



T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



DOKTORA TEZİ

***SİSTEMİK LUPUS ERİTEMATOZUS HASTALARINDA
SİTOKİNLERİN GEN ANLATIMI VE miRNA'LAR
ARASINDAKİ İLİŞKİNİN ARAŞTIRILMASI***

Farinaz JAFARI GHODS

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Moleküler Biyoloji ve Genetik Programı

Danışman

Prof. Dr. Nazlı ARDA

II. Danışman

Prof. Dr. Ayşegül TOPAL SARIKAYA

Haziran, 2014

İSTANBUL

Bu çalışma 04/06/2014 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı Moleküler Biyoloji ve Genetik programında Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

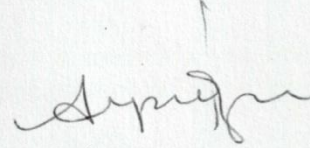
Tez Jürisi:



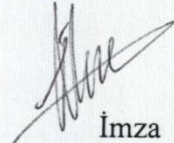
İmza
Prof. Dr. Nazlı ARDA (Danışman)
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi



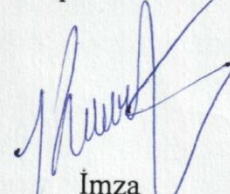
İmza
Prof. Dr. Nermin GÖZÜKIRMIZI
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi



İmza
Prof. Dr. Ayşe ÖZER
Marmara Üniversitesi
Tıp Fakültesi



İmza
Prof. Dr. Selma YILMAZER
İstanbul Üniversitesi
Cerrahpaşa Tıp Fakültesi



İmza
Prof. Dr. Kadir TURAN
Marmara Üniversitesi
Eczacılık Fakültesi

Bu alışma İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yürütücü Sekreterliğinin 26843 numaralı projesi ile desteklenmiştir.

ÖNSÖZ

Moleküler Biyoloji ve Genetik uzmanlığı mesleğinin öğrenilmesinde son kademe olan Doktora Tez aşamasının sonuna gelmiş bulunuyorum. Mesleğimin ayrıntılarını öğrenmek ve onun saygınlığını korunması ve geliştirilmesi amacı ile etik çerçevesinde çalışıp faydalı olmak için, önümde aşmam gereken engeller olduğunun farkında olarak;

Tüm eğitimim boyunca yanında çalışmaktan onur duyduğum, bilgi ve tecrübelerinden faydalanırken göstermiş olduğu hoşgörü ve sabırdan dolayı saygıdeğer Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü Başkanı ve danışman hocam, Prof. Dr. Nazlı ARDA'ya

Sevgi ve desteğini hiçbir zaman esirgemeyen ikinci danışman hocam, Prof. Dr. Ayşegül TOPAL SARIKAYA'ya (Yeni Yüzyıl Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi),

Sistemik Lupus Eritmatozus hastalarının kan örneklerine ulaşmamda yardımcı olan Prof. Dr. Vedat HAMURYUDAN'a (İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi),

Okunmasına ayırdıkları zaman ve olumlu eleştirileri ile çalışmanın olgunlaşmasına yaptıkları değerli katkılarından dolayı tez izleme jüri üyelerim, Prof. Dr. Nermin GÖZÜKIRMIZI ve Prof. Dr. Ayşe ÖZER'e (İstanbul Marmara Üniversitesi),

Eğitim süresince koşulsuz desteğini gördüğüm, başarılı meslek hayatını olduğu kadar etik davranışlarını da kendime örnek aldığım saygıdeğer sevgili hocam, Doç. Dr. Gülruh ALBAYRAK'a,

Bilimsel kariyerime başladığım ilk günden beri araştırmalarında bulunmamı sağlayarak eğitimime inanılmaz katkı sağlayan, bundan sonraki çalışma hayatımda bilgi, destek ve yardımını almaktan mutluluk duyacağım hocam Doç. Dr. Bedia PALABIYIK'a,

Umutlarımın bittiği anda bile her zaman desteğini hissettiğim, bugünkü başarımda önemli katkısı olan Yard. Doç. Dr. Evren ÖNAY UÇAR'a,

Beş yıl boyunca acı, tatlı pek çok anı paylaştığım ve tezimi hazırlarken yardımlarını esirgemeyen dostlarım MSc. Elif KARLIK'a, MSc. Gökhan SÜSLÜ'ye, MSc. Mehrab GULUOĞLU GULIYEV'e, MSc. Emre YÖRÜK'e, Araş. Gör. Dr. Murat PEKMEZ'e, Biyolog Levent DAYLAN'a ve sıcak bir çalışma ortamını paylaştığım diğer hocalarıma, birlikte çalışmaktan zevk aldığım tüm arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Beni yetiştirip yoluma ışık tutarak günlere gelmemde sonsuz emeği, sabrı, hoşgörüsü ve fedakarlığı olan, her zaman destek ve güvenlerini hissettiğim, çocukları olmaktan ömrüm boyunca gurur duyduğum ve her şeyimi onlara borçlu olduğum canım annem Rouhangiz SEYYEDRASOULI, canım babam Prof. Dr. Ahad JAFARI GHODS ve hayatıma yeni giren, varlığı ve sevgisile mutluluğuma mutluluk katan eşim MSc. Mohammad SALAVATI olmasalardı bu çalışma hayat bulamazdı.

Haziran, 2014

Farinaz JAFARI GHODS

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ÖNSÖZ.....	i
İÇİNDEKİLER	ii
ŞEKİL LİSTESİ.....	vi
TABLO LİSTESİ	ix
SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ	xi
ÖZET.....	xv
SUMMARY	xvii
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL KISIMLAR	3
2.1. SİSTEMİK LUPUS ERİTEMATOZUS.....	3
2.1.1. Tanıtım.....	3
2.1.2. Tarihçe	3
2.1.3. Epidemiyoloji.....	5
2.1.4. Patoloji	8
2.1.5. Etiyoloji ve patogenez.....	10
2.1.6. SLE'nin genetik bileşenleri.....	11
2.1.6.1. SLE'de kompleman eksikliği.....	11
2.1.6.2. SLE'de HLA genleri	12
2.1.6.3. SLE'de HLA-dışı genler	13
2.1.7. SLE'de apoptoz kusuru.....	13
2.1.8. SLE'de T hücre aktivasyonu yanıtları	16
2.1.9. SLE'de B hücre toleransı ve olgunlaşması.....	16
2.1.10. Dış faktörler	17
2.1.11. Cinsiyet ve hormonların etkileri	18
2.1.12. SLE'de otoantikorlar	21
2.1.13. Lupus nefriti.....	21
2.1.14. Hastaların sosyal ilişkileri üzerine SLE'nin etkisi.....	22
2.2. SİTOKİNLER.....	22

2.2.1. Tanıtım	22
2.2.2. Bağışıklık yanıtlarında yardımcı T-hücrelerinin merkezi rolü	23
2.2.3. Th1/Th2 Denge Hipotezi	24
2.2.4. SLE'de Th1/Th2 dengesi	25
2.3. MİKRORNA'LAR	26
2.3.1. Tanıtım	26
2.3.2. miRNA biyogenez yolağı ve miRNA'ların fonksiyonu	26
2.3.3. Hastalıklarda mikroRNA'lar	31
2.3.4. Plazma veya serumda mikroRNA'ların biyomarkır olarak kullanımı	31
2.3.5. Sistemik Lupus Eritematozus Hastalığında mikroRNA'lar	32
2.4. TAM KANDAN VERİMLİ TOTAL RNA İZOLASYONU İÇİN ÖRNEK TOPLAMA VE SAKLAMASI	34
2.4.1. Yoğunluk gradient ayırma ile periferik mononükleer hücrelerin izolasyonu	35
2.5. SPEKTROFOTOMETRİYE VE ELEKTROFOREZE DAYALI YÖNTEMLER	37
2.5.1. Nanodrop ile RNA kalite kontrolü ve miktar ölçümü	37
2.5.2. Biyoanalizör ile RNA kalite kontrolü ve miktar ölçümü	39
2.5.2.1. RNA'nın bütünlük sayısı (RIN)	40
2.6. NÜKLEİK ASİT TEMELLİ YÖNTEMLER	41
2.6.1. Serumdan miRNA izolasyonu	41
2.6.2. Mikrodizilim	42
2.7. İMMÜNOLOJİK YÖNTEMLER	42
2.7.1. ELISA yöntemi	42
3. MALZEME VE YÖNTEM	45
3.1. KLİNİK ÖRNEKLERİN TOPLANMASI VE SAKLANMASI	45
3.2. LENFOSİTLERİN ("PERİFERİK MONONÜKLEER HÜCRELERİN") İZOLASYONU	47
3.3. MOLEKÜLER ANALİZLER	47
3.3.1. Nükleik Asit İzolasyonu	47
3.3.1.1. Total RNA İzolasyonu	48
3.3.1.2. miRNA İzolasyonu	49
3.3.2. Nükleik Asit Miktarının Spektrofotometrik Analizi	51
3.3.2.2. Biyoanalizör Ölçümü	51
3.3.3. Nükleik Asit Saflığının Elektroforetik Analizi	52
3.3.3.1. RNA'ların Agaroz Jel Elektroforez ile Analizi	52

3.3.3.2. RNA'ların Biyoanalizör ile Elektroforetik Analizi	54
3.3.4. Mikrodizilim Temelli Yöntemler	54
3.3.4.1. miRNA Mikrodizilim Analizi	54
3.3.4.2. miRNA Mikrodizilim Veri Analizi	56
3.3.4.3. mRNA Mikrodizilim Analizi	56
3.3.4.4. mRNA Mikrodizilim Veri Analizi	59
3.3.5. İmmünolojik Yöntemler	59
3.3.5.1. Multipleks "ELISA"	59
3.3.6. İstatistiksel Yöntemler	61
3.3.6.1. miRNA ile mRNA eşleşmesinin Analizi	61
4. BULGULAR	63
4.1. DENEKLERİN DEMOGRAFİK VE TEMEL ÖZELLİKLERİ	63
4.2. MOLEKÜLER ANALİZLER	64
4.2.1. Nükleik Asit İzolasyonu	64
4.2.1.1. Total RNA Miktarı ve Saflığının Belirlenmesi	64
4.2.1.2. miRNA Miktarının Belirlenmesi	66
4.2.2. miRNA Mikrodizilim Veri Analizi	66
4.2.2.1. SLE'ye özgü miRNA'ların mikrodizilim analizi ile tanımlanması	67
4.2.2.2. Renal tutulumu olan ve olmayan SLE hastalarının miRNA düzeylerinin karşılaştırılması	68
4.2.2.3. Kompleman yetersizliği ve renal tutulumu göre SLE hastalarının miRNA düzeylerinin karşılaştırılması	69
4.2.2.4. Anti Nükleer Antikorlar (ANA) varlığı veya yokluğuna göre miRNA düzeylerinin karşılaştırılması	71
4.2.2.5. Anti-DNA varlığı veya yokluğuna göre miRNA düzeylerinin karşılaştırılması	72
4.2.3. miRNA'ların Hedef Tahmini	72
4.2.3.1. SLE hastalarında sağlıklı kontrollere göre farklı düzeyde transkripsiyonu yapılan miRNA'ların potansiyel hedef genlerinin tahmini ...	72
4.2.3.2. SLE hastalarında renal tutulumu, kompleman yetersizliği ve ANA durumuna göre farklı düzeyde transkripsiyonu yapılan miRNA'ların tahmini potansiyel hedef genleri	73
4.2.4. mRNA Mikrodizilim Veri Analizi	75
4.2.4.1. SLE'ye özgü mRNA'ların gen anlatımı analizi	75
4.2.4.2. SLE hastalarında renal tutulumu göre mRNA transkripsiyon analizi ...	77
4.2.4.3. Kompleman yetersizliği ve renal tutulumu göre SLE hastalarının mRNA düzeylerinin karşılaştırılması	79

4.2.4.4. <i>Anti Nükleer Antikorlar (ANA) varlığı veya yokluğuna göre mRNA düzeylerinin karşılaştırılması</i>	82
4.2.4.5. <i>Anti-DNA antikorunun varlığı veya yokluğuna göre mRNA düzeylerinin karşılaştırılması</i>	83
4.2.5. Eşzamanlı mRNA/miRNA profillemesi ile biyoinformatik tahminlerin doğrulanması	84
4.2.6. hsa-miR-149-5p ile ERbB3 mRNA eşleşmesinin Analizi.....	85
4.2.7. İmmünolojik Yöntemler.....	86
4.2.7.1. <i>Multipleks "ELISA"</i>	86
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	89
KAYNAKLAR	105
EKLER	143
ÖZGEÇMİŞ	146

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa No

- Şekil 2.1:** Lupus Eritematozus (LE) hücreleri. Bu hücrelerin çekirdekleri, olgun polimorfonükleer lökositler tarafından fagosite edilir ve sindirilir. Şekilde homojen inklüzyon polimorfonükleer lökosit ok ile gösterilmiştir (Rheumatology image bank).....5
- Şekil 2.2:** SLE hastalığında önde gelen olayların gelişimini gösteren bir model önerisi (Hochberg, 1997).....9
- Şeki 2.3:** SLE'de otoimmünite gelişimi. Normal bireylerde T hücre toleransı öz-antijenlerin sunumu ile meydana gelir. Birçok genetik ve çevresel faktör nedeniyle, periferik tolerans, SLE hastalarında kaybolur. Bu da patojenik antikörlerin salınmasına ve organ hasarının gelişmesine yol açar (Shlomchik ve diğ., 2001'den alınmıştır). 15
- Şekil 2.4:** Antijen sunan hücreler, farklılaşmamış naif T hücreleri ile antijenik paylaşım şeklinde etkileşime girip spesifik sitokinler salgılayarak onların ilk etapta “null” yardımcı T-hücelere (Th0) ve sonra da Th1 veya Th2 hücrelerine farklılaşmalarını teşvik ederler (kutuplaşma). Doğal öldürücü hücreler de büyük olasılıkla polarizasyon sürecine yardımcı olur. DÖ Hücre: Doğal öldürücü hücre (Kidd, 2003'den alınmıştır)...25
- Şekil 2.5:** miRNA'ların biyogenezi. miRNA'ların biyogenezi, RNA polimeraz II veya III aracılığıyla pri-miRNA transkriptlerinin transkripsiyonu ile başlar(1). Nükleusta, pri-miRNA'lar, Drosha tarafından işlenerek pre-miRNA'lara dönüştürülür (2). pri-miRNA'lar sitoplazmaya taşınır (3). Pre-miRNA'lardaki saç tokası yapıları 19-24 nükleotidlik olgun miRNA çift zincirlerine dönüştürülerek “Dicer” tarafından işlenir (4). Çift zincirli olgun miRNA'nın bir zinciri hedef mRNA'ların anlatımını düzenlemek için RISC kompleksi içine dahil olur (5). Diğer zincir ise ya yıkılır ya da muhtemelen hücreden dışarı salınır (6). Bazı miRNA'lar multivesiküler yapılardan türetilmiş eksozomlar içinde paketlenir (7). Diğerleri RNA'ya bağlanan proteinlerin eşliğinde hücre dışına salıverilir (8). Bazıları da hücre fiyozyonu sırasında mikrovessiküller ile atılır (9). Hücre dışı alanda, bu miRNA'lar diğer hücreler tarafından içeri alınarak ya RNaz'lar tarafından yıkılır ya da dışarı atılabilir(10) (Etheridge ve diğ. 2011'den alınmıştır).....28
- Şekil 2.6:** Yoğunluk gradient ayırımı. Tüm kan örneğinden yoğunluk gradient ayrılmasından sonra elde edilen farklı hücre tabakaları. Granülositleri de içeren kırmızı hücre pelleti, Ficoll-Hypaque aracılığıyla lenfositlerden ayrılır. Plazma ve trombositlerden oluşan üst tabakanın lenfosit tabakası ile karşılaştırıldığında, çok daha şeffaf olduğu görülmektedir (Fuss ve diğ., 2009'tan alınmıştır)...37
- Şekil 2.7:** (A) Agilent'in 6000 Nano Çipi. (Agilent RNA 6000 Nano Kit Guide'dan alınmıştır ¹). (B) Çiplerde yerleştirilen mikrokanallar. (Lab-on-Chip.gene-quantification'den alınmıştır ²).....39
- Şekil 2.8:** Yıkılmamış tam RNA'nın elektroferogramları. İkinci örneğin ribozomal oranı daha düşük olmasına rağmen “RIN” sayısı 10 olarak ölçülmüş. Biyoanalizördeki

yazılım az miktarda yıkılımı ölçebilmektedir (www.chem.agilent.com/RIN ’den alınmıştır).....	41
Şekil 2.9: Bio-Plex Sandviç ELISA. (Bio-Plex Pro™ Assays. Cytokine, Chemokine, and Growth Factors Instruction Manual’ dan alınmıştır.)	43
Şekil 3.1: Serum ayırımı için tam kan pıhtı aktivatörü içeren tüplerde tolandı. (A) Serum içermeyen sadece Z solüsyonu içeren tüp.(B) Serum içeren Z solüsyonlu tüp..	46
Şekil 3.2: Yoğunluk gradient ayırma ile periferik mononükleer hücrelerin İzolasyonu. (A) ve (B) Kan Ficoll-Hypaque solüsyonu ile karışmayacak bir biçimde yavaşça Ficoll-Hypaque solüsyonu içeren falkona eklenir. (C) Granülositleri de içeren kırmızı hücre pelleti, Ficoll-Hypaque aracılığıyla lenfositlerden ayrılır. Plazma ve trombositlerden oluşan üst tabakanın lenfosit tabakası ile karşılaştırıldığında, çok daha şeffaf olduğu görülmektedir.....	47
Şekil 3.3: RNeasy Mini Kit’in Prosedürü.....	49
Şekil 3.4: <i>mir Vana</i> PARIS Kiti’nin Prosedürü.....	50
Şekil 3.5: Standart solüsyonunun dört kat seyreltme serisinin hazırlanması.....	61
Şekil 4.1: Deney grubundan izole edilen RNA’ların DNaz I uygulaması yapılmadan önce agaroz jel görüntüsü. M: Markır. 1-3 ila 1-9: SLE hastalarına ait RNA örneklerinin kod numaraları.....	65
Şekil 4.2: Deney grubundan izole edilen RNA’ların “Biyoanalizör 2100” analiz sonuçları. (A) jel görüntüsü.1-1 ila 1-12: SLE hastalarına ait RNA örneklerinin kod numaraları. (B) Elektroforegram görüntüsü. 20-25 arasındaki bant markır’a, 40-45 arasındaki bant 18S ribosomal RNA’ya ve 45-50 arasındaki bant 28S ribosomal RNA’ya aittir... ..	66
Şekil 4.3: SLE hasta grubu ile sağlıklı kontrol grubunun karşılaştırılmasına göre farklı transkripte edilen miRNA’ların ısı haritası diyagramı. Veri, miRNA’ların isimlerine göre düzenlenmiştir. Renkli skala sütunu, miRNA’nın transkripsiyon düzeyini belirtmektedir (mavi düşük, kırmızı yüksek transkripsiyon).....	68
Şekil 4.4: SLE hastaların renal tutulumu olan ve olmayanları karşılaştırıldığında, düzenlenmesi artan yada azalan şekilde olan miRNA’ların “heat map” diyagramı. Veri, miRNA’ların isimlerine göre düzenlenmiştir. Renkli lejant sütünü, miRNA ‘nın transkripsiyon düzeyini belirtmektedir (mavi düşük, kırmızı yüksek transkripsiyon).....	69
Şekil 4.5: Renal tutulumu olan/olmayan SLE hastalarının C3 kompleman yetersizliği varken/ yokken miRNA düzeylerinin ısı haritası diyagramı. Veri, miRNA’ların isimlerine göre düzenlenmiştir. Renkli lejant sütünü, miRNA ‘nın transkripsiyon düzeyini belirtmektedir (mavi düşük, kırmızı yüksek transkripsiyon).....	70
Şekil 4.6: Renal tutulumu olan/olmayan SLE hastalarının C4 kompleman yetersizliği varken/ yokken miRNA düzeylerinin ısı haritası diyagramı. Veri, miRNA’ların isimlerine göre düzenlenmiştir. Renkli lejant sütünü, miRNA ‘nın transkripsiyon düzeyini belirtmektedir (mavi düşük, kırmızı yüksek transkripsiyon).....	71
Şekil 4.7: SLE hastalarıyla sağlıklı kontrollerin “PBMC” örneklerinde farklı anlatım yapan genler. Genler hastalar ve sağlıklı kontroller arasında melezleme yoğunluk oranı ile	

- gösterilmiştir. Mavi renk transkripsiyonu düşen genleri, kırmızı renk transkripsiyonu artan genleri göstermektedir..76
- Şekil 4.8:** Renal tutulumuna bağlı olarak SLE hastalarının “PBMC” örneklerinde farklı anlatım yapan genler. Genler iki grup arasında melezleme yoğunluk oranı ile gösterilmiştir. Mavi renk transkripsiyonu düşen genleri, kırmızı renk transkripsiyonu artan genleri göstermektedir...78
- Şekil 4.9:** Renal tutulumu olan/olmayan SLE hastalarının C3 kompleman yetersizliği varken/ yokken “PBMC” hücrelerinde farklı anlatım yapan genler. Genler iki grup arasında melezleme yoğunluk oranı ile gösterilmiştir. Mavi renk transkripsiyonu düşen genleri, kırmızı renk transkripsiyonu artan genleri göstermektedir.....80
- Şekil 4.10:** Renal tutulumu olan/olmayan SLE hastalarının C4 kompleman yetersizliği varken/ yokken “PBMC” hücrelerinde farklı anlatım yapan genler. Genler iki grup arasında melezleme yoğunluk oranı ile gösterilmiştir. Mavi renk transkripsiyonu düşen genleri, kırmızı renk transkripsiyonu artan genleri göstermektedir.....81
- Şekil 4.11:** NCBI veritabanında kayıtlı “*Homo sapiens*” genomundaki ErbB3 geninin 9144 – 9156 pozisyon arasındaki dizi ile hsa-miR-149-5p’nin eşleşme analizi.....85
- Şekil 4.12:** hsa-miR-149-5p ve ERbB3 geninin dizi eşleşmesi. hsa-miR-149-5p’ye ait olan 18 nukleotitten 13’ü hedef geninin (-) zincirine aralıksızın %100 bağlanır.18 nukleotid çapında ise sadece (2 nt) 9157. ve 9159. pozisyonundaki nukleotitler de eşleşme gerçekleşmezken 16’sında bağlanma olur...86
- Şekil 4.13:** Sağlıklı bireyler ile SLE hastalarında serum sitokin düzeylerinin ortalaması. Y-ekseninde konsantrasyon (pg/mL) olarak gösterilmiştir.....87
- Şekil 4.14:** SLE hastalarda renal tutulumu olanlarla renal tutulumu olmayanlarda serum sitokin düzeylerinin ortalaması. Y-ekseninde konsantrasyon (pg/mL) olarak gösterilmiştir.....87
- Şekil 5.1:** VEGFR’ye bağımlı PI3K-AKT-mTOR sinyal yolağı ve çalışmada saptanan miRNA’ların yolakla ilgili mRNA’lara bağlanarak düzenlenmelerini yapan hedef moleküller. VEGF: Vascular endothelial growth factor, VEGFR: Vascular endothelial growth factor receptor, PI3K: Phosphoinositide 3-kinase, PDK1: Phosphoinositide-dependent kinase-1, Akt: v-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1, Rheb: Ras homolog enriched in brain, Rheb GEF: Rheb- Guanine nucleotide exchange factor, TSC1: Tuberous sclerosis 1, TSC2: Tuberous sclerosis 2, mTOR: Mammalian target of rapamycin, ASK1: Apoptosis signal-regulating kinase 1, EIF4E: Eukaryotic translation initiation factor 4E, 4EBP1: Eukaryotic translation initiation factor 4E-binding protein 1, MITF: Microphthalmia-associated transcription factor, HIF1- α : Hypoxia-inducible factor 1-alpha, IR: Insulin receptor, IGF1: Insulin like growth factor1, IGF1R: Insulin like growth factor1receptor, IRS1: Insulin receptor substrate 1, IRS2: Insulin receptor substrate 2, IL-6: Interleukin-6, IL6R: Interleukin-6 receptor, TNF- α : Tumor necrosis factor alpha, TNF- α R: Tumor necrosis factor alpha receptor, SEMA6A: Semaphorin-6A.....96

TABLO LİSTESİ

Sayfa No

Tablo 2.1: Amerikan Romatoloji Koleji tarafından belirlenmiş ve 1982 ile 1997 yıllarında bir daha gözden geçirilmiş SLE sınıflandırma kriterleri.....	9
Tablo 2.2: SLE ile ilişkili aday genler (Nath, 2004'den alınmıştır).....	13
Tablo 3.1: RNeasy Mini Kit'in içeriği (50 reaksiyonluk).....	48
Tablo 3.2: <i>mir Vana</i> PARIS Kiti'nin içeriği (50 reaksiyonluk).....	50
Tablo 3.3: Formaldehitli agaroz jel içeriği.....	53
Tablo 3.4: RNA'ların denatürasyonu ve formaldehitli agaroz jelde yürütülmesi için kullanılan tamponların içeriği.....	53
Tablo 3.5: İşaretleme "Spike-In" solüsyonu ile Dana Bağırsak Alkalın Fosfataz ana karışımı.....	55
Tablo 3.6: T4 RNA ligaz için ligasyon ana karışımı.....	55
Tablo 3.7: Hyb "Spike-In" solüsyonu ile miRNA mikrodizilimler için hibridizasyon karışımı.....	55
Tablo 3.8: Yıkama koşulları.....	56
Tablo 3.9: T7 Promotör primerinin karışımı.....	57
Tablo 3.10: cDNA ana karışımı.....	57
Tablo 3.11: Transkripsiyon ana karışımı.....	58
Tablo 3.12: Sekizlik mikrodizilim için fragmentasyon karışımı.....	59
Tablo 3.13: Yıkama koşulları.....	59
Tablo 4.1: Deneklerin demografik ve temel özellikleri.....	64
Tablo 4.2: SLE'de transkripsiyonu artan miRNA'lar*. KD: Kat Değişim.....	67
Tablo 4.3: Renal tutulumu olan SLE hastalarında transkripsiyonu azalan miRNA'lar*. KD: Kat Değişim.....	68
Tablo 4.4: Renal tutulumu olan/olmayan SLE hastalarının C3 kompleman yetersizliği varken/ yokken miRNA düzeylerinin karşılaştırılması. KD: Kat Değişim.....	70

Tablo 4.5: Renal tutulumu olan/olmayan SLE hastalarının C4 kompleman yetersizliği varken/ yokken miRNA düzeylerinin karşılaştırılması. KD: Kat Değişim....	71
Tablo 4.6: Renal tutulumu olan/olmayan SLE hastalarının ANA varken/ yokken miRNA düzeylerinin karşılaştırılması. KD: Kat Değişim.....	72
Tablo 4.7: Sağlıklı kontrollerle karşılaştırıldığında, SLE hastalarında farklı şekilde transkripsiyonu yapılan miRNA'lar için potansiyel hedef genler....	73
Tablo 4.8: SLE hastalarında böbrek tutulumu, kompleman yetersizliği ve ANA durumuna göre farklı düzeyde transkripsiyonu yapılan miRNA'ların potansiyel hedef genleri.....	74
Tablo 4.9: SLE hastalarında farklı şekilde anlatım yapan sitokinlerle ilişkili mRNA'lar ve yer aldıkları yollar ("Wikipathway" analiz sonuçlarına göre). KD: Kat Değişim.....	77
Tablo 4.10: Renal tutulumu olan SLE hastalarında farklı şekilde anlatım yapan sitokinlerle ilişkili miRNA'lar ve yer aldıkları yollar ("Wikipathway" analiz sonuçlarına göre). KD: Kat Değişim.....	79
Tablo 4.11: Renal tutulumu olmayan SLE hastalarının C4 kompleman yetersizliği varken/ yokken transkripsiyonu düşen sitokinlerle ilişkili mRNA'lar ve yer aldıkları yollar ("Wikipathway" analiz sonuçlarına göre). KD: Kat Değişim....	81
Tablo 4.12: Renal tutulumu olan SLE hastalarının C4 kompleman yetersizliği varken/ yokken transkripsiyonu artan sitokinlerle ilişkili mRNA'lar ve yer aldıkları yollar ("GO" analiz sonuçlarına göre). KD: Kat Değişim....	82
Tablo 4.13: Renal tutulumu olmayan SLE hastalarının ANA varken/ yokken transkripsiyonu artan veya düşen sitokinlerle ilişkili mRNA'lar ve yer aldıkları yollar ("Wikipathway" analiz sonuçlarına göre). KD: Kat Değişim....	83
Tablo 4.14: SLE hastaları ile sağlıklı kontroller arasında farklı transkripte edilen miRNA'lar için tahmin edilmiş hedeflerin doğrulaması. KD: Kat Değişimi....	84

SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ

Simgeler Açıklama

µl	: Microliter
a	: Aaaaa
mg	: Milligram
mL	: Milliliter
ng	: Nanogram
nm	: Nanometer
pg	: Picogram
pmol	: Picomol

Kısaltmalar Açıklama

°C	: Degree Celsius
3'-UTR	: 3' Untranslated Region
4EBP1	: Eukaryotic translation initiation factor 4E-binding protein 1
8-oxodGuo	: 8-Oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine
ABD	: Amerika Birleşik Devletleri
ACID	: Activation Induced Cell Death
ACR	: American College of Rheumatology
ADORA3	: Adenosine A3 Receptor
AFE	: Agilent Feature Extraction
AGO	: Argonaute
AIR	: Annual Incidence Rate
Akt1	: v-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1
Akt3	: v-akt murine thymoma viral oncogene homolog 3
ANA	: Anti Nükleer Antikor
AP1	: Activator Protein 1
ASH	: Antijen Sunucu Hücre
ASK1	: Apoptosis signal-regulating kinase 1
BBC3	: (BCL2 binding component 3)
Bcl-2	: B-cell Lymphoma 2
BIM	: Bcl-2 family member
BlyS	: B Lymphocyte Stimulator
BOS	: Beyin Omurilik Sıvısı
C3	: Complement component 3
C4	: Complement component 4
CAB39	: Calcium-binding protein 39
CASP3	: Caspase 3
CASP7	: Caspase 7
CBL	: c-Cbl, Cbl proto-oncogene
CDKN1A	: Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor 1A (p21)
CIP	: Calf Intestinal Alkaline Phosphatase

c-MYC	: cellular Myelocytomatosis oncogene
COX2	: Cyclooxygenase 2
CPDS	: Cyclobutane Pyrimidine Dimers
CR1	: Complement Receptor 1
CR2	: Complement Receptor 2
CSFs	: Colony Stimulating Factors
CXCL11	: Chemokine (C-X-C motif) ligand 11
DGCR8	: DiGeorge Syndrome Critical Region gene 8
DH	: Dendritik Hücree
DNMT1	: DNA (cytosine-5)-methyltransferase 1
ds-DNA	: Double-stranded DNA
DTT	: Dithiothreitol
EBV	: Epstein Barr virus
EDTA	: Ethylenediaminetetraacetic acid
EGFR	: Epidermal growth factor receptor
EIF4E	: Eukaryotic translation initiation factor 4E
ELISA	: Enzyme-linked Immunosorbent Assay
ENDRA	: Gi-coupled endothelin-1 receptor type A
ERbB2	: Receptor tyrosine-protein kinase v-erb-b2 erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 2
ERbB3	: Receptor tyrosine-protein kinase v-erb-b2 erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 3
ERK	: Extracellular signal-regulated kinase
ETS1	: Protein C-ets-1
ETV5	: Ets variant gene 5
FOXO4	: Forkhead box protein O4
GFRA2	: Glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) family receptor alpha-2
GO	: Go Ontology
HIF-1α	: Hypoxia-Inducible Factor 1-alpha
HLA	: Human Leukocyte Antigen
HLA-B	: Human Leukocyte Antigen class I-B
HRT	: Hormon Replasman Tedavisi
IgE	: Immunoglobulin E
IGF1	: Insulin like growth factor 1
IgG	: Immunoglobulin G
IL-1	: Interleukin 1
IL-10	: Interleukin 10
IL-12	: Interleukin 12
IL-13	: Interleukin 13
IL-2	: Interleukin 2
IL-4	: Interleukin 4
IL-5	: Interleukin 5
IL-6	: Interleukin 6
IL-6R	: Interleukin-6 receptor
IL-7	: Interleukin 7
IL-9	: Interleukin 9
INF-γ	: Interferon Gamma (INGF)
IR	: Insulin receptor

IRF5	: Interferon regulatory factor
IRS1	: Insulin receptor substrate 1
IRS2	: Insulin receptor substrate 2
ISN	: International Society of Nephrology
İK	: İmmün Kompleks
KLF13	: Kruppel-like Factor 13
KLK9	: Kallikrein-related peptidase 9
La-Antigens	: RNA-binding protein related to the tRNAs & ribosomal proteins (SSB)
lincRNAs	: Large intergenic non-coding RNAs
MAF	: v-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog
MFI	: Median Fluorescence Intensity
MHC	: Major Histocompatibility Complex
MITF	: Microphthalmia-associated transcription factor
miRNA	: Micro-RNA
MO25	: Mouse protein-25
MOPS	: 3-(N-morpholino) propanesulfonic acid
mTOR	: Mammalian target of rapamycin
MYST2	: MYST histone acetyltransferase 2
NCBI	: National Center for Biotechnology Information
NFAT	: Nuclear Factor of Activated T-Cells
NFATC3	: Nuclear factor of activated T-cells, cytoplasmic 3
NF-κB	: Nuclear Factor Kappa-light-chain-enhancer of activated B Cells
NGS	: Next Generation Sequencing
NK	: Natural Killer Cell
NKR	: Natural Killer Cell Receptor
NKT	: Natural Killer T Cell
NOG	: Noggin
NRG4	: Neuregulin 4
NSMAF	: Neutral sphingomyelinase (N-SMase) activation associated factor
Oct4	: Octamer-binding transcription factor 4
OD	: Optical Density
OGG1	: 8-oxoguanine DNA glycosylase
OOR	: Out of Range
OPRM1	: Opioid Receptor, Mu 1
p21	: cyclin-dependent kinase inhibitor 1
P53	: Phosphoprotein p53
PBMC	: Peripheral Blood Mononuclear Cell
PBS	: Phosphate Buffered Saline
PCR	: Polymerase Chain Reaction
PDCD1	: Programmed Cell Death 1
PDK1	: Phosphoinositide-dependent kinase-1
PE	: Phycoerythrine
PI3K	: Phosphoinositide 3-kinase
PIK3R1	: Phosphoinositide-3-kinase, regulatory subunit 1 (alpha)
PKA	: Protein Kinase A
PKC	: Protein Kinase C
RASGRP1	: RAS guanyl-releasing protein 1
REPS2	: RalBP1-associated Eps domain-containing protein 2
Rheb	: Ras homolog enriched in brain

Rheb GEF	: Rheb- Guanine nucleotide exchange factor
RIN	: RNA Integrity Number
RISC	: RNA Induced Silencing Complex
Ro-Antigens	: Components of the Ro-RNP complex (SSA)
ROS	: Reactive oxygen species
RPS	: Renal Pathology Society
SEMA-6A	: Semaphorin-6A
SLE	: Systemic Lupus Erythematosus
Sm-Antigens	: Also known as “Smith”Antigens; core units of snRNPs, termed A to G
SMR	: Standardized Mortality Ratios
snRNPs	: small nuclear Ribonucleoproteins
SOCS1	: Suppressor of Cytokine Signaling1
SOCS3	: Suppressor of Cytokine Signaling3
SOCS6	: Suppressor of cytokine signaling 6
Sox2	: Sex determining region Y-box 2
SP1	: Specificity protein 1
SPRY2	: Sprouty homolog 2 (Drosophila)
SSM	: Superficial Spreading Melanoma
TAB3	: TGF-beta activated kinase 1/MAP3K7 binding protein 3
Tc	: Cytotoxic T Cell
TCR	: T Cell Receptor
TFE3	: Transcription factor E3
TGFs	: Transforming Growth Factors
TGF-β	: Transforming Growth Factor Beta
Th	: T Helper Cell
Th0	: Naive T Cell
TLR	: Toll-like receptor
TLR9	: Toll-like receptor 9
TNFSF	: Tumor Necrosis Factor Superfamily
TNF-α	: Tumor necrosis factor alpha
TNF-αR	: Tumor necrosis factor alpha receptor
Torc2	: Transducer of regulated CAMP response 2
TREX1	: Three Prime Repair Exonuclease 1
TSC1	: Tuberous sclerosis 1
TSC2	: Tuberous sclerosis 2
TUCP	: Transcripts of Uncertain Coding Potential
U1 RNP	: U1 small nuclear Ribonucleoprotein (snRNP70)
UV	: Ultraviolet
VEGF	: Vascular endothelial growth factor
VEGFR	: Vascular endothelial growth factor receptor

ÖZET

DOKTORA TEZİ

***SİSTEMİK LUPUS ERİTEMATOZUS* HASTALARINDA SİTOKİNLERİN GEN ANLATIMI VE miRNA’LAR ARASINDAKİ İLİŞKİNİN ARAŞTIRILMASI**

Farinaz JAFARI GHODS

İstanbul Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Danışman : Prof. Dr. Nazlı ARDA

II. Danışman : Prof. Dr. Ayşegül TOPAL SARIKAYA

Bu çalışmada, miRNA’ların; moleküler tıpta yeni diagnostik, prognostik ve hedefe yönelik terapötik biyomarkırların belirlenmesinde umut verici unsurlar olabileceği fikrinden yola çıkarak, *Sistemik Lupus Eritematozus* (SLE)’da tanı için kullanılabilecek spesifik bir veya birden fazla biyomarkırın ortaya konulabilmesi için, hastaların sitokin genlerinin anlatım profilleri belirlenmesi, serumdaki sitokin miktarları ile karşılaştırıldı ve miRNA – sitokin ilişkileri araştırıldı.

Öncelikle 16’sı hasta (10 böbrek tutulumu olan ve 6 böbrek tutulumu olmayan) ve 8’i kontrol olmak üzere toplam 24 gönüllü bireylerden, kan örnekleri alındı ve serumlar ayrıştırıldı. Mikrodizilim deneylerinde kullanılmak amacıyla kan ve serum örneklerinden total RNA ve miRNA izolasyonu yapıldı ve örnekler, 8x60K v2 “*SurePrint G3 Human Gene Expression*” ve 8x60K v19 miRNA slaytları (Agilent) kullanılarak mikrodizilim ile analiz edildi. Verilerin ön-işleme ve diferansiyel ekspresyon analizi “GeneSpring” yazılımı (Agilent) (versiyon 12.6) ile gerçekleştirildi. SLE’li hasta grubu ve kontrol grubunun miRNA ve mRNA mikrodizilim sonuçları, böbrek tutulumu, kompleman yetersizliği, ANA ve anti-DNA varlığı gibi faktörlerin eşzamanlı bulunmaları dikkate alınarak değerlendirildi ve karşılaştırıldı. Transkripsiyon düzeyleri farklılık gösteren miRNA’lar için microRNAorg, TargetScan ve PITA

programları kullanılarak tahmini potansiyel hedefler belirlendi. mRNA profillemesinden elde edilen veriler hedef genler için sorgulandı ve mRNA/miRNA dizi eşleşme analizleri yapıldı. Multipleks ELISA kiti (Bio-Rad) kullanılarak sitokinlerin miktarları tayin edildi.

Sağlıklı kontrollere göre SLE hastalarında transkripsiyonu farklı olan toplam 10 miRNA arasından **hsa-mir-1825**, **hsa-mir-933**, **hsa-mir-149-5p**, renal tutulumlu vakalarda belirlenen miRNA'lerden **hsa-mir-766-3p** ve renal tutumlu olmayıp ANA test sonucu pozitif olan hastalarda belirlenen **hsa-miR-621**'in PI3K-AKT-mTOR yolağında rolleri olabileceği gösterildi. Ayrıca IL-4, IL-6 ve TNF- α gibi pro-enflamatuvar sitokinlerin kandaki miktarının, hastalığın evresi ve şiddetine göre değişebilen miRNA'ların sentezini düzenleyerek nefropati, hipertansiyon, ciltteki koyu lekeler ve insülin direnci gibi bazı semptomların ortaya çıkmasında rolleri olabileceği yönünde veriler elde edildi.

Ayrıca **hsa-miR-149-5p** için yapılan biyoinformatik çalışmalar sonucu elde edilen tahmini hedef genlerden *ERBB3* mRNA'sı deneysel olarak mRNA ekspresyon analiz aşamasında da onaylandı. NCBI dizi eşleşme analiz sonuçlarına dayanarak yaklaşık %90 düzeyindeki benzerlik, hsa-miR-149-5p'nin bu gene ait primer transkripti kırılma öncesi yıkıma uğratarak düzenlediği gösterildi.

Örnek sayısının düşük olması ve SLE hastalığının klinik heterojenitesinden dolayı, çalışma kapsamında alınan sonuçların daha geniş çalışmalarla da teyit edilmesi gerekmektedir.

Haziran 2014, 170

Anahtar kelimeler: Sistemik Lupus Eritematozus, Sitokin, miRNA, Mikrodizilim, Biyomarkır.

SUMMARY

Ph.D THESIS

INVESTIGATION OF RELATIONSHIP BETWEEN CYTOKINES GENE EXPRESSION AND miRNAs IN *SYSTEMIC LUPUS ERYTHEMATOSUS* PATIENTS

Farinaz JAFARI GHODS

İstanbul University

Graduate School of Science and Engineering

Department of Molecular Biology and Genetics

Supervisor : Prof. Dr. Nazlı ARDA

Co-Supervisor : Prof. Dr. Ayşegül TOPAL SARIKAYA

miRNAs transpire as promising elements in molecular medicine for the identification of new diagnostic, prognostic and targeting therapeutic biomarkers. This being the case, we aimed to investigate a or a group of specific diagnostic biomarkers for *Systemic Lupus Erythematosus* (SLE) disease, to identify cytokines genes' expression profiling, comparison between the profiles with related amounts in the serum and eventually to study target-gene-mediated functional roles of miRNAs, which have been correlated to disease development and progression.

First, blood and serum samples were obtained from a total of 24 volunteers, including 16 patients (10 with renal involvement and 6 without renal involvement), and eight healthy controls. In order to use in microarray assays total RNA and miRNAs samples that were isolated from PBMCs and serum samples respectively, were assessed by using 8x60K v2 "SurePrint G3 Human Gene Expression" and 8x60K v19 miRNA microarray slides (Agilent). Data processing and differential expression analysis were done by "GeneSpring" software (version 12.6) (Agilent). Taking coexistence of factors such as the renal involvement, complement deficiency, positive ANA and anti-DNA, into the account, miRNA and mRNA microarray analysis, was performed by comparison of SLE patients with the healthy controls. For each differentially expressed miRNA, potential target genes were predicted by microRNAorg, TargetScan and PITA prediction tools. Obtained mRNA profiling data were interrogated for the target genes

and mRNA/miRNA binding site sequence analyses were done. Finally, the amounts of cytokines were measured by multiplex ELISA method (Bio-Rad).

The results of study showed that some differentially expressed miRNAs may play pivotal roles in PI3K-AKT-mTOR pathway. These included (**hsa-miR-1825, hsa-miR-933 and hsa-miR-149-5p**) of the 10 differentially expressed miRNAs in SLE patients comparing to healthy controls, **hsa-miR-766-3p** from those which were differentially expressed in SLE patients with renal compared to without renal involvement, and **hsa-miR-621** among those which were differentially expressed in SLE without renal involvement and positive ANA test compared to the others. In addition, according to the obtained data it is suggested that blood-borne proinflammatory cytokines such as IL-4, IL-6 and TNF- α alongside with stage and severity of disease may contribute to differential expression of these miRNAs which may also lead to much more serious complications such as nephropathy, hypertension, dark spots on the skin, and insulin resistance.

Furthermore, out of the target genes predicted for **hsa-miR-149-5p** through bioinformatics studies, *ERBB3* was confirmed experimentally in the mRNA expression analysis. Based on NCBI sequence matching analysis results, with approximately 90% homology level, it was shown that hsa-miR-149-5p regulates gene expression via degradation of primer transcript prior to mRNA splicing.

Because of the smaller sample size and clinical heterogeneity of SLE, our results must be confirmed in larger studies.

June 2014, 170

Keywords: Systemic Lupus Erythematosus, cytokine, miRNA, Microarray, Biomarker.

1. GİRİŞ

Sistemik Lupus Eritematozus (SLE) insanlardaki otoimmün hastalıkların bir protipidir. Birçok organda hasarlanma ve inflamasyona neden olan, otoantikor üretimi ve immün kompleks yapımı ile karakterize, etiyolojisi tam olarak bilinmeyen, yaygın, otoimmün bir hastalıktır. Sıklığı ve şiddeti açısından bölgesel farklılıklar göstermesine rağmen, SLE, dünya çapında tanınan ve tüm etnik gruplarda gözlenen bir hastalıktır. Hastalığın şiddeti hastalar arasında farklılık göstermektedir. SLE hastalarının bazıları nispeten hafif belirtilere sahip olup çok az tedavi gerektirir veya hiç tedavi gerektirmezken, diğerlerinde birden fazla iç organı etkileyen kronik inflamasyon oluşup yüksek doz kortikosteroid ve sitostatik ilaçlar ile agresif tedavi yoluna gidilmektedir.

Cinsiyet lupusun güçlü risk faktörüdür ve çalışmaların çoğunda, hastaların %90'ından fazlası kadındır. Genel olarak kadın-erkek oranı 7:1 olurken, doğurgan çağda bu oran 11:1'e yükselir. SLE'ye yatkınlıkta, genetik ve çevresel faktörlerin rolü bilinmektedir ve patogenezi tam anlamıyla tanımlanmamış olmakla beraber; monozigot ikizlerde görülen yüksek konkordans, aynı aile bireylerinde görülme sıklığında artış ve birinci dereceden akrabalarda artan rölatif risk, hastalığın genetik temellerle ilişkili olduğunu ortaya koymaktadır.

SLE'de, sitokinlerin etkin rollere sahip olduğu bilinmektedir. Sitokinler tarafından ortaya çıkan SLE immünopatolojisi birçok yönden tam olarak aydınlatılamamış olmasına rağmen genelde Th1 veya Th2 üstünlüğünün hastalığın evresine göre değişebileceği kabul edilmektedir. Th2 yanıtı, otoantikorların geliştirilmesi ve üretilmesi ile, Th1 yanıtı ise enflamatuvar aktivite ile ilgilidir. Sitokinlerin yüksek oranda polimorfik olarak kodlandığı bilinmektedir. Bu polimorfizmlerin kişiler arasında gözlenen farklı oranlarda sitokin üretiminden, dolayısıyla Th1/Th2 dengesinden sorumlu olabileceği düşünülmektedir. Son yıllarda bu farkın miRNA kökenli olabileceği konusunda da bulgulara rastlanmıştır. Otoimmün hastalıkların takibinde en önemli zorluk tanıya, hastalık aktivitesine ve atakların tahmin edilmesine yönelik spesifik bir biyomarkırın bulunmayışıdır. Biyomarkır keşfi veya etkili terapötiklerin

geliştirilebilmesi için miRNA'lar ve sitokinlerin daha derinlemesine incelenmesi gerekmektedir.

Oligonükleotid miRNA mikrodizilimler ve yoğun dizileme, bilinen tüm miRNA'ların ("*miRNAome*") analizini mümkün kılmıştır. Bu yöntemler tümörlerde ve diğer hastalıklarda sentezlenen miRNA tiplerini ve miktarlarını değerlendirmek için kullanılmaktadır. Günümüze dek, hemen hemen tüm kanser tiplerinde değişken miRNA profili bildirilmiştir. SLE'de de farklı sentezlenen miRNA'lar ile ilgili birkaç çalışma yayımlanmıştır. Araştırma konusunun yeni olması, uygulama süreçlerinin maliyetli ve uzun süreçler içermesi gibi nedenlerden dolayı Bugüne kadar SLE hastalığıyla ilişkilendirilmiş çok fazla sayıda miRNA rapor edilememiştir. Ayrıca yapılan çalışmalarda miRNA'lar ile proteinler arasındaki ilişki çok fazla ele alınmamıştır. miRNA'ların bu hastalığın etiolojisinde yer alabileceği yönündeki kanıtlar, miRNA'ların SLE'de potansiyel tanısal markır olarak kullanılabileceğini düşündürmektedir.

Gerçekleşen bu çalışmada sadece miRNA profilleri üzerinden sonuca gitmenin yanı sıra SLE hastalığıyla doğrudan ilişkili olduğu bilinen sitokin genlerinin anlatım düzeyi ve protein miktarları arasındaki farklar da araştırma konusuna dahil edilmiştir. Bu çalışmada miRNA ve sitokin ilişkili moleküllerin etkileşimleri belirlenmiştir, miRNA'lar için biyoinformatik yazılımlarla tahmin edilen hedef mRNA'lar, eşzamanlı mRNA/miRNA profillemesi ile doğrulanmış ve mRNA/miRNA dizi eşleşmeleri araştırılmıştır. Elde edilen verilere dayanarak SLE hastalığıyla ilişkilendirilmiş yeni miRNA'lar literatüre eklenecektir.

2. GENEL KISIMLAR

2.1. SİSTEMİK LUPUS ERİTEMATOZUS

2.1.1. Tanıtım

Sistemik lupus eritematozus (SLE) tipik olarak çoklu organ sistemlerini etkileyen, ribonükleoproteinler ve fosfolipidler de dahil çok sayıda öz-antijene karşı otoantikor üretimi ile karakterize otoimmün bir hastalıktır. Hayvan modellerinin aksine, SLE insanlarda heterojen bir hastalıktır. Hastalığın seyri ve belirtileri bireyden bireye farklılık gösterir (Tan ve diğ., 1982; Urrea ve diğ., 2012).

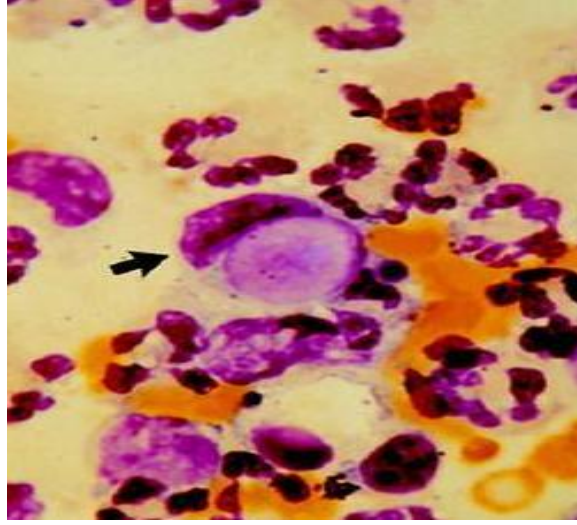
Bu kompleks otoimmün hastalık, patogenezi henüz tam olarak açıklanamamakla birlikte, hem doğuştan gelen bağışıklık sistemi hem de adaptif bağışıklık sisteminin birden fazla immünolojik bileşenindeki kusur sonucunda meydana gelir. Bu kusurların en önemlileri; immün tolerans mekanizmasındaki değişiklikler, B ve T hücrelerinin hiperaktivasyonu, immün komplekslerin ve apoptotik hücrelerin ortadan kaldırılmasındaki yetersizlik ve çoklu düzenleyici ağlardaki başarısızlıktır (Firestein, 2008). Tanımlanan immünolojik fonksiyon kayıplarının, hastalığın başlangıcından yıllar önce ortaya çıkması, hastalığın tanısını güçleştirmektedir (Arbuckle ve diğ., 2003).

2.1.2. Tarihçe

Lupus terimi yaklaşık bin yıldan beri tıbbi literatürde kullanılmaktadır (Rowell, 1997).“Lupus érythémateaux” terimi ilk kez 1851 yılında Cazénave tarafından kullanılmıştır (Cazénave, 1851). Latince’de lupus, kurt anlamına gelirken, “*erythema*” eritem, enfeksiyon veya enflamasyon sonucu deride meydana gelen kızarıklık ve hasar olarak tanımlanır. Hastalık kapsamında yaygın olarak kullanılan başka bir sembol de kelebeğdir. Yüzde kurt ısırığını andıran yaralanmalar ve/veya kelebek şeklini andıran uzunlamasına bir kızarıklık, hastalığın tanımlanmasında önemli semptomlardır. Diskoid biçimli kutanöz lupusun tanımı ise 1833 yılında yapılmış, ancak 1934 yılında deri değişikliklerinin dağılımı ve ölçülerine göre geliştirilmiştir (O’Leary, 1934). 1979’da

Richard D. Sontheimer ve arkadaşlarının yayınladığı olgu raporu, hastalığın temel açıklaması olarak kabul edilir (Sontheimer ve ark.,1979). Móríc Kaposi 1872’de diskoid lupus ve yayılmış “sistemik” lupusu ayırt eden ilk kişi olmuştur (Kaposi, 1872). Kaposi deri bulgularının yanında ateş, anemi, eklem çevresinde ağrı, kilo kaybı ve artrit gibi sistemik belirtilerin hastalıkla ilişkisini göstermiştir. Böbrek, kalp ve akciğerlerle ilgili daha tanımlanabilir belirtiler de 1895’de Osler tarafından gösterilmiştir (Osler, 1895).William Osler aynı zamanda günümüzde kullanılan "*Sistemik lupus eritematozus*" terimini de literatüre kazandırmıştır. Otoantikor ve antinükleer antijenlerin keşfi (1950-1960) ile birlikte hastalığın otoimmün doğası ve yüksek değişkenliği daha iyi anlaşılacakla birlikte sistemik lupus 2000’li yıllarda otoimmün bir hastalık olarak tanınmıştır (Meller ve diğ.,2005). SLE’nin otoimmün bir hastalık olduğu Hargraves (1948) tarafından gösterilmiştir. Yaklaşık on yıl sonra, 1957’de lupus hastalarında nükleer yapılara karşı otoantikorların yüksek düzeyde olduğunun tespiti (**A**nti-**n**ükleer **a**ntikorlar; **ANA**) ve bu ANA’ların gösterilmesi amacı ile tanısal immünofloresan deneyleri geliştirilmiştir (Friou, 1957). Bu antikorların çift sarmallı DNA (**dsDNA**) ve histon proteinlerine afinitesi olduğu belirlenmiştir. ANA’lar diğer sistemik otoimmün hastalıklarda da görülmekle birlikte, anti-dsDNA otoantikorları SLE için çok yüksek seçicilik göstermektedir.

Hastalığın tarihsel geçmişindeki en önemli başarılarından biri lupus eritematozus (**LE**) hücresinin keşfidir (Hargraves, 1969). Kemik iliği ve kan preparatlarında LE hücresinin tespiti, SLE hastalığının klinik teyidinde ya da şüpheli olan hastaların belirlenmesinde büyük önem taşımaktadır (Hepburn, 2001). Bu hücrenin belirgin özelliği, hastalıklı hücreye ait çekirdeğin olgun polimorfonükleer lökositler tarafından fagosite edilmiş olmasıdır (Şekil 2.1). Çift iplikli DNA’ya (dsDNA) karşı üretilen anti-dsDNA antikorları temel SLE araştırmalarının esas çalışma konularından biri haline gelmiştir.



Şekil 2.1: Lupus Eritematozus (LE) hücreleri. Bu hücrelerin çekirdekleri, olgun polimorfonükleer lökositler tarafından fagosite edilir ve sindirilir. Şekilde homojen inklüzyon polimorfonükleer lökosit ok ile gösterilmiştir (Rheumatology image bank)¹.

2.1.3. Epidemiyoloji

Diğer pek çok hastalık semptomları ile ortak özellikleri paylaştığından lupus hastalığı tek tek hastaların kendi raporlarına bağımlı olarak değerlendirilmektedir. Kesin epidemiyolojik bilgi eksikliği nedeniyle lupuslu kişilerin sayısı tam olarak bilinmemektedir. Mevcut sınırlı verilere dayanarak, dünya çapında en az beş milyon kişinin lupus hastası olduğu ve her yıl 100.000'den fazla yeni vakanın ortaya çıktığı tahmin edilmektedir (Rus ve Hochberg., 2002; Office of Minority Health 2004³; Calvo-Alen ve diğ., 2005). Yaygın bir hastalık olmasına rağmen toplumda birçok kişi bu hastalıkla ilgili bilgi sahibi değildir. Amerika'da Lupus Vakfı için yapılan 1.000 yetişkinin katıldığı bir ankette, katılımcıların %38'inin lupus hakkında az da olsa bilgi sahibi olduğu, %39'unun sadece hastalığın adını duyduğu, % 22'sinin ise hastalık hakkında hiçbir fikri olmadığı belirlenmiştir. Yapılan çeşitli anketlerde ankete katılanların sadece %20'sinin hastalık hakkında doğru temel bilgilere sahip olduğu görülmüştür (Lupus Foundation of America, 2004)².

1 <http://images.rheumatology.org/viewphoto.php?imageId>

2 Lupus Foundation of America, 2004, Statistics on Lupus, [Online], http://www.lupus.org/webmodules/webarticlesnet/templates/new_newsroomreporters.aspx?articlart=247&zoneid=60

3 Office of Minority Health, 2004, Burden of Lupus. [Online], <http://www.cdc.gov/omhd/AMH/factsheets/News/LupusNews.htm>,

Hem hastaların hem de doktorların belirtileri genellikle yanlış sınıflandırması veya göz ardı etmesi, lupus teşhisini geciktiren en önemli faktörlerdir. Amerika Lupus Vakfı üyelerinin bir anketinde lupus hastalarının yarısından çoğunun lupus tanısından önce en az dört yıl acı çektiklerini ve üç ya da daha fazla doktorla görüştiklerini ortaya koymaktadır (Lupus Foundation of America, 2004)¹. Bu tür veriler göz önüne alındığında, dünya genelinde lupusun yeterince fark edilmediği veya rapor edilmediği pek çok vakanın bulunduğu ifade edilebilir.

Sıklığı ve şiddeti açısından bölgesel farklılıklar göstermesine rağmen, SLE, dünya çapında tanınan ve tüm etnik gruplarda gözlenen bir hastalıktır. En düşük insidansı beyaz ırk nüfusunda gözlenmektedir (Danchenko ve diğ., 2006). İskandinavya'da yapılan çalışmalara göre, SLE'nin yıllık ortalama insidans oranı (***Annual Incidence Rate; AIR***), her 100000 kişide 1.5-4.8'dir (Gudmundsson ve diğ., 1990; Jonsson ve diğ., 1990; Johnson ve diğ., 1995; Voss ve diğ., 1998; Stahl-Hallengren ve diğ., 2000; Nossent, 2001). İngiltere ve Karayip adaları gibi multi-etnik ülkelerde SLE insidansı (her 100000 kişide ***1.8 - 7.6 AIR***) beyaz ırk nüfusunun yüksek olduğu ülkelere göre anlamlı derecede yüksektir (Fessel, 1974; Hochberg, 1985; Nossent, 1992; Johnson ve diğ., 1995; McCarty ve diğ., 1995; Uramoto ve diğ., 1999). Bir hastalığın yaygınlığı doğal olarak insidans oranına ve mortalite açısından da hastalığın şiddetine bağlıdır. ABD'de yapılan epidemiyolojik çalışmalar SLE'nin yaygınlığını her 100000 kişide 14.6-122 arasında olduğunu göstermektedir (Siegel ve Lee., 1973; Fessel, 1974; Hochberg, 1985; Michet ve diğ., 1985; Uramoto ve diğ., 1999). Bu yüksek oranlar, her 100000'de 22-68 aralığında rapor edilen İskandinavya'daki yatkınlık oranını geçmiştir (Nived ve diğ., 1985; Voss ve diğ., 1998; Stahl-Hallengren ve diğ., 2000; Nossent, 2001). Son yıllarda, standardize mortalite oranı (***Standardized Mortality Ratios; SMR***) 1970'lerdeki 10.1'den 2.4'e düşmüştür (Urowitz ve diğ., 1997; Bernatsky ve diğ., 2006). Aynı zamanda, 5 yıllık hayatta kalma oranları, 1950'lerde yaklaşık %50 iken günümüzde %90'ın üzerindedir (Tucker ve diğ., 1995; Merrell ve Shulman., 1995; Urowitz ve diğ., 1997; Abu-Shakra ve diğ., 2004; Pons-Estel ve diğ., 2010). Bu da SLE'nin popülasyonda aslında çok daha yaygın bir hastalık olduğunu göstermektedir.

1 Lupus Foundation of America, 2004, Economic Impact, [Online], http://www.lupus.org/webmodules/webarticlesnet/templates/new_newsroomreporters.aspx?articlart=247&zoneid=60

Geleneksel olarak, SLE çocuk doğurma çağındaki kadınlar arasında yaygın bir hastalık olarak kabul edilmiştir (Siegel ve Lee, 1973; Fessel, 1974). Ancak günümüzde en yüksek yaygınlık (her 100.000'de 130 vaka) menopoz sonrası kadınlarda görülmektedir (Eilertsen ve diğ., 2009). Bu değişiklik, genel nüfus içinde SLE hastalarının hayatta kalma süresinin artması ile birlikte, ortalama yaşamla ilgili beklentilerin uzaması sonucu meydana gelmiştir.

Epidemiyolojik veriler cinsiyet, yaş ve ırka göre belirgin farklılıklar göstermektedir. Son çalışmalar genel yaşa göre, SLE prevalansının (yaygınlık) 100000 kişide 20.6-78.5 olduğunu ve beyaz nüfusa oranla Afrika ya da Asya kökenli bireylerde yaklaşık 2 ila 3 kat daha fazla ortaya çıktığını göstermektedir (Peschken ve Esdaile., 2000; Naleway ve diğ., 2005; Chakravarty ve diğ., 2007). Cinsiyet lupusun güçlü risk faktörüdür ve çalışmaların çoğunda, hastaların %90'ından fazlası kadındır. Genel olarak kadın-erkek oranı 7:1 olurken, doğurgan çağda bu oran 11:1'e yükselir (Manzi, 2001). Çoğunlukla doğurganlık çağındaki kadınlarda gelişen bir hastalık olarak bilinmesine rağmen, SLE 40 yaşından sonra beyaz nüfusta yaşa özel en yüksek insidans (ortaya çıkış, görülme) oranını göstermektedir (Somers ve diğ., 2007). ABD ve Latin Amerika'da Afro-Amerikalılar ya da İspanyollar için yayınlanmış veriler, bu hastalığın bu bireylerde aslında daha önce geliştiğini göstermektedir (Alarcon ve diğ., 1999, Pons-Estel ve diğ., 2004, Pons-Estel ve diğ., 2010).

SLE'ye duyarlılıkta kalıtsal faktörler monozigotik ikizlerde % 26 ve dizigotik ikizlerde % 5 konkordans ile katkıda bulunmaktadır (Deapen ve diğ., 1992). Ayrıca, bir veya daha fazla birinci derece akrabalarında SLE hastalığının teşhisi konulan bireyler için ailesel yaygınlık %10-12'dir (Tsao ve Wu, 2006).

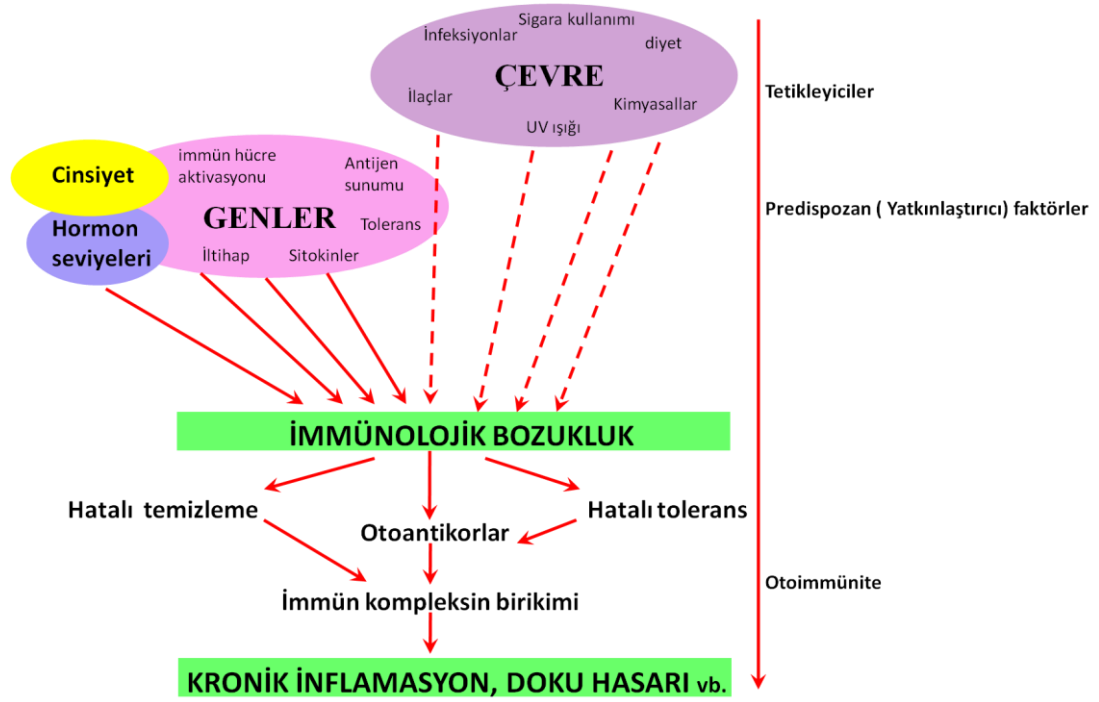
ABD, Fransa, İspanya, İngiltere, Japonya, Almanya ve İtalya'da 2010 yılında SLE prevalansının yaklaşık 404.300 vaka olduğu tahmin edilmektedir. Bu hastalardan yaklaşık %90'ı 45-64 yaşları arasındaki kadınları kapsamaktadır. Vaka sayısının 2020 yılında yaklaşık 420.000'e kadar yükselmesi beklenmektedir. Veri değerlendirmeleri ile 2010- 2020 yılları arasında, özellikle 45-65 yaş arası kadınların nüfus artışının gözleneceği ABD, Fransa, İspanya ve İngiltere'de lupus prevalans vakalarının sayısında genel bir artış olacağı öngörülmektedir (Wood, 2011).

Çalışmaların bir kısmı sadece hastanede yatan hastalara ait verileri kapsarken diğerleri iç hastalıklar uzmanı hekimlerin raporlarına veya hastaların kendilerinin sunduğu beyanlara dayanmaktadır. SLE prevalans ve insidans oranlarındaki değişkenlik, etnik köken ile veya çalışma merkezlerinin veri toplama ve değerlendirmedeki düzensizlikleri ile açıklanmaktadır (Danchenko ve ark., 2006).

2.1.4. Patoloji

SLE geniş yelpazede otoantikorlar ile ilişkili olan kronik bir otoimmün hastalıktır. Hastalığın gelişimi şu şekilde özetlenebilir: Bağışıklık yanıtı, **EBV** (*Epstein Barr Virüs*) enfeksiyonu gibi bir çevresel faktör ya da muhtemelen bir öz-antijen tarafından tetiklenir (James ve diğ., 1995; Harley ve diğ., 2006). Antijen peptitler, antijen sunucu hücreler tarafından T hücrelerine sunulur. Aktifleştirilmiş T-hücreleri, antikorları üretmek için B hücrelerini uyarır. B ve T hücreleri çeşitli aksesuar moleküller ve sitokinler tarafından daha da fazla uyarılır. Yetersiz tolerans sistemi, otoreaktiviteyi bastırmada başarısız olur. İmmün komplekslerin oluşum miktarları artar. Bu komplekslerin ortadan kaldırılma süresindeki bozukluklar, dokularda birikmelerine ve kompleman aktivasyonu aracılığıyla inflamasyona neden olur. Bazı durumlarda, otoantikorlar, kompleman sisteminin tutulumu olmaksızın belirtilere neden olabilir. Örneğin, farklı kan hücrelerine bağlanarak hematolojik hastalıklara sebep olur. Bu model, Şekil 2.2'de gösterilmiştir. Klinik bulgular; kızarıklık, yorgunluk, ateş, artrit başlayıp çeşitli kan hücrelerinin eksikliği, tromboz, serositis, nefrit, nöbet ve psikoza kadar değişir. Otoantikorlar ağırlıklı olarak çift zincirli DNA'ya veya nükleer bileşenlerine (histonlar gibi) karşı üretilir. Ayrıca antikorlar sitoplazmik moleküllere, hücre zarı bileşenlerine veya ekstraselüler moleküllere karşı da antikor üretilmi yapılabilmektedir (Sherer ve diğ., 2004).

Hastalığın şiddeti hastalar arasında farklılık göstermektedir. SLE hastalarının bazıları nispeten hafif belirtilere sahip olup çok az tedavi gerektirir veya hiç tedavi gerektirmezken, diğerlerinde birden fazla iç organı etkileyen kronik inflamasyon oluşup yüksek doz kortikosteroid ve sitostatik ilaçlar ile agresif tedavi yoluna gidilmektedir. Amerikan Romatoloji Koleji (*American College of Rheumatology*) bu hastalığın heterojenliği nedeniyle, sınıflandırmada kullanılacak 11 kriter (Tablo 2.1) belirlemiştir (Tan ve diğ., 1982; Hochberg, 1997).



Şekil 2.2: SLE hastalığında önde gelen olayların gelişimini gösteren bir model önerisi (Hochberg, 1997).

Tablo 2.1: Amerikan Romatoloji Koleji tarafından belirlenmiş ve 1982 ile 1997 yıllarında bir daha gözden geçirilmiş SLE sınıflandırma kriterleri.

Kriter	Açıklama
Malar (elmacık kemiği üzerinde) döküntü	Sabit eritem (cilt kızarıklığı), düz veya kabarık, elmacık kemiği üzerinde, nazolabial kıvrımlara (burun kenarından ağız kenarına inen oyuklara) doğru yayılma eğilimindedir.
Diskoid döküntü	Yapışık keratotik tabakanın soyulması ile foliküler tıkama, kabarmış eritematozus yamaları, büyük lezyonlar, atrofik skar oluşabilir.
Fotosensitivite (ışığa duyarlılık)	Hastanın öyküsü ve hekimin gözlem yoluyla teşhis ettiği güneş ışığına karşı oluşan tepki sonucu cilt döküntüsü.
Ağızda ülser	Hekim tarafından gözlenen genellikle ağrısız oral veya nazofarengeal ülserasyon
Artrit	2 veya daha fazla periferel eklemdeki hassasiyet, şişme veya efüzyon
Serozit	a: Plörit (akciğer zarı iltihabi), plöretik ağrı öyküsü, plevral efüzyon gibi kanıtlar veya hekim tarafından duyulan sürtünme sesi Veya b: Perikardit (ECG veya perikardiyal efüzyon veya hekim tarafından duyulan sürtünme sesi ile kanıtlanmış)
Böbrek bozukluğu	a: Devamlı idrarla protein atılması (> 0.5 g / gün) ya da 3+ daha büyük (eğer miktar ölçümü mümkün değilse) Veya b: Hücresel atmalar: eritrosit, hemoglobin, granüler, tübüler veya karışık
Nörolojik bozukluk	a: Nöbetler (soruna neden olan ilaçlar ya da bilinen metabolik bozuklukların yokluğunda) Veya b: Psikoz "ruhsal denge bozukluğu" (soruna neden olan ilaçlar ya da bilinen metabolik bozuklukların yokluğunda)
Hematolojik bozukluk	a: Retikülositoz ile hemolitik anemi Veya b: Lökopeni (2 veya daha fazla kez <4000/mm ³) Veya

İmmünolojik bozukluk	<p>c: Lenfopeni (2 veya daha fazla kez $<1500/\text{mm}^3$) Veya d: Trombositopeni (ilaç soruna neden olmaksızın $<100,000 / \text{mm}^3$) a: Nativ DNA'ya karşı anormal antikor titresi Veya b: Sm nükleer antijene karşı antikor Veya c: Antifosfolipid antikorlar 1) IgG veya IgM antikardiyolipin antikorlarının anormal serum düzeyi, 2) Standart bir yöntem kullanılarak lupus antikoagülan pozitif test sonucu, veya 3) Treponema pallidum immobilizasyon veya floresan treponemal antikor absorpsiyon testi ile teyit edilen en az 6 ay süreyle frengiye (sifilis) karşı bir yanlış pozitif serolojik test</p>
Anti-nükleer antikorlar	<p>Uyuşturucudan kaynaklanan lupus sendromu ile ilişkili olduğu bilinen ilaçların yokluğunda immunofloresan veya eşdeğer bir yöntem ile antinükleer antikorun anormal titresini</p>

Bu kriterler sınıflandırma amaçlı olmakla birlikte dört kriterin uyumlu olması durumunda tanı koymada etkilidir. Avrupa'daki hastalar üzerinde yapılan büyük bir çalışmada, artrit (hastaların % 48.1), karakteristik malar kızarıklığı (% 31.1) ve böbrek bozukluğu (% 27.9) en sık görülen klinik bulgular olarak tespit edilmiştir (Cervera ve diğ., 2006).

2.1.5. Etiyoloji ve patogenez

SLE'nin çeşitli genetik ve çevresel faktörler arasındaki karmaşık bir etkileşim sonucu ortaya çıktığı düşünülmektedir. Ancak SLE'nin nadir monogenik formlarının oluşumuna yol açan, yaklaşık 25 proteinlerden oluşan, birlikte antikor kaplı antijenlerin "antijen-antikor kompleksleri" vücuttan atılmasına yardımcı olan bir kompleks olan üyesi C1q, komplemanın erken bileşenlerinin tam eksikliği veya **TREX1** "*Three Prime Repair Exonuclease 1*" geninin kusuru ile ilişkili birkaç örnek de bilinmektedir (Lee-Kirsch ve diğ., 2006; Hübner, 2007).

SLE çoğunlukla patojenik antikorların varlığı nedeniyle bir B hücresinin aşırı aktivasyonu sonucu oluşur (Lipsky, 2001). Bununla birlikte, bu patojenik B hücrelerinin gelişimi ve hayatta kalması T-hücrelerinin yardımıyla mümkündür (Manson ve Isenberg, 2003). Otoantikorlar IgG izotipinde olduğundan ANA üreten B hücrelerinin T hücre teşvikli Ig sınıf değişimi geçirdiklerine ve bu yolla afinitelerinin olgunlaştığına ilişkin kanıtlar vardır (Hoffman, 2004).

2.1.6. SLE'nin genetik bileşenleri

SLE'nin genetik risk faktörleri tanımlanmıştır. Mürin ile yürütülen çalışmalar, 40'dan fazla genin lupus benzeri sendroma neden olduğunu göstermiştir (Raman ve Mohan, 2003). Bu genler, sayıları çok olmasına rağmen, genelde üç fonksiyonel gruptan birinde yer alırlar: (1) apoptotik hücrelerin temizlenmesini etkileyen moleküller, (2) lenfositlerin apoptoz ile ilgili moleküller, (3) lenfosit sinyalini ve yayılmasını düzenleyen ya da güçlendiren molekülleri kodlayan genler. SLE ile ilişkili olan bu genler immün sistemin düzenlenmesinde çeşitli fonksiyonlara sahiptirler. Bu moleküllerin hepsi birlikte, aşırı ve uzun süreli immün reaksiyonlara yol açmakta, kendini baskılamada yetersiz kalmakta ve bu durum hastalığa yatkınlık ile sonuçlanmaktadır.

Epigenetik faktörlerin, özellikle T-hücrelerinde düzenlenmeyi bozan DNA hipometilasyonlarının da SLE patogenizinde önemli olduğu düşünülmektedir (Yung ve Richardson, 1994).

SLE hastası kardeşi olan bir bireyin hastalık riski normal bir bireye göre 20 kat daha fazladır (Alarcon-Segovia ve diğ., 2005). İkizlerle yapılan çalışmalarda, aynı anda görülme oranı monozigotik ikizlerde % 24-69 arasında iken dizigotik ikizlerde % 2-3'tür.

2.1.6.1. SLE'de kompleman eksikliği

SLE hastalarının çoğunda hastalığın gelişimi için en az dört yatkınlık geninin bulunması gerektiği bildirilmiştir (Schur, 1995). Ancak, çok küçük bir hasta grubunda (<% 5) tek bir gen hastalıktan sorumludur (Mok ve Lau, 2003). Örneğin, C1 (C1q, C1r ve C1s), C2 ve C4 gibi komplemanın erken evre proteinlerinin sentezinden homozigot alleler sorumludur (Carroll, 2004; Nath ve diğ., 2004). Bunlar arasında özellikle C1q eksikliği güçlü bir yatkınlık geni olarak tanımlanmaktadır. Bu eksikliği taşıyan hastaların %90'unda hastalık gelişmektedir (Tsao, 2003). Kompleman sistemi apoptotik hücrelerin fagositozu ve atılımında önemli bir role sahiptir. Bu yolda oluşan kusurlar otoantijenlerin sunumuna yol açabildiğinden yüksek afinite IgG antikorlarının gelişimi ile sonuçlanmaktadır (Botto ve diğ., 1998). Ancak, komplemanın C3 proteininde eksikliği olan bireylerde SLE gelişme riskinin azalması bu hipotezle bir çelişki

oluşturmaktadır (Carroll, 2004). Başka bir hipoteze göre; komplemanın erken proteinleri B hücre toleransını oluşturmada etkin bir role sahiptir. Kompleman ile kaplanmış öz-antijenler, kompleman reseptör 1 (**CR1**) ve kompleman reseptör 2 (**CR2**) ile gelişmekte olan B hücrelerine bağlanır. Bu durum da negatif seleksiyonu artırır. Komplemanın erken bileşenlerindeki kusur, B hücrelerinin otoreaktivasyonun eliminasyonunda başarısız olmasına neden olabilir (Carroll, 2004).

2.1.6.2. SLE'de HLA genleri

Her insan, korunma sisteminin bir parçası olan, vücut dokusunun yabancı dokudan ayırt edilmesini sağlayan özgün doku özellikleri taşımaktadır. Doku immün sistem olarak da tanımlanan bu sistem **HLA** ("*Human Leukocyte Antigen*") sistemidir. Doku özellikleri ilk defa lökositlerin yüzeyinde 1963'de belirlenmiştir (Terasaki, 1990). Bu sistem hastalık tetikleyicilerine, özellikle yabancı proteinlere karşı bir savunma mekanizması oluşturur. Tüm HLA'ları kodlayan gen bölgesi insanda 6. kromozom üzerinde bulunur. Bu bölgeye temel doku uyumu kompleksi gen bölgesi ("Major Histocompatibility Complex Gene Region") denir. Doku uyumu antijenlerine **MHC** ("Major Histocompatibility Complex") antijenleri adı da verilir. Bu antijenler eritrosit ve megakaryositler dışında tüm hücrelerin yüzeyinde bulunurlar. Yapısal özellikleri, hücre dağılımı ve kodlandığı gen bölgeleri farklı üç MHC molekülü vardır: MHC-I, MHC-II ve MHC-III. MHC-I tüm çekirdekli hücrelerde, MHC-II ise antijen sunucu hücrelerde bulunmaktadır. Bunlar kodlandıkları genlere göre adlandırılırlar. HLA gen bölgesi yüksek derecede polimorfizme sahiptir. En önemli HLA-özellikleri HLA-A, HLA-B ve HLA-DR'dir. MHC'nin T-hücreleri ile beraber immün sistemin kendisinden olanı ve olmayanı ayırt etmede rol aldığı gösterilmiştir. İşlenmiş antijenik peptidler MHC molekülündeki peptid bağlanma oluşuna bağlanırlar. Yardımcı T-lenfositler (CD4-**Th**); MHC-Sınıf II ile bağlanmış peptidleri tanıırken, sitotoksik T-lenfositler (D8-**Tc**); MHC-Sınıf I ile bağlanmış peptidleri tanır.

Populasyon çalışmalarında **MHC** genlerinin otoimmün hastalıklar üzerindeki etkisi kapsamlı şekilde incelemiştir. Bu çalışmalar beyaz ırk nüfusunda HLA-DR2 ve HLA-DR3 sınıf II genlerinin SLE oluşumuna sürekli katkıda bulunduğunu ve göreceli riskin her allel için iki kat arttığını göstermiştir (Tsao, 2002). Beyaz ırk kökenli olmayan

populasyonlarda hastalığın HLA ile ilişkili olduğunu destekleyen tutarlı kanıtlar bulunmamaktadır.

2.1.6.3. SLE'de HLA-dışı genler

SLE'li aileler üzerinde yapılan bağlantı analizi çalışmalarında MHC bölgesinin dışında diğer bazı yatkınlık bölgeleri de saptanmıştır. SLE ile bağlantılı olan kromozom bölgeleri 1q23 (Moser ve diğ., 1998; Edberg ve diğ., 2002), 1q41-42 (Tsao ve diğ., 1997; Shai ve diğ., 1999; Edberg ve diğ., 2002), 2q35-37 (Lindqvist ve diğ., 2000), 4p16-15.2 (Gray-McGuire ve diğ., 2000) ve 16q12 (Gaffney ve diğ., 2000; Nath ve diğ., 2004) olarak saptanmıştır. Bu kromozom bölgelerinin her biri birçok olası SLE yatkınlık genini taşımaktadır (Tablo 2.2).

Sadece beyaz ırk denekleri ile yapılan bir çalışma, kromozom 19 p13.2 ve SLE arasındaki bağlantıyı ortaya koymuştur (Lindqvist ve diğ., 2000). SLE'nin ana belirtilerine göre hastaların sınıflandırıldığı başka bir çalışmada, anti-DNA antikor gelişiminin bu kromozomal bölge ile bağlantılı olduğu gösterilmiştir (Namjou ve diğ., 2002).

Tablo 2.2: SLE ile ilişkili aday genler (Nath, 2004'den alınmıştır).

Gen	Kromozomal bölge	İlişkili alel	Referans
FCgRIIa	1q22-23	R131	Salmon ve diğ., 1996
FCgRIIIa	1q22-23	F176	Wu ve diğ., 1997
IL-10	1q31-32	Çoklu alleller	Mehrain ve diğ., 1998
CTLA-4	2q33	+49G	Ahmed ve diğ., 2001
PDCD-1	2q37	PD-1.3A	Prokunia ve diğ., 2002
TNF-α	6p21	TNF2	Wilson ve diğ., 1994
LT-α	6p21	Bilinmiyor	Kim ve diğ., 1996
MBL	10q11.2-q21	230A	Davies ve diğ., 1995
FasL	1q23	-844C	Wu ve diğ., 2003
Fas	10q24	297C/416G	Horiuchi ve diğ., 1999
Bcl-2	18q21	Çoklu alleller	Mehrain ve diğ., 1998

2.1.7. SLE'de apoptoz kusuru

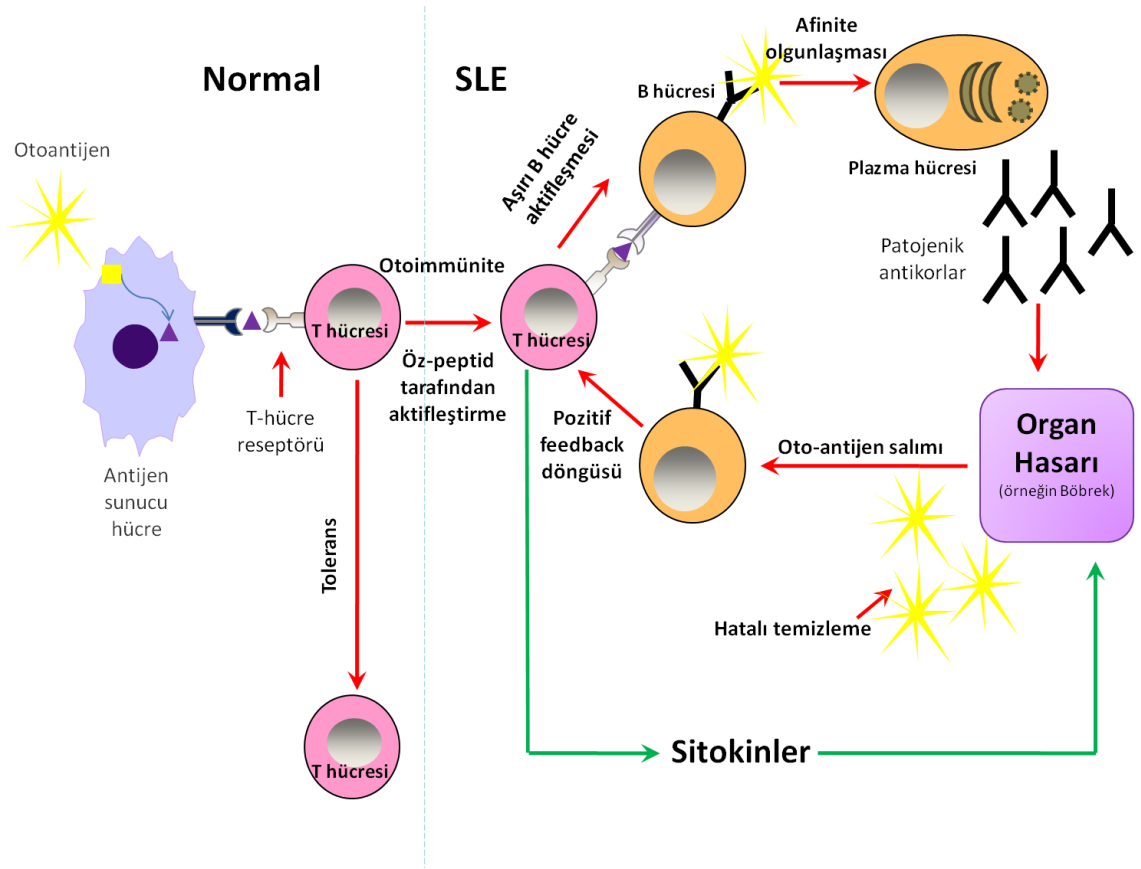
Organizmanın savunma gücünü oluşturan immün sistem normal şartlarda, dışarıdan gelebilecek her türlü yabancı unsura ve kendinden olmayan (ing: *non-self*) her türlü antijene karşı kendisini savunurken; bireyin kendine ait öz antijenlerine karşı bir

reaksiyon göstermemektedir. İmmünolojik bu yanıtızsızlık durumuna “immün tolerans” denir. İmmün toleransın ortaya çıkması için immün sistem hücrelerinin, özellikle T ve B lenfositlerinin, öz-antijenlere karşı immün yanıt oluşturmamayı öğrenmesi gerekir. Bu süreç embriyo döneminde, öncelikle timus ve kemik iliğinde, daha sonra da periferel kanda gerçekleşmektedir. Timus ve kemik iliğinde oluşan toleransa santral tolerans, daha sonra periferel kanda gelişen toleransa da periferik tolerans denir. Bu tolerans mekanizmaları çok sıkı olarak kontrol edilmekte ve değişik basamaklarda bu toleransın kırılması engellenmektedir. Ancak bir takım sebeplerle organizmanın yabancı antijenlere karşı savunmasında görevli olan immün sistem elemanlarının öz-antijenlere karşı duyarsızlığının veya toleransının kırılması sonucu öz doku ya da hücrelere karşı da saldırılar başlayabilir. Bu yolla oluşan hastalıklar otoimmün hastalıklar olarak isimlendirilir. Her insanın kanında, hücrelerinde veya bağ dokusunda potansiyel olarak immünojenik olabilecek öz-antijenler bulunmaktadır. Bu antijenler bireyin lenfositleri ile sıklıkla karşılaşılır. Ancak normalde lenfositler bu antijenlere yanıt vermezler. Bu şekilde self reaktif potansiyeli olan bu lenfositler olgunlaşamaz. Embriyonik dönemde timusta T lenfositlerinin, kemik iliğinde ise B lenfositlerinin çoğalma periyodunda bu hücrelere devamlı self-antijenler sunulmaktadır. Bu hücrelerden self-antijenlere aşırı reaksiyon gösteren klonların programlı hücre ölümü ile (apoptoz) yok edilerek olgun lenfosit haline gelmeleri engellenir. Bu da santral toleransın temel mekanizmasını oluşturur. Bu sırada self-antijene hiç cevap vermeyen anerjik klonlar da büyüme sinyali alamadıkları için yok olurlar. Aynı zamanda öz-antijene az miktarda yanıt veren T lenfosit klonlarının yaşaması sağlanır ve periferel kan ve lenf sistemine dağılırlar.

Santral toleransla, kendinden reaktifleşmiş lenfositler ortadan kaldırılır. Ancak bu süreçte eksik ve düşük afiniteli, kendinden reaktif olan B ve T hücreleri kaçıp, normal periferel immün sisteminin bir parçası haline gelebilirler (Shlomchik ve diğ., 2001) (Şekil 2.3). Otoantijenler periferelde düşük afinitiyeye sahip olan, kendinden reaktifleşmiş T hücrelerine sunulabilir. Normal bireylerde, ya bu öz-antijenlere karşı bir tolerans meydana gelir veya T-hücreyi, aktivasyon ile uyarılan hücre ölümü (Activation Induced Cell Death; **AICD**) ile ortadan kaldırılır. Normalde AICD, çözünebilir antijen ile karşılaşan veya sürekli aktivasyon ve proliferasyonu gerçekleştiren lenfositleri ortadan kaldıran doğal bir süreçtir (von Herrath ve Harrison, 2003). SLE hastalarında ise T-hücrelerinde AICD süreci kusurludur. Bu hücreler siklooksijenaz-2'nin (**COX-2**)

ekspresyonunu arttırıp onu kalıcı hale getirerek AICD sürecini engeller (Lu ve diğ., 2004).

Hücrelerin anormal apoptozu ve fagositozun bu apoptotik cisimciklerin kaldırmasında başarısız olması SLE'de öz-antijenlerin aşırı gözlenmesine neden olur. Genetik olarak yatkın bireylerde uzun süre apoptotik hücelere maruz kalma T hücre toleransını bozmada önemli bir faktördür (Cascicola-Rosen ve diğ., 1994).



Şeki 2.3: SLE'de otoimmünite gelişimi. Normal bireylerde T hücre toleransı öz-antijenlerin sunumu ile meydana gelir. Birçok genetik ve çevresel faktör nedeniyle, periferik tolerans, SLE hastalarında kaybolur. Bu da patojenik antikorların salınmasına ve organ hasarının gelişmesine yol açar (Shlomchik ve diğ., 2001'den alınmıştır).

Apoptotik hücrelerin ortadan kaldırılması kompleman reseptörleri, süpürücü reseptörler ve lipopolisakkarit (**LPS**) reseptörlerinin (CD14) dahil olduğu, çeşitli reseptörleri içeren makrofajlar aracılığıyla sağlanır (Berden, 2003). Daha önce belirtildiği gibi, kompleman reseptörlerinin veya C1, C2 ve C4 gibi erken kompleman proteinlerinin genlerindeki bozukluklar SLE'ye yüksek bir yatkınlık oluşturur.

2.1.8. SLE'de T hücre aktivasyonu yanıtları

SLE hastalarından izole edilmiş T hücreleri ile *in vitro*'da uyarılan kontrol grubu T hücreleri karşılaştırıldığında hastalarda daha yüksek hücre içi Ca^{++} akışı olduğu bulunmuştur (Vassilopoulos ve diğ., 1995). Hücre içi Ca^{++} iyonlarının sürekli artışı kalsinörin ve protein kinaz C (**PKC**) gibi enzimleri aktif durumda tutar ve bunlar da **NFAT**, **AP1** ve **NF- κ B** gibi birçok genel transkripsiyon faktörünü aktifleştirir. Daha önce belirtildiği gibi, bu transkripsiyon faktörlerinin aktivasyonu proinflamatuvar sitokinlerin sentezini artırır ve hücrenin bu şekilde hayatta kalmasını teşvik eder. Aynı zamanda SLE hastalarının T-hücrelerinde, Protein Kinaz A (**PKA**) izoenzimlerinin mRNA düzeyinde ve enzim aktivitesinde bir düşüş olduğu rapor edilmiştir (Laxminarayana ve diğ., 1999). PKA izoenzimleri normal bireylerde sinyalleşme olaylarında negatif düzenleyici olarak iş görür. Bu yolağın kusurlu olması T hücrelerinin anormal derecede yüksek yanıt vermesine neden olur (Tsokos ve Kammer, 2000).

Hastalığın aktif olduğu dönemlerde, SLE hastalarının periferik kanında düzenleyici T hücrelerinin ($CD4^+$, $CD25^+$) düzeyi düşer ve hastalığın şiddetinin hafiflemesi (remisyon) sırasında bu hücrelerin sayısı, tekrar normal bireylerdeki sayıya döner (Crispin ve diğ., 2004, Liu ve diğ., 2004). SLE'de B hücre olgunlaşmasında güçlü bir engelleyici rolü olan baskılıyıcı $CD8^+$ 'de fonksiyonel bozukluk tespit edilmiştir (Filaci ve diğ., 2001). Ayrıca yüzeylerinde doğal öldürücü reseptörü (**NKR**) ve değişmez T hücre reseptörü (**TCR**) bulunan doğal öldürücü T hücrelerinin (**NKT**) sayıları, aktif SLE hastalarında azalmaktadır (Oishi ve diğ., 2001). Oтореaktif B hücrelerinin doğal öldürücü T hücreleri tarafından inhibe olduğu da bildirilmiştir (Singh, 2005a). SLE sıçan modellerinde, α -galaktozilseramid kullanarak NKT hücrelerinin aktivasyonu lupus dermatit ve lupus nefriti baskılar, oysa NKT hücre kaybı, bu hayvan modellerinde lupus semptomlarını şiddetlendirir (Singh ve diğ., 2005b).

2.1.9. SLE'de B hücre toleransı ve olgunlaşması

C1q gibi erken kompleman proteinlerinin B hücre toleransında bir role sahip olmalarına dair spekülasyonlar vardır (Carroll, 2004). SLE hastalarında, düşük afiniteye sahip öz-reaktif B hücrelerinde tolerans indüklenmesindeki başarısızlık, bunların T hücre bağımlı

bir şekilde olgunlaştığı anlamına gelmektedir. **TNFSF** (ing: “**Tumor Necrosis Factor Superfamily**”)’nin bir üyesi olan B lenfosit uyarıcısı (**BlyS**) aktif lupusda yüksek seviyelerde ölçülmüştür (Zhang ve diğ., 2001). BlyS tarafından B hücrelerinin sürekli uyarımı, T hücre-bağımlı bir şekilde plazma hücrelerinin oluşmasına yol açmaktadır ki, bu da antikorların büyük miktarlarda üretilmesine sebep olur (Schiemann ve diğ., 2001).

Olgunlaşma süreci, düşük afiniteli öncülerden yüksek afiniteli B hücrelerinin oluşmasına sebep olur (Janeway ve ark., 2001). Sonuçta ortaya çıkan patojenik çözünür antikorlar, antijen ile immün kompleksleri (**İK**) oluşturabilirler. FCYRIIa (CD32) ve FCYRIIIa (CD16) genlerinin polimorfizmleri ile SLE gelişme riskinin artması arasında ilişki bulunmaktadır (Salmon ve ark., 1996; Edberg ve ark., 2002). Bu reseptörler immün komplekslerde bulunan ana **IgG** izotipleri olan IgG2 ve IgG3’ün fagositozuna katılırlar. FCYRIIa alelli R131 ve FCYRIIIa alelli F176 IgG2 veya IgG3 antikorları için reseptörlerin afinitesinde bir azalmaya neden olabilirler (Salmon ve ark.,1996; Wu ve ark.,1997). İK’lerin ortadan kaldırılamaması, böbrekler gibi çeşitli organların içinde birikmelerine yol açar ki, bu da yerel inflamasyon ve doku hasarına neden olabilmektedir. Bu organ hasarı, daha çok öz-antijenin bağışıklık sisteminine salgılanması ve inflamatuvar sürecin sürdürülmesi ile sonuçlanır. T hücrelerinin kendileri de, **TNF- α** ve **INF- γ** gibi güçlü sitokinlerin salınımına bağlı doku hasarına neden olabilmektedir (Hoffman, 2004).

2.1.10. Dış faktörler

İkizlerle gerçekleştirilen çalışmalar genetik bileşenlerin SLE etiyolojisindeki rolünü açıklamıştır. Konkordans oranlarının nispeten düşük olması, dış faktörlerin hastalıkla ilişkisini açıkça göstermektedir. Çeşitli enfeksiyöz ajanların (özellikle EBV) hastalığa bağlı olarak mononükleoza neden olduğu gösterilmiştir. Bu ajanların varlığında, viral antijenler ile öz antijenler arasında antikor çapraz reaktivite meydana gelmektedir. EBV enfeksiyonunda ise öz-reaktif B hücreleri virüs tarafından ölümsüzleştirilmektedir (Kaufman ve diğ., 2003; Pender, 2003; McClain ve diğ., 2005; Harley ve diğ., 2006).

Ayrıca **UV** radyasyonu, özellikle UVB SLE için bir risk faktörü olarak gösterilmektedir (Mok ve Lau, 2003; Sarzi-Puttini ve ark., 2005). Genelde SLE hastaları ışığa karşı hassastır. UV ışığı, keratinositlerin apoptozunu indükler. Sonuçta çekirdek ve

sitoplazmik antijenleri içeren hücrelerin yüzeyi üzerinde apoptotik kitleler (“*blebs*”) oluşur (Casciola-Rosen ve ark., 1996). Bu yapılar otoimmüniteyi tetikler. Pek çok ilacın Lupus-benzeri semptomları indüklediğibilinmektedir.

Hormon replasman tedavisi (**HRT**) ve oral kontraseptif kullanımı ile östrojenlere maruz kalmak SLE gelişme riskinde küçük bir artışa neden olmaktadır (Sanchez-Guerrero ve diğ., 1995; Sanchez-Guerrero ve diğ., 1997; Meier ve diğ., 1998). Genellikle ilaca bağlı lupus eritematozusun uzun bir gecikme dönemi vardır. Belirtiler ilaca başladıktan aylar veya bazen yıllar sonra ortaya çıkmaktadır (Borchers ve diğ., 2007).

SLE riskini arttıran diğer dış faktörler arasında, yüksek dozda silis tozuna maruz kalmak (Parks ve Cooper, 2006), bazı besinler (yüksek miktarda L-kanavanin içerdiğinden, özellikle kaba yonca) (Prete, 1985a-b) ve sigara (Costenbader ve Karlson, 2005) sayılabilir. Daha geniş çalışmalarla teyit edilmesi gerekmele birlikte ağır metaller, çözücü maddeler, kirleticiler, pestisitler ve saç boyalarının da risk faktör olabileceği ifade edilmektedir (Sarzi-Puttini ve ark., 2005).

2.1.11. Cinsiyet ve hormonların etkileri

Seks hormonlarının hem doğuştan hem de edinsel immün cevaplar üzerine büyük bir etkisi vardır. Kadınların hümorale immün yanıtı genel olarak, erkeklere göre daha güçlü ve kadınlarda genellikle enfeksiyon veya aşuya yanıt olarak üretilen toplam immünoglobulin düzeyi daha yüksektir. Bu fark ilk ergenlik döneminde belirginleşir ve çocuk doğurma yaşları boyunca devam eder (Lockshin, 2001; Verthelyi, 2001; Beagley ve Gockel, 2003). Kadınlar aynı zamanda daha hızlı allogreftleri reddeder, tolerans indüksiyonuna karşı nispeten dirençlidirler ve daha etkili bir anti-tümör immüniyeye sahiptirler (Grossman, 1984; Hall ve Goldstein, 1984; Ansar Ahmed ve Talal, 1988; Ansar Ahmed ve diğ., 1989; Morris ve diğ., 1994). Güçlü immün yanıt kabiliyetleri, kadınların SLE dahil olmak üzere bazı otoimmün hastalıklara daha duyarlı olmalarının sebebi olarak önerilmiştir. Kadınlarda hastalığın yüksek prevalansı, ergenlik döneminden sonra başlayan ve aktivitesi adet döngüsünden veya gebelikten etkilenen bulgular, hastalıkta hormonların etkili olabileceğini düşündürmektedir. Kadın cinsiyet hormonu östrojenin kendiliğinden-toleransın (“*self*”) bastırılmasına neden olarak B ve T-hücrelerini ve diğer lökositleri çeşitli şekillerde etkilediği belirlenmiştir (Bynoe ve

diğ., 2000; Grimaldi ve diğ., 2002; Peeva ve diğ., 2005; Grimaldi, 2006; Grimaldi ve diğ., 2006). Lupus eğilimli farelerin (MLR-lpr/lpr fare) kullanıldığı hayvan modeli çalışmalarında da, östrojenin hastalığın ilerlemesindeki hızlandırıcı etkisi gösterilmiştir (Carlsten ve diğ., 1990). Fare modellerinden elde edilen kanıtlara göre androjenlerin koruyucu bir role sahip olabildikleri de saptanmış, hatta bu hipotez SLE tedavisindeki insan üzerinde test edilmiştir (Jungers ve diğ., 1982). Oral kontraseptif kullanımı SLE riskinde artışa yol açmaktadır (Cooper ve diğ., 2002; Costenbader ve diğ., 2007; Sanchez-Guerrero ve diğ., 1997). Bazı çalışmalarda, hamilelik sırasında hastalığın aktivitesinde bir artış gözlemlenmiştir (Lockshin, 1989; Meehan ve Dorsey, 1987; Clowse ve diğ., 2005; Petri ve diğ., 1991). SLE’li erkek ve kadın hastaların çoğunlukla hiperöstrojenik ve / veya hipoandrojenik oldukları tespit edilmiştir (Lahita ve diğ.1981; Lahita ve diğ.1982; Carrabba ve diğ., 1985). SLE’li erkeklerde, testosteron düzeyi düşük iken östrojen düzeyi yüksek bulunmuştur (Lahita ve diğ., 1979). Klinefelter sendromlu erkeklerin (normal XY yerine XXY) SLE’ye daha yatkın olduğu belirlenmiş, gen dozajının hastalıkta etkili olabileceği öne sürülmüştür (Scofield ve diğ., 2008). İlginç olarak bu sendromda östrojenin yüksek düzeyde üretimi de dahil olmak üzere çeşitli cinsiyet hormon bozuklukları saptanmıştır. Örneğin bu sendromda androjen eksikliği saptanmıştır (Tanriverdi ve diğ., 2003). SLE hastalarında çok sayıdaki cinsiyet hormonları ile X kromozomundaki gen kombinasyonunun hastalık sürecindeki etkisi ortaya konulmuştur (Selmi, 2008; Pan ve diğ. 2009).

Seks hormonları bağışıklık hücrelerini nasıl module eder sorusu immünolojinin henüz cevaplandıramadığı bir sorudur. Östrojenlerin genellikle immün yanıtı arttırıcı etkileri vardır (en azından hümorale yanıtlarda), oysa androjen ve progesteronun doğal bağışıklık baskılayıcıları oldukları kabul edilir (Cutolo ve Wilder, 2000). Bağışıklık yanıtında östrojene maruz kaldıktan sonra çeşitli değişiklikler gözlenmiştir. Bunlardan hücre-aracılı bağışıklık yanıtının azalması, mitojenlere karşı azalmış yanıt verme, gecikmiş tip aşırı duyarlılığın bastırılması, periferik T hücrelerin azalması ve NK hücre aktivitesinde düşüş olarak örnek verilebilir (Kalland ve diğ.,1979; Luster ve diğ.,1984; Carlsten ve diğ., 1991). Öte yandan, otreaktif T hücrelerinin üretimi ve yüksek sitokin üretimi de gözlenmiştir (Fox ve diğ., 1991; Yahata ve diğ., 1996).

Östrojen, yardımcı T hücrelerini (Th_2 $CD4^+$) uyarır ve T ile B hücreleri arasındaki etkileşimi artırır ve Th_2 lenfositler tarafından salgılanan **IL-4**, **IL-5**, **IL-6** ve **IL-10**'ün miktarını artırır (Olsen ve Kovacs, 1996; Wilder ve Elenkov, 1998; Verthelyi, 2001; Beagley ve Gockel, 2003). Bu sitokinlerin B hücrelerin çoğalması, plazma hücreleri halinde olgunlaşması ve antikor sentezinde uyarıcı rolleri vardır. SLE hastalarında IL-6 ile IL-10 düzeylerinde artış doğrudan hastalığın klinik şiddeti ile ilişkilidir (Verthelyi, 2001; Wilder ve Elenkov, 1998). IL-4'ün, B hücrelerinin aktivasyonunu uarmasıyla beraber B ve T lenfositlerinin proliferasyonu ve farklılaşması da başlar (Kuby, 1997). Sağlıklı kontrol bireylerde, östrojenin artışı muhtemelen Th_2 hücrelerinin istenmeyen uyarılmasını önlemek için geri besleme ("*feed back*") inhibisyonunun bir mekanizması olarak, IFN- γ konsantrasyonunda bir artışa yol açar. SLE hastalarında, östrojen ile indüklenen IFN- γ salgılanması yoktur (Verthelyi, 2001). IFN- γ 'nın otoimmün hastalıkların başlanmasında önemli olduğu bulunmuştur, ancak daha sonraki aşamalarda rolü yoktur (Peng ve diğ., 1997). **IL-1**, makrofajlar tarafından salgılanan bir akut faz reaktanıdır ve antijenle karşılaştığında klonal T hücrelerinin proliferasyonunu artırır. IL-1'in makrofajların östrojene maruz kalmalarında doza bağımlı bir şekilde yükselmesi gözlenmiştir (Olsen ve Kovacs, 1996). Aktifleşmiş makrofajlar ve monositler tarafından salgılanan pro-inflamatuar TNF- α , T hücrelerinin aktivasyonunu teşvik eder. TNF- α 'nın da miktarı fizyolojik östradiol uygulamasından sonra artar. Makrofajlarda yüksek IL-1 ve TNF- α üretimi hastalığın devam etmesine yol açar (Dayan ve diğ., 1997). IL-1, yardımcı T hücrelerinin aktivasyonu ile olgunlaşmasını ve B hücrelerinin klonal büyümesini teşvik edebilir. TNF- α diğer inflammatuar sitokinlerin üretimini yükselterek apoptoza yol açar ve kilo kaybı ile de ilişkilidir (Kuby, 1997; Segal ve diğ., 1997). Östrojen ayrıca, **IL-2** ve **TGF- β** 'nin üretimini de modüle edebilir (Bouman ve diğ., 2004). Ayrıca, östrojen naif B hücrelerinde anti-apoptotik **Bcl-2** gen ekspresyonunu artırır. **Bcl-2**'nin ekspresyonu toleransın indüklenmesini engelleyerek otoreaktif T ve B hücre klonlarının varlığını sürdürmelerini sağlar. Lupus hastalarının T hücrelerinde sağlıklı gruba göre **Bcl-2** daha yüksek düzeyde anlatım yapar (Thompson, 1995; Bynoe ve diğ., 2000). Androjenler gelişim için de önemlidir ve doğal bağışıklık bastırıcılar oldukları kabul edilir (Cutolo ve Wilder, 2000). Androjenlerin T ve B hücre etkileşimlerini azaltarak düzenledikleri ve CD_4^+ Th_1 ile CD_8^+ lenfositlerin aktive etme yoluyla hücre-aracılı sitotoksik süreçlerini teşvik ettikleri bulunmuştur (Kocar ve diğ., 2000; Lockshin, 2001; Shames, 2002). Testosteron ve dihidrotestosteron uygulaması

hem timus kütlesinin küçülmesi, hem de kemik iliğindeki B hücre sayılarının azalması şeklinde sonuçlanır (Viselli ve diğ., 1997).

2.1.12. SLE'de otoantikolar

SLE hastalarında hücrelerin çeşitli bileşenlerine karşı oluşturulmuş bir takım özgün antikolar bulunmaktadır. Son zamanlarda bu antikoların klinik semptomların başlamasından da önce hastada mevcut olduğu gösterilmiştir (Arbuckle ve diğ., 2003). ANA, SLE hastalarının % 98'inde bulunmaktadır (Maddison, 2005). ANA antikoları, Sjögren sendromu hastalığı (%80) ve otoimmün hepatit vakaları (%70) da dahil olmak üzere organa özgün otoimmün hastalıklar gibi, çok sayıda sistemik romatizmal hastalıkta da bulunmaktadır. Dolayısıyla SLE için özgün değildir (Maddison, 2005). Anti-dsDNA antikoları SLE hastalarının % 70'inde bulunur (Mok ve Lau, 2003). Anti-DNA antikor titrelere zamanla ve hastalık aktivitesi ile dalgalanma göstermektedir ve SLE'de glomerulonefrit gelişimi ile de ilişkilidir (Maddison, 2005). RNA'ya bağlanan proteinlerin dört grubuna (**Sm**, **U1RNP**, **Ro** ve **La**) karşı oluşturulan antikolar da yaygın olarak SLE hastalarında bulunmaktadır (Reichlin ve Harley, 1988). SLE'ye en özgün olanı anti-Sm antikolarıdır ve bu antikolar küçük nükleer ribonükleoproteinlerin (**snRNPs**) temel protein grubu ile reaksiyona girer. Anti-Sm antikoları için geniş bir etnik varyasyon olmakla birlikte beyaz ırk popülasyonlarından daha çok Afro-Amerikan ve Afro-Karayip popülasyonlarında yaygındır (Arnett ve diğ., 1988).

2.1.13. Lupus nefriti

Glomerulonefrit, sistemik lupus eritematozus'un en yaygın ve ciddi tablolarından biridir (Mok ve Tang, 2004; Mok ve ark., 2005). Böbrek tutulumu SLE'nin yüksek mortalite ve morbidite ile seyreden bir formudur. Geçtiğimiz yirmi yıllık zaman zarfında SLE tedavisinde kaydedilen gelişmelere rağmen, lupus nefrit prognozu yetersiz kalmaktadır (Mok, 2010). Lupus nefrit, 2003 yılında Nefroloji Uluslararası Derneği ("**I**nternational **S**ociety of **N**ephrology", **ISN**) ve Böbrek Patoloji Derneği ("**R**enal **P**athology **S**ociety", **RPS**) tarafından tanımlanan histolojik kriterlere göre sınıflandırılır. Buna göre hastalıkta böbrek tutulumunun şiddeti, hiçbir belirtisi olmayan (rutin renal biyopsi ile tespit edilen "sessiz" lupus nefriti) bir formdan, eser proteinüri veya aktif üriner sedimanlar (mikroskopik hematüri, piyüri veya silindirik cisimler),daha ciddi proteinüri

(nefrotik sendrom) ve akut böbrek yetmezliği ile akut nefrotik sendromuna doğru hızla ilerler (Mok, 2012). Lupus nefrit için güncel laboratuvar belirteçleri (proteinüri, artmış kreatinin, glomerüler filtrasyon hızı, idrar protein-kreatinin oranı, hematüri ve aktif idrar sedimentasyonu) ile serolojik göstergeler (anti-dsDNA, C3 ve C4) lupus nefritin aktivitesini ve tekrarlama riskini tespit etmek için yeterince özgün değildir. Bu yüzden lupus böbrek hastalığında teşhisin doğruluğunu ve hassasiyetini arttırmak, prognostik sınıflandırma yapmak, tedaviye karşı gelişen cevabı izlemek ve yapılacak ek tedavi yöntemlerine erken karar verebilmek için yeni biyomarkırlara ihtiyaç vardır. Ayrıca prospektif olarak değerlendirilmiş olan biyomarkırların daha fazla doğrulanması için, lupus nefriti hastalar daha büyük gruplar şeklinde incelenmelidir.

2.1.14. Hastaların sosyal ilişkileri üzerine SLE'nin etkisi

SLE hastalarının çok büyük bir kısmı hastalığın bir sonucu olarak psikolojik ve sosyal stres yaşamaktadır. SLE hastalarının sosyal ağlarındaki sınırlanmalar, arkadaş sayılarının azalmasına, aile üyelerine daha fazla bağımlı hale gelmelerine yol açmaktadır (Karasz ve Ouellette,1995). SLE hastalarının % 66'sından fazlası, iş yerlerinde haftalık mesai saatleri daha az olarak çalışır ise bazı hastalar hiç çalışamazlar (Lupus Foundation of America). SLE hastalarının eş, anne, ya da çalışan kadın gibi toplumsal rollerde yetersiz kalmaları kendilerine olan saygı ve güven duygularında büyük bir eksiklik yaratabilir (Karasz ve Ouellette,1995).

2.2. SİTOKİNLER

2.2.1. Tanıtım

Sitokin termi, ilk kez 1974 yılında Stanley Cohen tarafından kullanıldı (Cohen ve ark., 1974). Sitokinler, hücreler ve dış çevre arasındaki iletişimi mümkün kılan, hormon benzeri çözünen proteinlerdir ve lenfokinler, monokinler, interlökinler, koloni uyarıcı faktörler (CSFs), interferonlar (IFNs), tümör nekroz faktörleri (TNFs), transforme edici büyüme faktörleri (TGFs) ve kemokinleri kapsıyor (Leonard, 1999). Sitokinler devamlı değil ancak uyarıcılara tepki olarak vücudun beyaz kan hücreleri yanı sıra, diğer çeşitli hücreleri (fibroblastlar, endotel hücreleri, epitel hücreleri vb.) tarafından salgılanır. Sitokinler bağışıklık sisteminin düzenlenmesi, inflamasyon ve hematopoiez gibi vücutta birçok fonksiyonda rol oynarlar. Sitokinlerin en büyük grubu bağışıklık sistemine ait

hücrelerin çoğalması ve farklılaşması süreçlerine katkıda bulunurlar. Birçok hücre popülasyonları tarafından salgılanmalarına rağmen, ağırlıklı olarak yardımcı T-hücreleri (Th) ve makrofajlar tarafından üretilirler (Tayal ve Singh Kalra, 2008). Sitokinler üç yolla etkilerini gösterirler; (1) onları üreten hücreler üzerinde etkililer (otokrin etki),örneğin aktive edilmiş T-hücreleri tarafından üretilen IL-2, T-hücrelerin büyümesini teşvik eder; (2) kendi çevrelerindeki diğer hücelere etkililer (parakrin etki), örneğin kemik iliğindeki stromal hücreler tarafından üretilen **IL-7**, B-hücrelerinin progenitörlerini farklılaşmaya teşvik eder; (3) hücreler üzerinde sistemik olarak etkililer (endokrin etkisi), örneğin IL-1 ve TNF inflamasyon sırasında akut faz yanıtı oluşturur (Ikram ve diğ., 2004).

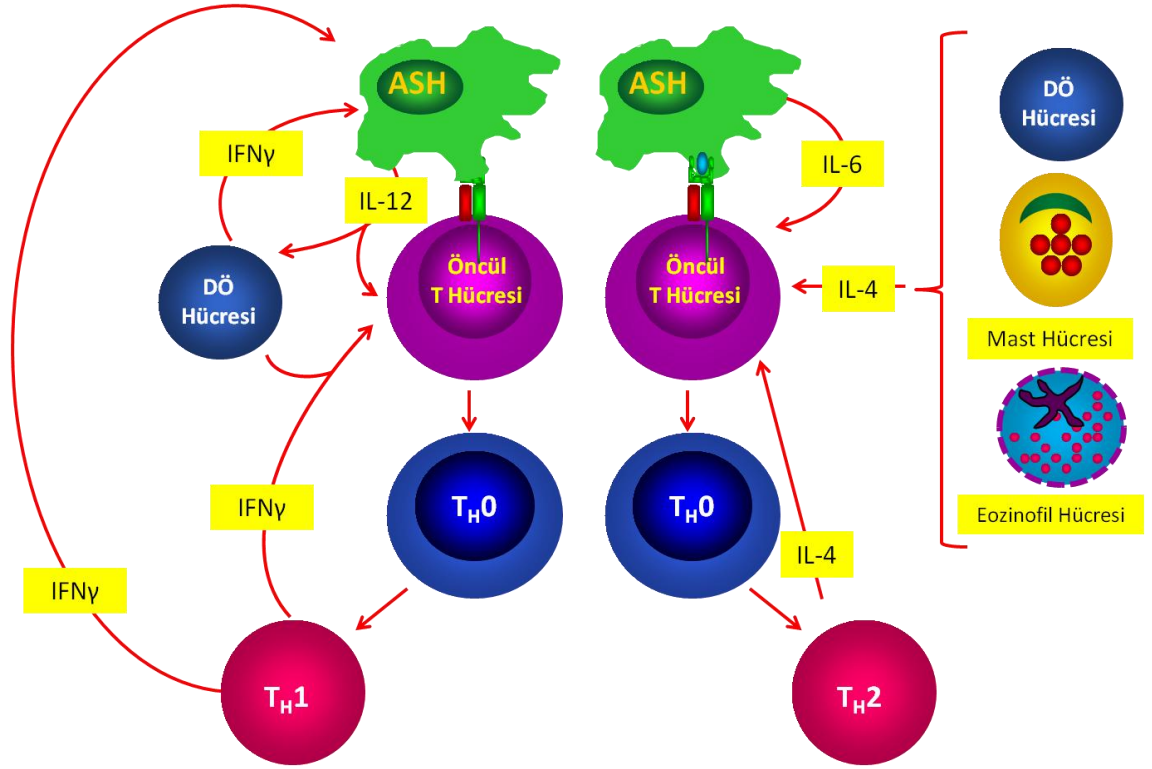
2.2.2. Bağışıklık yanıtlarında yardımcı T-hücrelerinin merkezi rolü

Th1 ve Th2 alt kümelerinin her ikisi de farklılaşmamış öncül T-hücreleri, tarafından meydana getirilir. Farklılaşma, antijen sunucu hücreler (**ASH**) ile öncül hücreleri doğrudan temasa geçtikten sonraki birkaç gün içinde gerçekleşir ve bu süreç polarizasyon denir (Lafaille,1998). Öncül T-hücreleri Th1 veya Th2 hücrelerine farklılaşırken geçici olarak, ön-aktivasyon durumunda olan **Th0** aşamasından geçebilir. Yardımcı T-hücrelerinin polarizasyonu, antijenlerin dendritik hücreler (**DH**), monositler ve makrofajlar gibi tüm ASH'ler ile birincil temasıyla başlar ve bu hücrelerden salgılanan sitokinler ile kemokinler aracılığı ile devam eder. Öz olmayan antijenlerin miktarı eşik seviyesini geçtiği takdirde ASH'ler harekete geçer. Polarizasyon bağışıklık sisteminin maruz kaldığı antijenin doğasına bağlı olarak Th1 veya Th2 yönünde devam eder (Moser ve Murphy,2000).

Bağışıklık sisteminin fonksiyonel bütünleşmesi temel olarak küçük moleküllere dayanan hücre-hücre iletişimi ile gerçekleştirilir. Bağışıklık sisteminin her hücresi çeşitli küçük moleküllerin sentezi ve salgılanmasını sağlayacak biçimde donanmıştır. Bu moleküller diğer hücelere doğru (immün ve immün olmayan) hareket edip ve hedef hücreleri daha fazla aktif (up- regüle) veya daha az aktif (down- regüle) olmak için uyarırlar. Bu moleküllerin büyük kısmını sitokinler oluşturmaktadır. Her bir sitokinin etkisi konsantrasyona bağımlı olarak hedef hücrelerin yüzeyindeki spesifik reseptörlere bağlanarak membran düzeyinde ya da, bazı durumlarda, genom düzeyinde hedef hücrenin sonraki aktivasyonunu belirler (Richards ve Gauldie,1998).

2.2.3. Th1/Th2 Denge Hipotezi

Th1/Th2 denge hipotezi, sitokin salınımı ve diğer fonksiyonlar açısından CD4+ yardımcı T hücrelerinin iki farklı alt tipini taşıyan farelerin gözlemlenmesi sırasında ortaya çıkmıştır (Mosmann ve ark., 1986). Bu kavram daha sonra, insan bağışıklık sistemine de uyarlanmıştır (Mosmann ve ark., 1986). Yardımcı-T hücre popülasyonu, salgıladıkları sitokinlere dayalı olarak alt sınıflara ayrılabilir. Çok sayıda inceleme ve tartışma sonucunda, Th1 hücrelerinin hakim olduğu yolağın ağırlıklı olarak interferon-gamma'ya (IFN-gamma) ve daha az ölçüde interlökin-2 (IL-2) ve interlökin-12'ye (**IL-12**) bağımlı olduğu gösterilmiştir. Bu sitokinler aracılığıyla Th1 hücreleri fagositleri etkinleştirip hücrel yanıtı artırarak enfeksiyonlara karşı koruyucu etki sağlamaktadır. Buna karşılık Th2 hücreleri, özellikle IL-4, IL-5, **IL-9** ve **IL-13** salgılar. IL-5 yardımıyla eozinofillerin ölmesini engeller, IL-4 ve IL-13 aracılığıyla B lenfositlerinin **IgE** de dahil olmak üzere yüksek miktarda antikör üretmesini sağlar. IL-4 ve IL-9 aracılığıyla da mast hücrelerinin ve bazofillerin büyümesini ve degranülasyonunu teşvik eder (Şekil 2.4). Th1 ve Th2 hücrelerinin dış yüzeyinde sitokinler ve diğer haberci moleküllere karşı yanıt için yer alan reseptörlerinin dizilimi farklı olabilir. İki özellik bu hipotezi daha da güçlendirmiştir. Birincisi, her hücre alt kümesi ("*subset*") kendi büyüme faktörü olarak görev yapan sitokinler üretmekte (otokrin etki) ve ikincisi, iki alt küme birbirlerinin gelişimini düzenleyen çapraz düzenleyici sitokinler salgılamaktadır (Abbas ve diğ., 1996). Th1 hücreleri tarafından salgılanan INF γ ve Th2 hücreleri tarafından üretilen IL4, kendi büyüme faktörleri olarak davranırken her birisi diğerinin farklılaşmasında da çapraz düzenleyici olarak rol oynar. Belli alt tipe farklılaşma büyük ölçüde antijen sunucu hücreye (ASH) ve onunla sunulan antijene bağlıdır. Bu süreç, ASH'lerin antijeni farklılaşmamış T lenfositlerine sunumu sırasında, sitokinlerin oluşturduğu bir mikro ortam tarafından yönlendirilir (Urta ve diğ., 2012). Th1 hücreleri, hücre içi patojenlere karşı koruma sağlarken Th2 hücrelerinin çok-hücreli parazitler gibi hücre dışı patojenlere karşı koruma sağladığı düşünülmektedir. Bu iki yoldan Th1 yolu genellikle daha agresif olarak tanımlanır. Bu yolağın aşırı aktivasyonu organ-spesifik otoimmün hastalıkların (Örneğin, artrit, multipl skleroz, tip 1 diyabet) nedeni olarak gösterilmektedir (Singh ve diğ., 1999). Th2 yolu temel olarak alerji ve alerji ile ilgili IgE bazlı hastalıklarda görülmektedir ve sistemik otoimmün hastalıklara yatkınlık yaratmaktadır (Zhai ve ark., 1999).



Şeki 2.4: Antijen sunan hücreler, farklılaşmamış naif T hücreleri ile antijenik paylaşım şeklinde etkileşime girip spesifik sitokinler salgılayarak onların ilk etapta “null” yardımcı T-hücrelere (Th0) ve sonra da Th1 veya Th2 hücrelerine farklılaşmalarını teşvik ederler (kutuplaşma). Doğal öldürücü hücreler de büyük olasılıkla polarizasyon sürecine yardımcı olur. DÖ Hücre: Doğal öldürücü hücre (Kidd, 2003’den alınmıştır).

2.2.4. SLE'de Th1/Th2 dengesi

SLE patogenezinde Th1 ve Th2 sitokinlerinin rolleri tartışmalıdır. SLE hastalarında, Th2 sitokinleri artarken (Ogawa ve diğ., 1992), Th1 sitokinleri azalmaktadır (Klinman & Steinberg, 1995). Bu nedenle, SLE başlangıçta Th2 yolağı baskın bir hastalık olarak kabul edilmiştir. Ancak SLE'li hastaların serumlarında IFN γ seviyesinin önemli ölçüde yüksek olması bu hipotezin çok doğru olmadığını, aynı zamanda salgılanan IFN γ miktarıyla hastalığın şiddeti arasında bir ilişki olduğunu ortaya koymaktadır (Al-Janadi ve diğ., 1993). Tüm bu bulgular, Th1 ve Th2 yanıtlarının lupus-ilişkili doku hasarının patogenezinde de önemli olduğunu göstermektedir. Artriti olan SLE hastalarında, diğer hastalara göre daha yüksek IFN γ seviyesi saptanırken, serozit veya beyin omurilik sıvısı (BOS) tutulumu olan hastalarda daha yüksek IL-4 seviyesi ölçülmüştür (Chang ve diğ., 2002). Ayrıca nefritli SLE hastalarında nefriti olmayan hastalara göre serum ve idrarda yüksek Th1 sitokinleri bulunmaktadır (Chan ve diğ., 2006). Akahoshi ve diğ. (1999), IV. ve V. sınıf lupus nefritli hastalardan aldıkları

periferel kan örneklerinde Th1/Th2 dengesi bakımından da anlamlı bir fark bulmuşlardır (Akahoshi ve diğ., 1999). Sınıf V'de CD4+ T hücrelerinin büyük bir kısmı de IL4 üretmektedir (Masutani ve diğ., 2001).

Bu bulgular Th1 veya Th2 üstünlüğünün hastalığın evresine göre değişebileceğini düşündürmektedir. Sonuç olarak hastalıkta Th2 yanıtı, otoantikor geliştirilmesi ve üretimi ile, Th1 yanıtı ise inflamatuvar aktivite ile ilgilidir (Urta ve diğ., 2012). Sitokinler tarafından ortaya çıkan SLE immünopatolojisi birçok yönden tam olarak aydınlatılmamıştır. Bu sitokinlerin daha derinlemesine incelenmesi hem hastalık mekanizmasının aydınlatılması, hem de biyomarkır veya terapötik maddelerin tanımlanması açısından klinik öneme sahiptir.

2.3. MİKRORNA'LAR

2.3.1. Tanıtım

MikroRNA'lar (**miRNA**), insanlarda sayıları bini geçen, protein kodlamayan, yaklaşık 20 nükleotit uzunluğunda tek iplikli RNA molekülleridir. DNA'dan transkripsiyonu yapılan ancak translasyonu yapılmayan genler tarafından kodlanan miRNA'lar, hedef genin mesajcı RNA (mRNA)'larına düşük özgüllükte bağlanarak, mRNA yıkımına ve translasyonel inhibisyona neden olabildiği için gen anlatımının kontrolünde önemli rollere sahiptir.

Çeşitli organizmalarda tespit edilen bu miRNA'ların neredeyse protein kodlayan genlerin yarısının düzenlenmesinde rolünün olduğu düşünülmektedir (Brodersen ve Voinnet, 2009).

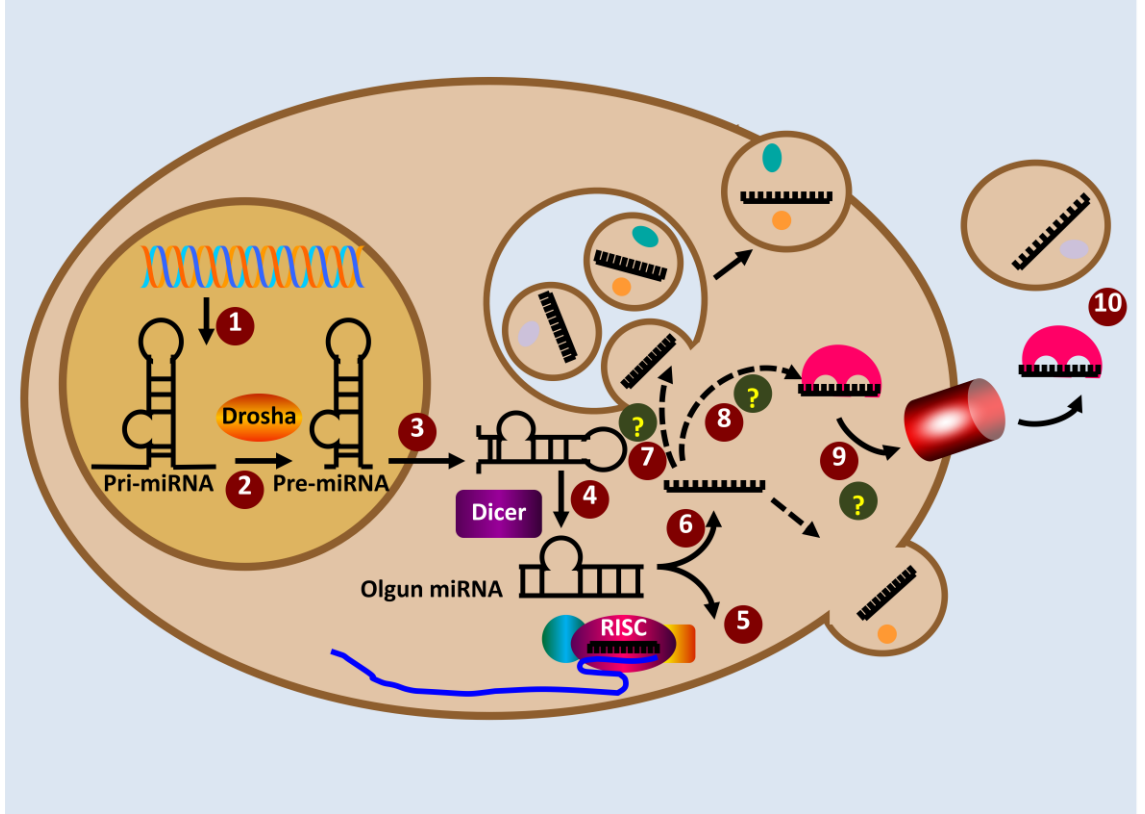
Bazı literatürler, miRNA'nın anormal ekspresyonunun insan hastalıkları (~270 hastalık) ile ilişkili olduğunu öne sürmektedir. Bugüne kadar yapılan çalışmalar, bu moleküllerin tanısal markır, dokuya ya da biyolojik aşamaya özgü hastalıklar için tedavi hedefleri olarak kullanılabileceğini düşündürmektedir.

2.3.2. miRNA biyogenez yolağı ve miRNA'ların fonksiyonu

miRNA kodlama bölgeleri, ya genomda bağımsız genler olarak mevcuttur, ya da protein kodlayan genlerin intronlarında yer almaktadır (Carthew ve Sontheimer, 2009; Kim ve

diğ., 2009; Olena ve Patton, 2010). miRNA genlerinin transkripsiyonundan genellikle RNA polimeraz II'nin sorumlu olmasına rağmen, miRNA genlerinin bir alt grubunun transkripsiyonu RNA polimeraz III üzerinden de yapılabilir (Chua ve diğ., 2009). miRNA'lar genomda, 5' ucunda bir şapka yapısı içeren ve 3' ucu poli-adenillenmiş, uzun primer transkriptler (pri-miRNA) olarak kodlanır. Bu transkriptler iyi tanımlanmış saç tokası yapılarına sahipler ve nükleusta yer alan mikroişlemci kompleks adı verilen bir multiprotein kompleksine doğru yönlendirilir (Carthew ve Sontheimer, 2009; Kim ve diğ., 2009; Beezhold ve diğ., 2010; Davis-Dusenbery ve Hata, 2010). Mikroişlemci kompleks, ("**Drosha**") (RNaz III-benzeri bir protein) ve kofaktörü (DiGeorge sendromu kritik bölge gen 8 "*DiGeorge syndrome Critical Region gene 8*", **DGCR8**) olmak üzere iki önemli protein içerir. "DGCR8" pri-miRNA'lardaki saç tokası yapılarını tanımlayıp Drosha'yı bu bölgelere yönlendirir. Pri-miRNA'lar, saç tokası yapısının civarından, "Drosha" tarafından kesilip prekürsör-miRNA (pre-miRNA) olarak adlandırılan 60-110 nükleotit (nt) uzunluğunda yapılara dönüştürülür, ardından Eksportin-5-bağımlı bir mekanizma ile nükleustan sitoplazmaya taşınır. Sitoplazmada, pre-miRNA'lar, büyük bir multiprotein kompleksinin alt birimi olan RNAaz III enzimi ("**Dicer-1**") tarafından ikiye ayrılır, ve kısa tam olmayan çift-iplikli miRNA çiftleri oluşur. "Dicer" hemen hemen tüm ökaryotik organizmalarda korunmuş büyük (~200 kDa) bir proteindir. Bu çift iplikli yapılar daha sonra yaklaşık 20 nt uzunluğunda olgun miRNA'ları oluşturmak üzere bir helikaz tarafından açılır ve ("*RNA Induced Silencing Complex*", **RISC**) olarak bilinen ("*Argonaute*", **AGO**) ailesi protein üyelerinden oluşan bir multikomponent kompleksine katılır (Siomi ve diğ., 2010). "AGO" proteinleri endonükleaz aktivitesine sahip, hedef mRNA degradasyonundan sorumlu olan katalitik enzimlerdir (Kim ve diğ., 2009). Birçok organizmada bazen farklı biyolojik fonksiyonlara sahip çok sayıda "AGO" proteini vardır. Bununla birlikte, insanlarda dört "AGO" proteini, AGO1-4, "RISC" oluşumu ve mRNA susturmada etkili rollere sahiptir. Olgun miRNA oluşumunda rolü olan "Dicer" içeren protein kompleksi, ek olarak rehber miRNA'nın "RISC" kompleksi içine monte olmasını da sağlar (Carthew ve Sontheimer, 2009; Davis ve Hata 2009; Kim ve diğ., 2009). Şekil 2.5'de gösterildiği gibi, olgun miRNA "RISC" üzerine yüklenir. Sonra miRNA ipliklerinden biri, yolcu iplik, parçalanır; diğer iplik (kılavuz iplik) aktif bir "RISC" kompleksi oluşturmak üzere "AGO"ya bağlanır. Bu kompleks miRNA ve mRNA'daki tamamlayıcı dizilerine göre hedef mRNA'ya yönlendirilir. "AGO" proteinleri, mükemmel tamamlayıcı miRNA'yı

bulduğu zaman, hedef mRNA'yı parçalamak üzere güçlü endonükleaz aktivitesini gösterir. Bununla birlikte “AGO”nun endonükleaz aktivitesi, “RISC” oluşumu ve hedef mRNA'nın translasyon inhibisyonu için her zaman gerekli değildir (Brodersen ve Voinnet, 2009; Cai ve diğ., 2009; Carthew ve Sontheimer, 2009; Chua ve diğ., 2009; Davis ve Hata 2009; Kim ve diğ., 2009).



Şeki 2.5: miRNA'ların biyogenezi. miRNA'ların biyogenezi, RNA polimeraz II veya III aracılığıyla pri-miRNA transkriptlerinin transkripsiyonu ile başlar(1). Nükleusta, pri-miRNA'lar, Droscha tarafından işlenerek pre-miRNA'lara dönüştürülür (2). pre-miRNA'lar sitoplazmaya taşınır (3). Pre-miRNA'lardaki saç tokası yapıları 19-24 nükleotidlik olgun miRNA çift zincirlerine dönüştürülerek “Dicer” tarafından işlenir (4). Çift zincirli olgun miRNA'nın bir zinciri hedef mRNA'ların anlatımını düzenlemek için RISC kompleksi içine dahil olur (5). Diğer zincir ise ya yıkılır ya da muhtemelen hücreden dışarı salınır (6). Bazı miRNA'lar multivesiküler yapılardan türetilmiş eksozomlar içinde paketlenir (7). Diğerleri RNA'ya bağlanan proteinlerin eşliğinde hücre dışına salıverilir (8). Bazıları da hücre fiyozyonu sırasında mikrovessiküller ile atılır (9). Hücre dışı alanda, bu miRNA'lar diğer hücreler tarafından içeri alınarak ya RNaz'lar tarafından yıkılır ya da dışarı atılabilir(10) (Etheridge ve diğ. 2011'den alınmıştır).

miRNA biyogenez yolağında, Droscha ve Dicer, sırasıyla nükleusta ve sitoplazmada lokalize olmalarıyla konumsal olarak ayrılmaktadır. Eksporin-5'in, kısa miRNA prekürsörlerinin nükleustan taşınmasını düzenlemede anahtar rol oynadığı Lund ve ark. tarafından gösterilmiştir (Lund ve diğ., 2004). Bununla beraber, miR-29b gibi bazı

miRNA'lar çoğunlukla nükleusta bulunabilirler (Hwang ve diğ., 2007). Hwang ve ark. (2007) tarafından bazı miRNA'ların kendi hücreiçi lokalizasyonlarını kontrol eden ek dizi elementleri içerdiği bulunmuştur. Aynı yazarlar tarafından miRNA'ların küçük boyutta olmalarına rağmen kendi posttranskripsiyonel davranışlarını etkileyebilecek, “*cis-acting*” düzenleyici ek motifler içerebildiği de gösterilmiştir (Hwang ve diğ., 2007).

miRNA'ların temel fonksiyonu, translasyonun inhibisyonu ya da mRNA degradasyonu yoluyla protein-kodlayan genlerin protein sentezini inhibe etmektir. Bununla beraber, birinci mekanizma, memelilerde çok daha yaygındır (Brodersen ve Voinnet, 2009; Cai ve diğ., 2009; Chua ve diğ., 2009; Kim ve diğ., 2009). Her bir mekanizmanın baskılamaya göreli katkısı olduğu son zamanlara kadar bilinmemekteydi. Guo ve diğ. (2010) miRNA'ların protein üretimine etkilerini ölçmek için ribozom profillendirme yapıp eş zamanlı olarak hedef mRNA düzeyleri üzerindeki etkilerini araştırdıkları çalışmalarında, hedef mRNA düzeyinde azalma olmadan translasyonun inhibe edildiği, bunu da mRNA destabilizasyonuna yol açan miRNA'ların ortaya koyduğu yeni bir mekanizma olduğu sonucuna vardılar (Guo ve diğ., 2010). “RISC”ın hedef mRNA'nın **(3'-UTR)** bölgesine bağlanarak (AGO/miRNA kompleksi) protein translasyonunu nasıl engellediği şimdiye kadar tam olarak anlaşılamamıştır. Çeşitli olasılıklar öne sürülmüştür: 1) Polyadenillenmiş 3'- ucunun deadenillenmesi, mRNA'nın yıkımına neden olabilir; 2) AGO-miRNA kompleksinin translasyon başlatıcı faktörler ile rekabet etmesi sonucu translasyon başlatılması yavaşlatılabilir; 3) AGO-miRNA kompleksinin bağlanması erken sonlandırma veya uzama aşamasında bozukluklara sebep olabilir; 4) AGO-miRNA kompleksi translasyon sırasında büyüyen polipeptidi parçalamak için peptidazları biraraya getirebilir (Brodersen ve Voinnet, 2009; Cai ve diğ., 2009; Chua ve diğ., 2009).

Buna karşın, miRNA'ların hedeflenmiş mRNA'ların translasyonunu aktive ettiği de ileri sürülmüştür (Fabian ve diğ., 2010; Vasudevan ve diğ., 2007). Vasudevan ve diğ. (2007) ilk kez açık bir şekilde, bazı durumlarda miRNA'ların translasyon aktivatörleri gibi çalışabildiğini göstermişlerdir. Örneğin, yalnızca serum açlığı durumlarında translasyon aktivasyonunu düzenlemek için miR-369-3, TNF α 'nın AU-zengin elementlerine bağlanmaktadır. Place ve diğ. (2008) miRNA'ların gen ekspresyonunu

arttırabildiğinin yeni kanıtını elde etmişler ve ilk kez miRNA'ların gen promotörlerini hedefleyebildiğini göstermişlerdir.

Uzun bir süre miRNA-hedef etkileşimi, mRNA'ların 3'-UTR bölgesiyle sınırlı kalmıştır, Bunun nedeni muhtemelen miRNA'lar ile ilgili ilk çalışmaların bu bölgeye odaklanmasıdır. Lytle ve diğ. (2007) ilk kez miRNA'ların hedef mRNA'ların herhangi bir bölgesi ile ilişkili olabildiğini öne sürmüşler ve mRNA hedeflerinin, 5'-UTR'deki miRNA-bağlanma bölgeleri tarafından etkili bir şekilde baskılandığını göstermişlerdir. Tay ve diğ. (2008) kodlama dizilerindeki bağlanma bölgelerinin çok fazla olduğunu bulmuşlar ve deneysel olarak Nanog farede, *Oct4* ve *Sox2* genlerinin kendi kodlama dizilerinde miRNA-bağlama bölgeleri içerdiğini göstermişlerdir. miRNA'ların hedeflediği bu genler embriyonik kök hücre farklılaşmasını düzenlemektedir (Tay ve diğ., 2008).

Belirli miRNA'ların miktarı, biyogenezleri ve yıkılışları ile belirlenir. miRNA biyogenezi gen transkripsiyonu seviyesinde düzenlenir (Kim ve diğ., 2009). Protein kodlayan genlere çok benzer bir şekilde miRNA genlerinin çoğu, promotör bölgeleri ile çevrilidir (Carthew ve Sontheimer, 2009; Chua ve diğ., 2009; Kim ve diğ., 2009). miRNA genlerinin promotör aktivitesi, hücrel miyelositomatozis onkogeni ("cellular myelocytomatosis oncogene", **c-MYC**), **p53** ve hipoksi-indüklenebilir faktörü-1 (**HIF1 α**) gibi özel transkripsiyon faktörleri tarafından yönetilir (Crosby ve diğ., 2009; Dang ve diğ., 2009; Takwi ve Li, 2009). Sonuç olarak, genotoksik stres koşulları p53'ü ve hipoksi koşulları HIF1'i aktiveştirir ki, bu da sırayla miR-34 ve miR-210 gibi miRNA'ların upregülasyonuna neden olur (Hermeking, 2010; McCormick ve diğ., 2010). Bu gözlemler, miRNA'ların ekspresyonunun, patofizyolojik durumlara karşılık vermek üzere, gen transkripsiyonu düzeyinde düzenlendiğini göstermektedir. Ayrıca miRNA'lar yıkılarak da düzenlenirler. miRNA yıkımından sorumlu olan moleküler mekanizma büyük ölçüde bilinmemekle beraber miRNA miktarının çeşitli hücrel koşullar altında hızla yükseldiği daha sonra da azaldığı gösterilmiştir (Kim ve diğ., 2009).

miRNA'lar çoğunlukla hücre içinde yer alırken, önemli bir kısmı, çeşitli vücut sıvıları da dahil olmak üzere, hücre dışında da (örneğin: plazma, serum, idrar, süt, tükürük, amniyotik sıvı, bronş lavajı, beyin omurilik sıvısı, kolostrum, periton sıvısı, plevral sıvı,

meni, gözyaşı) gözlenmiştir (Weber ve diğ., 2010). Hücre dışı bir ortamda çoğu RNA moleküllerinin kararsızlığına rağmen, miRNA'lar şaşırtıcı olarak burada çok kararlılırlar (Weickmann ve diğ., 1982; Etheridge ve diğ., 2011). Bazı çalışmalar, miRNA'ların taşıyıcı sistemler ve şaperon proteinler ile seçici olarak hücre dışına taşınarak miRNA'ları parçalayıcı enzimlerin etkisinden korunduğunu göstermektedir (Gibbins ve diğ., 2009; Etheridge ve diğ., 2011). Yeni bir çalışma, "Argonaute 2" komplekslerinin vesiküllerden bağımsız bir şekilde bazı miRNA'ları taşıdığı, bunun da dolaşımdaki miRNA'ların kararlılığı için sorumlu bir mekanizma olduğu gösterilmiştir (Arroyo ve diğ., 2011).

2.3.3. Hastalıklarda mikroRNA'lar

mRNA'lar gibi, bazı miRNA'lar da özel doku veya gelişim evrelerine özgün olarak kopyalanır. Bazı literatürler, anormal miRNA ekspresyonunun insan hastalıkları ile (örneğin: hipertansiyon, otoimmün hastalıklar, kanserler, böbrek hastalıkları vb) (~ 270 hastalık) ilişkili olduğunu öne sürmektedir (Urta ve diğ., 2012). MikroRNA'ların kontrol kaybına birkaç mekanizma neden olabilir, bunlar delesyon, amplifikasyon, mutasyon veya spesifik miRNA'ları hedefleyen transkripsiyon faktörlerinin regülasyon düzeylerinde bozulmalarıdır (Breving ve Esquela-Kerscher, 2010; Yang ve Wang, 2011). Ek olarak, miRNA'lar epigenetik mekanizmalarla da kontrol edilebilir. Saito ve diğ. (2006) ilk kez, miRNA ekspresyonunun iki major epigenetik mekanizma tarafından kontrol edilebildiğini göstermiştir. Bu mekanizmalar DNA metilasyonu ve histon modifikasyonlarıdır (Saito ve diğ., 2006; Chuang ve Jones., 2007). İlginç olarak, epigenetik ile miRNA'lar arasında çift yönlü bir ilişki kurulmuştur. Bir taraftan epigenetik mekanizmalar miRNA'ları kontrol ederken, diğer taraftan miRNA'lar temel epigenetik faktörleri hedef alabilir (Chuang ve Jones, 2007; Sato ve diğ., 2011).

Bugüne kadar yapılan çalışmalar, bu moleküllerin tanısal markır, dokuya ya da biyolojik aşamaya özgü tedavi hedefi olarak kullanılabileceğini düşündürmektedir.

2.3.4. Plazma veya serumda mikroRNA'ların biomarkır olarak kullanımı

Klinikte, miRNA'lar hastalık tanısı, prognozu ve tedaviye yanıtın öngörülmesinde son derece yararlı olabilir. Şu anda, birkaç kanser tipinde miRNA'ların tanısal/prognostik bir markır olarak klinik yararlılığı, cerrahi veya biyopsiler sırasında çıkarılan tümör

örneklerini kullanan çok sayıda çalışmada gösterilmiştir (Garzon ve diğ., 2009). Bu tekniklerin invaziv ve hastalar için rahatsız edici olması nedeniyle bazı çalışmalar plazma/serum, idrar veya tükürük gibi insan sıvılarında markırların araştırılmasına odaklanmıştır. Hastaların kan örnekleri genellikle kolayca elde edilir ve dolaşımdaki nükleik asitler ve miRNA'lar dahil birçok biyolojik molekül kan serum/plazmasında bulunabilir (Wittmann ve diğ., 2010; Cortez ve Calin., 2009). Ek olarak, yüksek duyarlılıklı **PCR** belirleme yöntemleri ile, miRNA'ların işlenme sonrası modifikasyonlarını saptamak da mümkündür (Wittmann ve diğ., 2010).

Bazı plazma/serum örnekleri çok az RNA içerir. Bu miktar, çok sayıda değişkene bağlıdır ve bireyden bireye değişir. Örneğin ribonükleazların içeriği, türü ve özgülüğü farklı dokularda değişir (Taylor,1979). miRNA'ların iskemiden veya kan akımı yetersizliğinden kaynaklanan doku hasarının onarımında önemli oldukları ve bu durumlarda daha fazla bulunmalarını gösteren çalışmalar vardır (Baker, 2012). Ateroskleroz, hipertansiyon, koroner arter hastalığı ve anjiyoplasti ya da stent insersiyonu sonrası restenoz (damar darlığı) gibi vasküler hastalıkların patofizyolojik etkileri sonucunda şişme, proliferasyon, hücre infiltrasyonu, apoptoz ve hasara karşı inflamatuvar yanıtlar oluşur ki, bunlar da miRNA'ların anlatım profillerini değiştirir (Chen ve diğ., 2012). Bazı miRNA'lar sadece kanser gibi özel durumlar ya da farklılaşma gibi biyolojik aşamalarla sınırlıdır (Wang ve diğ., 2008; Mitchell ve diğ., 2008; Wang ve diğ., 2012). İnsan Sitomegalovirüs enfeksiyonu gibi hastalıklarda enfeksiyonun aşamasıyla ilişkili olarak hücresel miRNA türlerinin anlatımı değişir ki, bu da virüsün çoğalmasını etkiler (Wang ve diğ., 2008). Son zamanlarda yapılan bazı çalışmalar sigara dumanına maruz kalmanın miRNA anlatımında değişikliklere yol açtığını göstermiştir; ancak bu değişiklikler yaş ve cins gibi faktörlere ile de ilişkilidir (Russ ve Slack., 2012).

2.3.5. Sistemik Lupus Eritematozus Hastalığında mikroRNA'lar

Otoimmünite alanındaki zorluklardan biri de tanıya, hastalık aktivitesine ve atakların tahmin edilmesine yönelik spesifik bir biyomarkırın bulunamayışıdır. Lupus patogenezi tam olarak aydınlatılamamış olmasına rağmen, B ve T lenfositlerde düzensizlik, bağışıklık hücrelerinin arasındaki anormal etkileşim ve anormal Toll-benzeri reseptör ("Toll-like Receptor", **TLR**), tip 1 IFN ve hücre-dışı sinyal ayarlı kinaz ("Extracellular

Signal-regulated Kinase”, **ERK**) sinyal yolları da dahil olmak üzere, bir takım immünolojik anormallikler, murin lupus modellerinde ve insanlarda tanımlanmıştır (Pauley ve diğ., 2009; Gorelik ve Richardson, 2009). Oligonükleotid miRNA mikrodizilim’ler ve yoğun dizileme teknikleri veya yazılımları, bilinen tüm miRNAome’un analizini mümkün kılmıştır. Ek olarak, akışlı sitometri “*bead-flow cytometry*”, kantitatif gerçek zamanlı PCR (qRT-PCR) ve yüksek veri çıkışlı, dizilim temelli Klenow enzimi gösterim tekniği “*high-throughput array-based Klenow enzyme assay*” gibi diğer yöntemler tümörlerde ve diğer hastalıklarda miRNA ekspresyonunu değerlendirmek için kullanılmaktadır. Günümüze dek, değişmiş miRNA ekspresyonu hemen hemen tüm kanser tiplerinde bildirilmiştir (Li ve diğ., 2009). SLE için farklı sentezlenen miRNA’lar ile ilgili birkaç çalışma yayınlanmıştır. Bununla birlikte, miRNA’ların bu hastalığın etyolojisinde yer alabileceği yönündeki kanıtlar miRNA’ların SLE’de potansiyel tanısal markır olabileceğini düşündürmektedir (Dai ve diğ., 2007; Pan ve diğ., 2010; Te ve diğ., 2010; Zhao ve diğ., 2010). Dai ve diğ. (2007) ilk kez SLE’de farklı düzeylerde eksprese olan 16 miRNA tanımlamışlardır. Bu yazarlar ayrıca ilk kez, lupus nefritli hastalarda da farklı düzeylerde eksprese olan 66 miRNA saptamışlardır (Dai ve diğ., 2009). Ayrıca 2010’da yapılan birkaç çalışma miRNA’lar ve SLE/lupus nefriti arasındaki bağlantıyı doğrulamaktadır (Pan ve diğ., 2010; Te ve diğ., 2010; Zhao ve diğ., 2010). Lupuslu hastaların CD4+ T hücrelerinde iki miRNA’nın (miR-21 ve miR-148a) yüksek miktarlardaki sentezlendiği gösterilmiştir. miR-148a doğrudan (“**DNA methyltransferase I**”, **DNMT1**) ekspresyonunu azaltmaktadır ve miR-21 dolaylı olarak, önemli bir otoimmün gen olan (“**RAS guanyl nucleotide-releasing protein 1**”, **RASGRP1**)’i hedefleyerek DNMT1 ekspresyonunu baskılamaktadır. DNMT1’in baskılamasına neden olarak her iki miRNA, lupusta CD4+ hücrelerindeki DNA hipometilasyonuna da katkıda bulunmaktadır (Pan ve diğ., 2010). Te ve diğ.(2010) iki ırktaki (Afrikalı Amerikan ve Avrupalı Amerikan) lupus nefritli hastaları inceleyip beş miRNA’nın (miR-371-5P, miR-423-5P, miR-638, miR-1224-3P ve miR-663) farklı ırklarda değişik şekilde eksprese olduğunu göstermişlerdir (Te ve diğ., 2010). Son zamanlarda, Zhao ve diğ. (2010) SLE hastalarında, miR-125 ekspresyonunun azaldığını ve onun tahmini hedefi transkripsiyon faktörü olan (“**Kruppel-like factor 13**”, **KLF13**) ekspresyonunun ilişkili olarak arttığını ortaya koymuşlardır.

Daha fazla sayıda örnek içeren ileriki çalışmalara gereksinim olsa da, bu çalışmalar miRNA'ları immün hastalıkların patogeneziyle ilişkilendirip onların potansiyel tanı markırı olarak kullanılabileceğini düşündürmektedir.

2.4. TAM KANDAN VERİMLİ TOTAL RNA İZOLASYONU İÇİN ÖRNEK TOPLAMA VE SAKLAMASI

Kan, çevre ve organizma arasındaki etkileşimde önemli bir role sahiptir ve bu nedenle kandan elde edilen gen ekspresyon profilleri immün yanıt ya da stres metabolizması hakkında daha derin bilgiler sağlayabilir (Sapolsky, 2005; Sutherland ve diğ., 2006; Hodson ve diğ., 2008; Almberg ve diğ., 2009). Ayrıca, diğer dokulara kıyasla, kan örneğini elde etmek nispeten kolaydır ve vericiye çok az zarar vererek küçük hacimlerde elde edilebilir. Ancak, tam kandan verimli RNA eldesi, çeşitli faktörler tarafından engellenmektedir. Birinci faktör RNA'nın etkin korunmasıdır. RNA, nükleik asitleri örnek toplamadan hemen sonra hızlıca parçalayan nadir transkriptlerin kaybıyla anlatım profilini değişikliklere uğratan endojen ve eksojen RNazlara duyarlıdır (Esnault ve Malter, 1999; Rainen ve diğ., 2002; Tanner ve diğ., 2002; Duvigneau ve diğ., 2003; Ohashi ve diğ., 2004). İkinci faktör kan hücrelerinin heterojen olmasıdır, çünkü bu durumda yüksek orandaki hemoglobin mRNA'ları sonraki aşamaları olumsuz etkileyebilir. Bu etkiyi en aza indirmek için globin mRNA'larının birincil kaynağı olan retikülositlerin santrifüj ile tam kandan kısmen ayrılması önerilmiştir. Şaşırtıcı bir şekilde, ekstraksiyon yönteminden bağımsız olarak, RNA özünün saflığını etkileyen ender miktarlarda bulunan DNA'yı ortadan kaldırmak amacıyla ilave bir DNaz uygulaması gereklidir. Olgun memeli eritrositleri nükleus ve mitokondri gibi hücre organellerini içermez, oysa kemik iliğinden serbest bırakılan, olgunlaşmamış retikülositlerde nükleus bulunmaktadır. Bu hücreler, dolaşımdaki ve insan kanının her μL 'sinde 4,000,000 – 6,000,000 bulunan eritrositlerin toplam sayısının %1'ni kapsamaktadır. Bu, olgunlaşmamış kırmızı kan hücrelerinden yaklaşık 40.000 - 60.000 nükleusun devreye girmesi anlamına gelir. Bu sayı, hücrelerin uygun bir biçimde uzaklaştırılmaması durumundaki pozitif PCR sonuçlarını açıklıyor (Morin ve diğ., 2001; Schwachow ve diğ., 2012). RNA miktarı bireyden bireye önemli ölçüde değişebilir ve ayrıca bireyin sağlık durumuna da bağlıdır. Ayrıca vericinin bireysel hidrasyon durumu veya vücudun bazı bölgelerinde kan yoğunluğu farklılıkları gibi

birçok faktör, kan örneklerinden elde edilen RNA miktarını etkiler ve gözlenen değişimi açıklamaya yardımcı olabilir (Chiari ve diğ., 2011). Dehidrasyon vücutta stres yaratarak lökosit sayısının artışına neden olur. Dehidrasyon kanın daha fazla konsantre olmasına yol açıp kan testinde beyaz kan hücrelerin yükseldiği ile kendini gösterir. RNA'nın yeterli miktarlarda eldesi ile birlikte bütünlüğü bir başka ve hatta daha önemli faktördür, çünkü sonraki uygulamaları etkileyebilir. Doğru bir şekilde saklanmadığı takdirde, uzun olan veya düşük miktarlarda bulunan transkriptler doku spesifik RNazlar tarafından hızla yıkılır. Günümüzde tam kan numunelerinde RNA'nın korunması için en sık kullanılan çözücü, "RNAlater"dir. Bir çalışmada bu koruma yönteminin çok etkili olmadığı bildirilmiştir (Schwochow ve diğ., 2012). Üreticinin verdiği bilgiye göre tam kan örnekleri içinde proteinlerin yüksek miktarda mevcut olması RNAlater ile çözünmez çökelti oluşuma yol açabilir. Bu olasılığı destekleyen bir gözlem, RNAlater içeren örneklerde yüksek miktarda kanın pıhtılaşmamasıdır; halbuki diğer koruma tamponlarını içeren, aynı vericilerden ve aynı hacimde depolanan kan örneklerinde herhangi bir çökelti oluşmamaktadır. RNAlater koruma mekanizması doku hücrelerinin geçirgenliği üzerine dayanır, muhtemelen büyük kan çökeltileri kimyasalların hücre zarından geçmesini ve RNA ile etkileşimini engellemektedir (Schwochow ve diğ., 2012). Bu bulgu, RNAlater'de saklanan katı doku malzemesinin büyüklüğünün RNA bütünlüğünü olumsuzca etkilediğini bildiren diğer çalışmaları desteklemektedir (Vomelova ve diğ., 2009; Gayral ve diğ., 2011).

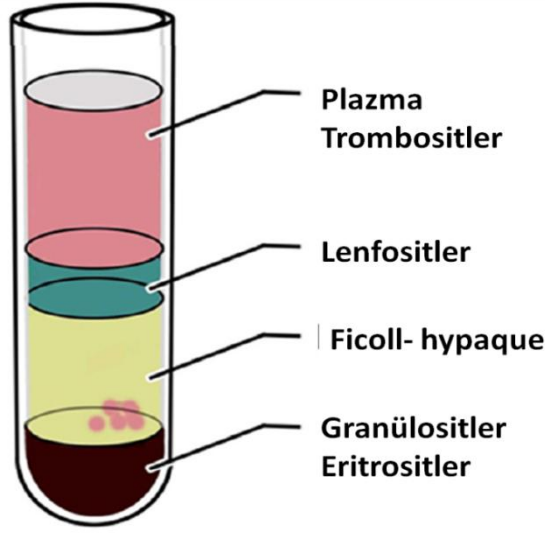
2.4.1. Yoğunluk gradient ayırma ile periferik mononükleer hücrelerin izolasyonu

Kan örnekleri ile gen transkripsiyonu analizi genellikle flebotomi (toplar damardan kan alınması) örneklerinden izole edilen lökositler üzerinde gerçekleştirilir (Barch ve diğ., 2000). Tam kan, sitrat tuzları, heparin, EDTA gibi çeşitli antikoagülanlarda toplanır. Bu katkı maddeleri pıhtılaşmayı inhibe ederler, ayrıca *in vivo* gen transkript miktarlarını korumada veya hücrelerden izolasyon sırasında etkili olan diğer preanalitik değişkenlerin olumsuz etkisini kontrol etmede küçük rolleri de bulunmaktadır (Rainen ve diğ., 2002). Bu nedenle, tam kan *in vivo* flebotomiden sonra örnek toplama, taşıma, depolama, ya da kontrolsüz koagülasyondan dolayı değişikliklere uğrayıp gen anlatımında doğru analizi engelleyebilir (Johnson ve diğ., 1998). Ayrıca, istenmeyen gen ekspresyonu flebotomi ile, dış yüzeyler ile temas sonucunda veya hemoglobin gibi

parçalanmış hücre içeriğine maruz kalma ile uyarılabilir (McFaul ve diğ., 1994; Haertel ve diğ., 2001).

Ficoll-Hypaque santrifüj yöntemi canlı periferik kan lenfositlerinin (**PBMC**) izolasyonu ve bu lenfositlerin daha sonra yapılacak olan araştırmalarda kullanılması için geliştirilmiştir. Bu yöntem, tanımlanmış hücre ayırma tekniklerinin en iyisidir ve ilk kez 1968 yılında Böyum tarafından tek-nükleuslu hücreleri izole etmek için, düşük viskoziteli Ficoll ve uygun yoğunluk ile ozmotik güce sahip olan sodyum metrizoat kullanılarak geliştirilmiştir (Böyum, 1968). Daha sonra, sodyum diatrizoat başarılı bir şekilde sodyum metrizoat'ın yerini almıştır (Benke ve Dittmar, 1976). Bu prosedür modern moleküler teknikler ile (örneğin: genomik çalışmalarda RNA ve DNA izolasyonu için ve proteomik çalışmalarda protein izolasyonu için) uyumludur. Heparin DNA ile kompleks oluşturur, bu yüzden EDTA'lı kan DNA ve RNA izolasyonu için daha uygundur. Maksimum hücre verimini sağlamak için kan örnekleri iki saat içinde kullanılmalıdır (McCoy, 2001).

Bu hücre ayırma yöntemi, hücrelerin santrifüj sırasında boyansı (batmazlık) yoğunluğuna göre farklı göç etme temeline dayanır ve farklı hücre tiplerinin ayrı katmanlar halinde ayrılması ile sonuçlanır. Bu santrifüjün ardından mononükleer lenfosit hücreleri içeren “buffy coat”, kırmızı kan hücreleri (eritrositler) ve granülositleri alt katmanda tutarak kolayca aspire edilebilir (German Rodriguez-Gonzalez ve diğ., 2013) (Şekil 2.6). Bu yöntemin hızlı ve düşük maliyetli olmasıyla birlikte avantajlarından biri de gözenekli bir bariyer ile eritrositlerin ayrılmasıdır ki, bu da nükleuslu hücrelerin ayırımına kolaylık sağlar. Bununla birlikte, ayrımsal santrifüj gibi, az da olsa bu hücrelerin kaybına da sebep olur. Bu çalışmada bu yöntemin kullanılmasının önemi eritrositlerden gelebilecek olan mRNA kontaminasyonunu önlemektir.



Şeki 2.6: Yoğunluk gradient ayırımı. Tüm kan örneğinden yoğunluk gradient ayrılmasından sonra elde edilen farklı hücre tabakaları. Granülositleri de içeren kırmızı hücre pelleti, Ficoll-Hypaque aracılığıyla lenfositlerden ayrılır. Plazma ve trombositlerden oluşan üst tabakanın lenfosit tabakası ile karşılaştırıldığında, çok daha şeffaf olduğu görülmektedir (Fuss ve diğ., 2009'tan alınmıştır).

2.5. SPEKTROFOTOMETRİYE VE ELEKTROFOREZE DAYALI YÖNTEMLER

2.5.1. Nanodrop ile RNA kalite kontrolü ve miktar ölçümü

Nükleik asitlerin miktarı, geleneksel olarak, spektrofotometre aracılığıyla UV absorpsiyonunu ölçerek belirlenir. En basit formunda absorbans 260 ve 280 nm'de ölçülür. Nükleik asit konsantrasyonu, konsantrasyon ile absorbans arasında doğrusal bir ilişki bulunduğunu öngören Beer-Lambert değeri ile saptanabilir. 260 nm'de **OD** değeri bir solüsyon içinde bulunan RNA konsantrasyonunu belirlemek için kullanılır. A_{260} 'de okunan her 1.0 ünite yaklaşık 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ RNA'ya eşdeğerdir. 260 nm'de RNA, maksimum absorbansa sahiptir ve 260 ile 280 absorbans oranı izole edilmiş RNA'nın saflığını değerlendirmek için kullanılır. Bu değer saf RNA için 2.1 dir ve birçok protokolda 1.9-2.1 olarak belirlenmiştir. İdeal olarak, taramalı spektrofotometri "*scanning spectrophotometry*", aynı zamanda olası kontaminasyonun kaynaklarını belirlemek açısından yararlıdır. Geleneksel spektrofotometre ile yapılan ölçümlerdeki sorunlardan biri, küvetlerin büyük olmasıdır ki, bu durum düşük konsantrasyonlarda bulunan RNA izolatlarının ölçülmesini zorlaştırır ve bazen değerli bir RNA örneğinin kısmen kaybına yol açar. NanoDrop spektrofotometre olağanüstü tekrarlanabilirlik ile

küçük örneklerin son derece doğru analizini sağlar. Örnek yükleme sistemi geleneksel spektrofotometrede olan küvet ihtiyacını ortadan kaldırır, bu da ölçüm için gerekli örnek miktarını azaltır. RNA'nın 260 nm'de absorbansı elüsyon tamponun pH'sına bağımlı değildir, ancak RNA çözeltisindeki bazı olası kontaminant maddelerin (proteinler gibi) absorbansı pH'a bağımlıdır. Bu, RNA çözeltisinin A_{260} değerinin farklı pH'larda aynı kalsa da, A_{280} değerinin pH'a bağımlı bir şekilde değişeceği anlamına gelir. Eğer saf su içinde çözülmüş RNA'nın OD A_{260}/A_{280} oranı 1.8 civarında ölçülürse, RNA kaliteli ve saf olabilir, ama bu DNA, protein ya da başka bir şey ile kontamine olmadığı anlamına gelmez (Wilfinger ve diğ., 1997). RNA'nın TE (pH 8) gibi bir elüsyon tamponu içinde ölçümünü daha güvenilir bir OD A_{260}/A_{280} oranı ile sonuçlanır. pH'nın yanı sıra, A_{260}/A_{280} oranı spektrofotometrik çözeltisinin iyon gücüne de bağlıdır. Bu nedenle, kör örnek "*blank*" ile seyreltici olarak kullanılan tampon aynı olmalıdır. Saf suyu kör örnek olarak kullanmak yanlıştır. Bu durum, özellikle ticari bir RNA izolasyon kiti ile birlikte gelen elüsyon tamponunun içeriği bildirilmemişse sorun yaratabilir. Genellikle protokollerin çoğunda sadece OD A_{260}/A_{280} oranından söz edilmesine rağmen, 230 nm'de güçlü absorbans kontaminasyonu gözlenir. Proteinler, guanidinyum izotiyosiyanat ve fenol gibi kaotropik tuzlar olmak üzere 220-230 nm arasında pik "*Peak*" yaratan üç kontaminasyon kaynağı vardır. Bu üç kontaminasyon kaynağı, doku örneklerinde ya da Chomczynski ile Sacchi'nin orijinal protokolundan türetilen doku lizis solüsyonlarının çoğunda mevcuttur (Chomczynski ve Sacchi, 1987). Öte yandan OD A_{260}/A_{230} oranının 2.0'ye çok yakın olması da önemlidir. Ancak bu değer genelde düşük miktarda RNA izole edildiğinde (örneği, serum ya da plazmadan miRNA izolasyonunda) 1.0'in altına düşer. Ayrıca serum/plazma herhangi bir hücre içermemelidir, dolayısıyla bu örneklerde herhangi bir ribozomal RNA tespit edilemez. Bunlardan izole edilen RNA, özellikle apoptoz veya eksositoz sonucu serbest bırakılan RNA'lardır ki doğalarından dolayı (küçük RNA'lar) ya da yıkıldıkları için kısa parçalar (fragmentler) olarak bulunurlar. Bu yüzden normalde OD A_{260}/A_{280} oranları düşüktür ve 1-1.6 arasında değişir. Bu değer, mikrodizilim analizi gibi sonraki uygulamaları etkilemez.

NanoDrop Spektrofotometrede çalışmak için en uygun nükleik asit konsantrasyon aralığı 2-3.7 ng/mL dir. Eğer bu aralıkta olmazsa, örnek uygun biçimde konsantre edilmeli veya seyreltilmelidir.

2.5.2. Biyoanalizör ile RNA kalite kontrolü ve miktar ölçümü

Biyoanalizör RNA, DNA ve proteinlerin analizi için günümüzde kullanılan çipli kapiller elektroforez sistemidir. Bu cihaz yaygın olarak mikrodizilim çalışmalarından önce, RNA kalite kontrolü için kullanılır (Şekil 2.7). RNA kalitesini kontrol etmek için en yaygın teknik olan agaroz jel elektroforezi, gen ekspresyon deneylerinde kullanılacak RNA'nın seçimi için çok uygun değildir. Bununla birlikte jelde RNA büyüklüğünün dağılımını belirlemek için tasarlanmış jel analizi yazılımı ile birarada bulunan floresan tarayıcılar veya dijital kameralar gibi seçenekler de bulunmaktadır. Bu teknikler sadece, toplam örneğin konsantrasyonu hakkında bilgi verir, örnek bileşenleri, potansiyel kirleticiler ve degradasyon derecesi hakkında bilgi sağlamaz, ayrıca yöntemler doğru bir ölçüm için daha fazla miktarda örnek ve daha uzun süre çalışma gerektirirler (Vitale, 2002).



Şeki 2.7: (A) Agilent'in 6000 Nano Çipi. (Agilent RNA 6000 Nano Kit Guide'dan alınmıştır ¹). (B) Çiplerde yerleştirilen mikrokanallar. (Lab-on-Chip.gene-quantification'den alınmıştır ²).

Biyoanalizörde ise, mikroakışkan teknolojisinin kullanımı sayesinde, nükleik asitlerin eleme polimeri ve floresan boya ile dolu mikrokanallarda (Şekil 2.7 B) ayrılması için 25 ng kadar küçük miktarda örnek kullanılır. Bir elektrik gerilimi mikroçipe uygulandığında, örnek çip yüzeyinde dağıtılmış bu mikrokanallar yoluyla göç eder. Örneğin hareketi esnasında ribozomal RNA ve diğer RNA türleri boyutlarına göre ayrılırlar. Eleme matrisi içindeki “*intercalating*” boya göç eden RNA'nın tespit edilmesini sağlar. Örneklerin göç zamanının normalizasyonu için her birisiyle bir iç markır yürütülür (Sodowich ve diğ., 2007).

1 https://www.chem.agilent.com/Library/usermanuals/Public/G2938-90037_RNA6000Nano_QSG.pdf.

2 <http://lab-on-chip.gene-quantification.info/>

Cihaza bağı olan bilgisayar ayrımları kontrol eder, konsantrasyonları kaydeder ve manipülasyon ile gerçek zamanlı veri analizini mümkün kılar. En önemlisi, biyoanalizör diğer mevcut tekniklere göre daha yüksek hassasiyet ve iyi performansa sahiptir. Ayrıca RNA örneklerini mikro plaka okuyucular ile yapılan floresan ölçümlere benzer bir hassasiyetle ölçülebilir. İlaveten bu cihazla örneklerin kalitesi ve bütünlüğü kolayca tespit edilebilir.

Biyoanalizörün en önemli avantajı tek bir platformda RNA'nın bütünlüğü, saflığı ve kantitatif değerini gösterebilmesidir. Biyoanalizör DNA kontaminasyonunu RNA'dan ayırt edebilir. RNA'nın DNAaz I ile muamelesi DNA kontaminasyonunu ortadan kaldırmak için her zaman gerçekleştirilebilir ve genellikle yeterlidir. Geleneksel agaroz elektroforezinin Biyoanalizöre göre tek avantajı, 3000 nt'lik veya 1000 nt aralıklarla büyük olan RNA transkriptlerini daha yüksek çözünürlükte gösterebilmesidir. İzolasyon işleminden sonra eğer %10'dan daha düşük konsantrasyonlarda protein kontaminasyonu varsa biyoanalizörde bu kontaminasyon gösterilemez (Sodowich ve ark., 2007).

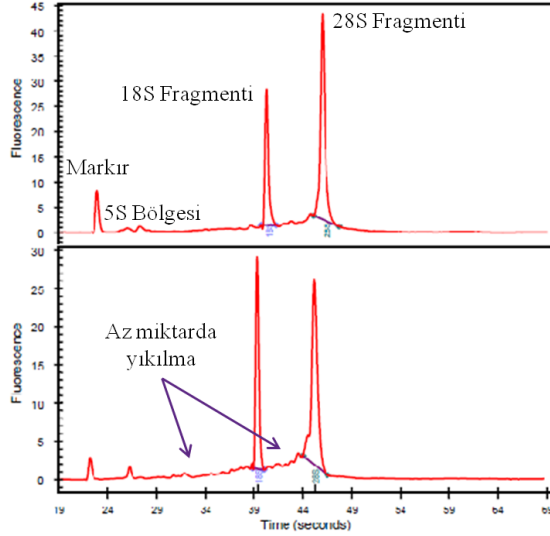
2.5.2.1. RNA'nın bütünlük sayısı (RIN)

RNA'nın bütünlüğünün göstergesi olan 28S/18S oranını hesaplamak için geleneksel olarak, agaroz jeller üzerindeki rRNA bantlarının yoğunluğu kullanılır. Bu oran 2 civarında olursa RNA'nın iyi kalitede olduğunu gösterir.

Agilent'e ait algoritma yazılımı ile düşük miktarlardaki RNA yıkılmaları hesaplanarak RNA örneklerinin bütünlüğü tahmin edilebilmektedir (Şekil 2.8). RNA'nın bütünlük sayısı ("**R**NA **I**ntegrity **N**umber", **RIN**) yazılım algoritması ile, 1-10 arasında bir numaralandırma sistemine göre, 1 değeri çok yıkılmış RNA'yı ve 10 değeri en sağlam RNA'yı göstererek, toplam RNA'nın sınıflandırılması yapılır. RIN sayısı 5 olan bir örnek, mikrodizilim deneyi için işe yaramayabilir, ama bir RT-PCR deneyi için uygun olabilir. Genel olarak, 7-8 veya daha yüksek RIN değerlerinde deneylerin çoğu iyi çalışır.

Ancak dikkate alması gereken bir durum daha vardır. Bazen mRNA'nın önemli bir kısmı tamamen bozulmuş iken, daha stabil (yarı ömrü 4-5 gün) moleküler olan ve ağırlığı yüksek olan rRNA'ların örnekte yeterince bulunması yanlış sonuçlara neden olabilir. rRNA daha stabil olduğu için örnekte yeterince bulunmasına rağmen bazen

mRNA'nın önemli bir kısmı tamamen bozulmuş olabilir, bu da yanlış sonuçlara neden olabilir.



Bozulmamış RNA: RIN 10

Ribozomal RNA oranı : 1.9

Bozulmamış RNA: RIN 10

Ribozomal RNA oranı : 1.4

Şeki 2.8: Yıkılmamış tam RNA'nın elektroferogramları. İkinci örneğin ribozomal oranı daha düşük olmasına rağmen "RIN" sayısı 10 olarak ölçülmüş. Biyoanalizördeki yazılım az miktarda yıkılımı ölçebilmektedir (www.chem.agilent.com/RIN den alınmıştır).

2.6. NÜKLEİK ASİT TEMELLİ YÖNTEMLER

2.6.1. Serumdan miRNA izolasyonu

Biyolojik örneklerden RNA izole etmek için genellikle iki yöntemin varyasyonları kullanılır: kimyasal ekstraksiyon veya katı-faz ekstraksiyon olarak adlandırılan silika immobilizasyonu. Kimyasal ekstraksiyon yöntemlerinde genellikle, RNazları inaktive edip RNA'ları diğer biyomoleküllerden ayırmak amacıyla asidik fenol ya da fenol-kloroform solüsyonları ile birlikte son derece konsantre kaotropik tuzlar kullanılır. Bunlar, çok saf RNA elde edilmesini sağlar, Tuzlar daha sonra uzaklaştırılmalı ve RNA alkol ile çöktürülerek konsantre edilmelidir. Rutin alkol çökeltme yolu kantitatif olarak küçük nükleik asit moleküllerini geri kazandıramaz. İkinci yöntem, katı faz ekstraksiyonu, ise RNA'nın suya olan afinitesini azaltıp katı tabakaya (silika) olan afinitesini artırmak için yüksek konsantrasyonda bir tuz ya da tuzla alkol karışımının kullanımına dayanır. Katı destek olarak silikanın (cam) kullanılmasının büyük RNA'lar için yararlı olduğu gösterilmiştir (Boom ve diğ., 1990).

2.6.2. Mikrodizilim

Mikrodizilim, son on yıllık zaman zarfında, transkriptom analizi yaparak büyük ölçekli biyomarkır keşfi için kullanılan en yaygın ve sonuçları başarılı olan bir yöntemdir (DeRisi ve diğ., 1996; Duggan ve diğ., 1999; Royce ve diğ., 2005). Genomik mikrodizilim, bir örnekte aynı anda birden fazla genin analizini yapabilmesi nedeniyle, gen ekspresyon çalışmaları için oldukça güçlü bir teknolojiyi temsil etmektedir. Mikrodizilim deneyleri genellikle dokulardan izole edilmiş, saptanabilir bir işaretleyici ile etiketlenmiş DNA, RNA veya miRNA ile gerçekleştirilir. Gen ekspresyonu düzeyini ölçmek amacıyla binlerce bireysel geni temsil eden gene özgü prob dizilerle hibridize edilir (Quackenbush, 2006). Deney başına büyük miktarda elde edilen veriler arasında artan veya azalan şekilde düzenlenen genlerin potansiyel biyomarkır olarak kabul edilebilmeleri için uygun istatistiksel analizlerin yapılması gereklidir. Hiyerarşik kümeleme (gruplandırma) algoritmaları kanser araştırmalarında, önceden tanımlanmış klinik bilgilere dayanarak tümörlerin sınıflandırılması ve daha sonra da ilgili genin tanımlanmasında en sık kullanılan araçlardan biridir. Bununla birlikte, son on yıl içinde, gen anlatımı dizi teknolojisi uygulanarak birçok hastalığın alt tiplerine göre sınıflandırılması, hastalıkların patogenezinin daha iyi anlaşılması ve çok sayıda tanı markırlarının keşfedilmesi sağlanmıştır (German Rodriguez-Gonzalez ve diğ., 2013).

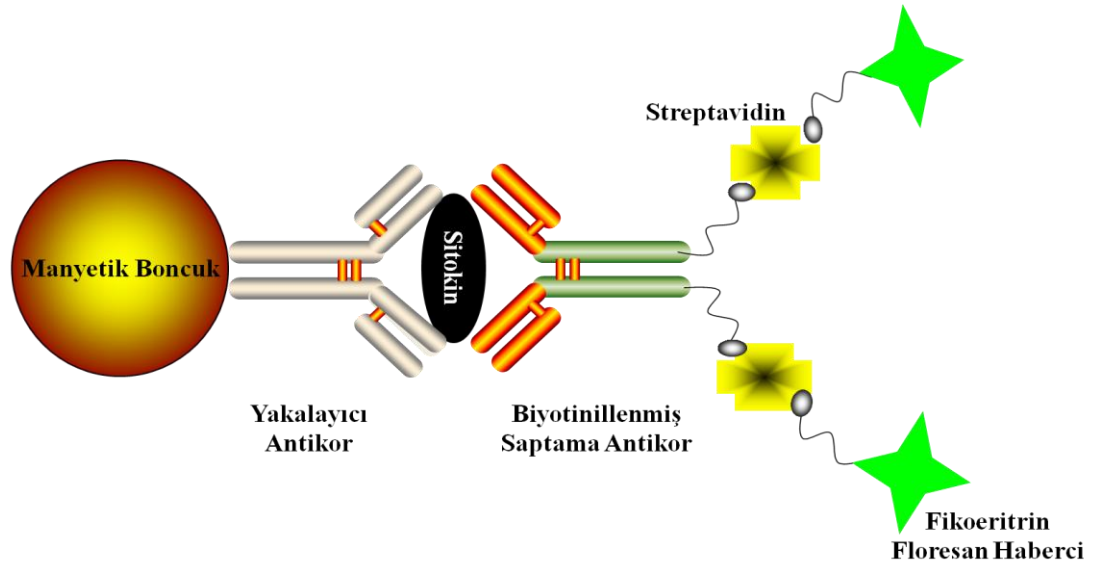
2.7. İMMÜNOLOJİK YÖNTEMLER

2.7.1. ELISA yöntemi

Bu yöntem Engvall ve Perlmann tarafından insan serumunda İmmünoglobulin G konsantrasyonunun analizi için geliştirilmiştir (Engvall ve Perlmann, 1971). Yöntem, antijen veya antikorun bağlandığı katı bir faz içerir (Engvall ve Perlmann, 1972). ELISA'yı diğer tekniklere karşılık üstün kılan faktör, bağlanan analitin okunma yöntemidir. ELISA'da istenen analitin konsantrasyonu, bir enzime konjuge edilmiş jenerik monoklonal bir antikorun eklenmesi ile ölçülür. Enzim basit bir substrat ilavesi ile bir renk değişimine uğrayıp bağlı analitlerin konsantrasyonunun okunmasına yol açar.

ELISA standart sitokin ölçüm yöntemi olarak kabul edilmiştir ve yaygın bir biçimde klinik laboratuvarlar ve biyomedikal araştırmalarda kullanılmaktadır. Son zamanlarda

multipleks analizler küçük miktarda bir örnekte (örneğin 12.5 µL) aynı zamanda birden fazla sitokinin ölçülebilmesi için geleneksel ELISA yönteminden geliştirilmiştir. Ayrıca boncuk temelli multipleks ölçümler olarak bilinen flowsitometrik multipleks analizler şu anda en çok kullanılan ELISA yöntemini temsil etmektedir (Şekil 2.9). Bu sistem, flositometre altında ayırt edilebilir özel boncuk setlerini kullanır. Her boncuk grubu, belirli bir yakalama antikoru ve ona bağlı olan floresan-etiketli streptavidin veya saptama antikoru ile kaplanır. Farklı boncuk setleri, kromojenik veya fluorojenik emisyonlarına göre saptanarak birden fazla sitokinin aynı anda ölçülmesi sağlanır. Ticari olarak üretilen antikor konjüge edilmiş boncuklar ile bir örnekte 25'e kadar farklı sitokinin ölçülmesi mümkündür, hatta bu sayı özel antikor konjüge edilmiş boncuklar "custom conjugate antibodies" kullanıldığı takdirde büyük ölçüde genişletilebilir (Leng ve diğ., 2008).



Şeki 2.9: Bio-Plex Sandviç ELISA. (Bio-Plex Pro™ Assays. Cytokine, Chemokine, and Growth Factors Instruction Manual'dan alınmıştır.)

miRNA'ların; moleküler tıpta yeni diagnostik, prognostik ve hedefe yönelik terapötik biyomarkırların belirlenmesinde umut verici unsurlar olabileceği fikrinden yola çıkarak, bu tez kapsamında SLE de tanı için kullanılacak spesifik bir veya birden fazla biyomarkırın araştırılması, hastaların sitokin genlerinin anlatım profillerinin belirlenmesi, profillerin serumdaki sitokin miktarları ile karşılaştırılması ve miRNA – sitokin ilişkilerinin saptanması amaçlandı.

Bu hedef için SLE hastalarında tüm mikroRNA molekülleri ile sitokin genlerinin anlatım düzeyleri ve sitokin miktarları arasındaki ilişkiler araştırılarak, mikroRNA'ların olası hedef sitokin genleri tanımlanmaya çalışıldı. Elde edilen sonuçlar SLE'nin patogenezinin aydınlatılmasına yönelik önemli katkılar sağlayacaktır. Ayrıca hastalığın tanısı, izlenmesi ve tedavisine yönelik çalışmalara da  n bulgular olarak ışık tutacağı  n görülmektedir.

3. MALZEME VE YÖNTEM

3.1. KLİNİK ÖRNEKLERİN TOPLANMASI VE SAKLANMASI

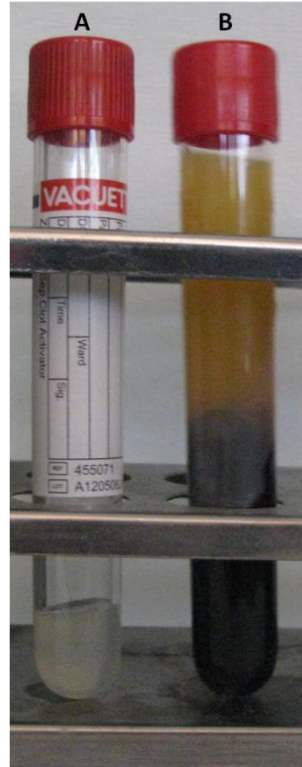
Çalışmanın ilk aşamasında İstanbul Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'na çalışma hakkında ayrıntılı bilgi verilerek 17.08.2012 tarih ve 1325 sayılı kararla etik kurul onayı alındı (EK.1). İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Hastanesinin Romatoloji Bölümüne başvuran ve çalışmaya alınan tüm vakalara çalışmayla ilgili ayrıntılı bilgi verildi. Çalışmaya gönüllü olarak katılmayı kabul eden hasta ve kontrol gruplarında yer alan bireylere aydınlatılmış hasta onam formu (EK.2) okutuldu ve dolduruldu. Çalışmaya alınan kişilerle yüz yüze görüşülerek bir anket formu dolduruldu. Bu anket formuna hastanın yaşı, cinsiyeti, sigara – alkol kullanımı, aile üyelerinin hastalık durumu gibi demografik bilgilerin yanı sıra, Sistemik Lupus Eritematozus hastalığının başladığı yıl, aldığı tedavi, kullanılan diğer ilaçlar ve dozları, diyet uygulama durumu, hormon replasman tedavisi alıp almadığı, ek hastalıkları gibi ilgili bilgiler kayıt altına alındı. Poliklinikte bulunan dosyalardan antinükleer antikörlerin (ANA) tipi ve miktarı gibi diğer yararlanılabilecek veriler de toplandı. Eksik kalan bilgiler için daha sonra her bir serum örneğinden analiz aşamasında gruplandırmayı sağlamak için biyokimyasal testler yapıldı.

Çalışma ve kontrol grubundaki tüm bireylerin seçim kriterleri şu şekilde sıralandı:

1. Diğer immünolojik hastalığı olanlar, çalışmaya dahil edilmedi.
2. Ayrıca gebelik ve emzirme durumu olanlar çalışmaya dahil edilmedi.
3. Genel durumda düşkünlüğe yol açan malignite ve kronik infeksiyonu olan bireyler çalışmaya alınmadı.

Bu tez çalışmasında, 16 deney ve 8 kontrol olmak üzere toplam 24 gönüllü bireyden kan örnekleri alındı. Deney grubu bireylerden kan alım işlemi, İstanbul Üniversitesi, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, Romatoloji Kliniğindeki görevli sağlık personeli tarafından, kontrol grubundan kan alım işlemi ise İstanbul Üniversitesi, Sağlık Kültür ve Spor

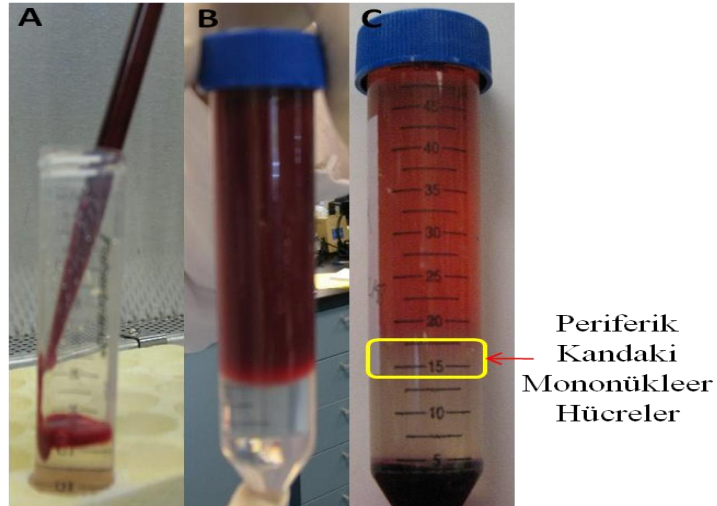
Daire Başkanlığı, Mediko Sosyal Merkezi'nde görevli sağlık personeli tarafından gerçekleştirildi. Kan örneklerinin alınması için vakumlu, kan pıhtılaşma inhibitörü EDTA içeren 4.5 mL'lik tüpler (her denek için ikişer tüp) ve serum örneklerinin alınması için vakumlu, kan pıhtılaşma aktivatörü Z solüsyonu içeren 8 mL'lik tüpler (her denek için birer tüp) kullanıldı. Z solüsyonu içeren tüplerde tam pıhtılaşmayı sağlamak ve daha fazla miktarda serum elde etmek için tüpler 10 dk oda sıcaklığında (15-25°C) bekletildi. Ardından 1900 x g, 4°C'de 10 dakika santrifüj edildi. Tüplerdeki özel jel, santrifüjden sonra üst fazında bulunan serum ile ara fazdaki beyaz kan hücreleri arasına yerleşir ve serumun ayırımını kolaylaştırır (Şekil 3.1). Yaklaşık 3-5 mL arasında elde edilen serum, dikkatli bir biçimde yeni tüplere aktarıldı ve 16000 x g, 4°C'de 10 dakika bir kez daha santrifüj edildi. Üst fazdaki serum 1.5 mL'lik tüplere bölüştürülerek gerektiği zaman kullanılmak üzere 80°C'de saklandı. Her bir bireye denek kodu verildi ve denek haklarının korunması için deney süresince bu kodlar kullanıldı.



Şeki 3.1: Serum ayırımı için tam kan pıhtı aktivatörü içeren tüplerde tolandı. (A) Serum içermeyen sadece Z solüsyonu içeren tüp.(B) Serum içeren Z solüsyonlu tüp.

3.2. LENFOSİTLERİN (“PERİFERİK MONONÜKLEER HÜCRELERİN”) İZOLASYONU

Periferik kan lenfositlerinin (PBMC) izolasyonu Ficoll-Hypaque solüsyonu kullanılarak yoğunluk gradient ayırımı yöntemi ile yapıldı (Böyum, 1968). Bu aşamada maksimum hücre verimini sağlamak için kan örneklerinin iki saat içerisinde çalışılması tavsiye edilmektedir (McCoy, 2001). Bu çalışmada alındıktan en geç 2 saat sonra örnekler 400 xg’de oda sıcaklığında 40 dk santrifüj edildi ve mononükleer lenfosit hücreleri içeren “*buffy coat*” bölgesi, kırmızı kan hücreleri (eritrositler) ile granüositleri içeren alt faz ve plazma ile trombositlerden oluşan üst fazdan ayrıldı (German Rodriguez-Gonzalez ve diğ., 2013) (Şekil 3.2).



Şeki 3.2: Yoğunluk gradient ayırma ile periferik mononükleer hücrelerin İzolasyonu. (A) ve (B) Kan Ficoll-Hypaque solüsyonu ile karışmayacak bir biçimde yavaşca Ficoll-Hypaque solüsyonu içeren falkona eklenir. (C) Granüositleri de içeren kırmızı hücre pelleti, Ficoll-Hypaque aracılığıyla lenfositlerden ayrılır. Plazma ve trombositlerden oluşan üst tabakanın lenfosit tabakası ile karşılaştırıldığında, çok daha şeffaf olduğu görülmektedir.

3.3. MOLEKÜLER ANALİZLER

3.3.1. Nükleik Asit İzolasyonu

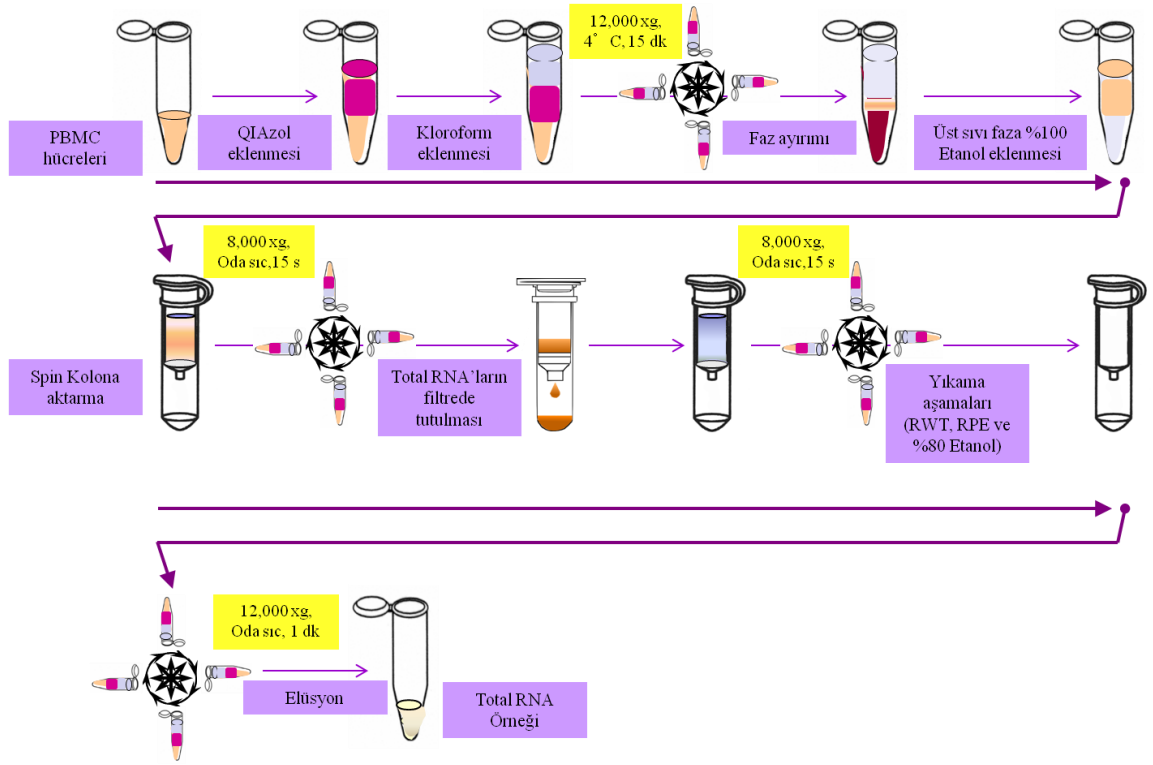
Bu çalışmada mikrodizilim deneylerinde kullanılmak amacıyla önce kan ve serum örneklerinden total RNA ve miRNA izolasyonu gerçekleştirildi. Daha sonra elde edilen RNA ve miRNA örneklerinin spektrofotometrik ve elektroforetik analizleri yapıldı.

3.3.1.1. Total RNA İzolasyonu

Bu çalışmada, EDTA'lı tüplerde toplanan kandan yoğunluk gradient ayırım yöntemi ile izole edilen ve **PBS** içinde süspansiyon halinde bulunan PBMC hücrelerinden, içeriği Tablo 3.1'de verilen ticari bir kit ("RNeasy Mini Kit", QIAGEN) kullanılarak; üreticinin talimatlarına göre total RNA izole edildi (Şekil 3.3). Son aşamada filtreli tüplere elüsyon tamponundan 30 µL eklenerek santrifüj yapıldı ve yaklaşık 28-30 µL RNA solüsyonu elde edildi.

Tablo 3.1: RNeasy Mini Kit'in içeriği (50 reaksiyonluk).

RNeasy Mini Kit	
RNeasy ® Mini Spin Kolonlar	50 adet
Toplama Tüpleri (1.5 mL'lik)	50 adet
Toplama Tüpleri (2 mL'lik)	50 adet
QIAzol ®	50 mL
RWT Tamponu	18 mL
RPE Tamponu	11 mL
RNaz İçermeyen Su	10 mL



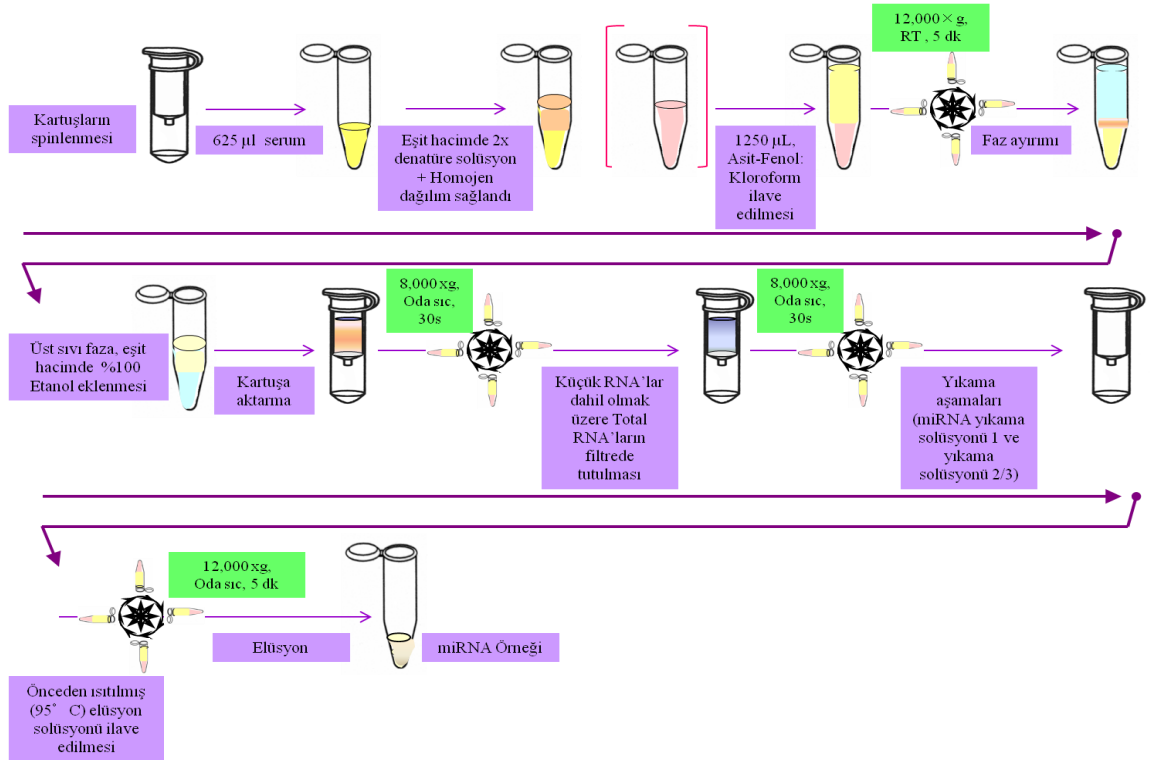
Şeki 3.3: RNeasy Mini Kit'in Prosedürü.

3.3.1.2. miRNA İzolasyonu

Bu çalışmada, deneklerden alınan ve yukarıda da bahsedildiği gibi daha önceden 1.5 mL'lik tüplere bölünmüş serum örneklerinden, içeriği Tablo 3.2' de verilen ("mir Vana PARIS" Kit, Ambion) kiti kullanılarak ve üreticinin talimatlarına göre miRNA izole edildi (Şekil 3.4).

Tablo 3.2: *mir Vana* PARIS Kiti'nin içeriği (50 reaksiyonluk).

<i>mir Vana</i> PARIS	(40)
Filtre Kartuşları	40 adet
Toplama Tüpleri (2 mL)	80 adet
Hücre Parçalama Tamponu	25 mL
2 x Denatürasyon Solüsyonu	25 mL
Kullanmadan önce 375 µL 2-merkaptoetanol eklendi	
Asit-Fenol: Kloroform	2 x 25 mL
miRNA Yıkama Solüsyonu 1	30 mL
Yıkama Solüsyonu 2/3	50 mL
Elüsyon Solüsyonu	5 mL

**Şeki 3.4:** *mir Vana* PARIS Kiti'nin Prosedürü.

3.3.2. Nükleik Asit Miktarının Spektrofotometrik Analizi

Nükleik asitlerin miktarı, geleneksel olarak, spektrofotometre aracılığıyla UV absorpsiyonu ölçülerek belirlenir. Geleneksel spektrofotometri yönteminin kullanımındaki sorunlardan biri, kullanılan küvetlerin büyük olmasıdır ki, bu durum düşük konsantrasyonlarda bulunan RNA molekülünün ölçülmesini zorlaştırır ve bazen değerli bir RNA örneğinin kısmen kaybına yol açabilir. Buna karşın, NanoDrop spektrofotometre tekrarlanabilme özelliği küçük örneklerin son derece doğru analizini sağlar. NanoDrop Spektrofotometrenin en uygun ölçüm aralığı 2-3.7 ng/mL'dir. Bazı plazma/serum örnekleri çok sayıda değişkene bağlı olmak üzere bireyden bireye değişir ve bu ölçüm aralığından çok daha az miktarda RNA içerir. Bu nedenle günümüzde mikroarray gibi hassas olan deneylerde, örneklerden elde edilen RNA miktarının azlığı ve DNA kontaminasyonu göz önüne alındığında RNA miktarının ölçümü için Biyoanalizör kullanımı tercih edilir.

3.3.2.1. Nanodrop2000 ölçümü

Elde edilen hem total RNA hem de miRNA örneklerinin absorbans değerleri, her örnekten 2 µL alınarak NanoDrop 2000 spektrofotometre (Thermo SCIENTIFIC) ile ölçüldü. "Blank" olarak RNA izolasyonunun son aşamasında kullanılan RNaz içermeyen su kullanıldı. İzole edilen RNA'ların miktarları ve protein kontaminasyonu açısından saflık değerleri belirlendi.

3.3.2.2. Biyoanalizör Ölçümü

NanoDrop ile spektrofotometre ölçümlerinde sadece toplam örneğin konsantrasyonu ölçülebilmekte ancak örnek bileşenleri, potansiyel kirleticiler, örneklerin yıkım derecesi hakkında bilgiler sağlanamamaktadır. Biyoanalizör DNA kontaminasyonunu RNA'dan ayırt edebilme özelliğine sahiptir. Bu nedenle Biyoanalizör tek bir adımda RNA'nın bütünlüğü, saflığı ve kantitatif değerleri gösterilebilmektedir.

Bu çalışmada hem total RNA hem de miRNA örnekleri RNA 6000 Nano Kiti ve Small RNA Kiti kullanılarak biyoanalizörde üreticinin talimatlarına göre analiz edildi. RNA 6000 Nano Kit'i 25-500 ng/µL arasında değişen RNA konsantrasyonları için kullanıldı. Small RNA Kit'i ise 50-2000 pg/µL arasında değişen saflaştırılmış miRNA

konsantrasyonları için kullanıldı. RNA 6000 Nano Kit'in de bulunan "ladder", 0.2-6 kb boyutları arasında değişen altı parça RNA içerir (0.2 kb, 0.5 kb, 1.0 kb, 2.0 kb, 4.0 kb ve 6.0 kb). Bu değerler "Small RNA Kit"i için 20-150 nt olarak değişmektedir.

3.3.3. Nükleik Asit Saflığının Elektroforetik Analizi

RNA'nın bütünlüğünün göstergesi olan 28S/18S oranını hesaplamak için genelde denatüre agaroz jeller üzerindeki rRNA bantlarının yoğunluğu kullanılır. Bu oranın 1.9-2.1 (ideali 2) değerleri arasında olması RNA'nın iyi kalitede olduğunun bir göstergesidir. 28S/18S rRNA oranı RNA bütünlüğünü tahmin etmek için geçerli bir yol olmasına rağmen, ideal bir yol sayılmaz ve bazen bu oran RNA bozulmasının tam düzeyini yansıtmamaktadır. Ayrıca agaroz jel elektroforezinde analizler daha uzun sürmekte ve doğru ölçüm alabilmek için fazla miktarda örnek kullanılması gerektirmektedir (Vitale, 2002). Bu oranın yanı sıra, "Agilent" firmasının piyasaya sürdüğü bir algoritma yazılımı ufak miktarlardaki yıkılmayı bile göstererek toplam RNA bütünlüğü hakkında bilgi edinmeyi oldukça kolaylaştırmaktadır. RNA'nın bütünlük sayısı ("**R**NA **I**ntegrity **N**umber", **RIN**) yazılım algoritması ile, 1-10 arasında bir numaralandırma sistemine göre, 1 değeri çok yıkılmış RNA'yı ve 10 değeri ise en sağlam RNA'yı temsil edecek şekilde, toplam RNA'nın sınıflandırılması sağlanır. Eğer bir çalışmada hasta örneği hiç bekletilmeden kullanılıyorsa RIN değeri kesinlikle 7.5-8 veya daha yüksek olmalıdır; aksi halde uygulanan RNA izolasyon prosedüründe bir sorun olduğu düşünülmelidir.

3.3.3.1. RNA'ların Agaroz Jel Elektroforez ile Analizi

RNA'ların elektroforetik analizi için %1.2'lik agaroz-formaldehit jel kullanıldı (Sambrook ve diğ., 1989). Jelin hazırlanmasında kullanılan madde miktarları Tablo 3.3'de verilmiştir.

Formaldehitli agaroz jel hazırlanırken öncelikle 0.45 g agaroz, 3 mL 10 x **MOPS** tamponu ve 24.6 mL ultra saf sudan oluşan karışım, mikrodalga fırında 2 dk tutularak çözdürüldü. Bu karışım, sıcaklığı 50-60°C'ye gelinceye kadar soğutuldu. Karışımın üzerine 2.4 ml formaldehit ile 2 µL (10 mg/mL) etidyum bromür eklendi. Karışım yatay jel elektroforez kasedine dökülerek soğumaya bırakıldı. RNA örneklerini denatüre etmek amacıyla 5 µL RNA çözeltisi üzerine RNA yükleme tamponundan (pH: 5)

(Tablo 3.4) 15 μ L eklendi. Karışım 55°C’de 10 dk bekletildi. Süre sonunda hemen buza alınan örneklere 5 μ L bromofenol mavisi eklendi ve homojen dağılım sağlandıktan sonra örnekler jele yüklendi. RNA örnekleri, RNA yürütme tamponunda (Tablo 3.4) 60 V’de ve 45 mA akım altında 30 dakika yürütüldü.

Tablo 3.3: Formaldehitli agaroz jel içeriği.

Jel içeriği		Miktar
Agaroz		0.45 g
10 x MOPS tampon (PH 7.0)	Morfolinopropansülfonik asit	400 mM
	Sodyum asetat	160 mM
	EDTA	20 mM
Ultra saf su		24.6 mL
Formaldehit		2.4 mL
Etidyum bromür (10 mg/mL)		2 μ L

Tablo 3.4: RNA’ların denatürasyonu ve formaldehitli agaroz jelde yürütülmesi için kullanılan tamponların içeriği.

Tampon	İçerik	Miktar
RNA yürütme tamponu	10 x MOPS	30 mL
	Formaldehit	5.4 mL
	Ultra saf su	264.6 mL
RNA yükleme tamponu	Formaldehit	175 μ L
	Formamid	500 μ L
	10 x MOPS	100 μ L

3.3.3.2. RNA'ların Biyoanalizör ile Elektroforetik Analizi

Yukarıda da bahsedildiği gibi örneklerin daha dikkatli analizi amacıyla hem total RNA hem de miRNA örnekleri, RNA 6000 Nano Kiti ve Small RNA Kiti kullanılarak biyoanalizörde üreticinin talimatlarına göre analiz edildi. Çalışmaya RIN değeri 7.5-8 veya daha yüksek olan örnekler ile devam edildi.

3.3.4. Mikrodizilim Temelli Yöntemler

Total RNA ve miRNA örneklerinin analizi mikrodizilim Agilent mikrodizilim aletinde “*Sem Laboratuvar Cihazları Pazarlama San. ve Tic. A.Ş.*”ine ait araştırma laboratuvarında, tarafımdan gerçekleştirildi.

3.3.4.1. miRNA Mikrodizilim Analizi

Bu çalışmada miRNA'ların analizi için “*Sanger miRBase*”den yararlanarak üzerlerinde 2006 insan miRNA'sını hedefleyen 60 nt'lik probalar sabitlenmiş *Agilent 8×60K v19* miRNA mikrodizilim slaytları (G4872A) kullanıldı. İşaretleme ve hibridizasyon reaksiyonları için “*microRNA Spike-In kit*” (Agilent p/n 5190-1934) içerisindeki uygun solüsyonlar (sırasıyla İşaretleme Spike-In solüsyonu ve Hyb Spike-In solüsyonu) kullanıldı. Örnek işaretleme ve melezleme için, miRNA'ları da içeren 100 ng total RNA'da miRNA'ların 3' ucuna siyanin 3-pCp molekülü bağlanarak bu moleküllerin floresan ile etiketlenmesi sağlandı.

Defosforilasyonu gerçekleştirilecek RNA örnekleri 50 ng/μL olacak şekilde 1xTE tamponunda (pH: 7.5) sulandırıldı ve buz üzerinde bekletildi. Dana bağırsak alkalın fosfataz (“*Calf Intestinal Alkaline Phosphatase*”, **CIP**) ana karışımı, üreticinin Tablo 3.5'de verdiği talimata göre hazırlandı. Her bir örnek için bu karışımdan 2 μL alınarak 2 μL (100 ng) RNA'ya eklenip 37°C'ye ayarlanmış ısı bloğunda 30 dk bekletildi. Daha sonra 2.8 μL 100% DMSO eklendi ve ısı bloğunda 100°C'de 10 dk inkübe edilerek denatürasyon sağlandı. Örnekler hemen buzlu su banyosuna aktarıldı. Ligasyon ana karışımı, Tablo 3.6'da verilen bileşenlerin yavaşça karıştırılması ile hazırlandı. Bu karışımdan her bir örnek tüpüne 4.5 μL eklendi ve çalkalyıcılı su banyosunda 16°C'de 2 saat bekletildi. Örnekler, 45°C'ye ayarlı, vakumla yoğunlaştırıcıda 3 saat kurutuldu.

Tablo 3.5: İşaretleme “Spike-In” solüsyonu ile Dana Bağırsak Alkalın Fosfataz ana karışımı.

Bileşenler	Reaksiyon başına hacim	25 reaksiyon için hacim
10x Dana Bağırsak Alkalın Fosfataz Tamponu	0.4 µL	10.0 µL
İşaretleme “Spike-In” Solüsyonu	1.1 µL	27.5 µL
Dana Bağırsak Alkalın Fosfataz	0.5 µL	12.5 µL
Toplam Hacim	2.0 µL	50.0 µL

Tablo 3.6: T4 RNA ligaz için ligasyon ana karışımı.

Bileşenler	Reaksiyon başına hacim	25 reaksiyon için hacim
10x T4 RNA Ligaz Tamponu	1.0 µL	25.0 µL
Siyanin 3-pCp	3.0 µL	75.0 µL
T4 RNA Ligaz	0.5 µL	12.5 µL
Toplam Hacim	4.5 µL	112.5 µL

Kurutulmuş örneklere 17 µL nükleaz içermeyen su ve 1 µL daha önceden seyrelterek hazırlanmış “Hyb Spike-In” hibridizasyon solüsyondan (üçüncü seyrelti) ilave edildi. Her bir numune tüpü için hibridizasyon reaksiyonun bileşenleri, üreticinin Tablo 3.7’de verdiği talimata göre eklenip 100°C’de 5 dk inkübe edildikten sonra, örnekler 5 dk buzlu su banyosunda bekletildi. Mikrodizilim slaytlarına örnek yüklenmesi, bölmelerin montajı ve bu düzeneğin kaldırılması üreticinin talimatlarına göre gerçekleştirildikten sonra monte edilmiş slayt bölmeleri daha önceden 50°C’ye ayarlanmış hibridizasyon fırınına yerleştirildi ve 20 devir/dk’da 20 saat bekletildi. Mikrodizilim slaytları Agilent’in miRNA mikrodizilim prosedüründe belirtildiği şekilde yıkandı. Yıkama işlemi için gereken koşullar Tablo 3.8’de listelenmiştir.

Tablo 3.7: Hyb “Spike-In” solüsyonu ile miRNA mikrodizilimler için hibridizasyon karışımı.

Bileşenler	Hacim (µL)
İşaretlenmiş miRNA Örneği	17
Hyb Spike-In Solüsyonu	1
10x GE Bloke Edici Solüsyonu	4.5
2x Hi-RPM Hibridizasyon Tamponu	22.5
Toplam Hacim	45

Tablo 3.8: Yıkama koşulları.

Bileşen	Kap	Yıkama Tamponu	Sıcaklık	Zaman
Parçaların Ayrılması	1	GE Yıkama Tamponu 1	Oda sıcaklığı	Birkaç saniye
1.Yıkama	2	GE Yıkama Tamponu 1	Oda sıcaklığı	5 dk
2.Yıkama	3	GE Yıkama Tamponu 2	37°C	5 dk

Melezlenmiş mikrodizilimler “*Agilent Microarray*” tarayıcı (versiyon SureScan) ile tarandı ve veriler (“*Agilent Feature Extraction*”, **AFE**) görüntü cihazı (versiyon 10.7.3) kullanılarak analiz edildi.

3.3.4.2. *miRNA Mikrodizilim Veri Analizi*

Verilerin ön-işleme ve diferansiyel ekspresyon analizi “GeneSpring” yazılımı (Agilent) (versiyon 12.6) kullanılarak yapıldı. “*Agilent Feature Extraction*” görüntü analiz yazılımı tarafından sağlanan toplam gen sinyali verileri “*quantile*” yöntemi kullanılarak normalize edildi. Görüntü analiz yazılımı sinyallerin farklı ölçüm hatalarını tanımlayıp minimum kaliteye ulaşamayan her bir veriyi işaretler ve bu yüzden miRNA verilerini filtrelemek için kullanılabilir. Bu filtreleme toplam gen sinyallerinin normalizasyon işleminden sonra yapıldı. “*gIsGeneDetected*” filtreleme, herhangi bir deneysel durumda ifade edilmemiş miRNA’ları işlem dışı tutar. Böylece analiz, “*Agilent Feature Extraction*” yazılımı tarafından en az bir deneysel durumda sabitlenip (*gIsGeneDetected*=1) işaretlenen miRNA genleriyle sınırlı kalır. Diferansiyel (farklılık gösteren) ekspresyon analizi için, GeneSpring paketi, her bir genin ekspresyon değeri için doğrusal modelleme yapar ve bu şekilde, farklı deneysel koşullar arasındaki anlamlı ekspresyon farklılığını değerlendirir. Yanlış pozitif sonuçları kontrol etmek için Benjamini yöntemi kullanıldı.

3.3.4.3. *mRNA Mikrodizilim Analizi*

Bu çalışmada birçok veri tabanından yararlanılarak hazırlanmış üzerlerinde protein kodlayan RNA’lar ile birlikte büyük intergenik kodlayıcı olmayan RNA’lar (“*Large intergenic non-coding RNA*”, **lincRNA**) ve kodlama potansiyeli belirsiz olan transkriptler (“*Transcripts of Uncertain Coding Potential*”, **TUCP**) ile ilişkili toplam 50,599 tane 60 nt’lik prob spotlanmış Agilent SurePrint G3 Human Gene Expression 8x60K v2 mikrodizilim slaytları (G4851B) kullanıldı.

Başlangıç RNA miktarına bağlı olarak (200 ng), “Spike-Mix” solüsyonu tüp karıştırıcıda karıştırıldıktan sonra su banyosunda 37°C’de 5 dk bekletildi. Kitte bulunan sulandırma tamponu kullanılarak üreticinin talimatına göre ana solüsyondan 3 dilüsyon serisi (1. için 1/20, 2. için 1/25, 3. için 1/10) hazırlandı. Her bir örnekte kullanılan RNA miktarı ve seyreltilmiş “RNA Spike-Mix” kontrolünün toplam hacminin 3.5 µL’ yi aşmaması için gerekli adımlarda vakumlu yoğunlaştırıcı kullanıldı. Her bir örnek için, total RNA’dan 200 ng (1-1.5 µL), final hacim 3 µL olacak şekilde “Spike- Mix” solüsyona (1.5-2 µL), eklendi. Bu karışıma 1.8 µL Tablo 3.9’da gösterildiği gibi hazırlanan T7 promotör primer karışımından eklenip denatürasyonu sağlamak için çalkalamalı su banyosunda 65°C’de 10 dk inkübasyona bırakıldı ve hemen buza transfer edilip 5 dk bekletildi. Her bir tüpe Tablo 3.10’da belirtildiği gibi hazırlanan cDNA ana karışımından 4.7 µL eklendi. Örnekler 40°C’de 2 saat ve ardından 70°C’de 15 dk inkübe edilip 5 dk buzda bekletildi. Her bir tüpe Tablo 3.11’de açıklandığı gibi hazırlanan transkripsiyon ana karışımından 6 µL ilave edilip 40°C’de 2 saat inkübe edildi. Bu aşamaya kadar reaksiyonun toplam hacmi 16 µL oldu.

Tablo 3.9: T7 Promotör primerinin karışımı.

Bileşenler	Reaksiyon başına hacim	25 reaksiyon için hacim
T7 Promotör Primeri	0.8 µL	20.0 µL
Nükleaz İçermeyen Su	1.0 µL	25.0 µL
Toplam Hacim	1.8 µL	45.5 µL

Tablo 3.10: cDNA ana karışımı.

Bileşenler	Reaksiyon başına hacim	25 reaksiyon için hacim
5x İlk İplik Tampon (“First Strand Buffer”)	2.0 µL	50.0 µL
0.1 M DTT	1.0 µL	25.0 µL
10 mM dNTP Karışımı	0.5 µL	12.5 µL
“AffinityScript RNase Block” karışımı	1.2 µL	30 µL
Toplam Hacim	4.7 µL	117.5 µL

Tablo 3.11: Transkripsiyon ana karışımı.

Bileşenler	Reaksiyon başına hacim	25 reaksiyon için hacim
Nükleaz İçermeyen Su	0.75 µL	18.75 µL
5x Transkripsiyon Tamponu	3.2 µL	80.0 µL
0.1M DTT	0.6 µL	15 µL
NTP Karışımı	1.0 µL	25.0 µL
T7 RNA Polimeraz Karışımı	0.21 µL	5.25 µL
Siyanin 3-CTP	0.24 µL	6 µL
Toplam Hacim	6.0 µL	150 µL

Elde edilen cRNA örneklerinin absorbans değerleri, her örnekten 2 µL alınarak nanofotometrede (IMPLEN) ölçüldü. “Blank” olarak nükleaz içermeyen su kullanıldı. Elde edilen sonuçlardan Siyanin-3 boya konsantrasyonu (pmol/µL), RNA absorbans oranı (A_{260}/A_{280}) ve cRNA konsantrasyonu (ng/µL) belirlenip her bir reaksiyonun özel aktivitesi ve miktarı (3.1) ve (3.2) formüllere göre hesaplandı.

$$\frac{cRNA \text{ konsantrasyonu} \times 30 \mu\text{l (elüsyon hacmi)}}{1000} = cRNA \text{ Miktarı } (\mu\text{g}) \quad (3.1)$$

$$\frac{Cy3 \text{ konsantrasyonu}}{cRNA \text{ konsantrasyonu}} \times 1000 = \mu\text{g cRNA başına Siyanin-3 Miktarı (pmol)} \quad (3.2)$$

Sekizli çiplerde en uygun reaksiyon aktivitesini (...= 6) yakalamak için tüm cRNA’lardan toplam hacimde 0.825 µL olacak şekilde sulandırmalar hazırlandı.

Tablo 3.12’de gösterildiği gibi fragmentasyon karışımı hazırlandı ve her bir mikrodizilim için, 1.5 mL’lik nükleaz içermeyen mikrosantifüj tüpüne 25 µL bu karışımdan ilave edilip yavaşça karıştırıldı. RNA fragmentasyonunu sağlamak için 60° C’de 30 dk inkübasyon gerçekleştirildi. Tüpler 1 dk buzda bekletildi. Fragmentasyon reaksiyonunu durdurmak için her bir tüpe 25 µL 2x GEx melezleme tamponu “2x GEx Hybridization Buffer HI-RPM” eklendi. Pipetleme yapıldıktan sonra 1 dk mikrosantrifüjde spinlendi. Her bir sıra için çiplere toplam 50 µL hacimdeki karışımdan

40'ar μL yüklendi. Slaytlara örnek yükleme ve bölmelerin monte ve demonte edilmesi üreticinin talimatlarına göre gerçekleştirildikten sonra montajı yapılmış slayt bölmeleri daha önceden 65°C 'ye ayarlanmış hibridizasyon fırınına yerleştirildi ve 10 devir/dk'da hızını ayarlayarak 17 saat bekletildi. Mikrodizin slaytlarının yıkama yöntemi Agilent'in "one-color platform"una göre yapıldı. Tablo 3.13'te, yıkama işlemi için gerekli koşullar listelendi. Melezeme işleminden sonra mikrodizilim slaytları "Agilent mikroarray" tarayıcı (versiyon SureScan) ile tarandı ve veriler AFE görüntü cihazı (versiyon 10.7.3) kullanılarak analiz edildi.

Tablo 3.12: Sekizlik mikrodizilim için fragmentasyon karışımı.

Bileşenler	8'lik Mikrodizilim (miktar veya hakim)
Siyanin -3' ile Etiketlenip Çoğaltılmış cRNA	600 ng
10x Bloke Edici Madde	5 μL
25x Fragmentasyon Tamponu	1 μL
Nükleaz İçermeyen Su	25 μL 'ye tamamlandı
Toplam Hacim	25 μL

Tablo 3.13: Yıkama koşulları.

Bileşen	Kap	Yıkama Tamponu	Sıcaklık	Zaman
Parçaların Ayrılması	1	GE Yıkama Tamponu 1	Oda sıcaklığı	Birkaç saniye
1. Yıkama	2	GE Yıkama Tamponu 1	Oda sıcaklığı	5 dk
2. Yıkama	3	GE Yıkama Tamponu 2	37°C	5 dk

3.3.4.4. mRNA Mikrodizilim Veri Analizi

Bölüm 3.3.2.'de miRNA mikrodizilim analizi için yapılan işlemler benzer bir şekilde küçük değişimler ile bu aşamada da gerçekleştirildi.

3.3.5. İmmünolojik Yöntemler

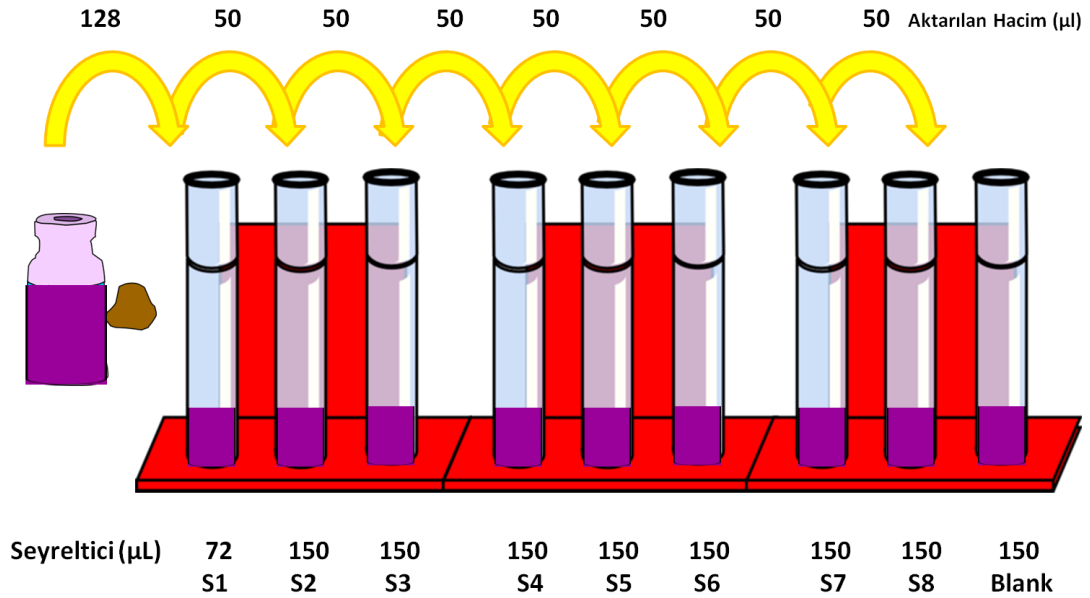
3.3.5.1. Multipleks "ELISA"

Birden fazla sitokin eş zamanlı belirlenmesi amacıyla multipleks ELISA yöntemi kullanıldı. Bu sistemde araştırılan sitokinlere özgü antikorlar kovalent bağlarla manyetik boncuklara bağlanmıştır. Deneye başlamadan önce floresan sinyali ayarlamak için üreticinin talimatlarına göre kalibrasyon kiti kullanılarak "Bio-Plex"

sistemi ve “Bio-Plex Manager” yazılımı kalibre edildi. Standartlar, kontroller, örneklerin ve kör örneğin plaka düzeni belirlendi. İçinde liyofilize standart madde bulunan kuyucuğa 500 µL standart seyreltici ekleyerek 1-3 s vorteks edilip 30 dk buzda inkübe edildi. Şekil 1’de de gösterildiği gibi bu ana standarttan seyreltme ile sekiz seri hazırlandı. Sekiz noktalık bir standart eğri (her iki nokta arasında dört kat seyreltme) oluşturuldu. Her bir örnek için 50 µL üzerine 150 µL örnek seyreltici ilave edildi ve bu şekilde örnekler 1:4 oranında seyreltildi. Üreticinin talimatına göre manyetik boncuklar orta hızda 30 s tüp karıştırıcıyla karıştırıldı ve daha sonra 1x manyetik boncuklar elde etmek amacıyla 5175 µL deney tamponu 15 mL’lik falkon tüpüne aktarıldı ve üzerine 575 µL 10x manyetik boncuk ilave edildi. Bu karışım orta hızda 30 s karıştırıldıktan sonra plaka üzerindeki her bir kuyucuğa 50’şer µL olacak şekilde dağıtıldı. Kuyucuklar manyetik plaka taşıyıcı kullanılarak her kuyucuk için 100 µL yıkama tamponu ile iki kere yıkandı. Seyreltilen standartlar, kontroller ve örnekler 1-3 s yavaşça karıştırıldı ve 50 µL’lik hacimlerde kuyucuklara dağıtıldı. Plakanın yüzeyi özel bantlar ve alüminyum folyo ile sarıldıktan sonra oda sıcaklığında 1100 devir/dk hızda 30 s ve ardından 300 devir/dk hızda 30 dk çalkalandı. Bu sırada 300 µL 10x tespit edici antikor ile 2700 µL tespit edici antikor seyreltici karıştırıldı ve 1x tespit edici antikor elde edildi. Deneyin inkübasyon süresi tamamlandıktan sonra kuyucuklar manyetik plaka taşıyıcısı kullanılarak üç kere 100’er µL yıkama tamponu ile yıkandı. Tespit edici antikor 1-3 s yavaşça karıştırıldı ve her kuyucuğa 25’er µL dağıtıldı. Plakanın yüzeyi özel bantlar ve alüminyum folyo ile sarıldıktan sonra oda sıcaklığında 1100 devir/dk hızda 30 s ve ardından 300 devir/dk hızda 30 dk çalkalandı. Bu sırada 60 µL 100x Streptavidin-PE solüsyonu ile 5940 µL deney tamponu karıştırıldı ve 1x Streptavidin-PE solüsyonu elde edildi. Deneyin inkübasyon süresi tamamlandıktan sonra kuyucuklar manyetik plaka taşıyıcısı kullanılarak üç kere 100’er µL yıkama tamponu ile yıkandı. 1x Streptavidin-PE solüsyonu 1-3 s yavaşça karıştırıldı ve her kuyucuğa 50’şer µL dağıtıldı. Plakanın yüzeyi özel bantlar ve alüminyum folyo ile sarıldıktan sonra oda sıcaklığında 1100 devir/dk hızda 10 s ve ardından 300 devir/dk hızda 30 dk çalkalandı. Deneyin inkübasyon süresi tamamlandıktan sonra kuyucuklar manyetik plaka taşıyıcısı kullanılarak üç kere 100’er µL yıkama tamponu ile yıkandı. Her kuyucuğa 125 µL deney tamponu eklendi ve plakanın yüzeyi özel bantla sarıldıktan sonra oda sıcaklığında 1100 devir/dk hızda 30 s çalkalandı. Bant plakadan ayrıldıktan sonra plaka daha önceden kalibre edilip ayarlanmış “Bio-Plex 200” (Bio-Rad) okuyucuya yerleştirildi.

Bu okuyucu kırmızı lazer (635 nm) ile boncukları tanımlayıp yeşil lazer (532 nm) ile floresan haberci sinyalini sağlamak için fikoeritrini (“*Phycoerythrine*”, **PE**) uyarır. Daha sonra “*Bio-Plex Manager*” yazılımı kullanılarak (Bio-Rad) ortalama floresan yoğunluğu (“*Median Fluorescence Intensity*”, **MFI**) ve konsantrasyon (pg/mL) verileri elde edildi. Standartlar ile ilişkili aykırı miktarlar, standart eğriden ve kabul edilebilir aralığın dışında kalan örnekler (“*Out of Range*”, **OOR**) analizden uzaklaştırıldı.

Tüm istatistiksel analizler “*Statistical Package for the Social Sciences v17.0*”i (SPSS Inc, Chicago, IL, ABD) kullanılarak gerçekleştirildi. Anlamlılık düzeyi % 5 ($p < 0.05$) olarak belirlendi.



Şeki 3.5: Standart solüsyonunun dört kat seyreltme serisinin hazırlanması.

3.3.6. İstatistiksel Yöntemler

3.3.6.1. miRNA ile mRNA eşleşmesinin Analizi

Mikro dizilim çiplerinde spotlanan miRNA'lara ait dizilim bilgileri ve hedef mRNA nükleotid dizileri NCBI veri tabanından elde edildi. miRNA moleküllerinin mRNA ile yüksek benzerlik gösteren eşleşmeleri Smith-Waterman algoritma skor matrisine göre BLAST algoritmasında hesaplandı. Elde edilen hizalamalara göre homoloji gösteren bölgelerin rastgeleliği istatistiksel olarak BLAST tarafından değerlendirildi. Nükleotidlerin görülme olasılıklarının maksimum değeri alınarak (“*Gumble Extreme*

Value Distribution”, **EVD**) formülüne göre benzerlik değeri (S) ile üssel ilişkili olan, beklenen değeri (e) hesaplandı. Küçük miRNA’ların mRNA ile eşleştiği parçalarda, benzerliğin kararlı olduğunu ifade eden e değerleri taranarak 0.05’ten küçük olanlar seçildi. Hataların en aza indirilebilmesi için S değerinin logaritmaları alınarak Bit değerleri belirlendi (Altschul ve diğ., 1997). E değeri için 0.05 değerinin altındaki, bit skoru için de 50’nin üzerindeki dizilim benzerlikleri anlamlı olarak kabul edildi (Pertsemlidis ve Fondon, 2001; Villareal ve diğ., 2005).

4. BULGULAR

4.1. DENEKLERİN DEMOGRAFİK VE TEMEL ÖZELLİKLERİ

Bu çalışmaya, 8 sağlıklı kontrol, 10 böbrek tutulumu olan SLE hastası ve 6 böbrek tutulumu olmayan SLE hastası dahil olmak üzere, toplam 24 gönüllü denek alındı. Grupların yaş dağılımının benzer olmasına dikkat edildi. 27-54 yaş aralığında olan sağlıklı grup için, yaş ortalaması 38.1 ± 10.5 yıl 21-60 yaş aralığında olan SLE hastalarının yaş ortalaması ise 39.5 ± 12.05 olarak belirlendi. SLE'nin kadınlarda daha yaygın olması nedeniyle, hastaların yaklaşık % 85, kontrol bireylerin % 100'ü kadın olarak seçildi.

Tüm SLE'li hastaların tanısı **ACR** ("American College of Rheumatology") tarafından belirlenen kriterlere göre yapıldı. Böbrek tutulumu, proteinüride artış (> 150 mg/24 saat), yüksek serum kreatinin düzeyi (> 1.4 mg/dL) (Böbrek Yetmezliği) veya her ikisi ile tanımlandı. Aktif lupus ise ANA, anti-DNA antikorlarının sürekli yüksek olması ve/veya C3 ve C4 kompleman yetersizliği ile tanımlandı. Çalışmada yer alan bireylerin demografik ve temel özellikleri Tablo 4.1'de özetlendi.

Tablo 4.1: Deneklerin demografik ve temel özellikleri.

Özellikler	Sağlıklı kontroller (N=8)				SLE hastaları (N= 16)			
					Renal tutulumu olanlar (N=9)		Renal tutulumu olmayanlar (N=7)	
Cinsiyet (E:K)	0:8				2:7		0:7	
Yaş aralığı (ortalama yıl ± SD)	27-54 (38.1±10.5)				21-60 (39.5±12.0)			
Sigara ya da alkol tüketimi (N=24)	Hiçbiri	Sadece Sigara	Sadece Alkol	Her ikisi	Hiçbiri	Sadece Sigara	Sadece Alkol	Her ikisi
	1	0	3	4	13	2	1	0
Hastalığın kaç yıl önce teşhis edildiği	-----				11.0±6.7			
Serum kreatinin (mg/dL) * (N=16)	-----				0.73±0.39		0.58±0.11	
C3 (g/L) ** (N=16)	-----				0.79±0.25		1.2±0.56	
C4 (g/L) *** (N=16)	-----				0.14±0.06		0.17±0.12	
Serum ANA **** (P:N) (N=16)	-----				5:4		5:2	
Anti DNA ***** (Unit/mL) (N=16)	-----				4:5		3:4	

*: Serumdaki kreatinin referans aralığı 0.7-1.4 mg/dL 'dir. **: Serumdaki C3 düzeyinin referans aralığı 0.89-1.87 g/L. ***: Serumdaki C4 düzeyinin referans aralığı 0.16-1.38 g/L. ****: ANA'nın (IF) < 1/180 titre değerleri negatiftir. *****: Anti DNA'nın <100 değerleri negatiftir.

4.2. MOLEKÜLER ANALİZLER

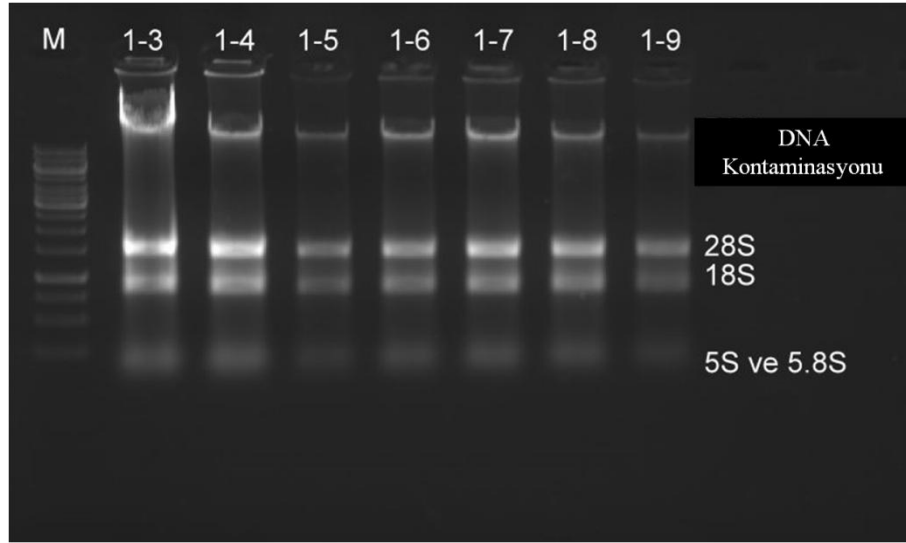
SLE hastalarında miRNA'lar ve sitokinlerin gen anlatımını araştırmak için mikrodizilim temelli yöntemler kullanıldı.

4.2.1. Nükleik Asit İzolasyonu

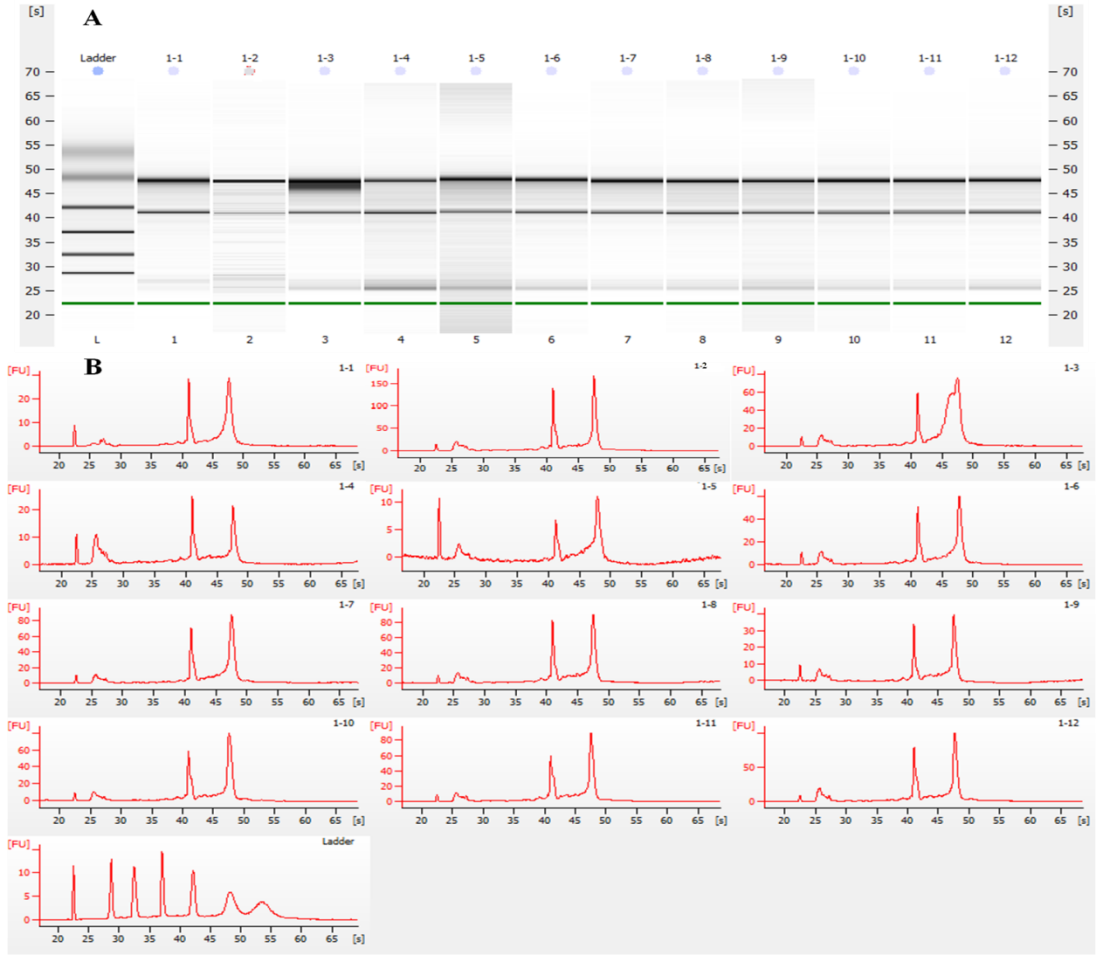
4.2.1.1. Total RNA Miktarı ve Saflığının Belirlenmesi

Deneklerden kan alındıktan sonra 2 saat içerisinde total RNA izolasyonu gerçekleştirildi. NanoDrop ölçümleri sonucunda izole edilen RNA örneklerine ait A_{260}/A_{280} oranlarının 1.94 – 2.1 aralığında ve RNA miktarlarının 118.6 – 1414.8 ng/ μ L aralığında değiştiği belirlendi. Total RNA'lar izole edildikten sonra %1.2'lik formaldehitli agaroz jelde kontrol edildi. İzolasyonun başarılı bir şekilde gerçekleştirildiği, jelde gözlenen 28S ve 18S rRNA'lara ait keskin ve parlak bantlardan

anlaşıldı (Şekil 4.1). Bir sonraki aşamada DNA kontaminasyonunu ortadan kaldırmak için DNaz I uygulaması yapıldı. Ayrıca RNA'ların konsantrasyonu ve kalitesi özel bir kuruluşun "Sem Laboratuvar Cihazları Pazarlama Sanayi ve Ticaret A.Ş." laboratuvarında RNA 6000 Nano Kiti kullanarak "2100 Biyoanalizör" (Agilent Technology) cihazı ile belirlendi. Bu analizlere göre elde edilen RNA'ların bütünlük sayısı (RIN) 8.5-9.8 aralığında hesaplandı (Şekil 4.2).



Şekil 4.1: Deney grubundan izole edilen RNA'ların DNaz I uygulaması yapılmadan önce agaroz jel görüntüsü. M: Markır. 1-3 ila 1-9: SLE hastalarına ait RNA örneklerinin kod numaraları.



Şekil 4.2: Deney grubundan izole edilen RNA'ların "Biyanalizör 2100" analiz sonuçları. (A) jel görüntüsü. 1-1 ila 1-12: SLE hastalarına ait RNA örneklerinin kod numaraları. (B) Elektroforegram görüntüsü. 20-25 arasındaki bant markır'a, 40-45 arasındaki bant 18S ribosomal RNA'ya ve 45-50 arasındaki bant 28S ribosomal RNA'ya aittir.

4.2.1.2. miRNA Miktarının Belirlenmesi

Deneklerin kan serumlarından izole edilen miRNA'ların konsantrasyonları NanoDrop cihazı ile ölçüldü. Küçük RNA'ların konsantrasyonunun 2.9-14.9 ng/μL aralığında değiştiği belirlendi. miRNA'ların konsantrasyonu "Small RNA Kit"i kullanılarak "2100 Biyanalizör" (Agilent Technology) cihazı ile de belirlenmeye çalışıldı. Ancak boyutlarının küçük olması nedeniyle miRNA'lar için RIN değeri ölçülemedi.

4.2.2. miRNA Mikrodizilim Veri Analizi

miRNA ve mRNA mikrodizilim veri analizinin kalite kontrolü ve kalite güvence analizi için, analiz yöntemleri 3 kere tekrarlandı. Benjamini ve Hochberg düzeltme analiz

yöntemi ile P değeri ve hata keşif oranı (“**F**alse **D**iscovery **R**ate”, **FDR**) 0.05’in altına ayarlandı.

İlimli t-testi normal t-testine göre daha düşük FDR ve daha yüksek ayırım gücüne sahip olduğu için, diferensiyel ekspresyon analizinde ilimli t-testi tercih edildi. P -değeri 0.05'ten küçük olan ve transkripsiyonu 2 kat artan/azalan miRNA ve mRNA değerleri anlamlı değişen (“*up-regulated/down-regulated*”) değerleri olarak kabul edildi. Bulgular çok çeşitli parametrelere göre gruplanarak analiz edildi.

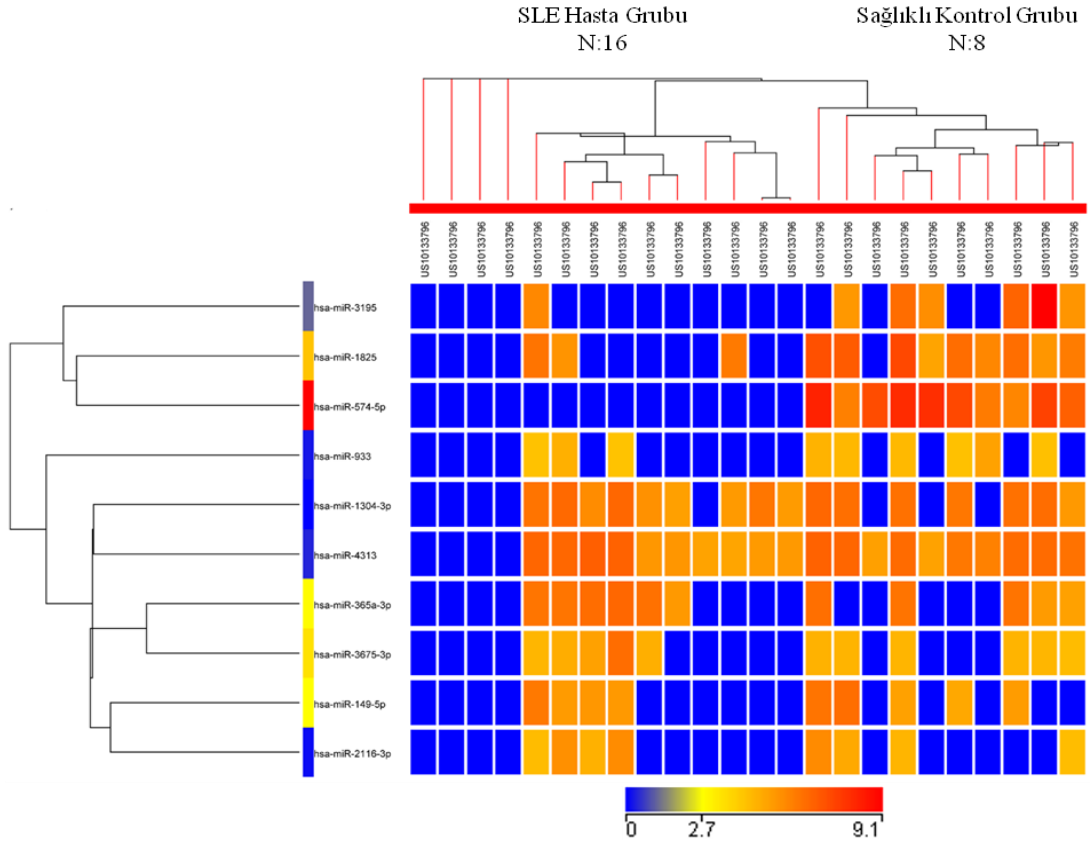
4.2.2.1. SLE'ye özgü miRNA'ların mikrodizilim analizi ile tanımlanması

miRNA mikrodizilim analizinde SLE hasta grubu ve kontrol grubunun karşılaştırması, 10 farklı miRNA üzerinden gerçekleştirildi. SLE hastalarında miRNA'ların sentezinde anlamlı artış olduğu ve aktif dizilerin otozomlarda bulunduğu ortaya konuldu (Tablo 4.2). Ayrıca en fazla değişimin hsa-miR-574-5p'de olduğu, 4.kromozomda bulunan bu miRNA'nın transkripsiyonunda kontrole göre 16 kat artış olduğu belirlendi. Sentezi artan 10 miRNA'nın ısı haritası Şekil 4.3'te diyagram olarak gösterildi. SLE hastalarının sağlıklı bireyler ile olan ilişkisi küme analizi ile ortaya konuldu.

Tablo 4.2: SLE'de transkripsiyonu artan miRNA'lar*. KD: Kat Değişim.

Sistemik Ad	KD**	P değeri **	Aktif Dizi	Kromozom No	Mirbase Ulaşım No
hsa-miR-149-5p	8.62	0.0257	GGGAGTGAAGACACGGAG	2	MIMAT0000450
hsa-miR-1825	11.17	0.0406	GGAGAGGAGGGCAC	20	MIMAT0006765
hsa-miR-3675-3p	9.90	0.0033	TTGGGGGAGTTCCTTA	1	MIMAT0018099
hsa-miR-4313	5.91	0.0019	GGGTTTGGGGCCA	15	MIMAT0016865
hsa-miR-574-5p	16	0.0062	ACACACTCACACACACAC	4	MIMAT0004795
hsa-miR-933	5.75	0.0113	GGGAGAGGTCTCCCT	2	MIMAT0004976
hsa-miR-1304-3p	3.68	0.0472	GGGGTTCGAGGCT	11	MIMAT0022720
hsa-miR-2116-3p	5.59	0.0376	GGGAGTTCTTGGCATG	15	MIMAT0011161
hsa-miR-3195	6.75	0.0364	AACCCGGGCCCG	20	MIMAT0015079
hsa-miR-365a-3p	8.75	0.021	ATAAGGATTTTAGGGGCA TTA	16	MIMAT0000710

*: SLE hasta grubu ile sağlıklı kontrol grubuna ait mikrodizilim sonuçları karşılaştırılarak belirlenmiştir. **: KD >2 ve P değeri ≤ 0.05 önemli fark olduğunu gösterir.



Şekil 4.3: SLE hasta grubu ile sağlıklı kontrol grubunun karşılaştırılmasına göre farklı transkripte edilen miRNA'ların ısı haritası diyagramı. Veri, miRNA'ların isimlerine göre düzenlenmiştir. Renkli skala sütunu, miRNA'nın transkripsiyon düzeyini belirtmektedir (mavi düşük, kırmızı yüksek transkripsiyon).

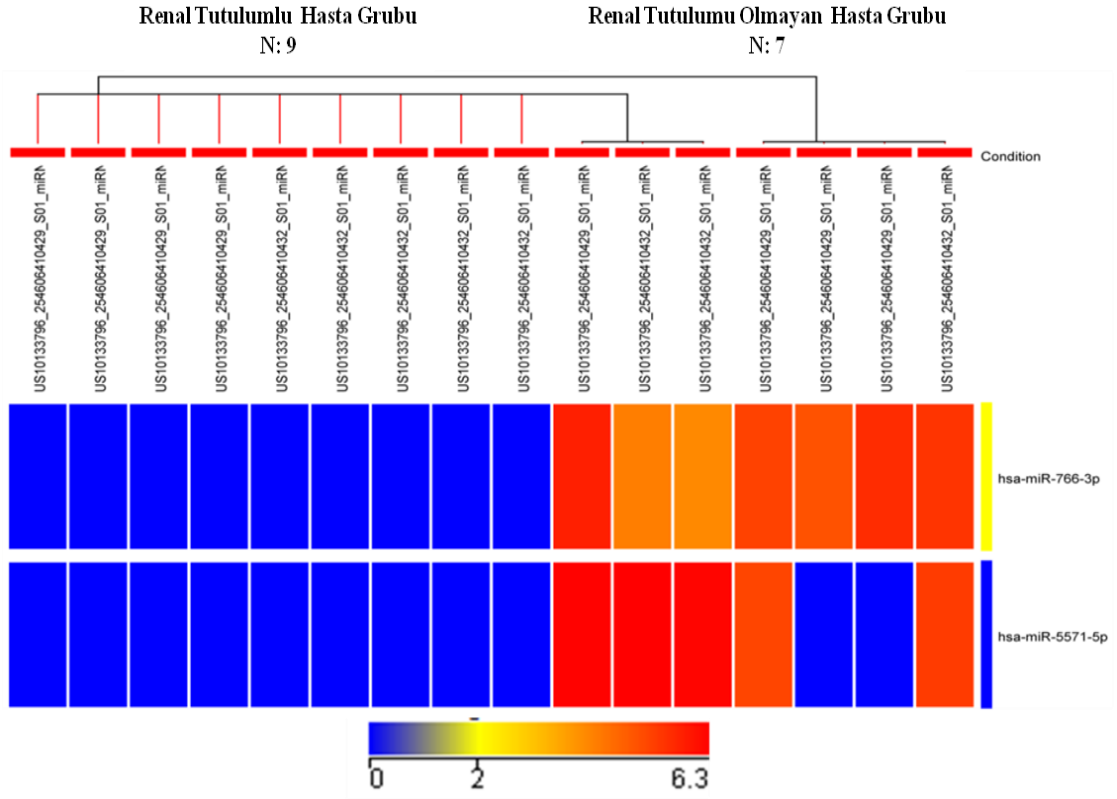
4.2.2.2. Renal tutulumu olan ve olmayan SLE hastalarının miRNA düzeylerinin karşılaştırılması

SLE hastaları renal tutulumu göre gruplandırıldı. Biri 22. kromozomda (hsa-miR-5571-5p) diğeri de X kromozomunda şifrelenen iki miRNA'nın sentezi, renal tutulumu olan hastalarda önemli ölçüde düşüktü ($p \leq .05$) (Tablo 4.3). Bu 2 miRNA'nın ısı haritası Şekil 4.4'de diyagram olarak gösterildi.

Tablo 4.3: Renal tutulumu olan SLE hastalarında transkripsiyonu azalan miRNA'lar*. KD: Kat Değişim.

Sistemik Ad	KD**	P değeri**	Aktif Dizi	Kromozom No	Mirbase Ulaşım No
hsa-miR-5571-5p	29.61	0.0205	GGGAGGCTCCTTTGA	22	MIMAT0022257
hsa-miR-766-3p	20.76	0.0369	GCTGAGGCTGTGGGGCT	X	MIMAT0003888

*: Renal tutulumu olan ve olmayan gruplarına ait mikrodizilim sonuçları karşılaştırılarak belirlenmiştir. **: KD >2 ve P değeri ≤ 0.05 önemli fark olduğunu gösterir.



Şekil 4.4: SLE hastaların renal tutulumu olan ve olmayanları karşılaştırıldığında, düzenlenmesi artan yada azalan şekilde olan miRNA'ların "heat map" diyagramı. Veri, miRNA'ların isimlerine göre düzenlenmiştir. Renkli lejant sütünü, miRNA'nın transkripsiyon düzeyini belirtmektedir (mavi düşük, kırmızı yüksek transkripsiyon).

4.2.2.3. Kompleman yetersizliği ve renal tutulumu göre SLE hastalarının miRNA düzeylerinin karşılaştırılması

Diferansiyel analizde renal tutulum ve kompleman (C3 ve / ya C4) eksikliklerinin eşzamanlılığı dikkate alınarak, veriler iki yönlü ANOVA testi ile analiz edildi. Bu yaklaşımla renal tutulumu olan/olmayanların, C3 ya da C4 kompleman eksikliği birlikte değerlendirilerek, değişen miRNA genlerinin transkripsiyonundaki farklılıklar ortaya konuldu.

Analizler renal tutumlu olan ve olmayan SLE hastalarında C3 konsantrasyonun yeterli olup (C3⁺) olmamasına (C3⁻) göre transkripsiyonu değişen miRNA'lar için yapıldı. Transkripsiyonu farklı olan toplam 2 farklı miRNA belirlendi. C3 eksikliği durumlarda renal tutumlu olmayan SLE hastalarında hsa-miR-5571-5p'nin transkripsiyonunda 6.32 kat düşüş ($p \leq 0.05$) ve renal tutulumu olan SLE hastalarında ise, hsa-miR-766-3p'nin

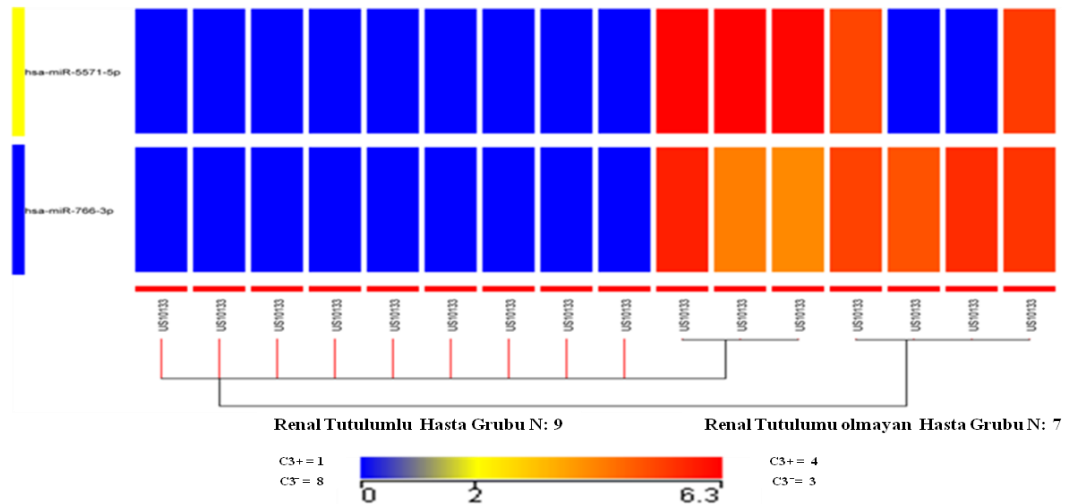
transkripsiyonunda 2.17 kat ($p \leq 0.05$) düşüş olduğu belirlendi (Tablo 4.4). Bu 2 miRNA'nın ısı haritası Şekil 4.5'de diyagram olarak gösterildi.

Analizler renal tutumlu olan ve olmayan SLE hastalarında C4 konsantrasyonunun yeterli olup ($C4^+$) olmamasına ($C4^-$) göre yapıldığında transkripsiyonu değişen 3 miRNA tespit edildi. C4 eksikliği durumlarda renal tutumlu olmayan SLE hastaları arasında, C4 konsantrasyonunun yeterli olmayanlar ile, C4 konsantrasyonunun yeterli olan bireyler karşılaştırıldığında 2 miRNA'nın (has-miR-5571-5p ve has-miR-4731-3p) transkripsiyonunda düşüş gösterildi. Renal tutulumu olan hastalarda C4 eksikliğinde has-miR-766-3p'nin transkripsiyonunda 2.63 kat ($p \leq 0.05$) düşüş olduğu belirlendi (Tablo 4.5). Aynı zamanda farklı transkriptte edilen 3 miRNA'nın ısı haritası Şekil 4.6'de diyagram olarak gösterildi.

Tablo 4.4: Renal tutulumu olan/olmayan SLE hastalarının C3 kompleman yetersizliği varken/yokken miRNA düzeylerinin karşılaştırılması. KD: Kat Değişim.

Sistemik Ad	KD***	P değeri ***	Aktif Dizi	Kromozom No	Mirbase Ulaşım No
hsa-miR-5571-5p*	6.32	0.0079	GGGAGGCTCCTTTGA	22	MIMAT0022257
hsa-miR-766-3p**	2.17	0.0189	GCTGAGGCTGTGGG GCT	X	MIMAT0003888

*: Sadece renal tutulumu olmayan ve C3 eksikliği olan hastalarda gözlemlendi. **: Sadece renal tutulumu olan ve C3 eksikliği olan hastalarda gözlemlendi. ***: KD >2 ve P değeri ≤ 0.05 önemli fark olduğunu gösterir.

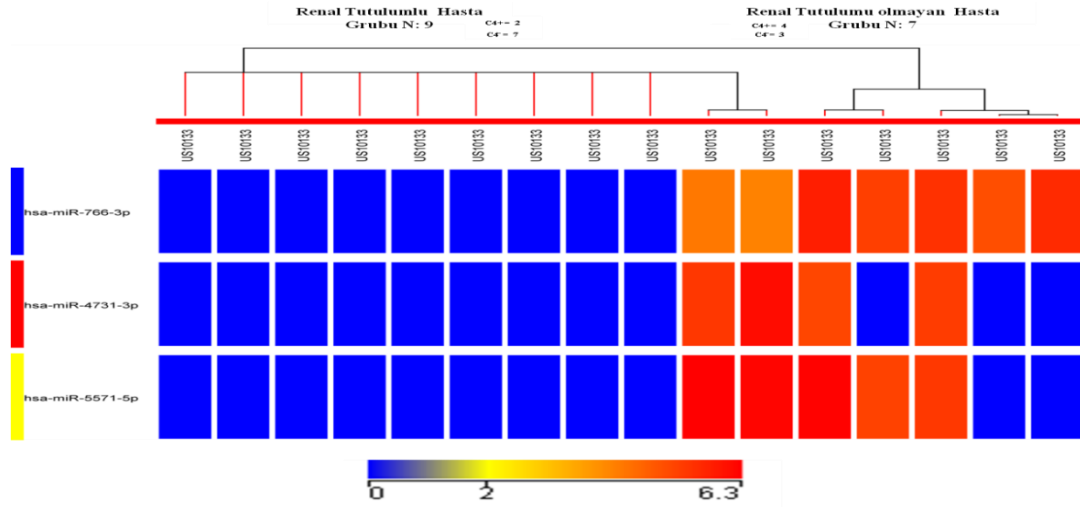


Şekil 4.5: Renal tutulumu olan/olmayan SLE hastalarının C3 kompleman yetersizliği varken/yokken miRNA düzeylerinin ısı haritası diyagramı. Veri, miRNA'ların isimlerine göre düzenlenmiştir. Renkli lejant sütünü, miRNA'nın transkripsiyon düzeyini belirtmektedir (mavi düşük, kırmızı yüksek transkripsiyon).

Tablo 4.5: Renal tutulumu olan/olmayan SLE hastalarının C4 kompleman yetersizliği varken/yokken miRNA düzeylerinin karşılaştırılması. KD: Kat Değişim.

Sistemik Ad	KD***	P değeri ***	Aktif Dizi	Kromozom No	Mirbase Ulaşım No
hsa-miR-5571-5p*	4.56	0.0039	GGGAGGCTCCTTTGA	22	MIMAT0022257
hsa-miR-4731-3p*	9.15	0.028	AGTGTTGGGGGCCA	17	MIMAT0019854
hsa-miR-766-3p**	2.63	0.0125	GCTGAGGCTGTGGG GCT	X	MIMAT0003888

*: Sadece renal tutulumu olmayan ve C4 eksikliği olan hastalarda gözlemlendi. **: Sadece renal tutulumu olan ve C4 eksikliği olan hastalarda gözlemlendi. ***: KD >2 ve P değeri ≤ 0.05 önemli fark olduğunu gösterir.



Şekil 4.6: Renal tutulumu olan/olmayan SLE hastalarının C4 kompleman yetersizliği varken/yokken miRNA düzeylerinin ısı haritası diyagramı. Veri, miRNA'ların isimlerine göre düzenlenmiştir. Renkli lejant sütünü, miRNA'nın transkripsiyon düzeyini belirtmektedir (mavi düşük, kırmızı yüksek transkripsiyon).

4.2.2.4. Anti Nükleer Antikorlar (ANA) varlığı veya yokluğuna göre miRNA düzeylerinin karşılaştırılması

Diferansiyel analizde renal tutulum ve pozitif ANA olgusu eşzamanlılığı dikkate alınarak, veriler iki yönlü ANOVA testi ile analiz edildi. Renal tutumlu SLE hastalarında pozitif ANA grubu ile negatif ANA grubu karşılaştırıldığında, miRNA transkripsiyon düzeyinde anlamlı bir farklılık saptanmadı. Renal tutumlu olmayan hastalarda pozitif ANA grubu ile negatif ANA grubu karşılaştırıldığında ise, 2 miRNA'nın transkripsiyon düzeyinin azaldığı tespit edildi (Tablo 4.6).

Tablo 4.6: Renal tutulumu olan/olmayan SLE hastalarının ANA varken/ yokken miRNA düzeylerinin karşılaştırılması. KD: Kat Değişim.

Sistemik Ad	KD**	P değeri**	Aktif Dizi	Kromozom No	Mirbase Ulaşım No
hsa-miR-5697*	32.87	0.00	CCTTTATCATGAACTACT TG	1	MIMAT0022490
hsa-miR-621*	26.38	0.00	AGGTAAGCGCTGTTGC	13	MIMAT0003290

*: Sadece renal tutulumu olmayan ve ANA test sonucu pozitif olan hastalarda gözlemlendi.
**: KD >2 ve P değeri ≤ 0.05 önemli fark olduğunu gösterir.

4.2.2.5. Anti-DNA varlığı veya yokluğuna göre miRNA düzeylerinin karşılaştırılması

SLE hastaları, sadece anti-DNA test sonuçları veya renal tutulum faktörü ile birlikte irdelendiği zaman, transkripsiyon düzeyi belirgin şekilde değişen miRNA varlığına rastlanmadı.

4.2.3. miRNA'ların Hedef Tahmini

Anlatım düzeyleri farklılık gösteren miRNA'ların hücrede hedefledikleri mRNA'lar microRNAorg, TargetScan ve PITA programları kullanılarak belirlendi. Tahmin yazılımlarının genellikle yüksek yanlış pozitif sonuç verdikleri göz önüne alınarak, sadece her üç bağımsız tahmin yazılım tarafından onaylanan hedef genler çalışma kapsamına alındı.

Gerçekleştirilen doktora tez çalışmasında SLE hastalarında miRNA'ların hedef genleri olarak sitokinler ve ilişkili genler ile ilgili yollar araştırıldı.

Ayrıca bu hastalarda steroid metabolizmasındaki değişikliklerin de hastalığın patojenezinde önemli olduğu bilindiği için, steroidlerin metabolizması ile ilgili yollar da incelenip hedef genler analize dahil edildi.

4.2.3.1. SLE hastalarında sağlıklı kontrollere göre farklı düzeyde transkripsiyonu yapılan miRNA'ların potansiyel hedef genlerinin tahmini

Yukarıdaki yazılımların tahminine dayanarak, tespit edilmiş 10 miRNA arasından sadece 2 tanesi (hsa-miR 149-5P ve hsa-miR-1825) için, sırasıyla toplam 142 ve 39 hedef gen belirlenmekle beraber diğerleri için, hiçbir potansiyel hedef tespit edilemedi.

Transkripsiyonu değişen miRNA'ların sitokinlerle ilişkili yollarda oynayabilecekleri rolü araştırmak amacıyla bu miRNA'lar için belirlenen hedef genler “*Wikipathway*” yazılımı ile incelendi. Tablo 4.7, bu miRNA'ları ile hedef genlerini ve onları içeren ilgili yolları göstermektedir. *P* değeri ≤ 0.05 olarak ayarlanmıştır.

Tablo 4.7: Sağlıklı kontrollerle karşılaştırıldığında, SLE hastalarında farklı şekilde transkripsiyonu yapılan miRNA'lar için potansiyel hedef genler.

Sistematik Ad	<i>P</i> değeri	Potansiyel Hedef Genler	Yolak
hsa-miR-149-5p	0.00000004	<i>ERBB3, AKT3, BIM</i>	ErbB Sinyalleşme Yolağı
	0.00000004	<i>REPS2, FOXO4, SP1</i>	EGF-EGFR Sinyalleşme Yolağı
	0.00355071	<i>IL-13</i>	Sitokin ve Yangıya Yanıt Yolağı
	0.00355071	<i>SP1</i>	JAK-STAT, IL-17- Sinyalleşme Yolağı
	0.00355071	<i>TAB3</i>	IL-1 Sinyalleşme Yolağı, TNF-alfa Sinyalleşme Yolağı
	0.00355071	<i>AKT3</i>	Toll-benzeri-Reseptör Sinyalleşme Yolağı
	0.00355071	<i>Torc2</i>	AMPK Sinyalleşme Yolağı
	0.00355071	<i>NFATC3</i>	B-Hücre- Reseptör - Sinyalleşme Yolağı
	0.00355071	<i>BBC3</i>	TP53-Ağı
	0.0000125	<i>MYST2</i>	Androjen- Reseptör - Sinyalleşme Yolağı
	0.00355071	<i>SP1</i>	Östrojen- Sinyalleşme Yolağı
hsa-miR-1825	0.0009719	<i>MITF</i>	Kit- Reseptör - Sinyalleşme Yolağı, RANKL-RANK- Sinyalleşme Yolağı
	0.0009719	<i>CELSRI, GPR51</i>	G Protein- Reseptör-aracılı Sinyalleşme Yolağı (GPCRs)

P değeri $\leq .05$ farkın önemli olduğunu gösterir.

4.2.3.2. SLE hastalarında renal tutulumu, kompleman yetersizliği ve ANA durumuna göre farklı düzeyde transkripsiyonu yapılan miRNA'ların tahmini potansiyel hedef genleri

Bu grup hastalar için çalışmamızda tespit edilen 5 miRNA'dan sadece 2'si için hedef genler bulundu. hsa-miR-766-3p ve hsa-miR-621 için toplamda sırasıyla 135 ve 33

hedef gen belirlendi. Tablo 4.8 bu miRNA'lar ile hedef genlerini ve onları içeren ilgili yolları göstermektedir. P değeri ≤ 0.05 olarak ayarlanmıştır.

Tablo 4.8: SLE hastalarında böbrek tutulumu, kompleman yetersizliği ve ANA durumuna göre farklı düzeyde transkripsiyonu yapılan miRNA'ların potansiyel hedef genleri.

Sistemik Ad	P değeri	Potansiyel Hedef Genler	Yolak
hsa-miR-766-3p	0.00001/ 0.0033	<i>PIK3R1</i>	B-Hücre- Reseptör - Sinyalleşme Yolağı ¹ , IL-4- Sinyalleşme Yolağı ¹ , İnterferon-tip-I ¹ , IL-11- Sinyalleşme Yolağı ² , IL-9- Sinyalleşme Yolağı ² , Regulation of Toll-benzeri-Reseptör- Sinyalleşme Yolağı, IL-3- Sinyalleşme Yolağı ² , IL-2- Sinyalleşme Yolağı ² , IL-7- Sinyalleşme Yolağı ² , TCR- Sinyalleşme Yolağı ² , IL-1- Sinyalleşme Yolağı ² , Kit- Reseptör- Sinyalleşme Yolağı ² , IL-6- Sinyalleşme Yolağı ² , IL-5- Sinyalleşme Yolağı ² .
	0.00001	<i>ETS1</i>	B-Hücre- Reseptör - Sinyalleşme Yolağı
	0.00001/ 0.0033	<i>IRS2</i>	IL-4- Sinyalleşme Yolağı ¹ , İnterferon-tip-I ¹ , EPO-Reseptör- Sinyalleşme Yolağı ² ,
	0.0033	<i>TFE3</i>	TGF-Beta- Sinyalleşme Yolağı
	0.0033	<i>NSMAF</i>	TNF-alfa- Sinyalleşme Yolağı
	0.0033	<i>ENDRA</i>	G Protein- Reseptör-aracılı Sinyalleşme Yolağı (GPCRs) ²
hsa-miR-621	0.0033	<i>PIK3R1</i>	Androjen-Reseptör- Sinyalleşme Yolağı
	0.0008	<i>MAF</i>	NRF2 aracılı Transkripsiyon Aktivatörü
	0.0008	<i>CAB39</i>	Endochondral-Kemikleşme Yolağı
	0.0008	<i>MO25</i>	AMPK- Sinyalleşme Yolağı
	0.0008	<i>ETV5</i>	Androjen-Reseptör- Sinyalleşme Yolağı

P değeri ≤ 0.05 farkı önemli olduğunu gösterir. 1: P değeri = 0.00001. 2: P değeri = 0.0033.

Bu bulgular tek bir miRNA'nın çok sayıda potansiyel hedef geni etkileyebileceği ve aynı genin birden fazla miRNA tarafından da hedef olabileceğini bir kez daha doğrulamaktadır.

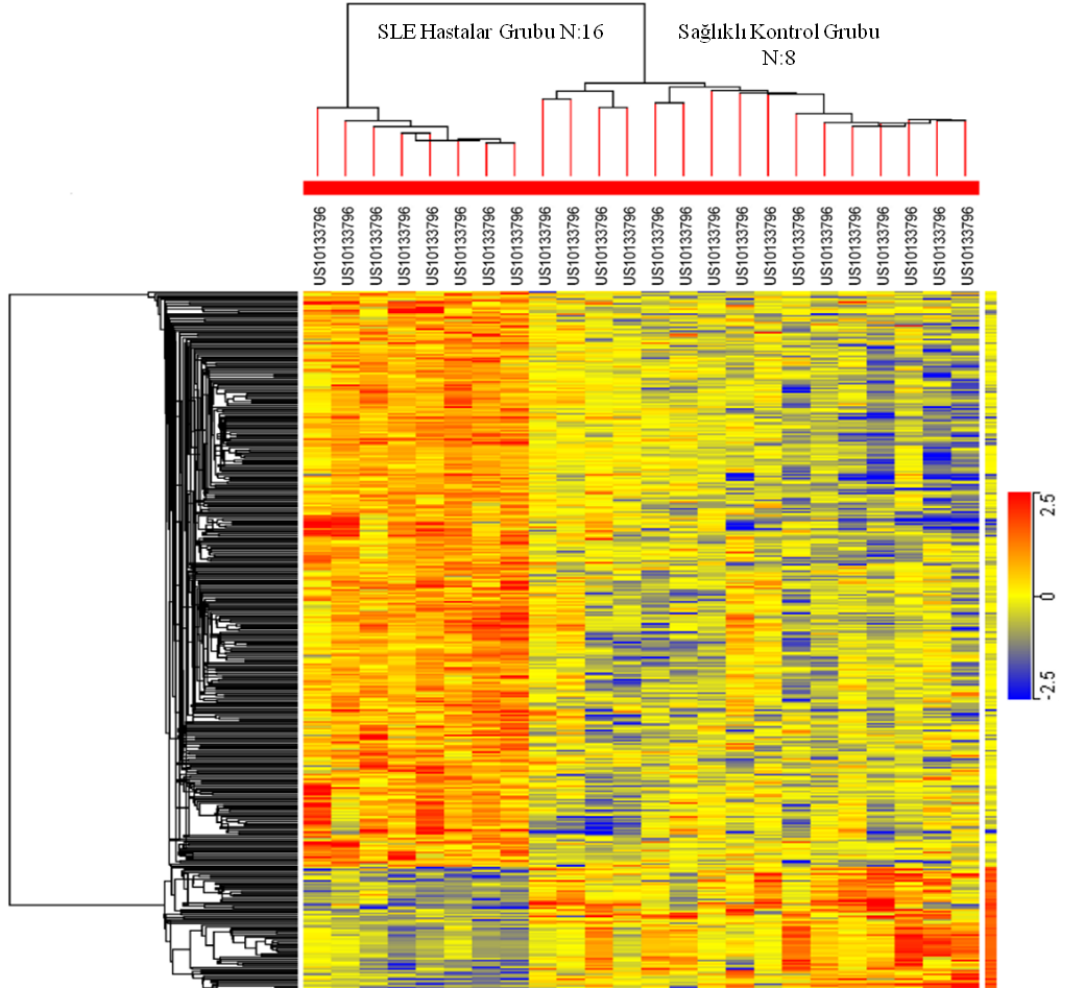
4.2.4. mRNA Mikrodizilim Veri Analizi

Çalışmanın bu bölümünde, SLE hastaları ile sağlıklı kontrollerin arasında “PBMC” hücrelerindeki gen ekspresyonu açısından genel bir fark olup olmadığı araştırıldı.

4.2.4.1. SLE'ye özgü mRNA'ların gen anlatımı analizi

mRNA'ların gen anlatım analizi için de ılımlı t-Testi kullanıldı. Zayıf noktalar (eksik sinyal değerleri olan spotlar) uzaklaştırıldıktan sonra hiyerarşik kümelemenin gerçekleştirilmesi için, değişiklik katları 2'den daha fazla ya da -2'den daha az olarak tespit edilmiş olanlardan, toplam 415 gen analize alındı. Bu 415 farklı gen anlatımını görüntülemek için iki gruptan oluşan 24 örneğin hiyerarşik kümeleneşi gerçekleştirildi (Şekil 4.7). Bu veriler, SLE hastalarıyla sağlıklı kontrollerin “PBMC” örneklerinde farklı gen anlatımı profillerinin varlığını göstermektedir.

SLE hastalarında sağlıklı kontrollere göre 415 genden, 75'inin transkripsiyonunun arttığı, geri kalan 340'ının transkripsiyonunun azaldığı belirlendi. Farklı anlatım yapan bu mRNA'lara “*wikipathway*” analizi yapıldı ve sitokinler ile ilişkili genlerin yer aldığı yollar Tablo 4.9'da gösterildi ($P \leq 0.05$).



Şekil 4.7: SLE hastalarıyla sağlıklı kontrollerin “PBMC” örneklerinde farklı anlatım yapan genler. Genler hastalar ve sağlıklı kontroller arasında melezleme yoğunluk oranı ile gösterilmiştir. Mavi renk transkripsiyonu düşen genleri, kırmızı renk transkripsiyonu artan genleri göstermektedir.

Tablo 4.9: SLE hastalarında farklı şekilde anlatım yapan sitokinlerle ilişkili mRNA'lar ve yer aldıkları yollar ("Wikipathway" analiz sonuçlarına göre). KD: Kat Değişim.

Gen Adı	KD	P değeri	Yolak	Yolak P değeri
<i>INFG</i>	+2.30	0.038	Sitokin ve Yangıya Yanıt Yolağı ¹ , Yangıya Yanıt Yolağı ² , Tip-II-İnterferon-Sinyalleşme Yolağı ³ , TGF-Beta-Sinyalleşme Yolağı ⁴	0.046 ¹ ,0.050 ² , 0.073 ³ ,0.105 ⁴
<i>p21</i>	+2.73	0.0000433	AMPK- Sinyalleşme Yolağı ⁵ , ErbB-Sinyalleşme Yolağı ⁶	0.046 ⁵ , 0.105 ⁶
<i>CXCL11</i>	+3.42	0.0402	Toll-benzeri-Reseptör Sinyalleşme Yolağı	0.180
<i>NRG4</i>	-2.09	0.0490	ErbB Sinyalleşme Yolağı	0.2173
<i>SPRY2</i>	+2.28	0.0000743	EGF-EGFR- Sinyalleşme Yolağı	0.285
<i>OPRM1</i>	-3.48	0.0204	TCR- Sinyalleşme Yolağı	0.335
<i>TLR9</i>	-2.05	0.0309	Toll-benzeri-Reseptör Sinyalleşme Yolağı	0.356
<i>CDKN1A</i>	+2.73	0.0000433	Androjen-Reseptör- Sinyalleşme Yolağı	0.165

P değeri $\leq .05$ farkın önemli olduğunu gösterir. (-) Transkripsiyonu azalmış genleri, (+) Transkripsiyonu artan genleri göstermektedir.

4.2.4.2. SLE hastalarında renal tutulumu göre mRNA transkripsiyon analizi

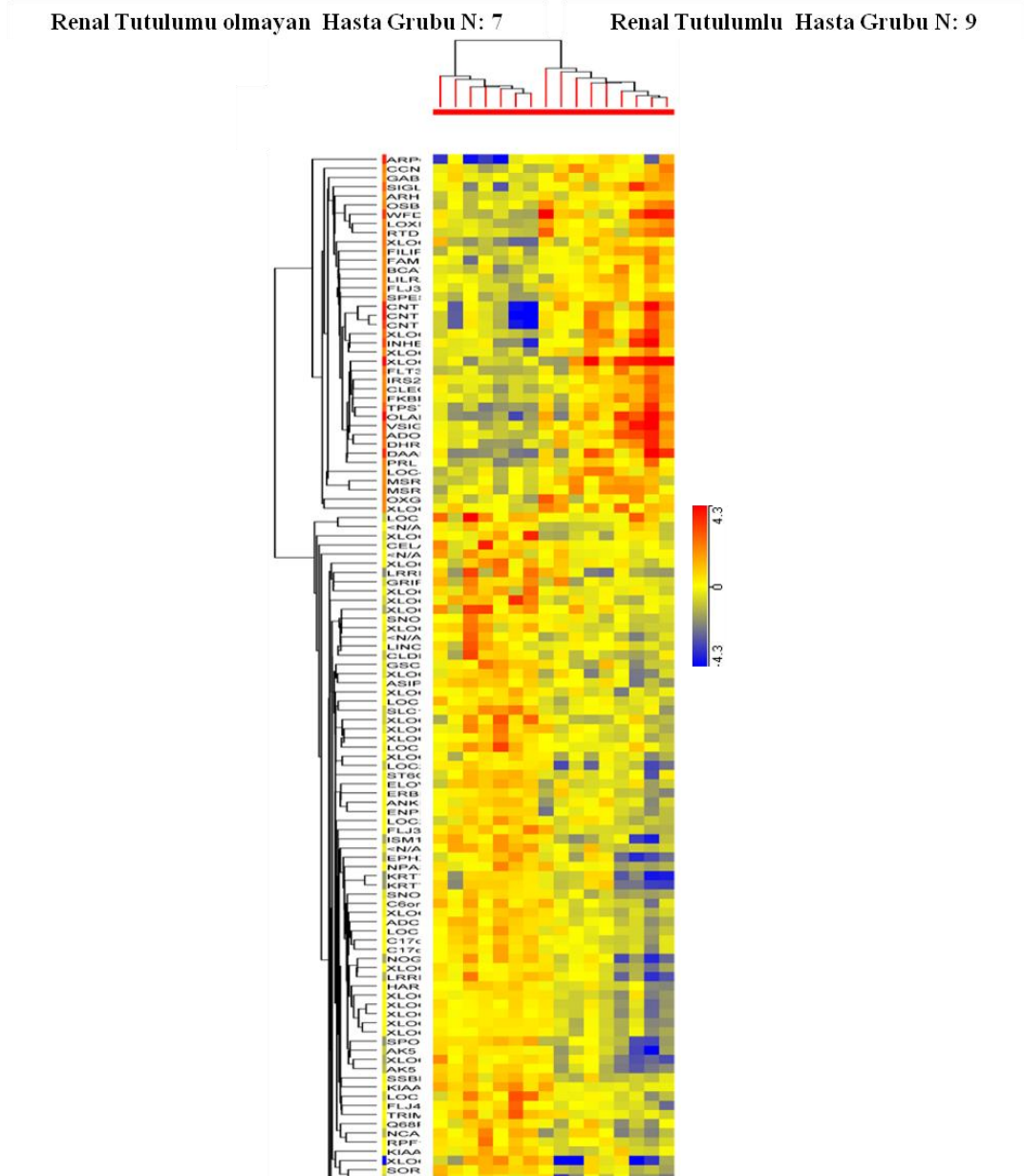
miRNA'lar için de belirtildiği gibi, burada yine SLE hastaları böbrek tutulumuna göre iki alt gruba ayrıldı. 119 mRNA'nın renal tutulumu olan hastaların "PBMC" hücrelerinde farklı düzeyde sentezlendiği saptandı. Bu 119 mRNA'dan, 39'unun transkripsiyonu kontrole göre yüksek iken, geri kalan 80'inin transkripsiyonu düştü. Şekil 4.8 iki gruptan oluşan 16 örneğin hiyerarşik kümelemesini göstermektedir. Sitokinler ile ilişkili genlerde değişiklik olup olmadığını araştırmak amacıyla anlatımı farklı yapılan bu mRNA'ların her iki grubuna da ayrıca "wikipathway" analizi yapıldı. Anlatımı değişen mRNA'lar ile ilgili yolak analizinin sonuçları Tablo 4.10'de gösterildi.

Bu genlerin biyolojik fonksiyonlarını belirlemek amacıyla anlatımı değişen genlere Gen Ontolojisi ("Gen Ontology", GO) analizi yapıldı. Transkripsiyonu artan genlerin çoğunun purinerjik reseptör aktivitesine veya hücre yüzeyindeki reseptörlere bağlanma aktivitesine sahip oldukları saptandı.

Purinerjik reseptörlerin (örneği: ADORA3) çoğalma ve sitokin salgılaması gibi çeşitli hücre fonksiyonlarında rolleri bilinmektedir. Arginin dekarboksilaz aktivitesi veya alfa-

N-asetilgalaktozaminit-alfa-2,6-sialiltransferaz aktivitesi olan genlerin renal tutulumu olan hastalarda transkripsiyonu azalmış genler grubunda olduğu tespit edildi.

Transkripsiyonu azalmış genler arasında timusta gelişmemiş T-hücrelerinin çoğalmasının negatif düzenlenmesinde rolü olan *ERBB2* geninin yer aldığı belirlendi (Tablo 4.10).



Şekil 4.8: Renal tutulumuna bağlı olarak SLE hastalarının “PBMC” örneklerinde farklı anlatım yapan genler. Genler iki grup arasında melezleme yoğunluk oranı ile gösterilmiştir. Mavi renk transkripsiyonu düşen genleri, kırmızı renk transkripsiyonu artan genleri göstermektedir.

Tablo 4.10: Renal tutulumu olan SLE hastalarında farklı şekilde anlatım yapan sitokinlerle ilişkili miRNA'lar ve yer aldıkları yollar ("Wikipathway" analiz sonuçlarına göre). KD: Kat Değişim.

Gen Adı	KD	P değeri	Yolak	Yolak P değeri
<i>IRS2</i>	+2.47	0.00836	IL-4-Signaling-Pathway ¹ , Interferon-type-I-Signaling-Pathway ²	0.0526 ¹ , 0.0546 ²
<i>ADORA3</i>	+4.05	0.00363	GPCRs-Class-A-Rhodopsin-like	0.23
<i>NOG</i>	-3.85	0.0074	TGF-Beta-Signaling-Pathway	0.783
<i>ERBB2</i>	-2.15	0.0083	EGF-EGFR-Signaling-Pathway ³ , ErbB-Signaling-Pathway ⁴	0.21 ³ , 0.078 ⁴

P değeri $\leq .05$ farkın önemli olduğunu gösterir. (-) Transkripsiyonu azalmış genleri, (+) Transkripsiyonu artan genleri göstermektedir.

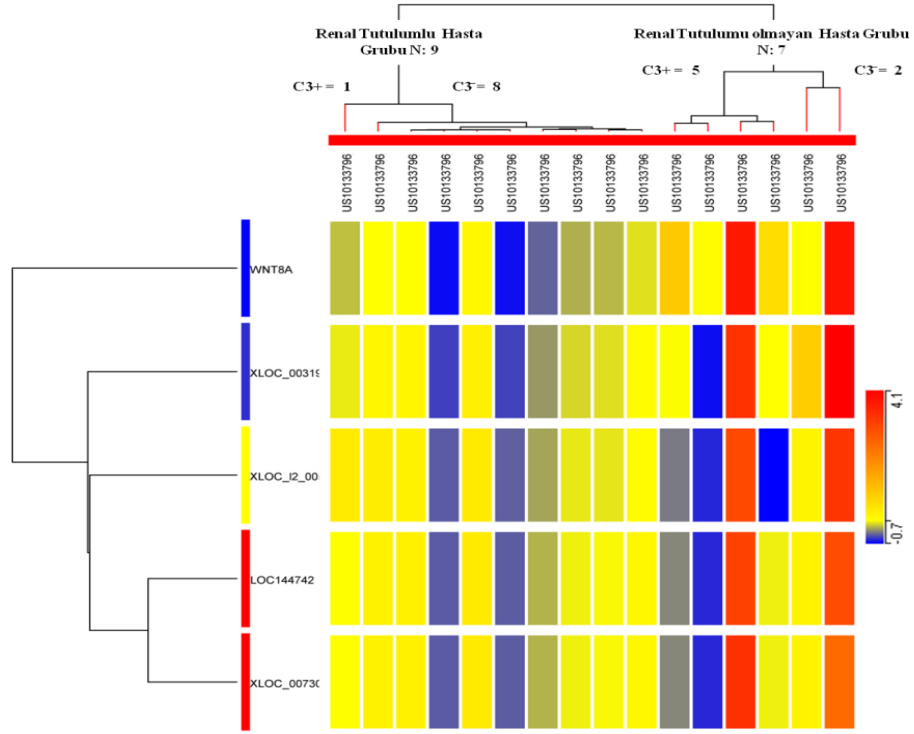
4.2.4.3. Kompleman yetersizliği ve renal tutulumu göre SLE hastalarının mRNA düzeylerinin karşılaştırılması

Bölüm 4.2.2.3'de de yapıldığı gibi, renal tutulumu olan/olmayan SLE hastalarında kompleman yetersizliğinin varlığına/yokluğuna göre sitokinler ile ilişkili genlerin mRNA düzeyleri incelendi ve bu yaklaşım için iki yönlü ANOVA testi uygulandı.

Diferansiyel gen analizlerine göre renal tutulumu olmayan ancak düşük C3 konsantrasyonu (C) olan SLE hastaları, C3 konsantrasyonu normal olanlarla karşılaştırıldığında, PBMC'lerinde anlatımı azalan 5 mRNA saptandı. Bu 5 mRNA'nın tümünün önemli ölçüde down-regüle edildiği saptanmıştır. Bu 5 mRNA'nın hiyerarşik kümelemesi Şekil 4.9'da gösterildi.

Sitokinler ile ilişkili genlerde değişiklik olup olmadığını araştırmak için sentezi artan bu mRNA'lara "wikipathway" analizi yapıldı, ancak bu alanda bir sonuç elde edilmedi.

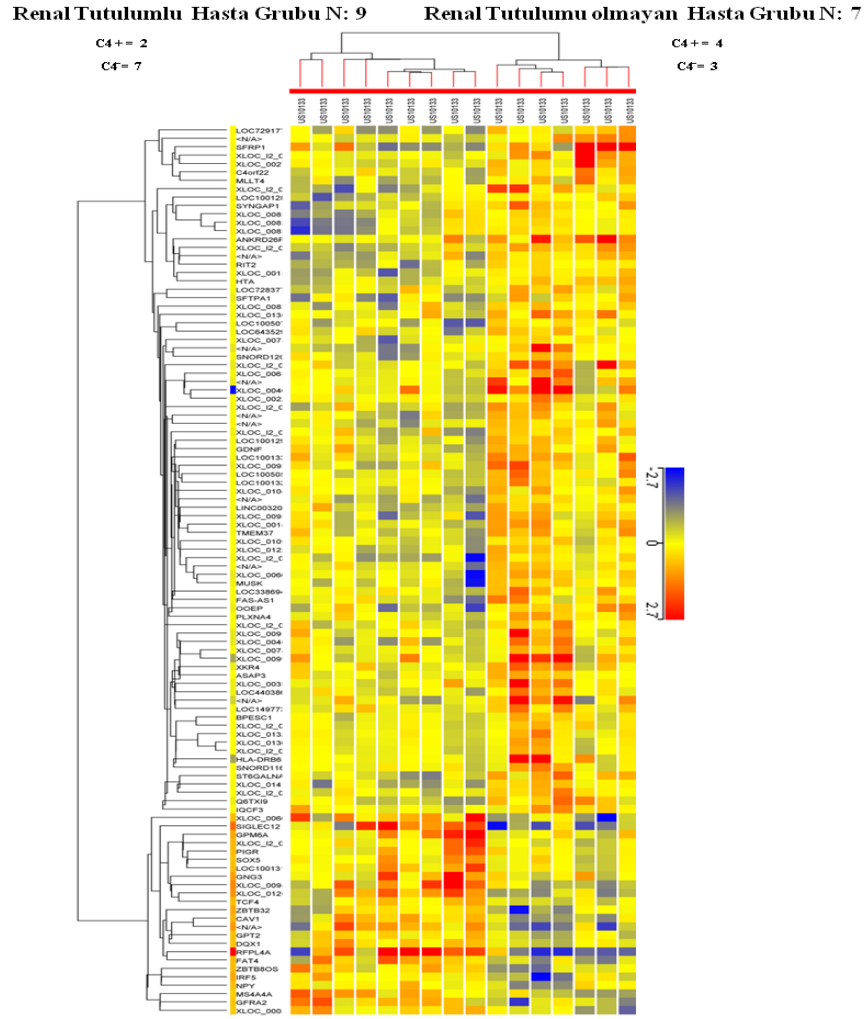
GO analizlerine göre, bu genlerin hepsinin Wnt reseptörü ve kalsiyum modülasyon sinyal yollarında rolleri oldukları bulundu.



Şekil 4.9: Renal tutulumu olan/olmayan SLE hastalarının C3 kompleman yetersizliği varken/yokken “PBMC” hücrelerinde farklı anlatım yapan genler. Genler iki grup arasında melezleme yoğunluk oranı ile gösterilmiştir. Mavi renk transkripsiyonu düşen genleri, kırmızı renk transkripsiyonu artan genleri göstermektedir.

Renal tutulum ile C4 kompleman yetersizliği eş zamanlı olarak dikkate alındığında, renal tutulumu olmayan hastalarda, C4 düzeyleri normal olanlara kıyasla C4 kompleman yetersizliği olan olgularda 22 mRNA’nın sentezinde düşüş ve 66 mRNA’nın sentezinde artış olduğu bulundu (Şekil 4.10).

“Wikipathway” analizi sonucunda sentezi azalanlar için iki sitokin ilişkili yolak tespit edildi (Tablo 4.11). Aynı zamanda, GO analizler, bu genlerin protein ürünlerinin, alanin-okso-asit transaminaz, gliyal hücreden türevlenen nörotropik faktör reseptörü, transkripsiyon korepresör ve nitrik oksit sentaza bağlanma aktiviteleri olduğunu göstermiştir. Sentezi artanlar için sitokin ilişkili herhangi bir yolak bulunamadı. GO analizine göre, bu genlerin bir kısmının sialil transferaz aktivitesine sahip olduğu veya ARF-GTPaz’ı aktive ettiği gösterildi.



Şekil 4.10: Renal tutulumu olan/olmayan SLE hastalarının C4 kompleman yetersizliği varken/yokken “PBMC” hücrelerinde farklı anlatım yapan genler. Genler iki grup arasında melezleme yoğunluk oranı ile gösterilmiştir. Mavi renk transkripsiyonu düşen genleri, kırmızı renk transkripsiyonu artan genleri göstermektedir.

Tablo 4.11: Renal tutulumu olmayan SLE hastalarının C4 kompleman yetersizliği varken/yokken transkripsiyonu düşen sitokinlerle ilişkili mRNA’lar ve yer aldıkları yollar (“Wikipathway” analiz sonuçlarına göre). KD: Kat Değişim.

Gen Adı	KD	P değeri	Yolak	Yolak P değeri
IRF5	4.13	0.0086	Apoptoz (İnterferon düzenleyici faktörler)	0.046
			Toll-benzeri-Reseptör- Sinyalleşme Yolu	0.053

Sadece renal tutulumu olmayan ve C4 eksikliği olan hastalarda gözlemlendi. P değeri $\leq .05$ farkın önemli olduğunu gösterir.

Renal tutulumu olan hastalarda C4 kompleman yetersizliğinin varlığı veya yokluğuna göre bir karşılaştırma yapıldığında, normal C4 seviyelere sahip olanlara göre C4

kompleman yetersizliği olan olgularda sentezi azalmış 21 ve sentezi artmış 11 mRNA saptandı. “*Wikipathway*” analizleri bu mRNA genlerinin sitokinler ile ilgili yollarda bulunmadığını ortaya koydu. GO analizinin sonuçlarına göre sentezi azalan mRNA'ların kodladıkları proteinlerin çoğunun, katalitik, bağlayıcı veya enzim düzenleyici aktiviteleri olduğunu gösterdi. Şaşırtıcı olarak, sentezi artan mRNA'lar için GO analizi yapıldığı zaman hücrenin sitokin uyarıcıya karşı verdiği yanıtta rolü olduğu düşünülen *GFRA2* genine ait mRNA saptandı, ancak web taramasında ek bilgi elde edilemedi (Tablo 4.12). Sentezi artan mRNA'ların bir kısmının glial hücrelerden tüvlenen nörotropik faktör reseptörünün aktivitesine sahip olduğu belirlendi.

Tablo 4.12: Renal tutulumu olan SLE hastalarının C4 kompleman yetersizliği varken/ yokken transkripsiyonu artan sitokinlerle ilişkili mRNA'lar ve yer aldıkları yollar ("GO" analiz sonuçlarına göre). KD: Kat Değişim.

Gen Adı	KD	P değeri	Biyolojik Süreç
<i>GFRA2</i>	2.99	0.0085	Sitokin Uyarıcıya Hücreyel Yanıt ?

Sadece renal tutulumu olmayan ve C4 eksikliği olan hastalarda gözlemlendi. *P* değeri $\leq .05$ farkın önemli olduğunu gösterir.

4.2.4.4. *Anti Nükleer Antikorlar (ANA) varlığı veya yokluğuna göre mRNA düzeylerinin karşılaştırılması*

Çalışmanın bu bölümünde SLE hastalarından renal tutulumu ve pozitif ANA sonucu bulunanlarda mRNA anlatımı araştırıldı. Renal tutulumu olmayan fakat ANA test sonucu pozitif olan hastalarda farklı anlatım yapan toplam 142 mRNA tespit edildi. Bunlardan, 138'inin sentezinde azalma görüldü ve sitokinler ile ilişkili olan sadece bir yolak tespit edildi. Geri kalan 4'ünün sentezinde artış olduğu ve sitokinler ile ilişkili sadece bir yolak bulunduğu tespit edildi (Tablo 4.13).

GO analizine göre transkripsiyonu düşen genlerin çoğunun katyon taşıyıcı, ferrik demir taşıyıcı, arildialkilfosfat ve potasyum kanalı aktiviteleri gibi moleküler işlevlere sahip olduğu saptanırken, transkripsiyonu artan genlerin sadece HLA-B ile ilişkili, sınıf I MHC reseptör aktivitesine sahip olduğu belirlendi.

Table 2.13: Renal tutulumu olmayan SLE hastalarının ANA varken/ yokken transkripsiyonu artan veya düşen sitokinlerle ilişkili mRNA'lar ve yer aldıkları yollar ("Wikipathway" analiz sonuçlarına göre). KD: Kat Değişim.

Gen Adı	KD	P değeri	Yolak	Yolak P değeri
SOCS6	-16	0.0042	IL-3- Sinyalleşme Yolağı	0.0835
HLA-B	11.90	0.0286	Tip-II-İnterferon- Sinyalleşme Yolağı	0.0012

P değeri $\leq .05$ farkın önemli olduğunu gösterir. (-) Transkripsiyonu azalmış genleri, (+) Transkripsiyonu artan genleri göstermektedir.

4.2.4.5. Anti-DNA antikörünün varlığı veya yokluğuna göre mRNA düzeylerinin karşılaştırılması

Burada yapılan karşılaştırmalarda iki grupta da önemli sonuçlar bulundu: renal tutulumu olmayan, ancak anti-DNA testi sonucu pozitif olan/olmayan hastalar arasında karşılaştırma yapıldığı zaman, transkripsiyonu değişen toplam 75 mRNA tespit edildi. Bunlardan anti-DNA testi sonucu pozitif olan bireylerde sentezi azalan 16 ve sentezi artan 59 mRNA bulundu. Renal tutulumu olan, ancak anti-DNA testi sonucu pozitif olan/olmayan hastalar arasında karşılaştırma yapıldığı zaman, transkripsiyonu değişen toplam 25 mRNA tespit edildi. Bunlardan anti-DNA testi sonucu pozitif olan bireylerde sentezi azalan 22 ve sentezi artan 3 mRNA belirlendi.

Renal tutulumu olan/olmayan vakalarda (anti-DNA testi sonucu pozitif olan/olmayan hastalar arasında) "wikipathway" analizi yapıldığı zaman, anlatımı değişen mRNA'lar için sitokin ilişkili hiçbir yolak bulunamadı.

GO analizine göre (renal tutulumu olmayan bireylerde) transkripsiyonu azalan genlerin çoğunlukla transkripsiyon faktörü, kanal regülatörü, bağlayıcı ve kataliz aktiviteleri gibi moleküler işlevlere sahip olduğu belirlendi. Transkripsiyonu artan genler için bu alanda bir sonuç elde edilemedi. Renal tutulumlu olgularda transkripsiyonu azalan genlerin dehidrogenaz ve oksidoredüktaz transhidrogenaz aktivitelere sahip oldukları görüldü. Ancak transkripsiyonu artan genler için böyle bir sonuç bulunamadı.

4.2.5. Eşzamanlı mRNA/miRNA profillemesi ile biyoinformatik tahminlerin doğrulanması

Önceden yapılmış çalışmalara göre, biyoinformatik tahminlerin doğruluk oranı % 10 gibi düşük olabilir (Huang ve diğ. 2007; Alexiou ve diğ. 2009; Huang ve diğ. 2010). Biyoinformatik tahminlerin doğruluğunu arttırmak için, miRNA transkript profillemesi ile mRNA anlatım profillemesi aynı anda yapıldı. Bu yaklaşım doğrultusunda, miRNA'ların hedef mRNA translasyonunu engelleyerek ya da deadenilasyonu uyararak mRNA'ların yıkılmasına yol açabileceği ve böylece gen anlatımını düzenliyor olabileceği, biri diğerini düzenliyor ise miRNA'lar ve mRNA'ların transkripsiyon düzeyleri arasında ters bir ilişki olması gerektiği mantığı yürütüldü. Başka bir deyiş ile sentezi artan miRNA için, hedef genlerin transkripsiyonunda azalma olması gerektiği veya tam tersi öngörüldü. Bu nedenle mRNA profillemesinden elde edilen veriler hedef genler için sorgulandı.

SLE hastalarında sentezinin arttığı gösterilen miRNA (has-miR-149-5p) için belirtilen hedeflerden *ERBB3* geninin (% 6.6) primer transkriptine ait iki mRNA'sı olduğu, söz konusu miRNA'nın her iki mRNA'yı da yıkıma götürdüğü, *ERBB3* gen anlatımının translasyonun inhibisyonu ile düzenlediği ortaya konuldu. (Tablo 4.14).

Tablo 4.14: SLE hastaları ile sağlıklı kontroller arasında farklı transkriptte edilen miRNA'lar için tahmin edilmiş hedeflerin doğrulanması. KD: Kat Değişimi.

Gen Adı	KD	P değeri	Yolak	Yolak P değeri
<i>ERBB3</i>	2.05	≤ 0.05	ErbB- Sinyalleşme Yolağı	0.00361
	2.07			

P değeri ≤ .05 farkı önemli olduğunu gösterir.

SLE hastalarından renal tutulumu olanlarla renal tutulumu olmayanlar arasında transkripsiyonu azalan miRNA (has-miR-766-3p) için tahmin edilen hedeflerden de sadece *IRS2* geninin transkripsiyonunun renal tutulumu olan bireylerde, yaklaşık 2.5 kat artmış olduğu bulundu.

4.2.6. hsa-miR-149-5p ile ERbB3 mRNA eşleşmesinin Analizi

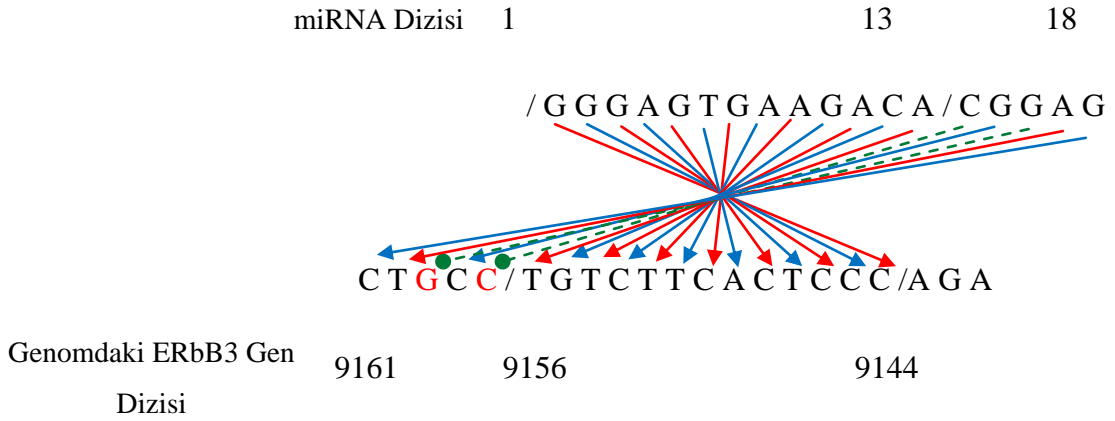
Biyoinformatik analizler sonucu hsa-miR-149-5p için bulunan tahmini hedef gen epidermal büyüme faktörü reseptörü ve tirozin kinaz ailesinin bir üyesi olan ErbB3 bulundu. Bu genin düzenlenmesinde hsa-miR-149-5p'nin rolünü daha ileri düzeyde araştırmak için hsa-miR-149-5p'ye ait nukleotid dizisi NCBI veritabanında kayıtlı "Homo sapiens" genomundaki *ERbB3* gen dizisi ile karşılaştırılarak benzerlik gösteren eşleşmeler tarandı. miRNA'nın hedef mRNA ile eşleştiği parçalarda, benzerliğin kararlı olduğunu ifade eden E değerleri taranarak 0.05'ten küçük olanlar seçildi. Bular arasından da bit skoru (26.3 [13]) ve "Query coverage" değeri (%72.2) en yüksek olan aynı zamanda E değeri de anlamlı olan (.003) seçildi. Eşleşen bölge mRNA üzerinde 9144-9156 pozisyonundaki nukleotidleri kapsamaktadır ve intronik bölgede yer almaktadır (Şekil 4.11).

```

9001 cagggtcaggggcaggtggtgttctgtggatagtgcagggtcagcagggactagtcaga
9061 gagaaacctgaggaccaagaggttacctggggagatgaggaaggggcctactggtatga
9121 ggcactttgaggagaaagctgcctgtcttactcccagaagtgacacagcagtggtgacac
9181 agtctactccctactcccaaataggaattagcaagagttaaggccaggtg cagtggctca
  
```

Şekil 4.11: NCBI veritabanında kayıtlı "Homo sapiens" genomundaki ErbB3 geninin 9144 – 9156 pozisyon arasındaki dizi ile hsa-miR-149-5p'nin eşleşme analizi.

Çalışmadan elde edilen bulgular hsa-miR-149-5p olarak kodlanan miRNA'nın hedef mRNA'yı kırılma aşamasından önce yıkıma uğrattığını göstermesi bakımından büyük önem taşımaktadır. Şekil 4.12'de gösterildiği gibi hsa-miR-149-5p'ye ait olan 18 nukleotitden 16'sı hedef geninin (-) zincirindeki nukleotitler ile eşleşmektedir (%89). mRNA molekülünün 9157. pozisyonundaki C ve 9159. pozisyonundaki G nukleotidleri'nin "mismatch" ile miRNA ile eşleşmesinin hedef mRNA yıkımını engellemediği de belirlenmiştir.



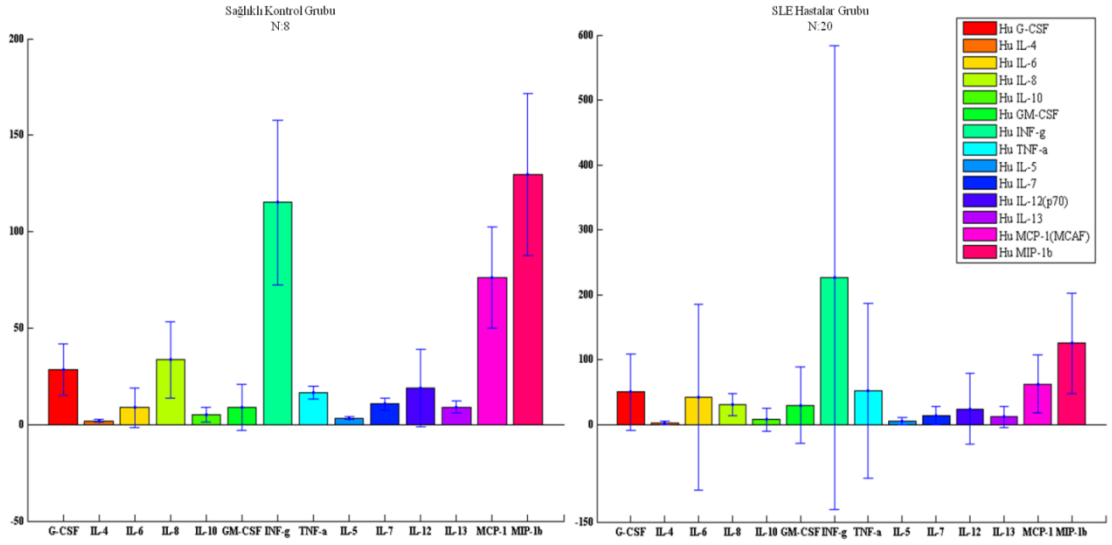
Şekil 4.12: hsa-miR-149-5p ve ERbB3 geninin dizi eşleşmesi. hsa-miR-149-5p'ye ait olan 18 nukleotitden 13'ü hedef geninin (-) zincirine aralıksızın %100 bağlanır. 18 nukleotid çapında ise sadece (2 nt) 9157. ve 9159. pozisyonundaki nukleotitler de eşleşme gerçekleşmezken 16'sında bağlanma olur.

4.2.7. Immünolojik Yöntemler

4.2.7.1. Multipleks "ELISA"

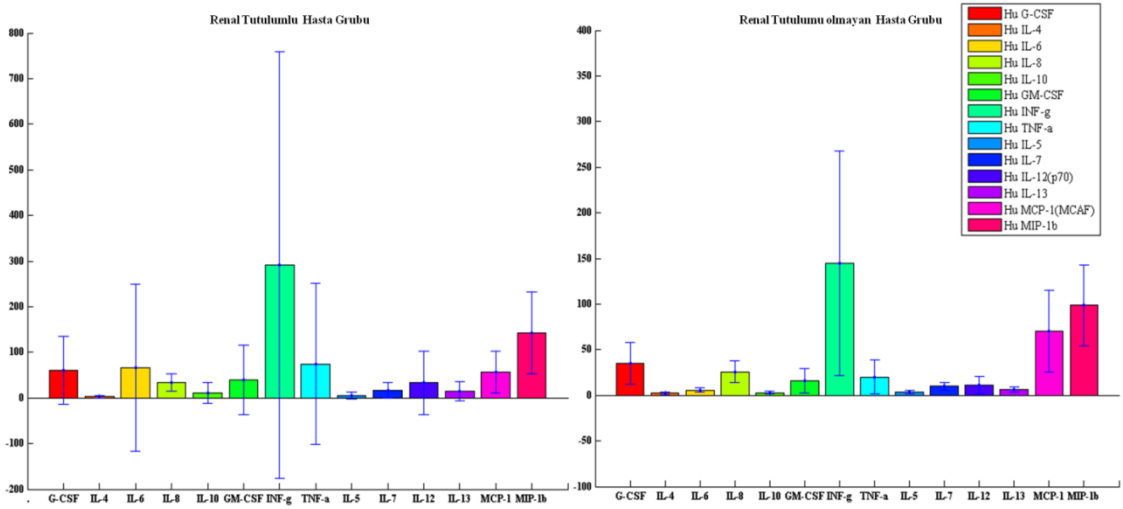
Çalışmanın bu bölümünde, lupus nefropatisi olanlar ile renal tutulumu olmayanların ve lupus hastalarıyla sağlıklı gönüllülerin serum sitokin düzeyleri karşılaştırıldı. Deneyle 16 lupus hastası ve 8 sağlıklı kontrolde yürütüldü. Tüm serum örnekleri *Multipleks* "ELISA" yöntemi ile IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-5, IL6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-12(p70), IL-13, IL-17, G-CSF, GM-CSF, IFN- γ , MCP-1, MIP-1 β , TNF- α olmak üzere toplam 17 sitokin belirlendi. Bunlardan IL-1 β , IL-2, IL-17'nin miktarları sadece bazı bireylerde ölçülebildi ve bu yüzden bu sitokinler analiz dışı bırakıldı.

Sağlıklı bireylerde ölçülen ortalama değerler ile karşılaştırıldığında SLE hastalarında G-CSF(50 vs 28), IL-6(42 vs 8.7), GM-CSF (30 vs 8.7), INF- γ (226 vs 115) ve IL-12 (24 vs 19)'un serum düzeylerinin ortalama değerleri yüksek idi (Şekil 4.13). TNF- α 'nın serum düzeyinin ortalaması SLE hastalarında sağlıklı kontrollere göre (16.54 vs 51.75) düşüktü. IL-4, IL-5, IL-7, IL-8, IL-10, IL-13, MCP-1ve MIP-1 β için serum düzeyleri arasında ise anlamlı bir fark bulunamadı.



Şekil 4.13: Sağlıkli bireyler ile SLE hastalarında serum sitokin düzeylerinin ortalaması. Y-ekseninde konsantrasyon (pg/mL) olarak gösterilmiştir.

Ayrıca renal tutulumu olan tüm SLE hastalarında G-CSF (60 vs 34), IL-6 (66 vs 5.7), IL7 (16 vs 10), IL-8(33 vs 25), IL-10 (10 vs 3), IL12 (33 vs 10), GM-CSF (39 vs 16), IL-13(15 vs 6), IFN- γ (292 vs 144), TNF- α (74 vs 20) ve MIP-1 β (142 vs 98)'nin serum düzeylerinin ortalama değerleri yüksek olarak belirlendi (Şekil 4.14). MCP- 1'in serum düzeyinin ortalaması renal tutulumu olan SLE hastalarında renal tutulumu olmayanlara göre (57.14 vs 70.28) düşüktü. IL-4 ve IL-5'in serum düzeylerinin arasında ise anlamlı fark bulunamadı.



Şekil 4.14: SLE hastalarda renal tutulumu olanlarla renal tutulumu olmayanlarda serum sitokin düzeylerinin ortalaması. Y-ekseninde konsantrasyon (pg/mL) olarak gösterilmiştir.

T-istatistiklerine göre, P değerleri sınır aralığında (borderline) ($0.05 < P < 0.1$) olmasına rağmen anlamlı fark ne SLE hastaları ile sağlıklı bireyler arasında ve ne de lupus nefritli olan hastalar ile renal tutulumu olmayan hastalar arasında tespit edildi (Hackshaw ve diğ. 2011).

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

MikroRNA'lar (miRNA'lar) çeşitli hücreyel süreçleri düzenlerler ve bağışıklık sistemi hastalıkları da dahil olmak üzere birçok hastalığın fizyolojik ve patolojik süreçlerinde rol alırlar.

Lupus patogenezi tam olarak bilinmemekle beraber, B ve T lenfositlerindeki düzensizlik, bağışıklık sistemi hücreleri arasındaki anormal etkileşimler, anormal Toll-benzeri reseptör (TLR), tip 1 interferon ve hücre-dışı sinyal ayarlı kinaz (ERK) gibi sinyal yollarındaki immünolojik anormallikler lupus murin modellerinde ve insanda gösterilmiştir (Gorelik ve Richardson, 2009; Pauley ve diğ., 2009; L, 2011). Bazı çalışmalar miRNA'ların, SLE patogenezi ile ilişkili sinyal yollarının ve otoimmün genlerin düzenlenmesinde rol oynayabileceğini ortaya koymuştur (Dai ve Ahmed, 2011).

Bu çalışmada sağlıklı kontrol bireyler ile SLE hastalarının serum miRNA profilleri belirlenmiştir. Ham verilerin normalleştirilmesinden sonra, sağlıklı kontrollere göre SLE hastalarında toplam 10 miRNA transkriptinde değişkenlik gösterdiği saptanmıştır. Diğer çalışmalarla karşılaştırıldığında (Dai ve diğ.,2007; Wang ve diğ., 2011; Wang ve diğ., 2012a) dolaşımdaki miRNA'ların çeşit sayısı önemli ölçüde azalmış olsa da, bu miRNA'ların sağlıklı kontrollere göre hastalarda yüksek seviyelerde olduğu tespit edilmiştir (Tablo 4.2). İlginç olarak bu çalışmada serumda belirlenen serbest miRNA'lardan ikisi (hsa-mir-1825 ve hsa-mir-574-5p), sağlıklı kontrollerle SLE'li hastalar ve RA'lı hastaların plazmalarındaki miRNA profillerini karşılaştıran başka bir çalışmanın verileri ile örtüşmüştür (Wang ve diğ., 2012a). Bu miRNA'ların SLE için aday biyomarkır olabileceği düşüncesinden bunların RA hastalarında da bulunması nedeniyle vazgeçilmiştir. Bu sonuçlar, SLE hastalığına özgü potansiyel miRNA biyomarkırların araştırılmasının hala gerekli olduğunu göstermektedir.

Bu iki miRNA'nın anlatım düzeylerinde diğer çalışma ile (Wang ve diğ., 2012a) karşılaştırıldığında, anlamlı bir artış saptanmıştır (hsa-mir-1825:11.17 vs 2.34, hsa-mir-574-5p: 16 vs 3.68). Chen ve arkadaşları, normal koşullar altında, dolaşımdaki

miRNA'ların dolaşan kan hücrelerinden türetilmiş olabileceğini ortaya koymuştur (Chen ve diğ., 2008). Bu da miRNA düzeylerindeki yükselmenin, immün ve enflamatuar hücrelerin dolaşan kana maruz kalmasıyla ilişkili olabileceğini düşündürmektedir.

2012'de Wang ve arkadaşları bir mikrodizilim çalışması sonucunda hsa-mir-574-5p transkripsiyonunun sepsis hastalarında arttığını ve bunun ölüm ile ilişkili olduğunu göstermiştir. Sepsis, çeşitli dokuları ve organları içeren kompleks bir hastalıktır. Ancak, bu çalışmada hsa-miR-574-5p'nin sepsis ile korelasyonu incelenmemiştir (Wang ve diğ., 2012 b). Buna karşın miR-574-5p'nin akciğer kanserinde bir tümör biyomarkırı olduğu kanıtlanmıştır (Foss ve diğ., 2011; Hennessey ve diğ., 2012). hsa-miR-574-5p'nin transkripsiyon seviyeleri akciğer kanseri hücre kültürü örneklerinde, kemoterapi direnci ile ilişkilidir ve serum hsa-miR-574-5p düzeyi kontrol grubu ile karşılaştırıldığında önemli ölçüde erken evrede olan akciğer kanseri hücre örneklerinde artmıştır (Ranade ve diğ., 2010; Foss ve diğ., 2011). Son zamanlarda, hsa-miR-574-5p'nin fonksiyonu ile ilgili yapılan deneyler, hsa-miR-574-5p'nin uyarıcıya ve strese karşı tepki olarak gelişen biyolojik süreçlerde rol oynayan mRNA'larla ilişkili olduğunu göstermiştir (Borgan ve diğ., 2011).

miRNA biyogenezinde miRNA çiftlerinin her iki zinciri de, mutlaka transkripsiyon sonucunda eşit miktarlarda üretilmektedir, ancak bunların birikimi asimetrikdir (Okamura ve diğ., 2008). Bu çift yapının her bir ucunun termodinamik stabilitesine göre, zincirlerin biri biyolojik olarak aktiftir ve lider zincir olarak adlandırılır; diğer etkin olmayan zincir miRNA* (yıldız miRNA) veya yolcu zincir olarak adlandırılır ve genelde, yıkılır (O'Toole ve diğ., 2006). Olgun miRNA ise RISC kompleksine monte edilir ve post-transkripsiyonel düzenleme için rehber olarak iş görür. Bunun için de miRNA üzerinde bulunan çekirdek bölgedeki 2 ila 8 nükleotid ("*seed region*"), ("*anchor*") bölgedeki 13 ila 16 nükleotid ile birlikte, hedef mRNA'nın 3' ucundaki translasyonu yapılmayan diziye (UTR) bağlanır (Grimson ve diğ., 2008). Başka bir deyiş ile, rehber zincirin seçim mekanizması muhtemelen çift zincirin uçlarının nispi serbest enerjileri ile ilişkilidir (Khvorova ve diğ., 2003; Schwarz ve diğ., 2007; Okamura ve diğ., 2008). Son zamanlarda, bazı miRNA*'ların yüksek miktarda transkripsiyonunun yapıldığı olgun fonksiyonel miRNA'lar gibi rolleri olduğu ve

miRNA / miRNA* oranının gelişim aşamalarına göre önemli ölçüde değişebileceği rapor edilmiştir (Ro ve diğ., 2007; Okamura ve diğ., 2008; Jagadeeswaran ve diğ., 2010). Örneğin *Drosophila*'da miRNA'lar Ago1'i tercih ederken miRNA*'lar Ago2'ye bağlanırlar (Ghildiyal ve diğ., 2010). Zincir seçimi genellikle rijit bir süreç değildir, çünkü bazı saç toka yapıları her iki zincirden de benzer frekanslarda miRNA'lar üretirler (Kim ve diğ., 2009). Bu tür miRNA*'ların yüksek seviyelerde bulunuşu fizyolojik koşullar ve Argonaute proteinleri ile ilişkilendirilmektedir (Okamura ve diğ., 2008). miRNA*'lar olgun miRNA'lar ile hemen hemen mükemmel bir şekilde korunmuş benzer diziler içerirler. “*MiRBase*”¹ veritabanına (<http://www.mirbase.org>) göre, yaklaşık 80 insan miRNA öncülü eşit seviyelerde bulunan iki çeşit olgun miRNA ile sonuçlanabilir. Bu miRNA'ların çekirdek dizileri ve hedef mRNA'ları farklıdır. Halbuki birçok miRNA öncülünden meydana gelen olgun miRNA, miRNA*'ya göre daha yüksek seviyelerde bulunur (Guo ve Lu., 2010).

Bu çalışmada sağlıklı kontrollerle SLE hastaları karşılaştırıldığında, hsa-miR-149-5p'nin transkripsiyon düzeyinde anlamlı bir artış (8.62 kat) saptanmıştır. Bu güne kadar SLE ile ilgili yapılan diğer çalışmalarda böyle bir bulguya rastlanmamıştır. Ancak lupus nefriti ile ilgili yapılan bir çalışmada monozigotik ikizlere ait PMNC örneklerinde hsa-miR-149* varlığı gösterilmiştir (Te ve diğ., 2010). Lin ve arkadaşları 2010'da kanser hücrelerinde hsa-miR-149*'ın (“*RAC-alpha serine/threonine-protein kinase*”) (Akt1)'ı ve Transkripsiyon faktörü E2F1'yi inhibe ederek apoptozu indüklediğini göstermişlerdir. Gelişen sinir sisteminde sinir hücrelerinin hayatta kalması serin-treonin protein kinaz AKT1 büyüme faktörü ile düzenlenmektedir. Hayatta kalma faktörleri, apoptoz bileşenlerini fosforlayarak inaktive eden serin/treonin kinaz AKT1'i aktifleştirerek apoptozu bastırırlar. Bu da hsa-miR-149*'un pro-apoptotik fonksiyona sahip olduğunu göstermektedir. Bu çalışmada hsa-miR-149 için yapılan hedef tahminlerinin sonuçları arasında (Tablo 4.7) *Akt3* geni de (p : 0.00355) bulunmaktadır. Apoptoz, SLE patogenezinin önemli mekanizmalarından biridir (Jin ve diğ., 2005). Bu hastalıkta lenfosit apoptozu artar ve apoptotik hücrelerin ortadan kaldırılması düzensizdir.

1 miRBase blog, miRBase news and views, [Online], <http://www.mirbase.org/blog/2014/03/high-confidence-micromas/>

AKT3'ün aşağı-regülasyonu apoptozu kaspaz-bağımlı bir biçimde indükler. Yukarıda da geçtiği gibi miRNA*'lar ve olgun miRNA'lar korunmuş benzer diziler içerirler. Bu da AKT1'in has-miR-149-5p için de bir hedef olabileceğini düşündürmektedir. Ancak bu hipotez hedef tahmini için kullanılan yazılımlarla gösterilememiştir. Bu yazılımların doğruluk oranı düşük olabileceği için bu hipotezin başka yöntemler ile de araştırılması gerekir.

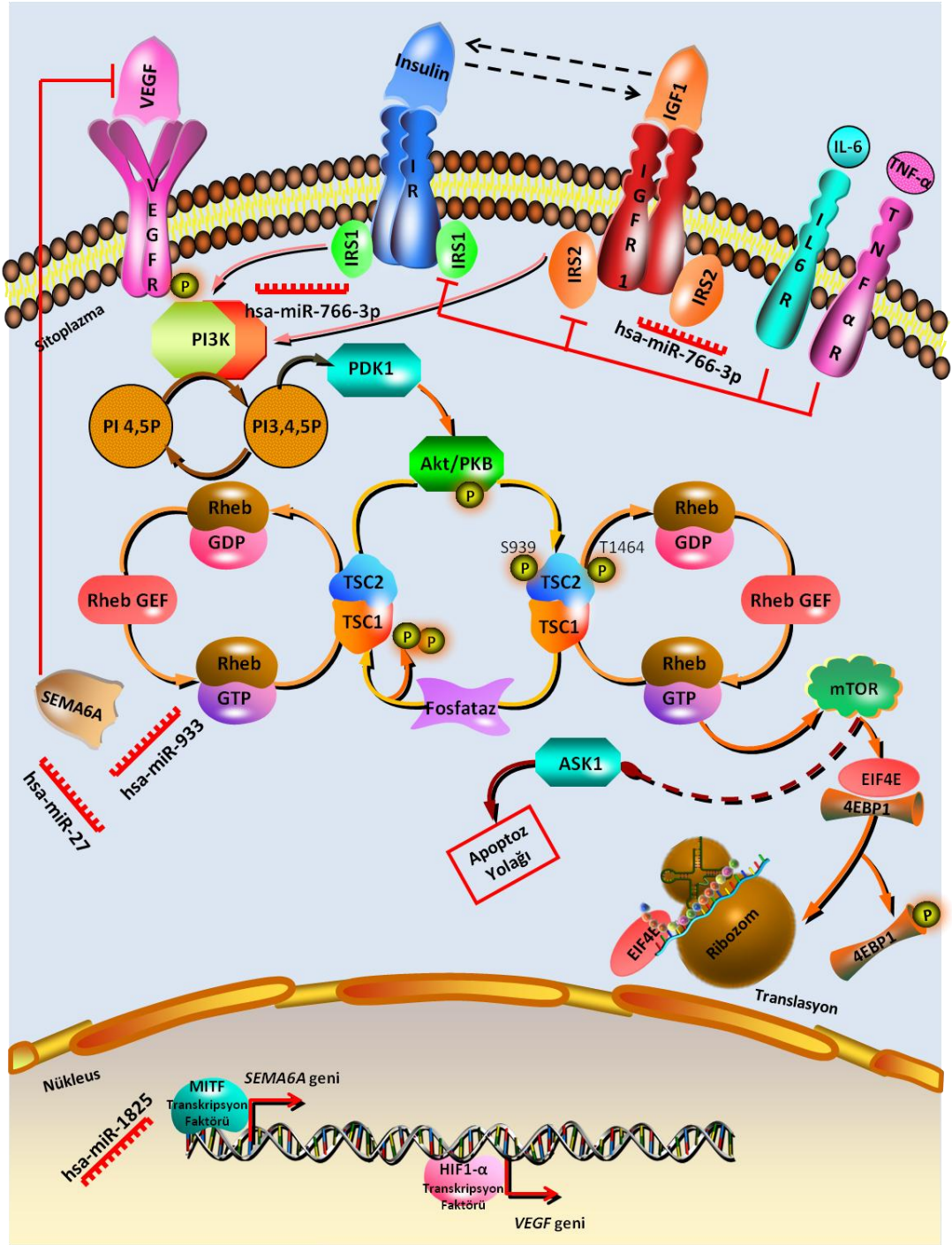
Ayrıca hsa-miR-149-5p için bulunan başka bir hedef mRNA adayı *ERbB3* genine aittir. ERbB3, epidermal büyüme faktörü reseptörü, tirozin kinazlar (**EGFR**) ailesinin bir üyesidir. ERbB3, gerçek kinaz aktivitesine sahip olmadığından diğer aile üyelerinden farklıdır (Guy ve diğ.1994). Bu nedenle, ERbB3, sadece bir heterodimer kompleksi olarak aktiftir ve en yüksek afiniteyi **ERbB2** için gösterir; ERbB2/ERbB3 heterodimeri alt yollarının (downstream pathways) aktivasyonu için en etkili komplekstir (Yarden ve Sliwkowski, 2001). ERbB2/ERbB3 heterodimerinin hemen ardından gelen PI3K/Akt yolu indüklenir ve kanser hücrelerinin proliferasyonunda, hayatta kalmasında ve invazyonunda önemli bir rol oynar (Arboleda ve diğ., 2003; Holbro ve diğ., 2003; Jackson ve diğ., 2004). ERbB2/ERbB3 heterodimerinin, PI3K ve Akt aktivasyonu yoluyla insan akciğer adenokarsinom hücrelerinin büyümesinde rol oynadığı gösterilmiştir (Sithanandam ve diğ., 2003; Sithanandam ve diğ., 2005). ERbB3 sinyali PI3K/AKT/FRAP1/RPS6 yolunu aktive ederek Kaspaz 3 (**CASP3**) aracılı apoptozu önler ve bu şekilde tümörün büyümesine katkıda bulunur (Lee ve diğ., 2009). Başka bir deyiş ile kanser hücrelerinin apoptozunu bastırarak ölümsüzleştirilmelerini sağlar. Bu çalışmada hsa-miR-149-5p için yapılan biyoinformatik çalışmalar sonucu elde edilen tahmini hedef genlerden ERbB3 mRNA'sı deneysel olarak mRNA ekspresyon analiz aşamasında da onaylanmıştır. NCBI dizi eşleşme analiz sonuçlarına göre yaklaşık %90 düzeyindeki benzerlik hsa-miR-149'un bu gene ait primer transkripti kırılma öncesi yıkıma uğratarak düzenlediğini göstermektedir. Ayrıca *ERbB3* geninin primer transkriptinin oluşturduğu her iki mRNA'nın (Katoh ve diğ., 1993) da hsa-miR-149-5p tarafından yıkılarak, traslasyon inhibisyonuyla anlatımının düzenlendiği ortaya konulmuştur. Bu bilgi ve bulgulardan yola çıkarak, hsa-miR-149-5p düzeyindeki artışın ERbB3 veya AKT3'ün traslasyonunu durdurarak doğrudan veya dolaylı olarak apoptozu aktifleştirme fonksiyonundan kaynaklandığı öne sürülebilir.

Sağlıklı kontrollerle SLE'li hastalar karşılaştırıldığında, hsa-miR-933 düzeyinde de anlamlı bir artış (5.75 kat) saptandı. Son zamanlarda melanom ile ilgili yapılan bir miRNA mikrodizilim çalışmasında yüzeysel yayılan melanomada ("Superficial Spreading Melanoma", SSM) hsa-miR-933 düzeyinde bir düşüş saptanmıştır (Poliseno ve diğ., 2012). Genel olarak melanoma, epiderminin bazal tabakasında bulunan melanositlerin genetik mutasyonlar sonucunda metastatik forma dönüşmeleri olarak tanımlanır (Kwong ve diğ., 2007). Melanoma, genetik olarak yatkın kişilerin güneş ışığındaki UV ışınlarına maruz kalması ile ilişkilidir. Lupusta da koyu renkli cilt değişiklikleri oluşabilir. Güneşin UV-B ve UV-A ışınları yılın 365 gününde fotoduyarlılık reaksiyonlarına yol açıp lupusu tetikler ve koyu lekelerin çoğalmasına yol açar. SLE'de kısa dalga boylu ultraviyole (UV-B) radyasyonu tarafından uyarılan fotoduyarlılık belgelenmiştir (Tan ve diğ., 1982). Diğer taraftan uzun dalga boyu ve düşük enerji spektrumuna sahip olan ultraviyole (UV-A) ışınları, *in vitro*'da, doğal öldürücü hücrelerin fonksiyonunu azaltır (Nived ve diğ., 1992). Aktif SLE'de doğal öldürücü hücrelerin fonksiyonundaki bu düşüşü mekanizması bilinmemektedir, ancak serum faktörleri, bağışıklık kompleksleri, lenfositlere karşı antikorlar ya da interleokin 2 aracılı sinyal iletiminin azalması gibi faktörlerin rol oynadığı düşünülmektedir (Goto ve diğ., 1980, Sirianni ve diğ., 1990). Ayrıca melanoma için de iki yolun varlığı rapor edilmiştir: 1) UV-B'nin pigment-bağımsız bir biçimde doğrudan DNA hasarına götürdüğü yol; 2) UV-A'nın pigment-bağımlı bir biçimde melanositlerde dolaylı olarak oksidatif DNA hasarına götürdüğü yol (Noonan ve diğ., 2012). UV-B radyasyonu sonucunda cilt hücrelerinde siklobutan pirimidin dimerleri ("Cyclobutane Pirimidine Dimers"; CPDS) oluşur (Noonan ve diğ., 2012). Siklobutan pirimidin dimeri, C = C ve T = T gibi, pirimidinlerin çift bağlı yapılar oluşturmasından kaynaklanan dört unsurlu bir halka içerir. Nükleotid kesip çıkarma onarım mekanizması bu hasarın giderilmesi için devreye girer. Onarılmamış pirimidin dimerleri melanomaya yol açabilir. UV-A'nın fotooksidatif mekanizmalar yoluyla dolaylı olarak DNA hasarına neden olduğu bilinmektedir. UV-A radyasyonu sonucunda ciltteki melanosit hücrelerinde diğer hücrelere kıyasla yüksek miktarlarda 8-okso-7,8-dihidro-2'-deoksiguanozin ("8-Oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine"; **8-oxodGuo**) oluşur. 8-oxodGuo seviyesindeki bu artış melaninin varlığından dolayıdır (Noonan ve diğ., 2012). 8-oxodGuo şeklindeki oksidatif DNA hasarı için hem UV-A hem de melanin varlığı gereklidir. 8-OxodGuo yüksek derecede mutajeniktir ve G-C →T-A transversiyon mutasyonlarına yol açarak reaktif

oksijen türlerinden (**ROS**) kaynaklanan DNA hasarına neden olabilir (Ravanat ve diğ., 2001). Melanin mükemmel optik emici, güçlü bir anti-oksidan ve serbest radikal süpürücüsüdür, ancak radyasyon absorpsiyonu sonucunda güçlü oksidan olarak tanımlanan melanin radikallerini oluşturabilir (Maresca ve diğ., 2006; Meyskens ve diğ., 2007; Simon ve diğ., 2009). Melaninin, DNA onarım enzimi, 8-OxoGuanine DNA glikozilaz (“*8-oxoguanine DNA glycosylase*”; **OGG1**) aktivitesi üzerinde inhibe edici bir etkiye sahip olduğu gözlenmiştir (Sava ve diğ., 2004). Bu mekanizmanın aydınlatılması oksidatif stresin melanom ve lupus hiperpigmentasyonu üzerindeki etkilerinin anlaşılmasını sağlayacaktır. Yukarıdaki bilgiler, melanoma ve SLE’deki koyu lekelerin benzer bir mekanizma ile oluştuğunu düşündürmektedir. Ancak daha ileri aşamalarda bir farklılık birisinin kansere doğru ilerlemesini ve diğerinin sadece koyu leke halinde kalmasını sağlamaktadır.

hsa-miR-933 anlatımının melanom ve mide kanseri gibi durumlarda azalması ve SLE’de anlatımının yükselmesi apoptoz ile ilişkili olabileceğini düşündürmektedir. “*miR0*” tahmini hedef veritabanına göre (<http://ferrolab.dmi.unict.it/miro...>) apoptotik olarak **CASP7** ve **SEMA6A** bu miRNA’nın potansiyel olası hedefleri olarak belirlenmiştir. **SEMA6A** geni melanositlerde mikrofitalmi-ilişkili transkripsiyon faktörü (“*Microphthalmia-associated Transcription Factor*”; **MITF**) tarafından düzenlenir (Levy ve diğ., 2006). **SEMA6A**, **MAPK**, **PI3K-AKT** kinaz ve vasküler endotelial büyüme faktörü reseptörü 2 (“*Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 2*”; **VEGFR2**) sinyal yollarının negatif düzenlenmesini sağlar (Şekil 5.1). **IL-1 β** , **IL-6** ve **TNF- α** gibi pro-enflamatuar sitokinler ve bazı faktörler, yangı olan dokuda **VEGF**’nin salgılanmasını teşvik edebilir (Cohen ve diğ., 1996; Jackson ve diğ., 1997; Honorati ve diğ., 2004). **VEGF**’nin endotel geçirgenliğinde artışa sebep olarak vazojenik ödeme yol açma gibi zararlı etkileri olabilir. 2002’de yapılan bir çalışmanın sonuçlarına göre lupus nefriti olan hastaların plazmasında **VEGF**’nin artmış olduğu gösterilmiştir (Navarro ve diğ., 2002). Böbrekte, glomerullerde **VEGF** değerlerinin yükselmesi glomerular hipertrofiye neden olmaktadır ki, bu da doğrudan proteinüri ile ilişkilidir (Liu ve diğ., 2007). **VEGF**, reseptörlerine bağlanarak **MAP** ve **PI3K-AKT** kinaz sinyal yollarını aktive eder. Buda fosfatidilinositol 3-kinaz (**PI3K**) sinyal yolağı ve ardından fosfoinositid bağımlı protein kinaz 1 (**PK1**) ve Akt’yi aktifleştirir. TOR doğrudan küçük GTP bağlayıcı proteini olan, beyine özgü Ras homologu (“*Ras homolog enriched*

in brain”; **Rheb**) ile aktive olabilir. Aktifleşmiş AKT, Rheb’nin negatif bir düzenleyicisi olarak işlev gördüğü tahmin edilen, (“**Tuberous sclerosis**”; **TSC**) TSC1-TSC2 kompleksini fosforile ederek etkisizleştirir. TOR doğrudan, eIF4E’nin bastırıcısı olan, ökaryotik translasyon başlatma faktörü 4E (**eIF4E**)’ye bağlanan protein 1 (“*eukaryotic translation initiation factor **4E** (eIF4E)-binding protein **1**; **4E-BP1***) fosforilleyerek inaktive eder. eIF4E’nin fosforile 4E-BP1’den serbest bırakılması, mRNA’ların 5’ şapka (“5’cap”) bağımlı translasyonu için gerekli olan, eIF4G’ye bağlanma ve eIF4F kompleksi oluşturma sürecini işletir. Ayrıca mTOR’un aktivasyonu Hipoksi indüklü faktör 1 (“**Hypoxia-inducible factor **1**; **HIF1****) gibi VEGF üretimi ve anjiyogenezde yer alan transkripsiyon faktörlerinin aktivasyonunu uyarır. Bunlarla birlikte mTOR’un apoptoz sinyali düzenleyici kinaz 1 (“**apoptosis-signal-regulating kinase **1**; **ASK1****) üzerindeki baskılıyıcı etkisi apoptozu önler (Huang ve diğ., 2004) (Şekil 5.1).



Şekil 5.1: VEGFR'ye bağımlı PI3K-AKT-mTOR sinyal yolu ve çalışmada saptanan mRNA'lara bağlanarak düzenlemede rol oynayan miRNA'ların yolakla ilgili hedefleri. VEGF: "Vascular endothelial growth factor", VEGFR: "Vascular endothelial growth factor receptor", PI3K: "Phosphoinositide 3-kinase", PDK1: "Phosphoinositide-dependent kinase-1", Akt: "v-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1", Rheb: "Ras homolog enriched in brain", Rheb GEF: "Rheb- Guanine nucleotide exchange factor", TSC1: "Tuberous sclerosis 1", TSC2: "Tuberous sclerosis 2", mTOR: "Mammalian target of rapamycin", ASK1: "Apoptosis signal-regulating kinase 1", EIF4E: "Eukaryotic translation initiation factor 4E", 4EBP1: "Eukaryotic translation initiation factor 4E-binding protein 1", MITF: "Microphthalmia-associated transcription factor", HIF1- α : "Hypoxia-inducible factor 1-alpha", IR: "Insulin receptor", IGF1:

“Insulin like growth factor 1”, IGF1R: “Insulin like growth factor 1 receptor”, IRS1: “Insulin receptor substrate 1”, IRS2: “Insulin receptor substrate 2”, IL-6: “Interleukin-6”, IL6R: “Interleukin-6 receptor”, TNF- α : “Tumor necrosis factor alpha”, TNF- α R: “Tumor necrosis factor alpha receptor”, SEMA6A: “Semaphorin-6A”.

SEMA6A mevcut olduğu durumda, VEGF'nin kısmen bağlanmasını önleyerek, MAPK ve VEGFR2 sinyalinin zayıflatarak mTOR'un aktivasyonunun azalmasını sağlayarak hem VEGF üretim hızını azaltır, hem de ASK1 bağımlı apoptozu uyarır. Burada hsa-miR-933 için bir savunma rolü önerilebilir. Bunun için iki hipotez söz konusu olabilir : 1) hsa-miR-933, hedef proteinin (SEMA6A) üretimini kısıtlayarak apoptozu yavaşlatır, ancak bu durumda VEGF daha fazla üretilir. VEGF'nin aşırı üretimi bir taraftan mTOR yolağının aktif olmasını sağlar, diğer taraftan da böbreklerde glomerular hipertrofi gibi olumsuz etkiler yaratır. 2) Bazı raporlar, miRNA aracılı etkilerin RNA dizisi kapsamı ile düzenlendiğini ve RNP faktörleri ve hücre koşulları ile ilişkili olabileceğini göstermektedir (Vasudevan, 2011). Anlatımın posttranskripsiyonel olarak artması doğrudan belli microRNP'lerin aracılığıyla yapılabilir (aktivasyon) veya dolaylı olarak microRNA'ların baskılayıcı etkilerini kaldıran bir düzenleyicinin aktivasyonu sonucu gerçekleşebilir (Vasudevan, 2011). miR-27'nin SEMA6A üzerine baskılayıcı etkisi olduğu ve bu şekilde MAP ve PI3K-AKT kinaz sinyal yollarını uyardığı daha önce bulunmuştur (Zhou ve diğ., 2011). Bu bilgilere dayanarak bu çalışmada anlatımı artırılarak düzenlenen hsa-miR-933'ün, SEMA6A'ya bağlanıp miR-27'nin bağlanmasını önlediği veya translasyon faktörlerinin bir araya gelip SEMA6A'nın translasyonunu teşvik ettiği düşünülmektedir. Bu hipotezlerin kanıtlanması için daha fazla araştırmaya gerek vardır.

Yukarıda da bahsedildiği gibi, sağlıklı kontrol bireyler ile SLE'li hastalar karşılaştırıldığında hsa-miR-1825'de artış saptanmıştır. Tahmini hedef analizlerine göre bu miRNA'nın *MITF* genine bağlanması olasıdır ki, bu da yukarıda sunulan hipotezi doğrulayan kanıtlardan biri sayılabilir (Şekil 5.1).

Ayrıca renal tutulumlu vakalarda hsa-miR-766-3p'de anlamlı düşüş tespit edilmiştir. hsa-miR-766-3p'nin olası hedef genleri olarak **PIK3R1** ve **IRS2** ($p=.00001$) belirlenmiştir. IRS proteinlerinin çeşitli dokularda, özgün sinyalleri düzenlediği yapıları sürdürülmektedir (Rui ve White, 2004). IRS2 insülin, (“*Insulin like growth factor*”; **IGF**), ve diğer sitokinlerin etkilerine aracılık eden bir sitoplazmik sinyal molekülüdür.

İnsülin ve IGF1, PI3K yolağı, IRS proteinlerin tirozin fosforilasyonu ile erişilebilir (Rui ve White, 2004). Bu yüzden IRS2, PI3K-Akt kaskadı için önemli bir düzenleyici nokta sayılır ve IRS2 sinyali apoptoz bastırılması için gereklidir. Normal şartlarda insülin veya IL-4 uyarılmasıyla insülin reseptör tirozin kinaz tarafından fosforile edilir. PI3KR, fosforillenmiş IRS proteinlerine bağlanarak PI3kinazın aktivasyonuna aracılık eder. TNF- α ve IL-6 gibi stres kaynaklı sitokinler IRS1/IRS2 proteinlerindeki serin bakiyelerinin fosforilasyonu teşvik etmeleriyle inaktif duruma geçer ve bu proteinlerin ilgili oldukları yolaklar da dolaylı olarak inaktif etmiş olurlar (Tanti ve Jager, 2009) (Şekil 5.1). Bu sitokinler IRS aracılı kinaz aktivasyonunun inhibisyonunu arttırarak insülin bağımlı glukoz alımında düzensizliğe yol açıp insülin direncine neden olabilirler (del Aquila ve diğ., 1999; Park ve diğ., 2013). 2013' de yapılan bir çalışmada IRS2'nin böbrek epitelinde anlatım yaptığı ve diyabetik nefropati'li hastalarda arttığı gösterilmiştir (Hookham ve diğ., 2013). İnsülin direnci ve onun yol açtığı tip 2 diyabet ve ardından oluşan diyabetik nefropati SLE'li hastalarda da rapor edilmiştir (Bao ve diğ., 2007; Sato ve diğ., 2010). Bu çalışmadan elde edilen verilerle yukarıdaki literatür bulguları birlikte değerlendirildiğinde şu hipotezi ileri sürebiliriz: Böbrek tutumlu olan hastalarda yüksek miktarlarda bulunan TNF- α ve IL-6, IRS2'yi inhibe eder ve bu şekilde bir taraftan dolaylı olarak Akt'nin inaktivasyonuna yol açarak apoptozu uyarırlar ve diğer taraftan insülin direncine yol açarak, insülin bağımlı glukoz alımında da sorun yaratırlar. Ancak vücut bu etkileri giderebilmek için hsa-miR-766-3p'nin anlatımını düşürür ve bu yolla IRS2'nin üzerindeki baskı ortadan kalkacağından anlatımı yükselir ve Akt yolağının aktifleşmesiyle hem VEGF üretilir, hem de apoptoz durdurulur. Ayrıca aynı zamanda miktarı yükselen IL-4 de IRS2'yi uyarır ve daha fazla anlatım yapmasını sağlar. İlaç tedavisinden dolayı çok anlamlı olmasa da bu çalışmada renal tutulumu olan hastalarda IL-4, IL-6 ve TNF- α diğerlerine göre daha yüksek ölçülmüştür. Bu bulgu da yukarıda ileri sürülen hipotezin doğru olabileceği yönünde bir kanıt olarak sayılabilir. Ancak bu hipotez başka deneylerle onaylanmalıdır. Bazı çalışmalara göre SLE'de oluşan insülin direnci hastalık tedavisinde kullanılan "cyclophosphamide" ve "mycophenolate mofetil" gibi ilaçlarla da ilgili olabilmektedir (Gehi ve diğ., 2003). Bu yüzden belki ilerideki çalışmalarda hiçbir tedavi uygulanmamış hastalarda miRNA'ların profillendirilmesi ve sitokinlerin ölçümü daha doğru bir açıklama yapılmasına yardımcı olabilir. Bu çalışmada mRNA profillendirmesinden elde edilen verilere göre gerçekten de, *IRS2* hedef geninin böbrek

tutulumu olan hastalarda böbrek tutulumu olmayanlara göre yaklaşık 2.47 kat arttığı görülmektedir. Bu veri de IRS2 geninin hsa-miR766-3p tarafından düzenlendiği hipotezini güçlendirmektedir (Şekil 5.1).

Antimalaryal ajanlar, klorokin ve hidroklorokin, romatoid artrit ve sistemik lupus eritematozus tedavisinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu ilaçların makrofaj ve diğer antijen sunan hücrelerin antijen işleme mekanizması ile negatif yönde etkileri olduğu bildirilmektedir (Fox, 1993).

Diğer taraftan bazı çalışmalarda bu ilaçların melanine bağlanarak hastalarda hiperpigmentasyona yol açabildiği öne sürülmüştür (Puri ve diğ., 2008; Jallouli ve diğ., 2013). Bu ilacın otofajiyi önleyip apoptozu uyarması, hsa-miR-933'deki artışın bir nedeni olabilir.

Literatür bilgilerine göre hsa-miR-3675-3p, hsa-miR-4313, has-miR-933, has-miR-1304-3p, hsa-miR-2116-3p, hsa-miR-3195 ve hsa-miR-365a-3p'nin SLE'li hastalarda etkili oldukları ilk kez bu çalışmada rapor edilmiştir.

SLE hastalarının PBMC hücrelerinde 9 miRNA'nın anlatımının yükseldiğini gösterilmiş, ancak bu miRNA'ların sadece ikisinin plazma örneklerinde saptandığı belirlenmiştir (Dai ve diğ., 2007; Wang ve diğ., 2012). Bu çalışmada da serumda saptanan 10 miRNA'dan sadece 2'sinin (hsa-mir-1825, hsa-mir-574-5p) diğer benzer çalışmalarla ortak olduğu belirlenmiştir. Bu sonuçlar SLE hastalarında miRNA'ların PBMC'lerden seçici olarak serbest bırakıldığını veya salgılandığını ve miRNA'ların seçici salgılanmasıyla ilgili bir mekanizmanın varolabileceğini düşündürmektedir. Bu yüzden hastalığa özgü dolaşımdaki biyomarkır miRNA'ların tanımlanması için böyle bir mekanizmanın olup olmadığı araştırılmalıdır.

Şaşırtıcı bir şekilde, SLE hastalarının serumunda SLE biomarkırı olarak öne sürülen hsa-miR-155 ve hsa-miR-146a'nın düzeylerinde anlamlı bir değişiklik bulunmamıştır. 2010'da Wang ve arkadaşları, SLE hasta serumlarında hsa-miR-155 ve hsa-miR-146a düzeylerinin anlamlı miktarda azaldığını göstermelerine rağmen (Wang ve diğ., 2010) plazma örneklerinde bir fark bulamamışlardır (Wang ve diğ., 2012). Ancak bu grup, çalışmanın devamında QRT-PCR kullanarak aday miRNA'ların dolaşımdaki düzeylerini araştırdıklarında SLE ile ilişkili hsa-miR-155 ve hsa-miR-146a'nın anlatım

düzeylerinde anlamlı düşüş saptamıştır. miRNA düzeylerine ilişkin bu değişik sonuçlar, ancak çeşitli teknolojilerde sağlanan farklı usul ve özgüllük ayarlarıyla açıklanabilir. Bu durumda elde edilen verilerin mutlak surette q-PCR veya mRNA profillendirilmesiyle onaylanması gerekliliği ortaya çıkmaktadır.

SLE hastalarında böbrek tutulumu olan ve olmayanlar arasında bireylerin dolaşımdaki miRNA düzeylerinin profili karşılaştırıldığında hsa-miR-5571-5p (22. kromozomda şifrelenen) ve hsa-miR-766-3p'nin (X kromozomda şifrelenen) anlatım düzeyinde anlamlı düşüşler (29.61 ve 20.76 kat) saptanmıştır.

Genetik özellikler, hormonal farklılıklar, bağışıklık sisteminin işliyişi ve erkek/dişi cinsiyet farkı, biyolojik davranış şekilleri, kadınlarda hastalığın gelişiminde önemli bir rol oynayabilir. Kadınlarda 2 X kromozomu olması da onlarda otoimmün hastalıkların oluşumu için zemin hazırlayabilir. Kadınlarda X-kromozom inaktivasyonuna rağmen, X'e bağlı genlerin yaklaşık %15'i bu işlemde kaçarlar (Berletch ve diğ., 2011). Önceki çalışmalar, X kromozomu üzerinde kodlanan bazı bağışıklık sistemi genlerinin, DNA demetilasyonundan dolayı X kromozomunun inaktivasyon işleminden kaçabildiğini göstermiştir. Bu tür genlerin aşırı sentezlenmesi T hücrelerinde otoreaktiviteyi neden olabilir ki, bu da lupus hastalığında görülmüştür (Lu ve diğ., 2007). Ayrıca X kromozomu, 1. kromozom hariç (134 miRNA), otozomal kromozomlarla karşılaştırıldığında en fazla miRNA genini (113) kodlarken Y kromozomu sadece 2 miRNA genini kodlar. Kadınlarda erkeklere kıyasla bazı X'e bağlı miRNA'ların aşırı transkripsiyonu, X kromozomunun inaktivasyon işleminden (XCI) kaçması olasılığının sonucu miRNA'larda transkripsiyonun indüklenmesi ve her iki X allelinden transkripsiyon olması nedeniyle olabilir. miRNA genlerinin transkripsiyon düzeyinde düzenlenmesinde östrojen aracılı nükleusa ait reseptörlere bağlanma bir rol oynayabilir. Bütün bu nedenlerle X'e bağlı miRNA'lar hastalık patogenezinde etkili olabilir.

Tablo 4.8 'de, X-ilişkili miRNA (hsa-miR-766-3p) için, sitokin ilişkili değişik yollarda temel rolleri olan hedef genlerin tahminleri gösterilmektedir. Ancak bu miRNA: hedef mRNA çiftlerinin çoğu deneysel olarak doğrulanmalıdır. Hewagama ve arkadaşları (2013) tarafından yapılan bir çalışmada aktif lupusu olan kadın hastaların CD4⁺ T hücrelerinde hsa-mir-766-3p'nin aşırı sentezlendiği gösterilmiştir. Aynı

çalışmada TargetScan, “DAVID” ve “ConceptGen” programları kullanarak (“Suppressor of Cytokine Signaling1”; **SOCS1**) ve (“*c-Cbl, Cbl proto-oncogene*”; **CBL**), potansiyel hedef genler olarak tahmin edilmiştir (Hewagama ve diğ., 2013). Araştırmacılar başka bir çalışmada elde edilen miRNA sonuçlarını sadece TargetScan programını kullanarak değerlendirmiştir. TargetScan tahmin programına göre bu miRNA'nın potansiyel olarak SOCS1, (“Suppressor of Cytokine Signaling 3”; **SOCS3**) ve (“Programmed Cell Death 1”; **PDCD1**) gibi, bağışıklık sisteminin negatif düzenleyici proteinlerinin anlatımını düzenlediği belirtilmektedir (Hewagama, 2013). Bu çalışmada ise 4.2.2.2’de belirtildiği gibi hedef tahminlerin yanlış pozitif sonuçlarını mümkün olduğunca azaltmak için 3 bağımsız programdan (microRNAorg, TargetScan ve PITA) yararlanılmıştır. Her üç yazılım tarafından onaylanan hedef genler çalışma kapsamına alınmıştır. Sonuçlar arasında elde edilen (“Phosphatidylinositol 3-kinase regulatory subunit alpha”; **PIK3R1**) ve IRS2 ($P=0.00001$) proteinlerinin PI3K-AKT-mTOR yolağında rolleri oldukları bilinmektedir. Bu çalışmadan ve diğer çalışmalardan elde edilen farklı sonuçlar biyoinformatik programların hiçbirisinin, diğerlerine göre doğruluk açısından daha üstün olmadığını göstermektedir.

Yapılan literatür taramasına göre 22. kromozomda şifrelenen hsa-miR-5571-5p, SLE veya böbrek tutulumu ile ilgili yapılan çalışmalarda daha önce bulunmamıştır. 2012’de Sjögren sendromu patogenezinde rol oynayabilen yeni miRNA dizilerini tanımlamak için yeni nesil dizileme, (“Next Generation Sequencing”; **NGS**) yöntemini kullanan araştırmacılar bu miRNA’yı bulmuşlar, ancak Taqman PCR deneylerinde bu veriyi doğrulayamamışlardır (Tandon ve diğ., 2012). Sjögren sendromu da otoimmün bir hastalık olmasından dolayı bu miRNA'nın otoimmünite ile ilişkili olabileceği ve gelecekte otoimmün özgülüğü olan potansiyel prognostik aday markır olarak kabul edilebileceği ileri sürülebilir.

SLE hastalarda böbrek tutulum ve kompleman (C3 ve/ya C4) eksikliklerinin eşzamanlılığı dikkate alındığında, hsa-miR-5571-5p ve hsa-miR-766-3p'nin anlatım düzeyinde anlamlı düşüşler saptanmıştır. Ancak bu düşüşlerin daha ılımlı olduğu gözlenmiştir (örneğin: C3 eksikliği durumlarda renal tutumlu olmayan SLE hastalarında hsa-miR-5571-5p, 6.32 kat düşüş göstermiştir). Bu değişikliğin nedeni olarak miRNA'ların %CG değerlerinin yüksek olmasından dolayı kompleman yolağı ile ilişkili

hedef mRNA'lara da bağlanabilecekleri söylenebilir. Ancak tez kapsamında hedef öngörülere sadece sitokinler ile ilişkili genler için yapılmıştır.

Renal tutulumlu olan SLE hastaları arasında, C4 konsantrasyonu yeterli olmayanlar ile C4 konsantrasyonu yeterli olanlar karşılaştırıldığında, hsa-miR-4731-3p'nin 9.15 kat daha az sentezlendiği belirlenmiştir ($p = 0.028$). Web taramalarında bu miRNA ile ilgili hiçbir bilgi elde edilememiştir.

Renal tutumlu olmayan SLE hastaları arasında, pozitif ANA test sonucu olanlar ile negatif ANA test sonucu olanlar karşılaştırıldığında, hsa-miR-5697'nin 32.87 kat ve hsa-miR-621'in 26.38 kat daha az sentezlendiği belirlenmiştir. Bu değişimler oldukça anlamlı ve yüksek olmalarına rağmen hsa-miR-5697 sadece 2009'da yapılan bir çalışmada metastatik olmayan prostat kanserinde biomarkır olarak rapor edilmiştir (Makarov ve diğ., 2009).

TargetScan ve PicTar tahmin programları kullanıldığında, bir serin-proteaz enzimi olan, kallikrein ile ilişkili peptidaz 9 ("*Kallikrein-related peptidase 9*"; *KLK9*) hsa-miR-621'in potansiyel hedef geni olarak bulunmuştur (Yousef ve White, 2012). Hipertansiyon, SLE ve Lupus nefropatinin en önemli semptomlarından biridir. KLK9'un idrarla atılımı hipertansiyon varlığında artar. Hipertansiyon varlığında KLK9'un üriner atılımının nedeni tübüler emilimi ("*tubular reabsorption*") azalması olarak görülür. KLK9, hipertansif nefropatinin başlamasından önce, lupus gibi durumlarda, hipertansiyon varlığında idrarda görünür (Blázquez-Medela ve diğ., 2012). Pozitif ANA test sonucu aktif SLE'nin bir göstergesidir ve bu çalışmada dahil olan hastaların bir kısmı (16 hastadan 7'si) aynı zamanda hipertansiyon hastasıdır. KLK9'un hsa-miR-621'in potansiyel hedef geni olduğu kabul edilirse, hsa-miR-621'in daha az sentez edilmesi, bu proteazın vücutta gerekli olmasından dolayı KLK9 üzerindeki baskılıyıcı etkiyi ortadan kaldırabilir. Bu hipotezin başka çalışmalarla doğrulanması gerekir. Eğer böbrek tutulumu olmayan ancak hipertansiyonu olan SLE hastalarının idrarlarında yüksek miktarda KLK9 ölçülürse ve aynı zamanda hsa-miR-621'nin düşüşü kanıtlanırsa, bu miRNA ilerideki böbrek tutulumunu için prognostik bir markır olarak düşünülebilir.

Bu çalışmada biyoinformatik tahminlerin doğruluğunun kanıtlanması için ayrıca tüm gruplarda mRNA anlatım profillendirmesi de yapılmış ve mRNA profillendirmesinden elde edilen veriler hedef genler için sorgulanmıştır. mRNA profillendirmesinde de sadece sitokin ilişkili genler ve ilgili yollar dikkate alınmıştır. Bunlar ile ilgili çok gen bulunmasına rağmen *ERBB3* ve *IRS2* hariç, diğerleri tahmini hedef sonuçları ile örtüşmemiştir. Bu da söz konusu genlerin miRNA'lar ile değil, başka faktörler aracılığı ile düzenlenmiş olabileceğini göstermektedir.

Çalışma sırasında elde edilen verilerden çıkan önemli sonuçlardan biri, *ERBB3* geninin mRNA'sının has-miR-149-5p tarafından translasyon düzeyinde inhibisyona uğratılmasıdır. Ancak, SLE hastalarında saptanan diğer miRNA'larla ilgili öngörülen hedef genlerin anlatımı için benzer mekanizma doğrulanamamıştır. Bu sonuç gen anlatımının sadece post-transkripsiyonel aşamada hedef genin mRNA'sını yıkarak değil, aynı zamanda translasyon baskılanmasıyla da düzenleyebileceğini düşündürmektedir. Bu yüzden anlatımı değişen miRNA'ları doğrulamak ve onlarla SLE arasındaki ilişkiyi kurmak için deneysel olarak fonksiyon çalışmaları yapılmalıdır.

Çalışmada sitokin genlerinin mRNA profilinin yapılması için periferik kan mononükleer hücreleri (PBMC) kullanıldı. Olgun memeli eritrositleri nükleus ve mitokondri içermez, oysa kemik iliğinden serbest bırakılan, olgunlaşmamış retikülositlerde nükleus bulunmaktadır. Bu hücreler, dolaşımdaki insan kanının her mikrolitresinde 4,000,000 – 6,000,000 kadar bulunan eritrositlerin toplam sayısının %1'ni kapsamaktadır. Bu, olgunlaşmamış kırmızı kan hücrelerinden yaklaşık 40.000 - 60.000 nükleusun dolaşıma girmesi anlamına gelmektedir (Morin ve diğ., 2001; Schwochow ve diğ., 2012). Eğer bu hücreler uygun bir biçimde uzaklaştırılmazsa hemoglobin gibi eritrositlere özgü mRNA'lar da deneye dahil olarak mikrodizilim sonuçlarını olumsuz etkileyecektir. Bu olumsuz etkiyi önlemek amacıyla, periferik kan lenfositleri (PBMC) Ficoll-Hypaque solüsyonu kullanılarak yoğunluk gradient ayırma temelli yöntem ile izole edilmiştir.

Çalışmamızda her bir örnek (sağlıklı kontrol ve SLE hasta grubu) havuz oluşturmadan ayrı ayrı incelendiği için, örneklerdeki diğer fizyolojik koşullar altında (farklı hastalıklar gibi) sentezlenmiş olan mRNA ve miRNA'ların havuz oluşturarak karışması sorunu ortadan kaldırılmıştır.

SLE hastalarının tedavi altında olmaları nedeniyle kullandıkları ilaçlar “Toll like receptor” aktivasyonunu inhibe edecektir (Willis ve diğ., 2012). Bu da proinflamatuvar sitokin sentezini ve antijen sunumunu baskılayacağı için kararlı bir sitokin ölçümü yapılamamıştır.

Çalışmada sitokin düzeyleri bakımından ne SLE hastaları ile sağlıklı bireyler arasında ve ne de lupus nefritli olan hastalar ile renal tutulumu olmayan hastalar arasında anlamlı bir fark tespit edilmemiştir.

Sonuç olarak:

(1) sağlıklı kontrollere göre SLE hastalarında anlatımı farklı olan toplam 10 miRNA’dan hsa-mir-1825, hsa-mir-933 ve hsa-mir-149-5p;

(2) renal tutulumlu vakalar renal tutulumu olmayanlar ile karşılaştırıldığında belirlenen miRNA’lardan hsa-mir-766-3p;

(3) renal tutumlu olmayıp ANA test sonucu pozitif olan hastalarla diğer gruplar karşılaştırıldığında belirlenen hsa-miR-621’in PI3K-AKT-mTOR yolağında rolleri olabileceği gösterilmiştir.

Ayrıca IL-4, IL-6 ve TNF- α gibi kanda bulunan pro-enflamatuvar sitokinlerin miktarı, hastalığın evresi ve şiddetine göre saptanan miRNA’ların sentezi üzerine etki ederek ciltteki koyu lekeler, nefropati, hipertansiyon ve insülin direncinin oluşumunda rol oynayabileceği yönünde veriler elde edilmiştir.

KAYNAKLAR

- Abbas, A.K., Murphy, K.M., Sher, A., 1996, Functional diversity of helper T lymphocytes, *Nature*, 383, 787-793.
- Abu-Shakra, M., Gladman, DD., Urowitz, MB., 2004, Mortality studies in SLE: how far can we improve survival of patients with SLE, *Autoimmun Rev*, 3 (6), 418-420.
- Ahmed, S., Ihara, K., Kanemitsu, S., Nakashima, H., Otsuka, T., Tsuzuka, K., Takeuchi, T., Hara, T., 2001, Association of CTLA-4 but not CD28 gene polymorphisms with systemic lupus erythematosus in the Japanese population, *Rheumatology.Oxford*, 40, 662-667.
- Akahoshi, M., Nakashima, H., Tanaka, Y., Kohsaka, T., Nagano, S., Ohgami, E., Arinobu, Y., Yamaoka, K., Niuro, H., Shinozaki, M., Hirakata, H., Horiuchi, T., Otsuka, T., Niho, Y., 1999, Th1/Th2 balance of peripheral T helper cells in systemic lupus erythematosus, *Arthritis and Rheumatism.*, 42 (8), 1644–8.
- Alarcon, G.S., Friedman, A.W., Straaton, K.V., Moulds, J.M., Lisse, J., Bastian, H.M., McGwin, G, J.r., Bartolucci, .A.A., Roseman, J.M., Reveille, J.D., 1999, Systemic lupus erythematosus in three ethnic groups: III. A comparison of characteristics early in the natural history of the LUMINA cohort. LUPus in MINority populations: Nature vs. Nurture, *Lupus*, 8, 197-209.
- Alarcón-Segovia, D., Alarcón-Riquelme, M.E., Cardiel, M.H., Caeiro, F., Massardo, L., Villa, A.R., Pons-Estel, B.A., 2005, GrupoLatinoamericano de Estudio del LupusEritematoso (GLADEL). Familial aggregation of systemic lupus erythematosus, rheumatoid arthritis, and other autoimmune diseases in 1,177 lupus patients from the GLADEL cohort, *Arthritis Rheum*, 52, 1138-1147.
- Alexiou, P., Maragkakis, M., Papadopoulos, G.L., Reczko, M., Hatzigeorgiou, A.G.,2009, Lost in translation: an assessment and perspective for computational microRNA target identification, *Bioinformatics*, 25 (23), 3049–3055.

- Al-Janadi, M., Al-Balla, S., Al-Dalaan, A., Raziudin, S., 1993, Cytokine profile in systemic lupus erythematosus, rheumatoid arthritis and other rheumatic disease. *J Clin Immunol.*, 13 (1), 58–67.
- Almberg, E.S., Mech, L.D., Smith, D.W., Sheldon, J.W., Crabtree, R.L., 2009, A Serological Survey of Infectious Disease in Yellowstone National Park's Canid Community, *PLoS One*, 4 (9), e7042.
- Altschul, S.F., Madden, T.L., Schaffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., Lipman, D.J., 1997, Gapped BLAST and PSI-BLAST: A new generation of protein database search programs, *Nucleic Acid Res.*, 17(25), 3389-3402.
- Anolik, J., Sanz, I., 2003, Looney RJ.B cell depletion therapy in systemic lupus erythematosus, *Curr Rheumatol Rep*, 5 (5), 350-356.
- Ansar Ahmed, S., Dauphinee, MJ., Montoya, AI., Talal, N., 1989, Estrogen induces normal murine CD5+ B cells to produce autoantibodies, *J Immunol*, 142 (8), 2647-2653.
- Ansar Ahmed, S., Talal, N., 1988, *Sex steroids, sex steroid receptors and autoimmune diseases*, In: Steroid receptors and disease : cancer, autoimmune, bone, and circulatory disorders, Sheridan, P.J., Blum, K., Trachtenberg, M.C. (ed.), Marcel Dekker Inc., New York, 0824779541 , 289-316.
- Arboleda, M.J., Lyons, J.F., Kabbinavar, F.F., Bray, M.R., Snow, B.E., Ayala, R., Danino, M., Karlan, B.Y., Slamon, D.J., 2003, Overexpression of AKT2/protein kinase Bbeta leads to up-regulation of beta1 integrins, increased invasion, and metastasis of human breast and ovarian cancer cells, *Cancer Res*, 63(1), 196-206.
- Arbuckle, M.R., McClain, M.T., Rubertone, M.V., Scofield, R.H., Dennis, G.J., James, J.A., Harley, J.B., 2003, Development of autoantibodies before the clinical onset of systemic lupus erythematosus. *N Engl J Med*, 349 (16), 1526-1533.
- Arnett, F.C., Hamilton, R.G., Roebber, M.G., Harley, J.B., Reichlin, M., 1988, Increased frequencies of Sm and nRNP autoantibodies in American blacks

compared to whites with systemic lupus erythematosus, *J Rheumatol*, 15 (12), 1773-1776.

Arroyo, J.D., Chevillet, J.R., Kroh, E.M., Ruf, I.K., Pritchard, C.C., Gibson, D.F., Mitchell, P.S., Bennett, C.F., Pogosova-Aqadjanyan, E.L., Stirewalt, D.L., Tait, J.F., Tewari, M., 2011, Argonaute2 complexes carry a population of circulating microRNAs independent of vesicles in human plasma, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108, 5003-5008.

Baker, T., 2012, Multiple miRNA Markers Associated with Angiogenesis and Tissue Injury Repair Expressed in Cytori's Cell Therapy,1131316/default.aspx, [Ziyaret tarihi: 11 Mayıs 2014]

Bao, S., Root, C., Jagasia, S., 2007, Type B insulin resistance syndrome associated with systemic lupus erythematosus, *Endocr Pract*, 13(1), 51-55.

Barch, S., Kleinhappl, B., Gutsch, A., Jelovcan, S., Marth, E., 2000, In vitro cytokine mRNA expression in normal human peripheral blood mononuclear cells, *Inflamm Res*, 49, 266–274.

Beagley, K.W., Gockel, C.M., 2003, Regulation of innate and adaptive immunity by the female sex hormones oestradiol and progesterone, *FMS Immunol Med Microbiol*. 38, 13-22.

Beezhold, K.J., Castranova, V., Chen, F., 2010, Microprocessor of microRNAs: regulation and potential for therapeutic intervention, *Mol Cancer*, 9, 134.

Benke, P.J., Dittmar, D., 1976, Human lymphocyte response to D-valine media, *Biochim. Biophys. Acta*, 451, 635–637.

Berden, J.H.M., 2003, Lupus nephritis: consequences of disturbed removal of apoptotic cells? *Ned J Med*, 61, 233-238.

Berleth, J.B., Yang, F., Xu, J., Carrel, L., Distech, C.M., 2011, Genes that escape from X inactivation, *Hum Genet*, 130, 237-245.

Bernatsky, S., Boivin, J.F., Joseph, L., Manzi, S., Ginzler, E., Gladman, D.D., Urowitz, M., Fortin, P.R., Petri, M., Barr, S., Gordon, C., Bae, S.C., Isenberg, D., Zoma, A., Aranow,

- C., Dooley, M.A., Nived, O., Sturfelt, G., Steinsson, K., Alarcón, G., Senécal, J.L., Zummer, M., Hanly, J., Ensworth, S., Pope, J., Edworthy, S., Rahman, A., Sibley, J., El-Gabalawy, H., McCarthy, T., St Pierre, Y., Clarke, A., Ramsey-Goldman, R., 2006, Mortality in systemic lupus erythematosus, *Arthritis Rheum*, 54 (8), 2550-2557.
- BIO-RAD., 2013, Bio-Plex Pro™ Assays. *Cytokines, Chemokines, and Growth Factors Instruction Manual*. 3.
- Blázquez-Medela, A., Garcia-Sanchez, O., Quiros, Y., Lopez-Hernandez, F.J., Lopez-Novoa, J. M., Martinez-Salgado, C., 2012, Urinary Excretion of KLK9 is Associated to Sustained Hypertension, Cardiac Hypertrophy and Aorta Wall Thickening, *Nephrol. Dial. Transplant*, 27 (suppl 2), ii88.
- Boom, R., Sol, C.J.A., Salimans, M.M.M., Jansen, C.L., Wertheim-Van Dillen, P.M.E., Van Der Noordaa, J., 1990, Rapid and Simple Method for Purification of Nucleic Acids, *J CLIN MICROBIOL*, 28 (3), 495–503.
- Borchers, A.T., Keen, C.L., Gershwin, M.E., 2007, Drug-induced lupus, *Ann N Y Acad Sci*, 1108, 166-82.
- Borgan, E., Navon, R., Vollan, H.K., Schlichting, E., Sauer, T., Yakhini, Z., Lingjaerde, O.C., Sorlie, T., Borresen-Dale, A.L., 2011, Ischemia caused by time to freezing induces systematic microRNA and mRNA responses in cancer tissue, *Mol Oncol*, 5, 564-576.
- Botto, M., Dell'Agnola, C., Bygrave, A.E., Thompson, E.M., Cook, H.T., Petry, F., Loos, M., Pandolfi, P.P., Walport, M.J., 1998, Homozygous C1q deficiency causes glomerulonephritis associated with multiple apoptotic bodies, *Nature Genet*, 19, 56-59.
- Bouman, A., Schipper, M., Heineman, M.J., Faas, M.M., 2004, Gender difference in the non-specific and specific immune response in humans, *Am J Reprod Immunol*, 52, 19-26.
- Böyum, A., 1968, Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood, *Scand. J. C/in. Lab. Invest*, 21(Suppl.97), 77-89.
- Breving, K., Esquela-Kerscher, A., 2010, The complexities of microRNA regulation: mirandering around the rules, *Int J Biochem Cell Biol*, 42(8):1316-1329.

- Brodersen, P., Voinnet, O., 2009, Revisiting the principles of microRNA target recognition and mode of action, *Nat Rev Mol Cell Biol*, 10, 141–148.
- Bynoe, MS., Grimaldi, CM., Diamond, B., 2000, Estrogen up-regulates Bcl-2 and blocks tolerance induction of naive B cells, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97, 2703-2708.
- Cai, Y., Yu, X., Hu, S., Yu, J., 2009, A brief review on the mechanisms of miRNA regulation, *Genomics Proteomics Bioinformatics*, 7, 147–154.
- Calvo-Alén, J., Bastian, HM., Straaton, KV., Burgard, SL., Mikhail, IS., Alarcón, GS., 2005, Identification of patient subsets among those presumptively diagnosed with, referred, and/or followed up for systemic lupus erythematosus at a large tertiary care center. *Arthritis & Rheumatism*, 38 (10), 1475–1484.
- Carlsten, H., Holmdahl, R., Tarkowski, A., 1991, Analysis of the genetic encoding of oestradiol suppression of delayed-type hypersensitivity in (NZB x NZW) F1 mice, *Immunology*, 73, 186-190.
- Carlsten, H., Tarkowski, A., Holmdahl, R., Nilsson, L.A., 1990, Oestrogen is a potent disease accelerator in SLE-prone MRL lpr/lpr mice, *Clin Exp Immunol*, 80 (3), 467–473.
- Carrabba, M., Giovine, C., Chevillard, M., Angelini, M., Ambrosi, B., Travaglini, P., 1985, Abnormalities of sex hormones in men with systemic lupus erythematosus, *Clin Rheumatol*, 4, 420-425.
- Carroll, M.C., 2004, The complement system in regulation of adaptive immunity, *Nat Immunol*, 5, 981-986.
- Carthew, R.W., Sontheimer, E.J., 2009, Origins and mechanisms of miRNAs and siRNAs, *Cell*, 136, 642–655.
- Cascicola-Rosen, L.A., Anhalt, G., Rosen, A., 1994, Autoantigen targets in systemic lupus erythematosus are clustered in two populations of surface structures on apoptotic keratinocytes, *J Ex Med*, 179, 1317-1370.

- Casciola-Rosen, L., Rosen, A., Petri, M., Schliessel, M., 1996, Surface blebs on apoptotic cells are sites of enhanced procoagulant activity: Implications for coagulation events and antigenic spread in systemic lupus erythematosus, *PNAS*, 93, 1624-1629.
- Cazénave, P.L.A., 1851, Lupus érythémateux (érythème centrifuge). *Ann Mal Peau Syph*, 3, 297-299.
- Cervera, R., Abarca-Costalago, M., Abramovicz, D., Allegri, F., Annunziata, P., Aydintug, A.O., Bacarelli, M.R., Bellisai, F., Bernardino, I., Biernat-Kaluza, E., Blockmans, D., Boki, K., Bracci, L., Campanella, V., Camps, M.T., Carcassi, C., Cattaneo, R., Cauli, A., Cervera, R., Chwalinska-Sadowska, H., Contu, L., Cosyns, J.P., Danieli, M.G., Dcruz, D., Depresseux, G., Direskeneli, H., Domènech, I., Espinosa, G., Fernández-Nebro, A., Ferrara, G.B., Font, J., Frutos, M.A., Galeazzi, M., García-Carrasco, M., GarcíaIglesias, M.F., García-Tobaruela, A., George, J., Gil, A., González-Santos, P., Grana, M., Gül, A., Haga, H.J., de Haro-Liger, M., Houssiau, F., Hughes, G.R., Ingelmo, M., Jedryka-Góral, A., Khamashta, M.A., Lavilla, P., Levi, Y., López-Dulpa, M., López-Soto, A., Maldykowa, H., Marcolongo, R., Mathieu, A., Morozzi, G., Nicolopoulou, N., Papasteriades, C., Passiu, G., Perelló, I., Petera, P., Petrovic, R., Piette, J.C., Pintado, V., de Pita, O., Popovic, R., Pucci, G., Puddu, P., de Ramón, E., Ramos-Casals, M., Rodríguez-Andreu, J., Ruiz-Irastorza, G., Sanchez-Lora, J., Sanna, G., Scorza, R., Sebastiani, G.D., Sherer, Y., Shoenfeld, Y., Simpatico, A., Sinico, R.A., Smolen, J., Tincani, A., Tokgöz, G., Urbano-Márquez, A., Vasconcelos, C., Vázquez, J.J., Verones, J., Vianna, J., Vivancos, J., 2006, European Working Party on Systemic Lupus Erythematosus, Systemic lupus erythematosus in Europe at the change of the millennium: lessons from the "Euro-Lupus Project", *Autoimmun Rev*, 5, 180-186.
- Chakravarty, E.F., Bush, T.M., Manzi, S., Clarke, A.E., Ward, M.M., 2007, Prevalence of adult systemic lupus erythematosus in California and Pennsylvania in 2000: estimates obtained using hospitalization data, *Arthritis Rheum*, 56, 2092-2094.
- Chan, R.W.Y., Lai, F.M.M., Li, E.K.M., Tam, L.S., Chow, K.M., Li, P.K.T., Szeto, C., 2006, Imbalance of Th1/Th2 transcription factors in patients with lupus nephritis, *Rheumatology*. Oxford, England, 45(8), 951-957.

- Chang, D.M, Su, W.L., Chu, S.J., 2002, The expression and significance of intracellular T helper cytokines in systemic lupus erythematosus, *Immunol. Invest*, 31 (1), 1-12.
- Chen, L.J., Lim, S.H., Yeh, Y.T., Lien, S.C., Chiu, J.J., 2012, Roles of microRNAs in atherosclerosis and restenosis, *Journal of Biomedical Science*, 19, 79.
- Chen, X., Ba, Y., Ma, L., Cai, X., Yin, Y., Wang, K., Guo, J., Zhang, Y., Chen, J., Guo, X., Li, Q., Li, X., Wang, W., Zhang, Y., Wang, J., Jiang, X., Xiang, Y., Xu, C., Zheng, P., Zhang, J., Li, R., Zhang, H., Shang, X., Gong, T., Ning, G., Wang, J., Zen, K., Zhang, J., Zhang, C.Y.2008, Characterization of microRNAs in serum: a novel class of biomarkers for diagnosis of cancer and other diseases, *Cell Res*, 18 (10), 997-1006.
- Chiari, Y., Galtier, N., 2011, RNA extraction from sauropsids blood: evaluation and improvement of methods, *Amphibia-Reptilia*, 32 (1), 136–139.
- Chomczynski, P., Sacchi, N., 1987, Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction, *Anal Biochem*, 162 (1), 156-159.
- Chua, J.H., Armugam, A., Jeyaseelan, K., 2009, MicroRNAs: biogenesis, function and applications, *Curr Opin Mol Ther*, 11, 189–199.
- Chuang, J.C., Jones, P.A., 2007, Epigenetics and MicroRNAs, *Pediatr Res*, 61, 24R–29R.
- Clowse, M.E., Magder, L.S., Witter, F., Petri, M., 2005, The impact of increased lupus activity on obstetric outcomes, *Arthritis Rheum*, 52, 514-521.
- Cohen, S., Bigazzi, P.E., Yoshida, T., 1974, Similarities of Tcell function in cell mediated immunity and antibody production. *Cell. Immunol.* 2, 150–159.
- Cohen, T., Nahari, D., Cerem, L.W., Neufeld, G., Levi, B.Z., 1996, Interleukin 6 induces the expression of vascular endothelial growth factor, *J Biol Chem*, 271,736–741.
- Cooper, G.S., Dooley, M.A., Treadwell, E.L., St Clair, E.W., Gilkeson, G.S., 2002, Hormonal and reproductive risk factors for developmentof systemic lupus erythematosus: results of a population-based, casecontrolstudy, *Arthritis Rheum*, 46, 1830-1839.

- Cortez, M.A., Calin, G.A., 2009, MicroRNA identification in plasma and serum: a new tool to diagnose and monitor diseases, *Expert Opin Biol Ther*, 9(6):703-711.
- Costenbader, K.H., Feskanich, D., Stampfer, M.J., Karlson, E.W., 2007, Reproductive and menopausal factors and risk of systemic lupus erythematosus in women, *Arthritis Rheum*, 56, 1251-1262.
- Costenbader, K.H., Karlson, E.W., 2005, Cigarette smoking and systemic lupus erythematosus: a smoking gun? *Autoimmunity*, 38, 541-547.
- Crispin, J.C., Vargas, M.I., Alcocer-Varela, J., 2004, Immunoregulatory T cells in autoimmunity, *Autoimmun Rev*, 3, 45-51.
- Crosby, M.E., Devlin, C.M., Glazer, P.M., Calin, G.A., Ivan, M., 2009, Emerging roles of microRNAs in the molecular responses to hypoxia, *Curr Pharm Des*, 15, 3861–3866.
- Cutolo, M., Wilder, R., 2000, Different roles for androgens and estrogens in the susceptibility to autoimmune rheumatic diseases, *Rheum Dis Clin North Am*, 26, 825-839.
- D’Cruz, D.P., 2006, Systemic lupus erythematosus, *BMJ*, 332 (7546), 890–894.
- Dai, R., Ahmed, S.A., 2011, MicroRNA, a new paradigm for understanding immunoregulation, inflammation, and autoimmune diseases, *Transl Res*, 157,163–179.
- Dai, Y., Huang, Y.S., Tang, M., Lv, T.Y., Hu, C.X., Tan, Y.H., Xu, Z.M., Yin, Y.B., 2007, Microarray analysis of microRNA expression in peripheral blood cells of systemic lupus erythematosus patients, *Lupus*, 16, 939-946.
- Dai, Y., Sui, W., Lan, H., Yan, Q., Huang, H., Huang, Y., 2009, Comprehensive analysis of microRNA expression patterns in renal biopsies of lupus nephritis patients, *Rheumatol. Int.*, 29 (7), 749–754.
- Danchenko, N., Satia, J.A., Anthony, M.S., 2006, Epidemiology of systemic lupus erythematosus: a comparison of worldwide disease burden. *Lupus*, 15(5), 308-318.
- Dang, C.V., Le, A., Gao, P., 2009, MYC-induced cancer cell energy metabolism and therapeutic opportunities, *Clin Cancer Res*, 15, 6479–6483.

- Davis, B.N., Hata, A., 2009, Regulation of microRNA biogenesis: a miRiad of mechanisms. *Cell Commun Signal*. Vol. 7, 18.
- Davies, E.J., Snowden, N., Haillarby, M.C., Carthy, D., Grennan, D.M., Thompson, W., Ollier, W.E., 1995, Mannose-binding protein gene polymorphisms in systemic lupus erythematosus, *Arthritis Rheum*, 38, 110-114.
- Davis-Dusenbery, B.N., Hata, A., 2010, Mechanisms of control of microRNA biogenesis, *J Biochem*, 148, 381–392.
- Dayan, M., Segal, R., Mozes, E., 1997, Cytokine manipulation by methotrexate treatment in murine experimental systemic lupus erythematosus, *J Rheumatol*, 24, 1075-1082.
- Deapen, D., Escalante, A., Weinrib, L., Horwitz, D., Bachman, B., Roy-Burman, P., Walker, A., Mack, T.M., 1992, A revised estimate of twin concordance in systemic lupus erythematosus, *Arthritis Rheum*, 35, 311-318.
- Del Aquila, L.F., Claffey, K.P., Kirwan, J.P., 1999, TNF-alpha impairs insulin signaling and insulin stimulation of glucose uptake in C2C12 muscle cells, *Am. J. Physiol*, 276 (5 Pt 1), E849-855.
- DeRisi, J., Penland, L., Brown, P.O., Bittner, M.L., Meltzer, P.S., Ray, M., Chen, Y., Su, Y.A., Trent, J.M., 1996, Use of a cDNA microarray to analyse gene expression patterns in human cancer, *Nat Genet*, 14 (4), 457-460.
- Duggan, D.J., Bittner, M., Chen, Y., Meltzer, P., Trent, J.M., 1999, Expression profiling using cDNA microarrays, *Nat Genet*, 21 (1), 10-14.
- Duvigneau, J.C., Hartl, R.T., Teinfalt, M., Gemeiner, M., 2003, Delay in processing porcine whole blood affects cytokine expression, *J Immunol Methods*, 272 (1–2), 11–21.
- Edberg, J.C., Langefeld, C.D., Wu, J., Moser, K.L., Kaufman, K.M., Kelly, J., Bansal, V., Brown, W.M., Salmon, J.E., Rich, S.S., Harley, J.B., Kimberly, R.P., 2002, Genetic linkage and association of Fcγ receptor IIIA (CD16A) on chromosome 1q23 with human systemic lupus erythematosus, *Arthritis Rheum*, 46, 2132–2140.

- Eilertsen, G.Ø., Becker-Merok, A., Nossent, J.C., 2009, The influence of the 1997 updated classification criteria for Systemic Lupus Erythematosus: epidemiology, disease presentation, and patient management, *J Rheumatol*, 36 (3), 552-559.
- Eiser, A.R., Shanies, H.M., 1994, Treatment of lupus interstitial lung disease with intravenous cyclophosphamide, *Arthritis Rheum*, 37 (3), 428-431.
- Engvall, E., Perlmann, P., 1971, Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G, *Immunochemistry*, 18, 871-874.
- Engvall, E., Perlmann, P., 1972, Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, Elisa: III. Quantitation of Specific Antibodies by Enzyme-Labeled Anti-Immunoglobulin in Antigen-Coated Tubes, *J Immunol*, 109 (1), 129-135.
- Esnault, S., Malter, J.S., 1999, Primary peripheral blood eosinophils rapidly degrade transfected granulocyte macrophage colony-stimulating factor mRNA, *J Immunol*, 163, 5228–5234.
- Etheridge, A., Lee, I., Hood, L., Galas, D., Wang, K., 2011, Extracellular microRNA: A new source of biomarkers, *Mutation Research*, 717, No.1-2, 85- 90.
- Fabian, M.R., Sonenberg, N., Filipowicz, W., 2010, Regulation of mRNA Translation and Stability by microRNAs, *Annu. Rev. Biochem*, 79, 351-379.
- Fessel, W.J., 1974, Systemic lupus erythematosus in the community. Incidence, prevalence, outcome, and first symptoms; the high prevalence in black women, *Arch Intern*, 134 (6), 1027-1035.
- Filaci, G., Bacilieri, S., Fravega, M., Monetti, M., Contini, P., Ghio, M., Setti, M., Puppo, F., Indiveri, F., 2001, Impairment of CD8⁺ T suppressor cell function in patients with active systemic lupus erythematosus, *J Immunol*, 166, 6452-6457.
- Firestein, G.S., 2008, *Kelley's textbook of rheumatology*, 8th ed., W.B. Saunders Company, Philadelphia, USA, ISBN: 1416048421, 1233.

- Foss, K.M., Sima, C., Ugolini, D., Neri, M., Allen, K.E., Weiss, G.J., 2011, miR-1254 and miR-574-5p: serum-based microRNA biomarkers for early-stage non-small cell lung cancer, *J Thorac Oncol*, 6, 482-488.
- Fox, H.S., Bond, B.L., Parslow, T.G., 1991, Estrogen regulates the IFN-gamma promoter, *J Immunol*, 146, 4362-4367.
- Fox, R.I., 1993, Mechanism of action of hydroxychloroquine as an antirheumatic drug, *Semin Arthritis Rheum*, 23(2 Suppl 1), 82-91.
- Friou, G.J., 1957, Clinical application of lupus serum: nucleoprotein reaction using fluorescent antibody technique. *J Clin Invest*, 36, 890.
- Fuss, I.J., Kanof, M.E., Smith, P.D. and Zola, H. 2009, Isolation of Whole Mononuclear Cells from Peripheral Blood and Cord Blood, *Current Protocols in Immunology*, 85:7.1.1–7.1.8.
- Gaffney, P.M., Ortmann, W.A., Selby, S.A., Shark, K.B., Ockenden, T.C., Rohlf, K.E., Walgrave, N.L., Boyum, W.P., Malmgren, M.L., Miller, M.E., Kearns, G.M., Messner, R.P., King, R.A., Rich, S.S., Behrens, T.W., 2000, Genome screening in human systemic lupus erythematosus: results from a second Minnesota cohort and combined analyses of 187 sib-pair families, *Am J Hum Genet*, 66, 547-556.
- Garzon, R., Calin, G.A., Croce, C.M., 2009, MicroRNAs in cancer. *Annu Rev Med*, 60: 167–179.
- Gayral, P., Weinert, L., Chiari, Y., Tsagkogeorga, G., Ballenghien, M., Galtier, N., 2011, Next-generation sequencing of transcriptomes: a guide to RNA isolation in nonmodel animals, *Mol Ecol Resour*, 11(4), 650–661.
- Gehi, A., Webb, A., Nolte, M., Davis, J.Jr., 2003, Treatment of systemic lupus erythematosus-associated type B insulin resistance syndrome with cyclophosphamide and mycophenolate mofetil, *Arthritis Rheum*, 48(4), 1067-1070.

- German Rodriguez-Gonzalez, F., Mustafa, D. A.M., Mostert, B., Sieuwerts, AM., 2013, The challenge of gene expression profiling in heterogeneous clinical samples, *Methods*, 59, 47–58.
- Ghildiyal, M., Xu, J., Seitz, H., Weng, Z.P., Zamore, P.D., 2010, Sorting of Drosophila small silencing RNAs partitions microRNA* strands into the RNA interference pathway, *RNA*, 16, 43–56.
- Gibbins, DJ., Ciaudo, C., Erhardt, M., Voinnet, O., 2009, Multivesicular bodies associate with components of miRNA effector complexes and modulate miRNA activity, *Nat. Cell Biol*, 11, (9), 1143–1149.
- Goldblatt, F., Isenberg, D.A., 2005, New therapies for systemic lupus erythematosus, *Clin Exp Immunol*, 140 (2), 205-212.
- Gorelik, G., Richardson, B., 2009, Aberrant T cell ERK pathway signaling and chromatin structure in lupus, *Autoimmun Rev*, 8, 196-198.
- Goto, M., Tanimoto, K., Horiuchi, Y., 1980, Natural killer cell mediated cytotoxicity in systemic lupus erythematosus: suppression by antilymphocyte antibody, *Arthritis Rheum*, 23, 1274-81.
- Gray-McGuire, C., Moser, K.L., Gaffney, P.M., Kelly, J., Yu, H., Olson, J.M., Jedrey, C.M., Jacobs, K.B., Kimberly, R.P., Neas, B.R., Rich, S.S., Behrens, T.W., Harley, J.B., 2000, Genome scan of human Systemic Lupus Erythematosus by regression modeling: evidence of linkage and epistasis at 4p16-15.2, *Am J Hum Genet*, 67 (6), 1460–1469.
- Grimaldi, C.M., 2006, Sex and systemic lupus erythematosus: the role of the sex hormones estrogen and prolactin on the regulation of autoreactive B cells, *Curr Opin Rheumatol*, 18, 456-461.
- Grimaldi, C.M., Cleary, J., Dagtas, A.S., Moussai, D., Diamond, B., 2002, Estrogen alters thresholds for B cell apoptosis and activation, *J Clin Invest*, 109, 1625-1633.

- Grimaldi, C.M., Jeganathan, V., Diamond, B., 2006, Hormonal regulation of B cell development: 17 beta-estradiol impairs negative selection of high-affinity DNA-reactive B cells at more than one developmental checkpoint, *J Immunol*, 176, 2703-2710.
- Grimson, A., Srivastava, M., Fahey, B., Woodcroft, B.J., Chiang, H.R., King, N., Degnan, B.M., Rokhsar, D.S., Bartel, D.P., 2008, Early origins and evolution of microRNAs and Piwi-interacting RNAs in animals, *Nature*, 455, 1193–U1115.
- Grossman, C.J., 1984, Regulation of the immune system by sex steroids, *Endocr Rev*, 5, 435-55.
- Gudmundsson, S., Steinsson, K., 1990, Systemic lupus erythematosus in Iceland 1975 through 1984. A nationwide epidemiological study in an unselected population, *J Rheumatol*, 17(9), 1162-1167.
- Guo, H., Ingolia, N.T., Weissman, J.S., Bartel, D.P., 2010, Mammalian microRNAs predominantly act to decrease target mRNA levels, *Nature*, 466 (7308), 835–840.
- Guo, L., Lu, Z., 2010, The Fate of miRNA* Strand through Evolutionary Analysis: Implication for Degradation As Merely Carrier Strand or Potential Regulatory Molecule? *PLoS ONE*, 5(6), e11387.
- Guy, P.M., Platko, J.V., Cantley, L.C., Cerione, R.A., Carraway, K.L., 1994, Insect cell-expressed p180 erbB3 possesses an impaired tyrosine kinase activity, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91, 8132–8136.
- Hackshaw, A., Kirkwood, A., 2011, Interpreting and reporting clinical trials with results of borderline significance, *BMJ*, 343, d3340.
- Haertel, C., Bein, G., Mueller-Steinhardt, M., Klueter, H., 2001, *Ex vivo* induction of cytokine mRNA expression in human blood samples, *J Immunol Methods*, 249, 63–71.
- Hall, R. N., Goldstein, A. L., 1984, *Endocrine regulation of host immunity*. In: Immune modulation Agents and their Mechanisms. Fenichel R.L., Chirigos M.A (ed.), Dekker, New York, USA, ISBN: 0824771788, 994- 533-63.

- Hargraves, M.M., Richmond, H., Morton, R., 1948, Presentation of two bone marrow elements: The “tart” cell and the “LE” cell. *Mayo Clin Proc*, 23, 25–28.
- Hargraves, MM., 1969, Discovery of the LE cell and its morphology. *Proc Staff Meet Mayo Clin*. Vol.44, 579.
- Harley, J.B., Harley, I.T., Guthridge, J.M., James, J.A., 2006, The curiously suspicious: a role for Epstein-Barr virus in lupus, *Lupus*, 15, 768-777.
- Hennessey, P.T., Sanford, T., Choudhary, A., Mydlarz, W.W., Brown, D., Tamas Adai, A., Ochs, M.F., Ahrendt, S.A., Mambo, E., Califano, J.A., 2012, Serum microRNA Biomarkers for Detection of Non-Small Cell Lung Cancer, *PLoS ONE*, 7(2), e32307.
- Hepburn, AL., 2001, The LE cell. *Rheumatology*. Vol.40, No.7, 826-827.
- Hermeking, H., 2010, The miR-34 family in cancer and apoptosis, *Cell Death Differ*, 17, 193–199.
- Hewagama, A., 2013, Role of X-Chromosome encoded miRNAs in Autoimmunity: Suppressing the suppressor and Female Predisposition, *Rheumatol Curr Res*, 3:118.
- Hewagama, A., Gorelik, G., Patel, D., Liyanarachchi, P., McCune, W.J., Somers, E., Gonzalez-Rivera, T., Michigan Lupus Cohort, Strickland, F., Richardson, B., 2013, Overexpression of X-linked genes in T cells from women with lupus, *J Autoimmun*, 41:60-71.
- Hochberg, M.C., 1985, The incidence of systemic lupus erythematosus in Baltimore, Maryland, 1970-1977. *Arthritis Rheum*, 28 (1), 80-86.
- Hochberg, M.C., 1997, Updating the American College of Rheumatology revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus, *Arthritis Rheum*, 40, 1725.
- Hodson, L., Skeaff, C.M., Fielding, B.A., 2008, Fatty acid composition of adipose tissue and blood in humans and its use as a biomarker of dietary intake, *Prog Lipid Res*, 47 (5), 348–380.

- Hoffman, R.W., 2004, T cells in the pathogenesis of systemic lupus erythematosus. *Clin Immunol*, 113, 4-13.
- Holbro, T., Beerli, R.R., Maurer, F., Koziczak, M., Barbas, C.F., Hynes, N.E., 2003, The ErbB2/ErbB3 heterodimer functions as an oncogenic unit: ErbB2 requires ErbB3 to drive breast tumor cell proliferation, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100 (15), 8933-8938.
- Honorati, M.C., Cattini, L., Facchini, A., 2004, IL-17, IL-1 β and TNF- α stimulate VEGF production by dedifferentiated chondrocytes, *Osteoarthr. Cartil*, 12 (9), 683-691.
- Hookham, M.B., O'Donovan, H.C., Church, R.H., Mercier-Zuber, A., Luzi, L., Curran, S.P., Carew, R.M., Droguett, A., Mezzano, S., Schubert, M., White, M.F., Crean, J.K., Brazil, D.P., 2013, Insulin receptor substrate-2 is expressed in kidney epithelium and up-regulated in diabetic nephropathy, *FEBS J*, 280 (14), 3232-3243.
- Horiuchi, T., Nishizaka Yasunga, S., Higuchi, M., Tsukamoto, H., Hayashi, K., Nagasawa, K., 1999, Association of Fas/Apo-1 gene polymorphism with systemic lupus erythematosus in Japanese, *Rheumatology*. Oxford, 38, 516-520.
- Huang, J.C., Babak, T., Corson, T.W., Chua, G., Khan, S., Gallie, B.L., Hughes, T.R., Blencowe, B.J., Frey, B.J., Morris, Q.D., 2007, Using expression profiling data to identify human microRNA targets, *Nat Methods*, 4 (12), 1045-1049.
- Huang, S., Shu, L., Easton, J., Harwood, F.C., Germain, G.S., Ichijo, H., Houghton, P.J., 2004, Inhibition of Mammalian Target of Rapamycin Activates Apoptosis Signal-regulating Kinase 1 Signaling by Suppressing Protein Phosphatase 5 Activity, *J Biol Chem*, 279 (35), 36490-36496.
- Huang, Y., Zou, Q., Song, H., Song, F., Wang, L., Zhang, G., Shen, X., 2010, A study of miRNAs targets prediction and experimental validation, *Protein Cell*, 1 (1), 979-986.
- Hübner, N., 2007, Mutations in the gene encoding the 3'-5' DNA exonuclease TREX1 are associated with systemic lupus erythematosus. *NatGenet*. Vol.39, 1065-1067.
- Hwang, H.W., Wentzel, E.A., Mendell, J.T., 2007, A hexanucleotide element directs microRNA nuclear import. *Science*. Vol.315, No.5808, 97-100.

- Ikram, N., Hassan, K., Tufail, S., 2004, Cytokines, *INT J PATHOL*, 2(1), 47-58.
- Jackson, J.G., St Clair, P., Sliwkowski, M.X., Brattain, M.G., 2004, Blockade of epidermal growth factor- or heregulin-dependent ErbB2 activation with the anti-ErbB2 monoclonal antibody 2C4 has divergent downstream signaling and growth effects, *Cancer Res*, 64 (7), 2601-2609.
- Jackson, J.J., Minton, J.A.L., Ho, M.L., Wei, N., Winkler, J.D., 1997, Expression of vascular endothelial growth factor in synovial fibroblasts is induced by hypoxia and interleukin 1 β , *J Rheumatol*, 24, 1253–1259.
- Jagadeeswaran, G., Zheng, Y., Sumathipala, N., Jiang, H.B., Arrese, E.L., Soulages, J.L., Zhang, W., Sunkar, R., 2010, Deep sequencing of small RNA libraries reveals dynamic regulation of conserved and novel microRNAs and microRNA-stars during silkworm development, *Bmc Genomics*, 11, 52.
- Jallouli, M., Francès, C., Piette, J.C., Huong, du. L.T., Moguelet, P., Factor, C., Zahr, N., Miyara, M., Saadoun, D., Mathian, A., Haroche, J., De Gennes, C., Leroux, G., Chapelon, C., Wechsler, B., Cacoub, P., Amoura, Z., Costedoat-Chalumeau, N.; Plaquenil LUpus Systemic Study Group, 2013, Hydroxychloroquine-induced pigmentation in patients with systemic lupus erythematosus: a case-control study, *JAMA Dermatol*, 149 (8), 935-940.
- James, J.A., Gross, T., Scofield, R.H., Harley, J.B., 1995, Immunoglobulin epitope spreading and autoimmune disease after peptide immunization: Sm B/B'-derived PPPGMRPP and PPPGIRGP induce spliceosome autoimmunity, *J Exp Med*, 181, 453-461.
- Janeway, C.A., Travers, P., Walport, M., Shlomchik, M., 2001, *Immunobiology: The Immune System In Health And Disease*, 5th ed., Garland Publishing, New York, USA, 216-301.
- Jayne, D., Passweg, J., Marmont, A., Farge, D., Zhao, X., Arnold, R., Hiepe, F., Lisukov, I., Musso, M., Ou-Yang, J., Marsh, J., Wulfraat, N., Besalduch, J., Bingham, S.J., Emery, P., Brune, M., Fassas, A., Faulkner, L., Ferster, A., Fiehn, C., Fouillard, L., Geromin, A., Greinix, H., Rabusin, M., Saccardi, R., Schneider, P., Zintl, F., Gratwohl, A., Tyndall, A., 2004, European Group for Blood and Marrow Transplantation; European

- League Against Rheumatism Registry. Autologous stem cell transplantation for systemic lupus erythematosus, *Lupus*, 13 (3), 168-176.
- Jin. O., Sun. L.Y., Zhou. K.X., Zhang. X.S., Feng. X.B., Mok. M.Y., Lau. C.S., 2005, Lymphocyte apoptosis and macrophage function: correlation with disease activity in systemic lupus erythematosus. *Clin Rheumatol*. Vol. 24(2),107-110.
- Johnson, A.E., Gordon, C., Palmer, R.G., Bacon, PA., 1995, The prevalence and incidence of systemic lupus erythematosus in Birmingham, England. Relationship to ethnicity and country of birth, *Arthritis Rheum*, 38(4), 551-558.
- Johnson, K., Yoon, C., Choi, Y., DeGroot, E., Samuels, I., Creasey, A., Aarden, L., 1998, Potential mechanisms for a proinflammatory vascular cytokine response to coagulation activation, *J Immunol*, 160, 1530–1535.
- Jonsson, H., Nived, O., Sturfelt, G., Silman, A., 1990, Estimating the incidence of systemic lupus erythematosus in a defined population using multiple sources of retrieval, *Br J Rheumatol*, 29, (3), 185-188.
- Jungers, P., Nahoul, K., Pelissier, C., Dougados, M., Tron, F., Bach, J.F., 1982, Low plasma androgens in women with active or quiescent systemic lupus erythematosus, *Arthritis & Rheumatism*, 25 (4), 454-457.
- Kalland, T., Strand, O., Forsberg, J.G., 1979, Long-term effects of neonatal estrogen treatment on mitogen responsiveness of mouse spleen lymphocytes, *J Natl Cancer Inst*, 63, 413-421.
- Kaposi, M., 1872, Neue Beiträge zur Kenntnis des Lupus erythematoses. *Arch Dermatol Syph*, 1, 36–78.
- Karasz, A., Ouellette, S.C., 1995, Role strain and psychological well-being in women with systemic lupus erythematosus, *Women Health*, 23 (3), 41-57.
- Karim, M.Y., Alba, P., Cuadrado, M.J., Abbs, I.C., D'Cruz, D.P., Khamashta, M.A., Hughes, G.R., 2002, Mycophenolate mofetil for systemic lupus erythematosus refractory to other immunosuppressive agents, *Rheumatology*. Oxford, .41 (8), 876-882.

- Katoh, M., Yazaki, Y., Suqimura, T., Terada, M., 1993, c-erbB3 gene encodes secreted as well as transmembrane receptor tyrosine kinase, *Biochem Biophys Res Commun*, 192(3),1189-97.
- Kaufman, K.M., Kirby, M.Y., Harley, J.B., James, J.A., 2003, Peptide mimics of a major lupus epitope of SmB/B', *Ann N Y Acad Sci*, 987, 215-229.
- Khvorova, A., Reynolds, A., Jayasena, S.D., 2003, Functional siRNAs and miRNAs exhibit strand bias, *Cell*, 115, 209–216.
- Kidd, P., 2003, Th1/Th2 Balance: The Hypothesis, its Limitations, and Implications for Health and Disease, *Alternative Medicine Review*, 8 (3), 223-246.
- Kim, T.G., Kim, K.Y., Lee, S.H., Cho, C.S., Park, S.H., Choi, H.B., Han, H., Kim, D.J., 1996, Systemic lupus erythematosus with nephritis is TNFB2 homozygote in the Korean population, *Hum Immunol*, 46, 10-17.
- Kim, V.N, Han, J., Siomi, M.C., 2009, Biogenesis of small RNAs in animals, *Nat Rev Mol Cell Biol*, 10, 126–139.
- Klinman, D.M., Steinberg, A.D., 1995, Inquiry into murine and human lupus, *Immunological reviews*, 144, 157-93.
- Kocar, I.H., Yesilova, Z., Ozata, M., Turan, M., Segul, A., Ozdemir, I., 2000, The effect of testosterone replacement treatment on immunological features of patients with Klinefelter's syndrome, *Clin Exp Immunol*, 121, 448-452.
- Kuby, J., 1997, *Immunology*, 3rd ed., WH. Freeman and Company, New York, ISBN: 9780716728689.
- Kwong, L., Chin, L., Wagner, S.N., 2007, Growth factors and oncogenes as targets in melanoma: lost in translation? *Adv Dermatol*, 23, 99-129.
- L, R.N., 2011, The type I interferon system in the etiopathogenesis of autoimmune diseases, *Ups J Med Sci*, 116, 227-237.

- Lafaille, J.J., 1998, The role of helper T cell subsets in autoimmune diseases, *Cytokine Growth Factor Rev*, 9, 139-151.
- Lahita, R.G., Bradlow, H.L., Kunkel, H.G., Fishman, J., 1979, Alterations of estrogen metabolism in systemic lupus erythematosus, *ArthritisRheum*, 22, 1195-1198.
- Lahita, R.G., Bradlow, H.L., Kunkel, H.G., Fishman, J., 1981, Increased 16 alphahydroxylation of estradiol in systemic lupus erythematosus, *J Clin Endocrinol Metab*, 53, 74-78.
- Lahita, R.G., Bradlow, L., Fishman, J., Kunkel, H.G., 1982, Estrogen metabolism in systemic lupus erythematosus: patients and family members, *Arthritis Rheum*, 25, 843-846.
- Laxminarayana, D., Khan, I.U., Mishra, N., Olorenshaw, I., Taskén, K., Kammer, G.M., 1999, Diminished levels of protein kinase A RI alpha and RI beta transcripts and proteins in systemic lupus erythematosus T lymphocytes, *J Immunol*, 162, 5639-5648.
- Lee, D., Yu, M., Lee, E., Kim, H., Yang, Y., Kim, K., Pannicia, C., Kurie, J.M., Threadgill, D.W., 2009, Tumor-specific apoptosis caused by deletion of the ERBB3 pseudo-kinase in mouse intestinal epithelium, *J. Clin. Invest*, 119, 2702–2713.
- Lee-Kirsch, M.A., Gong, M., Chowdhury, D., Senenko, L., Engel, K., Lee, Y.A., de Silva, U., Bailey, S.L., Witte, T., Vyse, T.J., Kere, J., Pfeiffer, C., Harvey, S., Wong, A., Koskenmies, S., Hummel, O., Rohde, K., Schmidt, R.E., Dominiczak, A.F., Gahr, M., Hollis, T., Perrino, F.W., Lieberman, J., Harley, J.B., Harley, I.T., Guthridge, J.M., James, J.A., 2006, The curiously suspicious: a role for Epstein-Barr virus in lupus, *Lupus*, 15, 768-777.
- Leng, X.S., McElhaney, J.E., Walston, J.D., Xie, D., Fedarko, N.S., Kuchel, G.A., 2008, ELISA and Multiplex Technologies for Cytokine Measurement in Inflammation and Aging Research, *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, 63 (8), 879–884.
- Leonard, W.J., 1999, *Fundamental Immunology*, 4th ed., Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, USA, 741–774.

- Levy, C., Khaled, M., Fisher, D.E., 2006, "MITF: master regulator of melanocyte development and melanoma oncogene". *Trends Mol Med.* Vol. 12 (9): 406– 414.
- Li, C., Feng, Y., Coukos, G., Zhang, L., 2009, Therapeutic microRNA strategies in human cancer, *AAPS J.*, 11(4), 747-57.
- Lindqvist, A.K., Steinsson, K., Johanneson, B., Kristjansdottir, H., Arnasson, A., Grondal, G., Jonasson, I., Magnusson, V., Sturfelt, G., Truedsson, L., Svenungsson, E., Lundberg, I., Terwilliger, J.D., Gyllensten, U.B., Alarcon-Riquelme, M.E., 2000, A susceptibility locus for human systemic lupus erythematosus (hSLE1) on chromosome 2q, *J Autoimmun.*, 14, 169-178.
- Lipsky, P.E., 2001, Systemic lupus erythematosus: an autoimmune disease of B cell hyperactivity, *Nat Immunol.*, 2, 764-766.
- Liu, E., Morimoto, M., Kitajima, S., Koike, T., Yu, Y., Shiiki, H., Nagata, M., Watanabe, T., Fan, J., 2007, Increased Expression of Vascular Endothelial Growth Factor in Kidney Leads to Progressive Impairment of Glomerular Functions, *J Am Soc Nephrol.*, 18 (7), 2094–2104.
- Liu, M.F., Wang, L.L., Wu, C.R., 2004, Decreased CD4+CD25+ T cells in the peripheral blood of patients with systemic lupus erythematosus, *Scand J Immunol.*, 59, 198-202.
- Lockshin, M.D., 1989, Pregnancy does not cause systemic lupus erythematosus to worsen, *Arthritis Rheum.*, 32, 665-70.
- Lockshin, M.D., 2001, Invited Review: Sex ratio and rheumatic disease, *J Appl Physiol.*, 91, 2366-2373.
- Lu, L., Zhang, L., Yi, Y., Kang, H-K., Datta, S.K., 2004, Human lupus T cells resist inactivation and escape death by upregulating COX-2, *Nat Med.*, 1-5.
- Lu, Q., Wu, A., Tesmer, L., Ray, D., Yousif, N., Richardson, B., 2007, Demethylation of CD40LG on the inactive X in T cells from women with lupus, *J Immunol.*, 179, 6352-6358.

- Lund, E., Güttinger, S., Calado, A., Dahlberg, J.E., Kutay, U., 2004, Nuclear export of microRNA precursors. *Science*. Vol.303, No.5654. 95–98.
- Luster, M.I., Hayes, H.T., Korach, K., Tucker, A.N., Dean, J.H., Greenlee, W.F., Boorman, G.A., 1984, Estrogen immunosuppression is regulated through estrogenic responses in the thymus, *J Immunol*, 133, 110-116.
- Lytle, J.R., Yario, T.A., Steitz, J.A., 2007, Target mRNAs are repressed as efficiently by microRNA-binding sites in the 5' UTR as in the 3' UTR, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 104 (23), 9667–9672.
- Maddison, P.J., 2005, *Rheumatic diseases associated with antinuclear antibodies*. Collected Reports on the Rheumatic Diseases (Series 4 “Revised”), In: Adebajo A.O., Dickson D.J. (eds.), *The Arthritis Research Campaign (arc)*. 37-43.
- Makarov, D.V., Loeb, S., Getzenberg, R.H., Partin, A.W., 2009, Biomarkers for Prostate Cancer, *Annu Rev Med*, 60, 139-151.
- Manson, J.J., Isenberg, D.A., 2003, The pathogenesis of systemic lupus erythematosus. *Ned J Med*, 61, 343-346.
- Manzi, S., 2001, Epidemiology of systemic lupus erythematosus, *Am. J. Manag. Care*, 17, S474-S479.
- Maresca, V., Flori, E., Briganti, S., Camera, E., Cario-André, M., Taïeb, A., Picardo, M., 2006, UVA-induced modification of catalase charge properties in the epidermis is correlated with the skin phototype, *J. Invest. Dermatol*, 126, 182–190.
- Masutani, K., Akahoshi, M., Tsuruya, K., Tokumoto, M., Ninomiya, T., Kohsaka, T., Fukuda, K., Kanai, H., Nakashima, H., Otsuka, T., Hirakata, H., 2001, Predominance of Th1 immune response in diffuse proliferative lupus nephritis. *Arthritis Rheum*, 44 (9), 2097–106.
- McCarty, D.J., Manzi, S., Medsger TA, Jr., Ramsey-Goldman, R., LaPorte, R.E., Kwoh, C.K., 1995, Incidence of systemic lupus erythematosus. Race and gender differences. *Arthritis Rheum*. 38 (9), 1260-1270.

- McClain, MT., Heinlen, LD., Dennis, GJ., Roebuck, J., Harley, JB., James, JA., 2005, Early events in lupus humoral autoimmunity suggest initiation through molecular mimicry, *Nat Med*, 11, 85-89.
- McCormick, R., Buffa, F.M., Ragoussis, J., Harris, A.L., 2010, The role of hypoxia regulated microRNAs in cancer, *Curr Top Microbiol Immunol*, 345, 47–70.
- McCoy, Jr. J.P., 2001, Handling, Storage, and Preparation of Human Blood Cells. *Current Protocols in Cytometry*. 5:5.1.1–5.1.13.
- McFaul, S.J., Bowman, P., Villa, V.M., Gutierrez-Ibanez, M.J., Johnson, M., Smith, D., 1994, Hemoglobin stimulates mononuclear leukocytes to release interleukin-8 and tumor necrosis factor α , *Blood*, 84, 3175–3181.
- Meehan, R.T., Dorsey, J.K., 1987, Pregnancy among patients with systemic lupus erythematosus receiving immunosuppressive therapy, *J Rheumatol*, 14, 252-258.
- Mehrain, R., Quismorio, F.P., Strassmann, G., Stimmler, M.M., Horwitz, D.A., Kitridou, R.C., Gauderman, W.J., Morrison, J., Brautbar, C., Jacob, C.O., 1998, Synergistic effects between IL-10 and bcl-2 genotypes in determining susceptibility to systemic lupus erythematosus, *Arthritis Rheum*, 41, 596-602.
- Meier, CR., Sturkenboom, MC., Cohen, AS., Jick, H., 1998, Postmenopausal oestrogen replacement therapy and the risk of developing systemic lupus erythematosus or discoid lupus, *J Rheumatol*, 25, 1515- 1519.
- Meller, S., Homey, B., Ruzicka, T., 2005, Socioeconomic factors in lupus erythematosus. *Autoimmun.Rev*, 4, 242-246.
- Merrell, M., Shulman, L.E., 1955, Determination of prognosis in chronic disease, illustrated by systemic lupus erythematosus, *J Chronic Dis*, 1 (1), 12-32.
- Meyskens, F.L., Jr, Farmer, P.J., Yang, S. Anton-Culver, H., 2007, New perspectives on melanoma pathogenesis and chemoprevention, *Recent Results Cancer Res*, 174, 191–195.

- Michet C.J., Jr., McKenna, C.H., Elveback, L.R., Kaslow, R.A., Kurland, L.T., 1985, Epidemiology of systemic lupus erythematosus and other connective tissue diseases in Rochester, Minnesota, 1950 through 1979, *Mayo Clin Proc*, 60 (2), 105-113.
- Mitchell, P.S., Parkin, R.K., Kroh, E.M., Fritz, B.R., Wyman, S.K., Pogosova-Agadjanyan, E.L., Peterson, A., Jennifer Noteboom, J., O'Briant, K.C., Allen, A., Lin, D.W., Urban, N., Drescher, C.W., Knudsen, B.S., Stirewalt, D.L., Gentleman, R., Vessella, R.L., Nelson, P.S., Martin, D.B., Tewari, M., 2008, Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. *Proc Natl Acad Sci USA*. 105, 10513–10518.
- Mok, C.C., 2010, Biomarkers for Lupus Nephritis: A Critical Appraisal, *J. Biomed. Biotechnol*, 2010, 1-11.
- Mok, C.C., 2012, Understanding lupus nephritis: diagnosis, management, and treatment options, *Int J Womens Health*, 4, 213-222.
- Mok, C.C., Lau, C.S., 2003, Pathogenesis of systemic lupus erythematosus, *J Clin Pathol*, 56, 481-490.
- Mok, C.C., Tang, S.S.K., 2004, Incidence and predictors of renal disease in Chinese patients with systemic lupus erythematosus, *Am J Med*, 117 (10), 791-795.
- Mok, C.C., Tang, S.S.K., To, C.H., Petri, M., 2005, Incidence and risk factors of thromboembolism in systemic lupus erythematosus: a comparison of three ethnic groups, *Arthritis Rheum*, 52 (9), 2774-2782.
- Morin, P.A., Chambers, K.E., Boesch, C., Vigilant, L., 2001, Quantitative PCR analysis of DNA from noninvasive samples for accurate microsatellite genotyping of wild chimpanzees (*Pan troglodytes verus*), *Mol Ecol*, 10, 1835–1844.
- Morris, D.L., Joeng, H.G., Steven, W.D., Chun, Y.J., Karras, J.G., Holsapple, M.P., 1994, Serum modulation of the effects of TCDD on the in vitro antibody response and on enzyme induction in primary hepatocytes, *Immunopharmacology*, 27, 93-105.
- Moser, K.L., Neas, B.R., Salmon, J.E., Yu, H., Gray-Mcguire, C., Asundi, N., Bruner, G.R., Fox, J., Kelly, J., Henshall, S., Bacino, D., Dietz, M., Hogue, R., Koelsch, G.,

- Nightingale, L., Shaver, T., Abdou, N.I., Albert, D.A., Carson, C., Petri, M., Treadwell, E., James, J.A., Harley, J.B., 1998, Genome scan of human systemic lupus erythematosus: Evidence for linkage on chromosome 1q in African-American pedigrees, *Proc. Natl. Acad. Sci*, 95, 14869–14874.
- Moser, M., Murphy K.M., 2000, Dendritic cell regulation of TH1-TH2 development, *Nat Immunol*, 1, 199-205.
- Mosmann, T.R., Cherwinski, H., Bond, M.W., Giedlin, M.A., Coffman, R.L., 1986, Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins, *Journal of Immunology*, 136 (7), 2348-2357.
- Naleway, A.L., Davis, M.E., Greenlee, R.T., Wilson, D.A., McCarty, D.J., 2005, Epidemiology of systemic lupus erythematosus in rural Wisconsin, *Lupus*, 14, 862-866.
- Namjou, B., Nath, S.K., Kilpatrick, J., Kelly, J.A., Reid, J., Reichlin, M., James, J.A., Harley, J.B., 2002, Genome scan stratified by the presence of anti-double-stranded DNA (dsDNA) autoantibody in pedigrees multiplex for systemic lupus erythematosus (SLE) establishes linkages at 19p13.2 (SLED1) and 18q21.1 (SLED2), *Genes Immun*, 3(Suppl 1), S35-41.
- Nath, S.K., Kilpatrick, J., Harley, J.B., 2004, Genetics of human systemic lupus erythematosus the emerging picture, *Cur Opin Immunol*, 16, 794-800.
- Navarro, C., Candia-Zúñiga, L., Silveira, L.H., Ruiz, V., Gaxiola, M., Avila, M.C., Amigo, M.C., 2002, Vascular endothelial growth factor plasma levels in patients with systemic lupus erythematosus and primary antiphospholipid syndrome, *Lupus*, 11(1), 21-24.
- Nived, O., Johansson, I., Sturfelt, G., 1992, Effects of ultraviolet irradiation on natural killer cell function in systemic lupus erythematosus, *Ann. Rheum. Dis*, 51, 726-730.
- Nived, O., Sturfelt, G., Wollheim, F., 1985, Systemic lupus erythematosus in an adult population in southern Sweden: incidence, prevalence and validity of ARA revised classification criteria, *Br J Rheumatol*, 24, (2), 147-154.

- Noonan, F.P., Zaidi, R.M., Wolnicka-Glubisz, A., Anver, M.R., Bahn, Jesse., Wielgus, A., Cadet, J., Douki, T., Mouret, S., Tucker, M.A., Popratiloff, A., Merlino, G., De Fabo, E.C., 2012, Melanoma induction by ultraviolet A but not ultraviolet B radiation requires melanin pigment, *Nat Commun*, 3, 884.
- Nossent, H.C., 2001, Systemic lupus erythematosus in the Arctic region of Norway. *J Rheumatol*, 28 (3), 539-546.
- Nossent, J.C., 1992, Systemic lupus erythematosus on the Caribbean island of Curacao: an epidemiological investigation, *Ann Rheum Dis*, 51 (11), 1197-1201.
- O'Leary, P.A., 1934, Disseminated lupus erythematosus. *Minn Med*, 17, 637-644.
- O'Toole, A.S., Miller, S., Haines, N., Zink, M.C., Serra, M.J., 2006, Comprehensive thermodynamic analysis of 3' double-nucleotide overhangs neighboring Watson-Crick terminal base pairs, *Nucleic Acids Res*, 34, 3338-3344.
- Ogawa, N., Itoh, M., Goto, Y., 1992, Abnormal production of B cell growth factor in patients with systemic lupus erythematosus, *Clin. Exp. Immunol.*, 89 (1), 26-31.
- Ohashi, Y., Creek, K.E., Pirisi, L., Kalus, R., Young, S.R., 2004, RNA degradation in human breast tissue after surgical removal: a time-course study, *Exp Mol Pathol*, 77 (2), 98-103.
- Oishi, Y., Sumida, T., Sakamoto, A., Kita, Y., Kurasawa, K., Nawata, Y., Takabayashi, H., Yoshida, S., Taniguchi, M., Saito, Y., Iwamoto, I., 2001, Selective reduction and recovery of invariant V α 24J α Q T cell receptor T cells in correlation with disease activity in patients with systemic lupus erythematosus, *J Rheumatol*, 28, 275-283.
- Okamura, K., Phillips, M.D., Tyler, D.M., Duan, H., Chou, Y.T., Lai, E.C. 2008, The regulatory activity of microRNA star species has substantial influence on microRNA and 3' UTR evolution, *Nat Struct Mol Biol*, 15, 354-363.
- Olena, A.F., Patton, J.G., 2010, Genomic organization of microRNAs, *J Cell Physiol*, 222, 540-545.
- Olsen, N.J., Kovacs, W.J., 1996, Gonadal Steroids and Immunity, *Endocr Rev*, 17, 369-384.

- Osler, W., 1895, On the visceral complications of erythema exsudativum multiforme. *Am J Med Sci*, 110, 629–646.
- Pan, H.F., Li, W.X., Yuan, H., Li, L.H., Feng, J.B., Li, J., Ye, D.Q., Li, X.P., 2009, Susceptibility to systemic lupus erythematosus may be related to gene dosage effect on the X chromosome, *Med Hypoth*, 72, 104-105.
- Pan, W., Zhu, S., Yuan, M., Cui, H., Wang, L., Luo, X., Li, J., Zhou, H., Tang, Y., Shen, N., 2010, MicroRNA-21 and microRNA-148a contribute to DNA hypomethylation in lupus CD4⁺ T cells by directly and indirectly targeting DNA methyltransferase 1, *J. Immunol.*, 184 (12), 6773–6781.
- Park, K., Li, Q., Rask-Madsen, C., Mima, A., Mizutani, K., Winnay, J., Maeda, Y., D'Aquino, K., White, M.F., Feener, E.P., King, G.L., 2013, Serine phosphorylation sites on IRS2 activated by angiotensin II and protein kinase C to induce selective insulin resistance in endothelial cells, *Mol. Cell. Biol*, 33(16), 3227-3241.
- Parks, C.G., Cooper, G.S., 2006, Occupational exposures and risk of systemic lupus erythematosus: a review of the evidence and exposure assessment methods in population- and clinic-based studies, *Lupus*, 15, 728-736.
- Pauley, K.M., Cha, S., Chan, E.K., 2009, MicroRNA in autoimmunity and autoimmune diseases, *J Autoimmun*, 32, 189-194.
- Peeva, E., Venkatesh, J., Diamond, B., 2005, Tamoxifen blocks estrogeninduced B cell maturation but not survival, *J Immunol*, 175, 1415-1423.
- Pender, M.P., 2003, Infection of autoreactive B lymphocytes with EBV, causing chronic autoimmune diseases, *Trends Immunol*, 24, 584-588.
- Peng, S.L., Moslehi, J., Craft, J., 1997, Roles of Interferon-gamma and Interleukin-4 in Murine Lupus, *J Clin Invest*, 99:1936-1946.
- Pertselmidis, A., Fondon, J.W., 2001, Having a BLAST with bioinformatics (and avoiding BLASTphemy), *Genome biol.*, 2(10), 1-10.

- Peschken, C.A., Esdaile, J.M., 2000, Systemic lupus erythematosus in North American Indians: a population based study. *J. Rheumatol*, 27, 1884-1891.
- Petri, M., Howard, D., Repke, J., 1991, Frequency of lupus flare in pregnancy. The Hopkins Lupus Pregnancy Center experience, *ArthritisRheum*, 34, 1538-45.
- Place, R.f., Li, L.C., Pookot, D., Noonan, E.J., Dahiya, R., 2008, MicroRNA-373 induces expression of genes with complementary promoter sequences, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 105 (5), 1608–1613.
- Poliseno, L., Haimovic, A., Segura, M.F., Hanniford, D., Christos, P.J., Darvishian, F., Wang, J., Shapiro, R.L., Pavlick, A.C., Berman, R.S., Hernando, E., Zavadil, J., Osman, I., 2012, Histology-Specific MicroRNA Alterations in Melanoma, *J Invest Dermatol*, 132 (7), 1860 -1868.
- Pons-Estel, B.A., Catoggio, L.J., Cardiel, M.H., Soriano, E.R., Gentiletti, S., Villa, AR., Abadi, I., Caeiro, F., Alvarellos, A., Alarcon-Segovia, D., 2004, The GLADEL multinational Latin American prospective inception cohort of 1,214 patients with systemic lupus erythematosus: ethnic and disease heterogeneity among "Hispanics", *Medicine (Baltimore)*, 83, 1-17.
- Pons-Estel, G.J., Alarcon, G.S., Scofield, L., Reinlib, L., Cooper, G.S., 2010, Understanding the epidemiology and progression of systemic lupus erythematosus, *Semin.Arthritis Rheum*, 39, 257-268.
- Prete, P.E., 1985a, Effects of L-canavanine on immune function in normal and autoimmune mice: disordered B-cell function by a dietary amino acid in the immunoregulation of autoimmune disease, *Can J Physiol Pharmacol*, 63, 843-854.
- Prete, P.E., 1985b, The mechanism of action of L-canavanine in inducing autoimmune phenomena, *Arthritis Rheum*, 28, 1198-200.
- Prokunia, L., Catillejo-lopez, C., Oberg, F., Gunnarsson, I., Berg, L., Magnusson, V., Brookes, A.J., Tentler, D., Kristjansdottier, H., Gröndal, G., Bolstad, A.I., Svenungsson, E., Lundberg, I., Sturfelt, G., Jönssen, A., Truedsson, L., Lima, G., Alcocer-Varela, J., Jonsson, R., Gyllensten, U.B., Harley, J.B., Alarcón-Segovia, D., Steinsson, K.,

- Alarcón-Riquelme, M.E., 2002, A regulatory polymorphism in PDCD1 is associated with susceptibility to systemic lupus erythematosus in humans, *Nat Genet*, 32, 666-669.
- Puri, P.K., Lountzis, N.I., Tyler, W., Ferringer, T., 2008, Hydroxychloroquine-induced hyperpigmentation: the staining pattern, *J Cutan Pathol.*, 35(12), 1134-1137.
- Quackenbush, J., 2006, Microarray Analysis and Tumor Classification, *N. Engl. J. Med*, 354, 2463–2472.
- Quezada, S.A., Eckert, M., Adeyi, O.A., Schned, A.R., Noelle, R.J., Burns, C.M., 2003, Distinct mechanisms of action of anti-CD154 in early versus late treatment of murine lupus nephritis, *Arthritis Rheum*, 48 (9), 2541-2554.
- Rainen, L., Oelmueller, U., Jurgensen, S., Wyrich, R., Ballas, C., Schram, J., Herdman, C., Bankaitis-Davis, D., Nicholls, N., Trollinger, D., Tryon, V., 2002, Stabilization of mRNA Expression in Whole Blood Samples, *Clin Chem*, 48 (11), 1883–1890.
- Raman, K., Mohan, C., 2003, Genetic underpinnings of autoimmunity--lessons from studies in arthritis, diabetes, lupus and multiple sclerosis, *Curr Opin Immunol*, 15, 651-659.
- Ranade, A.R., Cherba, D., Sridhar, S., Richardson, P., Webb, C., Paripati, A., Bowles, B., Weiss, G.J., 2010, MicroRNA 92a-2: a biomarker predictive for chemoresistance and prognostic for survival in patients with small cell lung cancer, *J Thorac Oncol*, 5, 1273-1278.
- Ravanat, J. L., Douki, T., Cadet, J., 2001, Direct and indirect effects of UV radiation on DNA and its components, *J. Photochem. Photobiol*, 63, 88–102.
- Reichlin, M., Harley, JB., 1988, Immune response to the RNA protein particles in systemic lupus erythematosus. A distinctive dichotomy. *Am J Med*. 85 (6A), 35-37.
- Richards C.D., Gauldie J., 1998, *Role of cytokines in acute-phase response*, Human cytokines: their Role in Disease and Therapy, In: Aggarwal, B.B, Puri, P. (ed.), Blackwell Science., Cambridge, 253-269.
- Ro, S., Park, C., Young, D., Sanders, K.M., Yan, W., 2007, Tissue-dependent paired expression of miRNAs, *Nucleic Acids Res*, 35, 5944–5953.

- Rowell, N.R., 1997, Some historical aspects of skin disease in lupus erythematosus. *Lupus*, 6, 76-83.
- Royce, T.E., Rozowsky, J.S., Bertone, P., Samanta, M., Stolc, V., Weissman, S., Snyder, M., Gerstein, M., 2005, Issues in the analysis of oligonucleotide tiling microarrays for transcript mapping, *Trends Genet*, 21, 466-475.
- Rui, L., White, M.F., 2004, *The Role of Insulin Receptor Substrate Proteins in Insulin Signaling and Metabolic Regulation*. Diabetes Mellitus: A Fundamental and Clinical Text, In: LeRoith, D., Taylor, S.I., Olefsky, J.M. (ed.), Chapter 14, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, USA, ISBN: 978-0781740975, 207-223.
- Rus, V., Hochberg, M., 2002, *The Epidemiology of Systemic Lupus Erythematosus*, Dubois' Lupus Erythematosus, 6th ed., In: Wallace, D., Hahnnahs, B. (ed.), 4, Elsevier, USA, ISBN-10: 1437718930- 34-44.
- Russ, R., Slack, F.J., 2012, Cigarette-Smoke-Induced Dysregulation of MicroRNA Expression and Its Role in Lung Carcinogenesis, *Pulmonary Medicine*, 2012, ID 791234.
- Saito, Y., Liang, G., Egger, G., Friedman, J.M., Chuang, J.C., Coetzee, G.A., Jones, P.A., 2006, Specific activation of microRNA-127 with downregulation of the proto-oncogene BCL6 by chromatin-modifying drugs in human cancer cells, *Cancer Cell.*, 9(6):435-443.
- Salmon, J.E., Millard, S., Schachter, L.A., Arnette, F.C., Ginzler, E.M., Gourley, M.F., Ramsey-Goldman, R., Peterson, M.G., Kimberly, R.P., 1996, Fc gamma RIIA alleles are heritable risk factors for lupus nephritis in African Americans, *J Clin Invest*, 97, 1348-1354.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T., 1989, *Electrophoresis of RNA through gels containing formaldehyde*, Molecular Cloning, 2nd ed., In: CSH Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, USA, 7.43-7.45.

- Sanchez-Guerrero, J., Karlson, EW., Liang, MH., Hunter, DJ., Speizer, FE., Colditz, GA., 1997, Past use of oral contraceptives and the risk of developing systemic lupus erythematosus, *Arthritis Rheum*, 40, 804-808.
- Sanchez-Guerrero, J., Liang, MH., Karlson, EW., Hunter, DJ., Colditz, GA., 1995, Postmenopausal estrogen therapy and the risk of developing systemic lupus erythematosus, *Ann Intern Med*, 122, 430-430.
- Sapolsky, RM., 2005, The Influence of Social Hierarchy on Primate Health, *Science*, 308 (5722), 648–652.
- Sarzi-Puttini, P., Atzeni, F., Iaccarino, L., Doria, A., 2005, Environment and systemic lupus erythematosus: an overview, *Autoimmunity*, 38, 465-472.
- Sato, F., Tsuchiya, S., Meltzer, S.J., Shimizu, K., 2011, MicroRNAs and epigenetics, *FEBS*, 278 (10), 1598–1609.
- Sato, N., Ohsawa, I., Takagi, M., Gohda, T., Horikoshi, S., Shirato, I., Yamaguchi, Y., Tomino, Y., 2010, Type B insulin resistance syndrome with systemic lupus erythematosus, *Clin Nephrol*, 73 (2), 157-62.
- Sava, V., Mosquera, D., Song, S., Cardozo-Pelaez, F., Sánchez-Ramos, J.R., 2004, Effects of melanin and manganese on DNA damage and repair in PC12-derived neurons, *Free Radic Biol Med*, 36(9), 1144-1154.
- Schiemann, B., Gommerman, J.L., Vora, K., Cachero, T.G., Shulga-Morskaya, S., Dobles, M., Frew, E., Scott, M.L., 2001, An essential role for BAFF in the normal development of B cells through a BCMA independent pathway, *Science*, 293, 2111-2114.
- Schur, PH., 1995, Genetics of Systemic Lupus Erythematosus, *Lupus*, 4, 425-437.
- Schwarz, D.S., Hutvagner, G., Du, T.T., Xu, Z.S., Aronin, N. Zamore, P.D., 2007, Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex, *Cell*, 131, 30-40.
- Schwochow, D., Serieys, L.E.K., Wayne, R.K., Thalmann, O., 2012, Efficient recovery of whole blood RNA - a comparison of commercial RNA extraction protocols for highthroughput applications in wildlife species, *BMC Biotechnology*, 12, 33.

- Scofield, R.H., Bruner, G.R., Namjou, B., Kimberly, R.P., Ramsey-Goldman, R., Petri, M., Reveille, J.D., Alarcón, G.S., Vilá, L.M., Reid, J., Harris, B., Li, S., Kelly, J.A., Harley, J.B., 2008, Klinefelter's syndrome (47,XXY) in male systemic lupus erythematosus patients: support for the notion of a genedose effect from the X chromosome, *Arthritis Rheum*, 58, 2511-2517.
- Segal R., Bermas B.L., Dayan M., Kalush F., Shearer G.M., Mozes E. 1997, Kinetics of Cytokine Production in Experimental Systemic Lupus Erythematosus, *J Immunol*, 158, 3009-3016.
- Selmi, C., 2008, The X in sex: how autoimmune diseases revolve around sex chromosomes, *Best Pract Res Clin Rheumatol*, 22 (5), 913–922.
- Shai, R., Quismorio, F.P., Li, L., Kwon, O.J., Morrison, J., Wallace, D.J., Neuwelt, C.M., Brautbar, C., Gauderman, W.J., Jacob, C.O., 1999, Genome-wide screen for systemic lupus erythematosus susceptibility genes in multiplex families, *Hum Molec Genet*, 8, 639-644.
- Shames, R. S., 2002, Gender differences in the development and function of the immune system, *J Adolesc Health*, 30, 59-70.
- Sherer, Y., Gorstein, A., Fritzler, M.J., Shoenfeld, Y., 2004, Autoantibody explosion in systemic lupus erythematosus: more than 100 different antibodies found in SLE patients, *Semin Arthritis Rheum*, 34, 501-537.
- Shlomchik, M.J., Craft, J.E., Mamula, M.J., 2001, From T and B and back again: positive feedback in systemic autoimmune disease, *Nat Rev Immuno*, 1, 147-153.
- Siegel, M., Lee, S.L., 1973, The epidemiology of systemic lupus erythematosus, *Semin. Arthritis Rheum*, 3 (1), 1-54.
- Simon, J.D., Peles, D., Wakamatsu, K., Ito, S., 2009, Current challenges in understanding melanogenesis: bridging chemistry, biological control, morphology, and function. *Pigment Cell. Melanoma Res.* 22, 563–579.

- Singh V.K, Mehrotra S., Agarwal S.S., 1999, The paradigm of Th1 and Th2 cytokines: its relevance to autoimmunity and allergy, *Immunol Res*, 20,147-161.
- Singh, A.K., Yang, J.Q., Parekh, V.V., Wei, J., Wang, C.R., Joyce, S., Singh, R.R., Van Kaer, L., 2005b, The natural killer T cell ligand alpha-galactosylceramide prevents or promotes pristane-induced lupus in mice, *Eur J Immunol*, 35 (4), 1143-1154.
- Singh, R.R., 2005a, SLE: translating lessons from model systems to human disease, *Trends in immunology*, 26 (11), 572-579.
- Siomi, H., Siomi, M.C., 2010, Posttranscriptional regulation of microRNA biogenesis in animals, *Mol. Cell*, 38 (3), 323–332.
- Sirianni, M.C., Tagliaferri, F., Aiuti, F., 1990, Pathogenesis of natural killer cell deficiency in AIDS, *Immunol Today*, 11, 81-2.
- Sithanandam, G., Fornwald, L.W., Fields, J., Anderson, L.M., 2005, Inactivation of ErbB3 by siRNA promotes apoptosis and attenuates growth and invasiveness of human lung adenocarcinoma cell line A549, *Oncogene*, 24, 1847–1859.
- Sithanandam. G., Smith, G.T., Masuda, A., Takahashi, T., Anderson, L.M., Fornwald, L.W., 2003, Cell cycle activation in lung adenocarcinoma cells by the ErbB3/phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway, *Carcinogenesis*, 24 (10), 1581-1592.
- Sodowich, B.I., Fadl, I., Burns, C., 2007, Method validation of in vitro RNA transcript analysis on the Agilent 2100 Bioanalyzer, *Electrophoresis*, 28, 2368-2378.
- Somers, E.C., Thomas, S.L., Smeeth, L., Schoonen, W.M., Hall, A.J., 2007, Incidence of systemic lupus erythematosus in the United Kingdom, 1990-1999, *Arthritis Rheum*, 57, 612-618.
- Sontheimer, R.D., 1979, The lexicon of cutaneous lupus erythematosus: a review and personal perspective on the nomenclature and classification of the cutaneous manifestations of lupus erythematosus. *Lupus*, 6, 84-95.

- Stahl-Hallengren, C., Jonsen, A., Nived, O., Sturfelt, G., 2000, Incidence studies of systemic lupus erythematosus in Southern Sweden: increasing age, decreasing frequency of renal manifestations and good prognosis, *J Rheumatol*, 27(3), 685-691.
- Sutherland, M.A., Niekamp, S.R., Rodriguez-Zas, S.L., Salak-Johnson, J.L., 2006, Impacts of chronic stress and social status on various physiological and performance measures in pigs of different breeds, *J Anim Sci*, 84 (3), 588–596.
- Takwi, A., Li, Y., 2009, The p53 pathway encounters the MicroRNA world, *Curr Genomics*, 10, 194–197.
- Tan, E.M., Cohen, A.S., Fries, J.F., Masi, A.T., McShane, D.J., Rothfield, N.F., Schaller, J.G., Talal, N., Winchester, R.J., 1982, The 1982 revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*, 25, 1271-1277.
- Tandon, M., Gallo, A., Jang, S.I., Illei, G.G., Alevizos, I., 2012, Deep sequencing of short RNAs reveals novel microRNAs in minor salivary glands of patients with Sjögren's syndrome, *Oral Dis*, 18(2), 127–131.
- Tanner, M.A., Nberk, L.S., Felten, D.L., Blidy, A.D., Nbit, S.L., Ruff, D.W., 2002, Substantial changes in gene expression level due to the storage temperature and storage duration of human whole blood, *Clin Lab Haematol*, 24 (6), 337–341.
- Tanriverdi, F., Silveira, L.F.G., MacColl, G.S., Bouloux, P.M.G., 2003, The hypothalamic-pituitary-gonadal axis: immune function and autoimmunity, *J Endocrinol*, 176, 293-304.
- Tanti, J.F., Jager, J., 2009, Cellular mechanisms of insulin resistance: role of stressregulated serine kinases and insulin receptor substrates (IRS) serine phosphorylation, *Curr. Opin. Pharmacol*, 9, 753-762.
- Tay, Y., Zhang, J., Thomson, A.M., Lim, B., Rigoutsos, I., 2008, MicroRNAs to Nanog, Oct4 and Sox2 coding regions modulate embryonic stem cell differentiation, *Nature*, 455, 1124-1128.

- Tayal, V., Singh Kalra, B., 2008, Cytokines and anti-cytokines as therapeutics - An update, *Eur J Pharmacol*, 579, 1-12.
- Taylor, JM., 1979, The Isolation of Eukaryotic Messenger RNA, *Annual Review of Biochemistry*, 48, 681-717.
- Te, J.L., Dozmorov, I.M., Guthridge, J.M., Nguyen, k.L., Cavett, J.W., Kelly, J.A., Bruner, G.R., Harley, J.B., Ojwang, J.O., 2010, Identification of unique microRNA signature associated with lupus nephritis, *PLoS One*, 5 (5), e10344.
- Terasaki, P.I., 1990, History of HLA: Ten recollections, *Los Angeles: UCLA Tissue Typing Laboratory Press*.
- Thompson, C. B., 1995, Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease, *Science*, 267, 1456-1462.
- Tsao, B.P., 2002, The genetics of human lupus. In *Dubois' Lupus Erythematosus*. Wallace D.J., Hahn B.H.(ed), Lippincott, Williams & Wilkins, 97-120.
- Tsao, B.P., 2003, The genetics of human systemic lupus erythematosus, *Trends Immunol*, 24, 595-602.
- Tsao, B.P., Cantor, R.M., Kalunian, K.C., Chen, C.J., Badsha, H., Singh, R., Wallace, D.J., Kitridou, R.C., Chen, S., Shen, N., Song, Y.W., Isenberg, D.A., Yu, C.L., Hahn, B.H., Rotter, J.I., 1997, Evidence for linkage of a candidate chromosome 1 region to human systemic lupus erythematosus, *J Clin Invest*, 99, 725-731.
- Tsao, BP., Wu, H., 2006, *Genetics of Human Lupus*. In *Dubois' Lupus Erythematosus*. In: Wallace, D.J. (ed), Lippincott Williams & Wilkins, 54-80.
- Tsokos, G.C., Kammer G.M., 2000, Molecular aberrations in human systemic lupus erythematosus, *Mol Med Today*, 6, 418-424.
- Tucker, L.B., Menon, S., Schaller, J.G., Isenberg, D.A., 1995, Adult- and childhood-onset systemic lupus erythematosus: a comparison of onset, clinical features, serology, and outcome, *Br J Rheumatol*, 34 (9), 866-872.

- Uramoto, K.M., Michet C.J, Jr., Thumboo, J., Sunku, J., O'Fallon, W.M., Gabriel, S.E., 1999, Trends in the incidence and mortality of systemic lupus erythematosus, 1950-1992, *Arthritis Rheum*, 42 (1), 46-50.
- Urowitz, MB., Gladman, DD., Abu-Shakra, M., Farewell, VT., 1997, Mortality studies in systemic lupus erythematosus. Results from a single center. III. Improved survival over 24 years, *J Rheumatol*, 24 (6), 1061-1065.
- Urta, M.J., Torre, M.D.L., 2012, *Cytokines and Systemic Lupus Erythematosus*. Systemic Lupus Erythematosus, In: Almoallim, H. (ed), 2, InTech, Rijeka, Croatia, ISBN: 978-953-51-0266-3, 53-76.
- Vassilopoulos, D., Kovacs, B., Tsokos, G.C., 1995, TCR/CD3 complex-mediated signal transduction pathway in T cells and cell lines from patients with systemic lupus erythematosus, *J Immunol*, 155, 2269-2281.
- Vasudevan, S., 2011, Posttranscriptional Upregulation by MicroRNAs, *Wiley Interdiscip Rev RNA*, 3(3), 311-330.
- Vasudevan, S., Tong, Y., Steitz, J.A., 2007, Switching from Repression to Activation: MicroRNAs Can Up-Regulate Translation, *Science*, 318 (5858), 1931-1934.
- Verthelyi, D., 2001, Sex hormones as immunomodulators in health and disease, *Int Immunopharmacol*, 1, 983-993.
- Villareal, D., Nirde, P., Hide, M., Barnabe, C., Tibayrenc, M., 2005, Differential gene expression in benznidazole-resistance Trypanosoma cruzi parasites, *Antimicrob agents chemother.*, 49 (7), 2701-2709.
- Viselli, S.M., Reese, K.R., Fan, J., Kovacs, W.J., Olsen, N.J., 1997, Androgens alter B cell development in normal male mice, *Cell Immunol*, 182, 99-104.
- Vitale, D. 2002, Comparing performance of the Agilent 2100 Bioanalyzer to traditional RNA analysis techniques. *Agilent publication*. 5980-2206E.
- Vomelova, I., Vanickova, Z., Sedo, A., 2009, Methods of RNA purification. All ways (should) lead to Rome, *Folia Biol (Praha)*, 55 (6), 243-251.



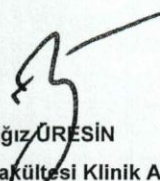
- Von Herrath, M.G., Harrison, L.C., 2003, Antigen-induced regulatory T cells in autoimmunity, *Nat Rev Immunol*, 3, 223-232.
- Voss, A., Green, A., Junker, P., 1998, Systemic lupus erythematosus in Denmark: clinical and epidemiological characterization of a county-based cohort, *Scand J Rheumatol*, 27(2), 98-105.
- Wang, F.Z., Frank Weber, F., Carlo Croce, C., Liu, C.G., Liao, X., Pellett, P.E., 2008, Human Cytomegalovirus Infection Alters the Expression of Cellular MicroRNA Species That Affect Its Replication, *J. VIROL*, 82 (18), 9065-9074.
- Wang, G., Tam, L.S., Li, E.K., Kwan, B.C., Chow, K.M., Luk, C.C., Li, P.K., Szeto, C.C., 2010, Serum and urinary cell-free MiR-146a and MiR-155 in patients with systemic lupus erythematosus, *J Rheumatol*, 37, 2516–2522.
- Wang, G., Tam, L.S., Li, E.K.M., Kwan, B.C.H., Chow, K.M., Luk, C.C.W., Li, P.K.T., Szeto, C.C., 2011, Serum and urinary free microRNA level in patients with systemic lupus erythematosus, *Lupus*, 20, 493-500.
- Wang, H., Meng, K., Chen, W., Feng, D., Jia, Y., Xie, L., 2012b, Serum miR-574-5P: A Prognostic Predictor of Sepsis Patients, *Shock*, 37 (3), 263-267.
- Wang, H., Peng, W., Ouyang, X., Li, W., Dai, Y., 2012a, Circulating microRNAs as candidate biomarkers in patients with systemic lupus erythematosus. *Transl Res*, 160 (3), 198-206.
- Wang, K., Yuan, Y., Cho, J-H, McClarty, S., Baxter, D., Galas, D J., 2012, Comparing the MicroRNA Spectrum between Serum and Plasma, *PLoS ONE*, 7 (7), e41561.
- Weber, J.A., Baxter, D.H., Zhang, S., Huang, D.Y., Huang, K.H., Lee, M.J., Galas, D.J., Wang, K., 2010, The MicroRNA Spectrum in 12 Body Fluids, *Clin Chem*, 56 (11), 1733-1741.
- Weickmann, J.L., Glitz, D.G., 1982, Human ribonucleases. Quantitation of pancreatic like enzymes in serum, urine, and organ preparations, *J. Biol. Chem*, 257, 8705–8710.

- Wilder, R.L., Elenkov, I.J., 1998, Hormonal regulation of tumor necrosis factoralpha, interleukin-12 and interleukin-10 production by activated macrophages: a disease-modifying mechanism in rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus, *Ann N Y Acad Sci*, 876, 14-31.
- Wilfinger, W.W., Mackey, K., Chomczynski, P., 1997, Effect of pH and ionic strength on the spectrophotometric assessment of nucleic acid purity, *Biotechniques*, 22 (3), 474- 481.
- Willis, R., Seif, A.M., McGwin, Jr.G., Martinez-Martinez, L.A., González, E.B., Dang, N., Papalardo, E., Liu, J., Vilá, L.M., Reveille, J.D., Alarcón, G.S., Pierangeli, S.S., 2012, Effect of hydroxychloroquine treatment on pro-inflammatory cytokines and disease activity in SLE patients: data from LUMINA (LXXV), a multiethnic US cohort, *Lupus*, 21, 8.
- Wilson, A.G., Gordon, C., di Giovine, F.S., de Vries, N., van de Putte, L.B., Emery, P., Duff, G.W., 1994, A genetic association between systemic lupus erythematosus and tumour necrosis alpha, *Eur J Immunol*, 24, 191-195.
- Wittmann, J., Jack, H.M., 2010, Serum microRNAs as powerful cancer biomarkers, *Biochim Biophys Acta*. 1806, 200–207.
- Wood L. Epidemiology: Lupus 2011 - 10-year epidemiology forecast of prevalent systemic lupus erythematosus cases. *Research and Markets*. [Online]. http://www.researchandmarkets.com/research/12509e/epidemiology_lupu, [Ziyaret tarihi: 3 Ekim 2012]
- Wu, J., Edberg, J.C., Redecha, B.P., BansaL, V., Guyre, P.M., Coleman, K., Salmon, J.E., Kimberly, R.P., 1997, A novel polymorphism of FcgammaIIIa (CD16) alters receptor function and predisposes to autoimmune diseases, *J Clin Invest*, 100, 1059-1070.
- Wu, J., Metz, C., Xu, X., Abe, R., Gibson, A.W., Edberg, J.C., Cooke, J., Xie, F., Cooper, G.S., Kimberly, R.P., 2003, A novel polymorphic CAAT/enhancer-binding protein beta element in the FasL gene promoter alter Fas ligand expression: a candidate background gene in African American systemic lupus erythematosus patients, *J Immunol*, 170, 132-138.

- Yahata, T., Kurabayashi, T., Honda, A., Tojo, Y., Tanaka, K., Abo, T., 1996, Physiological dose of estrogen regulates extrathymic T cells in female mice, *Cell Immunol*, 171, 269-276.
- Yang, Z., Wang, L., 2011. Regulation of microRNA expression and function by nuclear receptor signaling, *Cell Biosci*, 1, 31.
- Yarden, Y., Sliwkowski, M.X., 2001, Untangling the ErbB signalling network, *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2,127-137.
- Yousef, G.M., White, N.M.A., 2012, microRNAs: A New Control Mechanism for Kallikrein-related Peptidases in Kidney and Other Cancers. In: Magdolen, V., Sommerhoff, C.P., Fritz, H., and Schmitt, M. *Novel cancer-related biomarkers*. Walter de Gruyter Inc., New York, 167-182.
- Yung, R.L., Richardson, B.C., 1994, Role of T cell DNA methylation in lupus syndromes, *Lupus*, 3 (6), 487-491.
- Zhai, Y., Ghobrial, R.M., Busuttill, R.W., Kupiec-Weglinski, J.W., 1999, Th1 and Th2 cytokines in organ transplantation: paradigm lost? *Crit Rev Immunol*, 19, 155-172.
- Zhang, J., Roschke, V., Baker, K.P., Wang, Z., Alarcon, G.S., Fessler, B.J., Bastian, H., Kimberly, R.P., Zhou, T., 2001, Cutting edge: a role for B lymphocyte stimulator in systemic lupus erythematosus, *J Immunol*, 166, 6-10.
- Zhao, X., Tang, Y., Qu, B., Cui, H., Wang, S., Wang, L., Luo, X., Huang, X., Li, J., Chen, S., Shen, N., 2010, MicroRNA-125a contributes to elevated inflammatory chemokine RANTES via targeting KLF13 in systemic lupus erythematosus, *Arthritis Rheum.*, 62 (11), 3425-3435.
- Zhou, Q., Gallagher, R., Ufret-Vincenty, R., Xinyu Li, Olson, E.N., Wang, S., 2011, Regulation of angiogenesis and choroidal neovascularization by members of microRNA-23~27~24 clusters, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108(20), 8287–8292.

EKLER

EK 1. İstanbul Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulundan 17.08.2012 tarihli ve 1325 sayılı kararla etik kurul onayı.

	<p>T.C. İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU</p>	
Sayı : 1325		Tarih : 17.08.2012
Konu : Prof.Dr.Nazlı ARDA		
İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞINA		
İlgi :İ.Ü. Fen Fakültesinin 11/07/2012 gün ve 3882 sayılı yazısı		
<p>Sorumlu araştırmacılığını İ.Ü. Fen Fakültesi Öğretim Üyesi Prof.Dr.Nazlı ARDA'nın üstlendiği ve Doktora Öğrencisi Farinaz Jafari Ghods'in yürüteceği 2012/1280-1156 dosya numaralı "Sistemik Lupus Eritematozus Hastalarında Sitokinlerin Gen Anlatımı ve miRNA'lae Arasındaki İlişkinin Araştırılması" başlıklı tez çalışması kurulumuzun 10.08.2012 tarihli 13 sayılı toplantısında uygun bulunmuş olup, tutanaklar ekte sunulmuştur.</p> <p>Kararın İ.Ü. Fen Fakültesi Öğretim Üyesi Prof.Dr.Nazlı ARDA'ya ulaştırılması için gereğini arz ederim.</p>		
<p> Prof.Dr. A. Yağız ÜRESİN İstanbul Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurul Başkanı</p>		
Eki: Tutanak		

EK 2. Çalışmaya gönüllü olarak katılmayı kabul eden hasta ve kontrol gruplarında yer alan bireylere sunulan aydınlatılmış hasta onam formu.

BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU

Bu form, İstanbul Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Doktora öğrencisi, Farinaz Jafari Ghods tarafından hazırlanan “ Sistemik Lupus Eritematozus Hastalarında Sitokinlerin Gen Anlatımı ve miRNA’lar Arasındaki İlişkinin Araştırılması ”konulu tez çalışması ile ilgilidir.

Sistemik lupus eritematozus (SLE) tipik olarak multipl organ sistemlerini içeren çok sayıda otoantikor üretimi ile karakterize otoimmün bir hastalıktır. Hayvan modellerinin aksine, SLE insanlarda heterojen bir hastalıktır ve hastalığın seyri ve belirtileri geniş bir yelpazede farklı bireyleri etkiler. Patogenezi hala açıklanamamakla beraber doğal ve adaptif bağışıklık sistemindeki sayısız anormalliklerin hastalıkta önemli katkıların olduğu saptanmıştır. Sitokinler, bağışıklık sistemi hücreleri tarafından üretilen ve salınan, çözünür çeşitli proteinler ve peptitlerdir. Bir yandan humoral düzenleyici olarak rol oynayıp tek tek hücrelerin ve dokuların fonksiyonel aktivitelerini düzenler diğer yandan farklılaşma, olgunlaşma bağışıklık sistemine ait olan veya olmayan çeşitli hücrelerin aktivasyonunda önemli rollere sahiptirler.

Otoimmünite alanındaki zorluklardan biri de tanıya, hastalık aktivitesine ve atakların tahmin edilmesine yönelik spesifik bir biyomarkörün bulunmamasıdır. Bu noktadan hareket ederek Sistemik Lupus Eritematozus Hastalarında Sitokinlerin Gen Anlatımı ve miRNA’lar Arasındaki İlişki araştırılacaktır.

Proje kapsamında İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi İç Hastalıklar Ana Bilim Dalında hasta ve kontrol gruplarından alınan kan örneklerinden, İstanbul Üniversitesi Fen Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümünde, mevcut olan robotik izolasyon cihazı ve uygun kitler ile, mRNA ve miRNA izolasyonları yapılacaktır. Elde edilmiş olan mRNA’lar uygun cDNA kiti kullanarak cDNA’ya dönüştürülecek. Ayrıca hasta örneklerinden elde edilen serumlarda sitokinleri saptamak için ELISA kitleri kullanılarak protein miktar tayinleri yapılacaktır. mikroarray uygulamaları yapılacak olan HibriGen Şirketine soğuk zincir ile transfer edilecektir. Mikroarray uygulamaları “Mammalian miRNA array” ve “Human cytokine and inflammatory response oligo array” çipleri kullanılarak gerçekleştirilecektir. elde edilen veriler istatistiksel olarak değerlendirilecektir.

Bu karşılaştırma sonucunda mRNA ve protein düzeyleri arasında uyumsuzluk saptanan örneklerin miRNA düzeyleri aralarındaki ilişkiler incelenerek sitokinlerin anlatımlarını değiştiren olası miRNA’ lar tespit edilecektir. Olası saptanan miRNA’lar QPCR ile doğrulanması yapılacaktır.

Elde edilen sonuçlar SLE’nin patogenezinin aydınlatılmasına yönelik önemli katkılar saptayacaktır. Ayrıca hastalığın tanısını, seyrini ve tedavisine yönelik çalışmalara da ön bulgular olarak ışık tutacağını ön görmekteyiz.

Tüm yukarıdaki bilgiler tarafıma Sayın Prof.Dr Vedat Hamuryudan tarafından anlatıldı.Bu bilgilerden sonra böyle bir araştırmaya “katılımcı” (denek) olarak davet edildim.

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

Projenin yürütülmesi sırasında herhangi bir sebep göstermeden araştırmadan çekilebilirim. (Ancak araştırmacıları zor durumda bırakmamak için araştırmadan çekileceğimi önceden bildirmemim uygun olacağına bilincindeyim) Ayrıca tıbbi durumuma herhangi bir zarar verilmemesi koşuluyla araştırmacı tarafından araştırma dışı da tutulabilirim.

Araştırma için yapılacak harcamalarla ilgili herhangi bir parasal sorumluluk altına girmiyorum. Bana da bir ödeme yapılmayacaktır.

EK 2 (devam):

Araştırmaya katılma konusunda herhangi bir soru ile karşılaştığımda; Prof.Dr Vedat Hamuryudan, 02124143219 İç Hastalıkları ABD 'dan arayabileceğimi biliyorum. (Doktor ismi, telefon ve adres bilgileri mutlaka belirtilmelidir)

Bu araştırmaya katılmak zorunda değilim ve katılmayabilirim. Araştırmaya katılmam konusunda zorlayıcı bir davranışla karşılaşmış değilim. Eğer katılmayı reddedersem, bu durumun tıbbi bakıma ve hekim ile olan ilişkiye herhangi bir zarar getirmeyeceğini de biliyorum.

Bana yapılan tüm açıklamaları ayrıntılarıyla anlamış bulunmaktayım. Kendi başıma belli bir düşünme süresi sonunda 'Sistemik Lupus Eritematozus Hastalarında Sitokinlerin Gen Anlatımı ve miRNA'lar Arasındaki İlişkinin Araştırılması' adındaki bu araştırma projesinde "katılımcı" (denek) olarak yer alma kararını aldım. Bu konuda yapılan daveti büyük bir memnuniyet ve gönüllülük içerisinde kabul ediyorum.

İmzalı bu form kağıdının bir kopyası bana verilecektir.

Gönüllünün:

Adı-Soyadı,..... Tarih:.....

Adresi: Telefon no:.....

İmzası.....

Velayet veya vesayet altında bulunanlar için veli veya vasiin:

Adı-Soyadı:..... Tarih:.....

Adresi: Telefon no:.....

İmzası.....

Rıza Alma İşlemini Başından Sonuna Kadar Tamamlan Edenin :

Adı Soyadı:..... İmza: Tarih:.....

Açıklamada Bulunan Araştırmacının:

Adı-Soyadı:.....İmza: Tarih:.....

ÖZGEÇMİŞ



Kişisel Bilgiler

Adı Soyadı	Farinaz JAFARI GHODS
Uyruğu	İran
Doğum tarihi, Yeri	1979, Tahran
Telefon	+90 531 287 6148
E-mail	farghods@gmail.com
Web adres	

Eğitim

Derece	Kurum/Anabilim Dalı/Programı	Yılı
Doktora	İ.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü/ Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı / Moleküler Biyoloji ve Genetik Programı	2014
Yüksek Lisans	(İran) Tahran İslami Azad Üniversitesi, Bilim ve Araştırma Birimi/ Hücresel ve Moleküler Biyoloji Anabilim Dalı/ Mikrobiyoloji Programı	2009
Lisans	(İran) İslami Azad Üniversitesi, Kuzey Tahran Araştırma Birimi/ Hücresel ve Moleküler Biyoloji Anabilim Dalı/ Mikrobiyoloji Programı	2002
Lise	“Moallem” Lisesi	1998

Yabancı Diller

Farsça, Azerbaycan Türkçesi, Türkiye Türkçesi, İngilizce

Bilgisayar Beceriler

Microsoft Office, SPSS, Gene Spring 12.6

Araştırma Projeler ve İş Deneyimler

2003–2006: İran Mehr Hastanesi'nde Mikrobiyoloji, Seroloji, Hematoloji & Parazitoloji Bölümlerinde dönüşümlü olarak çalıştı.

1Nisan 2012-1 Nisan 2013: İstanbul Üniversitesi, Fen Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümünde “The investigation of glucose repression and stress response pathways in *Schizosaccharomyces pombe*” başlıklı projede Yardımcı Araştırmacı. Projesi "Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK)" tarafından desteklenmiştir. Proje No: 211T178.

Bildiriler

Farinaz J.Ghods, Ghasem Solgi, Ali Akbar Amirzargar, Behrouz Nikbin, Ahad J Ghods. High Prevalence of Clinically Significant Infections & Cytomegalovirus Disease in Renal Transplant Recipients with Serum Mannose – Binding Lectin Deficiency. Abstracts of 11th Congress of the Middle East Society for Organ Transplantation (MESOT).Shiraz – Iran. November 2008.

Ahad J.Ghods, Shokoufeh Savaj and **Farinaz J.Ghods**. Vitamin D, PTH and Bone Mineral Density status in Renal Transplant Recipients. Abstracts of 12th Congress of the Middle East Society for Organ Transplantation (MESOT).Tunis – Tunisia, Page300, October 18-21, 2010.

Tarhan, C., **Jafari Ghods F.**, Palabiyik B., Cetinkaya B., Topal Sarikaya A. The Effect of Copper Stress on Expression of the *ace2* gene in *Schizosaccharomyces pombe*. Abstracts of 6th International Fission Yeast Meeting. Boston – USA, Page 225, June 25-30, 2011.

Palabiyik B., **Ghods F.J.**, Kina U. Hydrogen Peroxide- induced Oxidative Stress and Trehalose Accumulation in *Schizosaccharomyces pombe*. Abstracts of 1th International Congress of the Molecular Biology Association of Turkey. Istanbul – Turkey, Page 86, November 23-24, 2012.

Bedia Palabiyik, **Farinaz Jafari Ghods**, Semian Karaer Uzuner. The investigation of glucose repression and stress response pathways in *Schizosaccharomyces pombe*. Abstracts of 7th International Fission Yeast Meeting. London – UK, Page 289, June 24-29, 2013.

Bedia Palabiyik, **Farinaz Jafari Ghods**, Evren Öney Uçar. The effects of glucose sensing and glucose intake on the oxidative stress response in *Schizosaccharomyces pombe*. Abstracts of 7th International Fission Yeast Meeting. London – UK, Page 294, June 24-29, 2013.

Bedia Palabiyik, **Farinaz Jafari Ghods**, Ahmet Akçay. The investigation of the role for thiamine in oxidative stress response in *Schizosaccharomyces pombe*. Abstracts of 7th International Fission Yeast Meeting. London – UK, Page 318, June 24-29, 2013.

- Farinaz Jafari Ghods**, Bedia Palabiyik. Correlation between Hyperglycemia-induced Oxidative Stress Response with Expression Levels of Hsp16 and CoQ10 in *Schizosaccharomyces pombe*. Abstracts of 7th International Iranian Congress of Clinical Microbiology. Shiraz – Iran, Page 72, October19-21, 2013.
- Jafari Ghods F.**, Hamuryudan V., Arda N., Topal Sarikaya A. Microarray Analysis of MicroRNA Expression in Serum of Patients with Systemic Lupus Erythematosus: Comparison Between Cases With and Without Renal Involvement. Abstracts of the 14th International Congress of Nephrology, Dialysis and Transplantation. Isfahan-Iran, Page3, February 11-14, 2014. (Oral Presentation)
- Jafari Ghods F.**, Hamuryudan V., Arda N., Topal Sarikaya A. Which Serum Cytokines Are Elevated in Lupus Nephritis? Abstracts of the 14th International Congress of Nephrology, Dialysis and Transplantation. Isfahan-Iran, Page13, February 11-14, 2014.

Makaleler

1. **Farinaz J. Ghods**, Ghasem Solgi, Ali Akbar Amirzargar, Behrouz Nikbin, Ahad J Ghods. High Frequency of Clinically Significant Infections & Cytomegalovirus Disease in Renal Transplant Recipients with Serum Mannose – Binding Lectin Deficiency. *Iranian Journal of Kidney Disease*.3 (1): 28-33, 2009.
 2. Shokoufeh Savaj, **Farinaz J. Ghods**. Vitain D, parathyroid hormone and bone mineral density status in kidney transplant recipients. *Iranian Journal of Kidney Disease*. 6(4): 295-299, 2012.
- B Palabiyik, **F Jafari Ghods**, E Onay Ucar. Effects of glucose sensing/signaling on oxidative stress response in glucose repression mutants of *Schizosaccharomyces pombe*. *Genetics and Molecular Research*. 12(4): 5046-5056, 2013.
- B Palabiyik, **F Jafari Ghods**, E Onay Ucar. A Potential Protective Role for Thiamine in Glucose-Driven Oxidative Stress. *Genetics and Molecular Research*. Accepted to be published on 2014.
- B Palabiyik, **F Jafari Ghods**. The role of oxidative stress response and trehalose accumulation in the longevity of fission yeast. *Jundishapur Journal of Microbiology*. Accepted to be published on 2014.

Eğitimsel Kongreler ve Çalıştaylar

1. **Proteomistanbul International**, İstanbul Üniversitesi /Fen Fakültesi / İstanbul – Türkiye. 12-13 Temmuz, 2010.
2. **6th International fission Yeast Meeting**, Harvard Medical School /Boston- Massachusetts –USA, 25-30 June, 2011.
3. **Örnek Hazırlama Teknikleri ve Uygulamaları**, İstanbul Üniversitesi /Eczacılık Fakültesi / İstanbul – Türkiye, 26 Mayıs, 2012.
4. **Symposium on Multidisciplinary R&D and Innovation in Life Sciences**, İstanbul Üniversitesi / FEN Fakültesi / İstanbul – Türkiye, 15-17 Haziran, 2012.
5. **Moleküler Biyoloji Derneği I. Uluslararası Kongresi**, Boğaziçi Üniversitesi / İstanbul –

Türkiye, 23-23 Kasım 2012.

6. **7th International fission Yeast Meeting**, University College London /London –UK, 24-29 June, 2013.
7. **Proteomistanbul International**, İstanbul Üniversitesi /Fen Fakültesi / İstanbul – Türkiye. 15-17 Temmuz, 2013.
8. **7th International Iranian Congress of Clinical Microbiology**. Medical School of Shiraz University /Shiraz–Iran, 12-21 October, 2013.
9. **14th International Congress of Nephrology, Dialysis and Transplantation**. Iranian Society of Nephrology/Isfahan-Iran, 11-14 February, 2014.

Ödüller

En iyi Abstract ödülü, 14.Uluslararası Nefroloji, Diyaliz ve Transplantasyon Kongresi. Isfahan- İran. 11-14 Şubat 2014.