



T.C.

PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

DOKTORA TEZİ

HÜCRE KÜLTÜRÜ PSORİASİS MODELİNDE KERATİNOSİT miRNA'LARININ
HASTALIĞIN BAŞLANGIÇ EVRESİNDE ARAŞTIRILMASI

Ayşen Buket ER URGANCI

Ağustos 2018

DENİZLİ

T.C.
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

HÜCRE KÜLTÜRÜ PSORİASIS MODELİNDE KERATİNOSİT miRNA'LARININ
HASTALIĞIN BAŞLANGIÇ EVRESİNDE ARAŞTIRILMASI

TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

DOKTORA TEZİ

Ayşen Buket ER URGANCI

Tez Danışmanı: Prof. Dr. İbrahim AÇIKBAŞ

Denizli, 2018

DOKTORA TEZİ ONAY FORMU

Ayşen Buket ER URGANCI tarafından Prof. Dr. İbrahim AÇIKBAŞ yönetiminde hazırlanan "**Hücre Kültürü Psoriasis Modelinde Keratinosit miRNA'larının Hastalığın Başlangıç Evresinde Araştırılması**" başlıklı tez tarafımızdan okunmuş, kapsamı ve niteliği açısından bir Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı: Prof. Dr. Sefa KIZILDAĞ
Dokuz Eylül Üniversitesi

Üye: Prof. Dr. İbrahim AÇIKBAŞ
Danışman Pamukkale Üniversitesi

Üye: Doç. Dr. Yasemin SOYSAL
Dokuz Eylül Üniversitesi

Üye: Doç. Dr. Yavuz DODURGA
Pamukkale Üniversitesi

Üye: Dr. Öğr. Üyesi Şule GÖKŞİN
Pamukkale Üniversitesi

Pamukkale Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun
06.09.2018 tarih ve 2018/22-32 sayılı kararıyla onaylanmıştır.


Prof. Dr. Hakan AKÇA
Müdür

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

Öğrenci Adı Soyadı : Ayşen Buket ER URGANCI

İmza :



ÖZET

HÜCRE KÜLTÜRÜ PSORIASIS MODELİNDE KERATİNOSİT miRNA'LARININ HASTALIĞIN BAŞLANGIÇ EVRESİNDE ARAŞTIRILMASI

Ayşen Buket ER URGANCI

Doktora Tezi, Tıbbi Biyoloji AD

Tez Yöneticisi: Prof. Dr. İbrahim AÇIKBAŞ

Ağustos 2018, 67 Sayfa

Psoriasis T hücre aracı keratinosit hiperproliferasyonuyla ve keskin sınırlı, eritemli plak veya papüller üzerinde yerleşmiş, parlak sedefi-beyaz skuamlarla karakterize kronik, multifaktöryel inflamatuvar bir deri hastalığıdır. MikroRNA'lar intron veya ekzonlardan ve protein kodlamayan genlerden transkribe olan; fakat proteine translasyonu gerçekleştirilmeyen, transkripsiyonel ve posttranskripsiyonel düzeyde negatif gen düzenleyiciler olarak görev alan, ~19-24 nükleotid uzunluğunda, tek zincirli, endojen, kısa RNA dizileridir. Psoriasis patogenezinde miRNA'lar keratinosit farklılaşması, proliferasyonu, inflamasyon, anjiyogenez de görev almalarının yanı sıra regülatör T hücrelerinin regülasyonu ve miRISC kompleksi üzerinden mRNA ve miRNA biyogenezinde görev almaktadır.

Çalışmamızda, psoriasis patogenezinde keratinosit hücre hatlarında zamana bağlı miRNA profillendirilmesini yaparak patogenezin başlangıç-tetiklenme aşamasındaki miRNA ekspresyon değişimlerini bulmayı amaçladık.

HaCaT keratinosit hücre hattı 1,2,4,8,12,24,48 ve 72 saat 200 ng/ml LPS ile muamele edildi ve ELISA ile IL-1 β , IL-17, TNF- α ve LL-37 miktarları tayin edildi. Bu hücrelerden keratinosit spesifik miR-203 ekspresyonu qRT-PCR ile teyit edildi. ELISA sonucu ve miR203 ekspresyon sonucuna göre 1,5 ve 8. saatler seçilerek miRNA'lar ve mRNA'lar arraye gönderildi, profillendirildi, listelendi ve ekspresyonu değişen m/miRNAların psoriasis oluşumundaki rolleri belirlendi.

Ekspresyonu değişen miRNA'ların ekstrasellüler matriks reseptör yolağı, Hippo sinyal yolağı, yağ asidi metabolizması, TGF- β sinyal yolağı ve kök hücrelerin pluripotensisini düzenleyen sinyal yolları ile ilişkili olduğu KEGG yolak analizi ile saptandı. Ayrıca psoriasis patogenezinde immün yanıt, keratinosit proliferasyonu ve farklılaşması, apoptoz inhibisyonu ve ROS oluşumunda görev alan miR-128-3p, miR-597-5p, miR-30c-1-3p, miR-769-5p, miR-486-3p, 1226-5p, miR-574-5p, miR-22-3p, miR-941, miR-301a-3p, miR-148b-5p, miR-146a-5p, miR-148a-3p, miR-148b-3p, miR-221, miR-181c-5p ve miR-224'ün bu saatlerde ekspresyonlarının anlamlı olarak değiştiği görüldü.

Bu bilgiler ışığında psoriasis hastalığını başlangıç aşamasındaki değişikliklerin bir kısmı aydınlatılmış oldu. Başlangıç aşamasının tam olarak ortaya konması için 8. saatten sonraki sürelerde de hücrel ve miRNA analizlerinin devam ettirilmesinin faydalı olacağını düşünmekteyiz.

Anahtar Kelimeler: Psoriasis, Patogenez, HaCaT, miRNA, Sitokin, LPS

Bu çalışma, PAÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi

tarafından desteklenmiştir (Proje No: 2016SABE007).

ABSTRACT**INVESTIGATION OF KERATINOCYTE miRNA IN THE INITIAL STAGE OF THE DISEASE AT PSORIASIS CELL CULTURE MODEL**

ER URGANCI, Ayşen Buket
PhD Thesis in Medical Biology
Supervisor: Prof. Dr. İbrahim AÇIKBAŞ (PhD)

August 2018,67 Pages

Psoriasis is a chronic, multifactorial inflammatory skin disease characterized by T cell-mediated keratinocyte hyperproliferation and shiny, marginal plaques or papules with bright, pearlescent white scales. MicroRNAs, are single-chain, endogenous, ~ 19-24 nucleotides length RNA sequence, transcribed from introns or exons and from genes that do not encode proteins; which serve as negative regulators of transcriptional and posttranscriptional levels. In the pathogenesis of psoriasis, miRNAs are involved in keratinocyte differentiation, proliferation, inflammation, angiogenesis, as well as regulation of regulatory T cells and mRNA and miRNA biogenesis via miRISC complex. In our study, we aimed to find miRNA expression changes in the initiation-triggering stage of pathogenesis by profiling miRNAs in keratinocyte cell lines at time-dependent manner.

The HaCaT keratinocyte cell line was treated with 200 ng / ml LPS for 1, 2, 4, 8, 12, 24, 48 and 72 hours and IL-1 β , IL-17, TNF- α and LL-37 secretion quantified by ELISA. Expression of keratinocyte-specific miR-203 from these cells was confirmed by qRT-PCR. According to the ELISA and miR203 expression results. 1,5th and 8th hours were selected for array. miRNAs and mRNAs isolated from LPS stimulated cell lines and arrayed by private company and array outputs were analysed. The roles of altered expression of the m/miRNAs in the pathogenesis of psoriasis were figured out.

Expression-altered miRNAs have been associated with extracellular matrix receptor pathway, Hippo signaling pathway, fatty acid metabolism, TGF- β signaling pathway, and signaling pathways regulating pluripotency of stem cells by KEGG pathway analysis. In addition, the miRNAs whose expression significantly changed at the time points, miR-128-3p, miR-597-5p, miR-30c-1-3p, miR-769-5p, miR-486-3p, MiR-148a-3p, miR-148b-3p, miR-148b-5p, miR-146a-5p, miR- miR-221, miR-181c-5p and miR-224, are involved in the immune response, keratinocyte proliferation and differentiation, apoptosis inhibition and ROS formation.

According to these results, some of the changes in the initiation stage of psoriasis disease have been clarified. We think it would be useful to continue cellular and miRNA analyses after the 8th hour to ensure that the baseline stage is fully established.

Keywords : Psoriasis, Pathogenesis, HaCaT, miRNA, Cytokine, LPS

This study was supported by Pamukkale University Scientific Research Projects Coordination Unit through project number 2016SABE007.

TEŞEKKÜR

Doktora öğrenimim ve tez çalışmam süresince deneyimlerini benimle paylaşan, desteği ile akademik eğitimime ve gelişimime yön veren tez danışman hocam ve aynı zamanda Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Başkanı olan Prof. Dr. İbrahim AÇIKBAŞ 'a,

Tez çalışma sürecimde yardımlarını esirgemeyen, kritik yorumlarını paylaşan ve her türlü laboratuvar desteğini sunan Tıbbi Genetik Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Hakan AKÇA'ya,

Tez sürecinde gerçekleştirdiğimiz toplantılarda bilimsel katkılarını benden esirgemeyen değerli Tez İzleme Komisyonu üyeleri Doç. Dr. Yavuz DODURGA'ya ve Dr. Öğr. Üyesi Şule GÖKŞİN'e,

Tüm eğitim sürecimde bana desteklerini esirgemeyen değerli bölüm hocalarıma ve asistan arkadaşlarıma,

Ve beni bugünlere getiren, tüm hayatım boyunca her koşulda yanımda olan, bilimsel olarak da her zaman destek veren aileme,

Bu süreçte her zaman yanımda olan destekleyen canım eşim ve doğduğu günden itibaren hayatımı aydınlatan biricik oğluma teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

	SAYFA
ÖZET	v
ABSTRACT	vi
TEŞEKKÜR	vii
İÇİNDEKİLER	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
TABLolar DİZİNİ.....	xi
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xii
1. GİRİŞ	1
1.1. Tez Çalışmasının Amacı	2
2. KURAMSAL BİLGİLER VE LİTERATÜR TARAMASI	3
2.1 Psoriasis	3
2.1.1 Klinik Özellikler	3
2.1.2 Etiyolojisi	5
2.1.3 Psoriasis ile İlişkili Genler ve Lokuslar	5
2.1.4 Psoriasis patogenezi	8
2.1.5 Psoriasis ile ilişkili sitokin ve kemokinler	11
2.1.6 Psoriasis Tedavisi	13
2.2 miRNA	13
2.2.1 miRNA biyogenezi.....	14
2.2.2 miRNA'ların hastalıklarla olan ilişkisi	15
2.2.3 Psoriasis miRNA'ların rolü	16
2.3 Hipotez	17
3. GEREÇ ve YÖNTEMLER	18
3.1. Hücre Kültürü	18
3.1.1. HaCaT hücre kültürü	18
3.1.2. HEK293 hücre kültürü	19

3.2. MTT Testi.....	20
Hücrelerin işaretlenmesi için;	20
3.3. Sitokin tayini.....	21
3.4. miRNA izolasyonu.....	22
3.5. cDNA Sentezi.....	23
3.6. Ekspresyon Analizi.....	23
3.8. mRNA array	25
3.9. İstatistik.....	26
4. BULGULAR	28
4.1 Hücre Kültürü.....	28
4.2 MTT Assay Sonuçları.....	29
4.3 Sitokin Tayini Sonuçları.....	30
4.4 miR-203 ekspresyonu	32
4.5 LPS muamelesinin miRNA ekspresyonlarına etkisi	33
4.5.1 Bir buçuk saat LPS muamelesinin etkisi	33
4.5.2 Sekiz saat LPS muamelesinin etkisi	37
4.5.3 Bir buçuk ve 8. saatler arasında değişim gösteren miRNA'lar	42
4.6 LPS muamelesinin mRNA ekspresyonlarına etkisi.....	44
4.6.1 Bir buçuk saat LPS muamelesinin etkisi	44
4.6.2 Sekiz saat LPS muamelesinin etkisi	46
4.6.3 Bir buçuk ve 8. saatler arasında değişim gösteren mRNA'lar	47
5. TARTIŞMA	50
6. SONUÇ.....	57
7. KAYNAKLAR	59
8. ÖZGEÇMİŞ	66
9. EKLER.....	67

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa
Şekil 2.1 Epidermiste keratinosit tabakaları (Young vd 2016)	8
Şekil 2.2 Normal deri ve psoriatik derinin histolojik görünümü (Lowes vd 2015).....	9
Şekil 2.3 Psoraisis patogenezi (Boehnke ve Schön 2015)	12
Şekil 2.4 miRNA biyogenezi (Winter vd 2009).....	14
Şekil 2.5 miRNA ekspresyonu ve sitokinler arasındaki ilişki (Wang vd 2017)	17
Şekil 4.1 Yoğun HEKn hücre flaskı	29
Şekil 4.2 LPS uygulanmış hücrelerin canlılık - zaman grafiği	29
Şekil 4.3 Yüksek doz LPS Hücre canlılığı-zaman grafiği.....	30
Şekil 4.4 LL-37 zamana göre salınım grafiği (ng/ml)	31
Şekil 4.5 TNF- α zamana göre salınım grafiği (ng/L).....	31
Şekil 4.6 IL-17 zaman göre salınım grafiği (ng/L).....	32
Şekil 4.7 IL-1 β zamana göre grafiği (pg/L)	32
Şekil 4.8 miR203 ekspresyonunun zamana bağlı kat değişimi (*, p<0.05)	33
Şekil 4.9 Bir buçuk LPS muamelesi ile ekspresyonu azalan miRNA'ların KEGG Yolağı Heatmap analizi	35
Şekil 4.10 Bir buçuk saat LPS muamelesiyle ekspresyonu artan miRNA'ların KEGG yolağı Heatmap analizi.....	37
Şekil 4.11 Sekiz saat LPS muamelesiyle ekspresyonu azalan miRNA'ların KEGG yolağı Heatmap analizi	39
Şekil 4.12 Sekiz saat LPS muamelesi ile ekspresyonu artan miRNA'ların KEGG yolağı Heatmap analizi	41
Şekil 4.13 Bir buçuk ve 8. saatler arasında değişim gösteren miRNA'ların KEGG yolak heatmap analizi.	44
Şekil 4.14 Bir buçuk ve 8. saatlerde ekspresyonu değişen genlerin protein-protein etkileşim analizi	49

TABLolar DİZİNİ

	Sayfa
Tablo 3.1 HKGS kit içeriği.....	19
Tablo 3.2 Standart konsantrasyonları	21
Tablo 3.3 cDNA sentezi için hazırlanan reaksiyon karışımı.....	23
Tablo 3.4 Real-Time PCR reaksiyon karışımı	24
Tablo 4.1 Bir buçuk saat LPS muamelesiyle ekspresyonu azalan miRNA'lar.....	34
Tablo 4.2 Bir buçuk saat LPS muamelesiyle ekspresyonu azalan miRNA'ların KEGG yolak analizi	35
Tablo 4.3 Bir buçuk saat LPS muamelesi ile ekspresyonu artan miRNA'lar	36
Tablo 4.4 Bir buçuk saat LPS muamelesiyle ekspresyonu artan miRNA'ların KEGG yolak analizi	36
Tablo 4.5 Sekiz saat LPS muamelesiyle ekspresyonu azalan miRNA'lar.....	38
Tablo 4.6 Sekiz saat LPS muamelesiyle ekspresyonu azalan miRNA'ların KEGG yolak analizi	38
Tablo 4.7 Sekiz saat LPS muamelesi ile ekspresyonu artan miRNA'lar	40
Tablo 4.8 Sekiz saat LPS muamelesi ile ekspresyonu artan miRNA'ların KEGG yolak analizi	40
Tablo 4.9 Bir buçuk ve 8. saatlerde miRNA ekspresyon kat değişimi.....	42
Tablo 4.10 Bir buçuk ve 8. saatler arasında değişim gösteren miRNA'ların KEGG yolak analizi	43
Tablo 4.11 Bir buçuk saat LPS muamelesiyle ekspresyonu azalan mRNA'lar.....	45
Tablo 4.12 Bir buçuk saat LPS muamelesiyle ekspresyonu artan mRNA'lar	45
Tablo 4.13 Sekiz saat LPS muamelesiyle ekspresyonu azalan mRNA'lar.....	46
Tablo 4.14 Sekiz saat LPS muamelesiyle ekspresyonu artan mRNA'lar	47
Tablo 4.15 Bir buçuk ve 8. saatlerde gen ekspresyon kat değişimleri	48
Tablo 4.16 Bir buçuk ve 8. saatlerde ekspresyonu değişen genlerin yolak analizi.....	48

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

AGO	Argonat
BPE	Sığır hipofiz salgısı
cDNA	Komplementer DNA
DC	Dendritik hücreler
dDC	Dermal dendritik hücreler
DMEM	Dulbecco'nun Modifiye mediyumu
dsRNA	Çift zincirli RNA
ECM	Extracellular matrix
EGF	Epidermal büyüme faktörü
ELISA	Enzim bağımlı immün assay
FBS	Fetal sığır serumu
IGF-1	İnsülin benzeri büyüme faktörü-1
KEGG	Kyoto gen ve genom ansiklopedisi
LD50	%50 Öldürücü doz
LPS	Lipopolisakkarit
MHC	Major Histocompatibility Kompleksi
miRNA	Mikro RNA
mRNA	Mesajcı RNA
ncRNA	Kodlamayan RNA
NK	Doğal öldürücü
PBS	Fosfatlanmış tuz tamponu
PCR	Polimeraz zincir reaksiyonu
pDC	Plasmasitoid dendritik hücreler
PSORS	Psoriasis yatkınlık
qRT-PCR	Kantitatif Gerçek zamanlı PCR
RNA	Ribonükleik asit
Th	T yardımcı

1. GİRİŞ

Psoriasis T hücre aracılı keratinosit hiperproliferasyonuyla ve keskin sınırlı, eritemli plak veya papüller üzerinde yerleşmiş, parlak sedefi-beyaz skuamlarla karakterize kronik, multifaktöryel, inflamatuvar bir deri hastalığıdır (Lowes vd 2015).

Lezyonlar genellikle saçlı deri, tırnaklar, ekstremitelerin ekstansör kısımları, umbilikal bölge ve sakrumda yerleşme eğilimindedir. Prevalansı %2-3'dür (James vd 2008).

Psoriasis etiyojisi tam olarak bilinmemektedir. Psoriasis birçok farklı nedenle tetiklenebilir. Bunlar; hasar, travma, enfeksiyon, çevresel faktörler, ilaçlar, metabolik faktörler, alkol ve sigara gibi nedenlerdir (Lowes vd 2015). Psoriasisde immün sistemi aktive eden tek bir faktör yoktur. Süreci başlatan ilk antijenin ekzojen kaynaklı (Ör: bakteri vb..) olduğu, ancak hastalığın süregenliğinden sorumlu olan faktörün ise, bu antijene yapısal olarak benzeyen (antigenic mimicry) bir epidermal antijen olabileceği ileri sürülmüştür (Fry ve Baker 2007).

Keratinositler epidermin temel ve yoğun hücre tipidir. Keratinositler epidermiste beş tabaka şeklinde düzenlenmişlerdir; stratum bazale, stratum spinosum, stratum granülozum, stratum lusidum ve stratum korneum. Farklılaşma sürecinde bazal tabakadaki prizmatik hücreler bölünüp yukarıya doğru hareket ederken gittikçe yassılaşır ve sonunda nukleuslarını kaybederler (Kierszenbaum 2006). Bu süreç normalde 28-30 gün iken psoriatik deride 3-4 güne kadar düşmektedir. Keratinositlerin anormal olgunlaşması ve epidermal hiperplazi ile oluşan kalın pullu plaklar psoriasis karakteristiğidir (Kim ve Kruger 2015). Aktif plaklarda IL-6 ve TNF- α ekspresyonlarının da artışı gözlemlenmiştir. IL-6'nın artan ekspresyonu keratinosit proliferasyonu ile immün aktivasyonun ve doku inflamasyonunun ilişkisini açıklamaktadır (Al-Shobaili ve Qureshi 2013).

Yaygın olarak kabul gören hipoteze göre, psoriatik plaklar deri hücreleri ile bağışıklık sisteminde doğal ve kazanılmış bileşenlerin düzensiz etkileşimlerinden kaynaklanır (Boehnke ve Schön 2015).

Psoriatik deride eksprese olan sitokinlerin birbirleriyle ilişkileri keratinositlerin hiperproliferasyonu, artan neovaskülarizasyon ve inflamasyon gibi olayları belirlemektedir (Baliwag vd 2015).

MikroRNA'lar, genom üzerinde protein kodlayan intron, ekzon ve protein kodlamayan bölgelerden transkribe olan; proteine translasyonu gerçekleştirilmeyen, transkripsiyonel ve posttranskripsiyonel düzeyde negatif gen düzenleyiciler olarak görev alan, yaklaşık olarak ~19-24 nükleotid uzunluğunda, tek zincirli, endojen, kısa RNA dizileridir (Schneider 2012).

Psoriasisli hastalardan alınan doku biyopsi örnekleriyle yapılan çalışmalarda miRNA'ların keratinosit farklılaşması, proliferasyonu, inflamasyon, anjiyogenez de görev almalarının yanı sıra, regülatör T hücrelerinin regülasyonu ve miRISC kompleksi üzerinden mRNA ve miRNA biyogenezinde görev aldığı görülmüştür (Hawkes vd 2015). Bu veriler miRNA'ların psoriasis patogenezinde farklı aşamalarda rol aldıklarını düşündürmektedir.

1.1. Tez Çalışmasının Amacı

Bizim çalışmamızda, hücre kültürü psoriasis modelinde, hastalığın başlangıç aşamasında miRNA ekspresyonlarının gösterilmesi ve ekspresyonu değişen miRNA'lar üzerinden psoriasis patogenezinde ilk aşamanın belirlenmesi amaçlanmaktadır.

2. KURAMSAL BİLGİLER VE LİTERATÜR TARAMASI

2.1 Psoriasis

Psoriasis ile ilgili ilk bilgiler Celsus'a (MÖ 25-MS 45) aittir. Hippocrates (MÖ 460-MS 375) skuamöz döküntüler olarak sınıfladığı psoriasise benzer lezyonları tanımlamıştır ve bunları Iopoi (Iepo, deskuamasyon) olarak adlandırmıştır. Ondokuzuncu yüzyılın başlarında Willian psoriasisin tanımını yapmıştır ve farklı klinik tiplerini belirlemiştir (Romiti vd 2009).

2.1.1 Klinik Özellikler

Psoriasis çeşitli boyutlarda dairesel, eritemli, skuamlı plaklar ve keratinositlerin T hücre aracılı hiperproliferasyonuyla karakterize, kronik ve yenileyici enflamatuar bir deri hastalığıdır. Lezyonlar genellikle gümüşü beyaz lameller skuamlarla kaplıdır. Saçlı deri, tırnaklar, ekstremitelerin ekstansör kısımları, umbikal ve sakral bölgelere yerleşme eğilimindedir (James vd 2008).

Psoriasis her iki cinsiyette eşit olarak görülür. Prevalansı %2-3'tür. Ortalama başlangıç yaşı 27'dir, ancak yeni doğan döneminden 70 yaşa kadar her yaşta başlayabilir. Psoriasis başlangıç yapabilme dönemine göre Tip I ve Tip II olarak ikiye ayrılmaktadır. Olguların %75'inden fazlası Tip I olarak belirlenmiştir. Tip I, başlangıcı 40 yaş öncesinde, özellikle 20-30 yaşlarda görülen psoriasis tipidir. Bu tip psoriasisde ailesel psoriasis öyküsü olmakta ve birinci derece yakınarda hastalığın görülme oranı yüksektir. Tip I'de hastalığı enfeksiyonlarla alevlenme eğilimi vardır. Tip II psoriasis ise geç başlangıçlı, 40 yaşından sonra özellikle 57-60 yaşlarında ortaya çıkan, aile öyküsü oldukça nadir olan psoriasis tipidir. Tip II psoriasis daha ılımlı seyreden, sporadik olarak gelişen psoriasis tipidir (Erkek 2008).

Klinik tipleri:

Plak Tip: Gövde ve/veya ekstremitelerde eritemli, skuamlı, infiltrate papüllerin birleşerek 1 cm'den büyük plaklar oluşturduğu lezyonlarla karakterizedir. Psoriasisın sık görülen formu kronik plak psoriasisidir (Baliwag vd 2015).

Guttat Tip: Guttat, Yunan kökenli bir kelime olup damla anlamına gelmektedir. 2-10mm çapında sayısız küçük lezyon olarak akut bir şekilde ortaya çıkar. Çoğunlukla çocuklarda, nadiren yetişkinlerde görülmektedir. Lezyonların sayısı 5, 10 ile 100 arasında değişir. Guttat psoriasis tüm psoriasis vakalarının % 2'sini oluşturur. (James vd 2008).

Püstüler Tip: Eritemli zeminde püstüllerin varlığı ile karakterizedir. Çocukluk çağında daha nadir görülür. Hastalık katmanlar şeklinde birleşen steril püstüllerin görüldüğü, inflamasyonlu deri ile karakterizedir (James vd 2008).

Eritrodermik Tip: Tüm vücutta yaygın eritem ve kepeklenme ile karakterizedir. Yetişkinlerde daha sık görülür. Vücutta çok az sağlam deri bölgesi bırakacak kadar yaygın olabilir. Aktif psoriasis yoluyla deride total ya da subtotal olarak gelişen ve iki formu olan psoriasisidir. İlkinde kronik plak psoriasis aşamalı bir biçimde ilerleme gösterir, birleşir, yaygınlaşır ve genişler. İkincisi eritrodermanın infeksiyonlar yoluyla ortaya çıkan unstabil psoriasisın oluşmasıyla meydana gelmektedir (James vd 2008).

Invers Tip: İntertriginöz alanlarda eritemli plakların varlığı ile karakterizedir. Derinin katlantı yerlerinde plaklar oluşur. Özellikle meme altı, koltuk altı, perianal bölgeyi tutan psoriasis formudur. Fleksural lezyonlar pulsuz, kırmızı, kızarıklık olurlar. Genellikle parlak plaklar arasındaki bölge candida, intertrigo ve dermatofit enfeksiyonlarına da açık olur (James vd 2008).

Tırnak Psoriasis: Tırnak psoriasis daha çok el tırnaklarında gözlenir. Tırnak yüzeyinde küçük oyuklar şeklinde görülür. Tırnak matriksinin proksimalindeki hatalı tırnak oluşumuyla sonlanır (James vd 2008).

2.1.2 Etiyolojisi

Psoriasisin etiolojisi tam olarak bilinmemektedir. Psoriasis birçok farklı nedenle tetiklenmektedir. Genetik yatkınlığı olan kişilerde psoriasis hastalığının gelişimi endojen ve eksojen faktörlere bağlıdır. Travma, stres, ilaçlar, enfeksiyonlar ve sigara bu faktörler olarak sayılmaktadır. Bu faktörler hastalığın tetiklenmesinin yanısıra alevlenmesinden de sorumlu olmaktadır (Saraç ve Kapıcıoğlu 2015).

Psoriasisde immün sistemi aktive eden tek bir neden yoktur. β hemolitik streptokok enfeksiyonu başta olmak üzere çeşitli bakteriyel enfeksiyonlar, HIV, HPV 5, endojen retrovirüsler, lityum, antimalaryaller, interferonlar, beta reseptör blokerleri, mekanik iritasyon (Köbner fenomeni) tetikleyici faktörler olarak kabul edilmektedir. Bu dış uyaranların haricinde, organizmaya ait (self) antijenler olarak streptokok M proteini ile homoloji gösteren keratin 17, HSP (ısı şok proteini) etken olabileceği ileri sürülmüştür. Süreci başlatan ilk antijenin ekzojen kaynaklı (Ör: bakteri vb..) olduğu, ancak hastalığın devamlılığında sorumlu olan faktörün ise, bu antijene yapısal olarak benzeyen (antigenic mimicry) bir epidermal antijen olabileceği hipotezini ileri sürülmektedir (Fry ve Baker 2007).

2.1.3 Psoriasis ile İlişkili Genler ve Lokuslar

Psoriasis multi-faktoriyel bir hastalıktır, hastalığın belirtisi ve şiddeti çevresel ve genetik faktörlerle ilişkilidir. Hastalığın insidansının, hastaların yakınları ve çift yumurta ikizlerinde %15-30 olduğu belirlenirken, tek yumurta ikizlerinde %66-72 olduğu gösterilmektedir (Chandra vd 2015).

Gen düzeyindeki çalışmalarda ilk olarak kromozom 6p lokusunda yerleşen bir psoriasis geni bulunarak PSORS1 adı verilmiştir. Bunu takiben farklı lokalizasyonlardaki diğer psoriasis genleri tanımlanmıştır. Psoriasisin yatkınlığa neden olduğu düşünülen bu genlerdeki çeşitlilik, hastalığın poligenik ve multifaktöryel olduğu görüşünü desteklemektedir. Son çalışmalarda psoriasis ilişkili çok sayıda farklı gen tespit edilmiştir, ancak öne çıkan 15 genin üzerinde durulmaktadır (WEB 1).

PSORS1 bugüne kadar en iyi tanımlanmış yatkınlık lokusudur. Kromozom 6p21'in "class I major histocompatibility complex (MHC)" (6p21.3) bölgesine yerleşmiş 300 kb'lık DNA segmentidir. Psoriasis oluşumundaki en önemli genetik lokus olduğu

düşünülmektedir. Tek ve kesin bir yatkınlık geni olmamasına karşın bu bölgenin psoriasis katkısının %30- 50 olduğu düşünülmektedir. HLA-B'ye telomerik olan ve HLA-C'yi de kapsayan 300 kb'lık bölge psoriasisten sorumlu olduğu düşünülen ve çok sayıda gen içeren bir alandır (Chandra vd 2015).

PSORS2 17q25'de lokalizedir. CARD14 (Caspase recruitment domain-containing protein 14) olarak da bilinir ve BCL10 ile ilişkiye girerek NF- κ B sinyal yolağında yer alır. NF- κ B; transkripsiyon faktörü olan bir protein kompleksidir. NF- κ B; inhibitörü olan I κ B ile kompleks halde inaktif olarak sitoplazma içinde bulunur. Ligandlar, büyüme faktörleri, viral veya bakteriyel ürünler, immün regülatörler hücre yüzeyindeki reseptörlere bağlandıklarında, NF- κ B'nin uyarı düzenleyici proteinleri olan, I κ B- α ve I κ B- β 'nin N-terminallerindeki serin 32 ve 36 kalıntıları, fosforilize olur. Fosforilizasyon sonrası I κ B'ler ubiquitimize olur ve proteolitik yolla yıkılırlar. I κ B nin yıkımı sonrası sitoplazmada serbest kalan NF- κ B nükleusa transloke olur. Aktif NF- κ B; nükleusta spesifik genlerin başlatıcı veya arttırıcı bölgelerine bağlanarak ilişkili transkripsiyonu düzenler. NF- κ B; sinyal yolağı özellikle IL-17 ve TNF- α üretiminde görev alır (Goldminz vd 2013).

PSORS3 4q'da lokalizedir. İnsan IRF2 geni PSORS3 lokusundan sadece 50kb uzakta bulunmaktadır. IRF2 Tip 1 interferon transkripsiyon baskılayıcısıdır ve psoriasis hastalarında Tip 1 interferon ekspresyonu oldukça yüksektir (Foerster 2004).

PSORS4 1q21'de lokalizedir. PSORS 4, Tip 1 psoriasis ile ilişkilidir. PSORS4 genine yakın lorcrin (LOR) bulunmaktadır. LOR terminal açıdan farklılaşmış keratinositlerde kornifiye zarfın bir bileşenini kodlamaktadır ve psoriatik deride LOR mRNA'sı down-regüledir (Giardina vd 2004).

PSORS5 3q21'de lokalizedir. PSORS 5, PSORS 1 geni ile ilişkilidir.

PSORS6 19p13-q13'de lokalizedir. PSORS 6, JunB (AP-1 alt ünitesi)'nin azalan ekspresyonu ile ilişkilidir. Tip 1 psoriasis hastalarında PSORS1 risk alleli ile PSORS 6 arasında ilişki olduğu gösterilmiştir. Bu risk faktörü yakınlarındaki MUC16 (mukozal yüzeyde enfeksiyöz ajanlara karşı bariyer görevli) gibi proteinlerin ekspresyonunu değiştirmektedir (Hüffmeier vd 2009).

PSORS7 1p34-35'de lokalizedir. PTPN22 geni ile ilişkilidir. Bu gen T lenfosit yolağında yer alan bir tirozin fosfatazdır (Puig vd 2014).

PSORS8 16q12-q13'de lokalizedir. MMP-2 geni bu lokusta bulunmaktadır. Ve psoriasis hastalığı ile ilişkili olduğu düşünülmektedir. Aynı zamanda PSORS 8 Chronn

hastalığına duyarlılık lokusu taşımaktadır. Bu da Chronn hastalığı olan kişilerde psoriasis görülme yaygınlığını açıklamaktadır (Vasku vd 2009).

PSORS9: 4q31-q34'de lokalizedir. PSORS 9, Çin popülasyonunda gözlenmiştir. Tip 1 psoriasis ile ilişkilidir (Yan vd 2007).

PSORS10 18p-11.23'de lokalizedir. Finlandiya aile çalışmalarında bulunmuştur (Asumalahti vd 2002).

PSORS11 5q31.1-q33'de lokalizedir. PSORS 11, IL12B ve IL23R genleriyle ilişkilidir. IL12B ve IL23R nin bir araya gelmesiyle heterodimerik bir reseptör olan IL23 reseptörü meydana gelir (Chandra vd 2015)

PSORS12 20q13'de lokalizedir. PSORS 12, E3 ubiquitin-protein ligaz olan RNF114 ile ilişkilidir. RNF114 interferonlar ve sentetik dsRNA ile indüklenebilen çözünebilir sitosolik bir proteindir. Real-time PCR analizi ile RNF114'ün hastalıkla ilişkili olan CD4+ T hücrelerinde, dentritik hücrelerde ve deride eksprese olduğu gözlenirken aynı zamanda, testis, pankreas, böbrek ve dalakta da ekspresyonu gözlenmiştir. Bu sonuç RNF114'in sadece immün sistem ile kısıtlı bir protein olmadığı göstermektedir (Rodriguez vd 2014).

PSORS13 6q21'de lokalizedir. PSORS 13, TRAF3IP2 ile ilişkilidir ve patojenlere, enflamatuar sinyallere ve strese karşı oluşan doğal bağışıklıkta merkezi rol oynar. TRAF3IP2 Act1'i kodlar. Act 1 CD40- ve BAFFR-aracılı sinyalleşme üzerindeki inhibe edici etkisi ile humoral bağışıklığın negatif regülatörüdür (Hüffmeier vd 2010). Act 1 NF-κB sinyal yolağını IKK (IκB kinaz) fosforilasyonu ile modifiye eder (Goldminz vd 2013).

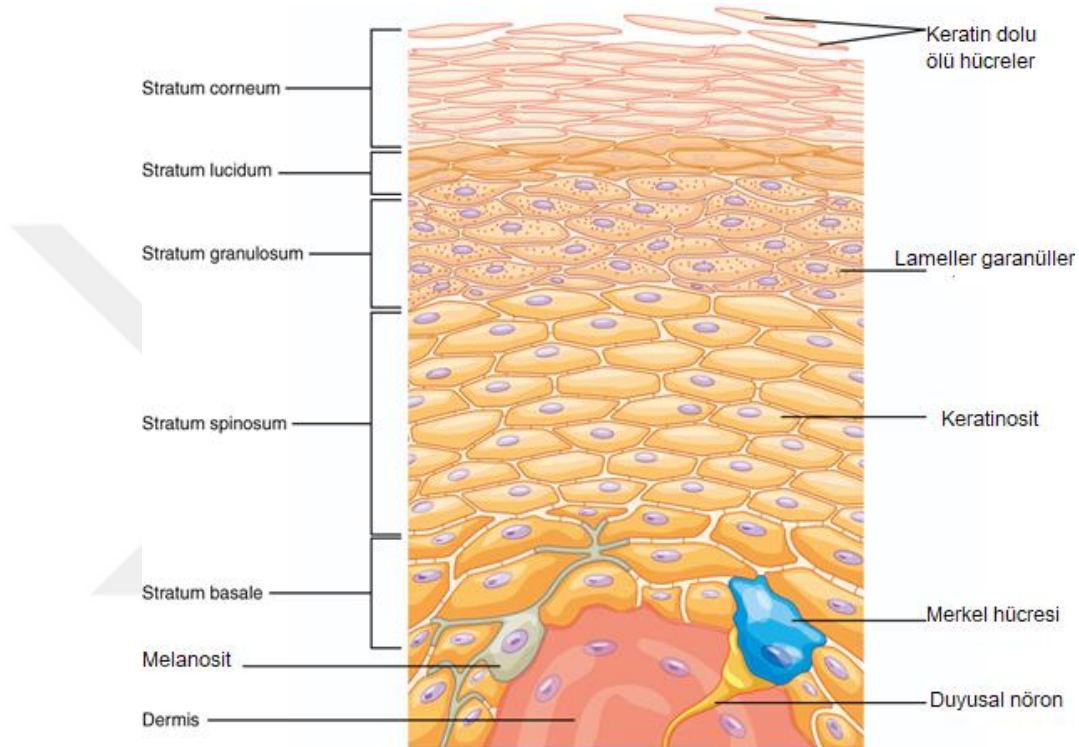
PSORS14 2q14.1'de lokalizedir. PSORS 14, IL36RN geninin mutasyonu ile oluşur. Bu gen IL 1 ailesi ile indüklenen NF-κB yolağının aktivasyonunu inhibe eder (Körber 2013)

Püstüler psoriasis ile ilişkili PSORS15 lokusu, 2q36'da lokalize olan AP1S3 genindeki mutasyon ile oluşur. Adaptör protein (AP) kompleksi küçük taşıyıcı veziküllerin trafiğinden sorumludur. AP-1 trans-Golgi ağından endozomlara olan kargo taşınmasında görev alır. AP1S3 geni klatrin bağımlı golgi transportunda görev almaktadır (Setta-Kaffetzi vd 2014).

2.1.4 Psoriasis patogenezine katılan hücreler

Keratinositler

Epidermis temel olarak beş keratinosit tabakasından oluşmaktadır; stratum bazale, stratum spinosum, stratum granulosum, stratum lusidum ve stratum korneum (Şekil 2.1) (Young vd 2016).

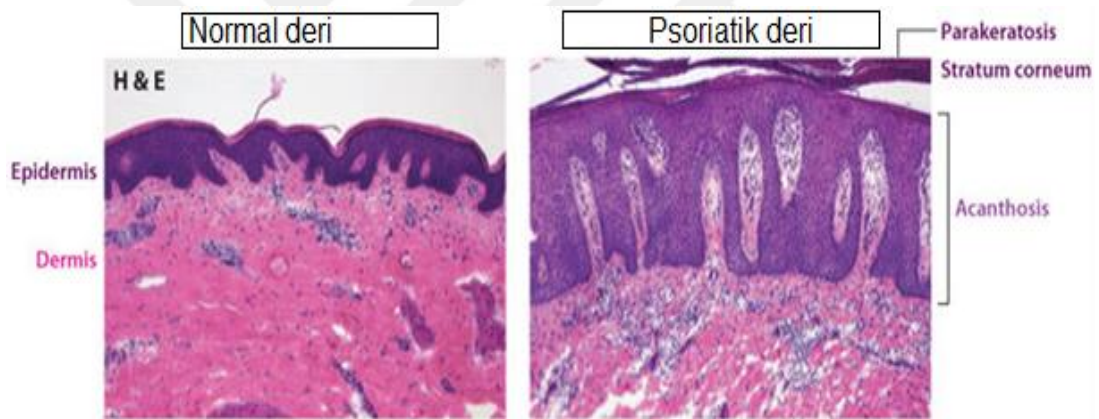


Şekil 2.1 Epidermiste keratinosit tabakaları (Young vd 2016)

Stratum bazale hücreleri mitozla çoğalırlar, bölünen hücrelerin bir kısmı stratum bazalenin kök hücre topluluğunu oluştururken geri kalanları stratum spinosuma göç ederler ve stratum korneum oluşumuna giden farklılaşma sürecine girerler. Stratum bazale tek sıra silindirik hücreden oluşur. Bazal hücrelerin bölünmesi ile oluşan yeni keratinositler spinos tabakayı oluşturur. Granüller tabakadaki keratinositler, yassı poligonallı ve belirgin oval bir çekirdeğe sahiptir. Avuç içi ve ayak tabanında, kaşıma ve sürtünme sonucu derinin kalınlaştığı yerlerde granüler tabaka üzerinde soluk pembe renkte stratum lusidum tabakası bulunur. Stratum korneum nükleuslarını tamamen kaybetmiş ve yassılaştırmış ölü keratinositlerden (korneositlerden) oluşur (Kierszenbaum 2006)

Psoriatik bölgelerdeki derinin karakteristik özelliklerinden biri hiperproliferasyonudur. Proliferatif fazda olan keratinosit miktarı normalin iki katına çıkmıştır. Farklılaşma sürecinde bazal tabakadaki prizmatik hücreler bölünüp yukarıya doğru hareket ederken gittikçe yassılaşır ve sonunda nukleuslarını kaybederler (Kierszenbaum 2006). Bu süreç normalde 28-30 gün iken bu süre psoriatik deride 3-4 güne kadar düşmektedir. Keratinositlerin anormal olgunlaşması ve epidermal hiperplazi ile oluşan kalın pullu plaklar psoriasis karakteristiğidir. Başlangıç lezyonu genellikle eritemli makül veya makülopapüller olup, 2 mm gibi çok küçük çapta olabilirler. Bu lezyonların giderek genişlemesiyle sonunda üzeri skuamla kaplı büyük plaklar ortaya çıkar. Bu lezyonlar normal deriden keskin bir kenar ile ayrılırlar (Lowes vd 2015)

Psoriatik epidermiste akantoz, retelerde uzama, stratum granülozumda incelme ve yer yer kaybolma, stratum korneumda parakeratoz ve hiperkeratoz görülür (Şekil 2.2). Stratum korneumda parakeratotik alanlarda nötrofillerin toplanması sonucu 'Munro mikroabseleri' oluşur (Calonje vd 2012).



Şekil 2.2 Normal deri ve psoriatik derinin histolojik görünümü (Lowes vd 2015)

İmmün sistem hücreleri

T hücreleri psoriasis başlaması ve devamlılığında önemli roller üstlenmektedir. Fakat sadece T hücreleri değil aynı zamanda endotel hücreler, dentritik hücreler, makrofajlar, doğal öldürücü(NK) hücreler, nötrofiller, makrofajlar ve keratinositler ve bunların yanında kemokin ve sitokinler de hastalığın patogenezinde farklı roller üstlenmektedir (Coimbra vd 2012).

T hücreler hücre sel savunmada görev alan hücrelerdir. Bu hücrelerin progenitörleri kemik iliğinde bulunan hematopoyetik kök hücrelerden (HKH) orijin almaktadır, olgunlaşma aşamaları ise timusta gerçekleşmektedir (Lai ve Kondo 2008).

Timusta üretilen T hücrelerinin birçoğu TCR $\alpha\beta$ yüzey molekülüne sahiptir. Bu yüzey molekülüne sahip T hücreler MHC molekülüne bağlı immun cevapta rol oynamaktadırlar (Abbas vd 2009). Psoriasis ile ilişkili birbirinden farklı, çeşitli sitokinler üreten birçok T hücre alt grubu tanımlanmıştır. Bunlar CD4+ Th1, Th17 ve Th22 hücreleridir ve sırasıyla IFN- γ /TNF- α , IL-17/IL-22 ve IL-22 üretmektedir. CD4+ T hücreler; IL-12 aracılığı ile Th1 hücrelerine, IL-6, IL-1 β , TGF- β ve sonrasında IL-23 aracılığı ile Th17 hücrelerine farklılaşırlar. IL-23 sadece Th17 hücrelerini değil, CD8+ Th17 hücrelerini ve IL-17 üreten $\gamma\delta$ T hücrelerini de aktive eder (Lowes vd 2013).

Dentritik hücreler, immun sistemin önemli bir parçasıdır. Antijen sunan hücre görevini üstlenirler. Yardımcı hücreler olup antijenlerin işlenip T hücrelerine sunumunda rol alırlar. Psoriatik lezyonda bol miktarda saptanmıştır. Bunlar, Langerhans hücreleri, dermal dentrositler, plasmositoid ve myeloid dentritik hücrelerdir. Dentritik hücreler, hem psoriasisdeki antijenin alınıp, işlemden geçirilip naif T-lenfositlerine sunumunu sağlar, hem de salgıladığı sitokinler aracılığı ile immün yanıtın ne yönde gelişeceğini belirler. Dentritik hücreler T hücrelerini IL-2 ve IFN- γ salınımı ile stimule eder (Lowes vd 2015). Plasmositoid dentritik hücrelerden psoriasisin erken gelişiminde rol oynayan Tip 1 interferonlar üretilir. Dentritik hücreler aynı zamanda psoriatik lezyonda bulunan hücrelerin aktivitesi için önemli olan IL-23'ün majör kaynağı olarak bilinmektedir (Coimbra vd 2012).

Nötrofiller hücre içi antimikrobiyal peptidlere sahip olan ve bir immün saldırıya karşı ilk savunma hattı hücreleridir. Psoriasis lezyonlarında stratum korneum altında mikroapse olarak görülür ve burada CXCL1, CXCL2, ve CXCL8/IL-8 gibi birçok nötrofil kemokini bulunmaktadır (Kim ve Kruger 2015). Aktive keratinositlerden salınan IL-8 gibi kemokinler psoriasisde nötrofil aktivasyonuna ve göçüne neden olan en önemli faktördür. Nötrofillerin tam olarak aktiviteleri bilinmemekle beraber, T hücrelerin bölgeye gelmesine ve aktiveleşmesinin yanında keratinosit farklılaşması ve proliferasyonunda görev aldığı düşünülmektedir (Coimbra vd 2012).

Makrofajlar doku homeostazına katılan fagositik hücrelerdir ve doku yeniden modellenmesi sırasında ortaya çıkan doku kalıntılarının ve eritrositlerin temizlenmesinde görev alırlar (Kim ve Kruger 2015) Makrofajlar, psoriasisde en erken infiltre olan hücreler arasındadır. Makrofaj infiltrasyonunun epidermal sinyaller ve dentritik hücrelerden salınan sitokinler aracılığıyla olduğu düşünülmektedir. Monosit ve makrofajlar IL-12 ve TNF- α üreterek psoriasis patogenezinde katkıda bulunmaktadır. Aktive makrofajların aynı zamanda proteazların, büyüme faktörlerinin (VEGF gibi) salınımıyla anjiyogenezde de rol aldıkları bilinmektedir (Coimbrab vd 2012).

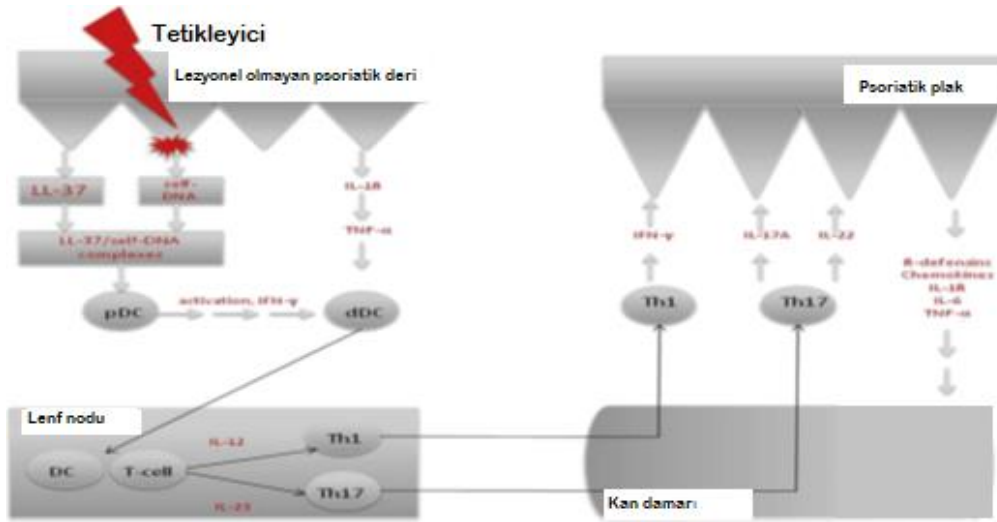
Doğal öldürücü (NK) hücreler majör histokompatibilite komplekse bağlı olmayan bir şekilde kanserli ve viral yönden enfekte hücreleri öldürme yeteneğindedir. Psoriasisde NK hücrelerinin IFN- γ , TNF ve IL-22 salgılayarak görev aldıkları düşünölmektedir (Kim ve Kruger 2015).

Mast hücreleri TNF- α , IFN- γ , IL-8 ve VEGF gibi mediatörleri fazla miktarda üreterek doğal ve T hücre aracılı inflamasyonda nötrofil ve lenfositlerin çağırılması için uygun çevreyi oluştururlar (Coimbra vd 2012).

2.1.5 Psoriasis ile ilişkili sitokin ve kemokinler

Sitokinler, hücreler arasında mediatör olarak davranan çeşitli antikor olmayan proteinlerin oluşturduğu bir gruptur. Bunlar, başlangıçta mediatör olarak davranan ve bağışıklık süreçleri regüle eden immün sistem hücrelerinin ürünleri olarak tanımlanmışsa da bu gün artık birçok sitokinin immün sistem dışındaki hücreler tarafından da üretildiği ve immün sistem dışı hücreleri de etkileyebileceği bilinmektedir (Mayer 2016). Sitokin terimi büyük bir protein grubunu tanımlamak için kullanılan genel bir terimdir ve lökosit göçünden sorumlu sitokine kemokin adı verilir. Kemokin üretimi için en önemli uyarı erken proinflamatuvar sitokinlerdir (IL1 ve TNF- α , viral infeksiyon, lipopolisakkarit gibi bakteriyel ürünler) (Mackay 2001).

Psoriasis T hücrelerinin Th1/Th17 sitokin çevresi ile ilişkilidir (Baliwag vd 2015). T hücreleri tip1 ve tip 2 sitokin üretme kapasitelerine göre iki ana grupta incelenebilir. Tip 1 sitokinler arasında IFN- γ ve TNF- α yer alırken, Tip 2 sitokinler arasında IL-4 ve IL-5 yer alır. Psoriasis hastalarında lezyonlu deri bölgesinde ve periferik kanda tip 1 sitokin yapımının arttığı tespit edilmiştir. Bu enflamatuvar hastalıkta Th17 hücrelerinin artışı gözlenmiştir. Th17 hücreleri IL-23 ile stimule olmaktadır ve IL-17 ve IL-22 salınımını arttırmaktadır (Balato 2010). IL-22 keratinosit hiperproliferasyonunu indükler ve IL-17 ve IL-22 birlikte keratinositlerden salgılanan antimikrobial peptid olan LL-37'nin üretimini arttırır. LL-37 artışı immün sistemin devamlı aktif olmasına neden olur (Fitz ve Conrad 2013). Şekil 2.3'de psoriasis patogenezi gösterilmektedir.



Şekil 2.3 Psoriasis patogenezi (Boehnke ve Schön 2015)

Psoriatik deride eksprese olan sitokinlerin birbirleriyle ilişkileri, keratinositlerin hiperproliferasyonu, artan neovaskülarizasyon ve inflamasyon gibi klinik olaylarda hangi sitokinlerin merkezi olarak rol oynadıkları belirlenmiştir. IL-2, IL-6, IL-8, IL-12, IFN- γ , TNF- α gibi Tip 1 sitokinlerin aşırı ekspresyonu gösterilmiştir (Baliwag vd 2015).

Keratin 16'nın artan ekspresyonu keratinosit hiperproliferasyonunun bir göstergesidir (Kim ve Kruger 2015). Aktif plaklarda IL-6 ve TNF- α ekspresyonlarının artışı gözlemlenmiştir. IL-6'nın artan ekspresyonu keratinosit proliferasyonu ile immün aktivasyonun ve doku inflamasyonunun ilişkisini açıklamaktadır (Al-Shobaili ve Qureshi 2013).

IL-17, TNF- α , IFN- γ , IL-1 ve IL-22 gibi sitokinler kendi başlarına veya birlikte kombinasyonlarla psoriasisde keratinosit cevabının oluşumunda rol oynarlar. IL-17, IFN- γ , IL-22 ve TNF- α keratinosit proliferasyonuna neden olurken aynı zamanda kemokin ve sitokinlerin üretimini de arttırmaktadır (Lowes vd 2015).

TNF- α , keratinosit, dendritik hücre, NK hücre, Th1, Th17 ve Th22 gibi psoriasis patogeneziinde rol oynayan birçok hücre tarafından salgılanır. TNF- α , enflamasyon, immün cevap, hücre motilitesi, hücre döngüsü, doku yenilenmesi ve apoptozisi düzenleyen multifonksiyonel bir sitokindir. Psoriasisin hem başlangıç hem de kronik fazında rol oynar (Grine vd 2015)

IL-15 psoriatik lezyonlarda artmış olan IFN- γ , TNF- α ve IL-17 de dahil olmak üzere enflamatuar sitokinlerin üretimini ve enflamatuar hücre toplanmasını, anjiyogenezi artırır.

Keratinositler immün hücrelerin çağırılması için çok sayıda farklı kemokin üretir. Psoriasis karakteristiği olan subkorneal abselerin oluşumu için keratinositler IL-8 (CXCL8) ve ilişkili kemokinleri salgılayarak nötrofillerin epidermis içine toplanmasını sağlarlar. CCL2 (MCP-1), CCL5 (RANTES), CXCL10 (IP-10) ve diğer CXCR3 ligandları ağırlıklı olarak monosit ve Th1 hücrelerinin bölgeye gelmesini sağlar. CCL20 (MIP-3 α) olgunlaşmamış Langerhans hücrelerini, dentritik hücreleri ve CLA+ T hücrelerini çağırır (Türsen 2010).

2.1.6 Psoriasis Tedavisi

Kortikosteroidler, vitamin D3 analogları, ultraviyole ışınları, retinoidler, metotreksat ve siklosporin içeren topikal ve sistemik tedavilerin çoklu kullanımıyla psoriasis tedavisinin başarılı olduğu bilinmektedir.

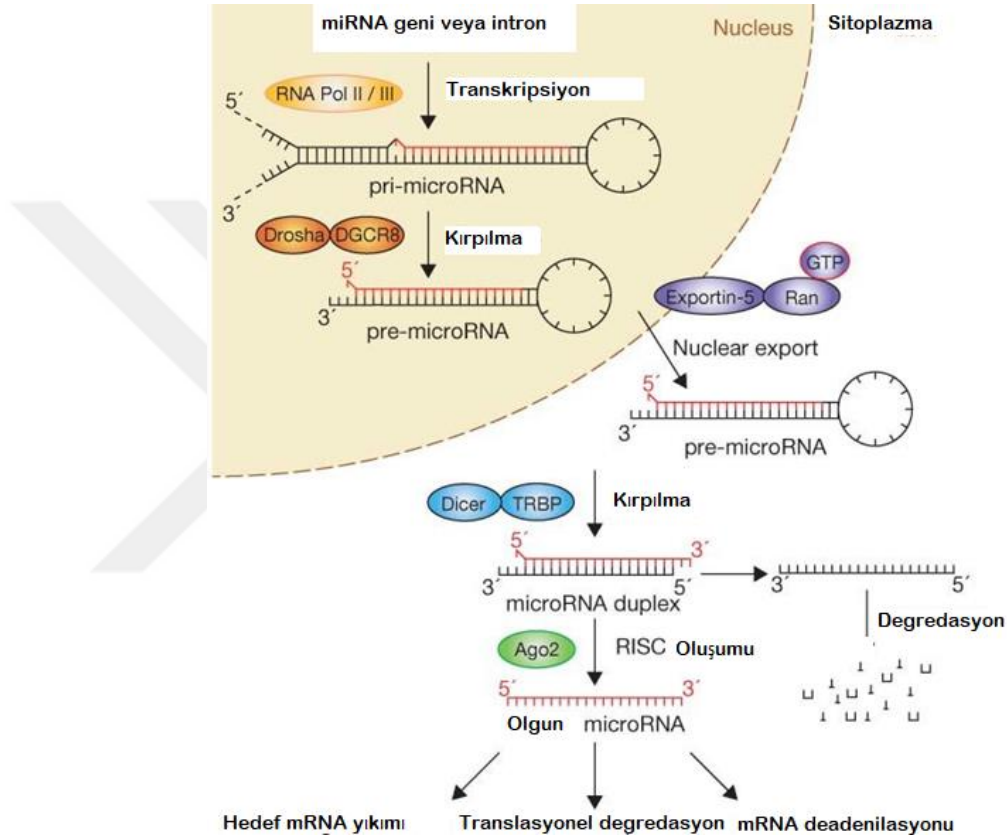
Buna ek olarak genel inflamatuvar yolları (TNF yolağı gibi) veya farklı immün hücre aktivasyon (CD2, IL-12, IL-17 ve IL-23 ekspresyonunu regüle edenler) yolları biyolojik olarak hedefleyen yeni tedavi stratejileri gelişmiştir. Patojenik süreçte farklı molekülleri hedefleyen çeşitli biyolojik ajanlar üzerine çalışmalar yapılmaktadır. Fakat bu gelişmelere rağmen hala psoriasis tedavisi tam olarak bulunamamıştır. Bazı hastalarda farklı tedavi protokolleri ile tam bir iyileşme gerçekleştirilmektedir fakat birkaç hafta veya ay sonra hastalığın nüks ettiği görülmektedir (Wagner vd 2010).

2.2 miRNA

MikroRNA'lar, genom üzerinde protein kodlayan intron veya ekzon bölgeleri ve protein kodlamayan bölgelerdeki genlerden transkribe olan; fakat proteine translasyonu gerçekleştirilmeyen, transkripsiyonel ve posttranskripsiyonel düzeyde gen düzenleyiciler olarak görev alan, yaklaşık olarak ~19-24 nükleotid uzunluğunda, tek zincirli, endojen, kısa kodlamayan RNA dizileridir.

2.2.1 miRNA biyogenezi

MikroRNA'lar, birbirini takip eden üç basamakla biyogenezi tamamlar. İlk basamakta miRNA genlerinden, pri-miRNA'ların transkripsiyonu gerçekleşir. İkinci basamakta pri-miRNA'lar; nükleus içinde, pre-miRNA'lara dönüştürülür. Son basamakta ise olgun miRNA'ların sitoplazma içinde oluşumu gerçekleşir (Winter vd 2009) (Şekil 2.4).



Şekil 2.4 miRNA biyogenezi (Winter vd 2009)

Pri-miRNA transkripleri genellikle RNA polimeraz II (küçük bir grubu RNA polimeraz III) tarafından intragenik ya da intergenik DNA'dan sentezlenir. Pri-miRNA'lar birkaç kilobaz uzunluğunda olup cap'lenmiş ve poli-adenil'lenmiş olarak bulunur. Pri-miRNA'lar çift zincirde bir ya da daha fazla sayıda saç tokası ilmeği ve bir terminal uç içerirler (Bui ve Mendell 2010).

Nükleusda başlamış olan miRNA oluşum süreci, Pri-miRNA'lar mikroişlemci kompleks (microprocessor complex) tarafından yaklaşık 70 nükleotid uzunluğundaki, pre-miRNA (precursor miRNA=pre-miRNA) formuna dönüştürülmesiyle devam eder (Winter vd 2009).

Nükleusda pre-miRNA formuna dönüştürülen yapı, RanGTP bağımlı olarak Exportin-5 (XPO-5) tarafından sitoplazmaya taşınır. Pre-miRNA sitoplazmada, Dicer endonükleaz enzimi ile ~20-25 nükleotid uzunluğundaki çift zincirli rehber (guide) ve yolcu (passenger) zincirden oluşan miRNA/miRNA* dubleksine çevrilir. Dicer, pre-miRNA'nın saç tokası ilmeğini keser. Akabinde miRNA/miRNA* dubleksinden sadece bir tanesi RISC (RNA induced silencing complex = RNA ile uyarılmış sessizleştirme kompleksi) içerisine girer. Seçilen bu zincir, 5' ucu ile Argonat (AGO) proteinine bağlanan rehber zincirdir. Rehber zincirin 5' ucu, öteki zincirin ucuna göre daha kararlı bir yapıya sahiptir. Rehber zincir RISC ve AGO'nun birlikte oluşturduğu yapı mi-RISC olarak adlandırılır. Komplekse dahil olmayan zincir, yolcu zincir (miRNA*) olarak adlandırılır. Komplekse dahil olmayan yolcu zincir nükleazlar tarafından parçalanarak yok edilir. Tek zincirli miRNA'yı içeren aktif RISC kompleksi miRNA'daki 2-8 nükleotidlik çekirdek dizi (seed sequence) ile mRNA (messenger RNA)'ya bağlanır. Bu eşleşme, mRNA'nın 3' UTR (untranslated region) bölgesi ya da ORF (open reading frame) ucu tarafında gerçekleşir. ORF ile kurulan bağ mükemmel bir şekilde gerçekleşirken, 3' UTR tarafındaki eşleşme, mükemmel olmayan eksik bir eşleşme şeklinde gerçekleşir (Saydam vd 2011). mi-RISC kompleksi, AGO yardımıyla hedef mRNA'nın yıkımını başlatmakta ve/veya protein translasyonunun baskılanmasına neden olmaktadır.

2.2.2 miRNA'ların hastalıklarla olan ilişkisi

miRNA'lar, özellikle gen ekspresyonunun negatif düzenlenmesi yoluyla, mesajcı RNA'ları (mRNA) düzenler. mRNA'nın bölgelerine bağlanarak translasyonu bloke ederler ya da tamamen degrade ederler (Taft vd 2010). Yapılan çalışmalarda miRNA'ların, translasyonu arttırdığını da gösterilmektedir (Winter vd 2009). miRNA'lar, hücrel farklılaşma, çoğalma ve apoptozun da dâhil olduğu birçok olayda önemli rol oynamaktadırlar. miRNA'ların gen ekspresyonunun ana düzenleyicileri olarak hareket edebilmeleri onları potansiyel farmakolojik hedefler haline getirmektedir (Roberts ve Wood 2013).

Yapılan araştırmalarda yaklaşık 200 kadar miRNA'nın kanser ile ilişkili olduğunu, kolon ve diğer gizli kanserlerle ilgili erken teşhiste karşılaşılan bazı zorlukların, hastaların serum, plazma, tükürük ve dokularından elde edilen miRNA profilleri ile aşılabileceği bulunmuştur (Hydbring ve Badalian-Verly 2013). Kanser dışında nörodejeneratif hastalıklar gibi diğer hastalıklarla kısa ncRNA ekspresyon seviyeleri arasında ilişkiler bulunduğunu gösteren bazı çalışmalar vardır (Hu vd 2016).

2.2.3 Psoriasisste miRNA'ların rolü

Psoriasisli hastalardan alınan doku biyopsi örnekleriyle yapılan çalışmalarda miR-203, miR-146a, miR-21, miR-31, miR-135b, miR-138, miR-155, miR-184, miR-210, miR-221/222, miR-424 ekspresyonları artmış olarak bulunurken, miR-99a ve miR-125b ekspresyonları düşük bulunmuştur. Bu miRNA'lar keratinosit farklılaşması, proliferasyonu, inflamasyon, anjiyogenez de görev almalarının yanı sıra, regülatör T hücrelerinin regülasyonu ve miRISC kompleksi üzerinden mRNA ve miRNA biyogenezinde görev alırlar. (Hawkes vd 2015).

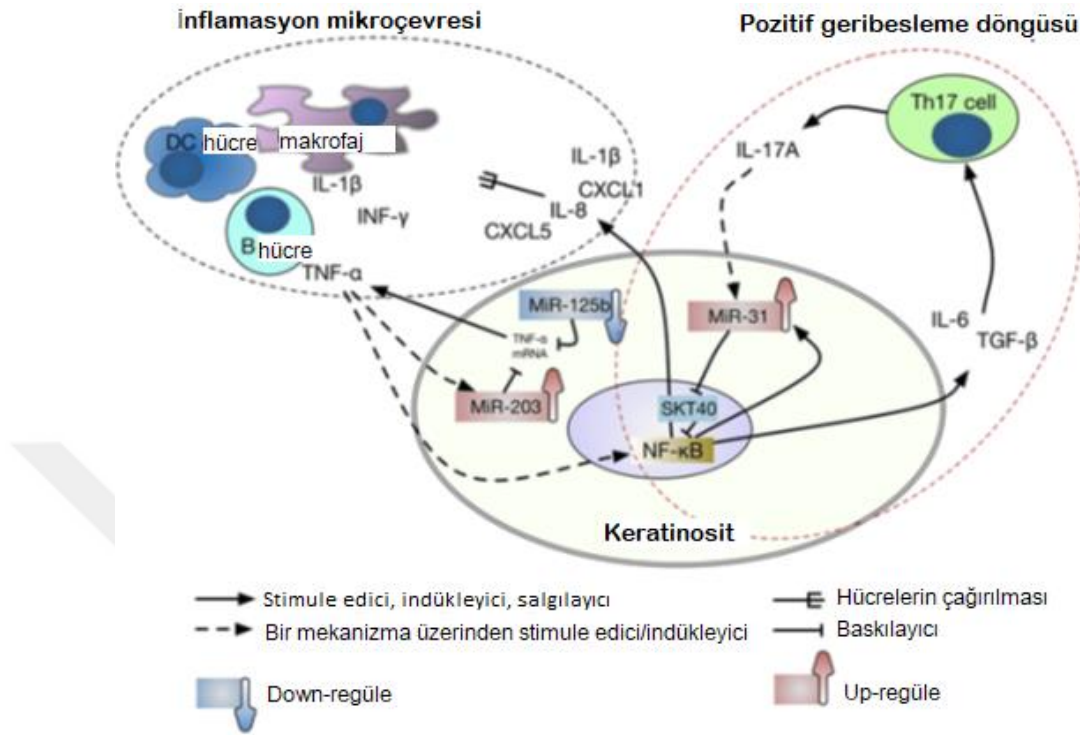
Bir derlemede ise yine biyopsi çalışmalarında miR31 ve miR203 yüksek ekspresyon gösterirken, miR99a ve miR125b down-regüle bulunmuştur (Wang vd 2017). Bu iki yaygın miRNA'ların psoriasis patogenezinde farklı aşamalarda rol aldıklarını düşündürmektedir.

miR-203, ilk deri spesifik miRNA olarak bilinmektedir ve protein kinaz c bağımlı keratinosit farklılaşmasının regülasyonunda görev almaktadır (Sonkoly vd 2010). Psoriatik deride en çok eksprese olanlardan bir diğeri de miR-146a'dır. miR-146a, inflamasyon, otoimmünite ve doğal immün yanıtın kritik bir negatif düzenleyicisidir (O'Connell vd 2012). Psoriatik deride ekspresyonu artan miR-31 NF-kB sinyal yolağını, lökosit çağırılmasını ve keratinositler tarafından üretilen endotel aktive edici sinyalleri düzenler (Xu vd 2013). Psoriatik deride ekspresyonu azalan miR-99a ve miR-125b'nin keratinosit proliferasyonunun ve farklılaşmasının regülasyonunda görev aldığı bilinmektedir (Lovendorf vd 2015).

miRNA'ların çeşitli deri hastalıklarında potansiyel biyomarkır olabileceği birçok çalışma ile gösterilmiştir (Jinnin 2014). miRNA'nın küçük deri örneklerinden veya kandan izole edilebilmesi, sistemik inflamatuvar durumların teşhisi ve / veya izlenmesi için potansiyel olarak yararlı, invazif olmayan bir yöntemi temsil eder. Ancak, incelenen çeşitli dokular arasındaki korelasyon eksikliği, cilt, kan ve saçta miRNA ekspresyonunun düzenleyici mekanizmalarının eksik bir şekilde anlaşıldığını düşündürmektedir (Xia vd 2012).

Keratinositler ve immün hücreleri arasındaki etkileşimin epidermal patolojik değişikliklere yol açtığı bilinmektedir. İmmün hücre kaynaklı sitokinler, keratinosit proliferasyonuna katkıda bulunan ve keratinosit farklılaşmasını bozan inflamatuvar genlerin ekspresyonunu teşvik etmek için keratinositler üzerinde etkilidir. miRNA'lar ve inflamatuvar faktörler arasındaki etkileşim, bu biyolojik süreçlerde önemli bir rol oynar (Şekil 2.5). TNF- α , miR-203'ün yüksek ekspresyonunu indükler, fakat artmış miR-203, transkripsiyonel seviyede TNF- α ekspresyonunu inhibe eder. MiR-203'ün tersine, TNF-

α 'yı doğrudan transkripsiyon sonrası seviyesinde hedefleyen miR-125b ekspresyonu azalmıştır, bu da TNF- α 'nın artan ekspresyonunu açıklar niteliktedir (Wang vd 2017).



Şekil 2.5 miRNA ekspresyonu ve sitokinler arasındaki ilişki (Wang vd 2017)

2.3 Hipotez

Bu çalışmada, psoriasis patogeneğinde etkilenen alan ana hücreler olan Keratinositlerin, transforme ve primer hücre hatları kullanılarak, LPS (lipopolisakkarit) muamelesi ile hücre kültürü psoriasis modeli oluşturulup, hastalığın başlangıç aşamasında, miRNA ekspresyonlarının gösterilmesi ve ekspresyonu değişen miRNA'lar üzerinden psoriasis patogeneğinde ilk aşamanın belirlenmesi amaçlanmaktadır. Daha önce yapılan çalışmalar tarandığında miRNA profillendirmelerinin biyopsi örnekleri ve hücre kültürü ile yapıldığı fakat süreç bilgisi olmadan gerçekleştirildiği görülmektedir. Bizim çalışmamız ile psoriasis patogeneğinin ilk aşaması aydınlatılabilecektir. Böylelikle ilk değişenin bulunmasının hastalığın oluşumunun önlenmesi ve başlangıç patogeneğinin aydınlatılması açısından önemli bilgiler sunacağını düşünmekteyiz.

3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

3.1. Hücre Kültürü

Model olarak literatürde psoriasis araştırmalarında HaCaT hücre hattının yaygın olarak kullanıldığı görölmektedir (Wei vd 2016). Bu nedenle literatürde çalışmamızın kıyaslanabilir olması açısından temel alışma HaCaT hücre hattı üzerinden yapılmıştır. Asıl amacımıza ek olarak, hasta lezyonlarından biyopsi alarak keratinositleri diğer hücrelerden izole ve steril/dezenfekte edip yeterli sayıda başlangıç hücresiyle hücre kültüründe test sistemi kurmanın zorlukları göz önünde bulundurulduğunda primer keratinosit hücre hattı (HEKn) kullanmanın daha makul olacağı düşünöldü.

3.1.1. HaCaT hücre kültürü

62 yaşında beyaz ırk erkek derisinden izole edilen ve *in vitro* ortamda transforme edilen HaCaT hücreleri Anadolu Üniversitesi Fen Fakóltesi Biyoloji Bölümünden temin edildi. HaCaT hücre kültürü için DMEM- yüksek glikoz (Gibco) besiyeri, %10 FBS (Gibco), %1 penisilin-streptomisin (Gibco) ve 1x amphotericin B (Capricorn) ile karıştırıldı. Tam besiyeri 50ml'lik falkonlara bölündü ve +4°C'de muhafaza edildi. Stok kültürün (1 vial) içindeki hücreler 2ml'lik serolojik pipet ile hücreler süspanse edildi. Süspanse hücreden 20 µl alınıp 20 µl tripan mavisini ile boyandı. Bu süspansiyondan 20 µl alınarak Neubauer lamı ile canlı hücre sayımı gerçekleştirildi. Hücre sayımında 340.000 canlı hücre varlığı saptandı. Vialin tamamı tek bir 25T(Corning) flaska eklendi ve üzerine 4 ml taze soğuk besiyeri ilavesi ile inkübatöre kaldırıldı, 37°C'de, %5 CO² ve %95 nemli hava içeren ortamda inkübe edildi. Hücreler %80 yoğunluğa ulaştığında pasajlama işlemi gerçekleştirildi. Hücrelerden 6 pasaj gerçekleştirildi. Pasajlama işlemleri sonrasında hücre sayımı gerçekleştirildiğinde her flasktan ortalama 2,5-3 milyon hücre sayıldı. Deneylerin gerçekleştirilmesi için hücrelerin kültürüne devam edildi.

3.1.2. HEKn hücre kültürü

Yenidoğan sünnnet derisinden izole edilen insan epidermal keratinosit primer hücre hattı, HEKn (Gibco – C-001-5C) ticari olarak temin edildi. Hücre kültürü için dermal hücre bazal mediyumu (Medium 154; Gibco) içerisine içeriği Tablo 3.1’de verilen insan keratinosit büyüme kiti (HKGS kit; Gibco) eklendi ve keratinosit tam besiyeri hazırlanarak 50ml’lik falkonlara bölünüp, +4°C’ye kaldırıldı.

Tablo 3.1 HKGS kit içeriği

Madde	Konsantrasyon
IGF-1	5 µg/ml
Bovin Transferrin	2.5 mg/ml
Hidrokortizon	0.18 mg/ml
BPE	12 mg protein/ml
EGF	10 ng/ml
Gentamicin/Amphotericin B	5 mg/ml, 125 µg/ml

HEKn stok kültürü (1 vial) çözüldü ve 2 ml’lik serolojik pipet ile hücreler süspansiyon edildi. Süspansiyon hücreden 20 µl alınıp 20 µl tripan mavisi ile boyandı. Bu süspansiyondan 20 µl alınarak Neubauer lamı ile canlı hücre sayımı gerçekleştirildi. Hücre sayımı sonucuna göre canlı hücre sayısının 290.000 hücre/ml olduğu saptandı. Her flaska (T25) ortalama 62.500 hücre ekileceği için 5 adet flask kullanıldı. Her flaska 200 µl hücre süspansiyonu ekildi ve üzerlerine 5 ml keratinosit tam besiyeri ilave edildi.

Hücreler 37°C’de, %5 CO² ve %95 nemli hava içeren etüvde inkübe edildi. Her 24 saat sonunda kontrol edildi, 96 saat sonunda yapışan hücre oranının %65 olduğu gözlemlendi ve besiyeri 3 ml taze besiyeri ile değiştirildi. İlk keratinosit kolonisi hücrelerin ekimini takip eden 8. günde gözlemlendi. Koloni görülmesini takiben hücrelerin besiyerleri 72 saatte bir 3 ml taze besiyeri ile değiştirilmeye başlandı.

Hücreler %70 yoğunluğa ulaştığında pasajlama işlemi gerçekleştirildi. Besiyeri uzaklaştırılan hücreler 3 ml PBS ile yıkandı. PBS uzaklaştırıldıktan sonra hücrelerin üzerine 3 ml Tripsin/EDTA (%0.05, Capricorn) ilave edildi ve hemen çekildi. Hücrelerin üzerine 2ml Tripsin/EDTA ilave edildi ve oda sıcaklığında bekletildi. Bu aşamada koloninin etrafındaki hücrelerin kalktığı fakat koloninin merkezindeki hücreler yapışık olarak gözlemlendi. Daha fazla tripsin muamelesi olmaması için flaska tripsin inhibisyonunu sağlayacak 6 ml tripsin nötralizatör (Gibco) ilave edildi ve bütün içerik steril 15 ml falkon tüpe aktarılarak 180 g de 7 dakika santrifüj edildi. Primer flaskta kalan hücrelerin üzerine de 3,5 ml taze besiyeri ilave edildi ve flask 37°C'de, %5 CO² ve %95 nemli hava içeren etüve kaldırıldı. Santrifüj sonrası supernatant uzaklaştırıldı ve pellet 2 ml taze besiyeri ile süspanse edildi. Hücre sayımı gerçekleştirildi. Hücre sayımı sonucuna göre canlı hücre sayısı 160.000 hücre/ml olarak saptandı. Bu hücreler iki yeni flaska paylaştırıldı. Üzerlerine 2,5 ml taze besiyeri ilavesi ile kültüre edildi. Flasklar 37°C'de, %5 CO² ve %95 nemli hava içeren etüve kaldırıldı.

3.2. MTT Testi

Hücre kültürü psoriasis modelini oluşturmak için, proinflatuar sitokinlerin ekspresyonlarını indükleyerek inflamasyonu başlatan LPS kullanılması planlandı. LPS'nin toksik doz belirlenmesi için MTT testi yapıldı (Vybrant MTT Cell Proliferation Assay Kit). İlk olarak 0, 10, 50, 100, 200, 500, 1000,1500ng/ml konsantrasyonda PBS ile sulandırılan LPS triplike olarak 12, 24, 48 ve 72. saat uygulandı. Bunun için 96-well platelerin her kuyusuna 10.000 hücre ekimi gerçekleştirildi. 24 saat inkübasyon sonrası LPS (Sigma-L2630) eklenerek hücreler muamele edildi. Daha sonra 12, 24, 48 ve 72. saatlerde okumalar gerçekleştirildi.

Reaktif Hazırlama için;

- MTT'nin (Bileşen A) bir 5 mg tüpüne 1 ml steril PBS ekleyerek, 12 mM MTT stok solüsyonu hazırlandı. Çözülene kadar vorteksleme işlemiyle karıştırıldı.
- 1 gr SDS içeren bir tüpe 10 ml 0.01 M HCl eklendi (Bileşen B). SDS çözülene kadar köpürtmeden karıştırıldı.

Hücrelerin işaretlenmesi için;

- Besiyeri uzaklaştırıldı ve 100 µl taze besiyeri ile değiştirildi.
- 10 µL 12 mM MTT stok solüsyonunu her kuyuya eklendi. Negatif kontrol olarak sadece 100 µL medium içeren kuyuya 10 µL MTT stok solüsyonu eklendi.
- 37°C'de 4 saat inkübasyona bırakıldı.

- 100 µL SDS-HCl solüsyonu her kuyuya eklendi ve pipetaj yapılarak karıştırıldı.
- Mikroplate 37°C'de 4 saat nemli ortamda inkübe edildi.
- Pipetaj yardımıyla bütün örnekler yeniden karıştırıldı ve 570 nm de absorbands ölçümü yapıldı.

İlk testten sonra toksisite görülmedi ve LD50 dozunu belirlemek için daha yüksek konsantrasyonlarda LPS muamelesi ile MTT testi tekrarlandı. 0, 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 3.5, 4, 4.5, 5, 5.5, 6, 6.5, 7, 7.5 ve 8 µg/ml konsantrasyonda LPS 24, 48 ve 72. saat muamele edildi.

3.3. Sitokin tayini

Kültüre edilen hücrelerin besiyerlerinde pro-inflamatuar ve inflamatuvar mediatörler olan IL-1 β , IL-17, TNF- α ve LL-37 miktarları ELISA ile tayin edildi.

6-well platalere kuyu başına 100.000 hücre ekimi yapıldı. 24 saat sonrasında test dozu olarak belirlenen LPS 200 ng/ml hücrelere uygulandı. Hücre kültürü 3 tekrarlı olarak gerçekleştirildi. 1., 2., 4., 8., 12., 24., 48., 72. saatlerde kültürlerin besiyerleri toplanarak ELISA ile sitokin salınımlarının miktarı zamana bağlı olarak tayin edildi. Belirtilen saatlerde toplanan besiyerleri ELISA ölçümü gerçekleştirilene kadar +4°C'de muhafaza edildi.

Sitokin tayini YLBiont marka kit ile gerçekleştirildi. Biotin çift antikor (sandwich) prensibine dayalı bu sistemde, kuyucuklar sitokinler için spesifik antikor ile kaplıdır. Standartlar her sitokin için farklı konsantrasyonlarda hazırlandı (Tablo 3.2)

Tablo 3.2 Standart konsantrasyonları

	LL-37	TNF- α	IL-17	IL-1 β
Standart 1	7.5 ng/ml	30 ng/ml	20 ng/ml	250 pg/L
Standart 2	15 ng/ml	60 ng/ml	40 ng/ml	500 pg/L
Standart 3	30 ng/ml	120 ng/ml	80 ng/ml	1000 pg/L
Standart 4	60 ng/ml	240 ng/ml	160 ng/ml	2000 pg/L
Standart 5	120 ng/ml	480 ng/ml	320 ng/ml	4000 pg/L

Standart kuyucuğuna 50 µl standart ve 50 µl Streptavidin-HRP eklendi. Örnek kuyucuklarına 40 µl örnek + 10 µl antikor+ 50 µl Streptavidin-HRP eklendi. 37°C derecede 60 dakika inkübasyon sonrasında yıkama solüsyonu ile yıkama gerçekleştirildi. Önce 50 µl kromojen solüsyonu A ve 50 µl Kromojen solüsyonu B sırasıyla kuyulara eklendi. 10 dakika 37°C derecede karanlıkta inkübasyon sonrasında 50 µl Stop solüsyonu ilave edildi (mavi renk sarıya dönecek). Oluşan renk değişikliği ile absorbanslar 450 nm dalga boyunda saptandı. Standartlar ile karşılaştırılarak örneklerin konsantrasyonları hesaplandı.

3.4. miRNA izolasyonu

Sitokin deneylerinden sonra, hedefimizin ikinci aşaması olan miRNA değişimlerinin analizine başlandı. Total RNA izolasyonu için 6-well platelere her kuyuya 100.000 hücre ekildi. 24 saat sonrasında 200 ng/ml LPS muamelesi yapıldı. Her saatin LPS muamelesi triplike olarak gerçekleştirildi ve ayrıca her saatin 1 adet kontrolü olacak şekilde ekim yapıldı ve ticari kit yardımı ile izolasyonlar gerçekleştirildi (Qiagen – miRNeasy Mini Kit). 1., 2., 4., 8., 12., 24., 48., 72. saatlerde kuyulardaki hücreler 700 µl QIAzol lysis Reagent ile kaldırılıp 1,5 ml'lik eppendorflara aktarıldı. Tüm kuyulardan hücre toplanana kadar -80°C'ye kaldırıldı. İzolasyonun yapılacağı zaman +4° C'de erimesi beklendi. Oda sıcaklığında (15-25° C'de) 5 dakika bekletildikten sonra 140 µl kloroform eklendi ve 15 saniye vorteks sonrası oda sıcaklığında 3 dakika inkübe edildi. İnkübasyon sonrası 12000 g'de +4°C'de 15 dakika santrifüj edilip supernatant kısmı yeni bir eppendorfa aktarıldı (aradaki faza dokunulmadan). Eppendorfa aktarılan supernatantın, 1,5 katı kadar %100'lük etil alkolle (yaklaşık 525 µl) yavaşça pipetaj yapıldı. RNeasy min elute spin kolonlarına 700 µl örnek koyulup, 8000 g'de oda sıcaklığında 15 saniye santrifüj edildi. Daha sonra kolona 700 µl RWT buffer eklendi ve 8000 g'de 15 saniye santrifüj yapıldı. Bu işlemleri takiben 500 µl RPE buffer eklendi ve 8000 g'de 15 saniye santrifüj edildi. Sonrasında 500 µl RPE buffer eklendi ve 2 dakika 8000 g'de santrifüj edildi. Son kurutma fazı için spin kolon yeni bir 2ml'lik toplama tüpüne aktarıldı ve en yüksek hızda 1 dakika santrifüj edildi. Spin kolonlar 1,5 ml'lik toplama tüplerine yerleştirildi ve 30µl RNase-free water spin kolonun ortasına koyulup 1 dakika 8000 g'de santrifüj yapıldı böylelikle kolonda bulunan total RNA 1,5 ml'lik yeni eppendorfa toplandı. RNA'ların konsantrasyon ve saflık tayinleri Nanodrop cihazı ile gerçekleştirildi. cDNA'ya dönüştürülmeyen RNA'lar -80°C'e kaldırıldı

3.5. cDNA Sentezi

miRNA ekspresyon analizi için cDNA dönüşümü gerçekleştirildi (Qiagen - miScript II Rt Kit). Reaksiyon karışımı Tablo 3.3' de verilen miktarlarla hazırlanmıştır.

Tablo 3.3 cDNA sentezi için hazırlanan reaksiyon karışımı

Madde	Miktar
5x HiSpec Buffer	4 µl
10x MiScript Nucleics Mix,	2 µl
MiScript Reverse Transkriptaz Mix	2 µl
RNA	1 µg
dH ₂ O	
Toplam	20µl

Hazırlanan reaksiyon karışımını içeren tüplerin 37°C derecede 60 dakika ve sonrasında 95°C derecede 5 dakika inkübasyonu ile reaksiyon gerçekleştirildi.

3.6. Ekspresyon Analizi

mir-203 epidermiste ve psoriasis doku biyopsilerinde en yüksek ekspresyon gösteren keratinositte özgü miRNA' dır. miRNA ekspresyonlarının sitokin salınımı ile aynı anda yükselmeyeceği düşünülerek belirlenen sitokin salınım saatlerinde miR203 ekspresyonu kontrol edildi. miR203 ekspresyonunun arttığı saatler ve sitokin salınım saatleri kullanılarak, asıl hedefimiz olan tüm miRNA profilinin yapılacağı "array" için miRNA' ların izolasyon saatleri belirlendi. Kontrol için U6 miRNA kullanıldı.

miR-203 ekspresyonu özgün primer ve SYBR Green master mix ile Real-Time PCR gerçekleştirildi. Reaksiyon karışımı Tablo 3.4'de verilen miktarlarla hazırlandı.

Tablo 3.4 Real-Time PCR reaksiyon karışımı

Madde	Miktar
2xSYBR green PCR mastermix	12,5 µl
10x Universal Primer	2,5 µl
10x Primer Assay (miR-203 veya U6)	2,5 µl
cDNA	2,5 µl
dH ₂ O	5 µl
Toplam	25 µl

Reaksiyon koşulları;

95°C 10 dakika
 94°C 15 saniye,
 55°C 30 saniye,
 70°C 30 saniye

} 40 döngü

Ekspresyon değişimleri $2^{-\Delta\Delta CT}$ metodu ile belirlendi.

3.7. miRNA array

Sitokin salınımı ve ekspresyon değişikliği gösteren saatlerin içerisinde ilk, 1,5. saat ve en yüksek 8.saatte, hücrelerden total RNA izolasyonları gerçekleştirildi ve miRNA arraye gönderilmek için hazırlandı.

Total RNA izolasyonu için T25 flaska 1.500.000 hücre ekimi gerçekleştirildi. 24 saat sonrasında 200ng/ml LPS muamelesi yapıldı. 1,5. ve 8., saatlerde flasklardaki hücreler 1 ml QIAzol lysis Reagent ile kaldırılıp 1,5 ml'lik eppendorflara aktarıldı. Hücreler -80° C'ye kaldırıldı, izolasyon yapılacağı zaman +4°C'de erimesi beklendi. Oda sıcaklığında (15-25°C'de) 5 dakika bekletildikten sonra 200 µl kloroform eklendi ve 15 saniye vorteks sonrası oda sıcaklığında 3 dakika inkübasyon edildi. İnkübasyon sonrası 12000 g'de +4°C'de 15 dakika santrifüj edilip supernatant kısmı yeni bir ependorfa aktarıldı (aradaki faza dokunulmadan). Ependorfa aktarılan supernatantın, 1,5 katı kadar %100'lük etil alkolle (yaklaşık 525 µl) yavaşça pipetaj yapıldı. RNeasy min elute spin kolonlarına 700 µl örnek koyulup, 8000 g'de oda sıcaklığında 15 saniye santrifüj edildi. Daha sonra kolona 700 µl RWT buffer eklendi ve 8000 g'de 15 saniye santrifüj yapıldı.

Bu işlemleri takiben 500 µl RPE buffer eklendi ve 8000 g'de 15 saniye santrifüj edildi. Sonrasında 500 µl RPE buffer eklendi ve 2 dk 8000 g'de santrifüj edildi. Son kurutma fazı için spin kolon yeni bir 2 ml'lik toplama tüpüne aktarıldı ve en yüksek hızla 1 dakika santrifüj edildi. Spin kolonlar 1,5 ml'lik toplama tüplerine yerleştirildi ve 50µl RNase-free water spin kolonun ortasına koyulup 1 dk 8000 g'de santrifüj yapıldı böylelikle kolonda bulunan total RNA 1,5 ml'lik yeni eppendorfa toplandı. RNA'ların konsantrasyon ve saflık tayinleri Nanodrop cihazı ile gerçekleştirildi.

Macrogen firmasına yaklaşık 4 µg RNA içeren 4 adet örnek (LPS 1,5. saat, Kontrol 1,5. saat, LPS 8. saat, Kontrol 8. saat) miRNA array hizmet alımı için gönderildi.

Macrogen firmasında miRNA array analizinde Affymetrix Genechip miRNA 4.0 array platformu kullanılarak 2578 miRNA'nın ekspresyonu örnekler arasında karşılaştırılmıştır. Bu karşılaştırma için öncelikle RNA saflığı ve bütünlüğü ND-1000 Spektrofotometre (NanoDrop, Wilmington, ABD) ve Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Palo Alto, ABD) cihazlarıyla değerlendirilmiştir. Affymetrix Genechip miRNA 4.0 array işlemi üreticinin protokolüne göre gerçekleştirilmiştir. 1000ng RNA örnekleri, FlashTag™ Biotin RNA İşaretleme Kiti (Genisphere, Hatfield, PA, ABD) ile işaretlenmiştir. İşaretlenmiş RNA, üretici tarafından sağlanan standart prosedürlere göre ölçülmüş, parçalara ayrılmış ve miRNA arraye hibritlenmiştir. İşaretli RNA 5 dakika 99° C'ye ve ardından 5 dakika 45° C'ye ısıtılmıştır. RNA dizi hibridizasyonu, Affymetrix® 450 Fluidics Station üzerinde 48° C'de 16 saat boyunca dakikada 60 rotasyonda çalkalama ile gerçekleştirilmiştir. Çipler yıkanmış ve Genechip Fluidics Station 450 (Affymetrix, Santa Clara, California, ABD) kullanılarak boyanmıştır. Çipler daha sonra bir Affymetrix GCS 3000 scanner (Affymetrix, Santa Clara, California, USA) ile taranmıştır. Sinyal değerleri Affymetrix® GeneChip™ Command Console yazılımı kullanılarak hesaplanmıştır. Affymetrix GeneChip® Command Console® Software (AGCC) tarafından sağlanan yazılım kullanılarak, ham veriler çıkarılmıştır.

3.8. mRNA array

miRNA array analizine gönderilen örneklerden mRNA array analizi de Macrogen firmasından hizmet alımı yapılarak gerçekleştirilmiştir. Affymetrix Whole transcript Expression array platformu kullanılarak 44630 transkript ekspresyonu örnekler arasında karşılaştırılmıştır.

Bu karşılaştırma için öncelikle RNA saflığı ve bütünlüğü ND-1000 Spektrofotometre (NanoDrop, Wilmington, ABD) ve Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Palo Alto, ABD) cihazlarıyla değerlendirilmiştir. Affymetrix Tüm Transkript Ekspresyon array süreci, üreticinin protokolüne göre (GeneChip Whole Transcript PLUS reagent Kit) gerçekleştirilmiştir.

cDNA, üretici protokolüne göre GeneChip WT (Whole Transcript) Amplifikasyon kiti kullanılarak sentezlenmiştir.

Daha sonra sens cDNA fragmanlanmış ve GeneChip WT Terminal İşaretleme kiti kullanılarak TdT (terminal deoksinükleotidil transferaz) ile biyotin işaretlenmiştir.

Yaklaşık 5.5 µg işaretli DNA hedefi, 45° C'de 16 saat boyunca Affymetrix GeneChip Human Array ile hibridize edilmiştir. Hibritlenmiş diziler yıkanmış ve GeneChip Fluidics Station 450 üzerinde boyanmış ve GCS3000 Scanner (Affymetrix) üzerinde taranmıştır.

Sinyal değerleri Affymetrix® GeneChip™ Command Console yazılımı kullanılarak hesaplanmıştır. Gen seviyesinde sonuçlar belirlenmiş ve farklı olarak eksprese olan genlerin analizi gerçekleştirilmiştir.

3.9. İstatistik

miRNA array istatistikleri MacroGen tarafından yapılmıştır. LPS muamelesi yapılmış hücreler ile kontrol hücreler arasındaki analiz kat değişimleri kullanılarak bağımsız T testi ile gerçekleştirilmiş, Benjamini-Hochberg algoritması kullanılarak *p* değeri hesaplanmıştır.

mRNA array istatistikleri MacroGen tarafından yapılmıştır. LPS muamelesi yapılmış hücreler ile kontrol hücreler arasındaki karşılaştırmalı analiz kat değişimleri kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Gen problemleri için fonksiyonel analizi, gen ontolojisi (<http://geneontology.org/>) ve KEGG (<http://kegg.jp>) kullanılarak yapılmıştır. Tüm istatistiksel testler ve farklı şekilde ifade edilen genlerin görselleştirilmesi, R istatistik dili v. 3.1.2 kullanılarak yapılmıştır.

MacroGen firmasından alınan veriler ile kendi laboratuvarımızda miRNA array sonuçlarında gelen artan ve azalan miRNA'ların olası fonksiyonel yollarını belirlemek için miRPath v.3 (Vlachos vd 2015) veritabanı kullanıldı. mRNA array sonuçlarında gelen

artan ve azalan miRNA'ların olası fonksiyonel yollarını belirlemek için PANTHER v13.1 veritabanı kullanılarak yolak analizi gerçekleştirildi. Bu mRNA'ları hedefleyen miRNA'lar TarBase v.8 (Karagkouni vd 2018) veritabanı kullanılarak belirlendi. Ayrıca STRING v10.5 veritabanı kullanılarak protein-protein etkileşimleri gösterildi.

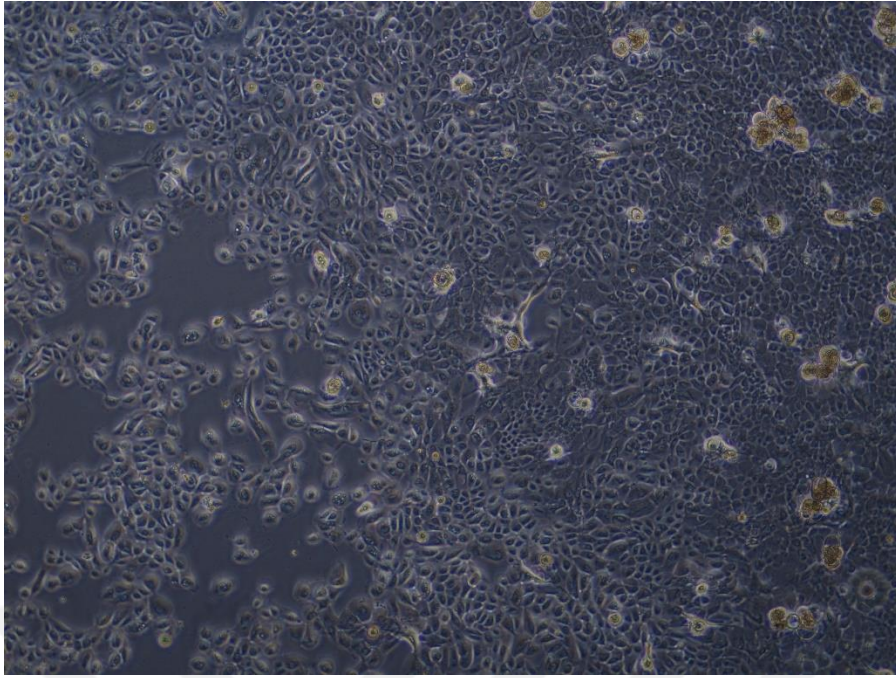
1,5 ve 8. saatler arasında ekspresyon farklılığı gösteren miRNA ve mRNA'larındaki bu ekspresyon değişimlerinin anlamlılığının belirlenmesi için Fisher-Exact test kullanıldı. Yapılan tüm istatistik verileri $p < 0.05$ anlamlı olarak kabul edilerek değerlendirildi.



4. BULGULAR

4.1 Hücre Kültürü

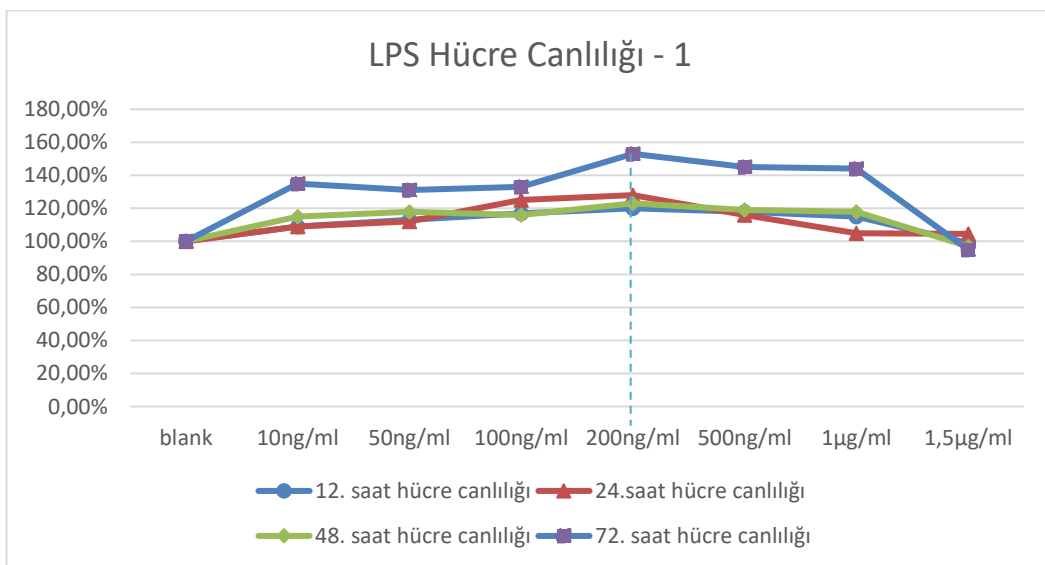
DeneYlerimizi planlarken asıl test grubu olarak, literatürde yer alan diğEr çalışmalarda da kullanılan HaCaT hücre hattını belirledik. Projenin ana/temel hedefi dışında primer hücre olan HEK_n hücre hattında LPS muamelesine cevabı görmek için, ek bir deney grubu olarak belirlendi. HEK_n hücreleri primer hücre hattı olmaları sebebiyle yavaş büyüme hızına sahiptirler. Aynı zamanda growth kit gereksinimleri varlığı ve zamanla growth kitlerin etkinliklerini azaltmaları sebebiyle 2. pasaj sonrasında hücrelerin büyümeleri iyice yavaşlamış ve doubling süreleri uzamıştır. Ayrıca yoğun gözükEn flasklardan tripsinizasyon işlemi gerçEkleştirildiğinde en fazla 300.000 hücre sayılmıştır (şekil 4.1). Bu sayı da deneylerimiz için yeterli olmamaktadır. Bunun sebebi olarak hücrelerin büyük olması ve yayılarak çoğalması olduğu öngörölmüştür. Bu sebeple HEK_n hücrelerin kültürü sonlandırıldı ve deneylerimize asıl hedefimiz olan HaCaT hücre hattı ile devam edildi.



Şekil 4.1 Yoğun HEK293 hücre flaskı (4x)

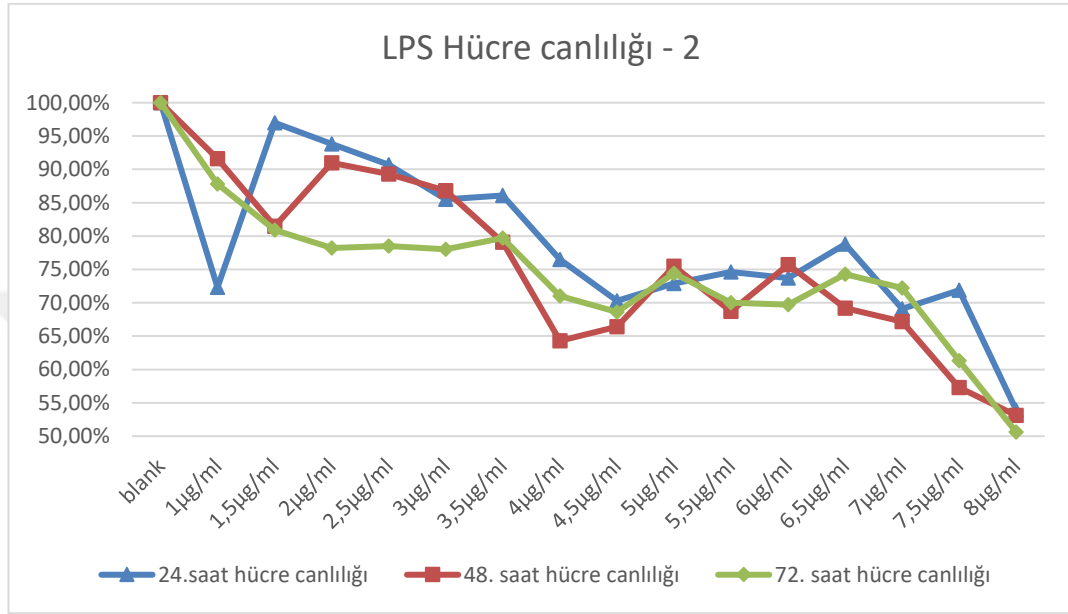
4.2 MTT Assay Sonuçları

LPS triplik olarak 10, 50, 100, 200, 500, 1000, 1500 ng/ml konsantrasyonda ve 12, 24, 48 ve 72 saat uygulandı. Hücre proliferasyon sonuçlarına göre 200 ng/ml LPS hücre proliferasyonunu en fazla arttıran doz olarak belirlendi (Şekil 4.2).



Şekil 4.2 LPS uygulanmış hücrelerin canlılık - zaman grafiği

İlk LPS testinden sonra toksisite görülmediği için daha yüksek konsantrasyonlarda LPS muamelesi ile MTT testi tekrarlandı. LPS triplike olarak 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 3.5, 4, 4.5, 5, 5.5, 6, 6.5, 7, 7.5 ve 8 µg/ml konsantrasyonda ve 24, 48 ve 72 saat uygulandı. Hücre proliferasyon değerlerine göre 72 saatte 8 µg/ml LPS' nin LD50 dozu olduğu belirlendi (Şekil 4.3).

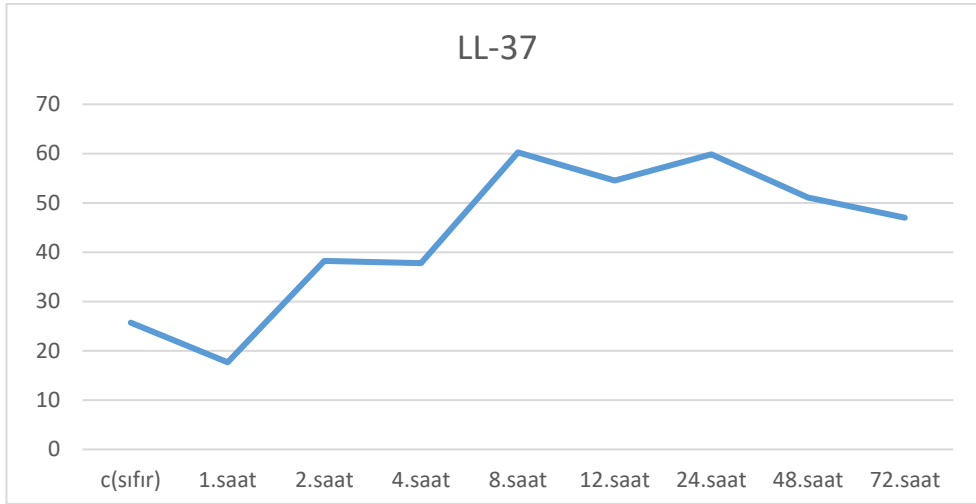


Şekil 4.3 Yüksek doz LPS Hücre canlılığı-zaman grafiği

4.3 Sitokin Tayini Sonuçları

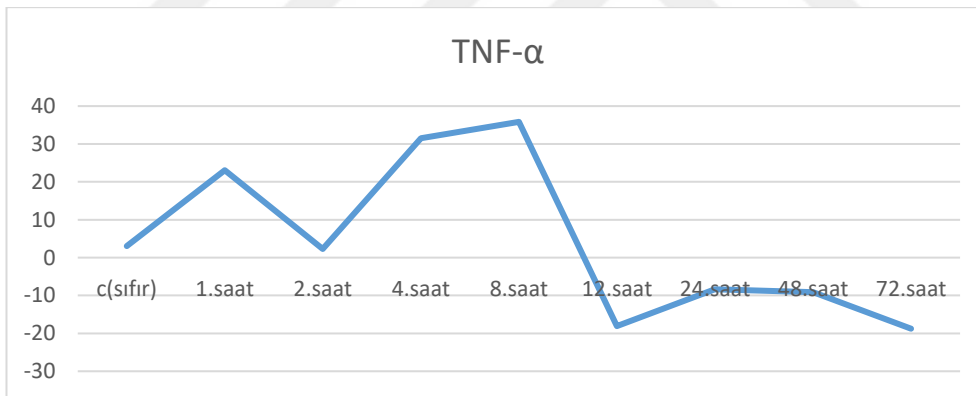
Tüm kültür hücrelerin besiyerlerinde pro-inflamatuar ve inflammatuar mediatörler olan IL-1 β , IL-17, TNF- α ve LL-37 miktarları ELISA ile tayin edildi.

Antimikrobiyal peptid olan LL-37 salınımının 1,5. saatte başladığı ve 8. saatte en yüksek değerine ulaştığı, 24. saatten sonra düşmeye başladığı gözlemlendi (Şekil 4.4)



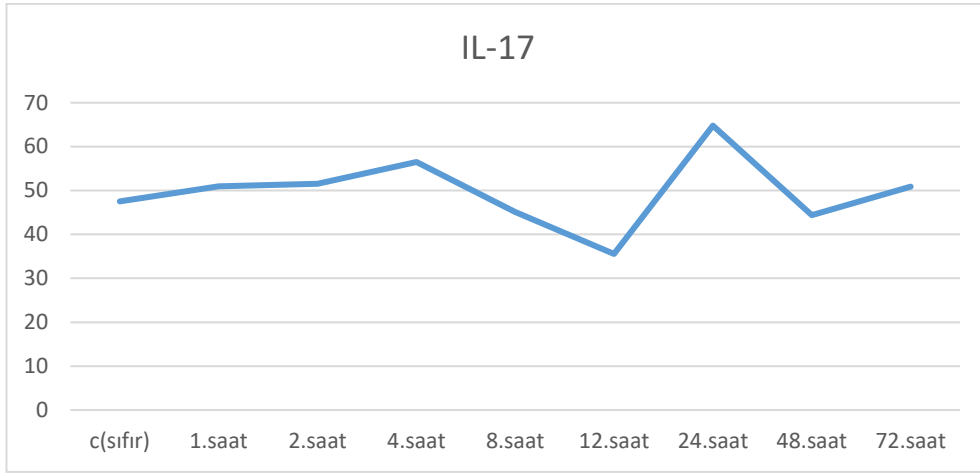
Şekil 4.4 LL-37 zamana göre salınım grafiği (ng/ml)

TNF- α salınımının 3. saatte artmaya başladığı, 4-8. saat arasında kısmi plato yaptığı (8. saatte %25 artış gösterdiği) ve sonrasında hızla düştüğü gözlemlendi (Şekil 4.5).



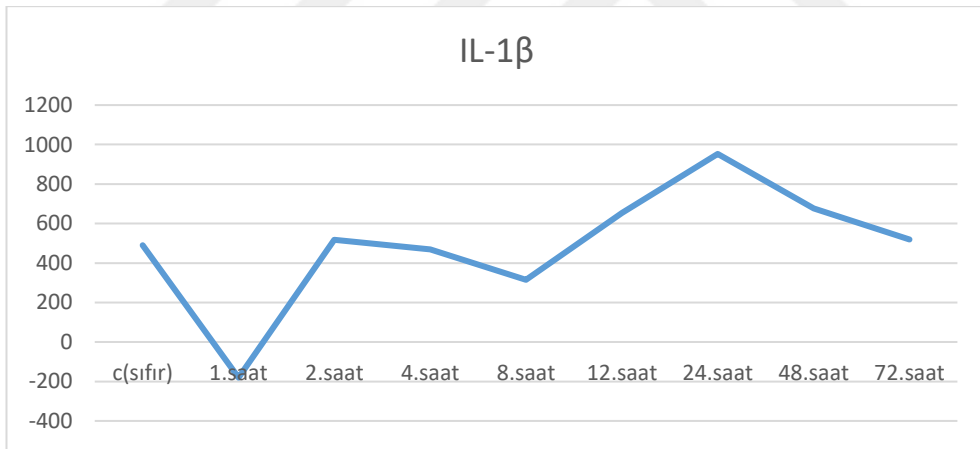
Şekil 4.5 TNF- α zamana göre salınım grafiği (ng/L)

IL-17 salınımının 24. saate kadar belirgin bir değişiklik olmadığı, 24. saatte (%48'lik) bir artış olduğu ve hemen düştüğü gözlemlendi (Şekil 4.6)



Şekil 4.6 IL-17 zaman göre salınım grafiği (ng/L)

IL-1 β salınımının 12. Saatte yükselmeye başladığı, 24. Saatte %50 artış gösterdiği ve 72. Saatte başlangıç seviyesine döndüğü gözlemlendi (Şekil 4.7).

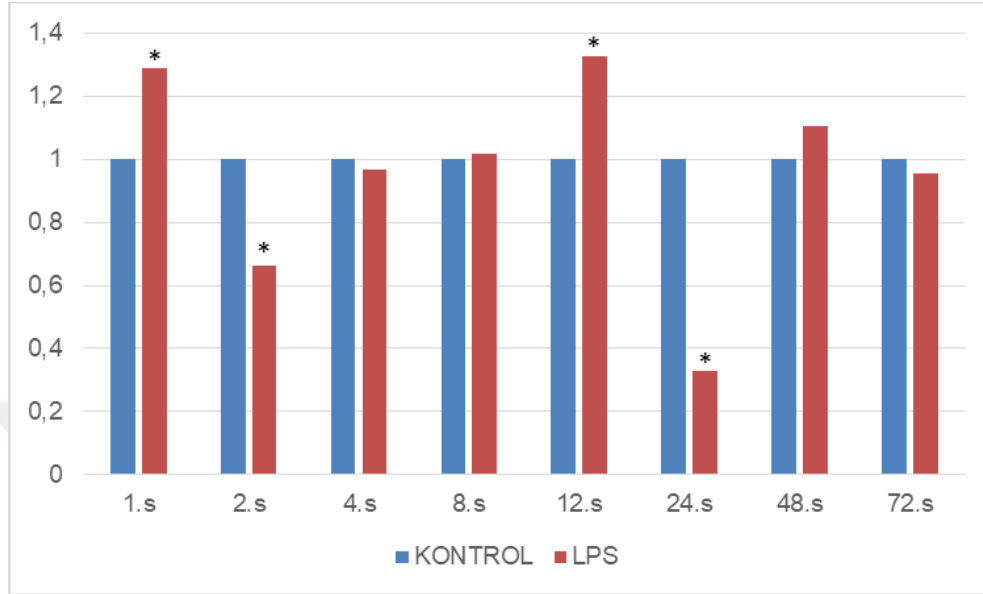


Şekil 4.7 IL-1 β zamana göre grafiği (pg/L)

4.4 miR-203 ekspresyonu

Epidermiste ve psoriasis doku biyopsilerinde en yüksek ekspresyon gösteren keratinositte özgü miRNA olan miR203 ekspresyonunun arttığı saatlerin belirlenmesi için qRT-PCR gerçekleştirildi. qRT-PCR sonuçlarına göre 1., 2., 12. ve 24. saatlerde miR203

ekspresyonu LPS indüklenen hücreleri ve kontrol hücreler arasında karşılaştırıldığında kat değişimlerinin anlamlı derecede fark gösterdiği belirlendi (Şekil 4.8).



Şekil 4.8 miR203 ekspresyonunun zamana bağlı kat değişimi (*, p<0.05)

4.5 LPS muamelesinin miRNA ekspresyonlarına etkisi

4.5.1 Bir buçuk saat LPS muamelesinin etkisi

Herhangi bir madde uygulanmamış kontrol grubu ile 1,5 saat LPS ile muamele edilen psoriasis model hücrelerinin miRNA ekspresyonları karşılaştırıldığında 129 adet miRNA ekspresyonunun 1,5 kat ve üzeri oranda değiştiği görülmüştür. 95 miRNA'nın ekspresyonunun LPS muamelesi ile azaldığı (Tablo 4.1) ve 34 adet miRNA'nın ekspresyonunun arttığı gözlenmiştir (Tablo 4.2). Ekspresyonu azalan miRNA'ların rol alabilecekleri hücre yolaklarının belirlediği KEGG yolak analizi Tablo 4.2 ve heatmap analizi Şekil 4.9 da gösterilmiştir. Ekspresyonu artan miRNA'ların rol alabilecekleri hücre yolaklarının belirlediği KEGG yolak analizi Tablo 4.4 ve heatmap analizi Şekil 4.10 da gösterilmiştir.

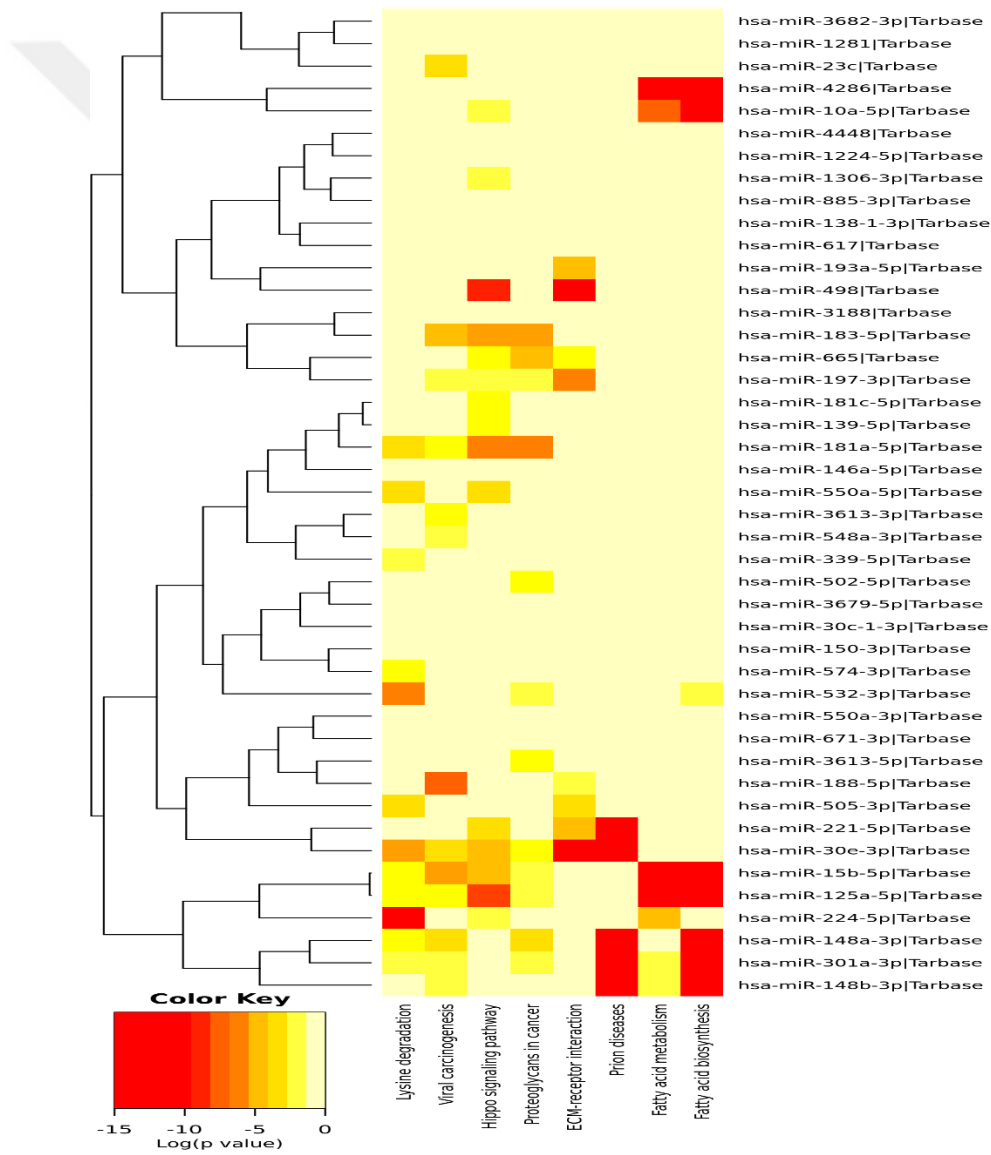
Ekspresyonu en çok azalan miRNA -6,62665 kat fark ile hsa-miR-7162-3p olurken, ekspresyonu en çok artan miRNA 3,287703 kat fark ile hsa-miR-5684 olduğu belirlenmiştir.

Tablo 4.1 Bir buçuk saat LPS muamelesiyle ekspresyonu azalan miRNA'lar

No	miRNA ismi	Kat değişimi			
1	hsa-miR-7162-3p	-6,62665	48	hsa-miR-934	-1,92063
2	hsa-miR-1306-3p	-4,00891	49	hsa-miR-4502	-1,9038
3	hsa-miR-4669	-3,79127	50	hsa-miR-6833-5p	-1,89001
4	hsa-miR-125a-5p	-3,75203	51	hsa-miR-4663	-1,88655
5	hsa-miR-6716-3p	-3,42653	52	hsa-miR-3937	-1,88332
6	hsa-miR-10a-5p	-3,28329	53	hsa-miR-7107-5p	-1,86127
7	hsa-miR-5739	-3,25593	54	hsa-miR-139-5p	-1,86025
8	hsa-miR-148b-3p	-3,25566	55	hsa-miR-550a-3p	-1,85696
9	hsa-miR-3613-5p	-3,17591	56	hsa-miR-30c-1-3p	-1,85436
10	hsa-miR-6831-5p	-3,12659	57	hsa-miR-4286	-1,84523
11	hsa-miR-5194	-3,00062	58	hsa-miR-6086	-1,81008
12	hsa-miR-885-3p	-2,96062	59	hsa-miR-5189-5p	-1,80759
13	hsa-miR-3911	-2,9468	60	hsa-miR-3646	-1,79088
14	hsa-miR-4534	-2,87498	61	hsa-miR-221-5p	-1,78146
15	hsa-miR-193a-5p	-2,67517	62	hsa-miR-671-3p	-1,77
16	hsa-miR-6790-5p	-2,65117	63	hsa-miR-502-5p	-1,76137
17	hsa-miR-4419a	-2,62506	64	hsa-miR-1281	-1,75158
18	hsa-miR-8064	-2,46028	65	hsa-miR-1229-5p	-1,74584
19	hsa-miR-183-5p	-2,4423	66	hsa-miR-617	-1,74382
20	hsa-miR-548a-3p	-2,42291	67	hsa-miR-504-3p	-1,73826
21	hsa-miR-378e	-2,37792	68	hsa-miR-4732-5p	-1,73167
22	hsa-miR-4298	-2,37051	69	hsa-miR-30e-3p	-1,72325
23	hsa-miR-138-1-3p	-2,35388	70	hsa-miR-3613-3p	-1,71457
24	hsa-miR-148a-3p	-2,3512	71	hsa-miR-4701-3p	-1,70071
25	hsa-miR-301a-3p	-2,30036	72	hsa-miR-1973	-1,68069
26	hsa-miR-146a-5p	-2,28509	73	hsa-miR-4448	-1,67954
27	hsa-miR-7847-3p	-2,28412	74	hsa-miR-15b-5p	-1,65361
28	hsa-miR-6812-5p	-2,26338	75	hsa-miR-6778-5p	-1,64022
29	hsa-miR-6776-5p	-2,25263	76	hsa-miR-23c	-1,6279
30	hsa-miR-532-3p	-2,25182	77	hsa-miR-4459	-1,62591
31	hsa-miR-6769a-5p	-2,24943	78	hsa-miR-181a-5p	-1,62585
32	hsa-miR-550a-5p	-2,24473	79	hsa-miR-3188	-1,62269
33	hsa-miR-197-3p	-2,23411	80	hsa-miR-2116-5p	-1,61357
34	hsa-miR-8071	-2,19672	81	hsa-miR-181c-5p	-1,59451
35	hsa-miR-505-3p	-2,16427	82	hsa-miR-6763-5p	-1,59444
36	hsa-miR-6865-5p	-2,16262	83	hsa-miR-6068	-1,59102
37	hsa-miR-4710	-2,15429	84	hsa-miR-3935	-1,5875
38	hsa-miR-3682-3p	-2,13147	85	hsa-miR-339-5p	-1,58432
39	hsa-miR-1224-5p	-2,10662	86	hsa-miR-574-3p	-1,58247
40	hsa-miR-942-3p	-2,08226	87	hsa-mir-92b	-1,57368
41	hsa-miR-7109-5p	-2,0492	88	hsa-miR-4667-5p	-1,56944
42	hsa-miR-188-5p	-2,02246	89	hsa-miR-3679-5p	-1,56029
43	hsa-miR-3141	-1,98934	90	hsa-miR-665	-1,54142
44	hsa-miR-6782-5p	-1,97125	91	hsa-miR-6124	-1,52476
45	hsa-miR-498	-1,95554	92	hsa-miR-4330	-1,52243
46	hsa-miR-3135b	-1,93796	93	hsa-miR-4800-5p	-1,51603
47	hsa-miR-150-3p	-1,92316	94	hsa-miR-224-5p	-1,50152
			95	hsa-miR-584-3p	-1,50135

Tablo 4.2 Bir buçuk saat LPS muamelesiyle ekspresyonu azalan miRNA'ların KEGG yolak analizi

KEGG yolağı	p değeri	Gen sayısı	miRNA sayısı
Prion hastalığı (hsa05020)	<1e-325	8	5
Yağ asidi biyosentezi (hsa00061)	<1e-325	7	8
Hippo sinyal yolağı (hsa04390)	4.330027e-09	83	15
ECM-reseptör etkileşimi (hsa04512)	0.0001665746	30	8
Viral karsinogenez (hsa05203)	0.0001676814	112	13
Lisin degradasyonu (hsa00310)	0.0003891305	30	12
Yağ asidi metabolizması (hsa01212)	0.001435271	18	7
Kanser ilişkili proteoglikanlar (hsa05205)	0.03225648	111	12



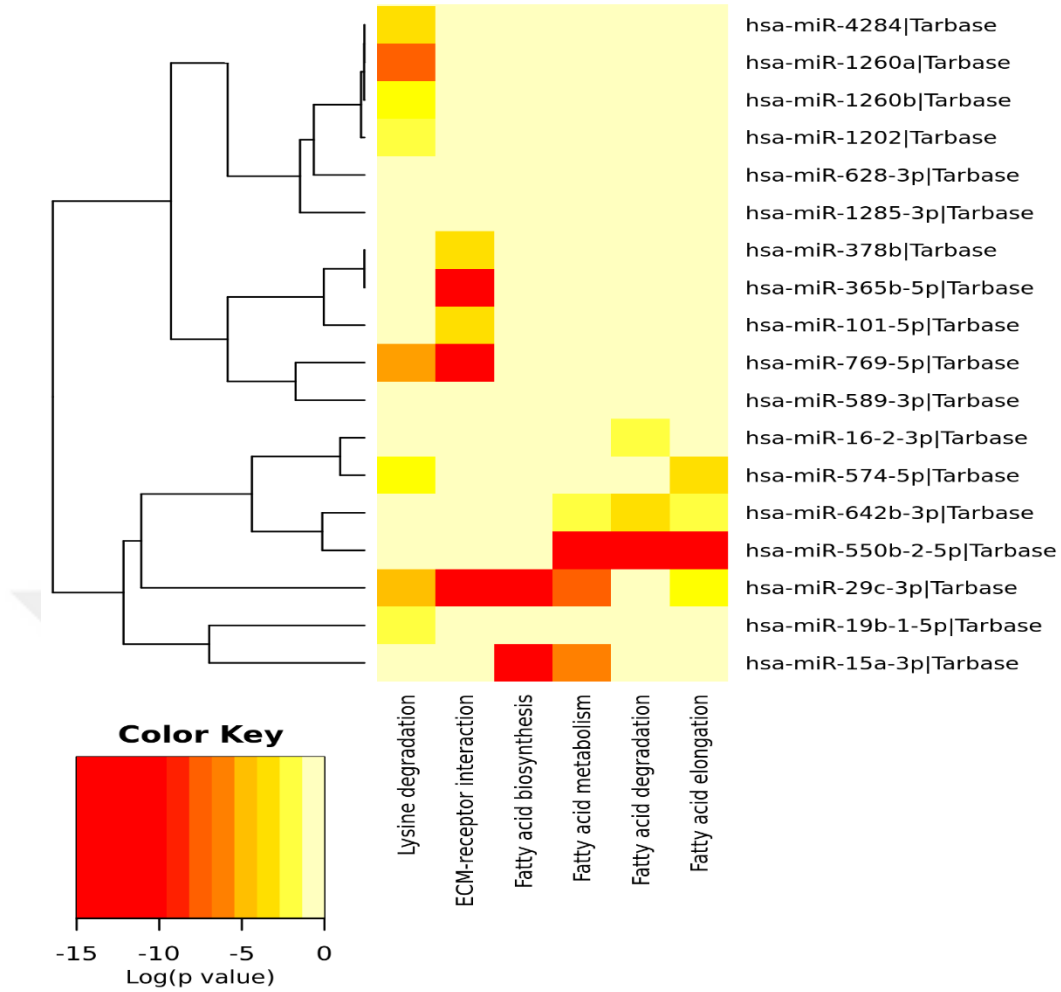
Şekil 4.9 Bir buçuk LPS muamelesi ile ekspresyonu azalan miRNA'ların KEGG Yolağı Heatmap analizi

Tablo 4.3 Bir buçuk saat LPS muamelesi ile ekspresyonu artan miRNA'lar

	miRNA ismi	Kat değişimi			
1	hsa-miR-628-3p	1,508819	17	hsa-miR-7110-5p	1,680464
2	hsa-mir-4699	1,508819	18	hsa-miR-769-5p	1,6817
3	hsa-miR-4750-5p	1,509133	19	hsa-miR-7641	1,69584
4	hsa-miR-589-3p	1,510912	20	hsa-miR-1909-3p	1,730034
5	hsa-miR-8075	1,526492	21	hsa-miR-550b-2-5p	1,757019
6	hsa-miR-4284	1,527021	22	hsa-miR-574-5p	1,775124
7	hsa-miR-125b-1-3p	1,5466	23	hsa-miR-1260b	1,788326
8	hsa-miR-642b-3p	1,567809	24	hsa-miR-324-5p	1,874986
9	hsa-miR-4530	1,57262	25	hsa-miR-3921	2,110522
10	hsa-miR-365b-5p	1,580981	26	hsa-miR-378b	2,112161
11	hsa-miR-1260a	1,587053	27	hsa-mir-711	2,14031
12	hsa-miR-29c-3p	1,588538	28	hsa-miR-4417	2,237395
13	hsa-miR-6794-5p	1,595137	29	hsa-miR-1244	2,438544
14	hsa-miR-1285-3p	1,595579	30	hsa-miR-101-5p	2,44103
15	hsa-miR-19b-1-5p	1,628846	31	hsa-miR-3175	2,460617
16	hsa-miR-15a-3p	1,640641	32	hsa-miR-16-2-3p	3,005844
			33	hsa-miR-1202	3,022642
			34	hsa-miR-5684	3,287703

Tablo 4.4 Bir buçuk saat LPS muamelesiyle ekspresyonu artan miRNA'ların KEGG yolak analizi

KEGG yolağı	p değeri	Gen sayısı	miRNA sayısı
Yağ asidi biyosentezi (hsa00061)	<1e-325	3	2
ECM-reseptör etkileşimi (hsa04512)	<1e-325	23	5
Lisin degradasyonu (hsa00310)	3.540607e-09	22	8
Yağ asidi metabolizması (hsa01212)	3.841833e-08	6	4
Yağ asidi uzatılması (hsa00062)	4.447588e-05	5	4
Yağ asidi degradasyonu (hsa00071)	0.04466238	4	3



Şekil 4.10 Bir buçuk saat LPS muamelesiyle ekspresyonu artan miRNA'ların KEGG yolağı Heatmap analizi

4.5.2 Sekiz saat LPS muamelesinin etkisi

Herhangi bir madde uygulanmamış kontrol grubu ile 8 saat LPS ile muamele edilmiş psoriasis model hücrelerinin miRNA ekspresyonları karşılaştırıldığında 67 adet miRNA ekspresyonunun 1,5 kat ve üzeri oranda değiştiği görülmüştür. 18 miRNA'nın ekspresyonunun LPS muamelesi ile azaldığı (Tablo 4.5) ve 48 adet miRNA'nın ekspresyonunun arttığı gözlenmiştir (Tablo 4.7). Ekspresyonu azalan miRNA'ların rol alabilecekleri hücresel yolakların belirlediği KEGG yolak analizi Tablo 4.6 ve heatmap analizi Şekil 4.11 de gösterilmiştir. Ekspresyonu artan miRNA'ların rol alabilecekleri hücresel yolakların belirlediği KEGG yolak analizi Tablo 4.8 ve heatmap analizi Şekil 4.12 de gösterilmiştir.

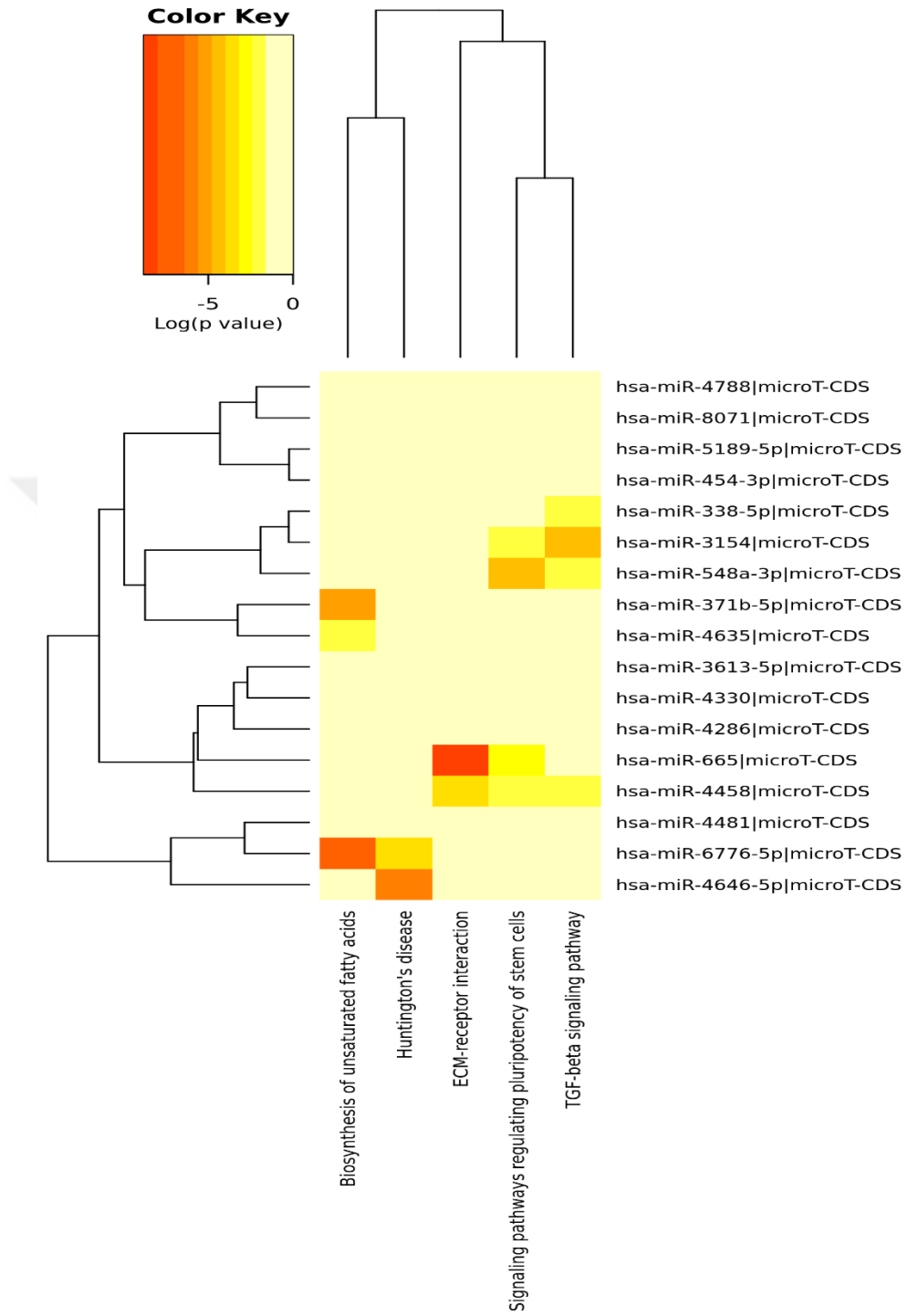
Ekspresyonu en çok azalan miRNA -2,49369 kat fark ile hsa-miR-548a-3p olurken, ekspresyonu en çok artan miRNA 2,944576 kat fark ile hsa-miR-550a-3-5p olduğu belirlenmiştir.

Tablo 4.5 Sekiz saat LPS muamelesiyle ekspresyonu azalan miRNA'lar

miRNA ismi	Kat değişimi				
1	hsa-miR-548a-3p	-2,49369	9	hsa-miR-4788	-1,6718
2	hsa-miR-4635	-2,30686	10	hsa-miR-454-3p	-1,66063
3	hsa-miR-8071	-2,22079	11	hsa-miR-338-5p	-1,66018
4	hsa-miR-4646-5p	-2,14457	12	hsa-miR-5189-5p	-1,65763
5	hsa-miR-665	-1,86448	13	hsa-miR-3613-5p	-1,64115
6	hsa-mir-3154	-1,8295	14	hsa-miR-371b-5p	-1,63178
7	hsa-miR-6776-5p	-1,79874	15	hsa-miR-4286	-1,61283
8	hsa-miR-4458	-1,77702	16	hsa-miR-4481	-1,56126
			17	hsa-miR-4330	-1,52863
			18	hsa-mir-101-1	-1,50052

Tablo 4.6 Sekiz saat LPS muamelesiyle ekspresyonu azalan miRNA'ların KEGG yolak analizi

KEGG yolağı	p değeri	Gen sayısı	miRNA sayısı
Doymamış yağ asidi biyosentezi (hsa01040)	0.0001191832	6	3
ECM-reseptör etkileşimi (hsa04512)	0.0005548516	6	2
Kök hücrelerin pluripotensisini düzenleyen sinyal yolları (hsa04550)	0.001507534	45	4
TGF- β sinyal yolağı (hsa04350)	0.01325001	28	4
Huntington hastalığı (hsa05016)	0.01396295	1	1



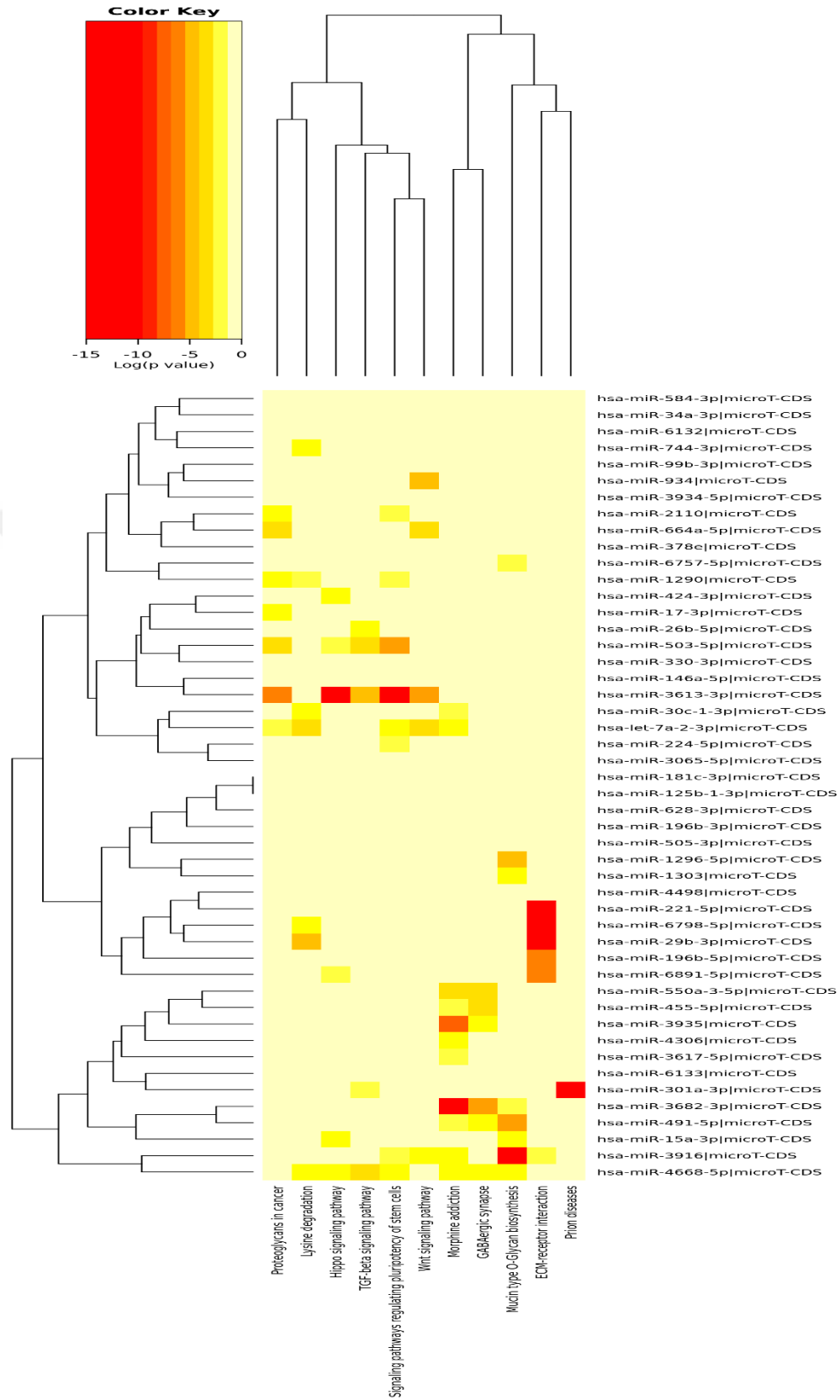
Şekil 4.11 Sekiz saat LPS muamelesiyle ekspresyonu azalan miRNA'ların KEGG yolağı Heatmap analizi

Tablo 4.7 Sekiz saat LPS muamelesi ile ekspresyonu artan miRNA'lar

miRNA ismi	Kat değışimi				
1	hsa-miR-3065-5p	1,502307	24	hsa-miR-146a-5p	1,748163
2	hsa-miR-4498	1,516452	25	hsa-miR-1296-5p	1,776922
3	hsa-miR-3935	1,517514	26	hsa-miR-125b-1-3p	1,802701
4	hsa-miR-4668-5p	1,52861	27	hsa-miR-6757-5p	1,810979
5	hsa-miR-330-3p	1,531452	28	hsa-miR-491-5p	1,820469
6	hsa-miR-2110	1,538762	29	hsa-miR-6133	1,848494
7	hsa-miR-224-5p	1,541463	30	hsa-miR-15a-3p	1,84975
8	hsa-miR-584-3p	1,545121	31	hsa-miR-664a-5p	1,859262
9	hsa-miR-3613-3p	1,570202	32	hsa-miR-455-5p	1,88314
10	hsa-miR-4306	1,581639	33	hsa-miR-26b-5p	1,890411
11	hsa-miR-221-5p	1,583471	34	hsa-miR-3682-3p	1,904233
12	hsa-miR-1303	1,600996	35	hsa-miR-503-5p	1,996883
13	hsa-miR-6891-5p	1,621108	36	hsa-miR-181c-3p	2,003552
14	hsa-miR-17-3p	1,624336	37	hsa-miR-3934-5p	2,064468
15	hsa-miR-29b-3p	1,642382	38	hsa-miR-3617-5p	2,125452
16	hsa-miR-628-3p	1,644478	39	hsa-miR-3916	2,161885
17	hsa-miR-99b-3p	1,649524	40	hsa-miR-378e	2,161885
18	hsa-miR-6798-5p	1,65092	41	hsa-miR-934	2,232391
19	hsa-miR-196b-5p	1,657524	42	hsa-miR-1290	2,26693
20	hsa-miR-34a-3p	1,66599	43	hsa-miR-505-3p	2,291639
21	hsa-miR-6132	1,667296	44	hsa-miR-30c-1-3p	2,402173
22	hsa-let-7a-2-3p	1,698557	45	hsa-miR-301a-3p	2,542222
23	hsa-miR-424-3p	1,746105	46	hsa-miR-744-3p	2,694747
			47	hsa-miR-196b-3p	2,846936
			48	hsa-miR-550a-3-5p	2,944576

Tablo 4.8 Sekiz saat LPS muamelesi ile ekspresyonu artan miRNA'ların KEGG yolak analizi

KEGG yolağı	p değeri	Gen sayısı	miRNA sayısı
ECM-reseptör etkileşimi (hsa04512)	<1e-325	27	6
Müsin tip O-Glycan biyosentezi (hsa00512)	6.178313e-11	13	8
Morfin bağımlılığı (hsa05032)	9.364103e-10	44	11
Kök hücrelerin pluripotensisini düzenleyen sinyal yolları (hsa04550)	8.899256e-09	78	8
Hippo sinyal yolağı (hsa04390)	2.81492e-05	71	6
Kanser ilişkili proteoglikanlar (hsa05205)	5.979061e-05	97	7
Prion hastalığı (hsa05020)	0.0003171226	1	1
Wnt sinyal yolağı (hsa04310)	0.0008849366	63	5
Lisin degradasyonu (hsa00310)	0.002108869	19	7
TGF-β sinyal yolağı (hsa04350)	0.02003302	35	5
GABAergic sinaps (hsa04727)	0.03617065	22	6



Şekil 4.12 Sekiz saat LPS muamelesi ile ekspresyonu artan miRNA'ların KEGG yoluğu Heatmap analizi

4.5.3 Bir buçuk ve 8. saatler arasında değişim gösteren miRNA'lar

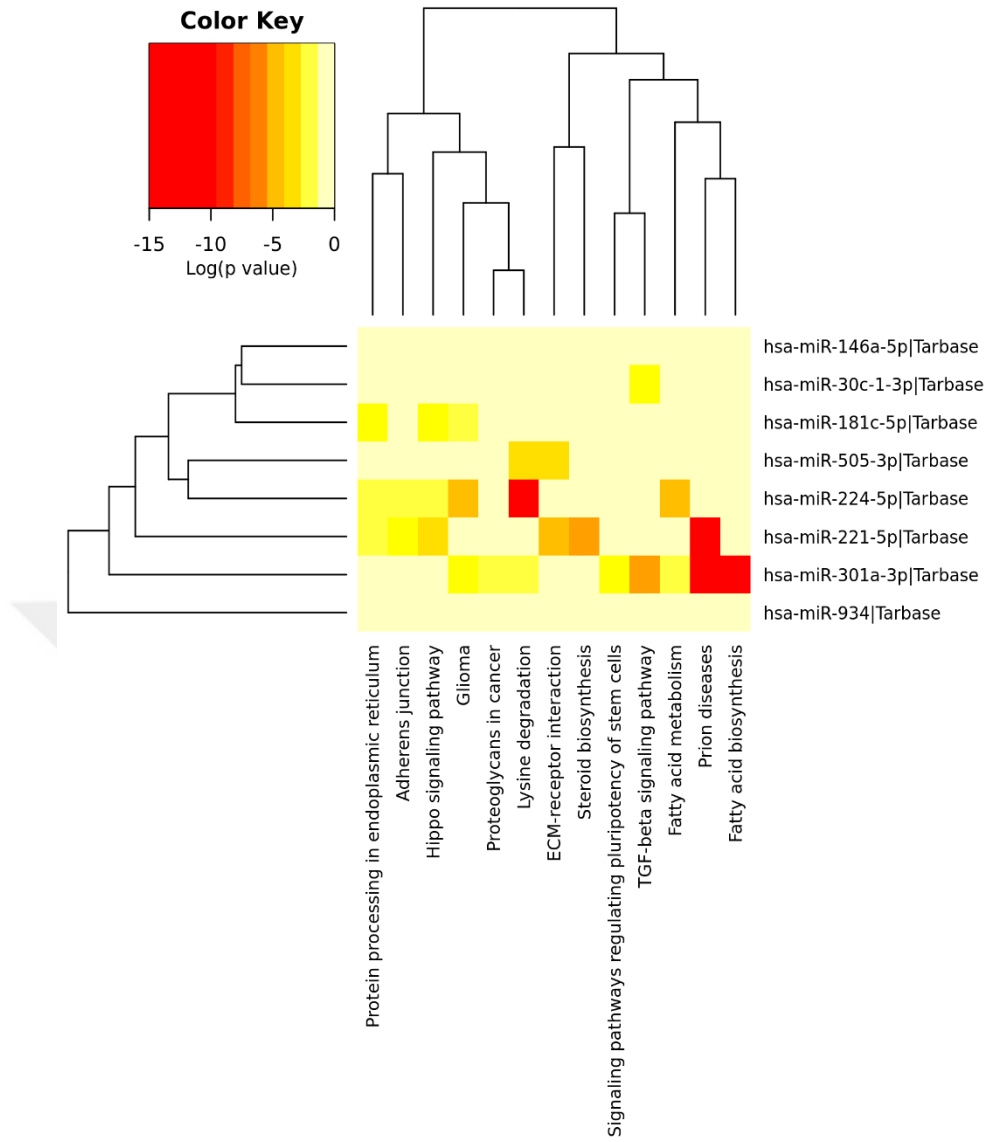
miRNA array sonuçları analiz edildiğinde 1,5 ve 8. saatler arasında ekspresyon değişimi gösteren psoriasis hastalığıyla ilişkili olduğunu düşünülen 8 miRNA öne çıkmıştır. Öne çıkan miRNA'lar, hsa-miR-30c-1-3p, hsa-miR-146a-5p, hsa-miR-181c-5p, hsa-miR-221-5p, hsa-miR-224-5p, hsa-miR-301a-3p, hsa-miR-505-3p ve hsa-miR-934'dir. Bu miRNA'ların ekspresyonlarının zamana bağlı olarak 8. saatte arttığı ve bu ekspresyon değişimindeki farkın anlamlı olduğu belirlenmiştir (Tablo 4.9). Ekspresyonu değişen miRNA'ların rol alabilecekleri hücresel yolların belirlediği KEGG yolak analizi Tablo 4.10 ve heatmap analizi Şekil 4.13 de gösterilmiştir.

Tablo 4.9 Bir buçuk ve 8. saatlerde miRNA ekspresyon kat değişimi

	1,5. saat	8. saat	p
hsa-miR-30c-1-3p	-1,854358	2,402173	< ,0001
hsa-miR-146a-5p	-2,285088	1,748163	< ,0001
hsa-miR-181c-5p	-1,594507	2,003552	< ,0001
hsa-miR-221-5p	-1,78146	1,583471	< ,0001
hsa-miR-224-5p	-1,501516	1,541463	< ,0001
hsa-miR-301a-3p	-2,300361	2,542222	< ,0001
hsa-miR-505-3p	-2,164269	2,291639	< ,0001
hsa-miR-934	-1,920631	2,232391	< ,0001

Tablo 4.10 Bir buçuk ve 8. saatler arasında değişim gösteren miRNA'lar'ın KEGG yolak analizi

KEGG Yolağı	p-değeri	Gen sayısı	miRNA sayısı
Prion hastalığı (hsa05020)	<1e-325	6	2 (miR-221, miR-301a)
Yağ asidi biyosentezi (hsa00061)	3.418377e-13	2	1 (miR-301a-3p)
Lisin degradasyonu (hsa00310)	9.860002e-12	16	3 (miR-224, miR301-a, miR-505)
Glioma (hsa05214)	7.898378e-06	25	3 (miR-181c, miR-224, miR-301a)
Hippo sinyal yolağı (hsa04390)	0.0005848472	40	3 (miR-181c, miR-221, miR-224)
ECM-reseptör etkileşimi (hsa04512)	0.000857462	13	2 (miR-221, miR-505)
TGF-β sinyal yolağı (hsa04350)	0.001079246	23	2 (miR-30c-1, miR-301a)
Endoplazmik retikulumda protein işlenmesi (hsa04141)	0.00457594	53	3 (miR-181c, miR-221, miR-224)
Kanser ilişkili proteoglikanlar (hsa05205)	0.007375466	23	1 (miR-301a)
Adherent bağlantılar (hsa04520)	0.01490272	18	2 (miR-221, miR-224)
Kök hücrelerin pluripotensisini düzenleyen sinyal yolakları (hsa04550)	0.02994417	21	1 (miR-301a)
Steroid biyosentezi (hsa00100)	0.03732984	3	1 (miR-221)
Yağ asidi metabolizması (hsa01212)	0.04172313	7	2 (miR- 224, miR-301a)



Şekil 4.13 Bir buçuk ve 8. saatler arasında değişim gösteren miRNA'lar'ın KEGG yolak heatmap analizi.

4.6 LPS muamelesinin mRNA ekspresyonlarına etkisi

4.6.1 Bir buçuk saat LPS muamelesinin etkisi

Herhangi bir madde uygulanmamış kontrol grubu ile 1,5 saat LPS ile muamele edilmiş psoriasis model hücrelerinin mRNA ekspresyonları karşılaştırıldığında 41 adet mRNA ekspresyonunun 2 kat ve üzeri oranda değiştiği görülmüştür. 24 mRNA'nın ekspresyonunun LPS muamelesi ile azaldığı (Tablo 4.6) ve 17 adet mRNA'nın

ekspresyonunun arttığı gözlenmiştir (Tablo 4.7). PANTHER version 13.1 veritabanı ile bu genlerin ilişkili oldukları yollar belirlenmeye çalışıldı fakat anlamlı bir yola analizi gerçekleştirilemedi.

Eksprasyonu en çok azalan mRNA -2,90426 kat fark ile koku alma reseptör proteini olan OR1F1 olurken, ekspresyonu en çok artan mRNA 3,509170 kat fark ile DNA çift zincir kırıklarının onarımında ve UV hasarını ekzisyonel onarımında görev alan ACTR5 olduğu belirlenmiştir.

Tablo 4.11 Bir buçuk saat LPS muamelesiyle ekspresyonu azalan mRNA'lar

	mRNA ismi	Kat değişimi			
			14	ZNF680	-2,10754
1	OR1F1	-2,90426	15	ZXDA	-2,10101
2	TAS2R43	-2,74465	16	SHANK2	-2,0921
3	DDX11L2	-2,69789	17	CCL1	-2,0703
4	OR5M1	-2,67289	18	TRAV12-1	-2,06022
5	CYP4A11	-2,57662	19	LOC646652	-2,0492
6	TRBV7-4	-2,32115	20	PRDM9	-2,04194
7	LOC400743	-2,28827	21	LOC100507556	-2,03823
8	OR11H12	-2,27609	22	FCGBP	-2,01651
9	FAM153B	-2,23179	23	TOP1P2	-2,00555
10	LOC100996713	-2,20985	24	LOC105377725	-2,00257
11	OR2T35	-2,20639			
12	TRDV1	-2,15336			
13	IGLV3-27	-2,12296			

Tablo 4.12 Bir buçuk saat LPS muamelesiyle ekspresyonu artan mRNA'lar

	mRNA ismi	Kat değişimi			
			9	LPAL2	2,155944
1	OR4D11	2,011818	10	TSL	2,173666
2	CYP1A2	2,016719	11	DDX46	2,249291
3	LOC105369441	2,039874	12	CELSR3-AS1	2,253192
4	LOC100131174	2,050577	13	RNVU1-19	2,255301
5	VCX3B	2,052056	14	IGLV1-44	2,343265
6	LOC105370435	2,094811	15	OR1S1	2,60953
7	ZNF582	2,103016	16	OR8H2	2,739628
8	LOC105371559	2,143428	17	ACTR5	3,50917

4.6.2 Sekiz saat LPS muamelesinin etkisi

Herhangi bir madde uygulanmamış kontrol grubu ile 8 saat LPS ile muamele edilmiş psoriasis model hücrelerinin mRNA ekspresyonları karşılaştırıldığında 52 adet mRNA ekspresyonunun 2 kat ve üzeri oranda değiştiği görülmüştür. 21 mRNA'nın ekspresyonunun LPS muamelesi ile azaldığı (Tablo 4.8) ve 31 adet mRNA'nın ekspresyonunun arttığı gözlenmiştir (Tablo 4.9). PANTHER version 13.1 veritabanı ile bu genlerin ilişkili oldukları yollar belirlenmeye çalışılmış fakat anlamlı bir yolk analizi gerçekleştirilememiştir.

Ekspresyonu en çok azalan mRNA -3,65573 kat fark ile LOC728093 (varsayılan POM121 benzeri protein 1 benzeri) olurken, ekspresyonu en çok artan mRNA 2,699477 kat fark ile epitelial yüzeylerin mikrobiyal kolonizasyona direncini büyük ölçüde artıran önemli bir katyonik antimikrobiyal peptid olan DEFB115 olduğu belirlenmiştir.

Tablo 4.13 Sekiz saat LPS muamelesiyle ekspresyonu azalan mRNA'lar

	mRNA ismi	Kat değişimi			
			11	ATP1A4	-2,15919
1	LOC728093	-3,65573	12	TRAV12-3	-2,13011
2	LOC441081	-3,65573	13	TRMO	-2,12676
3	LOC102724994	-3,65573	14	LOC102723446	-2,1217
4	EIF1AY	-2,53835	15	SNORA2A	-2,11437
5	ZNF876P	-2,43692	16	LOC102724465	-2,09265
6	TRAJ7	-2,42432	17	LOC105374356	-2,06633
7	SPATA31D4	-2,34504	18	LOC105375095	-2,056
8	KRTAP20-4	-2,21255	19	OR5H6	-2,05029
9	TRIM48	-2,21126	20	ZEB2	-2,03615
10	SPATA31D5P	-2,19602	21	LOC105373416	-2,00906

Tablo 4.14 Sekiz saat LPS muamelesiyle ekspresyonu artan mRNA'lar

	mRNA ismi	Kat değışimi			
			16	LOC105370492	2,221601
1	KRTAP4-8	2,008321	17	PAK7	2,24398
2	LOC105369873	2,011302	18	LRRC18	2,258164
3	OR11H12	2,011818	19	C1orf68	2,266192
4	MLIP-IT1	2,01609	20	ANKRD18B	2,271051
5	SCN8A	2,035143	21	CSH1	2,287799
6	LOC105375896	2,035481	22	BRS3	2,365196
7	POM121L4P	2,082649	23	LAIR2	2,385067
8	ADCY8	2,08509	24	GOLGA8H	2,417004
9	CLYBL	2,09188	25	CLEC4GP1	2,459389
10	SMR3B	2,093258	26	SBF1P1	2,474231
11	LOC105379829	2,095247	27	LOC105377643	2,494845
12	LYZL2	2,098386	28	LOC105372331	2,528304
13	MT1H	2,10982	29	LOC105370321	2,631782
14	LOC105370611	2,125202	30	SNORD116-27	2,660431
15	SNORD114-28	2,210634	31	DEFB115	2,699477

4.6.3 Bir buçuk ve 8. saatler arasında değışim gösteren mRNA'lar

mRNA array sonuçları analiz edildiğinde 1,5 ve 8. saatler arasında ekspresyon değışimi gösteren psoriasis hastalığıyla ilişkili olduğunu düşünölen 9 mRNA öne çıkmıştır. Öne çıkan mRNA'lar, TAB1, MAP2K6, WNT16, ICAM1, CCL2, MAPK10, RPS6KA4, CXCL5, FGF10'dur. mRNA'ların 1,5 ve 8. saatlerdeki ekspresyon kat değışimleri Tablo 4.15'de gösterilmiştir.

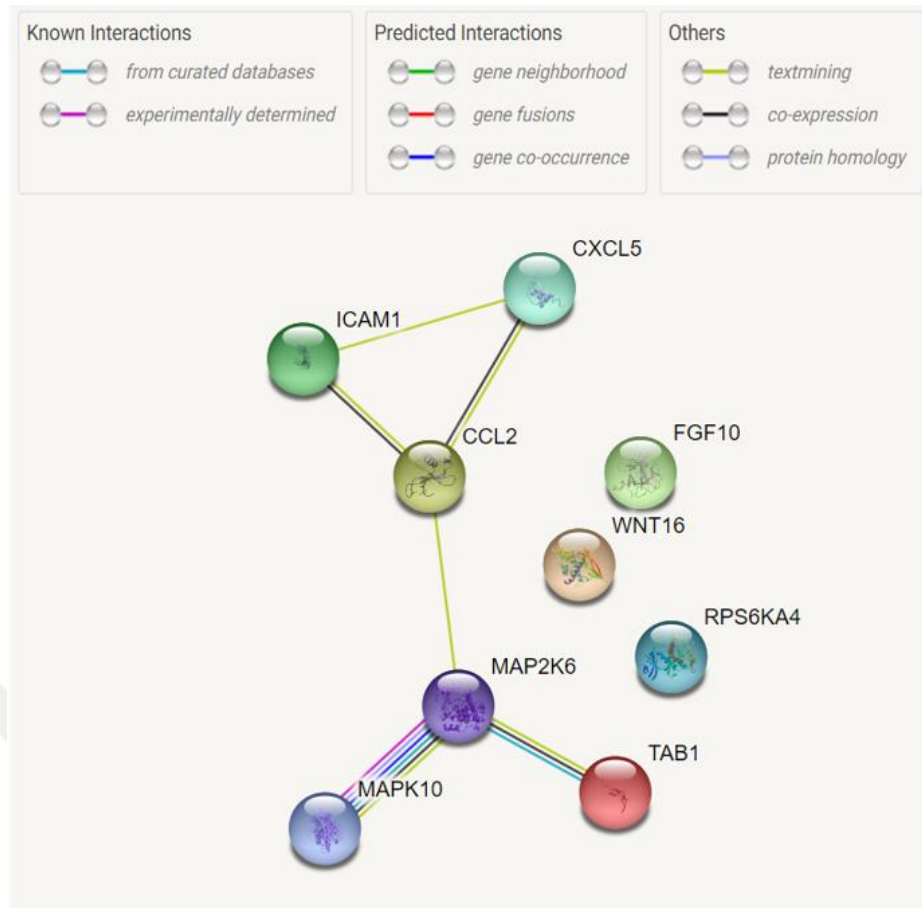
PANTHER version 13.1 veritabanı ile bu genlerin ilişkili oldukları yolaklar Tablo 4.16'da verildi. Ayrıca STRING v10.5 veritabanı kullanılarak protein-protein etkileşim analizi gerçekleştirildi. Yapılan analiz sonucunda ICAM1, CXCL5, CCL2, MAP2K6, MAPK10 VE TAB1 etkileşimi Şekil 4.14'de gösterildi.

Tablo 4.15 Bir buçuk ve 8. saatlerde gen ekspresyon kat değişimleri

	1,5. saat	8. saat	p
TAB1	-1,416244	1,047899	,0111
MAP2K6	1,230274	-1,361059	,0001
WNT16	-1,088167	1,303445	,0028
ICAM1	1,070637	1,405828	,0946
CCL2	1,419960	1,061328	,0809
MAPK10	-1,504298	1,006579	,0022
RPS6KA4	1,191534	-1,311720	,0107
CXCL5	-1,060159	1,490431	,0208
FGF10	1,201469	-1,827460	,0001

Tablo 4.16 Bir buçuk ve 8. saatlerde ekspresyonu değişen genlerin yolak analizi

Yolaklar	Gen sayısı	p değeri
p38 MAPK yolağı	3 (TAB1, RPS6KA4, MAP2K6)	7.60E-07
Oxidatif stres cevabı	2 (MAP2K6, MAPK10)	2.84E-04
Toll reseptör sinyal yolağı	2 (TAB1, MAPK10)	2.93E-04
Ras yolağı	2 (MAP2K6, MAPK10)	4.56E-04
FGF sinyal yolağı	3 (FGF10, MAP2K6, MAPK10)	1.71E-05
TGF- β sinyal yolağı	2 (TAB1, MAPK10)	7.71E-04
EGF reseptör sinyal yolağı	2 (MAP2K6, MAPK10)	1.58E-03
PDGF sinyal yolağı	2 (RPS6KA4, MAPK10)	1.80E-03
CCKR sinyal yolağı	2 (MAP2K6, MAPK10)	2.41E-03



Şekil 4.14 Bir buçuk ve 8. saatlerde ekspresyonu değişen genlerin protein-protein etkileşim analizi

5. TARTIŞMA

Psoriasis, üzerinde en çok çalışılan hastalıklardan biri olmasına rağmen patogenezi henüz tam açıklık kazanmamıştır. Hastalığın, T-lenfositler, dentritik hücreler, makrofajlar, mast hücreleri, nötrofiller ve keratinositler arasındaki karmaşık ilişkiler sonucu ortaya çıktığı düşünülmektedir. Psoriasis patogenezindeki olaylar zinciri üç basamakta incelenebilir; immün sistem aktivasyonu, keratinosit hiperproliferasyonu ve vasküler/endotelyal aktivasyon (Saraç ve Kapıcıoğlu 2015).

Psoriasis patogenezinin ilk basamağı olan immün sistem aktivasyonu bu çalışmada sitokin salınımları ile değerlendirildi. Antimikrobiyal bir peptid olan LL-37 ve Tip I sitokin olan TNF- α 'nın ekspresyonlarının 1,5. saatte artmaya başlaması ve 8. saatte en yüksek değerine ulaştığının görülmesi immün sistemin aktivitesyonunun çok erken olduğunu düşündürdü. Bu nedenle bu sürelerdeki LPS muamelesi sonrası miRNA ve mRNA ekspresyonlarını karşılaştırıldı, artan ve azalan m/miRNA'ların KEGG yolak analizleri yapıldı.

Bir buçuk ve 8. saatte artan ve azalan miRNA'ların ECM(Ekstraselüler matriks) reseptör etkileşim yolağıyla ilişkili olduğu belirlendi. ECM hücreler arasındaki boşlukları dolduran, hücreleri birbirine bağlayan ve destekleyen kompleks yapıdır. Hem doku homeostazı hem de aşırı ve patolojik koşullarda cildin korunması için çok önemlidir. Psoriaziste hücre döngüsü büyük ölçüde hızlanır, keratinositlerin terminal farklılaşması değişir ve dezmozomlar bozulur. Bu durum cildin bariyerini tehlikeye atmakta ve vücuda giren toksin ve enfeksiyöz ajanlara fırsat yaratmaktadır (Mezentsev vd 2014). Ayrıca ECM, bazı hastalıklar için enflamatuar bir mikroçevrenin korunmasında görev almaktadır ve daha önceki çalışmalar, ECM'yi hedeflemenin birçok terapötik fırsat sunabileceğini göstermektedir (Padmanabhan ve Gonzalez 2012).

Bu bilgilere ek olarak 1,5. saatte ekspresyonu azalan miRNA'ların yolak analizinde doku homeostazı ile ilişkili olan Hippo sinyal yolağı da öne çıkmaktadır. Bozulmuş bir hippo sinyal yolağının artan epidermal bazal hücrelerin proliferasyonu ve dengesiz epidermal homeostaza yol açarak cilt kanseri ve sedef hastalığı gibi hastalıklara yol açabileceği bilinmektedir (Beverdam vd 2013).

Bir buçuk saat LPS ile muamele sonrası ekspresyonu değişen diğer bir grup miRNA'nın yağ asidi metabolizması ve yağ asidi sentezi yolakları ile ilişkili olduğu belirlendi.

Yağ asidi metabolizması bozukluğunun, bozulmuş bir bağışıklık sistemi ve keratinosit aşırı proliferasyonu ile birleştiğinde psoriasis patogenezinde önemli bir rol oynadığı Mallbris ve arkadaşlarının (2006) yaptıkları bir çalışma ile gösterilmiştir. Yapılan bir araştırmada, psoriasisli hastaların kanında ve epidermisinde toplam lipid, fosfolipit, triasilgliserol ve kolesterolün arttığını göstermiştir (Pileggi vd 2016). Psoriatik odaklardaki fosfolipidlerin bileşimindeki değişikliklerin, retiküler endotel sistemindeki lipid birikimine bağlı inflamasyon ve parakeratozda rol aldığı bildirilmiştir (Viladomiu vd 2016). Bunlara ek olarak, Szepietowski ve arkadaşları (2010) psoriasis şiddetinin epidermiste artmış serbest kolesterol ve fosfolipit seviyeleri ile ilişkili olduğunu göstermiştir.

Sekiz saat LPS ile muamele sonrası ekspresyonu değişen miRNA'ların TGF- β sinyal yolağı ve kök hücrelerin pluripotensisini düzenleyen sinyal yolakları ile ilişkili olduğu belirlendi.

TGF- β gelişimi çok yönlü kontrol eden ekstrasellüler büyüme faktörlerinin büyük bir grubudur. Organizmanın tüm dokularının gelişiminde, homeostazisinde ve onarımında çok önemli rol oynayan TGF- β , yapısal olarak ilişkili çok sayıda polipeptid büyüme faktörleri içerir, bunların her biri hücre proliferasyonu, farklılaşması, motilitesi, adezyonu ve ölümü gibi hücresel süreçleri düzenleme yeteneğine sahiptir (Massague 1998). TGF- β keratinosit proliferasyonun önemli bir negatif regülatörü olarak kabul edilmektedir. Daha önce yapılan çalışmalarda Psoriasisde TGF- β sinyal yolağının önemli ölçüde bozulduğu gösterilmektedir (Litvinov vd 2011). TGF- β sinyal yolağının bozulması, keratinostlerin gen ekspresyonlarının değişimi ile proliferasyonun inhibisyonuna, artan diferansiyasyona ve apoptoza karşı duyarlılaşmaya yol açmaktadır (Rahimi 2007).

Psoriatik epidermiste kök hücre oranının yüksek olması, bölünen hücrelerin hücre siklus sayılarının artması ve hücrelerin apoptoza normal deri keratinositlerine kıyasla daha dirençli olmalarını sağlamaktadır. Apoptozun azalmasının sonucu olarak derideki hiperplastik ve hiperkeratotik görünüm ortaya çıkmaktadır (Campanati vd 2017). Bu

durum kök hücre pluripotensisini düzenleyen sinyal yolağıyla ilişkili miRNA'ların 8. saatte ekspresyonlarının değişimiyle açıklanabilir.

Ayrıca 1,5. ve 8. saatler kendi içlerinde de miRNA ve mRNA ekspresyonu değişimlerine göre karşılaştırıldı ve 8 adet miRNA (hsa-miR-30c-1-3p, hsa-miR-146a-5p, hsa-miR-181c-5p, hsa-miR-221-5p, hsa-miR-224-5p, hsa-miR-301a-3p, hsa-miR-505-3p ve hsa-miR-934) ve 9 adet mRNA (TAB1, MAP2K6, WNT16, ICAM1, CCL2, MAPK10, RPS6KA4, CXCL5, FGF10) ekspresyon farkının bu saatler arasında anlamlı olduğu belirlendi

TAB1 geninin ekspresyonu 8. saatte 1,5. saate göre arttığı saptandı. TAB1'i miR-128-3p ve miR-597-5p hedeflemektedir (Pillai vd 2014, Karginov vd 2013). Bu miRNA'ların ekspresyonlarının da TAB1 gibi 8. saatte arttığı belirlendi. Bu durum TAB1 geninin regülasyonunun ilerki saatlerde bu miRNA'lar ile düzenleneceği ve bu miRNA'ların ilk hedefinin TAB1 olduğunu düşünmekteyiz. TAB1'in TGF- β ile aktive olan kinaz 1 (TAK1)'i aktive ettiği bilinmektedir (Omori 2012). TAK1 sitokin ve Toll-benzeri reseptör yolaklarında NF- κ B ve AP-1'in başlıca aktivatörlerinden biridir (Shim vd 2005). TAB1, TAK1'in bazal aktivitesini düzenler ve epitelyal dokularda TAK1 aktivitesinin korunmasında önemli bir rol oynar (Omori 2012). Ayrıca TAK1'in TNF- α salınımda rol aldığı bilinmektedir (Ishitani 2003). TNF- α sitokin miktarı ELISA analizi ile test edildiğinde 4-8. saatler arasında en yüksek seviyelerine ulaştığının gösterilmesi bu ekspresyon artışı destekler niteliktedir. Aynı zamanda miR-30c-1-3p'nin TNF- α salınımı ile korele olduğu yapılan çalışmalar ile gösterilmiştir (Gong 2012). Çalışmamızda sekizinci saatte miR-30c-1-3p'nin ekspresyon artışı ELISA sonuçlarında TNF- α salınımının bu saatte en yüksek değerine ulaşmasını açıklamaktadır.

ICAM1 geninin ekspresyonunun 8. saatte arttığı görüldü. Yapılan çalışmalar, epidermal keratinositlerin yüzeyindeki ICAM-1 gibi adezyon moleküllerinin, deride enflamasyonun başlangıcında ve sürdürülmesinde önemli rol oynadığını bildirilmektedir (Cho vd 2017). İmmün cevap oluşumda rol aldığı bilinen bu genin ekspresyonunun 1,5. saatte kontrolle aynı olup 8. saatte artması, immün cevabın bu zaman aralığında başladığını göstermektedir. miR-1226-5p, miR-769-5p ve miR-486-3p'nin ICAM1'i hedef aldığı bilinmektedir (Balakrishnan vd 2014). Çalışmamızda miR-769-5p ve miR-486-3p'nin ekspresyonunun 8. saatte azalması ve özellikle miR-1226-5p'nin ekspresyonunun 1,5. saatte kontrolle aynı olup 8. saatte azalması ICAM1 ekspresyonunun bu miRNA'lar ile kontrol edildiğini düşündürdü.

Antimikrobiyal peptid olan ve immün cevabın oluşmasında rol oynayan LL-37'nin protein seviyesinin 2. saatte artmaya başlaması yukarıdaki sonucu destekler niteliktedir. Yaygın olarak, LL37 geniş bir bakteri, virüs ve fungus spektrumuna karşı öldürücü aktivite sergiler (Rudolph 2006). Ayrıca, LL37'nin, endotelial hücreler üzerinde eksprese edilen formil peptid reseptörü 1 (FPRlike 1) ile etkileşime girerek neovaskülarizasyonu, re-epitelizasyonu ve yara iyileşmesini desteklediği gösterilmiştir (Steintraesser 2013).

Fathi ve ark. (2011) nöronlarda MAPK10'un Toll-benzeri reseptör sinyal yolağında görev aldığını göstermişlerdir. MAPK10 / JNK3 kompleksi aktifleştğinde JUN ve ATF2 gibi AP-1 bileşenlerini oluşturan bir dizi transkripsiyon faktörünü fosforile eder ve böylece AP-1 transkripsiyon aktivitesini düzenleyerek nöronal apoptoz sırasında sinyal yollarında düzenleyici rol oynar (Yoshitane 2012). Bizim çalışmamızda keratinositlerde MAPK10'un LPS muamelesi ile ekspresyon değişimi ilk defa gösterilmiştir. MAPK10'un Toll-benzeri reseptör sinyal yolağı aracılığıyla LPS ile hücre uyarımında hücresel cevabın oluşmasında görev alabileceği düşünüldüğünde 8. saatte ekspresyon artışının görülmesi ile desteklenmektedir. Ayrıca MAPK10 miR-574-5p tarafından hedeflenmektedir (Boudreau vd 2014). miR-574-5p ekspresyonunun 8. saatte azalması MAPK10'un ekspresyonunun artışı kanıtlar niteliktedir.

RPS6KA4 ekspresyonu 8. saatte azalmıştır. RPS6KA4, LPS cevabında TLR4 reseptörünün alt yolağında görev almaktadır ve pro-inflamatuar sitokinlerin üretimini sınırlandırmaktadır. Muhtemelen, CREB1 ve ATF1 transkripsiyon faktörleri aracılığıyla MAP kinaz fosfataz DUSP1 ve anti-enflamatuar sitokin interlökin 10'un (IL10), transkripsiyonunu indükleyerek fonksiyon göstermektedir (Mu 2005). Ekspresyonunun azalması psoriasis patogenezinde belirtilen sürekli bir pro-inflamatuar sitokin üretimini destekler niteliktedir. miR-22-3p'nin RPS6KA4'ü hedeflediği bilinmektedir (Pillai vd 2014). miR-22-3p'nin ekspresyonunun 8. saatte artmasının RPS6KA4 ekspresyonunun 8. saatte azalmasına katkısı olduğunu düşünmekteyiz.

Monositler, astrositik hücreler, endotelial hücreler, keratinositler, mezenşiyal hücreler, düz kas hücreleri, mikrogial hücreler ve fibroblastlar dahil olmak üzere birçok farklı hücre CCL2 kemokinini (CC alt ailesinin bir üyesi olan ve iki birleşik sistein kanlıntısından oluşan) üretir (Behfar vd 2017). Psoriatik deride keratinositler CCL2'nin asıl kaynağıdır ve monositlerin enflamasyon bölgesine göçünden sorumludur. Genel olarak, CCL2 monositlerin, makrofajların, dendritik hücrelerin (DC'ler) ve hafıza T lenfositlerinin etkileşimine ve göçüne katkıda bulunur (Ninomiya 2015). Bizim çalışmamızda CCL2 ekspresyonu 8. saatte düşmüştür, bu düşüşün sebebinin hücre kültürü modelinde tek bir hücre tipinin, keratinositlerin, olması ve CCL2 ekspresyonunun

diğer hücreler ile etkileşim gösterememesinden kaynaklandığını düşünmekteyiz. Buna ek olarak Hu ve ark (2011) miR-941 CCL2'yi hedeflediğini göstermiştir ve bizim çalışmamızda 8. saatte miR-941 ekspresyonunun artması ile CCL2 ekspresyonunu azalttığını düşündürdü.

LPS ile indüklenen CXC kemokin olarak da bilinen CXCL5 keratinositler de dahil olmak üzere bariyer dokuların epitelyal hücreleri gibi çeşitli hücreler tarafından üretilir (Smith vd 2017). CXCL5 ekspresyonu immün yanıtta inflamasyonun düzenlenmesinde görev alan NF- κ B sinyal yolağı tarafından düzenlenmektedir (Smith vd 2002). İnflamasyon cevabı olarak CXCL5 ekspresyonu 8. saatte artması psoriasis patogenezinin başlangıcını destekler niteliktedir. miR-301a-3p ve miR-148b-5p'nin CXCL5'i hedeflediği gösterilmiştir (Lipchina vd 2011, grimson 2007). Çalışmamızda miR-301a-3p ve miR-148b-5p'nin ekspresyonları 8. saatte artmıştır. Bu da bu miRNA'ların CXCL5 ekspresyonunun inhibisyonunda miR-301a-3p ve miR-148b-5p'nin ilk yanıt veren, artan ve rol alan miRNA'lar olduğunu ve ekspresyonlarının 8. saatte başladığını ve ileriki saatlerde CXCL5'in diğer miRNA'ları ile birlikte tam inhibisyonu gerçekleştireceğini düşündürdü.

Genel olarak miR-146a, immün yanıtın negatif regülatörü olarak bilinir (Pivarcsi vd 2014). Kronik deri inflamasyonu sırasında keratinositlerde doğal immün yanıtın baskılanmasında önemli bir rol oynar. miR-146a NF κ B-bağımlı gendir ve promotorunda 2 tane NF κ B bağlanma bölgesi vardır. miR-146a-5p TNF reseptörü ile ilişkili faktör 6 (TRAF6) ve IL-1 reseptörüyle ilişkili kinaz 1'i (IRAK1) hedeflemektedir, böylece IFN- γ , TNF- α , IL-6, IL-8 ve IL-1 sitokinlerinin üretimini etkiler (Taganov vd 2006). Çalışmamızda artan miR-146a-5p ekspresyonunun LPS indüklü inflamasyondan kaynaklandığını düşündürmektedir. Li ve ark. (2010) miR-146a-5p'nin FGF10'u da hedeflediğini göstermişlerdir. FGF10 psoriatik dokuda keratinositlerin farklılaşmasını ve proliferasyonunu kontrol eden önemli bir sitokindir (Kovacs vd 2005). Bizim çalışmamızda da FGF10 ekspresyonu 8. saatte azalmasının bu saatte ekspresyonu artan miR-146a-5p'dan kaynaklanabileceğini düşünmekteyiz.

MAP2K6 geninin ekspresyonunun 8. saatte azaldığı görülmüştür. Mitojen ile aktive olan protein kinaz kinaz 6 (MAP2K6), p38 MAPK'ları spesifik olarak fosforile eden ve aktive eden mitojenle aktive olan protein kinaz (MAPK) kinaz (MAP2K) alt ailesinin bir üyesidir. MAP2K6'nın inflamatuvar sitokinler ve çevresel strese karşı, hücrede hücre döngüsü durdurulmasında ve apoptozda rol oynadığı bilinmektedir (Diao vd 2010). miR-148a-3p ve miR-148b-3p'nin MAP2K6'yı hedeflediği daha önce gösterilmiştir (Whisnant vd 2013). 8. saatte 148a-3p ve miR-148b-3p'nin ekspresyonlarının artması MAP2K6'nın

ekspresyonunun bu miRNA'lar tarafından baskılanmış olabileceğini düşündürmüştür. Ayrıca LPS muamelesi ile hücrelerin proliferasyonlarının %20 artması ile MAP2K6 geninin ekspresyonunun azalması arasında bağlantı olduğunu düşünmekteyiz.

miRNA-221, hücre döngüsü düzenleyicisi p53 / kip2 (P53) ve hücresel proliferasyonu artıran melanomlardaki c-KIT reseptörlerine bağlanmasında rol alır (Medina vd 2008, Felicetti vd 2008). miR-221-5p psoriasisde hücre proliferasyonu ve apoptozun düzenlenmesinde görev almaktadır (Zibert 2010). Çalışmamızda miR-221-5p'nin ekspresyon artışı LPS muamelesi ile hücre proliferasyonu artışını destekler niteliktedir.

Teh ve arkadaşları (2007) WNT16 ekspresyonunun, kanonik olmayan WNT sinyal yoluyla hem primer hem de immortalize insan keratinositlerinde keratinosit proliferasyonunu arttırdığını ve WNT16'nın upregülasyonunun, keratinosit farklılaşmasını antagonize ederek veya geciktirerek hücre büyümesi / proliferasyonu, uzamış klonojenisite ve hücre sağkalım avantajı sağlayarak tümörün oluşumunda önemli bir rol oynadığını bildiren bir çalışma yapmıştır. Bizim çalışmamızda WNT16'nın 8. saatte ekspresyonunun artması hem keratinosit proliferasyonu hem de psoriasis patogenezinin ilk aşaması olan terminal farklılaşmanın bozulması ile ilişkilendirilebilir. miR-181a-5p WNT16'yı hedeflemektedir (Grimson vd 2007). 8. saatte miR-181a-5p'nin de ekspresyonunun artması WNT16 ekspresyonunun regülasyonunda bu miRNA'nın ilk artan baskılayıcısı olduğunu ve ileriki saatlerde etkisini göstererek (diğer miRNA'lar ile birlikte) WNT16 geninin regülasyonunda ilk yanıt veren miRNA olduğunu düşündürdü.

miR-181c-5p nükleer genomdan köken alır, sitoplazmada işlenir ve mitokondriye gider, burada mitokondriyal enerji metabolizmasını mt-COX1 mRNA'yı hedefleyerek düzenler. MiR-181c-5p'nin aşırı ekspresyonu mt-COX1 proteininin ekspresyonunun azalmasını ve buna bağlı olarak ROS oluşumunu teşvik eder (Das 2012). ROS artışı hücre ve dokularda patolojik değişikliklere neden olur ve psoriasis patogenezinde oksidatif stresin önemli bir faktör olduğu daha önce yapılan çalışmalar ile gösterilmiştir (Khmaladze 2015). miR-181c-5p'nin 8. saatte ekspresyonunun artması bu miRNA'nın psoriasis patogenezinde ROS oluşumu üzerinden aktivite gösterdiğini düşündürmüştür.

miR-224, memelilerde X kromozomu üzerinde bulunan ve NF-κB yolağında kaspaz 3 ve kaspaz 7 üzerinden apoptozu regüle eden kanserle ilişkili bir gendir (Cui vd 2015; He vd 2017). Qi ve ark. (2017) yaptıkları bir çalışmada ise miR-224'ün NF-κB sinyal yolağında TANK geni üzerinden adiposit apoptozunu negatif regüle ettiğini göstermiştir. Bu sonuçlar arasındaki fark, miR-224'ün farklı hedefleri içeren farklı apoptoz

yollarında farklı roller oynayabileceğini göstermektedir. Bizim çalışmamızda 8. saatte miR-224 ekspresyonunun artışı apoptoz inhibisyonu ile hücre proliferasyonunun artmasını destekleyen bir bulgudur.



6. SONUÇ

Hücre kültürü psoriasis modelinde, hastalığın başlangıç aşamasında, miRNA ekspresyonlarının gösterilmesi ve ekspresyonu değişen miRNA'lar üzerinden psoriasis patogenezinde ilk aşamanın belirlenmesini amaçlayan bu çalışmada aşağıdaki sonuçlar öne çıkmaktadır:

- LPS'nin HaCaT hücre hattında LD50 dozunun 72 saatte 8µg/ml gibi oldukça yüksek bir doz olduğu,
- LL-37'nin immün cevabın oluşmasında ekspresyonu artan ilk sitokin olduğu,

Rol alan yollar;

- 1,5. saatte ekspresyonu azalan miRNA'ların Hippo sinyal yolağı ile ilişkili olduğu,
- 1,5. saatte ekspresyonu değişen miRNA'ların yağ asidi metabolizması ile ilişkili olduğu,
- 1,5 ve 8. saatler arasında ekspresyonu değişen miRNA'ların çoğunlukla ekstrasellüler matriks reseptör yolağı ile ilişkili olduğu,
- 1,5 ve 8. saatler arasında ekspresyonu değişen miR-221 ve miR-224'ün proliferasyon ve apoptoz yolları ile ilişkili olduğu,
- 1,5 ve 8. saatler arasında ekspresyonu değişen miR-181c-5p'nin ROS yolağı ile ilişkili olduğu,
- 8. saatte ekspresyonu değişen miRNA'ların TGF-β sinyal yolağı ve kök hücrelerin pluripotensisini düzenleyen sinyal yolları ile ilişkili olduğu,

- TAB1 genini hedefleyen ilk miRNA'ların miR-128-3p ve miR-597-5p olduğu,
- CXCL5 genini hedefleyen ilk miRNA'ların miR-301a-3p ve miR-148b-5p olduğu,
- WNT16 genini hedefleyen ilk miRNA'nın miR-181a-5p olduğu,

Ekspresyonu artarak hedef geninin ekspresyonunu düşüren miRNA'lar:

- miR-769-5p, miR-486-3p, **miR-1226-5p** → ICAM1
- miR-22-3p → RPS6KA4
- miR-941 → CCL2
- miR-146a-5p → FGF10
- miR-148a-3p, miR-148b-3p → MAP2K6

Ekspresyonu düşürerek hedef gendeki inhibisyonu kaldıran miRNA'lar;

- miR-574-5p → MAPK10

Bu bilgiler ışığında psoriasis hastalığını başlangıç aşamasındaki değişikliklerin bir kısmı, LL-37 ve TNF- α sitokinleri, ilk ve özgül miRNA'ların, aydınlatılmış oldu. Başlangıç aşamasının tam olarak ortaya konması için 8. saatten sonraki sürelerde sitokin, mRNA ve miRNA analizlerinin devam ettirilerek bu aşamanın tamamının ve bu noktadan sonra alt yollardaki aktörlerin somutlaştırılması ile patogenezin adım adım büyük oranda ortaya çıkarılması mümkün olacaktır.

7. KAYNAKLAR

Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S.. Cellular and Molecular Immunology. 7/E **Elsevier Saunders**. 2009; Philadelphia, USA. p:173-203.

Al-Shobaili HA ve Qureshi MG Pathophysiology of Psoriasis: Current Concepts, 2013, Psoriasis - Types, **Causes and Medication**, Chapter 4

Asumalahti K, Laitinen T, Lahermo P, Suomela S, Itkonen-Vatjus R, Jansen C, Karvonen J, Karvonen SL, Reunala T, Snellman E, Uurasmaa T, Saarialho-Kere U, Kere J. Psoriasis Susceptibility Locus on 18p Revealed by Genome Scan in Finnish Families Not Associated with PSORS1, **J Invest Dermatol** 2002; 121:735 -740

Baliwag, J, Barnes DH, Johnston A. Cytokines in Psoriasis. **Cytokine** 2015; 73(2): 342–350

Behfar S, Hassanshahi G, Nazari A, Khorramdelazad H. A brief look at the role of monocyte chemoattractant protein-1 (CCL2) in the pathophysiology of psoriasis. **Cytokine** 2017; S1043-4666(17)30381-2. doi: 10.1016/j.cyto.2017.12.010

Beverdam A, Claxton C, Zhang X, James G, Harvey KF, Key B. Yap Controls Stem/Progenitor Cell Proliferation in the Mouse Postnatal Epidermis. **Journal of Investigative Dermatology** 2013; 133, 1497–1505; doi:10.1038/jid.2012.430

Boehncke W, Schön MP. Psoriasis. **Lancet**. 2015; 386: 983–94

Boudreau RL, Jiang P, Gilmore BL, Spengler RM, Tirabassi R, Nelson JA, Ross CA, Xing Y, Davidson BL. Transcriptome-wide discovery of microRNA binding sites in human brain, **Neuron**. 2014 Jan 22;81(2):294-305. doi: 10.1016/j.neuron.2013.10.062.

Bui TV, Mendell JT. Myc: Maestro of MicroRNAs. **Genes Cancer**. 2010; 1,6, 568–575, 2010

Calonje E, Brenn T, Lazar A, McKee PH. McKee's Pathology of The Skin. 4th Edition. London. **Elsevier**. 2012; 201-11.

Campanati A, Consales V, Orciani M, Giuliadori K, Ganzetti G, Bobyr I, Sorgentoni G, di Primio R, Offidani A. Role of mesenchymal stem cells in the pathogenesis of psoriasis: current perspectives. **Psoriasis: Targets and Therapy** 2017;7 73–85.

Chandraa A, Raya A, Senapatib S, Chatterjeea R. Genetic and epigenetic basis of psoriasis pathogenesis. **Molecular Immunology** 2015;64, 313–323

Cho Y-C, Kim BR, Cho S. Protein tyrosine phosphatase PTPN21 acts as a negative regulator of ICAM-1 by dephosphorylating IKK β in TNF- α -stimulated human keratinocytes. **BMB Rep**. 2017; 50(11): 584-589

- Coimbra S, Figueiredo A, Castro E, Rocha-Pereira P, Santos-Silva A. The roles of cells and cytokines in the pathogenesis of Psoriasis. *International Journal of Dermatology* 2012; 51, 389–398
- Cui R, Kim T, Fassan M, Meng W, Sun H, Jeon Y, Croce CM. MicroRNA-224 is implicated in lung cancer pathogenesis through targeting caspase-3 and caspase-7. *Oncotarget* 2015; 6, 21802–21815
- Das S, Ferlito M, Kent OA, Fox-Talbot K, Wang R, Liu D, Raghavachari N, Yang Y, Wheelan SJ, Murphy E, Steenbergen C. Nuclear miRNA regulates the mitochondrial genome in the heart. *Circulation Research* 2012; 110(12):1596–1603.
- Diao Y, Liu W, Wong CC, Wang X, Lee K, Cheung PY, Pan L, Xu T, Han J, Yates JR 3rd, Zhang M, Wu Z. Oxidation-induced intramolecular disulfide bond inactivates mitogen-activated protein kinase kinase 6 by inhibiting ATP binding. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010; 107(49):20974-9. doi:10.1073/pnas.1007225107
- Duffin KC, Krueger GG, O'Connell RM. microRNAs in Psoriasis. *Journal of Investigative Dermatology* 2016; 136, 365e371
- Erkek E. Psoriasis etyopatogenezi. *Turkiye Klin J Dermatol-Special Topics* 2008; 1: 1-14.
- Fathi A., Hatami M, Hajihosseini V, Fattahi F, Kiani S, Baharvand H, Salekdeh GH. Comprehensive Gene Expression Analysis of Human Embryonic Stem Cells during Differentiation into Neural Cells. *PLoS ONE* 2011, 6, e22856
- Felicetti F, Errico MC, Bottero L, Segnalini P, Stoppacciaro A, Biffoni M, Felli N, Mattia G, Petrini M, Colombo MP, Peschle C, Carè A. The promyelocytic leukemia zinc finger-microRNA-221/-222 pathway controls melanoma progression through multiple oncogenic mechanisms. *Cancer Res* 2008; 68:2745–54.
- Flatz L ve Conrad C. Role of T-cell-mediated inflammation in psoriasis: pathogenesis and targeted therapy. *Psoriasis: Targets and Therapy* 2013; 3 1–10
- Foerster J. Evaluation of the IRF-2 Gene as a Candidate for PSORS3. *J Invest Dermatol* 2004; 122: 61–64
- Fry L, Baker BS. Triggering psoriasis: the role of infections and medications. *Clin Dermatol* 2007; 25:606-15
- Giardina E1, Capon F, De Rosa MC, Mango R, Zambruno G, Orecchia A, Chimenti S, Giardina B, Novelli G. Characterization of the loricrin (*LOR*) gene as a positional candidate for the PSORS4 psoriasis susceptibility locus. *Annals of Human Genetics* 2004; 68,639–645
- Goldminz AM, Au SC, Kim N, Gottlieb AB, Lizzul PF. NF-κB: An essential transcription factor in psoriasis. *Journal of Dermatological Science* 2013; 69: 89–94
- Gong J, Liu R, Zhuang R, Zhang Y, Fang L, Xu Z, Jin L, Wang T, Song C, Yang K, Wei Y, Yang A, Jin B, Chen L. miR-30c-1* promotes natural killer cell cytotoxicity against human hepatoma cells by targeting the transcription factor HMBOX. *Cancer Sci*. 2012;103(4):645-52. doi: 10.1111/j.1349-7006.2012.02207.x.
- Grimson A, Farh KK, Johnston WK, Garrett-Engele P, Lim LP, Bartel DP, MicroRNA targeting specificity in mammals: determinants beyond seed pairing, *Mol Cell*. 2007;27(1):91-105.
- Hawkes JE, Nguyen GH, Fujita M, Florell SR. microRNAs in Psoriasis, *Journal of Investigative Dermatology* 2015;136, 365e371

- He C, Wang L, Zhang J, Xu H. Hypoxia-inducible microRNA-224 promotes the cell growth, migration and invasion by directly targeting RASSF8 in gastric cancer. **Molecular Cancer**, 2017;16, 35
- Hu HY, Guo S, Xi J, Yan Z, Fu N, Zhang X, Menzel C, Liang H, Yang H, Zhao M, Zeng R, Chen W, Pääbo S, Khaitovich P, MicroRNA expression and regulation in human, chimpanzee, and macaque brains. **PLoS Genet**. 2011 Oct;7(10):e1002327. doi: 10.1371/journal.pgen.1002327.
- Hu YB, Li CB, Song N, Zou Y, Chen SD, Ren RJ, Wang G. Diagnostic value of microRNA for alzheimer's disease: a systematic review and meta-analysis. **Frontiers in Aging Neuroscience** 2016;8(13):1-9.
- Hüffmeier U, Uebe S, Ekici AB, Bowes J, Giardina E, Korendowych E, Juneblad K, Apel M, McManus R, Ho P, Bruce IN, Ryan AW, Behrens F, Lascorz J, Böhm B, Traupe H, Lohmann J, Gieger C, Wichmann HE, Herold C, Steffens M, Klareskog L, Wienker TF, Fitzgerald O, Alenius GM, McHugh NJ, Novelli G, Burkhardt H, Barton A, Reis A. Common variants at *TRAF3IP2* are associated with susceptibility to psoriatic arthritis and psoriasis. **Nat Genet**. 2010; 42(11): 996–999
- Hydbring P, Badalian-Very G. "Clinical applications of microRNAs".Version 3. **F1000Res**. 2013;2:13
- Ishitani T, Takaesu G, Ninomiya-Tsuji J, Shibuya H, Gaynor RB, Matsumoto K. Role of the TAB2-related protein TAB3 in IL-1 and TNF signaling. **EMBO J** 2003; 22:6277–6288
- James WD, Berger TG, Elston DM, Andrews Deri Hastalıkları Klinik Dermatoloji. **İstanbul Tıp Kitabevi**, İstanbul, 2008, 193-195
- Jinnin M. Various applications of microRNAs in skin diseases. **J Dermatol Sci** 2014;74:3e8
- Karagkouni D, Paraskevopoulou MD, Chatzopoulos S, Vlachos IS, Tastsoglou S, Kanellos I, Papadimitriou D, Kavakiotis I, Maniou S, Skoufos G, Vergoulis T, Dalamagas T, Hatzigeorgiou AG. DIANA-TarBase v8: a decade-long collection of experimentally supported miRNA-gene interactions. **Nucleic Acids Res**. 2018 Jan 4;46(D1):D239-D245. doi: 10.1093/nar/gkx1141
- Khmaladze I, Nandakumar KS, Holmdahl R. Reactive oxygen species in psoriasis and psoriasis arthritis: relevance to human disease. **Int Arch Allergy Immunol**. 2015;166(2):135-49. doi: 10.1159/000375401.
- Kierszenbaum AL. Deri Histolojisi, Histoloji ve hücre biyolojisine giriş, **Palme Yayınevi**, Ankara, 2006,
- Kim J, Krueger JG. The Immunopathogenesis of Psoriasis. **Dermatol Clin**. 2015; 33: 13–23.
- Kovacs D, Falchi M, Cardinali G, Raffa S, Carducci M, Cota C, Amantea A, Torrissi MR, Picardo M. Immunohistochemical analysis of keratinocyte growth factor and fibroblast growth factor 10 expression in psoriasis. **Exp Dermatol** 2005; 14: 130-137
- Körber A. Mutations in IL36RN in Patients with Generalized Pustular Psoriasis. **Journal of Investigative Dermatology** 2013; 133:2634–2637
- Lai AY, Kondo M. T and B lymphocyte differentiation from hematopoietic stem cell. **Seminars in Immunology**. 2008; 20: 207–21
- Li J, Wan Y, Guo Q, Zou L, Zhang J, Fang Y, Zhang J, Zhang J, Fu X, Liu H, Lu L, Wu Y. Altered microRNA expression profile with miR-146a upregulation in CD4+ T cells from patients with rheumatoid arthritis, **Arthritis Res Ther**. 2010;12(3):R81. doi: 10.1186/ar3006

Lipchina I, Elkabetz Y, Hafner M, Sheridan R, Mihailovic A, Tuschl T, Sander C, Studer L, Betel D. Genome-wide identification of microRNA targets in human ES cells reveals a role for miR-302 in modulating BMP response, **Genes Dev.** 2011;25(20):2173-86. doi: 10.1101/gad.17221311.

Litvinov IV, Bizet AA, Binamer Y, Jones DA, Sasseville D, Philip A. CD109 release from the cell surface in human keratinocytes regulates TGF- β receptor expression, TGF- β signalling and STAT3 activation: relevance to psoriasis. **Exp Dermatol.** 2011 Aug;20(8):627-32. doi: 10.1111/j.1600-0625.2011.01288.x.

Løvendorf MB, Mitsui H, Zibert JR, Røpke MA, Hafner M, Dyring-Andersen B, Bonefeld CM, Krueger JG, Skov L. Laser capture microdissection followed by next-generation sequencing identifies disease-related microRNAs in psoriatic skin that reflect systemic microRNA changes in psoriasis. **Exp Dermatol** 2015;24:187e93.

Lowes MA, Russell CB, Martin DA, Towne JE, Krueger JG. The IL-23/T17 pathogenic axis in psoriasis is amplified by keratinocyte responses. **Trends Immunol.** 2013;34(4):174-81.

Lowes MA, Suárez-Fariñas M, Krueger JG. Immunology of psoriasis. **Annu Rev Immunol.** 2014; 32: 227–255

Mackay CR. Chemokines: immunology's high impact factors **Nature Immunol** 2001; 2:95-101.

Mallbris L, Granath F, Hamsten A, Stahle M. Psoriasis is associated with lipid abnormalities at the onset of skin disease. **Journal of the American Academy of Dermatology** 2006;54(4):614–621

Massague J. TGF-beta signal transduction. **Annu Rev Biochem** 1998; 67:753-91

Mayer G. Cytokines and Immunoregulation. **Microbiology and Immunology On-line**, 2015. Hunt, R.C. editor. <http://www.microbiologybook.org/mhunt/flu.htm>.

Medina R, Zaidi SK, Liu CG, Stein JL, van Wijnen AJ, Croce CM, Stein GS. MicroRNAs 221 and 222 bypass quiescence and compromise cell survival. **Cancer Res** 2008; 68:2773–80.

Mezentsev A., Nikolaev A., Bruskin S. Matrix metalloproteinases and their role in psoriasis. **Gene** 2014; 540; 1–10 <https://doi.org/10.1016/j.gene.2014.01.068>

Mu MM, Koide N, Hassan F, Islam S, Sugiyama T, Ito H, Mori I, Yoshida T, Yokochi T. A role of mitogen and stress-activated protein kinase 1/2 in survival of lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 macrophages. **FEMS Immunol Med Microbiol.** 2005;43(2):277-86

Ninomiya H, Katakami N, Osonoi T, Saitou M, Yamamoto Y, Takahara M, Kawamori D, Matsuoka T-A, Yamasaki Y, Shimomura I. Association between new onset diabetic retinopathy and monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) polymorphism in Japanese type 2 diabetes. **Diabetes Res. Clin. Pract.** 2015; 108 (3) e35–e37.

O'Connell RM, Rao DS, Baltimore D. microRNA regulation of inflammatory responses. **Annu Rev Immunol** 2012; 30:295e312.

Omoría E, Inagakia M, Mishinab Y, Matsumotoc K, Ninomiya-Tsujia J. Epithelial transforming growth factor β -activated kinase 1 (TAK1) is activated through two independent mechanisms and regulates reactive oxygen species **PNAS** 2012; 109(9):3365–3370

Padmanabhan J, Gonzalez AL. The effects of extracellular matrix proteins on neutrophil-endothelial interaction—a roadway to multiple therapeutic opportunities. **Yale J Biol Med** 2012; 85:167–85

Pileggi CA, Segovia SA, Markworth JF, Gray C, Zhang XD, Milan AM, Mitchell CJ, Barnett MP, Roy NC, Vickers MH, Reynolds CM, Cameron-Smith D. Maternal conjugated linoleic acid supplementation reverses high-fat diet induced skeletal muscle atrophy and inflammation in adult male rat offspring. ***American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*** 2016; 310(5)R432–R439.

Pillai MM, Gillen AE, Yamamoto TM, Kline E, Brown J, Flory K, Hesselberth JR, Kabos P. HITS-CLIP reveals key regulators of nuclear receptor signaling in breast cancer. ***Breast Cancer Res Treat.*** 2014;146(1):85-97. doi: 10.1007/s10549-014-3004-9.

Pivarcsi A, Stahle M, Sonkoly E. Genetic polymorphisms altering microRNA activity in psoriasis--a key to solve the puzzle of missing heritability? ***Exp. Dermatol.*** 2014; 23, 620

Puig L, Julià A, Marsal S. The Pathogenesis and Genetics of Psoriasis. ***Actas Dermosifiliogr.*** 2014; 105(6):535---545

Qi R, Huang J, Wang Q, Liu H, Wang R, Wang J, Yang F. MicroRNA-224-5p regulates adipocyte apoptosis induced by TNF α via controlling NF- κ B activation. ***J Cell Physiol.*** 2018;233(2):1236-1246. doi: 10.1002/jcp.25992

Rahimi R A, Leof E B. TGF-beta signaling: a tale of two responses. ***J Cell Biochem*** 2007; 102: 593–608.

Roberts TC, Wood MJA. Therapeutic targeting of non-coding RNAs. ***Essays Biochem*** 2013;(54):127–145.

Rodriguez MS, Egaña I, Lopitz-Otsoa F, Aillet F, Lopez-Mato MP, Dorronsoro A, Lobato-Gil S, Sutherland JD, Barrio R, Trigueros C, Lang V. The RING ubiquitin E3 RNF114 interacts with A20 and modulates NF- κ B activity and T-cell activation. ***Cell Death and Disease*** 2014; 5, e1399.

Romiti R, Maragno L, Arnone M, Takahashi M. Psoriasis in childhood and adolescence. ***An. Bras. Dermatol*** 2009; 84: 9-20.

Rudolph B, Podschun R, Sahly H, Schubert S, Schroder JM, Harder J. Identification of RNase 8 as a novel human antimicrobial protein. ***Antimicrob. Agents Chemother.*** 2006; 50, 31943196.

Saraç G, Kapıcıoğlu Y. Psoriasis Etyopatogenezi. ***Dermatoz*** 2015;6(1):15061d2 doi: 10.15624.dermatoz15061d2. 6.

Saydam F, Değirmenci Ş, Güneş HV. MikroRNA'lar ve kanser. ***Dicle TıpDerg / Dicle Med J*** 2011; 38 (1), 113-120

Schneider M., MicroRNAs as novel players in skin development, homeostasis and disease. ***Br J Dermatol.*** 2012; 166(1):22-8. doi: 10.1111/j.1365-2133.2011.10568.x

Setta-Kaffetzi N, Simpson MA, Navarini AA, Patel VM, Lu HC, Allen MH, Duckworth M, Bachelez H, Burden AD, Choon SE, Griffiths CE, Kirby B, Kolios A, Seyger MM, Prins C, Smahi A, Trembath RC, Fraternali F, Smith CH, Barker JN, Capon F. AP1S3 Mutations Are Associated with Pustular Psoriasis and Impaired Toll-like Receptor 3 Trafficking. ***The American Journal of Human Genetics*** 2014; 94:790–797

Shim JH, Xiao C, Paschal AE. TAK1, but not TAB1 or TAB2, plays an essential role in multiple signaling pathways in vivo. ***Genes Dev*** 2005; 19:2668–2681.

Smith JB, Wadleigh DJ, Xia YR, Mar RA, Herschman HR, Lulis AJ. Cloning and genomic localization of the murine LPS-induced CXC chemokine (LIX) gene, Scyb5. ***Immunogenetics*** 2002; 54, 599–603

Smith KJ, Boyer JA, Muku GE, Murray IA, Gowda K, Desai D, Amin SG, Glick AB, Perdew GH. Ah Receptor Activation Potentiates Neutrophil Chemoattractant (C-X-C Motif) Ligand 5 Expression in Keratinocytes and Skin. *Toxicol Sci.* 2017;160(1):83-94. doi: 10.1093/toxsci/kfx160.

Sonkoly E, Wei T, Pavez Loriè E, Suzuki H, Kato M, Törmä H, Stähle M, Pivarcsi A. Protein kinase C-dependent upregulation of miR-203 induces the differentiation of human keratinocytes. *J Invest Dermatol* 2010; 130:124e34.

Steinstraesser L, Lam MC, Jacobsen F, Porporato PE, Chereddy KK, Becerikli M, Stricker I, Hancock RE, Lehnhardt M, Sonveaux P. Skin electroporation of a plasmid encoding hCAP-18/LL-37 host defense peptide promotes wound healing. *Mol. Ther.* 2013; 22, 734-742

Szepietowski JC, Pietrzak A, Michalak-Stoma A, Chodorowska G, Lipid disturbances in psoriasis: An update. *Mediators of Inflammation* 2010, Article ID 535612, 2010.

Taft RJ, Pang KC, Mercer TR, Dinger M, Mattick JS. Non-coding RNAs: regulators of disease. *J Pathol* 2010;220(2):126-139.

Taganov KD, Boldin MP, Chang KJ, Baltimore D. NF-kappaB-dependent induction of microRNA miR-146, an inhibitor targeted to signaling proteins of innate immune responses. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 2006, 103, 12481

Türsen Ü. Psoriasis etyolojisi, *Dermatoz* 2010; 1(2) : 91-108.

Vasku V, Vasku JB, Slonková V, Kakková K, Vasku A. Matrix metalloproteinase-2 promoter variability in psoriasis. *Arch Dermatol Res* 2009; 301:467–473

Viladomiu M, Hontecillas R, Bassaganya-Riera J. Modulation of inflammation and immunity by dietary conjugated linoleic acid. *European Journal of Pharmacology* 2016; 785:87–95.

Vlachos IS, Zagganas K, Paraskevopoulou MD, Georgakilas G, Karagkouni D, Vergoulis T, Dalamagas T, Hatzigeorgiou AG. DIANA-miRPath v3.0: deciphering microRNA function with experimental support. *Nucleic Acids Res.* 2015 ;43(W1):W460-6.

Wagner EF, Schonthaler HB, Guinea-Viniegra J, Tschachler E. Psoriasis: what we have learned from mouse models. *Nat. Rev. Rheumatol.* 2010;6: 704–714.

Wang MJ, Xu YY, Huang RY, Chen XM, Chen HM, Han L, Yan YH, Lu CJ. Role of an imbalanced miRNAs axis in pathogenesis of psoriasis: novel perspectives based on review of the literature. *Oncotarget* 2017; 8(3): 5498-5507

WEB 1: NCBI web sitesi: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim/?term=psoriasis> Erişim Tarihi:11.06.2018

Wei JA, Han L, Lu CJ, Zhao RZ, Sun J, Lu Y, Lin HJ. Formula PSORI-CM01 eliminates psoriasis by inhibiting the expression of keratinocyte cyclin B2. *BMC Complement Altern Med.* 2016 ;16:255. doi: 10.1186/s12906-016-1234-6.

Whisnant AW, Bogerd HP, Flores O, Ho P, Powers JG, Sharova N, Stevenson M, Chen CH, Cullen BR. In-depth analysis of the interaction of HIV-1 with cellular microRNA biogenesis and effector mechanisms. *MBio.* 2013; 4(2):e000193. doi: 10.1128/mBio.00193-13.

Winter J, Jung S, Keller S, Gregory RI, Diederichs S. Many roads to maturity: microRNA biogenesis pathways and their regulation. *Nature Cell Biology* 2009;11: 228–234

Xia P, Fang X, Zhang ZH, Huang Q, Yan KX, Kang KF, Han L, Zheng ZZ. Dysregulation of miRNA146a versus IRAK1 induces IL-17 persistence in the psoriatic skin lesions. *Immunol Lett* 2012;148:151e62

Xu N, Meisgen F, Butler LM, Han G, Wang XJ, Söderberg-Nauclér C, Ståhle M, Pivarcsi A, Sonkoly E. MicroRNA-31 is overexpressed in psoriasis and modulates inflammatory cytokine and chemokine production in keratinocytes via targeting serine/threonine kinase 40. *J Immunol* 2013;190:678e88.

Yan KL, Huang W, Zhang XJ, Yang S, Chen YM, Xiao FL, Fan X, Gao M, Cui Y, Zhang GL, Sun LD, Wang PG, Chen JJ, Li W, Chen ZH, Wang ZM, Wang DZ, Zhang KY, Liu JJ. Follow-Up Analysis of PSORS9 in 151 Chinese Families Confirmed the Linkage to 4q31–32 and Refined the Evidence to the Families of Early-Onset Psoriasis, *Journal of Investigative Dermatology* 2007; 127:312–318

Yoshitane H, Honma S, Imamura K, Nakajima H, Nishide SY, Ono D, Kiyota H, Shinozaki N, Matsuki H, Wada N, Doi H, Hamada T, Honma K, Fukada Y. JNK regulates the photic response of the mammalian circadian clock. *EMBO Rep.* 2012 ;13(5):455-61. doi: 10.1038/embor.2012.37.

Young KA, Wise JA, DeSaix P, Kruse DH, Poe B, Johnson E, Johnson JE, Korol O, Betts JG, Womble M. The Integumentary System, Anatomy & Physiology. *OpenStax CNX.* 2016

Zibert JR, Løvendorf MB, Litman T, Olsen J, Kaczkowski B, Skov L. MicroRNAs and potential target interactions in psoriasis. *J Dermatol Sci.* 2010;58(3):177-85. doi: 10.1016/j.jdermsci.2010.03.004

8. ÖZGEÇMİŞ

Ayşen Buket Er Urgancı 10.06.1986 tarihinde Ankara'da doğdu. İlk ve orta öğrenimini İstanbul'da tamamladıktan sonra lise öğrenimini Denizli Anadolu Lisesinde bitirerek, 2003 yılında İstanbul Üniversitesi Fen Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümünde okumaya hak kazandı. 2005-2006 yıllarında Erasmus bursu ile Hollandada bir sene okudu. 2009 yılında Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji-Embriyoloji AD' da yüksek lisansına başladı ve 2012 yılında yüksek lisans eğitimini tamamladı. 2013 yılında Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji AD'de doktora eğitimine başladı. 2014 yılında aynı bölümde araştırma görevlisi olarak çalışmaya başladı ve halen devam etmektedir. Evli ve bir çocuk annesidir.



9. EKLER

