

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

**KİSTİK FİBROZİS PATOGENEZİNDE ADAY MİRNA VE
HEDEF GENLERİNİN BİYOİNFORMATİK ARAÇLARLA
TANIMLANMASI**

MERVE ATALAY

**Tıbbi Biyoloji Programı
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

ANKARA

2021

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

**KİSTİK FİBROZİS PATOGENEZİNDE ADAY MİRNA VE
HEDEF GENLERİNİN BİYOİNFORMATİK ARAÇLARLA
TANIMLANMASI**

MERVE ATALAY

**Tıbbi Biyoloji Programı
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. Didem DAYANGAÇ-ERDEN**

ANKARA

2021

ONAY SAYFASI

HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
KİSTİK FİBROZİS PATOGENEZİNDE ADAY MİRNA VE HEDEF GENLERİNİN
BİYOİNFORMATİK ARAÇLARLA TANIMLANMASI
Merve ATALAY
Danışman: Prof. Dr. Didem DAYANGAÇ-ERDEN

Bu tez çalışması 05/08/2021 tarihinde jürimiz tarafından "Tıbbi Biyoloji Programı" nda yüksek lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı: *Prof. Dr. Serap DÖKMECİ*
Hacettepe Üniversitesi

Tez Danışmanı: *Prof. Dr. Didem DAYANGAÇ-ERDEN*
Hacettepe Üniversitesi

Üye: *Prof. Dr. Banu PEYNİRCİOĞLU*
Hacettepe Üniversitesi

Üye: *Prof. Dr. Hayriye Uğur ÖZÇELİK*
Hacettepe Üniversitesi

Üye: *Prof. Dr. Bünyamin AKGÜL*
İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü

Bu tez Hacettepe Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri tarafından uygun bulunmuştur.

10 Ağustos 2021

Prof. Dr. Diclehan Orhan
Enstitü Müdürü

YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI

Enstitü tarafından onaylanan lisansüstü tezimin/raporumun tamamını veya herhangi bir kısmını, basılı (kağıt) ve elektronik formatta arşivleme ve aşağıda verilen koşullarla kullanıma açma iznini Hacettepe Üniversitesine verdiğimi bildiririm. Bu izinle Üniversiteye verilen kullanım hakları dışındaki tüm fikri mülkiyet haklarım bende kalacak, tezimin tamamının ya da bir bölümünün gelecekteki çalışmalarda (makale, kitap, lisans ve patent vb.) kullanım hakları bana ait olacaktır.

Tezin kendi orijinal çalışmam olduğunu, başkalarının haklarını ihlal etmediğimi ve tezimin tek yetkili sahibi olduğumu beyan ve taahhüt ederim. Tezimde yer alan telif hakkı bulunan ve sahiplerinden yazılı izin alınarak kullanılması zorunlu metinlerin yazılı izin alınarak kullandığımı ve istenildiğinde suretlerini Üniversiteye teslim etmeyi taahhüt ederim.

Yükseköğretim Kurulu tarafından yayınlanan **“Lisansüstü Tezlerin Elektronik Ortamda Toplanması, Düzenlenmesi ve Erişime Açılmasına İlişkin Yönerge”** kapsamında tezim aşağıda belirtilen koşullar haricince YÖK Ulusal Tez Merkezi / H.Ü. Kütüphaneleri Açık Erişim Sisteminde erişime açılır.

- Enstitü / Fakülte yönetim kurulu kararı ile tezimin erişime açılması mezuniyet tarihimden itibaren 2 yıl ertelenmiştir. ⁽¹⁾
- Enstitü / Fakülte yönetim kurulunun gerekçeli kararı ile tezimin erişime açılması mezuniyet tarihimden itibaren 6 ay ertelenmiştir. ⁽²⁾
- Tezimle ilgili gizlilik kararı verilmiştir. ⁽³⁾

25 /07/2021

Merve ATALAY

¹“Lisansüstü Tezlerin Elektronik Ortamda Toplanması, Düzenlenmesi ve Erişime Açılmasına İlişkin Yönerge”

(1) Madde 6. 1. Lisansüstü teze ilgili patent başvurusu yapılması veya patent alma sürecinin devam etmesi durumunda, tez danışmanının önerisi ve enstitü anabilim dalının uygun görüşü üzerine enstitü veya fakülte yönetim kurulu iki yıl süre ile tezin erişime açılmasının ertelenmesine karar verebilir.

(2) Madde 6. 2. Yeni teknik, materyal ve metotların kullanıldığı, henüz makaleye dönüşmemiş veya patent gibi yöntemlerle korunmamış ve internetten paylaşılması durumunda 3. şahıslara veya kurumlara haksız kazanç imkanı oluşturabilecek bilgi ve bulguları içeren tezler hakkında tez danışmanının önerisi ve enstitü anabilim dalının uygun görüşü üzerine enstitü veya fakülte yönetim kurulunun gerekçeli kararı ile altı ayı aşmamak üzere tezin erişime açılması engellenebilir.

(3) Madde 7. 1. Ulusal çıkarları veya güvenliği ilgilendiren, emniyet, istihbarat, savunma ve güvenlik, sağlık vb. konulara ilişkin lisansüstü tezlerle ilgili gizlilik kararı, **tezin yapıldığı kurum tarafından verilir** *. Kurum ve kuruluşlarla yapılan işbirliği protokolü çerçevesinde hazırlanan lisansüstü tezlerle ilişkin gizlilik kararı ise, **ilgili kurum ve kuruluşun önerisi ile enstitü veya fakültenin** uygun görüşü üzerine **üniversite yönetim kurulu** tarafından verilir. Gizlilik kararı verilen tezler Yükseköğretim Kuruluna bildirilir.

Madde 7.2. Gizlilik kararı verilen tezler gizlilik süresince enstitü veya fakülte tarafından gizlilik kuralları çerçevesinde muhafaza edilir, gizlilik kararının kaldırılması halinde Tez Otomasyon Sistemine yüklenir

* Tez danışmanının önerisi ve enstitü anabilim dalının uygun görüşü üzerine enstitü veya fakülte yönetim kurulu tarafından karar verilir.

ETİK BEYAN

Bu çalışmadaki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi, görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu, kullandığım verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı, yararlandığım kaynaklara bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu, tezimin kaynak gösterilen durumlar dışında özgün olduğunu, Prof. Dr. Didem DAYAGAÇ ERDEN danışmanlığında tarafımdan üretildiğini ve Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Yönergesine göre yazıldığını beyan ederim.

Merve ATALAY

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim süresince hem akademik hem de kişisel yaşantımda bana her konuda yardımcı olan, desteğini hiçbir zaman esirgemeyen ve araştırmacı yönümü geliştirmemde en büyük katkısı olan değerli hocam ve danışmanım Prof. Dr. Didem DAYANGAÇ-ERDEN'e,

Tez çalışmamda değerli önerileri ve katkıları için sayın jüri üyeleri Prof. Dr. Serap DÖKMECİ, Prof. Dr. Banu PEYNİRCİOĞLU, Prof. Dr. H. Uğur ÖZÇELİK ve Prof. Dr. Bünyamin AKGÜL'e,

Tez çalışmama göstermiş oldukları emek ve ayırmış oldukları değerli vakit için sayın Doç. Dr. Nagehan EMİRALİOĞLU, Doç. Dr. Bala GÜR DEDEOĞLU ve Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Göğüs Hastalıkları Anabilim Dalı Göğüs Hastalıkları Ünitesi'ndeki tüm değerli hocalarıma,

Akademik hayatımda eğitim sürecime katkılarından dolayı Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'nda görev yapan değerli tüm hocalarıma,

Yüksek lisans eğitimim boyunca bana her koşulda destek olan, çalışma ortamıma mutluluk katan tüm çalışma arkadaşlarıma,

İstatistiksel analiz kısmında yardımları için kuzenlerim Özgür TAŞDEMİR ve Fatih TAŞDEMİR'e

Lise eğitimim boyunca her koşulda ve bölüm seçimimde destek olan biyoloji öğretmenin Sinan ONAR'a

İlköğretim sürecimde bana her koşulda destek olan sınıf öğretmenlerim Latife TARHUNCU ve Meltem SEVİNÇ'e,

Tez çalışmamda desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen ve bugünlere gelmemde en büyük katkısı olan bana her şekilde inanan ve her zaman yanımda olan sevgili babam Süleyman, annem Ayşe ve ağabeyim Halil İbrahim ATALAY'a,

En içten duygularla teşekkür ediyorum.

Bu tez Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi Tarafından desteklenmiştir (Proje No: TYL-2019-17977).

ÖZET

Atalay M., Kistik Fibrozis Patogenezinde Aday miRNA ve Hedef Genlerinin Biyoinformatik Araçlarla Tanımlanması, Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyoloji Yüksek Lisans Tezi, Ankara, 2021. Kistik fibrozis transmembran regülatör (CFTR) genindeki mutasyonların sebep olduğu kistik fibrozis (KF) otozomal resesif kalıtılan oldukça yaygın görülen genetik bir hastalıktır. Hastalık ciddiyeti mutasyonların CFTR proteini üzerindeki etkisiyle ilişkilendirilse de aynı mutasyonu taşıyan hastalarda hastalık ciddiyetini epigenetik faktörlerin de etkilediği bilinmektedir. Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı ve Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı Göğüs Hastalıkları Ünitesi iş birliği ile gerçekleştirdiğimiz ön çalışmalar sonucunda aynı mutasyonu taşımasına rağmen hastalık ciddiyeti farklı seyreden kardeşler saptanmıştır. Gerçekleştirdiğimiz ön çalışmada hasta kardeşlerden elde ettiğimiz nazal sürüntüler kullanılarak; hedeflenmiş transkriptomik Kistik Fibrozis PCR Array yöntemi ile ifade farklılığı gösteren genler ve yolaklar saptanmıştır. Bu tez çalışmada amacımız, aynı CFTR mutasyonuna sahip olmalarına rağmen farklı klinik ciddiyete sahip hasta kardeşlerde ifade değişikliği gösteren, fenotipik farklılığı açıklamaya yönelik ortak miRNA'ların ve hedef genlerinin tanımlanmasıdır. Bu amaç ile Hacettepe Üniversitesi Kapsamlı Araştırma Projesinde (TSA 201816629) gerçekleştirilmiş olan miRNA array ham verisi farklı biyoinformatik araçlarla tanımlanmış, kardeşler arasında klinik heterojeniteye sebep olabilecek aday miRNA'lar ve hedefleriyle ilişkili yolaklar saptanmıştır. BRB-ArrayTool, TAC 4.0 ve MeV programları kullanılarak Affymetrix miRNA 4.0 Array mikrodizin sonuçlarının ham verileri analiz edilmiş ve aday miRNA'lar seçilmiştir. Analizler sonucunda ağır seyirli hastalarda hafif seyirli hastalara göre ve Sınıf IV hasta grubunda ağır seyirli hastada hafif seyirli hastalara göre ifadesi artan miR-145-5p saptanmıştır. miR-145-5p'nin hedef genlerine ait yolak analizleri sonucunda miRWalk ve miRNET programlarında ortak ErbB sinyal yolağı elde edilmiştir. Ön çalışmamızın çıktılarında yer alan aday genlerin miRNA hedefleri olma durumu da araştırılmıştır. KF patolojisi ile uyumlu ve p değeri en yüksek IL-17 sinyal yolağı miR-145-5p için tanımlanmıştır. Ayrıca hastalarda kontrol bireylere göre ifadesi artan miR-92a-3p tanımlanmıştır. miR-92a-3p'nin hedef genlerine ait yolak analizleri sonucunda miRWalk ve miRNET programlarında en çok hedef geni içeren endositoz yolağı elde edilmiştir. Bu çalışma ile KF hastalarının klinik seyrini ve KF'ye eşlik eden diğer hastalıkların erken dönemde saptanmasını kolaylaştıracak, prognostik bir miRNA imzası tanımlanabilecek ve hastalık patogenezi ile ilişkili yeni yolaklar aydınlatılabilecektir.

Anahtar Kelimeler: Kistik fibrozis, CFTR, biyoinformatik, miRNA, genotip-fenotip ilişkisi

Bu tez Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi Tarafından desteklenmiştir (Proje No: TYL-2019-17977).

ABSTRACT

Atalay M., Identification of Candidate miRNA and Associated Genes by Bioinformatic Tools in Pathogenesis of Cystic Fibrosis, Hacettepe University Graduate School of Health Sciences Institute Medical Biology Master Thesis, Ankara, 2021. Cystic fibrosis (CF) is a very common autosomal recessive genetic disease caused by mutations in the cystic fibrosis transmembrane regulator (CFTR) gene. Although disease severity is associated with the effect of mutations on the CFTR protein, it is known that epigenetic factors also affect disease severity in patients carrying the same mutation. As a result of the preliminary studies, siblings with different disease severity were identified despite carrying the same mutation that was carried out in cooperation with Hacettepe University Faculty of Medicine, Department of Medical Biology and Department of Pediatrics, Chest Diseases. In the preliminary study, differentially expressed genes and pathways were determined between nasal brushing of affected siblings who have different disease severity (severe/mild) by using real-time PCR based cystic fibrosis PCR array. This thesis aims to identify common miRNAs and the target genes to explain the phenotypic changes, which show expression differences in siblings with different clinical severity despite having the same CFTR mutation. For this purpose, miRNA array raw data carried out in Hacettepe University Comprehensive Research Project (TSA 201816629) were defined with different bioinformatic tools, candidate miRNAs that may cause clinical heterogeneity among siblings and pathways related to their targets were determined. Raw data of Affymetrix miRNA 4.0 Array microarray results were analysed using BRB-ArrayTool, TAC 4.0 and MeV programs and candidate miRNAs were selected. As a result of the analyses, miR-145-5p was more expressed in patients with severe siblings and Class IV mutation patients with severe siblings than mild ones. After the pathway analysis of the target genes of miR-145-5p, a common ErbB signalling pathway was obtained in miRWalk and miRNET programs. The status of candidate genes included in the outputs of our preliminary study as miRNA targets was also investigated. The IL-17 signalling pathway which was compatible with CF pathology and had the highest p value was defined for miR-145-5p. In addition, miR-92a-3p expression was increased in patients compared to control individuals. As a result of the pathway analysis of the target genes of miR-92a-3p, the endocytosis pathway containing the most target genes was obtained in miRWalk and miRNET programs. This study will facilitate the clinical course of CF patients and the early detection of other diseases accompanying CF, identify a prognostic miRNA signature, and illuminate new pathways associated with the pathogenesis of the disease.

Keywords: Cystic fibrosis, CFTR, bioinformatics, miRNA, genotype-phenotype association

This thesis, was supported by Hacettepe University Scientific Research Projects Coordination Unit (Project No: TYL-2019-17977).

İÇİNDEKİLER

ONAY SAYFASI	iii
YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI	iv
ETİK BEYAN	v
TEŞEKKÜR	vi
ÖZET	vii
ABSTRACT	viii
İÇİNDEKİLER	ix
SİMGELER VE KISALTMALAR	iii
ŞEKİLLER	xv
TABLolar	xvi
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Kistik Fibrozis Patofizyolojisi	4
2.2. CFTR Geni ve Proteini	6
2.3. CFTR geninde tanımlanan mutasyonlar	8
2.4. miRNA Biyogenezi	11
2.5. Kistik Fibrozis Hastalığında miRNA araştırmaları	13
2.6. miRNA araştırmalarında kullanılan biyoinformatik araçlar	15
2.6.1. BRB-ArrayTools Programı	16
2.6.2. Transcriptome Analysis Console (TAC) Programı	17
2.6.3 Multiple Experiment Viewer (MeV) Programı	18
2.6.4 miRNA Hedef genlerinin belirlenmesi	19
2.6.5 miRNA Hedef genlerinin yollar ile ilişkilendirilmesi	21

3. BİREYLER VE YÖNTEMLER	23
3.1. Bireyler	23
3.2. Çalışmalarda Kullanılan Veri, Kimyasal Malzeme, Solüsyon ve Cihazlar	26
3.2.1. Ham Veri Analizi	26
3.2.2. cDNA Sentezi	26
3.2.3. Kantitatif Gerçek-Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (qRT-PCR)	26
3.3. Yöntemler	27
3.3.1. Ham Veri Analizi	27
3.3.2. cDNA Sentezi	28
3.3.3. Kantitatif Gerçek-Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu	29
3.3.4. Verilerin Değerlendirilmesi ve İstatistiksel Analiz	30
4. BULGULAR	31
4.1. Ağır ve Hafif Seyirli Hastalar Arasında İfade Farklılığı Gösteren Aday miRNA'lar	31
4.1.1. Sınıf II Grubunda Yer Alan Ağır ve Hafif Seyirli Hastalarda İfade Farklılığı Gösteren Aday miRNA'lar	31
4.1.2. Sınıf III Grubunda Yer Alan Ağır ve Hafif Seyirli Hastalarda İfade Farklılığı Gösteren Aday miRNA'lar	31
4.1.3. Sınıf IV Grubunda Yer Alan Ağır ve Hafif Seyirli Hastalarda İfade Farklılığı Gösteren Aday miRNA'lar	32
4.2. Hasta ve Kontrol Bireyler arasında İfade Farklılığı Gösteren Aday miRNA'lar	32
4.3. miRNA hedef genlerinin belirlenmesi ve yolak analizi	35
4.3.1. Ağır ve hafif seyirli hastalar arasında ifade farklılığı saptanan miR-145-5p'nin hedef genlerinin belirlenmesi ve yolak analizi	35
4.3.2. Hasta ve kontrol bireyleri arasında ifade farklılığı saptanan miR-92a-3p'nin hedef genlerinin belirlenmesi ve yolak analizi	36

4.4. KF PCR Array sonuçlarında yer alan genler ile miRNA hedef genlerinin karşılaştırılması	39
4.5. Aday miRNA'ların qRT-PCR ile validasyonu	42
5. TARTIŞMA	44
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	51
6.1. Sonuçlar	51
6.2. Öneriler	52
7. KAYNAKALAR	53
8. EKLER	
EK-1: Tez çalışması ile ilgili Etik Kurul İzni.	
EK-2: miR-145-5p'nin hedef genlerinin ve hedef genlere ait yolakların miRWalk ve miRNET ile analiz sonuçları.	
EK-3: miR-92a-3p'nin hedef genlerinin ve hedef genlere ait yolakların miRWalk ve miRNET ile analiz sonuçları.	
EK-4. Tez Orijinallik Ekran Görüntüsü	
EK-5. Dijital Makbuz	
9. ÖZGEÇMİŞ	66

SİMGELER VE KISALTMALAR

3'UTR	<i>3' untranslated region</i> 3' ucu kodlanmayan bölge
5'UTR	<i>5' untranslated region</i> 5' ucu kodlanmayan bölge
ABCC7	<i>ABC transporter C family member 7</i> ABC taşıyıcı protein C ailesi üyesi 7
AGE	<i>Advanced Glycation End Products,,</i> Yüksek İleri Glikasyon Son Ürünleri
ACTB	<i>Beta actin,</i> Beta aktin
ATP	Adenozin Trifosfat
cAMP	Siklik Adenozin Monofosfat
CBAVD	<i>Congenital Bilateral Absence of the Vas Deferens</i> Konjenital Bilateral Vas Deferens Eksikliği
cDNA	<i>complementary DNA</i> komplemeter DNA
CFTR	<i>Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator</i> Kistik Fibroz Transmembran iletkenlik Düzenleyici
CFLD	<i>Cystic Fibrosis Liver Disease</i> Kistik Fibrozis İlişkili Karaciğer Hastalığı
CFRD	<i>Cystic Fibrosis Related Diabetes</i> Kistik Fibrozis İlişkili Diyabet
CCL2	<i>Chemokine (C-X-C motif) Ligand 1</i> Kemokin ligand 1
dk	dakika
DNA	Deoksiribo Nükleit Asit
EDN1	<i>Endothelin 1</i> Endotelin 1

E.R.	Endoplazmik Retikulum
HSC70	<i>Heat shock cognate 71 kDa protein</i> Isı şoku 71 kDa proteini
HSP40	<i>Heat shock 40kDa protein 1A</i> Isı şoku 40 kDa proteini 1A
HSP70	<i>Heat shock 70kDa protein 1A</i> Isı şoku 70 kDa proteini 1A
IL8	<i>Interleukin-8</i> İnterlökin-8
IL-17	<i>Interleukin-17</i> İnterlökin-17
ITGB8	<i>Integrin Subunit Beta 8</i> İntegrin Altbirim Beta 8
MAP2K4	<i>Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase 4</i> Mitojen ile Aktive Olan Protein Kinaz Kinaz 4
MEA	<i>Modular Enrichment Analysis</i> Modüler Zenginleştirme Analizi
MeV	<i>Multiple Experiment Viewer</i> Çoklu Deney Görüntüleyici
miRNA	MikroRNA
MSD1	<i>Membrane-spanning domain 1</i> Hücre zarında yer alan domain 1
MSD2	<i>Membrane-spanning domain 2</i> Hücre zarında yer alan domain 2
MYC	<i>MYC Proto-Oncogene</i> MYC Proto-Onkogen
NBD1	<i>Nucleotide Binding Domain 1</i> Nükleotide Bağlanma Domaini 1
NBD2	<i>Nucleotide Binding Domain 2</i> Nükleotide Bağlanma Domaini 2

NFKB	<i>Nuclear Factor kappa B</i> Nükleer Faktör Kapa B
NOD	<i>Nucleotide-binding and oligomerization domain</i> Nükleotid bağlama ve oligomerizasyon domaini
NOS3	<i>Nitric Oxide Synthase-3</i> Nitrik Oksit Sentaz-3
NRAS	<i>Neuroblastoma RAS viral oncogene homolog</i> Nöroblastom RAS viral onkogen homoloğu
PKA	Protein Kinaz A
PRKCE	<i>Protein Kinase C Epsilon</i> Protein Kinaz C Epsilon
PZR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PXN	<i>Paxillin</i> Paksillin
R	<i>Regulatory Domain</i> Düzenleyici Bölge
RAGE	<i>Receptor of Advanced Glycation End Products</i> Yüksek İleri Glikasyon Son Ürünleri Reseptörü
RISK	RNA-indüklenmiş susturucu kompleks
RNU6	<i>Small Nucleolar RNA, C/D Box 6</i> Küçük Nükleolar RNA, C/D Kutusu 6
SAM	<i>Significance Analysis of Microarrays</i> Mikrodizin Analizi
SMAD3	<i>SMAD Family Member 3</i> SMAD Aile Üyesi 3
SMAD4	<i>SMAD Family Member 4</i> SMAD Aile Üyesi 3
TAC	<i>Transcriptome Analysis Console</i> Transkripsiyon Analiz Konsolu

TGFB1	<i>Transforming Growth Factor Beta 1</i> Dönüştürücü Büyüme Faktörü Beta 1
TGFB2	<i>Transforming Growth Factor Beta Receptor 2</i> Dönüştürücü Büyüme Faktörü Beta Reseptörü 2
TLR	<i>Toll-like receptor</i> Toll-benzeri reseptör
TNF	<i>Tumour necrosis factor</i> Tümör nekrozis faktör
TOM1	<i>Target Of Myb1 Membrane Trafficking Protein</i> Myb1 Hücre Zarı Trafiği Proteininin Hedefi
UPP	<i>Ubikuitin-Proteazom Pathway</i> Ubikütün- Proteozom Yolağı
WebGelstalt	<i>WEB-based Gene SeT AnaLysis Toolkit</i>

ŞEKİLLER

Şekil		Sayfa
2.1.	CFTR proteininin üç boyutlu yapısı ve domainleri	6
2.2.	CFTR biyogenezi	8
2.3.	CFTR mutasyonlarının sınıflandırılması	11
2.4.	Kistik fibrozis patogenezinde rol oynayan miRNA'lar	13
2.5.	BRB-ArrayTools programı	16
2.6.	TAC 4.0 programı	17
2.7.	MeV programı	18
2.8.	miRWalk veri tabanındaki aday genler listesi	19
4.1	mir-92a-3p ve miR-145-5p'nin ortak hedefleri olan 40 genin miRNET programı gösterimi	37
4.2	miR-145-5p'nin qRT-PCR sonuçları	41
4.3	miR-92a-3p'nin qRT-PCR sonuçları	42

TABLOLAR

Tablo		Sayfa
3.1.	Çalışmaya katılan KF hastalarının klinik bilgileri	24
4.1.	TAC 4.0 analiz programına göre hasta ve kontrol bireyler arasında ifade farklılığı saptanan miRNA'lar	32
4.2.	Üç farklı biyoinformatik programı aracılığıyla tez kapsamında yer alan bireylerin 5 grupta analiz edilmesi sonucu oluşan ve ifade artışı ve azalışı görülen aday miRNA'ların listesi	33
4.3.	Kistik fibrozis patolojisi ile uyumlu yollar	36
4.4.	miR-145-5p hedef genleri arasından KF PCR Array'de tanımlı ve ifade değişikliği gösteren genlerin listesi	39
4.5.	miR-145-5p'nin ifadesi azalan hedef genlerinin WebGestalt programında ilk 10 yola analiz sonucu	39
4.6.	miR-92a-3p hedef genleri arasından KF PCR Array'de tanımlı ve ifade değişikliği gösteren genlerin listesi	40
4.7.	miR-92a-3p'nin ifadesi azalan hedef genlerinin WebGestalt programında ilk 10 yola analiz sonucu	41

1. GİRİŞ

Kistik Fibrozis, *Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator* (CFTR) genindeki mutasyonlar sonucu otozomal resesif olarak kalıtılan genetik bir hastalıktır. Kromozomun 7q31.2 bölgesinde yer alan CFTR geninden sentezlenen CFTR proteini CFTR proteini cAMP ve protein kinaz A bağımlı çalışan bir klor kanalıdır. Epitel yüzeyindeki sıvı homeostazisi ile birlikte diğer klor kanallarının, epitel sodyum kanallarının düzenlenmesini sağlamakta ve glutatyon gibi küçük moleküllerin taşınmasında da rol oynamaktadır. Bu gende meydana gelen yaklaşık 2100 mutasyon <https://www.CFTR2.org> ve <http://genet.sickkids.on.ca/app> sitelerinde tanımlanmış olup; CFTR proteinin fonksiyonuna bağlı olarak 7 grupta sınıflandırılmıştır. Mutasyonlar sebebiyle CFTR proteinin sentezi, katlanması, taşınması, hücre yüzeyine yerleşmesi, iyon geçirgenliği ve hücre zarındaki proteinin stabilitesi bozulmaktadır.

Kistik fibrozis başta akciğerler olmak üzere, üst solunum yolları, pankreas, ter bezleri, erkek üreme sistemi, bağırsaklar ve karaciğerin de etkilendiği multisistemik bir hastalıktır. CFTR genindeki mutasyonlar sonucu, epitel yüzeylerdeki iyon dengesi bozulmaktadır. Akciğer epitel yüzeyindeki iyon dengesinin bozulması, su emilimini artırırken, solunum yolundaki sıvının azalmasıyla mukusun daha katı bir hal almasına neden olmaktadır. Katı mukus tabakası mukosiliyer klirens olarak tanımlanan mukusun havayolundaki yabancı mikroorganizmalardan ve bakterilerden temizleme sistemini de bozmaktadır. Sonuç olarak hastalarda patojen yerleşimi görülmekte ve enfeksiyon oluşturmaktadır. Hastaların çoğu tekrarlayan akciğer enfeksiyonu yüzünden hayatlarını kaybetmektedir.

Kistik fibrozis hastalığının görülme sıklığı ülkemizde 1/3000, Kuzey Amerika ve Avrupa'da 1/2500 olarak bulunmuştur. Araştırmalara göre, en sık görülen CFTR mutasyonunun F508del'dir. Avrupa ve Kuzey Amerika'da bu mutasyonun görülme sıklığı %70-80 iken genetik heterojenitenin görüldüğü ülkemizde bu mutasyonun allel frekansı %28,06 olarak saptanmıştır. CFTR proteininde gerçekleşen mutasyonlar sonucunda kistik fibrozis hastalığının klinik ciddiyeti farklılık göstermektedir.

Tanımlanan mutasyonlar hastalığın teşhis edilmesini sağlamakta fakat hastalık ciddiyeti, fenotipi ve ilerleyişi hakkında yeterli bilgi vermemektedir. Bu durum hastalık ciddiyetinin belirlenmesinde, klinik ciddiyeti etkileyebilecek epigenetik mekanizmaların önemli rol oynayabileceğini düşündürmektedir. Epigenetik mekanizmalar içerisinde histon modifikasyonları, DNA metilasyonu ve kodlanmayan RNA'lar yer almaktadır. Kodlanmayan RNA'lardan biri olan mikroRNA'lar ise son yıllarda birçok hastalığın patogeneziyle ilişkili olarak karşımıza çıkmaktadır. miRNA'lar yaklaşık 20-25 nükleotid uzunluğundadır. Günümüze kadar yapılan çalışmalarla 2500'den fazla miRNA molekülü tanımlanmış olup; protein kodlayan genlerin düzenlenmesinde rol oynadıkları bildirilmiştir. miRNA'lar hedeflediği genin 3' ucundaki proteine çevrilmeyen (3'UTR) bölgeye bağlanarak mRNA yıkımını ya da protein sentezinin engellenmesini gerçekleştirmektedir. Yapılan çalışmalarda, hastalık patogenezi etkileyen modifiye edici genlerin ve miRNA ifadelerinde gözlenen farklılıkların immün yanıt oluşumunu, epitel hücre farklılaşmasını, CFTR proteininin hücre içi trafiğini ve kanal aktivitesini düzenlediğine dair bulgular artmıştır.

Gerçekleştirilen tez çalışmasının amacı; genotip fenotip korelasyonu kurulamayan, mutasyonu aynı olan ancak farklı kistik fibrozis klinik bulguları ile seyreden (karaciğer tutulumu, tekrarlayan akciğer enfeksiyonu geçirme durumu ve solunum bulguları) ağır ve hafif seyirli kardeşler arasında ifade farklılığı gösteren ortak miRNA'ların tanımlanması, hedef genlerinin belirlenmesi, ilişkili yolların saptanması, hastalarda aday miRNA'ların gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu ile valide edilmesidir.

Bu amaç doğrultusunda Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı ve Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı Göğüs Hastalıkları Ünitesi iş birliği ile gerçekleştirilen ön çalışmalar sonucunda aynı mutasyonu taşımasına rağmen hastalık ciddiyeti farklı seyreden kardeşler saptanmıştır. Gerçekleştirilen ön çalışmalar sonucunda hasta kardeşlerden elde edilen nazal sürüntüler kullanılarak; hedeflenmiş transkriptomik Kistik Fibrozis PCR Array yöntemi ile ifade farklılığı gösteren genler ve yollar saptanmıştır. Aynı zamanda, kardeşlerin nazal epitel hücrelerinden RNA izolasyonu gerçekleştirilmiş ve mikrodizin (Affymetrix miRNA 4.0 Array) yöntemi ile ham veri elde edilmiştir.

Tez kapsamında Hacettepe Üniversitesi Kapsamlı Araştırma Projesinde (TSA 201816629) gerçekleştirilmiş olan miRNA array ham verisi farklı biyoinformatik araçlarla tanımlanacak, kardeşler arasında klinik heterojeniteye sebep olabilecek aday miRNA'lar ve hedefleriyle ilişkili yollar saptanacaktır. Ayrıca ön çalışmamızın çıktılarında yer alan aday genlerin miRNA hedefleri olma durumu da araştırılacaktır.



2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kistik Fibrozis Patofizyolojisi

Mukovisidoz olarak da bilinen kistik fibrozis (OMIM 219700), çoğunlukla beyaz ırkta görülen ve *cystic fibrosis transmembrane regulator* (CFTR) genindeki mutasyonlar sonucu otozomal resesif olarak kalıtılan genetik bir hastalıktır [1]. 1938 yılında çocukların pankreaslarındaki kist ve fibrozis bulguları sebebiyle hastalığa kistik fibrozis adı verilmiş, 1989 yılında CFTR geni tanımlanmıştır. Kistik fibrozis (KF) hastalığına neden olan mutasyonlar fizyolojik salgı süreçlerinde temel rol oynayan akciğer, tükürük bezleri, yemek borusu, mide, safra yolları, ter kanalı, bağırsak, böbrek, kalp, vas deferens, pankreas dahil olmak üzere farklı organ ve dokuları etkileyen multisistemik bir patofizyolojiye neden olmaktadır [2]. Özellikle akciğerlerdeki fonksiyon bozukluğu ile karakterize olup hastalık ilerledikçe kronik akciğer enfeksiyonlarına veya pnömoniye yol açmaktadır [3].

Hastalığın çoğunlukla Kuzey Amerika (1/3500), Avrupa'da (1/2000-4500) gözlemlenmiş olduğu belirtilse de Türkiye'de yapılan çalışmalar sonucunda hastalığın görülme sıklığının her 3000 doğumda 1 olduğu saptanmıştır. Genetik olarak heterojen olan Türk toplumunda hastalığın görülme sıklığı ile birlikte saptanan mutasyonlar da değişmektedir [4].

Epitel hücrelerde hücre içi ve dışı iyon dengesinin korunmasına yardımcı olan CFTR proteini, klor ve bikarbonat iyonlarının salgılanmasından sorumludur. CFTR proteininin yapısında ya da fonksiyonunda bozukluk meydana geldiğinde, klorür iyonlarının hücre içinde kalması, suyun hücre dışına çıkmasını engellemektedir [5]. Hücre dışında daha az su olması durumunda, hava yollarındaki mukus dehidrate olmakta ve kalınlaşmaktadır. Mukusun kalınlaşması silyaların süpürme işlemini düzgün gerçekleştirememesine neden olmaktadır [6]. Silyalar düzgün hareket edemediğinden, mukus solunum yollarında tıkanıp birikerek nefes almayı zorlaştırmaktadır. Ek olarak, mukusun taşınması yoluyla havayolunun yabancı mikroorganizmalardan ve bakterilerden temizlenme mekanizması olarak adlandırılan mukosiliyer klirens bozulmakta ve bu solunum yollarının enfeksiyonuna neden olmaktadır [7].

Gastrointestinal sistem de KF'den dolayı vücudun en erken etkilenen bölümleri arasındadır ve çoğunlukla yenidoğan bireylerde gözlemlenmektedir. CFTR pankreas duktal hücrelerinde yüksek oranda eksprese edilmekte ve ekzokrin hücre sekresyonunda önemli bir rol oynamaktadır. Hastalarda bikarbonattan zengin pankreas sıvılarının kaybı intestinal ortamı değiştirmekte ve sindirim için gerekli enzimatik ortam sağlanamamaktadır. Ciddi CFTR mutasyonları olan hastaların yaklaşık %60'ında ekzokrin pankreas yetmezliği saptanmakta ve ilerleyen yaşlarda bu oran %85-90 olarak artmaktadır [8]. Pankreas hasarı şiddetli inflamasyona, viskoz salgıya, kanalların tıkanmasına, kalsifikasyona ve pankreas kisti oluşumuna neden olmaktadır [9].

KF ile ilişkili karaciğer hastalığı ise KF'li hastaların %5-15'inde görülmektedir [10, 11]. KF ile ilişkili diyabet (CFRD), temel olarak yetersiz insülin sekresyonu ve β -hücre disfonksiyonundan kaynaklanmaktadır [12]. Klinik karaciğer hastalığı olmayan KF hastalarında safra asitlerinin kaybı sebebiyle [13], zayıf misel oluşumu görülmekte, bu da yağ ve vitamin malabsorpsiyonuna neden olmaktadır [14]. Ayrıca safranin işlevini yerine getirememesi sonucunda hastaların yaklaşık %5-10'nunda, siroz görülmektedir [15]. Siroz, akciğer hastalığı ve transplantasyon komplikasyonlarından sonra üçüncü ölüm nedeni olarak kabul edilen Kistik fibrozis ile ilişkili karaciğer hastalığı (CFLD) sonucunu geliştirmektedir [16].

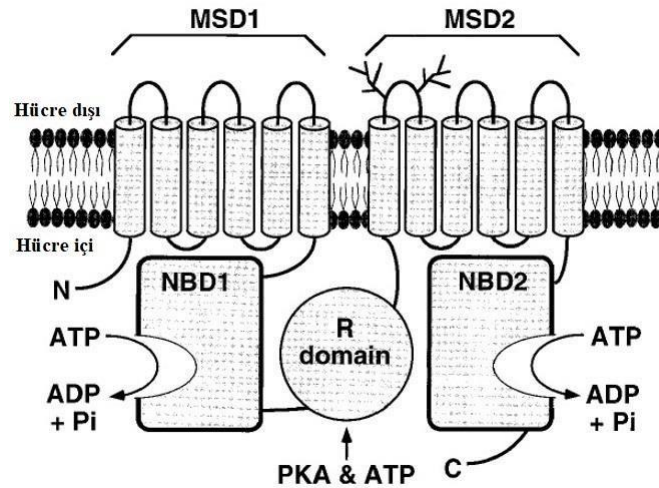
KF'nin muhtemelen en sık görülen kistik fibrozis ilişkili hastalık (CFTR-related disorder, CFTR-RD) formu, erkek kısırlığı olan vakaların %1-2'sinden sorumlu olan *congenital bilateral absence of the vas deferens* (CBAVD)' dir. Sebep olarak ise dar vas deferens veya wolffian kanallarında değişen CFTR fonksiyonunun obstrüktif azospermi ile sonuçlandığı düşünülmektedir [17].

Hastanın yaşına, tutulan sistemlere ve CFTR mutasyon ciddiyetine göre klinik bulgular değişmektedir. Hastalığın tanımlanmasında akciğer fenotip özellikleri, solunum fonksiyon testi (FEV1/FEVC), ter ile atılan klorürün ölçümü, bakteriyolojik belirteçler, akciğerde yapısal değişikliklerin saptanması gibi ölçütler kullanılmaktadır. Ayrıca başta CFTR genindeki mutasyonlar olmak üzere, çevresel faktörler ve fenotipi modifiye edici genler hastalığın belirtilerini ve ilerlemesini etkilemektedir.

2.2. CFTR Geni ve Proteini

Kistik fibrozis hastalığından sorumlu CFTR geni, kromozomun 7q31.2 bölgesinde haritalanmıştır. CFTR geni 27 ekzondan oluşmaktadır ve 250 kilobaz uzunluğa sahiptir. CFTR geninden 168 kDa'luk ve 1480 aminoasitlik CFTR proteinini sentezlemektedir. *ABC transporter C family member 7* (ABCC7) olarak da bilinen CFTR proteini bir iyon kanalı olması nedeniyle ATP bağlayıcı kaset ailesinin farklı bir üyesidir. Kanal kapanması ile ilişkili olan nükleotidin hidrolizinin ve kanal açılmasının ATP bağlanması ile başlatıldığı düşünülmektedir [18].

İki homolog motifin bir araya gelmesiyle oluşan CFTR proteini 5 domaine sahiptir. Alfa helix yapıdaki 6 transmembran segmentinin bir araya gelmesiyle *Membrane-spanning domain 1* (MSD1) ve *Membrane-spanning domain 2* (MSD2) olarak adlandırılan yapılar hücre zarında yer almaktadır. Sitoplazmik kısımda ise ATP ile etkileşen *Nucleotide Binding Domain 1* (NBD1) ve *Nucleotide Binding Domain 2* (NBD2) yine sitoplazmik tarafta yer alan ve çok fazla fosforilasyon bölgesi içeren *Regulatory Domain* (R) ile bir araya gelmektedir. Protein kinase A (PKA) tarafından fosforlanan R domain NBD1/NBD2 ile etkileşime girmekte ardından kanal açılması ve iyon geçişi sağlanmaktadır (Şekil 2.1) [19].

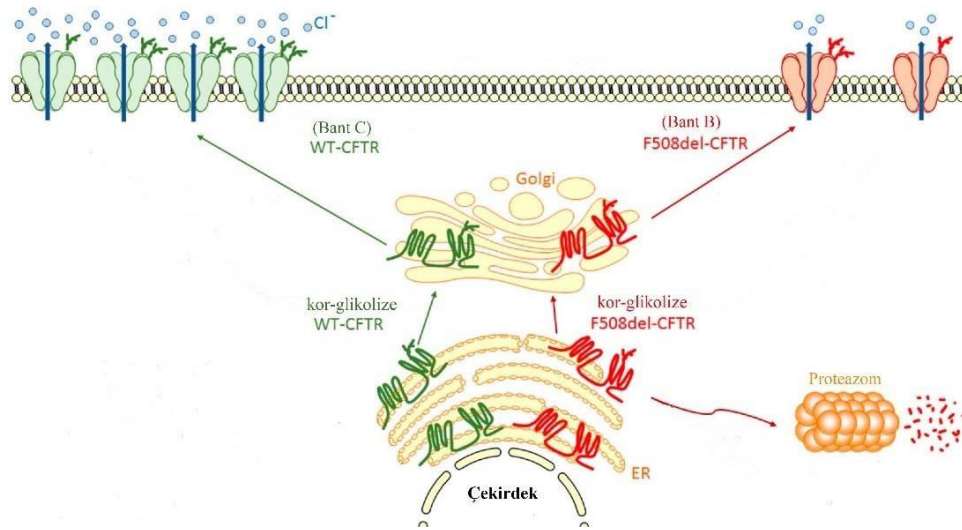


Şekil 2.1. CFTR proteininin üç boyutlu yapısı ve domainleri [19].

Hücre dışı sinyaller, CFTR gen ifadesini uyarmaktadır. Ribozomdan çıkan CFTR polipeptit zinciri, ER membranında Sec61 kompleksini tanıırken aynı zamanda kotranslasyona uğramaktadır. ER lümenine yerleşen CFTR proteini, Asn894 ve Asn900 aminoasitlerinin (MSD2’de yer alan) N-glikozillenmesi ile katlanmaktadır. N-glikozilasyona ek olarak Hsc70/Hsp70 ve Hsp90 içeren şaperon kompleksleri de CFTR katlanmasında rol almaktadır. CFTR şaperon komplekslerine bağlanıp kopmadığı takdirde, ubiquitin-proteazom yolu (UPP) yoluyla parçalanmaktadır. Bu mekanizma ER kalite kontrol (ERQC) olarak adlandırılmaktadır. Bu aşamada F508del mutasyonuna sahip CFTR proteini, şaperonlardan açığa çıkan hidrofobik kalıntıları tanımakta ve şaperonlara güçlü bir şekilde bağlanmaktadır. Katlanması başarılı olmayan bu CFTR proteinin kor-glikozillenmiş formu CFTR’nin B bandı (olgunlaşmamış) olarak adlandırılmaktadır [20, 21].

İkinci ER kalite kontrol noktası CFTR’nin glikozilasyonu ve kalneksin döngüsüdür. F508del-CFTR’nin aksine yabancıl tip CFTR, kalneksin döngüsü boyunca katlanma için ilerlemekte, burada art arda deglikozilasyona uğramaktadır. CFTR ER çıkış bölgelerinde COPII kaplı veziküller yoluyla Golgi’ye taşınırken üçüncü bir ERQC kontrol noktası oluşmaktadır. CFTR proteininin Sec24 aracılı COPII paketleme işlemi için ER tutma motifleri ve NBD1’de bulunan Aspartat-Alanin-Aspartat (DAD, di-asidik çıkış kodu) motifi kargo sinyali olarak görev almaktadır. CFTR, Golgi glikoziltransferazları tarafından işlenerek Golgi kompleksi boyunca taşınmakta ve tamamen olgun formu olan CFTR’ın C bandı oluşturulmaktadır [20, 21]

Olgunlaşmış CFTR, cis-Golgi’ye ulaşmakta ve COPI (kat protein I) veziküllerinde ER’ye geri dönüştürülmektedir. Geri dönüştürülmüş proteinler, katlanma işlemine yeniden girebilmekte, bir kez daha cis-Golgi’ye gönderilebilmekte, UPP yoluyla yıkılmaktadır [21].



Şekil 2.2: CFTR biyogenezi. CFTR ER'den sentezlendikten sonra, kor-glikozile edilmiş CFTR'nin ana kısmı agresomlar oluşturabilir veya ERQC sistemi tarafından tanınıp parçalanacak proteazoma yönlendirilebilir. ERQC'den kaçan CFTR B bandı, önce Golgi'de farklı glikozilasyon adımlarından geçerse, hücre zarına ulaşır. [21].

2.3. CFTR geninde tanımlanan mutasyonlar

Günümüzde CFTR genine ait 2104 mutasyon <https://www.CFTR2.org>, <http://genet.sickkids.on.ca/app> ve <https://cftr.iurc.montp.inserm.fr/cftr> gibi veritabanlarında tanımlanmaktadır. Mutasyon tipine göre sınıflandırıldığında CFTR geninde en çok yanlış anlamlı mutasyonlar (*missense*) gözlemlenmektedir. Daha sonra çerçeve kayması (*frameshift*), *splicing* hataları ve anlamsız (*nonsense*) mutasyonlar gözlemlenmektedir. CFTR geninin kodlanmayan bölümlerinden olan promotör, 5' translasyona uğramayan bölge (5'UTR) ve 3' translasyona uğramayan bölgelerinde de (3'UTR) mutasyonlar gözlemlenmektedir [22].

Genetik heterojenitenin görüldüğü ülkemizde F508del mutasyonunun allel frekansı %28,06 olarak saptanmıştır. Grubumuz tarafından yapılan bir çalışmanın sonucunda F508del mutasyonundan sonra görülme sıklığı en çok olan mutasyonlar G542X (%7,44), 1677delTA (%6,13), 2183AA-G (%4,87), N1303K (%4,8), G85E (%4,47), 2789+5G-A (%4,22), W1282X (%3,67), R334W (%3,59), CFTRdele2 (%2,07) ve, 3849+10kbC-T (%1,49) olarak tanımlanmıştır [4].

CFTR'nin proteinin sentezi, katlanması, taşınması, yerleşmesi ve doğru fonksiyon göstermesi basamaklarındaki hatalara göre mutasyon tipleri sınıflandırılmaktadır:

- Sınıf IA (Sınıf I) mutasyon grubunda CFTR mRNA'sı sentezlenmemektedir. Bu grup mutasyonları büyük delesyon ya da insersiyonları içermektedir. Mutasyon örnekleri arasında Dele2,3(21 kb) ve 1717-1G→A bulunmaktadır. Sınıf IA mutasyonlar, Sınıf IB mutasyonlar ile aynı sonuca sahip olsalar da düzeltici tedaviler (*corrective therapy*) ile de kurtarılamamaktadırlar. Düzeltici tedavilerin yerine CFTR proteinine ihtiyaç duymadan iyon seviyelerini dengelemek için hücre yüzeyindeki sodyum kanallarını inhibe etmek veya diğer klorür protein kanallarını uyarmak için tedaviler hakkında bazı araştırmalar bulunmaktadır [23].

- Sınıf IB (Sınıf VII) grubunda ise hatalı uzunlukta ya da fonksiyonel olmayan protein sentezlenmektedir, çünkü erken dur kodonu sebebiyle anlamsız mutasyonlar görülmektedir. G542X ve Y1282X mutasyonları bu grup mutasyonlara örnek gösterilmektedir. Tedavisi için *read-through compounds* adı verilen ve ribozomun erken durdurma dizisini atlamasına, mRNA üzerindeki bilgilerin geri kalanını okumasına ve CFTR proteinleri üretmesine yardımcı olabilen bileşikler kullanılmaktadır [23].

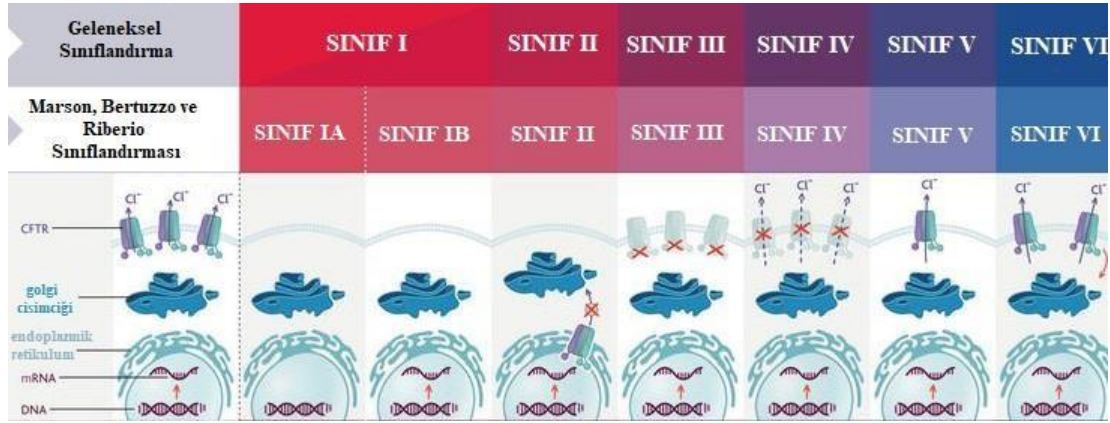
- Sınıf II mutasyonu yanlış protein katlanması nedeniyle ER-aracılı degradasyon, hücre içi iyon trafiğinin bozulması ve CFTR proteininin apikal membrandaki stabilitesinin azalması gibi hatalar görülmektedir. Bu mutasyon grubunda en sık görülen F508del mutasyonu ve ek olarak N1303K, 1677delTA örnekleri verilmektedir. Yanlış katlanmış proteinleri düzeltmek ve hücre zarına ulaşmalarına yardımcı olmak için CFTR düzelticileri (*CFTR correctors; lumacaftor/tezacaftor*) adı verilen tedaviler kullanılmaktadır [23].

- Sınıf III grubunda CFTR protein sentezlenmekte, hücre yüzeyine yerleşmekte fakat protein kanal fonksiyonu gösterememektedir (geçit hatası). Bu mutasyon grubuna örnek olarak G551D, S549R ve G1349D mutasyonları verilmektedir. CFTR güçlendirici (*CFTR potentiators; ivacaftor*) adı verilen tedaviler, kanalları açmak ve/veya daha uzun süre açık tutmak için kullanılmaktadır [23].

- Sınıf IV mutasyon grubunda, CFTR proteini sentezi etkilenmemekte ancak proteinin doğru katlanamamaktadır. Sentezlenen protein membrana yerleştikten sonra az miktarda klorür iyonunun geçişine izin vermekte ve klorür iyonu hareketindeki bu azalma, azaltılmış iletkenlik olarak adlandırılmaktadır. R347P, R334W ve D110H mutasyonları bu sınıfta yer almaktadır. Tedavi için ise CFTR güçlendiriciler kullanılarak daha fazla klorür iyonunun geçişine izin verilmektedir ve kanalların daha uzun süre açık tutulması sağlanmaktadır [23]

- Sınıf V grubunda ise doğru uzunlukta CFTR proteini sentezi gerçekleşmekte fakat az sayıda protein apikal membrana yerleşmektedir. Bu durum genellikle, yanlış uzunlukta ve yapıda sentezlenen protein miktarının, doğru uzunlukta ve yapıda sentezlenen proteinden fazla olmasından kaynaklanmaktadır. Klor geçişi için yeterli CFTR proteini sağlanamadığından, gerekenden daha az sayıda klor sitoplazmaya taşınmaktadır. 2789+5G-A, 3849 + 10kbC>T ve 5T bu grupta yer alan mutasyonlardandır. Bu tip mutasyonlar için olası tedaviler arasında, katlanması düzgün gerçekleşmemiş CFTR proteinlerini düzeltmek için CFTR düzelticileri (*CFTR correctors*), çalışan CFTR proteinlerini daha uzun süre açık tutmaya çalışmak için CFTR güçlendiricileri (*CFTR potentiators*), mRNA miktarını ve dolayısıyla daha fazla CFTR proteini üretilmesini artırmak için CFTR yükselticileri (*CFTR amplifiers*) veya antisens oligonükleotitleri bulunmaktadır [23]

- Sınıf VI son tip mutasyon grubu olup doğru çalışan bir CFTR proteini ile sonuçlanmaktadır, ancak protein konfigürasyonu stabil değildir. Bu yüzden hücre yüzeyinde çok hızlı bir şekilde bozulmaktadır. Üretilen proteinler daha az stabil ve yarı ömrü daha kısa olacak şekilde aktivite gösterirler. c.120del23, 4326delTC, 4279insA ve Q1412X mutasyonları bu grupta yer almaktadır. Stabilizatörler, bu tip mutasyon için bir tedavi yöntemidir ve CFTR'yi parçalayan enzimleri inhibe etmek için çalışırlar (Şekil 2.2) [23]



Şekil 2.3. CFTR mutasyonlarının sınıflandırılması. Geleneksel sınıflandırmaya göre 6 tip mutasyona sahip CFTR proteini, Sınıf I mutasyonlarının 2'ye ayrılması sebebiyle günümüzde 7 tip mutasyon sınıfı bulunmaktadır [24].

Mutasyon sınıflarının CFTR proteini üzerindeki etkisi gruplandığında; Sınıf VII, I, II, V ve VI CFTR proteininin sayısındaki yetersizlikten kaynaklı CFTR aktivitesini etkilerken, Sınıf III (kanal açıklığı) ve Sınıf IV (iyon geçirgenliği) mutasyonları CFTR fonksiyonunu etkilemekte, sonuç olarak total CFTR aktivitesi etkilenmektedir. CFTR mutasyonları hastalığın teşhis edilmesini sağlamakta ama hastalık ciddiyeti, fenotipi ve ilerleyişi hakkında yeterli bilgi vermemektedir. Bunun yanı sıra hastalık ciddiyetinin belirlenmesinde çevresel etkenler ve fenotipi etkileyen modifiye edici genler de rol oynamaktadır. Son yıllarda özellikle solunum yolu hastalıklarında modifiye edici genlerin yanı sıra miRNA ifadelerinde gözlenen farklılıkların da hastalık patogenezini düzenlediğine dair bulgular artmıştır.

2.4. miRNA Biyogenezi

MikroRNA'lar (miRNA'lar), mesajcı RNA (mRNA) degradasyonu veya translasyon inhibisyonu ile transkripsiyon sonrası seviyede gen ekspresyonunu düzenleyen kodlanmayan RNA sınıfını temsil etmektedirler. miRNA'nın insan genomunun %1-5'ini oluşturduğu ve protein kodlayan genlerin %30-60'ını düzenlediği tahmin edilmektedir [25]. İlk olarak 1990'ların başında miRNA'ların *Caenorhabditis elegans*'ta gen ifadesinin post-transkripsiyonel düzenleyicisi oldukları tanımlanmıştır. 21-23 nükleotid uzunluğundaki miRNA dizileri, çekirdekte birincil miRNA olarak (pri-miRNAs) RNA Polimeraz II enzimiyle sentezlenmektedir. Daha sonra *Drosha* ve onun kofaktörü olan *DiGeorge* kritik sendrom bölgesi 8

(DGCR8)'den oluşan bir kompleks tarafından kesilip; saç tokası şeklindeki öncül miRNA (pre-miRNA) oluşmaktadır. *Exportin 5* aracılığıyla çekirdekten sitoplazmaya taşınan pre-miRNA, *Dicer* enzimi ile kesildikten sonra RNA-indüklenmiş susturucu kompleks (RISC) ve Argonat proteinleri sayesinde tek zincirli hale getirilir. Tek zincirli bu yapı hedef mRNA molekülünün 3'UTR bölgesine bağlanmaktadır. Böylece mRNA yıkımı veya protein sentezinin baskılanması gerçekleşmektedir. Yapılan araştırmalar sonucunda, miRNA moleküllerinin temel görevinin gen ifade seviyesini değiştirmek ve hücredeki sinyal yollarının homeostazisini sağlamak olduğu gösterilmiştir (8). Ayrıca miRNA'ların sadece 3' UTR'ye değil, 5' UTR, kodlama dizisi ve gen promotörleri dahil olmak üzere diğer bölgelerle etkileşimde olduğu ve belirli koşullar altında gen ekspresyonunu aktive ettiği gösterilmiştir [26].

miRNA'ların pri-, pre- ve olgun formu olduğu için, birbirlerinden ayrılması ve doğru anlaşılması için isimlendirmesinde bazı kurallar mevcuttur. Veritabanlarındaki isimlendirmeler hsa-mir-121 biçimindedir. İlk üç harf organizmayı, *mir-121*, miRNA genini ve pre- formunu, *miR-121* ise olgun miRNA'yı ifade etmektedir. Özdeş olgun dizileri ifade eden farklı öncü diziler ve genomik lokuslar, *hsa-mir-121-1* ve *hsa-mir-121-2* formunda adlandırılmaktadır. Harfli son ekler ise yakından ilişkili olgun dizileri belirtir, örneğin *hsa-miR-121a* ve *hsa-miR-121b*. Son olarak olgun dizilerde hangi dizinin baskın olduğunu belirlemek için veriler yeterli olmadığında, miR-142-5p (5' uç) ve miR-142-3p (3' uç) olarak tanımlanmaktadır [27].

Bugüne kadar insana ait 2500'den fazla miRNA geni tanımlanmıştır. Bu miRNA'lar protein kodlayan genlerin yaklaşık %60'ını düzenlemektedirler. Proliferasyon, apoptoz, farklılaşma, hücre göçü ve inflamasyon gibi birçok süreçte rol oynamaktadırlar. miRNA düzeyindeki bu değişiklikler kanser, otoimmün hastalıklar, kardiyovasküler hastalıklar, nörodegeneratif hastalıklar ve solunum sistemi hastalıkları ile ilişkilendirilmektedir [28]. Kistik fibrozis hastalığında hasta ve kontrol bireyleri arasında fenotipi modifiye edebileceği düşünülen miRNA çalışmaları yapılmış olup genotipleri aynı olmasına rağmen farklı klinik bulgulara sahip hasta kardeşler ile ilgili bir çalışma bulunmamaktadır.

1827) CFTR mRNA ve/veya CFTR protein ekspresyonunu etkileyip etkilemediğini araştırmıştır. Caco-2, 16HBE14o- ve PANC-1 hücre hatlarına anti- ve pre- miR'ler uygulanarak farklı dokulardaki ifade değişimleri gösterdiği saptanmıştır [30]. Megiorni ve ark.'ların yaptığı bir diğer çalışmada ise insan embriyonik böbrek hücre hattında miR-101 ve miR-494 ile CFTR ifadesinin doğrudan baskılandığı gösterilmiştir [32]. Ayrıca, KF bronşlardan alınan sürüntü örneklerinde sağlıklı kontrollere kıyasla yapılan miRNA ekspresyon profili analizi çalışmalarında özellikle miR101 ifadesinin arttığı gösterilmiştir. İlginç bir şekilde, miR101/miR494 ve miR-509-3p/miR-494 çiftlerinin farklı genleri hedeflemelerine rağmen primer bronşiyel hücre kültüründe CFTR ifadesini düzenlemek için birlikte fonksiyon gösterdikleri tespit edilmiştir [33].

miRNA'ların doğuştan gelen ve uyarlanabilir bağışıklık tepkilerinin önemli düzenleyicileri oldukları bilinmekte olup; ifadesindeki artış/azalışlar çok sayıda inflamatuvar hastalıkla ilişkilendirilmiştir [34]. KF hastalığında ise CFTR mutasyonları ile proinflamatuvar yanıtların altında yatan mekanizmalar arasındaki bağlantı tam olarak anlaşılmamıştır. Hipoksi, pH, iyon konsantrasyonu ve ozmolaritedeki değişiklikler gibi uyarılar birçok miRNA ifadesini etkilemekte ve IL-8'deki ifade artışıyla birlikte proinflamatuvar yollarda düzensizliklere neden olmaktadır [35, 36]. Oglesby ve ark.'nın hasta bronşiyel sürüntü örneklerini kullanarak gerçekleştirdikleri çalışmada, miR-126'nın azaldığını ve NF- κ B sinyal yolunun negatif bir düzenleyicisi olan TOM1'in ifadesinin arttığı bulunmuştur. Bu gözlemler miR-126'nın tek başına TOM1 yolağında bir rol oynamadığını ve başka faktörlerin de dahil olabileceğini göstermektedir [37]. Rao ve ark. tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada ise, *Pseudomonas aeruginosa* ile enfekte KF hastalarının balgamından alınan örneklerde TLR ailesinin bir reseptörüne bağlanan miR-146 ifadesinde artış saptanmıştır [38]. Aynı zamanda IL-8 ile ilişkili bir diğer miRNA olan miR-155'in akciğer epitel hücrelerinde ve KF'li hastaların nötrofillerinde yüksek seviyede ifade olduğu gösterilmiştir [38]. Bu gözlemler miR-155'in IL-8 ifadesini düzenlediğini ve NF- κ B yolağında rol oynadığını göstermektedir [39, 40]. KF'li hastaların akciğerlerindeki bağışıklık tepkisinin bir diğer önemli sonucu, bronşektaziye yol açan proteaz-antiproteaz dengesinin düzensizliğidir [41]. Özellikle KF'li hastalarda akciğer iltihabı sırasında kitlesel olarak toplanan nötrofiller tarafından salgılanan elastazlar ve epitel

hücreleri tarafından salgılanan diğer proteazlar hava yolu fonksiyonunu etkilemektedir. Bu proteaz ailelerinden biri olan katepsinler (CTS'ler) 15 farklı izoforma sahip olup; KF'li hastaların akciğerlerinde katepsin B ve S'nin ifadesinde artış gözlenmiştir [42]. Weldon ve ark., KF'li insan embryonik böbrek hücre hattında miR-31'in bir transkripsiyon faktörü olan interferon düzenleyici faktör 1'i (*IRF1*) baskılamasıyla, CTSS geninin ifadesini düzenlediğini göstermişlerdir [43].

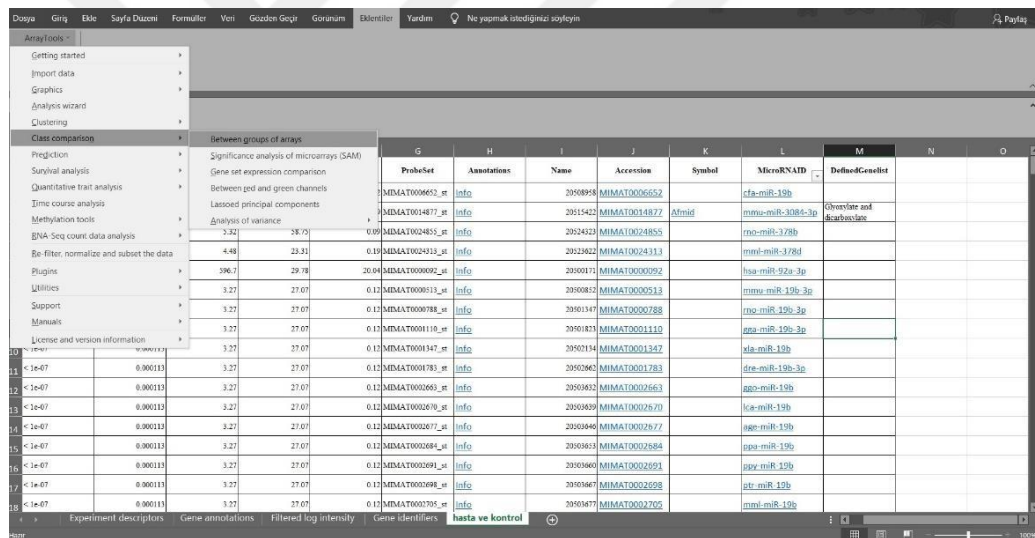
Tüm bu örnekler göz önüne alındığında, miRNA'lar KF hastalık patogenezi ile ilişkilendirilmiş olup; akciğer gelişimini ve inflamasyon sinyal yollarını etkilediklerine dair veriler üretilmiştir. Ancak KF hastalığının ciddiyeti ve hastalık ile ilişkili komplikasyon gelişiminde prognozu açıklamaya yönelik miRNA'ların rolü ile ilişkili çalışma bulunmamaktadır. Ayrıca çalışmalarda kullanılan örnekler genellikle hücre hatları, primer bronşiyel hücre kültürü ve balgam örnekleridir. Tez kapsamında kullanılan nazal sürüntü örnekleri alt solunum yollarındaki hücrelerin içeriği ve transkriptomik profilleri benzer olması sebebiyle seçilmiş olup şu ana kadar nazal miRNA transkriptomik çalışması görülmemiştir.

2.6. miRNA araştırmalarında kullanılan biyoinformatik araçlar

Biyoinformatiğin temel işlevleri, kapsamlı veri madenciliği, işlenmesi ve in-siliko istatistiksel ve matematiksel yöntemlere dayalı sonuçlar sağlamak için ham verilerin analizidir [44]. Biyoinformatik araçlarla miRNA biyobelirteçlerinin in-siliko olarak araştırılması deneysel araştırmalar için bir ön koşuldur [44]. Son yıllarda biyolojik ve biyoinformatik yaklaşımlar bitkilerde, hayvanlarda, tek hücreli ökaryotlarda ve virüslerde binlerce miRNA'nın keşfedilmesini sağlamıştır. Günümüzde miRNA dizileri ve açıklamaları miRBase'de toplanmaktadır. Mevcut miRBase (<http://www.mirbase.org>) sürümü, 2578 olgun miRNA üreten 1872 insan miRNA öncüsü dahil olmak üzere 206 türden (30424 olgun miRNA ürünü) 24521 miRNA lokusu içermektedir [45]

2.6.1. BRB-ArrayTools Programı

BRB-ArrayTools; mikrodizin, gen ekspresyonu, kopya sayısı, metilasyon ve RNA-Seq verilerinin görselleştirilmesi ve istatistiksel analizi için Excel'e entegre bir pakettir (Şekil 2.5). Analitik ve görselleştirme araçları, güçlü R istatistik sisteminde, C ve Fortran programlarında ve Java uygulamalarında geliştirilmiştir. BRB-Arraytools, "lumi" R paketini kullanarak Illumina Metilasyon verilerini içe aktarmaktadır. Metillenmiş problemlerin oranını yansıtan ve 0 ile 1 arasında değişen beta değerleri daha sonra normalleştirilecek ve $\log_2(\text{beta}/(1-\text{beta}))$ değerlerine benzer M değerlerine dönüştürülmektedir. Dönüştürülmüş ve normalleştirilmiş M değerleri kullanılarak sınıf karşılaştırma, tahmin, hiyerarşik kümeleme ve zenginleştirme analizi gibi farklı analizler gerçekleştirilmektedir [46].

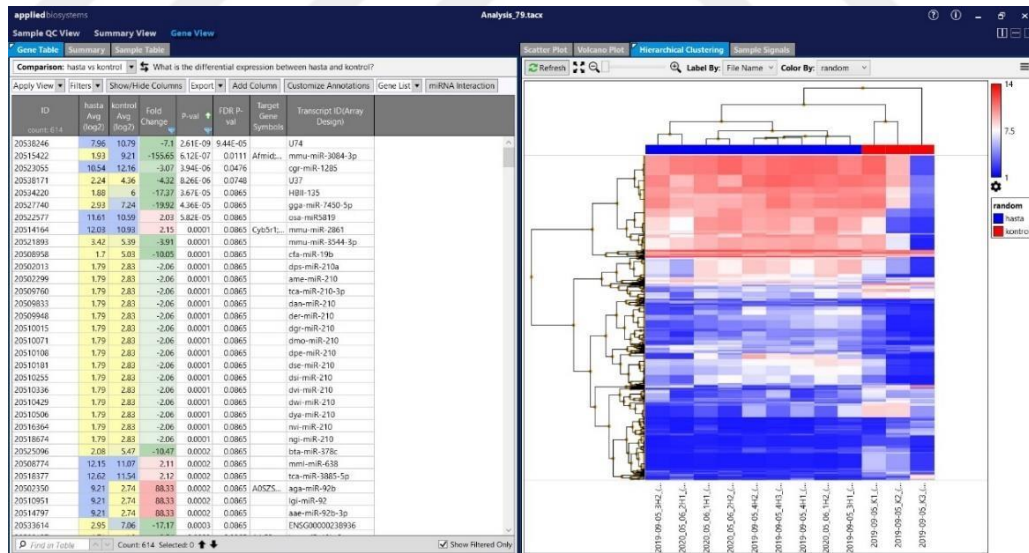


ProbeSet	Annotations	Name	Accession	Symbol	MicroRNAID	DefinedGeneList
3MDAT0006652_at	info	2050898	MIMAT0006652		rla-miR-12b	
3MDAT0014877_at	info	2051542	MIMAT0014877	Atmid	mmu-miR-3086-3p	Olivine and Scarabaeidae
3MDAT0024855_at	info	2052429	MIMAT0024855		miu-miR-378b	
3MDAT0024913_at	info	2052462	MIMAT0024913		mmi-miR-178d	
3MDAT0006092_at	info	2050017	MIMAT0006092		hsa-miR-92a-3p	
3MDAT0006113_at	info	2050081	MIMAT0006113		trmu-miR-12b-3p	
3MDAT0006078_at	info	2050147	MIMAT0006078		trmu-miR-12b-3p	
3MDAT0001118_at	info	2050187	MIMAT0001118		aga-miR-12b-3p	
3MDAT0001347_at	info	2050134	MIMAT0001347		sia-miR-12b	
3MDAT0001783_at	info	2050360	MIMAT0001783		dre-miR-12b-3p	
3MDAT0001663_at	info	2050402	MIMAT0001663		apo-miR-12b	
3MDAT0002679_at	info	2050409	MIMAT0002679		lra-miR-12b	
3MDAT0002677_at	info	2050409	MIMAT0002677		aga-miR-12b	
3MDAT0002684_at	info	2050409	MIMAT0002684		aga-miR-12b	
3MDAT0002691_at	info	2050409	MIMAT0002691		aga-miR-12b	
3MDAT0002698_at	info	2050409	MIMAT0002698		aga-miR-12b	
3MDAT0002705_at	info	2050409	MIMAT0002705		mmi-miR-12b	

Şekil 2.5. BRB-ArrayTools programı ile hasta ve kontrol bireylerinin kıyaslanması örnek görüntüsü. Örneklerin tanımlanmasının ardından gruplar arasında karşılaştırma analizi gerçekleştirilmiştir.

2.6.2. Transcriptome Analysis Console (TAC) Programı

Transkriptome Analiz Konsolu (TAC), Expression Console'un CEL dosya analizini ve kalite kontrol (QC) özelliklerini ve TAC'nin istatistiksel analizini tek bir yazılım uygulamasında birleştirmektedir (Şekil 2.6). Bu yeni birleştirilmiş uygulama, İfade Dizisi özellik yoğunluğu (CEL) dosyalarının QC özet değerlerini (CHP dosyaları) ve ardından kapsamlı grafikler ve tablolar dahil olmak üzere aşağı akış istatistiksel analizini oluşturmak için kolay bir yol sağlamaktadır. TA, Limma, EventPointer, Dbscan, Rtsne ve Apcluster gibi bir dizi R ve Bioconductor modülü içeren için kolay bir grafik arabirim görevi görmektedir. Tek bir çalışmada 1000'e kadar örnek dosyayı analiz edebilen TAC 4.0; örnekleri “Örnek Niteliğine” göre karşılaştırmak için sinyal yoğunluğuna dayalı “Temel Bileşen Analizini” kullanmaktadır. Çoklu analizlere dayalı ortak genler elde etmek için Gen Listelerine dayalı Venn Diyagramları elde edilebilmektedir. Ayrıca programın içinde dağılım ve volkan grafiği, hiyerarşik kümeleme ve örnek sinyallerinin gösterimleri görsellerle gerçekleştirilebilmektedir [47].



Şekil 2.6. TAC 4.0 programı ile hasta ve kontrol bireylerinin kıyaslanması örnek görüntüsü. Örneklerin tanımlanmasının ardından gruplar arasında karşılaştırma analizi ve hiyerarşik sınıflandırma gerçekleştirilmiştir.

2.6.3 Multiple Experiment Viewer (MeV) Programı

Multiple Experiment Viewer (MeV) verilerin analizi, görselleştirilmesi ve veri madenciliği için bir masaüstü uygulamasıdır. Kümeleme, görselleştirme, sınıflandırma, istatistiksel analiz ve biyolojik tema keşfi için gelişmiş algoritmalar içeren, Java tabanlı bir mikrodizin aracıdır (Şekil 2.7). Program MultiExperiment Görüntüleyici (.mev), TIGR ArrayViewer (.tav), GKYY (sekme sınırlı, Çoklu Numune), Affymetrix ve GenPix® dosya biçimleri dahil olmak üzere birçok türde dosyaları yorumlayabilmektedir. Çeşitli normalleştirme algoritmaları ve K-ortalama kümeleme, hiyerarşik kümeleme, t-Testleri, Mikrodizilerin Önem Analizi, Gen Kümesi Zenginleştirme Analizi kümeleme analizlerin, oluşturmada kullanıcıya esneklik sağlamaktadır. MeV, tek veya çoklu deneylerden bilgilendirici ve birbiriyle ilişkili ifade ve açıklama verileri görüntülemektedir [48].

Stored Color	Expression line	ProbeSet	Expected score (d)	Observed score(d)	Numerator(r)	Denominator (s+s0)	Fold change(Unlog)	q-value (%)
	LI31_st	2.9695106	11.967913	0.5173702	0.04322978	1.4347374	0.0	
	MIMAT0025551_st	0.5796881	12.653843	3.0632277	0.24207884	8.843794	0.0	
	MIMAT0020293_st	-1.3969944	14.322219	3.0484138	0.21284507	8.903052	0.0	
	MIMAT0002922_st	-1.3951896	14.322219	3.0484138	0.21284507	8.903052	0.0	
	MIMAT0003567_st	-1.2412895	14.322219	3.0484138	0.21284507	8.903052	0.0	
	MIMAT0006855_st	-0.9284127	14.322219	3.0484138	0.21284507	8.903052	0.0	
	MIMAT0004337_st	-1.1259912	14.322219	3.0484138	0.21284507	8.903052	0.0	
	MIMAT0013950_st	-0.24013942	14.322219	3.0484138	0.21284507	8.903052	0.0	
	MIMAT0002691_st	-1.4446777	14.322219	3.0484138	0.21284507	8.903052	0.0	
	MIMAT0019393_st	0.1374509	14.322219	3.0484138	0.21284507	8.903052	0.0	
	MIMAT0002705_st	-1.4422779	14.322219	3.0484138	0.21284507	8.903052	0.0	
	MIMAT0002698_st	-1.4440283	14.322219	3.0484138	0.21284507	8.903052	0.0	
	MIMAT0002677_st	-1.4472722	14.322219	3.0484138	0.21284507	8.903052	0.0	
	MIMAT0002670_st	-1.4492292	14.322219	3.0484138	0.21284507	8.903052	0.0	
	MIMAT0002663_st	-1.4509727	14.322219	3.0484138	0.21284507	8.903052	0.0	
	MIMAT0004170_st	-1.1434511	14.322219	3.0484138	0.21284507	8.903052	0.0	
	MIMAT0002684_st	-1.4458555	14.322219	3.0484138	0.21284507	8.903052	0.0	
	MIMAT0023841_st	0.4301688	14.322219	3.0484138	0.21284507	8.903052	0.0	
	MIMAT0000074_st	-3.5835226	14.322219	3.0484138	0.21284507	8.903052	0.0	
	MIMAT0000513_st	-2.390689	14.322219	3.0484138	0.21284507	8.903052	0.0	
	MIMAT0013097_st	-0.2674945	14.322219	3.0484138	0.21284507	8.903052	0.0	
	MIMAT0001547_st	-1.8135059	14.322219	3.0484138	0.21284507	8.903052	0.0	
	MIMAT0000788_st	-2.0920367	14.322219	3.0484138	0.21284507	8.903052	0.0	
	MIMAT0001110_st	-1.9063447	14.322219	3.0484138	0.21284507	8.903052	0.0	
	MIMAT0002726_st	-1.4383482	14.322219	3.0484138	0.21284507	8.903052	0.0	
	MIMAT0002719_st	-1.4390957	14.322219	3.0484138	0.21284507	8.903052	0.0	
	MIMAT0002712_st	-1.4408787	14.322219	3.0484138	0.21284507	8.903052	0.0	
	MIMAT0030041_st	0.89137846	14.322219	3.0484138	0.21284507	8.903052	0.0	
	MIMAT0001783_st	-1.6874469	14.322219	3.0484138	0.21284507	8.903052	0.0	
	MIMAT0014517_st	-0.18123843	14.322219	3.0484138	0.21284507	8.903052	0.0	
	MIMAT0024313_st	0.4852345	15.433002	2.3804686	0.15418239	5.202227	0.0	
	MIMAT0024855_st	0.52091914	16.054876	3.4663782	0.21590813	11.214588	0.0	
	MIMAT0014877_st	-0.15032867	25.342576	6.8959586	0.2685936	116.60318	0.0	
	MIMAT0006552_st	-0.7273369	29.076807	3.788364	0.13028817	14.177104	0.0	

Şekil 2.7. MeV programı ile hasta ve kontrol bireylerinin kıyaslanması örnek görüntüsü. Örneklerin tanımlanmasının ardından gruplar arasında karşılaştırma analizi gerçekleştirilmiştir.

2.6.4 miRNA Hedef genlerinin belirlenmesi

Seed bölgeleri (miRNA'ların 5' bölgesindeki 2-7 nükleotidleri) miRNA'ların mRNA 3'UTR bölgelerini hedefledikleri bölgelerdir. miRNA'lar seed bölgelerden mRNA'ların 3'UTR bölgelerini hedefleyerek gen ekspresyonunda değişikliğe neden olmaktadır. Ayrıca tek bir miRNA'nın birden fazla geni hedefleyebildiği veya birkaç miRNA tek bir geni hedefleyebildiği bilinmektedir [49]. Olası bir miRNA hedefinin laboratuvarda doğrulanması, her bir miRNA'nın çok sayıda potansiyel hedef bölgesi olduğundan pahalı ve zaman aldığından, Hesaplamalı yaklaşımlar, deneysel doğrulama için sayılarının azaltılmasına yardımcı olmakta ve hedeflenen bölge ile Watson-Crick eşleştirmesini kullanmaktadırlar [50].

miRNA hedef tahmin araçları bağımsız olarak kullanılabilse de, son yıllarda çoklu algoritmaları birleştirmek için bazı web tabanlı entegre platformlar oluşturulmuştur. Entegre platformlardan biri olan miRWalk içerisinde PICTAR2, MicroT4, miRMap, miRDB, PITA, miRNAMap, miRWalk, miRBridge, RNA22, miRanda, RNAhybrid ve Targetscan veritabanlarını bulundurmaktadır. miRWalk, miRNA'lar için spesifik 'miRWalk' algoritmasını kullanılarak öngörülen hedef genleri ve literatürde validasyonu tamamlanmış bilgileri kullanarak doğrulanmış bağlanma bölgelerini içeren kapsamlı bir veritabanıdır [51, 52]. Şekil 2.8'de bir miRNA'ya ait miRWalk ile yapılan analiz sonucu verilmiştir. 1 sayısı hedef genin programda bulunduğunu, 0 sayısı ise bulunmadığını göstermektedir. Toplamda 12 program tarafından belirlenen tüm hedef genler listeye dahil edilmiştir. Verilen skorlar sonucunda elde edilen hedef genlerin yanında bu genlere ait yolları da analiz edebilmektedir.

miRWalk 2.0: a comprehensive atlas of predicted and validated miRNA-target interactions

Predicted Target Module Validated Target Module Documentation Disclaimer Contact Statistics

Comparative platform of miRNA binding site predictions within 3'-UTR region resulting from different algorithms

The first 50 interactions are displayed in the below table, however, all the interactions can be downloaded by clicking on the below links.

[Download Gene symbol Table](#) [Download RefseqID Table](#) [Download Complete Table](#)

miRNA	Gene	EntrezID	RefseqID	miRWalk	Micro4	miRanda	mirbridge	miRDE	miRMap	miRNAMap	Pictar2	PITA	RNA22	RNAhybrid	Targetscan	SUM
hsa-miR-92a-3p	ATP2A2	488	NM_170965													11
hsa-miR-92a-3p	CCL1A2	1278	NM_000089													11
hsa-miR-92a-3p	FHL2	2274	NM_201555													11
hsa-miR-92a-3p	FMR1	2332	NM_002024													11
hsa-miR-92a-3p	GOLGA3	2802	NM_005895													11
hsa-miR-92a-3p	GOLGA4	2803	NM_002078													11
hsa-miR-92a-3p	ITGA5	3678	NM_002205													11
hsa-miR-92a-3p	MAN2A1	4124	NM_002372													11
hsa-miR-92a-3p	DNAJB2	4189	NM_012328													11
hsa-miR-92a-3p	PAFAH1B1	5048	NM_000430													11
hsa-miR-92a-3p	RAD21	5805	NM_005285													11
hsa-miR-92a-3p	RGS3	5998	NM_144488													11
hsa-miR-92a-3p	SOX4	6659	NM_003107													11

Şekil 2.8. miRWalk veri tabanındaki aday genler listesi. Şekilde miR-92a-3p için bu yaklaşımla belirlenen hedef genler örnek olarak gösterilmiştir.

Entegre platformlardan bir diğeri olan miRNET ise literatürdeki mevcut bilgilerle miRNA'ya ait validasyonu gerçekleştirilmiş hedef gen ve yolları analiz edebilen kullanımı kolay, web tabanlı bir platformdur. Temeldeki R paketi, R programcılar için daha esnek veri analizine izin vermek için sürüm 2.0 ile birlikte yayınlanmıştır. miRNet 2.0, miRBase ID'lerinin farklı versiyonlarını otomatik olarak tanıyabilmekte ve miRBaseConverter R paketine dayalı olarak pre-miRNA'ları olgun formlarına bağlayabilmektedir [53].

miRNA analizleri için en çok kullanılan veri tabanlarıyla bir gruplandırma gerçekleştirildiğinde:

- miRNA aramak için: MiRBase, MiRscan, MiReader,
- Öngörülen miRNA hedeflerinin değerlendirilmesine göre: MiRDB, DIANAmicroT-CDS, MiRMap, Targetscan, miranda, PITA. microT4, miRNAMap, RNA22, RNA-hybrid, miRBridge
- Doğrulanmış miRNA hedeflerinin değerlendirilmesine göre: PICTAR2, MiRTarBase, DIANA-TarBase,

- Öngörülen ve Doğrulanmış miRNA hedeflerinin değerlendirilmesi: miRwalk, miRNET ve MiRecords kullanılabilmektedir.

2.6.5 miRNA Hedef genlerinin yolaklar ile ilişkilendirilmesi

Yüksek verimli teknolojiler, genler ve gen ürünleri hakkında büyük ölçekli veri kümelerinin hızlı bir şekilde üretilmesine yol açmaktadır. Zenginleştirme analizi, miRNA hedef genlerinin ifade değişikliklerini biyolojik olarak anlamlı işlevsel yollar halinde düzenlemeyi sağlamaktadır. Biyolojik önemlerini belirlemek ve deneysel sonuçlar üzerinde çıkarımlar yapmak için gen listelerinin yollar analizleri gerçekleştirilmektedir. Algoritmaların farklılığına bağlı olarak, mevcut zenginleştirme araçları genel olarak üç sınıfa ayrılabilir. Bunlar tekil zenginleştirme analizi (SEA); WebGestalt, gen seti zenginleştirme analizi (GSEA); GSEA ve modüler zenginleştirme analizi (MEA); DAVID'tir .

- **WebGestalt** (*WEB-based Gene SeT AnaLysis Toolkit*) büyük ölçekli -omik çalışmalarından elde edilen gen listelerinin yorumlanması için popüler bir araçtır. 2019 güncellemesinde WebGestalt, 12 organizmayı, 342 gen tanımlayıcısını ve 155 175 fonksiyonel kategoriyi ve ayrıca kullanıcı tarafından yüklenen fonksiyonel veritabanlarını desteklemektedir. WebGelstat içerisindeki KEGG (Kyoto Genler ve Genomlar Ansiklopedisi) programı tez kapsamında kullanılan araçlardan biridir. KEGG üç veri tabanından oluşur: Etkileşen moleküller ağı açısından PATHWAY, gen kataloglarının toplanması için GENES ve hücredeki bileşikler, enzim molekülleri ve enzimatik reaksiyonlar için LIGAND. KEGG, genom haritalarına göz atmak, iki genom haritasını karşılaştırmak ve ifade haritalarını manipüle etmek için Java grafik araçları ve ayrıca dizi karşılaştırma, grafik karşılaştırma ve yollar hesaplama için hesaplama araçları sağlanmaktadır [54, 55].

Tez kapsamında, kistik fibrozis hastalığında önceki projelerimiz aracılığıyla aynı hasta popülasyonunda belirlenen mRNA'lar ve hedef genleri, miRNA'lar açısından değerlendirilmiştir. Bu amaç doğrultusunda daha önce Hacettepe Üniversitesi BAP: 013D05101005 numaralı proje için, GO16/478 Etik Kurul Onayı (Tarih: 01.09.2020) ile kistik fibrozis hastalarından ve sağlıklı kontrollerden toplanmış

olan RNA örneklerinden yapılan miRNA mikrodizin analizinin gerçekleştirilmesi ve sonrasında işlevsel çalışmalarla birlikte miRNA'ların hastalık patogenezindeki rolü aydınlatılmaya çalışılmıştır.

Bu kapsamda, tez bulgularına göre elde edilen iki aday miRNA'nın (miR-92a-3p ve miR-145-5p) validasyonu ve hedef gen ortaklıkları ile oluşturulan yolların etkileyebileceği inflamasyon ile alakalı TGF-beta sinyal yolağı, MAPK sinyal yolağı, *Toll-like* reseptör sinyal yolağı, IL-17 sinyal yolağı, NF-kappa B sinyal yolağı ve TNF sinyal yolağı, kan akış gerilimi ve aterosklerozis, *NOD-like* reseptör sinyal yolağı inflamasyon düzenleyen sinyal yollarının yanında; ER'daki protein işlenmesi ve ErbB sinyal yolları saptanmıştır.



3. BİREYLER VE YÖNTEMLER

3.1. Bireyler

Gerçekleştirdiğimiz ön çalışmalar sonucunda mutasyonu aynı olan ancak farklı KF klinik bulguları ile seyreden ağır/hafif seyirli kardeşler içeren 4 aileye (9 hasta) ve kontrol grubu olarak herhangi bir solunum yolu hastalık öyküsü bulunmayan 3 sağlıklı bireye ait nazal sürüntü örneklerinden RNA izolasyonu gerçekleştirilmiş ve *Affymetrix miRNA 4.0 Array* yöntemi ile analiz edilmiştir.

Klinik ciddiyeti belirleyen parametreler göz önüne alındığında 1. ailedeki kardeşler F508del/G85E (Sınıf II) mutasyonuna sahip olup, A1- H2'nin karaciğer tutulumu daha şiddetlidir. Bu yüzden, 1. ailedeki hasta kardeşler karaciğer tutulumu ve kistik fibrozis ilişkili diyabet parametreleri açısından değerlendirilmiş ve 12 yaşındaki A1-H1 hafif seyirli, 16 yaşındaki A1-H2 ağır seyirli olarak belirlenmiştir. 2. ailedeki kardeşler G178R/G178R (Sınıf III) mutasyonuna sahip olup (A2-H1, A2-H2) karaciğer tutulumu açısından değerlendirilerek A2-H1 (19 yaş) hafif seyirli, A2-H2 (14 yaş) ağır seyirli olduğu bulunmuştur. 3. ailede yer alan hasta kardeşler F508del/F508del (Sınıf II) mutasyonuna sahip olup, A2-H2'nin karaciğer tutulumu daha şiddetlidir ve bu hasta daha sık tekrarlayan akciğer enfeksiyonu geçirmektedir. 3. ailede yer alan hastalar karaciğer tutulumu ve tekrarlayan akciğer enfeksiyon geçirme durumu açısından değerlendirildiğinde A3-H1 (6 yaş) hafif seyirli, A3-H2 (3 yaş) ağır seyirli olduğu bulunmuştur. 4. ailedeki hasta kardeşler I1234V/I1234V (Sınıf IV) mutasyonuna sahiptir ve A4-H3'ün solunum bulgularında FEV% değerinin düşük olması A4-H1 ve A4-H2'ye göre daha ağır akciğer enfeksiyonu geçirdiğini göstermektedir. A4'te yer alan hastalar tekrarlayan akciğer enfeksiyonu geçirme durumu bakımından değerlendirildiğinde, 7 ve 19 yaşındaki A4-H1 ile A4-H2 hafif seyirli, 9 yaşındaki A4-H3 ağır seyirli olarak belirlenmiştir. Tablo 3.1' e klinik bulguların yok, hafif, var ve ağır olma durumları tek tek gösterilmiş ve 9 hastanın kistik fibrozis hastalığı geçirme seyri son satırda belirtilmiştir. Son olarak aktif solunum yakınması ve kronik hastalık öyküsü olmayan, fizik muayenesi normal ve ilaç kullanmayan üç sağlıklı kontrol dahil edilmiştir. Kontroller, hastaların yaş aralığında olacak şekilde seçilmiştir.

Ön çalışma kapsamında, Hacettepe Üniversitesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu onayı alınmış olup tez çalışmasına katılan hasta ve kontrol bireylere “Bilgilendirilmiş Onam Formu” imzalatılmıştır (Tarih: 15.01.2019 Karar No: 2019/02-14). Bu tez çalışmasında aynı bireylere ait örneklerin kullanımı için Hacettepe Üniversitesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu onayı (Tarih: 01/09/2020 Karar No: 2020/14-08) güncellenmiştir.



Tablo 3.1. Çalışmaya katılan KF hastalarının klinik bilgileri.

Klinik Özellikler	Aile 1		Aile 2		Aile 3		Aile 4		
	Hasta 1	Hasta 2	Hasta 1	Hasta 2	Hasta 1	Hasta 2	Hasta 1	Hasta 2	Hasta 3
Mutasyon	F508del/ G85E	F508del/ G85E	G178R/G178R	G178R/G178R	F508del/F508del	F508del/F508del	I1234V/ I1234V	I1234V/ I1234V	I1234V/ I1234V
Cinsiyet	Erkek	Kız	Kız	Erkek	Erkek	Kız	Erkek	Erkek	Kız
Yaş	12	16	19	14	6	3	7	19	9
Teşhis Yaşı	3 aylık	4 aylık	3,5 aylık	2 aylık	5 aylık	Yenidoğan	5,5 yaş	16 yaş	6 yaş
Terde Klor Konsantrasyonu (mmol/L)	96	110	116	116	101	96	88	80	150
FEV1(%)	88	105	98	91	-	-	99	89	53
Tuz Kaybı	Var	Yok	Var	Var	Var	Var	Yok	Yok	Var
Mekonyum İleus	Yok	Yok	Yok	Yok	Yok	Yok	Yok	Yok	Yok
Malabsorpsiyon	Var	Var	Var	Var	Var	Var	Var	Var	Var
Tekrarlayan Akciğer Enfeksiyonu	Yok	Yok	Var	Var, progresif	Var	Var	Yok	Var	Var, progresif
Karaciğer Tutulumu	Hafif	Ciddi	Hafif	Ciddi	Hafif	Ciddi	Hafif	Hafif	Hafif
Diyabet	Yok	Var	Yok	Yok	Yok	Yok	Yok	Yok	Yok
Pankreatit Atağı	Yok	Yok	Yok	Var	Yok	Yok	Yok	Var	Yok
Hastalık Seyri	Hafif	Ağır	Hafif	Ağır	Hafif	Ağır	Hafif	Hafif	Ağır
Tedavi	Multivitamin takviyesi Tuz takviyesi Mukolitik tedavi Pankreatik Enzim Replasman Tedavisi (PERT) Antibiyotik								

3.2. Çalışmalarda Kullanılan Veri, Kimyasal Malzeme, Solüsyon ve Cihazlar

3.2.1. Ham Veri Analizi

GeneChip miRNA 2.0 Array (Affymetrix) ile elde edilen ham veri dosyaları:

BRB-ArrayTools - Biometric Research Program (BRP)

Transcriptome Analysis Console (TAC) 4.0 Software

MeV 4.9.0 – Multiple Experiment Viewer kullanılarak analiz edilmiştir.

Kistik Fibrozis PCR Array ham verisi (ön çalışmaya ait veri)

3.2.2. cDNA Sentezi

TaqMan® MicroRNA Reverse Transcription Kit (ABI)

TaqMan® Advanced miRNA cDNA Synthesis Kit

3.2.3. Kantitatif Gerçek-Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (qRT-PCR)

TaqMan® MicroRNA Assays (ABI) primerleri (miR-92a, miR-145, RNU6)

TaqMan® Universal PCR Master Mix, no AmpErase® UNG (ABI) Kit

TaqMan® Advanced miRNA Assays (miR-92a ve miR-145)

3.3. Yöntemler

3.3.1. Ham Veri Analizi

Ön çalışma kapsamında 9 hasta ve 3 kontrol bireyin nazal sürüntü örneklerinden elde edilen RNA'ların *miRNeasy Micro izolasyon kiti (Qiagen)* yardımıyla RNA izolasyonu yapıldı. İzole edilen RNA'ların kalitesi agaroz jel elektroforezi ve spektrofotometrik ölçümlerle kontrol edilmiş olup miRNA'ların ham verisi *Affymetrix miRNA 4.0 Array* yöntemi kullanılarak elde edildi.

Ağır ve Hafif Seyirli Hastalar Arasında İfade Farklılığı Gösteren Aday miRNA'lar

4 ağır ve 5 hafif bireye ait *Affymetrix miRNA 4.0 Array* yöntemi sonrası elde edilen ham veriler tez kapsamında *Transcriptome Analysis Console (TAC)*, *BRB-ArrayTools- Biometric Research Program (BRP) – NIH* ve *MeV 4.9.0 – Multiple Experiment Viewer* programları kullanılarak analizler gerçekleştirilmiş ve ifadesi 2 kat ve üzeri artan ya da 2 kat üzeri azalan ortak miRNA'lar tanımlandı (p değeri <0,05). Ağır/hafif hasta grubu sınıflar arasında da ağır ve hafif seyirli hastalar olarak analiz edildi;

-Sınıf II grubunda yer alan ağır (n:2) ve hafif (n:2) seyirli hastalar,

-Sınıf III grubunda yer alan ağır (n:1) ve hafif seyirli (n:1) hastalar,

-Sınıf IV grubunda yer alan ağır (n:1) ve hafif seyirli (n:2) hastalar,

arasında ifadesi 2 kat ve üzeri artan ya da 2 kat ve üzeri azalan miRNA'lar saptandı.

Hasta ve Kontrol Bireyler arasında İfade Farklılığı Gösteren Aday miRNA'lar

9 hasta ve 3 bireye ait *Affymetrix miRNA 4.0 Array* yöntemi sonrası elde edilen ham veriler tez kapsamında *Transcriptome Analysis Console (TAC)*, *BRB-ArrayTools- Biometric Research Program (BRP) – NIH* ve *MeV 4.9.0 – Multiple Experiment Viewer* programları kullanılarak analizler gerçekleştirilmiş ve ifadesi 2 kat ve üzeri artan ya da 2 kat üzeri azalan ortak miRNA'lar tanımlandı (p değeri <0,05).

miRNA hedef genlerinin belirlenmesi ve yolak analizi

En az 2 programda ya da 2 grupta ortak elde edilen miRNA'ların hedef genlerinin belirlenmesi için içinde farklı veri bankalarını içeren ve miRWalk kullanıldı. Ağır ve hafif seyirli hastalar arasında ifade farklılığı saptanan miRNA'larına ait hedef genlerin belirlenmesi ve yolak analizi gerçekleştirildi. Aynı şekilde hasta ve kontrol bireyleri arasında ifade farklılığı saptanan miRNA'larına ait hedef genlerin belirlenmesi ve yolak analizi gerçekleştirildi. Seçilen miRNA'ların hedef genleri ve hedef genlere ait yolaklar ayrı ayrı tanımlandıktan sonra miRNA'ların ortak hedef genleri ve yolakları da analiz edildi.

KF PCR Array sonuçlarında yer alan genler ile miRNA hedef genlerinin karşılaştırılması

Grubumuzun yaptığı ön çalışmada elde edilen KF patolojisi ile ilişkili 84 genin *Kistik Fibrozis PCR Array* analizi sonrasında ifadesi 2 kat ve üzeri artan ya da 2 kat üzeri azalan genler ve yolaklar ile karşılaştırmalar yapıp transkriptomik datası ile ortak olan miRNA hedef genleri belirlendi.

Yolak Analizi

Çalışmaya dahil edilen hasta/kontrol ve ağır/hafif seyirli hasta gruplarında ifade farklılığı gösteren miRNA'lara ait hedef gen listeleri ile *KeGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes* kullanılarak yolak analizleri gerçekleştirildi. miRNA array hedef gen ve yolaklarının, *Kistik Fibrozis PCR Array* sonuçlarında yer alıp almadığı araştırılmış ve iki array sonucunda elde edilen veriler karşılaştırıldı. Elde edilen ortaklıklar ile Webgestalt kullanılarak yolak analizleri yapıldı.

3.3.2. cDNA Sentezi

Yolak analizi sonucunda aday miRNA olarak belirlenen 2 miRNA'nın mikrodizin sonuçları qRT-PCR ile valide edildi. Öncelikle 5ng/ µl olacak şekilde dilute edilen RNA'ların, *TaqMan® MicroRNA Reverse Transcription Kit (ABI)* kullanılarak cDNA sentezi gerçekleştirildi. cDNA çevirimi için seçilen miRNA'lar ve referans olan U6 primeri ile primer havuzu hazırlandı. Daha sonra, 10x RT tamponu, RNaz inhibitörü , 100 mM ddNTP, *Reverse Transcriptase* (50 U/µl), *RT-primer*

havuzu, su ve RNA (5 ng) kullanılarak reaksiyon karışımı hazırlandı. Reaksiyon koşullarına uygun bir şekilde örnekler PZR cihazına yerleştirildi.

Primer Havuzu	5X-20X (μ l)
U6	10 μ l
miR-92a	10 μ l
miR-145	10 μ l
TE tamponu (RNAz free su ile)	950 μ l
Toplam hacim	1000 μ l

RT reaksiyonu	1 rxn (μ l)
10xRT tamponu	1,5 μ l
RNAz inhibitörü	0,19 μ l
100 mM ddNTP	0,30 μ l
Reverse Transcriptase (50 U/ μ l)	2 μ l
RT-primer havuzu	6 μ l
Su (RNAz free)	3,01 μ l

Toplam *master mix* 13 μ l

RNA (5 ng) 2 μ l

Toplam hacim: 15 μ l

Reaksiyon Koşulları

- 16°C 30 dk
- 42°C 30 dk
- 85°C 5 dk
- 4°C ∞

3.3.3. Kantitatif Gerçek-Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu

cDNA çevirimin ardından miR-92a-3p, miR-145-5p ve U6'ya uygun TaqMan® MicroRNA Assays (ABI) primerleri ile TaqMan® Universal PCR Master Mix, no AmpErase® UNG (ABI) kiti kullanılarak amplifikasyon gerçekleştirildi. Yapılan RT-PCR deneylerinde FAM floresan boyası kullanıldı. Reaksiyon, seçilen uygun miRNA primerleri ile BioRad IQ5 cihazında gerçekleştirildi.

PCR reaksiyonu	1 rxn
Taqman microRNA Assay (20X)	1 µl
TaqMan 2x Universal PCR Master Mix	10 µl
Su	7,5 µl

Total master mix: 18,5 µl

cDNA: 1,5 µl

Toplam Hacim: 20 µl

Reaksiyon Koşulları:

- 50°C 2 dk
 - 95°C 10 dk
 - 95°C 15 sn
 - 60°C 1 dk
 - 20°C 5 dk
- } 40 döngü

3.3.4. Verilerin Değerlendirilmesi ve İstatistiksel Analiz

İfade değişimleri $2^{-\Delta\Delta C_t}$ yöntemi ile hesaplandı ve kat değişimleri için *GraphPad Prism 5.0* kullanılarak istatistiksel analiz yapıldı. Kat değişimlerinin anlamlılığının belirlenebilmesi için *Unpaired t-test* analizi gerçekleştirilmiş olup p değeri 0,05'ten küçük olanlar istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. *Small Nucleolar RNA*, *C/D Box 6 (RNU6)* referans gen ifadesi bütün miRNA'lar için normalizatör olarak kullanıldı.

4. BULGULAR

Tez çalışması öncesinde gerçekleştirdiğimiz ön çalışmalar sonucunda mutasyonu aynı olan ancak farklı KF klinik bulgularına sahip ağır/hafif seyirli kardeşler içeren 4 aileye (n: 9) ve kontrol grubuna (n: 3) ait nazal sürüntü örneklerinden RNA izole edilmiş olup; Affymetrix 4.0 ile mikrodizin çalışması tamamlanmıştır.

Elde edilen ham veriler tez çalışması kapsamında üç farklı biyoinformatik araç kullanılarak analiz edilmiştir.

4.1. Ağır ve Hafif Seyirli Hastalar Arasında İfade Farklılığı Gösteren Aday miRNA'lar

Ağır ve hafif hastalık seyri gösteren bireyler arasında, ifade farklılığı gösteren aday miRNA'lar TAC 4.0 programı ile analiz edildiğinde ifadesi artan miR-145-5p (3,32 kat, $p=0,032$) tanımlanmış, ifadesi azalan miRNA saptanmamıştır. BRB-ArrayTool ile yapılan sınıf karşılaştırması analizi sonucunda ifadesi 2 kat artan ve 2 kat azalan insan miRNA (*hsa-miR*) tanımlanmamıştır. MeV programı ile yapılan SAM (*Significance Analysis of Microarrays*) analizi sonucunda da anlamlı miRNA saptanmamıştır.

4.1.1. Sınıf II Grubunda Yer Alan Ağır ve Hafif Seyirli Hastalarda İfade Farklılığı Gösteren Aday miRNA'lar

Sınıf II grubunda yer alan ağır ve hafif hastalık seyri gösteren bireyler arasında ifade farklılığı gösteren miRNA'lar TAC 4.0 programı ile analiz edildiğinde herhangi bir miRNA saptanmamıştır. Ardından *BRB-ArrayTool* ve MeV programları ile yapılan analizler sonucunda da ifadesi 2 kat artan veya 2 kat azalan miRNA saptanmamıştır.

4.1.2. Sınıf III Grubunda Yer Alan Ağır ve Hafif Seyirli Hastalarda İfade Farklılığı Gösteren Aday miRNA'lar

Sınıf III grubunda ağır/hafif seyirli hasta sayısının bir olması sebebiyle ifade farklılığı gösteren miRNA'lar TAC 4.0 ve MeV programları ile analiz edilememiştir. BRB-ArrayTool ile yapılan analiz sonucunda ise ifadesi 2 kat artan ve 2 kat azalan miRNA hedefi saptanmamıştır.

4.1.3. Sınıf IV Grubunda Yer Alan Ağır ve Hafif Seyirli Hastalarda İfade Farklılığı Gösteren Aday miRNA'lar

Sınıf IV grubunda ağır ve hafif hastalık seyri gösteren bireyler arasında ifade farklılığı gösteren miRNA'lar TAC 4.0 programı ile analiz edilmiş olup; ifadesi artan miR-146a-5p (16,01 kat, $p=0,048$), miR145-5p (15,33 kat, $p=0,038$), miR-193a-5p (13,51 kat, $p=0,01$), miR-25-3p (5,36 kat, $p=0,035$), miR-223-3p (2,75 kat $p=0,01$) ve ifadesi azalan miR-4454 (-2,06 kat, $p=0,005$) saptanmıştır. Sınıf IV grubundaki ağır seyirli hasta sayısının bir olması sebebiyle BRB-ArrayTool ve MeV programları ile analizler gerçekleştirilememiştir.

Ham veri setinin 3 farklı programda ve farklı gruplarda yapılan analizleri sonucunda, en az iki programda ve en az iki grupta ortak olan miRNA'lar seçilmiştir. Ağır ve hafif seyirli hasta kardeşlerde gerçekleştirilen biyoinformatik analizler sonucunda; ağır/hafif ve Sınıf IV ağır/hafif gruplarında ortak tanımlanan miR-145-5p ileriki analizler için seçilmiştir.

4.2. Hasta ve Kontrol Bireyler arasında İfade Farklılığı Gösteren Aday miRNA'lar

Hasta ve kontrol grubunda yer alan bireyler arasında ifade farklılığı gösteren miRNA'lar TAC 4.0 programı ile analiz edildiğinde ifadesi 2 kat üzeri azalan 20 miRNA ve ifadesi 2 kat üzeri artan 18 aday miRNA tanımlanmıştır (Tablo 4.1). BRB-ArrayTool ile yapılan sınıf karşılaştırması analizi sonucunda ifadesi artan miR-92a-3p (20,04 kat, $p=0,001$), miR-17-5p (9,49 kat, $p=9,62E-05$) ve miR-106a-5p (7,8 artan, $p=8,79E-05$) saptanmıştır. İfadesi azalan miRNA saptanmamıştır. Son olarak MeV programı ile yapılan SAM analizi sonucunda ifadesi artan 34 miRNA arasından miR-19b-1 (8,9 kat, $q=0$) insan miRNA (*hsa-miR*) olarak tanımlanmış ve ifadesi azalan miRNA saptanmamıştır.

Tablo 4.1. TAC 4.0 analiz programına göre hasta ve kontrol bireyler arasında ifade farklılığı saptanan miRNA'lar.

Transkript ID	Kat artışı	P-değeri	Transkript ID	Kat artışı	P-değeri
miR-92a-3p	115,99	0,0005	miR-22-3p	-32,33	0,0101
miR-16-5p	69,8	0,0027	miR-7110-5p	-24,62	0,0145
miR-125a-5p	38,14	0,0298	miR-1246	-16,09	0,004
miR-17-5p	30,23	0,0019	miR-378c	-11,59	0,0016
miR-106a-5p	20,88	0,0017	miR-7107-5p	-9,39	0,0096
miR-181a-5p	11,02	0,0082	miR-6743-5p	-9,08	0,0125
miR-6789-5p	8,31	0,0113	miR-19b-3p	-8,54	0,0003
miR-20a-5p	7,1	0,0238	miR-4454	-7,92	0,0111
miR-181b-5p	5,15	0,0378	miR-378a-3p	-6,73	0,0063
miR-4734	4,56	0,0122	miR-151a-3p	-4,92	0,0452
miR-423-3p	4,47	0,0109	miR-2115-5p	-4,5	0,0011
miR-23a-3p	4,3	0,0437	miR-1275	-4,08	0,0157
miR-744-5p	3,2	0,0107	miR-1273g-3p	-3,7	0,0007
miR-6850-5p	2,89	0,03	miR-4449	-3,09	0,0274
miR-26a-5p	2,51	0,0463	miR-297	-3,05	0,034
miR-5001-5p	2,22	0,0175	miR-320d	-2,77	0,0248
miR-6821-5p	2,13	0,0443	miR-140-3p	-2,53	0,0413
miR-5189-3p	2,09	0,0459	miR-185-5p	-2,5	0,0199
			miR-4492	-2,5	0,0447
			miR-6808-3p	-2,03	0,0048

BRB-ArrayTool ile saptanan üç miRNA, TAC 4.0 programında da elde edilmiştir. MeV programı aracılığıyla elde edilen miR-19b-1 ise diğer programlarda saptanmamıştır. Kat artışı en yüksek olan ve hasta/kontrol grubunda çalışılmak üzere miR-92a-3p seçilmiştir.

Tablo 4.2'de üç farklı biyoinformatik programı aracılığıyla gerçekleştirilen ifade artışı ve azalışı görülen aday miRNA'lar özetlenmiştir.

Tablo 4.2. Üç farklı biyoinformatik programı aracılığıyla tez kapsamında yer alan bireylerin 5 grupta analiz edilmesi sonucu oluşan ve ifade artışı ve azalışı görülen aday miRNA'ların listesi. Bu analizlere göre en az 2 programda ve 2 grupta ortak olarak tanımlanan miR-92a-3p ve miR-145-5p altı çizili ve gri olarak gösterilmiş ve ileriki analizler için seçilmiştir.

GRUPLAR	TAC 4,0 p<0,05				BRB-ArrayTool p<0,05			MeV FDR=0		
Ağır ve Hafif	İfadesi artan	Kat artışı	İfadesi azalan		İnsana ait miRNA saptanmadı			Anlamlı miRNA saptanmadı		
	<u>miR-145-5p</u>	3,32	yok							
Sınıf II Ağır ve Hafif	miRNA saptanmadı				Anlamlı miRNA saptanmadı			Anlamlı miRNA saptanmadı		
Sınıf III Ağır ve Hafif	Ağır n=1 Hafif n=1, Sayı yeterli olmadığı için miRNA saptanmadı									
Sınıf IV Ağır ve Hafif	İfadesi artan	Kat artışı	İfadesi azalan	Kat artışı	Ağır n=1 olduğu için analiz edilemedi			Ağır n=1 olduğu için analiz edilemedi		
	miR-146a-5p	16,01	miR-4454	-2,06						
	<u>miR-145-5p</u>	15,33								
	miR-193a-5p	13,51								
	miR-25-3p	5,36								
	miR-223-3p	2,75								
Hasta ve Kontrol	İfadesi artan	Kat artışı	İfadesi azalan	Kat artışı	İfadesi artan	Kat artışı	İfadesi azalan	İfadesi artan	Kat artışı	İfadesi azalan
	<u>miR-92a-3p</u>	115,99	miR-22-3p	-32,33	<u>miR-92a-3p</u>	20,04	yok	miR-19b-1	8,9	yok
	miR-16-5p	69,8	miR-7110-5p	-24,62	miR-17-5p	9,49		miR-320d-1	4,4	
	miR-125a-5p	38,14	miR-1246	-16,09	miR-106a-5p	7,8				
	miR-17-5p	30,23	miR-378c	-11,59						
	miR-106a-5p	20,88	miR-7107-5p	-9,39						
	ve 28 miRNA daha									

4.3. miRNA hedef genlerinin belirlenmesi ve yolak analizi

miRNA hedef genlerinin belirlenmesi için miRWalk ve miRNET programları kullanılmıştır. miRWalk programında 12 veritabanının tamamı ve miRNET programında ise miRTarBase v8.0, TarBase v8.0 ve miRecords alt veritabanları seçilmiştir.

4.3.1. Ağır ve hafif seyirli hastalar arasında ifade farklılığı saptanan miR-145-5p'nin hedef genlerinin belirlenmesi ve yolak analizi

Ağır ve hafif seyirli hastalar arasında ifade farklılığı gösteren miR-145-5p'nin miRWalk programı ile yapılan analizi sonucunda p değeri 0,05'ten küçük 15324 hedef geni olduğu saptanmıştır. Bu genlerin yer aldığı yollar miRWalk içerisindeki KEGG yolak zenginleştirilmesi ile saptanmıştır. Analiz sonuçlarına göre anlamlı 14 yolak elde edilmiş olup; (EK-2) KF patolojisi ile uyumlu endositoz, aktin hücre iskeletinin düzenlenmesi, ErbB sinyal yolağı, Fc gama R aracılı fagositoz, ubiquitin aracılı proteoliz ve insülin sinyal yolları tanımlanmıştır.

miR-145-5p için miRNET analizi gerçekleştirildiğinde p değeri 0,05'ten küçük 238 hedef geni olduğu ve gen sayısının miRWalk' a göre azaldığı gözlemlenmektedir. Bunun nedeni miRWalk programının kullandığı algoritma ile hem öngördüğü hem de validasyonu gerçekleştirilmiş ve literatürde yayınlanmış miRNA hedef genlerini içermesidir-

Elde edilen hedef genler ile yolak zenginleştirilmesi yapıldığında p değeri 0,05'ten küçük ve en az 5 geni içeren 41 yolak elde edilmiştir (EK-2). Analiz sonuçlarına göre KF patolojisi ile uyumlu TGF-beta sinyal yolağı, ErbB sinyal yolağı, mTOR sinyal yolağı, MAPK sinyal yolağı, Toll- benzeri reseptör sinyal yolağı ve aktin hücre iskeletinin düzenlenmesi yolları saptanmıştır (Tablo 4.3). Ağır ve hafif hasta grubu kıyaslamasında elde edilen miR-145-5p'nin hedef genleri ile gerçekleştirilen yolak analizi sonucunda iki programda da ortak ErbB sinyal yolağına (EGFR yolağı ile yapısal olarak ilişkili ve 4 reseptör tirozin kinaz içeren protein ailesi) saptanmıştır.

Tablo 4.3'te miRNA hedef genlerinin yer aldığı yollar özetlenmiştir.

4.3.2. Hasta ve kontrol bireyleri arasında ifade farklılığı saptanan miR-92a-3p'nin hedef genlerinin belirlenmesi ve yolak analizi

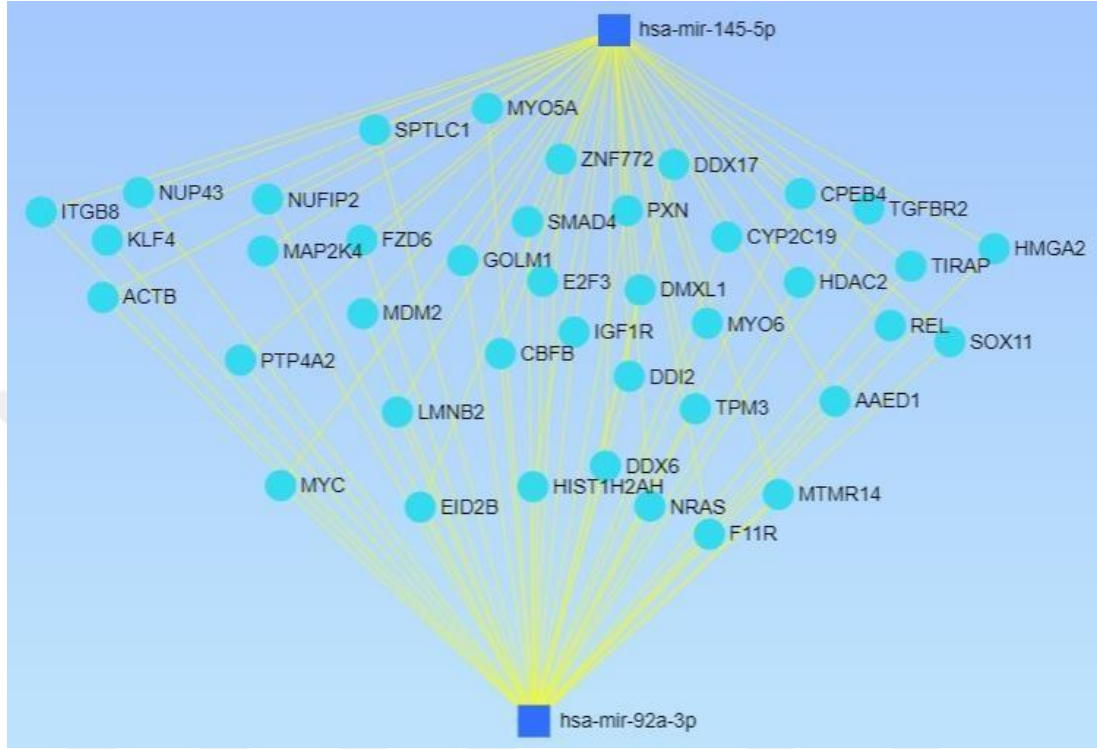
Hasta ve kontrol bireyler arasında ifade farklılığı gösteren miR-92a-3p'nin miRWalk programı ile yapılan analizi sonucunda p değeri 0,05'ten küçük 14376 hedef geni olduğu saptanmıştır. Bu genlerin yer aldığı yollar miRWalk içerisindeki KEGG yolak zenginleştirilmesi ile saptanmıştır. Analiz sonuçlarına göre p değeri 0,05'ten küçük ve anlamlı 9 yolak elde edilmiş olup (EK-3) KF patolojisi ile uyumlu apoptoz, T hücre reseptör sinyal yolağı ve endositoz yolları saptanmıştır.

miR-92a-3p'nin miRNET analizi ile yapılan analizinde ise 1407 hedef geni olduğu ve gen sayısının miRWalk' a göre azaldığı gözlemlenmektedir. Elde edilen hedef genler ile yolak zenginleştirilmesi yapıldığında p değeri 0,05'ten küçük ve en az 5 geni içeren 26 yolak saptanmıştır (EK-3). Analiz sonuçlarına göre KF patolojisi ile uyumlu RNA taşınması, RNA degradasyonu, TGF-beta sinyal yolağı, ErbB sinyal yolağı, epitel hücrelere bakteri invazyonu yolları saptanmıştır. Hasta ve kontrol grubu kıyaslamasında elde edilen miR-92a-3p'nin hedef genleri ile gerçekleştirilen yolak analizi sonucunda iki programda da ortak herhangi bir yolak saptanmamıştır.

Tablo 4.3. Kistik fibrozis patolojisi ile uyumlu yolaklar seçilerek oluşturulan bu tabloda, * ile işaretli ErbB sinyal yolağı iki programda da ortak olup; miR-145-5p'nin hedef genlerini içermektedir.

	miRWalk				miRNET			
	Hedef gen sayısı	Yolaklarda yer alan gen sayısı	Yolak adı	p değeri	Hedef gen sayısı	Yolaklarda yer alan gen sayısı	Yolak adı	p değeri
miR-145-5p	15324	173	Endositoz	1,82E+08	283	11	TGF-beta sinyal yolağı	1,12E-06
		194	Aktin hücre iskeletinin düzenlenmesi	3,57E+08		10	ErbB sinyal yolağı *	1,18E-05
		85	ErbB sinyal yolağı*	2,80E+09		6	mTOR sinyal yolağı	0,000322
		92	Fc gama R aracılı fagositoz	3,21E+09		14	MAPK sinyal yolağı	0,00121
		124	Ubikuitin aracılı proteoliz	5,26E+09		6	Toll-like reseptör sinyal yolağı	0,0162
		127	İnsülin sinyal yolağı	0,00021314		8	Aktin hücre iskeletinin düzenlenmesi	0,0377
miR-92a-3p	14376	80	Apoptoz	4,33E-05	1407	25	RNA taşınması	4,50E-05
		99	T hücre reseptör sinyal yolağı	5,65E-05		13	RNA degradasyonu	0,00133
		102	Endositoz	5,82E-05		15	TGF-beta sinyal yolağı	0,00444
						13	ErbB sinyal yolağı	0,0321
						9	Epitel hücrelere bakteri invazyonu yolağı	0,0459

Seçilen miRNA'ların hedef genleri ve hedef genlere ait yollar ayrı ayrı tanımlandıktan sonra miR145-5p ve miR-92a-3p'nin ortak hedef genleri ve yolları da analiz edilmiştir (Şekil 4.1).



Şekil 4.1. mir-92a-3p ve miR-145-5p'nin ortak hedefleri olan 40 genin miRNET programı gösterimi.

Ortak hedeflere ait yollar detaylı analiz edildiğinde p değeri anlamlılık sıralamasına göre endositoz (162 gen), TGF-beta sinyal yolağı (SMAD4, MYC ve TGFB2), ErbB sinyal yolağı (MYC, NRAS ve MAP2K4), aktin hücre iskeletinin düzenlenmesi (ACTB, ITGB8, NRAS ve PXN), epitel hücrelere bakteri invazyonu yolağı (ACTB ve PXN) ve MAPK sinyal yolları (MYC, NRAS, MAP2K4 ve TGFB2) saptanmıştır.

4.4. KF PCR Array sonuçlarında yer alan genler ile miRNA hedef genlerinin karşılaştırılması

Kistik fibrozis PCR Array Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) temeline dayalı bir yöntem olmakla birlikte hastalık ile ilişkili genler ve CFTR ile ilişkili yolların yer aldığı 84 adet genin ifadesi analiz edilebilmektedir. Yöntemin temelinde artan ürün miktarına paralel olarak artan floresan ışınım miktarının, eş zamanlı olarak bilgisayar ekranından görüntülenmesi yer almaktadır. Ön çalışmamızda KF PCR array kullanılarak ağır/hafif seyirli kardeşler içeren aileler ve kontrol grubunda transkriptomik analizler gerçekleştirilmiştir. Tez kapsamında ise saptadığımız miRNA'ların hedef genlerinin KF PCR array sonuçlarında yer alıp almadığı araştırılmış ve iki array sonucunda elde edilen veriler karşılaştırılmıştır.

miR-145-5p'nin hedefinde bulunan genlerden KF PCR Array' de tanımlı 76 gen saptanmıştır. Bu genlerden 37 tanesi ifade değişikliği göstermiş olup Tablo 4.4'te listelenmiştir. 19 genin ifadesi azalırken, 18 genin ifadesi artmaktadır. miR-145-5p de miR-92a-3p gibi ifadesi artan bir miRNA olduğu için etkileyeceği genlerin ifadesinin baskılanması beklenmektedir. Bu yüzden ifadesi azalan genler ile bir yolak analizi gerçekleştirildiğinde $FDR < 0,05$ olan inflamasyonda görevli TNF-alfa sinyal yolağı, IL-17 sinyal yolağı, antijen işlenmesi ve sunumu, TNF sinyal yolağı ve NOD-like reseptör sinyal yolağı inflamasyon düzenleyen sinyal yollarının yanında; ER'daki protein işlenmesine etki eden yollar da tanımlanmıştır (Tablo 4.5).

Tablo 4.4. miR-145-5p hedef genleri arasından KF PCR Array’de tanımlı ve ifade değişikliği gösteren genlerin listesi

İfadesi azalan genler	Kat artışı	İfadesi artan genler	Kat artışı
S100A8	-5,25	GSTM1	9,01
CXCL1	-3,53	TNFRSF11A	3,05
LCN2	-3,18	ACE	3,5
DUSP1	-2,61	STX1A	2,42
IL1B	-2,61	SFTPB	2,18
HSPH1	-2,56	PDZK1	2,18
SERPINA1	-2,54	SCNN1G	2,11
HSP90AA1	-2,38	SLC9A3R2	2,09
PTGS2	-2,33	IL6	1,84
SNAP23	-2,08	EDN1	1,82
CFTR	-1,80	KIT	1,76
EZR	-1,74	PRKCE	1,71
TNFSF10	-1,73	DEFB1	1,65
CANX	-1,63	ADIPOR2	1,59
IFRD1	-1,62	TNFRSF1A	1,57
ITGA2	-1,61	NOS3	1,52
DNAJA1	-1,58	ADRB2	1,52
MAPK1	-1,57	EPSTH1	1,51
HSPA8	-1,51		

Tablo 4.5. miR-145-5p’nin ifadesi azalan hedef genlerinin WebGestalt programında ilk 10 yolak analizi sonucu. P değeri anlamlılık sıralamasına göre sıralanmış ve FDR 0,05’ten küçük olan yolaklar gri ile gösterilmiştir. KF patolojisi ile uyumlu olan yolaklar * ile işaretlenmiştir.

Yolak adı	P Değeri	FDR
IL-17 sinyal yolağı*	1,26E-09	4,12E-07
ER’da protein işlenmesi*	0,0000382	0,0062266
TNF sinyal yolağı *	0,00012887	0,014004
Lejyonellozis	0,00030841	0,025136
NOD-like reseptör sinyal yolağı *	0,00065318	0,033868
Influenza A	0,00069828	0,033868
Leishmaniazis	0,00073995	0,033868
Antijen işlenmesi ve sunumu *	0,00083111	0,033868
Salmonella enfeksiyonu	0,0011467	0,041534
C tipi lektin reseptörü sinyal yolu	0,0019842	0,063798

miR-92a-3p'nin hedefinde bulunan genlerden KF PCR Array' de tanımlı 66 gen saptanmıştır. Bu genlerden 42 tanesi ifade değişikliği göstermiş olup ve Tablo 4.6'te listelenmiştir. 11 genin ifadesi azalırken, 31 genin ifadesi artmaktadır. miR-92a-3p ifadesi artan bir miRNA olduğu için etkileyeceği genlerin ifadesinin baskılanması beklenmektedir. İfadesi azalan genler ile bir yolak analizi gerçekleştirildiğinde $FDR < 0,05$ olan inflamasyonda görevli antijen işlenmesi ve sunumu, IL-17 sinyal yolağı, NF-kappa B sinyal yolağı ve TNF sinyal yolağı, kan akış gerilimi ve aterosklerozis gibi inflamasyonda görev alan sinyal yolaklarının yanında; ER'da protein işlenmesine etki eden yolak tanımlanmıştır (Tablo 4.7).

Tablo 4.6. miR-92a-3p hedef genleri arasından KF PCR Array' de tanımlı ve ifade değişikliği gösteren genlerin listesi

İfadesi azalan genler	Kat artışı	İfadesi artan genler	Kat artışı	İfadesi artan genler	Kat artışı
EZR	-7,27	GCLC	11,52	TCF7L2	2,87
NFKBIA	-2,84	IL6	9,6	CXCL1	2,8
PTGS2	-2,58	SFTPB	6,38	SCNN1G	2,75
TNFRSF1A	-2,43	CFTR	6,3	PLA2G5	2,62
HSPA1A	-2,39	TNF	5,5	HSPA4	2,56
SLPI	-2,26	IL10	4,67	STX1A	2,29
DNAJC5	-2	ICAM1	4,29	EDN1	2,16
DUSP1	-1,96	CXCL2	3,97	TLR2	2,05
CANX	-1,77	MBL2	3,96	PRKCE	2,02
ACTB	-1,71	MSRA	3,9	TLR5	1,99
HSP90AA1	-1,63	FAS	3,68	SERPINA1	1,97
		NOS3	3,21	EPSTI1	1,72
		PDZK1	3,28	SLC9A3R1	1,58
		EDNRA	3,16	PRKAA2	1,53
		SNAP23	3,07	ADK	1,51
		TLR4	2,88		

Tablo 4.7. miR-92a-3p'nin ifadesi azalan hedef genlerinin WebGestalt programında ilk 10 yolak analizi sonucu. P değeri anlamlılık sıralamasına göre sıralanmış ve FDR 0,05'ten küçük olan yolaklar gri ile gösterilmiştir. KF patolojisi ile uyumlu olan yolaklar * ile işaretlenmiştir.

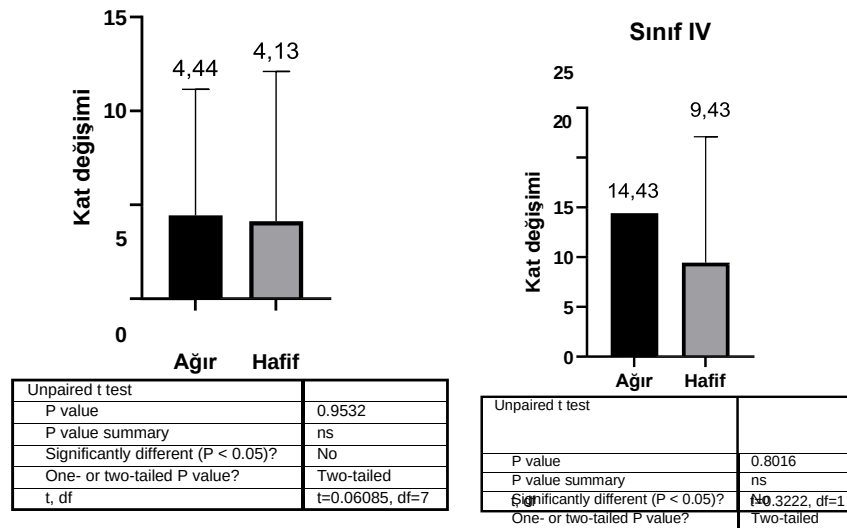
Yolak adı	P Değeri	FDR
Kan akış gerilimi ve aterosklerozis *	0,000023878	0,0060349
ER'da protein işlenmesi *	0,000048273	0,0060349
Influenza A	0,000055536	0,0060349
Antijen işlenmesi ve sunumu *	0,00012992	0,010588
IL-17 sinyal yolağı *	0,00022781	0,013183
NF-kappa B sinyal yolağı *	0,00024264	0,013183
TNF sinyal yolağı *	0,00037422	0,016081
Toksoplazmozis	0,00039463	0,016081
Apoptoz*	0,00069767	0,025271
Kaposi sarkomu ile ilişkili herpes virüsü enfeksiyonu	0,0017311	0,056435

4.5. Aday miRNA'ların qRT-PCR ile validasyonu

Ağır ve hafif seyirli hasta kardeşler (Şekil 4.2.A) ve Sınıf IV ağır/hafif hasta kardeşler (Şekil 4.2.B) arasında gerçekleştirilen qRT-PCR sonrasında miR-145-5p'nin ağır hastalık seyri gösteren bireylerde, hafiflere göre arttığı saptanmış ancak istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir.

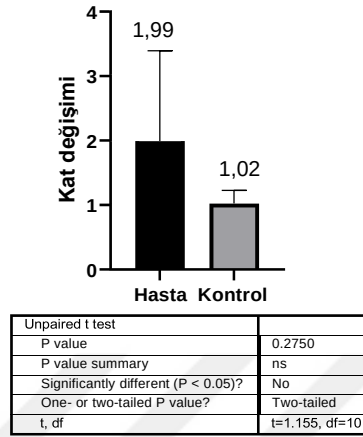
A

B



Şekil 4.2. A) Ağır ve hafif seyirli hasta kardeşler arasında kat değişimi gösteren miR-145-5p'nin qRT-PCR sonuçları. B) Sınıf IV ağır/hafif hasta kardeşler ile gerçekleştirilen analiz sonucu (Unpaired t test sonuçları *P <0,10; **P <0,01; ***P <0,001.).

Hasta ve kontrol bireyler arasında gerçekleştirilen qRT-PCR sonrasında miR-92a-3p'nin hasta bireylerde kontrole göre arttığı saptanmış ancak istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir (Şekil 4.3).



Şekil 4.3. Hasta ve kontrol bireyleri arasında ifadesi artan miR-92a-3p'nin qRT-PCR sonucu. (Unpaired t test sonucu *P <0,10; **P <0,01; ***P <0,001.)

5. TARTIŞMA

Kistik fibrozis ciddiyetinin belirlenmesinde CFTR mutasyonlarının yanı sıra çevresel etkenler, hastalık fenotipini modifiye eden genler ve gen ifade kontrolünde önemli rollere sahip olduğu bilinen miRNA'lar da rol oynamaktadır. Grubumuzun gerçekleştirdiği bir araştırmada; tez kapsamında da kullanmış olduğumuz aynı hasta grubunda, ifadesi değişen genler ve klinik özellikler arasında gerçekleştirilen korelasyon analizi sonucunda karaciğer tutulum şiddeti arttıkça 6 genin (PRKCE, CCL2, TNF, NOS3, EDN1 ve TGFB1) ifadesinin de anlamlı olarak arttığı saptanmıştır. Bu genlerin diyabetik komplikasyonlarda AGE-RAGE sinyal yolağı ile ilişkili olduğu gösterilmiş ve karaciğer ciddiyeti açısından fenotipi modifiye edici olabilecekleri düşünülmüş olup; hasta sayısı artırılarak çalışmalara devam edilmektedir.

Son yıllarda miRNA'ların hastalık ciddiyetindeki farklılıkları açıklayabilecek post transkripsiyonel regülatörlerden olabileceği fikri ortaya çıkmıştır. Günümüze kadar gerçekleştirilen araştırmalar sonucunda miRNA'lar hastalık patogenezi ile ilişkilendirilmiş olup; immün yanıt oluşumunu, epitel hücre farklılaşmasını, CFTR proteininin hücre içi trafiğini, kanal aktivitesini etkilediklerine dair veriler üretilmiştir. Ancak KF hastalığının ilerleyişi, hastalık ciddiyeti ve hastalık ile ilişkili komplikasyon gelişiminde miRNA'ların rolü ile ilgili bir araştırma yapılmamıştır.

Tez çalışması; aynı genotipe sahip olmasına rağmen klinik ciddiyeti farklı olan hasta kardeşler arasında ifade farklılığı gösteren ve fenotipik farklılığa sebep olabileceği düşünülen miRNA'ların, hedef genlerin ve ilişkili yolakların tanımlanmasını kapsamaktadır.

Kolay erişilebilen hücreler olan nazal epitel hücreleri, alt solunum yolunu yansıtan bir model olup; akciğer epitel hücreleri ile uyumlu bir transkriptomik profile sahiptir. Nazal hücreler invazif olmayan bir yöntem kullanılarak örnek alınması nedeniyle kistik fibrozis araştırmalarında sıklıkla kullanılmaktadır. Nazal sürüntülerden elde edilen nazal epitel hücreleri; %89,1 epitel (bazal, suprabazal, salgı, silli, seröz ve farklılaşmamış) hücrelerin yanında %6,2 immün ve %4,7 yerleşik hücre (düz kas, perisit, fibroblast ve endotelyal) popülasyonunu içermektedir [56].

Tez kapsamında nazal hücrelerden elde edilen RNA'lar ile ilk defa miRNA Array yöntemi gerçekleştirilmiş ve farklı algoritmalar içeren BRB-ArrayTool, TAC 4.0 ve MeV biyoinformatik programlar birbirleri ile karşılaştırılarak miRNA'lar saptanmıştır. BRB-ArrayTool' da elde edilen bütün miRNA'lar TAC 4.0 programında da saptanmış, fakat MeV programında ortak miRNA bulunmamıştır. Nadir hastalık çalışmalarında örneklem büyüklüğü, özellikle aynı mutasyona sahip ancak farklı klinik şiddete sahip kardeşlerde en büyük zorluklardan biridir. Biyoinformatik analiz sonuçlarında seçilen miRNA'ların qRT-PCR ile validasyonu gerçekleştirilmiş, iki sonuç için de miRNA ifadelerindeki kat artışlarının sayısal değerleri aynı olmasa da ifade artışı bakımından uyumluluk elde edilmiştir. Çünkü kullanılan biyoinformatik ve ham veri analiz yöntemleri bilgisayar tabanlı yöntemler olup farklı algoritmalar içermektedir. qRT-PCR ile validasyonu yönteminde ise hasta RNA'ları kullanılarak ifade artışları deneysel olarak gösterilmiştir. Fakat iki miRNA için de istatistiksel anlamlılık elde edilememiştir. Anlamlılık elde edilememesinin en büyük nedeninin hasta sayısının kısıtlı olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Çalışma kısıtlı hasta sayısı ile gerçekleştirilmiş olmasına rağmen ifade farklılığı gösteren genler ve işlevleri arasındaki korelasyon ile transkriptomik verilerin doğruluğu gösterilebilmiştir. Alt solunum yolunu temsil eden uygulanabilir bir model olan nazal epitel hücreleri ile elde edilen ön veriler kullanılarak, devam eden çalışmalarımız için nazal hücre kültürlerinin oluşturulması ile fonksiyonel çalışmalar için yeterli miktarda RNA ve protein üretilmesi planlanmaktadır.

Ağır ve hafif bireylerin karşılaştırılması sonucunda miR-145-5p' nin ağır hastalarda (3,32 kat) hafif bireylere göre artışı saptanmış fakat istatistiksel anlamlılık elde edilememiştir. Mutasyon sınıflarına göre ayırdığımızda ise miR-145-5p'nin Sınıf IV ağır seyirli hastada hafif seyirli hastalara göre ifadesinin arttığı (15,33 kat) saptanmış, fakat yine istatistiksel anlamlılık elde edilememiştir. Literatürde ağır ve hafif seyirli KF hasta bireylere ait miRNA profillerinin karşılaştırıldığı bir çalışma bulunmamaktadır. Gillien ve ark.'ları 2011 yılında CFTR 3' UTR bölgesine bağlanacak olası tüm miRNA'ları TargetScan programı ile analiz etmiş ve aday miRNA'lar arasında miR-145-5p'nin yüksek skor gösterdiğini saptamıştır [30]. Bizim çalışmamızda ise BRB-ArrayTool ve TAC 4.0 ile ham veri analizinde kullanılan programların sayısı arttırılarak analizler gerçekleştirilmiş, hedef gen analizinde ise 2

ayrı (miRWalk ve miRNET) program daha kullanılmıştır. Gillien ve ark.'larının sonuçlarından yola çıkarak Megiorni ve ark.'ları ise 2013 yılında yayınladıkları miR-145-5p'nin 18 KF hasta (en az 1 mutasyonu F508del olan) nazal örneklerinde kontrole göre arttığını göstermiş olup; hedeflediği SMAD3 geninin ifadesindeki azalmayı valide etmiştir [57]. Bizim çalışmamızda ise hasta bireyler; ağır/hafif ve sınıflar arası ağır hafif olarak gruplandırılmış olup; daha detaylı analizler gerçekleştirmiş ve miR-145-5p Sınıf IV grubunda tanımlanmıştır.

Kabir ve ark.'ları miR-145'in KF ve KF olmayan primer epitel hava yolu hücrelerinde (10 kat) ve bronkoalveolar lavaj sıvısında bulunan eksozomlarda (2 kat) kontrole göre arttığını göstermişlerdir [58]. Sultan ve ark.'ları, Kabir ve ark.'larının yaptığı çalışmadan yola çıkarak CFTR mRNA'sına bağlanan miR-145-5p'nin bağlanma bölgesi için bir peptid nükleik asit tasarlamış ve miRNA fonksiyonlarının inhibisyonunu Calu-3 hücre hatlarında gerçekleştirmiştir. miR-145-5p'nin inhibisyonu ile CFTR mRNA ve protein miktarında artış saptanmıştır [59]. Aynı ekip tarafından yayımlanan bir bildiride CFTR tedavisi için farklı mutasyon sınıfları göz önüne alındığında, miR-145'in baskılanmasının özellikle Sınıf IV (daha az işlev), Sınıf V (daha az protein) ve Sınıf VI (daha az kararlı protein) CFTR mutasyonları içeren hastalar için miR-145-5p'nin terapötik hedef olarak kullanılabileceği yorumlanmıştır [60]. Literatürde hücre hatları ile elde edilen veriler ile tez çalışması kapsamında kullanılan hasta nazal örneklerine ait sonuçların birbiri ile uyumlu olduğu dikkat çekmektedir.

Elde ettiğimiz bilgiler doğrultusunda, miR-145-5p ifadesinin Sınıf IV grubu mutasyon içeren hasta sayısı artırılarak araştırılması planlanmaktadır. miR-145-5p'nin potansiyel hedef genler üzerindeki etkilerinin araştırılması amacıyla ise; sentetik öncül miRNA'ların (oligomiRNA) veya miRNA inhibitörlerinin (anti-miRNA) nazal primer hücre hattına transfeksiyonu sonrasında CFTR ve olası diğer hedef genlerin ifadesi /yerleşiminin araştırılması, CFTR ve olası hedef genlerin görev aldıkları biyolojik yollara (klor kanal aktivitesi, inflamasyon, hücre ölümü vb.) ait işlevsel analizlerin gerçekleştirilmesi planlanmaktadır. Aynı zamanda miR-145-5p'nin hedef genleri ile oluşturulan yolak analizleri sonucunda farklı biyoinformatik programlarda ortak olarak belirlenmiş olan ErbB sinyal yolağını aydınlatmak üzere yeni araştırma projeleri hazırlanmaktadır. ErbB (epidermal büyüme faktörü reseptörü,

EGFR) ailesi, yapısal olarak ilişkili dört reseptör tirozin kinazdan oluşan bir ailedir. Literatürde ErbB sinyali, multipl skleroz ve Alzheimer Hastalığı gibi nörodejeneratif hastalıkların gelişimi ile ilişkilendirilmiştir. ErbB-1 ve ErbB-2 sinyalinde artış, çeşitli tümör türlerinin gelişimi ve malignitesinde saptanmıştır. Farelerde, ErbB ailesindeki sinyal değişikliği akciğerler, deri, kalp ve beyin dahil olmak üzere birçok etkide bulunmaktadır. Duan ve ark.'larının T84 hücre hatlarında EGF tarafından inhibe edilen K⁺ kanallarını ve apikal CFTR'nin aktivitesini ErbB tirozin kinaz inhibitörleri ile gerçekleştirmişlerdir [61].

Kistik fibrozis dışındaki solunum yolu hastalıklarında da (astım, alerjik rinit, kronik obstrüktif akciğer hastalığı) miR-145-5p'nin hastalara ait serum, plazma ve balgam örneklerinde sağlıklı kontrollere kıyasla artış gösterdiği saptanmıştır [62, 63] Aynı zamanda miR-145-5p ifadesinin çeşitli kanser türlerinde artış/azalış gösterdiği bulunmuştur [64-66].

Biyoinformatik analiz sonuçlarının gösterildiği Tablo 4.2'de, Sınıf IV ağır/hafif seyirli hasta bireylerin analizi sonucunda seçtiğimiz ve qRT-PCR ile valide ettiğimiz miR-145-5p dışında da ifadesi artan 4 miRNA (miR-146a-5p 16.01 kat, miR-193a-5p 13.51 kat, miR-25-3p 5.36 kat ve miR-223-3p 2.75 kat) dikkat çekmektedir. miR-145-5p hem bütün ağır/hafif hasta hem de Sınıf IV ağır/hafif hasta grubunda elde edildiği için seçilmiş olup, diğer miRNA'lar tez sonrası çalışmalar için aday miRNA olarak çalışılacaktır. Literatürde KF ve miR-193-5p ile miR-25-3p ilişkisi ile ilgili bir çalışmaya rastlanılmamış olup; ilk defa tez kapsamında tanımlanmıştır. Diğer 3 miRNA'nın (miR-144-5-5p, miR-146a-5p ve miR-223-3p) ortak hedef genleri araştırıldığında STAT1 genine ulaşılmıştır. STAT1 geninin yer aldığı yollardan olan JAK/STAT, MAPK ve NFkB sinyal yollarının yanında, STAT1'in EGFR/ErbB yolağında yer alan STAT1/STAT3 heterodimer yapısı ile ilişkilendirilebileceği düşünülmektedir [67].

Hasta ve kontrol bireylerin karşılaştırılması sonucunda biyoinformatik analizlerle miR-92a-3p'nin, BRB-ArrayTool (115,99 kat) ve TAC 4.0 (20,04 kat) programları ile kontrole göre arttığı saptanmış fakat qRT-PCR yöntemi sonrası istatistiksel anlamlılık elde edilememiştir. qRT-PCR sonuçları değerlendirilirken hasta bireyler mutasyon sınıflara göre ayrılmış ve ek analizler sonucunda miR-92a-3p

ifadesindeki artışın Sınıf II homozigot mutasyona (F508del/F508del) sahip Aile 3'e ait hasta bireylerde (4,14 kat) görüldüğü saptanmıştır ($p=0,004$, ek analiz sonucu Bulgular bölümünde bahsedilmemiştir). F508del homozigot mutasyonuna sahip KF hasta ve kontrol bireylerinin kan ve serum örneklerinde gerçekleştirilen bir çalışma sonucunda saptanan 10 miRNA arasından miR-92a-3p'nin qRT-PCR yöntemi ile artışı valide edilmiş fakat kontrol bireylerle yapılan kıyaslamada istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır [68].

Kistik fibrozis dışındaki solunum yolu hastalıklarında da (akut ve stabil kronik obstrüktif akciğer hastalığı) hasta serum örneklerinde sağlıklı bireylere göre daha yüksek miR-92a-3p ifadesi saptanmıştır [69]. Ek olarak miR-92a-3p'nin pankreas, mide, prostat, karaciğer ve kolon kanserleri için de olası bir biyobelirteç olabileceği yayınlanmıştır [70-72]

Literatürde KF hasta ve kontrol bireylerin karşılaştırılması sonucunda ifade değişikliği saptanan çok sayıda miRNA çalışması bulunmaktadır. Genelde Caco-2, 16HBE14o-, HEK293, Calu-3 hücre hatları, primer bronşiyal farklılaştırılmış hücre kültürü, KF ve sağlıklı primer trakeal ve primer bronşiyal hücre kültürleri kullanılarak miRNA'ların etkileri araştırılmıştır. Tez kapsamında yapılan ham veri analizlerinde miR-1246 ve miR-17-5p'nin bu miRNA'lar arasında yer aldığı bulunmuş olup, miR-17 hakkında insan dokularında bir çalışma bulunmamaktadır. Beta-ENaC transgenik fare ve sağlıklı fare primer bronşiyal hücre kültürü kullanılarak yapılan bir çalışmada, miR-17'nin ifadesindeki azalma ile IL-8 ifadesinin arttığı ve inflamasyonun tetiklendiği gösterilmiştir [73]. miR-1246'nın ise direkt CFTR'yi hedefleyerek insan vasküler düz kas hücrelerinde proliferasyonu, invazyonu ve farklılaşmayı düzenlediği saptanmıştır [74]. Hasta ve sağlıklı bireylerden oluşturulan primer bronşiyal hücre kültürleri ile gerçekleştirilen bir çalışmada, Activating Transcription Factor 6 (ATF6) genini doğrudan hedef alan miR-221'in ifade seviyesinin arttığı saptanmıştır. ATF6 doğru katlanmamış proteinleri yıkım yolağına yönlendirmektedir. Yıkıma uğrayamayan CFTR proteinini birikerek, ER stresini yaratmaktadır [75]. Benzer şekilde, miR-224-5p'nin de ifadesinin arttığı ve SMAD4'ü hedefleyerek TGF-beta sinyal yolağı aracılı IL-8 salınımını arttırdığı saptanmıştır [57]. Oglesby ve ark.'ları KF'li hastalardan oluşturulan primer bronşiyal hücre kültürlerinde miR-126'nın ifadesinin azaldığını bulmuştur. TLR2 ve TLR4 sinyal yollarının negatif düzenleyicisi olan

TOM1, miR-126'nın hedeflerinden birisi olup; immün yanıtın başlamasında rol almaktadır [76]. Farklı hücre modellerindeki çalışmalar sonucunda miR-155'in IL-8 aracılı inflamasyon yanıtında rol alan genleri ve akciğer fibrozunu hedeflediği bulunmuştur [77]. IL-8'in etkilendiği miRNA çalışmalarından bir diğeri olan bronşiyal ve trakeal örnekleri kullanarak yaptıkları çalışmada, hasta ve kontrol bireyleri arasında artan miR-145'in SMAD3'ü hedefleyerek IL-8 salınımını ve inflamasyonu tetiklediği gösterilmiştir [57]. Literatürde yayınlanan, hasta ve kontrol bireyleri arasında gerçekleştirilen tüm araştırmalar sonucunda ortak olarak inflamasyon yollarında görevli miRNA'ların tanımlandığı dikkat çekmektedir. Tez çalışması sonucunda ise miR-92a-3p'nin hedef genleri ve yolak analizi sonucunda KF patolojisi ile uyumlu p değerine göre anlamlılığı en yüksek yolağın apoptoz, içerdiği hedef gen sayısı açısından en fazla hedef gene sahip yolağın ise endositoz yolağı olduğu saptanmıştır.

Ağır/hafif, Sınıf IV ağır/hafif ve hasta/kontrol gruplarında artış saptadığımız miR-145-5p ve miR-92a-3p'nin hedef genlerinin KF PCR array sonuçlarında yer alıp almadığı araştırılmış ve öncelikli olarak ifadesi azalan hedef genler gruplandırılmıştır (Tablo 4.5 ve Tablo 4.7). miR-145-5p'nin hedeflediği 76 genin ve miR-92a-3p'nin hedeflediği 66 genin KF PCR Array'de yer aldığı tanımlanmış ve ifadelerinde azalış saptanan genler ile yolak analizi gerçekleştirilmiştir. miR-145-5p'nin ifadesi azalan 19 geni ile yapılan yolak analizi sonucunda p değeri en yüksek IL-17 sinyal yolağı, miR-92a-3p'nin ifadesi azalan 11 gen ile yapılan yolak analizi sonucunda ise p değeri en yüksek kan akışı ve ateroskleroz yolağı tanımlanmıştır. IL-17 sinyal yolağının ise hem akut hem de kronik inflamatuvar yanıtlarda ve epitel hücreleri hücre dışı patojenlere karşı korumada önemli role sahip olduğu bilinmektedir. İleriki çalışmalarda miR-145-5p'nin diğer hedef genlerinin ifadesi araştırılarak kistik fibrozis hastalığında IL-17 sinyal yolağına bağlı olarak artan nötrofil göçünün ve infiltrasyonunun aydınlatılması amaçlanmaktadır [78].

Son yıllarda yapılan çalışmalarla miRNA ifadelerindeki artışın, hedefledikleri genlerin ifadelerinde de artışa sebep olabileceği gösterilmiştir [79]. DNA metilasyonu (DNA metiltransferazlar) ve histon modifikasyonu (histon deasetilazlar) gibi epigenetik kontrol basamaklarında yer alan genlerin miRNA aracılı ifade değişimi sonucunda, metilasyon ve kromatin modifikasyonlarının değiştiği ve bu durumun

RNA polimerazların hedef gene bağlanabilmesini kolaylaştırdığı yayınlanmıştır [80]. Böylece azalan metilasyon ve kromatin modifikasyonları sebebiyle hedef gen ifadelerinde artış gözlenebilmektedir [81].

Xiao ve ark.'ları tarafından gerçekleştirilen bir diğer çalışmada ise miRNA'ların çekirdekte enhancer bölgelere bağlanarak hedef genlerin ifadelerini arttırdığı gösterilmiştir [82]. Tez kapsamında miR-145-5p'nin artan hedef genleri ile yolak analizi gerçekleştirildiğinde diyabetik komplikasyonlarda AGE-RANGE yolağı, insülin direnci ve kan akış gerilimi ve aterosklerozis saptanmıştır (FDR $\leq$ 0,05, ek analiz sonucu Bulgular bölümünde bahsedilmemiştir). Bu yolaklar fenotipi modifiye edici genler ile gerçekleştirdiğimiz çalışmamızda elde ettiğimiz ve karaciğer şiddeti arttıkça ifadesi değişen yolaklar ile örtüşmektedir [4]. miR-92a-3p'nin artan hedef genleri ile yolak analizi gerçekleştirildiğinde ise TNF ve diyabetik komplikasyonlarda AGE-RANGE yolağının KF patolojisi ile uyumlu oldukları saptanmıştır (ek analiz sonucu Bulgular bölümünde bahsedilmemiştir).

Gerçekleştirilen bu tez çalışması doğrultusunda, ağır ve hafif seyir gösteren hasta kardeşler arasındaki klinik ciddiyet farkına sebep olabilecek miRNA'lar saptanmış ve hedef genleri ile ilişkili yolaklar aydınlatılmıştır. Literatürde Sınıf IV grubunun klinik ciddiyet açısından karşılaştırıldığı bir çalışma bulunmayıp tez çalışması bu çıktılar doğrultusunda özgün bir çalışmadır. Tez çıktıları ileriki dönemde, tedavi için yeni hedef miRNA'ların geliştirilmesine ve elde edilen adayların hem prognostik hem de terapötik biyobelirteç olarak kullanılmalarına olanak sağlayabilecektir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

6.1. Sonuçlar

Gerçekleştirilen tez çalışması kapsamında, aşağıdaki sonuçlar elde edilmiştir.

- miRNA ham veri analizi sonucuna göre BRB-ArrayTool ve TAC 4.0 programlarının benzer miRNA adaylarını gösterdiği saptandı.
- miR-145-5p ağır hastalarda (4,44 kat) ve Sınıf IV ağır hastada (14,43 kat) hafif seyirli hasta grubuna göre artış gösteren miRNA olarak saptandı, qRT-PCR sonrası istatistiksel olarak anlamlılık elde edilemedi.
- Sınıf II ve Sınıf III ağır seyirli hasta grubunda kat değişimi gösteren miRNA tanımlanmadı.
- Sınıf IV grubunda miR-145-5p'in yanı sıra ifadesi artan 4 miRNA (miR-146a-5p, miR-193a-5p, miR-25-3p, miR-223-3p) daha tanımlandı.
- miR-145-5p'nin hedef genlerine ait yolak analizi sonucunda klinik ciddiyet ile ilişkilendirilebilen ve ortak olarak elde edilen ErbB sinyal yolağı tanımlandı.
- Kistik fibrozis hasta grubunda miR-92a-3p (1,99 kat), kontrol grubuna göre artış gösteren miRNA olarak saptandı, qRT-PCR sonrası istatistiksel olarak anlamlılık elde edilemedi..
- miR-92a-3p'nin hedef genlerine ait yolak analizi sonucunda klinik ciddiyet ile ilişkilendirilebilecek, p değeri anlamlılığına göre apoptoz ve en çok geni içeren yolak olarak ise endositoz saptandı.
- miR-145-5p ve miR-92a-3p'ye ait hedef genlerin ortak kesişim kümesi oluşturuldu. Hedef genlere ait yolak analizi sonucunda endositoz, TGF-beta sinyal yolağı, ErbB sinyal yolağı, aktin hücre iskeletinin düzenlenmesi, epitel hücrelere bakteri invazyonu yolağı ve MAPK sinyal yolakları saptandı.
- Elde edilen miRNAların hedef genlerinin KF PCR Array'de olma durumu araştırıldı ve miR145-5p için hedef 76 gen, miR-92a-3p için hedef 66 gen tanımlandı. miRNA hedef genleri ve KF Array'deki hedef genler ile yapılan yolak analizleri sonucunda iki miRNA'nın ortak hedefi olarak anlamlı İnfluenza A, miR92a-3p'nin ise Apoptoz yolağı saptandı.

6.2. Öneriler

- Tez kapsamında belirlenen miR-145-5p'in potansiyel hedef genler üzerindeki etkilerinin araştırılması amacıyla Sınıf IV mutasyonu içeren hasta sayısı arttırılacaktır. Aynı zamanda Sınıf IV grubu mutasyona sahip hastalarda nazal sürüntü örnekleri alınarak nazal primer hücre kültürü oluşturulacaktır. Artış saptadığımız miR-145-5p'nin ifadesi, nazal hücre kültürlerinde anti-miR yardımı ile baskılanacak ve miR-145-5p'nin hedef genlerinin (ErbB ve IL-17 yolaklarında yer alan genler arasından hedefler seçilecektir) ifadesinin artıp artmadığı araştırılacaktır. Seçilen yolaklar ile ilişkili olarak detaylı işlevsel analizler gerçekleştirilecektir.
- Sınıf IV ağır/hafif grubunda miR-145-5p yanı sıra ifadesi artan diğer miRNA'ların (miR-146a-5p, miR-193a-5p, miR25-3p ve miR-223-3p) ortaklık analizi sonucunda; miR-145-5p, miR-146a-5p ve miR-223-3p'nin STAT1 genini hedeflediği bulunmuştur. miR-146a-5p, miR-223-3p ve hedef gen olan STAT1 ifadelerinin Sınıf IV grubunda araştırılması planlanmaktadır.
- Tez kapsamında kullanılan hasta ve kontrol bireylere ait serumlar izole edilmiş olup; Hacettepe Üniversitesi Nadir hastalıklar Biyobankasında saklanmaktadır. Seçilen miRNA'ların eksozomlar aracılığıyla taşınıp taşınmadığının araştırılması planlanmaktadır. Dolaşımdaki varlığı gösterilebilen miRNA'lar ileride hastalığın seyri ve tedavisi açısından biyobelirteç olma özelliğine sahip olabilecektir.
- miR-92a-3p ve miR-145-5p'nin genomik dizilerindeki varyasyonlar miRNA gen dizilemesi ile araştırılacak ve hastalık durumunda bu miRNA ifadelerindeki değişimlerin genomik varyasyonlardan kaynaklı olup olmadığı belirlenecektir.
- miR-92a-3p ve miR-145-5p ifadesi diğer solunum yolu hastalıklarında da (IPF ve PCD) araştırılacaktır. Literatürde PCD hastalığı için bu iki miRNA hakkında çalışılma bulunmamaktadır. miR-92a-3p'nin ise akciğer fibrozunda etkili olabileceğini düşünen bir çalışma, tez kapsamında hasta örnekleriyle desteklenmiş olup ileriki çalışmalar için yeni bir araştırma konusu olabilecek durumdadır.

7. KAYNAKLAR

1. Navarro, S., [Historical compilation of cystic fibrosis]. *Gastroenterol Hepatol*, 2016. 39(1): p. 36-42.
2. Mall, M.A. and D. Hartl, CFTR: cystic fibrosis and beyond. *Eur Respir J*, 2014. 44(4): p. 1042-54.
3. O'Riordan, S.M., et al., Management of cystic fibrosis-related diabetes in children and adolescents. *Pediatr Diabetes*, 2009. 10 Suppl 12: p. 43-50.
4. Dayangac-Erden, D., et al., Mutations of the CFTR gene and novel variants in Turkish patients with cystic fibrosis: 24-years experience. *Clin Chim Acta*, 2020. 510: p. 252-259.
5. Kreda, S.M., et al., Characterization of wild-type and deltaF508 cystic fibrosis transmembrane regulator in human respiratory epithelia. *Mol Biol Cell*, 2005. 16(5): p. 2154-67.
6. Rutland, J. and P.J. Cole, Nasal mucociliary clearance and ciliary beat frequency in cystic fibrosis compared with sinusitis and bronchiectasis. *Thorax*, 1981. 36(9): p. 654-8.
7. Rey, M.M., M.P. Bonk, and D. Hadjiliadis, Cystic Fibrosis: Emerging Understanding and Therapies. *Annu Rev Med*, 2019. 70: p. 197-210.
8. Cipolli, M., et al., Pancreatic phenotype in infants with cystic fibrosis identified by mutation screening. *Arch Dis Child*, 2007. 92(10): p. 842-6.
9. Madacsy, T., P. Pallagi, and J. Maleth, Cystic Fibrosis of the Pancreas: The Role of CFTR Channel in the Regulation of Intracellular Ca(2+) Signaling and Mitochondrial Function in the Exocrine Pancreas. *Front Physiol*, 2018. 9: p. 1585.
10. Colombo, C., et al., Dietary and circulating polyunsaturated fatty acids in cystic fibrosis: are they related to clinical outcomes? *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 2006. 43(5): p. 660-5.
11. Lindblad, A., H. Glaumann, and B. Strandvik, Natural history of liver disease in cystic fibrosis. *Hepatology*, 1999. 30(5): p. 1151-8.
12. Sun, X., et al., Gastrointestinal pathology in juvenile and adult CFTR-knockout ferrets. *Am J Pathol*, 2014. 184(5): p. 1309-22.
13. O'Brien, S., et al., Intestinal bile acid malabsorption in cystic fibrosis. *Gut*, 1993. 34(8): p. 1137-41.
14. De Lisle, R.C. and D. Borowitz, The cystic fibrosis intestine. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 2013. 3(9): p. a009753.
15. Betapudi, B., A. Aleem, and J.P. Kothadia, Cystic Fibrosis And Liver Disease, in *StatPearls*. 2021: Treasure Island (FL).
16. Kobelska-Dubiel, N., B. Klineciewicz, and W. Cichy, Liver disease in cystic fibrosis. *Prz Gastroenterol*, 2014. 9(3): p. 136-41.
17. Yu, J., et al., CFTR mutations in men with congenital bilateral absence of the vas deferens (CBAVD): a systemic review and meta-analysis. *Hum Reprod*, 2012. 27(1): p. 25-35.
18. Hunt, J.F., C. Wang, and R.C. Ford, Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (ABCC7) structure. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 2013. 3(2): p. a009514.

19. Sheppard, D.N. and M.J. Welsh, Structure and function of the CFTR chloride channel. *Physiol Rev*, 1999. 79(1 Suppl): p. S23-45.
20. Bertrand, C.A. and R.A. Frizzell, The role of regulated CFTR trafficking in epithelial secretion. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2003. 285(1): p. C1-18.
21. Simon, S., et al., Small Hsps as Therapeutic Targets of Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator Protein. *International Journal of Molecular Sciences*, 2021. 22(8).
22. Cystic Fibrosis Mutation Database.2021[Erişim tarihi: 25 Temmuz 2021]. Erişim adresi: <http://www.genet.sickkids.on.ca/>
23. Cystic Fibrosis News Today. Types of CFTR mutations. 2021 [Erişim tarihi: 25 Temmuz 2021]. Erişim adresi: <https://cysticfibrosisnewstoday.com/types-of-cftr-mutations/?cn-reloaded=1>.
24. Rang, C., Kotsimbos, T., & Wilson, J. , Overview of CFTR Modulators and Gene Therapy. *Cystic Fibrosis - Heterogeneity And Personalized Treatment*, 2020.
25. Macfarlane, L.A. and P.R. Murphy, MicroRNA: Biogenesis, Function and Role in Cancer. *Curr Genomics*, 2010. 11(7): p. 537-61.
26. O'Brien, J., et al., Overview of MicroRNA Biogenesis, Mechanisms of Actions, and Circulation. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2018. 9: p. 402.
27. miRBase. Mirbase.org [Internet]. 2021 [Erişim tarihi: 25 Temmuz 2021]. Erişim adresi: <http://www.mirbase.org/>.
28. Bader, A.G., D. Brown, and M. Winkler, The promise of microRNA replacement therapy. *Cancer Res*, 2010. 70(18): p. 7027-30.
29. Glasgow, A.M.A., C. De Santi, and C.M. Greene, Non-coding RNA in cystic fibrosis. *Biochem Soc Trans*, 2018. 46(3): p. 619-630.
30. Gillen, A.E., et al., MicroRNA regulation of expression of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene. *Biochem J*, 2011. 438(1): p. 25-32.
31. Sabrina N., T.L., Emerging Roles of microRNAs in Cystic Fibrosis — From Pathogenesis to Development of New Therapies. *Cystic Fibrosis in the Light of New Research*, 2015.
32. Megiorni, F., et al., Synergistic post-transcriptional regulation of the Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator (CFTR) by miR-101 and miR-494 specific binding. *PLoS One*, 2011. 6(10): p. e26601.
33. Ramachandran, S., et al., Post-transcriptional regulation of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator expression and function by microRNAs. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2013. 49(4): p. 544-51.
34. Raisch, J., A. Darfeuille-Michaud, and H.T. Nguyen, Role of microRNAs in the immune system, inflammation and cancer. *World J Gastroenterol*, 2013. 19(20): p. 2985-96.
35. Tirouvanziam, R., et al., Inflammation and infection in naive human cystic fibrosis airway grafts. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2000. 23(2): p. 121-7.
36. Rosenfeld, M., et al., Early pulmonary infection, inflammation, and clinical outcomes in infants with cystic fibrosis. *Pediatr Pulmonol*, 2001. 32(5): p. 356-66.
37. Oglesby, I.K., et al., miR-126 Is Downregulated in Cystic Fibrosis Airway Epithelial Cells and Regulates TOM1 Expression. *Journal of Immunology*, 2010. 184(4): p. 1702-1709.

38. Rao, J.R., et al., Non-coding small (micro) RNAs of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from clinical isolates from adult patients with cystic fibrosis. *Br J Biomed Sci*, 2010. 67(3): p. 126-32.
39. Tsuchiya, M., et al., Differential regulation of inflammation by inflammatory mediators in cystic fibrosis lung epithelial cells. *J Interferon Cytokine Res*, 2013. 33(3): p. 121-9.
40. Bhattacharyya, S., et al., Regulation of miR-155 biogenesis in cystic fibrosis lung epithelial cells: antagonistic role of two mRNA-destabilizing proteins, KSRP and TTP. *Biochem Biophys Res Commun*, 2013. 433(4): p. 484-8.
41. Voynow, J.A., B.M. Fischer, and S. Zheng, Proteases and cystic fibrosis. *Int J Biochem Cell Biol*, 2008. 40(6-7): p. 1238-45.
42. Martin, S.L., et al., Association of airway cathepsin B and S with inflammation in cystic fibrosis. *Pediatr Pulmonol*, 2010. 45(9): p. 860-8.
43. Weldon, S., et al., miR-31 dysregulation in cystic fibrosis airways contributes to increased pulmonary cathepsin S production. *Am J Respir Crit Care Med*, 2014. 190(2): p. 165-74.
44. Tabrizi, Z.P. and M.S. Jami, Selection of suitable bioinformatic tools in micro-RNA research. *Gene Reports*, 2020. 21.
45. Akhtar, M.M., et al., Bioinformatic tools for microRNA dissection. *Nucleic Acids Res*, 2016. 44(1): p. 24-44.
46. Biometric Research Program (BRP). Available from: <https://brb.nci.nih.gov/BRB-ArrayTools/>.
47. Tools.thermofisher.com. 2021 [Erişim tarihi: 25 Temmuz 2021]. Erişim adresi: https://tools.thermofisher.com/content/sfs/brochures/tac_software_datasheet.pdf.
48. MeV 4.9.0 – Multiple Experiment Viewer My Biosoftware – Bioinformatics Softwares Blog. 2021[Erişim tarihi: 25 Temmuz 2021]. Erişim adresi: <https://mybiosoftware.com/mev-4-6-2-multiple-experiment-viewer.html>.
49. Thomson, D.W., C.P. Bracken, and G.J. Goodall, Experimental strategies for microRNA target identification. *Nucleic Acids Res*, 2011. 39(16): p. 6845-53.
50. Bartel, D.P., MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell*, 2009. 136(2): p. 215-33.
51. Dweep, H., et al., miRWalk--database: prediction of possible miRNA binding sites by "walking" the genes of three genomes. *J Biomed Inform*, 2011. 44(5): p. 839-47.
52. Dweep, H. and N. Gretz, miRWalk2.0: a comprehensive atlas of microRNA-target interactions. *Nat Methods*, 2015. 12(8): p. 697.
53. Xu, T., et al., miRBaseConverter: an R/Bioconductor package for converting and retrieving miRNA name, accession, sequence and family information in different versions of miRBase. *BMC Bioinformatics*, 2018. 19(Suppl 19): p. 514.
54. Wang, J., et al., WebGestalt 2017: a more comprehensive, powerful, flexible and interactive gene set enrichment analysis toolkit. *Nucleic Acids Res*, 2017. 45(W1): p. W130-W137.
55. Du, J., et al., KEGG-PATH: Kyoto encyclopedia of genes and genomes-based pathway analysis using a path analysis model. *Mol Biosyst*, 2014. 10(9): p. 2441-7.

56. Deprez, M., et al., A Single-Cell Atlas of the Human Healthy Airways. *Am J Respir Crit Care Med*, 2020. 202(12): p. 1636-1645.
57. Megiorni, F., et al., Elevated levels of miR-145 correlate with SMAD3 down-regulation in cystic fibrosis patients. *J Cyst Fibros*, 2013. 12(6): p. 797-802.
58. Dutta, R.K., et al., A Neutralizing Aptamer to TGFBR2 and miR-145 Antagonism Rescue Cigarette Smoke- and TGF-beta-Mediated CFTR Expression. *Mol Ther*, 2019. 27(2): p. 442-455.
59. Sultan, S., et al., A Peptide Nucleic Acid (PNA) Masking the miR-145-5p Binding Site of the 3'UTR of the Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator (CFTR) mRNA Enhances CFTR Expression in Calu-3 Cells. *Molecules*, 2020. 25(7).
60. Finotti, A., Gasparello, J., Fabbri, E., Tamanini, A., Corradini, R., & Dechecchi, M. et al., Enhancing the Expression of CFTR Using Antisense Molecules against MicroRNA miR-145-5p. *American Journal Of Respiratory And Critical Care Medicine*, 2019. 199(11): p. 1443-1444.
61. Duan, T., et al., Intestinal epithelial potassium channels and CFTR chloride channels activated in ErbB tyrosine kinase inhibitor diarrhea. *JCI Insight*, 2019. 4(4).
62. Panganiban, R.P., et al., Circulating microRNAs as biomarkers in patients with allergic rhinitis and asthma. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 2016. 137(5): p. 1423-1432.
63. Lacedonia, D., et al., Expression profiling of miRNA-145 and miRNA-338 in serum and sputum of patients with COPD, asthma, and asthma-COPD overlap syndrome phenotype. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis*, 2017. 12: p. 1811-1817.
64. Tang, W., et al., miR-145-5p Suppresses Breast Cancer Progression by Inhibiting SOX2. *Journal of Surgical Research*, 2019. 236: p. 278-287.
65. Zhou, K., et al., MiR-145-5p suppresses the proliferation, migration and invasion of gastric cancer epithelial cells via the ANGPT2/NOD_LIKE_RECEPTOR axis. *Cancer Cell International*, 2020. 20(1).
66. Ozen, M., et al., Overexpression of miR-145-5p Inhibits Proliferation of Prostate Cancer Cells and Reduces SOX2 Expression. *Cancer Investigation*, 2015. 33(6): p. 251-258.
67. Han, W., et al., STAT1 Gene Expression Is Enhanced by Nuclear EGFR and HER2 via Cooperation With STAT3. *Molecular Carcinogenesis*, 2013. 52(12): p. 959-969.
68. Ideozu, J.E., et al., Microarray profiling identifies extracellular circulating miRNAs dysregulated in cystic fibrosis. *Sci Rep*, 2019. 9(1): p. 15483.
69. Shen, Y., H. Lu, and G. Song, MiR-221-3p and miR-92a-3p enhances smoking-induced inflammation in COPD. *J Clin Lab Anal*, 2021. 35(7): p. e23857.
70. Zhu, S., et al., MicroRNA92a3p inhibits the cell proliferation, migration and invasion of Wilms tumor by targeting NOTCH1. *Oncol Rep*, 2018. 40(2): p. 571-578.
71. Yang, B., et al., High-metastatic cancer cells derived exosomal miR92a-3p promotes epithelial-mesenchymal transition and metastasis of low-metastatic

- cancer cells by regulating PTEN/Akt pathway in hepatocellular carcinoma. *Oncogene*, 2020. 39(42): p. 6529-6543.
72. Yamada, N.O. and T. Senda, Circulating microRNA-92a-3p in colorectal cancer: a review (Feb, 10.1007/s00795-021-00282-w, 2021). *Medical Molecular Morphology*, 2021.
 73. Oglesby, I.K., et al., miR-17 overexpression in cystic fibrosis airway epithelial cells decreases interleukin-8 production. *Eur Respir J*, 2015. 46(5): p. 1350-60.
 74. Pan, D., et al., MicroRNA-1246 regulates proliferation, invasion, and differentiation in human vascular smooth muscle cells by targeting cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR). *Pflugers Arch*, 2021. 473(2): p. 231-240.
 75. Bardin, P., et al., Emerging microRNA Therapeutic Approaches for Cystic Fibrosis. *Front Pharmacol*, 2018. 9: p. 1113.
 76. Oglesby IK, B.I., Chotirmall SH, Stallings RL, O'Neill SJ, McElvaney NG, Greene CM., miR-126 is downregulated in cystic fibrosis airway epithelial cells and regulates TOM1 expression. *J Immunol*, 2010. 15(4): p. 1702-9.
 77. Bhattacharyya, S., et al., Elevated miR-155 promotes inflammation in cystic fibrosis by driving hyperexpression of interleukin-8. *J Biol Chem*, 2011. 286(13): p. 11604-15.
 78. Brodlie, M., et al., Raised interleukin-17 is immunolocalised to neutrophils in cystic fibrosis lung disease. *European Respiratory Journal*, 2011. 37(6): p. 1378-1385.
 79. De Palma, F.D.E., et al., The Multifaceted Roles of MicroRNAs in Cystic Fibrosis. *Diagnostics (Basel)*, 2020. 10(12).
 80. Arif, K.M.T., et al., Regulatory Mechanisms of Epigenetic miRNA Relationships in Human Cancer and Potential as Therapeutic Targets. *Cancers*, 2020. 12(10).
 81. Bianchi, M., et al., Coordinated Actions of MicroRNAs with other Epigenetic Factors Regulate Skeletal Muscle Development and Adaptation. *Int J Mol Sci*, 2017. 18(4).
 82. Xiao, M., et al., MicroRNAs activate gene transcription epigenetically as an enhancer trigger. *Rna Biology*, 2017. 14(10): p. 1326-1334.

8. EKLER

EK-1: Tez çalışması ile ilgili Etik Kurul İzni.



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

Sayı : 16969557-1053

Konu :

ARAŞTIRMA PROJESİ DEĞERLENDİRME RAPORU

Toplantı Tarihi : 01 EYLÜL 2020 SALI
Toplantı No : 2020/14
Proje No : GO 16/478(Onay Tarihi : 13.07.2016)
Karar No : 2020/14-08

Kurulumuzun 13.07.2016 tarihli toplantısında GO 16/478 kayıt numarası ile onaylanmış olan, Üniversitemiz Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Anabilim Dalı öğretim üyelerinden Doç. Dr. Didem Dayangaç ERDEN'in sorumlu araştırmacı olduğu, Prof. Dr. Nural KİPER, Prof. Dr. H. Uğur ÖZÇELİK, Prof. Dr. Deniz Doğru ERSÖZ, Prof. Dr. Ebru Güneş YALÇIN, Doç. Dr. Nagehan EMİRALIOĞLU, Uzm. Dr. Gökçen Dilşa TUĞCU ile birlikte çalışacakları, GO 16/478 kayıt numaralı ve "*Kistik Fibrozis Hastalarında Fenotipik Farklılığı Açıklamaya Yönelik MikroRNA'ların Belirlenmesi ve İşlevlerinin Araştırılması*" başlıklı proje için vermiş olduğunuz araştırmacı değişikliği, protokol revizyonu ve süre uzatma dilekçeniz incelenmiş olup, projedeki miRNA analizi ve hedef genlerin sınıflandırılmasını içeren alt iş paketinden Merve ATALAY'ın "*Kistik Fibrozis Patogenezinde Aday miRNA ve Hedef Genlerinin Biyoinformatik Araçlarla Tanımlanması*" başlıklı yüksek lisans tezinin hazırlanması etik açıdan **uygun bulunmuştur**. Projenin yardımcı araştırmacılarından Uzm. Dr. Gökçen Dilşa TUĞCU'nun projeden ayrılması ve Üniversitemiz Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı öğretim elemanlarından Merve ATALAY'ın yardımcı araştırmacı olarak proje ekibine dahil edilmesi uygun bulunmuş ve kayıtlarımıza eklenmiştir. Projenin yeni sonlanım tarihi 02 Eylül 2021 olarak belirlenmiştir. Çalışma tamamlandığında sonuçlarını içeren bir rapor örneğinin Etik Kurulumuza gönderilmesi gerekmektedir.

- | | | | |
|------------------------------|----------|-------------------------------------|-------|
| 1. Prof. Dr. Ayşe Lale DOĞAN | (Başkan) | 7. Doç. Dr. Nüket Paksoy ERBASINDAR | (Üye) |
| 2. Prof. Dr. G. Burçay AYDIN | (Üye) | 8. Doç. Dr. Betül Çelebi SALTIK | (Üye) |
| 3. Prof. Dr. M. Özgür UYANIK | (Üye) | 9. Doç. Dr. Hande Güneş DENİZ | (Üye) |
| 4. Prof. Dr. Ayşe Kin İŞLER | (Üye) | 10. Dr. Öğr. Üyesi Müge DEMİR | (Üye) |
| 5. Doç. Dr. H. Tuna Çak ESEN | (Üye) | 11. Av. Serap MORALIOĞLU | (Üye) |
| 6. Doç. Dr. Can Ebru KURT | (Üye) | | |

EK-2: miR-145-5p'nin hedef genlerinin ve hedef genlere ait yolakların miRWalk ve miRNET ile analiz sonuçları.

miR-145-5p			
	Hedef gen sayısı	Yolak adı	p değeri
miRWalk	308	Kanser ilişkili yolaklar	7,90E+01
	127	Axon guidance	1,73E+04
	143	Wnt sinyal yolu	8,82E+06
	173	Endositoz	1,82E+08
	194	Aktin hücre iskeletinin düzenlenmesi	3,57E+08
	85	ErbB sinyal yolu	2,80E+09
	92	Fc gama R aracılı fagositoz	3,21E+09
	124	Ubikuitin aracılı proteoliz	5,26E+09
	55	Hedgehog sinyal yolu	5,73E+09
	72	Kronik miyeloid lösemi	6,87E+09
	54	Bazal hücreli karsinoma	7,04E+09
	71	Aritmojenik sağ ventriküler kardiyomiyopati ARVC	8,27E+09
	84	Prostat kanseri	0,000126222595733025
	127	İnsülin sinyal yolu	0,000213142376286157
miRNET	13	Kronik miyeloid lösemi	2,31E-09
	25	Kanser ilişkili yolaklar	2,67E-09
	12	Pankreas kanseri	1,33E-08
	17	HTLV-I enfeksiyonu	6,22E-07
	11	TGF-beta sinyal yolu	1,10E-06
	10	Melanoma	1,20E-06
	13	Hücre döngüsü	1,50E-06
	7	Mesane kanseri	1,60E-06
	9	Glioma	7,10E-06
	10	ErbB sinyal yolu	1,20E-05
	9	Adheren bağlantılar	1,30E-05
	7	Böbrek hücreli karsinom	0,00024
	13	Fokal adezyon	0,00026
	6	mTOR sinyal yolu	0,00032
	8	Prostat kanseri	0,00045
	6	Kolorektal kanser	0,00052
	7	p53 sinyal yolu	0,00052
	6	Küçük hücreli olmayan akciğer kanseri	0,00071
	5	Helicobacter pylori enfeksiyonunda epitel hücre sinyali	0,00098
	14	MAPK sinyal yolu	0,00121
	5	Endometriyal kanser	0,00216
	4	Tiroid kanseri	0,00261
	8	Axon guidance	0,00325
	7	GnRH sinyal yolu	0,00349
	8	Wnt sinyal yolu	0,0107
	7	Osteoklast farklılaşması	0,0124
	3	Hipertrofik kardiyomiyopati (HCM)	0,0151
	6	Toll benzeri reseptör sinyal yolu	0,0162
	4	Notch sinyal yolu	0,0168
	3	Viral miyokardit	0,0168
	2	Otoimmün tiroid hastalığı	0,0178
	6	Hepatit C	0,0185

5	VEGF sinyal yolu	0,0216
3	IgA üretimi için bağırsak bağışıklık ağı	0,0225
2	Dorso-ventral eksen oluşumu	0,0255
4	Akut miyeloid lösemi	0,0317
8	Aktin hücre iskeletinin düzenlenmesi	0,0377
5	Chagas hastalığı (Amerikan tripanosomiasisi)	0,0393
5	Epstein-Barr virüsü enfeksiyonu	0,0426
6	Nörotrofin sinyal yolu	0,045
2	Fenilalanin metabolizması	0,049



EK-3: miR-92a-3p'nin hedef genlerinin ve hedef genlere ait yolakların miRWalk ve miRNET ile analiz sonuçları.

miR-92a-3p			
	Hedef gen sayısı	Yolak adı	P değeri
miRWalk	120	Axon guidance	8,44E-08
	284	Kanser ilişkili yolaklar	4,22E-07
	71	Kronik miyeloid lösemi	6,89E-06
	62	Glioma	1,30E-05
	80	Apoptoz	4,33E-05
	99	T hücre reseptörü sinyal yolu	5,65E-05
	162	Endositoz	5,82E-05
	51	Küçük hücreli olmayan akciğer kanseri	0,000184193
	78	Kolorektal kanser	0,000186945
miRNET	30	Hücre döngüsü	8,72E-08
	25	RNA taşıma	4,50E-05
	44	Kanser ilişkili yolaklar	0,00042
	15	Salmonella enfeksiyonu	0,0009
	13	RNA bozulması	0,00133
	14	p53 sinyal yolu	0,00149
	8	Tiroid kanseri	0,00179
	16	Prostat kanseri	0,00245
	10	Valin, lösin ve izolösin yıkımı	0,00326
	15	TGF-beta sinyal yolu	0,00444
	10	Notch sinyal yolu	0,0054
	8	Patojenik Escherichia coli enfeksiyonu	0,00796
	15	Epstein-Barr virüsü enfeksiyonu	0,00947
	9	Lizin bozulması	0,0163
	26	HTLV-I enfeksiyonu	0,0179
	12	Kronik miyeloid lösemi	0,0197
	11	Glioma	0,0204
	9	Kolorektal kanser	0,0211
	7	Sistein ve metionin metabolizması	0,0224
	9	Küçük hücreli olmayan akciğer kanseri	0,0301
	11	Pankreas kanseri	0,0306
	13	ErbB sinyal yolu	0,0321
	5	Propanoat metabolizması	0,0347
	15	İnfluenza A	0,0372
	8	Şigelloz	0,0434
	9	Epitel hücrelere bakteri invazyonu	0,0459

EK-4. Tez Orijinallik Ekran Görüntüsü

TEZİN TAM BAŞLIĞI: Kistik Fibrozis Patogenezinde Aday miRNA ve Hedef Genlerinin Biyoinformatik Araçlarla Tanımlanması

ÖĞRENCİNİN ADI SOYADI: MERVE ATALAY

DOSYANIN TOPLAM SAYFASI: 54

Eşleşmelere Genel Bakış			×
%9			
<		>	
1	jag.journalagent.com İnternet Kaynağı	%2	>
2	Hacettepe University' n... Öğrenci Yazılı Ödevi	%2	>
3	www.openaccess.hace... İnternet Kaynağı	%1	>
4	openaccess.hacettepe.... İnternet Kaynağı	%1	>
5	mts.intechopen.com İnternet Kaynağı	%<1	>
6	www.istanbulsaglik.go... İnternet Kaynağı	%<1	>
7	www.kistikfibrozisturki... İnternet Kaynağı	%<1	>
8	Jingyao Wang, Chundu... Yayın	%<1	>

EK-5. Dijital Makbuz



Digital Receipt

This receipt acknowledges that Turnitin received your paper. Below you will find the receipt information regarding your submission.

The first page of your submissions is displayed below.

Submission author: Merve Atalay
Assignment title: MerveTez
Submission title: Merve Atalay Tez
File name: MERVE_ATALAY_YL_TEZ.docx
File size: 1.84M
Page count: 54
Word count: 10,560
Character count: 73,433
Submission date: 08-Aug-2021 05:23PM (UTC+0300)
Submission ID: 1629069485



9. ÖZGEÇMİŞ

