

T.C.
YEDİTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MOLEKÜLER TIP ANABİLİM DALI

**MİRNA33A İFADE DÜZEYİNİN TRİGLİSERİD
SEVİYESİ ÜZERİNE ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

AYŞE DİLARA AYDEMİR, Biyomüh.

DANIŞMAN

Prof. Dr. Turgay İSBİR

İstanbul-2018

TEZ ONAYI

TEZ ONAYI FORMU

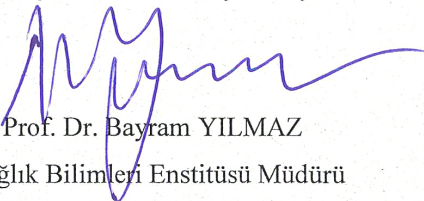
Kurum : Yeditepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Program : Moleküler Tıp Anabilim Dalı
Tez Başlığı : miRNA-33a İfade Düzeyinin Triglicerid Seviyesi Üzerine Etkisinin
Araştırılması
Tez Sahibi : A. Dilara Aydemir
Sınav Tarihi : 26 Ocak 2018

Bu çalışma jürimiz tarafından kapsam ve kalite yönünden Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

	Unvanı, Adı-Soyadı (Kurumu)	İmza
Jüri Başkanı: (Danışman)	Prof. Dr. Turgay İsbir Yeditepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji A.D./ Sağlık Bilimleri Enstitüsü / Moleküler Tıp A.D.	
Üye:	Prof. Dr. İnci Özden Yeditepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Biyokimya A.D.	
Üye:	Prof. Dr. Uzay Görmüş Biruni Üniversitesi Tıp Fakültesi, Biyokimya A.D.	

ONAY

Bu tez Yeditepe Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri tarafından uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulu'nun 08./02/2018 tarih ve 2018/02-08 sayılı kararı ile onaylanmıştır.


Prof. Dr. Bayram YILMAZ
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmayla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim.

AYŞE DİLARA AYDEMİR

İTHAF

Sevgili Annem'e - Babam'a ve Kız Kardeşim'e
ve
Çok Değerli Hocam Prof Dr Turgay İsbir'e ithaf ediyorum.

TEŞEKKÜR

Bu çalışmanın gerçekleştirilmesinde, değerli bilgilerini benimle paylaşan, mesleki hayatımda da bana verdiği değerli bilgilerden faydalanacağımı düşündüğüm kıymetli danışman hocam Prof. Dr. Turgay İSBİR'e teşekkürü bir borç biliyor ve şükranlarımı sunuyorum.

Tez çalışmam için gereken örnekleri temin etmemi sağlayan Yeditepe Üniversitesi ve Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi'ne teşekkür ediyorum.

İstatistiksel çalışmalarım için destek olan sayın Yrd. Doç. Dr. Çiğdem Altunok'a teşekkürlerimi sunuyorum.

Yine çalışmamda kaynak ve yöntem açısından bana sürekli yardımda bulunarak yol gösteren ve gelecekteki hayatında çok başarılı olacağına inandığım değerli Dr. G. Seda GÜLEÇ YILMAZ'a da sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Teşekkürlerin az kalacağı, çalışmamın her anında desteklerini ve güler yüzlerini eksik etmeyen, hayatları boyunca çok başarılı olmalarını dilediğim bir tanecik arkadaşlarım Biomüh. Ezgi YALBIR ve MolBio. Tuğçe GÜL'e sevgilerimi sunuyorum. Ayrıca çalışmalarım boyunca yardımlarını hiç esirgemeyen Moleküler Tıp ailesinin değerli üyeleri Dr. Selvi DUMAN, Dr. Müge KOPUZ, MSc. Hüseyin AYHAN, MSc E. Murat ALTINKILIÇ ve Biyo. Hüseyin Kilili'ye teşekkürlerimi sunuyorum.

Beni bugünlere sevgi ve saygı kelimelerinin anlamlarını bilecek şekilde yetiştirerek getiren ve benden hiçbir zaman desteklerini ve inançlarını esirgemeyen bu hayattaki en büyük şansım olan Canım Ailem'e sonsuz teşekkürler.

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI	ii
BEYAN	iii
İTHAF	iv
TEŞEKKÜR	v
İÇİNDEKİLER	vi
TABLolar LİSTESİ	viii
ŞEKİLLER LİSTESİ	ix
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ	x
ABSTRACT	xii
ÖZET	xiii
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. MikroRNA	3
2.1.1. MikroRNA'nın Tarihçesi	3
2.1.2. MikroRNA'nın Biyosentezi	4
2.1.2.1. MikroRNA'nın Çekirdekte İşlenmesi	5
2.1.2.2. Sitoplazmik Taşınması	5
2.1.2.3. Sitoplazmik İşlenmesi ve Argonat'a Yüklenmesi	5
2.1.2.4. MikroRNA'nın Etki Mekanizması	6
2.1.3. mRNA'nın Yıkımı	7
2.1.3.1. miRNA Aracılı Gen İfadesinin Down-Regülasyonu	7
2.1.4. MikroRNA Ekspresyonun Hastalıklar Üzerindeki Etkisi	9
2.1.4.1. MiRNA'nın Terapötik Moleküler Temeli	9
2.1.4.2. Biyobelirteç olarak miRNA'lar	10
2.2. MikroRNA-33a	11
2.2.1. SREBP Ailesi	13
2.2.2. ABCA1	15
2.2.3. miR-33a'nın Metabolizmadaki Görevi	20
2.2.4. miR-33a'nın Ateroskleroz'daki Görevi	21
2.2.5. Kolesterol ve Yağ Asidi Metabolizmasının Düzenlenmesi ve miRNA	22
2.2.6. Lipit Metabolizması Üzerine Etkisi	22
3. GEREÇ VE YÖNTEM	25

3.1. Örnek Seçimi Ve Tanımı	25
3.2. Kullanılan Malzemeler ve Cihazlar	25
3.2.1. Kullanılan Sarf ve Araç Malzemeler	25
3.2.2. Kullanılan Cihazlar	26
3.3. Yöntemler	26
3.3.1. MiRNA İzolasyonu ve Saflık Tayini	26
3.3.1.1. Serumdan mikroRNA İzolasyonu	26
3.3.1.2. cDNA Eldesi	27
3.3.1.3. MikroRNA Saflık Tayini	27
3.3.2. MikroRNA Düzeylerinin Belirlenmesi.....	28
3.3.2.1. Eş Zamanlı PZR ile Genotip ve MikroRNA Ekspresyon Analizleri	28
3.4. Lipid Profillerinin Ölçülmesi	29
3.5. İstatistiksel Analiz	30
4. BULGULAR	31
4.1. Çalışma Gruplarına ait Demografik Veriler.....	31
4.2. Çalışma Gruplarına Ait Lipid Değerleri	32
4.4. miR-33a ROC Sonuçları.....	36
4.5. Çalışma Gruplarına ait miR33a İfade Düzeyleri ile Lipid Değerleri ve Vücut Kitle İndeksinin Korelasyonu.....	37
5. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	43
KAYNAKLAR	50
HAM VERİLER	66
FORMLAR.....	68
ETİK KURUL KARARI	76
ÖZGEÇMİŞ.....	77

TABLolar LİSTESİ

Tablo 3.3.1.2-1. cDNA Sentezi için PZR İçeriği	27
Tablo 3.3.1.2-2. cDNA Sentezi için İnkübasyon Koşulları	27
Tablo 3.3.2.1-1. Kullanılan mikroRNA primer dizisi	29
Tablo 3.3.2.1-2. MikroRNA Ekspresyon için Eş Zamanlı PZR İçeriği	29
Tablo 3.3.2.1-3. MikroRNA Ekspresyon için Eş Zamanlı PZR Koşulları	29
Tablo 4.1-1. Kontrol ve Hasta Grubuna ait Demografik Veriler	31
Tablo 4.2-1. Kontrol ve Hasta Gruplarına ait Lipid Değerleri	32
Tablo 4.3-1. miR33a Ekspresyon Analizi Sonuçları.....	35
Tablo 4.5-1. Kontrol Grubuna ait miR33a Ekspresyonunun Lipid Değerleri ve VKİ ile Korelasyonu.....	38
Tablo 4.5-2. Hasta Grubuna ait miR33a Ekspresyonunun Lipid Değerleri ve BMI ile Korelasyonu.....	40

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2.1.2-1. Genel mikroRNA yolağı	4
Şekil 2.2-1. SREBP2 içinde miR33a lokalizasyonu ve dizilerin evrimsel korunumu. ...	11
Şekil 2.2-2. SREBP ve miR-33 ailesi.	12
Şekil 2.2.1-1. SREBPs genleri ve yapısı.	13
Şekil 2.2.2-2. İnsan ABCA1 gen promotörü.	16
Şekil 2.2.2-3. Kolesterol yokluğunda ve birikiminde, ABCA1 düzenlenmesi.	18
Şekil 2.2.2-4. ABCA1'in aterosklerotik plaka üzerindeki etkisi.....	19
Şekil 4.3-1. mikroRNA Ekspresyon Analizleri.	34
Şekil 4.4-1. Plazma miRNA33a seviyesinin kontrol ve hasta gruplarına göre ROC Analizi.	36
Şekil 4.5-1. Kontrol grubuna ait miR33a Ct ve HDL korelasyonu analizi.....	39
Şekil 4.5-2. Hasta grubuna ait miR33a Ct ile TG ve VLDL arasındaki korelasyonunun analizi.	41
Şekil 4.5-3. Hasta grubuna ait miR33a Δ Ct ile HDL arasındaki korelasyonunun analizi... 41	
Şekil 4.5-4. Hasta grubuna ait miR33a Livak değeri ile TG ve VLDL arasındaki korelasyonunun analizi.....	42
Şekil 4.5-5. Hasta grubuna ait miR33a Kat değişimi ile HDL arasındaki korelasyonunun analizi.	42

SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

- ABCA1: ATP-bağlayıcı kaset taşıyıcısı 1
- Ago: Argonaute
- anti-miR-33: miR-33'ü hedefleyen antisens oligonükleotid
- apoA1: apolipoprotein A-1
- bp: baz çifti
- CPT1a: karnitin palmitoiltransferaz 1A
- DGCR8: DiGeorge kritik sendrom bölgesi 8
- Drosha: RNAaz III enzimi
- EXP5: exportin-5
- FA: yağ asidi
- GTP: guanozin trifosfat
- HDL: Yüksek Yoğunluklu Lipoprotein
- KKH: Koroner Kalp Hastalığı
- LDL: Düşük Yoğunluklu Lipoprotein
- LDLr KO fare: düşük yoğunluklu lipoprotein reseptör knockout fare
- LXRa/b: Karaciğer X reseptörü a/b
- miRNA: mikroRNA
- NMD: anlamsız-aracılı mRNA bozulması - nonsense-mediated mRNA decay
- PABP: Sitoplazmik poli(A) bağlanma proteinleri - cytoplasmic poly(A) binding protein
- PACT: İnterferonun indüklediği protein kinazın protein Aktivatörü
- PRKRA: interferon ile uyarılabilir çift sarmallı RNA'ya bağlı aktive edici
- pri-miRNA: primer mikroRNA
- PTC: erken terminasyon kodonları
- RAN: RAS-ilişkili Nükleer protein
- RCT: Ters kolesterol taşınması - reverse cholesterol transport

RISC: RNA-indüklenmiş susturma kompleksi
RLC: RISC Yükleme Kompleksi-RISC Loading Complex
RNAi: RNA interferaz
RXR: retinoid X reseptör
SREBP: sterol düzenleyici eleman bağlama proteinler
ssRNA: tek sarmallı RNA
TG: Trigliserid
TRBP: HIV-1 TAR RNA-bağlanma proteini
UTR: çevrilmemiş bölge - untranslated region
VKİ: Vücut Kitle İndeksi
VLDL: Çok düşük yoğunluklu Lipoprotein
VYA: Vücut Yüzey Alanı
WAT: Beyaz adipoz doku

ABSTRACT

Aydemir A.D. The Investigation of Affect of miRNA33a Expression Level on The Triglyceride Level. Yeditepe University Health Sciences Institute, Department of Molecular Medicine. Master Thesis Istanbul, 2018.

In this thesis study, the relation between miRNA-33a expression level and human triglyceride level was examined after investigated by TargetScan, miRanda, and miRBase bioinformatics databases. By taking as reference of the lipid profiles in Turkish society that Mahley has published and the Triglyceride levels determined by Turkish Society of Cardiology; the volunteer with a TG level below 150 mg/dl is called control group and the volunteer with a TG level above 150 mg/dl were accepted as the patient group.

When the demographic data are evaluated statistically; gender and body mass index were found significant ($p = 0.033$). By observing the difference between lipid values; cholesterol, triglyceride, and VLDL and the difference between the mean of the patient and the control group, a statistical significance was determined ($p = 0,000$). When miR33a expression analysis was performed, more expression was observed in the patient group in terms of fold change, but no statistically significant difference was determined ($p = 0,654$). In the ROC analysis performed to detect the diagnosis, no threshold value was found at ΔCt and fold change ($p = 1,019$; $p = 1,012$). When Pearson correlation test is examined; in the group with TG level below 150 mg / dl, there was a positive correlation between miR33a Ct and HDL ($p = 0.036$). There was a negative correlation between miR33a Ct value, and TG and VLDL ($p = 0.047$; $p = 0.045$) in the patient group with TG level above 150 mg / dL, but a positive correlation was found between the livac value and these lipid values ($p = 0,005$). In addition, a negative correlation was found between miR33a ΔCt value and HDL ($p = 0,044$), while a positive correlation was observed with fold change ($p = 0,045$).

As a result, no significant relationship was found between expression level and TG level when the difference between the groups' averages was examined.

Keywords: miR33a, atherosclerosis, triglyceride

ÖZET

Aydemir A.D. Mirna33a İfade Düzeyinin Triglisericid Seviyesi Üzerine Etkisinin Araştırılması. Yeditepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Moleküler Tıp Anabilim Dalı. Master Tezi İstanbul, 2018.

Bu tez çalışmasında, TargetScan, miRanda, ve miRBase biyoinformatik veritabanları aracılığıyla araştırılan miRNA-33a ifade düzeyinin insanlarda triglisericid seviyesi ile ilişkisine bakılmıştır. Mahley'in yayınlamış olduğu Türk toplumundaki lipid profilleri ve Türk Kardiyoloji Derneği'nin belirlemiş olduğu Triglisericid seviyeleri referans alınarak; TG seviyesi 150 mg/dl'nin altından olan gönüllüler kontrol grubu ve üstünden olanlar ise hasta grubu olarak kabul edilmiştir.

Demografik veriler istatistiksel olarak değerlendirildiğinde; cinsiyet ve vücut kitle indeksinde anlamlılık saptanmıştır ($p=0,033$). Lipid değerlerinden; kolesterol, triglisericid ve VLDL ile hasta ve kontrol grubunun ortalamalar arasındaki farklılıkla ilişkisi ele alındığında, istatistiksel olarak bir anlamlılık belirlenmiştir ($p=0,000$). miR33a ekspresyon analizi yapıldığında, kat değişimi açısından, hasta grubunda daha fazla ekspresyon gözlemlenmiştir fakat istatistiksel analiz yapıldığında anlamlı bir fark gözlemlenmemiştir ($p=0,654$). Tanı saptamak amacıyla yapılan ROC analizinde, ΔC_t ve kat değişimde herhangi bir eşik değeri saptanamamıştır ($p=1,019$; $p=1,012$). Pearson korelasyon testine bakıldığında ise; TG seviyesinin 150 mg/dl'nin altında bulunduğu grupta, miR33a Ct ve HDL arasında pozitif bir ilişki bulunmuştur ($p=0,036$). TG seviyesinin 150 mg/dl'nin üstünde bulunduğu hasta grubunda, miR33a Ct değeri ile TG ve VLDL arasında ($p=0,047$; $p=0,045$) negatif bir korelasyon bulunmakla birlikte, livak değeri ile bu lipid değerleri arasında pozitif bir ilişki belirlenmiştir ($p=0,005$). Buna ek olarak miR33a ΔC_t değeri ile HDL arasında negatif bir ilişki saptanırken ($p=0,044$), Kat değişimi ile pozitif bir ilişki gözlemlenmiştir ($p=0,045$).

Sonuç olarak, grupların ortalamalarının arasındaki farka bakıldığında, ekspresyon düzeyi ve TG seviyesi arasında anlamlı bir ilişki saptanamamıştır.

Anahtar Kelimeler: miR33a, ateroskleroz, triglisericid

1. GİRİŞ VE AMAÇ

İnsan genomunun ilk taslağı Şubat 2001'de yayınlandığından beri, insan genomunun ve daha sonra insan proteomunun karmaşıklığını aydınlatan birçok yeni bulgu elde edilmiştir. Son on yılda, hastalıkların erken tespiti için genomik ve proteomik teknolojilerin uygulanması, birçok hastalığa erken dönemde teşhis konulabileceğini ve bu da klinikte daha erken bir süre zarfında tedavi protokollerinin başlatılmasında yardımcı olabileceğini ortaya koymuştur.

İnsan genom çalışmaları ve insan genomunda 25.000'den az gen bulunması sonucunda, mRNA'lardan insan genomunun ana regülatörü olan kodlamayan RNA'lara odaklanan bir değişim meydana geldi. Kodlanmamış RNA'ların varlığı ve insan hastalıklarındaki rolü, bu molekülleri tıbbi araştırmalarda anlaşılması gereken önemli araçlar haline getirir.

Parçalanma ve / veya translasyonel baskı ile spesifik mRNA'ları hedefleyerek, endojen, kodlanmayan RNA'ların (ncRNA'lar) yeni bir sınıfı olan mikro RNA'lar (miRNA'lar), gen ifadesinin kontrolünde önemli bir rol oynamaktadır [1].

MikroRNA'ların, metabolizma, hücre çoğalması, apoptoz, ve nöronal hücre akıbeti gibi geniş bir gelişimsel süreç yelpazesinde önemli bir rol oynadığı gösterilmiştir [2-4]. Diğer düzenleyici roller ise, nöronal gen ekspresyonu [5], beyin morfogenezini [6], kas farklılaşması [7] ve kök hücre bölünmesini [8] içerir.

MikroRNA'ların eksiklikleri veya aşırılıkları, miyokard enfarktüsünden otoimmün hastalıklara kadar klinik açıdan önemli olan birçok hastalığa bağlıdır. Son yıllarda miRNA'larda yapılan hızlı keşifler ve ilerlemeler, miRNA'ların yakın gelecekte bir çok hastalığın teşhisinde ve tedavisinde büyük bir potansiyele sahip olacağını gösteriyor.

Vasküler sistemin homeostazı, endotel hücrelerinin işlevselliğine ve anjiyogenez, vaskülogenez ve damar regresyonunun eşgüdümlü regülasyonuna bağlıdır. Neovaskülarizasyon ve vasküler remodeling sırasında gen ekspresyon seviyesindeki düzenleyici mekanizmalar hakkında çok az şey bilinmektedir [9]. Bununla birlikte, son yıllarda mikroRNA'ların keşfi, bu RNA moleküllerinin kalp fonksiyonlarının

düzenlenmesinde [10] ve genel olarak memeli kardiyovasküler sistemde önemli bir işleve sahip olduklarını ortaya koymuştur [11].

Ateroskleroz oluşum mekanizması farklı açılardan daha geniş değerlendirmek için miRNA ve hedef proteinlerinin veri tabanları araştırılmış (<http://www.mirbase.org/>, <http://www.targetscan.org/>) ve konuyla ilgili çalışmalar değerlendirilmiştir.

‘Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology’ dergisinde yayınlanan Marquart ve arkadaşlarına ait olan bir çalışmada [12], batı tipi aterojenik bir diyetle beslenen LDLr KO farelerindeki uzun vadeli (12 haftalık) anti-miR-33 tedavisinin etkilerini araştırdılar.

Elde edilen sonuçlar, miR-33 antisense tedavisinin beklendiği gibi ABCA1'in hepatic ekspresyonuna neden olduğu ve ayrıca birkaç metabolik hedefinin (örneğin CPT1 α) de olduğu gösterilmektedir. Bununla birlikte, dolaşımdaki HDL-C seviyeleri tedavinin ilk 2 haftalık yemle beslenme evresinde artarken, yazarlar şaşırtıcı bir şekilde bu anti-miR-33'ün, yüksek kolesterol batı tipi diyetlere geçtikten sonra bağımlı artışın sürmediğini tespit ettiler. HDL-C düzeyleri üzerinde sürekli bir etkinin var olmamasına ek olarak, Marquart ve ark. [12] çalışmasında dolaşımdaki trigliseridlerin 12 haftalık anti-miR-33 tedavisinin sonunda anlamlı bir şekilde yükseldiğini bildirmiştir.

Bu veriler ışığında ve buna ek olarak Türk Kardiyoloji Derneği'nin belirlemiş olduğu Trigliserid seviyeleri referans alınarak; miR33a ekspresyonunun Trigliserid seviyesi üzerine etkisinin araştırılması amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. MikroRNA

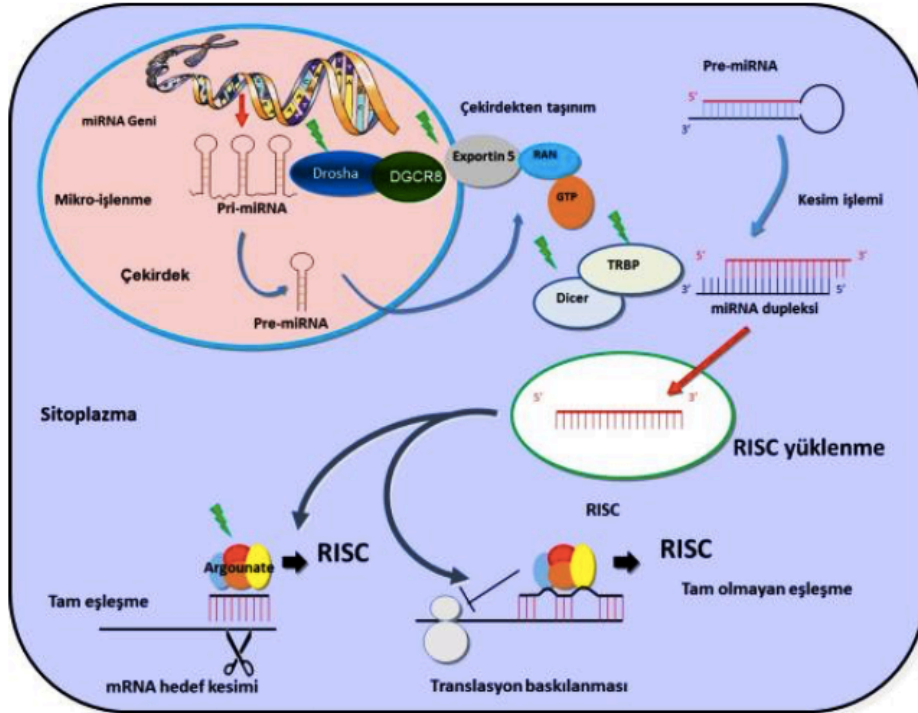
2.1.1. MikroRNA'nın Tarihçesi

Bitki ve hayvanlarda, organik olaylar mikroRNA'lar tarafından düzenlenir. MikroRNA'lar 17-25 nükleotid içeren ve posttranskripsiyonel düzenleyici olarak davranan, kodlanmayan RNA'lardır. *Caenorhabditis elegans*'taki birincil miRNA faktörü 'lin-4', 1993 yılında larvaların gelişim aşamasındaki genetik kusurlarının çalışmaları boyunca Victor Ambros ve meslektaşları tarafından incelendi [13]. Yirmi iki nükleotid içeren bir başka mikroRNA geni olan let-7, lin-4 çalışmalarından 7 yıl sonra *C. elegans*'ın gelişme sürecindeki önemiyle dikkat çekti. Bu raporlar, let-7 ve lin-4'ün mRNA'nın translasyonel baskılayıcıları olduğunu göstermiştir. İnsan ve başka bazı hayvanlar da let-7 gibi benzer genlere sahiptir ve bu da, bilim insanlarını, genlerin post-transkripsiyonel regülasyon üzerinde önemli rol oynadığı düşünülen miRNA'ları çalışmaya teşvik etmiştir [14]. Bu arada, RNA interferansın keşfedilmesi (RNAi), her yolağın ortak kısımları paylaştığını ve birbirine bağlı olduğunu açıkça ortaya koydu. Ertesi yıllar içerisinde, *Drosophila melanogaster*'de, solucanlarda ve insanlarda, yüzlerce RNA'nın var olduğu biliniyordu. Şu anda, elli organizma ile ilgili on sekiz bin iki yüz yedi miRNA kayıtlıdır. Memelilerdeki tüm kodlayıcı genlerin %60'ından fazlası bu küçük RNA'lar tarafından kontrol edilir. Bu miRNAlar, gelişme, farklılaşma, çoğalma ve programlanmış hücre ölümü gibi hücresel olaylara düzenleyiciler olarak katılırlar [15].

İnsanın daha geniş çeşitlilikte olan miRNA'sı, miRNA bilgi raporları kapsayan miRBase tarafından rapor edilir [16]. Evrim çalışmaları, bilateral hayvanlarda bazı miRNA dizilerinin biyolojik süreci muhafaza ettiğini gösterdi. İnsanlarda miRNA'nın yarısı kadar genin *C. elegans* ile benzerliğe sahip olduğu bulunmuştur. Analiz çalışmaları, miRNA'ların çoğunlukla intergenik bölgeler (IGR) içinde bulunduğunu, buna karşılık intronik bölgelerde (IR'ler) daha az bulunduğunu göstermiştir. Küçük RNA kümeleri, polisistronik olarak ve bazı durumlarda kendi öncüsünden gelen monokristronik birincil transkript olarak ifade edilirler [17].

2.1.2. MikroRNA'nın Biyosentezi

MikroRNA'lar, önceden oluşturulmuş öncülerden yapılmış ve 21-25 nükleotid içeren tek sarmallı RNA'lardır. Transkriptlerin ek bir işlemi, miRNA'ları sentezlemek için ayrılmıştır. Son yıllarda, bitkilerde ve hayvanlarda yapılan miRNA çalışmaları artış göstermiştir [18]. MiRNA genleri, uzun bir birincil transkript üreten RNA enzim II tarafından kopyalanır. Olgun miRNA, RNase III enzimleri ve eşlik eden çift sarmallı RNA bağlama alanı proteinlerini içeren 2 adımda üretilir. Çekirdekte, RNase III tipi katalizör Drosha, uzun primer transkriptleri bir saç tokası öncüsü üretmek üzere işler [19]. Pri-miRNA saç tokası, exportin-5 (EXP-5) yoluyla sitoplazmaya gönderilir ve buradan ayrıca bir RNase III tipi protein ile dicer tarafından kararsız miRNA dupleks yapılarına işlenirler. Dupleks içindeki 2 zincirin daha az stabil olanı, makromolekül (protein) ifadesini düzenleyen çoklu-protein nükleaz kompleksine dahil edilir. Bu olay, olgun miRNA'lar, çoklu-protein nükleaz kompleksiyle birleşip, RNA-indüklenmiş susturma kompleksi (RISC) oluşturup, Argonaute (ago) makromolekülüne yüklendikten sonra gerçekleşir [20].



Şekil 2.1.2-1. Genel mikroRNA yoluğu

[21]

2.1.2.1. MikroRNA'nın Çekirdekte İşlenmesi

Farklı türde proteinler miRNA süreci ile ilgilidir; miRNAlar başlangıçta çekirdeğin içinde yönetilir.

Poll II tarafından üretilen pri-miRNA'nın bölünmesi Drosha tarafından gerçekleştirilir; Drosha, *C. elegans* ve *D. melanogaster*'de pasha'ya, insanlarda ise bir kimyasal bileşik olan DiGeorge kritik sendrom bölgesi 8 (DGCR8)'e kofaktör olarak ihtiyaç duyar. Pasha ya da DGCR8 ile birlikte Drosha, mikroişlemci kompleksi adı verilen karmaşık bir yapı oluşturur [22]. Fare modellerindeki biyolojik işlemler için DGCR8 genleri gereklidir; hayvanlarda Drosha ve DGCR8 çoğunlukla korunmuştur. Metazoan pri-mikroRNA'ları genelde terminal çember, stem-loop ve tek sarmallı RNA (ssRNA) oblik kısımları neredeyse otuz üç baz çiftinden (bp) oluşur. DGCR8 daha sonra bu ssRNA bölümüyle etkileşime girer ve Drosha'yı pri-miRNA'yı parçalamaya yönlendirir. RNA dupleksleri, Drosha tarafından ssRNA stem-loop düğümünden on bir bp uzağında parçalanır ve böylece pri-miRNA iki nükleotid (nt) 30 çıkıntı (overhang) ve 50 fosfat kümesi ile pre-miRNA'ya rafine edilir [23].

2.1.2.2. Sitoplazmik Taşınması

Pre-miRNA'lar olgun miRNA'ların sentezi için sitoplazmaya taşınır. Pre-miRNA'ların taşınması, nükleer membranda içice yuvalanmış proteinlerin büyük kanalları olan nükleer gözenek kompleksleri aracılığıyla tamamlanır. Pre-miRNA'nın taşınmasına RanGTP'ye bağlı olan nükleer transport reseptörü exportin-5 (EXP5) aracılık eder [24]. EXP5, GTP'ye bağlı kofaktör Ran ve çekirdeğin içindeki pre-mikroRNA'nın her birinin kollektif bağlanmasına neden olan 14-bp'den fazla çift sarmallı RNA (ds-RNA) kök döngüsünü tanımladığında, çekirdeğin içindeki pre-miRNA'nın taşınması başlatılır [25].

2.1.2.3. Sitoplazmik İşlenmesi ve Argonat'a Yüklenmesi

EXP5, sitoplazmada pre-miRNA'yı serbest bırakır ve daha sonra Dicer'in etkisiyle olgun bir miRNA oluşturmak üzere işlenir. Dicer, pre-miRNA'dan yirmi iki nükleotid ölçümü yapıldıktan sonra, miRNA zincirini kesen son derece hassas bir katalizördür [26]. Bu Dicer proteinleri ökaryotik organizmaların çoğunda son derece korunmuş bir yapıdır. *D. melanogaster*; Dicer-1 ve Dicer-2'ye sahiptir ve her ikisi de

tamamen farklı rollere sahiptir. MiRNA olgunlaşması için Dicer-1 gereklidir ve siRNA'nın olgunlaşması için Dicer-2 gereklidir [27]. İnsanda, Dicer, interferonla uyarılabilir dsRNA'ya bağımlı madde (PRKRA, ayrıca PACT olarak da anılır) ve transaktivasyon cevabı oluşturan RNA bağlanma proteini olan iki yakından ilişkili makromolekül enzimleriyle ilgilidir. Bu ilişkili proteinlerin herhangi bir proses aktivitesi için gerekli olduğu düşünülmektedir; bununla birlikte, Dicer, RNA-indüklenmiş susturma kompleksi (RISC) oluşumunda yer alır. Dahası, bu proteinlerin özel rolü belirlenmeye devam etmektedir. Dicer tarafından gerçekleştirilen bölünme, bazen Agone ailesi makromolekül kompleksiyle entegre edilmiş, yirmi iki nükleotid içeren miRNA dupleks üreterek efektör kompleksi oluşturur. Prensipte olarak, bir zincir Agone'a, olgun miRNA, kılavuz zincir olarak kalırken, yolcu veya gezici zincir (passenger / traveler strand) olarak adlandırılan alternatif zincir bozulmuştur. Yine de, bazı durumlarda, gezgin miRNA zincirleri kararlı kalır ve RISC'e yüklenir. Dupleksin 2 ucunun gücü, alınacak parçaya karar verir [28]. Dicer, alternatif etkileşen proteinlerle (insanlarda PACT veya TRBP, sineklerde LOQS) bağlantılı olarak bir RISC yükleme kompleksi (RLC) oluşturarak RISC'in birleşmesine katkıda bulunur. RNA'nın Agone'a yüklenmesindeki gerçek RLC mekanizması iyi bilinmemektedir. İşlenmiş miRNA duplekslerinin Dicer'den uzaklaştırılmasıyla, Agone proteinleri kararsız uç ile etkileşime girer ve bu nedenle RLC'de etkileşen proteinler, miRNA dupleksinin kararlı ucuna bağlanır [29]. Agone proteinlerinin endonükleolitik aktivitesi, miRNA gezici zincirinin çıkarılmasına bağlıdır. Prensipte olarak, miRNA uyumsuzlukları ortada bulunur; genellikle, Agone proteinleri, miRNA'nın gezici zincirlerini oluşturan ayırmada yetersizdir. RNA helikaz, miRNA dupleksinin açılmasına aracılık eder ve seçilmemiş zinciri çıkarır. Yükleme tamamlandığında, RISC hedef mRNA'ya translasyonel baskılaması veya degradasyon ile bastırılan miRNA'ya rehberlik eder [30].

2.1.2.4. MikroRNA'nın Etki Mekanizması

MikroRNA, translasyonel baskılamaya veya miRISC'i kullanarak mRNA bölünmesi olarak adlandırılan 2 posttranskripsiyonel mekanizmadan birini kullanarak genlerin ekspresyonunu düşürerek düzenler. Başlangıçta, *C. elegans* lin-14 haberci RNA'sının translasyonunun lin-4 RNA tarafından inhibe edildiği düşünülmüştür; ancak, daha sonraki çalışmalarda, heterolog bir RNA tanıma sorunu, miRISC'de öngörülmuş,

daha sonra eksik miRNA bağlama alanları olmasına rağmen miRISC'nin tanımlanması ve baskı altında tutulmasına yardımcı olur [31].

Hatalı eşleşmelere sahip hayvan miRNA'larının bağlanması, Watson-Crick baz eşleşmesinde yanal genişlemeye neden olur. MiRNA-mRNA arasındaki tamamlayıcılık derecesi düzenleyici mekanizmanın temel belirleyicisidir. Hedef mRNA'yı parçalamak için Agone-katalizli mRNA kesilme mekanizması, tamamlayıcılık derecesinin yüksek olması ile mümkün olurken, translasyonel baskı mekanizması, parçalanmayı ihmal eden merkezi bir çift tarafından desteklenmektedir [32].

2.1.3. mRNA'nın Yıkımı

mRNA translasyonunu ve bozunmasını kontrol eden iki mekanizma bulunur: anlamsız-aracılı mRNA bozulması (nonsense-mediated mRNA decay (NMD)) ve mikroRNA (miRNA) aracılı gen ifadesinin susturulması. NMD, erken terminasyon kodonlarını (PTC'ler) barındıran mRNA'ları hızla parçalayan bir RNA denetleme mekanizmasıdır. miRNA'ların hedef mRNA'larının 3'çevrilmemiş bölgeleriyle (UTR'leri) baz eşleştirilmesi prensibine dayanır [33,34].

2.1.3.1. miRNA Aracılı Gen İfadesinin Down-Regülasyonu

RNA-indüklenmiş susturma kompleksine (RISC) dahil olduktan sonra, miRNA'lar RNA dupleksleri oluşturarak, RNAi mekanizmasını hedef mRNA'ya yönlendirir ve bunun sonucunda üretken translasyonun veya mRNA bozunmasının olduğu diziye özgü baskılamaya neden olur [35]. MiRNA'lar ile regülasyon, hedef mRNA'ların 3'UTR dizileri ile kısmi hibridlerin oluşumu ile gerçekleşir. Belirli bir miRNA hedefli mRNA, sıklıkla birden fazla miRNA hedef bölgesine sahiptir. MiRNA hedef genlerini öngörmek için geliştirilen hesaplama yöntemleri, protein kodlayan genlerin % 20-30'unun muhtemel miRNA hedefleri olduğunu düşündürür [36]. Başlangıçta, miRNA'ların sadece hedef mRNA translasyonunu inhibe ederek protein ekspresyonunu down-regüle ettiği düşünülmekteydi [37]. Bununla birlikte, son çalışmalar birçok miRNA'nın hedef mRNA'ların hızla azalmasına neden olduğunu ve dolayısıyla dolaylı olarak yapılan protein miktarını azalttığını gösterdi [38,39]. Bu nedenle, metazoan hücrelerdeki hedeflerin down-regülasyonunda, miRNA aracılı en az

iki genel mod vardır: miRNA aracılı translasyonel baskılama ve miRNA aracılı RNA bozunumu [40].

miRNA Aracılı Translasyonel Baskılama; MiRNA'lar tarafından translasyonel baskılama mekanizması halen tartışmalıdır. MiRNA aracılı translasyonel baskılamanın, hedef mRNA'ların miktarını etkilemeden nasıl gerçekleştirildiğini açıklayan iki farklı mekanizma önerilmiştir. Biri, miRNA'ların translasyon başlatılmasını inhibe ettiğini ve diğeri, gelişmekte olan peptidin eş-translasyonel bozunmasını da ortaya çıkaran, translasyonda bir "post-initiation" adımının önlenmesini hipotez haline getirir [40].

MiRNA-RISC kompleksinin, bir anti-translasyon başlatma faktörü, eIF6 ile bağlantılı olduğu keşfedildi; eIF6, 60S'nin 40S alt ünitelerine katılmasını engellediğinden, translasyon başlatmayı da engeller [41]. EIF6'nın insan hücrelerinde veya *C. elegans*'da yok edilmesi, miRNA aracılı translasyonel baskıyı etkili bir şekilde ortadan kaldırır. Başka bir çalışmada, mRNA stabilitesini etkilemeksizin, miRNA miR-2 aracılı translasyonel baskıyı tekrarlayan *D. melanogaster* embriyo özütleri kullanılarak bir sistem geliştirildi [42]. Translasyonel baskının, ökaryotlarda, cap'e bağımlı translasyon (cap-dependent translation initiation) başlatması için gerekli olan mRNA substratının 5' ucunda bulunan fizyolojik cap yapısının, m⁷GpppG'nin, varlığına bağlı olduğu tespit edildi [43].

RISC'in katalitik bileşeni olan Argonat proteinlerinin, m⁷G-cap yapısına bağlanan, yüksek derecede korunmuş bir motif içermesi, miRNA'ların translasyon başlatılmasını engellediğini desteklemektedir. Argonat proteinlerinin 'cap' bağlanması için eIF4E ile rekabet etmesi, dolayısıyla 'cap'e bağımlı translasyon başlatımı için gereken 5' uçtaki eIF4F kompleksinin oluşumunu önüyor olması mümkündür [44,45]. Bu, Ago2'nin, cap-bağlama motifinde mutasyonlara sahip olan varyantı değil, mRNA'ların 3'UTR'sine yapay olarak bağlı olduğu zaman translasyonu bloke ettiği gözlemleriyle tutarlıdır [46].

miRNA Aracılı RNA Bozunumu; Son yıllardaki kanıtlar, miRNA aracılığındaki bozunmanın, deadenilasyon ile tetiklenebileceğini gösteriyor. Zebra balığında, miR-430'ün, ilk önce hızla deadenilasyonu tetikleyerek, bozunma için yüzlerce maternal

mRNA'yı hedeflediği gösterildi [47]. Drosophila hücrelerinde, deadenilasyona Ccr4-Caf1-Not poli(A) nükleaz kompleksi aracılık etmektedir [48].

Sitoplazmik poli(A) bağlanma proteinleri (cytoplasmic poly(A) binding protein-PABP), poli (A) kuyrukları ve 5' ucuna bağlanan eIF4F kompleksi ile etkileşime girer, böylece mRNA'nın iki ucunu bir araya getirir [49]. Bu etkileşim, hem translasyon başlatılması hem de mRNA stabilitesi için önem taşır [50]. MiRNA'ların translasyonu baskıladığı önemli bir aşamada başlatma basamağı olduğu için, hedef mRNA üzerinde 5'-3' ucu etkileşimini bozmak için; miRNP ile oluşturulan deadenilasyonun kolaylaştırılması, translasyon başlatmayı indirgemenin etkili ve dolaysız bir yolunu sunar. Birkaç çalışma, özellikle başlatma aşamasında, deadenilasyon miRNA aracılı translasyonel baskının bir sonucu değil de, nedeni olduğunu düşündürüyor. Hedef mRNA'nın 5'UTR'sindeki bir kök-döngüyle translasyon başlatma işlemini bloke etmek, onun hızlı deadenilasyonunu ve miRNA tarafından indüklenen bozunmayı ortadan kaldırdığı gösterilmiştir [39].

2.1.4. MikroRNA Ekspresyonun Hastalıklar Üzerindeki Etkisi

MikroRNA'lar, viral hepatit enfeksiyonu, metabolik sağlık sorunu, kanser ve enfarktüs gibi çeşitli hastalıklarda farklı ifadeler gösterdiklerinden ötürü, gittikçe değer kazanmaya başlamıştır [51].

2.1.4.1. MiRNA'nın Terapötik Moleküler Temeli

MiRNA, mRNA'ların üçüncü çevrilmemiş bölgesine (UTR) diziye-özü hibridizasyonu yoluyla, birden fazla hedef genin ekspresyonunu düzenler ve hedef mRNA'ların doğrudan indirgenmesini veya translasyonunu engeller. miRNA'lar, hedefin tanınması için mükemmel tamamlayıcılığa sahip değildir; bu nedenle, bir miRNA birden fazla mRNA'yı düzenleyebilme imkanına sahiptir [52]. Her bir haberci ribonükleik asit hedefi miRNA hassas etkiler gösterse de, kombine edilen sonuç önemlidir ve ölçülebilir fenotipik sonuçlar bununla oluşturulmuştur. MiRNAlar, genlerin tüm ağını etkileyecek; ve bu miRNA'ların yeteneği günümüz ilaçlarının özgüllüğünden farklıdır ve çeşitli biyolojik süreçlerde muazzam bir terapötik potansiyel sağlarlar [53]. Birden çok hayvan türünde, miRNA'lar korunmuştur; bu da, evrimsel süreçte miRNA'ların, esas olarak biyolojik süreç ve yollarda modülatör olarak önemini

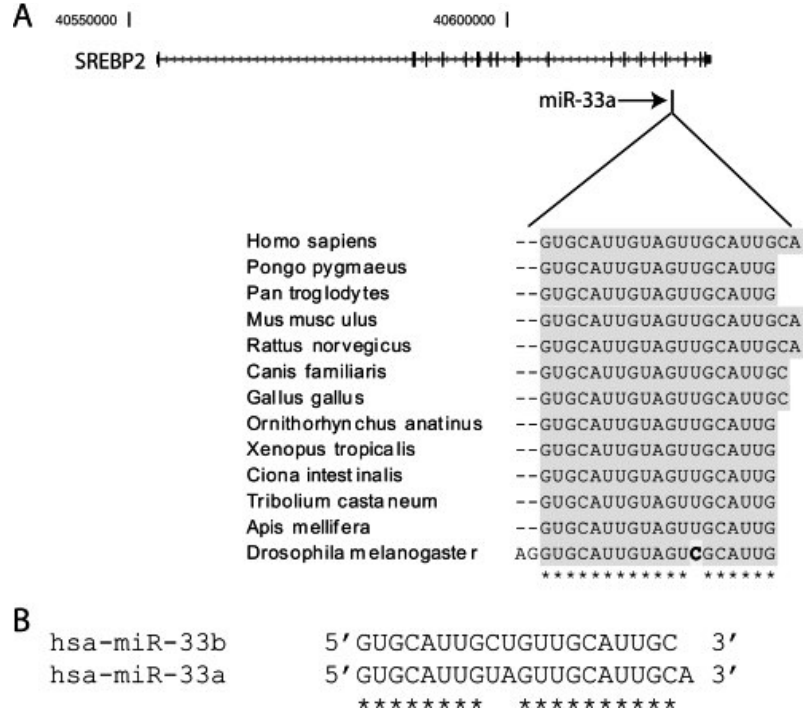
gösterir. MiRNA aktivitesini modüle etmek için ya viral vektör kullanılarak aşırı ekspresyon sağlanır ya da bir miRNA'nın performansını yeniden kuran suni çift sarmallı miRNA'lar kullanılır [54].

2.1.4.2. Biyobelirteç olarak miRNA'lar

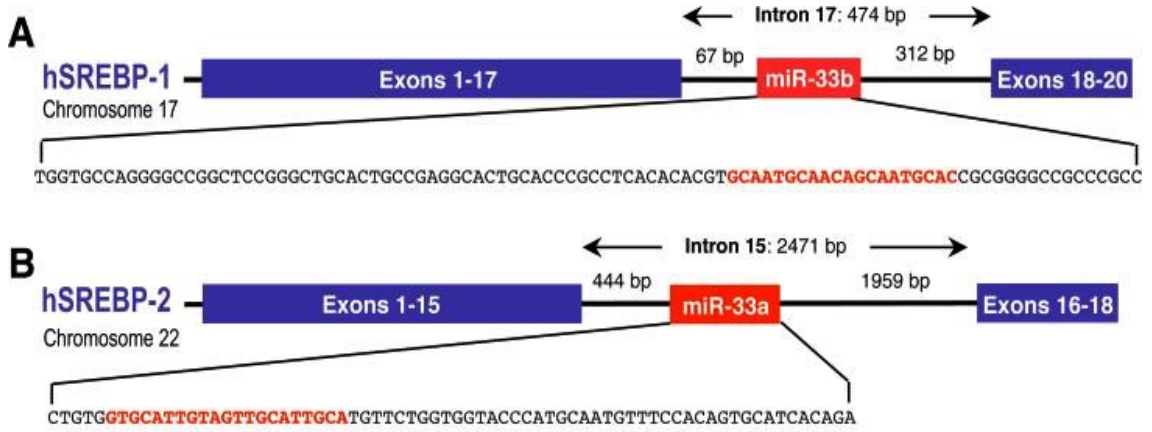
MiRNA'nın hücre dışı boşlukta bulunmasının, hücre-hücre iletişimini oluşturmasının, plazma, idrar, tükürükte bulunmasının ve son yıllarda bulunan lipoproteinlerin üzerinde taşınmasının keşfi, miRNA aracılı yolların karmaşıklığının artmasına yol açmıştır. Bu, dolaşımdaki miRNA'ların, kardiyovasküler hastalıklar, DM ve disregüle metabolizmanın diğer terimleri de dahil olmak üzere çeşitli hastalıklarda biyolojik belirteç olarak kullanılabilmesi önerisine yol açmıştır. MiRNA'nın salgılanmasından sorumlu hücre mekanizmasının anlaşılması eksik olsa da, miRNA'ların eksozomlar, mikrovesikül ve apoptotik cisimler içine paketlenmesi gösterilmiştir [55,56]. Hastalık başlangıcından önce, kodlanmamış RNA'ların hastalıklı dokulardan aktif şekilde salındığını giderek daha fazla kanıt desteklediğinden, miRNA'ların biyolojik belirteç olarak kullanılacaklarına dair heyecan giderek artmaktadır. Hücre dışı miRNA'ların hem tanı hem de terapötik ajanlar olarak muazzam bir potansiyele sahip olabileceği görüşü gün geçtikçe kuvvet kazanmaktadır [57].

2.2. MikroRNA-33a

Drosophila'dan insanlara yapılan organizmalarda SREBP genlerinin intronik dizileri içinde, oldukça korunmuş bir miRNA ailesi olan miR-33 bulunmaktadır [58].



Şekil 2.2-1. SREBP2 içinde miR33a lokalizasyonu ve dizilerin evrimsel korunumu. (A) gömülü miR-33a dizisine sahip olan insan SREBP2 lokusunun evrimsel korunumu da dahil olmak üzere şematik gösterimi. (B) insan miR-33a ve miR-33b'nin hizalanması [59].



Şekil 2.2-2. SREBP ve miR-33 ailesi.

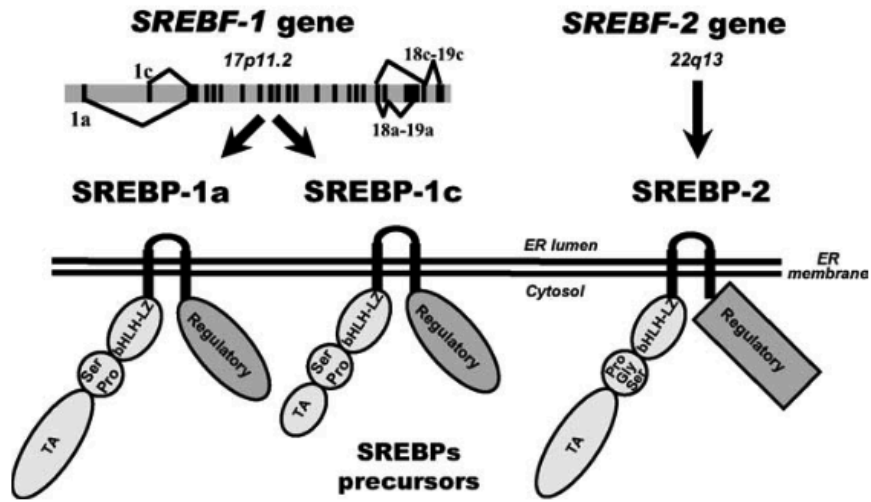
SREBPler, SREBP'ler ile birlikte ifade edilen, korunmuş intronik miR-33a / b'nin konakçı genleridir. İnsan SREBP-1 (**A**) ve SREBP-2 (**B**) genleri, ilgili intronik miRNA'ları barındırır (sırasıyla miR-33b ve miR-33a). Pri-miRNA'ları kodlayan sekanslar, olgun miRNA dizileri kırmızı ile vurgulanmış olarak gösterilir [60].

İnsanlarda miR-33'ün iki izoformu mevcuttur: kromozom 17'de SREBP-1 geninin 17'inci intronunda bulunan miR-33b ve 22'nci kromozomda SREBP-2 geninin intron 15'inde bulunan miR-33a. Farede ise SREBP-2 geninin intron 15'inde bulunan yalnızca bir tane miR-33 izoformu (insan miR-33a ile korunmaktadır) bulunurken, fare SREBP-1 genindeki intron17, miR-33b'yi barındıran insan intronik sekanslarıyla sekans homolojisine sahip olmadığı gösterilmiştir [60].

2.2.1. SREBP Ailesi

Hem kolesterol hem de FA biyosentetik süreçleri, sterol düzenleyici eleman bağlama proteinleri (SREBPs) olarak isimlendirilen yaygın bir transkripsiyon faktörü ailesi tarafından kontrol edilir. SREBP'ler transkripsiyonel olarak endojen kolesterol, FA, trigliserid (TG) ve fosfolipid sentezi için gerekli olan bir enzim kaskatını aktive eder. Böylece, SREBP'ler, kolesterogenezis ve lipogenezin ana düzenleyicileri olarak tanımlanmaktadır [61].

SREBP'ler endoplazmik retikül (ER) zarlarına bağlanan 1150 amino asit (aa) inaktif prekürsör olarak sentezlenen bazik heliks-loop-heliks-lösin fermuar (bHLH-LZ) transkripsiyon faktörleridir [61].



Şekil 2.2.1-1. SREBPs genleri ve yapısı.

[63]

SREBP ailesi üç üyeden oluşur: İnsan kromozomu 17p11.2'de bulunan SREBF-1 adlı tek bir genden üretilen SREBP-1a ve 1c [62] ve insan kromozomu 22q13 üzerinde bulunan SREBF-2 adlı ayrı bir genden SREBP-2'yi içerir [63]. SREBP-1a ve 1c transkriptleri, alternatif transkripsiyon başlangıç siteleri kullanılarak üretilir ve ilk ekzonlarında (ekson 1a ve ekson 1c) farklılık gösterir. Diğer ekzonlar her iki izoformda da ortaktır. İnsanlarda, 3 'ucunda alternatif ekleme de tarif edilmiştir (ekson 18a ve 19a veya ekson 18c ve 19c)

Her SREBP öncüsü üç alan halinde düzenlenmiştir: (a) transaktivasyon alanını içeren yaklaşık 480 amino aside sahip olan bir NH₂-terminal bölgesi, serin ve prolin bakımından zengin bir bölge ve DNA bağlama ve dimerizasyon için bHLH-LZ bölgesi; (b) ER lümenine uzanan yaklaşık 30 amino aside sahip kısa bir ilmekle kesilen iki hidrofobik transmembran kapsayan segmentler; ve (c) a \approx 590 aa COOH-terminal segment düzenleyici bölge (Şekil 2.2.1-1.). Aktivasyona bağlı olarak, ER sabitlenmiş SREBP öncüsü, SREBP'nin nükleer formu (nSREBP) olarak adlandırılan NH₂-terminal aktif alanını serbest bırakmak için sıralı bir iki aşamalı bölünme sürecine girer. BHLH-LZ alanı, nSREBP'lerin çekirdeğe taşınmasına izin veren, doğrudan importin'e bağlanan yeni bir nükleer lokalizasyon sinyali türünü içerir. Çekirdek içine translokasyon yapıldıktan sonra nSREBPs, kolesterologenezis ve lipogenezde yer alan birçok genin sentezlenmesinden sorumludur [64-66].

SREBP-1a, daha uzun NH₂-terminal transaktivasyon alanına sahip olduğu için SREBP-1c'den daha güçlü bir transkripsiyonel aktivatördür (Şekil 2.2.1-1.) [67]. Bununla birlikte, SREBP-1c karaciğer, beyaz adipoz doku (WAT), iskelet kası, adrenal bez ve beyinde özellikle yüksek seviyelerde olan fare ve insan dokularının çoğunda ifade edilen baskın izoformdur. Buna karşılık, SREBP-1a, hücre çoğalması için yüksek kapasiteli, dalak ve bağırsak gibi hücre çizgilerinde ve dokularında yüksek düzeyde eksprese edilir [68].

Bazik alanlarında iyi korunmuş bir arginin kalıntısı içeren diğer bHLH-LZ transkripsiyon faktörlerinin aksine, SREBP'ler bir tirozin kalıntısı içerir [69].

SREBP transkripsiyon faktörleri üç seviyede düzenlenir: (1) transkripsiyon, (2) SREBP öncüllerinin proteolitik bölünmesi ve (3) nSREBP'lerin translasyon sonrası modifikasyonu. SREBP izoformlarında düzenleyici mekanizmaların bazılarında çakışmaları olmasına rağmen, önemli farklılıklar mevcuttur. Özellikle, SREBP-1a ve SREBP-2'nin öncelikle öncül bölünme seviyesinde düzenlendiği görülürken, SREBP-1c'nin esas olarak transkripsiyonel seviyede düzenlendiğine dair kanıtlar mevcuttur.

2.2.2. ABCA1

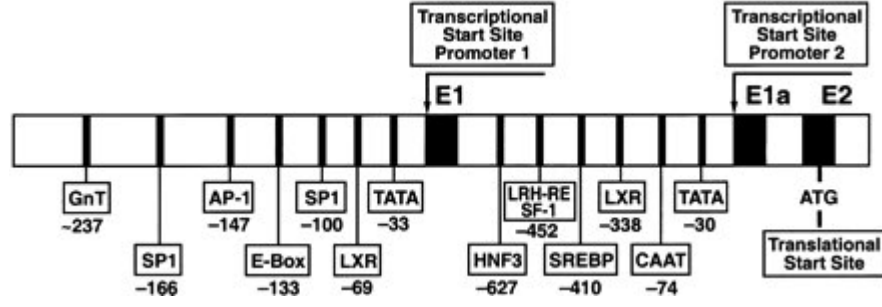
ABCA1 geninde oluşan mutasyondan dolayı meydana gelen otozomal resesif kalıtsal bir hastalık olan Tangier hastalığının (TH) keşfinden sonra, ABCA1'in çeşitli fonksiyonları anlaşılmıştır. Bu hastalıkta ciddi HDL eksikliği gözlemlenir [70].

ABCA1 geninde homozigot mutasyona sahip Tangier hastalarında HDL ve apoA1 yok olmakla birlikte, azalmış düşük yoğunluklu lipoprotein (LDL) seviyesi (% 40 normal) ve hipertrigliseridemi görülmektedir [71,72].

ABCA1'nin Yapısal ve Fonksiyonel Analizi: İnsan ABCA1 gen promotörü ilk önce ekson 1'in (221 bp) yukarı akış yönünde, ardından 24-kb intron 1 olarak rapor edildi (Şekil 2.2.2-1). Reporter gen konstruktlarını kullanarak bu promoterin analizleri, ABCA1 gen ifadesini düzenleyen önemli fonksiyonel motifleri tanımlanmıştır [71].

Cavelier ve ark. [73] ekzon 1'in (ekson 1a) 136 bp uzunluğunda ve ekzon 2'nin 2,210 bp yukarı akışında yer aldığını tespit etmiştir (Şekil 2.2.2-1). Bu alternatif olarak eklenmiş transkript insan ABCA1 kod dizisinin tamamını içerir ve testis ve karaciğerde ifade edilir, ancak makrofajlarda söz konusu özellik gözlemlenmemiştir.

Ekzon 1a'nın yukarı akışında, bir TATA kutusu ve CAAT alanları ile birlikte sterol algılayan nükleer reseptörler için diğer potansiyel bağlanma alanları içeren alternatif bir promotör olarak tanımlanmıştır [74].



Şekil 2.2.2-2. İnsan ABCA1 gen promotörü.

İnsan ABCA1 geninin tanımlanan iki promotörünün organizasyonunun şematik bir modeli gösterilmiştir. Ekzon 1, 1a ve 2 gösterilir. Her iki promotörde ABCA1 gen ifadesini düzenleyen motiflerin yerleri gösterilmektedir. AP-1, aktivatör protein 1; HNF-3, hepatosit nükleer faktör 3; LRH-RE, karaciğer reseptör homolog yanıt elementi; SREBP, sterol düzenleyici element 1-bağlayıcı protein [75].

Subselüler Lokalizasyonu: ABCA1 esas olarak plazma membranına lokalize olmakla birlikte, bazen de hücre içi bölmelerde lokalize olur. ABCA1 aracılı HDL oluşumu için iki farklı mekanizma önerilmiştir. Birincisi, ABCA1'in, hücre yüzeyi üzerinde fosfolipidler ve kolesterol ile apoA-I'in kompleks oluşumuna (hücre yüzeyi modeli) aracı olduğu ve diğerinin apoA-I'in hücre yüzeyi üzerinde ABCA1'e bağlandığı ve ABCA1 / apoA-I komplekslerinin daha sonra oluşturulduğu gözlemlenir. ApoA-I / lipid kompleksleri, geç endozomlarda oluşur (muhtemelen ABCA1 aktivitesi yoluyla) ve ekzositoz (retro-endositoz modeli) ile yeniden salgılanır [76,77].

ApoA-I'e doğru olan ABCA1 aracılı kolesterol akışının ağırlıklı olarak hücre yüzeyinde olduğu ve retroendositoz yolunun HDL oluşumuna önemli katkıda bulunmadığına dair birçok rapor bulunmaktadır. ABCA1 / apoA-I'in retroendositoz yolu, aşırı lipoproteinden türetilen kolesterol hücrelerde biriktiğinde HDL oluşumuna katkıda bulunur [78,79].

Transkripsiyonel Regülasyonu; ABCA1 aracılı kolesterol akışı, transkripsiyonel seviyede oldukça düzenlenmiştir. Makrofajlar ve fibroblastlar gibi çevresel hücrelerde ABCA1 gen ekspresyonu kolesterol yüklemesi ile arttırılır [80].

Bu tepki, ligandları 22- (R) -hidroksi kolesterol, 24- (S) -hidroksi kolesterol, 27-hidroksikolesterol ve 24- (S), 25-epoksi-kolesterol gibi sterol metabolitleri olan nükleer reseptörler olan LXRA ve LXRb ile sağlanır [81].

LXRb, her yerde eksprese edilirken, LXRA ekspresyonu, karaciğer, yağ dokusu, adrenal bezler, bağırsak, akciğerler, böbrekler ve miyeloid kaynaklı hücrelerle sınırlandırılmıştır. İnsan LXRA ekspresyonu yüksek oranda düzenlenir ve kendiliğinden düzenlenebilir, oysa insan LXRb'ı aşırı kolesterol yokluğunda bile stabil olarak eksprese edilir. Bazal halde, LXRb ve retinoid X reseptör (RXR) heterodimerleri, hedef genlerin promotörlerinde karaciğer X cevap elementlerine (LXRE) bağlıdır [82].

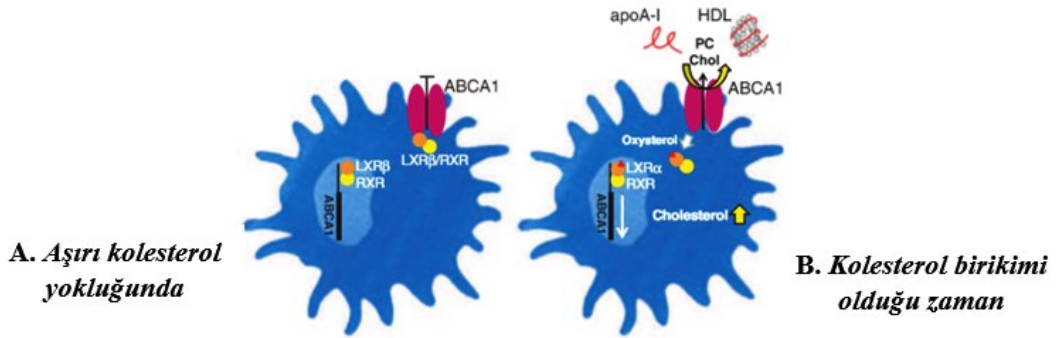
Kolesterol hücrelerde birikirse, hücre içi oksisterol konsantrasyonları artar; Daha sonra, oksisterollerin bağlanması yoluyla aktive olan LXRb, ABCA1'in [83] ve ayrıca LXRA'nın transkripsiyonunu uyarır. İlginç olarak, farelerin veya sıçanların kolesterol beslemesi, hepatik ABCA1 mRNA ekspresyonunda belirgin bir artış göstermekte başarısız olmuştur. Sterol düzenleyici eleman bağlama protein 2'ye (SREBP-2) yanıt veren bir destekleyici bölge, ABCA1 geninin ilk intronunda tanımlandı ve karaciğerde ABCA1 ekspresyonunun düzenlenmesinde yer aldığı bildirildi [84].

Son zamanlarda, bir kolesterol sentezinin transkripsiyonel bir düzenleyicisi olan SREBP-2'yi kodlayan genin içinde bulunan bir intronik mikroRNA olan MiR-33'ün, transkripsiyon sonrası seviyede ABCA1'in ekspresyonunu modüle ettiği bulunmuştur [60,85].

ABCA1 Aktivitesinin Post-Translasyonel Regülasyonu; ABCA1 aracılı kolestrol iletimi ayrıca translasyon sonrası seviyede yüksek oranda düzenlenir. Kolesterol, hücrelerin vazgeçilmez bir bileşenidir, çünkü aşırı kolesterol eliminasyonu da hücre ölümü ile sonuçlanabilir. Sonuç olarak, aşırı eliminasyonun önlenmesi için ABCA1'i hızla indirgeme yeteneği de önemlidir. Aslında, ABCA1 proteini, 1-2 saatlik yarılanma ömrüyle hızla döner [86].

A1-syntrophin, b1-syntrophin, calmodulin ve apoA-I gibi çeşitli proteinlerin ABCA1 ile etkileşime girdiği ve ABCA1 proteininin bozunum hızını azalttığı bildirilmiştir [87,88].

ABCA1'in bozunması çeşitli yollarla düzenlenir: (a) hücre yüzeyindeki ABCA1, endositozlanır ve plazma membranına yerleştirilir veya bozunma için erken ve geç endozomlar yoluyla lizozomlara gönderilir [89,90]; (b) kalpain proteazı, özellikle apoA-I ABCA1'e bağlanmadığında [91], plazma zarında ABCA1'i hücre içinde parçalamaktadır. Kalpain proteaz plazma zarında [86,92] ABCA1'i ve hücre içi olarak, özellikle apoA-I ABCA1'e bağlanmadığında [91] degrade olur. Buna ek olarak, ABCA1, ubiquitin-proteazom yolu ile de bozunur [79]. ApoA-I ayrıca PKCa'yı ve ABCA1'in fosforilasyonunu da aktive eder. Bu reaksiyon, ABCA1'i kalpain tarafından bozunumuna karşı korur [93].

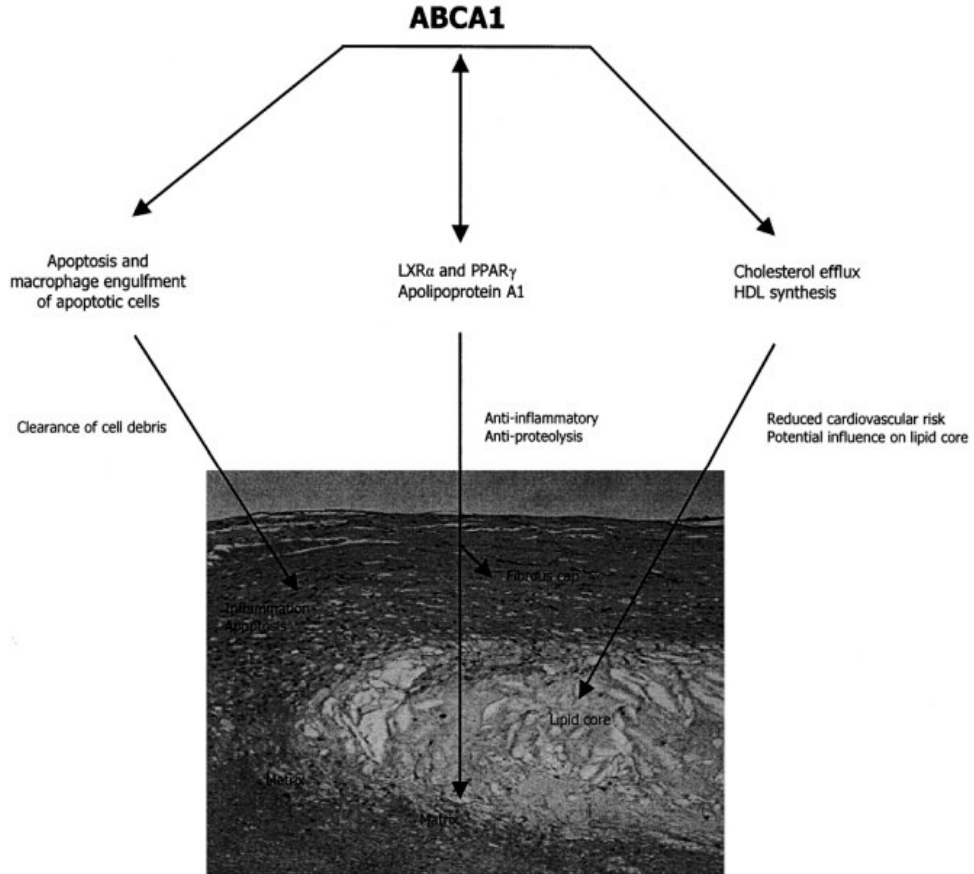


Şekil 2.2.2-3. Kolesterol yokluğunda ve birikiminde, ABCA1 düzenlenmesi.

(A) LXRb / RXR kompleksi, oksisterollerin hücre içi konsantrasyonu düşük olduğunda ABCA1'e bağlanır ve ABCA1-LXRb / RXR kompleksi plazma membranı üzerine dağıtılır ancak kolesterol iletimi açısından etkisizdir. (B) Kolesterol birikip ve oksisterollerin hücre içi konsantrasyonu arttığında, oksisteroller LXRb'ye bağlanır ve LXRb / RXR kompleksi ABCA1'den ayrılır. LXRb / RXR'den bir kere serbest kaldığında, ABCA1 HDL oluşumunda aktiftir ve lokal kolesterol konsantrasyonunu hemen düşürür. Oksisterollere bağlandıktan sonra, LXRb / RXR ABCA1'in ve diğer genlerin transkripsiyonunu aktive eder. Sonuç olarak, LXRb, kolesterol homeostazını korumak için bir translokasyon sonrası tepki yanı sıra translokasyon sonrası bir yanıtı neden olabilir [76].

ABCA1 için Lipid Alıcısı; Kolesterol ve fosfolipidler çok hidrofobik olduğundan dolayı, lipid sekresyonu için onları sulu solüsyonlarda çözebilen lipid alıcıları gereklidir. Amfipatik heliksleri içeren anfiyolojik koşullar, apoA-I ve apoE, ABCA1 tarafından serum içine salınan lipidlerin alıcıları olarak işlev görür. Sentetik amfipatik helikal peptid, ABCA1 eksprese eden hücrelerden kolesterol ve fosfolipid iletimini de yükseltir [94-96].

ABCA1 ve ateroskleroz ilişkisi; Aterosklerotik plak kompozisyonu plak bozulmasının ve takip eden komplikasyonların ana belirleyicisidir. Bir ateromatöz plağın aetiyo patogenezi, lipid metabolizması, düzensiz hücre döngüsü ve hücre dışı matriks turnoverından etkilenir. ABCA1, bu olayların tümünde rol oynar, bu nedenle bu taşıyıcıyı aterosklerotik vasküler hastalığın başlatılması, ilerlemesi ve patogenezi potansiyel olarak etkileyebilir [97].



Şekil 2.2.2-4. ABCA1'in aterosklerotik plaka üzerindeki etkisi.

[97]

Aterosklerotik plak; lipidler, hücreler ve hücre dışı matristen oluşan dinamik bir yapıdadır. Kararsız plakalarda ince bir kap, yoğun inflamatuvar infiltrat ve büyük bir lipid çekirdeği bulunurken, gelişmiş kararlı yapıdaki plaklar yüksek seviyede kollajen ve düz kas hücreleri ile kalın bir fibröz kap oluştururlar (43). Kararsız plaklar daha sonraki in situ trombozu ve embolisi (44) ile rüptür olma eğilimi gösterir, bu da belirgin klinik sonuçlara yol açar. Bu plakların davranışı öngörülebilir değildir ve kararsızlığa geçişin kesin mekanizmaları tam olarak anlaşılammıştır. Plakların gelişimi ve ilerleyişi üç ana bileşendeki değişikliklerle belirlenir ve ABCA1, plak mimarisini düzenleyen tüm süreçleri potansiyel olarak etkileyebilir; bu mekanizmalar şu şekildedir: (1) lipid birikimi ve metabolizması; (2) apoptoz ve iltihap içeren hücre döngüsünde değişiklikler; (3) değişmiş ekstrasellüler matriks dönüşümü [97].

2.2.3. miR-33a'nın Metabolizmadaki Görevi

Srebp2 ve Srebp1'in hızla ekspresyonunu hızlandıran metabolik uyarılar, miR-33a / b ifadesini de ayarlarlar; bu da, miR-33a ve miR-33b'nin konakçı genleri ile birlikte sentezlendiğini gösterir.

Her bir miRNA hedef geni, ABCA1, ABCG1, NPC1, CPT1A, CROT ve HADHB de dahil olmak üzere hücre kolesterolü ihracı ve yağ asidi oksidasyonunu düzenlemekle ilgilidir ve bu durumla birlikte, SREBP transkripsiyon elemanları ve miR-33a / b'nin LDL kolestrol ve yağ asidi metabolizmasında iş birliği yaptığı görülmüştür [98].

Endolizozomal nakil proteinleri Niemann-Pick C1 (NPC1) ve ATP-bağlayıcı kaset (ABC) taşıyıcıları ABCG1 ve ABCA1 gibi kolestrol ihracatı ile ilgili genler miR-33a tarafından hedeflenir.

miR-33a seviyesindeki bir değişiklik, makrofajlardaki kolesterolün akışındaki etkileri kapsar; bu nedenle, lipoproteinin in vivo düzenlenmesi, miR-33a'ya atfedilebilir [99].

2.2.4. miR-33a'nın Ateroskleroz'daki Görevi

Aterosklerotik lezyonların gelişiminde, makrofajlar arterin intimasında birikir. Apoptotik hücreler efferasitoz ile temizlendiğinden, erken lezyonlar aterosklerozda nadiren bulunurlar. Makrofajlar aterosklerotik plakların oluşumuna katıldığında, iltihaplanmayı gidermede başarısızlığa katkıda bulunan ve düz kas hücrelerini inflamatuvar sürece dahil eden göç etme kapasitesinde azalma gözükmektedir [100]. Bu ileri plaklarda makrofajlar inflamatuvar sitokinleri salgılar ve nekroz ve apoptoz meydana getirir ve fibröz kapak daha incedir ve rüptüre eğilim gösterir, böylece tromboza neden olur [101,102].

Ters kolesterol taşınması sırasında (RCT), ATP-bağlayıcı kaset A1 (ABCA1), kolesterol ve fosfolipidleri, zarın içerisinden dışına doğru taşır; burada, apolipoprotein A-1'in (ApoA-1), lipit bileşenlerini, daha büyük HDL üretmek için; yeni oluşmuş HDL'ye taşır [103,104].

Transgenik farelerde, insan ABCA1'in aşırı ekspresyonu, makrofajlardan artmış kolesterol akışı ile sonuçlandı. Bu, artmış ABCA1 aktivitesinin in vivo ateroskleroza karşı koruyabileceği anlamına gelir [105]. Makrofajlarda mikroRNA-33a'nın (miR-33a) bir ifadesi anormal şekilde artarsa, ABCA1 ifadesi aşağı doğru düzenlenir ve RCT düzgün şekilde çalışmayabilir. Hepatositlerde ve makrofajlarda, ABCA1 antitetik olarak miR-33a ifadesine eksprese edilir [98,106].

MiR-33a / b'nin aşırı ekspresyonu hepatik hücre dizilerinde hem yağ asidi oksidasyonunu hem de insülin sinyalini azaltır [107]. Bununla birlikte, bir anti-miR-33a oligonükleotidi hücrelere verildiğinde, miR-33a'nın ABCA1 ekspresyonu üzerindeki önleyici etkisi hafifletilmiş olur [108,109]. Bu nedenle, anti-miR-33a oligonükleotidleri ABCA1 veya HDL ekspresyonunu artırmak için terapötik bir araç olarak araştırılmaktadır [110,111].

2.2.5. Kolesterol ve Yağ Asidi Metabolizmasının Düzenlenmesi ve miRNA

Lipit homeostazı, sentez ve kolesterol, FA'lar, trigliseridler ve fosfolipidlerin alımının yanı sıra NADPH kofaktörü için gerekli 30 genin sentezini direkt olarak aktive eden sterol-düzenleyici eleman bağlama proteinleri adı verilen, membrana bağlı transkripsiyon faktörleri ailesinden düzenlenir. SREBP izoformlarının arasında, SREBP1, FA metabolizması ve denovo lipogenezinde rol oynayan genlerin aktive edilmesinde seçici olarak yer alırken, SREBP2 direkt olarak kolesterol homeostazı ile ilgili genler için daha seçicidir [112]. Farelerde anormal SREBP ifadesi, insanlardaki spesifik lipid metabolizma bozukluklarına benzer fizyolojik etkilere sahip metabolik sendroma (MS) yol açar [81].

SREBP'nin yanı sıra karaciğer X reseptörü (LXR'ler) de kolesterol metabolizmasının önemli transkripsiyonel düzenleyicilerindendir [113]. LXR α (NR1H3) ve LXR β (NR1H2) nükleer reseptörleri, retinoid X reseptörleri ile heterodimerler oluşturur ve kolesterol biyosentezi sırasında oluşan oksisterol ara maddeleri de dahil olmak üzere çeşitli sterol ile aktive edilir [114]. LXR, Abca1 ve Abcg1 dahil olmak üzere, hücrel kolesterol akışı ile ilgili genlerin transkripsiyonunu aktive eder. LXR, ayrıca, SREBP1'ı etkiler ve böylece FA sentezini artırmak için bu yolaklar arasındaki çapraz akıma aracılık eder [115]. LXRA geninde hedeflenen silinmenin gerçekleştiği farelerde, SREBP1c, yağ asidi sentaz (FAS), SCD1 (stearoil CoA desaturaz 1) ve ACC (Asil CoA Karboksilaz) ekspresyonunda yetersiz olduğu kaydedildi [116].

2.2.6. Lipit Metabolizması Üzerine Etkisi

Son yıllardaki araştırmalar, lipid metabolizma genlerinin post-transkripsiyonel düzenlenmesinde yer alan dolaşımdaki miRNA'ları tanımladı; bu miRNA'lar, kolesterol metabolizma genlerinin post-transkripsiyonel düzenlenmesiyle ilişkilendirilen miR-33'ü içerir [98].

miR33a ve miR33b, birçok intronik miRNA gibi konak genleriyle birlikte kopyalanırlar ve kolesterol homeostazını (Abca1, Abcg ve Npc1) [59,110] ve yağ asidi metabolizmasını (Ampk, Cpt1a, Crot, Hadhb ve Sirt6) düzenleyen genleri hedef alırlar [59,117].

MiR biyogenezi sırasında oluşan premiR33 (hem de diğeri premiR'ler), dicer ile parçalanıp, olgun miR33 ve geçiş miR33 (miR33*) ipliklerinden oluşan bir miR33 dupleksi oluşturulur [118]. Kolesterol metabolizması içinde, hem miR33 hem de miR33*, sırasıyla, kolesterolü HDL parçacıklarına yüklemek ve hücredeki lizozomal bölmeden kolesterol taşınımı için önemli moleküller olan ABCA1 ve Niemann-Pick hastalık C1'i (NPC1) hedef alır [117].

miR 33'ün kendisi, ABCA1'e benzer bir işleve sahip olan, HDL oluşumunu ve ters kolestrol taşınmasını (örneğin, aterosklerotik plak makrofajlarından karaciğere geri dönerek kolestrol taşınmasını) sağlayan farelerde ABCG1'i hedef aldığı gösterilmiştir; Ancak bu hedef insanlarda doğrulanmamıştır [60]. İlginç şekilde hem ABCA1 hem de ABCG1, LXR'nin transkripsiyonel kontrolü altındadır [60] ve böylece miR33, SREBP ile indüklenen kolestrol sentezi ve tutulumu ile LXR aracılı kolestrol akışı ve ters kolestrol taşınımı arasında bağlantı oluşturmaktadır [119].

miR 33, her ikisi de safra kanallarına kolestrol akışı için önemli moleküller olan ABCB11 ve ATP8B1'i hedef alır; bu nedenle bu hedefleme, hepatositlerde SREBP ve miR33'ün upregülasyonundan kaynaklanan kolestrol tutulumunu desteklemektedir. Bu upregülasyon, düşük dolaşımdaki kolestrol düzeyleri veya statin tedavisi dahil olmak üzere hücre dışı sinyaller ile indüklenebilir [120].

Yağ asidi metabolizmasındaki hem miR33 hem de miR33* için doğrulanmış hedefler arasında karnitin palmitoiltransferaz 1A (cpt1a) ve karnitin O-oktaniltransferaz (CROT) bulunur [121]. Ayrıca miR33*, sterol reseptör koaktivatörü 1 (SRC1), SRC3, Nükleer transkripsiyon faktörü Y (NFYC) ve reseptör etkileşen protein 140 (RIP140)'ı hedef alırken, miR33 ayrıca hidrosil açıl-Co-A-dehidrojenaz (HADBDH), sirtuin 6 (SIRT6) ve AMPK α 'yı hedef alır. Bu moleküllerin hepsini transkripsiyonel olarak düzenleyerek, hem miR33 hem de miR33*, yukarı regüle edildiğinde yağ asidi oksidasyonunu azaltır ve bunun tersi de aşağı yöne çevrildiğinde süreci uyarır [117]. MiR 33 aynı zamanda insülin reseptör substrat 2'yi (IRS2) hedefleyerek hem yağ hem de glikoz metabolizmasını etkileyerek insülin sinyalizasyonunu etkiler; glikoz metabolizması da glikoz-6-fosfataz (G6PC) ve fosfoenolpiruvat karboksil kinaz hedeflemesinden etkilenir [117]. Dolayısıyla, HDL düzeylerinde bir artışa ve yağ

asitleri ve glikoz düzeylerinde bir düşüşe neden olacağı için, sinyal verme yöntemlerinin terapötik aşağı düzenlenmesi, aterosklerozdan mustarip hastalarda faydalı olabilir. Bu bulgular, transkripsiyon faktörlerini kodlayan Srebp genomik lokusunun ve miR 33a / b'nin lipid metabolizmasını düzenlemek için işbirliği yapabileceğini ortaya koymaktadır [111,119].

Farklı stratejileri kullanarak miR33'ün inhibisyonu faredeki plazma yüksek yağlı lipoproteinlerini (HDL) artırır ve farelerde aterosklerozun ifadesini artırır [122]. Tamamen bu gözlemler, intronik miRNA'ların benzer hücresel süreçleri düzenlemek için konakçı genlerle birlikte çalıştıklarını göstermiştir.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Örnek Seçimi Ve Tanımı

Çalışma Türk Kardiyoloji Derneği'nin belirlemiş olduğu Trigliserid seviyeleri referans alınarak; Trigliserid seviyesi 150 mg/dl'den yüksek (n=29) ve 150 mg/dl'den düşük (n=38) olmak üzere iki ana gruptan ve her iki grupta; Ateroskleroz Hasta grubu, ve Sağlıklı Kontrol grubu olmak üzere 2 alt gruptan oluşmaktadır. Çalışmaya Marmara Üniversitesi Pendik Eğitim ve Araştırma Hastanesi Kalp ve Damar Cerrahisi Anabilim Dalı'na başvuran hastalar ve check-up kontrolü için yine aynı kliniğe başvuran sağlıklı kontroller dahil edildi.

3.2. Kullanılan Malzemeler ve Cihazlar

3.2.1. Kullanılan Sarf ve Ayraç Malzemeler

mikroRNA İzolasyon Kiti (miRNeasy Serum/Plazma Kit, Qiagen): Trizol (Quiazol, Qiagen), Kloroform (Sigma Aldrich) %100 Etanol (Sigma Aldrich), cDNA Reverse Transkripsiyon kiti (miScript II Kit, Qiagen): mikroRNA Universal Primer (Qiagen), miScript SYBR Green PCR Kit (Qiagen), miReasy Spike in kontrol (mir39, Qiagen), mikroRNA Primer Assay (hsa-miRNA33a-5p, Qiagen), mikroRNA Housekeeping Assay (SNORD68, Qiagen),

İzolasyon için kullanılan RWT Tamponu Guanidine tuzu içerir ve işlem den hemen önce 44 µl etanol eklenerek hazırlanır. RPE Tamponu izolasyon sırasında kolonlarda kalan tuz ve kalıntıları uzaklaştırmak için kullanılır ve 30 µl etanol eklenerek hazırlanmıştır.

Fluometre ile mikroRNA düzey belirleme: miRNA özgü Reagent, miRNA tamponu ile çalışma solüsyonu hazırlanır. Cihaz kalibrasyonu 10ng/µl rRNA içeren standart 1 ve 250pg/µl rRNA standart 2 kullanılarak yapılır. (Qubit 3.0 microRNA Assay kit, Invitrogen, Thermo Fisher Scientific Inc).

Real Time PCR 96 Well Plate (Thermo Fisher Scientific Inc), DNase RNase free 18m Ω su, Microamp Clear Adhesive Film.

3.2.2. Kullanılan Cihazlar

DNA İzolasyon Robotu (iPrep Purelink, Invitrogen, Thermo Fisher Scientific Inc), NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific Inc), Gerçek Zamanlı PZR (Lightcycler 480 II Instrument, Roche Diagnostics), Gerçek Zamanlı PZR (Fast Real Time 7500, Applied Biosystems), Fluorometre (Quibit 3.0, Invitrogen, Thermo Fisher Scientific Inc), Plate Santrifüj (Hettich), Santrifüj (Centrifuge 22R, Beckman Coulter), +4°C Buzdolabı (Haier), -20°C Buzdolabı (Haier), Ultra saf su cihazı (Purelab option Q, Elga), Vorteks (V.I. Plus Biosan), Pipet Takımı (Thermo Fisher Scientific Inc).

3.3. Yöntemler

3.3.1. MiRNA İzolasyonu ve Safılık Tayini

3.3.1.1. Serumdan mikroRNA İzolasyonu

MikroRNA izolasyonu için hasta ve sağlıklı gönüllülerden düz tüpe alınan kan örnekleri 4500 rpm'de 15 dk santrifüj yapılarak serum elde edilip çalışma yapılana kadar -80°C'de saklandı.

Serum örnekleri -80°C'den çıkarılarak oda ısısında çözünmeye bırakıldıktan sonra 37°C'de inkübe edildi. 200 µl serum steril ependorflara alındı, üzerlerine 1000 µl liziz çözeltisinden (Qiazol Lysis Solution) eklendi ve çalkalandı. Bu işlemden sonra örnekler oda sıcaklığında 5 dk bekletildi ve üzerine stok olarak hazırlanan 3,5 µl "miReasy Spike in kontrol" (1.6×10^8 kopya/µl) ilave edildi. Çeker ocak altında örneklere 200 µl kloroform eklendikten sonra 5dk vorteks cihazı ile çalkalandı ve oda ısısında 3 dk bekletildi. Söz konusu karışım +4°C'de 12.000g'de 15 dk. santrifüj edildi. Üstte bulunan renksiz sıvıdan 600 µl alınarak temiz ependorflara alındı. Ayrılan berrak karışıma 900 µl %100 etanol eklendi ve vorteks cihazı ile karıştırıldı. Bu karışımdan 700 µl alınarak kolonların üstüne konulduktan sonra oda sıcaklığında 15 sn 8000g'de santrifüj edildi ve aynı işlem tekrarlandı. Kolonların üzerine 700 µl RWT tamponu eklendikten sonra 15 sn 8000g'de yapılan santrifüj işleminden sonra supernatant atıldı. Aynı işlem 500 µl RPE tamponu eklenerek tekrarlandı. Aynı kolonlara 500 µl % 80 etanol eklendi, 2 dk 8000g santrifüj edildi, supernatant atıldı. Kolonlar yeni tüplere yerleştirildi ve kuru olarak 5 dk en yüksek hızda santrifüj edildi. Son olarak üzerine 14

μ l RNA free su koyuldu 1 dk en yüksek hızda santrifüjlenerek mikroRNA izolatu elde edildi.

3.3.1.2. cDNA Eldesi

Elde edilen mikroRNA izolatlarına ters transkripsiyon işlemi (Tablo 3.3.1.2-1) uygulanarak (miScript II Kit, Qiagen) cDNA'ya çevrildi (Tablo 3.3.1.2-2). Elde edilen örnekler çalışmaya kadar -20°C 'de saklanmıştır.

Tablo 3.3.1.2-1. cDNA Sentezi için PZR İçeriği

5x miScript Hiflex Buffer	4 μ l
10x miScript Nucleic mix	2 μ l
miScript Reverse Transcriptase Mix	2 μ l
RNA free su	10,5 μ l
mikroRNA	1,5 μ l
Toplam	20 μl

Tablo 3.3.1.2-2. cDNA Sentezi için İnkübasyon Koşulları

60 dk	37°C
5 dk	95°C
∞	95°C

3.3.1.3. MikroRNA Saflık Tayini

RNA örneklerin saflığı Nanodrop2000 cihazı ile ölçüldü ve saflığı $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$ oranı kullanılarak belirlendi. Saflık değeri $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$ değeri 2'den büyük olan örnekler uygun olarak kabul edildi.

3.3.2. MikroRNA Düzeylerinin Belirlenmesi

mikroRNA düzeyleri florometrik olarak belirlendi. İlk aşamada 199µl miRNA Tamponu ve 1µl miRNA Reagent (Qubit microRNA Assay, Invitrogen, Thermo Fisher Scientific Inc) karıştırılarak 200µl çalışma solüsyonu hazırlandı. 10µl standart 1 üzerine 190µl çalışma solüsyonuna eklenerek 1 numaralı standart ve 10µl standart 2 üzerine 190µl çalışma solüsyonuna eklenerek 2 numaralı standart hazırlanmış ve sırayla cihaza standartlar tanıtılmıştır. Her örnek ölçümü için 198µl çalışma çözeltisine 2µl örnek eklenerek toplamda 200µl'lik karışım elde edilmiş ve cihazda okuma yapılarak miRNA düzeylerinin tayinleri yapılmıştır.

3.3.2.1. Eş Zamanlı PZR ile Genotip ve MikroRNA Ekspresyon Analizleri

Çalışma çerçevesinde araştırılması planlanan mikroRNAlar “mirbase” ve “targetscan” veri tabanları (<http://www.mirbase.org/>, <http://www.targetscan.org/>) kullanılarak belirlenmiştir. Aterosklerozun moleküler mekanizması üzerinde farklı etkileri olan mikroRNAlar ve hedef proteinleri bu veri tabanları ile analiz edilmiştir. Lipid metabolizmasında rol alan hsa-miR-33a-5p, trigliserid seviyesi üzerine etkisinin araştırılması üzere seçilmiştir. Seçilen mikroRNA'nın primer dizisi Tablo 3.3.2.1-1'de verilmiştir. MikroRNA ekspresyon seviyelerini karşılaştırmak delta Ct (ΔCt) ve kat değişimi farklarını hesaplamak için 1 internal kontrol (housekeeping assay; SNORD68) kullanılmıştır. mikroRNA düzey belirleme hesaplamaları Livak formülü ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) kullanılarak yapılmıştır.

miRNA ekspresyon analizleri Gerçek Zamanlı PZR cihazında (Fast Real Time 7500, Applied Biosystems) gerçekleştirilmiştir (Tablo 3.3.2.1-2 ve Tablo 3.3.2.1-3). Syber Green (miScript SYBR Green PCR, Qiagen) ile işaretlenmiş cDNA dizisine analiz edilecek mikroRNA primerleri (hsa-miRNA 33a-5p, Qiagen) ve mikroRNA endojen kontrol (housekeeping) primeri (SNORD68, Qiagen) bağlanması sonucunda cihaz tarafından cyber green boyasının floresan ışımaya miktarı saptanılması ile gerçekleştirilmiştir.

Tablo 3.3.2.1-1. Kullanılan mikroRNA primer dizisi

hsa-miRNA 33a-5p	GUGCAUUGUAGUUGCAUUGCA
------------------	-----------------------

Tablo 3.3.2.1-2. MikroRNA Ekspresyon için Eş Zamanlı PZR İçeriği

SYBR Green PCR	12,5µl
Mix miScript Universal Primer	2,5 µl
miScript Primer Assay	2,5 µl
RNAase free su	-
cDNA	7,5 µl
Toplam	25 µl

Tablo 3.3.2.1-3. MikroRNA Ekspresyon için Eş Zamanlı PZR Koşulları

Holding Evresi	95°C	15 dk	40 Döngü
Döngü Evresi	94°C	15 sn	
	55°C	30 sn	
	70°C	34 sn	
Melt Curve Evresi	95°C	30 sn	

3.4. Lipid Profillerinin Ölçülmesi

Plazma kolesterol, TG, VLDL, HDL düzeyleri Marmara Üniversitesi Pendik Eğitim ve Araştırma Hastanesi Biyokimya Anabilim Dalı Laboratuvarlarında bulunan klinik otoanalizatörler ile enzimatik yöntemler kullanılarak ölçülmüştür.

3.5. İstatistiksel Analiz

Bu çalışmanın istatistiksel analizi lisanslı SPSS 25.0 programı kullanılarak yapılmıştır. İstatistiksel anlamlılık sınırı $p < 0.05$ olarak alınmıştır.

Demografik veriler açısından istatistik analizi; Pearson, Fisher's Exact Testi, ileri ki-kare testi (X^2), ve ikili bağımsız örneklem student t-testi ile incelenmiştir. Lipid Değerlerindeki ortalamalar arasındaki farklılık, ikili bağımsız örneklem student t-testi ile incelenmiştir. miR33a Ekspresyon analizi değerlendirmesinde ise, aynı şekilde ortalamalar arasındaki farklılık ikili bağımsız örneklem student t-testi ile belirlenmiştir.

Tanı saptamak amacıyla, MedCalc Programı kullanılarak Alıcı İşletim Karakteristiği (Receiver Operating Characteristic = ROC) analizi yapılmıştır.

miR33a İfade Düzeyleri ile Lipid Değerleri ve Vücut Kitle İndeksi arasındaki ilişki, ikili değişkenli Pearson korelasyon testi ile belirlenmiştir.

4. BULGULAR

4.1. Çalışma Gruplarına ait Demografik Veriler

Tez projemize katılan 38 gönüllüyü içeren Trigliserid seviyesi 150 mg/dl'den küçük kontrol grubu ve 29 gönüllüyü içeren Trigliserid seviyesi 150 mg/dl'den büyük hasta grubunun demografik verileri karşılaştırmalı olarak Tablo 4.1-1'de özetlenmiştir.

Tablo 4.1-1. Kontrol ve Hasta Grubuna ait Demografik Veriler

Grup (n=67)		Kontrol (TG < 150 mg/dl) (n=38)	Hasta Grubu (TG > 150 mg/dl) (n=29)	p değeri / OR
Yaş	($\bar{X} \pm SD$)	59,97 ± 11,98	61,66 ± 10,75	0,554
Cinsiyet (K/E)	% n	%26,3 / %73,7 n=10 / n=28	%51,7 / %48,3 n=15 / n=14	0,033* / 3,00
VKİ (kg/m ²)	($\bar{X} \pm SD$)	26,16 ± 5,79	28,94 ± 4,67	0,033*
VYA (m ²)	($\bar{X} \pm SD$)	1,84 ± 0,17	1,88 ± 0,24	0,417
Diabet	yok	%71,1 n=27	%55,2 n=16	0,179
	var	%28,9 n=11	%44,8 n=13	
KOAİ	yok	%89,5 n=34	%82,8 n=24	0,485
	var	%10,5 n=4	%17,2 n=5	
Sigara	kullanmayan	%50 n=19	%51,7 n=15	0,889
	kullanan	%50 n=19	%48,3 n=14	
Kolesterol İlacı Kullanımı	kullanmayan	%68,4 n=26	%86,2 n=25	0,091
	kullanan	%31,6 n=12	%13,8 n=4	

n=örnek sayısı, $\bar{X} \pm SD$ (Ortalama ± Standart Sapma), OR= Odss Ratio, K/E =Kadın/Erkek, TG=Trigliserid, VKİ=Vücut Kitle İndeksi, VYA=Vücut Yüzey Alanı, KOAİ=Kronik Obstrüktif Akciğer Hastalığı

* Tabloda koyu renk ile işaretlenmiş değerleri istatistiksel olarak anlamlılık göstermektedir (p<0,05).

Gruplar arası farklılıkları ki-kare testi (X^2), ikili bağımsız örneklem student t-testi ile incelenmiştir.

İleri ki-kare testi ve ikili bağımsız örneklem student t-testi analizi ile, kontrol ve hasta grupları demografik özellikleri açısından karşılaştırıldığı zaman; istendiği üzere yaş ortalamaları göz önüne alındığında anlamlı bir fark gözlemlenmezken (p=0,554), cinsiyet dağılımları arasında ve vücut kitle indeksinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmıştır (p=0,033; p=0,033). Tablo 4.1-1’de gösterildiği üzere, analiz sonuçlarına göre, kadın olmak Trigliserid seviyesini 3 kat 150 mg/dl’nin üstüne arttırmaktadır. Vücut kitle indeksinde bakıldığında ise, Trigliserid seviyesinin 150 mg/dl’nin altında olduğu durumda ortalama 26,16 kg/m² iken, Trigliserid seviyesinin 150 mg/dl’nin üstünde olması halinde ortalama 28,94 kg/m² olarak saptanmıştır. Tablo 4.1-1 de verilen bilgilere göre, hasta ve kontrol grubu arasında diyabet (p=0,179) ve KOAH (p= 0,485) hastası olmak/olmamak ve aynı şekilde sigara (p= 0,889) ve kolesterol ilacı (p=0,091) kullanmak/kullanmamak anlamlı bir fark oluşturmamıştır.

4.2. Çalışma Gruplarına Ait Lipid Değerleri

Hasta ve kontrol gruplarının tüm lipid değerleri, karşılaştırmalı olarak Tablo 4.2-1’de verilmiştir.

Tablo 4.2-1. Kontrol ve Hasta Gruplarına ait Lipid Değerleri

Lipid Değerleri	Kontrol (TG < 150 mg/dl) (n=38)	Hasta Grubu (TG > 150 mg/dl) (n=29)	p değeri	%95 Güven Aralığı	
				Alt Sınır	Üst Sınır
Kolesterol ($\bar{X}\pm SD$)	179,16 ± 45,63	221,72 ± 35,14	0,000*	-62,973	-22,159
TG ($\bar{X}\pm SD$)	106,71 ± 25,83	220,93 ± 69,13	0,000*	-138,536	-89,905
LDL ($\bar{X}\pm SD$)	122,76 ± 43,62	138,90 ± 32,34	0,100	-35,418	3,151
HDL ($\bar{X}\pm SD$)	40,05 ± 7,99	38,62 ± 6,63	0,437	-2,228	5,092
VLDL ($\bar{X}\pm SD$)	22,34 ± 6,14	44,14 ± 13,91	0,000*	-26,837	-16,755

n=örnek sayısı, ($\bar{X} \pm SD$) (Ortalama ± Standart Sapma), TG=Trigliserid, LDL=Düşük yoğunluklu lipoprotein, HDL=Yüksek yoğunluklu lipoprotein, VLDL=Çok düşük yoğunluklu lipoprotein

* Tabloda koyu renk ile işaretlenmiş değerleri istatistiksel olarak anlamlılık göstermektedir (p<0,05). Ortalamalar arasındaki farklılık, ikili bağımsız örneklem student t-testi ile incelenmiştir.

Gruplar arasında kolesterol düzeyleri açısından istatistiksel olarak anlamlılık gözlenmiş olup ($p=0,000$), kontrol grubunda ortalama 179,16 mg/dl iken, hasta grubunda ki ortalama 221,72 mg/dl olarak saptanmıştır. Aynı şekilde istendiği üzere, Trigliserid seviyeleri açısından gruplar arasında ortalamalar bakımından istatistiksel olarak anlamlılık bulunurken ($p=0,000$), buna ek olarak VLDL seviyeleri açısından da anlamlı bir fark tespit edilmiştir ($p=0,000$). Trigliserid değerlerinin ortalaması kontrol grubunda 106,71 mg/dl iken, hasta grubunda 220,93 mg/dl olarak hesaplanmıştır. VLDL seviyelerinde ise, kontrol grubundaki ortalama 22,34 mg/dl iken, hasta grubundaki ortalama 44,14 mg/dl olarak belirlenmiştir.

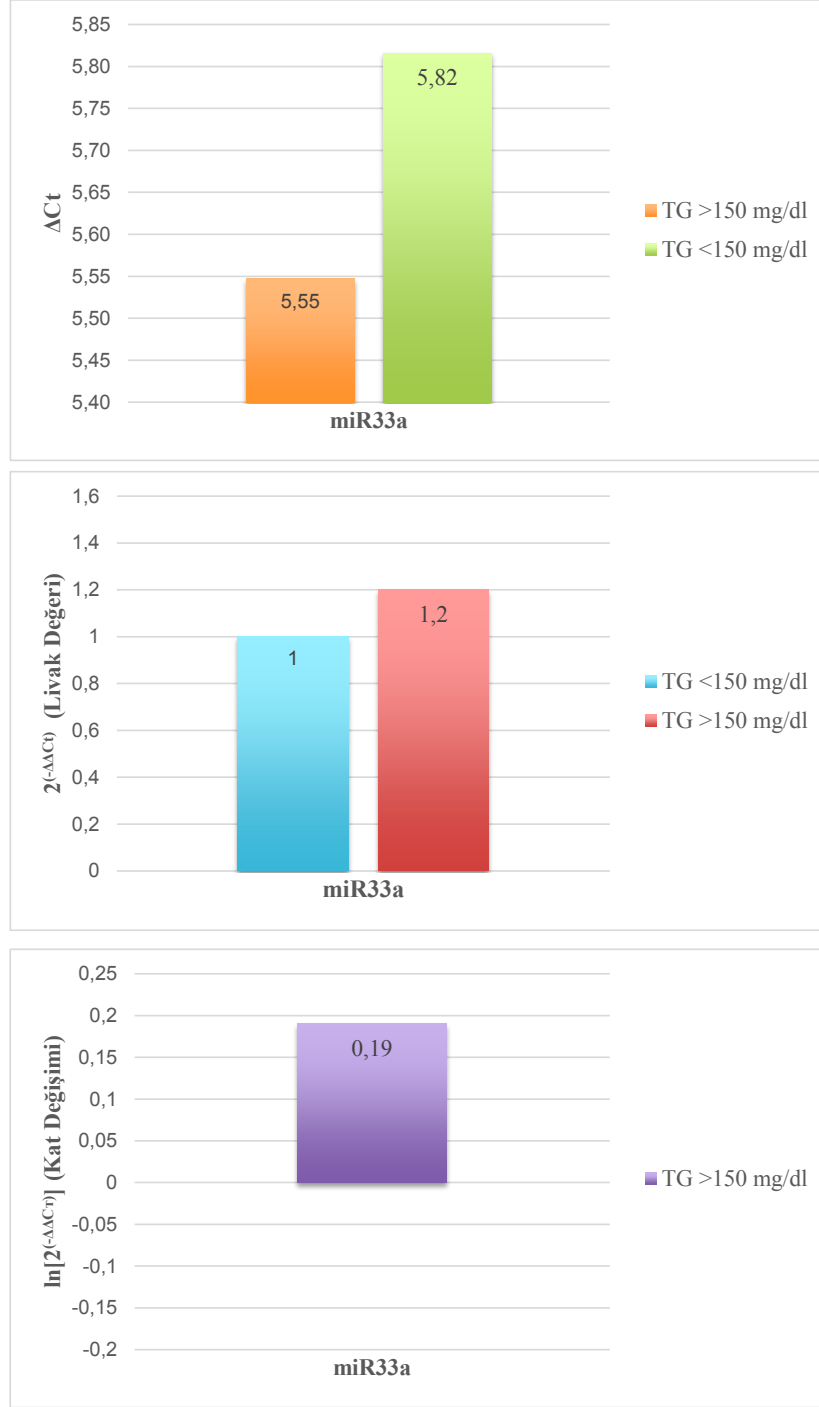
Bunlara ek olarak, LDL ve HDL seviyeleri açısından her iki grup arasında anlamlı bir fark saptanamamıştır ($p=0,100$; $p=0,437$).

4.3. Çalışma Gruplarına Ait miR33a Ekspresyon Sonuçları

miR33a'nın ekspresyon düzeyi, internal kontrol olan SNORD68 ile kıyaslandıktan sonra elde edilen ΔCt değerleri gruplar arasında karşılaştırıldığında, Trigliserid seviyesinin 150 mg/dl'den büyük olma durumunda, +5,55 kat; Trigliserid seviyesinin 150 mg/dl'den küçük olma durumunda +5,82 kat arttırdığı saptanmıştır (Şekil 4.3-1A). $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$ değişimi kontrol (1) kat değerine göre incelendiğinde ise, Trigliserid seviyesinin 150 mg/dl'den büyük olma durumu 1,2 kat arttırdığı belirlenmiştir (Şekil4.3-1B). İncelenen miRNAların tüm kontrol oluşturularak hesaplanan ($LN[2^{(-\Delta\Delta Ct)}]$) kat değişim değerleri Şekil 4.3-1C'de gösterilmiştir ve sonuç olarak Trigliserid seviyesinin 150 mg/dl'den büyük olma durumunda; tüm kontrole göre ifade düzeylerinin 0,19 kat arttığı görülmüştür.

Trigliserid seviyelerine göre ayrılan Kontrol ve Hasta Grubuna ait ekspresyon sonuç analizleri Tablo 4.3-1'de verilmiştir.

Belirtilen değerlere göre; Ct, ΔCt , Livak değeri ve kat değişiminde gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanamamakla birlikte p değerleri sırasıyla şu şekildedir: 0,457; 0,687; 0,387 ve 0,654.



Şekil 4.3-1. mikroRNA Ekspresyon Analizleri.

(A) ΔC_T değerleri dağılım grafiği kontrol (sıfır) değerine göre çizilmiştir, (B) $2^{(-\Delta\Delta C_T)}$ değerlerinin dağılım grafiği kontrol (1) kat değerine göre, (C) Real Time PCR ile belirlenen plazma miRNA seviyelerinin kat değişim ($\ln[2^{(-\Delta\Delta C_T)}]$) dağılım grafiği kontrol (sıfır) kat değerine göre çizilmiştir.

Tablo 4.3-1. miR33a Ekspresyon Analizi Sonuçları

miR33a		Kontrol Grubu (TG < 150 mg/dl) (n=38)	Hasta Grubu (TG > 150 mg/dl) (n=29)	p değeri	%95 Güven Aralığı	
					Alt Sınır	Üst Sınır
Ct	($\bar{X} \pm SD$)	36,06 ± 3,09	36,51 ± 1,02	0,457	-1,64288	0,74701
ΔCt	($\bar{X} \pm SD$)	5,81 ± 3,20	5,55 ± 1,61	0,687	-1,03583	1,56148
Livak Değeri	($\bar{X} \pm SD$)	827,63 ± 3,21	2,05 ± 1,61	0,387	-1066,520	2717,684
Kat Değişimi	($\bar{X} \pm SD$)	-0,0008 ± 2,2222	0,19 ± 1,12	0,654	-1,08871	0,71403

n=örnek sayısı, ($\bar{X} \pm SD$) (Ortalama ± Standart Sapma), TG=Trigliserid,

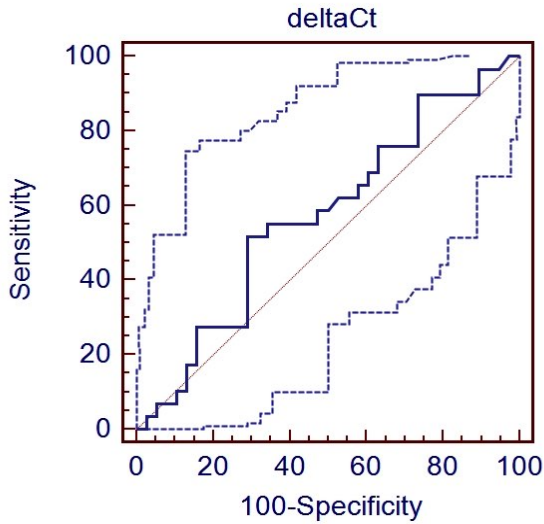
* Tabloda koyu renk ile işaretlenmiş değerleri istatistiksel olarak anlamlılık göstermektedir (p<0,05). Ortalamalar arasındaki farklılık, ikili bağımsız örneklem student t-testi ile incelenmiştir.

4.4. miR-33a ROC Sonuçları

MedCalc Programı kullanılarak Alıcı İşletim Karakteristiği (Receiver Operating Characteristic = ROC) analizi yapılarak, tüm plazma miRNA seviyeleri ile hasta ve kontrol gruplarında tanı saptaması amaçlanmıştır.

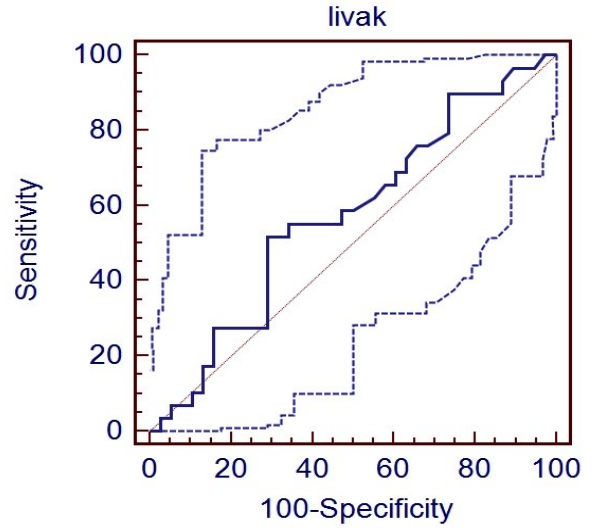
Yapılan analizin sonucuna göre, miRNA33a ekspresyon seviyesinin hasta gruplarında tanı olarak değerlendirilebileceği eşik değeri ortaya konulmamıştır. ΔC_T değerlerine göre miRNA33a AUC=0,572 olarak gösterilmiş olup p=1,019'dir (Şekil 4.4-1A), kat değişimi için ise AUC=0,572 ve p=1,012 olarak belirlenmiştir (Şekil 4.4-1B).

A) miR33a ROC Grafiği (ΔC_T)



AUC=0,572
%95 CI=0,445 - 0,692
p=1,019

B) miR33a ROC Grafiği (Kat değişimi)



AUC=0,572
%95 CI=0,445 - 0,692
p=1,012

Şekil 4.4-1. Plazma miRNA33a seviyesinin kontrol ve hasta gruplarına göre ROC Analizi.

A) ΔC_T değerlerine göre miRNA33a seviyesinin analizi **B)** Kat değişimi değerlerine göre miRNA33a seviyesinin analizi.

4.5. Çalışma Gruplarına ait miR33a İfade Düzeyleri ile Lipid Değerleri ve Vücut Kitle İndeksinin Korelasyonu

Trigliserid seviyesinin 150 mg/dl'den küçük olması durumunda, miR33a ifade düzeyleri ile lipid değerleri ve vücut kitle indeksinin korelasyonu Tablo 4.5-1'de verilmiştir.

Yapılan Pearson korelasyon analizi ile, Trigliserid seviyesinin 150 mg/dl'den küçük olduğu grupta, HDL ve miR33a Ct değeri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki ortaya konulmuştur ($p=0,036$) ve pearson korelasyon değeri 0,341 olduğundan; çok güçlü olmayan pozitif bir ilişki saptanmıştır. Bu ilişki grafiksel olarak, Şekil 4.5-1'de gösterilmiştir.

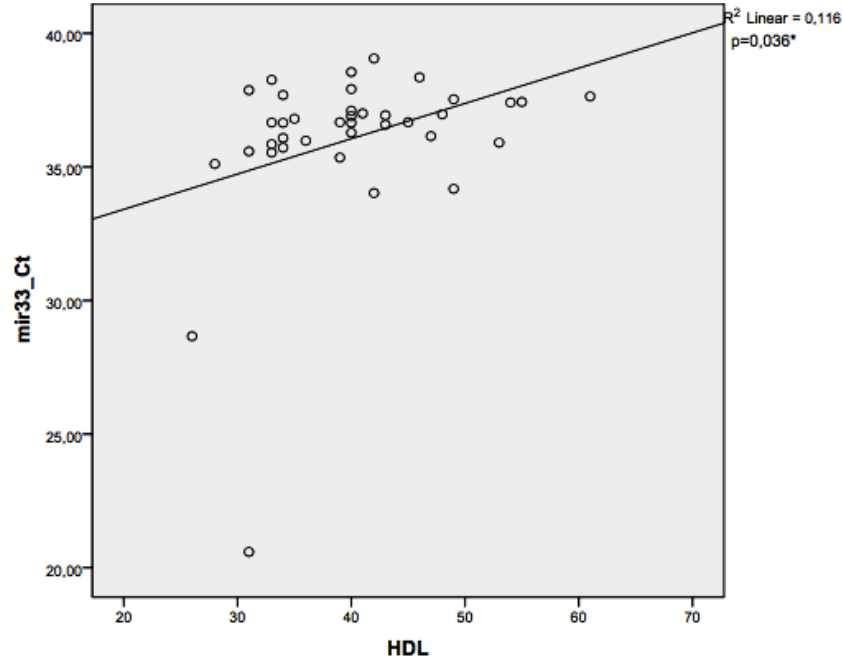
Buna karşın, ΔCt , livak değeri ve kat değişimi ile lipid değerleri ve VKİ arasındaki korelasyonda herhangi bir istatistiksel bir anlam saptanamamıştır.

Tablo 4.5-1. Kontrol Grubuna ait miR33a Ekspresyonunun Lipid Değerleri ve VKİ ile Korelasyonu

miR33 / Kontrol (TG < 150 mg/dl)		Kolesterol	TG	LDL	HDL	VDL	VKİ
Ct	Pearson korelasyonu	0,069	-0,054	0,050	0,341*	-0,049	0,023
	p değeri	0,679	0,746	0,767	0,036*	0,769	0,889
	N	38	38	38	38*	38	38
ΔCt	Pearson korelasyonu	0,147	-0,077	0,152	0,267	-0,124	-0,042
	p değeri	0,379	0,645	0,363	0,105	0,459	0,802
	N	38	38	38	38	38	38
Livak Değeri	Pearson korelasyonu	-0,026	-0,017	-0,011	-0,189	-0,036	-0,069
	p değeri	0,876	0,917	0,950	0,256	0,829	0,682
	N	38	38	38	38	38	38
Kat değişimi	Pearson korelasyonu	-0,150	0,065	-0,170	-0,267	0,110	0,050
	p değeri	0,370	0,696	0,309	0,106	0,510	0,766
	N	38	38	38	38	38	38

n=örnek sayısı, ($\bar{X} \pm SD$) (Ortalama \pm Standart Sapma), TG=Trigliserid, LDL=Düşük yoğunluklu lipoprotein, HDL=Yüksek yoğunluklu lipoprotein, VLDL=Çok düşük yoğunluklu lipoprotein

* Tabloda koyu renk ile işaretlenmiş değerleri istatistiksel olarak anlamlılık göstermektedir ($p < 0,05$). Korelasyon analizi, ikili değişkenli Pearson korelasyon testi ile yapılmıştır.



Şekil 4.5-1. Kontrol grubuna ait miR33a Ct ve HDL korelasyonu analizi.

Trigliserid seviyesinin 150 mg/dl'den büyük olması durumunda, miR33a ifade düzeyleri ile lipid değerleri ve vücut kitle indeksinin korelasyonu Tablo 4.5-2'de verilmiştir.

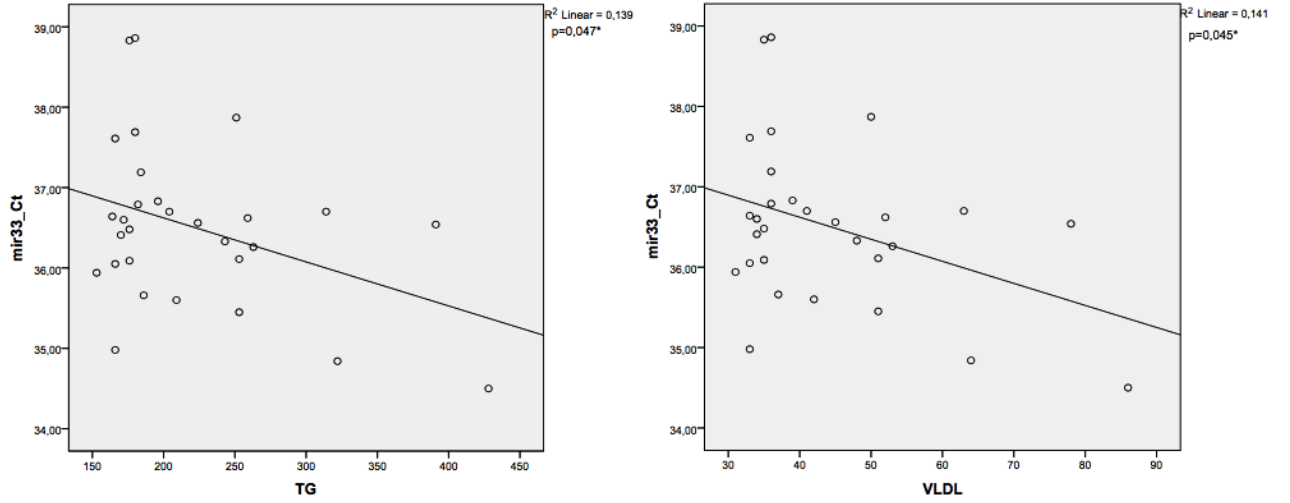
Yapılan Pearson korelasyon analizi ile, Trigliserid seviyesinin 150 mg/dl'den büyük olduğu grupta, Trigliserid ve VLDL seviyeleri ile miR33a Ct değerlerinin korelasyonunda istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunmuştur (Şekil 4.5-2.). Bu negatif ilişki güçlü olmamakla birlikte ((-0,372); (-0,375)), p değerleri sırasıyla 0,047 ve 0,045 olarak saptanmıştır. miR33a Δ Ct değeri ile HDL arasında istatistiksel olarak anlamlı bir negatif korelasyon belirlenmiştir (p=0,044; (-0,376)). Bu korelasyon Şekil 4.5-3'de gösterilmiştir. miR33a Livak değeri ile TG ve VLDL arasındaki istatistiksel olarak anlamlı pozitif korelasyon Şekil 4.5-4'de gösterilmiştir. (TG: p=0,005, (0,502); VLDL: p=0,005, (0,506)). Son olarak, HDL ve miR33a kat değişimi arasında anlamlı bir ilişki bulunmuş olup (p=0,045), güçlü olmayan pozitif bir ilişki olduğu gözlemlenmektedir (0,375) (Şekil 4.5-5).

Tablo 4.5-2. Hasta Grubuna ait miR33a Ekspresyonunun Lipid Değerleri ve BMI ile Korelasyonu

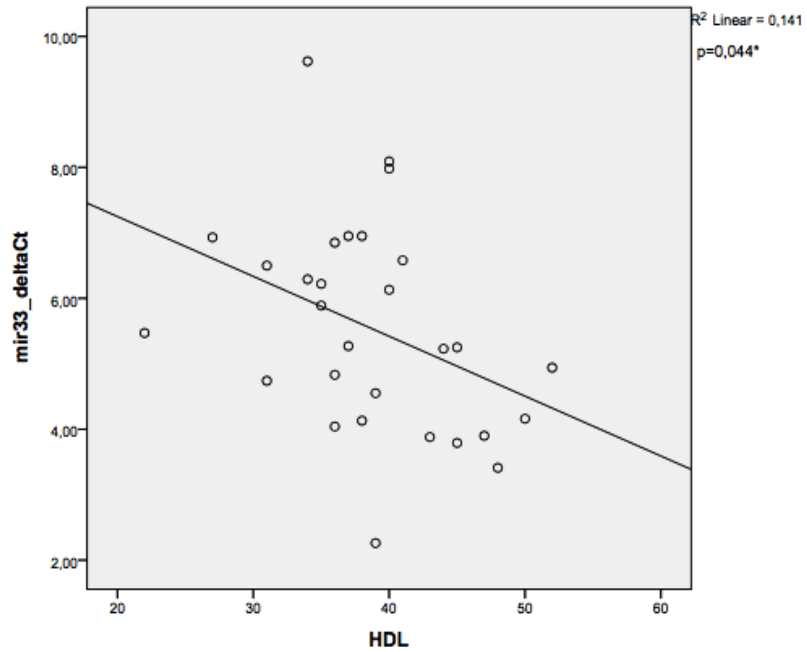
miR33 / Hasta Grubu (TG > 150 mg/dl)		Kolesterol	TG	LDL	HDL	VLDL	VKİ
Ct	Pearson korelasyonu	-0,144	-0,372*	0,004	-0,253	-0,375*	0,088
	p değeri	0,457	0,047*	0,982	0,185	0,045*	0,650
	N	29	29*	29	29	29*	29
ΔCt	Pearson korelasyonu	-0,091	-0,281	0,020	-0,376*	-0,285	0,099
	p değeri	0,640	0,140	0,917	0,044*	0,134	0,611
	N	29	29	29	29*	29	29
Livak Değeri	Pearson korelasyonu	0,094	0,502*	0,131	0,305	0,506*	-0,071
	p değeri	0,628	0,502*	0,498	0,108	0,005*	0,716
	N	29	29*	29	29	29*	29
Kat Değişimi	Pearson korelasyonu	0,089	0,280	-0,020	0,375*	0,284	-0,099
	p değeri	0,646	0,141	0,918	0,045*	0,135	0,609
	N	29	29	29	29*	29	29

n=örnek sayısı, TG=Trigliserid, LDL=Düşük yoğunluklu lipoprotein, HDL=Yüksek yoğunluklu lipoprotein, VLDL=Çok düşük yoğunluklu lipoprotein, VKİ=Vücut Kitle İndeksi

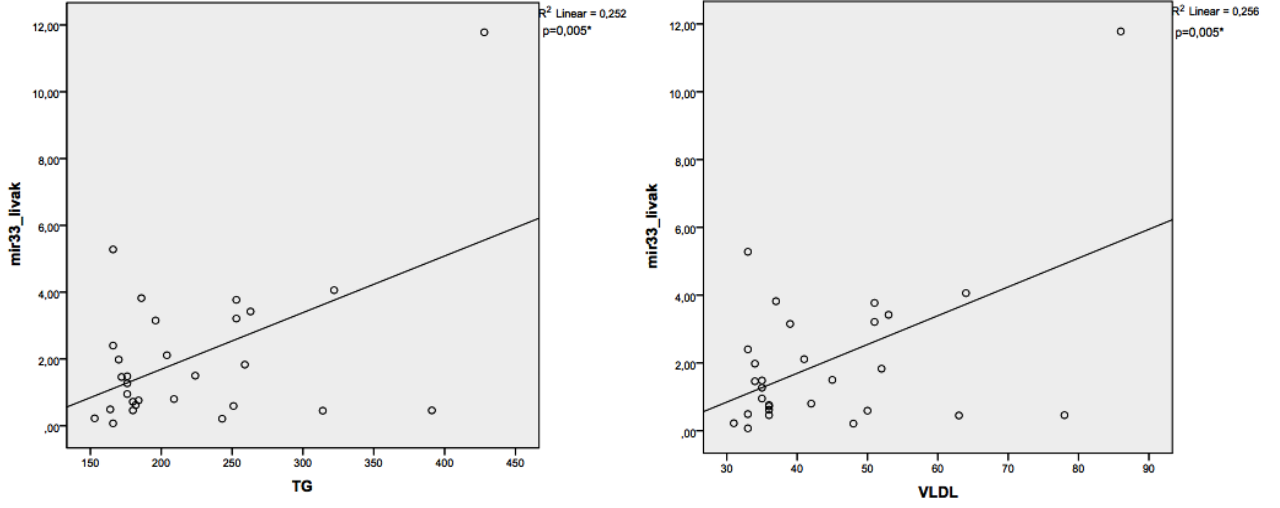
* Tabloda koyu renk ile işaretlenmiş değerleri istatistiksel olarak anlamlılık göstermektedir (p<0,05). Korelasyon analizi, ikili değişkenli Pearson korelasyon testi ile yapılmıştır.



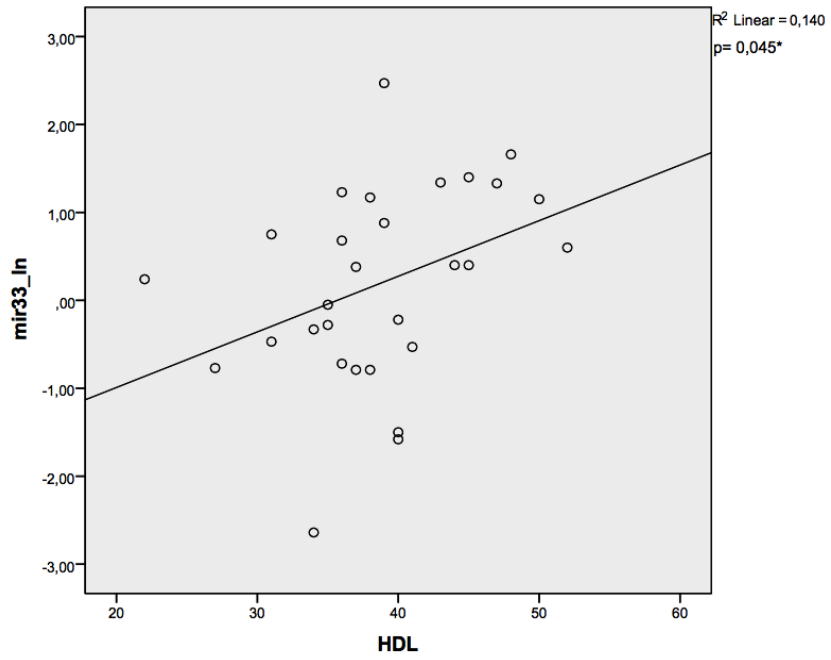
Şekil 4.5-2. Hasta grubuna ait miR33a Ct ile TG ve VLDL arasındaki korelasyonunun analizi.



Şekil 4.5-3. Hasta grubuna ait miR33a ΔCt ile HDL arasındaki korelasyonunun analizi.



Şekil 4.5-4. Hasta grubuna ait miR33a Livak değeri ile TG ve VLDL arasındaki korelasyonunun analizi.



Şekil 4.5-5. Hasta grubuna ait miR33a Kat değışimi ile HDL arasındaki korelasyonunun analizi.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Dünyadaki ölümlerin başlıca nedeni kardiyovasküler hastalıktır (KVH). Ateroskleroz, kalp krizi ve felç gibi en yaygın kardiyovasküler hastalıkların nedenidir [123,124]. Diğerleri arasında, aterosklerozun en önemli risk faktörleri, LDL-kolesterol (LDL-C) ve HDL-kolesterol (HDL-C) düzeylerinin dolaşımdaki seviyeleridir. Bu iki faktöre ek olarak, Hokanson ve Austin, 1996'da bir meta analizde TG'nin KKH için bağımsız bir risk faktörü olduğunu gösterdiler [125]. Aterojenik TG bakımından zengin kalıntı lipoproteinlerinin yüksek konsantrasyonlarda bulunması, bu ilişkiden sorumlu olan temel anormal olarak tanımlanmaktadır [126].

Bununla birlikte, TG'in KKH için bağımsız bir risk faktörü olduğuna dair kanıtlar bir dereceye kadar tartışmalıdır; çünkü büyük klinik çalışmalarda elde edilen veriler her zaman kesin değildir. Üstelik, olumlu bulguların olması durumunda bile, etki boyutları çok tahmin edici değildir. Bu yetersiz sonuçları açıklamak için bir takım konular gündeme getirilmiştir. Plazma TG, günlük yağ tüketimini yansıtan çok değişken bir lipid bileşenidir. Günümüzde insanlar günde en az üç ardışık yemek tüketiyorlar. Sonuç olarak, insanlar sürekli olarak post-prandial (tokluk) bir haldedirler ve bu durumun son derece değişken plazma TG düzeylerine yansıdığı gösterilmiştir [127].

İkincisi, yüksek TG seviyesine sahip hastalar sıklıkla ateroskleroza duyarlılıklarını etkileyebilecek insülin direnci gibi ek risk faktörleri sergilerler. Sonuç olarak, yüksek plazma TG seviyeleri düşük HDL-C seviyeleri ile güçlü bir şekilde ilişkilidir [128].

Prospektif epidemiyolojik çalışmalarda, HDL ve TG'nin ateroskleroz duyarlılığına olan katkılarını ayırmak güç olacaktır. Bir dizi popülasyon çalışması, plazma TG'sinin KVH için bağımsız bir risk faktörü olup olmadığını araştırmıştır. Prospektif Kardiyovasküler Münster (PROCAM) çalışması, 4849 orta yaşlı erkeği kapsamaktadır ve bunlar, çalışma girişinde mevcut risk faktörlerine göre koroner kalp hastalığı (KKH) olaylarının görülme sıklığını kaydetmek için 8 yıldır takip edilmektedir. Çalışma, TG'nin açlık düzeylerinin HDL-C veya LDL-C serum düzeylerinden bağımsız olarak KKH olayları için bağımsız bir risk faktörü olduğunu göstermiştir [129].

Başlangıçta kardiyovasküler hastalığı bulunmayan 2906 erkeğin dahil edildiği prospektif bir çalışma olan 8 yıllık Copenhagen Erkek çalışmasında [130], iskemik kalp hastalığı riski, düşük seviyeye sahip olanlar baz alınarak yapıldığında, orta TG seviyesine sahip olanlarda % 50, üst seviyeye sahip olanlarda % 120 olarak belirlenmiştir. Bu risk faktörü vücut kütle indeksi (VKİ), alkol alımı, sigara, fiziksel aktivite, hipertansiyon, diyabet ve LDL-C ve HDL-C seviyeleri gibi konvansiyonel risk faktörleri ayarlandıktan sonra elde edilmiştir. TG düzeyleri ile KKH riski arasında HDL-C düzeylerinden bağımsız bir ilişki bulunduğunu gösteren bir dizi meta-analiz yayınlandı [131-133]. Erkeklerde 1.32 (% 95 CI 1.26-1.39) ve kadınlarda 1.76'da (% 95 CI 1.50-2.07) göreceli bir risk olabileceği gösterilmiştir [134].

miRNA'lar, yüksek sıcaklık, aşırı pH değerleri, uzun süre oda sıcaklığında depolanma ve tekrarlanan donma-çözme döngüleri gibi sert koşullar altında stabilitesini korurlar. Dahası, bunlar muhtemelen ekzozomlar, mikroveziküller içerisinde veya Ago2 veya HDL ile bağlantılı oldukları için RNaz açısından zengin plazmada bile kararlıdır [135,136]. Geniş molekül ağırlığı olan plazma RNA'ya kıyasla, ekzozomal miRNA'lar ve plazma miRNA'ları, farklı saklama koşullarında kararlıdır ve plazma miRNA'larında önemli bir etkisi yoktur [137]. Serum miRNA'lar tekrarlanan donma - çözülme döngülerine dirençlidir. Serum düşük (pH = 1) veya yüksek (pH = 13) pH solüsyonlarında 3 saat süreyle muamele edildiğinde, miRNA'lar stabil kalır [138,139]. Bu nedenle, serum gibi plazma, hiperlipidemi ve koroner arter hastalığı araştırmaları için mükemmel bir miRNA kaynağıdır [140].

Son yıllarda birçok araştırma grubunun katkıları ile, miRNA'ların lipit metabolizması ve KVH'nın düzenlenmesindeki önemli rolü açıkça ortaya konmuştur [141,142]. miRNA'lar yakın zamanda, KVH riskini etkileyen önemli bir faktör olan dolaşımdaki lipidlerin düzenleyicisi olarak belirlenmişlerdir. HDL-C seviyesinin azalması, KVH gelişme riski ile ilişkilidir. Bir dizi miRNA, HDL-C metabolizmasında, sentezden temizlemeye kadar farklı aşamaları düzenler, ki bunların arasında miR-33a / b en iyi çalışılmış olanıdır [143,144]. HDL-C metabolizmasını düzenlemedeki rolü derin bir şekilde incelenirken, TG metabolizmasını kontrol altına alma konusundaki önemi geride kalmıştır.

Bu çalışmada, miR33a ekspresyonunun Trigliserid metabolizmasındaki etkilerini görebilmek amaçlanmıştır.

Yapılan bu çalışmada öncelikle grupların özelliklerini tanımlamak amacıyla hasta ve kontrol grubunun tüm demografik verileri karşılaştırılmıştır. Tablo 4.1-1.'de özetlendiği üzere, cinsiyete bakıldığı zaman, kadın olmanın Trigliserid seviyesini arttırmada anlamlı bir fark bulunmuştur ($p=0,033$). 2000'de yapılan Bertrais ve arkadaşlarına ait olan bu çalışma, ortaokulun birinci sınıfında, Fransız bir bölümdeki kamu veya özel kuruluşlarda olan çocukları kapsıyordu. Açlık kan örnekleri ile 10-13 yaşları arasındaki diyabetik olmayan erkek ve kız çocukları arasında cinsel olgunluk açısından heterojenite vardı. Sonuç olarak, Trigliserid ortalama seviyeleri açısından kızlarda anlamlı olan pozitif bir ilişki gözlenmiştir [145].

Aynı şekilde, vücut kitle indeksinde de, Trigliserid seviyesinin 150 mg/dl'den büyük olduğu hasta grubunda da istatistiksel anlamlı olan ortalama yüksekliği saptanmıştır ($p=0,033$). Bu beklenen bir anlamlılıktır çünkü Sommariva D ve arkadaşlarının çalışmasına [146] göre, 72 obez kadında vücut kitle indeksi yaşla pozitif korelasyon gösterdi ve her ikisi de serum lipidleri ve lipoprotein lipitleri ile çoklu korelasyon gösterdi. Yaşa göre ayarlandıktan sonra (kısmi korelasyon prosedürü), vücut kitle indeksi serum trigliseridleri, VLDL lipidleri, HDL-trigliseridler ile pozitif yönde ilişkilendirildi ve HDL-kolesterol ile negatif korelasyon söz konusu çalışmayla gösterilmiştir.

Başka bir çalışmaya göre ise, yine yüksek olan VKİ, trigliserid seviyesi ile doğru orantılı olarak ilişkilendirilmiş olup, bu ilişkinin insülin rezistansından kaynaklanabileceği rapor edilmiştir [147].

Lipid değerleri ortalamasının gruplara göre anlamlılığının karşılaştırıldığı Tablo 4.2-1'e göre ise, gruplar bu kritere göre belirlendiğinden, Trigliserid seviyesinde anlamlılık bulunması beklenen bir çıktıdır ($p=0,000$; %95 CI = [-138,536], [-89,905]). Buna ek olarak, VLDL seviyesinde de, Trigliserid seviyesi yüksek olan grupta fazla bir ortalama sahip olduğu gözlemlenmiştir ($p=0,000$; %95 CI = [-26,837], [-16,755]). Ki bu da şöyle açıklanabilir; çok düşük yoğunluklu lipoproteinler (VLDL), besin maddeleri

ve hormonlara tepki olarak karaciğerde bir araya getirilen lipidlerin ve proteinlerin kompleksleridir. VLDL salgılanırsa, hemen hemen tüm kan akışındaki trigliseridi taşırlar. Görevleri karaciğerden trigliseridleri taşımak, muhtemelen yağlı karaciğer gelişimini önlemek, onları yağ dokusunda depolamak veya iskelet kasında kullanmak üzere periferik dokulara götürmektir. VLDL plazmada trigliseridin çoğunu taşıdığından, VLDL trigliserid ve plazma trigliserid düzeyleri neredeyse aynıdır (düşük yoğunluklu lipoprotein ve yüksek yoğunluklu lipoproteinde de biraz trigliserid vardır). Postprandiyal dönemde, plazma trigliseridleri, şilomikronlar ve bunların kalıntılarında da belirgindir.

Ve son olarak kolesterol seviyesinde de istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmıştır ($p=0,000$; %95 CI = [-62,973], [-22,159]). Yapılan bir çalışmaya ait in vitro gözlemlere göre, hepatik miR-33 seviyeleri, kolesterol seviyeleri ve ABCA1 ekspresyonu ile ters korelasyon göstermiş ve SREBF2 mRNA seviyeleri ile pozitif korelasyon göstermiş olup, bu durum, miR-33'in in vivo diyet kolestrolü tarafından düzenlendiğini düşündürmektedir [85]. Bizim yapmış olduğumuz çalışmada ise, TG seviyesi yüksek olan grupta kolesterol seviyesi ortalaması yüksek çıkmıştır.

Demografik veriler ve lipid değerlerinin karşılaştırılmasından sonra, miRNA33a'nın hasta ve kontrol gruplarındaki ekspresyon analizleri yapılmıştır (Şekil 4.3-1). Bu analizin göstermiş olduğu sonuca göre, Trigliserid seviyesi 150 mg/dl'den büyük (hasta grubu) olarak seçilen grupta miRNA ekspresyon seviyesinin yüksek olduğu gözlemlenmiştir. Fakat istatistiksel olarak bir anlamlılık görülmemiştir. Bu sonuç ve kolesterol değerinin hasta grubunda istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde yüksek bir ortalamaya sahip olması, miR33a ekspresyonunun ABCA1 aktivitesini etkilemesinden dolayıdır. 2012 yılında yapılmış olan bir çalışmada (148) elde edilen veriler, miR-33a'nın pankreatik adacıklar ve β hücrelerinde eksprese edildiğini ve izole adacıklardan kolesterol düzeylerini ve insülin sekresyonunu etkileyen ABCA1 ifadesini modüle etmek üzere işlev gördüğünü göstermektedir. MiR-33a ifadesinde değişiklikler adacıklardaki ABCA1 ekspresyonundaki değişikliklerle ters korelasyon gösterdiğinden, miR-33a adacık ABCA1'in önemli bir regülatörü olarak tanımlanabilir. miR-33a'nın adacıklardan insülin sekresyonunu düzenlediğini göstermişlerdir. Bu veriler ışığında,

miR-33a inhibisyonunu kullanarak, ABCA1 ekspresyonunu arttırıp ve pankreatik adacıklardaki hücrel kolesterol seviyelerini normalleştirerek normal insülin sekresyonunu düzeltebileceği gözlemlenmiştir.

Daha sonra, MedCalc Programı kullanılarak Alıcı İşletim Karakteristiği (Receiver Operating Characteristic = ROC) analizi yapılmıştır. Duyarlılığa karşın özgüllüğün çizildiği eğri, deneklerin gerçek durumunu ayırt etmek için testlerin tanısal kabiliyetini değerlendirmede ve optimum kesme değerlerini bulmada merkezi bir rol oynar (149). Pubmed araştırması, bu analizin, klinik epidemiyolojide, biyolojik belirteçlerin (örneğin serum belirteçleri) tanısal kabiliyetinin değerlendirilmesi için ve ağırlıklı kişilerden gelen hastalıkların sınıflandırıldığı testleri görüntülerken yaygın olarak kullanıldığını ortaya koymaktadır. Bu tahmini model, tıbbi araştırmacılarıdaki hastanın risk profiline dayanarak olumsuz sonuç riskini tahmin etmek için de yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu analizin sonucunda ise, kurulan deney koşullarında, miR33a'nın biyobelirteç olarak kullanılamayacağı gözlemlenmiştir (150).

Pearson Korelasyon testleri sonucunda, Trigliserid seviyesinin 150 mg/dl'den küçük olduğu grupta, miR33a Ct değeri ile HDL pozitif bir ilişkiye sahipken ($p=0,036$) (Şekil 4.5-1); Trigliserid seviyesi 150 mg/dl'den büyük olan hasta grubunda, ΔCt ile HDL negatif bir korelasyon gözlenirken ($p=0,044$) (Şekil 4.5-3), kat değişim değeri ile HDL arasında pozitif bir ilişki saptanmıştır ($p=0,045$) (Şekil 4.5-5). Bu sonuçlara göre, hasta grubunda, mir33a ekspresyonu ile HDL seviyesi arasında doğru orantılı olan ilişki, kontrol grubunda tam tersi etki oluşturmaktadır.

Yapılan bir araştırmaya göre [60], miR33ün hedef aldığı ABCA1 ile olan ilişkisi ilk önce, miR33 inhibitörleri kullanıldığı zaman açığa çıkmış olup, deneyin sonucunda plazma HDL-kolesterol seviyesinin, farelerde %30 oranında arttığı gözlemlenmiştir. Daha sonra miR33 ün delesyonunu içeren bir başka çalışmada [122] erkek ve dişi farelerde sırasıyla HDL-kolesterol seviyesinde %25 ve %30 luk bir artış gösterdiği belirtilmiştir.

Her iki sonuçta değerlendirildiği zaman, miR33a'nın farklı Trigliserid seviyelerinde HDL-Kolesterol düzeyine farklı şekilde etki ettiği sonucuna varılabilir.

Çünkü yayımlanan diğer araştırmalar insan olmayan deneklerde gerçekleştirildiğinden dolayı, miR33a insan metabolizmasında farklı şekillerde davranıyor olabilir.

Korelasyon testinin bir diğeri sonucu ise, VLDL ve TG seviyeleri, miR33a Ct değeri ile negatif bir korelasyon gösterirken ($p=0,045$; $p=0,047$) (şekil 4.5-2), Kat değişimi ile pozitif bir korelasyon saptanmıştır ($p=0,005$; $p=0,502$) (şekil 4.5-3). Burdan ıkartabileceğimiz sonuç şu şekildedir; Triglicerid seviyesinin 150 mg/dl'de yüksek olduğu durumda; miR33a ekspresyon seviyesi artarken aynı şekilde VLDL ve TG seviyeleri de artış gösterir, aynı şekilde tersi şeklindeki durumda doğrudur.

2010 yılında yapılmış olan çalışmada [151] bulgumuzu doğrular niteliktedir; miR-33'n yağ asidi β -oksidasyonu üzerindeki etkisi değerlendirilirken, palmitik asitten suya dahil edilen radyoaktivite ölçülmüş olup, sonucunda miR-33'n ařırđ ekspresyonu, mitokondriyal β -oksidasyonun % 20'lik bir azalması ile ilişkili olduğu ortaya çıkmıştır. TLC ile hücresel ekstraktları analiz ederken, hücresel serbest yağlı asit seviyeleri ve triasilgliseridlerde belirgin bir artış gözlemlenmişlerdir. MiR-33'n miRNA süngerleri veya antisens oligonükleotidleri ile inhibisyonu, yağ asidi β -oksidasyonunda tekrarlanabilir bir artışa neden olmamıştır.

Fakat, yapılan başka bir çalışmada [152], plazma HDL seviyelerinin kontrolünde miR-33'n belirlenmiş rolüne ilaveten, in vitro olarak miR-33'n inhibisyonu, yağ asidi oksidasyonunu belirgin şekilde arttırarak, anti-miR-33 tedavisinin, hepatik lipid birikimini azaltmak ve NAFLD'li hastaları tedavi etmede faydalđ olabileceğini düşünen araştırmacılar, lipoprotein metabolizması üzerine uzun vadeli anti-miR-33 tedavisinin etkinliğini test etmeye karar vermişlerdir ve şaşırtıcı bir şekilde, yüksek yağlı diyetle beslenen farelerde miR-33'n susturulmasının uzun sürede hepatik lipid birikimi ve artmış plazma TG düzeyleri ile sonuçlandığını belirtmişlerdir.

SONUÇ OLARAK DİYE BİLİRİZ Kİ;

miR-33a'nın direkt fonksiyonel rolü henüz tam olarak anlaşılamamış olsa da, raporlar serum HDL kolesterolü, triglicerid seviyeleri, yağ asidi oksidasyonu ve sentezi modüle ettiğini ve inhibisyonunun ateroskleroza karřđ koruyucu olabileceğini gösteriyor. Bu nedenle, miR-33a aracılığıyla ABCA1'in upregülasyonu, β hücre

fonksiyonunda ve kolesterol homeostazında kombine kusurlara sahip kişiler için umut verici bir terapötik strateji olabilir.

Fakat bir miRNA'nın birçok hedefi olabilir ve birçok genin ekspresyon düzeylerini etkileyebileceğinden, miRNA biyolojisinin karmaşıklığını anlamak için daha fazla araştırmaya ihtiyaç vardır. MiR-33'lerde tam inhibisyon, bazı durumlarda istenmeyen hastalıklara ve durumlara yol açabilir; bu nedenle, gerektiği durumlarda (spatiotemporal) düzenlemeler yapılması daha uygun olabilir.

Hepatik ABCA1, plazma HDL'sinin üretilmesi için kritik olduğundan, statinler ve miR-33 antagomirleri içeren bir kombinasyon terapinin hem LDL, TG düzeylerinde azalma hem de HDL düzeylerinde artışa neden olacağı ve böylelikle hiperkolesterolemi ve kardiyovasküler hastalığı olan hastalarda prognozu iyileştirdiğine dair bir umut ışığı olabileceği görüşündeyiz.

KAYNAKLAR

1. Sevignani C, Calin GA, Siracusa LD, Croce CM. Mammalian micro RNAs: a small world for fine-tuning gene expression. *Mamm Genome*. 2006;17(3):189–202.
2. Mattick JS, Makunin IV. Small regulatory RNAs in mammals. *Hum Mol Genet*. 2005;14 (Suppl 1):R121–R132.
3. Berezikov E, Plasterk RH. Camels and zebrafish, viruses and cancer: a microRNA update. *Hum Mol Genet*. 2005;14(Suppl 2):R183–R190.
4. Croce CM, Calin GA. miRNAs, cancer, and stem cell division. *Cell*. 2005;122(1):6–7.
5. Klein ME, Impey S, Goodman RH. Role reversal: the regulation of neuronal gene expression by microRNAs. *Curr Opin Neurobiol*. 2005;15(5):507–513.
6. Giraldez AJ, Cinalli RM, Glasner ME, Enright AJ, Thomson JM, Baskerville S, et al. MicroRNAs regulate brain morphogenesis in zebrafish. *Science*. 2005;308(5732):833–838.
7. Naguibneva I, Ameyar-Zazoua M, Polesskaya A, Ait-Si-Ali S, Groisman R, Souidi M, et al. The microRNA miR-181 targets the homeobox protein Hox-A11 during mammalian myoblast differentiation. *Nat Cell Biol*. 2006;8:278–284.
8. Hatfield SD, Shcherbata HR, Fischer KA, Naka-hara K, Carthew RW, Ruohola-Baker H. Stem cell division is regulated by the microRNA pathway. *Nature*. 2005;435:974–978.
9. Urbich C, Kuehbacher A, Dimmeler S. Role of microRNAs in vascular diseases, inflammation and angiogenesis. *Cardiovasc Res*. 2008;79(4):581–588.
10. Ikeda S, Kong SW, Lu J, Bisping E, Zhang H, Allen PD, et al. Altered microRNA expression in human heart disease. *Physiol Genomics*. 2007;31:367–373.
11. Zhao Y, Samal E, Srivastava D. Serum response factor regulates a muscle-specific microRNA that targets Hand2 during cardiogenesis. *Nature*. 2005;436:214–220

12. Marquart TJ, Wu J, Lusic AJ, Baldán A. Anti-miR-33 therapy does not alter the progression of atherosclerosis in low-density lipoprotein receptor deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2013;33:455–458.
13. Gu W, Wang X, Zhai C, Zhou T, Xie X. Biological Basis of miRNA Action when Their Targets Are Located in Human Protein Coding Region. Tjwa M, ed. *PLoS ONE.* 2013;8(5):e63403. doi:10.1371/journal.pone.0063403.
14. MacFarlane, L. A., and Murphy, P. R. MicroRNA: Biogenesis, Function, and Role in Cancer. *Curr Genomics.* 2010;11:537–561.
15. Schirle NT, Sheu-Gruttadauria J, MacRae IJ. Structural Basis for microRNA Targeting. *Science (New York, NY).* 2014;346(6209):608-613. doi:10.1126/science.1258040.
16. Melo, C. A., & Melo, S. A. *Non-coding RNAs and Cancer. In Biogenesis and physiology of microRNAs.* Springer Science and business media; 2014
17. Chen, K., & Rajewsky, N. The evolution of gene regulation by transcription factors and microRNAs. *Nature Reviews Genetics.* 2007;8:93–103.
18. Valinezhad Orang A, Safaralizadeh R, Kazemzadeh-Bavili M. Mechanisms of miRNA-Mediated Gene Regulation from Common Downregulation to mRNA-Specific Upregulation. *International Journal of Genomics.* 2014;2014:970607. doi:10.1155/2014/970607.
19. Winter, J., & Diederichs, S. MicroRNA biogenesis and cancer. *Methods in Molecular Biology.* 2011;676:3–22.
20. Melamed, Z., et al. Alternative splicing regulates biogenesis of miRNAs located across exon–intron junctions. *Molecular Cell.* 2013;50:869–881.
21. Mustafa HİTİT, Ercan KURAR, Aydın GÜZELOĞLU. MikroRNA Biyogenezi. *Atatürk Üniversitesi Vet. Bil. Derg.* 2015;10(3): 211-218 DOI:10.17094/avbd.35776

22. Catalanotto C, Cogoni C, Zardo G. MicroRNA in Control of Gene Expression: An Overview of Nuclear Functions. Taguchi Y, ed. *International Journal of Molecular Sciences*. 2016;17(10):1712. doi:10.3390/ijms17101712.
23. Agranat-Tamir L, Shomron N, Sperling J, Sperling R. Interplay between pre-mRNA splicing and microRNA biogenesis within the supraspliceosome. *Nucleic Acids Research*. 2014;42(7):4640-4651. doi:10.1093/nar/gkt1413.
24. Katahira, J., & Yoneda, Y. Nucleocytoplasmic transport of MicroRNAs and related small RNAs. *Traffic*. 2011;12(11):1468-74. doi: 10.1111/j.1600-0854.2011.01211.x.
25. Shomron N, Levy C. MicroRNA-Biogenesis and Pre-mRNA Splicing Crosstalk. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*. 2009;2009:594678. doi: 10.1155/2009/594678.
26. Czech B, Hannon GJ. Small RNA sorting: matchmaking for Argonautes. *Nature reviews Genetics*. 2011;12(1):19-31. doi:10.1038/nrg2916.
27. Wahid, F., et al. MicroRNAs: Synthesis, mechanism, function, and recent clinical trials. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2010;1803(11):1231-43. doi: 10.1016/j.bbamcr.2010.06.013.
28. Rooij, E. V. The art of MicroRNA research. *Circulation Research*, 2011;108(2): 219-34. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.110.227496..
29. Lee, S. J., et al. Selective nuclear export mechanism of small RNAs. *Current Opinion in Structural Biology*. 2011;21(1):101-8. doi: 10.1016/j.sbi.2010.11.004..
30. Bartel, D. P. MicroRNAs: Genomics, Biogenesis, Mechanism, and Function. *Cell*, 2004;116(2):281-97.
31. LCheng, Ann-Joy. Pathological Function and Clinical Significance of Microrna-10b in Cancer. *Cancer Science & Research: Open Access*. 2014;1:1-5. 10.15226/csroa.2014.00107.

32. Jin, H. Y., & Xiao, C. MicroRNA mechanisms of action: What have we learned from Mice? *Frontiers in Genetics*. 2015;6:328.
33. Schell T, Kulozik AE, Hentze MW. Integration of splicing, transport and translation to achieve mRNA quality control by the nonsense-mediated decay pathway. *Genome Biology*. 2002;3(3):reviews1006.1-reviews1006.6.
34. Nilsen TW. Mechanisms of microRNA-mediated gene regulation in animal cells. *Trends Genet*. 2007;23:243–249
35. Ambros V. The functions of animal microRNAs. *Nature*. 2004;431:350–355
36. Lewis BP, Shih IH, Jones-Rhoades MW, Bartel DP, Burge CB. Prediction of mammalian microRNA targets. *Cell*. 2003;115:787–798
37. Olsen PH, Ambros V. The lin-4 regulatory RNA controls developmental timing in *Caenorhabditis elegans* by blocking LIN-14 protein synthesis after the initiation of translation. *Dev Biol*. 1999;216:671–680
38. Lim LP, Lau NC, Garrett-Engele P, Grimson A, et al. Microarray analysis shows that some microRNAs downregulate large numbers of target mRNAs. *Nature*. 2015;433:769–773
39. Wu L, Fan J, Belasco JG. MicroRNAs direct rapid deadenylation of mRNA. *Proc Natl Acad Sci*. 2006;103:4034–4039
40. Pillai RS, Bhattacharyya SN, Filipowicz W. Repression of protein synthesis by miRNAs: how many mechanisms?. *Trends Cell Biol*. 2007;17:118–126
41. Chendrimada TP, Finn KJ, Ji X, Baillat D, et al. MicroRNA silencing through RISC recruitment of eIF6. *Nature*. 2007;447:823–828
42. Thermann R, Hentze MW. *Drosophila* miR2 induces pseudo-polysomes and inhibits translation initiation. *Nature*. 2007;447:875–878

43. Gingras A-C, Raught B, Sonenberg N. eIF4 initiation factors: effectors of mRNA recruitment to ribosomes and regulators of translation. *Annu Rev Biochem.* 1999;68: 913–963
44. Kiriakidou M, Tan GS, Lamprinaki S, et al. An mRNA m7G cap binding-like motif within human Ago2 represses translation. *Cell.* 2007;129:1141–1151
45. Rand TA, Petersen S, Du F, Wang X. Argonaute2 cleaves the anti-guide strand of siRNA during RISC activation. *Cell.* 2005;123:621–629
46. Pillai RS, Artus CG, Filipowicz W. Tethering of human Ago proteins to mRNA mimics the miRNA-mediated repression of protein synthesis. *RNA.* 2004;10:1518–1525
47. Giraldez AJ, Mishima Y, Rihel J, et al. Zebrafish MiR-430 promotes deadenylation and clearance of maternal mRNAs. *Science.* 2006;312:75–79
48. Behm-Ansmant I, Rehwinkel J, Doerks T, et al. mRNA degradation by miRNAs and GW182 requires both CCR4:NOT deadenylase and DCP1:DCP2 decapping complexes. *Genes Dev.* 2006;20:1885–1898
49. Kahvejian A, Roy G, Sonenberg N. The mRNA closed-loop model: the function of PABP and PABP-interacting proteins in mRNA translation. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* 2001;66:293–300
50. Jacobson A. *Poly(A) metabolism and translation: the closed-loop model.* In *Translational Control*, Hershey JWB, Mathews MB, Sonenberg N: Plainview: Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1996. pp 451–480.
51. Ardekani, A. M., & Naeini, M. M. The role of Micro-RNAs in human diseases. *Avicenna Journal of Medical Biotechnology.* 2010;2:161–179.
52. Broderick, J. A., & Zamore, P. D. MicroRNA therapeutics. *Gene Therapy*, 2011;18: 1104–1110.

53. Jackson, A. I., & Linsley, P. S. The therapeutic potential of microRNA modulation. *Discovery Medicine*. 2010;9: 311–318
54. Li, Z., & Rana, T. M. Therapeutic targeting of micro-RNAs: Current status and future challenges. *Nature Reviews Drug Discovery*. 2014;13:622–638.
55. Rayner KJ, Hennessy EJ. Extracellular communication via miRNA: lipid particles have a new message. *Jr Lipid Res*. 2013;54:1174-1181.
56. Krützfeldt J, Rajewsky N, Braich R, et al. Silencing of microRNAs in vivo with ‘antagomirs’. *Nature*. 2005;438:685-689.
57. McDermott AM, Heneghan HM, Miller N, Kerin MJ. The therapeutic potential of microRNAs: disease modulators and drug targets. *Pharm Res*. 2011;28:3016-3029.
58. Yang F, Vought BW, Satterlee JS, et al. An ARC/Mediator subunit required for SREBP control of cholesterol and lipid homeostasis. *Nature*. 2006;442(7103): 700-4. Epub 2006 Jun 21.
59. Gerin I, Clerbaux L-A, Haumont O, et al. Expression of miR-33 from an SREBP2 Intron Inhibits Cholesterol Export and Fatty Acid Oxidation. *The Journal of Biological Chemistry*. 2010;285(44):33652-33661. doi:10.1074/jbc.M110.152090.
60. Najafi-Shoushtari SH, Kristo F, Li Y, et al. MicroRNA-33 and the SREBP Host Genes Cooperate to Control Cholesterol Homeostasis. *Science (New York, NY)*. 2010;328(5985):10.1126/science.1189123. doi:10.1126/science.1189123.
61. X. Hua, J. Sakai, Y.K. Ho, J.L. Goldstein, M.S. Brown, Hairpin orientation of sterol regulatory element-binding protein-2 in cell membranes as determined by protease protection, *J. Biol. Chem*. 1995;290:29422–29427.
62. X. Hua, J. Wu, J.L. Goldstein, M.S. Brown, H.H. Hobbs, Structure of the human gene encoding sterol regulatory element binding protein-1 (SREBF1) and localization of SREBF1 and SREBF2 to chromosomes 17p11.2 and 22q13, *Genomics*. 1995;25:667–673.

63. A.R. Miserez, G. Cao, L.C. Probst, H.H. Hobbs. Structure of the human gene encoding sterol regulatory element binding protein-2 (SREBF2). *Genomics*. 1997;40:31–40.
64. S.J. Lee, T. Sekimoto, E. Yamashita, et al. The structure of importin-beta bound to SREBP-2: nuclear import of a transcription factor. *Science*. 2003;302:1571–1575.
65. E. Nagoshi, Y. Yoneda. Dimerization of sterol regulatory element-binding protein 2 via the helix-loop-helix-leucine zipper domain is a prerequisite for its nuclear localization mediated by importin beta, *Mol. Cell. Biol.* 21 (2001) 2779–2789.
66. E. Nagoshi, N. Imamoto, R. Sato, Y. Yoneda, Nuclear import of sterol regulatory element-binding protein-2, a basic helix-loop-helix- leucine zipper (bHLH-Zip)-containing transcription factor, occurs through the direct interaction of importin beta with HLH-Zip. *Mol. Biol. Cell.* 1999;10:2221–2233.
67. H. Shimano, J.D. Horton, I. Shimomura, R.E. Hammer, M.S. Brown, J.L. Goldstein. Isoform 1c of sterol regulatory element binding protein is less active than isoform 1a in livers of transgenic mice and in cultured cells. *J. Clin. Invest.* 1997;99:846–854.
68. I. Shimomura, H. Shimano, J.D. Horton, J.L. Goldstein, M.S. Brown. Differential expression of exons 1a and 1c in mRNAs for sterol regulatory element binding protein-1 in human and mouse organs and cultured cells. *J. Clin. Invest.* 1997;99:838–845.
69. J.B. Kim, G.D. Spotts, Y.D. Halvorsen, et al. Dual DNA binding specificity of ADD1/SREBP1 controlled by a single amino acid in the basic helix-loop-helix domain. *Mol. Cell. Biol.* 1995;15:2582–2588
70. Bodzioch M, Orso E, Klucken J et al. The gene encoding ATP binding cassette transporter 1 is mutated in Tangier disease. *Nat Genet.* 1999;22:347–51
71. Oram JF. Tangier disease and ABCA1. *Biochim Biophys Acta.* 2000;1529:321–30.

72. Remaley A.T., Rust S., Rosier M., et al. Human ATP-binding cassette transporter 1 (ABC1): genomic organization and identification of the genetic defect in the original Tangier disease kindred. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1999;96:12685–12690
73. Cavelier L. B., Qui Y., Bielicki J. K., Afzal V., Cheng J-F., Rubin E. M. Regulation and activity of the human ABCA1 gene in transgenic mice. *J. Biol. Chem.* 2001;276:18046–18051.
74. Santamarina-Fojo S., Peterson K., Knapper C., et al. Complete genomic sequence of the human ABCA1 gene: analysis of the human and mouse ATP-binding cassette A promoter. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2000;97:7987–7992
75. Santamarina-Fojo S., Remaley A. T., Neufeld E.B., Brewer Jr. H. B. Regulation and intracellular trafficking of the ABCA1 transporter. *The Journal of Lipid Research.* 2001;42:1339-1345.
76. Nagao K1, Tomioka M, Ueda K. Function and regulation of ABCA1--membrane meso-domain organization and reorganization. *FEBS J.* 2011;278(18):3190-203. doi: 10.1111/j.1742-4658.2011.08170.x. Epub 2011 Jun 13.
77. Schwartz K., Lawn R. M., Wade D. P. ABC1 gene expression and apoA-I-mediated cholesterol efflux are regulated by LXR. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2000;274:794–802.
78. Denis M, Landry YD & Zha X. ATP-binding cassette A1-mediated lipidation of apolipoprotein A-I occurs at the plasma membrane and not in the endocytic compartments. *J Biol Chem.* 2008;283:16178–16186.
79. Faulkner LE, Panagotopoulos SE, Johnson JD, et al. An analysis of the role of a retro-endocytosis pathway in ABCA1-mediated cholesterol efflux from macrophages. *J Lipid Res.* 2008;49:1322–1332.
80. Lawn RM, Wade DP, Garvin MR, et al. The Tangier disease gene product ABC1 controls the cellular apolipoprotein-mediated lipid removal pathway. *J Clin Invest.* 1999;104:R25–31

81. Lehmann JM, Kliewer SA, Moore LB, et al. Activation of the nuclear receptor LXR by oxysterols defines a new hormone response pathway. *J Biol Chem.* 1997;272:3137–3140.
82. Bischoff ED, Daige CL, Petrowski M, et al. Non-redundant roles for LXRalpha and LXRbeta in atherosclerosis susceptibility in low density lipoprotein receptor knockout mice. *J Lipid Res.* 2010;51:900–906.
83. Venkateswaran A, Laffitte BA, Joseph SB, et al. Control of cellular cholesterol efflux by the nuclear oxysterol receptor LXR alpha. *Proc Natl Acad Sci.* 2000;97:12097–12102.
84. Tamehiro N, Shigemoto-Mogami Y, Takeya T, et al. Sterol regulatory element-binding protein-2- and liver X receptor-driven dual promoter regulation of hepatic ABC transporter A1 gene expression: mechanism underlying the unique response to cellular cholesterol status. *J Biol Chem.* 2007;282:21090–21099
85. Rayner KJ, Suarez Y, Davalos A. MiR-33 contributes to the regulation of cholesterol homeostasis. *Science.* 2010;328:1570–1573.
86. Arakawa R & Yokoyama S. Helical apolipoproteins stabilize ATP-binding cassette transporter A1 by protecting it from thiol protease-mediated degradation. *J Biol Chem.* 2002;277:22426–22429.
87. Munehira Y, Ohnishi T, Kawamoto S, et al. Alpha1-syntrophin modulates turnover of ABCA1. *J Biol Chem.* 2004;279:15091–15095.
88. Okuhira K, Fitzgerald ML, Sarracino DA, et al. Purification of ATP-binding cassette transporter A1 and associated binding proteins reveals the importance of beta1-syntrophin in cholesterol efflux. *J Biol Chem.* 2005;280:39653–39664.
89. Neufeld EB, Remaley AT, Demosky SJ, et al. Cellular localization and trafficking of the human ABCA1 transporter. *J Biol Chem.* 2001;276:27584–27590.

90. Azuma Y, Takada M, Shin H-W, Kioka N, Nakayama K and Ueda K. Retroendocytosis pathway of ABCA1 / apoA-I contributes to HDL formation. *Genes. Cells.* 2009;14:191–204.
91. Wang N, Chen W, Linsel-Nitschke P, et al. APEST sequence in ABCA1 regulates degradation by calpain protease and stabilization of ABCA1 by apoA-I. *J Clin Invest.* 2003;111:99–107.
92. Lu R, Arakawa R, Ito-Osumi C, Iwamoto N and Yokoyama S. ApoA-I facilitates ABCA1 recycle / accumulation to cell surface by inhibiting its intracellular degradation and increases HDL generation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2008;28:1820–1824.
93. Yamauchi Y, Chang CC, Hayashi M, et al. Intracellular cholesterol mobilization involved in the ABCA1 / apolipoprotein-mediated assembly of high density lipoprotein in fibroblasts. *J Lipid Res.* 2004;45:1943–1951
94. Remaley AT, Stonik JA, Demosky SJ, et al. Apolipoprotein specificity for lipid efflux by the human ABCA1 transporter. *Biochem Biophys Res Commun.* 2001;280: 818–823.
95. Fitzgerald ML, Morris AL, Chroni A, Mendez AJ, Zannis VI and Freeman MW. ABCA1 and amphipathic apolipoproteins form high-affinity molecular complexes required for cholesterol efflux. *J Lipid Res.* 2004;45:287–294.
96. Abe-Dohmae S, Kato KH, Kumon Y, et al. Serum amyloid A generates high density lipoprotein with cellular lipid in an ABCA1- or ABCA7-dependent manner. *J Lipid Res.* 2006;47:1542–1550.
97. S Soumian, C Albrecht, AH Davies and RGJ Gibbs. ABCA1 and atherosclerosis. *Vascular Medicine.* 2005;10:109–119
98. Osherovich, L. Micromanaging cholesterol. *SciBX* 2010;3(21); doi:10.1038/scibx.2010.635

99. Krutzfeldt, J., & Stoffe, M. MicroRNAs: A new class of regulatory genes affecting metabolism. *Cell Press*. 2006;4(1):9–12.
100. Moore K, Sheedy F, Fisher E. Macrophages in atherosclerosis: a dynamic balance. *Nat Rev Immunol*. 2013;13(10):709–721
101. Mao M, Lei H, Liu Q, et al. Effects of miR-33a-5p on ABCA1/G1-mediated cholesterol efflux under inflammatory stress in THP-1 macrophages. *PLoS One*. 2014;9(10):e109722. doi:10.1371/journal.pone.0109722
102. Gui T, Shimokado A, Sun Y, Akasaka T, Muragaki Y. Diverse roles of macrophages in atherosclerosis: from inflammatory biology to biomarker discovery. *Mediators Inflamm*. 2012:693083. doi:10.1155/2012/69308
103. Tang C, Liu Y, Kessler PS. The macrophage cholesterol exporter ABCA1 functions as an anti-inflammatory receptor. *J Biol Chem*. 2009;284:32336–32343
104. Zhao GJ, Yin K, Fu YC. The interaction of ApoA-I and ABCA1 triggers signal transduction pathways to mediate efflux of cellular lipids. *Mol Med*. 2012;18:149–158
105. Singaraja RR, Fievet C, Castro G. Increased ABCA1 activity protects against atherosclerosis. *J Clin Invest*. 2002;110:35–42
106. Rottiers V, Näär AM. MicroRNAs in metabolism and metabolic disorders. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2012;13:239–250
107. Horie T, Baba O, Kuwabara Y, et al. MicroRNA-33 deficiency reduces the progression of atherosclerotic plaque in ApoE^{-/-} mice. *J Am Heart Assoc*. 2012;1:e003376.
108. Fernandez-Hernando C, Moore KJ. MicroRNA modulation of cholesterol homeostasis. *Arterioscler Thrombo Vasc Biol*. 2011;31:2378–2382
109. Rayner KJ, Esau CC, Hussain FN. Inhibition of miR-33a/b in non-human primates raises plasma HDL and lowers VLDL triglycerides. *Nature*. 2011;478:404–407

110. Dávalos A, Goedeke L, Smibert P. miR-33a/b contribute to the regulation of fatty acid metabolism and insulin signaling. *Proc Natl Acad Sci*. 2011;108:9232–9237
111. Rayner KJ, Sheedy FJ, Esau CC. Antagonism of miR-33 in mice promotes reverse cholesterol transport and regression of atherosclerosis. *J Clin Invest*. 2011;121:2921–2931
112. Horton JD, Goldstein JL, Brown MS. SREBPs: activators of the complete program of cholesterol and fatty acid synthesis in the liver. *J Clin Invest*. 2002;109:1125-1131.
113. Tontonoz P, Mangelsdorf DJ. Liver X receptor signaling pathways in cardiovascular disease. *Mol Endocrinol*. 2003;17:985-993.
114. Repa JJ, Liang G, Ou J, Bashmakov Y, et al. Regulation of mouse sterol regulatory element-binding protein-1c gene (SREBP-1c) by oxysterol receptors, LXR alpha and LXR beta. *Genes Dev*. 2000;14:2819-2830
115. Peet DJ, Turley SD, Ma W, et al. Cholesterol and bile acid metabolism are impaired in mice lacking the nuclear oxysterol receptor LXR alpha. *Cell*. 1998;93:693-704.
116. Lagos-QM, Rauhut R, Yalcin A, et al. Identification of tissue-specific microRNAs from mouse. *Curr Biol*. 2002;12:735-739.
117. Goedeke L, Vales-Lara FM, Fenstermaker M, et al. A regulatory role for microRNA 33* in controlling lipid metabolism gene expression. *Mol Cell Biol*. 2013;33:2339-2352.
118. Kochar Kaur K. An Update on MicroRNA's and Metabolic Regulation with Future Therapeutic Potentials Regarding Diagnosis and Treatment of Obesity, Metabolic Syndrome and Other Related Disorders. *J Heal Med Informatics*. 2015;6(2). doi: 10.4172/2157-7420.1000184.
119. Fernández-Hernando C, Suárez Y, Rayner KJ, and Moore KJ. MicroRNAs in lipid metabolism. *Curr Opin Lipidol*. 2011;22:86-92.

120. Ramírez CM, Goedeke L, Rotllan N, et al. MicroRNA 33 regulates glucose metabolism. *Mol Cell Biol.* 2013;33:2891-2902.
121. Allen RM, Marquart TJ, Albert CJ, et al. miR-33 controls the expression of biliary transporters, and mediates statin- and diet-induced hepatotoxicity. *EMBO Mol Med.* 2012;4:882-895.
122. Horie T, Ono K, Horiguchi M, et al. MicroRNA-33 encoded by an intron of sterol regulatory element-binding protein 2 (Srebp2) regulates HDL in vivo. *Proc Natl Acad Sci.* 2010;107:17321-17326.
123. Glass CK, Witztum JL. Atherosclerosis. the road ahead. *Cell* 2001; 104:503 – 516.
124. Lusis AJ. Atherosclerosis. *Nature* 2000; 407:233 – 241.
125. Hokanson JE, Austin MA. Plasma triglyceride is a risk factor for cardiovascular disease independent of high density lipoprotein cholesterol: a meta analyses of population based prospective studies. *J Cardiovasc Res.* 1996;3:213–19
126. Stalenhoef AF, de Graaf J. Association of fasting and nonfasting serum triglycerides with cardiovascular disease and the role of remnant-like lipoproteins and small dense LDL. *Curr Opin Lipidol.* 2008;19:355–61.
127. Mora S, Rifai N, Buring JE, et al. Fasting compared with nonfasting lipids and apolipoproteins for predicting incident cardiovascular events. *Circulation.* 2008;118:993–1001.
128. Ginsberg HN, Bonds DE, Lovato LC, et al. Evolution of the lipid trial protocol of the Action to Control Cardiovascular Risk in Diabetes (ACCORD) trial. *Am J Cardiol.* 2007;99:56i–67i
129. Assmann G, Schulte H, Funke H, et al. The emergence of triglycerides as a significant independent risk factor in coronary artery disease. *Eur Heart J.* 1998;19(Suppl M):M8–14.

130. Jeppesen J, Hein HO, Suadicani P, et al. Triglyceride concentration and ischemic heart disease: an eight-year follow-up in the Copenhagen Male Study. *Circulation*. 1998;97:1029–36
131. Hokanson JE, Austin MA. Plasma triglyceride is a risk factor for cardiovascular disease independent of high density lipoprotein cholesterol: a meta analyses of population based prospective studies. *J Cardiovasc Res*. 1996;3:213–19.
132. Abdel-Maksoud M, Sazonov V, Gutkin SW, et al. Effects of modifying triglycerides and triglyceride-rich lipoproteins on cardiovascular outcomes. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2008;51:331–51.
133. Sarwar N, Danesh J, Eiriksdottir G, et al. Triglycerides and the risk of coronary heart disease: 10,158 incident cases among 262,525 participants in 29 Western prospective studies. *Circulation*. 2007;115:450–8.
134. Hokanson JE, Austin MA. Plasma triglyceride level is a risk factor for cardiovascular disease independent of high-density lipoprotein cholesterol level: a meta-analysis of population-based prospective studies. *J Cardiovasc Risk*. 1996;3:213–19.
135. Creemers EE, Tijssen AJ, Pinto YM. Circulating micro-RNAs novel biomarkers and extracellular communicators in cardiovascular disease?. *Circ Res*. 2012;110:483–495
136. Vickers KC, Palmisano BT, Shoucri BM. MicroRNAs are transported in plasma and delivered to recipient cells by high-density lipoproteins. *Nat Cell Biol*. 2011;13:423–433
137. Ge Q, Zhou Y, Lu J, Bai Y, Xie X, Lu Z. miRNA in Plasma Exosome is Stable under Different Storage Conditions Molecules. 2014;19(2):1568–1575 doi:10.3390/molecules19021568
138. Chen X, Ba Y, Ma L. Characterization of microRNAs in serum: a novel class of biomarkers for diagnosis of cancer and other diseases. *Cell Res*. 2008;18:997–1006

139. Mitchell PS, Parkin RK, Kroh EM. Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. *Proc Natl Acad Sci. USA* 2008;105:10513–10518
140. Fichtlscherer S, De Rosa S, Fox H. Circulating microRNAs in patients with coronary artery disease. *Circ Res.* 2010;107:677–684
141. Fernandez-Hernando C, Ramirez CM, Goedeke L, Suarez Y. MicroRNAs in metabolic disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2013;33:178 – 185.
142. Olson EN. MicroRNAs as therapeutic targets and biomarkers of cardiovascular disease. *Sci Transl Med.* 2014;6:239ps233.
143. Canfran-Duque A, Ramirez CM, Goedeke L, et al. MicroRNAs and HDL life cycle. *Cardiovasc Res.* 2014; 03:414 – 422.
144. Fisher EA, Feig JE, Hewing B, Hazen SL, Smith JD. HDL Function, Dysfunction, and Reverse Cholesterol Transport. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology.* 2012;32(12):2813-2820. doi:10.1161/ATVBAHA.112.300133.
145. Bertrais S., Balkau B., Charles M. A.. Puberty-associated Differences in Total Cholesterol and Triglyceride Levels According to Sex in French Children Aged 10–13 Years. *Ann Epidemiol.* 2000;10:316–323
146. Sommariva D, Tirrito M, Bellintani L, et al. Interrelationships between body mass and lipid and lipoprotein triglycerides and cholesterol in obese women. *Ric Clin Lab.* 1986;16(3):481-8.
147. Shamai L, Lurix E, Shen M, et al. Association of body mass index and lipid profiles: evaluation of a broad spectrum of body mass index patients including the morbidly obese. *Obes Surg.* 2011;21(1):42-7. doi: 10.1007/s11695-010-0170-7.
148. Wijesekara N, Zhang L, Kang MH, et al. miR-33a Modulates ABCA1 Expression, Cholesterol Accumulation, and Insulin Secretion in Pancreatic Islets. *Diabetes.* 2012;61(3):653-658. doi:10.2337/db11-0944.

- 149.Hanley JA, McNeil BJ. The meaning and use of the area under a receiver operating characteristic (ROC) curve. *Radiology*. 1982;143:29–36.
- 150.Zou KH, O'Malley AJ, Mauri L. Receiver operating characteristic analysis for evaluation diagnostic tests and predictive models. *Circulation*. 2007;115:654–57.
- 151.Gerin I, Clerbaux L-A, Haumont O, et al. Expression of miR-33 from an SREBP2 Intron Inhibits Cholesterol Export and Fatty Acid Oxidation. *The Journal of Biological Chemistry*. 2010;285(44):33652-33661. doi:10.1074/jbc.M110.152090.
- 152.Goedeke L, Salerno A, Ramírez CM, et al. Long-term therapeutic silencing of miR-33 increases circulating triglyceride levels and hepatic lipid accumulation in mice. *EMBO Molecular Medicine*. 2014;6(9):1133-1141. doi:10.15252/emmm.201404046.

HAM VERİLER

ROC curve

Variable	deltaCt
Classification variable	Diagnosis
Positive group	
Diagnosis	= 1
Sample size	29
Negative group	
Diagnosis	= 0
Sample size	38
Disease prevalence (%)	unknown
Area under the ROC curve (AUC)	0,572
Standard Error	0,0704
95% Confidence Interval	0,445 to 0,692
z statistic	1,019
Significance level P (Area=0.5)	0,3083

Criterion values and coordinates of the ROC curve [Hide]

Criterion	Sensitivity	95% CI	Specificity	95% CI	+LR	95% CI	-LR	95% CI
< -9,12	0,00	0,0 - 12,1	100,00	90,7 - 100,0			1,00	
<=-9,12	0,00	0,0 - 12,1	97,37	86,1 - 99,6	0,00		1,03	0,1 - 7,1
<=2,26	3,45	0,6 - 17,8	97,37	86,1 - 99,6	1,31	0,2 - 9,0	0,99	0,1 - 6,9
<=2,91	3,45	0,6 - 17,8	94,74	82,2 - 99,2	0,66	0,1 - 4,5	1,02	0,3 - 3,9
<=3,41	6,90	1,0 - 22,8	94,74	82,2 - 99,2	1,31	0,3 - 5,0	0,98	0,3 - 3,8
<=3,43	6,90	1,0 - 22,8	92,11	78,6 - 98,2	0,87	0,2 - 3,3	1,01	0,3 - 3,0
<=3,73	6,90	1,0 - 22,8	89,47	75,2 - 97,0	0,66	0,2 - 2,5	1,04	0,4 - 2,6
<=3,79	10,34	2,3 - 27,4	89,47	75,2 - 97,0	0,98	0,3 - 2,9	1,00	0,4 - 2,6
<=3,83	10,34	2,3 - 27,4	86,84	71,9 - 95,5	0,79	0,3 - 2,3	1,03	0,5 - 2,4
<=3,88	13,79	4,0 - 31,7	86,84	71,9 - 95,5	1,05	0,4 - 2,6	0,99	0,4 - 2,3
<=3,9	17,24	5,9 - 35,8	86,84	71,9 - 95,5	1,31	0,6 - 2,9	0,95	0,4 - 2,2
<=3,96	17,24	5,9 - 35,8	84,21	68,7 - 93,9	1,09	0,5 - 2,5	0,98	0,5 - 2,1
<=4,04	20,69	8,0 - 39,7	84,21	68,7 - 93,9	1,31	0,6 - 2,7	0,94	0,4 - 2,0
<=4,13	24,14	10,3 - 43,5	84,21	68,7 - 93,9	1,53	0,8 - 3,0	0,90	0,4 - 1,9
<=4,16	27,59	12,8 - 47,2	84,21	68,7 - 93,9	1,75	1,0 - 3,2	0,86	0,4 - 1,9
<=4,3	27,59	12,8 - 47,2	81,58	65,7 - 92,2	1,50	0,8 - 2,8	0,89	0,4 - 1,8
<=4,36	27,59	12,8 - 47,2	78,95	62,7 - 90,4	1,31	0,7 - 2,4	0,92	0,5 - 1,8
<=4,37	27,59	12,8 - 47,2	76,32	59,8 - 88,5	1,16	0,6 - 2,2	0,95	0,5 - 1,8
<=4,43	27,59	12,8 - 47,2	73,68	56,9 - 86,6	1,05	0,6 - 1,9	0,98	0,6 - 1,8
<=4,48	27,59	12,8 - 47,2	71,05	54,1 - 84,6	0,95	0,5 - 1,8	1,02	0,6 - 1,8
<=4,55	31,03	15,3 - 50,8	71,05	54,1 - 84,6	1,07	0,6 - 1,9	0,97	0,6 - 1,7
<=4,74	34,48	18,0 - 54,3	71,05	54,1 - 84,6	1,19	0,7 - 2,0	0,92	0,5 - 1,6
<=4,83	37,93	20,7 - 57,7	71,05	54,1 - 84,6	1,31	0,8 - 2,2	0,87	0,5 - 1,6
<=4,94	41,38	23,5 - 61,1	71,05	54,1 - 84,6	1,43	0,9 - 2,3	0,83	0,5 - 1,5
<=5,23	44,83	26,5 - 64,3	71,05	54,1 - 84,6	1,55	1,0 - 2,4	0,78	0,4 - 1,4
<=5,25	48,28	29,5 - 67,5	71,05	54,1 - 84,6	1,67	1,1 - 2,6	0,73	0,4 - 1,3
<=5,27 *	51,72	32,5 - 70,5	71,05	54,1 - 84,6	1,79	1,2 - 2,7	0,68	0,4 - 1,3
<=5,37	51,72	32,5 - 70,5	68,42	51,3 - 82,5	1,64	1,1 - 2,5	0,71	0,4 - 1,3
<=5,44	51,72	32,5 - 70,5	65,79	48,6 - 80,4	1,51	1,0 - 2,3	0,73	0,4 - 1,3
<=5,47	55,17	35,7 - 73,5	65,79	48,6 - 80,4	1,61	1,1 - 2,4	0,68	0,4 - 1,2
<=5,48	55,17	35,7 - 73,5	63,16	46,0 - 78,2	1,50	1,0 - 2,3	0,71	0,4 - 1,3
<=5,55	55,17	35,7 - 73,5	57,89	40,8 - 73,7	1,31	0,9 - 2,0	0,77	0,4 - 1,3
<=5,68	55,17	35,7 - 73,5	55,26	38,3 - 71,4	1,23	0,8 - 1,9	0,81	0,5 - 1,4
<=5,87	55,17	35,7 - 73,5	52,63	35,8 - 69,0	1,16	0,7 - 1,8	0,85	0,5 - 1,4
<=5,89	58,62	38,9 - 76,5	52,63	35,8 - 69,0	1,24	0,8 - 1,9	0,79	0,5 - 1,4
<=6	58,62	38,9 - 76,5	50,00	33,4 - 66,6	1,17	0,8 - 1,8	0,83	0,5 - 1,4
<=6,13	62,07	42,3 - 79,3	47,37	31,0 - 64,2	1,18	0,8 - 1,8	0,80	0,5 - 1,4

ROC curve

Variable	livak
Classification variable	Diagnosis
Positive group	
Diagnosis	= 1
Sample size	29
Negative group	
Diagnosis	= 0
Sample size	38
Disease prevalence (%)	unknown
Area under the ROC curve (AUC)	0,574
Standard Error	0,0712
95% Confidence Interval	0,447 to 0,694
z statistic	1,032
Significance level P (Area=0.5)	0,3021

Criterion values and coordinates of the ROC curve [Hide]

Criterion	Sensitivity	95% CI	Specificity	95% CI	+LR	95% CI	-LR	95% CI
>=0	100,00	87,9 - 100,0	0,00	0,0 - 9,3	1,00			
>0	100,00	87,9 - 100,0	2,63	0,4 - 13,9	1,03	0,1 - 7,1	0,00	
>0,07	96,55	82,2 - 99,4	5,26	0,8 - 17,8	1,02	0,3 - 3,9	0,66	0,1 - 4,5
>0,12	96,55	82,2 - 99,4	7,89	1,8 - 21,4	1,05	0,4 - 3,1	0,44	0,06 - 3,0
>0,16	96,55	82,2 - 99,4	10,53	3,0 - 24,8	1,08	0,4 - 2,7	0,33	0,05 - 2,3
>0,21	93,10	77,2 - 99,0	13,16	4,5 - 28,1	1,07	0,5 - 2,4	0,52	0,1 - 2,0
>0,22	89,66	72,6 - 97,7	13,16	4,5 - 28,1	1,03	0,5 - 2,4	0,79	0,3 - 2,3
>0,23	89,66	72,6 - 97,7	15,79	6,1 - 31,3	1,06	0,5 - 2,2	0,66	0,2 - 1,9
>0,25	89,66	72,6 - 97,7	18,42	7,8 - 34,3	1,10	0,6 - 2,2	0,56	0,2 - 1,7
>0,26	89,66	72,6 - 97,7	21,05	9,6 - 37,3	1,14	0,6 - 2,1	0,49	0,2 - 1,5
>0,27	89,66	72,6 - 97,7	23,68	11,5 - 40,2	1,17	0,7 - 2,1	0,44	0,1 - 1,3
>0,39	89,66	72,6 - 97,7	26,32	13,4 - 43,1	1,22	0,7 - 2,1	0,39	0,1 - 1,2
>0,45	86,21	68,3 - 96,0	26,32	13,4 - 43,1	1,17	0,7 - 2,0	0,52	0,2 - 1,3
>0,46	79,31	60,3 - 92,0	26,32	13,4 - 43,1	1,08	0,6 - 1,9	0,79	0,4 - 1,6
>0,49	75,86	56,5 - 89,7	31,58	17,5 - 48,7	1,11	0,7 - 1,8	0,76	0,4 - 1,5
>0,51	75,86	56,5 - 89,7	34,21	19,6 - 51,4	1,15	0,7 - 1,9	0,71	0,4 - 1,4
>0,59	72,41	52,8 - 87,2	36,84	21,8 - 54,0	1,15	0,7 - 1,8	0,75	0,4 - 1,4
>0,62	68,97	49,2 - 84,7	36,84	21,8 - 54,0	1,09	0,7 - 1,8	0,84	0,5 - 1,5
>0,63	68,97	49,2 - 84,7	39,47	24,1 - 56,6	1,14	0,7 - 1,8	0,79	0,4 - 1,4
>0,72	65,52	45,7 - 82,0	39,47	24,1 - 56,6	1,08	0,7 - 1,7	0,87	0,5 - 1,5
>0,73	65,52	45,7 - 82,0	42,11	26,3 - 59,2	1,13	0,7 - 1,8	0,82	0,5 - 1,4
>0,76	62,07	42,3 - 79,3	44,74	28,6 - 61,7	1,12	0,7 - 1,8	0,85	0,5 - 1,5
>0,8	58,62	38,9 - 76,5	50,00	33,4 - 66,6	1,17	0,8 - 1,8	0,83	0,5 - 1,4
>0,88	58,62	38,9 - 76,5	52,63	35,8 - 69,0	1,24	0,8 - 1,9	0,79	0,5 - 1,4
>0,95	55,17	35,7 - 73,5	52,63	35,8 - 69,0	1,16	0,7 - 1,8	0,85	0,5 - 1,4
>0,96	55,17	35,7 - 73,5	55,26	38,3 - 71,4	1,23	0,8 - 1,9	0,81	0,5 - 1,4
>1,1	55,17	35,7 - 73,5	57,89	40,8 - 73,7	1,31	0,9 - 2,0	0,77	0,4 - 1,3
>1,2	55,17	35,7 - 73,5	63,16	46,0 - 78,2	1,50	1,0 - 2,3	0,71	0,4 - 1,3
>1,26	55,17	35,7 - 73,5	65,79	48,6 - 80,4	1,61	1,1 - 2,4	0,68	0,4 - 1,2
>1,27	51,72	32,5 - 70,5	65,79	48,6 - 80,4	1,51	1,0 - 2,3	0,73	0,4 - 1,3
>1,3	51,72	32,5 - 70,5	68,42	51,3 - 82,5	1,64	1,1 - 2,5	0,71	0,4 - 1,3
>1,36 *	51,72	32,5 - 70,5	71,05	54,1 - 84,6	1,79	1,2 - 2,7	0,68	0,4 - 1,3
>1,46	48,28	29,5 - 67,5	71,05	54,1 - 84,6	1,67	1,1 - 2,6	0,73	0,4 - 1,3
>1,48	44,83	26,5 - 64,3	71,05	54,1 - 84,6	1,55	1,0 - 2,4	0,78	0,4 - 1,4
>1,5	41,38	23,5 - 61,1	71,05	54,1 - 84,6	1,43	0,9 - 2,3	0,83	0,5 - 1,5
>1,83	37,93	20,7 - 57,7	71,05	54,1 - 84,6	1,31	0,8 - 2,2	0,87	0,5 - 1,6
>1,98	34,48	18,0 - 54,3	71,05	54,1 - 84,6	1,19	0,7 - 2,0	0,92	0,5 - 1,6

FORMLAR

YEDİTEPE ÜNİVERSİTESİ OLGU RAPOR FORMU

1. ÇALIŞMANI ADI: **miRNA-33a İfade Düzeyinin Trigliserid seviyesi üzerine etkisinin araştırılması**

ÇALIŞMAYA / ARAŞTIRMAYA DAHİL **EDİLME** KRİTERLERİ

Deney Grupları için;

- Gönüllü Olma
- Ateroskleroz Hastası Olma
- 18 – 85 yaş aralığında olma
- Yukarıda belirtilenler haricinde bir hastalığa sahip olmama

Kontrol Grubu için ;

- Gönüllü olma
- Sağlıklı olma (yukarıda belirtilenlerde dahil olmak üzere hiçbir hastalığa sahip olmama)
- 18 – 85 yaş aralığında olma

ÇALIŞMAYA / ARAŞTIRMAYA DAHİL **EDİLMEME** KRİTERLERİ

- Gönüllü olmama
- 18 – 85 yaş aralığı dışında olma
- Yukarıda belirtilenler dışında bir hastalığa sahip olma

Sorumlu Araştırmacı

OLGU RAPOR FORMU

Adı Soyadı :
Yaş :
Cinsiyet :
Boy :
Kilo :
Şikayeti :
Tanısı :
ASA :

Randomizasyon Sayısı:

VAS Skoru
Geliş :
Redüksiyon :

Sedasyon Derinliği
 Sedasyon yok, anksiyöz
 Uyanık ,sakin-konuşuyor
 İyi sedatize, konuşması peltek

Ek Sedasyon gereksinimi oldu mu ? Evet / Hayır
Evet ise ne kadar (mg) uygulandı?

Sedasyon Başlama Süresi
Derlenme Süresi :
Taburculuk Süresi :

Hipoksi (Sat O2<%95) gelişti mi ?

EVET Kaç saniye/dk : Oksijen verildi mi: Evet / Hayır
 HAYIR Entübasyon yapıldı mı: Evet / Hayır

Yan etkiler:

Bulantı / Kusma / Halusinasyon / Solunum depresyonu / Aritmi / Diğer

Hasta memnuniyeti: Çok iyi / İyi / Orta / Kötü / Çok kötü

Uygulayıcı memnuniyeti: Çok iyi / İyi / Orta / Kötü / Çok kötü

	TA (mmHg)	Nabız(vr/dk)	End Tidal CO2	O2 Sat (%)
Geliş				
0. dk				
5. dk				
10. dk				
30. dk				
60. dk				
90. dk				
120. dk				

Telefon :
Faks :
E-posta :

Bu anlaşmada belirtilen koşulları okudum ve anladım. Gönderilen materyalde bu anlaşmada belirtilen koşullara uyacağımı taahhüt ederim.

	GÖNDERİCİ			ALICI	
	Gönderen Araştırmacı	Gönderen Destekleyici Firma Yetkilisi veya Yasal Temsilcisi	Eğitim Görevlisi / Ana Bilim Dalı Başkanı	Kurum Amin / Rektör veya Yetkilendirdiği Makam	Alıcı Kurum Yetkilisi
Eİ Yazısı İlg Adı Soyadı Ünvanı					
Tarih					
İmza					

Not: Bu anlaşmada yer alan alıcı kurum yetkilisinin imzası yerine alıcı kurum tarafından verilecek olan ve içerik olarak bu anlaşmadaki hükümlere benzer hükümleri içeren imzalı "end use certificate" "son kullanım sertifikası" de kabul edilebilir.

Asgari Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formu

Sayın Hastamız,

- Bu belge bilgilendirilme ve aydınlatılmış onam haklarınızdan yararlanabilmenizi amaçlamaktadır.
- Size gerçekleştirilebilecek klinik araştırmalar amaçlı girişimler konusunda, tüm seçenekler ile bu girişimlerin yarar ve muhtemel zararları konusunda anlayabileceğiniz şekilde **bilgi alma hakkınız ve bir kopyasını isteme hakkınız** vardır.
- Yasal ve tıbbi zorunluluk taşıyan durumlar dışında **bilgilendirmeyi reddedebilirsiniz**. Yazılı bildirmek koşulu ile bilgi almama veya yerinize güvendiğiniz bir kimsenin bilgilendirilmesini talep etme hakkına sahiptir.
- klinik araştırmalara katılım konusunda bilgilendirildikten sonra bunu kabul edebilirsiniz. Ya da karar verebilmek için uygun zaman talep edebilirsiniz.
- Hayatınız veya hayati organlarınız tehlikede olmadığı sürece onamınızı (yazılı talep etme koşulu ile) **dilediğiniz zaman geri alabilir** ya da önceden kabul etmediğiniz herhangi bir tanı/televi amaçlı girişimi **tekrar talep edebilirsiniz**.
- Hastanemizde verilen hizmetleri **Hastane Tanıtım Broşüründen** edinebilirsiniz. Ayrıca Hastane personeli hakkında <http://www.yeditepe.edu.tr> web sayfasından daha detaylı bilgilere ulaşabilirsiniz.
- Burada belirtilenlerden başka sorularınız varsa bunları yanıtlamak görevimizdir.

TANIMLAMA

1. **Araştırmanın Adı:** miRNA-33a İfade Düzeyinin Trigliserid seviyesi üzerine etkisinin araştırılması

Araştırmaya Katılımcı Sayısı: 200

Bu araştırmanın Amacı:

Trigliseridler yağ hücrelerinde saklanır. Daha sonra, hormonlar yemekler arasında enerji için trigliseritleri serbest bırakır.Yüksek TG seviyeleri aterosklerotik lipoproteinler için belirteçlerdir. MikroRNA'lar, spesifik mRNA'nın 3' çevrilmemiş bölgesine bağlanıp, translasyonu engeller veya mRNA degradasyonuna katkıda bulunurlar. Ayrıca Mikro RNA'lar, lipoprotein metabolizmasını yöneten transkripsiyon faktörleri, enzimler ve reseptörlerin ekspresyonunu ve işlevini modüle eder. miR33a, SREBF2'nin intron bölgesinde kodlanır. SREBP'ler

(Sterol Düzenleyici Element Bağlayan Protein), karaciğerdeki lipid metabolizmasına katılan genlerin ekspresyonunu düzenler. SREBP2, 3-hidroksi-3-metilglutaril koenzim A redüktaz (HMGR) ve düşük yoğunluklu lipoprotein reseptörü (LDLR) gibi kolesterol homeostazının kontrolünde rol oynayan genlerin ekspresyonunu düzenler. MiR33'ü antagonize etmek, plazma HDL'yi yükseltmek için cazip bir strateji olarak gelişebilir ve ateroskleroza karşıdır, dikkatli olunmalıdır çünkü miR33'ün uzun vadeli terapötik susturulması dolaşımdaki trigliserit seviyelerini artırabilir. Hücre düzeyinde, miR-33'ler ABCA1'i (ATP bağlayıcı kaset taşıyıcı) hedef alır ve kolesterol tükenmiş koşullar altında hücre içi kolesterol düzeylerini korumak için kolesterol salınımını azaltır. Kolesterol açısından zengin koşullarda, miR33a seviyeleri azalır, bu da ABCA1'in baskı altına alınmasına neden olur. Tüm vücut seviyesinde, miR-33a, yağ asiti sentezi pahasına kolesterol düzeylerini korur. Bir çalışmaya göre, MiR-33 inhibisyonu, kardiyovasküler hastalık riskini etkilemek için HDL, VLDL-TG ve hepatik salgılanmış proteinleri etkileyebilir. Hepatositlerde miR-33'ün inhibisyonu, sırasıyla ABCA1 ve NSF'nin baskılamasından ötürü VLDL-TG'nin ve diğer hepatik proteinlerin artmış HDL sentezi ve hepatik salınımına yol açar. Makrofajlarda, miR-33, ABCA1 / ABCG1'i hedef alır. Artan VLDL-TG sekresyonu, Kardiyovasküler Hastalığını (KVH) olumsuz şekilde etkileyebilir. MiR-33'ün engellenmesi, makrofajlardaki ters kolesterol taşınmasını teşvik eder ve bu da KVH'ye karşı koruma sağlayabilir.

TargetScan (targetscan.org), miRanda (microrna.org), ve miRBase (miRBase.org) biyoinformatik veritabanları aracılığıyla araştırılan miRNA-33a ifade düzeyinin insanlarda trigliserid seviyesi ile ilişkisi olduğu anlaşıldığı için, bu mikroRNA ile çalışılmaya karar verilmiştir.

Süresi: 1 Yıl

İzlenecek Yöntem/Yöntemler:

Hasta (n=100) ve kontrol (n=100) grubu olmak üzere iki gruptan oluşması planlanmıştır.

miRNA izolasyonu:

miRNA izolasyonu için hasta ve kontrol grubundan alınan kanlar 4500 rpm'de 15 dakika boyunca santrifüj edilecek ve elde edilen serumlar çalışma yapılana kadar -80'de saklanacaktır. miRNA izolasyonu için Qiagen serum plazma kiti kullanılacaktır. Qiagen kiti kullanılarak cDNA sentezi yapılacaktır. miRNA ekspresyon seviyesi 7500 gerçek zamanlı PZR kullanılarak ölçülecektir

Araştırma Sonunda Beklenen Fayda

miRNA-33a İfade Düzeyinin Trigliserid seviyesi üzerine etkisinin belirlenmesi

Bu Çalışmada Herhangi Bir Alternatif Tedavi yada Girişimde Bulunulmayacaktır.

Bu Araştırma Gönüllüler İçin Hiçbir Risk Teşkil Etmemekte ve Hiçbir Rahatsızlığa Sebep olmamaktadır.

ONAM (RIZA)

Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formundaki tüm açıklamaları okudum. Bana, yukarıda konusu ve amacı belirtilen araştırma ile ilgili yazılı ve sözlü açıklama aşağıda adı belirtilen hekim tarafından yapıldı. Araştırmaya gönüllü olarak katıldığımı, istediğim zaman gerekçeli veya gerekçesiz olarak araştırmadan ayrılabileceğimi ve kendi isteğime bakılmaksızın araştırmacı tarafından araştırma dışı bırakılabileceğimi biliyorum. Bu durumda hastanenin çalışma düzeni ve hastalara verilen bakımda aksaklık olmayacağı konusunda bilgilendirildim. Bu araştırmaya katılırken zorlama, maddi çıkar ve ast üst ilişkisine dayalı herhangi bir baskı olmaksızın bu çalışmaya katıldığımı beyan ederim. Bu bilimsel çalışmanın devamı esnasındaki süreçle ilgili olarak ayrıca eklenen çalışma protokolü ile bilgilendirildim. Tarafımdan alınan kan ve doku örneklerinin daha sonra başka araştırma çalışmalarında kullanılmasında herhangi bir sakınca yoktur.

Söz konusu araştırmaya, hiçbir baskı ve zorlama olmaksızın kendi rızamla katılmayı kabul ediyorum.

Gönüllünün:

Adı Soyadı:

İmzası:

Tarih:

Açıklamaları Yapan Kişinin:

Adı Soyadı:

İmzası:

Tarih:

Gerekliyse Olur İşlemine Tanık Olan Kişinin:

Adı Soyadı:

İmzası:

Tarih:

Gerekliyse Yasal Temsilcinin :

Adı Soyadı:

İmzası:

Tarih:

Klinik Araştırma Proje Koordinatörü İletişim Bilgileri:

Adı Soyadı:

Uzmanlık alanı:

Kurumu:

E-posta adresi:

Telefon numarası:

ETİK KURUL KARARI



T.C. YEDİTEPE ÜNİVERSİTESİ

Sayı : 37068608-6100-15-1382
Konu: Klinik Araştırmalar
Etik kurul Başvurusu hk.

23/11/2017

İlgili Makama (Ayşe Dilara Aydemir)

Yeditepe Üniversitesi Moleküler Tıp Anabilim Dalı Prof. Dr. Turgay İsbir'in sorumlu olduğu "**MİRNA-33a İfade Düzeyinin Triglicerid Seviyesi Üzerine Etkisinin Araştırılması**" isimli araştırma projesine ait Klinik Araştırmalar Etik Kurulu (KAEK) Başvuru Dosyası (**1362** kayıt Numaralı KAEK Başvuru Dosyası), Yeditepe Üniversitesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu tarafından **22.11.2017** tarihli toplantıda incelenmiştir.

Kurul tarafından yapılan inceleme sonucu, yukarıdaki isimi belirtilen çalışmanın yapılmasının etik ve bilimsel açıdan uygun olduğuna karar verilmiştir (**KAEK Karar No: 752**).

Prof. Dr. Turgay ÇELİK

Yeditepe Üniversitesi
Klinik Araştırmalar Etik Kurulu Başkanı

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	Ayşe Dilara	Soyadı	Aydemir
Doğum Yeri	Kadıköy/İstanbul	Doğum Tarihi	08.11.1992
Uyruğu	T.C.	TC Kimlik No	25913004532
E-mail	adilara.aydemir@gmail.com	Tel	5367799499

Öğrenim Durumu

Derece	Alan	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mezuniyet Yılı
Doktora			
Yüksek Lisans			
Lisans	Genetik ve Biyomühendislik	T.C. Yeditepe Üniversitesi	2016
Lise	-	Özel Maltepe Gökyüzü Koleji	2010

Bildiği Yabancı Diller	Okuduğunu Anlama	Yazma	Konuşma	Yabancı Dil Sınav Notu (#)
İngilizce	İyi	İyi	İyi	56,25

Başarılmış birden fazla sınav varsa (KPDS, ÜDS, TOEFL; EELTS vs), tüm sonuçlar yazılmalıdır.

*Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin.

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
LES Puanı			
(Diğer) ALES Puanı	74,697	74,268	65,634

Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma becerisi
Microsoft Office	İyi
Matlab	Orta
Phyton	İyi

*Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin.

Bilimsel Çalışmaları

Uluslararası bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitabında (*Proceedings*) basılan bildiriler

Dilara Aydemir, Ezgi Yalbir, Tuğçe Gül, Seda Güleç Yılmaz, Emre Murat Altıncılıç, Selim İsbir, Atike Tekeli Kunt, Orhan Fındık, Turgay İsbir. Analysis of GCK-MODY (MODY2) Gene Polymorphism on Chr. 7:44149424 in Coronary Artery Disease Patients. Turkish Journal of Molecular Biology & Biotechnology Supplement 1, Number 01, Volume 02, May 2017

Ezgi Yalbir, **Dilara Aydemir**, Tuğçe Gül, Seda Güleç Yılmaz, Selvi Duman, Selim İsbir, Atike Tekeli Kunt, Orhan Fındık, Turgay İsbir. Effects of GCK-MODY (MODY2) Gene Polymorphism on Chr.7:44163407 in Patients With Coronary Artery Disease. Turkish Journal of Molecular Biology & Biotechnology Supplement 1, Number 01, Volume 02, May 2017

Tuğçe GUL, **Dilara AYDEMİR**, Ezgi YALBIR, Seda GULEC YILMAZ, Hüseyin AYHAN, Selim ISBİR, Atike TEKELI KUNT, Orhan FINDIK, Turgay ISBİR. Investigation of Mody 2 (c.7: 44183880G>A) Polymorphism in Patients With Coroner Artery Disease. Turkish Journal of Molecular Biology & Biotechnology Supplement 1, Number 01, Volume 02, May 2017