72	12,75
miR-N662	2,02	2,20	5,94	0,17	8,12	9,46	5,95	8,61

Çizelge 3.12 : NKH hastalarında sekans ve RT-qPCR sonuçları istatistiksel analiz değerleri.

miRNA	<i>AMT</i> geninde homozigot mutasyonu olan		<i>GLDC</i> geninde homozigot mutasyonu olan		
	P1- C1 sekans verisi, p değeri	<i>AMT</i> hasta-kontrol grup RT-qPCR, p değeri	P2- C1 sekans verisi, p değeri	P3- C1 sekans verisi, p değeri	<i>GLDC</i> hasta-kontrol grup RT-qPCR, p değeri
hsa-miR-133a-3p	0,96	0,59	<0,05	<0,05	0,12
hsa-miR-152-5p	0,99	-	0,11	<0,05	-
hsa-miR-219b-5p	0,99	0,43	0,65	0,66	0,85
hsa-miR-433-3p	0,99	0,38	0,19	<0,05	0,33
hsa-miR-504-5p	0,99	0,15	0,22	<0,05	0,48
hsa-miR-627-5p	0,80	0,87	0,20	<0,05	0,26
hsa-miR-671-3p	0,47	0,49	0,99	0,99	0,78
hsa-miR-4503	<0,05	<0,05	0,43	<0,05	<0,05
hsa-miR-4669	<0,05	0,13	<0,05	0,99	<0,05
hsa-miR-4707-3p	<0,05	0,78	0,56	<0,05	0,55
hsa-miR-5189-3p	0,99	0,44	0,52	0,14	0,74
miR_n_62	<0,05	0,48	<0,05	<0,05	0,76
miR_n_278	0,70	0,54	0,99	<0,05	0,98
miR_n_363	0,16	0,97	0,99	0,99	0,78
miR_n_480	0,48	0,71	0,47	0,48	0,71
miR_n_662	<0,05	0,21	0,58	0,18	0,22

NKH hastaları ve heterozigot bireylerde biyoinformatik analiz sonucu seçilen 16 miRNA'nın RT-qPCR ifade profilleri kontrol grubuna göre karşılaştırıldığında miR-152-5p'de P5 ve T7 de belirgin yükseklik dikkat çekti. Bunun nedeni miR-152-5p'nin RT-qPCR analizinde bütün bireylerde Ct değerinin hesaplanamamasına bağlıdır. miR-152-5p, P2, P3, P4 ve T6'da RT-qPCR 45. döngüye kadar ifade vermemiştir. Bu nedenle, diğer bireylerde ölçülen ifade profilleri ile karşılaştırıldığında oldukça yüksek olduğu görülmektedir. Sonuçlarımızda miR-152-5p primerinin tekrar tasarlanarak RT-qPCR analizinin tekrarlanması gerektiğini düşünülmektedir. Aynı şekilde miR-504-5p, T7'de diğer bireylere göre oldukça yüksek bir ifade profili vermiştir. Bu örneğin de T7 için tekrar analizinin yapılması gerektiğini düşünülmektedir. P5 ve T7'deki uç ifadeler dışlandığında hasta bireylerde miR-152-5p, miR-219b-5p, miR-504-5p, miR-627-5p ve miR-5189-3p'nin belirgin artmış ifade profili gösterdiği dikkat çekmiştir. Aynı şekilde heterozigot bireylerde miR-152-5p, miR-219b-5p, miR-504-5p ve miR-4503'ün belirgin şekilde yukarı yönde ifade profili gösterdiği dikkat çekmiştir.



4. TARTIŞMA

NKH, glisin parçalayıcı enzim sisteminde dört proteinden herhangi birinin (P, T, H ve L proteinleri) veya kofaktörlerin defekti ile oluşabilir. Bu enzimatik bozukluk OR geçiş gösteren bir genetik hastalıktır. Glisin, yıkım ürünlerine parçalanamazsa vücutta birikir ve toksik etkileri ortaya çıkar. NKH’de ilk bulgular genellikle doğumda ya da ilk haftalarda meydana gelir. Glisin’in inhibitör etkisi ile hipotoni, apne, hıçkırık atakları; eksitator etkisi ile nöbet, zihinsel gerilik ve çeşitli serebral disfonksiyon bulguları oluşur [139]. Neonatal formunda yaşamın ilk günlerinde uykuya meyil, miyokloniler, hıçkırık, dirençli konvülsiyonlar ve tekrarlayan apne atakları görülür. Araştırmamızda tüm hastalarımız semptomatiktir. Yaygın nörolojik bulgular, hipotoni, emmeme/zayıf beslenme, apne, uykuya meyil ve dirençli nöbetler mevcuttu. NKH, çeşitli nöbet tiplerinin (fokal nöbetler, miyoklonus, burst veya epileptik spazmlar gibi) kombinasyonu ile karakterize edilir [140]. Bu araştırma, Türkiye’de ve dünyada NKH hastalığında miRNA araştırması yapılan ilk çalışma olması nedeniyle NKH genetik etyolojisinin aydınlatılmasında önemli katkılar sunmaktadır. Prospektif nitelikte olan bu çalışmada, Sağlık Bilimleri Üniversitesi Ankara Dr. Sami Ulus Kadın Doğum, Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Eğitim-Araştırma Hastanesi, Çocuk Metabolizma Hastalıkları Ünitesi’ne başvuran ve hastanemizde servislerden konsülte edilen, izlemde klinik, biyokimyasal, radyolojik ve/veya moleküler genetik analiz ile NKH tanısı olan beş hasta incelendi. Klasik NKH genlerinden *GLDC*, *AMT* ve *GCSH* genlerine Sanger dizileme veya yeni nesil dizileme \pm ‘MLPA’ ile bakılmış olup, *GCSL* genine bakılmadı.

NKH, glisin yıkımında rol alan glisin parçalayıcı enzim kompleksi veya glisin yıkım sistemindeki enzim aktivite eksikliğine bağlı olarak gelişen OR geçişli bir doğumsal metabolik hastalıktır [1, 2]. Glisin yıkımında rol alan enzim bozukluğu sonucu klinik bulgular ortaya çıkar. NKH’de ilk bulgular genellikle doğumda ya da ilk haftalarda meydana gelir. Glisinin beyin sapı ve medulla spinaliste inhibitör etkisi ile hipotoni, apne, hıçkırık atakları; beyinde eksitator etkisi ile nöbet, zihinsel gerilik ve çeşitli

serebral disfonksiyon bulguları oluşur [4]. *GLDC* ve *AMT* genleri, biallelik patojenik varyantlar nedeniyle NKH'ye sebep olduğu bilinen iki gendir [141]. NKH hastalığında; klinik, laboratuvar ve radyolojik bulgulara sahip kişilerde şüphelenilmeli ve genetik analiz yöntemi ile tanısı doğrulanmalıdır. Özellikle dirençli nöbetleri olan ve yüksek plazma glisin seviyelerine sahip kişiler ve laboratuvar bulgularında, kantitatif aminoasit analizi plazma ve BOS'da eş zamanlı olarak izole edilmiş glisin seviyeleri kombinasyonu ve artmış bir BOS/plazma glisin oranı NKH olasılığını artırır, fakat doğrulayıcı test gerektirir. NKH'nin kesin tanısı, lenfositlerde ya da karaciğer biyopsi örneklerinde enzim aktivitesinin ölçümü ya da moleküler genetik analiz yöntemleri ile genetik değişikliğin saptanması ile konulur [15]. NKH'nin prognozunu değiştirecek uygun bir tedavi metodu henüz yoktur, mevcut tedavilerde vücutta glisin birikiminin önlenmesi ve atılması hedeflenmektedir.

miRNA'lar; kısa, 18-22 nükleotid uzunluğunda, endojen, protein kodlamayan ama kodlanacak proteinin mRNA düzeyinde ifadesine etki eden RNA molekülleridir. Hastalıkla ilişkili miRNA'ları ve ilgili hedeflerini belirlemek, hastalığa yeni moleküler bakış açısı sağlayarak yeni tedavi stratejilerin tasarlanmasını sağlar. miRNA'lar vücut sıvılarında stabil formda bulunurlar, bu da onları rutin klinik işleme ve analize uygun hale getirmekle birlikte yeni hastalık biyobelirteçleri olarak kullanımlarının ve tedaviye yanıtın yolunu açmıştır [142]. miRNA'lar, hedef mRNA'ları ile her canlıda yüksek oranda korunmuş tohum dizisi adı verilen 5' ucundaki 6-8 nükleotidlik bir bölge ile etkileşir [143]. miRNA hedeflediği mRNA'yı deadenile ederek mRNA'nın bozunmasına neden olur ve sitoplazmadaki mRNA miktarını azaltır. Hedefledikleri mRNA bölgelerinin 3' UTR bölgelerine bağlanarak mRNA'nın baskılanması veya parçalanmasına yol açarak, gen ifadelerinin post transkripsiyonel düzenleyicileri olarak fonksiyon gösterirler [144]. miRNA'lar hücrede çoğalma, farklılaşma, hücre ölümü ve metabolizma ile ilgili genlerin ifadesini düzenlediği için miRNA düzensizliğinin hücre fizyolojisi üzerinde ve dolayısıyla hastalıkların patofizyolojisinde mRNA hedeflerini susturarak etki ettiği bilinmektedir. Tek bir miRNA hücredeki tüm fonksiyonel ağları düzenleyerek kompleks fizyolojik veya hastalık fenotiplerini düzenleyebilmektedir [145]. miRNA ile ilgili yapılan pek çok çalışma kansere yöneliktir. miRNA genlerinin %50'den fazlası, kanserle ilişkili amplifikasyon, delesyon ve translokasyon bölgelerinde yer almaktadır. miRNA gibi

RNA hedefli tedavi ajanları mRNA moleküllerinin işlevlerini artırıp ya da azaltarak, bir mRNA'nın ifadesinde değişiklik yapar ve mRNA'nın hedefleri ile etkileşimini inhibe etmek için kullanılır. Son yıllarda yapılan çalışmalar ile miRNA'lar başta kanser olmak üzere pek çok hastalığın tanı ve tedavisinde etkili olarak kullanılmaktadır ve günümüzde yeni miRNA bazlı tedavi metotları giderek artmaktadır. FDA tarafından onay almış miRNA tedavi ajanı bulunmamaktadır, ancak faz çalışmaları devam etmekte olan miRNA bazlı tedavi ajanları bulunmaktadır. Kanser, viral enfeksiyon, nörodejeneratif hastalık, lipit bozukluğu gibi pek çok hastalıkta miRNA çalışmaları devam etmektedir [146]. Kalıtsal metabolik hastalık ve miRNA ilişkisi ile ilgili çalışmalar literatürde oldukça az sayıda olmasına rağmen son yıllarda sıklığında artış görülmektedir.

Literatürde NKH-mirna ilişkisini gösteren bir çalışma bulunmamaktadır, ancak miRNET veri tabanında hsa-miR-155'in NKH ile ilişkili olduğu bildirilmektedir. Ancak, bizim çalışmamızda hsa-miR-155 ve NKH arasında anlamlı bir korelasyon gösterilmemiştir. Aynı şekilde NKH hastalığı ile ilişkili olduğunu düşündüğümüz 11 miRNA'nın da daha önceki çalışmalarda NKH yolağına doğrudan etki ettiği belirtilmemiştir. Çalışmamızda belirtilen miRNA'ların çoğu literatürde kanser ile ilişkilendirilmiştir. En çok ilişkilendirilen kanserler santral sinir sistemi kanserleri ve hepatik kanserlerdir. Bu durum glisin gibi en küçük yapıdaki aminoasitin, kanser hastalarında artan ihtiyacını karşılaması için *AMT* ve *GLDC* genlerinin aşırı ifadesi ile ilişkili olabilir. Mukha ve ark. yaptıkları çalışmada, *GLDC* geninin aşırı ifadesi ve artmış glisin parçalayıcı enzim aktivitesi HCC ile ilişkilendirmiştir [147]. Aynı şekilde Kim ve ark. yaptıkları çalışmada glioma hücrelerinde *GLDC* ifadesinin arttığı belirtilmiştir. Hücre metabolizması için hayati öneme sahip olan glisin metabolizması aktivitesinin artışı kanser ile ilişkilendirilmiştir, fakat glisin metabolizmasındaki blok sonucu oluşan miRNA ifade farklılıkları daha önce literatürde gösterilmemiştir [148]. O nedenle çalışmamız öncü niteliktedir. Literatürde *AMT* ve *GLDC* genlerinde miRNA çalışmaları mevcuttur, fakat çalışmaların çoğu kanser gibi *AMT* ve *GLDC* genlerinin ifadelerinin arttığı durumlar ile ilişkilidir. Zhuang ve ark. yaptıkları çalışmada glisin dekarboksilazın otofajiyi indüklediği ve HCC'de miRNA-30d-5p tarafından azalma elde edildiğini göstermişlerdir. *GLDC*'nin miR-30d-5p'nin posttranskripsiyonel hedefi olduğu belirtilmiştir. *GLDC*'nin HCC ilerlemesini

baskılamak için miR-30d-5p ile azaltılmış otofajiyi artırmada önemli bir rol oynayabileceği belirtilmiştir [149]. Xie ve ark. yaptıkları çalışmada, miR-30e tarafından baskılanan *GLDC*, TNBC'de (triple negatif meme ca) hücre proliferasyonunu ve tümör immün infiltrasyonunu düzenlediğini göstermişlerdir. *GLDC*'nin aşırı ifadesi TNBC hücrelerinin proliferasyonunu kolaylaştırırken, *GLDC*'nin azaltılması proliferasyonunu önler ve ek olarak, miR-30e, *GLDC*'nin işlevsel bir artmış ifade profili olarak görev yapar ve miR-30e'nin hücre proliferasyonu üzerindeki inhibitör etkileri, *GLDC*'nin yeniden aktifleşmesini azaltmaktadır [150]. Chen ve ark. yaptıkları çalışmada, glisin miR-19a-3p/AMPK/GSK-3 β /HO-1 yolağı aracılığıyla iskemik inmeyi düzelttiği belirtilmiştir. miR-19a-3p ve AMPK glisin tedavisi sırasında sırasıyla azalmış ve artmıştır. AMPK'nın miR-19a-3p'nin hedef geni olduğu ve glisinin miR-19a-3p/AMPK/GSK-3 β /HO-1 yolağı aracılığıyla hücre apoptozunu, enflamatuvar yanıtı ve iskemik inmedeki glukoz metabolizması bozukluğunu iyileştirdiğini göstermiştir [151]. Wei ve ark. yaptıkları çalışmada, glisin dekarboksilaz enziminin akciğer kanserini uyarıcı etkisinin olduğu bildirilmiştir. ELISA kullanılarak, daha sonra takip sırasında akciğer kanseri teşhisi konulan 300 vaka ve 600 eşleştirilmiş sağlıklı kontrolde serum glisin dekarboksilaz enzimi düzeyleri ölçülmüş, sonuçlar serum glisin dekarboksilaz enziminin artmış akciğer kanseri riski ile ilişkili olduğunu ortaya koymuştur [odds oranı=1.48; %95 güven aralığı (1.01-2.04)]. Glisin dekarboksilaz enziminin aşırı ifadesi malign transformasyona katkıda bulunmuş ve normal insan bronş epitel hücrelerinde miRNA (miR)-29 ailesi ifadesini inhibe etmiştir. Yüksek serum glisin dekarboksilaz enzimi aktivitesinin akciğer kanseri riskini artırabileceği bildirilmiştir. *GLDC*, miR-29 ailesi ve DNMT sinyal yollarının akciğer kanseri gelişimi sırasında erken malign dönüşümde önemli bir rol oynayabileceği sonucuna varılmıştır [152]. Çalışmamızda yukarıda belirtilen miRNA'lar ve NKH hastaları arasında bir korelasyon gösterilmemiştir. Bu durumun sebebi hastalarımızda *AMT* ve *GLDC* genlerinin ifadesinde artış değil azalmanın olmuş olması olabilir. Bu farklılık farklı miRNA'ların profil değişikliğinin nedeni olabilir. Δ Ct değeri, hedeflenen gen ile normal gen arasındaki eşik değer miktarının farkını ifade eder. $\Delta\Delta$ Ct değeri ise, analiz edilen genin Ct değeri ile 'housekeeping gen' arasındaki farktan, normal gen ile housekeeping gen arasındaki farkın çıkarılarak hesaplanması ile elde edilir. Başka bir deyişle; Δ Ct değeri

sonuçları endojen kontrole göre normalize edilir, $\Delta\Delta C_t$ değeri sonuçları housekeeping gene göre normalize edilir. Normalizasyon gerçekleştirildikten sonra $2^{-\Delta\Delta C_t}$ değerleri hesaplanır ve gen ifadeleri gösterilir [153, 154]. Bu çalışmada, *AMT* ve *GLDC* genlerinin homozigot ve heterozigot varyantlarında çoklu miRNA'ların diferansiyel ifadesini analiz ettik ve ifade seviyelerini kontrol örnekleriyle karşılaştırdık. $2^{-\Delta\Delta C_t}$ değerleri, farklı genetik arka planlarda bu miRNA'ların artışı veya azalmasındaki ifade profili hakkında bilgi sağlar. Kantitatif PCR analizi sonucunda elde ettiğimiz verilerde, ilk 5 döngü ve 45. döngü sonrası dışlanarak değerlendirildi. Çünkü bu döngülerin özgül olmayan ışımalardan kaynaklanan yanlış pozitiflik verdiği bilinmektedir. Sekans verileri sonucu NKH ile ilişkili olduğunu düşündüğümüz 16 (11 bilinen ve beş novel miRNA) aday miRNA RT-qPCR ile doğrulandı. Sonuçta bir adet miRNA'nın (has-miR-4503) NKH ile yüksek oranda ilişkili miRNA olduğunu gösterdik.

Sonuçlarımız, farklı genetik varyantlar arasında miRNA ifadesinde önemli değişkenlik olduğunu ortaya koymuştur. Özellikle miR-133a, miR-152, miR-219, miR-433 ve miR-504, *GLDC* gen varyantlarında, özellikle homozigot c.1382 G>A (p.R461Q) ve heterozigot c.1382 G>A (p.R461Q) vakalarında önemli kat değişiklikleri sergilemiştir. Bu durum, bu miRNA'ların *GLDC* ile ilgili metabolik süreçlerle ilişkili yollarda düzenleyici bir rol oynayabileceğini düşündürmektedir. Ayrıca miR-4503, miR-4669 ve miR-4707, özellikle c.15_18delAAGT (p.S6Wfs*89) ve c.452_466delAAGATTTGGCCCTCA gibi *AMT* gen mutasyonlarında aşırı ifade dalgalanmaları göstermiştir. P5 ve T7'de (*AMT* gen delesyonları taşıyan) miR-152'nin artmış ifadesi, *AMT* gen disfonksiyonu ile ilgili olası bir telafi edici veya düzensiz yanıtı işaret etmektedir. Ayrıca, miR-627 ve miR-671'in ifadesi çoğu örnekte nispeten sabit kalmıştır, bu da bu miRNA'ların incelenen mutasyonlardan doğrudan etkilenemeyeceğini veya farklı düzenleyici mekanizmalar altında olabileceğini göstermektedir. Buna karşılık, miR-novel_490 ve miR-novel_662 belirli heterozigot *GLDC* varyantlarında (T4 ve T5) kayda değer bir artış göstererek alternatif telafi edici yollara potansiyel katılımı düşündürmüştür.

miRNA'larda değişen ifade profillerinin eski haline getirilmesi alternatif bir tedavi metodu oluşturmaktadır. *AMT* ve *GLDC* genlerinin ifadesinin azaldığı durumda değişen miRNA profillerinin bilinmesi hem NKH hem de kanser gibi *AMT* ve *GLDC* genlerinin ifadesinin arttığı durumlarda miRNA terapötikleri için önemlidir.

Çalışmamız *AMT* ve *GLDC* genlerinin ifadesinin azaldığı durumlarda değişen miRNA profillerini gösteren ilk çalışmadır. NKH’de belirgin bir genotip- fenotip ilişkisi bulunmadığından dolayı miRNA gibi bir modifiye edici faktörün etkisinin olabileceği düşünülmektedir.

NKH gibi metabolik blok sonucu toksik madde birikimi ile giden kalıtsal metabolik hastalıklarda erken tanı hayati önem taşımaktadır. Bu durum kalıtsal metabolik hastalıklarda, bize hastalığın erken tanısı için alternatif metodların geliştirilmesi gerektiğinin önemini vurgulamaktadır. miRNA’ların NKH gibi kalıtsal metabolik hastalıkların erken tanısı için daha spesifik ve daha hızlı bir biyobelirteç olarak kullanılabileceği düşünülmektedir. Dolaşımdaki miRNA’ların biyobelirteç olarak kullanımları sayesinde; hızlı müdahale için bir hastalığın erken evrelerini tespit etmek, böylece patolojiyi önlemek, iyileştirmek veya yavaşlatmak, benzer etiyojilere sahip patolojileri ayırt etmek, prognozu tahmin etmek ve tedaviye yanıtın izlenmesinde faydalı olacağı düşünülmektedir [155, 156]. Literatürde pek çok kalıtsal metabolik hastalık için miRNA çalışması yapılmış olmasına rağmen daha önce NKH-miRNA ilişkisini inceleyen bir araştırma bulunmamaktadır. Çalışmamız, NKH hastalarının miRNA profili hakkında bilgi sağlayarak gelecekteki karşılaştırmalı çalışmalar için bir temel oluşturabilir. NKH hastalarının, sağlıklı bireylere göre miRNA’larındaki farklılıkların mevcut durumunun araştırılması ve NKH hastalığı ile ilişkili miRNA’ların belirlenmesi, genotip-fenotip ilişkisi net olarak aydınlatılamamış bu hastalık için önemlidir. NKH’ye neden olan glisin parçalayıcı enzimdeki dört proteinden herhangi birindeki değişikliklerden kaynaklanan biyokimyasal patoloji iyi anlaşılmıştır, ancak literatürde henüz genotip-fenotip ilişkisi bulunmamaktadır.

Bir hücredeki genetik ifadedeki dalgalanmalar hücre fenotipinde etkilidir. Raj ve ark. yaptıkları çalışmada, *C. elegans* embriyolarında tek bir mRNA molekülündeki ifade değişikliğinin değişken fenotiplerin oluşmasını sağladığını göstermişlerdir. *end-1* mRNA miktarı, *elt-2* geninin aktive ya da inaktive olmasını belirler ve bu durum *C. Elegans*’da intestinal gelişimin tetikleyicisidir [157]. miRNA’ların mRNA’lar üzerindeki inhibitör etkisinin antagomiR’ler ile baskılanması ya da ortama ‘miRNA mimics’ler eklenerek inhibisyonun artırılması ortamdaki mRNA seviyesini düzenleyerek hücre fenotipine etki etmektedir. Bu yaklaşım, miRNA bazlı tedavi stratejilerinin ana mekanizmasıdır. Kanser, inflamatuvar hastalıklar gibi ‘gain of

function' kazanan ve sürekli ifade olan mRNA'ların antagomiR'ler ile baskılanması ve ortamda azalan belirli miRNA'ların yerine konulması bu hastalıklarda alternatif tedavi yöntemleridir. Çalışmamız literatürdeki ilk NKH-miRNA ilişkisini inceleyen çalışmadır. NKH hastalığı mortalitesi yüksek bir hastalıktır ve toplumda oldukça nadir görülmektedir. Bu yüzden çalışmaya dahil edilen hasta sayısı oldukça azdır. Hasta sayısının az olması sonuçların yanlış analizine neden olabilir ve çalışmanın güvenilirliğini etkileyebilir.





5. SONUÇ VE ÖNERİLER

NKH'de tedavi başarısı oldukça düşük olup, yeni çalışmalara ihtiyaç vardır. miRNA'lar alternatif bir tedavi yöntemi olabilir. Ayrıca gelecekteki çalışmalarda enzimatik, genetik temelli tedavi denemelerinin tartışılması gerekmektedir. Ülkemizde NKH insidansı ve prevalansı ile ilgili mevcut bilgi olmadığı görülmüştür. Bunun için yeni çalışmalara ihtiyaç vardır. Kalıtsal metabolik hastalıklar, bulgularını yenidoğan döneminden itibaren farklı yaşlarda göstermesi, klinik bulgularının oldukça farklı olması, özellikle santral sinir sistemi tutulumuna bağlı olan değişken klinik ve laboratuvar semptomlarının değerlendirilmesi bir çok aşamada; yenidoğan, metabolizma ve beslenme, nöroloji, fizik tedavi ve rehabilitasyon, çocuk genetik, çocuk ruh sağlığı, pediatri, gelişimsel pediatri ve diğer bir çok üniteler arasındaki etkileşim, bilgi paylaşımı, multidisipliner yaklaşım ve deneyim gerektirir. Bu hastalıkların erken tanı ve tedavisi için yenidoğan döneminden itibaren bütün yaş gruplarında metabolik hastalıklardan şüphe edilmesi gerekmektedir. Çalışmamız hem ülkemizde hem de dünyada kalıtsal metabolik hastalık-miRNA ilişkisini inceleyen sayılı çalışmalardandır. Ayrıca NKH-miRNA ilişkisini inceleyen ilk çalışmadır. Bu çalışma ile hsa-miR-4503'ün NKH ile ilişkili olduğu literatüre kazandırılmıştır.

Bu tez çalışması kapsamında elde edilen sonuçlar şu şekilde özetlenebilir:

- 1- *GLDC* ve *AMT* gen varyantlarında miRNA profil değişiklikleri: Çalışmamızda, *GLDC* ve *AMT* gen varyantlarına bağlı olarak belirgin miRNA profili değişiklikleri gözlemlenmiştir. Bu değişikliklerin, glisin metabolizmasıyla ilişkili metabolik süreçlerde düzenleyici bir rol oynayabileceği sonucuna varılmıştır.
- 2- *AMT* gen mutasyonlarında miRNA ifade dalgalanmaları: miR-4503, miR-4669 ve miR-4707 gibi miRNA'ların, *AMT* gen mutasyonları taşıyan örneklerde aşırı ifade dalgalanmaları gösterdiği tespit edilmiştir. Bu bulgular, söz konusu

miRNA'ların, mutasyonlar nedeniyle meydana gelen genetik değişikliklere yanıt olarak önemli bir rol oynayabileceğini düşündürmektedir.

- 3- miRNA'ların NKH hastalığının patofizyolojisindeki rolü: miRNA ifadesindeki değişikliklerin, NKH hastalığının patofizyolojisinde ve potansiyel tedavi yaklaşımlarında önemli biyobelirteçler olabileceği sonucuna varılmıştır.
- 4- Gen mutasyonları ile miRNA ilişkisi: *GLDC* gen varyantları (özellikle homozigot c.1382 G>A ve heterozigot c.1382 G>A) ile miRNA'lar arasında önemli değişiklikler gözlemlenmiştir. Bu miRNA'ların *GLDC* ile ilişkili metabolik süreçlerde düzenleyici bir rol oynayabileceği düşünülmektedir.
- 5- *AMT* gen disfonksiyonuna yanıt olarak miRNA ifadesindeki dalgalanmalar: *AMT* gen mutasyonlarında, özellikle miR-4503, miR-4669 ve miR-4707 gibi miRNA'ların ifadesinde belirgin değişiklikler gözlemlenmiştir. Bu miRNA'ların, *AMT* gen disfonksiyonuna karşı bir yanıt olarak düzenlenebileceği ve potansiyel olarak düzenleyici bir rol oynayabileceği öne sürülmektedir.
- 6- miR-152'nin *AMT* gen disfonksiyonuyla ilişkisi: P5 ve T7 örneklerinde, özellikle *AMT* gen delesyonları taşıyan hastalarda miR-152'nin yüksek oranda düzenlendiği gözlemlenmiştir. Bu durum, miR-152'nin *AMT* geninin işlevsizlik durumunda düzenleyici bir yanıt gösterdiğini düşündürülebilir.
- 7- Sabit ifade gösteren miRNA'lar: miR-627 ve miR-671 gibi bazı miRNA'ların ifadesinin çoğu örnekte nispeten sabit kaldığı tespit edilmiştir. Bu durum, bu miRNA'ların incelenen mutasyonlardan doğrudan etkilenmeyebileceğini veya farklı düzenleyici mekanizmalar altında çalışabileceğini göstermektedir.
- 8- Alternatif düzenleyici yolların rolü: miR-novel_490 ve miR-novel_662'nin özellikle heterozigot *GLDC* varyantlarında kayda değer bir artmış ifade profili gösterdiği gözlemlenmiştir. Bu durum, bu miRNA'ların alternatif düzenleyici yollara dahil olabileceğini ve *GLDC* geninin ifadesindeki azalmayı düzenleyebileceğini düşündürmektedir.

Bulgularımız *AMT* ve *GLDC* genlerindeki spesifik mutasyonlarla ilişkili farklı miRNA ifade profillerini vurgulamaktadır. Bu miRNA'ların hastalık patogenezi ve metabolik

düzensizlikteki kesin rollerini aydınlatmak için daha fazla fonksiyonel çalışma yapılması gerekmektedir. Gözlenen miRNA düzensizliği, hastalık şiddeti veya ilerlemesi için potansiyel biyobelirteçler olarak hizmet edebilir ve daha büyük kohortlarda daha fazla araştırmayı gerektirmektedir.

Artan teknoloji ve yeni tedavi olanakları sayesinde hastalara yeni gen tedavileri çalışmaları yapılabilmektedir. Çalışmamız yeni gen tedavilerinde kullanılan genin ürünü olan mRNA'nın vücutta parçalanmasını önleyerek kombine tedaviler için yol gösterici bir yaklaşım sunabilir. Ayrıca miRNA'lar başlıca kanser araştırmaları için öncü bir çalışma alanıdır. Birçok kanser çeşidinde artan genin ifadesini azaltmak için miRNA'ların tedavide kullanılabileceği vurgulanmaktadır. Örneğin *GLDC* geninin birçok akciğer kanserinde, beyin tümörlerinde ifadesinin arttığı bilinmektedir. Fakat literatürde *GLDC* geninin mutant formlarının değişen miRNA profilleri çalışılmamıştır. *GLDC* geninin mutant formlarında değişen miRNA ifade profilleri, *GLDC* geninin aşırı ifade edildiği kanser tedavisinde alternatif olabilecek yeni miRNA'ların belirlenmesinde öncü olabilir. Çalışmamız bu açıdan öncü bir çalışmadır.

Öneriler:

Çalışmamızda belirlediğimiz miRNA'ların ifadesindeki değişiklikler, NKH gibi kalıtsal metabolik hastalıkların tanısında ve tedavisinde kullanılabilir. Özellikle belirli miRNA'lar, hastalığın erken evrelerinde biyobelirteç olarak işlev görebilir ve hastalığın erken tespiti için yeni tanı yöntemlerinin geliştirilmesine olanak tanıyabilir. Bu, klinik uygulamalarda hastaların daha hızlı tanı almasını sağlayabilir ve tedavi sürecini başlatmada önemli bir rol oynayabilir.

Bir diğer öneri; miRNA-genetik hastalık ilişkilerinin derinlemesine incelenmesidir. miRNA'ların genetik varyantlar üzerindeki etkileri ve bu etkileşimlerin hastalığın klinik seyrine nasıl yansıdığı daha ayrıntılı bir şekilde incelenmelidir. Özellikle genetik varyantların miRNA ifade profilleri ile ilişkisi, genetik değişikliklerin hastalık üzerindeki etkisini anlamada yeni bir bakış açısı sağlayabilir. Bu, bireysel genetik farklılıkların hastalık sürecindeki rolünü daha iyi anlamamıza yardımcı olabilir.

Ayrıca; tedavide miRNA modülasyonu potansiyelinin keşfedilmesi önemlidir. Çalışmamız, miRNA'ların terapötik olarak modülasyonunun potansiyelini araştırmak

için yeni tedavi stratejileri sunabilir. Belirli miRNA'ların baskılanması veya arttırılması, hastalığa neden olan metabolik yolağı hedef alabilir ve tedavi edici bir etki yaratabilir. Özellikle *AMT* ve *GLDC* gen mutasyonlarıyla ilişkili miRNA'lar üzerinde yapılacak çalışmalar, bu yolda potansiyel terapötik hedeflerin belirlenmesine katkı sağlayabilir.

miRNA'ların diğer metabolik yollarla etkileşimi de ileri çalışmalarda araştırılabilir. Çalışmamızda glisin metabolizmasıyla ilişkilendirilen miRNA'ların yanı sıra, bu miRNA'ların diğer metabolik yollarla nasıl etkileşimde bulunduğu da araştırılmalıdır. Diğer genetik bozukluklarla ilişkili miRNA'lar belirlenerek, bu miRNA'ların farklı hastalıkların tedavisinde nasıl kullanılabileceğı keşfedilebilir. Bu, miRNA'ların genel biyolojik işlevlerini ve potansiyel terapi alanlarını genişletebilir.

miRNA ve genotip-fenotip ilişkisini daha detaylı incelemek de önemlidir. miRNA ifadesindeki değişiklikler ile genotip-fenotip ilişkisi daha derinlemesine incelenmelidir. miRNA'ların klinik bulgularla olan ilişkisini ve genetik varyantların klinik semptomları nasıl etkilediğini daha ayrıntılı bir şekilde incelemek, genetik hastalıkların daha iyi anlaşılmasına yardımcı olabilir. Bu çalışmalar, bireysel hastalar için özelleştirilmiş tedavi yaklaşımlarının geliştirilmesinde faydalı olabilir.

Ayrıca, hasta sayısının artırılması ve yeni miRNA analizlerinin yapılması gereklidir. Çalışmamızda elde ettiğimiz önemli miRNA'lar ve novel miRNA'lar üzerine daha geniş hasta gruplarında yapılan analizler, bulguların genelleştirilebilirliğini artıracaktır. İleriye dönük çalışmalarda hasta sayısının artırılması, daha güçlü ve güvenilir sonuçlar elde edilmesine olanak tanıyacaktır.

Son olarak, hücre kültürü çalışmaları ile miRNA'nın hastalığa etkisi incelenebilir. Çalışmamızda elde ettiğimiz en önemli miRNA (*hsa-miR-4503*) üzerine hücre kültürü çalışmaları yapılarak, bu miRNA'nın hastalığa etkisi incelenebilir. Bu çalışmalarda, miRNA'nın hücre düzeyinde nasıl bir rol oynadığını ve genetik mutasyonların etkisi altındaki hücrelerde nasıl bir düzenleme sağladığını araştırmak, hastalığın moleküler mekanizmalarını anlamamıza yardımcı olabilir. Ayrıca, bu çalışmalar miRNA modülasyonunun tedavi edici etkilerini değerlendirmek için bir temel oluşturabilir.

KAYNAKLAR

- [1] Swanson, M. A., Coughlin Jr, C. R., Scharer, G. H., Szerlong, H. J., Bjoraker, K. J., Spector, E. B., ... & Van Hove, J. L. (2015). Biochemical and molecular predictors for prognosis in nonketotic hyperglycinemia. *Annals of neurology*, 78(4), 606-618.
- [2] Applegarth, D. A., & Toone, J. R. (2001). Nonketotic hyperglycinemia (glycine encephalopathy): laboratory diagnosis. *Molecular genetics and metabolism*, 74(1-2), 139-146.
- [3] Tada, K., & Kure, S. (2005). Nonketotic hyperglycinemia: pathophysiological studies. *Proceedings of the Japan Academy, Series B*, 81(10), 411-417.
- [4] von Wendt, L., Similä, S., Saukkonen, A. L., & Koivisto, M. (1980). Failure of strychnine treatment during the neonatal period in three Finnish children with nonketotic hyperglycinemia. *Pediatrics*, 65(6), 1166-1169.
- [5] Tan, E. S., Wiley, V., Carpenter, K., & Wilcken, B. (2007). Non-ketotic hyperglycinemia is usually not detectable by tandem mass spectrometry newborn screening. *Molecular genetics and metabolism*, 90(4), 446-448.
- [6] Chiu, C. F., Lin, J. L., Lin, J. J., Tseng, M. H., Lo, F. S., & Chiang, M. C. (2016). Nonketotic hyperglycinemia of infants in Taiwan. *Pediatrics & Neonatology*, 57(5), 420-426.
- [7] Boneh, A., Korman, S. H., Sato, K., Kanno, J., Matsubara, Y., Lerer, I., ... & Kure, S. (2005). A single nucleotide substitution that abolishes the initiator methionine codon of the GLDC gene is prevalent among patients with glycine encephalopathy in Jerusalem. *Journal of human genetics*, 50(5), 230-234.
- [8] Aliefendioğlu, D., Coşkun, T., Dursun, A., Çakmak, F. N., & Kesimer, M. (2003). Transient nonketotic hyperglycinemia: two case reports and literature review. *Pediatric neurology*, 28(2), 151-155.
- [9] Kurolap, A., Armbruster, A., Hershkovitz, T., Hauf, K., Mory, A., Paperna, T., ... & Baris, H. N. (2016). Loss of glycine transporter 1 causes a subtype of glycine encephalopathy with arthrogyriposis and mildly elevated cerebrospinal fluid glycine. *The American Journal of Human Genetics*, 99(5), 1172-1180.
- [10] Van Hove, J. L., Hennermann, J. B., & Coughlin II, C. R. (2016). Nonketotic hyperglycinemia (glycine encephalopathy) and lipoate deficiency disorders. *Inborn Metabolic Diseases: Diagnosis and Treatment*, 349-356.
- [11] Ito, S. (2016). GABA and glycine in the developing brain. *The journal of physiological sciences*, 66(5), 375-379.
- [12] Beyoğlu, D., & Idle, J. R. (2012). The glycine deportation system and its pharmacological consequences. *Pharmacology & therapeutics*, 135(2), 151-167.
- [13] Newell, D. W., Barth, A., Ricciardi, T. N., & Malouf, A. T. (1997). Glycine causes increased excitability and neurotoxicity by activation of NMDA receptors in the hippocampus. *Experimental neurology*, 145(1), 235-244.

- [14] Tada, K., & Kure, S. (1993). Non-ketotic hyperglycinaemia: molecular lesion, diagnosis and pathophysiology. *Journal of inherited metabolic disease*, 16(4), 691-703.
- [15] Van Hove, J. L. K., Coughlin, C. II, & Swanson, M. (1993). Nonketotic hyperglycinemia. In Adam, M. P., Ardinger, H. H., Pagon, R. A., & Wallace, S. E. (Eds.), *GeneReviews®*. University of Washington, Seattle.
- [16] Stence, N. V., Fenton, L. Z., Levek, C., Tong, S., Coughlin, C. R., Hennermann, J. B., ... & Van Hove, J. L. (2019). Brain imaging in classic nonketotic hyperglycinemia: Quantitative analysis and relation to phenotype. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 42(3), 438-450.
- [17] Gabis, L., Parton, P., Roche, P., ... & Vezzani, A. (2001). In vivo ¹H magnetic resonance spectroscopic measurement of brain glycine levels in nonketotic hyperglycinemia. *Journal of Neuroimaging*, 11(2), 209-211.
- [18] Kure, S., Korman, S. H., Kanno, J., ... & Van Hove, J. L. (2006). Rapid diagnosis of glycine encephalopathy by ¹³C-glycine breath test. *Annals of Neurology*, 59(5), 862-867.
- [19] Dinopoulos, A., Matsubara, Y., & Kure, S. (2005). Atypical variants of nonketotic hyperglycinemia. *Molecular Genetics and Metabolism*, 86(1-2), 61-69.
- [20] Iqbal, M., Prasad, M., & Mordekar, S. R. (2015). Nonketotic hyperglycinemia case series. *Journal of Pediatric Neurosciences*, 10(4), 355-358.
- [21] Mourmans, J., Majoie, C., Barth, P., ... & Van Hove, J. L. (2006). Sequential MR imaging changes in nonketotic hyperglycinemia. *American Journal of Neuroradiology*, 27(1), 208-211.
- [22] Scriver, C. R. (2001). *The metabolic & molecular bases of inherited disease* (Vol. 4). McGraw-Hill.
- [23] Van Hove, J. L., Kishnani, P., Muenzer, J., ... & Coughlin, C. R. (1995). Benzoate therapy and carnitine deficiency in non-ketotic hyperglycinemia. *American Journal of Medical Genetics*, 59(4), 444-453.
- [24] Coşkun, T. (2003). Amino asit metabolizması ve bozuklukları (ss. 238-264). *Alp Ofset Matbaacılık*.
- [25] Hennermann, J. B., Berger, J.-M., Grieben, U., ... & Van Hove, J. L. (2012). Prediction of long-term outcome in glycine encephalopathy: A clinical survey. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 35(2), 253-261.
- [26] Tsuyusaki, Y., Shimbo, H., Wada, T., ... & Kure, S. (2012). Paradoxical increase in seizure frequency with valproate in nonketotic hyperglycinemia. *Brain and Development*, 34(1), 72-75.
- [27] Cusmai, R., Martinelli, D., Moavero, R., ... & Van Hove, J. L. (2012). Ketogenic diet in early myoclonic encephalopathy due to nonketotic hyperglycinemia. *European Journal of Paediatric Neurology*, 16(5), 509-513.
- [28] Ha, M., & Kim, V. N. (2014). Regulation of microRNA biogenesis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 15(8), 509-524.
- [29] Pasquinelli, A. E., ... & Ruvkun, G. (2000). Conservation of the sequence and temporal expression of let-7 heterochronic regulatory RNA. *Nature*, 408(6808), 86-89.
- [30] Chalfie, M., Horvitz, H. R., & Sulston, J. E. (1981). Mutations that lead to reiterations in the cell lineages of *C. elegans*. *Cell*, 24(1), 59-69.

- [31] Lee, R. C., Feinbaum, R. L., & Ambros, V. (1993). The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*, 75(5), 843-854.
- [32] Bartel, D. P. (2004). MicroRNAs: Genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*, 116(2), 281-297.
- [33] O'Brien, J., Hayder, H., Zayed, Y., & Peng, C. (2018). Overview of microRNA biogenesis, mechanisms of actions, and circulation. *Frontiers in Endocrinology*, 9, 402.
- [34] Ortega, M. A., Fraile-Martínez, O., Guijarro, L. G., ... & Martínez, R. (2020). The regulatory role of mitochondrial microRNAs (mitomirs) in breast cancer: Translational implications present and future. *Cancers*, 12(9), 2443.
- [35] Friedländer, M. R., ... & Meister, G. (2014). Evidence for the biogenesis of more than 1,000 novel human microRNAs. *Genome Biology*, 15(1), 1-17.
- [36] Croce, M. M., & Carlo, M. (2011). MicroRNAs: Master regulators as potential therapeutics in cancer. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 51, 25-43.
- [37] Matthias, S., ... & Groß, M. (2008). Widespread changes in protein synthesis induced by microRNAs. *Nature*, 455(7209), 58-63.
- [38] Bitesize Bio. (erişim :26 Ocak 2025). Mysterious miRNA: Identifying miRNAs and their targets. Retrieved from <https://bitesizebio.com/24926/mysterious-mirna-identifying-mirnas-and-their-targets/>
- [39] de Rie, D., Abugessaisa, I., Alam, T., ... & Kawaji, H. (2017). An integrated expression atlas of miRNAs and their promoters in human and mouse. *Nature Biotechnology*, 35(9), 872-878.
- [40] Raufi, A. G., May, M. S., Hadfield, M. J., ... & Patel, S. (2023). Advances in liquid biopsy technology and implications for pancreatic cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(6), 4238.
- [41] Bartel, D. P. (2009). MicroRNAs: Target recognition and regulatory functions. *Cell*, 136(2), 215-233.
- [42] Kozomara, A., Birgaoanu, M., & Griffiths-Jones, S. (2019). miRBase: From microRNA sequences to function. *Nucleic Acids Research*, 47(D1), D155-D162.
- [43] ENCODE Project Consortium. (2012). An integrated encyclopedia of DNA elements in the human genome. *Nature*, 489(7414), 57-74.
- [44] Costa Dos Santos, G. Jr, Renovato-Martins, M., & de Brito, N. M. (2021). The remodel of the "central dogma": A metabolomics interaction perspective. *Metabolomics*, 17(1), 48.
- [45] Vidigal, J. A., & Ventura, A. (2015). The biological functions of miRNAs: Lessons from in vivo studies. *Trends in Cell Biology*, 25(3), 137-147.
- [46] Baer, C., Claus, R., Frenzel, L. P., ... & Lichter, P. (2012). Extensive promoter DNA hypermethylation and hypomethylation is associated with aberrant microRNA expression in chronic lymphocytic leukemia. *Cancer Research*, 72(15), 3775-3785.
- [47] Grimson, A., Farh, K. K., Johnston, W. K., ... & Bartel, D. P. (2007). MicroRNA targeting specificity in mammals: Determinants beyond seed pairing. *Molecular Cell*, 27(1), 91-105.

- [48] Undi, R. B., Kandi, R., & Gutti, R. K. (2013). MicroRNAs as hematopoiesis regulators. *Advances in Hematology*, 2013, 695754.
- [49] Shang, R., Lee, S., Senavirathne, G., ... & Liu, Z. (2023). MicroRNAs in action: Biogenesis, function, and regulation. *Nature Reviews Genetics*, 24(9), 816-833.
- [50] Gebert, L. F. R., & MacRae, I. J. (2019). Regulation of microRNA function in animals. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 20(1), 21-37.
- [51] Winter, J., Jung, S., Keller, S., ... & Diederichs, S. (2009). Many roads to maturity: MicroRNA biogenesis pathways and their regulation. *Nature Cell Biology*, 11(2), 228-234.
- [52] Yang, J. S., & Lai, E. C. (2011). Alternative miRNA biogenesis pathways and the interpretation of core miRNA pathway mutants. *Molecular Cell*, 43(6), 892-903.
- [53] Bohnsack, M. T., Czapinski, K., & Gorlich, D. (2004). Exportin 5 is a RanGTP-dependent dsRNA-binding protein that mediates nuclear export of pre-miRNAs. *RNA*, 10(2), 185-191.
- [54] Macfarlane, L. A., & Murphy, P. R. (2010). MicroRNA: Biogenesis, function, and role in cancer. *Current Genomics*, 11(7), 537-561.
- [55] Baumberg, N., & Baulcombe, D. C. (2005). Arabidopsis ARGONAUTE1 is an RNA slicer that selectively recruits microRNAs and short interfering RNAs. *Proceedings of the National Academy of Sciences U S A*, 102(34), 11928-11933.
- [56] Lee, Y., Ahn, C., Han, J., ... & Kim, V. N. (2003). The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature*, 425(6956), 415-419.
- [57] Basyuk, E., Suavet, F., Doglio, A., Bordonné, R., & Bertrand, E. (2003). Human let-7 stem-loop precursors harbor features of RNase III cleavage products. *Nucleic Acids Research*, 31(22), 6593-6597.
- [58] Aukerman, M. J., & Sakai, H. (2003). Regulation of flowering time and floral organ identity by a MicroRNA and its APETALA2-like target genes. *Plant Cell*, 15(11), 2730-2741.
- [59] Vishnoi, A., & Rani, S. (2017). MiRNA biogenesis and regulation of diseases: An overview. *Methods in Molecular Biology*, 1509, 1-10.
- [60] Lingel, A., Simon, B., Izaurralde, E., & Sattler, M. (2003). Structure and nucleic-acid binding of the Drosophila Argonaute 2 PAZ domain. *Nature*, 426(6965), 465-469.
- [61] MacRae, I. J., & Doudna, J. A. (2007). Ribonuclease revisited: Structural insights into ribonuclease III family enzymes. *Current Opinion in Structural Biology*, 17(2), 138-145.
- [62] Schwarz, D. S., Hutvagner, G., Haley, B., & Zamore, P. D. (2002). Evidence that siRNAs function as guides, not primers, in the Drosophila and human RNAi pathways. *Molecular Cell*, 10(2), 537-548.
- [63] Cogswell, J. P., Ward, J., Taylor, I. A., Waters, M., Shi, Y., Cannon, B., ... & Law, P. (2008). Identification of miRNA changes in Alzheimer's disease brain and CSF yields putative biomarkers and insights into disease pathways. *Journal of Alzheimer's Disease*, 14(1), 27-41.
- [64] van Rooij, E. (2011). The art of microRNA research. *Circulation Research*, 108(2), 219-234.

- [65] Seyhan, A. A. (2015). MicroRNAs with different functions and roles in disease development and as potential biomarkers of diabetes: Progress and challenges. *Molecular Biosystems*, 11(5), 1217-1234.
- [66] Gareev, I., de Jesus Encarnacion Ramirez, M., Goncharov, E., ... & Lipatov, I. (2023). MiRNAs and lncRNAs in the regulation of innate immune signaling. *Noncoding RNA Research*, 8(4), 534-541.
- [67] Pauley, K. M., Cha, S., & Chan, E. K. (2009). MicroRNA in autoimmunity and autoimmune diseases. *Journal of Autoimmunity*, 32(3), 189-194.
- [68] Elfimova, N., Schlattjan, M., Sowa, J. P., ... & Boeck, S. (2012). Circulating microRNAs: Promising candidates serving as novel biomarkers of acute hepatitis. *Frontiers in Physiology*, 3, 476.
- [69] Nunez Lopez, Y. O., Coen, P. M., Goodpaster, B. H., ... & Binns, D. (2017). Gastric bypass surgery with exercise alters plasma microRNAs that predict improvements in cardiometabolic risk. *International Journal of Obesity (Lond)*, 41(8), 1121-1130.
- [70] Nunez Lopez, Y. O., Garufi, G., & Seyhan, A. A. (2016). Altered levels of circulating cytokines and microRNAs in lean and obese individuals with prediabetes and type 2 diabetes. *Molecular Biosystems*, 13(1), 106-121.
- [71] He, L., Thomson, J. M., Hemann, M. T., ... & Hannon, G. J. (2005). A microRNA polycistron as a potential human oncogene. *Nature*, 435(7043), 828-833.
- [72] Uhlmann, S., Mannsperger, H., Zhang, J. D., ... & Haibe-Kains, B. (2012). Global microRNA level regulation of EGFR-driven cell-cycle protein network in breast cancer. *Molecular Systems Biology*, 8, 570.
- [73] Saetrom, P., Heale, B. S., Snøve, O. Jr., ... & Aagaard, L. (2007). Distance constraints between microRNA target sites dictate efficacy and cooperativity. *Nucleic Acids Research*, 35(7), 2333-2342.
- [74] He, B., Zhao, Z., Cai, Q., ... & Liu, Y. (2020). MiRNA-based biomarkers, therapies, and resistance in cancer. *International Journal of Biological Sciences*, 16(14), 2628-2647.
- [75] Li, X., Wei, Y., & Wang, Z. (2018). MicroRNA-21 and hypertension. *Hypertension Research*, 41(8), 649-661.
- [76] Wu, Y., Li, Q., Zhang, R., Dai, X., Chen, W., & Xing, D. (2021). Circulating microRNAs: Biomarkers of disease. *Clinical Chimica Acta*, 516, 46-54.
- [77] Lynn, F. C. (2009). Meta-regulation: microRNA regulation of glucose and lipid metabolism. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 20(9), 452-459.
- [78] Mersey, B. D., Jin, P., & Danner, D. J. (2005). Human microRNA (miR29b) expression controls the amount of branched chain alpha-ketoacid dehydrogenase complex in a cell. *Human Molecular Genetics*, 14(21), 3371-3377.
- [79] Ozsait, B., Komurcu-Bayrak, E., Levula, M., ... & Göksel, A. (2010). Niemann-Pick type C fibroblasts have a distinct microRNA profile related to lipid metabolism and certain cellular components. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 403(3), 316-321.
- [80] Li, Y., Peng, T., Wang, X., ... & Zhang, Z. (2014). A Primary Study on Down-Regulated miR-9-1 and Its Biological Significances in Methylmalonic Acidemia. *Journal of Molecular Neuroscience*, 53(3), 280-286.

- [81] Karatas, O. F., Guzel, E., Karaca, E., ... & Yilmaz, S. (2013). MicroRNA profiling in lymphocytes and serum of tyrosinemia type-I patients. *Molecular Biology Reports*, 40(7), 4619-4623.
- [82] de Freitas, R. C. C., Bortolin, R. H., Borges, J. B., ... & Silva, F. A. (2023). LDLR and PCSK9 3'UTR variants and their putative effects on microRNA molecular interactions in familial hypercholesterolemia: A computational approach. *Molecular Biology Reports*, 50(9), 9165-9177.
- [83] Ray, K. K., Landmesser, U., Leiter, L. A., ... & Schwartz, G. G. (2017). Inclisiran in Patients at High Cardiovascular Risk with Elevated LDL Cholesterol. *The New England Journal of Medicine*, 376(15), 1430-1440.
- [84] Momtazi, A. A., Banach, M., Pirro, M., ... & Pistrosch, F. (2018). MicroRNAs: New Therapeutic Targets for Familial Hypercholesterolemia? *Clinical Reviews in Allergy & Immunology*, 54(2), 224-233.
- [85] Siebert, M., Westbroek, W., Chen, Y. C., ... & Desnick, R. J. (2014). Identification of miRNAs that modulate glucocerebrosidase activity in Gaucher disease cells. *RNA Biology*, 11(10), 1291-1300.
- [86] Guibinga, G. H., Hrustanovic, G., Bouic, K., ... & Peyron, J. (2012). MicroRNA-mediated dysregulation of neural developmental genes in HPRT deficiency: Clues for Lesch-Nyhan disease?. *Human Molecular Genetics*, 21(3), 609-622.
- [87] Resaz, R., Cangelosi, D., Morini, M., ... & Porcelli, P. (2020). Circulating exosomal microRNAs as potential biomarkers of hepatic injury and inflammation in a murine model of glycogen storage disease type 1a. *Disease Models & Mechanisms*, 13(8), dmm043364.
- [88] Chiu, L. Y., Kishnani, P. S., Chuang, T. P., ... & Watters, K. (2014). Identification of differentially expressed microRNAs in human hepatocellular adenoma associated with type I glycogen storage disease: A potential utility as biomarkers. *Journal of Gastroenterology*, 49(10), 1274-1284.
- [89] Frankel, L. B., Di Malta, C., Wen, J., ... & Saftig, P. (2014). A non-conserved miRNA regulates lysosomal function and impacts on a human lysosomal storage disorder. *Nature Communications*, 5, 5840.
- [90] Meseguer, S., Martínez-Zamora, A., García-Arumí, E., ... & Ayala, R. (2015). The ROS-sensitive microRNA-9/9* controls the expression of mitochondrial tRNA-modifying enzymes and is involved in the molecular mechanism of MELAS syndrome. *Human Molecular Genetics*, 24(1), 167-184.
- [91] Rivera-Barahona, A., Fulgencio-Covián, A., Pérez-Cerdá, C., ... & Sánchez, I. (2017). Dysregulated miRNAs and their pathogenic implications for the neurometabolic disease propionic acidemia. *Scientific Reports*, 7, 5727.
- [92] Aires, V., Delmas, D., Djouadi, F., ... & Schreiber, R. (2017). Resveratrol-induced changes in microRNA expression in primary human fibroblasts harboring carnitine-palmitoyl transferase-2 gene mutation, leading to fatty acid oxidation deficiency. *Molecules*, 23(7), 7.
- [93] Cammarata, G., Scalia, S., Colomba, P., ... & Russo, G. (2018). A pilot study of circulating microRNAs as potential biomarkers of Fabry disease. *Oncotarget*, 9(42), 27333-27345.
- [94] Morena, F., Oikonomou, V., Argentati, C., ... & Costa, R. (2019). Integrated computational analysis highlights unique miRNA signatures in the

- subventricular zone and striatum of GM2 gangliosidosis animal models. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(12), 3179.
- [95] Lin, Y., Wang, X., Rose, K. P., ... & Yanjun, Y. (2020). miR-143 regulates lysosomal enzyme transport across the blood-brain barrier and transforms CNS treatment for mucopolysaccharidosis type I. *Molecular Therapy*, 28(10), 2161-2176.
- [96] Qin, H., Hu, L. L., Wang, W. J., ... & Wang, Y. (2023). MiR-20b-5p involves in vascular aging induced by hyperhomocysteinemia. *Experimental Gerontology*, 184, 112330.
- [97] Bregalda, A., Carducci, C., Viscomi, M. T., ... & Amato, F. (2023). Myelin basic protein recovery during PKU mice lifespan and the potential role of microRNAs on its regulation. *Neurobiology of Disease*, 180, 106093.
- [98] Chen, P. S., Su, J. L., & Hung, M. C. (2012). Dysregulation of microRNAs in cancer. *Journal of Biomedical Science*, 19, 90.
- [99] Mercadal, M., Herrero, C., López-Rodrigo, O., ... & Esteve, A. (2020). Impact of extracellular vesicle isolation methods on downstream miRNA analysis in semen: A comparative study. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(17), 5949.
- [100] Silver, S. J., Hagen, J. W., Okamura, K., ... & Rubin, G. M. (2007). Functional screening identifies miR-315 as a potent activator of Wingless signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(46), 18151-18156.
- [101] Keller, A., & Meese, E. (2016). Can circulating miRNAs live up to the promise of being minimal invasive biomarkers in clinical settings?. *Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA*, 7(2), 148-156.
- [102] Diener, C., Keller, A., & Meese, E. (2022). Emerging concepts of miRNA therapeutics: From cells to clinic. *Trends in Genetics*, 38(6), 613-626.
- [103] Winkle, M., El-Daly, S. M., Fabbri, M., ... & Min, Y. (2021). Noncoding RNA therapeutics - challenges and potential solutions. *Nature Reviews Drug Discovery*, 20(9), 629-651.
- [104] Rupaimoole, R., & Slack, F. J. (2017). MicroRNA therapeutics: Towards a new era for the management of cancer and other diseases. *Nature Reviews Drug Discovery*, 16(4), 203-222.
- [105] Elmén, J., Lindow, M., Schütz, S., ... & Persson, M. (2008). LNA-mediated microRNA silencing in non-human primates. *Nature*, 452(7189), 896-899.
- [106] Elmén, J., Lindow, M., Silahatoglu, A., ... & Peters, C. (2008). Antagonism of microRNA-122 in mice by systemically administered LNA-antimiR leads to up-regulation of a large set of predicted target mRNAs in the liver. *Nucleic Acids Research*, 36(4), 1153-1162.
- [107] Gale, D. P., Gross, O., Wang, F., ... & van der Merwe, P. (2024). A randomized controlled clinical trial testing effects of lademirsen on kidney function decline in adults with Alport syndrome. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*, 19(6), 995-1004.
- [108] Kamel, A., Owen, T., Cole, I., ... & Hirst, A. (2023). Pharmacokinetics and absorption, distribution, metabolism and excretion of RGLS4326 in mouse and monkey, an anti-miR-17 oligonucleotide for the treatment of polycystic kidney disease. *Drug Metabolism and Disposition*, 51(9), 1536-1546.

- [109] Meijboom, K. E., & Brown, R. H. (2022). Approaches to gene modulation therapy for ALS. *Neurotherapeutics*, 19(4), 1159-1179.
- [110] Xia, X., Zhou, H., Huang, Y., & Xu, Z. (2006). Allele-specific RNAi selectively silences mutant SOD1 and achieves significant therapeutic benefit in vivo. *Neurobiology of Disease*, 23(3), 578-586.
- [111] Miniarikova, J., Zanella, I., Huseinovic, A., ... & Mancuso, R. (2016). Design, characterization, and lead selection of therapeutic miRNAs targeting huntingtin for development of gene therapy for Huntington's disease. *Molecular Therapy - Nucleic Acids*, 5, e297.
- [112] Samaranch, L., Blits, B., San Sebastián, W., ... & Mulder, A. (2017). MR-guided parenchymal delivery of adeno-associated viral vector serotype 5 in non-human primate brain. *Gene Therapy*, 24(4), 253-261.
- [113] Keskin, S., Brouwers, C. C., Sogorb-Gonzalez, M., ... & Waller, C. (2019). AAV5-miHTT lowers huntingtin mRNA and protein without off-target effects in patient-derived neuronal cultures and astrocytes. *Molecular Therapy - Methods & Clinical Development*, 15, 275-284.
- [114] Li, T., Liu, L., Zhu, K., ... & Yang, X. (2024). Biomimetic microRNAs-selenium-nanocomposites for targeted and combined hyperlipidemia therapy. *Advanced Healthcare Materials*, 13(1), e2400064.
- [115] Menon, A., Abd-Aziz, N., Khalid, K., ... & Ismail, A. (2022). miRNA: A promising therapeutic target in cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(22), 11502.
- [116] Hong, D. S., Kang, Y. K., Borad, M., ... & Kim, S. (2020). Phase 1 study of MRX34, a liposomal miR-34a mimic, in patients with advanced solid tumors. *British Journal of Cancer*, 122(11), 1630-1637.
- [117] Gallant-Behm, C. L., Piper, J., Lynch, J. M., ... & Hemmings, L. (2019). A microRNA-29 mimic (Remlarsen) represses extracellular matrix expression and fibroplasia in the skin. *Journal of Investigative Dermatology*, 139(5), 1073-1081.
- [118] Seto, A. G., Beatty, X., Lynch, J. M., ... & Law, G. (2018). Cobomarsen, an oligonucleotide inhibitor of miR-155, co-ordinately regulates multiple survival pathways to reduce cellular proliferation and survival in cutaneous T-cell lymphoma. *British Journal of Haematology*, 183(3), 428-444.
- [119] van Zandwijk, N., Pavlakis, N., Kao, S. C., ... & Fong, P. (2017). Safety and activity of microRNA-loaded minicells in patients with recurrent malignant pleural mesothelioma: A first-in-man, phase 1, open-label, dose-escalation study. *Lancet Oncology*, 18(10), 1386-1396.
- [120] Jeong, H. R., & Hwang, I. T. (2024). MicroRNAs as novel biomarkers for the diagnosis and treatment of pediatric diseases. *Clinical and Experimental Pediatrics*, 67(3), 119-125.
- [121] Huen, K., Lizarraga, D., Kogut, K., ... & Armenta, R. (2019). Age-related differences in miRNA expression in Mexican-American newborns and children. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 16(3), 524.
- [122] Dickinson, B., Zhang, Y., Petrick, J. S., ... & Liu, W. (2013). Lack of detectable oral bioavailability of plant microRNAs after feeding in mice. *Nature Biotechnology*, 31(10), 965-967.

- [123] Sullivan, C. S., & Ganem, D. (2005). MicroRNAs and viral infection. *Molecular Cell*, 20(1), 3-7.
- [124] Fu, Z., Wang, L., Li, S., ... & Lin, L. (2021). MicroRNA as an important target for anticancer drug development. *Frontiers in Pharmacology*, 12, 736323.
- [125] Michaud, M., Mauhin, W., Belmatoug, N., ... & Pelletier, J. (2020). When and how to diagnose Fabry disease in clinical practice. *American Journal of Medical Sciences*, 360(6), 641-649.
- [126] Martins, A. M. (1999). Inborn errors of metabolism: A clinical overview. *São Paulo Medical Journal*, 117(6), 251-265.
- [127] Tebani, A., Abily-Donval, L., Afonso, C., ... & Nogueira, C. (2016). Clinical Metabolomics: The new metabolic window for inborn errors of metabolism investigations in the post-genomic era. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(7), 1167.
- [128] Ferreira, C. R., & van Karnebeek, C. D. M. (2019). Inborn errors of metabolism. In *Handbook of Clinical Neurology*, 162, 449-481.
- [129] Arnold, G. L. (2018). Inborn errors of metabolism in the 21st century: Past to present. *Annals of Translational Medicine*, 6(4), 467.
- [130] Zhang, S., Cheng, Z., Wang, Y., ... & Liu, L. (2021). The risks of miRNA therapeutics: In a drug target perspective. *Drug Design, Development and Therapy*, 15, 721-733.
- [131] Langmead, B., Trapnell, C., Pop, M., ... & Salzberg, S. (2009). Ultrafast and memory-efficient alignment of short DNA sequences to the human genome. *Genome Biology*, 10, R25.
- [132] Friedländer, M. R., Chen, W., Adamidi, C., ... & Poy, M. (2008). Discovering microRNAs from deep sequencing data using miRDeep. *Nature Biotechnology*, 26(4), 407-415.
- [133] Enright, A. J., John, B., Gaul, U., ... & Sander, C. (2003). MicroRNA targets in *Drosophila*. *Genome Biology*, 5(1), R1.
- [134] Wen, M., Shen, Y., Shi, S., ... & Zhang, W. (2012). miREvo: An integrative microRNA evolutionary analysis platform for next-generation sequencing experiments. *BMC Bioinformatics*, 13, 140.
- [135] Zhou, L., Chen, J., Li, Z., ... & Liu, Y. (2010). Integrated profiling of microRNAs and mRNAs: MicroRNAs located on Xq27.3 associate with clear cell renal cell carcinoma. *PLoS One*, 5(12), e15224.
- [136] Bayrak, H., Yıldız, Y., Olgaç, A., ... & Özdemir, H. (2021). Genotypic and phenotypic features in Turkish patients with classic nonketotic hyperglycinemia. *Metabolic Brain Disease*, 36(6), 1213-1222.
- [137] Wang, J., Duncan, D., Shi, Z., ... & Zhang, B. (2013). WEB-based GENE SeT AnaLysis Toolkit (WebGestalt): Update 2013. *Nucleic Acids Research*, 41(W1), W77-W83.
- [138] Xiang, M., Zeng, Y., Yang, R., ... & Zhang, X. (2014). U6 is not a suitable endogenous control for the quantification of circulating microRNAs. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 454(2), 210-214.
- [139] Genç Sel, Ç., Kılıç, M., Yüksel, D., ... & Yalçın, S. (2018). Nonketotic hyperglycinemia: Clinical range and outcome of a rare neurometabolic disease in a single-center. *Brain and Development*, 40(11), 865-875.

- [140] Dulac, O. (2013). Epileptic encephalopathy with suppression-bursts and nonketotic hyperglycinemia. In *Handbook of Clinical Neurology*, 113, 1785-1797.
- [141] Baker, P. R., 2nd, Friederich, M. W., Swanson, M. A., ... & Nyhan, W. L. (2014). Variant nonketotic hyperglycinemia is caused by mutations in *LIAS*, *BOLA3*, and the novel gene *GLRX5*. *Brain*, 137(2), 366-379.
- [142] Seyhan, A. A. (2024). Trials and tribulations of microRNA therapeutics. *International Journal of Molecular Sciences*, 25(4), 1469.
- [143] Ameres, S. L., & Zamore, P. D. (2013). Diversifying microRNA sequence and function. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 14(7), 475-488.
- [144] Brümmer, A., & Hausser, J. (2014). MicroRNA binding sites in the coding region of mRNAs: Extending the repertoire of post-transcriptional gene regulation. *BioEssays*, 36(7), 617-626.
- [145] Sayed, D., & Abdellatif, M. (2011). MicroRNAs in development and disease. *Physiological Reviews*, 91(3), 827-887.
- [146] Kp, A., Kaliaperumal, K., & Sekar, D. (2024). MicroRNAs and their therapeutic strategy in phase I and phase II clinical trials. *Epigenomics*, 16(4), 259-271.
- [147] Mukha, D., Fokra, M., Feldman, A., ... & Singh, P. (2022). Glycine decarboxylase maintains mitochondrial protein lipoylation to support tumor growth. *Cell Metabolism*, 34(6), 775-782.e9.
- [148] Kim, D., Fiske, B. P., Birsoy, K., ... & Chandel, N. S. (2015). SHMT2 drives glioma cell survival in ischemia but imposes a dependence on glycine clearance. *Nature*, 520(7547), 363-367.
- [149] Zhuang, H., Wu, F., Wei, W., ... & Li, J. (2019). Glycine decarboxylase induces autophagy and is downregulated by miRNA-30d-5p in hepatocellular carcinoma. *Cell Death and Disease*, 10(1), 192.
- [150] Xie, H., Yan, T., Lu, X., ... & Tang, J. (2022). GLDC mitigated by miR-30e regulates cell proliferation and tumor immune infiltration in TNBC. *Frontiers in Immunology*, 13, 1033367.
- [151] Chen, Z. J., Zhao, X. S., Fan, T. P., ... & Chen, L. (2020). Glycine improves ischemic stroke through miR-19a-3p/AMPK/GSK-3 β /HO-1 pathway. *Drug Design, Development and Therapy*, 14, 2021-2031.
- [152] Wei, H. Y., Feng, R., Shao, H., ... & Li, Y. (2018). Serum glycine dehydrogenase is associated with increased risk of lung cancer and promotes malignant transformation by regulating DNA methyltransferases expression. *Molecular Medicine Reports*, 18(6), 2293-2299.
- [153] Rao, X., Huang, X., Zhou, Z., ... & Liu, Y. (2013). An improvement of the 2^{-delta delta CT} method for quantitative real-time polymerase chain reaction data analysis. *Biostatistics, Bioinformatics and Biomath*, 3(1), 71-85.
- [154] Lovén, J., Orlando, D. A., Sigova, A. A., ... & Lee, T. I. (2012). Revisiting global gene expression analysis. *Cell*, 151(2), 476-482.
- [155] de Planell-Saguer, M., & Rodicio, M. C. (2011). Analytical aspects of microRNA in diagnostics: A review. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 699(1), 134-152.
- [156] Yang, N., Ekanem, N. R., Sakyi, C. A., ... & Fagbohun, O. (2015). Hepatocellular carcinoma and microRNA: New perspectives on therapeutics and diagnostics. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 81, 62-74.

- [157] Raj, A., Rifkin, S. A., Andersen, E., ... & van Oudenaarden, A. (2010). Variability in gene expression underlies incomplete penetrance. *Nature*, 463(7283), 913-918.





EKLER

EK 1: Klinik Araştırma Etik Kurul Kararı



Şekil Ek.1 : Klinik araştırma etik kurul kararı.

KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARAR FORMU					
ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Nonketotik Hiperglisinemi Hastalarında Genotip-Fenotip Özelliklerinin Değerlendirilmesinde Etkin MikroRNA'ların Belirlenmesi				
VARSA ARAŞTIRMANIN PROTOKOL KODU	E-2022-64				
ETİK KURUL BİLGİLERİ	ETİK KURULUN ADI	YILDIRIM BEYAZIT UNİVERSİTESİ YENİMAHALLE EĞİTİM ARAŞTIRMA HASTANESİ KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU BAŞKANLIĞI			
	AÇIK ADRESİ:	Yeni Batı Mah. 2026. Cad. 2367. Sk. No. 4 Batıkent/ANKARA			
	TELEFON	0312 587 2000 /2067			
	FAKS	0312 587 3775			
	E-POSTA	Yenimahalleeah.etikkurul@gmail.com			
BAŞVURU BİLGİLERİ	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACI UNVANI/ADI/SOYADI	Prof. Dr. Mustafa KILIÇ			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ UZMANLIK ALANI	Çocuk Metabolizma Kliniği			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ BULUNDUĞU MERKEZ	Çok Merkezli (Dr. Sami Ulus Kadın Doğum, Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Eğitim ve Araştırma Hastanesi/ TOBB ETÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü Morfoloji Laboratuvarı)			
	VARSA İDARI SORUMLU UNVANI/ADI/SOYADI	-			
	DESTEKLEYİCİ	-			
	PROJE YÜRÜTÜCÜSÜ UNVANI/ADI/SOYADI (TÜBİTAK vb. gibi kaynaklardan destek alanlar için)	-			
	DESTEKLEYİCİNİN YASAL TEMSİLCİSİ	-			
	ARAŞTIRMANIN FAZİ VE TÜRÜ	FAZ 1	<input type="checkbox"/>		
		FAZ 2	<input type="checkbox"/>		
		FAZ 3	<input type="checkbox"/>		
FAZ 4		<input type="checkbox"/>			
Gözlemsel ilaç çalışması		<input type="checkbox"/>			
Tabii cihaz klinik çalışması		<input type="checkbox"/>			
In vitro tıbbi tanı cihazları ile yapılan performans değerlendirme çalışmaları		<input type="checkbox"/>			
İlaç dışı klinik araştırma		<input checked="" type="checkbox"/>			
Diğer ise belirtiniz: Gözlemsel					
ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	TEK MERKEZ <input type="checkbox"/>	ÇOK MERKEZLİ <input checked="" type="checkbox"/>	ULUSAL <input type="checkbox"/>	ULUSLARARASI <input type="checkbox"/>	

Etik Kurul Başkanı
Prof. Dr. Tuba DAL

Şekil Ek.1 (devam) : Klinik araştırma etik kurul kararı.

KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARAR FORMU

ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Nonketotik Hiperglisinemi Hastalarında Genotip-Fenotip Özelliklerinin Değerlendirilmesinde Etkin MikroRNA'ların Belirlenmesi
VARSA ARAŞTIRMANIN PROTOKOL KODU	E-2022-64

DEĞERLENDİRİLEN BELGELER	Belge Adı	Tarihi	Versiyon Numarası	Dili
	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ			Türkçe <input type="checkbox"/> İngilizce <input type="checkbox"/> Diğer <input type="checkbox"/>
	BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU			Türkçe <input type="checkbox"/> İngilizce <input type="checkbox"/> Diğer <input type="checkbox"/>
	OLGU RAPOR FORMU			Türkçe <input type="checkbox"/> İngilizce <input type="checkbox"/> Diğer <input type="checkbox"/>
	ARAŞTIRMA BROŞÜRÜ			Türkçe <input type="checkbox"/> İngilizce <input type="checkbox"/> Diğer <input type="checkbox"/>
DEĞERLENDİRİLEN DİĞER BELGELER	Belge Adı			Açıklama
	SİGORTA	<input type="checkbox"/>		
	ARAŞTIRMA BÜTÇESİ	<input type="checkbox"/>		
	BİYOLOJİK MATERYEL TRANSFER FORMU	<input type="checkbox"/>		
	İLAN	<input type="checkbox"/>		
	YILLIK BİLDİRİM	<input type="checkbox"/>		
	SONUÇ RAPORU	<input type="checkbox"/>		
	GÜVENLİLİK BİLDİRMELERİ	<input type="checkbox"/>		
DİĞER:	<input type="checkbox"/>			
KARAR BİLGİLERİ	Karar No: E-2022-64	Tarih: 18.01.2023		
	Yukarıda bilgileri verilen başvuru dosyası ile ilgili belgeler araştırmanın/çalışmanın gerekece, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş ve uygun bulunmuş olup araştırmanın/çalışmanın başvuru dosyasında belirtilen merkezlerde gerçekleştirilmesinde etik ve bilimsel sakınca bulunmadığına toplantıya katılan etik kurul üye tam sayısının salt çoğunluğu ile karar verilmiştir. İlaç ve Biyolojik Ürünlerin Klinik Araştırmaları Hakkında Yönetmelik kapsamında yer alan araştırmalar/çalışmalar için Türkiye İlaç ve Tıbbi Cihaz Kurumu'ndan izin alınması gerekmektedir.			

Etik Kurul Başkanı
Prof. Dr. Tuba DAL

Şekil Ek.1 (devam) : Klinik araştırma etik kurul kararı.

KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARAR FORMU	
ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Nonketotik Hiperglisitemi Hastalarında Genotip-Fenotip Özelliklerinin Değerlendirilmesinde Etkin MikroRNA'ların Belirlenmesi
VARSA ARAŞTIRMANIN PROTOKOL KODU	E-2022-64

KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU	
ETİK KURULUN ÇALIŞMA ESASI	İlaç ve Biyolojik Ürünlerin Klinik Araştırmaları Hakkında Yönetmelik, İyi Klinik Uygulamaları Kılavuzu
BAŞKANIN UNVANI / ADI / SOYADI:	Prof. Dr. Tuba DAL

	Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyet		Araştırma ile ilişkisi		Katılım *		İmza
				E	K	E	H	E	H	
1	Prof. Dr. Tuba DAL	Mikrobiyoloji	Ankara Yıldırım Beyazıt Üniversitesi Tıp Fak.	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
2	Prof. Dr. Nilgün ALTUNTAŞ	Çocuk Sağ. Ve Hast.	Ankara Yıldırım Beyazıt Üniversitesi Ankara Şehir Hastanesi	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
3	Dr.Phil. Deniz UZUN	Farmakoloji	Ankara İl Sağlık Müdürlüğü İlaç ve Tıbbi Cihazlar Başkanlığı	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
4	Dr. Öğr. Üyesi Egemen ÜNAL	Halk Sağlığı	Ankara Yıldırım Beyazıt Üniversitesi Tıp Fak.	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
5	Doç. Dr. Selma Tural HESAPÇIOĞLU	Çocuk Psikiyatrisi	Yüksek Öğretim Kurulu Engelli Komisyonu Üyesi	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
6	Doç. Dr. Mustafa AKKAYA	Ortopedi	Ankara Yıldırım Beyazıt Üniversitesi Ankara Şehir Hastanesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
7	Doç. Dr. Alper SARI	Romatoloji	Sağlık Bakanlığı	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
8	Doç. Dr. Gülsüm İnel BAYHAN.	Çocuk Sağ. Ve Hast.	Ankara Yıldırım Beyazıt Üniversitesi Ankara Şehir Hastanesi	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
9	Uzm. Dr. Semiha SOLAK GRASSIE	Enfeksiyon Hast. Ve Klinik Mikrobiyoloji	Yıldırım Beyazıt Üniversitesi Yenimahalle EAH	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
10	Müh. Fatma İNAL	Biyomedikal Mühendisi	Yıldırım Beyazıt Üniversitesi Yenimahalle EAH	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
11	Tayfun ÜNAL	Müdür Yrd	Celal Yarımcı Anadolu Lisesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
12	Sergin CAN	Stajyer Avukat	Ankara 2 Nolu Baro	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	

Etik Kurul Başkanı
Prof. Dr. Tuba DAL

