



T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ-CERRAHPAŞA
CERRAHPAŞA TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ FARMAKOLOJİ ANABİLİM DALI



**NAİVE VE FARKLI EVRELERDEKİ HIV HASTALARINDA BİYOİNFORMATİK
ANALİZ SONUCU ELDE EDİLEN MİRNALARIN EKSPRESYONUNUN
ANTİRETROVİRAL TEDAVİ ÜZERİNE ETKİSİ: ART-MİRNA**

TIBBİ FARMAKOLOJİ UZMANLIK TEZİ
Dr. HAKTAN SÖNMEZ

TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. ÖNER SÜZER

İSTANBUL – 2023

T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ-CERRAHPAŞA
CERRAHPAŞA TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ FARMAKOLOJİ ANABİLİM DALI

NAİVE VE FARKLI EVRELERDEKİ HIV HASTALARINDA BİYOİNFORMATİK
ANALİZ SONUCU ELDE EDİLEN MİRNALARIN EKSPRESYONUNUN
ANTİRETROVİRAL TEDAVİ ÜZERİNE ETKİSİ: ART-MİRNA

TIBBİ FARMAKOLOJİ UZMANLIK TEZİ
Dr. HAKTAN SÖNMEZ

TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. ÖNER SÜZER

İSTANBUL – 2023

ÖNSÖZ

Uzmanlık eğitimim süresince bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım, her zaman desteğini hissettiğim, tez hazırlamamda yol gösteren değerli hocam Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı Başkanı Prof.Dr.Öner Süzer'e

Uzmanlık eğitimim süresince bana destek olan, bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım çok değerli hocam Prof. Dr. Sibel Özyazgan'a

Tez hazırlama sürecimde ve deneylerin her aşamasında bana yardımlarıyla destekte bulunan Doktor Öğretim Üyesi Sayın Andleeb Shahzadi'ye

Kendileriyle çalışmaktan büyük onur ve mutluluk duyduğum, tüm asistan arkadaşlarıma, aile ortamında çalışmamızı sağlayan anabilim dalımızın saygıdeğer üyeleri Esma Bilmez ve Necmi Türker'e

Hayatımın her aşamasında yanımda duran sevgili annem ve babama

Her anımda bulunarak bana destek veren eşime, bu keyifli yol arkadaşlığı ve varlığı için

Sonsuz teşekkürler...

Dr. Haktan Sönmez

İstanbul, 2023

İÇİNDEKİLER

SİMGE VE KISALTMALAR	i
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xiii
TABLOLAR DİZİNİ	xiv
ETİK KURUL ONAYI.....	xv
TEZ FİNANSAL DESTEK BİLDİRİMİ.....	xvii
ÖZET.....	xviii
ABSTRACT.....	xx
1.GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	6
2.1. MiRNA.....	6
2.1.1 Tanım	6
2.1.2 miRNA Klinik Kullanım Alanları.....	8
2.2 Retrovirüsler.....	17
2.2.1 Human Immunodeficiency Virüs.....	17
2.2.2. Bulaş Yolu.....	19
2.2.3. Bölgesel Dağılım.....	19
2.2.4. Enfeksiyon Progresyonu	20
2.2.5 Enfeksiyondan Korunma.....	21
2.2.6. Tedavi.....	22
3. GEREÇ VE YÖNTEMLER.....	28
3.1. Biyoinformatik Analiz	28
3.1.1. Etkileşim ağları	28
3.1.2. Doku Ekspresyon analizi	30
3.1.3. Etkileşim ağı analizi.....	30
3.1.4 Enrichment analizi	30
3.1.5. miRNA tahminleri.....	31
3.2. Olgu seçimi	32
3.2.1 Örnek alımı.....	33
3.3 MiRNA sonuçlarının validasyonu.....	34
3.4 Kan Örneği Toplama.....	34
3.4.1 Plazma İzolasyonu	35
3.5 RNA İzolasyonu.....	35
3.5.1 Örnek Hazırlanması	35

3.6 miRNA cDNA Sentezi	36
3.6.1. Poli(A) kuyruk reaksiyonu	37
3.6.2 Adaptör ligasyon reaksiyonu	38
3.6.3 Revers transkripsiyon (RT) reaksiyonu	39
3.7 miR-Amp reaksiyonu	40
3.8 TaqMan® Fast Advanced Master Mix	40
3.9. qRT-PCR	41
3.10. İstatistiksel Analiz	42
4. BULGULAR	43
4.1. Hastaların Sosyo-Demografik Özellikleri	43
4.2. HIV Hastalığı ile En Yüksek Düzeyde Etkileşen MiRNA'ların Belirlenmesi	43
4.3. En Güçlü İlişkiye Sahip MiRNA Hedeflerinin Enrichment Analizi: Hsa-miR-27a-3p ve Hsa-miR-548c-3p	44
4.4. RT-qPCR ile Seçilen MiRNA'ların Validasyonu	55
5. TARTIŞMA	62
6. SONUÇ	68
7. KAYNAKLAR	70
8. EKLER	78
9. ÖZGEÇMİŞ	80
10. İNTİHAL RAPORU	82

SİMGE VE KISALTMALAR

3' UTR: 3' Untranslated Bölgesi

AIDS: Edinsel Bağışıklık Yetmezliği Sendromu

ART: Antiretroviral tedavi

AZT: Zidovudin

CMV: Sitomegalovirüs

HAART: Highly Active Antiretroviral Therapy/Yüksek Derece Aktif Antiretroviral Tedavi

HBV: Hepatit B virüsü

HCV: Hepatit C virüsü

HIV: İnsan İmmün Yetmezlik Virüsü

LAT: Gecikme İle İlişkili Transkript

MiRNA: MikroRNA

MSS: Merkezi Sinir Sistemi

NNRTI: Nonnükleosid Revers Transkriptaz İnhibitörleri

NRTI: Nükleosid Revers Transkriptaz İnhibitör

PAZ: Piwi-Argonaute-Zwille

PBMC: Periferik Mononükleer Kan Hücreleri

PI: Proteaz İnhibitörleri

PPI: Protein-Protein İnterraction

RISC: RNA-İnduced Silencing Kompleksi

RT: Revers Transkripsiyon

rtPCR: Real Time Polimeraz Zincir Reksiyonu

Th17: T helper 17

TLR: Toll Benzeri Reseptör

UNAIDS: Birleşmiş Milletler HIV/AIDS Ortak Programı

WHO: Dünya Sağlık Örgütü

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1 MiRNA'ların üretilme süreci	7
Şekil 2.2 MiRNA'ların merkezi sinir sistemi üzerine etkisi.....	9
Şekil 2.3 MiRNA'ların kardiyak morfogenezin regülasyonunda rolü	10
Şekil 2.4 Kanserde miRNA disregülasyonu.....	12
Şekil 2.5 HIV-1 genomu ve virion yapısı.	18
Şekil 3.1 Biyoinformatik analiz özet şeması.....	32
Şekil 3.2 Çalışmanın metodolojik adımları.....	42
Şekil 4.1 KEGG_2021 ve Bioplanet_2019 veritabanları ile yapılan analiz.....	45
Şekil 4.2 Jensen_diseases ve Disgenet veritabanları ile yapılan analiz	47
Şekil 4.3 hsa-miR-27a-3p ve hsa-miR-548c-3p'nin farklı doku ve hücrelerle ilişkisi.	48
Şekil 4.4 hsa-miR-27a-3p ve hsa-miR-548c-3p'nin biyolojik sistemler ve hücresel yollarla ilişkisi.	49
Şekil 4.5 hsa-miR-27a-3p ve hsa-miR-548c-3p'nin çeşitli hücre belirteçleri ile ilişkisi.	50
Şekil 4.6 Elsevier Pathway Collection kullanılarak hsa-miR-27a-3p ve hsa-miR-548c-3p'nin hastalıklarla ilişkili çeşitli proteinlerle ilişkisi.	51
Şekil 4.7 GWAS Catalog 2019 kullanılarak hsa-miR-27a-3p ve hsa-miR-548c-3p'nin hastalıklarla ilişkisi.....	52
Şekil 4.8 UK Biobank GWAS v1 kullanılarak hsa-miR-27a-3p ve hsa-miR-548c-3p'nin çeşitli hücre sayımlarıyla ilişkisi.	53
Şekil 4.9 Etkileşim ağı analizi.....	54
Şekil 4.10 Enrichment sonrası genlerin sayısı ile ilişki verisinin görselleştirilmesi..	55
Şekil 4.11 Çalışma gruplarında Hsa-miR27a-3p'nin RealTime qPCR verileri ile karşılaştırılması	55
Şekil 4.12 Antiretroviral tedavi öncesi naive hasta grubunda hsa-miR27a-3p ile viral RNA kopya sayısı korelasyonu	56
Şekil 4.13 Antiretroviral tedavi sonrası hasta grubunda hsa-miR27a-3p ile viral RNA kopya sayısı korelasyonu	57
Şekil 4.14 Antiretroviral tedavi öncesi naive hasta grubunda hsa-miR27a-3p ile CD4+ sayısı korelasyonu	57
Şekil 4.15 Antiretroviral tedavi sonrası hasta grubunda hsa-miR27a-3p ile CD4+ sayısı korelasyonu	58
Şekil 4.16 Çalışma gruplarında hsa-miR548c-3p'nin RealTime qPCR verileri ile karşılaştırılması	58
Şekil 4.17 Antiretroviral tedavi öncesi naive hasta grubunda hsa-miR548c-3p ile viral RNA kopya korelasyonu.....	59
Şekil 4.18 Antiretroviral tedavi sonrası hasta grubunda hsa-miR548c-3p ile viral RNA kopya korelasyonu	60
Şekil 4.19 Antiretroviral tedavi öncesi naive hasta grubunda hsa-miR548c-3p ile CD4+ sayısı korelasyonu	60
Şekil 4.20 Antiretroviral tedavi sonrası hasta grubunda hsa-miR548c-3p ile CD4+ sayısı korelasyonu	61

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 3.1 Gene Ontology prosesleri ilgili gen listeleri	29
Tablo 3.2 Çalışma grupları ve kan örnekleme protokolü.....	33
Tablo 3.3. Çalışma sırasında kullanılan cihazlar	34
Tablo 3.4 Çalışma sırasında kullanılan sarf malzemeler	34
Tablo 3.5 Çalışma sırasında kullanılan malzemelerin saklanma koşulları	36
Tablo 3.6 Poli(A) Reaksiyon Karışımı.....	37
Tablo 3.7 Termal döngü cihazındaki işlemin adımları	38
Tablo 3.8 Adaptör Ligasyon reaksiyon karışım içeriği.....	38
Tablo 3.9 Termal döngü cihazındaki işlemin adımları	38
Tablo 3.10 Termal döngü cihazındaki işlemin adımları	40
Tablo 3.11 Çalışma sırasında kullandığımız miRNA'ların primer dizileri	41
Tablo 3.12 Termal döngü adımları.....	41
Tablo 4.1 Çalışmaya dahil edilen hastaların sosyo-demografik verileri.....	43
Tablo 4.2 HIV ile etkileşime giren en güçlü miRNA'ların sıralanmış listesi.	44

TEZ FİNANSAL DESTEK BİLDİRİMİ

Bu tez çalışması İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa Rektörlüğü Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje numarası: TTU-2021-36084 Proje başlama tarihi: 06.12.2021



ÖZET

Naif ve farklı evrelerdeki HIV hastalarında biyoinformatik analiz sonucu elde edilen miRNAların ekspresyonunun antiretroviral tedavi üzerine etkisi: ART-miRNA.

Amaç: Yıllar boyunca, HIV/AIDS (İnsan immün yetmezlik virüsü/Edinsel bağışıklık yetmezliği sendromu) üzerine yapılan araştırmalar yüksek derece aktif antiretroviral tedavinin kullanıma girmesiyle hızlı bir gelişim göstermiştir. Bu ilerlemelere rağmen, HIV progresyonunun her açıdan değerlendirilmesi ile ilgili temel boşluklar devam etmektedir. Dolaşımdaki miRNA'lar son zamanlarda bulaşıcı hastalıklar için umut verici biyobelirteçler olarak kullanılmaktadır. Moleküler yollardaki potansiyel düzenleyici rolleri nedeniyle miRNA'lar, HIV gibi hastalıkların teşhis ve tedavisinde yeni adaylar arasındadır. Mirna keşfi, yapısının analizi, hedef tahminleri, diğer biyolojik süreçlerle ilişkisini içeren ve bu amaçlarla geliştirilen biyoinformatik araçlar ile hedeflediğimiz hasta grubunda prediktif olarak yaptığımız analizler valide edilecektir. Bu çalışma, naive HIV hastalarında tanısal ve prognostik belirteçler olarak plazma miRNA'larını tanımlamayı amaçlamaktadır.

Yöntem: HIV'in patogenezinde ve çeşitli hücresel yollarında yer alan potansiyel miRNA'ları tanımlamak için biyoinformatik analiz kullandık ve real time polimeraz zincir reaksiyonu (RT-qPCR) aracılığıyla hsa-miR-548-3p ve hsa-miR-27a-3p'yi validasyonunu yaptık. 15 naive HIV hastasından iki farklı zaman noktasında kan alındı. Taq-Man problemleri kullanılarak örnekler üzerinde gerçek zamanlı qPCR yapıldı ve veriler $\Delta\Delta CT$ yöntemi ile analiz edildi.

Bulgular: Verilerimiz, antiretroviral tedavi gruplarında kontrole kıyasla hsa-miR27a-3p'nin up regüle, hsa-miR548c-3p'nin down regüle olduğunu göstermektedir ($p<0.001$). Antiretroviral tedavi öncesi durumunda hsa-miR27a-3p ile viral RNA kopya sayısı arasında pozitif korelasyon gözlemlendi ($p<0.001$). Biyoinformatik analizlere dayanarak, hsa-miR27a-3p ve hsa-miR548c-3p'nin HIV hücre içine girerken kullandığı reseptörleri, çeşitli hücresel yollar ve potansiyel diğer hastalıklar dahil

olmak üzere katkıda bulunan çeşitli faktörler aracılığıyla HIV patogeneğine katkıda bulunduğu tahmin edilmektedir.

Sonuç: Verilerimiz, hsa-miR27a-3p ve hsa-miR548c-3p'nin taklitçileri veya inhibitörlerinin, gelecekteki çalışmalarda HIV tedavisi için potansiyel terapötik ajanlar olarak düşünölebileceğini göstermektedir.

Anahtar Sözcükler: HIV, miRNA, ART, CD8+ T hücre, CD4+ T hücre, hsa-miR27a-3p, hsa-miR548c-3p



ABSTRACT

Effect of expression of miRNAs obtained by bioinformatics analysis on antiretroviral therapy at different stages in HIV patients: ART-miRNA.

Aim: Over the decades, research on HIV/AIDS has progressed with the introduction of HAART. Circulating miRNAs are recently used as promising biomarkers for infectious diseases. Due to their potential regulatory roles in molecular pathways, miRNAs are among the novel candidates for diagnosing and treating conditions like HIV. We will validate our predictive analyzes in the targeted patient group with bioinformatics tools developed for these purposes, including miRNA discovery, analysis of its structure, target predictions, and its relationship with other biological processes. This study aimed to identify plasma miRNAs as diagnostic markers in naive patients, followed by HAART to monitor the immune status of HIV infection.

Method: To identify the potent miRNAs involved in the pathogenesis and various cellular pathways of HIV. We used bioinformatics analysis and validated the hsa-miR-548-3p and hsa-miR-27a-3p through RT-qPCR. Blood was collected from 15 naive HIV patients at two different time points. Real-time qPCR was performed on the samples using Taq-Man probes, and data were analyzed by the $\Delta\Delta CT$ method

Results: Our data show that hsa-miR27a-3p was up-regulated and hsa-miR548c-3p was down-regulated in antiretroviral treatment groups compared to control ($p < 0.001$). A positive correlation was observed between hsa-miR27a-3p and viral RNA load in naive patients before antiretroviral therapy ($p < 0.001$). Based on bioinformatics analyses, it is speculated that hsa-miR27a-3p and hsa-miR548c-3p contributing to the pathogenesis of HIV through several contributing factors.

Conclusion: According to our data, mimetics or inhibitors of hsa-miR27a-3p and hsa-miR548c-3p could be considered as potential therapeutic agents for the treatment of HIV in future studies.

Keywords: HIV, miRNA, ART, CD8+ T cell, CD4+ T cell, hsa-miR27a-3p, hsa-miR548c-3p



1.GİRİŞ

MikroRNA'lar (miRNA'lar) hayvanlarda, bitkilerde, mantarlarda ve virüslerde birçok biyolojik süreci düzenleyen 21-23 nükleotid uzunluğunda kodlamayan küçük RNA'lardır [1]. Yüzlerce farklı miRNA'nın keşfinden ortaya çıkan en önemli soru, tüm bu küçük kodlamayan RNA'ların ne işe yaradığıdır. MiRNA'lar gen ekspresyonunu, öncelikle RNA-induced silencing kompleksini (RISC), hedef mRNA'ların 3' untranslated bölgesindeki (3'UTR) tamamlayıcı dizilere yönlendirerek, bununla beraber translasyon inhibisyonu veya mRNA degradesyonu yoluyla gen ekspresyon seviyelerinde ayarlamalar yaparak düzenler. miRNAların ekspresyon seviyelerinde değişiklikler yoluyla bu şekilde etki göstermesi çeşitli hastalıkların neden-sonuç ilişkisinin değerlendirilmesinde bunların bir araç olarak kullanılabilmesine olanak sağlamıştır. Hastalık patogenezinin aydınlatılmasının yanısıra progresyonu ve prognozu üzerinde de tahminlerde bulunabilme olasılığı sebebiyle son zamanlarda kanserlerde, enfeksiyon hastalıklarında, diyabet gibi kronik süreçlerde ve kardiyovasküler hastalıklarda hedef olarak bu küçük kodlanmayan RNA'lara odaklanılmıştır [2,3].

Birleşmiş Milletler HIV/AIDS Ortak Programına (UNAIDS) göre, HIV tanımlandığı günden bugüne kadar 36 milyondan fazla kişinin ölümüne sebep olarak halk sağlığı sorunları arasında önemli bir yer kaplamaktadır. 2020'de dünya çapında 680000 insan HIV ve HIV'den kaynaklanan klinik komplikasyonlar sebebiyle yaşamını yitirdi. Dünya genelinde 1,5 milyon yeni tanının alındığı 2020 senesinin sonuna gelindiğinde HIV ile enfekte yaklaşık 37,7 milyon insan vardı. Antiretroviral tedaviye (ART) ulaşımın kolaylaşması ve HIV enfeksiyonunun yeni vaka görülme sıklığının azalması dünya genelinde HIV ve HIV'nin sebep olduğu hastalıkların azalmasına sebep olsa da oransal olarak hala büyük bir grup hastalığın kendisi ve komplikasyonları ile karşı karşıyadır. Dünya Sağlık Örgütü (WHO)/UNAIDS çalışma gruplarının 2020 yılına kadar 90-90-90 hedefleri ele alındığında (HIV ile yaşayan kişilerin yüzde 90'ı tanımlarını biliyor, HIV ile enfekte ve tanımlarını bilen bu grubun yüzde 90'ı tedavi görüyor, tedavi alan hastaların yüzde 90'ının viral yükleri kontrol altına alınabiliyor)

geldiğimiz noktada hastalığın kendisi ve komplikasyonlarının devam eden bir sorun olduğu görülmektedir [4].

HIV-1 ile enfekte hasta popülasyonunun serumunda (dolaşan miRNA'lar olarak) ya da periferik mononükleer kan hücrelerinde (PBMC) bulunan miRNA'lar doğrudan protein modülasyonu üzerinden veya konağın replikasyona karşı kullandığı ana parametreleri hedefleyerek HIV-1 enfeksiyonunun progresyonu üzerinde rol oynar [5].

Klinisyenler akut dönemde hasta yaşamını tehdit eden bağışık sorunlarını ele almaya devam ederken bir yandan da hastanın uzun süre boyunca maruz kalacağı kronik etkileri de yönetebilmek amacıyla hala yeni terapötik ve kronik etkiler için prognostik biyomarker arayışı içindedir. Ayrıca uzun vadede bu klinik prezentasyonu yönetebilmek için öncelikli olarak ART süresince ortaya çıkan kalıcı inflamasyonun sebeplerini ve bunun ek sağlık problemlerine sebep olan sürecini miRNA'lar üzerinden anlamlandırmak bir amaç olacaktır [6].

Genel olarak miRNA'lar, ya doğrudan viral RNA'ya bağlanarak ya da HIV-1'in hayatta kalmasıyla ilgili hücresel faktörleri hedefleyerek HIV-1 enfeksiyonunu etkiler. Bununla birlikte, bir ART şemasının virüs replikasyonuna karşı etkinliği, her bir ART'nin etkinliğine ve ART'ye virüs direncinin oluşmasını sağlayan HIV-1'in genetik varyasyonlarının sayısına bağlıdır.

Enfeksiyonun hem hücre kültürü düzeyinde yapılan çalışmalarda hem de izole edilmiş mononükleer kan hücrelerinde deneysel düzlemde yapılan çalışmalarda miRNA ekspresyonu üzerine etkileri gözlemlenmiştir [7]. Deneysel çalışmalar, hücresel miRNA'ların, viral RNA'ları doğrudan hedefleyerek HIV-1 replikasyonunu etkilediğini göstermiştir. Örneğin, birkaç araştırma grubu, miR-29a'nın HIV-1 nef genini hedeflediğini ve insan hücrelerinde HIV-1 replikasyonuna işlevsel olarak müdahale ettiğini bildirmiştir [8].

Örneğin, Huang ve ark. beş miRNA'nın (miRs-28, -125b, -150, -223 ve -382) HIV-1 RNA'sının 3' UTR'sine bağlanarak HIV-1 replikasyonunu baskılayabildiğini gösterdi. Bu miRNA'ların latent CD4+ T hücrelerinde zenginleştirilmesinin HIV-1 progresyonunun gecikmesinde çok önemli olduğu öne sürülmüştür ve bu nedenle, bu miRNA'ların manipülasyonun, anti-HIV-1 tedavisi için etkili bir yaklaşım olabileceği öne sürülmüştür [9].

Antiviral bağışıklık yanıtının temelini oluşturan CD8+T hücreleri de dahil olmak üzere bu hücre tiplerinin işlevlerinin nasıl regüle edildiğini anlamada miRNA'ların rolü araştırılmaktadır [10]. Bu regülasyon için yapılan düzenleyici işlevsel değişiklikler protein ekspresyonunun modülasyonu ile sağlanmaktadır.

Viral dizileri tanımanın yanı sıra, konaktaki miRNA'lar HIV-1'i düzenleyebilen hücresel faktörleri de modüle edebilir. Örneğin, miR-198, HIV-1 Tat kofaktörü, siklin T1 dizisini hedefler, bu da monositler ve makrofajların HIV-1 enfeksiyonuna karşı farklı şekillerde yanıt verilmesi ile sonuçlanır [11].

Uzun çalışma sürelerini kapsayan birden fazla çalışmada tedavi alan ve almayan hasta gruplarında, bir yıldan kısa sürede hızlı AIDS gelişiminden on yıllar sonra ilerleme olmamasına kadar uzanan dramatik farklılıklar ortaya konmuştur. HIV pozitif popülasyonun %10-15'ini temsil eden hızlı progresyon gösteren HIV ile enfekte hastaların benzersiz patojenik gelişimi, kronik progresyonlu olanlara göre daha az anlaşılmıştır.

HIV serokonversiyonundan birkaç ay sonra plazma viremi, HIV hastalığının ilerleme hızının önemli bir belirleyicisi olan kararlı duruma veya viral set point noktasına ulaşır [12]. Genel olarak çalışmalar bu nokta üzerinden kurgulansa da erken evrelerde saptanabilir belirteçlerin olmaması konak miRNA profili üzerinden tanısal testlerin de geliştirilmesini sağlayacaktır [13]. Bu profillerin biyobelirteç olarak kullanılabilmesini sağlayan avantaj miRNAların Argonaut proteinleri ile olan bağlanmalarının büyük ihtimalle RNaz degradasyonundan onları koruması, ayrıca hem serumda hem mikroveziküllerdeki, eksozomlardaki stabil yapılarıdır [14].

HIV-1, hücresel miRNA ekspresyonunu değiştirebilir ve hayatta kalması için uygun bir mikro-ortam oluşturabilir. MiRNA'lar ve bunlarla ilişkili proteinler, hücrede bol bulunan ribonükleoprotein komplekslerinden biri gibi görünmektedir. Bununla birlikte, ekspresyonu bol olmayan hücre tipleri veya belirli çevresel koşullarla sınırlı olan miRNA'lar, klonlama çabalarında hala gözden kaçabilir. Bu nedenle, miRNA gen tanımlamasına yönelik deneysel yaklaşımları tamamlamak için hesaplamalı yaklaşımlar geliştirilmiştir.

HIV/AIDS patogeneğinde, bazı hücresel miRNA'lar, virüsün enfeksiyonu ve replikasyonu sırasında antiviral bir etkiye sahiptir. HIV tedavisi görmemiş veya

sağlıklı durumdaki hastalar arasındaki miRNA ekspresyon farklılıklarının belirlenmesi, viral replikasyonun regülasyon mekanizmalarını netleştirecektir [15].

Yüksek stabiliteleri ve ölçüm kolaylıkları nedeniyle, dolaşımdaki miRNA'ların konakçı bağışıklık ve hastalık durumunu izlemek için potansiyel olarak yararlı belirteçler olarak kullanımı, kanser ve viral enfeksiyonlar gibi çeşitli insan hastalıkları için kapsamlı bir şekilde araştırılmıştır. Tutarlı, tekrarlanabilir sonuçlar elde etmek için araştırmacılar sonuçların çapraz karşılaştırmasını temel alarak standartlaştırılmış protokoller geliştirmeye devam etmektedir. Bu yöntemler daha da rafine edildiğinde, hastalık riski tahmini ve tespiti için miRNA biyobelirteçlerinin faydası artmaya devam edecektir.

MiRNA'ların keşfi, yeni bir araştırma alanı açtı ve HIV/AIDS ve aşılarda hastalıklar bağlamında benzersiz miRNA profillerini belirleme olasılığını ortaya çıkardı. HIV ile enfekte hastalarda naive durumlarında (antiretroviral tedavi olmadan) miRNA ekspresyonu ele alınarak hastalık süreci içindeki miRNA'ların değişimini gözlemlemek çalışmamızın çekirdeğini oluşturuyor. Biyoinformatik analizler ile HIV enfeksiyonunun progresyonunda ve izleminde daha büyük öneme sahip olan miRNA'ların sistematik olarak tespit edilmesi ve bu önemi kanıtlanmış miRNA'lar üzerinden rtPCR yöntemiyle validasyon yapılması çalışmamızı değerli kılan diğer bir noktadır. Biyoinformatik analizlerde mevcut çalışmaların aksine CD8 T hücreleri ile kolere miRNA profillerinin belirlenmesini amaçladık. Bu kolerasının amacı ise henüz yeterince ilerleme kaydedilememiş olan CD8 T hücreleri hedefleyen aşı çalışmalarının bulunması ve ilerlemeye açık bir alan olmasıdır. Farklı şekilde ifade edilen miRNA'ları belirlemek, HIV enfeksiyonunun erken evresindeki bireyleri tespit edebilen biyobelirteçleri keşfetmemize yol açabilir. İmmunolojik değişimlerin temelini ve terapötik amaçları anlayabilmek için miRNA açısından spesifik profillendirilme yapılabilmesi enfeksiyonun progresyon tayini açısından faydalı olacaktır. Devamında miRNA'ların endotel disfonksiyonu, inflamasyon süreçleri üzerine etkisi, kardiyovasküler hastalık patogenezi ve lipid profilleri üzerine olan etkileri de göz önüne alınarak hastalığın uzun süreçte yaptığı etkiler modellendirilerek anlam kazandırılacaktır [16].

HIV ile enfekte hastalarda bugüne kadar yapılan çalışmalarda hasta grupları dizayn edilirken naive olan bir hasta grubunun tedaviye başlaması ile beraber süreç içerisinde

farklı noktalarda değerlendirilip, bu hasta grubunun takibinin yapmaktansa bu hastaları takipte izleme zorluğu sebebiyle HIV hastalarının tedavide farklı yıllarındaki miRNA profilleri üzerine çalışmalar yapılmıştır. Çalışmamızda tedavi almadan takibe aldığımız aynı hasta grubunun sürecini izleyeceğimiz için tedavi süreci ile miRNA değişimi üzerine sağlıklı bir korelasyon kurarak eşsiz sonuçlar elde etmeyi amaçlıyoruz.



2. GENEL BİLGİLER

2.1. MiRNA

2.1.1 Tanım

Genetik materyalin istenmeyen kısımlarını düzenlemek ve transkripsiyonun regülasyonu ile kontrol altına almak amacıyla birden fazla RNA türü evrimleşmiştir. Argonaute ailesi proteinleriyle olan ilişkileri üzerinden açıklanan ve ayrıştırılan bu küçük RNA'lar (yaklaşık 20-30 nükleotid uzunluğunda olan) 3 ayrı grupta değerlendirilir. Bunlar siRNA, PIWI etkileşimli RNA (piRNA), miRNA'dır. ~22 nükleotit boyutunda olan somatik dokunun baskın sınıfı miRNA'lar Drosha ve Dicer olarak bilinen iki RNase III proteini tarafından üretilir [17].

PAZ (Piwi-Argonaute-Zwille) ve PIWI alanlarının varlığı ile öncelikli olarak bitkilerde tespit edilen Argonaute protein ailesi türler arasında yüksek oranda korunur ve farklı organizmalar bünyesinde bu ailenin çok sayıda üyesini kodlar [18].

Ago ve Piwi subfamilyalarına ayrılabilen Argonaute protein ailesinde günümüze kadar olan çalışmalarda fare ve zebra balığı dahil olmak üzere Piwi proteinlerinin ekspresyonu, Piwi etkileşimli proteinlerin bağladıkları germ hattıyla sınırlıdır. Ago proteinleri ise bunun aksine yaygın olarak birden fazla organizmada eksprese edilir.

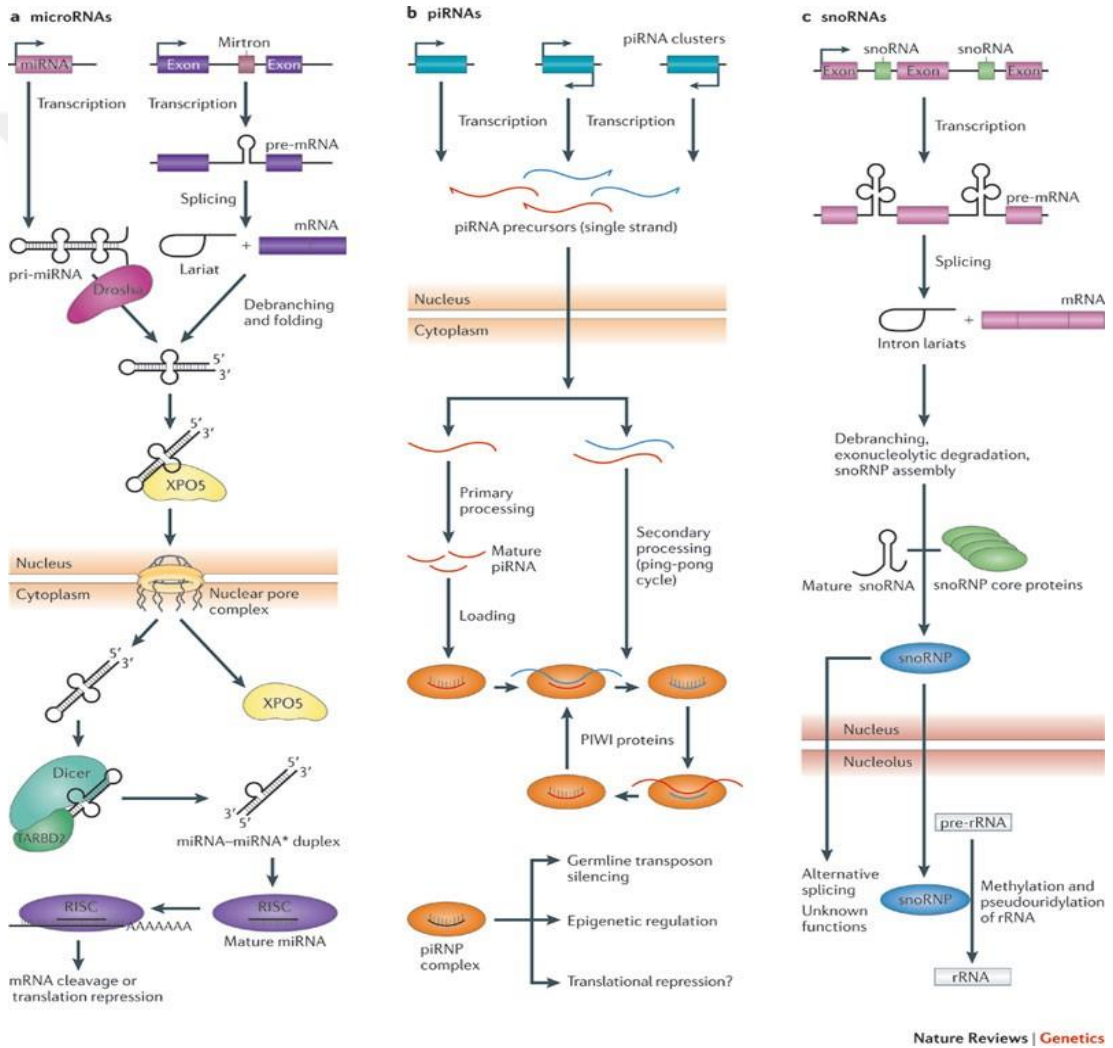
İzole edilen PAZ alanları incelenerek yapılan araştırmalarda, RNase III (small RNA'ların işlenmesinde kullanılan, RNA'nın endonükleolitik bölünmesini katalize eden bir enzim) etkisi sonucunda karakteristik olarak elde edilen iki-nükleotit 3' çıkıntısının konumunu sabitleyen spesifik bir bağlanma cebi içerdiği tespit edilmiştir.

PIWI alanları, RNase H'ye (Replikasyon sırasında ortaya çıkan RNA/DNA hibritlerinin RNA'sını parçalayan enzim) yaygın benzerlik gösterir [19].

Yapılan in vitro çalışmalarda Argonaute 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 tarafınca yönetilmektedir [20].

Argonaute 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.



Şekil 2.1 MiRNA'ların üretilme süreci

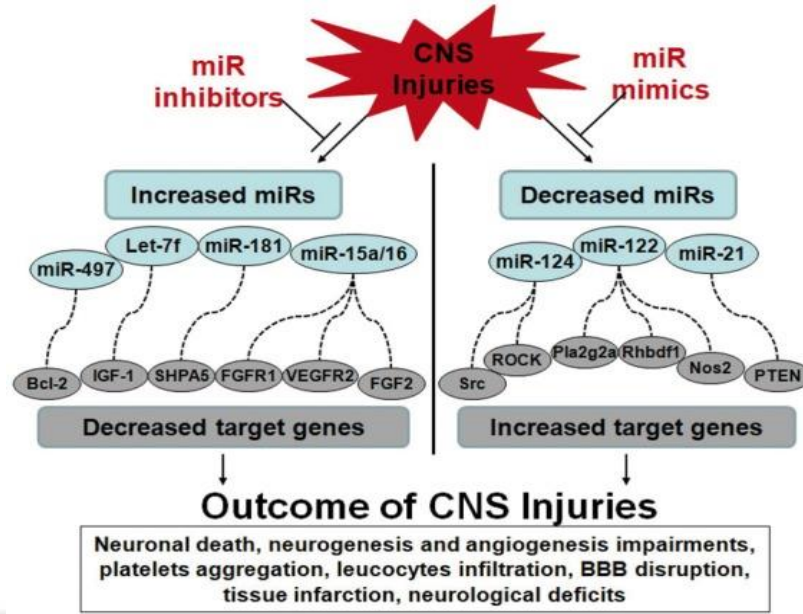
MikroRNA'lar, bireysel üniteler (pri-miRNA) veya konak genler (mirtronlar) ile birlikte kopyalanır. Takip eden süreçte Drosha kompleksi veya lariat-debranching enzimi tarafından işlenmesi ile beraber, öncü miRNA'lar (pre-miRNA'lar) çekirdekten exportin 5 (XPO5) ile çıkarılır. Dicer ve TAR RNA bağlayıcı protein 2 (TARBP2) tarafından yapılan ileri işlemler, RNA kaynaklı susturma kompleksine (RISC) yüklenen olgun miRNA'lar üretilmesini sağlar. miRNA'lar, protein kodlayan transkriptlerin degradasyonu veya translasyonel inhibisyon yoluyla işlev görür [21].

2.1.2 miRNA Klinik Kullanım Alanları

Moleküler biyolojinin temelinde yatan dogmanın “tek gen, tek protein” görüşü insan genomundaki büyük bir bölümü işlevsiz kılmasına rağmen günümüzde bu transkripsiyonun çok daha karmaşık olduğu, işlevsiz olarak tanımlanan %98’lik kısmının uzantılarının gen aktivitesinin üzerinde önemli etkilere sahip olduğu ortaya çıkmıştır. Tanımlanan bu kodlanmayan RNA’ların hastalık süreçlerinde yeni bir pencere açması klinik araştırmalar üzerinde yol gösterici olmuştur.

MiRNA’ların keşfi, çeşitli hastalıklardaki rollerini belirleme konusunda büyük ilgi görmesine sebep oldu. 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 kazandı. Örneğin beyinde medial frontal girus, serebellum ve hipokampus gibi ayrı bölgelerin ekspresyon miktarları birbirinden farklı olmakla beraber dokunun miRNA açısından zengin olduğu gösterildi [22]. Plazma ve beyin omurilik sıvısı arasındaki ilişki de incelenerek merkezi sinir sistemi (MSS) hastalıklarında miRNA seviyelerindeki değişiklikler ortaya çıkarıldı. MiRNA’ların MSS bozukluklarının fizyolojik ve patolojik koşullarını yansıttığı görüldü.

Beyin dokusunun karmaşık nöroanatomisi ve işleyişini merkezi sinir sistemi hastalıklarında erken bir aşamada anlamlandırmak ve böylelikle bu safhada hedefe yönelik tedavi modaliteleri geliştirebilmek için miRNA profilleri değerlidir. Ayrıca bazı miRNA’ların risk faktörleri ile ilişkili olması ve bu miRNA’ların değiştirilmesi ile hücresel yolların üzerinden oluşan bozuklukların etkilerinin değişimi odaklanılan konulardandır.



Şekil 2.2 MiRNA'ların merkezi sinir sistemi üzerine etkisi

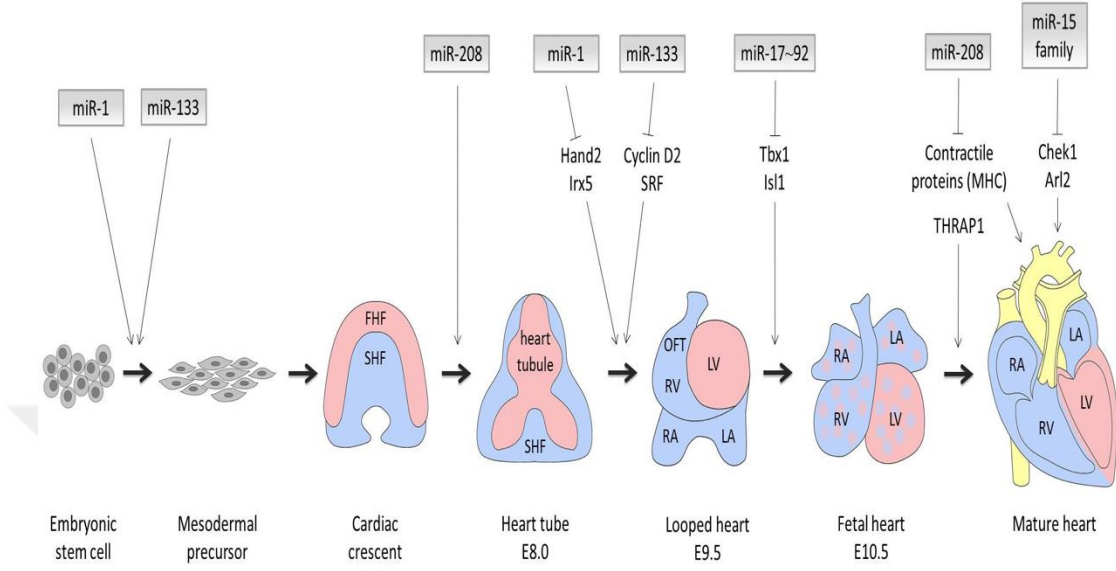
Düzeyi değişen miRNA'lar, MSS yaralanmalarından sonra farklı sonuçlara yol açan hedef genleri düzenler. MSS yaralanmaları sırasında miRNA'lar, trombosit agregasyonu, anjiyogenez bozuklukları, lökosit infiltrasyonu, nöronal ölüm, BBB bozulması, nörolojik bozukluklar ve diğerleri dahil olmak üzere çok sayıda patolojik sonuca neden olur. Şeklin sol kısmı: Artan miRNA'lar, hedef genleri üzerinde down regülasyonuna yol açarak, CNS yaralanmalarından sonra klinik sonuçların kötüleşmesine neden olur [23].

İnme sonrası nörolojik rehabilitasyona katkıda bulunduğu bilinen Mezenkimal kök hücreler hedeflenerek yapılan in vitro miR-133b çalışmaları, miRNA'nın serebral iskemi sonrası astrositlere ve nöronlara eksozomlar aracılığı ile taşınması sayesinde bağlantı kurduğu durumda nörit büyümesini uyardığını göstermiştir [24].

Kardiyovasküler sistem üzerinde miRNA fonksiyonu için yapılan çalışmaların majör hedefi kalbin morfolojisi ve işlevidir. Dicer knockout fareler üzerinde yapılan çalışmalarda bu delesyonun embriyonik gelişim aşamalarında yarattığı problem sonucunda kalp yetmezliğine sebep olduğu, doğum sonrasında kalbin gelişimi için miRNA'nın temel bir gereklilik olduğu gösterildi. Fibrozis, hipertrofi gibi kalbin şekillenmesinde oluşan problemlerin temelinde yatan süreçler ile bu delesyonun ilişkisi vardı [25].

Kardiyak miRNA'ların büyük bir bölümü, yaklaşık %90'ı, 18 miRNA ailesi tarafından oluşturulur. Kardiyomyositlerde farklı miktarlarda bulunmakla beraber en fazla olanı miR-1'dir. MiR-1 ve miR-133, aynı bisistronik transkriptten kaynaklanmasına rağmen

miR-133 daha az sayıda bulunur. Embriyonik kök hücrelerden beraber mezodermin farklılaşmasını uyarırlar ancak miR-133 inhibisyon ile MiR-1 ise aktivasyon ile farklılaşmayı düzenler.



Şekil 2.3 MiRNA'ların kardiyak morfogenезin regülasyonunda rolü

Farede kardiyak morfogenезi ve miRNA'ların bu süreçteki rolünü anlatan bir şema. Renkler, mezodermal kökenli olan kalbin farklı prekürsör kısımlarının kalp odalarının şekillendirilmesine katkısını temsil eder. Embriyonik 7.5. günde (E7.5), birinci kalp alanı (FHF) ve ikinci kalp alanı (SHF) olarak adlandırılan 2 hücre popülasyonu, kardiyak hilali oluşturur. Daha sonra, hücreler göç eder ve doğrusal kalp tüpü Embriyonik 8. günde (E8.0) oluşur. Kısa bir süre sonra kalp tüpü spontan kasılmalara başlar ve geliştirmekte olan embriyonun kanlanmasını destekler. Son olarak, kardiyak döngü süreci ve bir dizi morfolojik değişiklik, Embriyonik 10.5. günde (E10.5) ile dört odacıklı kalbin oluşumuna katkıda bulunur. Atriyumun, ventriküllerin ve ortak çıkış yolunun septasyonu daha sonra gerçekleşir [26].

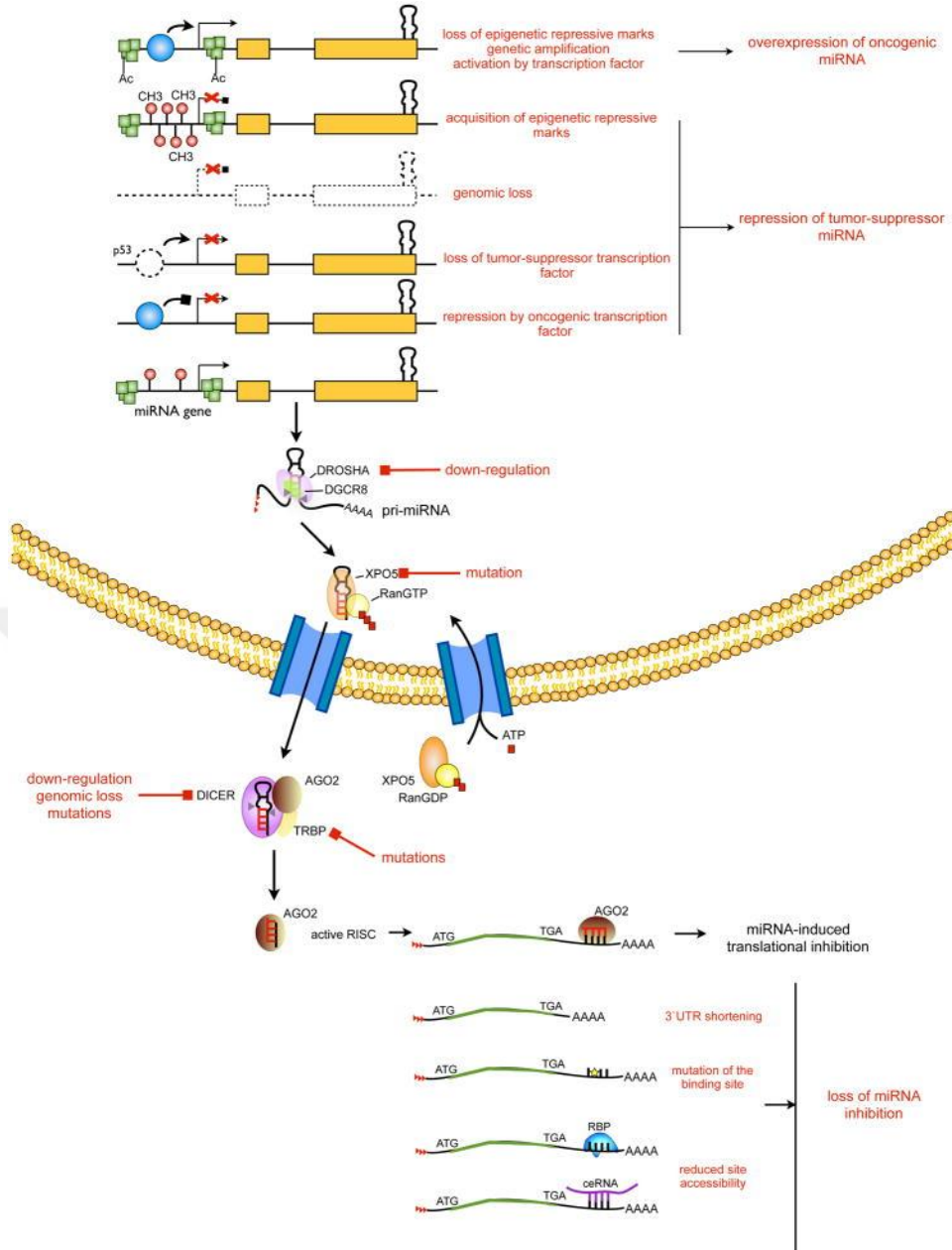
Miyokardiyal hücre morfolojisinin düzenlenmesinde ve kalbin embriyolojik yapısının oluşumu ve işleyişinde görev alan miR-143, miR-145 ile beraber vasküler düz kas hücresi farklılaşması üzerinden çeşitli kardiyovasküler hastalıklarla ilişkilidir [27]. MiR-143/145'in azalan ekspresyonu, akut ve kronik vasküler süreçler ile ilgili olduğu rapor edilmiştir.

MiRNA'ların kardiyak remodelizasyondaki temel işlevi ve kardiyovasküler hastalıklarda sinyal yollarındaki birden fazla geni düzenleme yeteneği sebebiyle kullanımı sayesinde ilgi çekici çalışma alanları haline gelmiştir. Ayrıca, miRNA'lar genellikle bir sinyal kaskadı boyunca birden fazla bileşeni kontrol ettiğinden, bir bileşene karşı oluşan etki kaybını kaskadın diğer elemanları ile tolere edebilmektedir.

Gen ekspresyonunun kritik düzenleyicileri olmaları sebebiyle kanser patogeneğinde miRNA onkogeneğ, metastaz ve çeşitli tedavilere dirençte rol oynarlar. miRNA'lar tümör baskılayıcı genler , onkogenler olarak farklı işlevlere sahiptirler.

Up ve/veya down regölasyon gözlemlenerek kanser patogeneğinde miRNA'ların fonksiyonları incelenir. Bu sonuçlar kanserin başlangıç ve gelişim sürecinde miRNA'ların spesifik görevlerini saptamamızı sağlar. Bu görevlerin hücre büyümesi ve apoptoz üzerindeki etkisi göz önüne alınarak yapılan çalışmalarda miR-15 ve miR-16'nın birden fazla kanser türünde önemli bir bileşen olan antiapoptotik gen B hücre lenfoma 2'yi (BCL2) hedefleyerek karsinom, lenfoma ve lösemide rol aldığı biliniyor [28].





Şekil 2.4 Kanserde miRNA disregülasyonu

MiRNA biyogenez yolu ve miR-RISC aktivitesi şematik olarak temsil edilir. Kırmızı renkte, kanserde yaygın olarak ortaya çıkan adımlar gösterilir ve kanserde tanımlanan miRNA disregülasyonu ile görsel olarak ilişkilendirilir. RBP olarak kısaltılan RNA bağlayıcı protein. Mavi ile temsil edilen ceRNA'lar. CH3, metilasyon; Ac, asetilasyon [29].

Mikroarray ile 217 miRNA gen ekspresyon profillerini değerlendirmek için primer tümör ve normal dokular arasında yapılan çalışmada farklı profillere sahip olduğu ve bu profillerin diğer kanser türlerine göre de farklı oldukları gösterildi [30]. Bu çalışmada tümörün gelişimsel süreci de değerlendirildiğinde kullanılan mRNA profillerine kıyasla daha fazla bilgi elde edildi.

Enfeksiyon alanında yapılan çalışmalar enfeksiyon sürecindeki konak hücrelerin hücresel miRNA ekspresyonunu ve virüs kodlu miRNA'ların konak translasyonu üzerindeki etkilerini temel alarak devam etmiştir. Virus kodlu miRNA'lar konakçı miRNA'ların analogları olanlar ve viral spesifik olanlar olmak üzere iki sınıfa ayrılabilir. Konak efektrlerini taklit eden viral miRNA'lara "analoglar" denir. Virüs tarafından kodlanan düzenleyici proteinlere benzer şekilde, viral miRNA'ların bir alt kümesi, konak efektrlerini taklit etmek için evrimleşmiştir.

Virüs kodlu miRNA'nın virüs replikasyonunu üzerindeki etkileri sadece kendi transkriptleri üzerinden değil konakçı gen ekspresyonlarını azaltarak replikasyonları için uygun ortamı sağlamaya yöneliktir. Konağın bağışıklık tepkisinden kaçabilmek için konağın protein düzeylerini manipüle edebilir, doğuştan gelen bağışıklık sistemlerini inhibe edebilir ve böylece replikasyonlarını devam ettirebilir.

Dünya nüfusunun üçte birinden daha fazlasını enfekte etmesinin yanında morbidite ve mortalite oranlarının yüksek seviyelerde olduğu önemli patojenlerden olan Mycobacterium tuberculosis'in bu özellikleri büyük ölçüde bağışıklık sistemlerinin verdiği reaksiyonlara rağmen konak içinde güçlü bir şekilde hayatta kalma yeteneğine atfedilir. MiRNA'lar tüberküloza neden olan ajan Mycobacterium tuberculosis ile enfeksiyonun seyrini belirleyen konakçı arasındaki hassas etkileşime dahil olurlar. Enfekte olan canlı üzerinde miRNA'ların farklı ekspresyon seviyelerine sahip olmaları konak ile arasındaki ilişkiyi apoptoz, otofaji ve makrofajların inflamasyonu gibi durumlar üzerinden düzenler. Virlent M. tuberculosis'in konak üzerinden oluşan antibakteriyel sinyal yollarının engelleyerek patojeniteyi kuvvetlendirmek için miRNA'ları kullandığı buna karşılık olarak ise konağın indüklediği miRNA'ların otofaji gibi bakteri artışını sınıflandırmak için antibakteriyel süreçleri regüle ettiği görülür. Makrofajlar fagositoz ve fagozom oluşmasını bakteriyel patojenlerin ortadan kaldırılmasında anahtar rollerde kullanırlar. Patojenik mikobakteriler kısmi olarak aktin yapısı blokasyonu ile bulundukları bölgede fagozom olgunlaşmasından kaçınırlar. M. tuberculosis ile makrofajların enfekte olması durumunda aktin yapısının inhibisyonu için hedefinde N-Wiskott-Aldrich sendromu proteini olan miR-142-3p'de bir artışın olduğu ortaya konmuştur [31]. Bu durum miRNA aracılı fagositozun M.tuberculosis enfeksiyonu sırasında düzenlendiğini gösterir. Yine inflamasyon üzerinden etkili olan miR-155, miR-21 ve miR-146a/b, Toll-like reseptör (TLR) ve

RIG-I reseptör (RLR'ler) yollarının birden fazla adımını düzenleyerek etki eder. Farklı araştırmalarda in vivo ya da in vitro olarak miRNA profilleri karşılaştırıldığında hastalığın farklı evrelerini tespit ederken yaşanan zorluk, hasta sayısı, bu hasta grubunun cinsiyet ve yaş ayrımının yapılması gerekliliği, Rna ekstraksiyon yöntemleri gibi zorluklarla karşılaşılmasına karşın enfeksiyonun klinik sonuçlarını belirlemede inflamasyon, otofaji, apaoptoz ve metabolizma gibi önemli fonksiyonları düzenlemesi ile hedeflenen araştırma konuları olarak görülmektedir.

Sepsis ve sepsise bağlı olarak görülen organ yetmezliğinin ana sebeplerinden biri olan bakteriyel enfeksiyon yüksek mortalite ve morbidite oranlarına sahiptir. Doğal bağışıklık sistemi bu enfeksiyonlara karşı konağın yaptığı savunmanın ilk kısmını oluşturur. Yanıtın bu kısımdaki en baskın komponenti patojenlerin makrofajlar tarafından fagositozudur. Bu fonksiyonda bir problem görülmesi durumunda enfeksiyon hızlı bir şekilde yayılarak şiddetli sepsis tablosuna sebep olur. Konak tarafından patojenlerin tanınması ve fagositoz mekanizmasının başlatılmasında önemli bir rol oynayan TLR'ler, bir doğal bağışıklık sistemi reseptör sınıfıdır. İnterlökin-1 reseptör ilişkili kinaz, TLR/IL-1 reseptör ailesinin sinyal transdüksiyonunda yer almıştır. İnterlökin-1 reseptör ilişkili kinaz ve İnterlökin-4 reseptör ilişkili kinaz nükleer faktör- κ B (NF- κ B) ve mitojenle aktive olan protein kinaz (MAPK) sinyal iletimine aracılık etmede önemli roller oynar. Ayrıca İnterlökin-1 reseptör ilişkili kinaz, tümör nekroz faktör reseptörü (TNFR) süper ailesinin etkili olduğu sinyal yollarını da düzenler. MiR-15a/16 özellikle bakteri invazyonundan hemen sonra erken aşamada bakteriyel sepsiste önemli bir rol oynar. Miyelod hücreler üzerinde yapılan miR-15a/16'nın delesyonu sonucunda hem bazal seviye hem de bakteriyel enfeksiyon sonrası TLR-4'ün up regülasyonu ve böylelikle fagositik kapasitenin artışı görüldü [32]. Enfeksiyonun ilk dönemlerinde bu miRNA'ların hedeflenmesinin yeni bir terapötik araç olarak enfeksiyöz sepsis tedavisinde kullanılabileceği öngörüldü.

Herpesvirüs ailesi olarak bilinen DNA virüsleri virüs kodlu miRNA'ların büyük bir bölümünü oluşturur. Hem total mutlak virüs kodlu miRNA sayısı açısından hem de virüs başına kodlanan ortalama miRNA sayısı (tipik olarak >10/genom) açısından baskındır. Genellikle MiRNA'ları kodlayan virüsler replikasyon siklusları için bir DNA bileşenine sahiptirler böylece konak miRNA biyogenez mekanizmalarına

erişime sahip olmaları sayesinde çekirdekte çoğalıp uzun süreli enfeksiyon patogeneğinde rol oynarlar.

Herpes virüsleri, konakta yaşam boyu latent enfeksiyonları sürdürme yetenekleri ile karakterize edilir. Bununla birlikte, latent durumun başlangıcına ve sürdürülmesine izin veren mekanizmalar henüz tam olarak anlaşılamamıştır.

Duyusal nöronlarda gecikmeyi oluşturan gecikme ile ilişkili transkriptin (LAT) HSV-1 ile enfekte olmuş hücrelerde miRNA'yı kodlayan bir miRNA öncüsü olarak işlev görmesine odaklanılmıştır [33]. LAT'ın bir proteini kodladığı düşünülmediğinden, LAT'ın ekzonik bölgelerinin birincil miRNA öncüsü olarak işlev görebileceğini varsayarak yapılan çalışmada HSV-1'in, viral gen ekspresyonunu transkripsiyon sonrası düzenleyerek latent durumun sağlanmasını ve korunmasını kolaylaştırabilen, enfekte olmuş nöronlarda en az iki birincil miRNA öncüsünü eksprese ettiğini göstermiştir.

Yine aynı şekilde miRNA'ların enfeksiyonun latent durumu üzerine etkisi Sitomegalovirüs (CMV) enfeksiyonunda da görülür. Latent enfeksiyon sırasında CMV'nin ve konak hücrelerin miRNA ekspresyon profili CMV ile enfekte insan monositik lösemi hücre hattı THP-1'den izole edilen small RNA'ların derin dizileme analizi gerçekleştirilerek değerlendirildiğinde, enfeksiyon sırasında CMV tarafından eksprese edilen 8 miRNA'nın, konak tarafından eksprese edilen miRNA'lar arasında ise 49 hücrel miRNA'nın farklı şekilde eksprese edildiği, CMV latent enfeksiyonu sırasında bunların 39'unun up regüle, 10'unun down regüle olduğu görülmüştür [34]. İnsan miRNA hsa-miR-124-3p'nin ifadesi, CMV latent enfeksiyon sırasında önemli ölçüde up regüle edilmiştir.

Kronik hepatit, siroz ve hepatoselüler karsinom için dünya genelinde önemli bir risk faktörü olan Hepatit B virüsü (HBV) dünya çapında tahmini olarak 2 milyara yakın insanı enfekte etmiştir. Hepadnavirüs ailesine ait bir DNA virüsü olan HBV enfekte olmayan popülasyon ile karşılaştırıldığında hepatoselüler karsinom için 100 kat artmış risk içerilmesine sebep olur. Bu sebeplerle virüs üzerine patogene z ve tedavi araştırmaları devam etmektedir. Virüs ve konak arasında moleküler düzeyde olan etkileşimler enfeksiyonun seyrini belirleyen önemli süreçlerdendir. HBV tarafından kodlanan miRNA-3'ü temeline alan çalışmada HBV'nin transkripsiyonunu hedefleyip

HBc protein ekspresyonu üzerinden etkili olarak replikasyonun baskılandığı görüldü. Hücre kültürleri üzerinden yapılan çalışmada HBV-miR-3'ün, HBV+ ve HBV+ hepatoma hücre hatlarında yüksek düzeylerde eksprese edildiği HBV- hepatoma hücre hatlarında bu durumun gözlenmediği görüldü [35]. Buna ek olarak akut fazda hastalardan toplanan serum örneklerinde HBV-miR-3 düzeyleri iyileşme dönemlerine göre daha yüksektir.

Dünya nüfusunun 80 milyondan fazlasını enfekte eden siroz ve karaciğer kanseri dahil olmak üzere ciddi sağlık problemlerine yol açan Hepatit C virüsü (HCV) enfeksiyon alanında üzerine çalışılan diğer bir konudur. Diğer birçok kronik viral enfeksiyonun aksine, HCV'nin tedavi edilebilir olması bunların miRNA'lar için çalışma konusu olmasını sağlamıştır. MiR-122, karaciğere özgü ekspresyon paterninde korunan, karaciğerdeki toplam miRNA içeriğinin yaklaşık %70'ini oluşturan bir miRNA'dır. MiR-122'nin virüs replikasyonunu desteklediği ana mekanizmalar sırasıyla genom translasyonunun uyarılması, genom stabilizasyonu ve genom amplifikasyonunun desteklenmesinde doğrudan etkili olmasıdır. HCV genomu pozitif bir sens RNA olduğundan, hücreye girdikten sonra hemen çevrilerek translasyonun uyarımı ve genom stabilizasyonu ile bir HCV enfeksiyonunu başlatılmasına yardımcı olur [36]. Ayrıca miR-122 bağlanması, kanonik HCV IRES (internal ribozomal giriş bölgesi) yapısını desteklemek ve stabilize etmek için HCV 5'UTR'nin yapısını değiştirdiği de öne sürülmüştür. Küçük RNA'nın viral genoma kaynaşmasının getirdiği yapısal değişiklikleri anlamak, RNA yapıları ile viral fonksiyon ve protein düzeyleri arasındaki ilişkiyi anlamamıza yol açar.

Günümüzde klinik karşılığı olan başka bir enfeksiyon etmeni olan HIV için de belirli çalışma grupları oluşturulmuştur. MiRNA'lar doğrudan HIV RNA'yı hedefleme veya HIV replikasyonu ile ilgili konakçı hücre faktörlerini kodlayan mRNA'ları hedefleme şeklinde olmak üzere HIV replikasyonunu iki şekilde modüle edebilir.

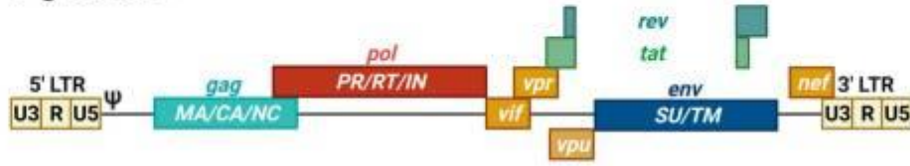
2.2 Retrovirüsler

2.2.1 Human Immunodeficiency Virüs

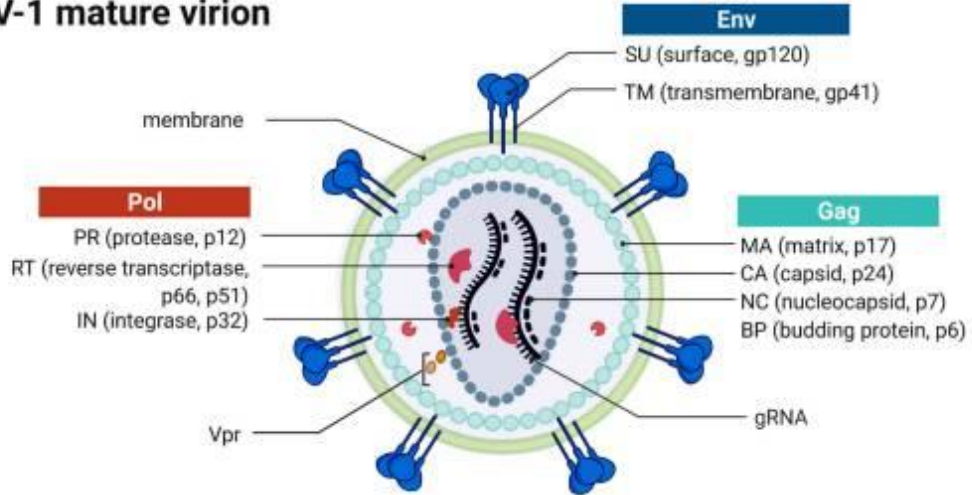
Günümüzde insan immün yetmezlik virüsü tip 1 (HIV-1) olarak isimlendirilen bir retrovirüs, yakın tarihte ortaya çıkan en yıkıcı bulaşıcı hastalıklardan biri haline gelen hastalığın etkeni olarak tanımlandı.

HIV tip 1 (HIV-1) ve HIV tip 2 (HIV-2) olmak üzere iki grupta incelenen HIV suşları Retroviridae ailesinin Lentivirus cinsinin genetik olarak ilişkili bir üyesidir. Lentivirüslerle enfeksiyonlar tipik olarak, uzun bir klinik gecikme periyodu, kalıcı viral replikasyon ve merkezi sinir sisteminin tutulumu ile birlikte hastalığın kronik seyrini gösterir. AIDS salgını ve HIV'in keşfinden önce, retrovirüslerin var olduğu biliniyordu ve bazı hayvan ve insan lösemileriyle ilişkilendirilmişti. Bu tür "oncoretrovirüsler", enfekte ettikleri hücreleri öldürmeden çoğalma yeteneği ile karakterizedir. HIV'leri içeren lentiretrovirüsler, genellikle daha yüksek seviyelerde çoğalır ve enfekte ettikleri hücreleri öldürür. Retrovirüs genomu, tek sarmallı RNA moleküllerinin iki özdeş kopyasından oluşur ve gag, pol, env yapısal genlerinin varlığı ile karakterize edilir. Tüm retrovirüsler, çoğalmak için virion RNA'sının ters transkripsiyonunu kullanır ve konakçı hücre kromozomlarında latent kalabilen bir proviral DNA formu üretirler. HIV-1 ve HIV-2 virüsleri, temel yapı (yani üç yapısal genin, gag, pol ve env'nin varlığı) tüm retrovirüslerle aynı olmasına rağmen, genomlarının organizasyonunda farklılık gösterir. Tüm retrovirüsler ayrıca RNA'yı kopyalarken yüksek oranda mutasyon üretir, ancak hata oranı HIV gibi yüksek seviyelere çoğalan virüsler için en yüksektir. Yüksek mutasyon oranı, HIV'ler için hızlı bir evrimsel değişim oranını kolaylaştırır. Yapısal genlere sahip olmasının yanı sıra, HIV-1 ve HIV-2 genomları, diğer düzenleyici/aksesuar genlerin karmaşık bir kombinasyonunu sunar.

HIV-1 genome



HIV-1 mature virion



Şekil 2.5 HIV-1 genomu ve virion yapısı.

(Üst) HIV-1 genomunun genomik organizasyonuna şematik genel bakış. Dimerik, lineer gRNA ~9 kb uzunluğundadır ve ters transkripsiyon, entegrasyon ve gen ekspresyonu için gerekli viral promotörü ve dizileri içeren 5'- ve 3'-uzunlu terminal tekrarları (LTR'ler) ile çevrilidir. Gag, viral çekirdeği oluşturan yapısal proteinler matrisini (MA), kapsidi (CA) ve nükleokapsiti (NC) kodlar. Viral enzimler proteaz (PR), ters transkriptaz (RT) ve integras (IN) için pol kodları vardır. Pol genini iki düzenleyici gen rev ve tat ve üç yardımcı gen vif, vpr ve vpu takip eder. Env, viral zarf glikoproteinlerini (gp120 ve gp41) kodlar. Env'yi başka bir aksesuar gen nef takip eder. (Altta) Olgun zarflı virion, küresel bir şekle sahiptir ve 7-35 zarf glikoprotein trimeri içeren konakçı hücreden türetilmiş bir lipid çift katmanlı zar tarafından sarılmıştır. Membranın iç tabakası, Gag'dan türetilen MA proteinlerini tutturur ve ayrıca Vpr ve PR'yi barındırır. Kapsid, virionun merkezinde bulunur ve gRNA, RT ve IN'nin iki kopyasını içerir. gRNA, NC proteinleri tarafından stabilize edilir [37].

HIV-1 sadece bir virüs değildir, M, N, O ve P grupları olarak adlandırılan ve her biri bağımsız bir türler arası geçiş olayından kaynaklanan dört farklı soy içerir. Grup M ilk keşfedilen gruptur ve HIV-1'in pandemik formunu temsil eder; dünya çapında milyonlarca insanı enfekte etmiştir ve dünyadaki hemen hemen her ülkede saptanmıştır. Grup O 1990'da keşfedildi ve M grubundan çok daha az yaygındır. Küresel HIV-1 enfeksiyonlarının %1'inden daha azını temsil eder ve büyük ölçüde Kamerun, Gabon ve komşu ülkelerle sınırlıdır. Grup N, 1998'de tanımlanmıştır ve O grubundan daha az yaygındır; Şimdiye kadar, tümü Kamerunlu bireylerde olmak üzere, yalnızca 13 grup N enfeksiyonu vakası belgelenmiştir. Son olarak, 2009 yılında Fransa'da yaşayan Kamerunlu bir kadında P grubu keşfedildi. Kapsamlı taramaya

rağmen, P grubu şimdiye kadar sadece Kamerun'dan başka bir kişide tanımlandı. Tüm bu grupların üyeleri, CD4+ T-hücresi tükenmesine ve AIDS'e neden olma yeteneğine sahip olsalarda, insan popülasyonu içindeki dağılımları bakımından büyük ölçüde farklılık gösterirler.

Birleşmiş Milletler HIV/AIDS Ortak Programı incelendiğinde 2020 senesi itibariyle HIV ile enfekte 36 milyonu erişkin 1,7 milyonu çocuk olmak üzere yaklaşık 37,7 milyon insan vardır. 19,3 milyon kadın ve 16,7 milyon erkekten oluşan erişkin hasta grubunda 2020 yılı içinde 1,3 milyon yeni tanı ve 580 bin HIV ile ilişkili ölüm görülmüştür. Dünya sağlık örgütünün bu tahminleri göz önüne alındığında 2020 yılını 2000 yılı ile kıyaslırsak yıllık yeni vaka sayısının %49, komplikasyonlar sonucu ölüm kıyaslamasında ise %55lik bir azalma olmasına rağmen tedavi hedef şeması göz önüne alındığında yıllık 1,3 milyon yeni tanı ve 580 bin kişi kaybı hala açıklanması gereken süreçler olduğunu göz önüne sermektedir [4].

2.2.2. Bulaş Yolu

HIV-1 cinsel, perkütan ve perinatal yollarla yayılır; bununla birlikte, yetişkinlerin %80'i mukozal yüzeylere maruz kaldıktan sonra HIV-1'i alır ve bu nedenle AIDS esas olarak cinsel yolla bulaşan bir hastalıktır. HIV bulaşma dinamikleri etkili tedavi ve önleme protokollerinin tasarımında oldukça önemlidir. Bu dinamikleri cinsel yolla bulaşan hastalıklar, yüksek riskli davranışlar, tıbbi bakım ve tedaviye erişim, koenfeksiyonlar dahil olmak üzere birçok kofaktör etkiler. Enfeksiyonun erken dönemlerinde genellikle hastalığın teşhis edilemediği ve bunun sonucu olarak tedaviye ulaşım olmadığı durumlarda yüksek riskli davranışların ortaya çıkması, korunmasız cinsel ilişki gibi sebepler ile bulaşı kolaylaştırabilir. Yine aynı şekilde Afrika'da şırıngaların yeniden kullanımının yaygın olduğu yirminci yüzyıl ortalarında bu durum HIV'in yayılımını kolaylaştıran başka bir etmen olabilir.

2.2.3. Bölgesel Dağılım

Heteroseksüel bulaşma, tüm enfeksiyonların yaklaşık %85'ini oluşturarak baskın bulaş şeklini oluşturmaya devam etmektedir. Güney Afrika yüksek oranda yeni HIV-1 enfeksiyonu gözlemlenmesi ile salgının ana kaynaklarından biridir. Sahra altı Afrika dışında, tüm HIV-1 enfeksiyonlarının üçte biri, çoğu doğu Avrupa ile orta ve güneydoğu Asya'da olmak üzere, intravenöz uyuşturucu kullanımı yoluyla bulaşır.

HIV-1 Demokratik Kongo Cumhuriyeti'nin Kinşasa bölgesinde ortaya çıkarak bu bölgeden ulaşım ağları boyunca Batı Afrika, Sahra altı Afrika, Avrupa ve dünyanın geri kalanına yayılım göstermiştir. Bu yayılım sonucunda genetik olarak birkaç farklı alt tip virüsün farklı bölgelerde belirgin olarak tanımlanmasını sağladı. Örneğin, B alt tipi, Amerika'nın birçok bölgesinin yanı sıra Avrupa'da yaygın hale gelirken Afrika'da çeşitli alt tipler ve alt tipler arası rekombinantlar bulunur. Virüsün başlangıcından beri M grubu küresel olarak pandemiye egemen olurken diğer türler bölgesel olarak bu baskınlığı gösterememiştir.

2.2.4. Enfeksiyon Progresyonu

En yüksek viremi seviyeleri, akut enfeksiyon ve ilerlemiş HIV-1 hastalığı sırasında görülür. Ayrıca, asemptomatik HIV-1 ile enfekte kişilerde cinsel yolla bulaşan diğer hastalıklarla birlikte enfeksiyonlar, akut enfeksiyon sırasında görülenlere benzer seviyelere viral bulaşmayı artırabilir [38]. Bu gözlem, bazı ortamlarda HIV-1 bulaşma verimliliğinin neden daha önceki matematiksel tahminleri aştığını açıklamaya yardımcı olabilir. Bu nedenle, yakın zamanda enfekte olmuş kişilerin tespiti ve tedavisi, bulaşmayı azaltmak için önemli bir araçtır. Bununla birlikte, çoğu insan enfeksiyonun bu çok önemli ilk aylarında HIV-1 durumlarından habersizdir. Antikor geliştirmeden önce erken enfeksiyonun etkin bir şekilde tanımlanması için laboratuvar testlerine ve klinik algoritmalara dayalı çeşitli tarama stratejileri geliştirilmekte ve test edilmektedir.

İlk olarak 5 Haziran 1981'de yayınlanan bir raporda AIDS olarak bilinen hastalık tanımlanmıştır. Gottlieb ve meslektaşları, daha önce sağlıklı olan beş eşcinsel erkeğin üçünün Los Angeles hastanesinde *Pneumocystis carinii* (şimdi *Pneumocystis jirovecii*) pnömonisi nedeniyle tedavi edildiğini, bu hasta grubunda yapılan testlerde T-lenfosit tükenmesine dair kanıtlara ulaşıldığını ve bu hastaların ikisini kaybettiklerini bildirdi. Süregelen aylarda, birkaç ABD şehrinden ek PCP vakaları, diğer fırsatçı enfeksiyonlar ve bu hasta popülasyonu arasında Kaposi sarkomu bildirildi. Bağışıklık yetmezliğinin nedeni bilinmemekle birlikte, seks partnerlerindeki vakalar ve ulusal bir vaka kontrol çalışmasının sonuçları cinsel yolla bulaşan bir enfeksiyonu düşündürdü [39].

Daha sonraki yıllar içinde HIV/AIDS algısı, başta Amerika Birleşik Devletleri olmak üzere dünyada öncelikle MSM'yi (man who have sex with men) hedefleyen tıbbi bir

ikilem algısından kurtulup dünya üzerindeki çeşitli popülasyonları tehdit eden ciddi büyüklükte bir salgına dönüştü. Farklı zamanlarda farklı ülke ve gruplarda görülüp yayılıma devam eden bir salgın hastalığın parçası olarak değerlendirilmeye başlanarak hastalığın tanımları ve önlemek için atılması gereken adımlar daha net planlandı. Süreç asemptomatik olan HIV enfeksiyon sürecinden sonra klinik yansıması olan hastalık ve devamında da komplikasyonlar sonucu ölüm ile karakterize edildi.

2.2.5 Enfeksiyondan Korunma

HIV de bulaşı önlemek hastalık bütünüyle değerlendirildiğinde önemli bir başlıktır. HIV-1 enfeksiyonunu önlemek amacıyla hamleler yapılabilmesi için HIV-1 özelinde bulaşı etkileyen parametrelerin değerlendirilip anlaşılması gerekmektedir. Bunun gibi bulaşıcı hastalıkların seyri tanımlanırken, belirlenen etkenin enfektivitesi ve ortalama enfektivite süresi, popülasyon genelinde enfeksiyonun oluşturduğu yükü artırıp arttırmayacağı değerlendirilerek salgının büyüme ve yavaşlama potansiyeli üzerinden yorum yapılır. Bulaşma dinamikleri ele alındığında, seyrin analiz edilip modülasyonun doğru bir şekilde yapılması gerekmektedir.

Bu noktada elde edilen veriler ve bunların klinik deneyimlerle sentezlenmesi ile üzerine düşünülmesi ve planlama yapılması gereken alt başlıklar oluşmuştur. Bunlar cinsel ilişki sırasında kendini koruma, ilaç enjeksiyonları sırasında korunma, anne-çocuk arasındaki geçişi göz önüne alarak korunma, temas öncesi profilaksisi gibi konulardan oluşmaktadır.

Bu konuların en önemlisi cinsel ilişki sırasında ve sonrasında kendini korumadır. HIV pozitif bir partnerin viral yükü ile HIV negatif bir partnere bulaşma riski arasında kuvvetli bir korelasyon olduğuna dair elde edilen verilere heteroseksüel çiftler arasında yapılan gözlemsel çalışmalar sonucunda ulaşılmıştır. Bu çiftler arasında viral supresyon yapan antiretroviral tedavi kapsamında HIV bulaş riskine dair yapılan randomize çalışma neticesinde ulaşılan sonuçlar erken dönemde ART alan hasta grubunda geç dönemde tedaviye ulaşan hasta grubuna göre %96'lık bir azalmanın görüldüğü HPTN 052 çalışmasıyla elde edilmiştir [38].

HIV-AIDS salgınının büyüklüğü ve bulaşmayı önlemenin aciliyeti nedeniyle, HIV önleme programları dikkatle takip edilmelidir ve zamanında değerlendirmeler yüksek önem arzemektedir. 2012 yılında, WHO, HIV ile enfekte kişilerde HIV bulaşmasını

engellemek için bir önlem olarak ART kullanımı (TasP: treatment as prevention) konusunda programlı bir güncelleme yapmış ve bu hasta gruplarını hedeflemiştir [40].

Enfeksiyonun anneden çocuğa geçişi, gebelik, doğum veya doğum sonrası emzirme yoluyla HIV'in enfekte bir anneden çocuğuna bulaşması olarak tarif edilir. HIV-2 için bu bulaş nadiren olsa da HIV-1 enfeksiyonunda anneden çocuğa bulaş sıklıkla olur. Bulaşın olduğu çocuklarda doğumda HIV semptom veya belirtilerine nadiren rastlanır ancak çoğunlukla ilerleyen aylarda bunlar görülmeye başlanır. UNAIDS'in verilerine baktığımızda dünya genelinde 2 milyona yakın çocuğun HIV-1 ile enfekte olduğu, her sene bunlara 150 bin yeni vakanın eklendiği tahmin edilmektedir. Oransal olarak bunların %80'den fazlasının anne-çocuk sağlığının büyük ölçüde tehdit altında olduğu Sahra altı Afrika'da olduğu görülmektedir.

Tanzanya'da gerçekleştirilen bir araştırmada 6 haftalık bebeklerde yapılan PCR sonuçlarına bakılarak doğum sırasında annenin 50.000 kopya/mL veya daha fazla viral yüke sahip olmasının erken bulaş riskinde 4 kat artış ile ilişkili olduğu tespit edilmiştir [41]. Maternal risk faktörleri buna ek olarak ilerlemiş HIV hastalığını, koryoamniyoniti, cinsel yolla bulaşan hastalıkları, düşük CD4+ sayısını, uzun süreli membran rüptürünü, kanamalı obstetrik olayları (perineal laserasyon, intrapartum kanama ve epizyotomi) içermektedir. Bebeklik döneminde enfeksiyonun seyri değişkendir. Enfekte olan bebeklerin %25 gibi bir oranının hızlı bir şekilde AIDS'e ilerlediği veya yaşamının ilk yılında ölüm ile sonuçlandığı tahmin edilmektedir.

2.2.6. Tedavi

Ana tedavi planı HIV'nin konak hücre üzerinde özellikle CD4+ T lenfositler üzerinden direkt olarak yapmış olduğu toksisiteyi hedeflemekte ve tüm problemlerin bu ana sorundan kaynaklandığı düşünülerek yapılmaktadır. Viral replikasyonu en kısa sürede kontrol altına almak amaç edinilmiştir. Yapılan randomize klinik çalışmalar sonucunda tedavi başlangıcındaki CD4 sayısından bağımsız bir şekilde tedaviye başlamanın faydası ortaya konulduktan sonra mevcut tedavi planı dünya üzerinde enfekte olan tüm bireylere bu tedaviyi sunmak olarak belirlenmiştir [42]. Daha sonra kişiler arası bulaş önleme üzerine yapılan çalışmalar ortaya konuldukça tedavinin önemi kanıtlanmaktadır [43].

Ters transkripsiyon, retrovirüslerin yaşam döngüsünde önemli bir adımdır ve süreç, viral tek sarmallı (ss) RNA genomundan çift sarmallı (ds) DNA'nın sentezinden oluşmaktadır. Şaşırtıcı olmayan bir şekilde, HIV replikasyonundaki ters transkripsiyon/DNA polimerizasyon aşaması, hemen bir ana ilaç hedefi olarak kabul edildi ve nükleozid analogu zidovudin (AZT), HIV'e karşı kullanılan ilk tedavi seçeneği olarak FDA tarafından 1987'de onayladı [44]. AZT, nükleosid revers transkriptaz inhibitör (NRTI) olarak kategorize edilen nükleozid timidinin sentetik bir analogudur. Timidin kinaz ile monofosfat türevine fosforillenerek enfekte olan hücrelerde etkiye başlar. Sırasıyla difosfat ve trifosfata fosforillenen AZT-monofosfatın katalizi timidilat kinaz yoluyla olur. AZT-trifosfat timidin yerine yeni sentezlenmiş viral DNA'ya eklenerek viral DNA zincir sonlandırıcısı olarak anti-viral bir ajan işlevi görür. RNA şablonundan HIV-1 ters transkriptaz ile viral DNA yapma yeteneğini engelleyerek HIV-1 yaşam siklusuna doğrudan etki eder.

AZT'nin klinik kullanımı, HIV enfeksiyonunun tek bir ilaç tedavisi ile viral yükü uzun süre baskılayıp düşük tutmada etkili olmadığını ortaya koydu. HIV'in enfekte bir kişiden temizlenmesi için yeterince güçlü olmadığı anlaşılan AZT'ye tedavi süresince duyarlılık kaybının da eklenmesi ile ilaca dirençli virüsler ortaya çıktı.

Kullanılan diğer NRTI'ler, Abakavir, Emtrisitabin, Didanosin, Lamivudin, Stavudin, Tenofovir disoproksil fumarattır. NRTI'ler, entegre proviral DNA'yı içeren konaktan virüsü elimine etmez. Yüksek düzeyde aktif antiretroviral tedaviye başlanırken tedavi protokollerinin büyük çoğunluğu bu sınıftan minimum bir ajanı içererek yapılır.

Sentetik bir timidin analogu olan Stavudin erişkin ve yenidoğan hasta grubu dahil olmak üzere kullanım için onay almasına rağmen diğer ajanların toksisite konusunda daha güvenli olmaları sebebiyle aynı didanozin gibi yaygın olarak kullanılmamaktadır.

Bir sitidin analogu olan Lamivudin kronik hepatit B tedavisinde onaylanmasının yanı sıra erişkin ve 3 aydan daha büyük çocuk hasta grubunda HIV için de onaylı olarak kullanılan bir ilaçtır. Güvenilirlik ve etkinlik ön planda tutulduğunda hem naife hasta grubunda hem de tedavisi devam edenlerde diğer antiretroviral ilaçlarla birlikte kullanılarak kombinasyon tedavisinde önemli bir yere sahip olmuştur.

Diğer antiretroviral ajanlarla kombinasyonda kullanılan Abacavir bir sentetik pürin analogudur. AZT ve lamivudin ile günde iki kez kullanılan, lamivudin veya lamivudin ve dolutegravir ile günde bir kez kullanılan koformülasyonları mevcuttur.

Tamamlanmamış bir riboz halkasına sahip 5'-AMP türevi olan Tenofovir, HIV-1 ve HBV tedavisinde kullanılmaktadır. Oral absorpsiyonunu arttırmak için disoproksil ile iyileştirilen ilaç enfeksiyon riski olduğu durumlarda maruziyet öncesi kullanılmak amacıyla kimyasal yapı olarak lamuvidine benzemesi sebebiyle birçok ortak özelliğe sahip başka bir sitidin analogu olan emtrisitabin ile kombinasyon halinde erişkinler için kullanım onayı almıştır. Eğer virüs suşlarında zidovudin ve stavudine karşı direnç gelişimi görüldü ise bu hasta grubunda tenofovir için etkinlik azalır.

Bu ilaç grubunun bir kısmı insanda DNA polimeraz α ve β için düşük düzeyde afinite gösterse de mitokondriyal bir enzim olan DNA polimeraz γ 'yı inhibe eder. Mitokondriyal DNA sentez aşamalarında görülen bu kısmi inhibisyon periferik nöropati, granülositopeni, pankreatit gibi önemli toksisiteler için bir sebep olarak gösterilmektedir [45].

Nonnükleosid revers transkriptaz inhibitörleri (NNRTI'ler), HIV-1 ters transkriptazın p66 alt birimi üzerindeki hidrofobik bir alana bağlanan kimyasal substratları ile 3 boyutlu yapıda meydana getirdiği konformasyonel değişiklik sayesinde enzim aktivitesini azaltarak non-kompetitif inhibitörler olarak etki gösterirler. Bu bağlanma bölgeleri virüse özgü olduğundan HIV-1 tedavisinde kullanmasına rağmen diğer retrovirüslere etkili değildir. Onaylanan NNRTI'ler nevirapin, efavirenz, etravirin, rilpivirin ve delavirdindir.

Bu ilaç grubu oldukça etkili olmasına rağmen direnç gelişimi problem olduğu için diğer ilaçlarla kombine şekillerde kullanılmakta, monoterapide tek ajan kullanımı ya da başarısız bir tedavi planına sonradan dahil edilme gibi bir olanağa sahip değildir. Nevirapin'in diğer ajanlara ulaşımın kısıtlı olduğu durumlarda tek doz kullanımı bile hastaların kayda değer bir kısmında direnç gelişimi ile karşılaşmamıza neden olmaktadır [46].

Diğer bir NNRTI olan Efavirenz etkinlik profili ile kombinasyon tedavilerin içerisinde iki NRTI ile beraber naive hastalar için tercih edilen bir rejim olmasına rağmen zamanla yerini aynı etkinlik profiline sahip daha iyi tolere edilebilen ilaçlara

bırakmaktadır. HIV-1'e karşı güçlü aktiviteye sahip, diarilpirimidin NNRTI grubu Rilpivirin mevcut NNRTI'ler içerisinde en iyi yan etki profiline sahip olması ile ön plana çıkmaktadır, Efavirenz ile karşılaştırıldığında MSS yan etkisi yok denecek kadar azdır. Eğer bu ilaca direnç gelişip rejim başarısız olursa büyük ihtimalle diğer NNRTI'ler için de aynı direnç gelişecektir. Yine bir diarilpirimidin NNRTI olan Etravirin'in NNRTI bağlama cebinde konformasyonel esnekliğe sahip olması HIV-1 revers transkriptaz fonksiyonu üzerinde inhibisyon gücüne sahip olmasını sağladığı için diğer NNRTI'lara direnç geliştiği durumda kullanım onayına sahiptir.

Proteaz inhibitörleri (PI), virüs aspartil proteazını, fenilalanin ve prolin arasındaki prolin kalıntılarının N-terminal kısmını hedefleyerek yarışmacı bir şekilde inhibe ederler. Bu gruptaki ilaçların, ilaç etkileşimleri açısından bir potansiyele sahip olması sebebiyle kullanımında dikkatli olunması gerekir. Ritonavir enzimin aktif bölgesinin C2 simetri aksını hedefleyen bu amaçla geliştirilmiş peptidomimetik HIV proteaz inhibitörü bir ilaçtır. Lopinavir yapısal olarak benzediği ritonavire göre daha güçlü etki profiline sahiptir, daha önce tedavi rejiminde PI alıp başarısız olmuş hasta grubunda önemli derecede antiretroviral etkisi vardır [47]. Yetişkin ve 3 aylıktan büyük pediatrik hasta grubunda kullanılan diğer bir PI olan Atazanavir HIV-1 ve HIV-2'nin tedavisinde kullanılan diğer bir ilaçtır. Peptid yapıda olmayan Darunavir etkisini HIV proteazın aktif kısmını hedeflemesinin yanı sıra proteaz dimerizasyonunu önleyerek de yapan bir proteaz inhibitörüdür.

Giriş inhibitörleri olarak adlandırılan diğer bir ilaç grubu enfuvirtid ve maraviroktan oluşmaktadır. Maravirok konak CCR5 reseptörüne bağlanarak viral gp120'nin bağlanmasını engelleyen bir kemokin reseptör antagonisti iken Enfuvirtid gp41 ve CD4 etkileşimleri üzerinden füzyon inhibisyonu yapar[48]. Maravirok'un CXCR4-tropik etkinliğe sahip olmaması ilaç tedavisine başlandığında tropizimde CXCR4 baskınlığına doğru bir kayma yaşanması ile beraber ilaca direnç gelişmesine neden olabilir. Birlikte kullanıldığı ilaçların metabolik etkileşimlerine göre 3 ayrı başlangıç dozu onayına sahip olan tek antiretroviral tedavi ajanı Maraviroktur. HIV-2'ye karşı etkinliği olmayan ancak HIV-1'in klinik suşlarına karşı etkili sentetik bir peptid olan Enfuvirtid, ilacın maliyeti ve uygulama şekli zorlukları sebebiyle kısıtlı bir hasta grubunda kullanılmaktadır. Parenteral olarak uygulanması gereken onaylı tek

antiretroviral ilaç olan Enfuvirtid CD4+ hücrelerini hedefleyen serbest virüs partiküllerinin füzyonunu engelleyerek enfeksiyonu inhibe eder.

Viral olarak kodlanan üç enzimatik sürecin tanımlanıp net tedavi hedefleri sunması üzerine klinik kullanımda Ters transkriptaz ve proteaz inhibitörleri daha hızlı bir şekilde yer edinmesine rağmen viral entegrasyon sürecinin inhibisyonu tedavi şemasına daha sonra dahil olmuştur. HIV integraz inhibitörleri muhtemelen integrazın katalitik çekirdeğinin iki değerlikli katyonları ile etkileşime girerek konakçı ve viral DNA arasında kovalent bağların oluşumunu engelleyerek iplik transfer adımını inhibe eder. İntegrazın katalitik etkisini hedefleyen böylelikle viral DNA'nın konak entegrasyonunu bloke eden Raltegravir hem HIV-1 hem de HIV-2 üzerine etkili bir integraz inhibitörüdür. Elvitegravir aynı mekanizma ile etkili diğer bir integraz inhibitörü olması sebebiyle diğer antiretroviral ilaçlara karşı gelişen direnç durumlarında kullanılmasına karşın Raltegravir'i etkileyen mutasyonlarda çapraz direnç geliştirebilir. Bu grubun diğer bir ajanı olan Dolutegravir ise raltegravir veya elvitegravire direnç gelişen bazı durumlarda da aktivitesine devam edebilmektedir.

1996 yılına gelindiğinde araştırmalar, HIV tedavisi için ilaçları kombine etmenin avantajlarını gösterdi. Günümüzde ilaç direnci hala tedavinin önemli bir zorluğunu oluşturmaktadır. Tedavi hedeflenmeyen her enfekte birey HIV yüksek mutasyon oranları ile kullandığımız her ilaç için bir noktaya kadar direnç gösterebilir[49]. Bu sebeple tüberküloz tedavisine benzer strateji ile ilaç direncinin önüne geçmek amacıyla kombine tedaviler gereklidir. Genellikle, HAART olarak adlandırılan bir tedavi rejiminde üç veya dört ilaç birleştirilir. Bu tedavi şekli, Sağlık ve İnsan Hizmetleri Departmanı ve WHO tarafından HIV'li tüm hastalar için önerilmektedir. Doğru tedavi stratejilerini ve kombinasyonlarını seçmek, belirli faktörler nedeniyle zordur; farklı coğrafi koşullar ve sosyoekonomik durumlar sebebiyle ilaçlara ulaşımındaki kısıtlılıklar, kişiye özel verilen tedavilerde hasta uyumu ve ilaçlar arasında etkileşimler, uzun dönem ilaç kullanımı sonucunda ortaya çıkan yan etki maruziyeti sorunları, ilaç dirençli türlerin ortaya çıkışı, tedavi başlangıcı veya süreci sırasında farklı cevap profilleri ile karşılaşma gibi problemler olası tedavi seçimlerini kısıtlayabilir. Tipik bir başlangıç HIV rejimi, en az iki ilaç sınıfından üç HIV ilacı içerir. Bu protokol, tedavi edici olmasa da hastalar için daha uzun ömür sağlayabilir ve HIV bulaşmasını

azaltabilir. Ancak bir hastanın alabileceği ajan sayısı toksisite ve yan etkiler nedeniyle sınırlıdır.



3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

Çalışmamız 08.09.2021-178384 tarih ve sayılı İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa-Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu onayı sonrasında başlatıldı.

3.1. Biyoinformatik Analiz

3.1.1. Etkileşim ağları

Biyoinformatik, genomik ve bunların bir yansıması olan klinik bilgilerin bütünleştirici bir şekilde kullanılmasıyla, hastalık mekanizmalarının daha derinden anlaşılmasını sağlamak amacıyla başvurulmuş bir yöntemdir. Bu verileri değerlendirip klinik süreç hakkında tahminlerde bulunmak amacıyla belirli veri kümelerine başvurulmaktadır. STRING database (*'Search Tool for Retrieval of Interacting Genes/Proteins'*) belirli bir biyolojik işleve birlikte katkıda bulunan proteinler arasındaki ilevsel ilişkileri değerlendirir. Veri kümesinde çok sayıda organizma (5090) ve protein (24,6 milyon) içermesi ve çok geniş ve çeşitli karşılaştırmalı verilere sahip olmasıyla bilinmektedir. Proteinlerin arasındaki fiziksel etkileşimi ilişkilendirmekten ziyade hücredeki fonksiyonel görevlerinin belirli bir ortak paydada buluşması ve bunun bir yolak olarak tanımlanabilecek şekilde spesifik olması fark yaratmaktadır. Bu veri kümesinde sistemik genom karşılaştırmalarına dayanan tahminler, gen ifadesi veri setleri arasındaki korelasyona dayanan tahminler, deneylerden gelen biyokimyasal veriler, KEGG ve Gene Ontology gibi manuel olarak derlenen, önceden bilinen protein etkileşimlerinin veri setlerinden gelen tahminler bulunmaktadır.

Çalışmamız için HIV-1 ve HIV-2 için HIV-insan konak interaktomları STRING: Viruses database v 10.5 <http://viruses.string-db.org/> adresinden indirildi. HIV reseptörleri için etkileşim ağı CD4-CD8 (ENSG00000010610), CCR5 (R5, ENSG00000160791) ve CXCR4 (X4, ENSG00000121966) etkileşim ağı, bu reseptörlerin I seviye etkileşimcileri tam İnsan interaktom versiyonu 11.0b'den, stringApp v1.5.1'ten [50] Cytoscape yazılımı v3.8.2 [51] aracılığıyla alınarak görselleştirildi ve oluşturuldu. Disgenet_database'den, 807 gen

<https://www.disgenet.org/browser/0/1/0/C0019693/> dahil olmak üzere HIV Enfeksiyonları (C0019693) için gen-hastalık ilişkilerinin bir listesi indirildi. GWAS kataloğundan HIV-1 enfeksiyonu (EFO_0000180, 2021-09-23) için 12 çalışma, 143 ilişkilendirme ve 82 rapor edilmiş genin dahil olduğu bildirilen 6 özellik (HIV-1 kontrolü, HIV-1 progresyonu, HIV-1 replikasyonu, HIV-1 duyarlılığı, HIV-1 viral ayar noktası, HIV-1 enfeksiyonunda ayar noktası viral yükü) indirildi.

Aşağıda Gene Ontology prosesleri ilgili gen listeleri bulunmaktadır:

Tablo 3.1 Gene Ontology prosesleri ilgili gen listeleri

GO_process
CD8-positive, alpha-beta T cell differentiation
CD4-positive or CD8-positive, alpha-beta T cell lineage commitment
Negative regulation of CD8-positive, alpha-beta T cell differentiation
Regulation of CD8-positive, alpha-beta T cell differentiation
Regulation of CD8-positive, alpha-beta cytotoxic T cell extravasation
CD8-positive, alpha-beta T cell activation
Positive regulation of CD8-positive, alpha-beta T cell proliferation
Positive regulation of CD8-positive, alpha-beta T cell activation
Regulation of CD8-positive, alpha-beta T cell activation
Positive regulation of CD8-positive, alpha-beta T cell differentiation
CD8 receptor binding
Positive regulation of CD8-positive, alpha-beta cytotoxic T cell extravasation
Negative regulation of CD8-positive, alpha-beta T cell activation
Negative regulation of activated CD8-positive, alpha-beta T cell apoptotic process
CD8-positive, alpha-beta T cell differentiation involved in immun response
Positive regulation of activated CD8-positive, alpha-beta T cell apoptotic process
CD8-positive, alpha-beta T cell lineage commitment
Negative regulation of CD8-positive, alpha-beta T cell proliferation
Regulation of CD8-positive, alpha-beta T cell proliferation
CD8-positive, alpha-beta intraepithelial T cell differentiation
CD8-positive, alpha-beta intraepithelial T cell differentiation
Positive regulation of CD8-positive, alpha-beta T cell extravasation

Veri entegrasyonu ve biyoinformatik analizlerin tüm adımlarında R paketimiz wizbionet kullandık [52]. Toplanan tüm genler, daha fazla miRNA tahmin analizi ve etkileşim ağları oluşturmak için kullanıldı.

3.1.2. Doku Ekspresyon analizi

Tahmin edilen miRNA'ların kan ekspresyonu seviyesi, 0,5'ten yüksek doku ekspresyonu güven skoru için entegre edilen tüm bağlantılar indirilip kullanılmak amacıyla TISSUES 2.0 veritabanından alındı [53].

3.1.3. Etkileşim ağı analizi

HIV ve konakçı genler arasındaki bağlantıları analiz etmek için, Cytoscape 3.7.2'de, bilinen ve tahmin edilen protein-protein etkileşimleri dahil olmak üzere StringApp (Etkileşimdeki Genlerin/Proteinlerin Alınması için Arama Aracı) veri tabanından insan interaktom verilerini kullanarak bir protein-protein interaction (PPI) ağı oluşturduk[50,51].Etkileşim ağları, bu genler arasındaki işlevsel ilişkileri temsil eden edgelerle birbirine bağlanan bir dizi genden (noddan) oluşuyordu. StringApp tarafından önerildiği gibi, 1 olası en yüksek güven ve 0 en düşük olmak üzere, edge etkileşim güven sınırı $>0,4$ (orta güven) olan bağlantıları dikkate aldık.

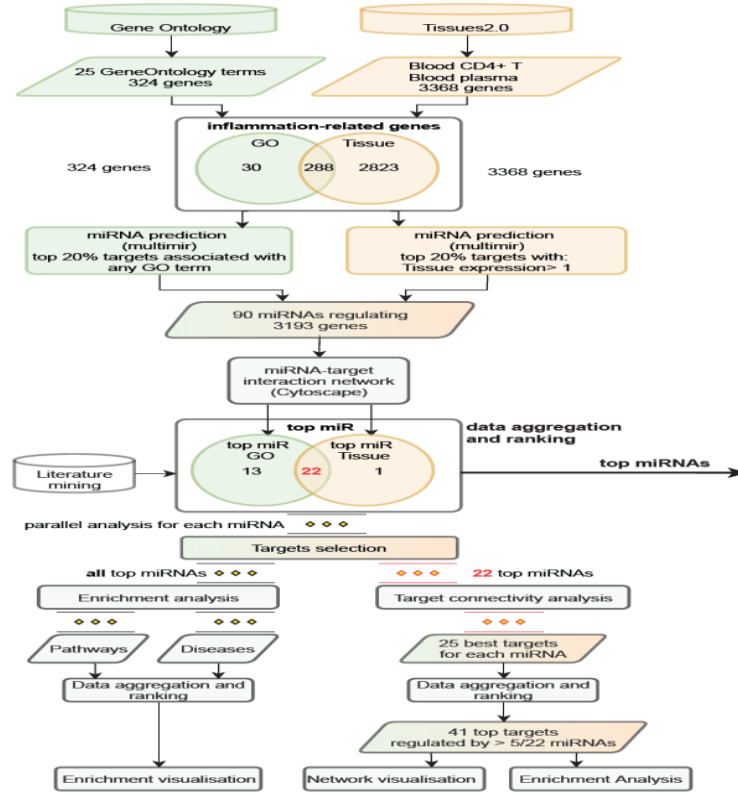
3.1.4 Enrichment analizi

Enrichment analizi, çalışmayla ilgili en önemli biyolojik süreçleri belirleme olasılığını artırmak için bir hesaplama yöntemidir [54]. Hastalıkların ve ağların Enrichment analizi, EnrichR veritabanı API eklentisi ile [55], Fisher exact testi Benjamini ve Hochberg metodu kullanılarak, referans, her bir gen seti kütüphanesindeki her terim için önceden hesaplandı. Sinyal yolları BioPlanet2019 ve Human KEGG 2019 datasetleri kullanılarak analiz edildi. Hastalıklar DisGenet Dataset ve Rare Diseases AutoRIF Gene List'e göre analiz edildi. Tüm istatistiksel analizlerde, anlamlılık sınırı düzeltilmiş p değeri $\leq 0,05$ olarak ayarlandı. Tüm analizlerde BH düzeltmeli p değeri cutoff değeri 0,05'ten düşük olarak ayarlandı. EnrichR, 190'dan fazla ontolojik veritabanına analitik erişim sağlamaktadır. (<https://maayanlab.cloud/Enrichr/#libraries>). Tüm analizlerde BH düzeltmeli p değeri cutoff değeri 0,05'ten düşük olarak ayarlandı. En iyi 20 ontolojik sonucun görselleştirilmesi, ggplot2 ve ggrepel kitaplıkları kullanılarak R'de gerçekleştirildi [55].

3.1.5. miRNA tahminleri

HIV ile ilgili genleri düzenleyen miRNA'ları tanımlamak için önceki yayınlara benzer şekilde varsayılan ayarlarla R ve multimiR paketini kullandık[56,57]. HIV ile ilgili genleri düzenleyen miRNA'ları tanımlamak için multiMiR 1.4 R paketini kullandık [58]. Korunan tüm hedef bölgelerini 14 hedef tahmin veritabanında taradık. Her bir harici veritabanının en çok tahmin edilen %20'lik hedef bölgeleri sorgulandı.

MiRNA-hedef etkileşim ağları, R'de oluşturuldu ve Cytoscape'de, StringApp paketi sürüm 1.4.2'den alınan etkileşim verileriyle birleştirildi. Rcy3 [59] ve wizbionet R paketini kullanarak, her bir miRNA tarafından düzenlenen hedef sayısının ve her bir miRNA için her bir hedefin bağlantı derecesinin otomatik bir hesaplamasını yaptık. Bu hesaplamalar, en iyi miRNA'ları ve en iyi hedeflerini belirlememizi sağladı. OneR algoritmasını kullanarak, GO ve dokuya özgü gen listelerinden en yüksek sayıda hedefi düzenleyen miRNA'ların ilk iki kümesinde mevcut olarak tanımlanan op miRNA'ları seçtik. Gen-gen etkileşim verileri, Cytoscape için StringApp paketi sürüm 1.4.2'den alındı [50]. Ağı görselleştirmek için, nodları bağlantılarına göre sıralayan dereceli bir dairesel düzen uyguladık. MiRNA'lar, düzenlenmiş en iyi hedeflerin sayısına göre sıralanırken, hedefler diğer en iyi hedeflerle bağlantılarının sayısına göre sıralandı. MiRNA'lar tarafından düzenlenen gen sayısının kümelenmiş biçimde görselleştirilmesi, <https://software.broadinstitute.org/morpheus> kullanılarak yapıldı. Mirna keşfi, yapısının analizi, hedef tahminleri, diğer biyolojik süreçlerle ilişkisini içeren ve bu amaçlarla geliştirilen biyoinformatik araçlar ile hedeflediğimiz hasta grubunda prediktif olarak en güçlü eşleşen miRNA'ların 2'sini seçtik.



Şekil 3.1 Biyoinformatik analiz özet şeması

3.2. Olgu seçimi

Çalışmamız İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa-Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji polikliniğine başvuran, dahil edilme kriterlerini karşılayan 15 hastanın katılımıyla gerçekleştirildi. Buna ek olarak hastalarımızın demografik özelliklerini göz önünde bulundurarak seçtiğimiz 20 gönüllü çalışmaya kontrol grubu olarak dahil edildi. Çalışmanın başlangıç aşamasında bütün hastalara bilgilendirilmiş onam formu verilerek doldurmaları istendi ve onamları alındı.

Çalışmaya Dahil Edilme Ölçütleri:

1. HIV-1 pozitif teşhisi konulan hastalar
2. ART başlanmamış naif hastalar
3. Tedaviye başlandığında BIKTARVY (Biktegravir sodyum, emtrisitabin ve tenofovir alafenamid fumarat içerir.) adlı ilaç protokolü başlanması planlanan hastalar
4. Sağlıklı popülasyon için polikliniğe herhangi bir sebeple başvurmuş ancak herhangi bir sağlık sorunu saptanmamış gönüllüler
5. 18 ve üzeri yaş erişkinler

6. Gelecekteki çalışmalar için kanın depolanmasını kabul eden gönüllüler

Çalışmadan Dışlanma Ölçütleri:

1. Hamile ve /veya emzirdiği bilinen kadınlar
2. Başka bir yerde tedaviye başlanmış olması
3. Tekrarlanan kan alımlarının veya enjeksiyonlarının hasta için ciddi pıhtılaşma bozuklukları veya önemli ölçüde bozulmuş venöz dolaşım riski oluşturduğu durumlar
4. Katılımcının hayati tehlikesini önlemek için aktif tıbbi müdahale veya izlem gerektiren komorbid bir durum

3.2.1 Örnek alımı

Çalışmaya katılacak hastalardan analiz için başlangıçta ve 6. haftada olmak üzere toplam 2 defa ve her defasında 10 ml bir tüp kan örnek alınıp, izne tabi olmak üzere ileride yapılacak çalışmalarda kullanılmak üzere örneklerin saklanması planlandı.

Tablo 3.2 Çalışma grupları ve kan örnekleme protokolü

	BAŞLANGIÇ		6. HAFTA	
	MiRNA'ların ölçülmesi	Viral Yük/ Biyobelirteçlere bakılması	MiRNA'ların ölçülmesi	Viral Yük/ Biyobelirteçlere bakılması
Grup 0 N:20	X	X		
Grup I N:15	X	X	X	X
Grup 0: Sağlıklı populasyon -kontrol Grup I: Naive HIV hasta X: Kan örneği alındığını belirtmektedir.				

3.3 MiRNA sonuçlarının validasyonu

Biyoinformatik analiz ile elde ettiğimiz verilerin qRT-PCR kullanılarak validasyonunu sağladık, bu aşamaların protokolleri aşağıda ayrıntılı şekilde açıklandı:

Kullanılan Aletler ve Malzemeler

Çalışmamızda kullanılan alet ve sarf malzemelerinin açıklaması aşağıdaki tabloda detaylı şekilde yer almaktadır.

Tablo 3.3. Çalışma sırasında kullanılan cihazlar

Cihaz Adı	Cihaz Markası
Nanodrop	Invitrogen™ NanoDrop™ Spectrophotometers
PCR	Applied Biosystems™ MiniAmp™ Thermal Cycler
Real Time PCR	Applied Biosystems™ 7500 Real-Time PCR System
Santrifüj	Neofuge 13R-Refrigerated Centrifuge-Heal Force Bio

Tablo 3.4 Çalışma sırasında kullanılan sarf malzemeler

Sarf Malzemesi Adı	Sarf Malzemesi Markası	Sarf Malzemesi modeli
MiRna İzolasyon Kiti	Thermofisher	AM1561
Nükleaz Free, Ultra Distile Su	Gibco™	15230162
cDNA Kiti	Applied Biosystems™	A28007
Real Time PCR Master Mix	Applied Biosystems™	4444557
Fenol kloroform	Invitrogen™	AM9722

3.4 Kan Örneği Toplama

Kan örneklerinin toplanma aşaması için HIV hastaları ile çalışma konusunda deneyimi olan, enfeksiyon konusunda bilgilendirilmiş bir hemşireden hizmet aldık. Kan numuneleri 5 ml hacmindeki EDTA'lı tüplerde toplandı. Kolun üst ekstremitte damarlarının bulunduğu kısma turnike uygulandı. Alan dezenfekte edildikten sonra

venöz kan alımı için iğne damara sokuldu. Kan, kullanacağımız tüpe dolmaya başladığı anda turnike açıldı. Yeterli miktara ulaşan tüp mekanizmadan ayrılarak en az 3-4 defa ters çevirmek suretiyle karıştırıldı. Daha sonra bu EDTA'lı tüp dik bir durumda işlemin devamı için bekletildi. Hastanın kolundan çıkarılan iğne uygun koşullarda tıbbi atık olarak atıldı. İşlem yerine kanama duruncaya kadar uygulanmak üzere pamuk konuldu ve durduğu zaman yara bandı ile kapatıldı. Aldığımız örnek tüpü üzerine hastanın kimlik bilgileri, kanın alındığı tarih ve saatinden oluşan etiket yerleştirildi. Son olarak elde ettiğimiz bu örneğin en uygun şartlarda çalışılıp plazma izolasyonunun sağlanması için laboratuvara transferi sağlandı.

3.4.1 Plazma İzolasyonu

Kullandığımız protokollere göre miRNA analizi için çift santrifüjleme işlemi gerçekleştirdik. Elde ettiğimiz örnekler, kan alma işlemi gerçekleştirildikten sonra 30 dakika içerisinde santrifüjlendi. Bu işlem 20 dakika süresinde, 20°C'de 1560 xg derecesinde gerçekleştirildi. Elde edilen plazmanın yaklaşık %60'ı Pasteur pipet vasıtasıyla dikkatli bir şekilde toplandı. Bu kısım 5 ml'lik yeni bir santrifüj tüpüne aktarılarak tekrar 20 dakika süresinde, 20°C'de 1560 xg derecesinde santrifüj işlemine tabi tutuldu. Parçalanan hücre artıklarından kaçınmak amacıyla supernatant tekrar toplandı. Pipetle karıştırılan plazma kullandığımız 1.5ml'lik tüplere 250 µl'lik numuneler olarak ayrıldı. Bu plazma daha sonra yapacağımız işlemler için uygun olan -80°C düzeyinde saklanmak amacıyla dondurucuya kaldırıldı.

3.5 RNA İzolasyonu

Çalışma günü -80°C dondurucudan çıkarıldıktan sonra yarım saat içerisinde protokole uygun işlemlere başlandı.

3.5.1 Örnek Hazırlanması

3.5.1.1 Total plazma RNA ekstraksiyonu:

Total RNA ekstraksiyonu için mirVana miRNA Isolation Kit kiti (Applied Biosystems, CA) kullanıldı. 250 µl miktarında plazma numuneleri kullanıldı. RNA ekstraksiyonundan önce, elde ettiğimiz tüm plazma numuneleri buz üzerinde tamamen çözüldü. Kalan hücre artıklarını ortamdan uzaklaştırmak amacıyla 15 dakika süresince

4°C 20.000 xg derecesinde tekrar bir santrifüjleme yapıldı. Bu basamaktan sonra 250 µl miktarında plazma numunesi dikkatli bir şekilde yeni bir 2 ml'lik DNA-LoBind tüpüne (Eppendorf, Almanya) transfer edildi. Bu numune, üreticilerin protokollerinde açıklanan hacimlerde denatüre edici tamponla karıştırıldı. Bir vorteks karıştırıcıya yerleştirilerek 15 saniye boyunca 3,000 rpm'de muamele edilen numune daha sonra plazma RNazlarının tamamen etkisiz hale gelmesi amacıyla 5 dakika oda sıcaklığına bırakıldı. U6 snRNA, miR Ct değerlerini normalleştirmek için endojen kontroller olarak kullanıldı [60,61].

Ayrıca literatürde açıklandığı gibi, normalizasyon olarak kullanmak için ekstraksiyon aşamasında her numuneye 5 nmol/L sentezlenmiş *Caenorhabditis elegans* (cel) miRNA (cel-miR-39,5'- CACCGGGUGUAAAUCAGCUUG-3') (Integrated DNA Technologies) eklendi [62–64].

Total RNA, 30 µl nükleaz içermeyen su (Applied Biosystems, CA) ile yıkandı.

3.5.1.2 RNA kalite kontrolü

Ekstre edilen RNA verimi ve kalitesi, 2100 Bioanalyzer (Agilent Genomics, ABD) kullanılarak değerlendirildi.

3.6 miRNA cDNA Sentezi

cDNA sentezi için TaqMan Advanced miRNA cDNA Synthesis Kit kiti kullanıldı. Bu kit, ters transkripsiyondan önce her bir uçta numunede bulunan olgun miRNA'ları arttırmak amacıyla bir adaptör dizisinin 3' poli-A kuyruğunu ve 5' ligasyonunu kullanır. Universal RT primerleri, olgun miRNA'ların hem 5' hem de 3' uzatılmış uçlarında bulunan universal dizileri tanır. Numunedeki tüm mature miRNA'lar, cDNA'ya kopyalandı.

Tablo 3.5 Çalışma sırasında kullanılan malzemelerin saklanma koşulları

Kullanılan malzemeler	Saklama koşulları
------------------------------	--------------------------

10X PolyA Buffer	-5 / -30°C arası
ATP, 10mM	
Poly A Enzyme, 5 U/μL	
5X Ligase Buffer	
RNA Ligase, 10 U/μL	
50% PEG 8000	
25X Ligation Adaptor	
10X RT Enzyme Mix	
20X Universal RT Primer	
dNTP Mix, 100mM	
20X miR-Amp Primer Mix	
5X RT Buffer	2–8°C
2X miR-Amp Master Mix	

3.6.1. Poli(A) kuyruk reaksiyonu

Numuneler ve cDNA sentez reaktifleri, iyice karışması için buz üzerinde eritildi ve vortekslendi, ardından içeriği ters yüz etmek ve hava kabarcıklarını ortadan kaldırmak için santrifüjlendi. Poli(A) Reaksiyon Karışımı, üretici protokolüne göre hazırlandı ve aşağıdaki tabloda belirtildi.

Tablo 3.6 Poli(A) Reaksiyon Karışımı

İçerik	1 Rxn	4 Rxns	10 Rxns
<i>10X Poly(A) Buffer</i>	0.5 μL	2.2 μL	5.5 μL
<i>ATP</i>	0.5 μL	2.2 μL	5.5 μL
<i>Poly(A) Enzyme</i>	0.3 μL	1.3 μL	3.3 μL
<i>RNase-free water</i>	1.7 μL	7.5 μL	18.7 μL
Total Poli(A) Reaksiyon Karışımı miktarı (<i>Total Poly(A) Reaction Mix volume</i>)	3.0 μL	13.2 μL	33 μL

Reaksiyon tüpü veya platelerinin her bir kuyucuğuna 2 μl RNA ilave edildi, ardından her bir kuyucuğa veya tüpe 3 μl Poly(A) Reaksiyon Karışımı aktarıldı. Toplam hacim kuyucuk veya tüp başına 5 μl idi. Reaksiyon tüpleri kapatıldı ve içeriklerin iyice karışması için az bir miktarda vortekslendi. Reaksiyon tüpleri, içeriği ters yüz etmek

ve hava kabarcıklarını ortadan kaldırmak için santrifüjlendi. Reaksiyon tüpleri termal döngü cihazına yerleştirildi, ardından aşağıdaki tabloda gösterildiği gibi standart döngü kullanılarak inkübe edildi.

Tablo 3.7 Termal döngü cihazındaki işlemin adımları

Adım	Sıcaklık	Süre
<i>Polyadenylation</i>	37°C	45 dakika
<i>Stop reaction</i>	65°C	10 dakika
<i>Hold</i>	4°C	<i>Hold</i>

3.6.2 Adaptör ligasyon reaksiyonu

1,5 mL'lik bir mikrosantrifüj tüpünde, aşağıdaki tabloya göre gereken sayıda reaksiyon için yeterli Ligasyon Reaksiyon Karışımı hazırlandı.

Tablo 3.8 Adaptör Ligasyon reaksiyon karışım içeriği

İçerik	1 Rxn	4 Rxns	10 Rxns
<i>5X DNA Ligase Buffer</i>	3 µL	13.2 µL	33 µL
<i>50% PEG 8000</i>	4.5 µL	19.8 µL	49.5 µL
<i>25X Ligation Adaptor</i>	0.6 µL	2.6 µL	6.6 µL
<i>RNA Ligase</i>	1.5 µL	6.6 µL	16.5 µL
<i>RNase-free water</i>	0.4 µL	1.8 µL	4.4 µL
Total Ligasyon Reaksiyon Karışımı miktarı (Toplam Ligation Reaction Mix volume)	10 µL	44 µL	110 µL

Ligasyon Reaksiyon Karışımı, 1.5 ml'lik mikro santrifüj tüpünde karıştırmak için vortekslendi, ardından içeriği ters yüz etmek ve hava kabarcıklarını ortadan kaldırmak için santrifüjlendi. 10 uL Ligasyon Reaksiyon Karışımı, poli(A) kuyruk reaksiyon ürünü içeren her bir reaksiyon platenin kuyucuğuna veya reaksiyon tüpüne aktarıldı. Toplam hacim kuyu veya tüp başına 15 µl idi. Reaksiyon plate veya tüpleri, içerikleri karıştırmak için vortekslendi. Reaksiyon tüpleri termal döngü cihazına yerleştirildi, ardından aşağıdaki tabloda gösterildiği gibi standart döngü kullanılarak inkübe edildi.

Tablo 3.9 Termal döngü cihazındaki işlemin adımları

Adım	Sıcaklık	Süre
<i>Ligation</i>	16°C	60 dakika
<i>Hold</i>	4°C	<i>Hold</i>

3.6.3 Revers transkripsiyon (RT) reaksiyonu

İçeriği karıştırmak amacıyla vortekslenen yeterli miktardaki RT Reaksiyon karışımına, bu işlemler ardından hava kabarcıklarından kurtulmak amacıyla santrifüj işlemi uygulandı. RT Reaksiyon karışımından 15 µL alınarak, Ligasyon Reaksiyon karışımı ürünü içeren her bir reaksiyon platenin kuyucuğuna veya reaksiyon tüpüne aktarıldı. Total hacmin 30 µL içerik, termal döngü cihazında üreticinin sağladığı protokole göre işleme tabi tutuldu. Uyguladığımız tüm adımları üreticinin sağladığı protokole göre gerçekleştirdik. Daha sonraki analizlerimiz için bu RT reaksiyon ürünü, sağladığımız -20°C ortamında bekletildi.

İçerik	1 Rxn	4 Rxns	10 Rxns
<i>5X RT Buffer</i>	6 µL	26.4 µL	66 µL
<i>dNTP Mix (25 mM each)</i>	1.2 µL	5.3 µL	13.2 µL
<i>20X Universal RT Primer</i>	1.5 µL	6.6 µL	16.5 µL
<i>10X RT Enzyme Mix</i>	3 µL	13.2 µL	33 µL
<i>RNase-free water</i>	3.3 µL	14.5 µL	36.3 µL
Total RT Reaksiyon Karışımı miktarı (Total RT Reaction Mix volume)	15 µL	66 µL	165 µL

Adım	Sıcaklık	Süre
------	----------	------

<i>Reverse transcription</i>	42°C	15 dakika
<i>Stop reaction</i>	85°C	5 dakika
<i>Hold</i>	4°C	<i>Hold</i>

3.7 miR-Amp reaksiyonu

Kullandığımız üretici protokolüne göre gereken sayıdaki reaksiyonu sağlamak amacıyla yeterli miktarda miR-Amp reaksiyon karışımı hazırlanarak, yeni reaksiyon platenin her bir kuyucuğuna aktarıldı. Toplamda 45 µl olan miR-Amp reaksiyon karışımının aktarımı sağlandıktan sonra her bir reaksiyon kuyucuğuna 5 µl RT reaksiyon ürünü eklendi. Total hacim her bir kuyu başına 50 µl olarak hesaplandı. Bu plateler kapatılıp içeriklerinin uygun şartlarda karışması amacıyla vortekslenerek işleme devam edildi. Hava kabarcıklarını ortamdaki elimine etmek amacıyla santrifüj işlemi yapıldıktan sonra termal döngü cihazına yerleştirildi. Aşağıdaki tabloda belirttiğimiz adımlar şeklinde işlemlere devam edildi. Daha sonra yapacağımız adımlar için -20°C'de ortamında seyreltilmemiş miR-Amp reaksiyon ürünü muhafaza edildi.

Tablo 3.10 Termal döngü cihazındaki işlemin adımları

Adımlar	Sıcaklık	Süre	Döngü
<i>Enzyme activation</i>	95°C	5 dakika	1
<i>Denature</i>	95°C	3 saniye	14
<i>Anneal/Extend</i>	60°C	30 saniye	
<i>Stop reaction</i>	99°C	10 dakika	1
<i>Hold</i>	4°C	Hold	1

3.8 TaqMan® Fast Advanced Master Mix

Numuneler buz üzerinde eritilip yeterli miktarda karışması amacıyla vortekslenildikten sonra hava kabarcıklarının eliminasyonu için santrifüjleme işlemi yapıldı. 5 µl miktarındaki miR-Amp reaksiyon ürünü, 45 µl miktarındaki 0.1X TE tamponuna ilave edilerek seyreltildi. İçeriklerin karışmasını sağlamak için TaqMan® Fast Advanced Master Mix vortekslenildi. Üreticiden sağlanan protokole uygun şekilde gereken düzeydeki reaksiyon sayısı için yeterli miktarda PCR Reaksiyon Karışımı hazırlandı.

İçeriğin karışması amacıyla vortekslendikten sonra hava kabarcıklarının eliminasyonu için santrifüj edilip PCR reaksiyon platenindeki her bir kuyucuğa aktarılan 15 µl PCR reaksiyon karışımına 5 µl seyreltilmiş cDNA template eklendi. Reaksiyon kuyucuğu başına toplam hacim 20 µl olarak elde edildi. Adheziv bir örtü ile kapatılan reaksiyon plate devamında içeriklerin karışması amacıyla vortekslendi.

Tablo 3.11 Çalışma sırasında kullandığımız miRNA'ların primer dizileri

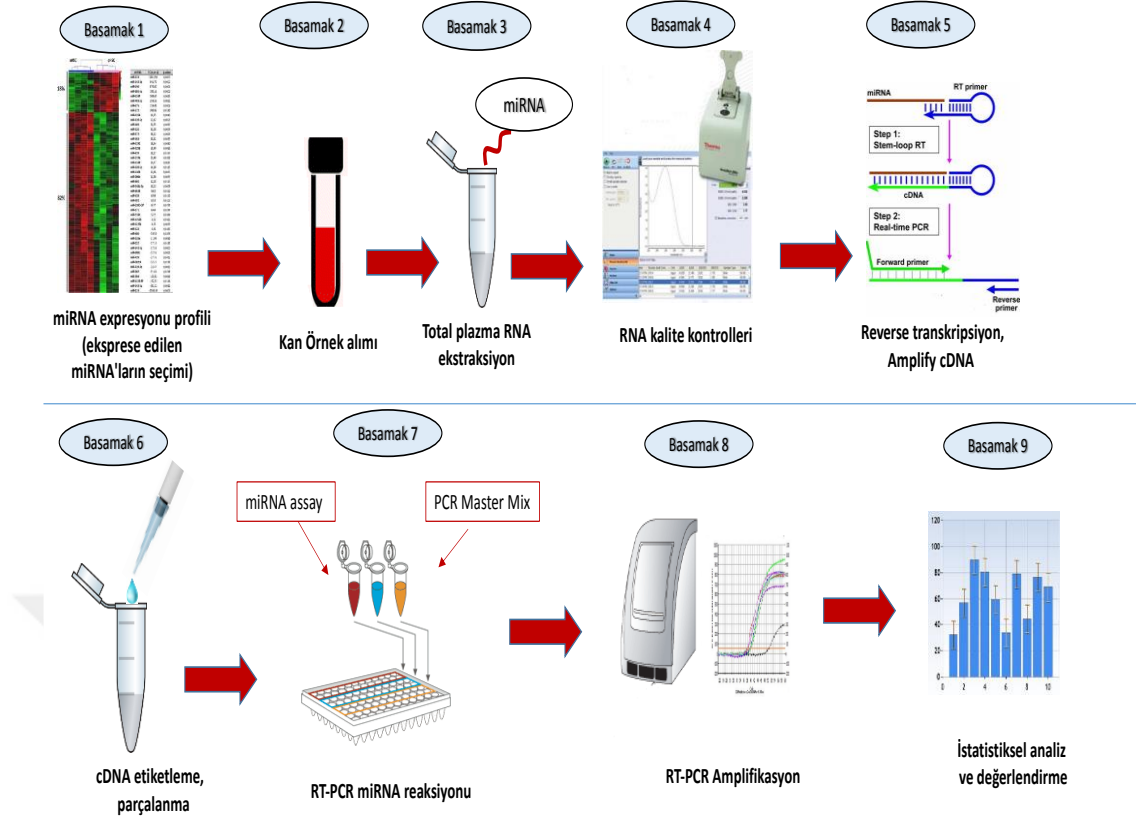
miR-27a-3p	F:TGCGGTTACAGTGGCTAAG, R: CTCAACTGGTGTCTGTGGA
MiR-548c-3p	F:ACACTCCAGCTGGGCAAAAATCTCAA, R: CTCAACTGGTGTCTGTGGA
U6 snRNA	F:CTCGCTTCGGCAGCACA, R: AACGCTTCACGAATTTGCGT
Cel-miR-39 (housekeeping gen olarak)	5'- CACCGGGUGUAAAUCAGCUUG-3'

3.9. qRT-PCR

Bu aşamada reaksiyon plate, real time PCR cihazına aktarıldı. Uygun deney ayarları ve PCR termal döngü adımları 7500 Fast Roche sistemlerine göre ayarlandı (Tablo 3.12). Bu şekilde her parametre için elde edilen okuma değerleri, analizlerimizin alt yapısını oluşturdu.

Tablo 3.12 Termal döngü adımları

Adım	Sıcaklık	Süre	Döngü
<i>Enzyme activation</i>	95°C	20 saniye	1
<i>Denature</i>	95°C	3 saniye	40
<i>Anneal / Extend</i>	60°C	30 saniye	



Şekil 3.2 Çalışmanın metodolojik adımları

3.10. İstatistiksel Analiz

İstatistiksel analizler, GraphPad Prism yazılımı sürüm 8.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, ABD) kullanılarak yapıldı. MiRNA'ların ekspresyon verileri, istatistiksel analiz için log10'a dönüştürüldü. Nicel değişkenlerin normal dağılıma uygun olup olmadığı Shapiro-Wilk testi ile kontrol edildi. Nicel değişkenlere ilişkin tanımlayıcı istatistikler ortalama±standart sapma olarak sunuldu. Grupların karşılaştırılmasında bağımsız gruplar karşılaştırılırken bağımsız örneklem t testi, bağımlı gruplar karşılaştırılırken bağımlı (ilişkili) gruplar t testi kullanıldı. Nicel değişkenler arasındaki ilişkinin incelenmesi için Spearman korelasyon analizleri kullanıldı. P değeri <0,05 istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

4.1. Hastaların Sosyo-Demografik Özellikleri

Çalışmada İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa-Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji polikliniğine başvuran, dahil edilme kriterlerini karşılayarak tedaviye başlanmış toplam 15 hastanın yaşlarının 21 ile 46 arasında olduğu, 14'ünün (%93.3) erkek 1'inin (%6.6) kadın olduğu görülmüştür. Erkek hastaların yaş ortalaması $34,21 \pm 7,66$, Kadın hastanın yaş ortalaması 26 olarak bulunmuştur. Hastaların sosyo-demografik özellikleri Tablo 4.1'de gösterilmiştir.

Tablo 4.1 Çalışmaya dahil edilen hastaların sosyo-demografik verileri

Yaş (Ortalama $\pm$ SD)	33,66 $\pm$ 7,68
ERKEK	34,21 $\pm$ 7,66
KADIN	26
Cinsiyet (n=15)	n (%)
ERKEK	14 (% 93.3)
KADIN	1 (% 6.6)

4.2. HIV Hastalığı ile En Yüksek Düzeyde Etkileşen MiRNA'ların Belirlenmesi

Hastalık ile en yüksek düzeyde etkileşen miRNA'ları belirlemek için elde ettiğimiz sonuçlarımızı bir araya topladık ve sıraladık. Bu analiz, hsa-miR-590-3p'nin hastalık ile ilişkili altı önemli anahtar nokta (biyoinformatik analizimizin keskinliğini arttırmak için kullandığımız altı anahtar terim) ile bağlantılı olarak analiz edilen tüm ağlarda en yüksek düzeyde etkileşen miRNA olduğunu gösterdi. Anahtar terimler ile etkileşime giren diğer ilk 5 miRNA, hsa-miR-27a-3p, hsa-miR-16-5p, hsa-miR-548c-3p, hsa-miR-1-3p ve hsa-miR-155-5p idi. Bu etkileşime giren miRNA'ların listesi Tablo 4.2'de gösterilmektedir.

Belirlediğimiz miRNA CD4, CD8 ile ilişkileri ve CXCR4 ile CXCR5 reseptörlerinin dahil olduğu yollar ile en üst düzeyde etkileşime girmeleri sebebiyle seçildi. Bu yaklaşım, HIV düzenlemesinde rol oynayan ve kritik süreçlere dahil olabilecek dikkate değer miRNA'ları belirlememizi sağladı. MiRNA'lar, seçilen anahtar terimlerle olan ilişkilerine göre sıralandı. Doku güven skorunun seviyesi (0-5) organizmalar

arasındaki benzerlik ve farklılıkları moleküler düzeyde değerlendirmeyi amaçlayan araştırmacılar tarafından çoklu organizmaların ekspresyon verilerini kullanarak oluşturduğu TISSUES 2.0 veri tabanından alındı.

Tablo 4.2 HIV ile etkileşime giren en güçlü miRNA'ların sıralanmış listesi.

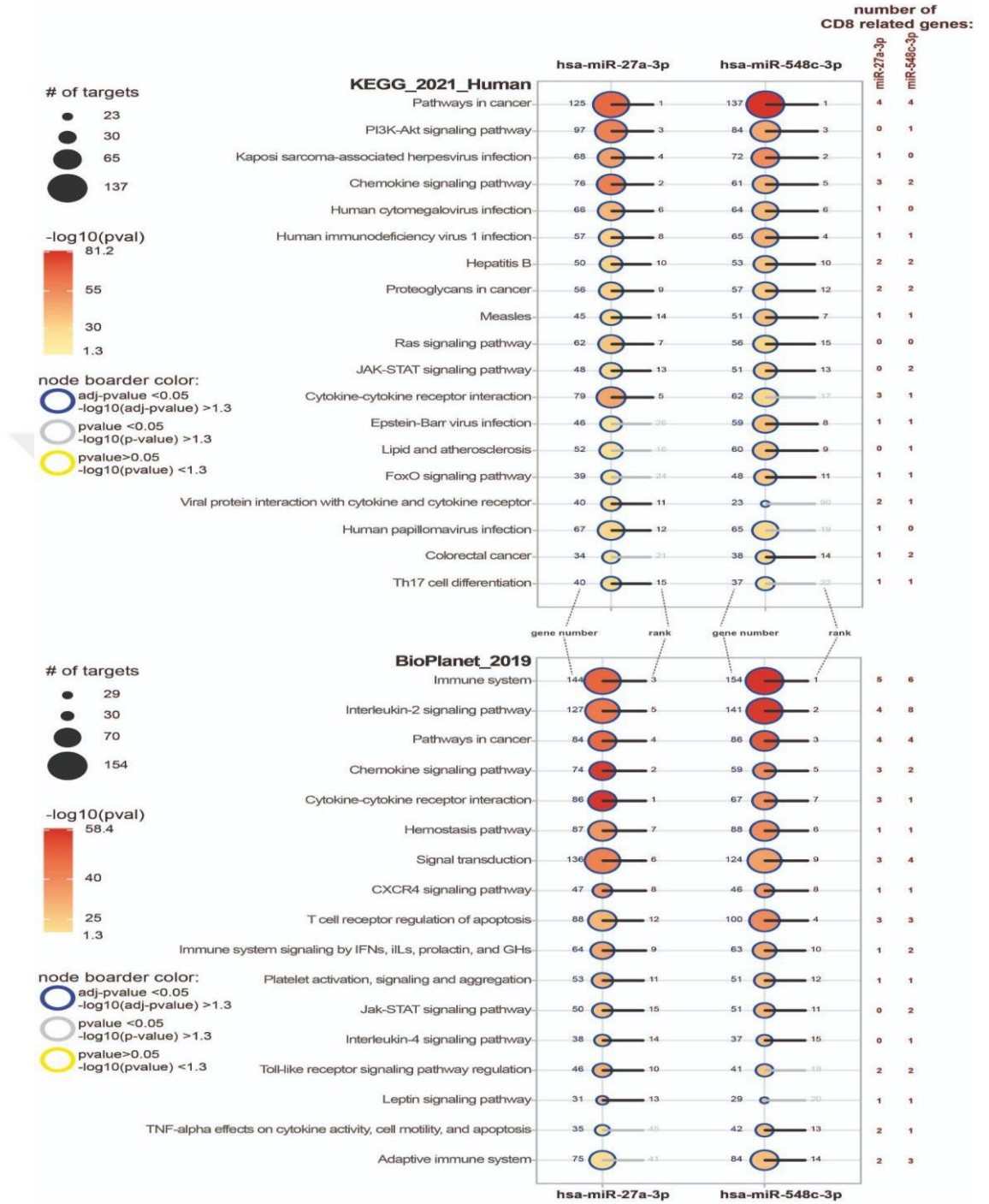
nature miRNA id	COUNT all genes														COUNT CD4 inter		COUNT CCR6 inter		COUNT CXCR4 inter		COUNT CXCR4 inter		COUNT CXCR4 inter		COUNT CXCR4 inter		COUNT CXCR4 inter		COUNT CXCR4 inter		COUNT CXCR4 inter		COUNT CXCR4 inter		COUNT CXCR4 inter		COUNT CXCR4 inter		COUNT CXCR4 inter		COUNT CXCR4 inter		COUNT CXCR4 inter		COUNT CXCR4 inter		COUNT CXCR4 inter		COUNT CXCR4 inter		COUNT CXCR4 inter		COUNT CXCR4 inter		COUNT CXCR4 inter		COUNT CXCR4 inter		COUNT CXCR4 inter		COUNT CXCR4 inter		COUNT CXCR4 inter		COUNT CXCR4 inter		COUNT CXCR4 inter		COUNT CXCR4 inter		COUNT CXCR4 inter		COUNT CXCR4 inter		COUNT CXCR4 inter		COUNT CXCR4 inter		COUNT CXCR4 inter		COUNT CXCR4 inter		COUNT CXCR4 inter		COUNT CXCR4 inter		COUNT CXCR4 inter		COUNT CXCR4 inter		COUNT CXCR4 inter		COUNT CXCR4 inter		COUNT CXCR4 inter		COUNT CXCR4 inter		COUNT CXCR4 inter		COUNT CXCR4 inter		COUNT CXCR4 inter		COUNT CXCR4 inter		COUNT CXCR4 inter		COUNT CXCR4 inter		COUNT CXCR4 inter		COUNT CXCR4 inter		COUNT CXCR4 inter		COUNT CXCR4 inter		COUNT CXCR4 inter		COUNT CXCR4 inter		COUNT CXCR4 inter		COUNT CXCR4 inter		COUNT CXCR4 inter		COUNT CXCR4 inter		COUNT CXCR4 inter		COUNT CXCR4 inter		COUNT CXCR4 inter		COUNT CXCR4 inter		COUNT CXCR4 inter		COUNT CXCR4 inter		COUNT CXCR4 inter		COUNT CXCR4 inter		COUNT CXCR4 inter		COUNT CXCR4 inter		COUNT CXCR4 inter		COUNT CXCR4 inter		COUNT CXCR4 inter		COUNT CXCR4 inter		COUNT CXCR4 inter		COUNT CXCR4 inter		COUNT CXCR4 inter		COUNT CXCR4 inter		COUNT CXCR4 inter		COUNT CXCR4 inter		COUNT CXCR4 inter		COUNT CXCR4 inter		COUNT CXCR4 inter		COUNT CXCR4 inter		COUNT CXCR4 inter		COUNT CXCR4 inter		COUNT CXCR4 inter		COUNT CXCR4 inter		COUNT CXCR4 inter		COUNT CXCR4 inter		COUNT CXCR4 inter		COUNT CXCR4 inter		COUNT CXCR4 inter		COUNT CXCR4 inter		COUNT CXCR4 inter		COUNT CXCR4 inter		COUNT CXCR4 inter		COUNT CXCR4 inter		COUNT CXCR4 inter		COUNT CXCR4 inter		COUNT CXCR4 inter		COUNT CXCR4 inter		COUNT CXCR4 inter		COUNT CXCR4 inter		COUNT CXCR4 inter		COUNT CXCR4 inter		COUNT CXCR4 inter		COUNT CXCR4 inter		COUNT CXCR4 inter		COUNT CXCR4 inter		COUNT CXCR4 inter		COUNT CXCR4 inter		COUNT CXCR4 inter		COUNT CXCR4 inter		COUNT CXCR4 inter		COUNT CXCR4 inter		COUNT CXCR4 inter		COUNT CXCR4 inter		COUNT CXCR4 inter		COUNT CXCR4 inter		COUNT CXCR4 inter		COUNT CXCR4 inter		COUNT CXCR4 inter		COUNT CXCR4 inter		COUNT CXCR4 inter		COUNT CXCR4 inter		COUNT CXCR4 inter		COUNT CXCR4 inter		COUNT CXCR4 inter		COUNT CXCR4 inter		COUNT CXCR4 inter		COUNT CXCR4 inter		COUNT CXCR4 inter		COUNT CXCR4 inter		COUNT CXCR4 inter		COUNT CXCR4 inter		COUNT CXCR4 inter		COUNT CXCR4 inter		COUNT CXCR4 inter		COUNT CXCR4 inter		COUNT CXCR4 inter		COUNT CXCR4 inter		COUNT CXCR4 inter		COUNT CXCR4 inter		COUNT CXCR4 inter		COUNT CXCR4 inter		COUNT CXCR4 inter		COUNT CXCR4 inter		COUNT CXCR4 inter		COUNT CXCR4 inter		COUNT CXCR4 inter		COUNT CXCR4 inter		COUNT CXCR4 inter		COUNT CXCR4 inter		COUNT CXCR4 inter		COUNT CXCR4 inter		COUNT CXCR4 inter		COUNT CXCR4 inter		COUNT CXCR4 inter		COUNT CXCR4 inter		COUNT CXCR4 inter		COUNT CXCR4 inter		COUNT CXCR4 inter		COUNT CXCR4 inter		COUNT CXCR4 inter		COUNT CXCR4 inter		COUNT CXCR4 inter		COUNT CXCR4 inter		COUNT CXCR4 inter		COUNT CXCR4 inter		COUNT CXCR4 inter		COUNT CXCR4 inter		COUNT CXCR4 inter		COUNT CXCR4 inter		COUNT CXCR4 inter		COUNT CXCR4 inter		COUNT CXCR4 inter		COUNT CXCR4 inter		COUNT CXCR4 inter		COUNT CXCR4 inter		COUNT CXCR4 inter		COUNT CXCR4 inter		COUNT CXCR4 inter		COUNT CXCR4 inter		COUNT CXCR4 inter		COUNT CXCR4 inter		COUNT CXCR4 inter		COUNT CXCR4 inter		COUNT CXCR4 inter		COUNT CXCR4 inter		COUNT CXCR4 inter		COUNT CXCR4 inter		COUNT CXCR4 inter		COUNT CXCR4 inter		COUNT CXCR4 inter		COUNT CXCR4 inter		COUNT CXCR4 inter		COUNT CXCR4 inter		COUNT CXCR4 inter		COUNT CXCR4 inter		COUNT CXCR4 inter		COUNT CXCR4 inter		COUNT CXCR4 inter		COUNT CXCR4 inter		COUNT CXCR4 inter		COUNT CXCR4 inter		COUNT CXCR4 inter		COUNT CXCR4 inter		COUNT CXCR4 inter		COUNT CXCR4 inter		COUNT CXCR4 inter		COUNT CXCR4 inter		COUNT CXCR4 inter		COUNT CXCR4 inter		COUNT CXCR4 inter		COUNT CXCR4 inter		COUNT CXCR4 inter		COUNT CXCR4 inter		COUNT CXCR4 inter		COUNT CXCR4 inter		COUNT CXCR4 inter		COUNT CXCR4 inter		COUNT CXCR4 inter		COUNT CXCR4 inter		COUNT CXCR4 inter		COUNT CXCR4 inter		COUNT CXCR4 inter		COUNT CXCR4 inter		COUNT CXCR4 inter		COUNT CXCR4 inter		COUNT CXCR4 inter		COUNT CXCR4 inter		COUNT CXCR4 inter		COUNT CXCR4 inter		COUNT CXCR4 inter		COUNT CXCR4 inter		COUNT CXCR4 inter		COUNT CXCR4 inter		COUNT CXCR4 inter		COUNT CXCR4 inter		COUNT CXCR4 inter		COUNT CXCR4 inter		COUNT CXCR4 inter		COUNT CXCR4 inter		COUNT CXCR4 inter		COUNT CXCR4 inter		COUNT CXCR4 inter		COUNT CXCR4 inter		COUNT CXCR4 inter		COUNT CXCR4 inter		COUNT CXCR4 inter		COUNT CXCR4 inter		COUNT CXCR4 inter		COUNT CXCR4 inter		COUNT CXCR4 inter		COUNT CXCR4 inter		COUNT CXCR4 inter		COUNT CXCR4 inter		COUNT CXCR4 inter		COUNT CXCR4 inter		COUNT CXCR4 inter		COUNT CXCR4 inter		COUNT CXCR4 inter		COUNT CXCR4 inter		COUNT CXCR4 inter		COUNT CXCR4 inter		COUNT CXCR4 inter		COUNT CXCR4 inter		COUNT CXCR4 inter		COUNT CXCR4 inter		COUNT CXCR4 inter		COUNT CXCR4 inter		COUNT CXCR4 inter		COUNT CXCR4 inter		COUNT CXCR4 inter		COUNT CXCR4 inter		COUNT CXCR4 inter		COUNT CXCR4 inter		COUNT CXCR4 inter		COUNT CXCR4 inter		COUNT CXCR4 inter		COUNT CXCR4 inter		COUNT CXCR4 inter		COUNT CXCR4 inter		COUNT CXCR4 inter		COUNT CXCR4 inter		COUNT CXCR4 inter		COUNT CXCR4 inter		COUNT CXCR4 inter		COUNT CXCR4 inter		COUNT CXCR4 inter		COUNT CXCR4 inter		COUNT CXCR4 inter		COUNT CXCR4 inter		COUNT CXCR4 inter		COUNT CXCR4 inter		COUNT CXCR4 inter		COUNT CXCR4 inter		COUNT CXCR4 inter		COUNT CXCR4 inter		COUNT CXCR4 inter		COUNT CXCR4 inter		COUNT CXCR4 inter		COUNT CXCR4 inter		COUNT CXCR4 inter		COUNT CXCR4 inter		COUNT CXCR4 inter		COUNT CXCR4 inter		COUNT CXCR4 inter		COUNT CXCR4 inter		COUNT CXCR4 inter		COUNT CXCR4 inter		COUNT CXCR4 inter		COUNT CXCR4 inter		COUNT CXCR4 inter		COUNT CXCR4 inter		COUNT CXCR4 inter		COUNT CXCR4 inter		COUNT CXCR4 inter		COUNT CXCR4 inter		COUNT CXCR4 inter		COUNT CXCR4 inter		COUNT CXCR4 inter		COUNT CXCR4 inter	
-----------------	-----------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	-----------------	--	------------------	--	-------------------	--	-------------------	--	-------------------	--	-------------------	--	-------------------	--	-------------------	--	-------------------	--	-------------------	--	-------------------	--	-------------------	--	-------------------	--	-------------------	--	-------------------	--	-------------------	--	-------------------	--	-------------------	--	-------------------	--	-------------------	--	-------------------	--	-------------------	--	-------------------	--	-------------------	--	-------------------	--	-------------------	--	-------------------	--	-------------------	--	-------------------	--	-------------------	--	-------------------	--	-------------------	--	-------------------	--	-------------------	--	-------------------	--	-------------------	--	-------------------	--	-------------------	--	-------------------	--	-------------------	--	-------------------	--	-------------------	--	-------------------	--	-------------------	--	-------------------	--	-------------------	--	-------------------	--	-------------------	--	-------------------	--	-------------------	--	-------------------	--	-------------------	--	-------------------	--	-------------------	--	-------------------	--	-------------------	--	-------------------	--	-------------------	--	-------------------	--	-------------------	--	-------------------	--	-------------------	--	-------------------	--	-------------------	--	-------------------	--	-------------------	--	-------------------	--	-------------------	--	-------------------	--	-------------------	--	-------------------	--	-------------------	--	-------------------	--	-------------------	--	-------------------	--	-------------------	--	-------------------	--	-------------------	--	-------------------	--	-------------------	--	-------------------	--	-------------------	--	-------------------	--	-------------------	--	-------------------	--	-------------------	--	-------------------	--	-------------------	--	-------------------	--	-------------------	--	-------------------	--	-------------------	--	-------------------	--	-------------------	--	-------------------	--	-------------------	--	-------------------	--	-------------------	--	-------------------	--	-------------------	--	-------------------	--	-------------------	--	-------------------	--	-------------------	--	-------------------	--	-------------------	--	-------------------	--	-------------------	--	-------------------	--	-------------------	--	-------------------	--	-------------------	--	-------------------	--	-------------------	--	-------------------	--	-------------------	--	-------------------	--	-------------------	--	-------------------	--	-------------------	--	-------------------	--	-------------------	--	-------------------	--	-------------------	--	-------------------	--	-------------------	--	-------------------	--	-------------------	--	-------------------	--	-------------------	--	-------------------	--	-------------------	--	-------------------	--	-------------------	--	-------------------	--	-------------------	--	-------------------	--	-------------------	--	-------------------	--	-------------------	--	-------------------	--	-------------------	--	-------------------	--	-------------------	--	-------------------	--	-------------------	--	-------------------	--	-------------------	--	-------------------	--	-------------------	--	-------------------	--	-------------------	--	-------------------	--	-------------------	--	-------------------	--	-------------------	--	-------------------	--	-------------------	--	-------------------	--	-------------------	--	-------------------	--	-------------------	--	-------------------	--	-------------------	--	-------------------	--	-------------------	--	-------------------	--	-------------------	--	-------------------	--	-------------------	--	-------------------	--	-------------------	--	-------------------	--	-------------------	--	-------------------	--	-------------------	--	-------------------	--	-------------------	--	-------------------	--	-------------------	--	-------------------	--	-------------------	--	-------------------	--	-------------------	--	-------------------	--	-------------------	--	-------------------	--	-------------------	--	-------------------	--	-------------------	--	-------------------	--	-------------------	--	-------------------	--	-------------------	--	-------------------	--	-------------------	--	-------------------	--	-------------------	--	-------------------	--	-------------------	--	-------------------	--	-------------------	--	-------------------	--	-------------------	--	-------------------	--	-------------------	--	-------------------	--	-------------------	--	-------------------	--	-------------------	--	-------------------	--	-------------------	--	-------------------	--	-------------------	--	-------------------	--	-------------------	--	-------------------	--	-------------------	--	-------------------	--	-------------------	--	-------------------	--	-------------------	--	-------------------	--	-------------------	--	-------------------	--	-------------------	--	-------------------	--	-------------------	--	-------------------	--	-------------------	--	-------------------	--	-------------------	--	-------------------	--	-------------------	--	-------------------	--	-------------------	--	-------------------	--	-------------------	--	-------------------	--	-------------------	--	-------------------	--	-------------------	--	-------------------	--	-------------------	--	-------------------	--	-------------------	--	-------------------	--	-------------------	--	-------------------	--	-------------------	--	-------------------	--	-------------------	--	-------------------	--	-------------------	--	-------------------	--	-------------------	--	-------------------	--	-------------------	--	-------------------	--	-------------------	--	-------------------	--	-------------------	--	-------------------	--	-------------------	--	-------------------	--	-------------------	--	-------------------	--	-------------------	--	-------------------	--	-------------------	--	-------------------	--	-------------------	--	-------------------	--	-------------------	--	-------------------	--	-------------------	--	-------------------	--	-------------------	--	-------------------	--	-------------------	--	-------------------	--	-------------------	--	-------------------	--	-------------------	--	-------------------	--	-------------------	--	-------------------	--	-------------------	--	-------------------	--	-------------------	--	-------------------	--	-------------------	--	-------------------	--	-------------------	--	-------------------	--	-------------------	--	-------------------	--	-------------------	--	-------------------	--	-------------------	--	-------------------	--	-------------------	--	-------------------	--	-------------------	--	-------------------	--	-------------------	--	-------------------	--	-------------------	--	-------------------	--	-------------------	--	-------------------	--	-------------------	--	-------------------	--	-------------------	--	-------------------	--	-------------------	--	-------------------	--	-------------------	--	-------------------	--	-------------------	--	-------------------	--	-------------------	--

4.3. En Güçlü İlişkiye Sahip MiRNA Hedeflerinin Enrichment Analizi: Hsa-miR-27a-3p ve Hsa-miR-548c-3p

Enrichment analizinin nasıl yorumlanacağına ilişkin talimatlar: Aşağıda, analiz edilen her ontolojik süreç için paneller bulunmaktadır. Analiz edilen her veri tabanı ve her miRNA için en önemli 15 terimi seçtik. Veriler ayrıca birleştirildi ve en düşükten en yükseğe doğru sıralandı. Grafiklerin en üstünde en düşük sıralarda yer alan ve aynı zamanda en önemli olan ontolojik terimler yer almaktadır. Noktanın boyutu, seçilen miRNA'lar tarafından düzenlenen, aynı zamanda ilgili gen listemizde bulunan zenginleştirilmiş genlerin sayısı ile ilişkilidir (HIV genleri = 1769). hsa-miR-27a-3p bu tür 707 geni hedeflerken hsa-miR-548c-3p 688 geni hedefledi (yukarıdaki tabloda olduğu gibi). Noktaların rengi, p-değerleri ile ilişkilendirilir, daha koyu nokta=daha düşük BH ayarlı p değeri.

Pathway enrichment analizi: miRNA-HIV ağı özelinde potansiyel gen ifadesini değiştirebilen etmeni belirlemek için bir dizi enrichment analizi yaptık. Pathway enrichment analizi hücrel bağışıklık sistemi, PI3k-AKT sinyal yolu, kanser yolları,

sinyal iletimi, interlökin-2 sinyali, apoptozun T hücre reseptörü düzenlemesi ile güçlü ilişkiye sahip olduğunu gösterdi (Şekil 4.1).

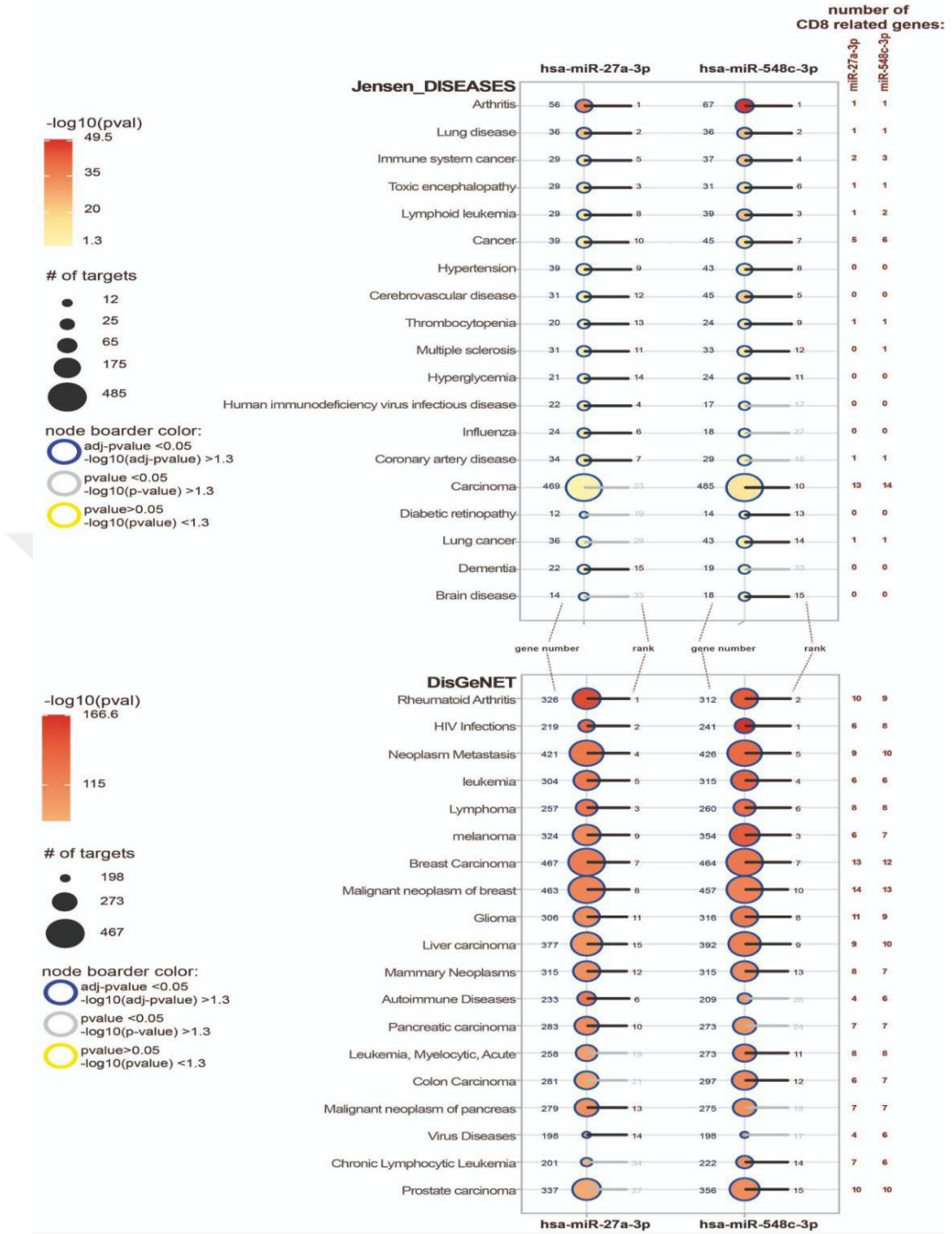


Şekil 4.1 KEGG_2021 ve Bioplanet_2019 veritabanları ile yapılan analiz

Enrichment analizi ile elde edilen HIV, CD8 ve hsa-miR-27a-3p, hsa-miR-548c-3p ilişkili ilk 15 yol. Analiz, KEGG_2021 (üst panel) ve Bioplanet_2019 (alt panel) veritabanları üzerinden EnrichR API kullanılarak yapıldı. Terimler, hsa-miR-27a-3p ve hsa-miR-548c-3p ağı ve ardından genişletilmiş etkileşim ağı için önem düzeyine göre sıralandı. Düzeltilmiş p-değerleri, biyolojik olarak anlamlı olma olasılığı daha yüksek kategorileri gösterir. Noktaların renk gradyanı, karşılıklı gelen düzeltilmiş p değerleri ile ilişkilidir. Kırmızı renk, düşük p değerlerini (yüksek enrichment) ve mavi, yüksek p değerlerini (düşük enrichment) gösterir. Noktaların boyutu, enrichment edilmiş genlerin sayısı ile ilişkilidir. Ek olarak, sağ tarafta, analiz edilen miRNA'lar tarafından hedeflenen CD8 ile ilgili genlerin sayısını vurguladık.

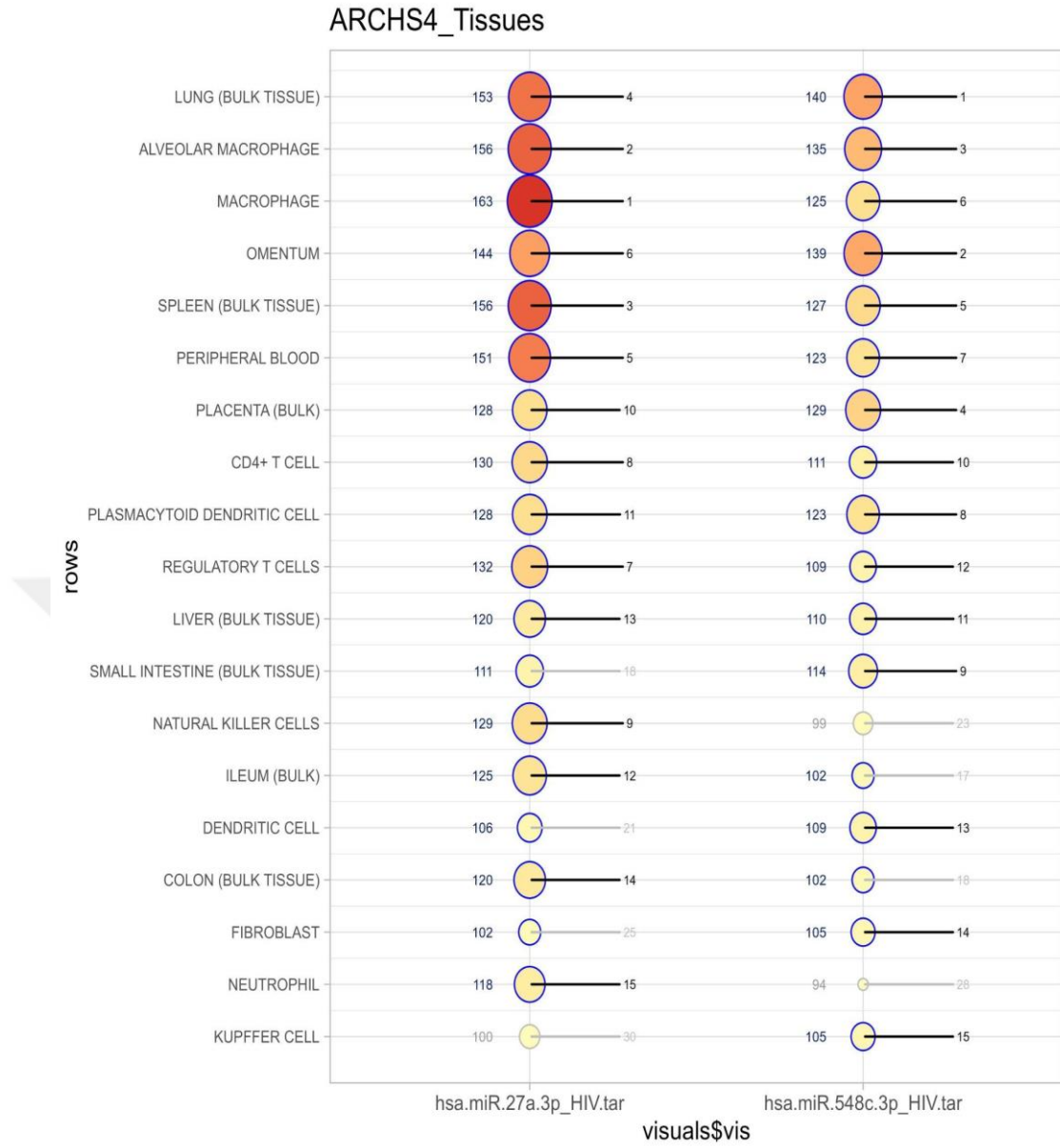
Hastalık enrichment analizi: Gen-hastalık ilişkilerini önceliklendirmek için destekleyici kanıtlara dayalı bir puan üzerinden değerlendirme yapan kullandığımız veri tabanlarına göre, belirlediğimiz miRNA'ların en güçlü ilişkiyi romatoid artrit ile gösterdiğini saptadık (Şekil 4.2). Ayrıca neoplastik süreçler gibi ortak düzenlemeler ile regüle edilen hastalıkları inceledik. Hsa-miR-27a-3p'nin immüitenin dolaylı olarak rol oynadığı kanserler ile ilgili hedefleri güçlü bir şekilde düzenlediğini gösterdik. Yine aynı şekilde hsa-miR-548c-3p'nin karsinom ve diğer malignensi süreçleri ile ilişkili olduğu gösterildi.



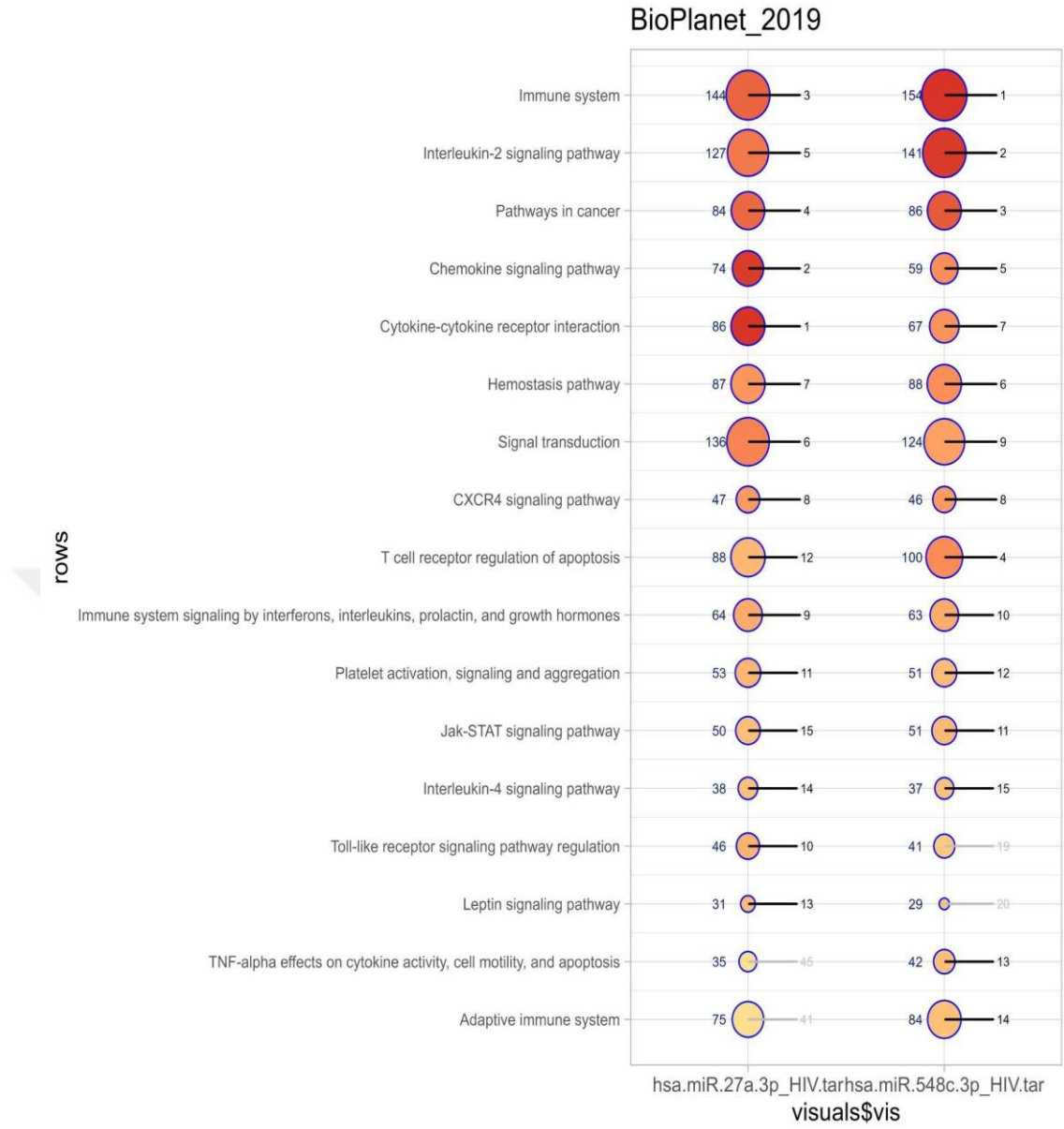


Şekil 4.2 Jensen_diseases ve Disgenet veritabanları ile yapılan analiz

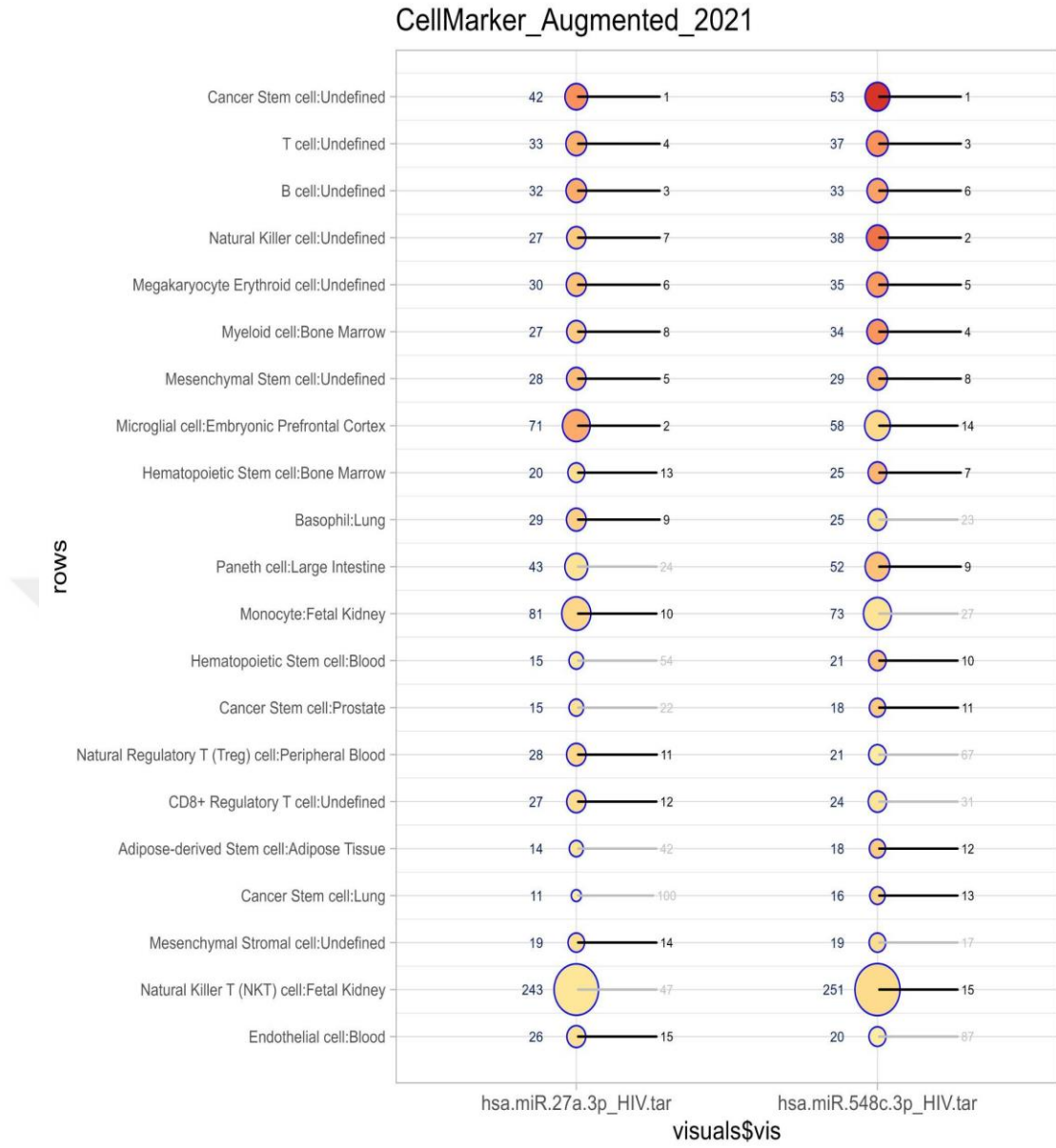
Enrichment analizi ile elde edilen hsa-miR-27a-3p ve hsa-miR-548c-3p ile ilişkili önemli ilk 17 yol ve hastalık. Analiz, Jensen_diseases ve Disgenet veritabanları üzerinden EnrichR API kullanılarak yapıldı. Terimler, hsa-miR-27a-3p ve hsa-miR-548c-3p ve genişletilmiş etkileşim ağı için önem düzeyine göre sıralandı. Düzeltilmiş p-değerleri, biyolojik olarak anlamlı olma olasılığı daha yüksek kategorileri gösterir. Noktaların renk gradyanı, karşılık gelen düzeltilmiş p değerleri ile ilişkilidir. Kırmızı renk, düşük p değerlerini (yüksek enrichment) ve mavi, yüksek p değerlerini (düşük enrichment) gösterir. Noktaların boyutu, enrichment edilmiş genlerin sayısı ile ilişkilidir.



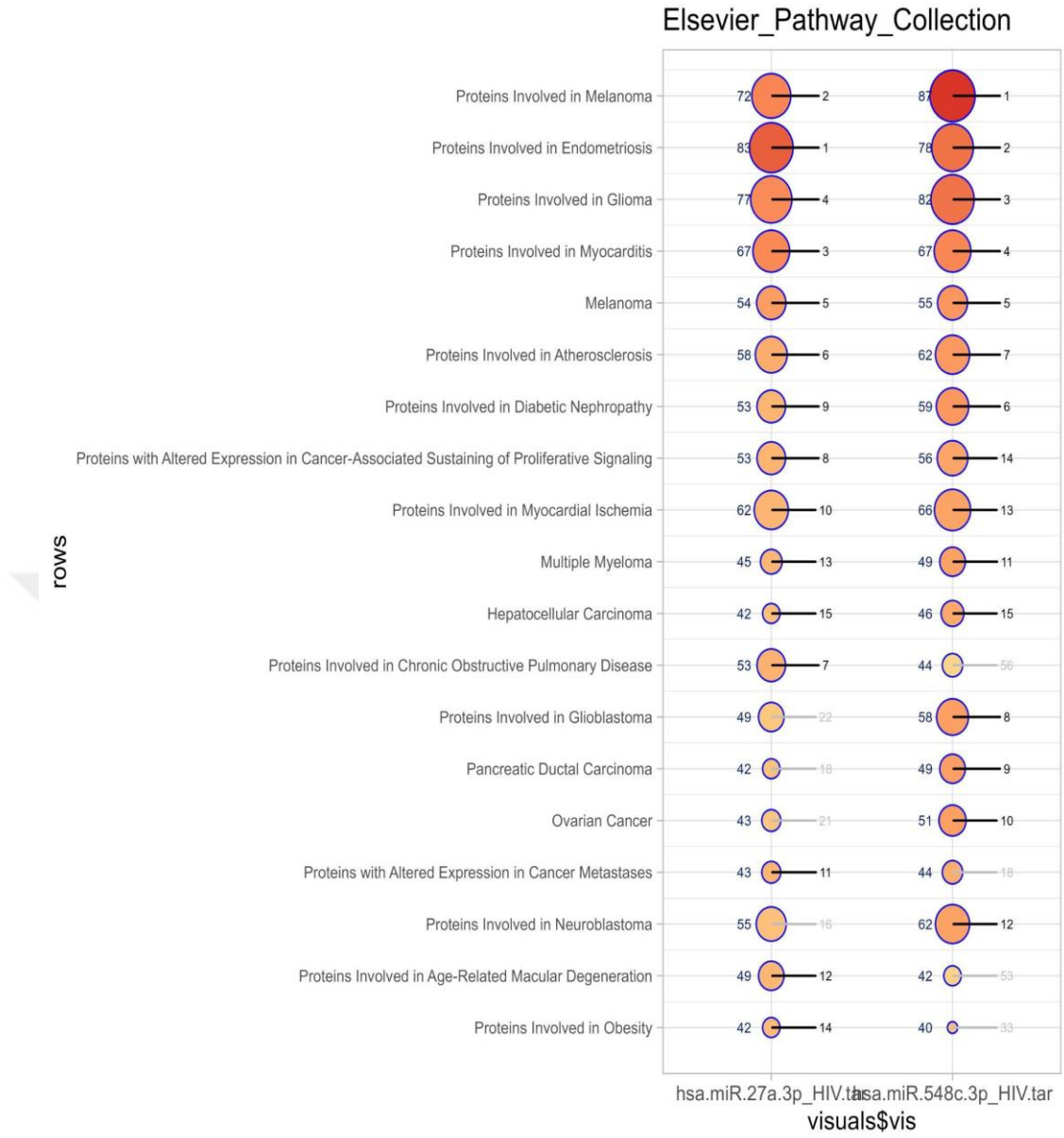
Şekil 4.3 hsa-miR-27a-3p ve hsa-miR-548c-3p'nin farklı doku ve hücrelerle ilişkisi.



Şekil 4.4 hsa-miR-27a-3p ve hsa-miR-548c-3p'nin biyolojik sistemler ve hücresel yollarla ilişkisi.



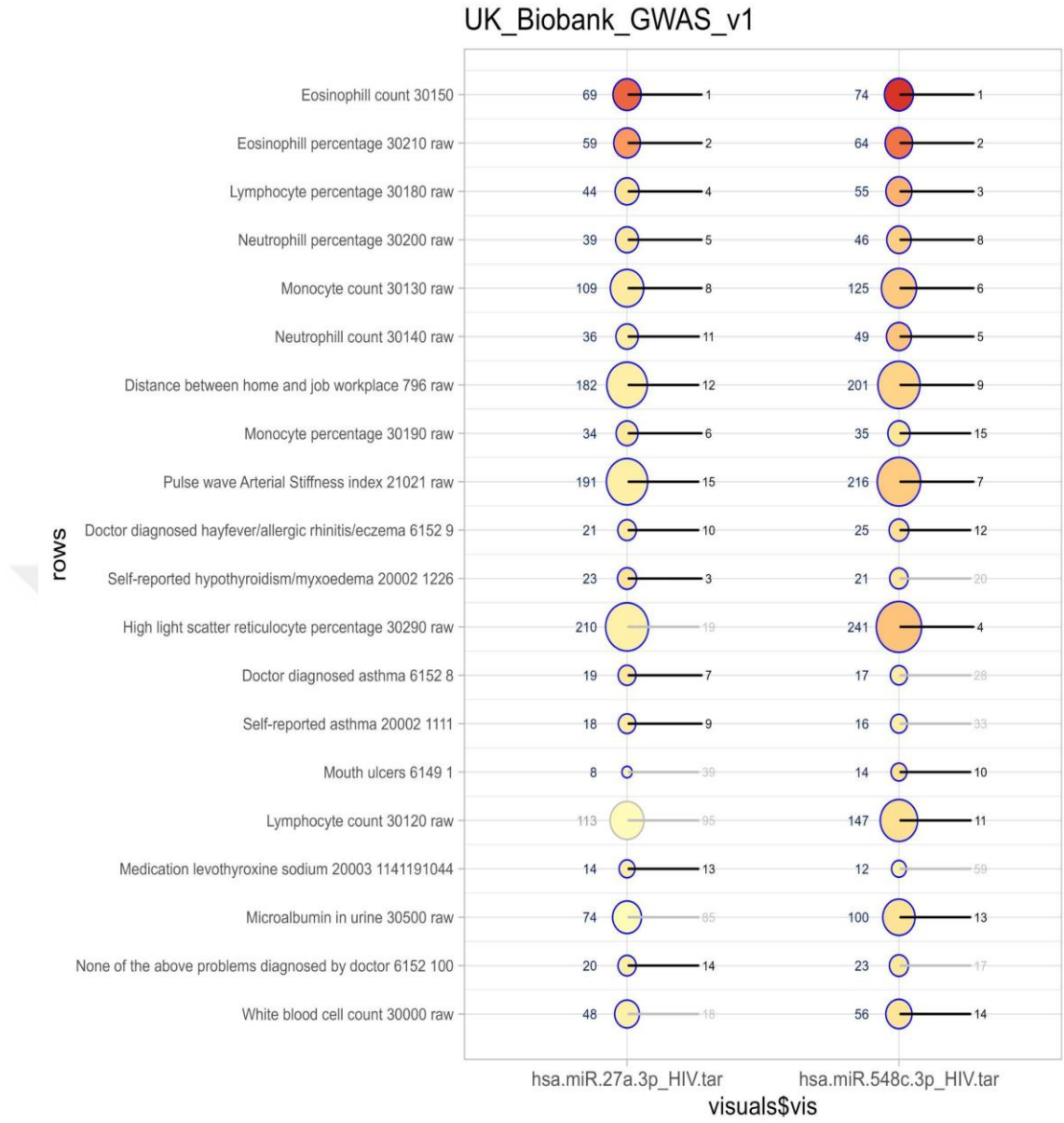
Şekil 4.5 hsa-miR-27a-3p ve hsa-miR-548c-3p'nin çeşitli hücre belirteçleri ile ilişkisi.



Şekil 4.6 Elsevier Pathway Collection kullanılarak hsa-miR-27a-3p ve hsa-miR-548c-3p'nin hastalıklarla ilişkili çeşitli proteinlerle ilişkisi.

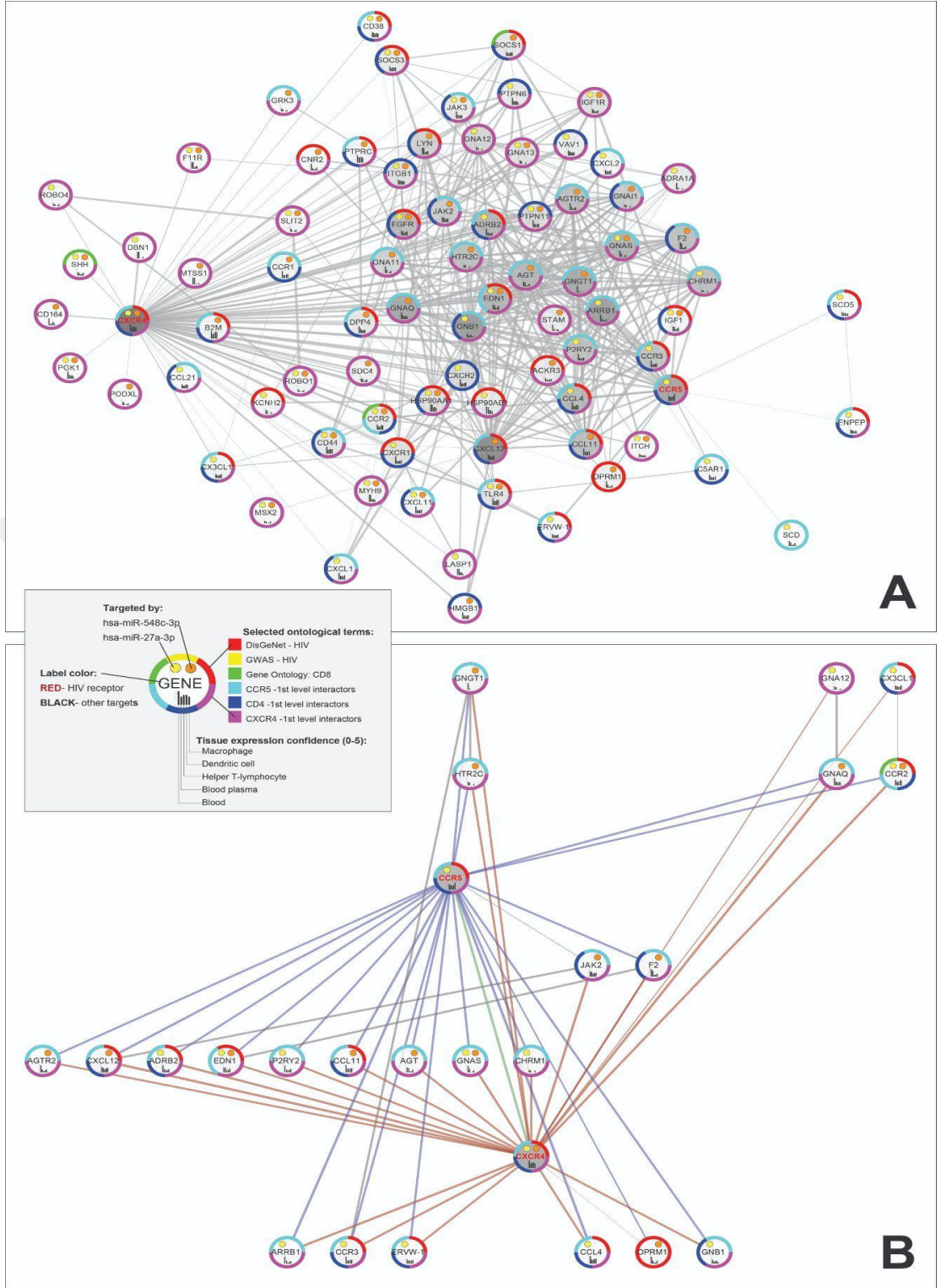


Şekil 4.7 GWAS Catalog 2019 kullanılarak hsa-miR-27a-3p ve hsa-miR-548c-3p'nin hastalıklarla ilişkisi.



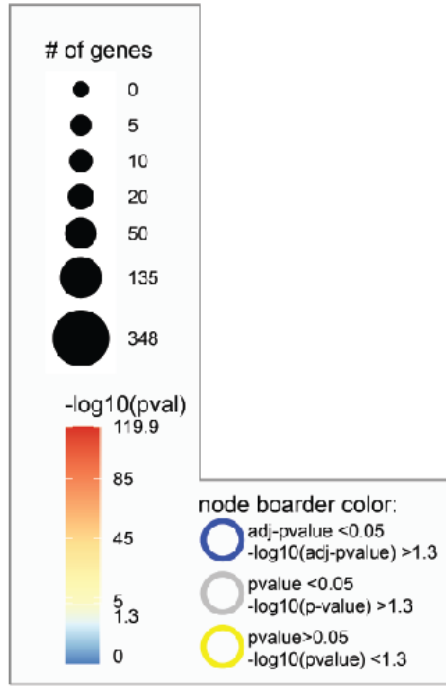
Şekil 4.8 UK Biobank GWAS v1 kullanılarak hsa-miR-27a-3p ve hsa-miR-548c-3p'nin çeşitli hücre sayımlarıyla ilişkisi.

Etkileşim ağı analizi: Doğrulanmış miRNA'ların en önemli hedeflerini belirlemek için miRNA-hedef etkileşimlerinin ağ analizini gerçekleştirdik. String veritabanındaki PPI fiziksel etkileşim verilerini kullanarak, analiz edilen miRNA'ların (hsa-miR-27a-3p ve hsa-miR-548c-3p) hedefleri arasındaki etkileşimleri yeniden yarattık. Görselleştirme için, analiz edilen miRNA'lar tarafından düzenlenen HIV reseptörleri ile etkileşime giren genleri seçtik (Şekil 4.9).



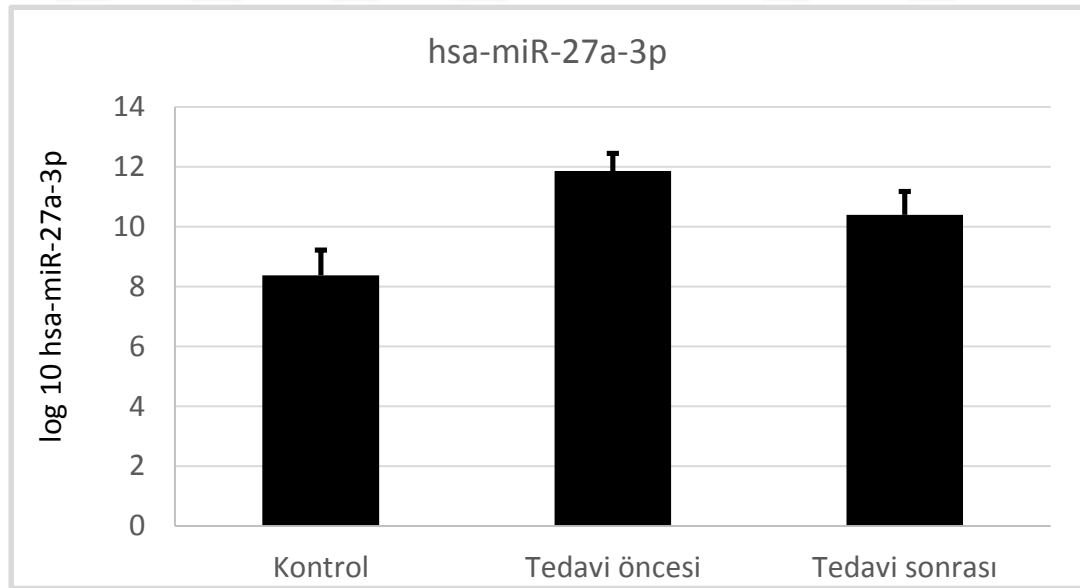
Şekil 4.9 Etkileşim ağı analizi

Doğrulanmış miRNA'lar hsa-miR-27a-3p (sarı nokta) ve hsa-miR-548c-3p (turuncu nokta) tarafından düzenlenen hedeflerin HIV reseptörleri ile ilgili etkileşim ağları. Panel A, HIV reseptörleri ve etkileşimler arasındaki eksiksiz bir PPI ağını gösterirken, Panel B, analiz edilen miRNA'lar tarafından düzenlenen iki HIV reseptörü arasındaki en kısa yolları gösterir. Nodların rengi, ağdaki diğer düğümlerle etkileşim sayısı ile ilişkilendirilir.



Şekil 4.10 Enrichment sonrası genlerin sayısı ile ilişki verisinin görselleştirilmesi
Nokta, hsa-miR-27a-3p ve hsa-miR-548c-3p tarafından düzenlenen enrichment sonrası genlerin sayısı ile ilişkilidir.

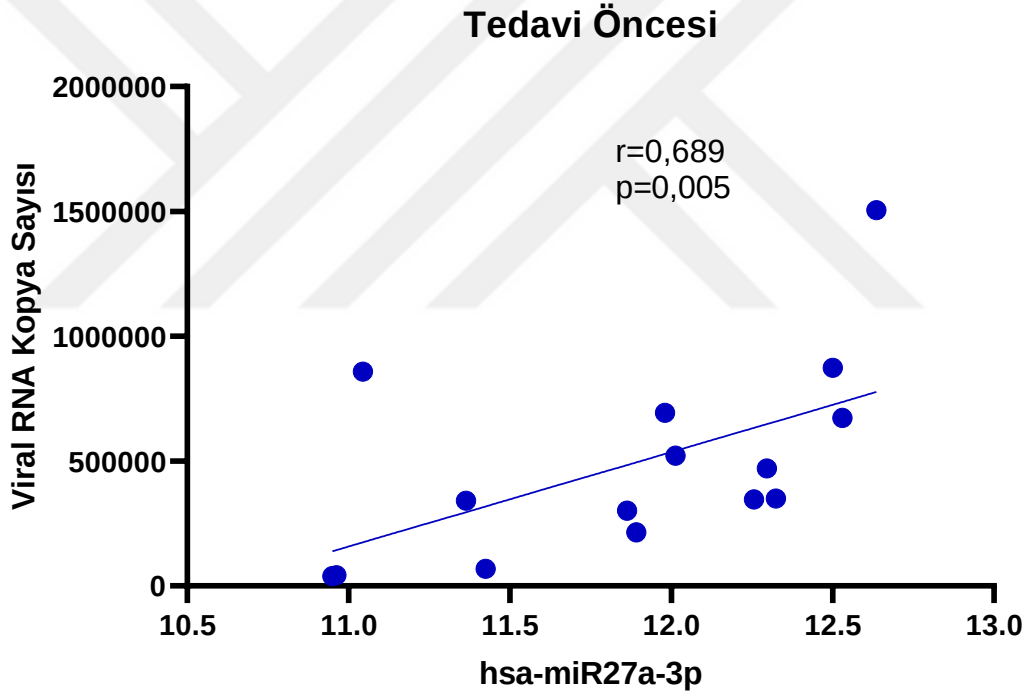
4.4. RT-qPCR ile Seçilen MiRNA'ların Validasyonu



Şekil 4.11 Çalışma gruplarında Hsa-miR27a-3p'nin RealTime qPCR verileri ile karşılaştırılması

Hsa-miR27a-3p ekspresyonunun sağlıklı kontrol, naive ve aynı hastanın antiretroviral tedavi sonrası aşamasındaki durumunun RealTime qPCR verileri ile karşılaştırılması. Veriler ortalama $\pm$ SD olarak gösterilmiştir. Hsa-miR27a-3p'nin ekspresyonu, aynı hastanın antiretroviral tedavi sonrası hasta grubu, sağlıklı kontrol ile karşılaştırıldığında up regüle olmasına rağmen, tedavi öncesi naive hasta hali ile karşılaştırıldığında down regüle durumdadır.

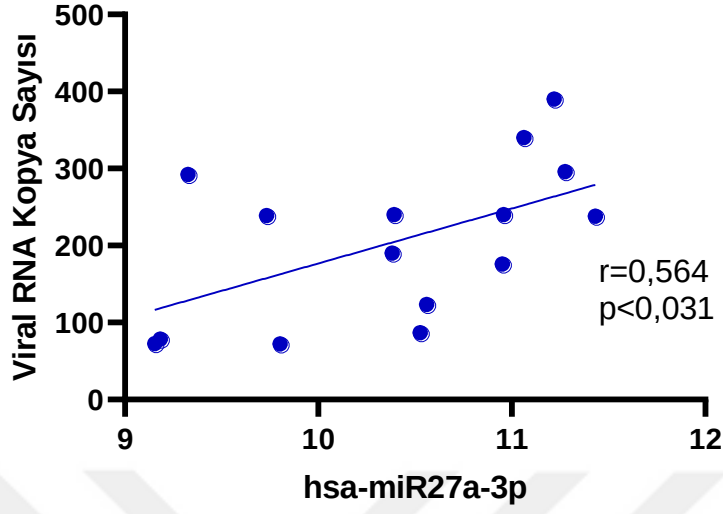
Sağlıklı kontrol, tedavi öncesi naive hasta ve aynı hastanın antiretroviral tedavi sonrası aşamadaki durumu arasında hsa-miR27a-3p ekspresyonunun RealTime qPCR sonuçlarına dayalı verileri karşılaştırıldı. Veriler ortalama $\pm$ SD olarak gösterilmiştir. Tedavi öncesi naive hasta grubu (11.87 ± 0.584) sağlıklı kontrol grubu (8.38 ± 0.844) ile karşılaştırıldığında hsa-miR27a-3p'de up regulasyon olduğu ortaya konuldu ($p<0,001$). Antiretroviral tedavi sonrası hasta grubu (10.40 ± 0.783), sağlıklı kontrol grubu (8.38 ± 0.844) ile karşılaştırıldığında hsa-miR27a-3p'de up regulasyon olduğu ortaya konuldu ($p<0,001$). Antiretroviral tedavi sonrası hasta grubu (10.40 ± 0.783), tedavi öncesi naive hasta grubu (11.87 ± 0.584) ile karşılaştırıldığında hsa-miR27a-3p'de down regulasyon olduğu ortaya konuldu ($p<0,001$).



Şekil 4.12 Antiretroviral tedavi öncesi naive hasta grubunda hsa-miR27a-3p ile viral RNA kopya sayısı korelasyonu

Antiretroviral tedavi öncesi naive hasta grubunda hsa-miR27a-3p ile viral RNA kopya sayısı arasında güçlü pozitif korelasyon gözlemlendi ($r = 0,689$; $p=0,005$; Şekil 4.12)

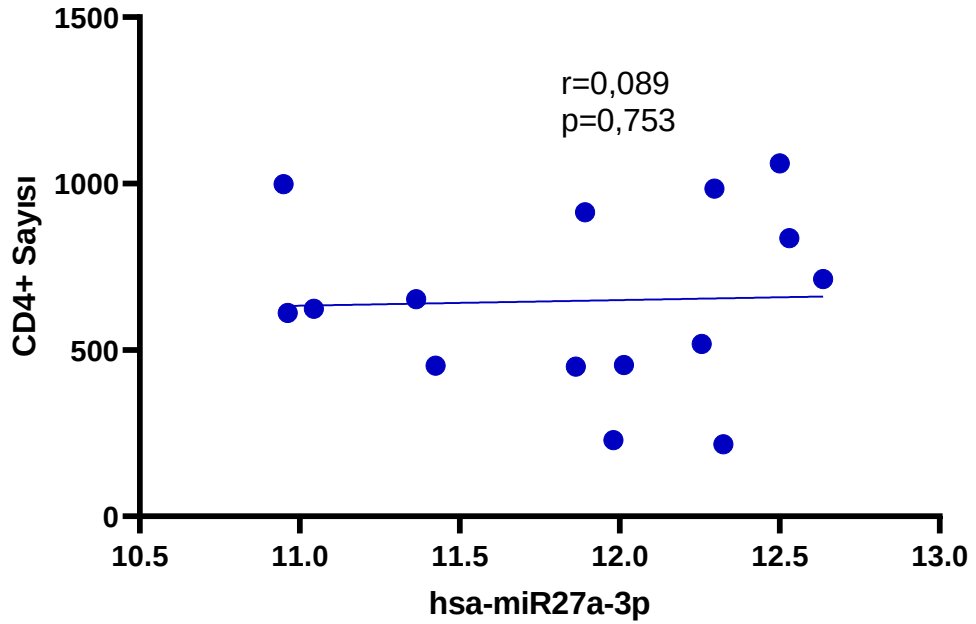
Tedavi Sonrası



Şekil 4.13 Antiretroviral tedavi sonrası hasta grubunda hsa-miR27a-3p ile viral RNA kopya sayısı korelasyonu

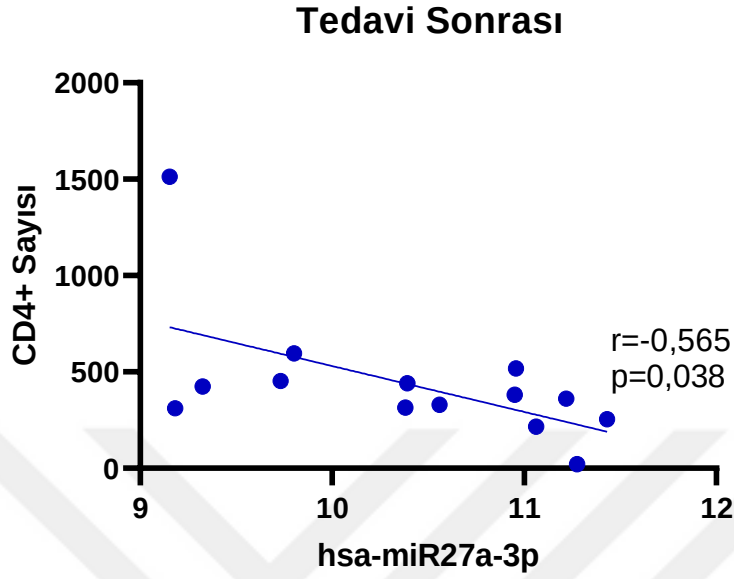
Aynı hastanın antiretroviral tedavi sonrası durumunda hsa-miR27a-3p ile viral RNA kopya sayısı arasında pozitif korelasyon gözlemlendi ($r = 0,564$; $p<0,031$; Şekil 4.13)

Tedavi Öncesi



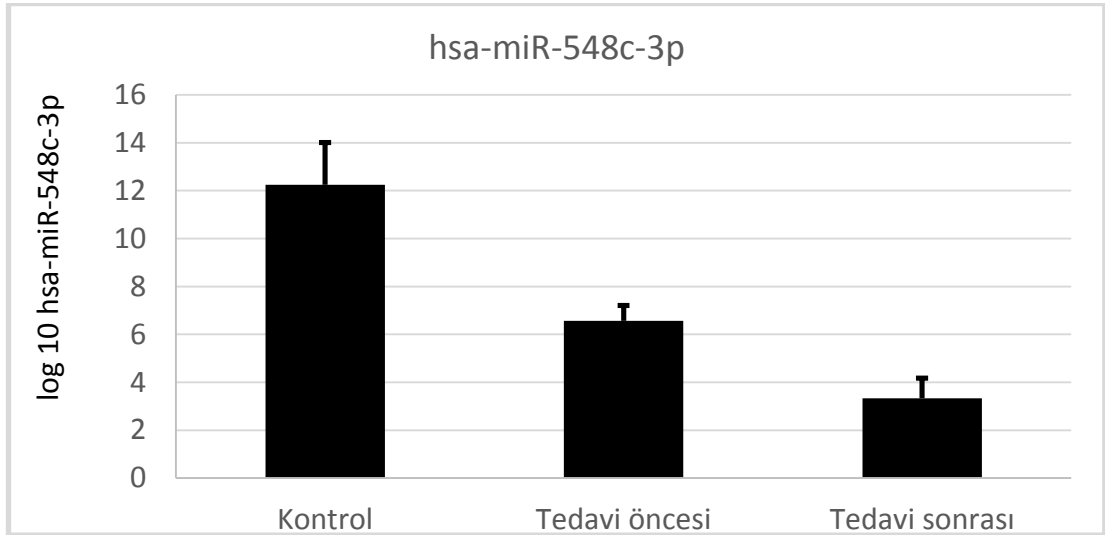
Şekil 4.14 Antiretroviral tedavi öncesi naive hasta grubunda hsa-miR27a-3p ile CD4+ sayısı korelasyonu

Antiretroviral tedavi öncesi naive hasta grubunda hsa-miR27a-3p ile CD4+ sayısı arasında korelasyon gözlenmedi ($r = 0,089$; $p=0,753$; Şekil 4.14).



Şekil 4.15 Antiretroviral tedavi sonrası hasta grubunda hsa-miR27a-3p ile CD4+ sayısı korelasyonu

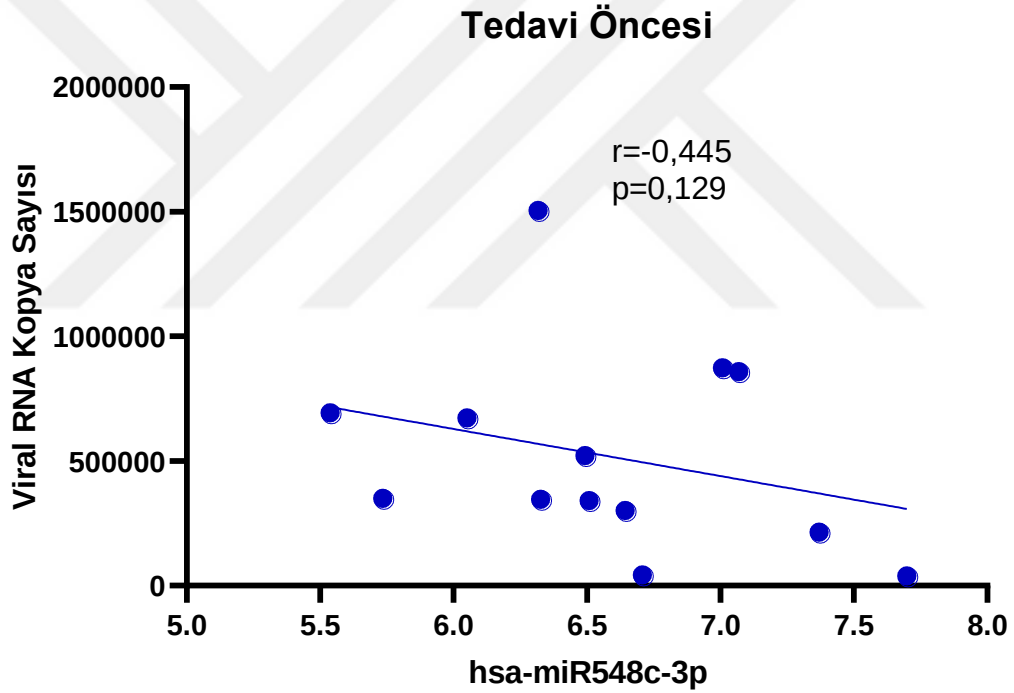
Antiretroviral tedavi sonrası hasta grubunda hsa-miR27a-3p ile CD4+ sayısı arasında negatif korelasyon gözlemlendi ($r = -0,565$; $p=0,038$; Şekil 4.15)



Şekil 4.16 Çalışma gruplarında hsa-miR548c-3p'nin RealTime qPCR verileri ile karşılaştırılması

Hsa-miR548c-3p ekspresyonunun sağlıklı kontrol, naive ve aynı hastanın antiretroviral tedavi sonrası aşamasındaki durumunun RealTime qPCR verileri ile karşılaştırılması. Veriler ortalama $\pm$ SD olarak gösterilmiştir. Hsa-miR548c-3p'nin ekspresyonu, kontrollerle karşılaştırıldığında naive ve aynı hastanın antiretroviral tedavi sonrası aşamasında down regüle durumdadır.

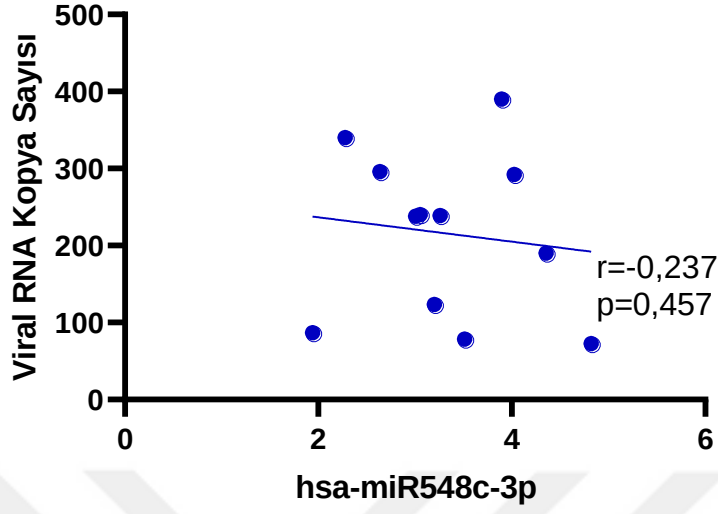
Veriler, sağlıklı kontrol, tedavi öncesi naive hasta ve aynı hastanın antiretroviral tedavi sonrası aşamadaki durumu arasında karşılaştırıldı. Veriler ortalama $\pm$ SD olarak gösterilmiştir. Tedavi öncesi naive hasta grubu (6.57 ± 0.642), sağlıklı kontrol grubu (12.25 ± 1.757) ile karşılaştırıldığında hsa-miR548c-3p'de down regülasyon olduğu ortaya konuldu ($p < 0,001$). Antiretroviral tedavi sonrası hasta grubu (3.33 ± 0.843), sağlıklı kontrol grubu (12.25 ± 1.757) ile karşılaştırıldığında hsa-miR548c-3p'de down regülasyon olduğu ortaya konuldu ($p < 0,001$). Antiretroviral tedavi sonrası hasta grubu (3.33 ± 0.843), tedavi öncesi naive hasta grubu (6.57 ± 0.642) ile karşılaştırıldığında hsa-miR548c-3p 'de down regülasyon olduğu ortaya konuldu ($p < 0,001$).



Şekil 4.17 Antiretroviral tedavi öncesi naive hasta grubunda hsa-miR548c-3p ile viral RNA kopya korelasyonu

Antiretroviral tedavi öncesi naive hasta grubunda hsa-miR548c-3p ile viral RNA kopya arasında korelasyon saptanmadı ($r = -0,445$; $p = 0,129$; Şekil 4.17)

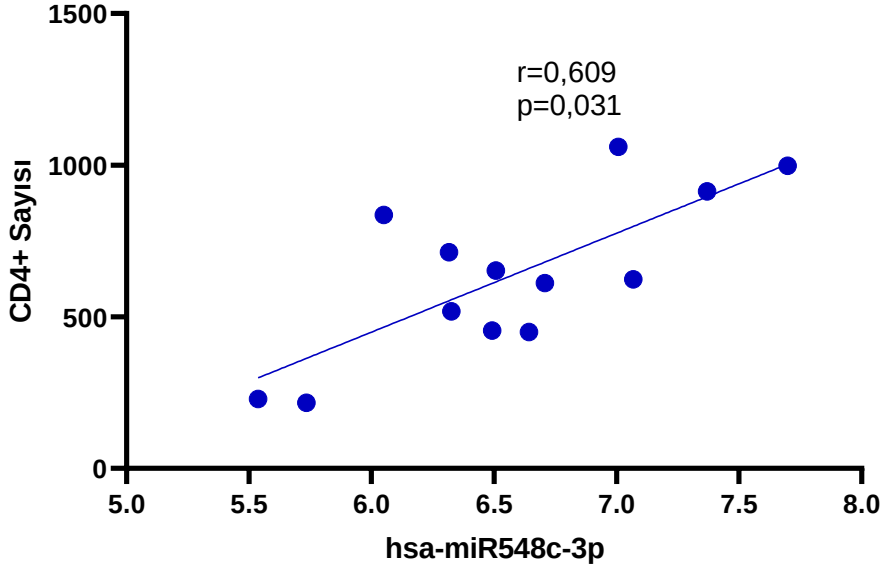
Tedavi Sonrası



Şekil 4.18 Antiretroviral tedavi sonrası hasta grubunda hsa-miR548c-3p ile viral RNA kopya korelasyonu

Aynı hastanın antiretroviral tedavi sonrası durumunda hsa-miR548c-3p ile viral RNA kopya arasında korelasyon saptanmadı ($r = -0,237$; $p=0,457$; Şekil 4.18)

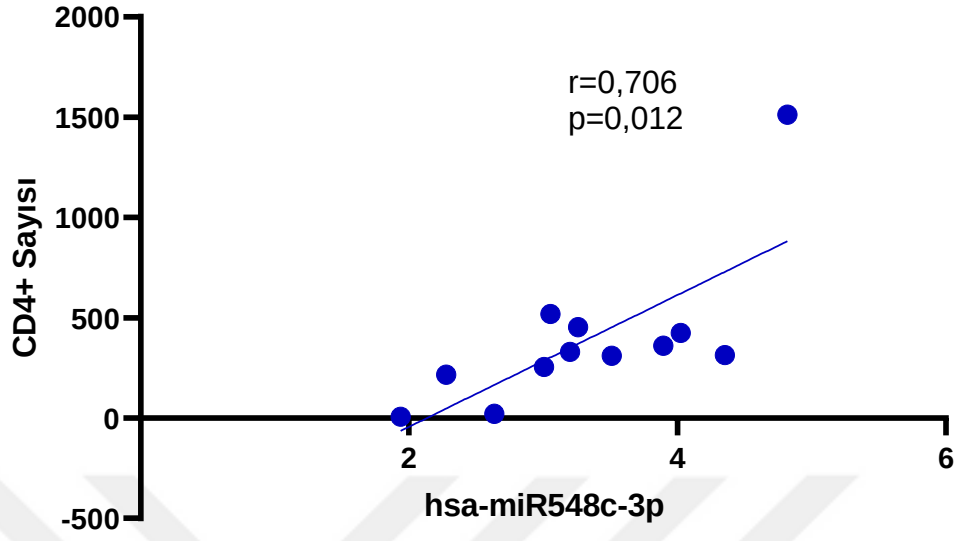
Tedavi Öncesi



Şekil 4.19 Antiretroviral tedavi öncesi naive hasta grubunda hsa-miR548c-3p ile CD4+ sayısı korelasyonu

Antiretroviral tedavi öncesi naive hasta grubunda hsa-miR548c-3p ile CD4+ sayısı arasında bir pozitif korelasyon gözlemlendi ($r = 0,609$; $p=0,031$; Şekil 4.19)

Tedavi Sonrası



Şekil 4.20 Antiretroviral tedavi sonrası hasta grubunda hsa-miR548c-3p ile CD4+ sayısı korelasyonu

Aynı hastanın antiretroviral tedavi sonrası durumunda hsa-miR548c-3p ile CD4+ sayısı arasında güçlü bir pozitif korelasyon gözlemlendi ($r = 0,706$; $p < 0,012$; Şekil 4.20)

5. TARTIŞMA

MiRNA'lar, ilgili virüs-konakçı etkileşimlerini belirleyerek, HIV remisyonu elde etmek için yeni müdahale yolları sunar. Tedavi sürecinin yaygınlaşması ile hastalarda yaşam süresinin uzamasına rağmen kötü prognoz durumunda hem tedavi süresince sağlık sistemleri üzerinde yüksek maliyetlere hem de kümülatif toksisitelere neden olabilmektedirler. Tam anlamıyla remisyonu sağlamak temel amaç olarak belirlenmekte bunun için de anahtar faktörler CD4+ ve CD8+ hücreleri olarak görülmektedir[65–67]. HIV eradikasyonu için ilgi çekici noktalar, konak miRNA'ların latent enfeksiyonların aktif forma geçişinde rol almaları, latent enfeksiyonlarda rezervuarların azalması ve virüs üretimin azalması gibi düzenleyici basamaklardaki etkileridir. Tüm bunlar bizim için enfeksiyonun tedavisinde yeni stratejiler belirlememize olanak sağlamaktadır. Biz bu noktada buna ek olarak biyoinformatik yaklaşımları kullanarak devasa biyomedikal veri zenginliğini klinik eylemlere dönüştürmek için ortaya çıkan veri kümelerinden yararlanarak mekanizmaları derinlemesine değerlendirdik. Genomik bilgilere dayalı verileri, biyokimyasal sonuçlardan ortaya çıkan verileri, önceden yapılan deneylerden gelen yolaklar ve protein komplekslerinin verilerini ortak bir ifade elde etmek için işleyen veri tabanlarını kullandık. HIV ile ilgili en umut verici miRNA'ları bunların CD4, CD8, hücre içine girişte kullandıkları HIV reseptörleri, hastalık ve hücreyel yolaklarla etkileşimlerini biyoinformatik analizler ile değerlendirdik. Bunları önceliklendirmek için destekleyici kanıtlara dayalı elde ettikleri puanlara göre yapılan sıralamalar sonucunda en etkili miRNA'ları belirledik. Ayrıca bildiğimiz kadarıyla belirlediğimiz en etkili bu miRNA'ların (hsa-miR-27a-3p ve hsa-miR-548c-3p) aynı hasta grubunun takibinde (naive halde tedavi öncesi ve tedavi sonrası olmak üzere) önemli klinik parametreler ile ilişkisini ilk defa değerlendirilmiş oldu.

Çalışmamızda, Real-time qPCR'den yararlanılarak HIV ile enfekte hastaların hsa-miR-27a-3p ve hsa-miR-548c-3p'nin plazma ekspresyonları araştırıldı. İstatistiksel analizler, hsa-miR-27a-3p ekspresyonunun aynı hastanın anti retroviral tedavi alırken erken aşamadaki durumunda sağlıklı kontroller ile karşılaştırıldığında up regüle olmasına rağmen, naive hastalar ile karşılaştırıldığında down regüle

durumda olduğunu gösterdi. hsa-miR-548c-3p'nin ise sağlıklı kontrollerle karşılaştırıldığında HIV hastalarının naive ve tedavinin erken döneminde olan hastalarda down regüle olduğunu gösterdi.

miR-27a-3p ekspresyonu, tedavi grubunda (antiretroviral tedavi alan grup) naive grupla karşılaştırıldığında önemli ölçüde daha düşüktü. Bu bulgular literatürdeki diğer yayınlarda bildirilen sonuçlarla uyumludur. Sağlıklı kontrollerle karşılaştırıldığında HIV ile enfekte yetişkin hastaların plazmasında hsa-miR-27a-3p seviyelerinde artış bulundu [68]. Benzer şekilde, Consuegra ve ark., HIV hastalarının sağlıklı kontrol grubuna kıyasla miR-27a seviyelerinde önemli bir artış gösterdiğini de göstermiştir [69]. HIV-1 enfeksiyonu nedeniyle konakçı miRNA'lardaki değişiklikler üzerine yapılan araştırmaların çoğu, miRNA'ların birçoğunun ekspresyon seviyelerinin, HIV-1 enfeksiyonuna hücrel tepkinin bir sonucu olarak up regüle olma eğiliminde olduğunu göstermiştir [70–72]. MiRNA analizlerinin HIV-1 enfeksiyonu olan ve olmayan bireyleri ayırt etme yeteneği dünya çapında çalışmalar ile ortaya konmuştur. Gupta ve ark., HIV-1 ile enfekte olmuş bireylerin ve sağlıklı kontrollerin periferik kan mononükleer hücrelerinde 704 çeşit miRNA'yı analiz ederek bu miRNA'ların 28'inin HIV ile enfekte bireylerde up regüle edildiğini ve 14'ünün down regüle edildiğini bulmuşlardır. Sonuçlarımız, kontrol ile karşılaştırıldığında HIV ile enfekte hastalarda miR-27a-3p'nin düzenlenmesini sergileyen önceki bulgularla uyumludur.

Birçok çalışma, konakçı ve patojenler arasındaki karmaşık etkileşimlerin kritik modülatörleri olarak miRNA'ları vurgulamıştır [73,74]. Zhang ve diğerlerinin in vitro çalışmasından elde edilen veriler, Enterovirüs 71 ile enfekte olmuş hücrelerde miR-27a ekspresyonunun önemli ölçüde azaldığını buldu [75]. İlginç bir şekilde, miR-27a'nın aşırı ekspresyonu, virüs titrasyonu, qPCR ve Western blot ile ölçülen Enterovirüs 71 replikasyonunu inhibe edebilir. Ek olarak, EGFR mRNA'nın miR-27a'nın gerçek bir hedefi olduğu bulunmuştur. miR-27a, qPCR ve Western blot ile ölçülen EGFR ekspresyonunu azaltabilir. Ayrıca, EGFR ekspresyonunun miR-27a tarafından inhibisyonu, virüs replikasyonunu kolaylaştıran Akt ve ERK fosforilasyonunu azaltmıştır [75].

Protein kinaz B veya Akt, hücrelerin metabolizmasında, büyüme ve çoğalmasının düzenlenmesinde merkezi bir role sahiptir ve bu enzimi HIV-1 dahil

olmak üzere viral patojenlerin çeşitli şekillerde hedeflediği bilinmektedir. Bu merkezi rol Akt'nin HIV-1 patogeneğinde özellikle virüsün hücre içine girişini, latent olma durumunu ve yeniden aktive olmasını, viral yayılım, sağkalım gibi aşamalarda bağışıklık tepkisini etkileyerek kritik öneme sahip bir molekül haline gelmesini sağlamaktadır. Enfeksiyonun ilerleme hızını artırmak için belirli birkaç HIV proteini PI3K/Akt yolunu aktive eder. Akt inhibitörlerinin virüsün latent halde kaldığı durumları azaltan ilaçlarla beraber kullanılması, bağışıklık mikroçevresinin kontrol edilmesini sağlayarak enfekte hücre sayısının azaltılmasını sağlayabilir ve HIV'i bloklayarak ortadan kaldırmak için yeni terapötik stratejilerin bir parçası olabilir.

Antiretroviral tedavi öncesi naive hasta grubunda ve aynı hastanın 6. hafta tedavisi sırasında hsa-miR27a-3p ile viral RNA kopya sayısı arasında pozitif korelasyon gözlemlendi. Bu durum hsa-miR27a-3p'nin azaltılarak düzenlenmesi aracılığıyla hastanın ilerleyen dönemde viral yükünü kontrol altına almamızı sağlayabileceğini düşünmekteyiz. Ayrıca antiretroviral tedavi sonrası hsa-miR-27a-3p ile CD4+ T hücre sayısı arasında negatif korelasyon bulduk. Bu, hsa-miR-27a-3p'nin up regülasyonunun düşük CD4+ T hücre sayısından sorumlu olabileceğini göstermektedir. Kontrol grubu ile tedavi alan hasta grubunu karşılaştırdığımızda hsa-miR-27a-3p ekspresyonunda düşme gözlenmesine rağmen, sağlıklı kontrol grubundan yüksek olarak saptanmıştır. Bu durumun sebeplerinden biri numunenin çok erken, yani 6 hafta sonra alınmasına bağlı olabilir. Diğer olası açıklama, düşük örneklem büyüklüğü olabilir. Verilerimizin önemli bir sınırlaması, COVID pandemisi nedeniyle hastanemize az sayıda naive HIV hasta girişi olması ve takibi sürdürmenin zorluğudur.

Öte yandan, biyoinformatik analiz, miR-27a'nın viral enfeksiyonlara yanıt olarak ortaya çıkan lokal ve sistemik inflamasyonun regüle edilmesinde temel bir rol oynayan, JAK-STAT yolunda önemli bir rol oynaması nedeniyle terapötik bir hedef olduğunu göstermiştir [76]. Literatürde, miR-27a'nın, P38 ve JNK38 gibi IL-6 ve MAP kinazlarını hedef alarak inflamasyonu baskıladığı gösterilmiştir. Ayrıca miR-27a, TGF- β yolağı içerisinde bulunan SMAD sinyal aracılarının ekspresyonunu inhibe etmektedir [77].

Çalışmamızda, hsa-miR-548c-3p'nin HIV pozitif naive ve anti-retroviral tedavi alan gruplarımızın kontrol ile karşılaştırıldığında önemli oranda down regüle edildiğini bulduk. Bu konu literatürde tam olarak aydınlatılmamış bir parçayı oluşturmaktadır,

Roth ve ark., bizim çalışmamızın aksine makrofajlara farklılaştırılmış insan monositlerini kullanarak miR-548a'nın HIV ile enfekte hücrelerde up regülasyonunu göstermiştir [78]. Yakın tarihli bir yayın, miR-548'in tedavinin erken aşamalarında HIV hasta grubunda önemli ölçüde down regüle edildiğini gösterdi [79]. MiRNA-548'in up regülasyonunun koruyucu etkiye sahip olduğu spekülasyonu yapılabilir. Mümkün olan en iyi açıklama, bu olayı konak immün savunma mekanizması aktivasyonu üzerinden değerlendirmek veya ART tedavisinin ayrıca hsa-miR-548c-3p'nin down regülasyonuna yol açabildiğini düşündürmektedir.

İlginç bir şekilde, hsa-miR-548c-3p ile viral yük arasında anlamlı bir korelasyon kurmayı başaramadık. miRNA'ların çoğu HIV-1 replikasyonunu baskılayarak işlev görür bazıları bunun aksine indükleyerek etki gösterebilir. Her iki durumda da miRNA profilindeki bu değişiklikler HIV-1 enfeksiyonunun neden olduğu veya konakçı bağışıklık yanıtının bir parçası olarak ortaya çıkan, viral yük ile ilişkili olan HIV-1'in çoğalma kabiliyetindeki değişikliklerin miRNA'lar ile ilişkisini ortaya koymaktadır. Bir miRNA profili saptanması ve üzerindeki değişikliklerin takibi daha önce farklı viral yüklere ve özelliklere sahip hasta gruplarındaki hastalar için yapılmıştır [80]. Witwer ve ark. liderliğinde elit kontrolörler üzerinde yapılan bir araştırmada, miR-125b ve -150 düzeylerinin HIV-1 ile enfekte hastalarda viral yük ile güçlü bir şekilde ilişkili olduğunu gösterdi [81]. Başka bir çalışmada doğal bağışıklık sistemi ve enflamatuar faktörleri hedef aldığı bilinen miRNA'lar miR-19b, 146a, 615-3p, 382, 34a, 144 ve 155, yüksek viral yüke sahip PBMC'lerde önemli ölçüde up regüle edilmektedir [82]. Dolayısıyla bu sonuçlar, verilerimizi destekleyen olası açıklamalar olabilir.

Benzer şekilde çalışmamız, HIV ile enfekte hastalarda naive ve tedavi alan hasta gruplarında hsa-miR-548c-3p ile CD4+ T hücre sayısı arasında güçlü korelasyon gösterdi. Bu, HIV hastalarında antiretroviral tedaviden sonra bile CD4+ T hücre sayısını azalması ile hsa-miR-548c-3p'nin down regülasyonunu göstermektedir. Ortaya çıkan bu durum HIV ile enfekte hastalarda latent inflamasyondaki (hsa-miR-548c-3) rolü ile açıklanabilir. Bu korelasyonu doğrudan desteklemek için yayınlanmış hiçbir veri yoktur. Bununla birlikte, hesaplamalı bir analiz miR-548'in HIV-1, HCV ve HBV hastaları ile üçlü enfeksiyonun tedavisinde potansiyel antiviral terapötik ajanlar olacağını gösterdi çünkü üç virüsün tümü için de tohum bölgesinde mükemmele yakın eşleşme göstermektedir[83].

MiRNA'lar HIV-1 enfeksiyonunu birden fazla mekanizma yoluyla etkileyebilir

Anti-HIV-1 miRNA'lar, HIV-1 aktivitelerini HIV-1 reseptörleri olan CCR5 veya CXCR4 aracılığıyla baskılar [80]. Çalışmamızda elde ettiğimiz biyoinformatik analiz, CXCR4'ün Kolinerjik Reseptör Muskarinik 1 (CHRM1), Guanin Nükleotit bağlayıcı protein (GNAS), Anjiyotensinojen (AGT) C-C motifi kemokin 11 (CCL11) ve diğer birçok yolla potansiyel etkileşiminin olduğunu göstermiştir (Şekil 4.1). Bu yardımcı reseptörlerin bahsettiğimiz yollarla potansiyel etkileşimi, HIV progresyonu ile birlikte başka komplikasyonlara yol açabilir. Gutiérrez-Rivas ve ark., sTNF-R1 ve CCL11'in yüksek plazma düzeylerinin, virolojik kontrole sahip HIV elit kontrolörlerinde CD4+ T hücrelerindeki düşüşle ilişkili olduğunu göstermiştir [84].

Çalışmamızdan elde edilen enrichment analizleri, miRNA-HIV ağının potansiyel değiştiricilerini tanımladı. Pathway enrichment analizi, hem miR-27a hem de CD8+ T hücre network bileşenlerinin, hücresel ilişkili yollar ve bağışıklık sistemi ile en güçlü ilişkiye sahip olduğunu, en yüksek ilişkinin Th17 hücre farklılaşması, viral proteinin sitokin ve sitokin reseptörleri ile etkileşimi, JAK-STAT sinyal yolu, interleokin-4 ve Toll benzeri reseptör sinyal yolları üzerine olduğunu gösterdi (Şekil 4.9). HIV-1'in CD4+ T hücrelerini enfekte ettiği ve bunlar arasında özellikle T helper 17 (Th17) hücrelerinin virüs replikasyonunda biyolojik sürecin meydana gelmesine izin verdiği bilinmektedir. Th17 hücrelerinin enfeksiyonu, AIDS patogenezi ve latent halde vücutta kalan virüs için kritik öneme sahiptir. Wiche Salinas ve ark., HIV-1 enfeksiyonunun bir sonucu olan Th17 hücrelerinin kaybını azaltmak için hücreye özgü bir hedef olarak hormon reseptörünün (RORC2) hedeflenebileceğini buldu [85].

Öte yandan, biyoinformatik analizlerle hsa-miR27a-3p, hsa-miR548c-3p ve CD4/8 sayısı arasındaki bağlantıyı kurmaya çalışıyoruz. Bazı çalışmalar ile aydınlatılmaya çalışılmasına rağmen CD8+ T hücre sayısının HIV ile ilişkili miRNA'lar, hücresel yollar, hastalıklar ve reseptörler ile ilişkisi tam olarak açıklanmamıştır. Daha önceki çalışmalar CD8+ T hücre sayısı ile viral rezervuar arasında pozitif bir korelasyon göstermiştir [86,87]. Yüksek CD8+ T hücre sayıları, ART sırasında CD4+ T hücrelerinde zayıf bir artışla ilişkilendirildi [88,89]. Collins ve arkadaşları yakın tarihli çalışmasında, B hücre aşısı çalışmalarıyla birlikte CD8+ T hücresi bazlı bir HIV aşısı geliştirmeye yönelik çalışmalar için açık bir gerekçe sağlayan, antiretroviral tedavi olmaksızın enfeksiyonu kendiliğinden kontrol eden

bireylerden elde edilen artan kanıtları tartışmaya açmıştır [90]. T hücresi farklılaşmasını düzenleyen hücre içi faktörler arasında miRNA'lar bulunur. miR-16, miR-142-3p, miR-150, miR-142-5p, miR-15b, naive CD8+ T hücrelerinde en fazla eksprese edilen miRNA'lardır ve bu miRNA'ların tümünün, in vitro şartlarda yapılan deneylerde down regülasyona uğradığı görülmektedir.

Huang ve arkadaşları, miR-28, miR-125b, miR-150, miR-223 ve miR-382-5p'nin hücrelerde HIV-1 mRNA'nın 3'UTR bölgesini hedeflediğini ve bunun da dinlenme periyodu sırasında CD4+ T-hücresi aktivasyonunu azalttığını keşfetti. Monositler, farklılaşmadan sonra makrofajlarda down regüle edilen ve makrofajları HIV-1 enfeksiyonuna duyarlı hale getiren bu anti-HIV-1 miRNA'lar açısından zengindir. Bu miRNA'ların baskılanması, mononükleer hücrelerin HIV-1 enfeksiyonuna duyarlılığını artırır [9,91]. HIV-1 RNA genomunun 3'UTR bölgesi, miR-196b ve miR-1290'ın hedefi olarak tanımlanmıştır. Bu iki miRNA'nın inhibisyonu, latent HIV-1'in aktivasyonuna yol açarak, virüs kaynaklı sitoliz ve antiretroviral tedavinin varlığında konakçı antiviral bağışıklık tepkileri ile latent viral rezervuarların temizlenmesini sağlar [92].

6. SONUÇ

Sonuç olarak, erken antiretroviral tedaviyi takiben HIV-1 naive hastalarda plazma hsa-miR27a-3p ve hsa-miR548c-3p düzeylerini tespit ettik. Verilerimiz, hsa-miR27a-3p'nin antiretroviral tedavi grubunda sağlıklı kontrole kıyasla upregule olduğunu ve hsa-miR548c-3p'nin erken antiretroviral tedavi grubunda kontrole kıyasla önemli ölçüde downregule olduğunu ve potansiyel klinik biyobelirteçlerle anlamlı korelasyon gösterdiğini ortaya koydu. Tedavi alan hastalarda hsa-miR27a-3p ile CD4+ sayıları arasında negatif korelasyon saptadık. Antiretroviral tedavi öncesi naive hasta grubunda ve aynı hastanın 6. hafta tedavisi sırasında hsa-miR27a-3p ile viral RNA kopya sayısı arasında pozitif korelasyon gözlemlendi. Aynı şekilde tedavi öncesi ve tedavi sonrası CD4+ sayıları ile hsa-miR548c-3p arasında pozitif korelasyon saptadık. Tedavi ile birlikte hsa-miR27a-3p ve hsa-miR548c-3p'nin regülasyonun düzenlenmesi CD4+ sayısını artırarak latent inflamasyona karşı terapötik etkilerin elde edilmesinde kullanılabilir. Bu miRNA'ların klinik verilerle beraber değerlendirilmesi kişiselleştirilmiş antiretroviral terapi seçeneğinin değerlendirilmesine izin verebilir. Bu miRNA'ların aktivatör veya inhibitörleri, T hücre popülasyonunun olması gerektiği düzeye getirecek şekilde CD4+ ve CD8+ T hücrelerini kapsamlı aktive ederek böylelikle HIV hastalığının teşhisi ve erken aşamadaki yönetimi için faydalı olabilir. Son olarak, bu miRNA'lar, HIV-1 enfeksiyonu takibi ve tedavinin etkinliğinin değerlendirilmesi için yararlı potansiyel prognostik biyobelirteçler olabilir, ancak kantitatif korelasyonlar kurmak için daha fazla araştırma yapılmalıdır.

ÇALIŞMANIN KISITLILIKLARI

Bu çalışma, HIV tedavisine yönelik terapötik yaklaşımlarla ilgili değerli bilgiler sağlar, bu miRNA'ların terapötik potansiyelini vurgular, ancak sınırlı örneklem boyutu ve bir bölgedeki demografik örneklemin kısıtlılığı, diğer popülasyonlara

genellenebilirliği sınırlar. Kapsamı sınırlı olmakla birlikte, çalışma bulguları řu anda yalnızca Türkiye'deki ana HIV merkezini temsil eden Cerrahpaşa Tıp Fakültesi HIV merkezi hastalarının karakteristiğidir. Bu miRNA'ların elit kontrolörlerle karşılaştırılması literatüre katkıda bulunabilir. Öte yandan, CD8+ T hcreti ile korelasyonunu sınırlı kaynaklar nedeniyle kuramadık. HIV hastalarında teşhis ve prognostik değer olabilecek, biyoinformatik analiz yoluyla elde edilen tüm miRNA profilini kısıtlı kaynaklar nedeniyle doğrulamadık.



7. KAYNAKLAR

1. Bartel DP. MicroRNAs. *Cell*. 2004;116:281–97.
2. Saeedi Borujeni MJ, Esfandiary E, Taheripak G, Codoñer-Franch P, Alonso-Iglesias E, Mirzaei H. Molecular aspects of diabetes mellitus: Resistin, microRNA, and exosome. *J of Cellular Biochemistry*. 2018;119:1257–72.
3. Gholamin S, Mirzaei H, Razavi S, Hassanian SM, Saadatpour L, Masoudifar A, et al. GD2-targeted immunotherapy and potential value of circulating microRNAs in neuroblastoma. *J Cell Physiol*. 2018;233:866–79.
4. cdn.who.int [Internet]. Latest HIV estimates and updates on HIV policies uptake, December 2021. Available from: https://cdn.who.int/media/docs/default-source/hq-hiv-hepatitis-and-stis-library/2021_global_summary_web_v32.pdf?sfvrsn=4b8815ad_30
5. Sun B, Yang R, Mallardo M. Roles of microRNAs in HIV-1 Replication and Latency. *MicroRNA*. 2016;5.
6. Deeks SG, Lewin SR, Havlir DV. The end of AIDS: HIV infection as a chronic disease. *The Lancet*. 2013;382:1525–33.
7. Houzet L, Yeung M-L, Lame V de, Desai D, Smith SM, Jeang K-T. MicroRNA profile changes in human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) seropositive individuals. *Retrovirology*. 2008;5.
8. Patel P, Ansari MY, Bapat S, Thakar M, Gangakhedkar R, Jameel S. The microRNA miR-29a is associated with human immunodeficiency virus latency. *Retrovirology*. 2014;11.
9. Huang J, Wang F, Argyris E, Chen K, Liang Z, Tian H, et al. Cellular microRNAs contribute to HIV-1 latency in resting primary CD4+ T lymphocytes. *Nature Medicine*. 2007;13.
10. O’Connell RM, Rao DS, Chaudhuri AA, Baltimore D. Physiological and pathological roles for microRNAs in the immune system. *Nat Rev Immunol*. 2010;10:111–22.

11. Sung T-L, Rice AP. miR-198 Inhibits HIV-1 Gene Expression and Replication in Monocytes and Its Mechanism of Action Appears To Involve Repression of Cyclin T1. *PLoS Pathogens*. 2009;5.
12. Moir S, Chun T-W, Fauci AS. Pathogenic Mechanisms of HIV Disease. *Annu Rev Pathol Mech Dis*. 2011;6:223–48.
13. Biswas S, Haleyurgirisetty M, Lee S, Hewlett I, Devadas K. Development and validation of plasma miRNA biomarker signature panel for the detection of early HIV-1 infection. *EBioMedicine*. Elsevier B.V.; 2019;43:307–16.
14. Mitchell PS, Parkin RK, Kroh EM, Fritz BR, Wyman SK, Pogosova-Agadjanyan EL, et al. Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2008;105:10513–8.
15. Swaminathan G, Navas-Martín S, Martín-García J. MicroRNAs and HIV-1 Infection: Antiviral Activities and Beyond. *Journal of Molecular Biology*. 2014;426:1178–97.
16. Jiang Y, Wang H, Li Y, Guo S, Zhang L, Cai J. Peripheral blood miRNAs as a biomarker for chronic cardiovascular diseases. *Sci Rep*. 2014;4:5026.
17. Ha M, Kim VN. Regulation of microRNA biogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2014;15:509–24.
18. Bohmert K. AGO1 defines a novel locus of *Arabidopsis* controlling leaf development. *The EMBO Journal*. 1998;17:170–80.
19. Parker JS, Roe SM, Barford D. Crystal structure of a PIWI protein suggests mechanisms for siRNA recognition and slicer activity. *EMBO J*. 2004;23:4727–37.
20. Baumberger N, Baulcombe DC. *Arabidopsis* ARGONAUTE1 is an RNA Slicer that selectively recruits microRNAs and short interfering RNAs. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2005;102:11928–33.
21. Esteller M. Non-coding RNAs in human disease. *Nat Rev Genet*. 2011;12:861–74.
22. Cogswell JP, Ward J, Taylor IA, Waters M, Shi Y, Cannon B, et al. Identification of miRNA changes in Alzheimer's disease brain and CSF yields putative biomarkers and insights into disease pathways. *J Alzheimers Dis*. 2008;14:27–41.
23. Sun P, Liu DZ, Jickling GC, Sharp FR, Yin K-J. MicroRNA-based therapeutics in central nervous system injuries. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2018;38:1125–48.
24. Xin H, Li Y, Buller B, Katakowski M, Zhang Y, Wang X, et al. Exosome-Mediated Transfer of miR-133b from Multipotent Mesenchymal Stromal Cells to Neural Cells Contributes to Neurite Outgrowth. *Stem Cells*. 2012;30:1556–64.

25. Zhao Y, Ransom JF, Li A, Vedantham V, von Drehle M, Muth AN, et al. Dysregulation of Cardiogenesis, Cardiac Conduction, and Cell Cycle in Mice Lacking miRNA-1-2. *Cell*. 2007;129:303–17.
26. Wojciechowska A, Osiak A, Kozar-Kamińska K. MicroRNA in cardiovascular biology and disease. *Adv Clin Exp Med*. 2017;26:868–74.
27. Zhao W, Zhao S-P, Zhao Y-H. MicroRNA-143/-145 in Cardiovascular Diseases. *BioMed Research International*. 2015;2015:1–9.
28. Cimmino A, Calin GA, Fabbri M, Iorio MV, Ferracin M, Shimizu M, et al. miR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102:13944–9.
29. Di Leva G, Garofalo M, Croce CM. MicroRNAs in Cancer. *Annu Rev Pathol Mech Dis*. 2014;9:287–314.
30. Lu J, Getz G, Miska EA, Alvarez-Saavedra E, Lamb J, Peck D, et al. MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature*. 2005;435:834–8.
31. Bettencourt P, Marion S, Pires D, Santos LF, Lastrucci C, Carmo N, et al. Actin-binding protein regulation by microRNAs as a novel microbial strategy to modulate phagocytosis by host cells: the case of N-Wasp and miR-142-3p. *Front Cell Infect Microbiol* 2013;3:19.
32. Moon H-G, Yang J, Zheng Y, Jin Y. miR-15a/16 Regulates Macrophage Phagocytosis after Bacterial Infection. *Jl*. 2014;193:4558–67.
33. Umbach JL, Kramer MF, Jurak I, Karnowski HW, Coen DM, Cullen BR. MicroRNAs expressed by herpes simplex virus 1 during latent infection regulate viral mRNAs. *Nature*. 2008;454:780–3.
34. Fu M, Gao Y, Zhou Q, Zhang Q, Peng Y, Tian K, et al. Human cytomegalovirus latent infection alters the expression of cellular and viral microRNA. *Gene*. 2014;536:272–8.
35. Yang X, Li H, Sun H, Fan H, Hu Y, Liu M, et al. Hepatitis B Virus-Encoded MicroRNA Controls Viral Replication. Ou J-HJ, editor. *J Virol*. 2017;91:e01919-16.
36. Kunden RD, Khan JQ, Ghezelbash S, Wilson JA. The Role of the Liver-Specific microRNA, miRNA-122 in the HCV Replication Cycle. *IJMS*. 2020;21:5677.
37. van Heuvel Y, Schatz S, Rosengarten JF, Stitz J. Infectious RNA: Human Immunodeficiency Virus (HIV) Biology, Therapeutic Intervention, and the Quest for a Vaccine. *Toxins*. 2022;14:138.
38. Cohen MS, Pilcher CD. Amplified HIV Transmission and New Approaches to HIV Prevention. *J INFECT DIS*. 2005;191:1391–3.
39. Jaffe HW, Choi K, Thomas PA, Haverkos HW, Auerbach DM, Guinan ME, et al. National Case-Control Study of Kaposi's Sarcoma and Pneumocystis

carinii Pneumonia in Homosexual Men: Part 1, Epidemiologic Results. *Ann Intern Med.* 1983;99:145.

40. [cdn.who.int](https://cdn.who.int/media/docs/default-source/hq-hiv-hepatitis-and-stis-library/2022_global_summary_web_v12.pdf) [Internet]. Latest HIV estimates and update on COVID-19 disruptions, July 2022 . Available from: https://cdn.who.int/media/docs/default-source/hq-hiv-hepatitis-and-stis-library/2022_global_summary_web_v12.pdf
41. Teasdale CA, Marais BJ, Abrams EJ. HIV: prevention of mother-to-child transmission. *BMJ Clin Evid.* 2011;2011:0909.
42. Lundgren JD, Babiker AG, Gordin F, Emery S, Grund B, Sharma S, et al. Initiation of Antiretroviral Therapy in Early Asymptomatic HIV Infection. *N Engl J Med.* 2015;373:795–807.
43. Cohen MS, Chen YQ, McCauley M, Gamble T, Hosseinipour MC, Kumarasamy N, et al. Prevention of HIV-1 Infection with Early Antiretroviral Therapy. *N Engl J Med.* 2011;365:493–505.
44. Fischl MA, Richman DD, Grieco MH, Gottlieb MS, Volberding PA, Laskin OL, et al. The Efficacy of Azidothymidine (AZT) in the Treatment of Patients with AIDS and AIDS-Related Complex. *N Engl J Med.* 1987;317:185–91.
45. Lee H, Hanes J, Johnson KA. Toxicity of Nucleoside Analogues Used to Treat AIDS and the Selectivity of the Mitochondrial DNA Polymerase. *Biochemistry.* 2003;42:14711–9.
46. Eshleman SH, Guay LA, Mwatha A, Cunningham SP, Brown ER, Musoke P, et al. Comparison of Nevirapine (NVP) Resistance in Ugandan Women 7 Days vs. 6–8 Weeks after Single-Dose NVP Prophylaxis: HIVNET 012. *AIDS Research and Human Retroviruses.* 2004;20:595–9.
47. Wensing AMJ, van Maarseveen NM, Nijhuis M. Fifteen years of HIV Protease Inhibitors: raising the barrier to resistance. *Antiviral Research.* 2010;85:59–74.
48. Tilton JC, Doms RW. Entry inhibitors in the treatment of HIV-1 infection. *Antiviral Research.* 2010;85:91–100.
49. Coffin JM. HIV Population Dynamics in Vivo: Implications for Genetic Variation, Pathogenesis, and Therapy. *Science.* 1995;267:483–9.
50. Doncheva NT, Morris JH, Gorodkin J, Jensen LJ. Cytoscape StringApp: Network Analysis and Visualization of Proteomics Data. *J Proteome Res.* 2019;18:623–32.
51. Shannon P, Markiel A, Ozier O, Baliga NS, Wang JT, Ramage D, et al. Cytoscape: A Software Environment for Integrated Models of Biomolecular Interaction Networks. *Genome Res.* 2003;13:2498–504.
52. Soplińska A, Zareba L, Wicik Z, Eyileten C, Jakubik D, Siller-Matula JM, et al. MicroRNAs as Biomarkers of Systemic Changes in Response to Endurance Exercise—A Comprehensive Review. *Diagnostics.* 2020;10:813.

53. Palasca O, Santos A, Stolte C, Gorodkin J, Jensen LJ. TISSUES 2.0: an integrative web resource on mammalian tissue expression. Database [Internet]. 2018 [cited 2022 Nov 10];2018. Available from: <https://academic.oup.com/database/article/doi/10.1093/database/bay003/4851151>
54. Huang DW, Sherman BT, Lempicki RA. Bioinformatics enrichment tools: paths toward the comprehensive functional analysis of large gene lists. *Nucleic Acids Research*. 2009;37:1–13.
55. Chen EY, Tan CM, Kou Y, Duan Q, Wang Z, Meirelles GV, et al. Enrichr: interactive and collaborative HTML5 gene list enrichment analysis tool. *BMC Bioinformatics*. 2013;14:128.
56. Pordzik J, Jakubik D, Jarosz-Popek J, Wicik Z, Eyileten C, De Rosa S, et al. Significance of circulating microRNAs in diabetes mellitus type 2 and platelet reactivity: bioinformatic analysis and review. *Cardiovasc Diabetol*. 2019;18:113.
57. Eyileten C, Wicik Z, De Rosa S, Mirowska-Guzel D, Soplińska A, Indolfi C, et al. MicroRNAs as Diagnostic and Prognostic Biomarkers in Ischemic Stroke—A Comprehensive Review and Bioinformatic Analysis. *Cells*. 2018;7:249.
58. Ru Y, Kechris KJ, Tabakoff B, Hoffman P, Radcliffe RA, Bowler R, et al. The multiMiR R package and database: integration of microRNA–target interactions along with their disease and drug associations. *Nucleic Acids Research*. 2014;42:e133–e133.
59. Gustavsen JA, Pai S, Isserlin R, Demchak B, Pico AR. RCy3: Network biology using Cytoscape from within R. *F1000Res*. 2019;8:1774.
60. Gautier L, Cope L, Bolstad BM, Irizarry RA. affy—analysis of *Affymetrix GeneChip* data at the probe level. *Bioinformatics*. 2004;20:307–15.
61. Gentleman RC, Carey VJ, Bates DM, Bolstad B, Dettling M, Dudoit S, et al. Bioconductor: open software development for computational biology and bioinformatics. *Genome Biol*. 2004;5:R80.
62. Carino A, De Rosa S, Sorrentino S, Polimeni A, Sabatino J, Caiazza G, et al. Modulation of Circulating MicroRNAs Levels during the Switch from Clopidogrel to Ticagrelor. *BioMed Research International*. 2016;2016:1–5.
63. De Rosa S, Fichtlscherer S, Lehmann R, Assmus B, Dimmeler S, Zeiher AM. Transcoronary Concentration Gradients of Circulating MicroRNAs. *Circulation*. 2011;124:1936–44.
64. Gareri C, De Rosa S, Indolfi C. MicroRNAs for Restenosis and Thrombosis After Vascular Injury. *Circ Res*. 2016;118:1170–84.
65. Hartana CA, Yu XG. Immunological effector mechanisms in HIV-1 elite controllers. *Current Opinion in HIV and AIDS*. 2021 [cited 2023 Feb 17];Publish Ahead of Print. Available from: <https://journals.lww.com/10.1097/COH.0000000000000693>

66. Dybul M, Attoye T, Baptiste S, Cherutich P, Dabis F, Deeks SG, et al. The case for an HIV cure and how to get there. *The Lancet HIV*. 2021;8:e51–8.
67. Lian X, Gao C, Sun X, Jiang C, Einkauf KB, Seiger KW, et al. Signatures of immune selection in intact and defective proviruses distinguish HIV-1 elite controllers. *Sci Transl Med*. 2021;13:eabl4097.
68. Qi Y, Hu H, Guo H, Xu P, Shi Z, Huan X, et al. MicroRNA profiling in plasma of HIV-1 infected patients: potential markers of infection and immune status. *Journal of Public Health and Emergency*. AME Publishing Company; 2017;1:65–65.
69. Consuegra I, Gasco S, Serramía MJ, Jiménez JL, Mellado MJ, Muñoz-Fernández MÁ. Establishment of a miRNA profile in paediatric HIV-1 patients and its potential as a biomarker for effectiveness of the combined antiretroviral therapy. *Sci Rep*. 2021;11:23477.
70. Fowler L, Conceicao V, Perera S, Gupta P, Chew C, Dyer W, et al. First Evidence for the Disease-Stage, Cell-Type, and Virus Specificity of microRNAs during Human Immunodeficiency Virus Type-1 Infection. *Medical Sciences*. 2016;4.
71. Balasubramaniam M, Pandhare J, Dash C. Are microRNAs Important Players in HIV-1 Infection? An Update. *Viruses*. 2018;10.
72. Yahyaei S, Biasin M, Saulle I, Gnudi F, De Luca M, Tasca KI, et al. Identification of a Specific miRNA Profile in HIV-Exposed Seronegative Individuals. *JAIDS Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes*. 2016;73:11–9.
73. Swaminathan S, Hu X, Zheng X, Kriga Y, Shetty J, Zhao Y, et al. Interleukin-27 treated human macrophages induce the expression of novel microRNAs which may mediate anti-viral properties. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2013;434.
74. Zhang X, Daucher M, Armistead D, Russell R, Kottlilil S. MicroRNA Expression Profiling in HCV-Infected Human Hepatoma Cells Identifies Potential Anti-Viral Targets Induced by Interferon- α . Choi J, editor. *PLoS ONE*. 2013;8:e55733.
75. Zhang L, Chen X, Shi Y, Zhou B, Du C, Liu Y, et al. miR-27a suppresses EV71 replication by directly targeting EGFR. *Virus Genes*. 2014;49:373–82.
76. Ezeonwumelu IJ, Garcia-Vidal E, Ballana E. JAK-STAT Pathway: A Novel Target to Tackle Viral Infections. *Viruses*. 2021;13:2379.
77. Chae D, Ban E, Yoo YS, Kim EE, Baik J, Song EJ. MIR-27a regulates the TGF- β signaling pathway by targeting *SMAD2* and *SMAD4* in lung cancer. *Mol Carcinog*. 2017;56:1992–8.
78. Roth W, Huang M, Addae Konadu K, Powell M, Bond V. Micro RNA in Exosomes from HIV-Infected Macrophages. *IJERPH*. 2015;13:32.

79. Tarancon-Diez L, Consuegra I, Vazquez-Alejo E, Ramos-Ruiz R, Ramos JT, Navarro ML, et al. miRNA Profile Based on ART Delay in Vertically Infected HIV-1 Youths Is Associated With Inflammatory Biomarkers and Activation and Maturation Immune Levels. *Front Immunol*. 2022;13:878630.
80. Su B, Fu Y, Liu Y, Wu H, Ma P, Zeng W, et al. Potential Application of MicroRNA Profiling to the Diagnosis and Prognosis of HIV-1 Infection. *Frontiers in Microbiology*. 2018;9.
81. Witwer KW, Watson AK, Blankson JN, Clements JE. Relationships of PBMC microRNA expression, plasma viral load, and CD4+ T-cell count in HIV-1-infected elite suppressors and viremic patients. *Retrovirology*. 2012;9.
82. Duskova K, Nagilla P, Le H-S, Iyer P, Thalamuthu A, Martinson J, et al. MicroRNA regulation and its effects on cellular transcriptome in Human Immunodeficiency Virus-1 (HIV-1) infected individuals with distinct viral load and CD4 cell counts. *BMC Infectious Diseases*. 2013;13.
83. Khokhar A, Noorali S, Sheraz M, Mahalingham K, Pace DG, Khanani MR, et al. Computational analysis to predict functional role of *hsa-miR-3065-3p* as an antiviral therapeutic agent for treatment of triple infections: HCV, HIV-1, and HBV. *Libyan Journal of Medicine*. 2012;7:19774.
84. Gutiérrez-Rivas M, Jiménez-Sousa MÁ, Rallón N, Jiménez JL, Restrepo C, León A, et al. High Plasma Levels of sTNF-R1 and CCL11 Are Related to CD4+ T-Cells Fall in Human Immunodeficiency Virus Elite Controllers With a Sustained Virologic Control. *Front Immunol*. 2018;9:1399.
85. Wiche Salinas TR, Zhang Y, Sarnello D, Zhyvoloup A, Marchand LR, Fert A, et al. Th17 cell master transcription factor RORC2 regulates HIV-1 gene expression and viral outgrowth. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2021;118:e2105927118.
86. Ananworanich J, Chomont N, Eller LA, Kroon E, Tovanabutra S, Bose M, et al. HIV DNA Set Point is Rapidly Established in Acute HIV Infection and Dramatically Reduced by Early ART. *EBioMedicine*. 2016;11:68–72.
87. Jain V, Hartogensis W, Bacchetti P, Hunt PW, Hatano H, Sinclair E, et al. Antiretroviral Therapy Initiated Within 6 Months of HIV Infection Is Associated With Lower T-Cell Activation and Smaller HIV Reservoir Size. *The Journal of Infectious Diseases*. 2013;208:1202–11.
88. Ostrowski SR, Katzenstein TL, Thim PT, Pedersen BK, Gerstoft J, Ullum H. Low-Level Viremia and Proviral DNA Impede Immune Reconstitution in HIV-1–Infected Patients Receiving Highly Active Antiretroviral Therapy. *J INFECT DIS*. 2005;191:348–57.
89. Helleberg M, Kronborg G, Ullum H, Ryder LP, Obel N, Gerstoft J. Course and Clinical Significance of CD8⁺ T-Cell Counts in a Large Cohort of HIV-Infected Individuals. *J Infect Dis*. 2015;211:1726–34.
90. Collins DR, Gaiha GD, Walker BD. CD8+ T cells in HIV control, cure and prevention. *Nat Rev Immunol*. 2020;20:471–82.

91. Hariharan M, Scaria V, Pillai B, Brahmachari SK. Targets for human encoded microRNAs in HIV genes. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2005;337.
92. Wang P, Qu X, Zhou X, Shen Y, Ji H, Fu Z, et al. Two cellular microRNAs, miR-196b and miR-1290, contribute to HIV-1 latency. *Virology*. 2015;486.

