



T.C.  
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI  
YÜKSEK LİSANS TEZİ

HACAT HÜCRE HATTINDA SECUKİNUMAB'IN  
LNCRNALAR MEG3 VE MSX2P1'NİN EKSPRESYON  
SEVİYELERİNE ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

Ömer Seyfettin KURTOĞLU

Temmuz 2022  
DENİZLİ

T.C.  
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

HACAT HÜCRE HATTINDA SECUKİNUMAB'IN LNCRNALAR MEG3  
VE MSX2P1'İN EKSPRESYON SEVİYELERİNE ETKİSİNİN  
ARAŞTIRILMASI

TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI  
YÜKSEK LİSANS TEZİ

Ömer Seyfettin KURTOĞLU

Tez Danışmanı: Prof. Dr. İbrahim AÇIKBAŞ

Denizli, 2022

Bu tezin tasarımı, hazırlanması, yürütülmesi, araştırmalarının yapılması ve bulgularının analizlerinde bilimsel etiğe ve akademik kurallara özenle riayet edildiğini; bu çalışmanın doğrudan birincil ürünü olmayan bulguların, verilerin ve materyallerin bilimsel etiğe uygun olarak kaynak gösterildiğini ve alıntı yapılan çalışmalara atfedildiğini beyan ederim.

Öğrenci Adı Soyadı: Ömer Seyfettin Kurtoğlu

İmza

## ÖZET

### HaCaT HÜCRE HATTINDA SECUKİNUMAB'IN LNCRNALAR MEG3 VE MSX2P1'NİN EKSPRESYON SEVİYELERİNE ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

Ömer Seyfettin KURTOĞLU

Yüksek Lisans Tezi, Tıbbi Biyoloji AD

Tez Yöneticisi: Prof. Dr. İbrahim AÇIKBAŞ

Ağustos 2022, 59 Sayfa

Psoriasis, sıklıkla iyi sınırlı, pullu plaklar şeklinde görülen yaygın, kronik inflamatuvar bir deri hastalığıdır. İnsidansı yüksektir ve hastalık nüksetmeye eğilimlidir. Epidermis, genellikle dermisin hemen üzerindeki bazal katman (stratum bazale) ile başlayan ve dikenli ve granüler katmanlardan üst katman olan stratum corneum'a doğru ilerleyen, genellikle birkaç katmana bölünmüş, sürekli yenilenen bir katmandır. Ana işlevi, cildi potansiyel olarak tehlikeli çevresel tehditlerden korumak, fiziksel, kimyasal, biyokimyasal ve adaptif immünolojik bariyerler sağlamaktır. miRNA Ortalama 22 nükleotit uzunluğunda, kodlamayan küçük RNA'lardır. miRNA'lar, ifadeyi bastırmak için hedef mRNA'ların 3' UTR'si ile etkileşime girmektedir. lncRNA'lar, 200 nükleotidden daha uzun olan ve proteinleri kodlama yeteneği olmayan bir RNA grubudur.

Çalışmamızda, hücre kültürü psoriasis modelinde, psoriasisin tedavisinde en son kullanıma giren biyolojik ajan olan interlökin-17 inhibitörü Secukinumab'ın keratinosit proliferasyonu ve inhibisyonun da rol alan iki uzun kodlanmayan RNA'nın ekspresyon seviyelerine etkisinin araştırılması amaçlanmaktadır.

HaCaT keratinosit hücre hattı 24 saat 200 ng/ml LPS ile muamele edildi ve hücreler Secukinumab'ın 0,1 0,25 0,5 1 2,5 5 7,5 10 mg/ml dozları hücreleri muamele ederek 24,48,72 saatlerde hücre canlılığı değerleri tespit edildi. LD50 değeri olarak 7,5 mg/ml dozu belirlenip MEG3 VE MSX2P1'nin ekspresyon sonucu belirlendi.

Secukinumab uygulanan hücrelerde MEG3 ekspresyonunun 3,7 kat azaldığı ve MSX2P1 ekspresyonunun ise 1.77 kat arttığı tespit edildi.

**Anahtar Kelimeler:** Psoriasis, Patogenez, HaCaT, lncRNA, LPS

**Bu çalışma, Pamukkale Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi (PAUBAP) tarafından desteklenmiştir.**

**ABSTRACT****INVESTIGATION OF THE EFFECT OF SECUKINUMAB ON THE EXPRESSION LEVELS OF LNCRNALAR MEG3 AND MSX2P1 IN HaCaT CELL LINE**

KURTOGLU, Ömer Seyfettin

PhD Thesis in Medical Biology

Supervisor: Prof. Dr. İbrahim AÇIKBAŞ (PhD)

August 2022, 59 Pages

Psoriasis is a frequently, chronic inflammatory skin disease that often presents as well-demarcated, scaly plaques. The incidence is high and the disease is prone to relapse. The epidermis is a constantly regenerating epithelium, usually divided into several layers, beginning with the basal layer (stratum basale) just above the dermis and progressing from the spiny and granular layers to the upper layer, the stratum corneum. Its main function is to protect the skin from potentially dangerous environmental threats, providing physical, chemical, biochemical and adaptive immunological barriers. miRNAs are small non-coding RNAs with an average length of 22 nucleotides. miRNAs interact with the 3' UTR of target mRNAs to suppress expression. lncRNAs are a group of RNAs that are longer than 200 nucleotides and do not have the ability to encode proteins.

In our study, it is aimed to investigate the effect of interleukin-17 inhibitor Secukinumab, which is the most recently used biological agent in the treatment of psoriasis, on the expression levels of two long non-coding RNAs that play a role in keratinocyte proliferation and inhibition in a cell culture psoriasis model.

The HaCaT keratinocyte cell line was treated with 200 ng/ml LPS for 24 hours and the cells were treated with 0,1, 0,25, 0,5, 1, 2,5, 5, 7,5, 10 mg/ml doses of Secukinumab at 24,48,72 hours for determining the cell viability values. As the LD50 value, the dose of 7,5 mg/ml was determined and the expression result of MEG3 and MSX2P1 was determined.

It was determined that the expression of MEG3 decreased 3.7 times and the expression of MSX2P1 increased 1.77 times in the cells treated with secukinumab.

**Keywords:** Psoriasis, Pathogenesis, HaCaT, lncRNA, LPS

**This work was supported by the Scientific Research Projects Unit of The Pamukkale University (PAUBAP).**

## TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans öğrenimim ve tez çalışmam süresince tecrübesini benimle paylaşan, akademik eğitimime yön veren tez danışman hocam Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Başkanı olan Prof. Dr. İbrahim AÇIKBAŞ 'a,

Tez çalışma sürecimde yardımcı olan, Laboratuvar desteği sunan Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Asistanı Dr Ayşen Buket ER URGANCI' ya,

Tüm eğitim sürecimde bana desteklerini esirgemeyen değerli bölüm hocalarıma ve Yüksek Lisans Öğrencisi Cihangir DOĞAN'a,

Hayatım boyunca her koşulda yanımda olan, maddi ve manevi desteklerini hiç esirgemeyen aileme, teşekkürlerimi sunarım.



## İÇİNDEKİLER

### Sayfa

<b>ÖZET</b> .....	<b>i</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>ii</b>
<b>TEŞEKKÜR</b> .....	<b>iii</b>
<b>İÇİNDEKİLER</b> .....	<b>iv</b>
<b>ŞEKİLLER DİZİNİ</b> .....	<b>vi</b>
<b>SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ</b> .....	<b>viii</b>
<b>1 GİRİŞ</b> .....	<b>1</b>
1.1. Tez Çalışmasının Amacı.....	2
<b>2. KURAMSAL BİLGİLER VE LİTERATÜR TARAMASI</b> .....	<b>3</b>
2.1 Psoriasis.....	3
2.1.1 Klinik Özellikler .....	3
2.1.2 Klinik Tipleri .....	4
2.1.3 Psoriasis ile ilişkili genler ve lokuslar.....	6
2.1.4 Psoriasis patogenezinin katılan hücreler ve İmmün sistem hücreleri.....	9
2.1.5 Psoriasis patogenezinin katılan proteinler ve moleküller .....	13
2.1.6 Psoriasis patogenezinin katılan sitokin ve kimokinler .....	17
2.1.7 Psoriasis Tedavisi.....	18
2.2 miRNA (MikroRNA).....	20
2.2.1 miRNA biyogenezi .....	20
2.2.2 miRNA ifadesinin düzenlenmesi: Transkripsiyon.....	23
2.2.3 miRNA'ların epigenetik kontrolü .....	23
2.2.4 Psoriasisde miRNA'ların rolü .....	24
2.3 lncRNA (Uzun Kodlanmayan RNA'lar) .....	26
2.3.1 Psoriasisde lncRNA Rolü .....	27
2.4 Hipotez .....	30
<b>3. GEREÇ VE YÖNTEMLER</b> .....	<b>31</b>
3.1 HaCaT Hücre Kültürü.....	31
3.2 Hücre Canlılığı Testi .....	31
3.3 RNA İzolasyonu .....	32
3.4 cDNA Sentezi .....	33
3.5 Ekspresyon Analizi .....	33

<b>4. BULGULAR .....</b>	<b>35</b>
4.1 Hücre Kültürü.....	35
4.2 Hücre Canlılığı Testi .....	36
4.3 Ekspresyon Analizi .....	38
<b>5. TARTIŞMA.....</b>	<b>40</b>
<b>6. SONUÇLAR .....</b>	<b>42</b>
<b>7. KAYNAKLAR .....</b>	<b>43</b>
<b>8.EKLER .....</b>	<b>46</b>



## ŞEKİLLER DİZİNİ

	<b>Sayfa</b>
ŞEKİL 2.1 DERİNİN HİSTOLOJİK YAPISI (JOEL M. REICHERTER VD 2015) .....	9
ŞEKİL 2.2 EPİDERMİSTE KERATİNOŞİT TABAKALARI (SHOHREH NAFİSİ VD 2018) .....	10
ŞEKİL 2.3 SAĞLIKLI DERİ VE PSORİYATİK DERİNİN HİSTOLOJİK GÖRÜNÜMÜ (MICHELLE A. LOWES VD 2015).....	11
ŞEKİL 2.4 PSORİYATİK DERİ DE T HÜCRELERİNİN ETKİSİ (MICHELLE A. LOWES VD 2015) .....	12
ŞEKİL 2.5 NORMAL DERİ VE PSORİYATİK DERİNİN YAPILARININ DEĞİŞİMİ (MICHELLE A. LOWES VD 2015) .....	17
ŞEKİL 2.6 MİRNA BİYOGENEZİ (DÓNAL O'CARROLL VD 2013).....	21
ŞEKİL 2.7 MİRNA KANONİK OLMAYAN BİYOGENEZ (JR-SHIUAN YANG VD 2011) .....	22
ŞEKİL 4.1 HACAT HÜCRE FLASKI .....	35
ŞEKİL 4.2 HACAT HÜCRE HATTININ 24 SAAT LPS MUAMELE SONRASI MİKROSKOP GÖRÜNTÜSÜ.....	36

**TABLolar DİZİNİ**

	<b>Sayfa</b>
<b>TABLO 3.1</b> TERS TRANSKRİPTAZ REAKSİYONU İÇİN GEREKLİ MİKTARLAR.....	33
<b>TABLO 3.2</b> CDNA REAKSİYONU BASAMAKLARI .....	33
<b>TABLO 3.3</b> PRİMERLER VE BAZ DİZİLERİ .....	34
<b>TABLO 3.4</b> EKSPRESYON REAKSİYON MİKTARLARI .....	34
<b>TABLO 3.5</b> EKSPRESYON REAKSİYON BASAMAKLARI .....	34
<b>TABLO 4.1</b> 24 SAAT HÜCRE CANLILIĞI TABLOSU .....	37
<b>TABLO 4.2</b> 48 SAAT HÜCRE CANLILIĞI TABLOSU .....	37
<b>TABLO 4.3</b> 72 SAAT HÜCRE CANLILIĞI TABLOSU .....	37
<b>TABLO 4.4</b> SECUKİNUMAB UYGULANMIŞ HÜCRELERİN CANLILIK-ZAMAN GRAFİĞİ.....	38
<b>TABLO 4.5</b> EKSPRESYON ANALİZ GRAFİĞİ.....	38
<b>TABLO 4.6</b> FOLD CHANGE KONTROL ANALİZİ .....	39
<b>TABLO 4.7</b> FOLD CHANGE SECUKİNUMAB ANALİZİ.....	39

## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

IGF-1R	İnsülin benzeri büyüme faktörü 1 reseptörü
TLR	Toll benzeri reseptör
TIMP-3	Keratinositlerde metalloproteinaz inhibitörü-3
DGCR8	DiGeorge Sendromu Kritik Bölge 8
IgG1	Immunoglobulin G1
ATM	Dipoz doku makrofajları
WAT	Beyaz yağ dokusundan
Th17	T Yardımcı Hücre 17
ROR	Retinoik asit reseptörü ile ilişkili reseptör
IL-23	İnterlökin 23
DAMP	Hasarla ilişkili moleküler paternler
TCR	T hücre reseptörü
cDNA	Komplementer DNA
DC	Dendritik hücreler
DMEM	Dulbecco'nun Modifiye mediyumu
FBS	Fetal sığır serumu
LD50	%50 Öldürücü doz
LPS	Lipopolisakkarit
MHC	Major Histocompatibility Kompleksi
miRNA	Mikro RNA
mRNA	Mesajcı RNA
ncRNA	Kodlamayan RNA
NK	Doğal öldürücü
PBS	Fosfatlanmış tuz tamponu
PSORS	Psoriasis yatkınlık
qRT-PCR	Kantitatif Gerçek zamanlı PCR
RNA	Ribonükleik asid
Th	Yardımcı T lenfosit
CCK-8	Cell Counting Kit-8

## 1 GİRİŞ

Psoriasis, sıklıkla iyi sınırlı, pullu plaklar şeklinde görülen yaygın, kronik inflamatuvar bir deri hastalığıdır. İnsidansı yüksektir ve hastalık nüksetmeye eğilimlidir. Patogenezi karmaşık ve belirsizdir; anormal proliferasyon, keratinositlerin farklılaşması ve immün regülasyon bozuklukları gibi birçok faktörle ilişkili olduğu düşünülmektedir. (Wei-Wei Jiang vd 2019)

Epidermis, genellikle dermisin hemen üzerindeki bazal katman (stratum bazale) ile başlayan ve dikenli ve granüler katmanlardan üst katman olan stratum corneum'a doğru ilerleyen, genellikle birkaç katmana bölünmüş, sürekli yenilenen bir epiteldir. Ana işlevi, cildi potansiyel olarak tehlikeli çevresel tehditlerden korumak, fiziksel, kimyasal, biyokimyasal ve adaptif immünolojik bariyerler sağlamaktır. Bazal tabakanın hücreleri epidermisin sürekli yenilenmesinden sorumludur, ancak kalan hücreler dinlenme veya hareketsiz durumda olduğundan sadece %15'i bu sürece sürekli olarak katılmaktadır. (Adone Baroni vd 2012)

Psoriasis yatkinlığı bilinen dokuz farklı bölge tanımlamaktadır. Bunlardan sadece PSORS1(Psoriasis yatkinlık geni) incelenen tüm canlılar da sağlam bir şekilde doğrulanmaktadır. (Francesca Capon vd 2017)

miRNA Ortalama 22 nükleotit uzunluğunda, kodlamayan küçük RNA'lardır. Çoğu miRNA, DNA dizilerinden birincil miRNA'lara (pri-miRNA'lar) transkribe edilir ve öncü miRNA'lara (pre-miRNA'lar) ve olgun miRNA'lara işlenmektedir. (Xue Zhoun vd 2022)

Uzun kodlamayan RNA'lar (lncRNA'lar), 200 nükleotidden daha uzun olan ve proteinleri kodlama yeteneği olmayan bir RNA grubudur. lncRNA'ların hücrel homeostaz, genomik damgalama, bağışıklık ve gelişim dahil olmak üzere çok sayıda önemli biyolojik süreçte yer aldığı tahmin edilmektedir. (Qianqian Zhou vd 2019)

### 1.1. Tez Çalışmasının Amacı

Bu çalışmamızda, hücre kültürü psoriasis modelinde, psoriasisin tedavisinde en son kullanıma giren biyolojik ajan olan interlökin-17 inhibitörü Secukinumab'ın keratinosit proliferasyonu ve inhibisyonun da rol alan iki uzun kodlanmayan RNA'nın ekspresyon seviyelerine etkisi araştırılacaktır.



## 2. KURAMSAL BİLGİLER VE LİTERATÜR TARAMASI

### 2.1 Psoriasis

Psoriasis, sıklıkla iyi sınırlı, pullu plaklar şeklinde görülen yaygın, kronik inflamatuvar bir deri hastalığıdır. Bu lezyonlar, patogenezinin altında yatan temel süreçleri, inflamasyon ve epidermal hiperproliferasyonun altını çizmektedir. İnsidansı yüksektir ve hastalık nüksetmeye eğilimlidir. Patogenezi karmaşık ve belirsizdir; bunun kalıtım, anormal proliferasyon, keratinositlerin farklılaşması ve immün regülasyon bozuklukları gibi birçok faktörle ilişkili olduğu düşünülmektedir. (Wei-Wei Jiang vd 2019)

Dünya nüfusunun yaklaşık %2 ila %3'ünü etkileyen sedef hastalığı, genellikle obezite, tip 2 diyabet, hiperlipidemi, hipertansiyon ve kardiyovasküler hastalıklarla ilişkili olduğu düşünülmektedir. (Bruce Strober vd 2019)

#### 2.1.1 Klinik Özellikler

Oksidatif ve anti-oksidatif moleküller arasındaki dengesizlik, sedef hastalığının gelişmesine ve şiddetlenmesine yol açan faktörlerden birisidir. (QuanQiu Wang vd 2018)

Psoriasis tetiklediği veya kötüleştirdiği bilinen faktörler arasında şunlar bulunmaktadır:

Fiziksel travmalar, Kaşıma, piercing, dövme, güneş yanığı, kimyasal tahriş ediciler

İlaçlar, 1  $\beta$ -blokerler, lityum, antimalaryaller ve nonsteroid antiinflamatuvar ilaçlar

HIV enfeksiyonu (Wolf-Henning Boehncke vd 2015)

Streptokokal farenjit

Popülasyon çalışmaları, hastaların birinci ve ikinci derece akrabalarında genel popülasyona göre daha fazla sedef hastalığı insidansı olduğunu göstermektedir. Monozigotik ikizler arasındaki uyum oranları, dizigotik ikizlere göre 3 kat daha fazladır.

Erken başlangıçlı hastalar daha şiddetli bir seyir ve pozitif bir aile öyküsü sergilerken, geç başlangıçlı hastalığı olan hastalar daha az şiddetli bir prezantasyon ve seyir yaşama eğilimindedir ve sıklıkla negatif bir aile öyküsü sergilemektedir.

Psoriasis prevalansı farklı etnik gruplar arasında farklılık göstermektedir. (Wolf-Henning Boehncke vd 2015)

Obezite, diyabet ve kalp hastalığı dâhil olmak üzere birçok başka durumla sedef hastalığının önemli bir komorbiditesini belgelemiştir. Bu sistemik bozuklukların birlikteliğinin beslenme alışkanlıkları, beslenme durumu veya ortak genetik faktörlerle ilişkili olabileceğini varsayılmaktadır. Çok sayıda vaka raporu, sedef hastalığı ve böbrek hastalığının bir komorbiditesine işaret etmektedir. (David L Mcmillin vd 2000)

### **2.1.2 Klinik Tipleri**

Psoriasis klinik olarak püstüler ve püstüler olmayan lezyonlar olmak üzere 2 grupta sınıflandırılmaktadır.

#### **Püstüler olmayan psoriasis hastalığı**

##### **Psoriasis vulgaris (erken ve geç başlangıçlı)**

Psoriasisin en sık görülen klinik formu olan Psoriasis vulgaris, vakaların yaklaşık %90'ını oluşturmaktadır. Klinik olarak sedefli skuamlarla kaplı keskin sınırları olan eritemli plaklar olarak görülmektedir. Lezyonlar simetrik dağılım gösterir ve en sık diz, dirsek, saçlı deri ve sakral bölgede lokalizedir. Bu lezyonlar travmatik olayın bir sonucu olabilmektedir.(Gülbahar Saraç vd 2016)

##### **Guttat psoriasis hastalığı**

Çocuklarda ve ergenlerde sık görülür ve sıklıkla streptokok bademcik iltihabı ile ilişkilidir. Bu sedef hastalığı formu en sık HLA-Cw6 geni ile ilişkilidir. Enfeksiyonun gerilemesi ile lezyonlar genellikle kendiliğinden kaybolmaktadır. Lezyonlar genellikle gövdede, yüzde ve saçlı deride görülmektedir. Genellikle 3-4 ay içinde gerilemektedir. (Wolf-Henning Boehncke vd 2015)

### **Eritrodermik psoriasis hastalığı**

Psoriatik lezyonlar, vücut yüzeyinin yaklaşık %80'ini etkilemektedir. Ağırlıklı olarak eritemli lezyonlar görülür, tipik papül ve plaklar karakteristik özelliklerini kaybederler. Deskuamasyon ayrıca protein kaybına ve alt ekstremitelerde ödem, kalp, karaciğer ve böbrek yetmezliği gibi ilgili sistemik sorunlara yol açabilmektedir. Ek olarak, cildin koruyucu bariyeri bozulur ve potansiyel sistemik reaksiyonların gelişmesine yol açmaktadır. Tırnak bozuklukları çok dramatik olabilmektedir. (Gülbahar Saraç vd 2016)

### **Palmoplantar psoriasis hastalığı**

Genellikle bu tip Psoriasis simetrik olarak ellerin avuçlarını ve ayak tabanlarını tutar ve tenar bölgeler hipotenar bölgelere göre daha sık etkilenmektedir. Eritem her zaman bulunmaz, ancak var olduğunda pembemsi sarı bir lezyon olarak ortaya çıkarmaktadır. (Gülbahar Saraç vd 2016)

### **Psoriatik artrit (PsA)**

PsA'nın genel prevalansı %0.02-0,1 arasında değişirken, psoriatik hastalarda prevalansı %5,4-7 arasında değişmektedir. Şiddetli deri tutulumu ve özellikle püstüler psoriasis olgularında PsA prevalansı %30-40'lara çıkmaktadır. (Wolf-Henning Boehncke vd 2015)

### **Ters psoriasis hastalığı**

Koltuk altı veya kasık gibi deri kıvrımlarında meydana gelen kronik plak tipi sedef hastalığının tipik bir örneğidir. Obez bireylerde daha sık görülür ve seboreik lezyon geliştirme eğilimi vardır. Bu form genellikle klasik tedavilere daha direnç göstermektedir. (Wolf-Henning Boehncke vd 2015)

### **Püstüler psoriasis hastalığı**

#### **Yaygın Püstüler Psoriasis Hastalığı (von Zumbusch tipi)**

Püstüllerle ilerleyen, nadir görülen bir psoriasis hastalığı şeklidir. En sık genç bireylerde görülmektedir. Bağımsız olarak veya sistemik steroid tedavisinin aniden kesilmesi, araya giren tetikleyici faktörler, hipokalsemi veya tahriş edici tedaviye sekonder olarak psoriasis vulgarisin bir komplikasyonu olarak gelişmektedir. Yüksek ateş, halsizlik ve poliartralji gibi genel semptomlarla birlikte aniden eritemli bir zeminde başlamaktadır. (Gülbahar Saraç vd 2016)

### 2.1.3 Psoriasis ile ilişkili genler ve lokuslar

Psoriasis, genetik temeli bağlantı ve genom çapında ilişkilendirme çalışmalarında gösterilen karmaşık ve çok faktörlü bir hastalıktır. İkiz çalışmalarda psoriasis hastalığının bozukluğu ailesel bir temeli olduğunu düşündürmektedir. Dizigotik ikizlerde %12-30'luk bir uyum görünmektedir. Monozigotik ikizlerde % 35-72'lik bir uyum görülmektedir. Ayrıca, uyumlu ikiz çiftleri arasında sedef hastalığı, benzer başlangıç yaşı, hastalık dağılımı, şiddeti ve klinik seyri ile karakterize edilmektedir. (Monica Enamandram vd 2013)

Psoriasis hastalığının da bağlantı analizi, hastalığa yatkınlığa katkıda bulunması beklenen dokuz farklı bölgeyi tanımlamaktadır. Bunlardan sadece PSORS1 incelenen tüm canlılar da sağlam bir şekilde doğrulanmaktadır. Bu, araştırmacıları, aralığın hastalık için önemli bir genetik belirleyiciyi barındırdığı sonucuna varmasına yol açmaktadır. (Francesca Capon vd 2017)

#### PSORS1

PSORS1 lokusu, kromozom 6p219 üzerindeki Majör Histouyumluluk Kompleksine (MHC) eşlenmektedir. Bu bölgeye bağlantı kesin olarak doğrulandıktan sonra, çeşitli gruplar tarafından ince haritalama çalışmaları yapılmaktadır. Bu araştırmalar, MHC sınıf I bölgesini ve dokuz geni kapsayan 150 kb bir konsensüs tanımlamaktadır. Bunlardan üçü HLA-C, CCHCR1 ve CDSN oldukça polimorfiktir ve psoriasis ile önemli ölçüde ilişkili olan kodlama varyantlarını barındırmaktadır. (Francesca Capon vd 2017)

Genomik ilişkilendirme çalışmaları ile tespit edilen SNP'ler (tek nükleotid polimorfizmi) 300 kb'lik kritik bölgede yaklaşık on beş gen (DDR1, DPCR1, MUC21, MUC22, HCG22, C6orf15, PSORS1C1, CDSN, PSORS1C2, CCHCR1, TCF19, POU5F1, PSORS1C3, HCG27, HLA-C) ortaya çıkarmıştır. PSORS1'in bölgesi sedef hastalığı ile güçlü bir şekilde ilişkilendirilmektedir. Haplotip analizi, GWAS (Genom çapında ilişkilendirme çalışmaları) ve SNP verilerinin analizi, tutarlı bir şekilde en olası PSORS1 geni olarak HLA-C'yi göstermektedir. (S. Singh vd 2018)

HLA-C genindeki otuz bir SNP'nin sedef hastalığı ile ilişkili olduğu bildirilmektedir. HLA-C'nin promotör bölgesindeki SNP'ler, HLA-Cw0602 dahil olmak üzere çeşitli allellerin farklı ekspresyonu ile sonuçlanmaktadır. HLA-Cw0602 alleli, genel popülasyonun %10-15'inde ve psoriatik hastaların %60'ında bulunmaktadır. HLA-Cw0602 alleli olan bireyde sedef hastalığı riski 20 kat artmaktadır. Ayrıca, homozigot

HLA-Cw0602 alleleline sahip bireyler, heterozigot olanlara kıyasla beş kat daha yüksek psoriasis hastalığına yatkınlık göstermektedir. HLA-Cw0602 alleli büyük ölçüde pozitif aile öyküsü olan genç psoriasis hastalarında gözlenmektedir. Bu bireylerde, psoriasis hastalığı sıklıkla önceki streptokok boğaz ağrısı ve guttat lezyonları ile başlar, bu da HLA-Cw0602 bireylerde bulaşıcı patojenlerin muhtemelen başlatıcı tetikleyiciler olduğuna inanmaya yol açmaktadır. (S. Singh vd 2018)

PSORS1 bölgesinde yer alan HLA-C06:02 dışında CCHCR1 ve CDSN gibi genler bulunmaktadır. CCHCR1, pg8, HCR veya C6orf18 olarak da bilinen coiled-coil  $\alpha$ -helical rod protein 1, HLA-C lokusuna 113 kb telomerik olarak yerleşmektedir. Bu gen, en az 12 kodlama varyantı dâhil olmak üzere oldukça polimorfiktir. CCHCR1'in Finliler, Hintliler ve Çinliler gibi çeşitli popülasyonlarda psoriasis hastalığına yatkınlık geni olduğu doğrulanmaktadır ve birçok çalışma CCHCR1'inerken başlangıçlı sedef hastalığı ile ilişkilidir. Sedef hastalığında CCHCR1 ekspresyon paterni, diğer hiperproliferatif deri hastalıklarının paternlerinden farklıdır ve normal sağlıklı keratinositlerle karşılaştırıldığında kültüre edilmiş lezyonsuz keratinositlerde bir aşağı regülasyon sergilemiştir. Aktive edilmiş T lenfositlerin birikmesine izin vererek, keratinosit hiperproliferasyonuna katkıda bulunmaktadır.(Deli Ran vd 2019)

CDSN geni oldukça polimorfiktir ve cilde karşı sınırlı ifade göstermektedir. Bu gen, korneodesmozini kodlar ve keratosit olgunlaşma sürecinde, kodlanmış proteinler art arda bölünmelere uğrar ve insan epidermisine sınırlandırılmış olmaktadır. CDSN, sedef hastalığı ile ilişkilendirilmektedir. (Deli Ran vd 2019)

## **PSORS2**

PSORS2, 17q25 kromozomu üzerinde bulunmaktadır esas olarak CARD14 genindeki mutasyona atıfta bulunmaktadır. CARD14, membranla ilişkili guanilat kinaz (MAGUK) ailesinin bir parçası olan protein CARMA2 içeren bir kaspaz alım alanı kodlamaktadır. Bu protein, hücre aktivasyonu ve proliferasyonunda önemli bir rol oynayan nükleer faktör kappa B (NF- $\kappa$ B) yolunun aktivasyonuna aracılık etmektedir. Ayrıca psoriasis hastalığının patofizyolojisi ile ilgilidir. CARD14'teki mutasyon, epidermiste inflamatuvar bir yanıtla sonuçlanmaktadır ve sedef hastalığı benzeri lezyonların oluşumunu şiddetlendirmektedir. (Francesca Capon vd 2017)

PSORS2 bölgesi başlangıçta, psoriasis hastalığının otozomal dominant bir durum olarak kalıtıldığı çok kuşaklı bir kuzey Amerika soyağacının bağlantı analizi yoluyla tanımlanmaktadır. Aynı bölgeyle bağlantı daha sonra geniş bir Asya akrabasında belgelenmektedir. Yeni nesil dizilemenin ortaya çıkmasıyla birlikte, CARD14 genindeki

mutasyonlar, bu iki ailede hastalık ayrımının altında yatan moleküler kusur olarak tanımlanmaktadır. (Deli Ran vd 2019)

CARD14, keratinositlerde yüksek oranda eksprese edilen ve TRAF2'ye (TNF reseptörü ile ilişkili faktör) bağımlı NF-κB sinyal transdüksiyonuna aracılık ettiği bir adaptör proteini kodlamaktadır. Şimdiye kadar karakterize edilen CARD14 mutasyonlarının, yapıcı NF-κB aktivasyonuna neden olan ve proinflamatuvar sitokinlerin artan üretimine yol açan işlev kazanımı alelleri olduğu kanıtlanmaktadır. CARD14 mutasyonları sadece az sayıda sedef hastalığında bulunduğundan, hastalığın monogenik formlarından sorumlu ek genler tanımlanmayı beklemektedir (Deli Ran vd 2019)

### **PSORS3–PSORS15**

PSORS3, psoriasis hastalığı için önemli bir yer olarak kabul edilir. D4S1535'in yakınında 4q kromozomu üzerinde bulunmakta ve PSORS3 içindeki IRF2 geni, sedef hastalığı için bir risk lokusu olarak tanımlanmıştır. PSORS1 ve PSORS4 arasında doğrudan etkileşim bulunmaktadır.

PSORS4 bölgesi, Epidermal Farklılaşma Kümesini (EDC) kapsadığı kromozom 1q21 ile eşleşmektedir. Bu, terminal keratinosit farklılaşmasında yer alan 60'tan fazla geni barındıran evrimsel olarak korunmuş bir genomik segmenttir. Daha sonraki çalışmalar, iki EDC geninin ( LCE3B ve LCE3C), psoriasis ile güçlü bir şekilde ilişkili olduğunu göstermektedir, bu da deri bariyer fonksiyonunun bozulmasında patojenik bir rol olduğunu düşündürmektedir. (Francesca Capon vd 2017)

PSORS5, İsveç popülasyonunda 3q21'de yer aldığı genom çapında bir tarama ile erken tanımlandı. PSORS5'teki SLC12A8'in, PsV ile bir ilişkisi olduğu kabul edilmektedir. Bu bölgedeki bir başka sedef hastalığıyla ilişkili gen, keratinosit terminal farklılaşması sürecinde oluşan kornifiye hücre zarfının bir öncüsü olan cilt bariyeri sistein proteaz inhibitörünü kodlayan CSTA'dır (sistatin A). Keratinosit farklılaşması ile yakından ilişkilidir ve CSTA varyantı ile sedef hastalığı arasındaki ilişkinin HLA-Cw6 ile bağlantısına atfedildiği öne sürülmektedir. PSORS6, 19p13 kromozomunda yer almaktadır. Tip I sedef hastalığı (daha genç yaşta, ≤40 yaş) ile ilgili risk faktörünün PSORS1 ile bir etkileşim olduğu kanıtlanmaktadır. (Deli Ran vd 2019)

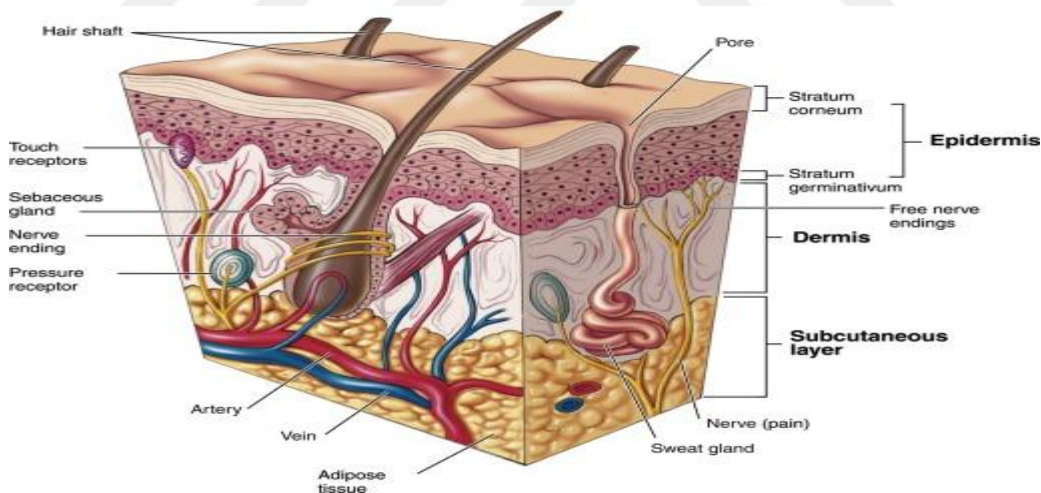
Şimdiye kadar tanımlanan aday genler, az sayıda bağışıklık yoluna kümelenme eğilimindedir. Bunlara antijen sunumu ( HLA-C ve ERAP1 ), doğuştan gelen antiviral sinyalleşme ( IFIH1, DDX58, TYK2, RNF114 ) ve en önemlisi Th17 hücre aktivasyonu dâhildir. İkincisi, CD4 + T lenfositlerinin IL-17 üreten Th17 hücrelerine

farklılaştığı süreçtir. Anormal Th17 sinyalinin patojenik doğası, IL12B ve IL23A içindeki sedef hastalığıyla ilişkili alellerin tanımlanmasıyla vurgulanmaktadır. (Francesca Capon vd 2017)

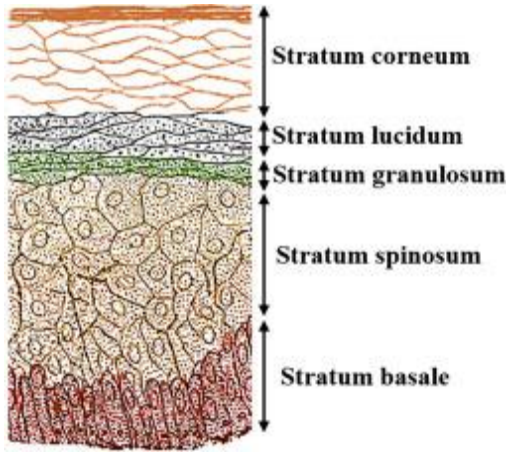
## 2.1.4 Psoriasis patogenezinin katılan hücreler ve İmmün sistem hücreleri

### Keratinositler

Epidermis, genellikle derminin hemen üzerindeki bazal katman (stratum bazale) ile başlayan ve dikenli ve üst katman olan stratum corneum'a doğru ilerleyen, genellikle birkaç katmana bölünmüş, sürekli yenilenen bir katmandır. Ana işlevi, cildi potansiyel olarak tehlikeli çevresel tehditlerden korumak, fiziksel, kimyasal, biyokimyasal (antimikrobiyal, doğuştan gelen bağışıklık) ve adaptif immünolojik bariyerler sağlamaktır. Bazal tabakanın hücreleri epiderminin sürekli yenilenmesinden sorumludur, ancak kalan hücreler dinlenme veya hareketsiz durumda olduğundan sadece %15'i bu sürece sürekli olarak katılmaktadır. (Adone Baroni vd 2012)



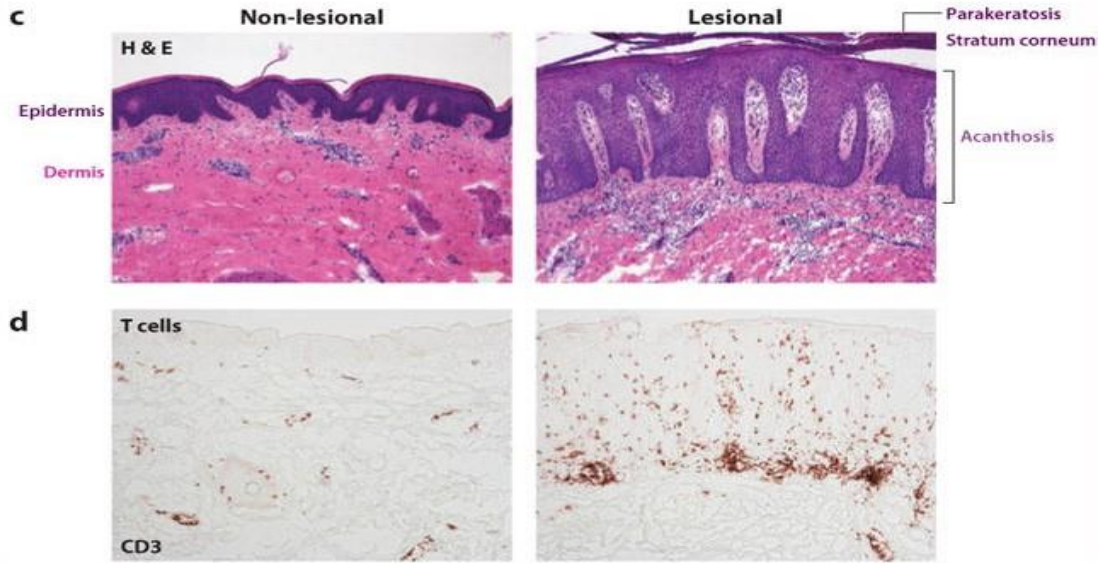
Şekil 2.1 Derinin histolojik yapısı (Joel M. Reicherter vd 2015)



Şekil 2.2 Epidermiste keratinosit tabakaları (Shohreh Nafisi vd 2018)

Epiderminin baskın hücre tipi, bazal tabakadan granüler tabakaya kadar çekirdekli ve canlı olan keratinositlerdir. Keratinositler, olgunlaşmaları sırasında çeşitli yapısal proteinleri ve lipidleri sentezler ve ekspresyon etmektedir. Keratinosit farklılaşmasındaki son adımlar, yapılarındaki derin değişikliklerle ilişkilidir, bu da stratum corneum'un düz ve çekirdeksiz skuamöz hücrelerine dönüşümüyle sonuçlanır, esas olarak keratin filamentleri ile hareket eder ve çapraz bağlı proteinlerden oluşan bir hücre zarfı (kornifiye zarf) ile çevrilidir. (Adone Baroni vd 2012)

Keratinositler 4-5 gün boyunca epidermisi büyük ölçüde kalınlaştırmaktadır. Normal farklılaşma süreci gerçekleşemediğinden, normal granüler tabakanın kaybı, kalınlaşmış stratum corneum (hiperkeratoz) ve üst tabakalarda ve stratum corneumda (parakeratoz) çekirdeklerin tutulmasıyla belirlenmektedir. Nötrofiller epidermis ve stratum corneum'da toplanmaktadır. Dermiste, ağırlıklı olarak miyeloid hücreler olmak üzere bol miktarda mononükleer hücre ve T hücreleri vardır. Sedef hastalığı lezyonlarının eritemi, daha fazla sayıda dermal kan damarından kaynaklanmaktadır. (Michelle A. Lowes vd 2015)



Şekil 2.3 Sağlıklı deri ve psoriatik derinin histolojik görünümü (Michelle A. Lowes vd 2015)

### Nötrofiller

Nötrofiller, dolaşımda en bol bulunan lökositlerdir ve enfeksiyon veya iltihaplanma bölgelerine toplanan ilk hücrelerdir. Mikropların fagositozu, degranülasyon tepkileri, reaktif oksijen türlerinin (ROS) üretimi ve nötrofil hücre dışı tuzaklarının (NET'ler) oluşumu dahil olmak üzere çeşitli süreçlerle gerçekleşmektedir (Wen Ming Wang vd 2022)

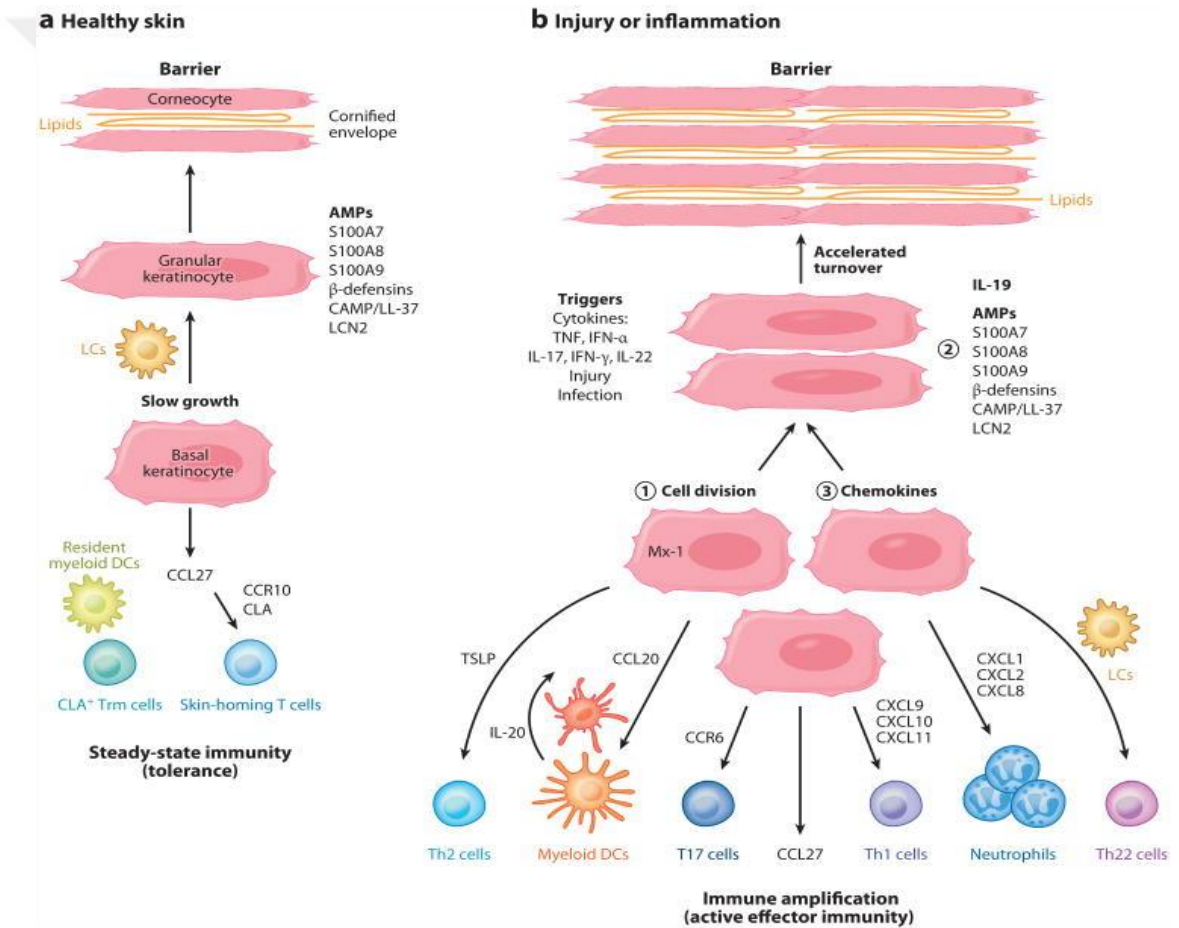
Şiddetli psoriatik hastalardan alınan nötrofillerde CD62L ekspresyonu, orta derecede psoriatik bireylerden ve normal sağlıklı kontrollerden daha düşükken, biyolojik tedaviler alan psoriasis hastalarından alınan nötrofiller normal CD62L seviyelerine sahiptir. Aktifleştirilmiş nötrofillerde CD11b ve CD66b ekspresyonu artmaktadır. CD11b ve CD66b'nin şiddetli psoriasis hastalarında orta derecede psoriatik hastalardan ve normal sağlıklı kontrollerden daha yüksek olduğu, biyolojik tedavi alan psoriasis hastalarından alınan nötrofillerin normal CD11b ve CD66b seviyelerine sahip olduğu bilinmektedir. Nötrofiller, psoriatik deri lezyonlarında IL-17A'nın başlıca kaynağıdır. IL-17, keratinositler tarafından HBD-2, S100A7, S100A8, S100A9 ve LL37 ekspresyonunu destekleyebilmektedir. (Wen Ming Wang vd 2022)

### T Hücreleri

Bağışıklık sistemi antijenlerle karşılaştığında, naif T hücrelerinden bellek T hücreleri üretilir ve aynı antijenlerin yeniden maruz kalmasına hızlı bir yanıt verilmesini kolaylaştırır. İnsan kan dolaşımından iki bellek T hücresi popülasyonu tanımlanmaktadır.

Efektör bellek T hücreleri (T<sub>EM</sub>) ve merkezi bellek T hücreleri (T<sub>CM</sub>). Bellek T hücreleri popülasyonunun, dokuda yerleşik bellek T hücrelerinin (T<sub>RM</sub>) kurulmasına yol açmaktadır. (Trung T. Vu vd 2021)

Cilt T<sub>RM</sub>'nin kendi hedef arama moleküllerine sahip olduğu gösterilmiştir. Cildin hedeflenen moleküllerinden biri olan kutanöz lenfosit ilişkili antijen (CLA), E-selektin ve P-selektine bağlanır ve hücrelerin deriye göç etmesine izin verir. Sedef hastalığı olan hastaların lezyonlu derisinde, T<sub>RM</sub>, IL-17A, IL-22 ve IFN- $\gamma$  gibi inflammatuar sitokinlerin artan ekspresyonu ile yüksek bağışıklık tepkisini senkronize eden hem CD4 hem de CD8 fraksiyonlarından oluşmaktadır. IL-17A üreten CD4 + T<sub>RM</sub> sağlıklı ciltte de bulunurken, IL-17A üreten CD8 + T<sub>RM</sub>'nin epidermiste zenginleşmesi sedef hastalığının özelliklerinden biridir. (Trung T. Vu vd 2021)



Şekil 2.4 Psoriatik deri de T hücrelerinin etkisi (Michelle A. Lowes vd 2015)

### **NKT Hücre Özellikleri**

NKT(Doğal öldürücü hücre) hücreleri sadece NK reseptörünü değil, aynı zamanda  $\alpha$  ve  $\beta$  zincirlerinden oluşan TCR'yi ( T hücre reseptörü) de ifade etmektedir. NKT hücreleri, TCR tipine göre tip I ve tip II olarak sınıflandırılır. Tip I hücreler aynı zamanda değişmez NKT (iNKT) hücreleri olarak da bilinir, çünkü bu hücreler sadece TCR  $\alpha$  zincirinin tek V  $\alpha$  alanını (insan, Va24Ja18) ve TCR  $\beta$  zincirinin birkaç V $\beta$  alanını ( $\beta$ 7 veya  $\beta$ 2; insan, V $\beta$ 11). Tip II NKT hücreleri, diğer TCR tiplerini ifade etmektedir. (Yuki Sato vd 2020)

IL-17, psoriasis hastalığı patolojisinde yer alır ve NKT17 hücreleri olarak adlandırılan bazı NKT hücreleri tarafından üretilmektedir. NKT17 hücreleri, IL-1 $\beta$  ve IL-23 ile yanıt olarak IL-17 üretir ve akciğer, karaciğer, marjinal lenf düğümleri ve deride bulunmaktadır. Bununla birlikte, NKT17 hücrelerinin ciltteki rolü henüz tanımlanmamaktadır ve bu nedenle NKT17 hücrelerinin sedef hastalığındaki rolü belirsizliğini korumaktadır. (Yuki Sato vd 2020)

### **2.1.5 Psoriasis patogenezinin katılan proteinler ve moleküller**

#### **AhR**

Ligand bağımlı bir transkripsiyon faktörüdür AhR, bağışıklık ve epitel hücreleri de dâhil olmak üzere bir dizi hücrede gen ekspresyonunu düzenleyen ligand bağımlı bir transkripsiyon faktörüdür. Sağlıklı ciltte AhR sinyali, cilt bağışıklık ağını, keratinosit farklılaşmasını, cilt bariyer fonksiyonunu ve pigmentasyonu ve oksidatif strese tepkileri düzenleyerek cilt homeostazının korunmasında ayrılmaz bir rol oynamaktadır. (Robert Bissonnette vd 2021)

AhR, antijen sunan hücreler, T hücreleri, fibroblastlar, makrofajlar, mast hücreleri ve diğer cilt bağışıklık hücreleri dâhil olmak üzere bağışıklık hücrelerinde yaygın olarak ifade edilmektedir. AhR ifadesi, Langerhans hücreleri de dahil olmak üzere antijen sunan hücrelerin işleyişi için gereklidir. AhR sinyalinin, CD4 + T yardımcı Th17 ve Th22 hücrelerinin terminal farklılaşmasını ve ayrıca IL-17 ve IL-22 sitokinlerinin ekspresyonunu düzenlediği gösterilmektedir. AhR'nin sedef hastalığında potansiyel bir işlevsel rolü, AhR eksikliğinin de artan IL-17 ve IL-22 ekspresyonu ile şiddetlenmiş sedef hastalığı benzeri cilt iltihabı geliştiren fareler gösterilmektedir. (Robert Bissonnette vd 2021)

## LL-37

LL-37, insan katyonik antimikrobiyal protein-18'den salınan bir  $\alpha$ -sarmal amfipatik oligopeptittir ve CAMP geni tarafından kodlanmaktadır. Bu özellikler, LL-37'nin mikrobiyal membranlar üzerinde gözenekler oluşturmaya ve mikrobiyal yapışmayı ve çoğalmayı sınırlandırmasına izin vererek enfeksiyonlara karşı koruma sağlamaktadır. Psoriatik deri lezyonlarındaki yüksek LL-37 seviyeleri, hastalık aktivitesi ile pozitif korelasyon göstermektedir. Psoriasis hastalığında, keratinositlerde LL-37'nin ekspresyonu, IL-17A ve tümör nekroz faktörü (TNF)-  $\alpha$  gibi sitokinler tarafından desteklenmektedir. LL-37'nin cilt yaralanmasını takiben hızla indüklendiği göz önüne alındığında, LL-37, fiziksel travmadan sonra psoriatik lezyonların ortaya çıktığı Koebner fenomenine kısmen katkıda bulunabilmektedir. (Jing-Yi Ma vd 2020)

LL-37, IL-23, IL-12 ve TNF  $\alpha$  dâhil olmak üzere TLR7 (Toll benzeri reseptör 7) içeren endozomda proinflamatuvar sitokinlerin aşırı üretimini indüklemektedir. IL-23, Th1'i IFN (İnterferon) üretmesi için indükler, IL-12 ve TNF  $\alpha$ , Th17/Th22 hücrelerinin farklılaşmasından ve IL-17 ile IL-22 salgılanmasının uyarılmasından sorumludur. LL-37'ye özgü Th1/Th17/Th22 hücreleri epidermise göç ederek keratinositlerin hiperproliferasyonuna neden olmaktadır. Psoriatik lezyonların ve inflamasyonun gelişimini desteklemektedirler. Bu mekanizma ve TNF/IL-23/IL-17 sinyal ekseninin psoriasis hastalığındaki anahtar rolü, anti-IL-12, anti-IL-17, anti-IL-23 ve anti-TNFa tedavilerinin etkinliği ile doğrulanmaktadır. (Joanna Czerwińska vd 2022)

LL-37'nin aşırı ekspresyonu, cilt enfeksiyonlarına karşı düşük duyarlılıkla ilişkilidir. Ayrıca, LL-37'nin keratinositler üzerinde anti-apoptotik etkilere sahip olduğu ve artan hücresel proliferasyona neden olduğu gösterilmektedir. LL-37'nin monositleri aktive edebileceği, bu da inflamatuvar aktivasyona ve IL-1 $\beta$  üretimine yol açabileceği bildirilmektedir. (Joanna Czerwińska vd 2022)

## hBD'ler (Defensinler)

Defensinler, güçlü antimikrobiyal aktiviteye sahip bir grup küçük katyonik polipeptittir. Bu polipeptitler genellikle disülfid bağları ile stabilize edilmiş bol arginin ve lizin kalıntılarına sahip antiparalel  $\beta$ -tabakaları olarak yapılandırılmaktadır. Defensinler, disülfid bağ bağlantılarına göre  $\alpha$ - ve  $\beta$ -defensinler olmak üzere iki alt aileye ayrılmaktadır. Bugüne kadar, aralarında hBD-2 ve hBD-3'ün sedef hastalığında kapsamlı bir şekilde çalışıldığı altı hBD (hBD-1-6) tanımlanmaktadır. hBD-2 ve hBD-3 deri, solunum yolu, vajina ve bağırsaktaki çoğu epitel hücrelerinde bulunmaktadır. Deride, bu faktörler epidermisin en üst katmanlarında bulunan keratinositlerde ifade edilir ve hücreler arası boşluğa salgılanabilmektedir. IL-17A, IL-22

gibi birçok bağışıklık faktörü, keratinositlerde hBD'lerin ekspresyonunu modüle etmektedir. hBD-2, değişiklikleri cilt yaşlanması ile ilişkili olan Langerhans hücrelerinde (LC'ler) de bulunmaktadır. (Jing-Yi Ma vd 2020)

hBD'ler çeşitli hücre tiplerini düzenler ve psoriatik inflamasyonu kolaylaştırır. Hem hBD-2 hem de hBD-3, keratinosit proliferasyonunu ve IL-6, IL-10, IFN-y ile indüklenebilir proteinler, monosit kemoatraktan protein-1, makrofaj inflamatuvar protein (MIP)-3 biyomoleküllerin salgılanmasını indüklemektedir (Jing-Yi Ma vd 2020)

### **S100 proteinleri**

S100 proteinleri, küçük moleküler ağırlıklara sahip bir kalsiyum bağlayıcı molekül ailesidir. S100 proteinlerinin, özellikle S100A8/A9 tetramerlerinin aktivasyonu, Ca<sup>2+</sup> + bağlanmasını, protein oligomerizasyonunu ve demir yardımıyla homo- veya heterodimer oluşumunu gerektirir. Bu ailenin birçok üyesi kromozom 1q21 üzerindeki sedef hastalığına yatkınlık lokusundaki genlerde kodlanmaktadır; S100 proteinleri ile sedef hastalığı arasında bir ilişki olduğunu göstermektedir. Bu proteinlerden S100A4, S100A7, S100A8/A9, S100A12 ve S100A15, psoriazisli hastaların hem serumunda hem de cildinde yüksek oranda eksprese edilmektedir. S100 proteinleri keratinositler, nötrofiller, monositler/makrofajlar ve dermal DC'ler tarafından salgılanabilmektedir. Bu proteinler stres kaynaklı moleküllerdir ve bu nedenle yaralanma ile hızla yukarı regüle edilebilirler, IL-1 $\alpha$ , TNF- $\alpha$ , IL-19 ve IL-22 gibi proinflamatuvar sitokinleri indüklemektedir. (Jing-Yi Ma vd 2020)

S100 proteinlerinin psoriasis hastalığındaki ana rolü, keratinositlerin düzenlenmesidir. S100 proteinleri nötrofilleri toplayabilir ve aktive edebilir; S100 proteinlerinin bu özelliği, psoriatik deri lezyonlarında nötrofil infiltrasyonunu hızlandırmaktadır (Jing-Yi Ma vd 2020)

### **RNase 7**

RNase 7, RNase A süper ailesinin bir üyesi ve disülfid bağları olan bir biyomoleküldür; 14q11.2 kromozomunda kodlanmaktadır. Stratum corneum ve bronşiyal ve böbrek epitel hücrelerindeki primer keratinositlerde, RNase 7'nin bol olduğu bildirilmektedir. Enflamatuvar sitokinler IL-17A, IFN-y ve IL-1 $\beta$ , RNase 7 ekspresyonunun pozitif düzenleyicileridir. Özellikle, RNase 7'nin, hem psoriasis hastalığında hem de atopik dermatitte (AD) cilt lezyonlarında artan seviyelerde cilt yaralanması ile hBD-2 (Deri antimikrobiyal peptit 2) ve hBD-3'ten daha hızlı indüklendiği rapor edilmektedir. Bu bulgu, inflamasyonun akut fazında RNase 7'nin fonksiyonlarını gösterir. Özellikle, RNase 7'nin,

TLR düzenlemesi yoluyla insan pDC'leri ve keratinositler tarafından DNA'nın algılanmasını desteklediği bildirilmektedir. (Jing-Yi Ma vd 2020)

### **Alarminler/DAMP'ler**

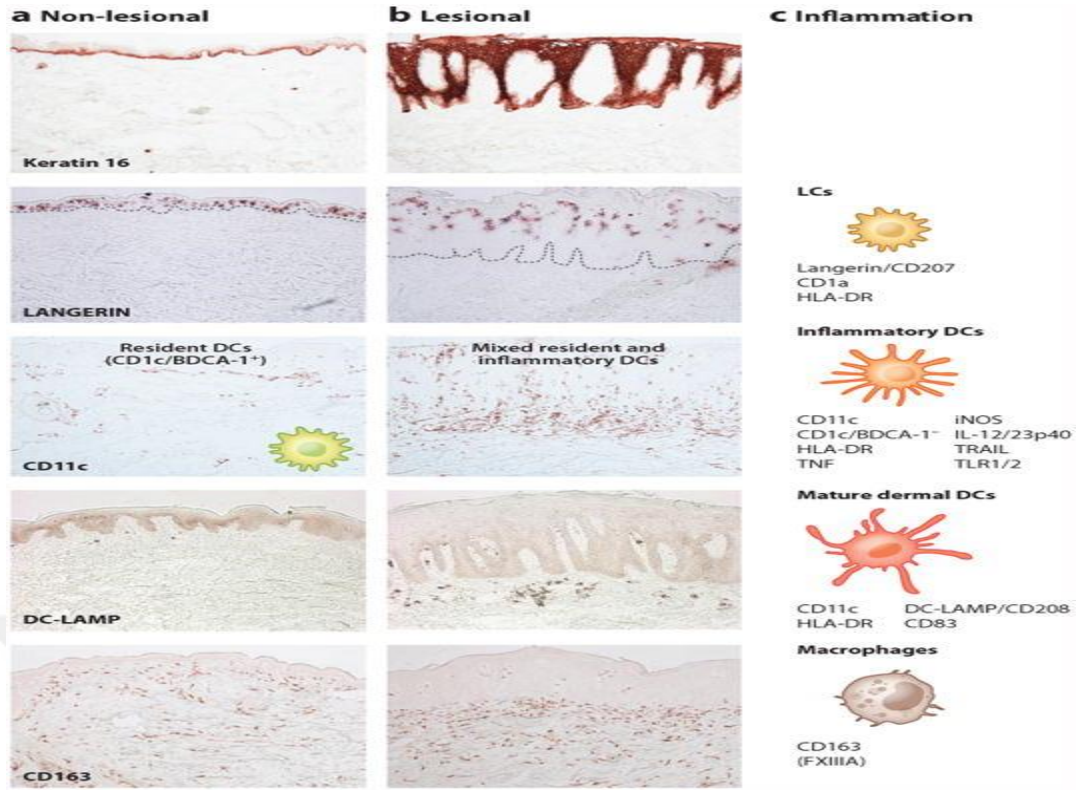
Alarminler, keratinositler tarafından üretilen ve hücre dışı ortama salındığında bakterileri inaktive edebilen endojen moleküllerdir. Bu nedenle, bakteriyel enfeksiyonlara karşı doğuştan gelen bir koruma mekanizması ve sedef hastalığının başlangıç aşamasına katkıda bulunabilecek inflamatuvar yanıtın uyarılması arasında bağlantı kurmada rol oynayabilmektedirler. (Masaru Honma vd 2021)

Travmatik doku hasarı ve hücrel kayma stresi, DAMP'lerin (hasarla ilişkili moleküler paternler) salınımını veya bunların arasında sitoplazmik konsantrasyonu 5-10 mM (hücre dışında 0'a yakın) olan hücre dışı ATP olan tehlike sinyallerini indükleyebilir. Hücre dışı ATP konsantrasyonundaki artış, çevreleyen hücreler tarafından bir DAMP olarak algılanır, aktive edici ve proinflamatuvar yanıtları indükler. Plazma zarı hasarının yanı sıra, ATP hücre dışına, konneksinler, pannexin 1, P2X7 ve veziküler ekzositoz gibi zar molekülleri gibi farklı yollarla hücre dışına aktarılabilirler. (Masaru Honma vd 2021)

Kontrolsüz veya uzun süreli ATP salınımı, aşırı bağışıklık hücresi aktivasyonuna neden olarak, proinflamatuvar sitokinlerin, reaktif oksijen ara ürünlerinin (ROI'ler) ve granüler enzimlerin salgılanmasının artmasına neden olarak doku hasarına neden olur ve kronik inflamasyonun kurulmasıyla bağışıklık hücrelerini çekmektedirler. (Masaru Honma vd 2021)

### **Yağ Dokusu**

Beyaz yağ dokusundan (WAT) türetilen adipokinler ve proinflamatuvar sitokinler, Th17 aracılı inflamatuvar yanıtı artırabilir ve etkileyebilir. Psoriasis hastalığı sıklıkla metabolik anormallikler ile yakından ilişkili olan obezite ve fazla kilo ile birliktedir ve deri lezyonlarının ve komorbiditelerin şiddetini azaltmak için kilo verme müdahaleleri gereklidir. Obeziteye benzer şekilde, TNF, IL-6, leptin, resistin ve chemerin gibi proinflamatuvar adipokinlerin ekspresyonu sedef hastalığında yukarı regüle olurken, adiponektin ve omentin gibi antiinflamatuvar adipokinlerin ekspresyonu baskılanır. M1-makrofajlara benzeyen adipoz doku makrofajları (ATM'ler), lipopolisakkarit ve doymuş yağ asitleri (SFA'lar) tarafından TLR4 stimülasyonu yoluyla aktive edilebilir ve TNF ve IL-6 gibi proinflamatuvar sitokinleri serbest bırakabilmektedir. (Masaru Honma vd 2021)



Şekil 2.5 Normal deri ve psoriatik derinin yapılarının değişimi (Michelle A. Lowes vd 2015)

## 2.1.6 Psoriasis patogenezinin katılan sitokin ve kimokinler

### IL-23 (İnterlökin 23)

Birçok kronik inflamatuvar hastalıkta, özellikle psoriasis hastalığında 'ana düzenleyici' sitokin olarak ortaya çıkmaktadır. IL-23, doğuştan gelen bağışıklık hücreleri (örneğin, doğal öldürücü hücreler, makrofajlar, dendritik hücreler ve doğuştan gelen lenfoid hücreler) T hücreleri üzerinde de etkili olduğu için doğuştan gelen ve adaptif bağışıklık sistemleri arasında köprü kurmaktadır. IL-23 normalde bakteri ve mantar enfeksiyonlarına karşı bağışıklık sağlamaktadır. Bununla birlikte, düzensiz IL-23 üretimi, kronik enflamasyonun gelişimini desteklemektedir. T hücreleri, doğal öldürücü hücreler, nötrofiller, mast hücreleri, doğuştan gelen lenfoid hücreler ve makrofajlar dâhil olmak üzere çeşitli tipte bağışıklık hücreleri üzerinde ifade edildiğine inanılan IL-23 reseptörü aracılığıyla sinyal vermektedir. (Masaru Honma vd 2021)

IL-23'ün reseptörüne bağlanması, öncelikle Th17 (T Yardımcı Hücre 17) hücre aktivasyonu, farklılaşması, proliferasyonu ve hayatta kalmasında kritik fonksiyonlara sahip olan sinyal transdüserini ve transkripsiyon aktivatörünü (STAT3) aktive etmektedir. STAT3, IL-17A, IL-17F ve IL-23R'i kodlayan genleri doğrudan düzenler

ve Th17 farklılaşmasının bir düzenleyicisi olan retinoik asit reseptörü ile ilişkili reseptör (ROR) transkripsiyon faktörünün ekspresyonunu dolaylı olarak kontrol etmektedir. (Masaru Honma vd 2021)

### **IL17**

IL17 psoriasis hastalığı patogenezinde önemlidir. Genetik ilişkilendirme çalışmalarına ek olarak, IL17'yi hedefleyen monoklonal antikorların etkinliği, bu sitokinin etkisi için güçlü bir argümandır. (Masaru Honma vd 2021)

IL17'nin altı izoformu mevcuttur ve IL17A ve IL17F'nin psoriasis hastalığında en patojenik olduğu kabul edilmektedir. Th17, Th1 ile birlikte psoriatik lezyonların dermisinde bulunur ve IL17 ve IL22 üretir, bu da keratinositler tarafından inflamatuvar ve antimikrobiyal moleküllerin salgılanmasını sağlamaktadır. Keratinositlerin kendileri IL17C üretebilir, bu da sedef hastalığındaki iltihabı otokrin bir şekilde arttırmaktadır. (Masaru Honma vd 2021)

IL-23 ve IL-17A, psoriasis patogenezinde anahtar inflamatuvar sitokinlerdir. IL-23, IL-17A ve IL-22 gibi efektör sitokinlerin üretimini destekleyen Th17 hücrelerinin farklılaşmasını, aktivasyonunu, çoğalmasını ve hayatta kalmasını uyarır, ancak IL-17, IL-23'ten bağımsız olarak da üretilmektedir. (Andrew Blauvelt vd 2018)

IL-17'nin psoriasis hastalığındaki başlıca hedefleri arasında keratinositler, endotelial hücreler ve doğuştan gelen bağışıklık hücreleri yer almaktadır. Keratinositlerde IL-17, antimikrobiyal peptitlerin (lipokalin 2, S100A proteinleri (S100A7, psoriasin) ve beta defensinler), proinflamatuvar sitokinlerin ve kemokinlerin (IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-17C, CXCL1) üretimini uyarmaktadır. (Andrew Blauvelt vd 2018)

### **2.1.7 Psoriasis Tedavisi**

Topikal tedavi, özellikle hafif psoriasis hastalığı için semptomatik rahatlama için yardımcı olabilir. Orta ila şiddetli sedef hastalığı için fototerapi ve sistemik tedaviler standart tıbbi tedavilerdir. Bununla birlikte, bu tedavilerin tümü önemli yan etkilerle ilişkilidir. Fototerapi eritem, kaşıntı, buruşma, solar elastoz ve cilt kanseri riskinde artışa neden olabilir. Asitretin, metotreksat, siklosporin, hidroksiüre ve tioguanin gibi sistemik tedavilerin tümü önemli sistemik toksisite ile ilişkilidir ve yakından izlenmelidir. (David L Mcmillin vd 2000)

### **Secukinumab**

IL-17A'yı hedefleyen bir insan monoklonal antikordur: orta ila şiddetli plak psoriasis hastalığı yapılan Faz III klinik çalışmalarda, secukinumabın hem oldukça etkili olduğu hem de iyi tolere edildiği kanıtlanmaktadır. (Eric J Yang vd 2018)

Psoriasis patogenezinde T hücrelerinin ana rolüne ilişkin bilgi ve kronik inflamatuvar yolakların anlaşılmasındaki ilerlemeler, spesifik inflamatuvar basamakları hedefleyebilecek çeşitli biyolojik ajanların geliştirilmesine yol açmaktadır. (Catia de Felice vd 2007)

### **T Hücre İnhibitörleri**

#### **Alefacept**

Alefacept, bellek efektör T lenfositleri üzerindeki CD2'ye bağlanan, aktivasyonlarını inhibe eden ve bu hücrelerin sayısını azaltan rekombinant bir proteindir. Bir LFA-3 (Lenfosit Fonksiyonu İlişkili Antijen) proteini ve insan IgG1 (Immunoglobulin G1) fragmanı kristalize edilebilir. Alefacept ile tedavi edilen hastalarda CD45RO + hafıza T hücrelerinde klinik iyileşme ile bağlantılı bir azalma görülmektedir. (Catia de Felice vd 2007)

#### **Efalizumab**

Efalizumab, CD11  $\alpha$  (lenfosit fonksiyonuyla ilişkili antijen) molekülüne karşı oluşturulmuş bir monoklonal antikordur. Bu ilaç, LFA-1 ile hücreler arası yapışma molekülü 1 (ICAM-1), molekülü arasındaki etkileşimi bloke eden T hücreleri üzerindeki CD11a'ya bağlanmaktadır. Blokaj geri dönüşümlüdür ve T hücrelerini tüketmemektedir. (Catia de Felice vd 2007)

### **TNF- $\alpha$ İnhibitörleri**

#### **Infliximab**

Infliximab, zara bağlı ve çözünür TNF-a'yı bağlayan kimerik bir monoklonal antikordur. Orta ila yüksek derecede aktif romatoid artrit metotreksat, orta ila yüksek derecede aktif Crohn hastalığı ve hem romatoid artrit hem de başarısız olan Crohn hastalığı ile birlikte tedavi etmek için FDA tarafından onaylanan sedef hastalığının tedavisi için çalışılan ilk blokerdir. (Catia de Felice vd 2007)

### **Etanersept**

Etanercept, 75-kDa insan TNF reseptörü ve insan IgG1'in alanlarını içeren, bu sitokinin hücre yüzeyi reseptörleri ile etkileşimini rekabetçi bir şekilde inhibe eden ve çözünür TNF'yi bağlayarak, bunun aracılık ettiği hücrel tepkileri ve TNF tarafından düzenlenen diğer proinflamatuvar sitokinlerin aktivitesini modüle etmektedir. (Catia de Felice vd 2007)

### **Adalimumab**

İnsan anti-TNF- $\alpha$  monoklonal antikordur. Romatoid artrit tedavisi için FDA tarafından onaylanmıştır ve şu anda orta-şiddetli plak sedef hastalığı ve PsA tedavisi için Faz II ve III klinik çalışmalarda değerlendirilmektedir. (Catia de Felice vd 2007)

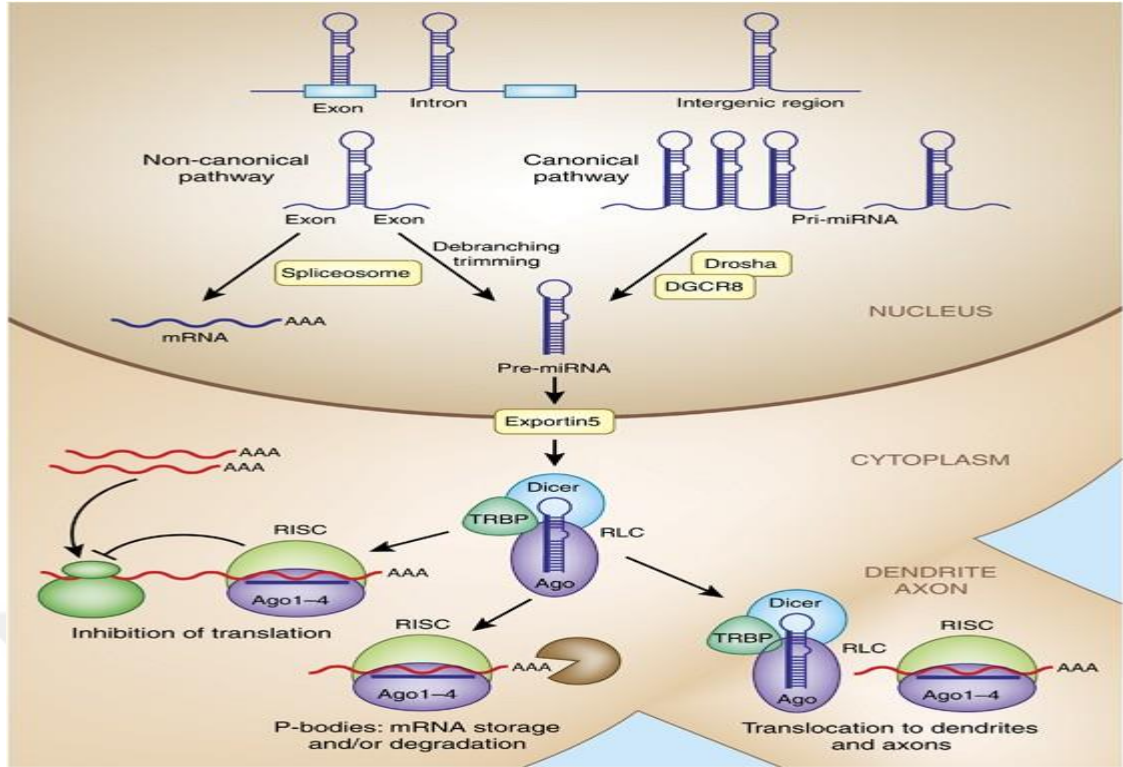
## **2.2 miRNA (MikroRNA)**

Ortalama 22 nükleotit uzunluğunda, kodlamayan küçük RNA'lardır. Çoğu miRNA, DNA dizilerinden birincil miRNA'lara (pri-miRNA'lar) kopyalanır ve öncü miRNA'lara (pre-miRNA'lar) ve olgun miRNA'lara işlenmektedir. Çoğu durumda miRNA'lar, ifadeyi bastırmak için hedef mRNA'ların 3' UTR'si ile etkileşime girmektedir. Bununla birlikte, miRNA'ların 5' UTR, ekzonlar ve promotorler dahil olmak üzere diğer bölgelerle etkileşimi de rapor edilmektedir. Ayrıca, miRNA'ların belirli koşullar altında gen ekspresyonunu aktive ettiği de gösterilmiştir. (Xue Zhoun vd 2022)

miRNA'lar, büyük, çok proteinli bir kompleks olan RNA İndüklenmiş Susturma Kompleksi (RISC) ile birliktelik yoluyla aşağı regülasyon için mRNA hedeflerini seçmektedir. Bu seçim, hedef mRNA içinde miRNA dizisine kusursuz şekilde komplementer olan dizilerin varlığını gerektirir; miRNA bağlanma bölgeleri yaygın olarak mRNA'nın 3' UTR içinde bulunmaktadır. (Brandi N Davis vd 2009)

### **2.2.1 miRNA biyogenezi**

RNA polimeraz II/III transkriptlerinin transkripsiyon sonrası veya birlikte transkripsiyonel olarak işlenmesiyle başlamaktadır. Hâlihazırda tanımlanmış tüm miRNA'ların yaklaşık yarısı intrageniktir ve çoğunlukla intronlardan ve nispeten az sayıda ekzondan işlenirken, geri kalanı intergeniktir, konakçı genden bağımsız olarak transkribe ve kendi promotörleri tarafından düzenlenmektedir. (Jacob O'Brien vd 2018)



Şekil 2.6 miRNA biyogenezini (Dónal O'Carroll vd 2013)

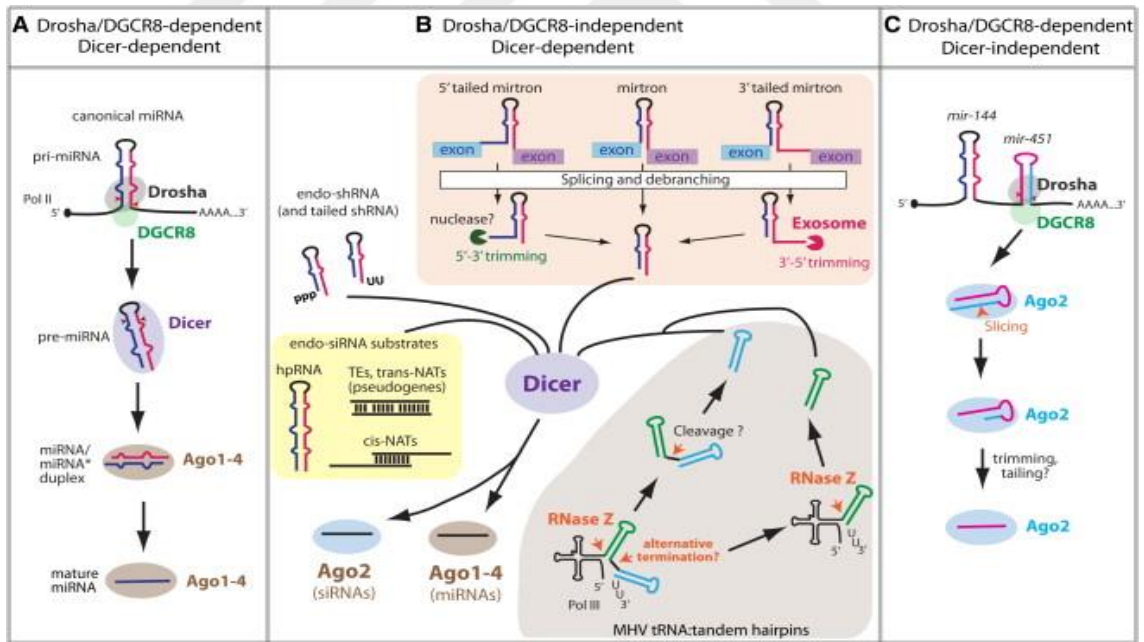
### miRNA Biyogenezinin Kanonik Yolu

Kanonik biyogenez yolu, miRNA'ların işlendiği baskın yoldur. Bu yolda, pri-miRNA'lar genlerinden kopyalanır ve daha sonra bir RNA bağlayıcı protein DiGeorge Sendromu Kritik Bölge 8 (DGCR8) ve ribonükleaz III enzimi Drosha'dan oluşan mikroışlemci kompleksi tarafından pre-miRNA'lara işlenmektedir. (Jacob O'Brien vd 2018)

Drosha, pri-miRNA'nın karakteristik saç tokası yapısının tabanında pri-miRNA dubleksini bölmektedir. Bu, pre-miRNA üzerinde 2 ntlık 3' bir çıkıntının oluşmasıyla sonuçlanmaktadır. Pre-miRNA'lar oluşturulduktan sonra, bir exportin 5 (XPO5)/RanGTP kompleksi tarafından sitoplazmaya aktarılır ve daha sonra RNase III endonükleaz Dicer tarafından işlenmektedir. Bu işlem, olgun bir miRNA dubleksiyile sonuçlanan terminal döngüsünün çıkarılmasını içermektedir. miRNA zincirinin yönlülüğü, olgun miRNA formunun adını belirlemekte. 5p ipliği pre-miRNA saç tokasının 5' ucundan, 3p ipliği ise 3' ucundan kaynaklanmaktadır. Olgun miRNA dubleksinden türetilen her iki zincir de ATP'ye bağlı bir şekilde Argonaute (AGO) protein ailesine (insanlarda AGO1-4) yüklenebilmektedir. (Jacob O'Brien vd 2018)

## Kanonik olmayan miRNA Biyogenez Yolları

Kanonik olmayan çok sayıda miRNA biyogenez yolu aydınlatılmıştır. Bu yollar, kanonik yola dâhil olan proteinlerin, özellikle Drosha, Dicer, exportin 5 ve AGO2'nin farklı kombinasyonlarını kullanılmaktadır. Genel olarak, kanonik olmayan miRNA biyogenezi, Drosha/DGCR8'den bağımsız ve Dicer'den bağımsız yollar olarak gruplandırılabilir. Drosha/DGCR8'den bağımsız yol tarafından üretilen pre-miRNA'lar, Dicer substratlarına benzemektedir. Bir örnek, 7-metilguanozindir (m 7G)-başlıklı pre-miRNA. Bu yeni oluşan RNA'lar, Drosha kırılmasına ihtiyaç duymadan exportin 1 aracılığıyla doğrudan sitoplazmaya aktarılır. Büyük olasılıkla m 7 G başlığının Argonaute'ye 5p dizi yüklemesini önlediği için güçlü bir 3p dizi yanlılığı vardır. Öte yandan, Dicer'den bağımsız miRNA'lar, shRNA transkriptlerinden Drosha tarafından işlenmektedir. Bu pre-miRNA'lar, Dicer substratları olmak için yetersiz uzunlukta olduklarından sitoplazma içinde olgunlaşmalarını tamamlamak için AGO2'ye ihtiyaç duymaktadırlar. Bu da, tüm pre-miRNA'nın AGO2'ye yüklenmesini ve 3p ipliğinin AGO2'ye bağlı kırılmasına katkıda bulunur. 5p ipliğinin 3'-5' kırılması olgunlaşmalarını tamamlamaktadır. (Jacob O'Brien vd 2018)



Şekil 2.7 miRNA Kanonik olmayan biyogenez (Jr-ShiuanYang vd 2011)

### 2.2.2 miRNA ifadesinin düzenlenmesi: Transkripsiyon

RNA pol II aracılı transkripsiyon, miRNA'ların biyosentezi için önemli bir kontrol noktası sağlamaktadır. Nükleozom konumlandırma ve genomik DNA mikrodizi çipi analizi yoluyla 175 insan miRNA promotörünün yakın zamanda yapılan büyük ölçekli bir haritalaması, CpG adalarının nispi frekansları, TATA dâhil miRNA genlerinin promotör yapısının, TFIIB tanıma, başlatıcı elemanlar ve histon modifikasyonları, miRNA ve mRNA promotörleri arasında ayırt edilememektedir. Ayrıca, miRNA transkripsiyonunu düzenleyen DNA bağlama faktörleri, protein kodlayan genleri kontrol edenlerle büyük ölçüde örtüşmektedir. (Brandi N Davis vd 2009)

### 2.2.3 miRNA'ların epigenetik kontrolü

miRNA genlerinin çoğu, protein kodlayan genlerle aynı RNA polimeraz tarafından kopyalandığından, protein kodlayan genler için bilinen epigenetik kontrol mekanizmalarının miRNA lokusları için de geçerli olması muhtemeldir.

miR-9-1, -193a, -137, -342, -203 ve -34b/c dâhil olmak üzere birçok miRNA lokusunun, birçok insan kanserinde hipermetile olduğu bulunmaktadır. Tersine, let-7a-3 lokusunun akciğer adeno karsinomunda hipometile olduğu bulundu ve bu lokusun yüksek ekspresyonu, onkojenik gen transkripsiyonunun artmasına neden olmaktadır. miRNA promotörleri, gelişim ve patogenez sırasında histon modifikasyonları tarafından da düzenlenmektedir. Histon deasetilaz (HDAC) inhibitörlerinin, kanser hücrelerinde miR-1 dâhil miRNA'ların bir alt kümesini yukarı regüle ettiği bildirilmektedir. (Brandi N Davis vd 2009)

Asetilasyon ve metilasyonun aracılık ettiği geçici düzenlemeye ek olarak miRNA, genomik damgalama (imprinting) yoluyla stabil epigenetik kontrole de tabidir. (Brandi N Davis vd 2009)

## 2.2.4 Psoriasisde miRNA'ların rolü

### miR-21

miR-21 psoriasis hastalığında aşırı eksprese edilir, psoriatik cilt lezyonlarında, psoriatik epidermal hücrelerde, dermal T hücrelerinde ve kan örneklerinde bulunur ve sedef hastalığında önemli bir role sahiptir. Psoriatik hastalarda, TGF- $\beta$  (Dönüştürücü Büyüme Faktörü Beta) ekspresyonu normalden daha yüksektir ve cilt iltihabı ile ilişkilidir. Ayrıca epidermal keratinositlerde miR-21'in transkripsiyonunu tetiklemektedir. miR-21-5p'nin, metalloproteinaz gen ailesinin ana doku inhibitörü olan keratinositlerde metalloproteinaz inhibitörü-3'ü (TIMP-3) aşağı regüle ettiği bilinmektedir (Teodora Larisa vd 2018)

### miR-31

Psoriatik kan ve deri örneklerinde miR-31'in ekspresyonu artmaktadır. miR-31, inflamatuvar aracılardan (TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6, IL-17 ve IL-22) üretimini düzenler ve lökosit kemotaksisini uyarır, bu nedenle miR-31'i inhibe etmek sedef hastalığında terapötik bir seçenek olabilmektedir (Teodora Larisa vd 2018)

### miR-146a

miR-146a, psoriatik lezyonlarda ve periferik kan mononükleer hücrelerinde ve kronik inflamasyon sırasında artar; keratinositlerde doğuştan gelen bağışıklık tepkisinin baskılanmasında rol oynuyor gibi görünmektedir. Azalmış miR-146a seviyeleri, aralarında sedef hastalığının erken başlangıcı, cilt iltihabının alevlenmesi, IL-17'nin aşırı ekspresyonu ve hiperproliferasyonun açıklanabileceği çeşitli etkilere neden olmaktadır. Toll benzeri reseptör (TLR) ligandları nedeniyle, keratinositlerde miR-146 kalıcı olarak artar, IL-8 ve CC motifli kemokin ligandı 20 dâhil inflamatuvar kemokinlerin ekspresyonunu aşağı regüle etmektedir. Sonuç olarak miR-146a, IL-1 reseptörü ile ilişkili kinaz-1 ve TNF reseptörü ile ilişkili faktör 6 yolları aracılığıyla TLR'ye bağlı epidermal inflamasyonu azaltır, bunlar IL-17A'nın NF- $\kappa$ B'ye sinyal vermesine ve inflamatuvar hücrelerin alınmasına aracılık etmektedir (Teodora Larisa vd 2018)

### **miR-155**

miR-155'in ekspresyonu, psoriatik biyopsi örneklerinde yukarı doğru düzenlenmektedir. Hücre büyümesi ve çoğalmasını içeren süreçlerde önemlidir. miR-155, T yardımcı Th2 fenotipini karakterize eden bir sitokin olan IL-4'ün ekspresyonunu azaltarak, bir Th1 fenotipine doğru farklılaşmayı desteklemektedir. Bu koşullar altında, T-hücresi aktivasyonu sırasında, miR-155'in ekspresyonu artar, muhtemelen CD4 + hücrelerinin kronik deri iltihabında birkaç T-hücresi alt grubuna anormal farklılaşmasına yol açmaktadır. Keratinositlerde miR-155, TNF-  $\alpha$  ve IFN- $\gamma$  tarafından indüklenmektedir. Bir proinflamatuvar miRNA olarak, pozitif geri besleme yoluyla miR-155, TNF-  $\alpha$  üretimini arttırmaktadır. Aynı zamanda, son zamanlarda psoriasis ile ilişkili olarak tanımlanan yeni bir yol olan fosfoinositid 3-kinaz (PI3K)/ $\alpha$ -serin/treonin-protein kinaz (AKT) sinyalini inhibe eden fosfataz ve tensin homologunu da hedefler, daha sonra kendi etkisini artırır ve inflamasyonu sürdürmektedir. (Teodora Larisa vd 2018)

### **miR-203**

miR-203, yalnızca psoriatik keratinositlerde aşırı eksprese edilen ve sedef hastalığında anjiyogenez ve keratinosit farklılaşmasında rol oynayan cilde özgü bir miRNA'dır. IL-17 ile indüklenen vasküler endotelial büyüme faktöründeki (VEGF) rolü tam olarak açıklanmaya devam etse de, yukarı regüle edilmiş IL-17'nin, Janus kinaz sinyal yolunu aktive eden miR-203 ekspresyonunu indüklediğini gösterildi bu, ölümsüzleştirilmiş tümörjenik olmayan insan epidermal hücreleri (HaCaT) hücrelerinde VEGF salgılanmasını desteklenmektedir. (Teodora Larisa vd 2018)

### **miR-125**

miR-125, psoriasis hastalığı olan hastaların kan ve cilt lezyonlarında bulunur ve hücrel proliferasyonu baskılayan ve psoriatik keratinositlerin hücrel farklılaşmasını uzatan fibroblast büyüme faktörü reseptörü 2'nin düzenlenmesinde rol oynamaktadır. Sedef hastalığı olan hastaların serumunda aşağı regüle olduğu görülmektedir. İnsan keratinositlerinde miR-125'in inhibe edilmesinin hiperproliferasiyona ve gecikmiş hücrel farklılaşmaya yol açabileceği görülmektedir. (Teodora Larisa vd 2018)

### **miR-99**

miR-99, psoriasis hastalığında, özellikle keratinositlerde ve epidermin üst tabakasında spesifik olarak aşağı regüle edilmektedir. Sedef hastalığı olan hastalarda bazal tabaka hücrelerinin proliferasyonunu artıran, hiperplazi ve hiperkeratozu uyaran IGF-1R'yi (İnsülin benzeri büyüme faktörü 1 reseptörü) hedeflemektedir. IGF-1R mRNA

3' çevrilmemiş bölgeyi (3'UTR) hedef alan miR-99, IGF-1R'nin protein seviyelerini düşürür ve sonuç olarak keratinosit proliferasyonunu inhibe etmektedir. Bu aynı zamanda hücrelerin farklılaşmasına neden olur ve muhtemelen epiderminin yüzeysel katmanlarında tespit edilen daha yüksek miR-99a seviyesini açıklamaktadır. (Teodora Larisa vd 2018)

### **miR-197**

Psoriatik cilt örneklerinde aşağı regüle edilmesine rağmen miR-197, proliferasyon ve migrasyonun azaltılmasında ve normal keratinositler yoluyla farklılaşma sürecinin yürütülmesinde rol oynamaktadır. IL-22'nin IL-22RA1 alt birimine bağlanarak hiperproliferasyona yol açmaktadır. Ayrıca IL-17R'nin IL-17RA alt birimine bağlanabilir, böylece normal çoğalmayı teşvik eder ve anormal farklılaşma sürecini azaltmaktadır. miR-197, keratinositlerde IL-17RA'yı inhibe ederek, dendritik hücreler ve T lenfositler için bir kemo-çekici olan CCL'nin ekspresyonunu azaltmaktadır. (Teodora Larisa vd 2018)

### **miR-520**

miR-520, psoriatik keratinositlerde bulunur ve belirgin şekilde aşağı regüle edilmektedir. HaCaT hücreleri üzerinde yapılan in vitro deneyler, insan keratinositlerinin proliferasyonu ve mitozunda miR-520'nin önemini doğrulanmaktadır. In vitro olarak, AKT'yi inhibe ederek HaCaT hücrelerinin proliferasyonunu ve mitotik girişini belirgin şekilde bastırmaktadır. miR-520a, hücre döngüsü ilerlemesini ve proliferasyonunu baskılayan transkripsiyon faktörü E2F'yi aşağı regüle etmektedir. Ayrıca AKT1 mRNA'nın 3'UTR'sine bağlanır, böylece keratinosit proliferasyonunu inhibe etmektedir. MiR-520'yi psoriatik hastalar için bir tedavi seçeneği olarak kullanmak bir zorluk olmaya devam etse de, sorun miRNA-520 taklitleri kullanılarak çözülebilmektedir. (Teodora Larisa vb 2018)

## **2.3 lncRNA (Uzun Kodlanmayan RNA'lar)**

Uzun kodlamayan RNA'lar (lncRNA'lar), 200 nükleotidden daha uzun olan ve proteinleri kodlama yeteneği olmayan bir RNA grubudur. lncRNA'ların hücrel homeostaz, genomik damgalama, bağışıklık ve gelişim dahil olmak üzere çok sayıda önemli biyolojik süreçte yer aldığı tahmin edilmektedir. Ek olarak, belirli lncRNA'ların kanserlerin yanı sıra kardiyovasküler, nörolojik ve gelişimsel hastalıklarda rolü vardır. Son zamanlarda, lncRNA'ların psoriasis çok önemli rollere sahip olduğu bildirilmektedir. Örneğin, stres tarafından indüklenen lncRNA sedef hastalığı duyarlılığı ile

ilişkili RNA geni (PRINS), psoriasis olan hastaların sağlıklı epidermisinde en sık saptanan transkripttir ve sedef hastalığının patogeneze katkıda bulunduğu düşünülmektedir. (Qianqian Zhou vd 2019)

lncRNA'lar, genomik lokusların damgalanması, kromozom konformasyonunun şekillendirilmesi ve enzimatik aktivitenin allosterik olarak düzenlenmesi gibi sayısız önemli biyolojik işlev de yer almaktadır. ( Jeffrey J. Quinn vd 2016)

### 2.3.1 Psoriasis de lncRNA Rolü

#### LncRNA MEG 3

Kromozom 14q32.3 üzerinde bulunan DLK1-MEG3 lokusuna ait genidir. Mide kanseri, küçük hücreli olmayan akciğer kanseri ve safra kesesi kanseri gibi çeşitli kanser türlerinde MEG3'ün belirgin düşük ekspresyonu doğrulanmaktadır. MEG3'ün aşırı ekspresyonu, bazı tümör hücrelerinde proliferasyonu baskılayabilir ve apoptozu teşvik edebilmektedir. MEG3'ün miR-21'i düzenleyerek mide ve rahim ağzı kanseri hücrelerinin proliferasyonunu, apoptozunu ve metastazını etkilediğini görülmektedir. Fiziksel olarak MEG3'ün miR-21 ile bağlantılı olduğu bildirilmektedir. Bununla birlikte, MEG3'ün psoriasis epidermal hücrelerinin proliferasyonu ve apoptozu sırasında miR-21 üzerindeki etkisi belirsizliğini korumaktadır. (Hai Yan Jia vd 2019)

Gen delesyonu, promotör hipermetilasyonu ve intergenik diferansiyel olarak metillenmiş bölgenin hipermetilasyonu dahil olmak üzere tümörlerde MEG3 ekspresyonunun kaybına birçok mekanizma katkıda bulunmaktadır. MEG3'ün yeniden ifadesi kültürde tümör hücresi proliferasyonunu ve yumuşak agarda koloni oluşumunu inhibe etmektedir. Bu büyüme inhibisyonu, kısmen MEG3 tarafından indüklenen apoptozun sonucudur. MEG3, p53 (TP53) proteininin birikmesini indükler, p53'e bağlı bir promotörden transkripsiyonu uyarır ve p53 hedef gen ekspresyonunu seçici olarak düzenlemektedir. (Yunli Zhou vd 2012)

MEG3 geni on ekzondan oluşur. MEG3 geninden transkripsiyon, alternatif RNA eklenmesi nedeniyle çoklu MEG3 transkript izoformları vermektedir. MEG3, MEG3a ila MEG3k olarak adlandırılan toplam 12 MEG3 RNA izoformu tanımlanmaktadır. Ağırlıklı olarak ifade edilen izoform, 1-4 ve 8-10 eksonlarını içeren MEG3'tür. Olgun MEG3 RNA, ~1600 nt uzunluğundadır. ( Yunli Zhou vd 2012)

MEG3'ün mikobakterileri ortadan kaldırmak için otofajiye katkıda bulunduğu bildirilmektedir. MEG3'ün şimdiye kadar bildirilmemiş olan psoriasis otofajiyi ve iltihabı düzenleyebileceğini göstermektedir. (Zhan-Li Tang vd 2021)

### **LncRNA MSX2P1**

MSX2P1, Msx gen ailesi ile ilişkilidir. Msx gen ailesi homeobox gen ailesine girmektedir. Homeobox genleri, çoğu hayvanların embriyonik gelişiminde önemli roller oynayan geniş ve çeşitli bir gen grubudur. Homeobox genleri, çok değişken olmasına rağmen tanınabilir bir protein alanını, homeodomain'i kodlayan homeobox adlı belirli bir DNA dizisine sahip olmaları ile karakterize edilir. İstisnalar bilinmesine rağmen çoğu homeo alan adı 60 amino asit uzunluğundadır. Birçok homeodomain proteini, embriyonik modellenme ve hücre farklılaşmasında önemli rollere sahip olan transkripsiyon faktörleridir ve birçoğu hastalıklar ile ilişkilendirilmiştir. (Holland, P.W vd 2007)

Msh homeobox 2 psödogen 1 (MSX2P1), microRNA (miRNA/miR)-6731-5p'yi baskılayarak ve S100A7 ekspresyonunu yukarı doğru düzenleyerek IL-22 ile uyarılan keratinositlerin çoğalmasını kolaylaştırmaktadır.

### **LncRNA HOTAIR**

HOTAIR, kromozom 12'de bulunan HOXC gen kümesinin antisens dizisinden kopyalanan 2.2 kb uzunluğunda bir lncRNA'dır. HOTAIR'ın HOXC12 ve HOXC11 ile çevrili, kromozom 12'deki HOXC lokusunda yer aldığı gösterilmektedir. HOTAIR, histon metilaz (PRC2) ve histon demetilaz (LSD1) etkileşimi yoluyla gen susturulmasını indüklemektedir. (Arunoday Bhan vd 2015)

HOTAIR'ın siRNA aracılı yıkılmasının, HOXD8, HOXD9, HOXD10 ve HOXD11 dahil olmak üzere kromozom 2 de bulunan HOXD lokus genlerinin transkripsiyonel aktivasyonuna yol açtığı gösterilmektedir. Ancak, HOTAIR'ın kodlandığı kromozom 12'de bulunan HOXC küme genlerinin transkripsiyonu üzerinde önemli bir etki yoktur. HOTAIR yıkımının HOXD lokusunda önemli bir H3K27-trimetilasyon işareti kaybıyla sonuçlandığını gösterilmektedir. Özellikle, H3K27-metilasyon ( H3K27-me3), gen susturmanın ayırt edici özelliği olarak bilinmektedir. (Arunoday Bhan vd 2015)

HOTAIR'ın mikro RNA seviyelerini doğrudan tanıma ve ardından hedef bozunma yoluyla düzenlediği bilinmektedir. HOTAIR, miRNA-130a için bir bağlanma bölgesine sahiptir ve bu bağlanma bölgesi, miRNA-130a'nın HOTAIR tarafından düzenlenmesi için önemlidir. HOTAIR yıkımının miRNA-130a seviyelerini indüklediğini, HOTAIR'ın ekspresyonunun ise safra kesesi kanseri hücrelerinde miRNA-130a seviyesini azalttığını gösterilmektedir. Öte yandan, miRNA-130a inhibitörü HOTAIR seviyesini yukarı regüle ederken, miRNA-130a HOTAIR seviyesini bastırır, bu da HOTAIR ve miRNA-130a'nın karşılıklı bir baskı geri besleme döngüsü oluşturabileceğini düşündürülmektedir. HOTAIR'ın miR-331-3p ve miR-124 için rekabetçi bir endojen RNA

(ceRNA) gibi davrandığı ve bunların hücresele seviyelerini düzenlediği gösterilmektedir. miR-331-3p, insan epitelyal büyüme faktörü reseptörü 2 (HER2) ile etkileşime girer ve HER2 seviyelerini aşağı regüle etmektedir. Özellikle karsinomlarda HER2, proliferasyon, anjiyogenez ve apoptoz gibi çeşitli malign hücre fonksiyonlarını etkileyen, hücre sinyal ağlarının aktivasyonunu tetikleyen bir proteini kodlayan bir onkogen görevi görmektedir. (Arunoday Bhan vd 2015)

HOTAIR'in aşırı ekspresyonu, psoriasis hücrelerin hayatta kalma oranlarını önemli ölçüde azaltmaktadır, apoptozu artırır, Bcl-2 proteininin ekspresyonunu inhibe etmektedir ve apoptoz ile ilgili faktörlerin (Bax, kaspaz 3 ve 9) üretimini teşvik eder, TNF- $\alpha$ , ve IL-6 protein ekspresyonu. HOTAIR'in aşırı ekspresyonu, hücre canlılığını inhibe etti, apoptozu iyileştirdi ve TNF- $\alpha$  ve IL-6'nın protein ekspresyonunu arttırdı. Ayrıca HOTAIR, RNA'ya bağımlı protein kinaz R (PKR) mRNA'nın ekspresyonunu da arttırmaktadır. HOTAIR aşırı ekspresyonu, PKR'yi, TNF- $\alpha$  ve IL-6 inflamatuvar faktörlerinin protein ekspresyonunu artırarak apoptozu ve inflamatuvar hasarı teşvik etmede önemli bir rol oynamaktadır. (Jian-Kun Song vd 2021)

#### **LncRNA RP6-65G23.1**

RP6-65G23.1'in yıkılması, hücre proliferasyonunu önemli ölçüde inhibe etmektedir ve apoptozu teşvik etmektedir. G1/S fazı büyümesini indüklerken, RP6-65G23.1'in aşırı ekspresyonu zıt etkiler göstermektedir. Protein kinaz B (AKT) ve hücre dışı sinyalle düzenlenen kinaz (ERK)1/2, hücre proliferasyonu düzenleyicileridir. HaCaT hücrelerinde, RP6-65G23.1 ekspresyonunun aşağı regülasyonu, AKT ve ERK1 / 2 sinyal yollarının aktivitesini inhibe etmektedir. Anti-apoptotik Bcl-2 ve Bcl-xL proteinlerinin ekspresyonu, RP6-65G23.1'i tüketen HaCaT hücrelerinde aşağı regüle edilmekte ve RP6-65G23.1'i aşırı eksprese eden hücrelerde yukarı regüle edilmektedir. (Jian-Kun Song vd 2021)

#### **LncRNA H19**

LncRNA H19, iki miRNA-130b-3p bağlanma bölgesi içermektedir. miRNA-130b-3p, H19 içeren containing wild type (WT) lusiferaz aktivitesini önemli ölçüde azaltırken, H19 mutant formunun lusiferaz aktivitesini zayıflatmaktadır. Keratinosit'lerde miRNA-130b-3p'nin aşırı ekspresyonu, H19 ekspresyonunun aşağı regülasyonuna yol açmaktadır. Keratinosit farklılaşması sırasında, H19 ifadesi artarken miR-130b-3p ifadesi aşağı regüle edilmektedir. (Jian-Kun Song vd 2021)

## 2.4 Hipotez

Bu çalışmada, psoriasis patogenezinde etkilenen ana hücreler olan Keratinositlerin, HaCaT hücre hatları kullanılarak, LPS (lipopolisakkarit) muamelesi ile hücre kültürü psoriasis modeli oluşturulup, secukinumab'ın lncRNAlar (Uzun kodlamayan RNA) MEG3 ve MSX2P1'nin ekspresyon seviyelerine etkisinin araştırılması amaçlanmaktadır. Bizim çalışmamız ile psoriasis patogenezine secukinumab etkisi aydınlatılabilecektir. Böylelikle lncrnalar MEG3 ve MSX2P1'nin ekspresyonlarında ki değişikliklerin bulunması hastalığın oluşumunun önlenmesi ve patogenezinin aydınlatılması açısından önemli bilgiler sunacağını düşünmekteyiz.



### 3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

#### 3.1 HaCaT Hücre Kültürü

Secukinumab (Verxant) etkisini araştırmak için HaCaT hücreleri kullanıldı. HaCaT hücreleri için DMEM (Sigma) (Dulbecco'nun Modifiye mediyumu) besiyerine %10 FBS(CAPRICORN) (Fetal sığır serumu), %1 penisilin-streptomisin, 1x amphotericin B(Capricorn) karıştırılarak hazırlandı. 25 ml flaska 4 ml besiyeri karışımından konuldu. Besiyerine 250000 bin hücre konulup 37°C'de, %5 CO2 ve %95 nemli hava içeren ortamda inkübe edildi. 2 gün ara ile ortamdaki besiyeri değişimi yapıldı.

Flaskdaki hücreler %80 yoğunluğa ulaştığında pasajlama işlemine alındı. Flaskdaki besiyeri serolojik pipet ile alındı ve hücrelerin üzerine 3 ml PBS (Capricorn) (Fosfatlanmış tuz tamponu ) eklendi, 5 saniye bekledikten sonra PBS ortamdaki uzaklaştırıldı, hücrelerin üzerine 1 ml tripsin-EDTA (Capricorn) eklendi ve 37°C'de, %5 CO2 ve %95 nemli hava içeren ortamda 5 dakika inkübe edildi. Hücrelerin flask yüzeyinden ayrıldığı anda tripsinin üzerine 4 ml besiyeri konuldu. Karışım falkon tüplere alınarak 37°C'de 1800 RPM(Dakikadaki devir sayısı) de 5 dakika santrifüj edildi. Supernatant uzaklaştırıldı. Pellet'e 4 ml besiyeri eklenerek süspanse edildi. Süspanse pelletten 20 µl alınarak 20 µl tripan mavisi boyası ile boyanarak Neubauer lamı ile hücre sayımı yapıldı. 3000000 hücre tespit edildi. Hücrelerden 30000 hücre yeni flaska aktararak pasajlama işlemine devam edildi.

#### 3.2 Hücre Canlılığı Testi

HaCaT hücre hattı psoriasis modeli oluşturmak için 200 ng/ml LPS (SigmaL2630) (Lipopolisakkarit) ile muamele edildikten sonra Secukinumab'ın 0,1, 0,25, 0,5, 1, 2,5, 5, 7,5, 10 mg/ml dozlarının toksik değerini belirlemek için Hücre canlılığı testi yapıldı.

İlk olarak;

96-well platelerin her kuyusuna 10.000 hücre ekimi yapıldı. 24 saat inkübasyon sonrası LPS (SigmaL2630) eklenerek hücreler muamele edildi. LPS ile muamele edilen hücreler 37°C'de, %5 CO<sub>2</sub> ve %95 nemli hava içeren ortamda 24 saat inkübe edildi.

Hücreler Secukinumab'ın için 0,1, 0,25, 0,5,1,2,5,5,7,5,10 mg/ml dozları hücreleri muamele ederek 24,48,72 saatlerde hücre canlılığı değerleri tespit edildi.

Hücre canlılığı değerini tespit etmek için; Secukinumab ile muamele ettiğimiz hücrelere 10 µl CCK-8 (Cell Counting Kit-8) eklenip 37°C'de, %5 CO<sub>2</sub> ve %95 nemli hava içeren ortamda 4 saat inkübe edildi. Hücre canlılığı değerlerine göre LD 50 değeri belirlendi.

### 3.3 RNA İzolasyonu

Total RNA izolasyonu için 6-well platelere her kuyuya 100.000 hücre ekildi. 24 saat sonrasında 200 ng/ml LPS muamelesi yapıldı. Hücrelere LPS muamelesi yapıldıktan 24 saat sonra 6-well platelere 7,5 mg/ml Secukinumab (Verxant) muamele edilip 72 saat beklendi ve ticari kit yardımı ile izolasyonları gerçekleştirildi. (GeneALL – Hybrid-R Mini Kit).

Hücreler 1 ml RiboEx™ ile kaldırılıp 1,5 ml'lik eppendorflara aktarıldı. Oda sıcaklığında (15-25° C'de) 5 dakika bekletildikten sonra 12000 g 4°C de 10 dakika santrifüj edildi ve süpernatant 1,5 ml yeni eppendorfa aktarıldı. 1 ml RiboEx™ için 200 µl kloroform eklenip 15 saniye karıştırılıp 2 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. 12000 g 4°C de 15 dakika santrifüj edildi. Süpernatant yeni eppendorfa alındı. 1 ml Buffer RB1 eklenerek iyice karıştırıldı. Karışımdan 700 µl alınıp Hybrid-R spin kolonlarına aktarıldı. Oda sıcaklığında 10000 g de 30 saniye santrifüj yapıldı. Süpernatant atıldı ve Hybrid-R mini spin kolonu yeni tüpe aktarıldı. 500 µl Buffer SW1 eklendi. Oda sıcaklığında 10000 g de 30 saniye santrifüj yapıldı. Süpernatant atıldı ve Hybrid-R mini spin kolonu yeni tüpe aktarıldı. 500 µl Buffer RNW eklendi. Oda sıcaklığında 10000 g de 30 saniye santrifüj yapıldı. Süpernatant atıldı ve Hybrid-R mini spin kolonu yeni tüpe aktarıldı. Oda sıcaklığında 10000 g de 1 dakika santrifüj yapıldı. Süpernatant atıldı ve 1,5 ml'lik yeni eppendorf tüplere aktarıldı. Tüplerin merkezine 50-100 µl Nuclease-free water eklenip 1 dakika oda sıcaklığında bekletildi. Oda sıcaklığında 10000 g de 1 dakika santrifüj yapıldı. Kolonda bulunan total RNA 1,5 ml'lik yeni eppendorfa toplandı. RNA'ların konsantrasyon ve saflık tayinleri Nanodrop cihazı ile gerçekleştirildi.

### 3.4 cDNA Sentezi

lncRNA ekspresyon analizi için cDNA dönüşümü gerçekleştirildi (A.B.T.™ cDNA Synthesis Kit). Reaksiyon karışımı Tablo 3.1 de verilen miktarlarla hazırlanmıştır ve Tablo 3.2 de gösterilen reaksiyon basamakları ile reaksiyon gerçekleştirilmiştir.

**Tablo 3.1** Ters Transkriptaz Reaksiyonu için gerekli miktarlar

20 µl cDNA Reaksiyonu	Miktar
10X Reaction Buffer	2 µl
dNTP mix (2.5 mM each)	1 µl
Random hexamer (50 µM)	2 µl
Reverse Transcriptase (200 U/µl)	1 µl
RNase Inhibitor	0.5 µl
RNase free Water	3.5 µl
RNA Template	10 µl

**Tablo 3.2** cDNA Reaksiyonu Basamakları

cDNA Reaksiyonu Basamakları	Sıcaklık (°C)	Zaman	Döngü
1.Basamak	25	10 Dakika	1
2.Basamak	37	120 Dakika	1
3.Basamak	85	5 Dakika	1
4.Basamak	4	∞	1

### 3.5 Ekspresyon Analizi

MEG3 VE MSX2P1'nin ekspresyonu özgün primer ve A.B.T.™ 2X PCR MasterMix ile Tablo 3.4 da verilen miktarlarla hazırlanıp, Tablo 3.5 de verilen reaksiyon basamakları ile Real-Time PCR gerçekleştirildi. Tablo 3.3 de gösterilen primerler kullanılmıştır. PCR Array Data Analysis kullanarak analiz yapılmıştır.

**Tablo 3.3** Primerler ve baz dizileri

PRİMERLER	BAZ DİZİSİ 5'-3'
MEG3-F	5' TTGAACTTAACTCTTTTGGGGCA 3'
MEG3-R	5' TGCCGATATTGTTGTTTCATCTTGT 3'
MSX2P1-F	5' CGTCACTGATACTCACCTCATA 3'
MSX2P1-R	5' GTACTGGCCTACAGAACTGGTA 3'
GAPDH-F	5' ATGTTCCAATATGATTCACCC 3'
GAPDH-R	5' ATGAGTCCTCCACGATACC 3'

**Tablo 3.4** Ekspresyon reaksiyon miktarları

20 µl PCR Reaksiyonu	Miktar
A.B.T.™ 2X PCR MasterMix	10 µl
Forward Primer (10 µM)	1 µl
Reverse Primer (10 µM)	1 µl
Template	5 µl
RNase-Free Distilled Water	20 µl tamamlanır

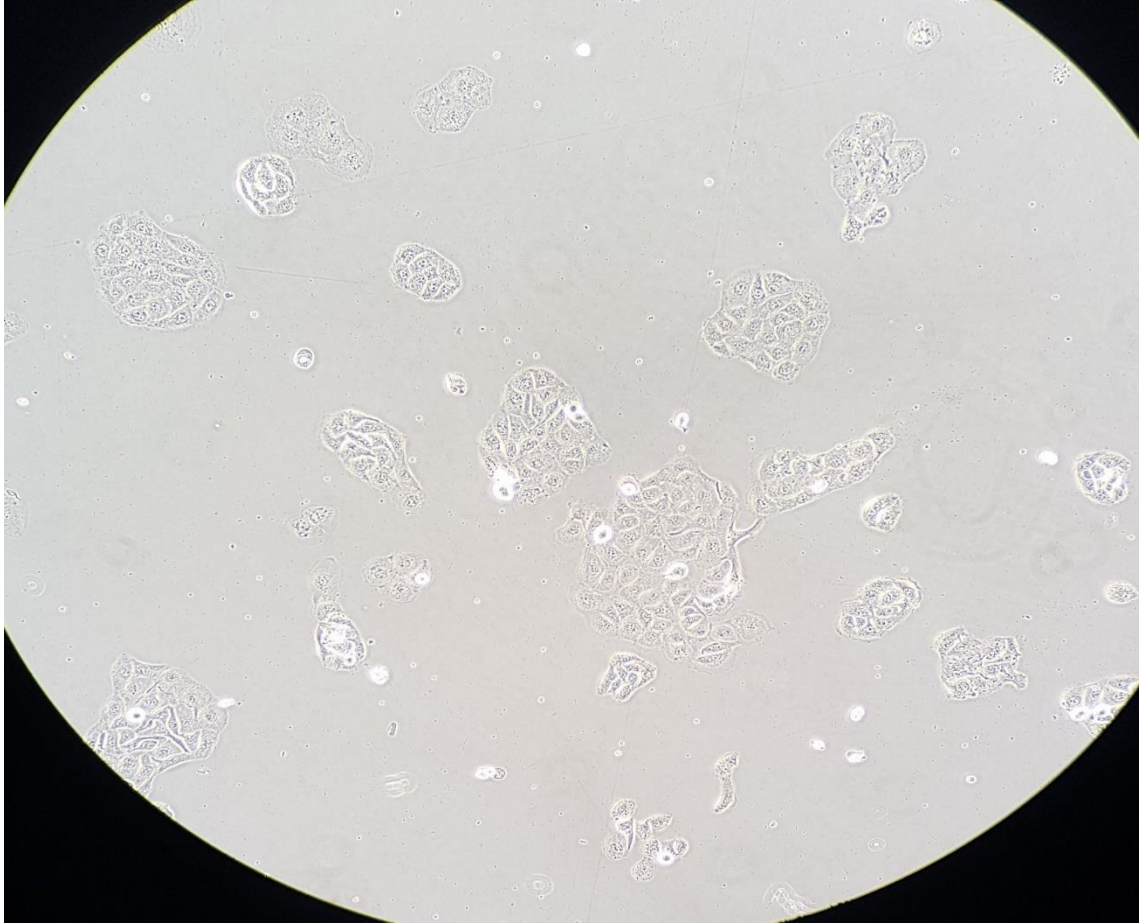
**Tablo 3.5** Ekspresyon reaksiyon basamakları

PCR Reaksiyon Basamakları	Sıcaklık(°C)	Zaman	Döngü
İlk Denatürasyon	95	300 Saniye	1
Denatürasyon	95	10-60 Saniye	25-40
Anneal	68	10-60 Saniye	25-40
Uzatma	72	60 Saniye	25-40
Son Uzatma	72	300 Saniye	1

## 4. BULGULAR

### 4.1 Hücre Kültürü

DeneYlerimiz için, literatürde yer alan diğEr çalışmalarda da kullanılan HaCaT hücre hattını belirledik. Yapılan pasajlamalarla 1 ml de 1800000 hücre tespit edilmiştir. Tespit ettiğimiz hücre yoğunluğu yeterli görünüp deneylere devam edildi.



Şekil 4.1 HaCaT hücre flaskı

## 4.2 Hücre Canlılığı Testi

96-well ekilen hücreler 200 ng/ml LPS muamelesi yapıp 24 saat beklendi.



Şekil 4.2 HaCat hücre hattının 24 saat LPS muamele sonrası mikroskop görüntüsü

LPS ile muamele edilen hücreler, Secukinumab'ın toksik değerini belirlemek için 0,1, 0,25, 0,5, 1, 2,5, 5, 7,5, 10 mg/ml muamele yapıp 24, 48 ve 72 saatler de hücre canlılığı testi uygulanmıştır. Tablo 4.1, tablo 4.2 ve tablo 4.3 hücre canlılığı değerleri gösterilmiştir. Hücre canlılığı testi CCK-8 (Cell Counting Kit-8) kimyasalı ile gerçekleştirildi. Yapılan testler ile Secukinumab 7,5 mg/ml dozu LD 50 değeri olduğu belirlendi. Tablo 4.4 de LD 50 değerleri gösterilmiştir.

**Tablo 4.1** 24 saat hücre canlılığı tablosu

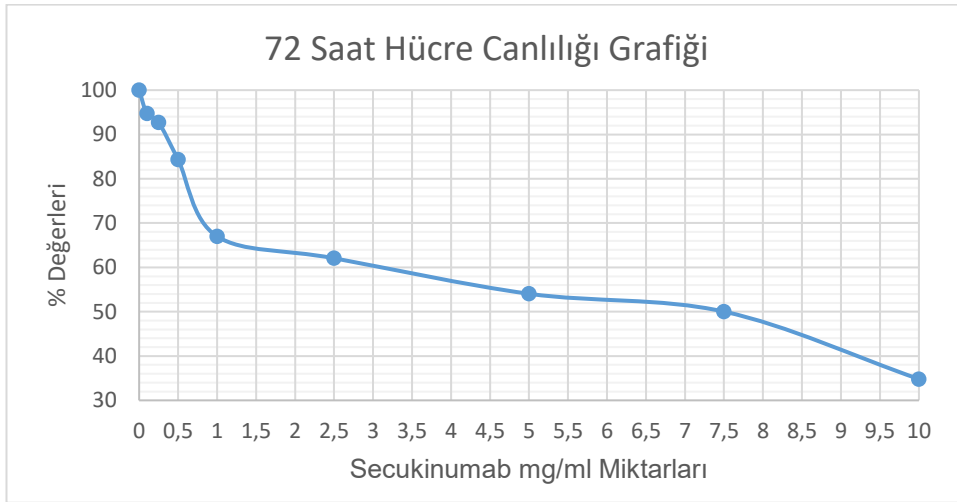
	24 saat			Ortalama	%
					Canlılık
w cell	2,0507	2,1006	1,851	2,000767	100
0,1mg/ml	1,805	2,154	1,908	1,955667	97,664
0,25 mg/ml	1,793	1,661	2,087	1,847	92,0356
0,5 mg/ml	1,612	1,77	1,768	1,716667	85,2849
1 mg/ml	1,642	1,689	1,7	1,677	83,2303
2,5 mg/ml	1,601	1,609	1,606	1,605333	79,5183
5 mg/ml	1,264	1,593	1,418	1,425	70,1778
7,5 mg/ml	1,422	1,296	1,435	1,384333	68,0715
10 mg/ml	1,288	1,104	1,537	1,309667	64,2041

**Tablo 4.2** 48 saat hücre canlılığı tablosu

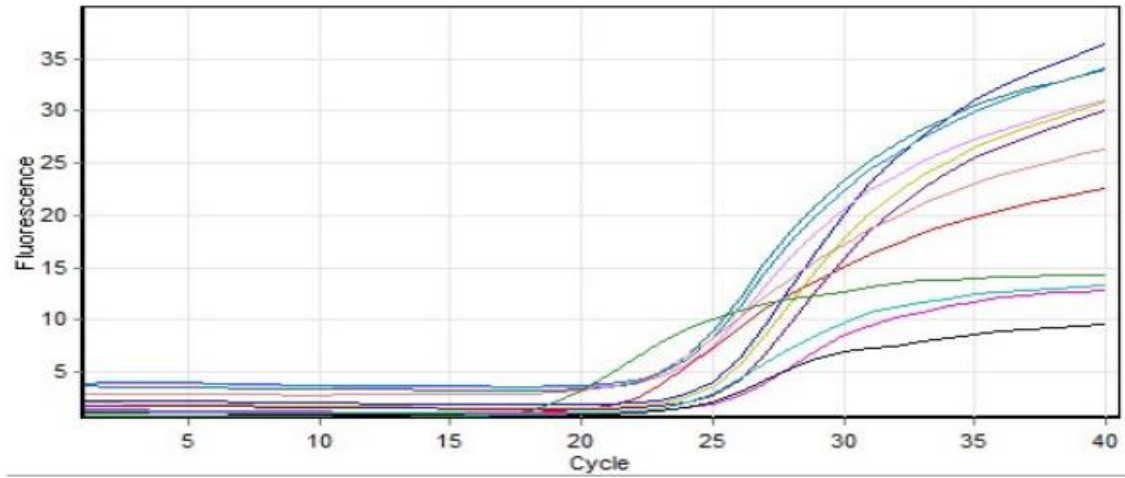
	48 saat			Ortalama	%
					Canlılık
w cell	2,937	3,1153	2,941	2,997767	100
0,1mg/ml	2,861	2,935	2,954	2,916667	97,23
0,25 mg/ml	2,679	2,886	2,582	2,715667	90,3647
0,5 mg/ml	2,339	2,55	2,417	2,435333	80,7897
1 mg/ml	2,252	2,2156	2,2155	2,2277	73,6978
2,5 mg/ml	2,1305	2,1397	2,1308	2,133667	70,486
5 mg/ml	2,1211	2,1165	2,1185	2,1187	69,9748
7,5 mg/ml	2,082	2,0269	2,0149	2,041267	67,33
10 mg/ml	1,912	1,91212	1,9124	1,912173	62,9208

**Tablo 4.3** 72 saat hücre canlılığı tablosu

	72 saat			Ortalama	%
					Canlılık
w cell	3,1617	3,0928	3,112	3,122167	100
0,1mg/ml	2,926	3,045	2,914	2,961667	94,7347
0,25 mg/ml	2,86	2,976	2,864	2,9	92,7117
0,5 mg/ml	2,67	2,57	2,6921	2,644033	84,3146
1 mg/ml	2,1778	2,1103	2,0609	2,116333	67,0031
2,5 mg/ml	1,9432	1,9778	1,9766	1,965867	62,067
5 mg/ml	1,737	1,704	1,723	1,721333	54,0449
7,5 mg/ml	1,658	1,517	1,622	1,599	50,0317
10 mg/ml	1,274	1,042	1,089	1,135	34,8099

**Tablo 4.4** Secukinumab uygulanmış hücrelerin canlılık-zaman grafiği

### 4.3 Ekspresyon Analizi

**Tablo 4.5** Ekspresyon Analiz Grafiği

**Tablo 4.6** Fold Change kontrol analizi

		Kontrol Fold Change
1	GAPDH	1
2	MEG3	20,68
3	MSXP2	190,02

**Tablo 4.7** Fold Change Secukinumab analizi

		Secukinumab Fold Change
1	GAPDH	1
2	MEG3	0,27
3	MSXP2	1,77

## 5. TARTIŞMA

Kaspaz aktivasyon mekanizması, apoptoza neden olan önemli bir sinyal yoludur. miR-21 inhibitörü apoptotik hücre hızını önemli ölçüde artırırken, kaspaz-8 susturma, azalan apoptozu kısmen tersine çevirmektedir. Bu nedenle miR-21, kaspaz-8'i hedefleyerek apoptozu inhibe edebilmektedir. MEG3 tarafından miR-21'in düzenlenmesini dikkate alarak, MEG3/miR-21 ekseninin kaspaz-8'i hedefleyerek hücre proliferasyonunu ve apoptozu kontrol edebileceği sonucuna varılmaktadır. (Hai Yan Jia vd 2019)

MEG3'ün düşük ekspresyonu, kaspaz-8 ve Bax ekspresyonunu azalttı ve apoptozu inhibe eden Bcl-2 proteininin ekspresyonunu arttırmaktadır. Bir çift luciferase reporter assay, miR-21'in MEG3 tarafından doğrudan bağlanmasını göstermektedir. MEG3'ün aşırı ekspresyonu, miR-21'in ekspresyon seviyelerini önemli ölçüde azaltmaktadır. HaCaT ve NKEK'te miR-21'in aşırı ekspresyonu, hücre proliferasyon oranlarındaki düşüşü tersine çevirir, apoptoz oranlarını artırır, kaspaz-8 ve Bax ekspresyonunu artırır ve MEG3'ün aşırı ekspresyonunun neden olduğu Bcl-2 ekspresyonunu azaltmaktadır. Bir ikili lusiferaz raportör tahlili, kaspaz-8 ve miR-21'in bağlanma bölgesini ortaya çıkarmaktadır. Kaspaz-8, parçalanmış kaspaz-8, cytc ve apaf-1'in birkaç aşağı akış proteini, miR-21 ve MEG3 tarafından düzenlenmektedir. Özetle, MEG3, miR-21 ve kaspaz-8 ekspresyonunu düzenleyerek psoriatik KC'lerin aşırı çoğalmasını ve yetersiz apoptozunu hafifletebilmektedir. (Youdong Chen vd 2022)

MEG3, safra kesesi kanseri hücrelerinde EZH2 ubiquitination'ı güçlendirerek kanser hücrelerinin yayılmasını ve proliferasyonunu inhibe edebilmektedir. MEG3 ayrıca PKM2/PTEN sinyali yoluyla  $\beta$ -katenin seviyesini azaltarak karaciğer kanserinin büyümesini engellemektedir. MEG3 ayrıca MC'lerin enflamatuar tepkilerinin yanı sıra fibrozu da artırır ve MEG3'ün aşırı ekspresyonu, inflamasyonla ilgili sitokinlerin yanı sıra fibrozis ile ilgili proteinlerin ekspresyon seviyesini artırır. Öte yandan, MEG3'ün susturulması, iltihaplanma düzeyinin yanı sıra fibrozu da inhibe etmektedir. (Chaoxiang Zhong vd 2022)

Çalışmamız da hücrelerimiz Secukinumab 7,5 mg/ml dozu muamele yapıldığında kontrol grubuna göre MEG3 ekspresyonunda 3.7 kat aşağı regüle olduğu tespit edildi.

MSX2P1'in miR-6731-5p'yi doğrudan hedeflediğini ve proliferasyonu destekleyen, IL-22 ile uyarılan keratinosit'lerde apoptozu baskılayan S100A7, IL-12 $\beta$ , ekspresyonunu hedeflediği bilinmektedir. (Qianqian Zhou vd 2019)

Çalışmamız da hücrelerimiz Secukinumab 7,5 mg/ml dozu muamele yapıldığında kontrol grubuna göre MSX2P1 ekspresyonunda 1.77 kat yukarı regüle olduğu tespit edildi.

Secukinumab ve kontrol hücreleri karşılaştırıldığında MEG3 ekspresyonu 20 kat yukarı regüle, MSX2P1 ise 190 kat yukarı regüle olduğu tespit edilmiştir. Bu IL-17 inhibitörünün MEG3 ve MSX2P1 ekspresyonu üzerine inhibitör etkisi olduğunun göstergesidir.

IL-17, sedef hastalığının ayırt edici inflamatuvar sitokinidir. Psoriatik iltihabı sürdüren ve güçlendiren dönüştürücü büyüme faktörü (TGF)- $\beta$  ve IL-1 $\beta$  dahil olmak üzere keratinositlerin hiperproliferasyonunu, sitokin ve kemokin üretimini indüklemektedir. (Youdong Chen vd 2022)

IL-17A sitokinin rolü, güçlü bir kemotaktik faktör olan (monositlerde olduğu gibi) nötrofillerin üretimini teşvik etmektedir. IL-17F, diğer taraftan, antimikrobiyal peptitlerin üretimi, epitelyal bütünlük ile ilgili claudinlerin salgılanması ve inflamatuvar sitokinlerin üretimi ile bağlantılıdır. (Daniel Octavian Costache vd 2022)

IL-17'nin vasküler endotelyal büyüme (VEGF) faktör yolunun aktivasyonu yoluyla neo-anjiyogenezi indüklediği ve metastatik aktiviteyi artıran matris metalloproteinaz-2 ve -9'un (MMP-2 ve MMP-9) aktivitesini arttırdığı kanıtlanmaktadır. (Daniel Octavian Costache vd 2022)

Secukinumab, IL-17A'ya seçici olarak bağlanan ve onu nötralize eden tamamen insan IgG1/k monoklonal antikordur. IL-17A'yı hedefleyerek ve keratinositler de dahil olmak üzere çeşitli hücre tiplerinde ifade edilen IL-17 reseptörü ile etkileşimini engelleyerek çalışmaktadır. IL-17A aracılı katkıları azaltmaktadır. ( Daniel Octavian Costache vd 2022)

## 6. SONUÇLAR

Hücre kültürü psoriasis modelinde, psoriasisin tedavisinde en son kullanıma giren biyolojik ajan olan interlökin-17 inhibitörü Secukinumab'ın keratinosit proliferasyonunda ve inhibisyonunda rol alan iki uzun kodlanmayan RNA'nın ekspresyon seviyelerine etkisi araştırılmasını amaçlayan bu çalışmada aşağıdaki sonuçlar öne çıkmaktadır:

MEG3 ekspresyonu secukinumab muamelesi sonrasında da 3.7 kat azaldığı tespit edildi.

MSX2P1 ekspresyonu secukinumab muamelesi sonrasında da 1.77 kat arttığı tespit edildi.

Bu bilgiler ışığında, Secukinumab'ın IL 17 etkileyerek farklı bir yolak izlediği ve MEG3, MSX2P1'in yollarıyla etkileşime girmediğinden dolayı beklenen değerlerde değişim görülmemiştir.

## 7. KAYNAKLAR

Arunoday Bhan, Subhrangsu S. Mandal. LncRNA HOTAIR: A master regulator of chromatin dynamics and cancer. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)** 2015. <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2015.07.001>

Adone Baroni, Elisabetta Buommino, Vincenza De Gregorio, Eleonora Ruocco, Vincenzo Ruocco, Ronni Wolf. Structure and function of the epidermis related to barrier properties. **Clin Dermatol** 2012; 30(3):257-62. doi: 10.1016/j.clindermatol.2011.08.007.

Andrew Blauvelt, Andrea Chiricozzi. The Immunologic Role of IL-17 in Psoriasis and Psoriatic Arthritis Pathogenesis. **Clin Rev Allergy Immunol** 2018; 55(3): 379–390. doi: 10.1007/s12016-018-8702-3.

Bruce Strober, Ali Alikhan, Benjamin Lockshin, Rebecca Shi, Joshua Cirulli, Peter Schafer. Apremilast mechanism of efficacy in systemic-naïve patients with moderate plaque psoriasis: Pharmacodynamic results from the UNVEIL study. **J Dermatol Sci** 2019; 96(3):126-133. doi: 10.1016/j.jdermsci.2019.09.003.

Brandi N Davis, Akiko Hata. Regulation of MicroRNA Biogenesis: A miRiad of mechanisms. **Cell Commun Signal** 2009; 7:18. doi: 10.1186/1478-811X-7-18.

Catia de Felice, Georgiana Clare Marulli, Marco Ardigò, Enzo Berardesca. Biological markers in the etiology of psoriasis: Targeted treatment options. **Biologics** 2007; 1(1):11-8.

Chaoxiang Zhong, Qiuju Yao, Jing Han, Jie Yang, Fei Jiang, Qiong Zhang, Haiyi Zhou, Yuchao Hu, Wei Wang, Yan Zhang, Ye Sun. SNP rs322931 (C>T) in miR-181b and rs7158663 (G>A) in MEG3 aggravate the inflammatory response of anal abscess in patients with Crohn's disease. **Aging (Albany NY)** 2022. doi: 10.18632/aging.204014

Daniel Octavian Costache, Oana Feroiu, Adelina Ghilencea, Mihaela Georgescu, Ana Căruntu, Constantin Căruntu, Sorin George Țiplica, Mariana Jinga, Raluca Simona Costache. Skin Inflammation Modulation via TNF- $\alpha$ , IL-17, and IL-12 Family Inhibitors Therapy and Cancer Control in Patients with Psoriasis. **Int J Mol Sci** 2022. doi: 10.3390/ijms23095198

DL Mcmillin, DG Richards, EA Mein, CD Nelson. Systemic aspects of psoriasis. An integrative model based on intestinal etiology. **Integr Med** 2000; 2(2):105-113. doi: 10.1016/s1096-2190(00)00010-x.

Delin Ran, Minglong Cai, Xuejun Zhang. Genetics of psoriasis: a basis for precision medicine. Precision **Clinical Medicine** 2019; Volume 2, Issue 2, Pages 120–130. <https://doi.org/10.1093/pcmedi/pbz011>.

Dónal O'Carroll, Anne Schaefer. General principals of miRNA biogenesis and regulation in the brain. **Neuropsychopharmacology** 2013; 38(1):39-54. doi: 10.1038/npp.2012.87.

Eric J Yang, Kristen M Beck, Wilson Liao. Secukinumab in the treatment of psoriasis: patient selection and perspectives. **Psoriasis (Auckl)** 2018; 8: 75–82. doi: 10.2147/PTT.S146004.

Francesca Capon. The Genetic Basis of Psoriasis. **Int J Mol Sci** 2017; 18(12), 2526. <https://doi.org/10.3390/ijms18122526>

Gulbahar Sarac, Tuba Tulay Koca, Tolga Baglan. A brief summary of clinical types of psoriasis. **North Clin Istanb.** 2016; 3(1): 79–82. doi: 10.14744/nci.2016.16023

Holland, P.W. Booth, H.A.F. & Bruford, E.A. Classification and nomenclature of all human homeobox genes. **BMC Biol** 2007. <https://doi.org/10.1186/1741-7007-5-47>

Hai Yan Jia, Kai Zhang, Wen-Jing Lu, Gui-Wen Xu, Jian-Fen Zhang, Zhan-Li Tang. LncRNA MEG3 influences the proliferation and apoptosis of psoriasis epidermal cells by targeting miR-21/caspase-8. **Molecular and Cell Biology** 2019.

Jian-Kun Song, Shuang-Yi Yin, Wei Li, Xiao-Dong Li, Yue Luo, Ying Luo, Meng Xing, Bin Li, Le Kuai. An update on the role of long non-coding RNAs in psoriasis. **Chin Med J (Engl)** 2021. doi: 10.1097/CM9.0000000000001243

Joel M. Reicherter. Anatomy and physiology for polygraph examiners. **Fundamentals of Polygraph Practice** 2015.

Jing-Yi Ma, Shuai Shao, Gang Wang. Antimicrobial peptides: bridging innate and adaptive immunity in the pathogenesis of psoriasis. **Chin Med J (Engl)** 2020; 133(24):2966-2975. doi: 10.1097/CM9.0000000000001240.

Joanna Czerwińska, Agnieszka Owczarczyk-Saczonek. The Role of the Neutrophilic Network in the Pathogenesis of Psoriasis. **Int J Mol Sci** 2022; 23(3), 1840. <https://doi.org/10.3390/ijms23031840>.

Jacob O'Brien, Heyam Hayder, Yara Zayed, Chun Peng. Overview of MicroRNA Biogenesis, Mechanisms of Actions, and Circulation. **Front Endocrinol (Lausanne)** 2018; 9:402. doi: 10.3389/fendo.2018.00402.

Jr-Shiuan Yang, Eric C Lai. Alternative miRNA biogenesis pathways and the interpretation of core miRNA pathway mutants. **Mol Cell** 2011; 43(6):892-903. doi: 10.1016/j.molcel.2011.07.024.

Masaru Honma, Hiroyoshi Nozaki. Molecular Pathogenesis of Psoriasis and Biomarkers Reflecting Disease Activity. **J Clin Med** 2021; 10(15):3199. doi: 10.3390/jcm10153199.

Michelle A. Lowes, Mayte Suárez-Fariñas, James G. Krueger. Immunology of Psoriasis. **Annu Rev Immunol** 2014; 32: 227–255. doi: 10.1146/annurev-immunol-032713-120225.

Monica Enamandram, Alexa B.Kimball. Psoriasis Epidemiology: The Interplay of Genes and the Environment. **Journal of Investigative Dermatology** 2013; Volume 133, Issue 2, Pages 287-289.

Qianqian Zhou, Qian Yu, Yu Gong, Zhicui Liu, Hui Xu, Yao Wang, Yuling Shi. Construction of a lncRNA-miRNA-mRNA network to determine the regulatory roles of lncRNAs in psoriasis. **Experimental and Therapeutic Medicine** 2019. <https://doi.org/10.3892/etm.2019.8035>

Robert Bissonnette, Linda Stein Gold, David S Rubenstein, Anna M Tallman, April Armstrong. Tapinarof in the treatment of psoriasis: A review of the unique mechanism of action of a novel therapeutic aryl hydrocarbon receptor-modulating agent. **J Am Acad Dermatol** 2021; 84(4):1059-1067. doi: 10.1016/j.jaad.2020.10.085.

S Singh, D Pradhan, P Puri, V Ramesh, S Aggarwal, A Nayek, A K Jain. Genomic alterations driving psoriasis pathogenesis. **Gene** 2019; 683:61-71. doi: 10.1016/j.gene.2018.09.042.

Shohreh Nafisi, Howard I. Maibach. Skin penetration of nanoparticles. **Emerging Nanotechnologies in Immunology** 2018

Trung T. Vu, Hanako Koguchi-Yoshioka, Rei Watanabe. Skin-Resident Memory T Cells: Pathogenesis and Implication for the Treatment of Psoriasis. **J Clin Med** 2021; 10(17), 3822. <https://doi.org/10.3390/jcm10173822>.

Teodora Larisa Timis, Remus Ioan Orasan. Understanding psoriasis: Role of miRNAs. **Biomed Rep** 2018; 9(5):367-374. doi: 10.3892/br.2018.1146.

Wei-Wei Jiang, Yi-Meng Wang, Xiao-Yu Wang, Qian Zhang, Si-Man Zhu, Chun-Lei Zhang. Role and mechanism of matrine alone and combined with acitretin for HaCaT cells and psoriasis-like murine models. **Chin Med J (Engl)** 2019; 132(17):2079-2088. doi: 10.1097/CM9.0000000000000412.

Wang, Dan, Cheng, Shiping, Zou, Guoming, Ding, Xiongfei, Paeoniflorin inhibits proliferation and migration of psoriatic keratinocytes via the lncRNA NEAT1/miR-3194-5p/Galectin-7 axis. **Anti-Cancer Drugs** 2022. doi: 10.1097/CAD.0000000000001225

Wolf-Henning Boehncke. Etiology and Pathogenesis of Psoriasis. **Rheum Dis Clin North Am** 2015; 41(4):665-75. doi: 10.1016/j.rdc.2015.07.013.

Wen-Ming Wang, Hong-Zhong Jin. Role of Neutrophils in Psoriasis. **Journal of Immunology Research** 2020; 6. <https://doi.org/10.1155/2020/3709749>.

Xue Zhou, Youdong Chen, Lian Cui, Yuling Shi, Chunyuan Guo. Advances in the pathogenesis of psoriasis: from keratinocyte perspective. **Cell Death Dis** 2022; 13(1):81. doi: 10.1038/s41419-022-04523-3.

Yuki Sato, Eisaku Ogawa, Ryuhei Okuyama. Role of Innate Immune Cells in Psoriasis. **Int J Mol Sci** 2020; 21(18): 6604. doi: 10.3390/ijms21186604.

Yunli Zhou, Xun Zhang ve Anne Klibanski. MEG3 noncoding RNA: a tumor suppressor. **Journal of Molecular Endocrinology** 2012. DOI: <https://doi.org/10.1530/JME-12-0008>

Youdong Chen, Yifan Hu, Xue Zhou, Zihan Zhao, Qian Yu, Zeyu Chen, Yuanyuan Wang, Peng Xu, Zengyang Yu, Chunyuan Guo, Xilin Zhang & Yuling Shi. Human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells ameliorate psoriasis-like dermatitis by suppressing IL-17-producing  $\gamma\delta$  T cells. **Cell Tissue Res** 2022. <https://doi.org/10.1007/s00441-022-03616-x>

Zhan-Li Tang, Kai Zhang, Shao Cong, Gui-Wen Xua, Jian-Fen Zhang, Hai Yan Jia. LncRNA MEG3 suppresses PI3K/AKT/mTOR signalling pathway to enhance autophagy and inhibit inflammation in TNF- $\alpha$ -treated keratinocytes and psoriatic. **Cytokine Volume**;148 2021. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2021.155657>

**8.EKLER**

