

TÜRKİYE CUMHURİYETİ
NECMETTİN ERBAKAN ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Probiyotiklerin İnsan miRNA'ları Üzerine Etkileri

MERVE İLHAN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

PROF. DR. MEHMET GÜRBİLEK

KONYA 2017

TÜRKİYE CUMHURİYETİ
NECMETTİN ERBAKAN ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Probiyotiklerin İnsan miRNA'ları Üzerine Etkileri

MERVE İLHAN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

PROF. DR. MEHMET GÜRBİLEK

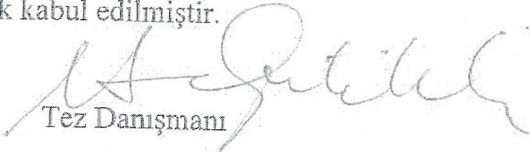
Bu araştırma Necmettin Erbakan Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından 161318004 proje numarası ile desteklenmiştir.

KONYA 2017

TEZ ONAY SAYFASI

Necmettin Erbakan Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Yüksek Lisans Öğrencisi 'Merve İLHAN'ın "Probiyotiklerin İnsan miRNA'ları Üzerine Etkileri" başlıklı tezi tarafımızdan incelenmiş; amaç, kapsam ve kalite yönünden Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

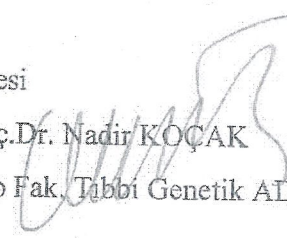
Konya, TÜRKİYE/ 04.08.2017


Tez Danışmanı

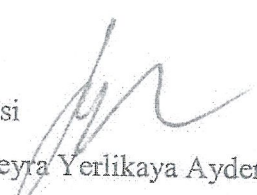
Prof. Dr. Mehmet Gürbilek

N.E.Ü. Meram Tıp Tıbbi Biyokimya AD

Jüri Üyesi


Yrd. Doç. Dr. Nadir KOÇAK
S.Ü. Tıp Fak. Tıbbi Genetik AD

Jüri Üyesi


Doç. Dr. F. Hümeysra Yerlikaya Aydemir
N.E.Ü. Meram Tıp Tıbbi Biyokimya AD

Jüri Üyesi

Prof. Dr. Tülin ÇORA
S.Ü. Tıp Fak. Tıbbi Genetik AD

Jüri Üyesi

Yrd. Doç. Dr. İbrahim KILINÇ
N.E.Ü. Meram Tıp Tıbbi Biyokimya AD

Yukarıdaki tez, Necmettin Erbakan Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulunun 11.08.2017 tarih ve 16/05 sayılı kararı ile onaylanmıştır.

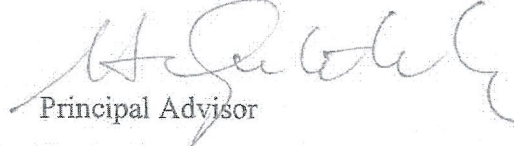


Prof. Dr. Kısmet Esra NURULLAHOĞLU ATALIK

Enstitü Müdürü

APPROVAL

We certify that we have read this dissertation entitled “Probiyotiklerin İnsan miRNA’ları Üzerine Etkileri” by “Merve İLHAN” that in our opinion it is fully adequate, in scope and quality, as dissertation for the degree of *Master of Science* in the Department of “Tıbbi Biyokimya”, Institute of Health Sciences, University of Necmettin Erbakan Konya, TÜRKİYE/ 04.08.2017



Principal Advisor

Prof.Dr. Mehmet Gürbilek

N.E.Ü. Meram Tıp Tıbbi Biyokimya AD

Examination Committee Member

Yrd.Doç.Dr. Nadir KOÇAK

S.Ü. Tıp Fak. Tıbbi Genetik AD

Examination Committee Member

Doç.Dr. F.Hümeýra Yerlikaya Aydemir

N.E.Ü. Meram Tıp Tıbbi Biyokimya AD

Examination Committee Member

Prof.Dr. Tülin ÇORA

S.Ü. Tıp Fak. Tıbbi Genetik AD

Examination Committee Member

Yrd.Doç.Dr. İbrahim KILINÇ

N.E.Ü. Meram Tıp Tıbbi Biyokimya AD

This thesis has approved for the University of Necmettin Erbakan Institute of Health Sciences.



Prof. Dr. Kısmet Esra NURULLAHOĞLU ATALIK

Director of Institute of Health Sciences

Date and Signature

TEZ BEYANATI

Bu tezin tamamının kendi çalışmam olduğunu, planlanmasından yazımına kadar hiçbir aşamasında etik dışı davranışımın olmadığını, tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları kaynaklar listesine aldığımı, tez çalışması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

Tarih: 04.08.2017

Merve İLHAN



TURNİTİN

Turnitin

https://turnitin.com/t_inbox.asp?r=61.0458965332032&svr=334&lang=...

[Öğrenciler](#)
[Not Defteri](#)
[Kütüphaneler](#)
[Tarihçe](#)
[Tarihçe](#)

Bu sayfa hakkında

Bu sizin ödev gelen kutunuzdur. Bir ödevi görüntülemek için, ödev başlığına tıklayın. Orjinallik Raporunu görmek için, benzerlik kolonundaki orjinallik raporu ikonuna tıklayın. Bu ikon tıklanabilir durumda değilse, orjinallik raporu henüz oluşturulmamış demektir.

tez

Gelen Kutusu | Görüntüleniyor: yeni ödevler ▼

[Dosyayı Gönder](#) [GradeMark Raporu](#) | [Ödev ayarlarını düzenle](#) | [E-posta bildirmeyenler](#)

84 [İndir](#) [Görüntüle...](#)

<input type="checkbox"/>	Yazar	Başlık	Benzerlik	web	yayın	student papers	Puanla	cevap	Dosya	Ödev Numarası	Tarih
<input type="checkbox"/>	Merve İhan	Tez	567 57	4%	4%	5%	--	--	ödev indir	834276729	31-Tem-2017

ÖNSÖZ

Tez çalışmamda beni destekleyen ve yön veren, tezin gelişmesini sağlayan, yüksek lisans eğitimimde bilgi ve deneyimleri ile mesleki bakış açımın gelişmesinde sonsuz emeği geçen, çok değerli tez danışmanım Prof. Dr. Mehmet Gürbilek'e teşekkür ederim.

Çalışmamda bana destek veren Öğr. Gör. Dr. Cemile TOPÇU'ya ve Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı'ndaki tüm hocalarıma, yardımlarını esirgemeyen Biyokimya Laboratuvarı tüm asistan ve çalışanlarına, beni kendi öğrencilerinden ayırmayan Doç. Dr. Ercan KURAR'a, maddi ve manevi her türlü yanımda olan arkadaşlarıma ve akrabalarıma, kuzenim Nazife ELİAÇIK'a teşekkür ederim.

Bugünlere gelmemi sağlayan, her aldığım kararda beni sonsuz destekleyen sevgili anneciğim ve anneanneciğime minnettarım.

Merve İLHAN

KONYA-2017

İÇİNDEKİLER

İÇ KAPAK.....	i
TEZ ONAYI.....	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.
TEZ BEYANATI.....	iv
TURNİTİN.....	v
ÖNSÖZ.....	vi
İÇİNDEKİLER.....	vii
TABLolar	ix
ŞEKİLLER	x
GRAFİKLER.....	xi
KISALTMALAR.....	xii
ÖZET	xiii
ABSTRACT	xiv
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Probiyotikler	3
2.2. Probiyotiklerin tıpta kullanım alanları.....	4
2.2.1. İmmünite	5
2.2.2. Diyare	5
2.2.3. Helicobacter Pylori.....	5
2.2.4. Alerji.....	6
2.2.5. Vajinosiz.....	6
2.2.6. İnflamatuvar Bağırsak Hastalığı (IBH).....	7
2.2.7. Kanser.....	7
2.2.8. Hepatik Ensefalopati	7
2.2.9. Hipertansiyon	8
2.2.10. Böbrek Taşı.....	8

2.2.11. Laktoz İntoleransı	8
2.2.12. Kolesterol	8
2.3. MikroRNA (miRNA)	10
2.4. MikroRNA'ların Biyogenezi ve Olgunlaşması.....	11
2.4.1. Primary(birincil)-MikroRNA (pri-miRNA) Prosesi	12
2.4.2. Prekürsör MikroRNA (pre-miRNA) Prosesi.....	12
2.4.3. Pre-miRNA'nın Sitoplazmaya Taşınımı:	13
2.4.4. MikroRNA'ların Sitoplazmik Prosesi	14
2.5. MikroRNA'ların Biyolojik Rollerini.....	16
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	20
3.1. Çalışma grubunu oluşturan örnekler.....	20
3.1.1. Gönüllülerin çalışmaya dahil edilmeme kriterleri:.....	20
3.2. Kullanılan kimyasal maddeler ve deney ekipmanları:.....	20
3.3. MikroRNA Analizi	21
3.3.1. Plazma Eldesi:	21
3.3.2. MikroRNA İzolasyonu:.....	22
3.3.3. MikroRNA'dan cDNA Sentezi	22
3.4. GERÇEK ZAMANLI POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU (RT-PZR)	24
4. BULGULAR:.....	28
4.1. İstatistiksel Sonuçlar	35
4.1.1. Grup 1: miR-15	35
4.1.2. Grup 2: miR-16	36
4.1.3. Grup 3: miR-29	37
4.1.4. Grup 4: miR-196	38
5. TARTIŞMA	44
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	52
7. KAYNAKLAR.....	53

TABLÖLAR

TABLO 1.....	4
TABLO 2.....	9
TABLO 3.....	23
TABLO 4.....	23
TABLO 5.....	23
TABLO 6.....	25
TABLO 7.....	26
TABLO 8.....	27
TABLO 9.....	31
TABLO 10.....	32
TABLO 11.....	33
TABLO 12.....	34
TABLO 13.....	39

ŞEKİLLER

ŞEKİL 1.....	11
ŞEKİL 2.....	13
ŞEKİL 3.....	14
ŞEKİL 4.....	14
ŞEKİL 5.....	16
ŞEKİL 6.....	24
ŞEKİL 7.....	26
ŞEKİL 8.....	27
ŞEKİL 9.....	28
ŞEKİL 10.....	28
ŞEKİL 11.....	29
ŞEKİL 12.....	29

GRAFİKLER

GRAFİK 1	35
GRAFİK 2	36
GRAFİK 3	37
GRAFİK 4	38
GRAFİK 5	40
GRAFİK 6	40
GRAFİK 7	41
GRAFİK 8	41
GRAFİK 9	42
GRAFİK 10	42
GRAFİK 11	43

KISALTMALAR

ALL: Akut lenfoblastik lösemi

AML: Akut miyelooid lösemi

CDC42: Hücre bölünme siklus 42

DGCR8: Di George sendrom kritik bölge gen 8

IFN- γ : İnterferon- γ

Ig: İmmünglobülin

IL: İnterlökin

KLL: Kronik lenfositik lösemi

MAPK: Mitojen aktive protein kinaz

miRNA: Mikro ribonüleik asit

mTOR: Rapamisin protein kompleksinin memeli hedefi

NF- κ B: Nükleer faktör kappa

NK: Doğal Öldürücü

PDAC: Pankreas Duktal Adenokarsinoması

PI3K: Fosfatidilinositol 3 kinaz

RT- PZR: Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu

TGF β : Transforme edici büyüme faktörü beta

TLR: Tool-benzeri reseptör

TNF- α : Tümör nekroz faktörü-alfa

TRBP: Trans-aktivatör RNA (tar)-bağlanmış protein

ÖZET

Giriş: Probiyotikler, "yeterli miktarda tüketildiklerinde konakçıyı olumlu yönde etkileyen canlı mikroorganizmalar" olarak tanımlanır. Probiyotiklerin inflamatuvar bağırsak hastalığını önlediği, antimikrobiyal ve anti-kororektal kanser faaliyetler sergilediği gösterilmiştir. Mikro RNA'lar (miRNA'lar), çoğalma, apoptoz ve gelişme gibi temel hücresel süreçleri düzenleyen temel koordinatörler olarak görülen 17-25 nükleotid uzunluğunda, küçük, kodlayıcı olmayan RNA'lardır. İnsan Genom Projesinin tamamlanması, diğer bilimlerde olduğu gibi, beslenme biliminde de en önemli dönüm noktalarından biri olmuştur. Beslenme, gen ekspresyonunda önemlidir ve hastalık önleme üzerindeki genetik çeşitlilikleri etkiler. Dolayısıyla, bu çalışmada gıda takviyesi olarak alınan probiyotiklerin insan miRNA'ları üzerinde etkisi olup olmadığını araştırmak amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem: Çalışma, 18-65 yaş aralığındaki 20 (11 erkek, 9kadın) sağlıklı bireyle gerçekleştirilmiştir. Bireyler 10 gün gıda takviyesi probiyotik kullanmışlardır. Probiyotik kullanmadan önce ve sonraki alınan kan numunelerinden elde edilen plazma, RT-PZR ile analiz edilmiştir. MiR-15, miR-16, miR-29 ve miR-196'nın ekspresyon seviyeleri belirlenmiştir.

Bulgular: Bu çalışmada aşağıdaki formül ile, seçilen miRNA'ların ekspresyonunu hesaplamak için bir internal kontrol olarak U6 housekeeping geni kullanılmıştır: $\Delta C_{t\text{miRNA}} = C_{t\text{miRNA}} - C_{tU6}$. Düşük ΔC_t değeri, yüksek miRNA seviyesini ve yüksek ΔC_t , daha düşük miRNA seviyesini temsil eder. Gruplar arasındaki farkı karşılaştırmak için T-testi kullanılmıştır. 4 miRNA grubu, kat artış oranı ≥ 1.5 olarak tanımlanmıştır ancak t-testine göre miR-196 hariç $p > 0.05$; miR-15, miR-16 ve miR-29 için $p < 0.05$ bulunmuştur.

Sonuç: miR-15, miR-16, miR-29 ve miR-196'nın ekspresyon seviyeleri çeşitli hastalıklarda, özellikle kanserde çok düşük iken; probiyotik kullanımından sonra bu miRNA seviyeleri yüksek bulunmuştur. Sonuç olarak, probiyotikler miRNA seviyelerini etkilemiştir ancak miRNA'lar üzerindeki probiyotik etki mekanizmasını daha iyi anlamak ve doğrulamak için ileri çalışmalar yapmak zorunludur.

Anahtar kelimeler: miRNA, gen ekspresyonu, probiyotik

ABSTRACT

Introduction: Probiotics are defined as “live microorganisms that beneficially affect the host once consumed in adequate amounts”. Probiotics have been reported to prevent inflammatory bowel disease, exhibit antimicrobial and anti-colorectal cancer activities. MicroRNAs (miRNAs) are small noncoding RNAs, 17–25 nucleotides long that can be seen as master-coordinators, regulating fundamental cellular processes such as proliferation, apoptosis, and development. Completion of the Human Genome Project has been one of the most important turning point in nutrition science, as in some other sciences. There is much evidence that, nutrition is important in gene expression and effect genetic variations on disease prevention. So this study was aimed to whether or not investigate the effects of probiotics which are taken as dietary supplement on the human miRNAs.

Material and Method: This study was conducted with 20 healthy individuals (11 males, 9 females) aged between 18-65 years. Individuals took dietary supplement probiotics for 10 days. Plasma is obtained from blood samples of individuals-before and after using probiotic-was analyzed by RT-PCR. We evaluated expression levels of miR-15, miR-16, miR-29 and miR-196.

Results: In this study, U6 housekeeping gene was used as an internal control to calculate the expression of selected miRNAs following the formula: $\Delta Ct_{\text{target miRNA}} = Ct_{\text{target miRNA}} - Ct_{U6}$. Lower ΔCt represent higher miRNA abundance level and higher ΔCt represent lower miRNA abundance level. T-test was used to compare difference between group. 4 miRNA groups were identified fold change ≥ 1.5 but according to t-test; except for miR-196 ($p > 0.05$) miR-15, miR-16 and miR-29 values of $p < 0.05$.

Conclusions: While expression levels of miR-15, miR-16, miR-29 and miR-196 are very low in various diseases, especially in cancer; the expression of miR-15, miR-16 miR-29 and miR-196 were found high after using probiotics. Consequently, probiotics are impacted on miRNA expression levels but further studies are mandatory to a better understand and confirm probiotics effect mechanism on miRNAs.

Key words: miRNA, gene expression, probiotic

1. GİRİŞ VE AMAÇ

İnsan bağırsak florası ilk olarak doğumla beraber anneden geçen ve çevresel koşulların etkisiyle de çevreden alınan yararlı ve zararlı bakterilerden oluşur. Bağırsak flora dengesinin korunması kişinin yalnızca bağırsak sisteminin sağlığının devamında değil genel sağlığında da önemli bir rol oynar. Bu mikrobiyal popülasyon içerisinde laktik asit bakterisi (LAB) grubuna dahil bakterilerin bağırsak olgunlaşması ve dengesi için gerekli temel bakteri suşlarının kaynağıdır. Laktik asit bakterileri genel olarak karbonhidrat fermantasyonu neticesinde son ürün olarak laktik asit oluşturan, çubuk ya da kok şeklinde, spor oluşturmeyen, katalaz negatif ve gram-pozitif doğal bir gruptur (Khalid 2011).

Probiyotik kelimesi Yunanca bir kelime olup; “yaşam için” anlamına gelmektedir. Gıda ve Tarım Örgütü (FAO), ve Dünya Sağlık Örgütü (WHO), probiyotikleri “uygun miktarda alındıkları zaman konakçı sağlığı üzerinde olumlu etkileri olan canlı mikroorganizmalar” olarak tanımlamıştır. Probiyotik mikroorganizmalar genellikle LAB grubuna dahil olan bakterilerden Lactobacillus, Streptococcus, Enterococcus, Lactococcus, Bifidobacterium ve Pediococcus cinslerine ait çeşitli türleri içermektedir. Laktik asit bakterilerinin kardiovasküler hastalıklardan, gastrointestinal mukozadaki zararlı patojenlerin sebep olduğu enfeksiyonların ve alerjik hastalıkların engellenmesine ve bağışıklık sisteminin uyarılmasına kadar pek çok olumlu etkilere sahip olduğu bilinmektedir.

Yaklaşık 20-23 nükleotid uzunluğundaki küçük genetik materyal olan mikroRNA’lar gen ekspresyonunu transkripsiyonel ve post transkripsiyonel seviyede düzenlediği gibi hücre tipinin belirlenmesi ve hücre farklılaşması olmak üzere pek çok fizyolojik işlemlerde yer alır. Ayrıca kanserlerde bazı miRNA’ların onkogen, bazılarının ise tümör baskılayıcı gen gibi işlev görmesi, tümör ilerlemesi, metastazı ve invazyonunda miRNA’ların düzenleyici olarak kilit rol aldığını göstermektedir. Bu nedenle hücre içerisindeki miRNA seviyelerinin artışı veya azalışı çeşitli hastalıkların biyobelirteci olsa da bu düzensiz miRNA seviyeleri hastalığa da yol açabilir.

Günümüzdeki beslenme alışkanlıklarının insan sağlığına etkileriyle ilgili veriler artmaktadır. İnsan genom projelerinin uygulamaya konulduğu ve insanlar arası genetik farklılıkların araştırıldığı son yıllarda beslenmenin kişiler üzerine etkisi çeşitlilik göstermektedir. Beslenme ile vücudumuza aldığımız kimyasalların çoğu genlerimizi etkiler. Daha ileriki çalışmalarla birlikte doğru beslenme şeklinin yakın gelecekte genetik yapıya göre düzenlenerek insan yaşamının uzatılabilmesi olasıdır. Bu sebeple diyet-gen ilişkisinin sağlık üzerindeki olumlu ve

olumsuz yanlarını incelemek üzere nutrigenetik ve nutrigenomik gibi iki alanın kombinasyonu olan nutrisyonel genetik bilimine ilgi gün geçtikçe artmaktadır(Soylu ve Ayhan 2012).

Biz de bu çalışmayla gıda takviyesi olarak kullanılan, insan sağlığına yarar sağlayan probiyotik bakterilerin, gen ekspresyonunu etkileyen ve çeşitli hastalıkların biyobelirteci olan miRNA'lardan miR-15, miR-16, miR-29 ve miR-196'ya etkisi olup olmadığını araştırmayı amaçladık.



2. GENEL BİLGİLER

2.1.Probiyotikler

Probiyotikler, Gıda ve Tarım Örgütü ile Dünya Sağlık Örgütüne göre "yeterli miktarda verildiğinde konakçının sağlığına yarar sağlayan canlı mikroorganizmalar" olarak tanımlanmıştır (Culligan ve ark. 2009). Probiyotik öyküsü 20. yüzyılın başında Nobel Ödülü sahibi Rus bilim insanı Elie Metchnikoff tarafından sunulan ve Kafkas insanların sağlıklı ve uzun süreli yaşamlarının fermente süt ürünlerinin tüketilmesinden kaynaklandığı hipoteziyle başladı. Ayrıca, yoğurttaki bulunan organizmaların bağırsağın diğer zararlı bakterilerin kötü etkilerinden korunması için gerekli olduğunu göstermiştir (Metchnikoff ve ark. 1907).

1965 yılında Lily ve Stillwell tarafından tanımlanan probiyotik kelimesi Latince "pro" ve "bios" köklerinden türetilmiş ve "yaşam için" anlamına gelmektedir. Probiyotikler konakçının sağlığına yararlı olan sindirim kanalı mikroorganizmalarıdır. Mikroorganizmaları ideal probiyotik preparatlar olarak sınıflandırmak için gerekli kriterler şunları içerir : Genelde güvenli olarak tanımlanmalıdır; safra, hidroklorik asit ve pankreas suyuna dirençli olmalıdır, anti-kanserojenik aktiviteye sahip olmalı ve bağışıklık sistemini uyarabilmelidir, bağırsak permeabilitesini azaltmalı, laktik asit üretmeli, midenin hem asidik koşulları hem de duodenumun alkali koşullarını atatabilmelidir, gastrik transporta dayanabilir olmalıdır, bakteriyel patojenlere karşı antagonistik etkinlik göstermelidir, konakçının bağırsak epiteline yapışabilmeli ve kolonize olabilmelidir, işleme, nakliye ve saklama sırasında canlı kalabilmeli ve klinik olarak kanıtlanabilir sağlık sonuçlarına yol açabilir olmalıdır (Lin ve ark. 2006; Vimala ve ark. 2006). Probiyotik preparatlarda en yaygın organizmalar *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Escherichia*, *Enterococcus*, *Bacillus* ve *Streptococcus*'dur. Probiyotik içeren insan gıdaları, tekli veya çoklu kültürlerle hazırlanmış fermente sütler, peynirler, meyve suları, şarap, tahıllar ve sosislerdir (Dsouza ve ark. 2002). Ticari probiyotikler toz, sıvı, jel, macun, granül, kapsül veya şaşe olarak hazırlanabilir (Vimala ve ark. 2006). Mevcut probiyotik uygulama dozları, 10^8 ile 10^{11} koloni oluşum birimi (CFU) arasında değişmektedir (Ndagijimana ve ar. 2009). Probiyotiklerin sınıflandırılması Tablo 1'de gösterilmiştir.

Lactobacillus sp.	Bifidobacterium sp.	Diğer laktik asit bakterileri	Laktik asit bakterisi olmayan diğer bakteriler
L. acidophilus	B. adolescentis	Enterococcus faecalis ¹	Bacillus cereus var. Toyoi ^{1,2}
L. amylovorus	B. animalis	Enterococcus faecium	Escherichia coli nissle
L. casei	B. bifidum	Lactococcus lactis ³	propionibacterium
L. crispatus	B. breve	Leuconosto mesenteroides	Freudenreichii ^{1,2}
L. delbrueckii ssp. bulgaricus ³	B. infantis	Pediococcus acidilactici ³	Saccharomyces cerevisiae ²
L. gallinarum ¹	B. lactis ⁴	Sporolactobacillus inulimus ¹	Saccharomyces boulardii ²
L. gasseri	B. longum	Streptococcus salivarius ssp. thermophilus ³	
L. johnsonii			
L. paracasei			
L. plantarum			
L. reuteri			
L. rhamnosus			

Tablo 1: Probiyotik bakterilerin sınıflandırılması: 1Hayvanlarda kullanılmaktadır.2Tıpta ve ilaçların hazırlanmasında kullanılmaktadır. 3Probiyotik mikroorganizma değil veya probiyotik özellikleri hakkında az bilgi mevcuttur (Sağdıç ve ark. 2004).

2.2.Probiyotiklerin tıpta kullanım alanları

Probiyotikler mukus bağlayıcı proteinler, ankrajsız (sabit olmayan) temizlik proteinleri, büyük yüzey proteinleri, LPXTG motif proteinleri, taşıyıcı proteinler ve glikolipidler gibi çeşitli proteinler tarafından bağırsak epitel hücresi reseptörlerine bağlanırlar ve mukus bariyerini arttırmak için, MUC2 ve MUC3(müsinler)'ü aşırı eksprese ederler (Mack ve ark. 1999). Ek olarak bağırsak pH'sını düşürür, organik asitler (laktik, asetik, bütirik asit), H₂O₂ ve bakteriyosinler gibi bakterisit bileşenleri serbest bırakır, nitrik oksit sentezini düzenler, epitel hücrelerin mukoza yüzeyine yapışır, fermente edilebilir substratlar için rekabet eder, bağırsak koruyucu metabolitleri (arjinin, glutamin, kısa zincirli yağ asitleri ve konjuge linoleik asitler) üretir, toksin bozunmasını indükler, bağırsak motilitesini ve mukus üretimini modüle eder ve viral replikasyona karışan hücre içi mekanizmaları önlerler (MEK, PKA, p38 MAPK gibi) (Yan ve ark. 2007; Lemberg ve ark. 2007).

2.2.1. İmmünite

Antijen sunan hücreler (APC), NK (doğal öldürücü) hücreler, B ve T hücreler, sitokinler ve antikorlar gibi doğal ve edinimsel immüniteye dahil olan hücrelerin ve bileşenlerin fonksiyonu probiyotiklerle modüle edilir. Probiyotiklerden elde edilmiş DNA, Toll-like reseptörlerine (TLR) bağlanır, NF-κB (nükleer faktör kappa)'yı bloke eder ve IκB (κB inhibitörü) faktörünü stabilize eder. Probiyotikler tarafından üretilen metabolitler hızlı bir şekilde proteazomlar tarafından aracılık edilen ısı şoku protein bozunmasını engelleyerek bağırsak hücrelerinin korunmasını sağlarlar (Petrof ve ark. 2004). Ayrıca probiyotik bakteriler anti-apoptotik Akt/protein kinaz B aktivasyonunu ve MAPK (Mitojen aktive protein kinaz) sinyalleme IFN-γ (interferon gama), TNF-α (Tümör nekroz faktörü-alfa) ve IL-1-α (interlökin-1-alfa) ile bloke edilmesini takiben sitokine bağımlı bir şekilde apoptozu önleyebilirler (Neish ve ark. 2000). Birçok çalışma, humoral bağışıklık sisteminin uyarılmasında çok sayıda probiyotik maddenin spesifik antikorları salgılamak için, özellikle sIgA (s immünoglobulin A), potansiyel göstermiştir (Macpherson ve ark. 2004). Th1 (tip 1 yardımcı T hücresi) tarafından üretilen IFN-γ ve IL-12 (interlökin-12) hücresel bağışıklığı uyarır. Th2 (tip 2 yardımcı T hücresi) tarafından üretilen IL-4 (interlökin-4) ise B lenfosit hücrelerinin farklılaşmasını sağlar ve immünoglobulin E (IgE) üretimini kuvvetlendirmektedir (Lucey ve ark. 1996). Probiyotik suşların Th1 tip sitokinlerinin üretimini kuvvetlendirdiği ve Th2 tip sitokin düzeyini ise düşürdüğü rapor edilmiştir (Pavan ve ark. 2003; Makino ve ark. 2006).

2.2.2. Diyare

Antibiyotik ilişkili diyarede çocuklarda antibiyotik kullanımı sırasında karşılaşılan ve özellikle *Clostridium difficile*'in aşırı çoğalmasına bağlı olarak oluşan bir diyare çeşididir. Gerçekleştirilen çeşitli çalışmalarda antibiyotik ilişkili ishalin tedavisinde ve önlenmesinde probiyotiklerin yararlı etkisinin olabileceği belirtilmiştir. Bu etkinin temelinde ise suşların bağırsak koruyucu mukoza engelinin oluşumunu düzenledikleri ve bağışıklık düzenleyici etkilenen artmasına katkıda buldukları belirtilmiştir (De Vrese ve Marteau 2007).

2.2.3. Helicobacter Pylori

Son yıllarda probiyotiklerin enfeksiyonlara karşı etkinliğine yönelik çalışmalar hız kazanmıştır. *Helicobacter pylori* ise bu araştırmaların büyük bir kısmını oluşturmaktadır. Gerçekleştirilen çalışmalar probiyotik suşların *H. pylori* gelişimini inhibe ettiğini göstermektedir (Vitor ve Vale 2011). *H. pylori* enfeksiyonu midedeki Smad7 ve NF-κB ekspresyonunu tetiklemekte, probiyotikler ise bu metabolik yolu engelleyerek *H. pylori*'nin

indüklediği inflamasyonu azaltmaktadır (Imase ve ark. 2008). Bununla beraber probiyotik suşların *Candida albicans* enfeksiyonlarını önlediğine ya da azalttığına dair çalışmalar da mevcuttur (Hasslöf ve ark. 2010).

2.2.4. Alerji

Allerji, spesifik antikor aracılı veya hücre aracılı immünolojik mekanizmalar tarafından başlatılan aşırı duyarlılık reaksiyonu olarak tanımlanır (Weinmayr ve ark. 2007). Prospektif randomize çift kör kontrollü bir çalışmada, probiyotik takviyelerinin alerjik çocuklarda rinit atak sayısını azalttığı bulunmuştur (Giovannini ve ark. 2007). Başka randomize plasebo kontrollü bir çalışmada ise, atopik egzema, alerjik rinit veya astımlı gebe annelere ve postnatal olarak 6 ay boyunca bebeklerine, spesifik suş içeren probiyotik takviyesi verilmesi yüksek riskli çocuklarda erken atopik hastalığın önlenmesinde etkili olabileceği gösterilmiştir (Kalliomäki ve ark. 2001). Bazı çalışmalar, probiyotik desteğin tüketilmesinin atopik dermatit, inek sütü alerjisi ve alerjik bulguların ciddiyetini azaltabileceğini ortaya koymuştur (Kalliomäki ve ark. 2010; Niers ve ark. 2009). Başka bir çalışma, *Lactobacillus Rhamnosus*'un atopik hastalıkların önlenmesi ve tedavisi için daha iyi bir seçim olabileceğini göstermiştir (Hoang ve ark. 2010). Fakat mevcut verilere göre, probiyotikleri atopik dermatit, alerjik sensitizasyon ve astım için koruyucu tedavi olarak önermek güvenilir değildir. Yapılan bir çalışmada, probiyotik karışım (VSL # 3 ve *Lactobacillus casei* türü) ile oral tedavinin, bir gıda alerjisi modelinde anafilaktik semptomların azalmasına neden olabileceği sonucuna varılmıştır (Özdemir ve ark. 2010). Probiyotik suşların besin ve polen alerjisine karşı elde edilmiş başarılı sonuçları da bulunmaktadır. Özellikle IgE ve IL-4 üretiminin baskılanması alerji tedavilerinde oldukça önemli kabul edilmektedir (Repa ve ark. 2004). BALB/c soyu farelerde gerçekleştirilen 3 farklı alerji grubuna ait çalışmada probiyotik *Lactobacillus Paracasei* suşunun inflamasyonu azalttığı ve alerji tedavilerinde potansiyel oluşturabileceği belirtilmiştir (Wang ve ark. 2012).

2.2.5. Vajinosiz

Vajinosize çeşitli organizmalar neden olabilir ve birçok durumda buna neden olan faktörler belirlenemeyebilir. Sağlıklı vajinada laktobasiller baskındır ve vajinosiz, vajinal florada hidrojen peroksit üreten *Lactobacillus* türlerinin vajinal pH'ını yükselten anaeroblara dönüşmesinden kaynaklanır (Jones ve ark. 2011). Birçok çalışma, idrar yolu enfeksiyonlarının tedavisinde Laktobasilli probiyotiklerinin kullanılabileceğini göstermiştir. Yapılan bir çalışmada ise *L. acidophilus* içeren yoğurt tüketiminin *Candida* maya enfeksiyonlarının görülme sıklığını azalttığını göstermiştir (Reid ve ark. 2003).

2.2.6. İnflamatuvar Bağırsak Hastalığı (IBH)

Ülseratif kolit ve Crohn hastalığı da dahil olmak üzere İnflamatuvar Bağırsak Hastalığı (IBH), öngörülemeyen ve kendiliğinden ortaya çıkan, hastalısız dönem ve nüks dönemleri ile karakterize, bağırsak rahatsızlıklarının bir grubudur. Etki mekanizması bağırsakta normal floradaki değişiklikleri, konak immün yanıtlarının uyarılmasını ve organizmaların antioksidan özellikleri ve antioksidan enzim üretimi nedeniyle oksidatif reaksiyonların azaltılmasını içerir. Genişletilmiş araştırmalara rağmen, bu hastalıkların nedenleri bilinmemektedir. Karın ağrısı, gaz sıkıntısı, ishal gibi semptomları olan “irritable” bağırsak sendromu hastalığına yönelik gerçekleştirilen çalışmalarda probiyotik suşların bağırsak florasını düzenleyerek gaz oluşumunu azalttığı ve hastalık tedavisinde umut verici olduğu belirtilmiştir (Clarke ve ark. 2012).

2.2.7. Kanser

Hücrenin büyümesi ve bölünmesinin düzenlenmesine katkıda bulunan genlerin mutasyonu veya uygunsuz şekilde harekete geçirilmesi kansere neden olabilir. Bazı çalışmalarla bağırsak bakterilerinin genel popülasyonu tarafından üretilen kanserojen, kokarsinojen veya pro-kanserojenlerin kolon kanseri oluşumunu teşvik ettiği gözlemlenmiştir. Buna karşın diğer bulgular, probiyotik bakterilerinin kolon kanserinden kaçınmaya yardımcı olabileceğini ifade etmiştir (Liong 2008). Probiyotikler tarafından kolon kanserinden kaçınma mekanizmaları şunlardır:

- Gıda kanserojenlerinin detoksifikasyonunu oluşturma,
- Kanserojenik bileşikler üretebilecek bakterilerin popülasyonlarını veya metabolik faaliyetlerini zayıflatan bağırsaktaki fizikokimyasal koşulların modifikasyonu,
- Antitümörigenik veya antimutajenik bileşiklerin üretilmesi,
- Bütirat, asetat ve propiyonat gibi kısa zincirli yağ asitlerinin üretimi, kolonik içeriğin pH'sının düşürülmesi,
- Bağışıklık sistemini kanser hücre çoğalmasına karşı daha iyi korunması için teşvik edilmesi, kanser önlemeye katkıda bulunabilir (Lin ve ark. 2006; Chakraborti 2011).

2.2.8. Hepatik Ensefalopati

Hepatik ensefalopati (HE), patogenezi bilinmeyen bir karaciğer hastalığıdır. Bağırsağın ürettiği amonyağın patogeneze önemli bir rol oynadığı düşünülmektedir. Birkaç çalışmada probiyotiklerin portal kan içindeki toplam amonyak miktarını, hepatositteki artmış inflamasyonu ve oksidatif stresi azaltan ve amonyak ve diğer toksinlerin temizlenmesi ile

hepatik ensefalopati tedavisinde güçlü etki gösterdiği ve son olarak toksin alımını zayıflattığı ispatlanmıştır (Solga 2003; Malaguarnera ve ark. 2010). 97 hastada yapılan bir çalışmada, minimal karaciğer ensefalopatisinde sinbiyotiğin (probiyotik ve prebiyotik karışımı) amonyum düzeylerinde bir azalmaya neden olduğu ayrıca hepatik ensefalopatinin semptomlarının iyileştirilmesi gibi yararlı etkileri gözlemlenmiştir (Lata ve ark. 2011).

2.2.9. Hipertansiyon

Yüksek kan kolesterol düzeyleri, diyabet, reninin yanlış modülasyonu, dengesiz cinsel hormonlar ve obezite hipertansiyona neden olan risk faktörleridir (Yekeen ve ark. 2003). Araştırmalar, belirli laktobasillerin ya da bunların formülasyonlarının tüketilmesinin serum kolesterolünü düşürebileceğini ve lipid profillerini iyileştirip daha sonra hipertansiyon riskini hafiflettiğini göstermiştir (Lye ve ark. 2009).

2.2.10. Böbrek Taşı

İdrarın oksalat düzeylerinin yükselmesi böbrek taşları için bir risk faktörüdür. Bağırsak mikropları tarafından oksalatın kullanımı, emilimi kısıtlar. Probiyotik verilen hastalarda, dışkı atımlarında düşük oksalat seviyeleri görülmüştür. Bu nedenle bakteri içeren probiyotik formülasyonlar oksalatın in vitro olarak bozunmasına neden olabilir böylece hastalarda oksalat dışkı atılımı azaltılır. Çeşitli çalışmalar, probiyotik bakteri içeren bağırsak florasının modifikasyonunun gastrointestinal sistemde oksalat düzeylerini iyileştirebileceğini ve oksalat absorpsiyonunu azaltabileceğini önermektedir (Hoesl ve ark. 2005; Lieske ve ark. 2005).

2.2.11. Laktoz İntoleransı

Laktoz sindirilemediğinden dolayı ozmotik denge bozulmakta ve bakterilerin fermentasyonu sonucunda oluşan metabolitler neticesinde aşırı gaz ve şişkinlik oluşmaktadır. Probiyotiklerin kullanımı ile serbest kalan bakteriyel laktaz enzimi ise laktozu parçalamakta ve hastalığın tedavisinde önemli bir rol oynamaktadır (Rolfe 2000). Laktozu sindiremeyen hastalarda probiyotik *Lb. casei* ve *B. breve* suşlarının 4 hafta süresince birlikte uygulanması neticesinde iyileşme kaydedilmiştir.

2.2.12. Kolestrol

Koroner kalp hastalığı gelişimi için en güçlü risk faktörlerinden biri, toplam kan kolesterolü veya diğer kan lipidlerinin yüksek seviyede olmasıdır. Asimilasyon, bağlanma ve indirgeme işlevleri, diyetle bulunan kolesterolün absorpsiyonunu zayıflatmak için üç yararlı mekanizmadır. Probiotik suşlar kendi metabolizması için kolesterolü ortadan kaldırabilir ve katabolik ürünlerine indirgeyebilir. Kolesterolün safra asidi dekonjügasyonu, toplam kan

kolesterol düzeyini düşürmek için dolaylı bir yol oluşturmaktadır (Lin ve ark. 2006; Ooi ve ark. 2010; Suvarna ve ark. 2005).

Laktik asit bakterilerinin kardiovasküler hastalıklardan, gastrointestinal mukozadaki zararlı patojenlerin sebep olduğu enfeksiyonların ve alerjik hastalıkların engellenmesine ve bağışıklık sisteminin uyarılmasına kadar pek çok olumlu etkilere sahip olduğu bilinmektedir (Bhadoria ve Mahapatra 2011). Tablo 2’de probiyotiklerin bazı hastalıklarda etki ettiği mekanizmalar gösterilmiştir.

HASTALIK	PROBİYOTİK MEKANİZMALAR
IBD	↑IL-10, IL-12, IL-2 TGF-β ve ↑Periferik kandaki T regülasyonu, ↓TNF-α
Diyare	↑sIgA salgılaması, ↓viral dökülme, ↓pH, organik asit üretimi, ↑NO ve H ₂ O ₂ , ↓mikrobiyal kolonizasyon, toksin hidrolizi
Kanser	↓ROS reaktivitesi ve mutasyonu, hücre duvarı üzerinde kanserojenleri absorbe etme, ↓DNA hasarı, Ksenobiyotik detoksifiyesine katılan enzimleri modüle edilmesi
Vajinosiz	↓pH, ↑H ₂ O ₂ üretimi, ↓Patojen kolonizasyonu
Laktoz İntoleransı	↑Laktaz üretimi, laktozu glikoz ve galaktoza hidrolize edilmesi
Kolesterolün kontrolü	Kolesterol moleküllerini sindirimi ve indirgenmesi, Kolesterolün safra asidine dekonjüğe olması
Hipertansiyon	Hücre duvarı bileşenleri ve γ-amino bütirik asit gibi antihipertansif maddelerin üretimi
Karaciğer Hastalığı	↓Hiperamonyemi, ↓inflamatuvar ve oksidatif stres, ↓toksin alımı, karaciğerde ↓TNF-α ve ↑NK hücresi
Alerji	TLR ve enterositlerin proteoglikan tanıma proteinlerini modüle eder, dendritik hücrelerin aktivasyonuna ve Th1 yanıtına yol açar, Th1 sitokinlerinin ve Th2 yanıtlarının bastırılmasının uyarılması, ↑IFN-α üretiminin uyarılması, ↓IgE ve antijen-indüklenmiş TNF-α, IL-5 ve IL-10 salınımı

Tablo 2: Probiyotiklerin hastalıklarda etki ettiği mekanizmalar (Khani ve ark. 2012)

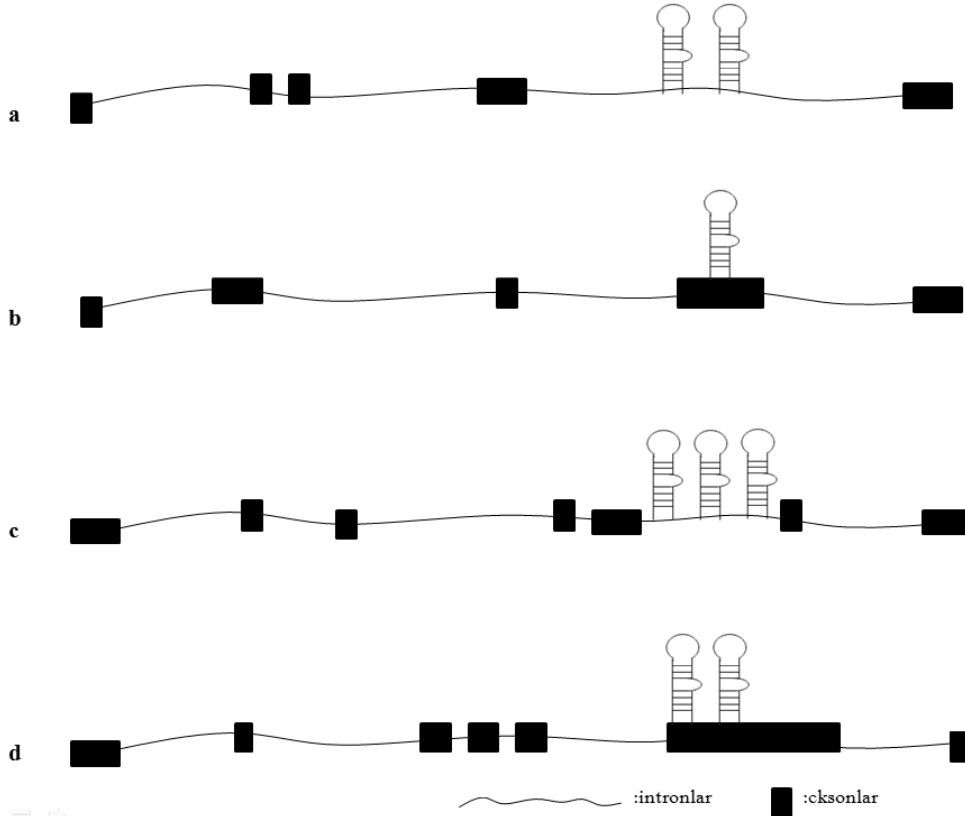
Gıda takviyesi olarak kullanılan probiyotiklerin pek çok hastalıkla ilişkisi araştırılmıştır ayrıca günümüzdeki beslenme alışkanlıklarının insan sağlığına etkileriyle ilgili veriler artmaktadır. İnsan genom projelerinin uygulamaya konulduğu ve insanlar arası genetik farklılıkların araştırıldığı son yıllarda beslenmenin kişiler üzerine etkisi çeşitlilik göstermektedir. Beslenme ile vücudumuza aldığımız kimyasalların çoğu genlerimizi etkiler. Daha ileriki çalışmalarla birlikte doğru beslenme şeklinin yakın gelecekte genetik yapıya göre düzenlenerek insan yaşamının uzatılabilmesi olasıdır. Bu sebeple diyet-gen ilişkisinin sağlık üzerindeki olumlu ve

olumsuz yanlarını incelemek üzere nutrigenetik ve nutrigenomik gibi iki alanın kombinasyonu olan nutrisyonel genetik bilimine ilgi gün geçtikçe artmaktadır (Ayhan ve Soylu 2015).

2.3. MikroRNA (miRNA)

MikroRNA'lar (miRNA) 17-25 nükleotid uzunluğundaki tek iplikli kodlayıcı olmayan RNA'ların küçük sınıfıdır. Hayvanlarda, bitkilerde ve tek hücreli ökaryotlarda gen ifadesini kontrol eder, gen ifadesinin post-transkripsiyonel düzenlenmesinde kilit rol oynar (Bartel 2004; Zhao ve ark. 2007). İlk miRNA olan lin-4, toprak solucanı *Caenorhabditis elegans* (*C. Elegans*) ile yapılan çalışmalarla 1993'te Victor Ambros ve arkadaşları tarafından keşfedilmiştir (Lee ve ark. 1993). Şuanda 2661 insan miRNA geni olmak üzere toplamda 28645 miRNA geni veri tabanında kayıtlıdır (<http://www.mirbase.org/>). Bu küçük RNA'lar memelilerde tüm protein kodlayan genlerin yaklaşık %60'ını kontrol eden gen ifadesinin post-transkripsiyonel düzenleyicileri olarak ortaya çıkmıştır. Böylece miRNAlar gelişim, farklılaşma, proliferasyon ve apoptoz gibi hemen hemen her hücrel olayın düzenlenmesine katılırlar (Fabbri 2014).

İnsanlarda bilinen miRNA'ların yaklaşık olarak %50'si kromozomlarda küme şeklinde bulunmuştur ve bu miRNA'lar polisistronik olarak transkribe edilir (Lagos-Quintana ve ark. 2001; Lau ve ark. 2001). İnsan miRNA'ları Y kromozomu hariç tüm kromozomlarda bulunur. Genomik konumlarına göre miRNA'nın 4 grubu vardır: Kodlama yapmayan transkripsiyon birimlerinde intronik miRNA; kodlama yapmayan transkripsiyon bölgelerindeki eksonik miRNA; protein kodlayan transkript bölgelerinde intronik miRNA ve eksonik miRNA. MiRNA genlerinin yaklaşık üçte biri protein kodlayan genlerin intronlarında bulunur; bunlar miRNA ve konakçı mRNA transkripsiyonunun bazı bağlantısını içeren, yolcu ipliğinde yer alır (Rodriguez ve ark. 2004; Baskerville ve Bartel 2005). Şekil 1'de mikroRNA'ların genomik yerleşimleri ve gen yapısı verilmiştir.



Şekil 1: miRNA'lar genomik konumlarına göre dört gruba ayrılabilir: **a)** Kodlama yapmayan transkripsiyon birimlerinde intronik miRNA **b)** kodlama yapmayan transkripsiyon bölgelerindeki eksonik miRNA **c)** protein kodlayan transkript bölgelerinde intronik miRNA **d)** protein kodlayan transkript bölgelerinde eksonik miRNA (Fabbri 2014)

2.4. MikroRNA'ların Biyogenezi ve Olgunlaşması

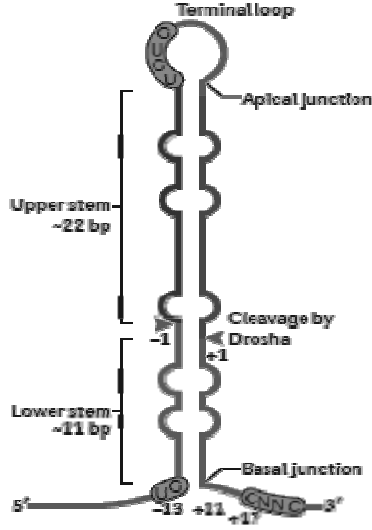
MiRNA'ların biyogenezi, hücrenin çekirdeğinde başlayan, transkripsiyonu takiben sıkı bir şekilde düzenlenen ve son olarak olgun miRNA molekülünün asıl işlevini uyguladığı sitoplazma boyunca devam eden çok adımlı bir süreçtir. Çekirdekte sap-ilmek öncüsünün özel olarak kırılmasıyla işlem başlatılır (Lee ve ark. 2003). Elde edilen yapı prekürsör miRNA (pre-miRNA); küçük-RNA yollarında yer alan tüm dsRNA'lar (çift-iplikli RNA'lar) için bir imza motifi gibi görünür. Exportin-5, bu imza motifini tanır ve pre-miRNA'ları bir GTP-GDP gradyanı üzerinde çekirdek porları vasıtasıyla sitoplazmaya verir. Daha sonra, pre-miRNA başka bir olgun miRNA'ya dönüşmesi için bir RNAaz enzimi olan Dicer'a teslim edilir ve son olarak olgun miRNA, RNA-indüklenmiş susturucu kompleksle birleşir (Lund ve ark. 2004; Yi ve ark. 2003).

2.4.1. Primary(birincil)-MikroRNA (pri-miRNA) Prosesi

miRNA biyogenezi pri-miRNA olarak bilinen transkriptin senteziyle başlar. Pri-miRNA'lar genellikle RNA Polimeraz II tarafından transkribe edilir. Ek olarak RNA Polimeraz III'ün bazı viral miRNA'ları transkribe ettiği görülmüştür (Pfeffer ve ark. 2005). Ayrıca tRNA'dan türetilmiş bazı endojen miRNA-benzeri küçük RNA'ları da RNA Polimeraz III transkribe eder (Babiarz ve ark. 2008). Saç tokası yapısındaki 33-35 bp'lik pri-miRNA'lar bir sap ve terminal ilmek yanlarında 5'cap ve 3' poliA kuyruğu içerir (Carthew ve Sontheimer 2009; Lee ve ark. 2004). P53, MYC, ZEB1 ve ZEB2 gibi transkripsiyon faktörleri ve miyoblast belirleme proteini 1 (MYOD 1) miRNA ekspresyonunu pozitif veya negatif olarak düzenler (Kim ve ark. 2009; Krol ve ark. 2010). DNA metilasyonu ve histon modifikasyonları gibi epigenetik kontroller miRNA gen düzenlemesine katkıda bulunur (Davis-Dusenbery ve ark. 2010)

2.4.2. Prekürsör MikroRNA (pre-miRNA) Prosesi

Klasik miRNA biyogenezi yolağında miRNA olgunlaşmasının ilk basamağı çekirdekte pri-miRNA'dan yaklaşık 70 nt saç tokası yapısındaki pre-miRNA'nın mikroişlemci kompleks tarafından kırılmasıyla başlar. Bu kompleksin temel bileşeni şunlardır: bir RNaz III enzimi olan Drosha ve ortağı DGCR8 (Di George sendrom kritik bölge gen 8), çift-iplikli RNA-bağlanmış domain (dsRBD) proteindir (Lee ve ark. 2003; Denli ve ark. 2004; Gregory ve ark. 2004) . DGCR8 proteini, sap ve komşu tek-iplikli RNA'yı (ssRNA) tanır ve Drosha için bir cetvel gibi görev yaparak sap kısmından yaklaşık 11 nt uzaklıktaki sap-ssRNA bağlantı noktasını keser ve pre-miRNA'yı serbest bırakır (Han ve ark. 2006). Pre-miRNA RNaz III endonükleaz ürünleri için 5' fosfat ve 2 nt'lik 3' uzantılı karakteristik yapıya sahiptir (Lee ve ark 2003; Basyuk ve ark. 2003). Drosha gibi RNaz III enzimleri bütün yaşayan hücrelerde eksprese olan çift-iplikli (dsRNA) ribonükleazların bir ailesidir (Conrad ve Rauhut 2002). Mikroişlemcinin iki Drosha ve iki DGCR8 moleküllerinden oluşan heterotetramer yapısı vardır. Yaklaşık 120 kDa'lık DGCR8 proteini iki dsRNA-bağlanmış protein içerir. Ayrıca DGCR8 pri-miRNA'nın mikroişlemci kompleks tarafından tanınması ve bağlanmasında önemli rol oynar.

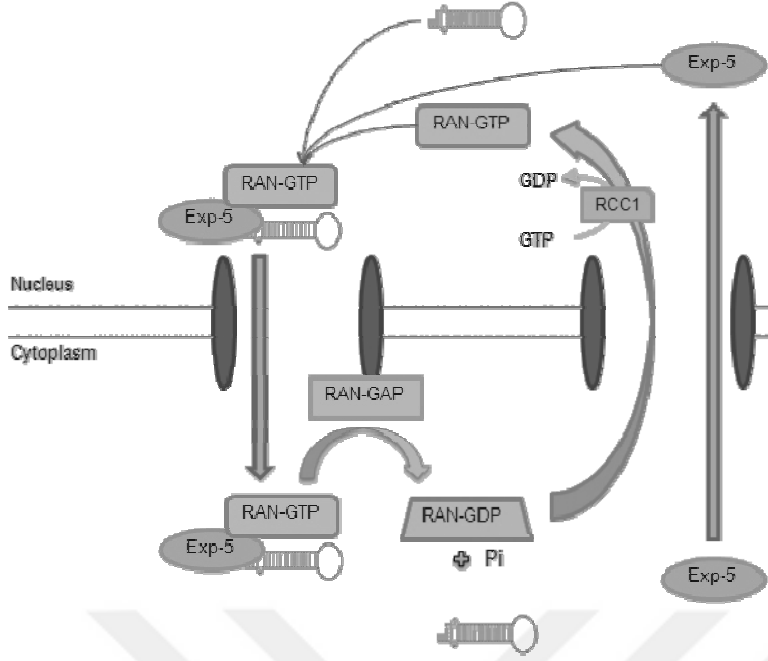


Şekil 2: Mikroişlemci kompleksi (Drosha ve DGCR8'den oluşan), tek sarmallı RNA kuyruklarını, yaklaşık 35 bp uzunluğunda bir sap ve birincil mikroRNA'nın (pri-miRNA) terminal döngüsünü tanıır. Mikroişlemci, bazal kavşaktan ~ 11 bp ve apikal kavşağından ~ 22 bp ölçer ve Drosha pri-miRNA'yı bu konumda keser. (Ha ve Kim; 2014).

Diğer yandan DGCR8 geni kromozom 22'nin bir bölgesinde yer alır. Bu genin monoallel olarak silinmesi Di George sendrom olarak adlandırılan nispeten yaygın ve çok kompleks bir genetik hastalığa yol açar. Bu da miRNA sürecindeki bozukluk ve Di George sendrom arasındaki bağlantıyı gösterir (Shiohama ve ark. 2003). DEAD box RNA helikaz p68 (DDX5) ve p72 (DDX17) ve heterojen ribonükleoproteinler (hnRNPs) gibi diğer kofaktörler de mikroişlemci kompleksinin çalışmasında önemlidirler (Gregory ve ark. 2004).

2.4.3. Pre-miRNA'nın Sitoplazmaya Taşınımı:

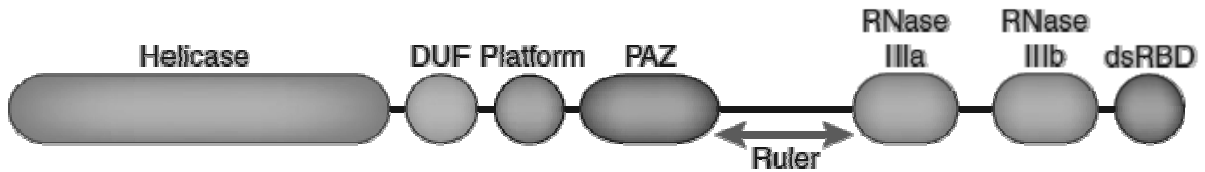
Drosha prosesinden sonra pri-miRNA olgunlaşmanın tamamlanabileceği sitoplazmaya aktarılır (Lund ve ark. 2004; Yi ve ark. 2003). Bu basamak miRNA aracılı RNA baskılanmasında hız sınırlayıcı bir basamaktır (Kim 2004; Murchison ve Hannon 2003). Exportin-5 (Exp-5) fonksiyonunda Ran'a (bir GTPaz) bağlı olan nükleositoplazmik transport faktörlerinin karyoferin ailesinin bir üyesidir. Çekirdek porlarından geçen, pre-miRNA bağlanmış EXP-5/Ran-GTP kompleksi sitoplazmada GTP'nin hidroliziyle pre-miRNA'yı serbest bırakır ve EXP-5/Ran-GDP tekrar çekirdeğe taşınır (Lund ve ark. 2004; Yi ve ark. 2003). EXP-5 ekspresyonunun baskılanması durumunda pre-miRNA'ların seviyesi hem sitoplazmada hem de çekirdekte azalacaktır (Yi ve ark. 2003). Bu nedenle EXP-5 pre-miRNA'ları yıkımdan korur. Ayrıca EXP-5'in kaybı veya mutasyonu pre-miRNA'ların çekirdekte alıkonulmasına sebep olur (Melo ve ark. 2010).



Şekil3: Exp-5/RAN-GTP/pre-miRNA kompleksi çekirdekdeki nükleoporinlere bağlanır ve çekirdek porlarından geçer. Pre-miRNA'ların sitoplazmada serbest bırakılması, RAN-bağlı GTP'nin RAN-GTPaz aktive edici protein tarafından hidrolizi ile ilişkilidir. Daha sonra Exp-5, çekirdeğe geri taşınır ve RAN-GTP, RCC1(Ran guanin nükleotid değişim faktörüdür) ile yeniden oluşturulur. (Lages ve ark 2012)

2.4.4. MikroRNA'ların Sitoplazmik Prosesi

Pre-miRNA'lar sitoplazmada serbest kaldıktan sonra sitoplazmik RNaz III enzimi olan Dicer ve katalitik partneri trans-aktivatör RNA (tar)-bağlanmış protein (TRBP) tarafından olgun miRNA'ya dönüştürülür (Bernstein ve ark. 2001; Knight ve Bass 2001). Olgun miRNA'lar yaklaşık 22 nükleotid uzunluğundadır. Bu aşamada miRNA'lar hala çift ipliklidir. Dicer'in iki RNaz III domainlerinin moleküler arası dimerizasyonlu tek bir işlem merkezi vardır. Her bir RNaz domaini dubleksin bir RNA ipliğini bağımsız olarak keser ve 2-nt 3' uzantılı ürünleri oluşturur (Filipowicz 2005). Memeli hücreleri 200 kDa moleküler ağırlığındaki tek bir Dicer proteinine sahiptir. Dicer, bir ATPaz/RNA helikaz domain, bir DUF domain (farklı bir dsRBD), bir PAZ domain iki RNaz III domain ve bir dsRBD içerir (Bernstein ve ark. 2001).

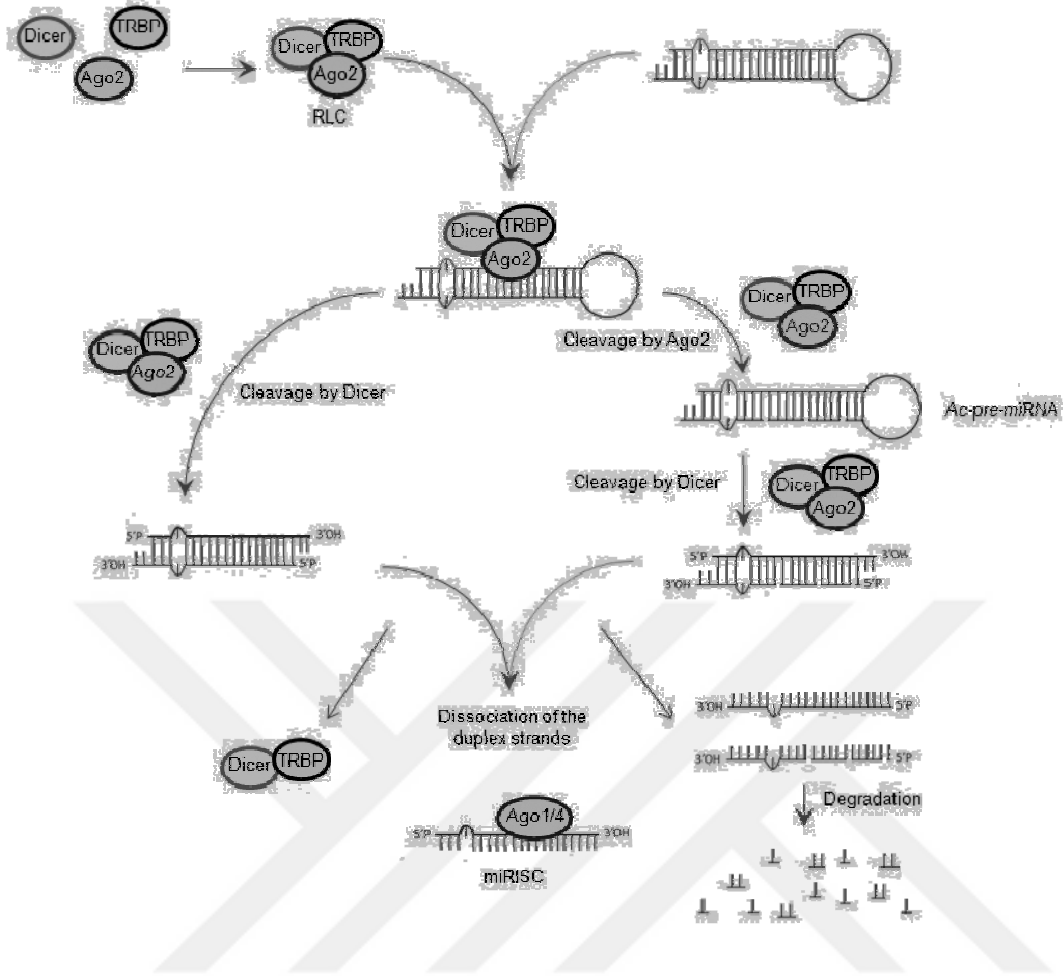


Şekil 4: Dicer'daki domainlerin yapı şematığı (Sawh ve Duchaine, 2012)

Dicer knockout ($Dcr^{-/-}$) fare ve hücreler yaşayamaz, gelişimsel ve normal hücre fonksiyonları boyunca bu protein önemli bir rol oynar (Bernstein ve ark. 2001). TRBP C-terminal-Dicer etkileşimi ve RNA-İndüklenmiş susturucu kompleksin (RISC) bir parçası olarak fonksiyonu RNA baskılanması yolağında önemlidir (Daniels ve ark. 2009). TRBP, amino-terminal DExD/H box helikaz domaininde Dicer'ı bağlar ve konformasyonel bir yeniden düzenleme ile aktive eder (Ma ve ark. 2008). Dicer/TRBP ayrımı 22nt'lik RNA dubleksini Argonaute (AGO) proteinine yüklenir böylece RISC meydana gelmiş olur.

AGO proteinleri N terminal lobunda bir PAZ ile N-terminal domaini ve C terminal lobunda bir orta (MID) ile PIWI domainine sahiptir (Elkayam ve ark. 2012; Schirle ve MacRae 2012). Kılavuz RNA'nın 5' monofosfatı MID ve PIWI arasındaki 5'fosfat-bağlanma yerine sıkıca bağlanır. İnsan AGO2 proteininin MID domainindeki nükleotide özgül ilmeği, U veya A bağlanma tercihi olan kılavuz RNA'nın 5' nükleobazı ile temas eder (Frank ve ark. 2010). Kılavuz RNA, AGO MID-PIWI lobunun temel kanalı boyunca hareket ederek RNA'nın 3' ucunu bağlayan PAZ alanına ulaşır. İnsanlardaki 4 AGO proteinlerinden (1-4) sadece AGO2 mükemmel şekilde eşleşen hedef mRNA'ları parçalayabilir. Bütün insan AGO proteinleri translasyon mekanizmaları ve mRNA bozunma faktörleriyle etkileşim yoluyla hedef mRNA'ların translasyonel baskı ve bozunumunu indüklemeye yeteneğine sahiptir (Huntzinger ve Izaurralde 2011).

MiRNA dubleksinin yüklenmesini takiben pre-RISC olgun RISC oluşturmak için yolcu ipliği hızlı bir şekilde ortadan kaldırır. Kesme-yetkili AGO2 proteinleri eğer dubleks merkezde eşleştirilirse yolcu ipliği parçalayabilir (Miyoshi ve ark. 2005; Rand ve ark. 2005). Kılavuz ipliğinin 2-8 ve 12-15 nükleotid konumlarındaki uyumsuzluklar, miRNA dublekslerinin ayrılmasını sağlar (Tomari ve ark. 2007; Kawamata ve ark. 2009; Yoda ve ark. 2010). Küçük RNA dublekslerinin RISC ile yüklenmesi, ATP gerektiren aktif bir süreçken, yolcu ipliğinin serbest bırakılması ATP'den bağımsızdır (Liu ve ark. 2009; Pham ve ark. 2004; Tomari ve ark. 2004). Kılavuz iplik AGO yükleme aşaması sırasında belirlenir. Çoğunlukla küçük RNA dubleksinin iki ucunun nispi termodinamik stabilitesine göre 5'bölgesindeki nispeten kararsız bir uç bölgesine sahip iplik, tipik olarak kılavuz iplik olarak seçilir (Khvorova ve ark. 2003; Schwarz ve ark. 2003). İplik seçimi için belirleyici faktör ilk nükleotid dizisidir. AGO proteinleri, nükleotid konumunda U olan rehber ipliği seçer. Serbest bırakılan yolcu ipliği, hızla bozunur (Czech ve ark. 2009; Ghildiyal ve ark. 2010; Okamura ve ark. 2009).



Şekil 5: RISC-yüklenmiş kompleks (RLC), Dicer, TRBP ve Ago2'den oluşur. miRISC oluşumuna neden olan iki yol vardır: Biri (solda), pre-miRNA'nın Dicer tarafından bölündükten sonra dubleksin iki ipliğinin ayrışmasını içerir. İkincisi (sağda) öncelikle Dicer tarafından bölünmeden önce Ac-pre-miRNA (Ago2-cleaved pre-miRNA) olarak adlandırılan geçici bir miRNA oluşumuna izin vererek Ago2 tarafından tamamlayıcı ipliğin bölünmesine dayanır. Bu modelde, yolcu ipliği daha sonra bozulur. (Lages ve ark, 2012)

2.5. MikroRNA'ların Biyolojik Rollerini

Doğru miRNA ekspresyonu, hayvan gelişimi sırasında, hücre akıbeti belirleme, proliferasyon ve hücre ölümü gibi birçok kilit sürecin zamanlaması ve düzenlenmesi için çok önemli olan sayısız hücresel olaylarla ilgilidir (Stefanive ark. 2008). Bu hayati süreçlere ilaveten, miRNA'lar, immün yanıtı, insülin sekresyonu, nörotransmitter sentezi, sirkadyen ritim ve viral replikasyon gibi diğer çoklu biyolojik fonksiyonlarla da ilişkilendirilir (Poy ve ark. 2004; Jopling ve ark. 2005; Greco ve ark. 2007; Gantier ve ark. 2007). Deneysel veriler biriktikçe bu liste şüphesiz genişleyecektir. miRNA regülasyonunun geniş kapsamlı temsili örnekleri miRNA let-7 de bulunmuştur, Let-7'nin yanlış ekspresyonu, birkaç insan kanseri tipiyle ilişkilendirilmiştir (Hornstein ve ark. 2005). Diğer örnekler, arka ekstremite gelişiminde rol oynayan miR-196 ve sinaptik gelişme ve plastisite için gerekli olan beyine özgü miR-134'dür (Schratt ve ark. 2006). Deri farklılaşması, çok katlı epitel dokularda p63'ü baskılayan miR-

203 tarafından desteklenirken, miR-1'in hassas seviyeleri kardiyojenezde önemlidir (Kwon ve ark. 2005). Normal bağışıklık fonksiyonu miR-155'e bağlıdır ve B hücresi farklılaşması, c-Myb transkripsiyon faktörünün miR-150 aracılı baskılanması ile kontrol edilir (Rodriguez ve ark. 2007; Xiao ve ark. 2007). Buna ek olarak, pankreatik adacık hücrelerine özgü miR-375, ekzositoz yolağının bir bileşenini oluşturan miyotrofini inhibe ederek insülin sekresyonunu düzenler (Poy ve ark. 2004).

MiRNA'lar, yalnızca erken embriyonik kök hücrenin sağ kalımı ve farklılaşması için gerekli değildir, aynı zamanda olgun nöronların sağ kalımı ve işlevlerini sürdürmesinde de önemli bir rol oynamaktadır. Nörolojik hastalıklarda, miR-20a/b-1 kümesinin kaybı, Alzheimer hastalığında görülmüştür ve miR-133b'nin kaybı, Parkinson hastalığında görülen dopaminerjik nöronların azalmasına sebep olabilir (Heber ve ark. 2008, Kim ve ark. 2007). Kalp hastalığında kardiyak fibroblastlardaki miR-21'in ekspresyonu interstisyel fibrozise ve kardiyak hipertrofiye yol açarken, kardiyomiyositlerde miR-1 ve miR-133 hipertrofiye karşı korur (Care ve ark. 2007). MiR-133a CTGF (bağ doku büyüme faktörü) ve COL1A1 (kollajen tip 1) gibi profibrotik genleri hedefleyerek hipertrofide önemli bir rol oynar. miR-133a'nın downregülasyonu kardiyak fibroziste kollajen sentezi ve fibrozisi düzenleyen profibrotik proteinlerin seviyelerinin artışına neden olur (Renaud ve ark. 2015). Birincil miR-34a (pre-miR-34a) preeklampatik plasentada ve hamileliğin ilk evresi boyunca over-ekspresyon edilir (Doridot ve ark. 2014). miR-141 geninin downregülasyonu Hirschsprung'lu (HSCR'li) hastalarda artmış CD47 ve CUL3 ekspresyon seviyeleri ile sonuçlanır. CD47 apoptozis, proliferasyon, adezyon ve hücre göçüne karışan her yerde bulunan bir membran reseptörüdür. CUL3 ise bir Cullin ailesinden iskelet proteindir ve muhtemelen erken embriyonik gelişimi kontrol eder (Tang ve ark. 2013).

MiR-203 ekspresyonu romatoid artrit sinovyal fibroblastlarda osteoartrit sinovyal fibroblastlara veya sağlıklı donörlerdeki fibroblastlara göre daha yüksektir. miR-203'ün zorlanmış ekspresyonu NF- κ B sinyal yolağı aracılığıyla IL-6 (interlökin-6) ve MMP1 salınımında artışa neden olur (Stanczyk ve ark. 2011). miR-150'nin downregülasyonu sistemik skleroz (SSc) fibroblastlarda gözlenmiştir. Honda ve ark. (2013) miR-150'nin direk olarak TGF β seviyelerini değiştirmeksizin integrin aracılığıyla TGF β aktivasyonunu düzenlediğini göstermişlerdir (Honda ve ark. 2013). miR-142 bir T-hücre spesifik miRNA'dır ve T hücre gelişiminde önemlidir (Zhao ve ark. 2011). miR-876-3p'nin upregülasyonu Watson Grade 1 hipokampal skleroziste potansiyel belirteç değeri olduğu bilinmektedir. Ek olarak miR-193a-5p temporal lob epilepside (hipokampal sklerozis derecesine bakılmaksızın)

upregüle edildiğini gösteren çalışmalar mevcuttur (Miller-Delaney ve ark. 2015). Kronik obstrüktif akciğer hastalığında (KOA) hsa-miR-17-92 kümesinin ekspresyonu artar, kümenin ayrıca çeşitli kronik akciğer hastalıklarına da karıştığı düşünülmektedir (Dakhlallah ve ark. 2013).

Otizm spektrum bozukluğu olan kişilerin beyininde hsa-miR-142-5p, hsa-miR-142-3p, hsa-miR-451a, hsa-miR-144-3p ve hsa-miR-21-5p'nin over-eksprese olur. Otizmde upregüle olmuş miRNA'lar sinaps fonksiyonu ve sinyal iletimi ile ilgilidir (Mor ve ark. 2015). Hsa-miR-34b/c, metakron gastrik kanser riskinin önemli bir prediktif biyolojik belirteçidir. Ek olarak, hsa-miR-137, hsa-miR-10b, hsa-miR-195, hsa-miR-378, hsa-miR-512-5p, hsa-miR-196b, hsa-miR-219-2-3p ve hsa-miR-338-3p için anormal metilasyonla epigenetik susturma gözlemlenmiştir (Guo ve ark. 2015).

Mesane kanserinde hsa-miR-193a, hsa-miR-212, hsa-miR-149, hsa-miR-328 ve hsa-miR-1224 dahil 20 miRNA yakınındaki 35 CpG bölgesinde hipermetilasyon belirlenmiştir. Hipermetilasyon beklenenden daha düşük miRNA gen ekspresyonu ile sonuçlanmış ve hastalığın ilerleyen aşaması ile birlikte artmıştır. Buna ek olarak, histon metilasyonunun genellikle miRNA genlerinin ilgili DNA metilasyon durumuyla eşleştiği gösterilmiştir (Dudziec ve ark. 2011). Meme kanserinde epigenetik olarak düzenlenen sekiz miRNA geninin hipometilasyona uğradığı bulunmuştur: hsa-miR-675, hsa-miR-1286, hsa-miR-1275, hsa-miR-328, hsa-miR-24-1, hsa-miR-1307, hsa-miR-1910 ve hsa-miR-548a1 (Cordero ve ark. 2015).

Skvamöz hücreli karsinomda hsa-miR-9-3 promotörünün metilasyonu bildirilirken hsa-miR-34b, hsa-miR-126, hsa-miR-127, hsa-miR-125b, hsa-miR-375 ve hsa-miR-1258, küçük hücreli dışı akciğer kanserinde DNA promotörü metilasyonu ile düzenlendiği gösterilmiştir (Belinsky 2015). Hsa-miR-203 promotörünün hipermetilasyonu, akut miyeloid lösemi (AML) ve non-Hodgkin lenfoma'da (NHL) hsa-miR-203'ün downregülasyonu ile sonuçlanır (Chim ve ark. 2011). Melanom ciltte pigment üreten bir kanser hücrelidir. Hsa-miR-211 ve hsa-miR-375 gibi çeşitli miRNA'ların melanom hücrelerinde farklı şekilde metilasyona uğradıkları bildirilmiştir (Mazar ve ark. 2011). Hipermetillenmiş genler hsa-miR-432, hsa-miR-1286, hsa-miR-641, hsa-miR-1290, hsa-miR-1287 ve hsa-miR-95'in servikal kanseri patogenezinde rolü olduğu bildirilmiştir (Yao ve ark. 2013).

miR-15 ve miR-16 miRNA'larının aşırı ifadelerinin hücre proliferasyonunu inhibe ederek kanser hücrelerini apoptoza götürdüğü böylece hem in vivo hem in vitro şartlarda tümör oluşumunu engellediği gösterilmiştir (Rivas ve ark. 2012). Son yapılan çalışmalarda miR-

196'nin over-ekspresyonunun etoposid-indüklenmiş apoptozu arttırdığı ve hipoksia altında hücre ölümü korumasını tersine döndürdüğü gözlemlenmiştir (Magali ve ark. 2015). MiR-29 ailesinin üyelerinin ise kronik lenfositik lösemi (KLL), akciğer kanseri, invaziv meme kanseri, akut miyelooid lösemi (AML) ve kolanjiyokarsinom hücrelerini baskılayıcı olarak aktivite gösterdiği yapılan çalışmalar ile ortaya konulmuştur (Mott ve ark. 2007).



3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1.Çalışma grubunu oluşturan örnekler

Araştırma; kontrol amacıyla Necmettin Erbakan Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi Hastanesi Diyet polikliniklerine başvuran, sağlıklı ve 18-65 yaş aralığındaki 11 erkek, 9 kadın toplam 20 gönüllü kişiyle gerçekleştirilmiştir.

Probiyotik olarak isimlendirilen, gıda takviyesi olarak kabul edilen ve Tarım ve Köy İşleri Bakanlığınca ruhsatlandırılıp sertifikalandırılan ürünler kullanılarak tez yöntemi standardize edilmiştir. Önerilen doz uygulamaları Tarım ve Köy İşleri Bakanlığının 7 Temmuz 2006 tarih ve 26221 sayılı Resmi Gazetede yayınlanan tebliğinde belirtilmiştir, bunun dışında farklı bir doz uygulaması yapılmamıştır. Bu nedenle her katılımcı kullanacağı probiyotik takviyesinin markasını kendisi belirlemiştir.

Çalışmaya katılmak isteyen gönüllüler tarafımızca bilgilendirilip onamları alınmıştır. Çalışmada probiyotik kullanmadan önce rutin analizler için verdikleri venöz kan örneklerinden artan numuneler ile probiyotik kullanımına başladıktan 10 gün sonra gelinen kontrolde rutin analiz için verdikleri venöz kan örneklerinden artan numuneler kullanılmıştır. Bu numunelerde belirlediğimiz miR-15a-5p, miR-16-1-3p, miR-29a-3p ve miR-196b-5p miRNA'larının seviyeleri RT-PZR yöntemi kullanılarak analiz edilmiştir.

3.1.1. Gönüllülerin çalışmaya dahil edilmeme kriterleri:

- En az 10 gün süreyle düzenli olarak gıda takviyesi probiyotikleri kullanmayanlar,
- Hastalar (tıbbi tedavi gerektiren kabızlık, daire ve mide hastalıkları, kronik iltihabi bağırsak hastalığı, aktif enfeksiyon, geriatrik anoreksiya, diyabetes mellitus, dislipidemi ve diğer metabolik bozukluklar)
- Gebe kadınlar,
- Emziren kadınlar,
- Acil vakalar,
- Şahsen olur veremeyecek gönüllüler.

3.2.Kullanılan kimyasal maddeler ve deney ekipmanları:

-GeneAll Hybrid-R™ miRNA izolasyon kiti

-GeneAll HyperScript cDNA sentez kiti

- Fast Plus EvaGreen qPCR Master Mix
- Sentegen senteligo primerleri
- Yıkama solüsyonu (wash buffer)
- Filtreli tüpler
- 200µl ve 1000µl pipet ve pipet uçları (DNase ve RNase free)
- 1.5 ml eppendorf (DNase ve RNase free)
- Vortex (İka vortex 1)
- Spin Santrifüj (Mrc,Ecen6)
- Santrifüj (D-78532 ,Hettich)
- Real Time PZR (Applied Biosystems)
- Isıtıcı (Eppendorf 2672)

3.3.MikroRNA Analizi

3.3.1. Plazma Eldesi:

- ✓ Kan örneği alındıktan sonra en az 5-10 kez yavaşça alt-üst edilerek karıştırıldı.
- ✓ Oda sıcaklığında bekleyen örneklerin 2 saat içerisinde plazmaları ayrıldı.
- ✓ Tüpler 2.000 g'de 10 dakika santrifüj edildi.
- ✓ Santrifüj işlemi sonunda tüpler sarsılmadan dikkatlice santrifüjden çıkarıldı ve yavaşça kapakları açıldı. Plazmanın en üst kısmından 200µl'lik pipetlerle (DNase, RNase Free, filtreli pipet uçları kullanılarak) 5 kez toplamda 1.000 µl olacak şekilde plazma steril eppendorf tüplere toplandı.
- ✓ Toplanan 1.000 µl'lik bu plazma örneği 2.000 g'de 10 dakika santrifüj edildi ve plazmanın üst kısmından (en üstte bir miktar zor görülen lipid birikir ona değmeden) 250 µl lik kısım steril bir eppendorf tüpe alındı. Bu işlem alttaki hücresel kısım rahatsız edilmeden (DNase, RNase Free, filtreli pipet uçları kullanılarak) pipet ile yapıldı
- ✓ Bu şekilde ayrılan plazma örnekleri -80 °C'lik derin dondurucuda saklandı.

3.3.2. MikroRNA İzolasyonu:

- ✓ MikroRNA izolasyon kiti (GeneAll Hybrid-R™) kullanılarak toplanılan plazmalardan miRNA izolasyonu yapıldı.
- ✓ Plazma örneklerinden 200 µl'lik kısım DNase, RNase free eppendorf tüpe aktarıldı.
- ✓ Her bir tüpe 500 µl'lik RiboEx™ eklendi ve 15 saniye vortekslendi.
- ✓ Daha sonra üzerine 100 µl'lik klorofom eklendi ve iyice karışması sağlandıktan sonra 2 dakika oda ısısında bekletildi.
- ✓ Elde edilen karışım 4°C'de 12,000 x g'de 15 dakika santrifüj yapıldı. Karışım 3 faza ayrıldı. En üstte ki aqua faz temiz bir tüpe alınarak %50'lik 450 µl alkol eklendi. Pipetaj yapıldı.
- ✓ Daha sonra type B kolona(kırmızı halkalı) 150 µl kadar aqua faz aktarıldı.
- ✓ 10,000 x g'de 30 saniye santrifüj yapıldı. Kolon atıldı, altta kalan sıvı kısma %100'lük alkol eklendi. Pipetaj yapıldı.
- ✓ Karışım tip W(mavi halkalı) kolonuna aktarıldı ve oda sıcaklığında 10,000 x g'de 1 dakika santrifüj edildi.
- ✓ Bağlantı tüpü yenilendi ve kolonun üzerine 500 µl RBW buffer eklendi. 10,000 x g'de 30 saniye oda sıcaklığında santrifüj yapıldı.
- ✓ Daha sonra bağlantı tüpü yenilendi ve kolonun üzerine 500 µl RNW buffer eklendi. 10,000 x g'de 30 saniye oda sıcaklığında santrifüj yapıldı. Bu işlem toplamda 2 kez tekrarlandı.
- ✓ Tüpler dököldü ve herhangi bir wash buffer kalmasına karşın 10,000 x g'de 1 dakika santrifüj yapıldı.
- ✓ Bağlantı tüpü yenilendi ve kolonun üzerine 50µl RNase-free su eklendi. 10,000 x g'de 1 dakika santrifüj yapıldı.
- ✓ Filtre atıldıktan sonra elde edilen miRNA'lar -20°C'de saklandı.

3.3.3. MikroRNA'dan cDNA Sentezi

GeneAll HyperScript cDNA sentez kitiyle reaksiyon sağlandı. Kite dahil olan reaksiyon bileşenleri her bir örnek için tablo 3'te belirtilen hacimlerde hazırlandı ve son hacim 14 µl 'ye tamamlanacak şekilde kitin çalışma protokolüne uygun olarak kullanıldı.

BİLEŞENLER	Hacim
NF Water	8 µl
Stem-loop primer	1 µl
10mMdNTP	1 µl
RNA	4 µl
TOTAL	14 µl

Tablo 3: cDNA sentezi için gerekli olan bileşenler

65°C’de 5 dakika bekletildi ve primer denatürasyonu sağlandı. Hemen buz üzerine alındı. Daha sonra her bir örnek için 6 µl olacak şekilde aşağıdaki bileşenler eklendi.

BİLEŞENLER	Hacim
10X First S.Buffer	2 µl
0,1M DTT	2 µl
HyperScript Reverse Transkriptaz	1 µl
RNase İnhibitör(40U/ µl)	1 µl
TOTAL	6 µl

Tablo 4: cDNA sentezi için gerekli olan bileşenler

Karışım termal döngü cihazına alındı ve aşağıdaki protokol uygulandı.

16°C	30dakika	60X
30°C	30 saniye	
42°C	30 saniye	
50°C	1 saniye	
85°C	5 dakika	

Tablo 5: cDNA sentezi için termal döngü cihazında uygulanan protokol

Elde edilen cDNA'lar nanodropta ölçüldü. Ölçülen örnekler 500ng/µl olacak şekilde seyreltildi. Her bir örnek kendi primerleri ile Real Time PZR yapıldı. Plate dizaynı word dosyası olarak kaydedildi.

3.4.GERÇEK ZAMANLI POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU (RT-PZR)

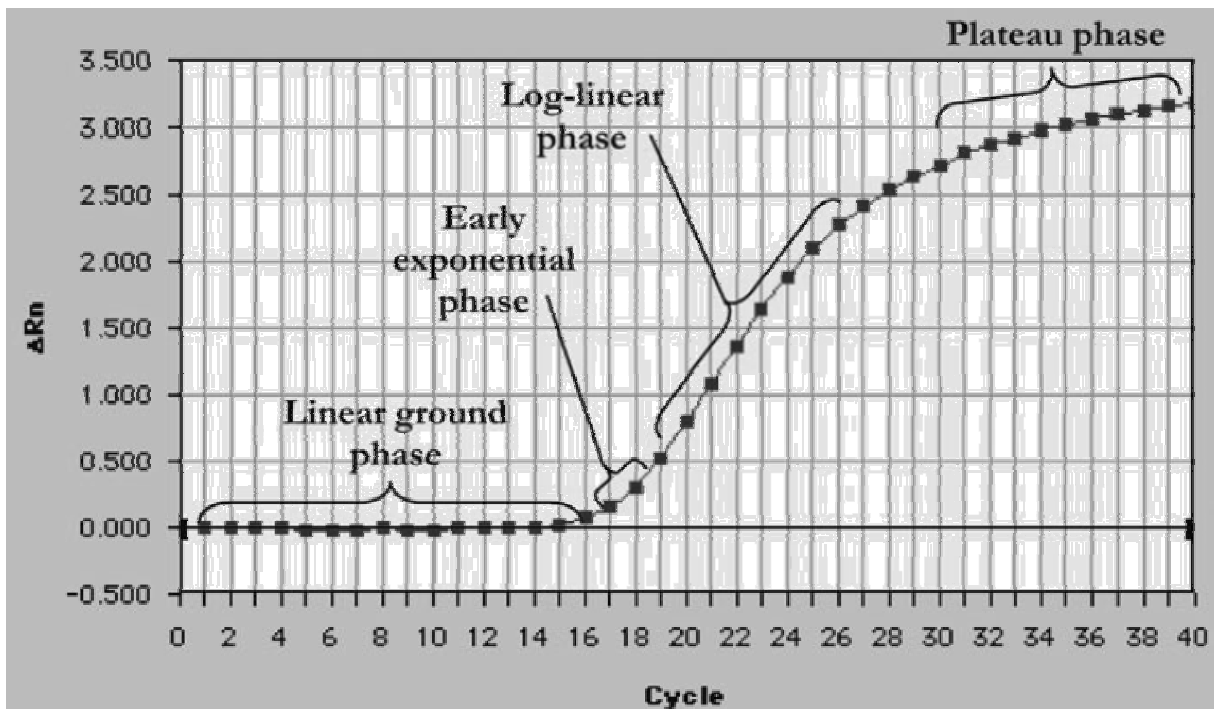
Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu çalışmalarında 4 aşamada eğri görünümü vardır.

1) Doğrusal Faz (Linear ground phase):Bu fazda PZR yeni başlamıştır. Floresan emisyonu bu fazda daha yükselmeye başlamaz. Taban hattı floresan hesaplaması bu fazda yapılır.

2) Erken Oluşum Fazı (Early exponential phase): PZR ürün oluşumu bu fazda başlar. Floresan etkileşimi başlangıç miktarına bağlı olarak taban hattından ayrılması bu fazda görülür (genellikle 10 ct döngüden sonra yükselme görülür).

3) Uzun Doğrusal Faz (Long Linear phase): PZR için en uygun şartların olduğu ve kendini her döngüde çoğalttığı fazdır. Bu faz bileşenlerin bitmesi ve floresan etkiyle daha fazla hesaplama yapılamayınca kadar devam eder.

4) Plato Fazı (Plateu phase): Bu fazda PZR ürünü elde edilmez, reaksiyon yavaşlar, ortamda bulunan enzim miktarı azalır ve oluşan ürünler daha fazla ürün oluşumunu inhibe eder. Yani bu faz yeni ürün oluşmadığı, reaksiyonların durduğu fazdır (Wong ve Medrano, 2005)



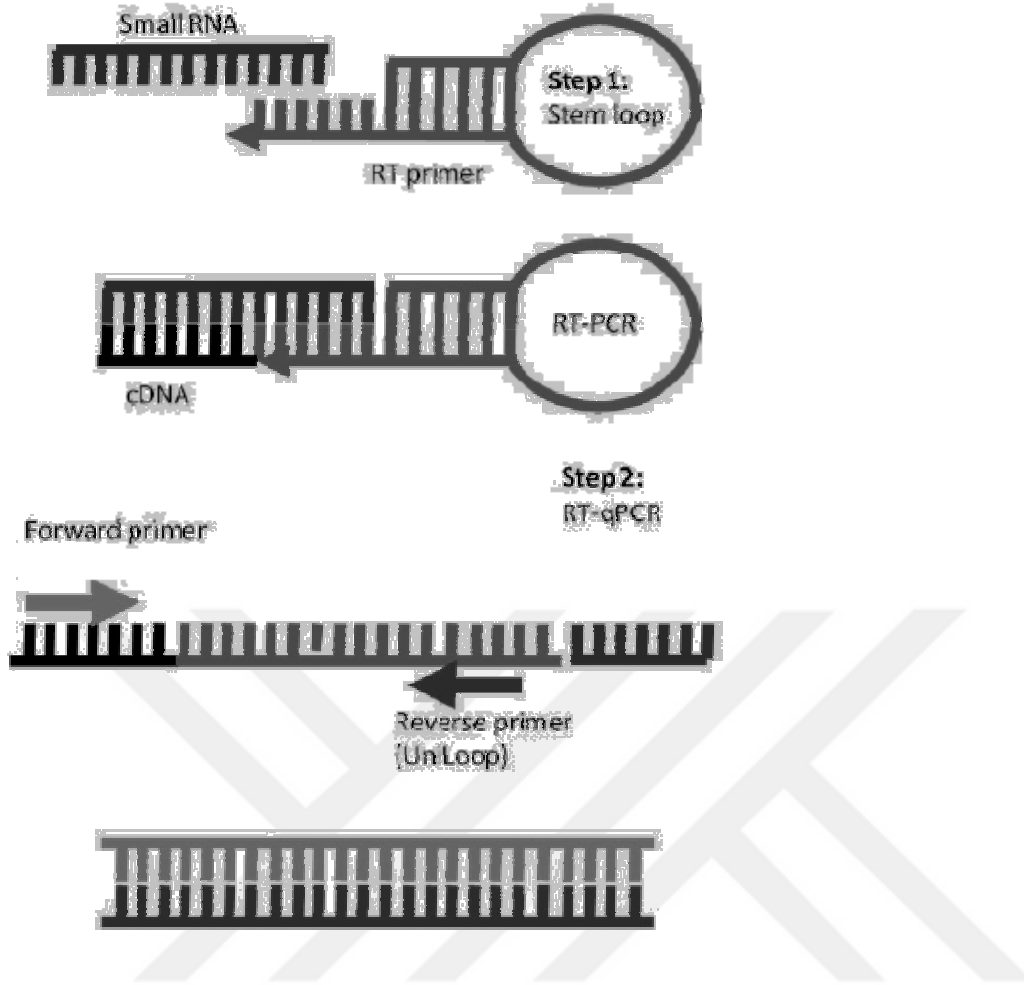
Şekil 6: RT-PZR işlemindeki fazlar

Tez çalışmasına konu olan miR-15, miR-16, miR-29 ve miR-196 moleküllerinin ekspresyon seviyesini ölçmek için Fast Plus EvaGreen qPCR Master Mix kullanıldı. Primerler Sentegen Senteligo tarafından belirlenen mikroRNA'lara spesifik olarak dizayn edilmiştir. İnternal kontrol (housekeeping) olarak U6 kullanıldı. Tablo 6'daki bileşenler son hacim 20 µl olacak şekilde 96'lık plate alındı.

BİLEŞENLER	Hacim
NF WATER	7 µl
MASTER MIX	10 µl
FORWARD PRİMER(10pmol)	0,5 µl
REVERSE PRİMER(10pmol)	0,5 µl
cDNA	2 µl
TOTAL	20 µl

Tablo 6: RT-PZR için gerekli olan bileşenler ve hacimleri

MikroRNA boyut olarak 20-24 nükleotid uzunluğunda olduğu için Forward ve Reverse primerlerinin bu kısa bölgeden seçilmesi çok zordur. Bunun için bu kısa bölgenin uzatılması gerekir. Bu da iki yöntemle gerçekleştirilebilir. İlki genel olarak kullanılan polyA kuyruğunun eklenmesi, diğeri ise stem-loop yapısının eklenmesidir. PolyA kuyruğu eklendiği zaman plazma içerisindeki diğer miRNA'lara da bağlanabilir. Ancak stem-loop primeri ile yaptığımızda diziyeye özgü bölge ile çakıştırdığımız için onun dışındaki herhangi bir miRNA'ya bağlanması söz konusu değildir. Bu çalışmada daha zahmetli ancak daha güvenilir sonuç veren stem-loop yapısını kullanıldı. Öncelikle stem-loop yapısı oluşturuldu. miRbase adlı sitede istediğimiz miRNA'yı yazdığımızda bize uygun bir stem-loop dizisi veriyor. Bu stem-loop yapısının son 6 bazı hedef dizinin son 6 bazı ile eşleşir. Primer uzunlukları 25 bazı üstüne çıkmamasına, kendi üzerine ve birbiri ile eşleşme durumunun en az olmasına dikkat edilir.

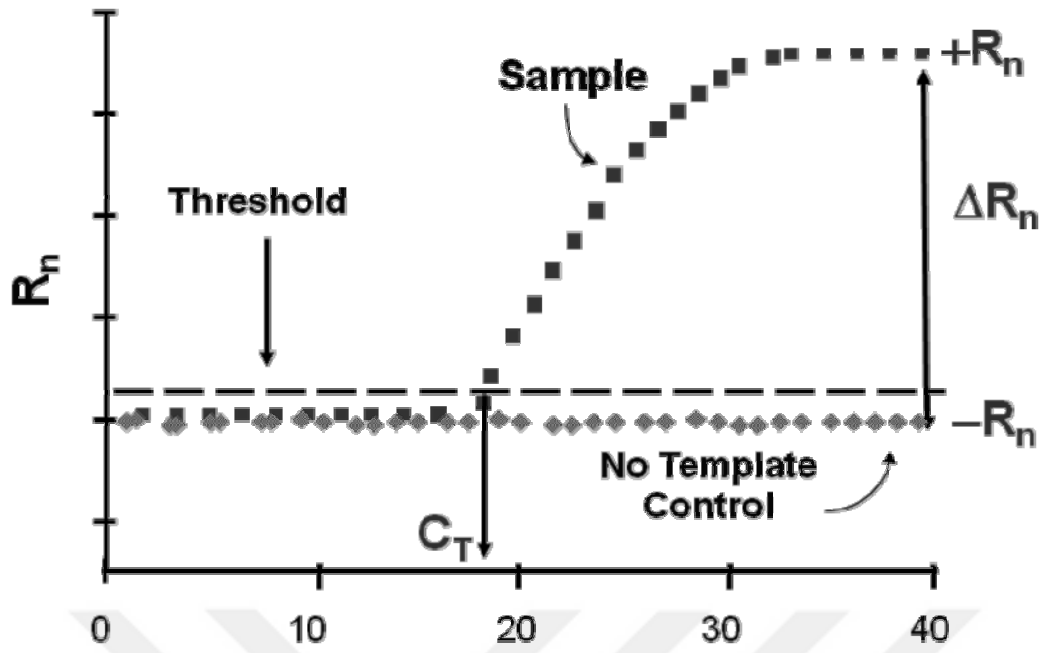


Şekil 7: Stem-loop primer dizisinin oluşumu (Marcial-Quino ve ark. 2016)

HEDEF	İleri Primer Dizisi	Geri Primer Dizisi
miR-15	CAGCTAGCAGCACATAATGGT	AGTGCAGGGTCCGAGG
miR-16	CCAGCCAGTATTA ACTGTGCT	AGTGCAGGGTCCGAGG
miR-29	GAGCGTAGCACCATCTGAAAT	AGTGCAGGGTCCGAGG
miR-196	GGTGGTAGGTAGTTTCCTGTT	AGTGCAGGGTCCGAGG

Tablo 7: Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonunda kullanılan primerler

RT-PZR işleminde en önemli faz oluşumun gözlemlendiği (exponential phase) fazdır. Farklı ürünlerin oluşum serilerinin incelenebilmesi bu fazda olur ve bu fazın oluşumu öncelik olarak başlangıç miktarına bağlıdır. Bütün ürünlerin çoğalma dengesi aynı noktaya geldiğinde karşılaştırmaya başlanabilir. Bu noktaya eşik noktası (threshold point) denir. Eşik noktası oluşum fazındaki kesin okumanın yapıldığı yerdir. Örneklerin karşılaştırıldığı bu faz C_T (Cycle Threshold) olarak gösterilir (slideplayer.com, 2016).



Şekil 8: 1) R_n^+ değeri bütün componentlere bağlıdır. 2) R_n^- değeri taban değeridir. 3) ΔR_n ; R_n^+ ile R_n^- ile arasındaki farktır arasındaki farkın büyüğü elde edilen PZR ürünün miktarının sinyalidir. 4) ΔR_n değerinin ürün oluşum döngü sayısına oranı C_t değerini verir (slideplayer.com, 2016)

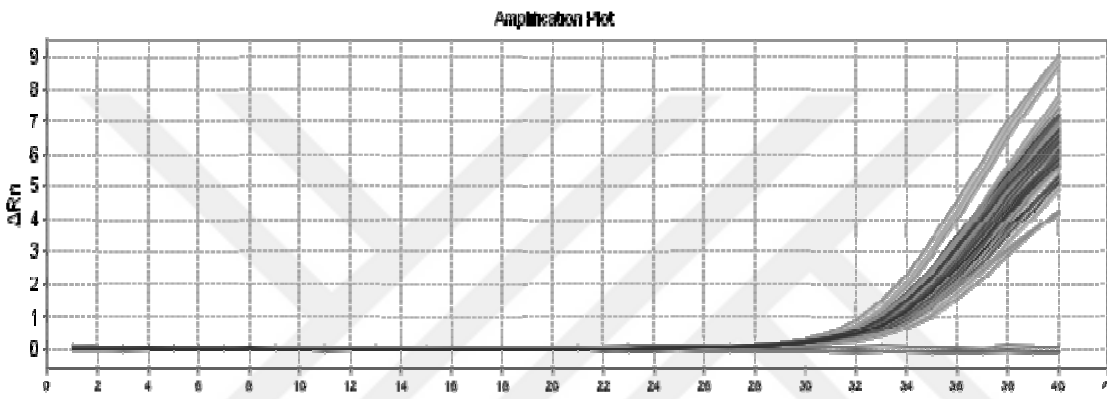
miR-15, miR-16, miR-29 ve miR-196 için Applied Biosystems, Step one plus cihazıyla yapılan PZR protokolü aşağıdaki tabloda verilmiştir.

Sıcaklık	Süre	Döngü Sayısı
95	10 dakika	1X
95	10 saniye	40X
55	30 saniye	

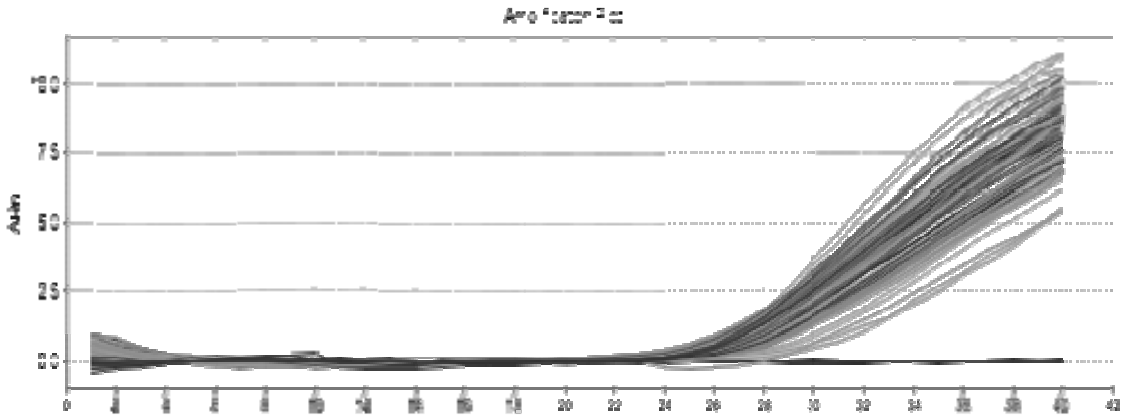
Tablo 8: Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonunda uygulanan protokol

4. BULGULAR:

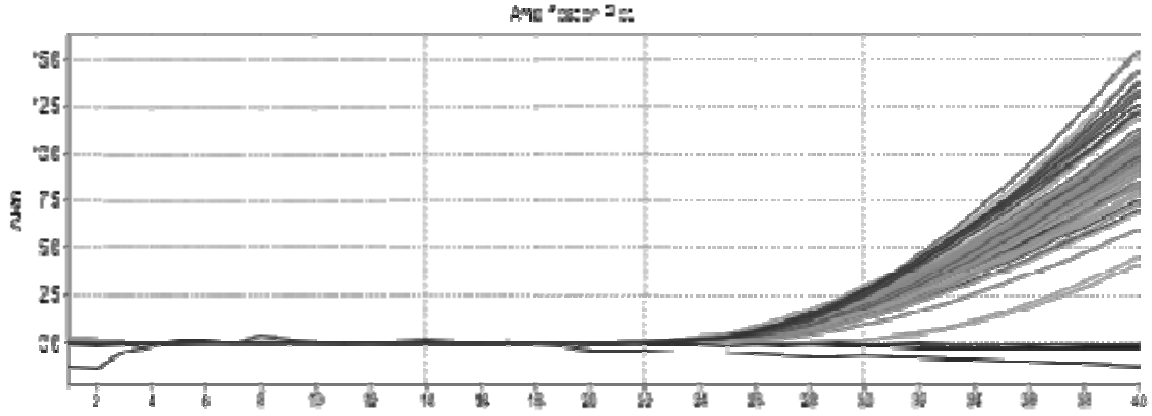
Çalışmaya katılan kişilerin probiyotik kullanmadan önce ve kullandıktan sonraki alınan venöz kanlarından izole edilen ve daha sonra cDNA'ya dönüştürülen miR-15a-5p, miR-16-1-3p, miR-29a-3p ve miR-196b-5p genleri ile U6 referans geninin gerçek zamanlı PZR işlemi sırasında çoğalmaya başladığı, ilk döngü değeri yani C_T değerleri kullanılarak gen anlatım düzeyleri hesaplandı ve bu değerler birbirleriyle karşılaştırıldı. Elde edilen miR-15a-5p, miR-16-1-3p, miR-29a-3p ve miR-196b-5p genlerine ait gerçek zamanlı PZR çoğalma eğrileri şekillerde gösterilmiştir.



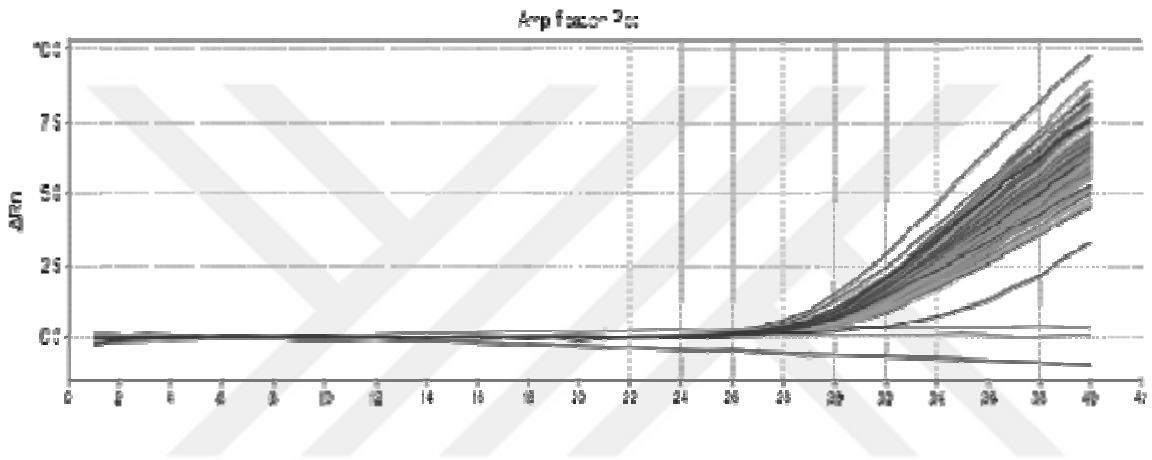
Şekil 9: miR-15a-5p'nin RT-PZR döngü sayısına göre ΔRn değerleri



Grafik 10: miR-16-1-3p'nin RT-PZR döngü sayısına göre ΔRn değerleri



Şekil 11: miR-29a-3p'nin RT-PZR döngü sayısına göre ΔRn değerleri



Şekil 12: miR-196b-5p'nin RT-PZR döngü sayısına göre ΔRn değerleri

Gerçek zamanlı PZR verilerinin analizi için en yaygın kullanılan metod bağıntılı ölçme yöntemidir. Bu yöntemde hedef genin probiyotik kullanmadan önce ve sonra gruplarındaki sinyaller göz önünde bulundurulur. Deneylerde gen ifadelerindeki göreceli değişikliklerin analizinde $2^{-\Delta\Delta C_t}$ metodu kullanılır. Hedef genlerimiz olan miR-15a, miR-16-1, miR-29a, miR-196b ve referans genimiz için C_T değerlerini belirleyerek aşağıdaki formül ile genlerin ifade düzeylerindeki artış veya eksilme oranları belirlenir.

$$\Delta C_T = C_{T(\text{HEDEF})} - C_{T(\text{REFERANS})}$$

ΔC_T ; hedef ve referans genler için belirlenen thresholdcycle (C_T) yani döngü sayısı farkını ifade etmektedir. Pratik olarak baseline floresans sinyallerinin 10X standart sapma değeri threshold olarak kabul edilir ve 35X'ten büyük C_T kullanılması uygun değildir.

$$\Delta\Delta C_T = (C_{T(\text{hedef})} - C_{T(\text{referans})})_{\text{SONRA}} - (C_{T(\text{hedef})} - C_{T(\text{referans})})_{\text{ÖNCE}}$$

$$2^{-\Delta\Delta C_T} = \text{Ürün miktarı oranı}$$

Probiyotik kullanmadan önceki ve sonraki guplara ait örneklerin hem housekeeping gen U6 için hem de hedef genler miR-15, miR-16, miR-29, miR-196 için C_T , ΔC_T , $\Delta\Delta C_T$ ve $2^{-\Delta\Delta C_T}$ değerleri sırasıyla tablolarda gösterilmiştir. Düşük ΔC_T , daha yüksek miRNA seviyesini ve yüksek ΔC_T daha düşük miRNA seviyesini temsil eder (Liang ve ark. 2014).

İstatiksel değerlendirmeler ise t-testi ile yapılmıştır. miR-15, miR-16, miR-29, miR-196 ekspresyon seviyelerindeki kat oranı değeri >1.5 olarak tespit edilmiştir. T-testi verilerine göre ise miR-15 $p<0.05$, miR-16 $p<0.05$, miR-29 $p<0.05$ ve miR-196 $p>0.05$ bulunmuştur.



No	miR-15a-5p Hedef(Sonra) C _T	miR-15a-5p Hedef(Önce) C _T	miR-15a-5p Referans(Sonra) C _T	miR-15a-5p Referans(Önce) C _T	ΔC_T (Sonra)	ΔC_T (Önce)	$\Delta\Delta C_T$	$2^{-\Delta\Delta C_T}$
1	33,66	33,77	33,4	32,2	0,26	1,57	-1,31	2,48
2	34,63	33,42	36	32,8	-1,37	0,62	-1,99	3,97
3	33,21	33,36	31,33	33,65	1,88	-0,29	2,17	0,22
4	33,57	34,12	32,7	32,42	0,87	1,7	-0,83	1,78
5	33,25	33,45	34,51	32,16	-1,26	1,29	-2,55	5,86
6	33,3	33,59	34,52	32,12	-1,22	1,47	-2,69	6,45
7	33,42	33,78	34,29	33,65	-0,87	0,13	-1	2
8	33,62	34,03	34,19	31,65	-0,57	2,38	-2,95	7,72
9	34,06	33,22	35,21	31,3	-1,15	1,92	-3,07	8,39
10	33,75	33,18	36,12	32,2	-2,37	0,98	-3,35	10,19
11	33,23	33,38	33,19	33,2	0,04	0,18	-0,14	1,1
12	32,99	32,97	34,66	32,4	-1,67	0,57	-2,24	4,72
13	34,36	32,53	34,78	33,51	-0,42	-0,98	0,56	0,68
14	33,48	33,1	34,23	33,67	-0,75	-0,57	-0,18	1,13
15	33,18	34,36	32,46	34,29	0,72	0,07	0,65	0,63
16	33,37	33,55	34,61	34,31	-1,24	-0,76	-0,48	1,39
17	33,32	33,72	34,67	33,37	-1,35	0,35	-1,7	3,25
18	32,7	33,2	34,64	33,38	-1,94	-0,18	-1,76	3,38
19	33,7	33,27	32,8	32,99	0,9	0,88	0,02	0,99
20	33,27	34,46	34,44	33,2	0,83	1,26	-0,43	1,34

Tablo 9: miR-15a-5p'nin C_T, ΔC_T , $\Delta\Delta C_T$ ve $2^{-\Delta\Delta C_T}$ değerleri

NO	miR-16-1-3p Hedef(Sonra) C _T	miR-16-1-3p Hedef(Önce) C _T	miR-16-1-3p Referans(Sonra) C _T	miR-16-1-3p Referans(Önce) C _T	ΔC_T (Sonra)	ΔC_T (Önce)	$\Delta\Delta C_T$	$2^{-\Delta\Delta C_T}$
1	26,6	28,06	33,4	32,2	-6,8	-4,14	-2,66	6,32
2	27,56	28,83	36,	32,8	8,44	-3,97	-4,47	22,16
3	26,52	27,76	31,33	33,65	-4,81	-5,89	1,08	0,47
4	25,74	28,44	32,7	32,42	-6,96	-3,98	-2,98	7,89
5	26,74	28,11	34,51	32,16	-7,77	-4,05	-3,72	13,17
6	26,32	28,34	34,52	32,12	-8,2	-3,78	-4,42	21,41
7	26,81	28,44	34,29	33,65	-7,48	-5,21	-2,27	4,82
8	27,89	28,56	34,19	31,65	-6,3	-3,09	-3,21	9,25
9	27,36	26,96	35,21	31,3	-7,85	-4,34	-3,51	11,39
10	29,78	28,05	36,12	32,2	-6,34	-4,15	-2,19	4,56
11	27,22	31,02	33,19	33,2	-5,97	-2,18	-3,79	13,82
12	26,72	29,31	34,66	32,4	-7,94	-3,09	-4,85	28,84
13	26,45	28,77	34,78	33,51	-8,33	-4,74	-3,59	12,04
14	27,04	26,22	34,23	33,67	-7,19	-7,45	0,26	0,84
15	26,92	27,35	32,46	34,29	-5,54	-6,94	1,4	0,38
16	27,97	26,95	34,61	34,31	-6,64	-7,36	0,72	0,6
17	26,86	26,62	34,67	33,37	-7,81	-6,75	-1,06	2,08
18	27,14	26,31	34,64	33,38	-7,5	-7,07	-0,43	1,34
19	26,89	26,1	32,8	32,39	-5,91	-6,29	0,38	0,76
20	26,62	26,25	32,44	33,2	-5,82	-6,95	1,13	0,45

Tablo 10: miR-16-1-3p'nin C_t, ΔC_t , $\Delta\Delta C_t$ ve $2^{-\Delta\Delta C_t}$ değerleri

NO	miR-29a-3p Hedef(Sonra) C _T	miR-29a-3p Hedef(Önce) C _T	miR-29a-3p Referans(Sonra) C _T	miR-29a-3p Referans(Önce) C _T	ΔC_T (Sonra)	ΔC_T (Önce)	$\Delta\Delta C_T$	$2^{-\Delta\Delta C_T}$
1	26,6	26,34	33,4	32,2	-6,8	-5,86	-0,94	1,91
2	27,81	26,58	36,	32,8	-8,19	-6,22	-1,97	3,91
3	26,54	27,47	31,33	33,65	-4,79	-6,18	-1,39	0,38
4	26,47	27,85	32,7	32,42	-6,23	-4,57	-1,66	3,16
5	26,7	28,06	34,51	32,16	-7,81	-4,1	-3,71	13,08
6	27,45	27,13	34,52	32,12	-7,07	-4,99	-2,08	4,22
7	27,41	27,18	34,29	33,65	-6,88	-6,47	-0,41	1,32
8	27,27	27,53	34,19	31,65	-7,19	-4,12	-3,07	8,39
9	27,38	26,5	35,21	31,3	-7,83	-4,8	-3,03	8,16
10	27,53	26,49	36,12	32,2	-8,59	-5,71	-2,88	7,36
11	27,11	32,8	33,19	33,2	-6,08	-0,4	-5,68	51,27
12	26,96	26,72	34,66	32,4	-7,7	-5,68	-2,02	4,05
13	28,8	27,09	34,78	33,51	-5,98	-6,42	0,44	0,74
14	27,72	26,86	34,23	33,67	-6,51	-6,81	0,3	0,81
15	27,33	27,17	32,46	34,29	-5,13	-7,12	1,99	0,25
16	26,32	26,79	34,61	34,31	-8,29	-7,52	-0,77	1,7
17	26,56	26,98	34,67	33,37	-8,11	-6,39	-1,72	3,29
18	26,78	26,51	34,64	33,38	-7,86	-6,87	-0,99	1,98
19	25,8	26,78	32,8	32,99	-7	-5,61	-1,39	2,62
20	26,4	28,6	32,44	33,2	-6,04	-4,6	-1,44	2,71

Tablo 11: miR-29a-3p'nin Ct, ΔC_T , $\Delta\Delta C_T$ ve $2^{-\Delta\Delta C_T}$ değerleri

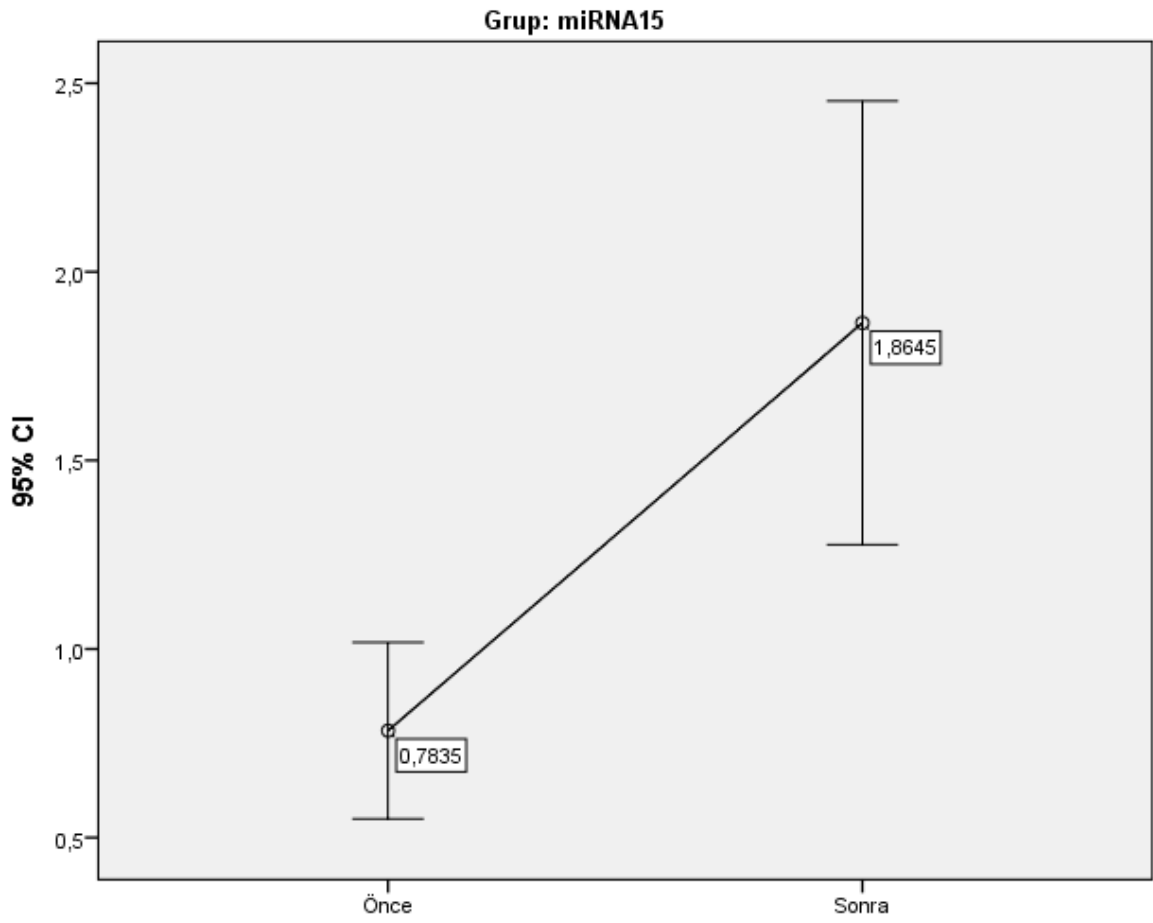
NO	miR-196b-5p Hedef(Sonra) C _T	miR-196b-5p Hedef(Önce) C _T	miR-196b-5p Referans(Sonra) C _T	miR-196b-5p Referans(Önce) C _T	ΔC_T (Sonra)	ΔC_T (Önce)	$\Delta\Delta C_T$	$2^{-\Delta\Delta C_T}$
1	30,48	29,57	33,4	32,2	-2,92	-2,63	-0,29	1,22
2	30,96	29,62	36,	32,8	-5,04	-3,18	-1,86	3,63
3	31,6	30,	31,33	33,65	0,27	-3,65	3,92	0,06
4	30,5	30,66	32,7	32,42	-2,2	-1,76	-0,44	1,35
5	30,72	29,83	34,51	32,16	-3,79	-2,33	-1,46	2,75
6	30,6	30,31	34,52	32,12	-3,92	-1,81	-2,11	4,31
7	30,96	30,26	34,29	33,65	-3,33	-3,39	0,06	0,96
8	31,13	28,83	34,19	31,65	-3,06	-2,82	-0,24	1,18
9	30,17	30,13	35,21	31,3	-5,04	-1,17	-3,87	14,62
10	31,34	30,34	36,12	32,2	-4,78	-1,86	-2,92	7,56
11	31,02	30,78	33,19	33,2	-2,17	-2,42	0,25	0,84
12	31,44	30,74	34,66	32,4	-3,22	-1,66	-1,56	2,94
13	31,38	30,38	34,78	33,51	-3,4	-3,13	-0,27	1,2
14	31,52	29,86	34,23	33,67	-2,71	-3,81	1,1	0,46
15	31,12	30,65	32,46	34,29	-1,34	-3,64	2,3	0,2
16	30,4	29,67	34,61	34,31	-4,21	-4,64	0,43	0,74
17	30,02	29,99	34,67	33,37	-4,65	-3,38	-1,27	2,41
18	30,82	29,76	34,64	33,38	-3,82	-3,62	-0,2	1,14
19	31,33	30,31	32,8	32,39	-1,47	-2,08	0,61	0,65
20	31,68	30,45	32,44	33,2	-0,76	-2,75	1,99	0,25

Tablo 12: miR- 196b-5p' nin C_T, ΔC_T , $\Delta\Delta C_T$ ve $2^{-\Delta\Delta C_T}$ değerleri

4.1.İstatistiksel Sonuçlar

4.1.1. Grup 1: miR-15

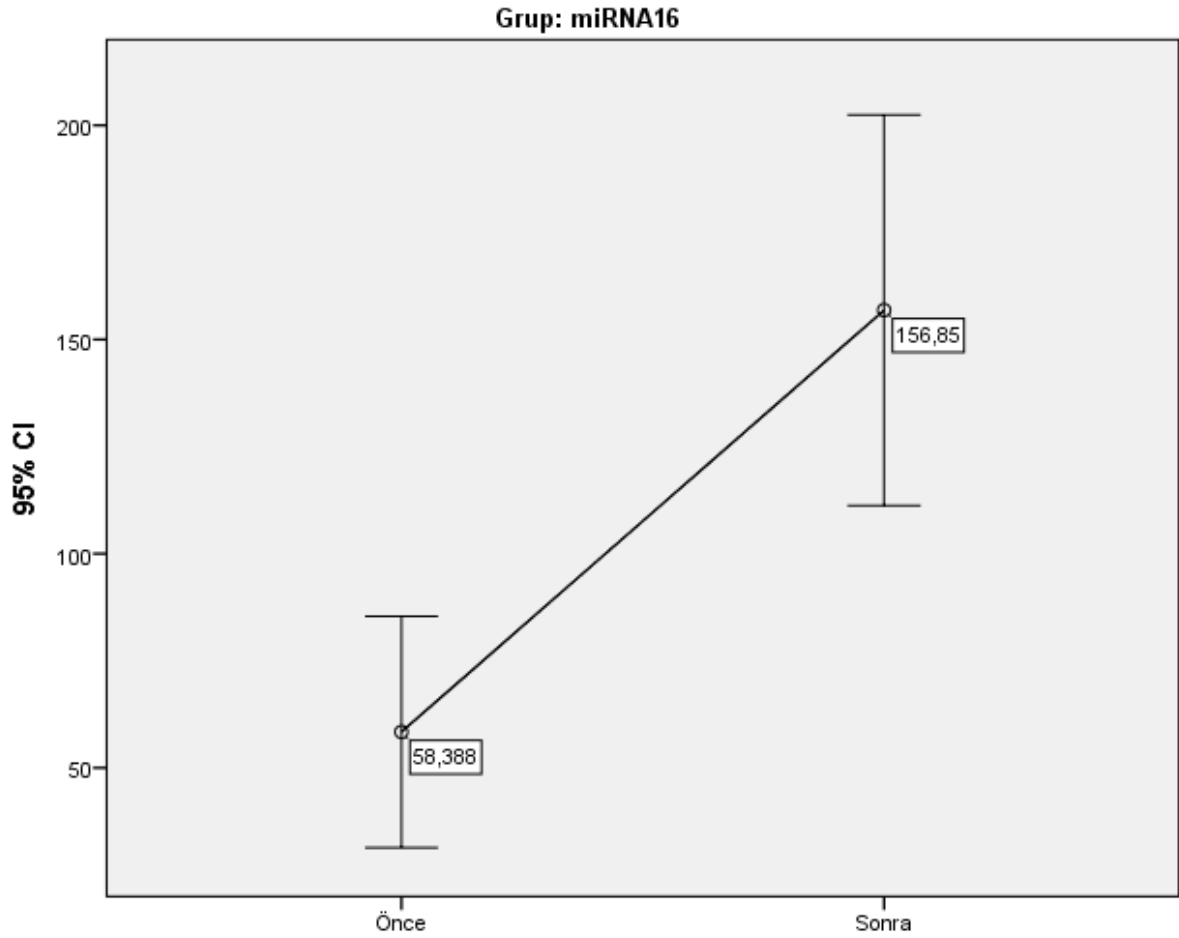
miR-15			
	Geçerli N	Ortalama	Standart sapma
Önce	20	0,7835	0,49954
Sonra	20	1,8645	1,25686



Grafik 1: miR-15'in ortalaması ve standart sapması ($p < 0.05$)

4.1.2. Grup 2: miR-16

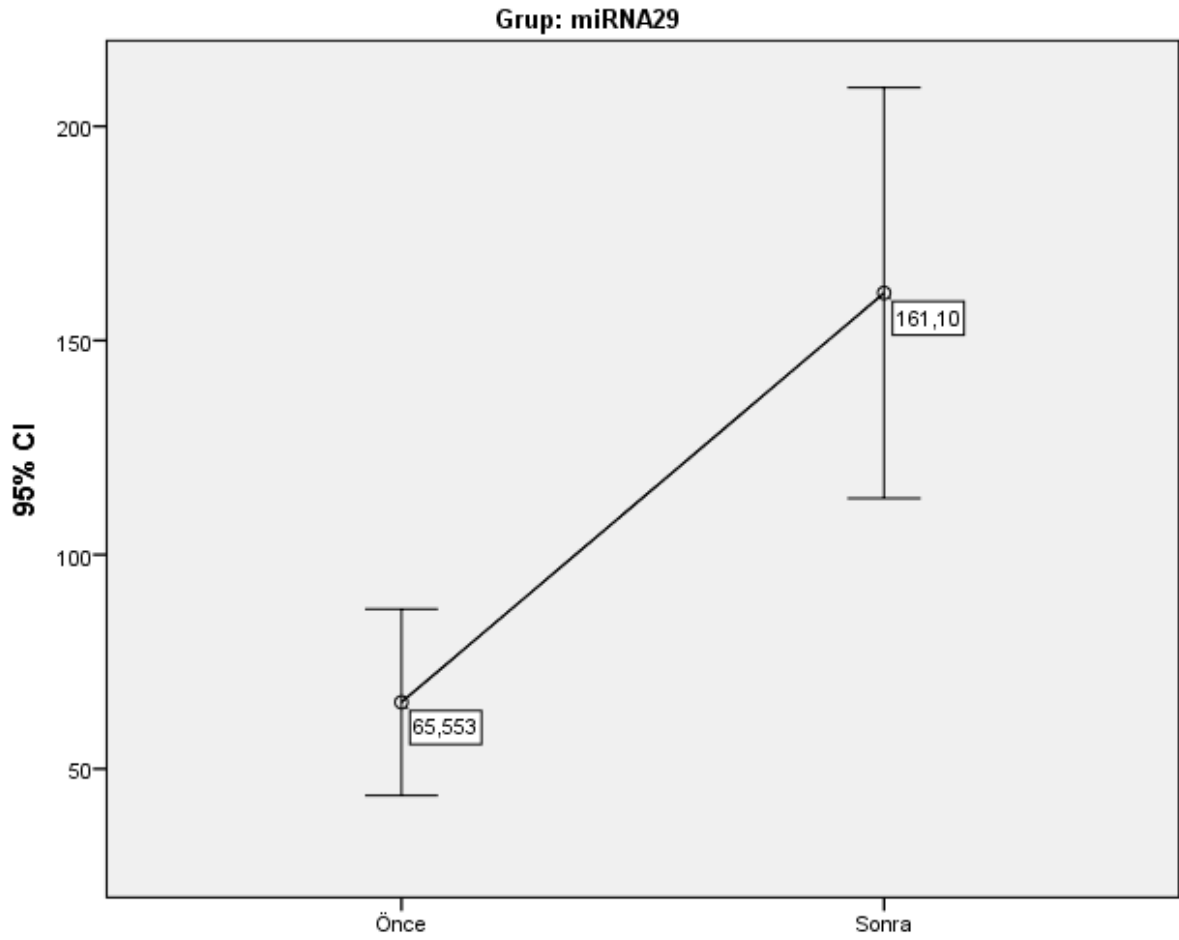
miR-16			
	Geçerli N	Ortalama	Standart sapma
Önce	20	58,3880	57,70180
Sonra	20	156,8520	97,44461



Grafik 2: miR-16'nin ortalaması ve standart sapması ($p < 0.05$)

4.1.3. Grup 3: miR-29

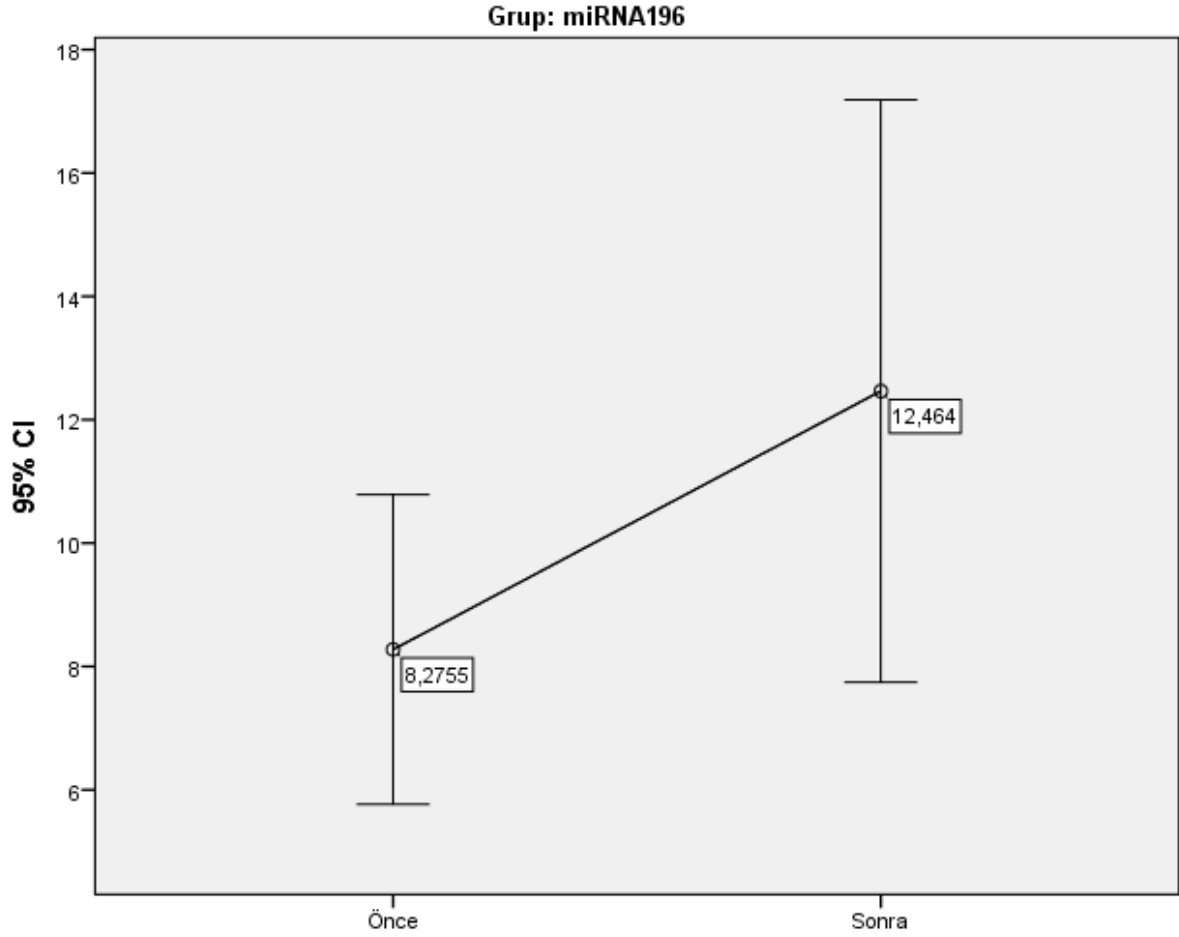
miR-29			
	Geçerli N	Ortalama	Standart sapma
Önce	20	65,5530	46,49326
Sonra	20	161,0960	102,40566



Grafik 3: miR-29'un ortalaması ve standart sapması ($p < 0.05$)

4.1.4. Grup 4: miR-196

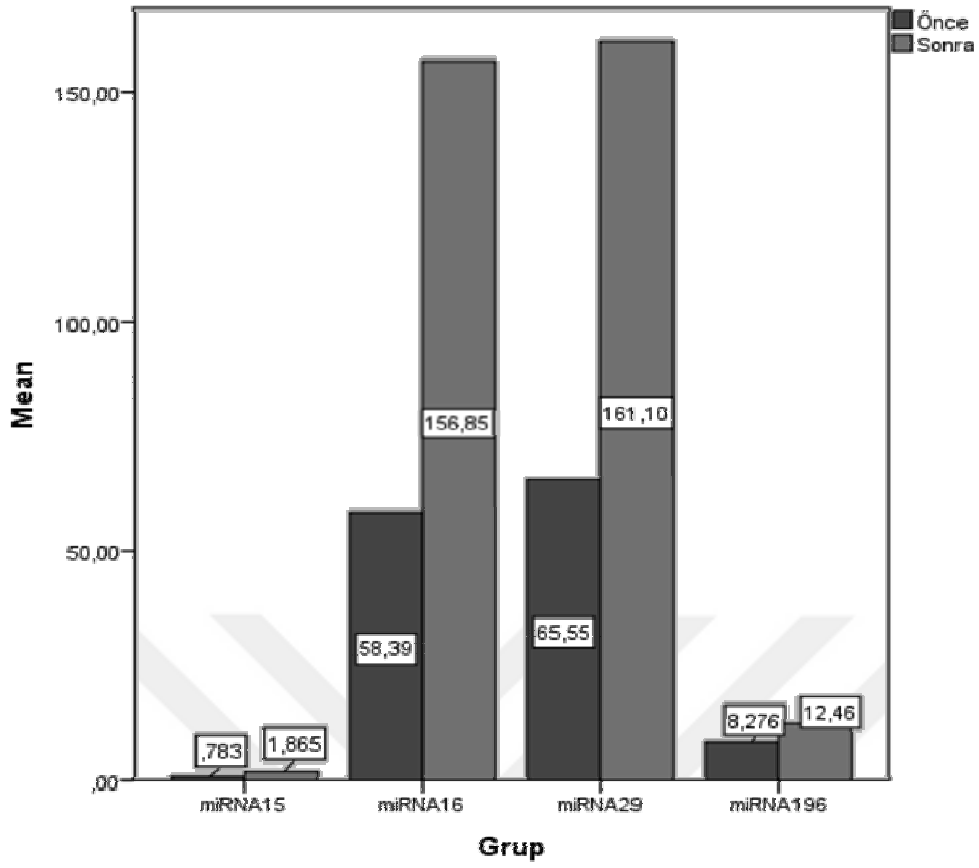
miR-196			
	Geçerli N	Ortalama	Standart sapma
Önce	20	8,2755	5,36613
Sonra	20	12,4640	10,08787



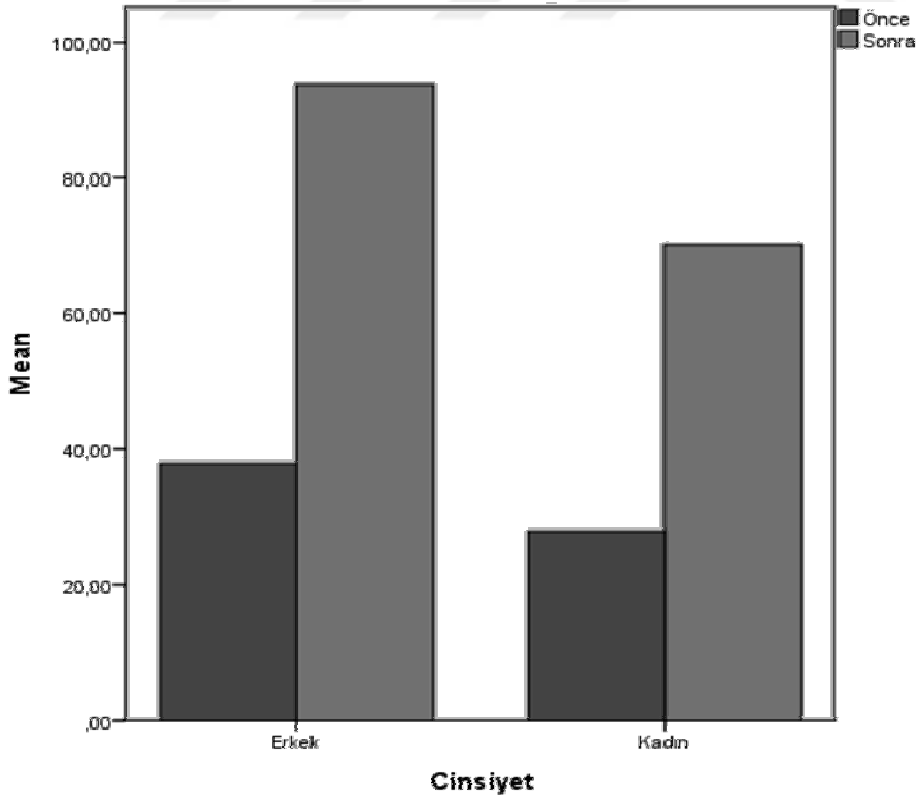
Grafik 4: miR-196'nın ortalaması ve standart sapması ($p>0.05$)

			GRUPLAR		
			Kat artışı	Önce	Sonra
miR-15	KADIN	Geçerli N	9	9	9
		Ortalama	0,8144	0,7556	1,6567
		Standart sapma	1,76095	0,54763	1,63611
	ERKEK	Geçerli N	11	11	11
		Ortalama	1,4491	0,8064	2,0345
		Standart sapma	1,16170	0,48262	0,88840
TOTAL		Geçerli N	20	20	20
		Ortalama	1,1635	0,7835	1,8645
		Standart sapma	1,45633	0,49954	1,25686
miR-16	KADIN	Geçerli N	9	9	9
		Ortalama	1,8200	45,4089	137,0722
		Standart sapma	2,38728	46,44690	101,87308
	ERKEK	Geçerli N	11	11	11
		Ortalama	1,9818	69,0073	173,0355
		Standart sapma	2,01231	65,76121	95,38684
TOTAL		Geçerli N	20	20	20
		Ortalama	1,9090	58,3880	156,8520
		Standart sapma	2,13019	57,70180	97,44461
miR-29	KADIN	Geçerli N	9	9	9
		Ortalama	0,9811	58,2311	132,8656
		Standart sapma	1,91293	38,09276	118,09051
	ERKEK	Geçerli N	11	11	11
		Ortalama	1,8918	71,5436	184,1936
		Standart sapma	1,62568	53,46505	86,39872
TOTAL		Geçerli N	20	20	20
		Ortalama	1,4820	65,5530	161,0960
		Standart sapma	1,77420	46,49326	102,40566
miR-196	KADIN	Geçerli N	9	9	9
		Ortalama	-0,1411	6,8778	8,7100
		Standart sapma	2,17599	3,66395	8,28996
	ERKEK	Geçerli N	11	11	11
		Ortalama	0,6455	9,4191	15,5355
		Standart sapma	1,47816	6,38551	10,73846
TOTAL		Geçerli N	20	20	20
		Ortalama	0,2915	8,2755	12,4640
		Standart sapma	1,81791	5,36613	10,08787

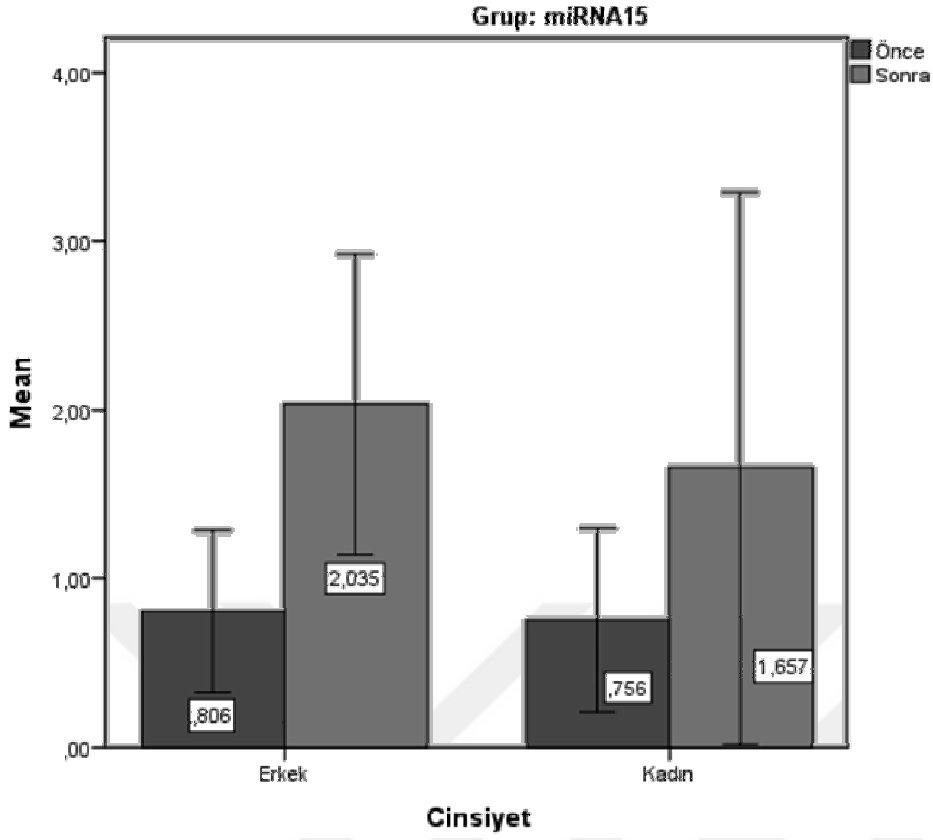
Tablo 13:miR-15, miR-16, miR-29 ve miR-196'nın erkek ve kadınlar arasındaki kat artışı-önce-sonra değerleri



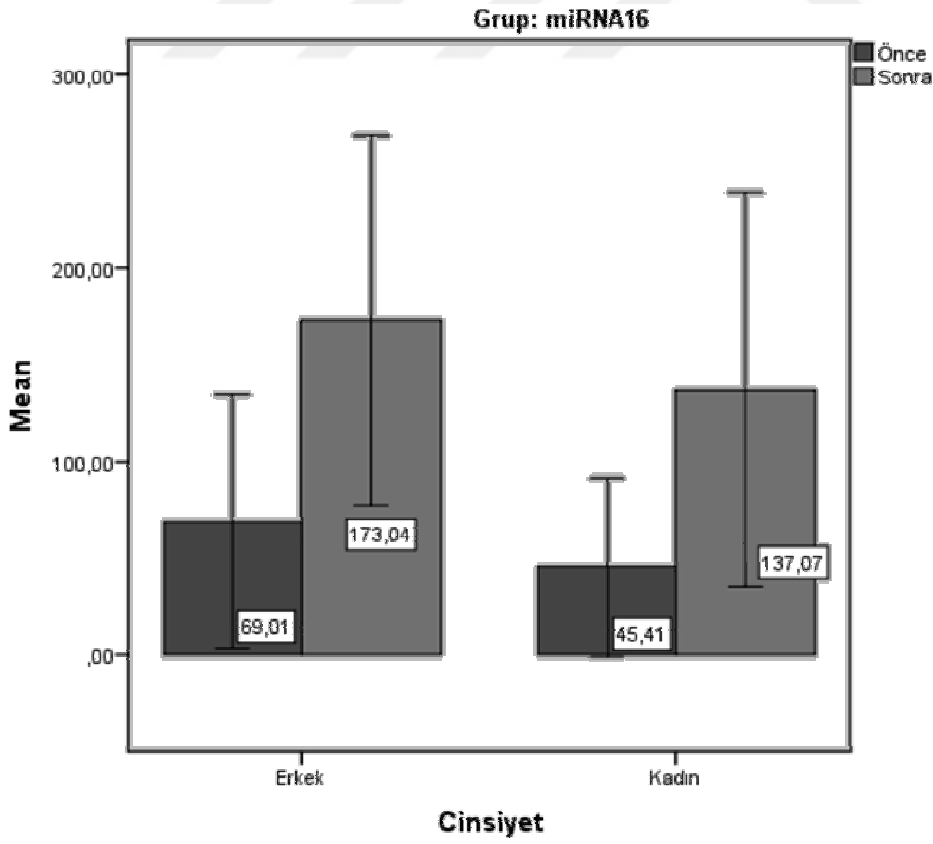
Grafik 5: miR-15, miR-16, miR-29 ve miR-196'nın önce ve sonra ortalama değerleri



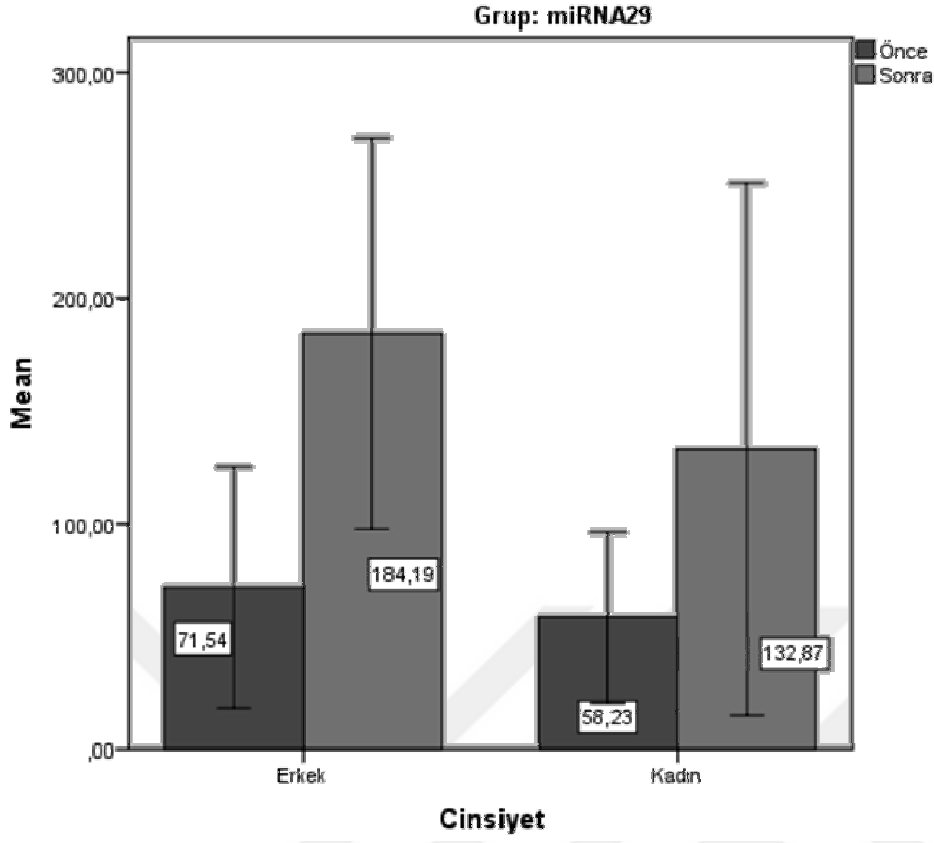
Grafik 6: Tüm hedef miRNA'lar için erkek ve kadın grupları arasındaki önce ve sonra ortalama değerleri



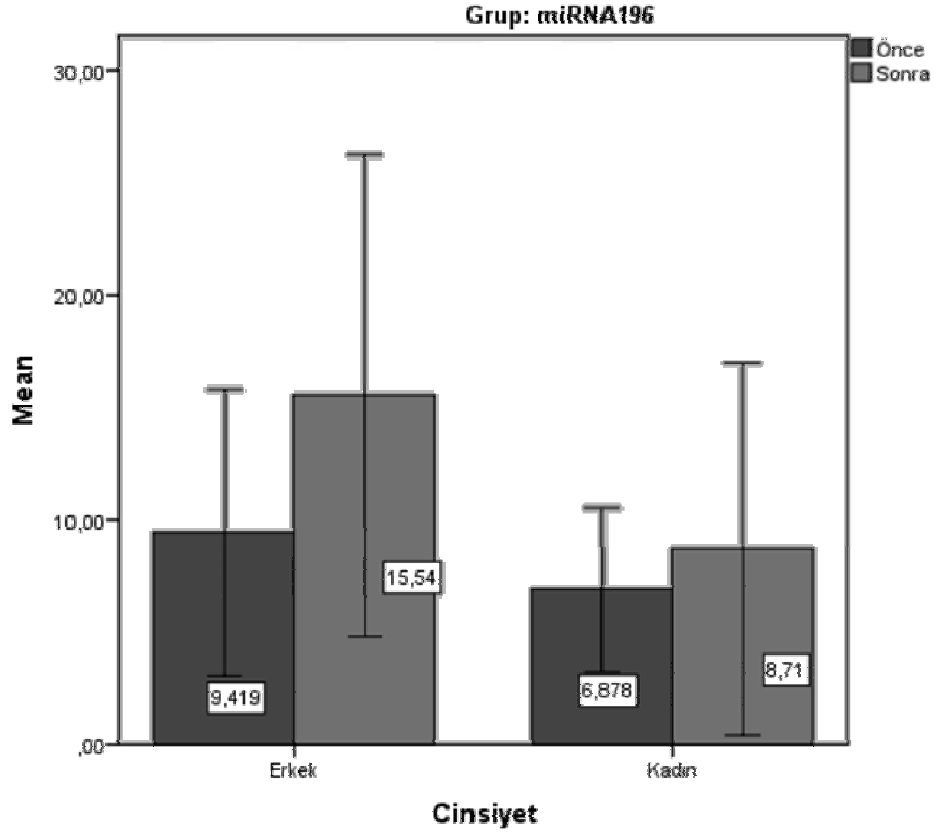
Grafik 7: miR-15'in kadın ve erkek gruplar arasında önce ve sonra değerlerindeki artış ($p>0.05$)



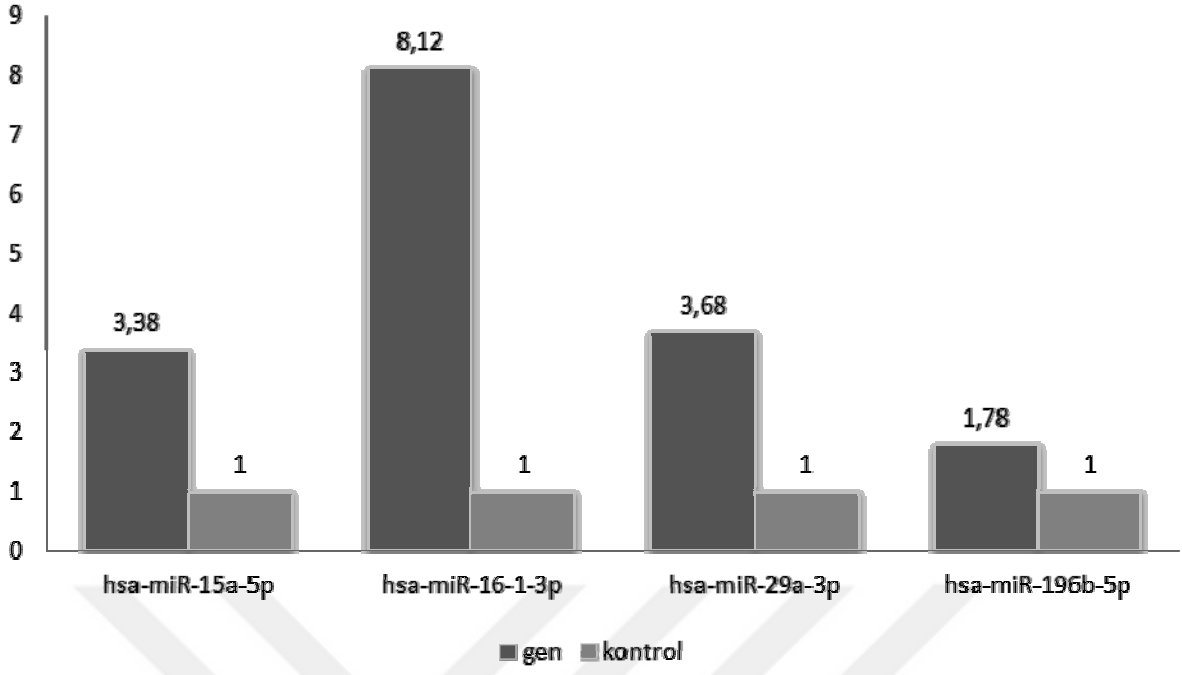
Grafik 8: miR-16'nın kadın ve erkek gruplar arasında önce ve sonra değerlerindeki artış ($p>0.05$)



Grafik 9: miR-29'un kadın ve erkek gruplar arasında önce ve sonra değerlerindeki artış ($p>0.05$)



Grafik 10: miR-196'nın kadın ve erkek gruplar arasında önce ve sonra değerlerindeki artış ($p>0.05$)



Grafik 11: $2^{-\Delta\Delta C_t}$ değeri kullanılarak housekeeping gene göre miRNA hedef gen ekspresyonundaki artış (kat oranı değeri >1.5)

5. TARTIŞMA

Probiyotikler, belirli miktarlarda tüketildiğinde konakçı sağlığı üzerinde olumlu etkilere neden olan mikrobiyal gıda katkıları olarak tanımlanmaktadır. Probiyotiklerin tüketici sağlığı üzerinde yarattığı etkilerin en detaylı şekilde araştırıldığı mikroorganizma grubu laktik asit bakterileridir. Bu çalışmalardan elde edilen veriler; probiyotiklerin kullanımının insanların ve hayvanların sağlıklı beslenmesinde ve mikrobiyel enfeksiyonlardan korunmasında ucuz ve güvenli bir yol olduğuna işaret etmektedir (Kim ve ark. 2006). Günümüzde probiyotik katkılı birçok süt ürününün endüstriyel üretimi gerçekleştirilmektedir. İnsan ve hayvan bağırsak sisteminden izole edilen *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus paracasei* ve *Bifidobacterium* türleri, bu amaçla en yaygın kullanım alanı bulan bakterilerdir. MikroRNA'lar (miRNA'lar) küçük, yaklaşık 22-23 nükleotid uzunluğundaki protein kodlamayan RNA molekülleridir. Normal dokularda düzenli miRNA transkripsiyonu önemlidir çünkü miRNA'lar hedef mRNA'ya bağlanıp protein translasyonunu bloke eder böylece hedef gen ekspresyonunu baskılayarak gelişim, farklılaşma, çoğalma, hücre ölümü gibi süreçlerde rol oynarlar. İlk olarak bazı miRNA'ların bu süreçleri tek bir hedef geni baskılayarak düzenledikleri belirlenmiş olsa da zamanla birçok miRNA'nın tek başına birden fazla hedef geni baskılayabildiği anlaşılmıştır (Selbach ve ark. 2008; Baek ve ark. 2008).

Başta kanser olmak üzere çeşitli hastalıklarda miR-15, miR-16, miR-29 ve miR-196'nın ekspresyon seviyelerinin çok düşük veya hiç olmadığı pek çok çalışmayla gösterilmiştir. Her ne kadar miRNA'ların çeşitli hastalıklardaki rolü geniş ölçüde belirlenmiş olsa da insan vücudundaki en geniş canlı popülasyonuna sahip olan bağırsakta bulunan yararlı bakterilerin kan gibi vücut sıvılarındaki miRNA'ların üzerindeki etkisine dair yeterli çalışmalar mevcut değildir. Bu sebeple yaptığımız bu çalışma için literatür araştırmalarında benzer bir çalışmaya rastlanmamıştır. Mevcut çalışmamız probiyotiklerin ve miRNA'ların arasındaki etki mekanizmasına dair yapılan ilk çalışmadır. Özgün değeri yüksek bu araştırma için tespit ettiğimiz miRNA'lar ile ilgili literatür çalışmaları aşağıda sunulmuştur.

Liang ve ark. 2014'te yaptıkları çalışmada erken yaşları boyunca gastrointestinal sistem (GIS) gelişiminde miRNA'ların potansiyel düzenleyici rolünü araştırmayı amaçla, inek buzağularının doğduktan 7 gün, 21 gün, 30 gün ve 42 gün sonra rumen ve ince bağırsak (orta jejunum ve ileum) doku örneklerini kullanmışlardır. MiR-15, miR-16, miR-29 ve miR-196'nın ekspresyon seviyelerini, *Bifidobacterium* veya *Lactobacillus* türlerinin 16S rRNA geninin kopya sayılarıyla pozitif yönde ilişkili bulmuşlardır. Sağlıklı bireylerde yaptığımız çalışmayla biz de

saşe olarak satılan probiyotik gıda takviyesi kullanımıyla plazmada miR-15, miR-16, miR-29 ve miR-196'nın ekspresyon seviyelerini arttığı sonucuna ulaştık.

CD4+ regülatör T hücreleri (Treg'ler) immün yanıtları kontrol etmek ve otoimmüniteyi önlemek için gereklidir. Gelişmeleri için, miRNA'lar tarafından gen ekspresyonu düzenlenmelidir. Treg gelişiminde miRNA fonksiyonunu anlamak için, Yogesh ve ark. 2015 yılında yaptıkları çalışmayla önemli miRNA'ları ve ilgili hedef genlerini araştırmışlardır. Treg'lerde daha fazla miktarda eksprese edilen miRNA'lardan sadece miR-15b/16, miR-24 ve miR-29, Treg'lerin in vitro indüksiyonunu overekspresyon ve bloke etme deneylerinden etkilediğini ortaya çıkarmışlardır. miRNA mimikleri bunlar için iTreg'lerin indüksiyonunu Dicer-/- CD4+ T hücrelerinde belirli şekilde arttırmıştır. Ayrıca miR-15b/16'nın over-ekspresyonu Rag2-/- farelerine aktarılmış konvansiyonel CD4+ T hücrelerinde periferik Treglerin in vivo gelişimini arttırmış ve otoimmün kolit şiddetini azaltmıştır. MiR-15b/16 hedefleri için yaptıkları deneyler esnasında rapamisin (mTOR) sinyal yolağının memeli hedefini Dicer-/- CD4+ T hücrelerinde arttırdığını ve farmakolojik inhibisyonunun iTreg'lerin indüksiyonunu iyileştirdiğini gözlemlemişlerdir. mTOR sinyalinin baskılanması naif CD4 + T hücrelerinden iTreg'lerin indüksiyonu için gerekli olduğu ve mTORC2 bileşeni olan Rictor, miR-15b/16 için fonksiyonel bir hedef yeri içerdiği vurgulanmıştır. Rictor, mTOR'da olduğu gibi Dicer-/- T hücrelerinde daha fazla eksprese edilmiş ve bunların ekspresyonu, miR-15b/16'nın aşırı ekspresyonu tarafından downregüle edilmiştir. Yaptığımız çalışmayla miR-15, miR-16 ve miR-29'un ekspresyon seviyeleri probiyotik kullanımıyla artmıştır. Böylece probiyotiklerin immüniteyi kontrol eden Treg'lere mTOR ve rictor yolaklarını baskılayan miR-15, miR-16 ve miR-29 üzerinden etki edebileceği kanısına varılmıştır.

Anke ve ark. 2014'te kalbin yeniden yapılanmasındaki miR-15 ailesindeki artışının, TGFβ aktivitesini sınırlamak için feedback mekanizmasının bir parçası olduğuna dair bir çalışma yapmışlardır. MiR-15b'nin inhibisyonu ve over-ekspresyonundan sonra kültürlü kardiyomiyositlerde ve fibroblastlarda TGFBR1mRNA ve protein ve SMAD3mRNA düzeylerinin düzenlendiğini bulmuşlardır. In vivo olarak, TGFBR1 ve SMAD3, antimiR-15b enjekte edilen farelerde mRNA seviyesinde belirgin şekilde upregüle edildiği gösterilmiştir. Çalışmalar, TGFβ-yolağının birkaç geninin miR-15 ailesinin doğrudan hedefi olduğunu söylemektedir. Çoklu TGFβ yolağı genlerinin ekspresyonunu, kültürlenmiş kardiyak hücrelerde miR-15'in hem knockdown hem de over-ekspresyonu tarafından sıkı bir şekilde düzenlendiği gösterilmiştir. Ayrıca lusiferaz analizi ile bu TGFβ yolağı genlerinin 3'UTR'sinin miR-15 ailesinin üyelerine duyarlı olduğu kanıtlanmıştır. Overloaded kalp; kalp

yetmezliğinin gelişimine katkıda bulunan kardiyomiyosit hipertrofisi ve interstisyel fibroz tarafından yeniden yapılandırılır. TGF β -yolağı tarafından sinyalleşme bu yeniden yapılanma için önemlidir. Overloaded kalpte birden fazla türe bağlı olarak upregüle edildiği bulunan miRNA-15 ailesinin TGF β yolağını TGFBR1 ve p38, SMAD3, SMAD7 ve endoglin de dahil olmak üzere doğrudan veya dolaylı olarak bu yolak içindeki birkaç geni hedefleyerek inhibe ettiğini göstermişlerdir. Transvers aort daralmasına maruz kalmış C57BL/6 farelerde LNA-temelli anti-miRs'nin subkutan enjeksiyonu ile miR-15b'nin inhibisyonu, fibrozisi ve daha az derecede de hipertrofiyi arttırdığı kanıtlanmıştır. miR-15 seviyesi fibrosiz ve hipertrofide azalırken probiyotik kullanımında miR-15 seviyesinin arttığı kanıtlanmıştır.

Başka bir çalışmada Yuanbin ve ark. tarafından 2015'te yaşla ilişkili kataraktlı hastalarda lens epitel hücrelerinde hsa-miR-15a ve hsa-miR-16-1'in ekspresyon düzeylerini incelemek ve bu mikroRNA'ların bu hastalığın patogenezindeki rollerini daha iyi anlamak için yapılmıştır. Çalışmaya 61 ± 8.4 yaş aralığındaki 60 yaşa-bağlı kataraktlı hasta (20 kortikal kataraktlı, 20'si nükleer kataraktlı, 20'si posterior subkapsüler kataraktlı) ve 20 normal kişi dahil edilmiştir. RT-PCR ile lens epitel hücrelerden elde edilen hsa-miR-15a-5p, hsa-miR-15a-3p, hsa-miR-16-1-5p ve hsa-miR-16-1-3p ekspresyonu saptanmıştır. Bu mikroRNA'ların, hedef genlerinin yani Bcl-2 ve Mcl-1'in ekspresyonu da değerlendirilmiştir. Hsa-miR-15a-5p, hsa-miR-15a-3p ve hsa-miR-16-1-5p, normal lens epitel hücrelerinde düşük seviyelerde eksprese edildiği, ancak kortikal, nükleer veya posterior subkapsüler kataraktlı hastaların hücrelerinde anlamlı olarak daha yüksek seviyelerde bulunmuştur ($p < 0.01$). Normal lens epitel hücrelerinde hsa-miR-16-1-3p nispeten yüksek seviyelerde eksprese edildiği, ancak her katarakt grubundaki hastaların hücrelerinde ekspresyon önemli derecede azalmış veya gözlemlenmemiştir ($p < 0.01$). Bcl-2 ve mcl-1 hedef genleri ile ilgili olarak, normal lens epitel hücrelerinde ekspresyon saptanabilirken, kataraktlı hastalarda tiplerine bakılmaksızın düzeyleri anlamlı olarak azalmıştır ($p < 0.01$). Yaşa bağlı kataraktın üç tipinde lens epitel hücrelerinde anti-apoptotik genler Bcl-2 ve Mcl-1'in ekspresyonunu baskılayabilen, hsa-miR-15a-5p, hsa-miR-15a-3p ve hsa-miR-16-1-5p ekspresyonu yükselmiştir böylece apoptoz yoluyla yaşa bağlı katarakt patogenezinin katkıda bulunmuşlardır. Bizim çalışmamızda miR-15 ve miR-16 seviyeleri probiyotik kullanımıyla artmıştır.

2012 yılında yapılan yine bir başka çalışmada Rivas ve ark. aşırı progesterin verilen ve progesteron reseptörü (PR) susturulmuş meme kanseri hücre hatlarında miRNA ifade düzeylerini incelemişlerdir. Daha önce lösemilerde tümör baskılayıcı fonksiyonu olduğu gösterilen miR-16 geninin ekspresyon düzeyine bakılmıştır. Bu çalışmada aşırı progesterin ve

büyüme faktörleri verilen hücre hatlarında miR-16'nın ifade düzeyinin azaldığı bunun da progesteron reseptör vasıtasıyla sinyal indükleyici ve yazılımı aktifleştirici STAT3 ve onkogenik yazılım faktörü c-myc arasında karşılıklı bir etkileşime neden olduğu vurgulanmıştır. miR-16 hedeflerinin araştırılması sonucunda hücre döngüsünün düzenleyicisi siklin E1 geninin 3'UTR bölgesinde korunmuş miR-16 gen bölgesi içerdiği bildirilmiştir ve benzer olan bir moleküler mekanizma ile progestinin miR-16 ifade düzeyini değiştirebileceği savunulmuştur. Progestin, STAT3 ve c-myc'in de etkisiyle siklin E1 ifadesini tetiklemektedir. Sonuç olarak progestin ile artan siklin E1 ifadesini miR-16'nın ekspresyonu engellemektedir. Bu durum siklin E1'in ve dolayısıyla miR-16 geninin meme kanserinde yeni bir hedef olabileceğini göstermektedir. Yapıtığımız çalışma ile probiyotik gıda takviyesi alımının miR-16 geninin ekspresyon seviyesini arttırdığını ortaya çıkarmıştır.

Proto-onkogen c-Myc multipl miyelom patogeneğinde önemli rol oynar ve potansiyel bir ilaç hedefi olarak kabul edilir. Manujendra ve ark. 2016 yılında yayınladıkları makaleyle PRIMA-1Met'in faz I/II klinik denemesinde anti-tümör aktivitesine sahip küçük bir molekül olan PRIMA-1Met için yeni bir mekanizmanın kanıtını sunmaktalar. PRIMA-1Met'in c-Myc'ı baskılayarak ve miRNA-29a'yı upregüle ederek MM (multipl myeloma) hücrelerinde apoptosizi başlattığını göstermişlerdir. Çalışmaları, normal hematopoietik hücelere kıyasla, MM hücre hatları ve hasta primer hücrelerinde miRNA-29a'nın anlamlı olarak daha düşük ekspresyonunu ortaya koymuş, in vitro MM hücrelerinde miRNA-29a'nın zorlanmış ekspresyonu canlılığı inhibe edip apoptozu tetiklediğini göstermiştir. MiRNA-29a, MM hücrelerinde PRIMA-1Met tedavisini takiben upregüle edildiği ve PRIMA-1Met-indüklenmiş etkilerde miRNA-29a'nın olası tümör baskılayıcı olduğunu ortaya çıkarmıştır. Çalışmamız, probiyotik kullanımının miRNA-29a'nın seviyesini arttırıcı etkiye sahip olduğunu keşfetmemize yol açmıştır.

Pankreas Duktal Adenokarsinoması (PDAC) mevcut terapötik yöntemlere olumsuz yanıt veren çok ölümcül bir malignitedir. Jason ve ark. 2016'da yeni terapötik stratejilerin geliştirilmesi amacıyla, pankreatik kanser hücrelerinde miR-29'un downregülasyonu ve miR-29a'ya duyarlı kemoterapötik dirençli pankreatik kanser hücrelerinin gemsitabine karşı aşırı ifadesini, kanser hücresi canlılığını azalttığını ve sitotoksiteyi arttırdığını bulmuşlardır. Dahası, miR-29a otofagozom ve otofaji belirteçleri, LC3B ve p62 birikimi ve otofagosome-lizozom füzyonunda bir azalma ile kanıtlandığı üzere otofaji akışını engellemiştir. Buna ek olarak, miR-29a, sırasıyla, lizozomal fonksiyon ve otofagozom trafiği için kritik olan otofaji proteinleri, TFEB ve ATG9A'nın ekspresyonunu azaltmıştır. TFEB'nin veya ATG9A'nın

knockdownu otofajiyi, miR-29a over-ekspresyonuna benzer şekilde inhibe etmiştir. Yapılan çalışmalarla, miR-29a'nın güçlü bir otofaji inhibitörü olarak işlev gördüğünü, kanser hücrelerini gemesitabine duyarlı hale getirdiğini ve invaziv potansiyellerini azalttığını göstermiştir. Probiyotik-aracılı miR-29a seviyesindeki artış yeni bir terapi olarak miR-29a'nın kullanımı için kanıt sunmuştur.

İnterferon- γ (IFN- γ) intraselüler bakteriyel enfeksiyona karşı bağışıklık tepkimelerinde kritik bir role sahiptir. miRNA'lar doğal ve adaptif bağışıklığın düzenlenmesinde önemlidir. Fakat miRNA'ların direkt olarak IFN- γ 'yı hedefleyip hedeflemediği ve transkripsiyon sonrası IFN- γ üretimini düzenleyip düzenleyemediği bilinmemektedir. Feng ve ark. 2011'de yaptıkları çalışmayla farelerin *Listeria monocytogenes* veya *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guérin (BCG) (-bcg aşısı) ile enfekte edilmesinin, IFN- γ üreten NK hücreler, CD4+ T hücreleri ve CD8+ T hücrelerinde miR-29 ifadesini down-regüle ettiğini göstermişlerdir. Üstelik, miR-29, doğrudan IFN- γ mRNA'sını hedefleyerek IFN γ üretimini bastırmıştır. Endojen miR-29 hedefleri (GS29 fareleri) ile yarışmak için bir 'sünger' hedefinin transjenik ekspresyonu olan fareler geliştirmişlerdir. *L. monocytogenes*-enfekte GS29 farelerinde IFN- γ ve düşük *L. monocytogenes* yüklerinin serum konsantrasyonlarını, batınlarından daha yüksek bulmuşlardır. GS29 fareleri, T yardımcı tip 1 (TH1) yanıtlarını arttırmış ve BCG veya *Mycobacterium tuberculosis* ile enfeksiyona karşı daha fazla dirençli olduğunu göstermişlerdir. Dolayısıyla miR-29, hücre içi patojenlere karşı immün yanıtları IFN- γ 'yi hedef alarak bastırabilir bu da probiyotik alımıyla artmış miR-29 seviyesinin IFN γ 'yı etkilediği ve immüniteyi koruduğu fikrini ortaya çıkarmıştır.

MiRNA'lar onkogeneze katkıda bulunan yolları düzenlerler. Bu nedenle kanserde mikroRNA ekspresyonunun bozulmasına neden olan mekanizmalar çok önemlidir. Olgun mir-29 seviyeleri malign hücrelerde azalır ve bu değişiklik apoptoz direnci de dahil olmak üzere malign fenotipi teşvik eder. Bununla birlikte, miR-29 baskılanmasından sorumlu mekanizma bilinmemektedir. Justin ve ark. 2011 yılındaki çalışmalarında kromozom 7q32'den eksprese olan miR-29'un down-regülasyonunu kolanjiyokarsinom hücreleri kullanarak incelemişlerdir. cDNA uçlarının 5' hızlı amplifikasyonu kullanılarak, bu mikroRNA lokusu için transkripsiyonel başlangıç yeri belirlenmiştir. Hesaplamalı analiz, transkripsiyonel başlatma alanının yanındaki bölgede, iki varsayılan E-box (Myc-bağlama) alanları, bir Gli-bağlama bölgesi ve dört NF- κ B bağlanma yeri bulunduğunu ortaya çıkarmıştır. Kolanjiyokarsinoma hücrelerindeki promotör aktivitesi c-Myc transfeksiyonu ile baskılanmış, diğer hücre tipleri ile uyumlu bulunmuştur. Düzeltilmiş sinyalleri engelleyen

Hedgehog inhibitör cyclopamine ile tedavi; promotör aktivitesini ve olgun miR-29 ekspresyonunu arttırmıştır. Mutajenez analizi ve jel kayma(değişim) verileri, Gli'nin mir-29 promotörüne doğrudan bağlanması ile uyumludur. Son olarak, TLR ligasyonu yoluyla NF-κB sinyalleme aktivasyonu mir-29 ekspresyonunu ve promotör fonksiyonunu da baskılamıştır. Hedgehog aktivasyonu, TLR ve c-Myc sinyalleme kolanjiyositleri TRAIL-indüklenmiş apoptozdan korur. Probiyotik kullanımı mir-29 ekspresyonuna etki ederek, c-Myc'e ilaveten, hedgehog sinyalleme ve inflamuar yollarını bastırabildiği ve probiyotik ve insan malignitelerinin oluşumunu önleyici mekanizmaların arasında bir ilişki olduğu kanısına varılmıştır.

Tümör süpresörü p53 birçok hücrel stres tepkisinin merkezindedir. Seong ve ark. çalışmasında CDC42 ve p85a'yı; p53 yolağındaki miR-29 miRNA'larının kritik hedefleri olarak tanımlamaktadır. PI3K, katalitik altbirim p110 ve düzenleyici altbirim p85a'dan oluşan bir kinazdır. P110, yalnızca p85a'ya bağlandığında dengelenir. Bu nedenle, miR-29 miRNA'ları p85a'yı hedefleyerek PI3K aktivitesini azaltabilmiş ve bu AKT'nin azalmış fosforilasyonu ile sonuçlanmıştır. AKT, p53'e bağlanan ve proteolize etmeyi kolaylaştıran MDM2'yi fosforile ve inaktive ettiğinden, MDM2 fosforilasyonundaki azalma, p53'ün stabilizasyonuna neden olmuştur. Dolayısıyla, miR-29 bir PI3K, AKT ve MDM2 aracılı mekanizma yoluyla p53'ü upregüle etmiştir. Çalışmalarında knockdown CDC42'nin p53 seviyelerini arttırdığını ve CDC42'nin ektopik ekspresyonu, miR-29-indüklenmiş, p53'e bağlı apoptozu kurtardığı gösterilmiştir. Ayrıca P53 aktivitesini modüle eden miRNA'lar için bir taramada, miR-29 ailesi üyelerinin (miR-29a, miR-29b ve miR-29c) p53 düzeylerini upregüle ettiği ve p53'e bağımlı bir şekilde apoptozise neden olduğu bulunmuştur. Dolayısıyla probiyotik bakteri suşlarının p53 aracılı yolağı miR-29 üzerinden etkileyerek apoptozisi indükleyebilir düşüncesi ortaya çıkmıştır.

Tümör hipoksisi, kemorezistansa katkıda bulunan tümör mikro ortamının özelliklerinden biridir. Hipoksi, bir dizi miRNA'nın ekspresyonunu da düzenler. Magali ve ark. 2015'te yaptıkları çalışmada, kemoterapi-indüklenmiş apoptozu karşı direnç gösteren hipoksi altındaki miRNA'lar tarafından aktive/inhibe edilen mekanizmaları anlatmışlardır. MiR-196b hedef mRNA'ları, proteomik analiz, lüsiferaz aktivite analizi, RT-qPCR ve western blot analizi ile belirlemişlerdir. Sonuçlar, hipoksinin, etoposid tarafından indüklenen miR-196b ekspresyonunu downregüle ettiğini göstermiştir. MiR-196b over-ekspresyonu, etoposide-indüklenmiş apoptozu arttırmıştır ve hipoksi altında hücre ölümünün korunmasını tersine çevirdiği gözlenmiştir. Biyoinformatik analizlerle kombine edilen proteomik bir yaklaşımla,

IGF2BP1 miR-196b'nin potansiyel bir hedefi olarak tespit edilmiştir. Aslında, miR-196b over-ekspresyonu, IGF2BP1 RNA ekspresyonunu ve protein seviyesini düşürmüştür. MiR-196b veya IGF2BP1 siRNA tarafından downregüle edilen IGF2BP1 apoptozda artışa ve normal kültür koşullarında hücre yaşayabilirliği ve proliferasyonunda bir azalmaya neden olmuştur. Ancak IGF2BP1 susturma, muhtemelen apoptozun düzenlenmesinde yer alan miR-196b'nin tek hedefi olmadığı için, hipoksi tarafından indüklenen kemorezistans üzerinde değişiklik yapmamıştır.

HOXA9 ve MEIS1, karışık kökenli lösemi (MLL) ile yeniden düzenlenmiş lösemide önemli onkojenik rollere sahiptir. 2012'de Zejuan ve ark. yaptığı çalışmada miR-196b zorlanmış ekspresyonu, Hoxa9/Meis1 ekspresyonunu baskılayarak primer kemik iliği transplantasyonunda MLL-füzyon aracılı lösemogenezini önemli ölçüde geciktirdiği gözlemlenmiştir. Ancak, miR-196b'nin ektopik ekspresyonu, daha agresif lösemi fenotiplerine neden olmuştur bu da büyük olasılıkla, MLL ile yeniden düzenlenmiş lösemide downregüle edilen bir proapoptotik gen olan Fas ifadesinin daha fazla bastırılması yoluyla meydana gelmiştir. FAS'ın aşırı ekspresyonu, lösemogenezini önemli derecede inhibe etmiştir ve miR-196b aracılı fenotipleri tersine çevirmiştir. Hoxa9/Meis1 ve Fas'ın miR-196b tarafından hedeflenmesi muhtemelen normal hematopoez için de önemlidir. miR-196-Fas ilişkisi probiyotik-miR-196 ilişkisinin tam tersine bir mekanizmaya sahiptir.

Önceki çalışmalarda, hem EB-3 hücrelerinde hem de B hücreli ALL (akut lenfoblastik lösemi) hastalarında, kendi kontrolleri ile karşılaştırıldığında, miR-196b'nin önemli derecede down-regüle edildiği ortaya koyulmuştur. 2011'de Suman ve ark. yaptıkları çalışma ile EB-3 hücrelerindeki miR-196b restorasyonunun, c-myc ve efektör genlerinin yani insan telomeraz ters transkriptaz (hTERT), B-hücreli lenfoma/lösemi-2 (Bcl-2), apoptoz antagonize edici transkripsiyon faktörü (AATF) gibi, önemli ölçüde down-regülasyonuna yol açtığını ve B-hücreli ALL'de tümör baskılayıcı fonksiyona uygun olduğunu kanıtlamışlardır. Çalışmalarını, T-hücreli ALL hücre hatları ve hasta örneklerinde ALL'nin karakteristik genetik translokasyonlarına katılan genomik bölgelerin yakınında/içinde bulunan miR-196b ve diğer miRNA'ların rolünü incelemek amacıyla yapmışlardır. MOLT-4 ve T-hücreli ALL hastalarında, ilgili kontrol hücrelerine göre miR-196b ekspresyonunda anlamlı down-regülasyonunu göstermişlerdir. İlginç bir şekilde, miR-196b'nin, c-myc geninin hedef 3'-çevrilmemiş bölgedeki (3'-UTR) mutasyonların bir sonucu olarak T-hücreli ALL'de c-myc geninin ekspresyonunu azaltma kabiliyetini kaybettiği bulunmuştur. Sonuç olarak miR-196b, c-myc geninin 3'UTR'sindeki mutasyonların bir sonucu olarak T-hücreli ALL'de işlevsiz hale

gelmiştir. Bizim yaptığımız çalışmayla miR-196b'nin ekspresyon seviyelerini probiyotik kullanımıyla artırılabilir sonucuna varılmıştır.



6. SONUÇ VE ÖNERİLER

- 1) Bu çalışmayla saşe olarak satılan probiyotiklerin sağlıklı ve 18-65 yaş aralığındaki kişilerde hedeflediğimiz miR-15, miR-16, miR-29 ve miR-196 üzerinde ekspresyonu arttırıcı bir etkisi olduğu bulundu.
- 2) Elde edilen sonuçlar bağırsaktaki probiyotik bakterilerin dolaşımında bulunan kan hücrelerindeki miRNA seviyelerine etki ettiği ortaya çıkmıştır. Bu etki mekanizması arasındaki ilişki başka vücut sıvılarında nasıl gerçekleştiğine dair daha ileriki çalışmaların yapılması önerilmektedir.
- 3) Gıda takviyesi olarak kullanılan probiyotikler her yaş için uygun olsa da geriatric olan veya lösemi gibi hastalığa sahip olan kişilerde daha dikkatli kullanılması gerektiğini düşünmekteyiz.
- 4) Probiyotiğin sağlık üzerine etkilerini başka bir hedef kitle ve farklı miRNA ölçümlerindeki değerlendirmelerle araştırmak tedavi yaklaşımlarına yeni bir bakış açısı sağlayabileceği görüşündeyiz.

7. KAYNAKLAR

- Ahilya N Sawh & Thomas F Duchaine, Turning Dicer on its head, *Nature Structural & Molecular Biology* volume 19 number 4, APRIL 2012
- Anke J. Tijssen, Ingeborg van der Made, Maarten M. van den Hoogenhof, Wino J. Wijnen, Elza D. van Deel, Nina E. de Groot, Sergey Alekseev, Kees Fluiters, Blanche Schroen, Marie-Jose Goumans, Jolanda van der Velden, Dirk J. Duncker, Yigal M. Pinto, Esther E. Creemers. The microRNA-15 family inhibits the TGF β -pathway in the heart, *European Society of Cardiology-2014*.
- Ayhan NY, Soylu M. *Nütrisyonel Genomik-İnsan Yaklaşımı. Türkiye Klinikleri J Nutr Diet-Special Topics* 2015;1(3):25-30
- Babiarz, J. E., Ruby, J. G., Wang, Y., Bartel, D. P. & Blelloch, R. Mouse ES cells express endogenous shRNAs, siRNAs, and other Microprocessor-independent, Dicer-dependent small RNAs. *Genes Dev.* 22, 2773–2785 (2008).
- Baek D, Villen J, Shin C, Camargo FD, Gygi SP, Bartel DP. The impact of microRNAs on protein output. *Nature* 2008;455(7209):64-71.
- Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell.* 2004;116(2):281–97.
- Baskerville S, Bartel DP. Microarray profiling of microRNAs reveals frequent coexpression with neighboring miRNAs and host genes. *RNA.* 2005;11(3):241–7.
- Basyuk E et al. Human let-7 stem-loop precursors harbor features of RNase III cleavage products. *Nucleic Acids Res.* 2003;31(22):6593–7.
- Belinsky SA (2015) Unmasking the lung cancer epigenome. *Annu Rev Physiol* 77:453–474.
- Bernstein E et al. Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature.* 2001;409(6818):363–6.
- Bhadoria, P.B.S. ve Mahapatra, S.C., 2011. Prospects, technological aspects and limitations of probiotics-A worldwide review. *European Journal of Food Research and Review*, 1(2): 23-42.
- Care A et al. MicroRNA-133 controls cardiac hypertrophy. *Nat Med.* 2007;13(5):613–8.
- Carthew RW, Sontheimer EJ. Origins and Mechanisms of miRNAs and siRNAs. *Cell.* 2009;136(4):642–55.
- Chakraborti CK. The Status of Synbiotics in Colorectal Cancer, *Life Sciences and Medicine Research*, Volume 2011: LSMR-20.
- Chim CS, Wong KY, Leung CY, Chung LP, Hui PK, Chan SY, Yu L (2011) Epigenetic inactivation of the hsa-miR-203 in haematological malignancies. *J Cell Mol Med* 15:2760–2767.
- Conrad C, Rauhut R. Ribonuclease III: new sense from nuisance. *Int J Biochem Cell Biol.* 2002;34(2):116-29.
- Culligan, E.P.; Hill, C.; Sleator, R.D. Probiotics and gastrointestinal disease: Successes, problems and future prospects. *Gut Pathogens*, 2009, 1, 19.
- Czech, B. et al. Hierarchical rules for Argonaute loading in *Drosophila*. *Mol. Cell* 36, 445–456 (2009).
- Dakhlallah D et al (2013) Epigenetic regulation of miR-17–92 contributes to the pathogenesis of pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 187:397–405.
- Daniels SM et al. Characterization of the TRBP domain required for dicer interaction and function in RNA interference. *BMC Mol Biol.* 2009;10:38.
- Davis-Dusenbery, B. N. & Hata, A. Mechanisms of control of microRNA biogenesis. *J. Biochem.* 148, 381–392 (2010).

- de Vrese M, Marteau PR. Probiotics and prebiotics: effects on diarrhea. *J Nutr.* 2007 Mar;137(3 Suppl 2):803S-11S.
- Denli AM et al. Processing of primary microRNAs by the Microprocessor complex. *Nature.* 2004;432(7014):231–5.
- Doridot L, Houry D, Gaillard H, Chelbi ST, Barbaux S, Vaiman D (2014) miR-34a expression, epigenetic regulation, and function in human placental diseases. *Epigenetics* 9:142–151.
- Dsouza, A.L., Rajkumar, C., Cooke, J., Bulpitt, C.J. Probiotics in prevention of antibiotic associated diarrhea: Meta analysis. *BMJ*, 2002, 324(7350), 1361.
- Dudziec E et al (2011) Hypermethylation of CpG islands and shores around specific microRNAs and mirtrons is associated with the phenotype and presence of bladder cancer. *Clin Cancer Res* 17:1287–1296.
- Elkayam, E. et al. The structure of human Argonaute-2 in complex with miR-20a. *Cell* 150, 100–110 (2012).
- Elodie Lages, H_e_l_e_n_e Ipas, Audrey Guttin, Houssam Nesr, Fran_cois Berger, et al.. MicroRNAs: molecular features and role in cancer.. *Frontiers in Bioscience*, *Frontiers in Bioscience*, 2012, 17, pp.2508-40.
- Fabbri M. *Non-coding RNAs and Cancer*, Inc. 2014, Springer USA, New York, p: Chapter 2.
- FAO/WHO (Food and Agriculture Organization/World Health Organization) Cordoba, Nutritional properties of probiotics in food including milk powder with live lactic acid bacteria. http://www.who.int/foodsafety/publications/fs_management/en/probiotics. (Accessed on 2001)
- Filipowicz W. RNAi: the nuts and bolts of the RISC machine. *Cell.* 2005;122(1):17–20.
- Frank, F., Sonenberg, N. & Nagar, B. Structural basis for 5'-nucleotide base-specific recognition of guide RNA by human AGO2. *Nature* 465, 818–822 (2010).
- Functional genomics of tumor suppressor miR-196b in T-cell acute lymphoblastic leukemia. Suman Bhatia, Deepak Kaul, Neelam Varma. *Mol Cell Biochem* -2011.
- Gantier MP, Sadler AJ, Williams BR. Fine-tuning of the innate immune response by microRNAs. *Immunol Cell Biol.* 2007;85(6):458–62.
- Ghildiyal, M., Xu, J., Seitz, H., Weng, Z. & Zamore, P. D. Sorting of Drosophila small silencing RNAs partitions microRNA* strands into the RNA interference pathway. *RNA* 16, 43–56 (2010).
- Giovannini M., Agostoni C., Riva E., Salvini F., Ruscitto A., Zuccotti GV., Radaelli G., A randomized prospective double blind controlled trial on effects of long-term consumption of fermented milk containing *Lactobacillus casei* in pre-school children with allergic asthma and/or rhinitis. *Pediatr. Res.*, 2007, 62, 215-220.
- Greco SJ, Rameshwar P. MicroRNAs regulate synthesis of the neurotransmitter substance P in human mesenchymal stem cell-derived neuronal cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007; 104(39):15484–9.
- Gregory RI et al. Human RISC couples microRNA biogenesis and posttranscriptional gene silencing. *Cell.* 2005;123(4):631–40.
- Gregory RI et al. The Microprocessor complex mediates the genesis of microRNAs. *Nature.* 2004;432(7014):235–40.
- Guo X, Xia J, Yan J (2015) Promoter methylated microRNAs: potential therapeutic targets in gastric cancer. *Mol Med Rep* 11:759–765.
- Gupta, V.; Garg, R. Probiotics. *Indian. J. Med. Microbiol.* 2009, 27(3), 202-209.
- Han J et al. Molecular basis for the recognition of primary microRNAs by the Drosha- DGCR8 complex. *Cell.* 2006;125(5):887–901.
- Hebert SS et al. Loss of microRNA cluster miR-29a/b-1 in sporadic Alzheimer's disease correlates with increased BACE1/beta-secretase expression. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008;105(17):6415–20.

- Hoang, B.X.; Shaw, G.; Pham, P.; Levine, S.A. Lactobacillus rhamnosus cell lysate in the management of resistant childhood atopic eczema. *Inflamm. Allergy Drug Targets*, 2010, 9(3), 192-196.
- Hoesl, C., Altwein J.E., The probiotic approach: An alternative treatment option in urology. *Eur Urol*. 2005, 47(3), 288-296.
- Honda N et al (2013) miR-150 down-regulation contributes to the constitutive type I collagen overexpression in scleroderma dermal fibroblasts via the induction of integrin β 3. *Am J Pathol* 182:206–216.
- Huntzinger, E. & Izaurralde, E. Gene silencing by microRNAs: contributions of translational repression and mRNA decay. *Nature Rev. Genet.* 12, 99–110 (2011).
- Imani Fooladi, A.A., Mousavi, S.F., Seghatoleslami, S., Yazdani, S., Nourani, M.R. Toll-like receptors: Role of inflammation and commensal bacteria. *Inflamm. Allergy Drug Targets*, 2011, 10(3), 198-207.
- Imase K, Takahashi M, Tanaka A, Tokunaga K, Sugano H, Tanaka M, Ishida H, Kamiya S, Takahashi S. Efficacy of Clostridium butyricum preparation concomitantly with Helicobacter pylori eradication therapy in relation to changes in the intestinal microbiota. *Microbiol Immunol*. 2008 Mar;52(3):156-61
- Jaime Marcial-Quino, Saúl Gómez-Manzo, Francisco Fierro, America Vanoye-Carlo, Yadira Rufino-González, Edgar Sierra-Palacios, Adriana Castillo-Villanueva, Rosa Angélica Castillo-Rodríguez, Eduardo Rodríguez-Bustamante, Roberto Arreguin-Espinosa and Horacio Reyes-Vivas. Stem-Loop RT-qPCR as an Efficient Tool for the Detection and Quantification of Small RNAs in Giardia lamblia. *Genes* 7:131,2016.
- Jason J. Kwon, Jeffrey A. Willy, Kayla A. Quirin, Ronald C. Wek, Murray Korc, Xiao-Ming Yin, Janaiah Kota. Novel role of miR-29a in pancreatic cancer autophagy and its therapeutic potential. *Oncotarget*, Vol. 7, No. 44, 2016.
- Jijon, H., Backer, J., Diaz, H., Yeung, H., Thiel, D., McKaigney, C., De Simone, C., Madsen, K. DNA from probiotic bacteria modulates murine and human epithelial and immune function. *Gastroenterology*, 2004, 126, 1358 -1373.
- Jones, K., Ewigman, B., Stevermer, J. Help for recurrent bacterial vaginosis. *J. Fam. Pract.* 2011, 60(2),91 93.
- Jopling CL et al. Modulation of hepatitis C virus RNA abundance by a liver- specific MicroRNA. *Science*. 2005;309(5740):1577–81.
- Justin L. Mott, Satoshi Kurita, Sophie Cazanave, Steven F. Bronk, Nathan W. Werneburg, and Martin E. Fernandez-Zapico. Transcriptional Suppression of mir-29b-1/mir-29a Promoter by c- Myc, Hedgehog, and NF-kappaB. *Cell Biochem*. 2010 August 1; 110(5): 1155–1164.
- Kalliomäki, M.; Antoine, J.M.; Herz, U.; Rijkers, G.T.; Wells, J.M; Mercenier, A. Guidance for substantiating the evidence for beneficial effects of probiotics: prevention and management of allergic diseases by probiotics. *J. Nutri.*, 2010, 140, 713-721.
- Kalliomäki, M.; Salminen, S.; Arvilommi, H.; Kero, P.; Koskinen, P.; Isolauri, E.; Probiotics in primary prevention of atopic disease: a randomised placebo-controlled trial. *Lancet*, 2001, 357, 1076-1079.
- Kawamata, T., Seitz, H. & Tomari, Y. Structural determinants of miRNAs for RISC loading and slicer-independent unwinding. *Nature Struct. Mol. Biol.* 16, 953–960 (2009).
- Kenneth J. Livak and Thomas D. Schmittgen, Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real- Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ Method. *METHODS* 25, 402–408 2001.
- Khvorova, A., Reynolds, A. & Jayasena, S. D. Functional siRNAs and miRNAs exhibit strand bias. *Cell* 115, 209–216 (2003).
- Kim J et al. A MicroRNA feedback circuit in midbrain dopamine neurons. *Science*. 2007;317(5842):1220–4.
- Kim VN. MicroRNA precursors in motion: exportin-5 mediates their nuclear export. *Trends Cell Biol*. 2004;14(4):156–9.

- Kim, V. N., Han, J. & Siomi, M. C. Biogenesis of small RNAs in animals. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 10, 126–139 (2009).
- Knight SW, Bass BL. A role for the RNase III enzyme DCR-1 in RNA interference and germ line development in *Caenorhabditis elegans*. *Science*. 2001;293(5538):2269–71.
- Krol, J., Loedige, I. & Filipowicz, W. The widespread regulation of microRNA biogenesis, function and decay. *Nature Rev. Genet.* 11, 597–610 (2010).
- Kwon C et al. MicroRNA1 influences cardiac differentiation in *Drosophila* and regulates Notch signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005;102(52):18986–91.
- Lagos-Quintana M et al. Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. *Science*. 2001;294(5543):853–8.
- Lata J., Jurankova J., Kopacova M., Vitek P. Probiotics in hepatology. *World. J. Gastroenterol*, 2011, 17(24), 2890-2896.
- Lau NC et al. An abundant class of tiny RNAs with probable regulatory roles in *Caenorhabditis elegans*. *Science*. 2001;294(5543):858–62.
- Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*. 1993;75(5):843–54.
- Lee Y et al. MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *EMBO J.* 2004;23(20):4051–60.
- Lee Y et al. The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature*. 2003;425(6956):415–9.
- Liang G, Malmuthuge N, McFadden TB, Bao H, Griebel PJ, et al. (2014) Potential Regulatory Role of MicroRNAs in the Development of Bovine Gastrointestinal Tract during Early Life. *PLoS ONE* 9:3.
- Lieske J.C., Goldfarb D.S., De Simone C., Regnier C., Use of a probiotic to decrease enteric hyperoxaluria. *Kidney Int.*, 2005.
- Life Sciences and Medicine Research.Chakraborti, C.K. The status of synbiotics in colorectal cancer. <http://astonjournals.com/lsmr> (Accessed January 2011)
- Lin, W.H., Hwang, C.F., Chen, L.W., Tsen, H.Y. Viable counts, characteristic evaluation for commercial lactic acid bacteria products. *Food Microbiol.* 2006, 23(1), 74-81.
- Liong, M.T. Roles of probiotics and prebiotics in colon cancer prevention: Postulated mechanisms and in-vivo evidence. *Int. J. Mol. Sci.* 2008, 9(5), 854-863.
- Liu, Y. et al. C3PO, an endoribonuclease that promotes RNAi by facilitating RISC activation. *Science* 325, 750–753 (2009).
- Lucey, D.R., Clerici, M. ve Shearer, G.M., 1996. Type 1 and type 2 cytokine dysregulation in human infectious, neoplastic, and inflammatory diseases. *Clinical Microbiology Reviews*, 9: 532-562.
- Lund E et al. Nuclear export of microRNA precursors. *Science*. 2004;303(5654):95–8.
- Lye H.S., Kuan C.Y., Ewe J.A., Fung W.Y., Liong M.T. The improvement of hypertension by probiotics: Effects on cholesterol, diabetes, renin, and phytoestrogens. *Int. J. Mol. Sci.* 2009, 10(9), 3755-3775.
- Ma E et al. Autoinhibition of human dicer by its internal helicase domain. *J Mol Biol.* 2008;380(1):237–43.
- Mack, D.R., Michail, S., Wei, S., McDougall, L., Hollingsworth, M.A. Probiotics inhibit enteropathogenic *E. coli* adherence in vitro by inducing intestinal mucin gene expression. *Am. J. Physiol.* 1999, 276, 941-950.
- Macpherson, A.J., Uhr, T. Induction of protective IgA by intestinal dendritic cells carrying commensal bacteria. *Science*, 2004, 303, 1662-1665.

- MacRae IJ et al. In vitro reconstitution of the human RISC-loading complex. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2008;105(2):512–7.
- Malaguarnera M., Gargante M.P., Malaguarnera G., Salmeri M., Mastrojeni S., Rampello L., Pennisi G., Li Volti G., Galvano F., Bifidobacterium combined with fructo-oligosaccharide versus lactulose in the treatment of patients with hepatic encephalopathy. *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.* 2010, 22(2), 199-206.
- Manujendra N. Saha, Jahangir Abdi, Yijun Yang, Hong Chang. miRNA-29a as a tumor suppressor mediates PRIMA-1^{Mct}-induced anti-myeloma activity by targeting c-Myc, *Oncotarget*, Vol. 7, No. 6, 2016.
- Marisa L. Wong and Juan F. Medrano. Real-time PCR for mRNA quantitation, *BioTechniques* 39:75-85 (July 2005).
- Matranga C et al. Passenger-strand cleavage facilitates assembly of siRNA into Ago2-containing RNAi enzyme complexes. *Cell*. 2005;123(4):607–20.
- Mazar J et al (2011) Epigenetic regulation of microRNA genes and the role of miR-34b in cell invasion and motility in human melanoma. *PLoS ONE* 6:e24922.
- Melo SA et al. A genetic defect in exportin-5 traps precursor microRNAs in the nucleus of cancer cells. *Cancer Cell*. 2010;18(4):303–15.
- Metchnikoff, E. Lactic acid as inhibiting intestinal putrefaction in: *The prolongation of life: Optimistic studies*. W. Heinemann. London, 1907, 161-183.
- Miller-Delaney SF et al (2015) Differential DNA methylation profiles of coding and non-coding genes define hippocampal sclerosis in human temporal lobe epilepsy. *Brain* 138:616–631.
- Miyoshi, K., Tsukumo, H., Nagami, T., Siomi, H. & Siomi, M. C. Slicer function of Drosophila Argonautes and its involvement in RISC formation. *Genes Dev.* 19, 2837–2848 (2005).
- Mor M, Nardone S, Sams DS, Elliott E (2015) Hypomethylation of miR-142 promoter and upregulation of microRNAs that target the oxytocin receptor gene in the autism prefrontal cortex. *Mol Autism* 6:46.
- Mott JL, Kobayashi S, Bronk SF, Gores GJ. Mir-29 regulates Mcl-1 protein expression and apoptosis. *Oncogene* 2007; 26(42):6133-140.
- Murchison EP, Hannon GJ. miRNAs on the move: miRNA biogenesis and the RNAi machinery. *Curr Opin Cell Biol.* 2004;16(3):223–9.
- Ndagijimana, M., Laghi, L., Vitali, B., Placucci, G., Brigidi, P., Guerzoni, M.E. Effect of a symbiotic food consumption on human gut metabolic profiles evaluated by (1)H Nuclear Magnetic Resonance spectroscopy. *Int. J. Food. Microbiol.* 2009, 134(1-2), 147-153.
- Neish, A.S., Gewirtz, A.T., Zeng, H., Young, A.N., Hobert, M.E., Karmali, V., Rao, A.S., Madara, J.L. Prokaryotic regulation of epithelial responses by inhibition of I-kappa B-alpha ubiquitination. *Science*, 2000, 289(5484), 1560 -1563.
- Niers, L.; Martin, R.; Rijkers, G.; Sengers, F.; Timmerman, H.; Van Uden, N.; Smidt, H.; Kimpen, J.; Hoekstra, M. The effects of selected probiotic strains on the development of eczema (the PandA study). *Allergy*, 2009, 64, 1349-1358.
- Okamura, K., Liu, N. & Lai, E. C. Distinct mechanisms for microRNA strand selection by Drosophila Argonautes. *Mol. Cell* 36, 431–444 (2009).
- Ooi L.G., Liong M.T., Cholesterol-Lowering Effects of Probiotics and Prebiotics: A review of in vivo and in vitro findings. *Int. J. Mol. Sci.*, 2010, 11(6), 2499-2522.
- Özdemir, Ö. Various effects of different probiotic strains in allergic disorders:an update from laboratory and clinical data. *Clin. Exp. Immunol.*, 2010, 160(3), 295-304.

- Pamela Hasslöf, Maria Hedberg, Svante Twetman and Christina Stecksén-Blicks. Growth inhibition of oral mutans streptococci and candida by commercial probiotic lactobacilli - an in vitro study. *BMC Oral Health* 2010;10:18.
- Parvez, S., Malik, K.A., Kang S.Ah.; Kim, H.Y. Probiotics and their fermented food products are beneficial for health. *J. Applied. Microbiol.* 2006, 6(100), 1171-1185.
- Petrof, E.O., Kojima, K., Ropeleski, M.J., Musch, M.W., Tao, Y., De Simone, C., Chang, E.B. Probiotics inhibit nuclear factor-kappa B and induce heat shock proteins in colonic epithelial cells through proteasome inhibition. *Gastroenterology*, 2004,127, 1474-1487.
- Pfeffer, S. et al. Identification of microRNAs of the herpesvirus family. *Nature Methods* 2, 269–276 (2005).
- Pham, J. W., Pellino, J. L., Lee, Y. S., Carthew, R. W. & Sontheimer, E. J. A Dicer-2-dependent 80s complex cleaves targeted mRNAs during RNAi in *Drosophila*. *Cell* 117, 83–94 (2004).
- Poy MN et al. A pancreatic islet-specific microRNA regulates insulin secretion. *Nature*. 2004;432(7014):226-30.
- Rand, T. A., Petersen, S., Du, F. & Wang, X. Argonaute2 cleaves the anti-guide strand of siRNA during RISC activation. *Cell* 123, 621–629 (2005).
- Real time Pcr Dr. Basim Ayesb Biotechnology training course <http://slideplayer.com/slide/6027110/>, 2016
- Rebucci et al . miRNA-196b inhibits cell proliferation and induces apoptosis in HepG2 cells by targeting IGF2BP1 *Molecular Cancer* 14:79 2015.
- Reid, G., Bruce, A.W. Urogenital infections in women: Can probiotics help? *Postgrad. Med. J.* 2003, 79(934), 428-432.
- Renaud L et al (2015) HDACs regulate miR-133a expression in pressure overload-induced cardiac fibrosis. *Circ Heart Fail* 8:1094–1104.
- Rivas MA, Venturutti L, Huang YW, Schillaci R, Huang TH, Elizalde PV. Downregulation of the tumor-suppressor miR-16 via progesterin-mediated oncogenic signaling contributes to breast cancer development. *Breast Cancer Res.* May 14 2012;14.
- Rodriguez A et al. Identification of mammalian microRNA host genes and transcription units. *Genome Res.* 2004;14(10A):1902–10.
- Rodriguez A et al. Requirement of bic/microRNA-155 for normal immune function. *Science*. 2007;316(5824):608–11.
- Rolfé RD. The role of probiotic cultures in the control of gastrointestinal health. *J Nutr.* 2000 Feb;130(2S Suppl):396S-402S.
- Sağdıç O, Küçüköner E, Özçelik S, Probiyotik ve Prebiyotiklerin Fonksiyonel Özellikleri, Atatürk Üniv. Ziraat Fak. Derg. 35 (3-4), 221-228, 2004.
- Sanders, M.E. Probiotics: Definition, sources, selection, and uses. *Clin. Infect. Dis.*, 2008, 46 (Suppl2), 58-61.
- Schirle, N. T. & MacRae, I. J. The crystal structure of human Argonaute2. *Science* 336, 1037–1040 (2012).
- Schratt GM et al. A brain-specific microRNA regulates dendritic spine development. *Nature*. 2006;439(7074):283–9.
- Schwarz, D. S. et al. Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex. *Cell* 115, 199–208 (2003).
- Selbach M, Schwanhauser B, Thierfelder N, Fang Z, Khanin R, Rajewsky N. Widespread changes in protein synthesis induced by microRNAs. *Nature* 2008;455(7209):58-63.
- Seong-Yeon Park, Jung Hyun Lee, Minju Ha, Jin-Wu Nam & V Narry Kim. miR-29 miRNAs activate p53 by targeting p85a and CDC42, *Nature structural & molecular biology* 16 :1, January 2009.

- Shiohama A et al. Molecular cloning and expression analysis of a novel gene DGCR8 located in the DiGeorge syndrome chromosomal region. *Biochem Biophys Res Commun.* 2003;304(1):184–90.
- Solga, S.F. Probiotics can treat hepatic encephalopathy. *Med. Hypotheses*, 2003, 61(2), 307-313.
- Stanczyk J et al (2011) Altered expression of microRNA-203 in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts and its role in fibroblast activation. *Arthritis Rheum* 63:373–381.
- Stefani G, Slack FJ. Small non-coding RNAs in animal development. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 9(3):219–30, 2008.
- Suvarna V.C., Boby V.U., Probiotics in human health: A current assessment. *Curr. Sci.* 2005, 11, 1744-1748.
- Tang W et al (2013) Aberrant reduction of MiR-141 increased CD47/CUL3 in Hirschsprung's disease. *Cell Physiol Biochem* 32:1655–1667.
- Tomari, Y. et al. RISC assembly defects in the *Drosophila* RNAi mutant armitage. *Cell* 116, 831–841 (2004).
- Tomari, Y., Du, T. & Zamore, P. D. Sorting of *Drosophila* small silencing RNAs. *Cell* 130, 299–308 (2007).
- Turpin, W., Humblot, C., Thomas, M., Guyot, J. Lactobacilli as multifaceted probiotics with poorly disclosed molecular mechanisms. *Int. J. Food. Microbiol.*, 2010, 143, 87-102.
- Vimala, Y., Dileep, P. Some aspects of probiotics. *Ind. J. Microbiol.* 2006, 46, 1-7.
- Vitor JM1, Vale FF. Alternative therapies for *Helicobacter pylori*: probiotics and phytomedicine. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2011 Nov;63(2):153-64.
- Wang HF, Tseng CY, Chang MH, Lin JA, Tsai FJ, Tsai CH, Lu YC, Lai CH, Huang CY, Tsai CC. Anti-inflammatory effects of probiotic *Lactobacillus paracasi* on ventricles of BALB/C mice treated with ovalbumin. *Chin J Physiol.* 2012 Feb 29;55(1):37-46
- Weinmayr G., Weiland S. K., Björkstén B., Brunekreef B., Büchele G., Cookson W. O., Marcos G.L., Gotua, M., Gratzou C., Hage M. V., Mutius E.V., Riiikjäv M.A., Rzehak P., Renato T. Stein R.T., Strachan D.P., Tsanakas J., Wickens K., Wong G.W., Atopic sensitization and the international variation of asthma symptom prevalence in children. *Am. J. Respir. Crit. Care. Med.*, 2007, 176, 565-574.
- Xiao C et al. MiR-150 controls B cell differentiation by targeting the transcription factor c-Myb. *Cell.* 2007;131(1):146–59.
- Yao T, Rao Q, Liu L, Zheng C, Xie Q, Liang J, Lin Z (2013) Exploration of tumor-suppressive microRNAs silenced by DNA hypermethylation in cervical cancer. *Virology* 10:175.
- Yekeen L.A., Sanusi R.A., Ketiku A.O. Prevalence of obesity and high level of cholesterol in hypertension: Analysis of data from the university college hospital. *Afr. J. Biomed. Res.* 2003, 6(3), 129-132.
- Yi R et al. Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs. *Genes Dev.* 2003;17(24):3011–6.
- Yoda, M. et al. ATP-dependent human RISC assembly pathways. *Nature Struct. Mol. Biol.* 17, 17–23 (2010).
- Yogesh Singh, Oliver A Garden, Florian Lang, Bradley S Cobb. MicroRNA-15b/16 enhances the induction of regulatory T cells by regulating the expression of Rictor and mTOR. *J Immunol.* 2015 December 15; 195(12): 5667–5677.
- Yuanbin Li, Shujun Liu, Fenglan Zhang, Pengfei Jiang, Xinyi Wu, Yan Liang. Expression of the microRNAs hsa-miR-15a and hsa-miR-16-1 in lens epithelial cells of patients with age-related cataract, *Int J Clin Exp Med* 2015.
- Zejuan Li., Hao Huang, Ping Chen, Miao He, Yuanyuan Li, Stephen Arnovitz, Xi Jiang, Chunjiang He, Elizabeth Hyjek, Jun Zhang, Zhiyu Zhang, Abdel Elkahlon, Donglin Cao, Chen Shen, Mark Wunderlich, Yungui Wang, Mary Beth Neilly, Jie Jin, Minjie Wei, Jun Lu, Peter J.M. Valk, Ruud Delwel, Bob Lowenberg, Michelle M. Le Beau, James Vardiman, James C. Mulloy, Nancy J. Zeleznik-Le, Paul P. Liu, Jiwang Zhang,

and Jianjun Chen. miR-196b directly targets both HOXA9/MEIS1 oncogenes and FAS tumour suppressor in MLL-rearranged leukaemia. Nat Commun. 3: 688. 2012.

