

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

**MİKRORNA-148A İFADE DÜZEYİNİN LDL  
KOLESTEROL SEVİYESİ ÜZERİNE ETKİSİNİN  
ARAŞTIRILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Mol. Bio. Tuğçe GÜL

İstanbul-2018

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

**MİKRORNA-148A İFADE DÜZEYİNİN LDL  
KOLESTEROL SEVİYESİ ÜZERİNE ETKİSİNİN  
ARAŞTIRILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Mol. Bio. Tuğçe GÜL

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 : mikroRNA-148a İfade Düzeyinin LDL Kolesterol Seviyesi Üzerine Etkisinin Araştırılması

Tez Sahibi : Tuğçe Gül

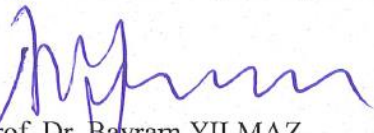
Sınav Tarihi : 26 Ocak 2018

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 2018/03-09..... 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.

Tuğçe GÜL

## İTHAF

Sevgili Aileme  
ve  
Sayın hocam Prof. Dr. Turgay İsbir'e ithaf ediyorum.

## TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim süresince yolumu gerek akademik gerek hayat tecrübeleriyle aydınlatan, tezimin her aşaması için gereken tüm ihtiyaçları en iyi şekilde sağlayan, Yeditepe Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji ve Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Moleküler Tıp Anabilim Dalı Başkanı sayın hocam Prof. Dr. Turgay İsbir'e,

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

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

Başta tüm tez çalışmam boyunca desteğini hiç esirgemeyen Dr. G. Seda Güleç Yılmaz ve her zaman sevgiyle ve ilgiyle bana destek olan canım arkadaşlarım Biomüh. A. Dilara Aydemir ve Biomüh. Ezgi Yalbir olmak üzere Moleküler Tıp ailesinin değerli üyeleri olan Dr. Selvi Duman, Dr. Müge Kopuz, MSc. E. Murat Altıncılıç, MSc. Hüseyin Ayhan'a ve Hüseyin Kilili'ye,

Hayatta her zaman arkamda ve yanımda olduklarından emin olduğum, tüm çalışmalarım süresince bana en iyi çalışma koşullarını sağlayan, hayattaki en büyük hazinem olan; çok sevgili babam Ayhan Gül, annem Fazilet Gül ve kardeşim Ece Gül'e, eğitim hayatımdaki zorlu aşamaları beraber paylaştığım can dostum Mol. Bio. Gamze Turan'a en içten teşekkürlerimi sunarım.

Tuğçe GÜL

# İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI .....	ii
BEYAN.....	iii
İTHAF .....	iv
TEŞEKKÜR .....	v
İÇİNDEKİLER.....	vi
TABLOLAR LİSTESİ.....	viii
ŞEKİLLER LİSTESİ .....	ix
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ .....	x
ABSTRACT .....	xv
ÖZET .....	xvi
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. KOLESTEROL .....	3
2.2 KOLESTEROL BİYOSENTEZİ .....	3
2.2.1. Mevalonatin Asetattan Sentezi .....	4
2.2.2. Mevalonatin İki Aktif İzoprene Çevrilmesi .....	4
2.2.3. Aktifleşmiş Altı İzopren Biriminin Skualen Oluşturmak Üzere Kondensleşmesi .....	5
2.2.4. Skualenin Dört Halkalı Steroit Çekirdeğine Çevrilmesi .....	5
2.3. KOLESTEROL KATABOLİZMASI.....	6
2.4. KOLESTEROLÜN TAŞINMASI .....	6
2.4.1. Lipoprotein Çeşitleri .....	7
2.4.2. Ekzojen Lipit Transportu.....	8
2.4.3. Endojen Lipit Transportu.....	9
2.4.4. Hepatik ve Ekstrahepatik Dokularda Kolesterol Metabolizması .....	10
2.4.5. Ters Kolesterol Taşınması.....	12
2.5. KOLESTEROL KONSANTRASYONUNUN DÜZENLENMESİ .....	13
2.6. KISA RNA'LAR .....	16
2.7. MİKRO RNA'LAR .....	17
2.7.1. miRNA'ların Biyogenezi .....	19
2.7.2. miRNA'ların mRNA'ları Düzenlemesi .....	22
2.7.3. miRNA'ların Hücre Dışına Çıkartılması .....	23
2.7.4. miRNA-148a .....	24

3. GEREÇ VE YÖNTEMLER.....	27
3.1. Örneklerin Seçimi.....	27
3.2. Kullanılan Malzeme ve Cihazlar.....	27
3.2.1. Kullanılan Sarf ve Ayrac Malzemeler.....	27
3.2.1.1. miRNA İzolasyonu.....	27
3.2.1.2. Fluometre ile miRNA Düzeyi Belirleme.....	28
3.2.1.3. NanoDrop ile miRNA Saflık Tayini.....	28
3.2.1.4. Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) Cihazı ile miRNA Ekspresyon Düzeyi Belirleme.....	28
3.2.2. Kullanılan Cihazlar .....	28
3.3. Yöntemler.....	28
3.3.1. Serumdan miRNA İzolasyonu .....	28
3.3.2. cDNA Eldesi .....	29
3.3.3. miRNA Saflık Tayini.....	30
3.3.4. miRNA Miktarlarının Belirlenmesi.....	30
3.3.5. Eş Zamanlı PZR Cihazı ile miRNA Ekspresyon Analizleri .....	30
3.3.6. Lipid Profillerinin Ölçülmesi .....	31
3.3.7. İstatistiksel Analiz .....	32
4. BULGULAR .....	33
4.1. Çalışmaya Ait Demografik Veriler .....	33
4.2. Çalışma Gruplarına Ait miRNA-148a İfade Düzeyi Sonuçları.....	34
4.3. miRNA-148a İfade Düzeylerinin Lipid Seviyeleriyle Korelasyon Analizleri.....	37
4.4. miRNA-148a İfade Düzeylerinin ROC Analizleri .....	41
5. TARTIŞMA VE SONUÇ .....	43
6. KAYNAKLAR .....	50
HAM VERİLER .....	59
FORMLAR .....	61
ETİK KURUL KARARI.....	70
ÖZGEÇMİŞ .....	71



## TABLULAR LİSTESİ

<b>Tablo 3.3.2-1.</b> cDNA Sentezi için PZR .....	29
<b>Tablo 3.3.2-2.</b> cDNA Sentezi için İnkübasyon Koşulları .....	30
<b>Tablo 3.3.5-1.</b> miRNA Ekspresyon Analizleri için Hazırlanan İçerik .....	31
<b>Tablo 3.3.5-2.</b> miRNA Ekspresyon Analizleri için Gereken Döngü Koşulları .....	31
<b>Tablo 4.1.-1:</b> LDL 130 mg/dl Üstü ve LDL 130 mg/dl Altı (Kontrol) Gruplarına ait Demografik Veriler .....	33
<b>Tablo 4.1.-2.</b> Lipit Değerleri Ortalamalarının LDL 130 mg/dl Üstü ve LDL 130 mg/dl Altı (Kontrol) Grupları Arasında Kıyaslanması .....	34
<b>Tablo 4.2.-1.</b> miRNA-148a İfade Düzeylerinin Ortalamalarının LDL 130 mg/dl Üstü ve Altı Grupları Arasında Kıyaslanması .....	37
<b>Tablo 4.3.-1:</b> LDL Seviyesi 130 mg/dl'den Düşük Olan Gruba ait CT , $\Delta$ CT, $2^{-(\Delta\Delta CT)}$ (Livak) ve $\ln(2^{-(\Delta\Delta CT)})$ (kat değişimi) Değerleri ile Total Kolesterol, Trigliserit, VLDL, HDL ve LDL Düzeyleri Arasındaki Korelasyonlar .....	38
<b>Tablo 4.3.-2:</b> LDL Seviyesi 130 mg/dl'den Yüksek Gruba ait CT , $\Delta$ CT, $2^{-(\Delta\Delta CT)}$ (Livak) ve $\ln[2^{-(\Delta\Delta CT)}]$ (kat değişimi) Değerleri ile Total Kolesterol, Trigliserit, VLDL, HDL ve LDL Düzeyleri Arasındaki Korelasyonlar .....	41

## ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2.1-1. Kolesterolün Yapısı .....	3
Şekil 2.2.1-1. Mevalonatın Asetattan Sentezi Tepkimesi .....	4
Şekil 2.2.2-1. Mevalonatın İki Aktif İzoprene Çevrilme Tepkimesi .....	4
Şekil 2.2.3-1. Aktifleşmiş Altı İzopren Biriminin Skualen Oluşturmak Üzere Kondensleşme Tepkimesi .....	5
Şekil 2.2.4-1. Skualenin Dört Halkalı Steroit Çekirdeğine Çevrilme Tepkimesi .....	5
Şekil 2.4-1. Lipoproteinlerin Temel Yapısı .....	6
Şekil 2.4.1-1. LDL'nin Üç Boyutlu Yapısı .....	8
Şekil 2.4.4-1. LDL'nin Hücre İçerisine Alınması .....	10
Şekil 2.4.4.1-1. LDL Reseptörünün 19. Kromozomda Bulunduğu Bölge .....	11
Şekil 2.4.4.1-2. LDL Reseptörünün Üç Boyutlu Yapısı .....	11
Şekil 2.5.-1. İnsanda Bulunan SREBP1a ve SREBP2 Proteinlerinin Domain Yapısı....	15
Şekil 2.7.1-1. miRNA Biyogenezinin ve miRNA'ların mRNA'ları Düzenlemesinin Şematik Özeti .....	19
Şekil 2.7.1-2. Pre-miRNA ile Etkileşime Geçmiş Dicer Enzimi .....	21
Şekil 2.7.4.-1. miRNA-148a'nın Sentezlendiği pre-miRNA-148a'nın ve Olgun miRNA-148a'nın Yapısı .....	24
Şekil 2.7.4.-2. miRNA-148a'nın 7. Kromozomunda Bulunduğu Bölge .....	24
Şekil 4.2.-1. miRNA-148a Analizleri .....	36
Şekil 4.3.-1: LDL Kolesterol Seviyesi 130 mg/dl'nin Altında Olan Grupta miRNA-148a'ya ait $\Delta C_T$ değeri ile HDL Kolesterol Seviyeleri Arasındaki Korelasyon Analizi.....	39
Şekil 4.3.-2: LDL Kolesterol Seviyesi 130 mg/dl'nin Altında Olan Grupta miRNA-148a'ya ait Kat Değişimi [ $\ln(2^{-(\Delta\Delta C_T)})$ ] Değeri ile HDL Kolesterol Seviyeleri Arasındaki Korelasyon Analizi. ....	39
Şekil 4.4.-1: miRNA-148a Seviyesinin LDL 130 mg/dl Üstü ve LDL 130 mg/dl Altı Gruplarına Göre ROC Analizi. ....	42

## SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

$\Delta C_T$	: Delta $C_T$
$\Delta\Delta C_T$	: Delta Delta $C_T$
$2^{-(\Delta\Delta C_T)}$	: Livak formülü
3' UTR	: 3' çevrilmeyen bölge
Å	: Angstrom
ABCA	: ATP Bağlayıcı Kaset Transporter'ı
ABCA1	: ATP Bağlayıcı Kaset Transporter'ı 1
ABCA2	: ATP Bağlayıcı Kaset Transporter'ı 2
ABCG1	: ATP Bağlayıcı Kaset Alt Ailesi G Elemanı 1
ACAT	: Açıl-Koa: Kolesterol Transferaz
ADP	: Adenozindifosfat
Ago2	: Argonaute 2
AMP	: Adenozinmonofosfat
AMO	: Antisense İnhibitör Oligonükleotid
ApoA	: Apolipoprotein A
ApoA-I	: Apolipoprotein A-I
ApoB	: Apolipoprotein B
ApoB-48	: Apolipoprotein B-48
ApoB-100	: Apolipoprotein B-100
ApoC-II	: Apolipoprotein C-II
ApoE	: Apolipoprotein E
ATP	: Adenozintrifosfat

ATPaz	: Adenozintrifosfataz
C <sub>T</sub>	: Cycle Threshold
°C	: Santigrat
CO <sub>2</sub>	: Karbondioksit
cDNA	: Tamamlayıcı Deoksiribonükleik Asit
C. elegans	: Caenorhabditis elegans
DCP2	: mRNA Dekapaj Edici Protein 2
DDX6	: DEAD-Kutusu Helikaz 6
DGCR8	: DiGeorge Sendromu Kritik Kontrol Geni 8
DNA	: Deoksiribonükleik Asit
dsRBD	: Çift Zincirli RNA Bağlama Domaini
dl	: Desilitre
DiI	: 3,3' dioktadesil- 3,3,3''-tetrametil-indokarbosiyanin
EGF	: Epidermal Büyüme Faktörü
eIF4E2	: Ökaryotik Başlatıcı Faktör 4E2
g	: Yerçekimi İvmesi
H <sub>2</sub> O	: Su Molekülü
HAND2	: İfade Edilmiş Kalp ve Sinirsel Krest Türevleri 2
HDL	: Yüksek Yoğunluklu Lipoprotein
HIV	: İnsan Bağışıklık Yetmezlik Virüsü
HLA	: İnsan Lökosit Antijeni
HMG-KoA	: 3-Hidroksi-3- Metilglutaril Koenzim A
HTT	: Huntingtin
Huh7	: İnsan Hepatosit Hücreleri
<sup>125</sup> I	: <sup>125</sup> Iodin

Idol	: LDLR'nin İndüklenebilir Degrede Edici Molekülü
IDL	:Orta Yoğunluklu Lipoprotein
kDa	: Kilo Dalton
kg	: Kilogram
LCAT	: Lesitin-Kolesterol Açıltransferaz
LDL	: Düşük Yoğunluklu Lipoprotein
LDLR	: Düşük Yoğunluklu Lipoprotein Reseptörü
$\ln(2^{-(\Delta\Delta CT)})$	: Kat Değişimi
$\ln$	: e Tabanında Logaritma
LNA	: Kilitli Nükleik Asit
lncRNA	: Uzun Kodlama Yapmayan RNA
LPL	: Lipoprotein lipaz
LXR	: Karaciğer X Reseptörü
LXRE	: LXR Sorumlu Element
$\mu\text{l}$	: Mikrolitre
m	: Metre
m7G	: 7-Metil Guanozin
MAFB	: V-maf Kas-Portoneoziti Fibrosarkom Onkogen Homologu B
mg	: Miligram
miRNA	: Mikro Ribonükleik Asit
miRNA-148a	: Mikro Ribonükleik Asit-148a
mRNA	: Mesajcı Ribonükleik Asit
$\text{NADP}^+$	: Nikotinamid Adenin Dinükleotit Fosfat
ng	: Nanogram
OD	: Optik Yoğunluk

PAN2-PAN3	: Poli(A)-Nükleaz 2-3
PAZ	: Piwi/Argonaute/Zwille
pg	: Pikogram
Pi	: İnorganik Fosfat
piRNA	: Piwi ile Etkileşen RNA
PPi	: Pirofosfat
pre-miRNA	: Prekürsör miRNA
pri-miRNA	: Primer-miRNA
PZR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
Ran-GTP	: Ras ile İlişkili Nükleer Protein-Guanozin Trifosfat
RIIDa	: RNase III Domain a
RIIDb	: RNase III Domain b
RISC	: RNA Tarafından Uyarılmış Susturma Kompleksi
RNase III	: Ribonükleaz III
rpm	: Saniyedeki Dönüş Sayısı
rRNA	: Ribozomal RNA
ROC	: Alıcı İşletim Karakteristiği
ROCK1	: Protein kinaz 1 İçeren Rho ile İlişkili Sargılı Sarmal
RXR	: Retinoid X Reseptörü
SD	: Standart Sapma
siRNA	: Kısa Müdahale Edici RNA
SNP	: Tek Nükleotid Polimorfizmi
snoRNA, snaRNA	: Küçük Nükleer RNA Çeşitleri
SR-BI	: Scavenger-BI
SREBP	: Sterol Kontrol Edici Elemente Bağlanan Protein

SREBP1a	: Sterol Kontrol Edici Elemente Bağlanan Protein 1a
SREBP1c	: Sterol Kontrol Edici Elemente Bağlanan Protein 1c
SREBP2	: Sterol Kontrol Edici Elemente Bağlanan Protein 2
stRNA	: Kısa Geçici RNA
TEKHARF	: Türkiye'de Erişkinlerde Kalp Hastalığı ve Risk Faktörleri Sıklığı Taraması
TRBP	: Transaktive Edici Cevabı Oluşturan RNA Bağlanan Protein
tRNA	: Transfer RNA
TTP	: Tristetraprolin
VKİ	: Vcut Kitle İndeksi
VLDL	: ok Dşk Yoğunluklu Lipoprotein
VYA	: Vcut Yüzey Alanı
XRN1	: 5'-3' Ekzoribonkleaz 1

## ABSTRACT

**Gül T. Investigation of the Effect of microRNA-148a Expression on LDL Cholesterol Level. Yeditepe University, Health Sciences Institute, Department of Molecular Medicine. Master Thesis. İstanbul, 2018.**

In this thesis study, it is aimed to investigate differences in expression levels of microRNA-148a relative to the level of LDL cholesterol, which plays an important role in the pathophysiology of atherosclerosis is the main reason of coronary artery disease. For this purpose, in total 90 people, who were diagnosed with coronary artery disease and had no heart disease, were separated to two groups according to LDL cholesterol levels (LDL cholesterol > 130 mg/dl (n=45) and LDL cholesterol < 130 mg/dl (n=45)). The grouping was made by taking as an example the study of Mahley and his colleagues in 1995 and the reference values were taken from Turkish Cardiology Society. The expression levels of miRNA-148a of the groups were analyzed by real-time polymerase chain reaction. We didn't observed any statistical significance between miRNA-148a expression levels between two groups ( $p=0,368$ ). However; when the averages of lipid profiles of groups and LDL cholesterol levels were compared, it is shown that; the group, have LDL levels more than 130 mg/dl, have significantly higher total cholesterol, triglycerides and VLDL levels than the other group ( $p=0,000^*$ ,  $p=0,002^*$ ,  $p=0,003^*$ ). Also there is a statistical negative correlation, is not very strong, between HDL cholesterol levels and the expression levels of miRNA-148a in the group has LDL cholesterol levels lower than 130 mg/dl (control group) ( $p=0,043^*$ ). In addition, no threshold values were determined to indicate that expression levels of miRNA-148a expressing the resultant ROC analysis miRNA-148a may constitute a pathological condition in terms of LDL (for  $\Delta C_T$ ;  $p=0,7992$ , for fold change;  $p=0,8086$ ).

In conclusion; no statistically significant relationship was found between miRNA-148a expression levels and LDL cholesterol levels.

**Key Words:** miRNA-148a, cholesterol metabolism, LDL cholesterol



## ÖZET

**Gül T. MikroRNA-148a İfade Düzeyinin LDL Kolesterol Seviyesi Üzerine Etkisinin Araştırılması. Yeditepe Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Moleküler Tıp Anabilim Dalı. Yüksek Lisans Tezi. İstanbul, 2018.**

Bu tez çalışmasında mikroRNA-148a'nın koroner arter hastalığının başlıca nedeni olan aterosklerozun patofizyolojisinde önemli rol oynayan LDL kolesterol seviyesine göre ifade düzeyi farklılıklarının araştırılması amaçlanmaktadır. Bu amaç doğrultusunda, koroner arter hastalığı teşhisi konulmuş ve herhangi bir kalp rahatsızlığı bulunmayan toplam 90 kişi; Mahley ve arkadaşlarının 1995 yılında yapmış olduğu çalışma ve Türk Kardiyoloji Derneği'nin belirtmiş olduğu referans değerleri değerlendirilerek LDL kolesterol seviyesi 130 mg/dl'den düşük (n=45) ve 130 mg/dl'den yüksek (n=45) olmak üzere iki gruba ayrılmıştır. Her iki gruba ait miRNA-148a ifade düzeyi seviyeleri gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu ile tespit edilmiştir. İki grup arasında miRNA-148a ifade düzeyleri ortalamaları arasında herhangi bir istatistiksel anlamlılık bulunmamıştır (p=0,368). Ancak grupların lipid profilleri ortalamaları kıyaslandığında LDL kolesterol seviyesi 130 mg/dl'nin üzerinde olan grubun toplam kolesterol, trigliserit, VLDL seviyeleri anlamlı bir şekilde yüksektir (p=0,000\*, p=0,002\*, p=0,003\*). miRNA-148a ifade düzeylerinin lipid seviyeleriyle korelasyonu incelendiğinde LDL kolesterol seviyesi 130 mg/dl'nin altında olan (kontrol) grubun HDL seviyeleriyle miRNA-148a ifade düzeyi arasında istatistiksel olarak anlamlı, çok güçlü olmayan negatif korelasyon görülmektedir (p=0,043\*). Ayrıca yapılan ROC analizleri sonucu miRNA-148a ifade miRNA-148a ifade düzeylerinin LDL açısından patolojik durum teşkil edebileceğine dair herhangi bir eşik değeri tespit edilememiştir ( $\Delta C_T$  için; p=0,7992, kat değişimi için; p=0,8086).

Sonuç olarak; miRNA-148a ifade düzeyleri ile LDL kolesterol seviyeleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunamamıştır.

**Anahtar Kelimeler:** miRNA-148a, kolesterol metabolizması, LDL kolesterol

## 1. GİRİŞ VE AMAÇ

Kalp yaşam için en önemli organlardan olup kalp hastalıkları Dünya'daki en yaygın ölüm nedenlerini oluşturmaktadır. Kalp hastalıklarının; konjenital kalp hastalıkları, romatizmal kalp hastalıkları, kalbin enfeksiyon hastalıkları, edinsel kapak hastalıkları, kardiyomyopatiler, koroner arter hastalıkları, ateroskleroz, miyokart enfarktüsü, ritim bozuklukları, kalp yetmezliği gibi çeşitleri vardır (1). Ülkemizde de yaygın görülen koroner arter hastalığı hem hayat kalitesini düşürmekte hem de kalp nedenli ölümlerin başında bulunmaktadır. 2005 yılına kadar yapılmış olan Türkiye'de Erişkinlerde Kalp Hastalığı ve Risk Faktörleri Sıklığı Taraması (TEKHARF) verilerine göre erkeklerdeki koroner arter kaynaklı ölüm yaygınlığı kadınlara kıyasla oldukça yüksektir. 1990-2005 yılları arası incelendiğinde koroner arter kaynaklı ölümlerin görülme ihtimali kadınlarda binde 3,9 erkekler de ise binde 5,95'dir (2). 2014'deki araştırmaya göre ise erkeklerde görülme ihtimalinin binde 7,0'a yükseldiği kadınlarda ise binde 3,8'e gerilediği görülmektedir (3).

Koroner arter hastalığının gelişmesinde etkili olduğu bilinen ateroskleroz damar zedelenmesine bağlı olarak gerçekleşir. Kandaki düşük yoğunluklu lipoproteinlerin (LDL) hasar alan damarda biriken lipidlerin öncü molekülleri olduğu düşünülmektedir. Bu lipidler köpük hücreleri olarak adlandırılan lipid molekülleri kanda fazla miktarda bulunan ve karaciğerce alınamamış LDL'nin makrofajlarca parçalanması nedeniyle oluşurlar. Ateroskleroza neden olan LDL'lerin okside olduğu da bilinmektedir (4). Türkiye'de yapılan lipoprotein çalışmaları yüksek yoğunluklu lipoproteinlerin (HDL) kalp hastalıkları için koruyucu olduğunu göstermiştir (5).

mikroRNA'lar (miRNA'lar) yaklaşık 22 nükleotidden oluşan genellikle tek zincirli nükleotid dizileridir. İlk miRNA'nın keşfedilmesinden yaklaşık 20 yıl sonrasında insanda yaklaşık 2000 miRNA keşfedilmiş ve bu miRNA'ların insan hastalık ve metabolizmasında etkili rol oynayan küçük moleküler yapılar oldukları bilinmektedir. miRNA'lar insan sıvılarında kolay bulunabildiğinden biyobelirteç olarak güçlü moleküller oldukları düşünülmektedir. Bunun yanı sıra miRNA düzenlenmesinden kaynaklanan hastalıkların çözülmesi için de miRNA'ların terapötik olarak kullanılması da güncel araştırma konuları arasındadır (6).

Birçok miRNA'nın hem lipid metabolizmasında hem de ateroskleroza düzenleyici rol oynadığı bilinmektedir. Lipid metabolizmasında rol oynayan miRNA'ların genellikle apolipoprotein B (ApoB) içeren çok düşük yoğunluklu (VLDL) ve düşük yoğunluklu lipoprotein (LDL)'lerin insan vücut döngüsüne katılmasında düzenleyici görev aldıkları bilinmektedir (7).

miRNA-148a ise Goedeke ve arkadaşları tarafından 2015 yılında (8) kolesterol metabolizmasında önemli bir düzenleyici miRNA olduğu keşfedilen miRNA-148/152 ailesine mensup bir miRNA'dır. Literatür taraması yapıldığında hakkındaki ilk çalışma 2011'de yayımlanmıştır. Çalışmalar arttıkça çeşitli metabolizma ve hastalıklarda görev aldığı tespit edilmiştir ve edilmeye devam edecektir (9). Kolesterol metabolizmasındaki aktivitesi ise LDL reseptörlerine (LDLR) etki ederek hücre içerisine LDL alımının kontrol edilmesidir. Aynı zamanda ATP bağlayıcı kaset transporter'ları olan (ABCA), ABCA1 ve ABCA2 mesajcı RNA'ları (mRNA) da hedef mRNA'ları arasındadır (8).

miRNA'ların hedef dizileri deneysel olarak bulunabilmekle birlikte bu deney sonuçlarını baz alarak oluşturulmuş algoritmalar da tahmini hedef dizileri belirlemektedir. Bu algoritmaları kullanan internet sitelerinden miRNA'ların hedefleri olan mRNA'lar ve etkili oldukları biyolojik yollar bulunabilmektedir (10).

Bu tez çalışması için hücre içerisine LDL alımında düzenleyici rol oynadığı yeni tespit edilen miRNA-148a'nın LDL düzeylerine göre ekspresyon farklılıklarının araştırılması amaçlanmaktadır. Üzerinde az çalışılmış bu miRNA'nın LDL metabolizması üzerindeki etkisi hem şimdiye kadar yayımlanmış literatürlerden hem de TargetScan ([targetscan.org](http://targetscan.org)) ve miRanda ([microrna.org](http://microrna.org)) web sitelerinden araştırılmıştır (10). Konu ile ilgili çalışmalar şimdiye kadar fareler ve insan hepatosit hücrelerinin doku kültürlerinde yapılmıştır. Yapılan incelemelere göre miRNA-148a'nın LDL metabolizması üzerindeki etkisi ile ilgili insan serumu ile çalışma yapılmadığı görülmüştür (9).

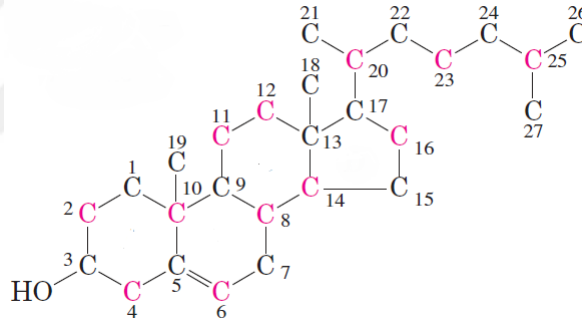
Bu çalışmada ilk etapta miRNA-148a'nın LDL metabolizmasındaki etkisinin araştırılması amaçlanmıştır. İleriki çalışmalarda ise miRNA-148a'nın serum LDL seviyesi üzerine etki mekanizması bulunduğundan sonra konu hakkında biyobelirteç olup olmayacağına değerlendirilmesi planlanmaktadır.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. KOLESTEROL

Kolesterol, sekiz karbonlu yan zincire ve siklopentano-perhidro-fenantren olarak isimlendirilen halkasal yapıya sahip bir hidrokarbon olup hayvan dokularındaki en önemli steroldür (11, 12). Halkalarının açık halde olduğu düşünüldüğü takdirde 27 karbonlu bir yağ asidi kadar uzun bir apolar gövdeye sahiptir (12). Hücre membranlarının ve plazma lipoproteinlerinin yapısında bulunup hücre büyümesi ve hayatı için esansiyel bir steroldür (13, 14). D vitamini, safra asitleri ve steroid hormonların (progesteron, testosteron vb.) öncül maddesidir (13). Suda çözünebilir bir yapı olmadığından kanda lipoproteinler aracılığıyla taşınır. Kanda taşınan kolesterolün üçte ikisi esterleşmiş şekildedir (11).

Kolesterol dışarıdan besinle alınmakla birlikte karaciğerde *de novo* olarak sentezlenir. Karaciğer dışında deri, adrenal, beyin ve barsaklar gibi çeşitli organlarda da sentezlenir (11).



Şekil 2.1-1. Kolesterolün Yapısı (12).

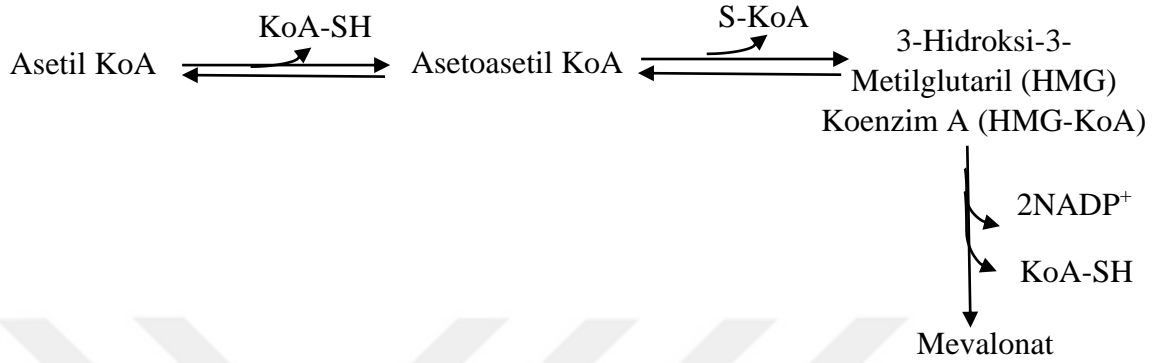
### 2.2 KOLESTEROL BİYOSENTEZİ

Kolesterol biyosentezinin en az yirmi bir basamaktan oluştuğu düşünülmele birlikte (15) dört temel bölümden oluşmaktadır;

- Mevalonatın asetattan sentezi
- Mevalonatın iki aktif izoprene çevrilmesi
- Aktifleşmiş altı izopren biriminin skualen oluşturmak üzere kondensleşmesi
- Skualenin dört halkalı steroit çekirdeğine çevrilmesi (12)

### 2.2.1. Mevalonatın Asetattan Sentezi

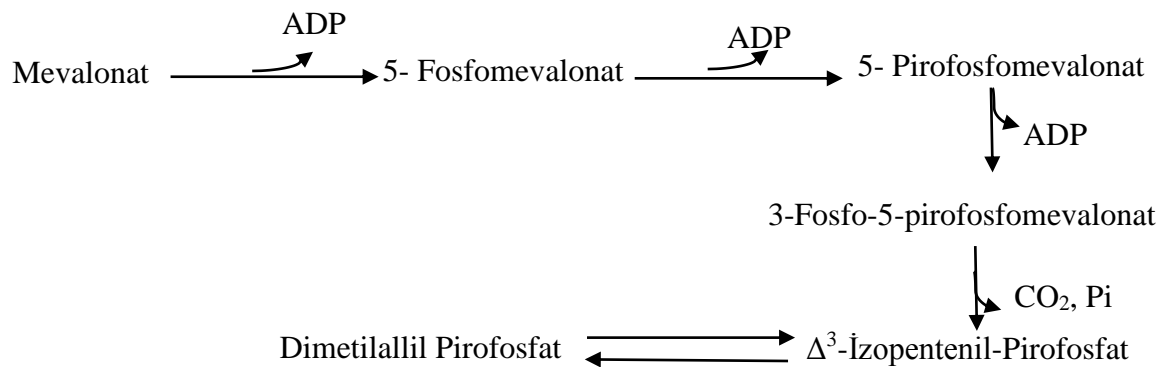
Biyosentezin bu aşamasında üç asetat birimi altı karbondan oluşan mevalonatu oluşturur. Bu tepkime sırasında üç molekül koenzim A ve iki molekül nikotinamid adenin dinükleotit fosfat (NADP<sup>+</sup>) açığa çıkar.



Şekil 2.2.1-1. Mevalonatın Asetattan Sentezi Tepkimesi (12).

### 2.2.2. Mevalonatın İki Aktif İzoprene Çevrilmesi

Kolesterol biyosentezinin ikinci temel aşaması olan bu aşamada da birinci aşamada sentezlenmiş mevalonat, üç adenozin trifosfattan (ATP) üç fosfat grubunun mevalonata aktarılmasıyla iki aktif izoprene çevrilir (12). Tepkimenin  $\Delta^3$ -izopentenil-pirofosfatın sentezinin olduğu aşamada bir mol karbondioksit açığa çıkar.

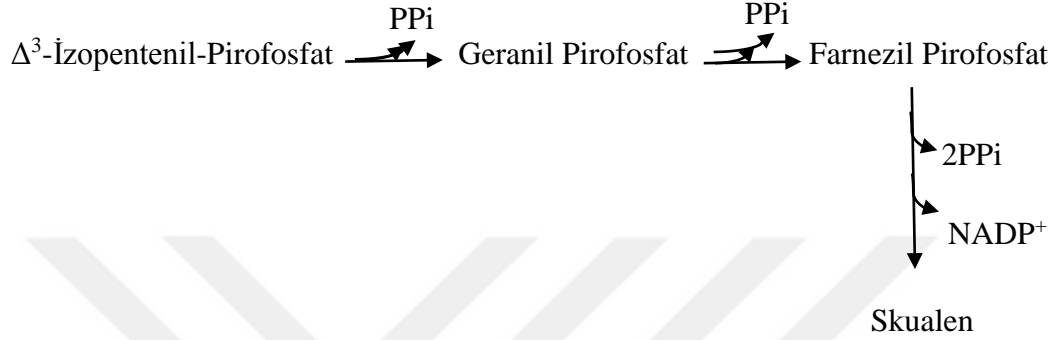


Şekil 2.2.2-1. Mevalonatın İki Aktif İzoprene Çevrilme Tepkimesi (12).

Tepkimeler sonucunda oluşan  $\Delta^3$ -İzopentenil-Pirofosfat ve dimetilallil pirofosfat beş karbonlu aktif izopren olup denge halinde bulunmaktadır.

### 2.2.3. Aktifleşmiş Altı İzopren Biriminin Skualen Oluşturmak Üzere Kondensleşmesi

Beş karbonlu altı adet izoprenin kondensleşmesi sonucu skualen yapısı oluşur. Bu yapı kolesterol biyosentezi sırasında oluşan ilk halkasal yapıdır (12). Tepkime sonucunda toplamda dört mol ionorganik fosfat ve bir mol NADP<sup>+</sup> açığa çıkar.



Şekil 2.2.3-1. Aktifleşmiş Altı İzopren Biriminin Skualen Oluşturmak Üzere Kondensleşme Tepkimesi (12).

### 2.2.4. Skualenin Dört Halkalı Steroit Çekirdeğine Çevrilmesi

Tek halkalı bir yapıdan dört halkalı yapı olarak kolesterol sentezlenir. Sentez sırasında oksidasyon, metil gruplarının uzaklaşması ya da yer değiştirmesi gibi kimyasal tepkimeler gerçekleşir (12). Bu aşamadaki tepkimelerin ilk basamağında birer mol su ve NADP<sup>+</sup> açığa çıkar.



Şekil 2.2.4-1. Skualenin Dört Halkalı Steroit Çekirdeğine Çevrilme Tepkimesi (12).

### 2.3. KOLESTEROL KATABOLİZMASI

Kolesterol vücutta karbondioksit ve suya parçalanmak suretiyle elimine edilemeyen bir moleküldür. Kolesterolün vücuttan atılımı sadece karaciğer aracılığıyla olmaktadır.

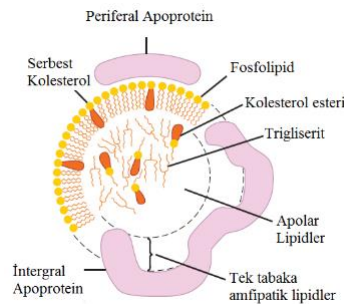
Kolesterolün atılımı sırasında iki farklı yol gözlenir;

- Kolesterol safraya gönderilir ve burada safra asitlerine çevrilir. Bu safra asitlerinin %97'si bağırsakta geri emilerek karaciğere gönderilir. Burada parçalanarak yeniden kolesterolün sentezlenmesinde ve safra asitlerinin düzenlenmesinde rol oynar. Bu safra asitlerinin %3'ü ise barsaklarda emilir ve dolaşıma döner.
- Kolesterol direkt barsağa geçer. Buraya geçen kolesterollerin %50'si dolaşıma dönerken kalan %50'si ise dışkıyla atılır.

Kolesterolün yeniden sentezlenmek ve atılmak üzere vücutta yaptığı bu dolaşıma enterohepatik sirkülasyon denir (11).

### 2.4. KOLESTEROLÜN TAŞINMASI

Kolesterol apolar bir molekül olup suda çözünemez. Bu sebeple kolesterol ihtiyacı olan dokulara plazma aracılığı ile aktarılırken tek başına taşınamaz. İçi hidrofobik, dışı hidrofilik özelliğe sahip bir yapı olan lipoproteinlerce taşınır (15). Lipoproteinlerin dış kısmı polar ve apolar yapıya sahip olan ve hücre zarının da yapısını oluşturan fosfolipitlerden ve serbest kolesterolden oluşur. İç kısmının hidrofobik olmasını sağlayan moleküller ise trigliseritler ve kolesterol esterleridir. Tüm bu yapılar dışında apoprotein olarak adlandırılan protein yapılarına da sahiptirler (16). Apoproteinler lipoproteinlerin yapısında hem periferik hem de integral olarak bulunabilirler (17). Bu durum lipoproteinlerin çeşitlerine göre değişir.



Şekil 2.4-1. Lipoproteinlerin Temel Yapısı (17).

### 2.4.1. Lipoprotein Çeşitleri

Lipoproteinler büyüklüklerine ve kolesterol-protein içeriklerine göre birbirlerinden ayrılırlar ve isimlendirilirler. En büyük lipoproteinler şilomikronlar olup trigliseritçe zengindirler. Büyüklükleri yaklaşık 800 – 5000 Å olup (18) diğer lipoproteinlerle karşılaştırıldıklarında en az miktarda protein, serbest kolesterol ve esterleşmiş kolesterole sahip olup apoprotein olarak yapılarında Apolipoprotein B48 (ApoB-48) barındırırlar (19). Plazmadaki yarı ömürleri 4 - 5 dakikadır (18). Şilomikronlar diyetle alınmış kolesterolün taşınmasında görevlidirler.

Şilomikronlardan sonraki en büyük lipoproteinler çok düşük yoğunluklu lipoproteinler (VLDL)'dir. VLDL'ler karaciğerde *de novo* olarak sentezlenmiş kolesterolün ekstrahepatik dokulara taşınmasında görevlidirler. Yapısal olarak trigliseritçe zengin olup apoprotein olarak Apolipoprotein B100 (ApoB-100), Apolipoprotein C-II (ApoC-II) ve Apolipoprotein E (ApoE) barındırırlar (17, 18). Büyüklükleri 300 - 800 Å olup plazmadaki yarı ömürleri 1 - 3 saattir (18).

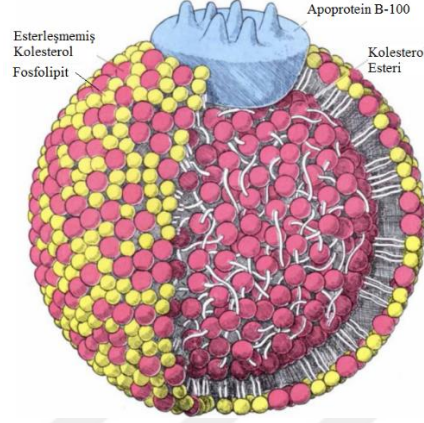
VLDL'den sonraki en büyük lipoprotein ise orta yoğunluklu lipoprotein (IDL)'dir. VLDL lipoprotein lipaz (LPL) adı verilen bir enzimle plazmada parçalanır ve parçalandıkça yoğunluğu artarak IDL'nin oluşmasını sağlar. IDL yapısal olarak apolipoprotein B-100 (ApoB-100) içerir (13, 18). IDL'nin yapısında bulunan ApoB-100 dışındaki apoproteinlerin, trigliseritlerin ve kolesterol esterlerinin yapıdan uzaklaştırılması ile düşük yoğunluklu lipoproteinler (LDL) oluşur (16) LDL aynı zamanda direkt olarak VLDL'lerden de sentezlenmektedir (13, 18).

LDL'ler plazmada ekstrahepatik dokulara kolesterol taşıyan en temel lipoprotein olup (20) çoğunlukla çekirdeğinde non-polar yapıya sahip kolesterol esteri taşıyan, yaklaşık 180 – 250 Å büyüklüğünde olabilen bir lipoproteinlerdir (21). Esas apoproteinleri 4563 aminoasitten oluşan ApoB-100 olup bir LDL molekülünde bir adet bulunur (22).

Reardon ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada normal lipid değerlerine sahip kişilere radyoionize olarak işaretlenmiş VLDL'ler enjekte edildiğinde VLDL'lerdeki ApoB proteinlerinin IDL ve LDL'lerin yapısında bulunan ApoB proteinlerinin öncüsü olduğu tespit edilmiştir (23). Bu çalışma LDL moleküllerinin VLDL moleküllerinden sentezlendiğini ispat etmektedir. Ancak ailesel



hiperkolesterolemi hastalarıyla yapılan başka bir çalışmada ise <sup>125</sup>Iodin (<sup>125</sup>I) işaretlemesi sayesinde plazmada hem VLDL kaynaklı hem de VLDL ile ilişkili olmayan LDL molekülleri tespit edilmiştir (24). Bu çalışma ise LDL'nin hem VLDL'den üretildiğini hem de VLDL'den bağımsız olarak üretildiğini göstermektedir.



**Şekil 2.4.1-1.** LDL'nin Üç Boyutlu Yapısı (25).

Yüksek yoğunluklu lipoproteinler (HDL) en küçük çapa (70 - 120 Å) ve en uzun yarı ömre (5 – 6 gün) sahip lipoproteinlerdir. Yapılarındaki lipit – protein oranı eşittir. Başlıca apoproteinleri apolipoprotein A'lar (ApoA) olmakla birlikte çok az miktarda ApoC ve ApoE de içermektedirler. Karaciğerde ve az miktarda barsaklarda üretilirler (11, 13, 18). Yapılarında bulunan apolipoprotein A-I (ApoA-I) karaciğer ve ince barsakta üretilip hücreden salındıktan sonra hücresel ABCA1 ile etkileşir ve lipid içermeyen HDL'nin yapısına katılır. ABCA1 integral bir membran proteini olup kolesterol ve fosfolipitten fakir olan lipoproteinlere bu moleküllerin aktarılmasıyla HDL sentezlenmesini sağlar (19). Aynı zamanda IDL tarafından HDL'nin yapısına fosfolipit ve kolesterol aktarılabilir (18). HDL'nin lipit metabolizmasındaki rolü karaciğer dışı dokulardaki fazla kolesterolün karaciğere geri taşınmasını sağlamaktır.

Kolesterol kaynağına göre iki farklı mekanizmayla karaciğer dışı dokulara taşınır;

#### **2.4.2. Ekzojen Lipit Transportu**

Ekzojen lipit transportunda amaç diyetle alınan kolesterolün ince bağırsaklardan dokulara taşınmasıdır. Diyetle alınan kolesterol şilomikron yapısı içerisinde paketlenir. Şilomikronlar ince bağırsak lenf sistemi yoluyla plazmaya ulaşırlar (19) ve adipoz ve kas dokularının kılcal damarlarını oluşturan endotel hücrelerinin luminal yüzeyine bağlanmak

için LPL enzimi ile kompleks oluştururlar. Şilomikronların yapısındaki ApoC-II LPL'yi aktive ederek adipoz ve kas dokularına aktarılmak üzere trigliseritlerden serbest yağ asitlerinin açığa çıkmasına katkıda bulunur. Yağ asitlerini adipoz dokuya veya kasa aktarmış şilomikrondan şilomikron kalıntısı oluşur. Şilomikron kalıntısı yapısında kolesterol esteri, ApoB ve ApoE içerir. Şilomikronlardan veya kalıntılarında arta kalan kolesterol ve fosfolipitler HDL yapısına aktarılırlar. Şilomikronlar ve kalıntıları karaciğere taşınarak karaciğer hücrelerince lizozom aktivasyonu ile parçalanırlar (18).

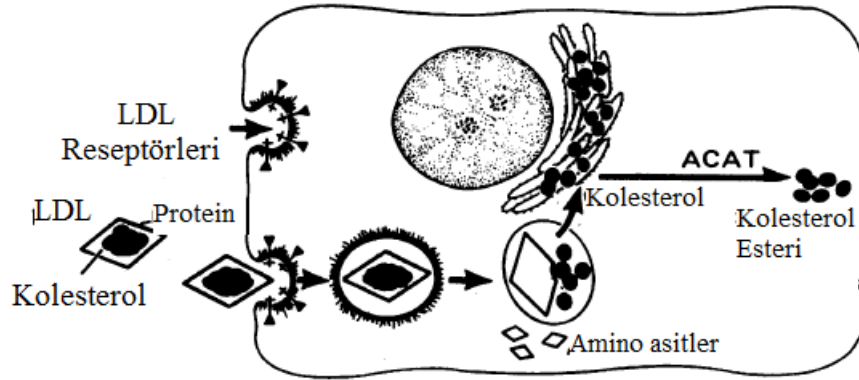
### 2.4.3. Endojen Lipit Transportu

Endojen lipit transportunun amacı ise karaciğerde *de novo* olarak üretilmiş kolesterolün ekstrahepatik dokulara taşınmasını sağlamaktır. Karaciğerde üretilmiş olan kolesterol VLDL yapısı içerisine alınıp plazmaya aktarılır. VLDL'nin yapısı plazmaya aktarıldığı andan itibaren değişmeye başlar. Yeni sentezlenmiş VLDL kolesterol esteri içermez. Yapısına kolesterol esteri ya HDL'den aktarılır ya da VLDL üzerindeki serbest kolesterol lesitin-kolesterol açıltransferaz (LCAT) enzimi aracılığıyla esterleştirilir (16). VLDL'nin yapısındaki trigliseritler adipoz ve kas dokularının kılcal damarlarını oluşturan endotel hücrelerinin luminal yüzeyine bağlanmak için LPL ile hidroliz edilir. LPL, VLDL'lerden çok şilomikronlara duyarlıdır (18) ve aktivitesi insülin tarafından kontrol edilir (19). Yapılarındaki gliserol ve yağ asitleri dokulara aktarıldıkça yoğunluğu artar ve IDL oluşmuş olur (16, 18). IDL'ye dönüşmüş ve VLDL artığı olarak kalmış VLDL'ler toplam VLDL miktarının yarısını oluşturur. Bunlar karaciğerde parçalanarak temizlenir. Sentezlenmiş VLDL'lerin diğer yarısı ise LDL'ye dönüştürülür (13). IDL'ler aynı zamanda yapılarındaki kolesterolü ve fosfolipitleri HDL'ye aktarabilirler. LCAT enzimi aracılığıyla HDL'nin yapısındaki serbest kolesterol esterleştirilir ve HDL'den IDL sentezlenmiş olur. IDL yapısındaki trigliseritleri çevre dokulara aktarır, yapısındaki ApoB proteini hariç tüm apoproteinlerini kaybederek LDL'ye dönüşür (18). LDL'nin endojen lipit transportundaki görevi ise kolesterolü karaciğer dışı dokulara taşımaktır. Bu işlemi karaciğer dışı dokulardaki hücrelerin yüzeyinde yer alan LDL reseptörü aracılığıyla gerçekleştirir.

#### 2.4.4. Hepatik ve Ekstrahepatik Dokularda Kolesterol Metabolizması

Hepatik ve ekstrahepatik hücelere kolesterol alınması LDL reseptörü tarafından sağlanır. Hücre kolesterol ihtiyacı olduğunda LDL reseptörü üretir. Hücre başına düşen LDL reseptör sayısı hücrenin bölünme oranına, yaşına ve kolesterol ihtiyacına göre değişmektedir (26). LDL bu reseptöre yüksek afiniteyle bağlanır.

Goldstein, Brown ve Anderson'ın 1975 yılında (27) yaptığı çalışmada elektronca yoğun ferritinle kompleks oluşturulmuş LDL'ler incelendiğinde bu LDL'lerin reseptöre bağlı olarak endositoz ile hücre içerisine alındığı tespit edilmiştir (28). LDL reseptörle birlikte endositoz sonucu endosom olarak kolesterol ihtiyacı olan hücreye giriş yapmış olur. Endositoz yoluyla hücreye giriş yapmış LDL hücre içerisindeki herhangi bir lizozoma denk geldiğinde lizozomla kompleks oluşturur. LDL'nin proteinleri lizozom içerisindeki proteazlarca parçalanır. Lizozomal membranlardan kolesterol esterleşmiş olarak sitoplazmaya geçemez (29), bu sebeple LDL'nin yapısındaki kolesterol esterleri lizozomal asidik lipaz tarafından hidroliz edilir (16). Serbest kolesteroler ise lizozomal membrandan geçtikten sonra endoplasmik retikulumda (30) açıl-KoA: kolesterol transferaz (ACAT) enziminin aktivitesiyle esterleştirilir (29). Bu şekilde hücre içerisinde depolanmaya veya hücre dışına çıkmak için hazır hale getirilirler (16).



Şekil 2.4.4-1. LDL'nin Hücre İçerisine Alınması (31).

LDL reseptörü kendisine ligand olarak bağlanan LDL'yi hücre içerisine teslim ettikten sonra hücre yüzeyine geri döner. Böylece bir LDL reseptörü 20 saatlik ömrü boyunca her 10 dakikada bir hücre içi ve çevresinde toplamda yüzlerce tur atmış olur (32).

#### 2.4.4.1. LDL Reseptörü

LDL reseptörü hücrelerin kolesterol ihtiyacı olması durumunda sentezlenen glikoprotein yapıdaki bir reseptör proteindir. Bu protein 839 aminoasitten (25) oluşup insan genomunda 19. kromozomda yer almaktadır (33, 34). Yaklaşık 95.000 dalton ağırlığındadır (35). LDL reseptörü ligand bağlayan bölge, epidermal büyüme faktörü-öncül homoloji bölgesi (EGF-precursor homology region), oksijen bağlantılı glikan bölgesi, transmembran domain ve sitoplazmada olan sitosolik domain olmak üzere beş alt birimden oluşmaktadır (36).



Şekil 2.4.4.1-1. LDL Reseptörünün 19. Kromozomda Bulunduğu Bölge (34).

Goldstein ve Brown'un Nobel ödülü almalarını sağlayan lipoprotein metabolizması ve LDL reseptörüyle ilgili çalışmaları insan fibroblast hücre kültür çalışmalarıyla başlamıştır. Bu çalışmalarda ilk olarak ekstrahepatik hücrelere kolesterol iletimini sağlayan lipoprotein LDL olduğunu tespit etmişlerdir (25). Goldstein ve Brown konuyla ilgili çalışmalarını genişlettikçe <sup>125</sup>I ile işaretlenmiş LDL'lerin görüntülenmesiyle LDL'nin bu reseptör aracılığıyla hücre içerisine alındığını keşfetmişlerdir. Bu sistemle aynı zamanda +4°C'de hücre başına düşen LDL reseptörü sayısının 7.500 ila 15.000 olduğu ve LDL reseptörlerinin hücre zarında bulunduğu bölgelerin ise rastgele dağılmadığı tespit edilmiştir (26). LDL molekülünün reseptöre bağlanabilmesi için ilgili ortamda kalsiyum, mangan gibi divalent bir katyon bulunmalıdır (31).



Şekil 2.4.4.1-2. LDL Reseptörünün Üç Boyutlu Yapısı (37).

Ateroskleroz plazmadaki fazla LDL moleküllerinin makrofajlarca parçalanması sonucu oluşan köpük hücrelerinin hasarlı damarlarda birikmesiyle oluşan kardiyovasküler bir hastalıktır. LDL reseptörü ile arasındaki bağlantı ise yine aynı kişilerin ailesel hiperkolesterolemi hastalarıyla yaptıkları çalışmada ortaya çıkmıştır. Ailesel hiperkolesterolemi otozomal baskın bir hastalıktır. Goldstein ve Brown'un yaptığı çalışmalarda sağlıklı bireylerle homozigot ve heterozigot genotipe sahip hastaların plazma LDL değerleriyle hücre yüzeylerindeki reseptör miktarları kıyaslanmış olup hastalarda ya LDL reseptörü yoktur ya da hastaların LDL reseptörleri yeterli fonksiyonu göstermemesine neden olan bir mutasyona uğramışlardır (25, 26, 28, 35). Böylelikle araştırmacılar LDL reseptöründeki herhangi bir hata olması ve bu reseptörün olmaması durumunda plazma LDL seviyelerinin arttığını ve bunun da kalp hastalıklarına neden olabileceğini tespit etmişlerdir.

LDL reseptörleri adrenal korteks, testis ve over gibi steroid hormonların sentezlendiği hücrelerde diğer ekstrahepatik hücelere kıyasla çok fazladır. Bu hücrelerde LDL reseptörlerince alınan LDL'den elde edilen kolesterol hücredeki mitokondriye iletilir ve burada steroid hormonlar sentezlenir (31).

LDL reseptörleri sadece ekstrahepatik doku hücrelerinde değil karaciğer hücrelerinde de bulunur. Buradaki reseptörler ekstrahepatik dokulardakilere kıyasla daha büyük boyutlarda ve çok miktarda oldukları için karaciğer ekstrahepatik dokulara göre daha fazla kolesterol alıp degrade eder (25).

ApoE proteinlerinin ApoB-100 proteinlerine göre karaciğerdeki LDL reseptörlerine olan afinitesi çok daha yüksektir. Bu sebepten karaciğer LDL moleküllerinden çok IDL moleküllerini alıp degrade ettiğinden LDL moleküllerinin plazmadaki yarı ömrü IDL moleküllerine göre daha uzundur (25).

#### **2.4.5. Ters Kolesterol Taşınması**

Ters kolesterol taşınması ekstrahepatik dokulardaki fazla kolesterolün karaciğere veya VLDL ve IDL'ye aktarılmasını sağlayan mekanizmadır (16). Kolesterol hücrede fazla miktarda bulunduğu hücre için toksik etki oluşturmaktadır. Ters kolesterol taşınması mekanizması ise hücredeki kolesterol dengesinin kurulmasını sağlar (19). İlk kez Glomset bu mekanizmada HDL'nin etkili lipoprotein olduğunu belirtmiş ve mekanizmada önemli rol oynayan lektin-kolesterol açıltransferaz enzimiyle ilgili

çalışmalar yapmıştır (38). HDL sadece karaciğere kolesterol taşımamakla birlikte steroid hormonları üreten adrenal bez, testis ve overlere de taşıma yapar (18). Hücredeki serbest kolesterol ATP bağlayıcı kaset alt ailesi G elemanı 1 (ABCG1) ve Scavenger-BI (SR-BI) proteinleri tarafından yeni sentezlenmiş HDL'ye verilir. Ancak yeni sentezlenmiş HDL'ye kolesterol aktarımı ABCA1 proteininin görevidir. ABCA1 olgun HDL'ye kolesterol veremez (19). Hücreden gelen serbest kolesteroller diskoidal ve küresel HDL'ler ile etkileşime geçen LCAT enzimi aktivitesiyle esterleştirilirler (39).

Ters kolesterol taşınmasına dair iki hipotez vardır; difüzyon temelli ve reseptöre bağlı. Difüzyon temelli taşınmada direkt lipoproteinden difüzyon yoluyla ilgili dokuya kolesterol geçişi olduğu düşünülürken reseptöre bağlı hipotezde ise HDL'ye yüksek affinite gösteren HDL bağlayan protein tarafından kolesterol karaciğere alınır (39).

Karaciğere alınan kolesterol safra asitlerine çevrilerek, tekrardan serbest kolesterole çevrilerek veya lipoprotein sentezinde kullanılarak geri dönüştürülebilir (39).

## **2.5. KOLESTEROL KONSANTRASYONUNUN DÜZENLENMESİ**

Kolesterol biyosentezi hücresele kolesterol konsantrasyonuna bağlı olarak düzenlenir. Karaciğer dokularında ve plazmada kolesterol miktarı arttığı zaman kolesterol biyosentezi inhibe edilerek azalması sağlanır. Kolesterol konsantrasyonunun fazla olduğu durumlarda konsantrasyonu azaltmak için HMG-KoA redüktaz enziminin geri beslenmesiyle, katalizlediği tepkime sonucu oluşan mevalonatın sentezi engellenerek kolesterol biyosentezi inhibe edilmiş olur.

Bu düzenleme sistemi dışında biyosentez için oldukça önemli olan HMG-KoA redüktaz enziminin parçalanmasının artırılmasıyla, mRNA'sının ve translasyonunun azaltılmasıyla da enzimin varlığı azaltılır ve böylece biyosentezin normalden daha az olması sağlanır.

Ayrıca HMG KoA redüktazın açlık durumunda adenin mono fosfat (AMP) tarafından aktive edilmiş protein kinaz tarafından fosfatlanması ile de inaktive edilir (40).

Vücuttaki kolesterolün düzenlenmesi ayrıca hepatik ve ekstrahepatik hücrelerdeki LDL reseptörlerine de bağlıdır. Ekstrahepatik dokularda hücre kolesterole ihtiyaç duyduğu anda LDL reseptör sentezi ve hücre içerisine LDL alımı artar (29). LDL reseptörlerince hücreye alınan LDL hücre içi kolesterolün artmasına neden olacağı için

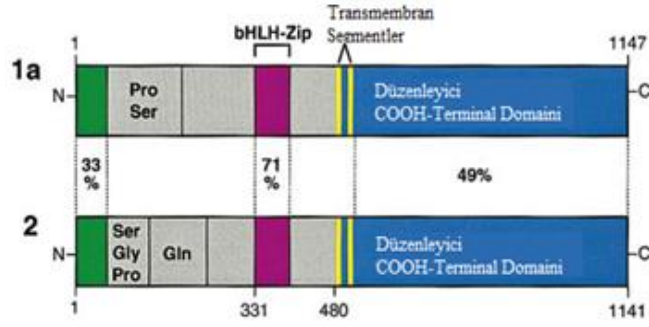
hücredeki HMG-KoA redüktaz enziminin gen transkripsiyonunu suprese ederek (28) enzimi inhibe eder ve hücrenin kendi kolesterolünü üretmesini engeller. Bunun dışında hücredeki kolesterol artışıyla birlikte kolesterolün esterleşmesini katalizleyen ACAT aktive olur ve hücredeki kolesteroler esterleştirilerek depo haline getirilirler. Yine kolesterol artışı nedeniyle LDL reseptör sentezi inhibe edilerek dışarıdan da kolesterol alınması engellenir. Böylece hücre içi kolesterol dengelenmiş olur (25, 31). LDL molekülünün sterol kontrol edici elemente bağlanan proteininin (SREBP) yolağını inhibe etmesi LDL reseptör sentezinin inhibe eder. SREBP'ye bağlı düzenleme plazma LDL'sini azaltan statin aktivasyonu için önemlidir (28).

Hepatik dokularda ise karaciğerin kolesterol ihtiyacına göre LDLR üretimi düzenlenir. LDLR miktarına bağlı olarak karaciğere alınacak kolesterol miktarı belirlenir. Eğer karaciğer içerisinde yeterince *de novo* kolesterol sentezi yapılamıyorsa ve/veya plazma LDL seviyeleri yüksekse karaciğer LDLR üretilen plazmadaki LDL'leri alır. Ancak karaciğerde yeterince LDL varsa LDLR üretimini indükleyerek içerisine kolesterol alınmamasını sağlar (41).

Bu kontrol mekanizması sterol kontrol edici elemente bağlanan proteinler (SREBP'ler) ve karaciğer X reseptörü (LXR) olarak adlandırılan iki protein ile ilişkilidir.

SREBP'ler kolesterol biyosentezindeki HMG-KoA redüktaz, HMG-KoA sentaz gibi enzimlerin transkripsiyonunu kontrol etmekle birlikte LDL reseptörünün de transkripsiyonunu kontrol eder. SREBP1a, SREBP1c ve SREBP2 olmak üzere üç çeşit SREBP vardır. SREBP'lerin hedef genin sentezlenmesini düzenlemeleri için en önemli kısımları N-terminal bölgeleridir. Yapılan çalışmalarda N-terminal ucu olmayan SREBP proteinlerinin ilgili gen bölgelerine bağlanamadığı tespit edilmiştir (42). SREBP-1 proteini sterol düzenleyici element-1'e (SRE-1) bağlanarak LDL metabolizmasının son aşaması olan LDL'nin reseptörü tarafından hücre içerisine alınması aşamasını düzenler (43). Hücresel kolesterol miktarı azaldığında SREBP1 SRE-1'i aktive eder ve LDLR'nin transkripsiyonu aktif edilir. Bu aktiviteyle birlikte LDL alımı sağlanmış olur.

Karaciğerde ise SREBP1 proteininden daha çok olgun SREBP2 proteini bulunur. SREBP2'nin HMG-KoA redüktaz, HMG-KoA sentaz ve LDLR mRNA miktarlarını arttırdığı tespit edilmiştir (42).



**Şekil 2.5.-1.** İnsanda Bulunan SREBP1a ve SREBP2 Proteinlerinin Domain Yapısı (42).

LXR ise aktivitesini gösterebilmek için retinoid X reseptörüyle (RXR) heterodimer yapı oluşturmak zorunda olan nükleer hormon reseptörüdür. Oluşan heterodimer yapı hedef genlerinin LXR sorumlu elementlerine (LXRE) bağlanarak aktivitesini gösterir. Oluşan heterodimer yapıya kolesterol, oksisterol gibi bir ligandın bağlanmasıyla yapıya bağlı olan ko-represör yapıdan uzaklaşır ve ko-aktivatör yerleşir. Böylece yapı hedef geni aktive eder (44).

LXR, LDLR'nin indüklenebilir degrede edici molekülü (Idol) olarak adlandırılan bir ubikuitin ligazın transkripsiyonunu aktive ederek LDLR'nin sitoplazmik domaininin ubikuinasyonunu tetikler. Bu mekanizmanın sonucunda LDLR degrede olur. Sonuç olarak hücreye kolesterol alınması engellenmiş olur (45).

Kolesterol biyosentezi aynı zamanda üç ayrı yolla safra asitleri tarafından da kontrol edilir;

- Safra asitleri kolesterolün absorpsiyonunu sağlayarak biyosentezini inhibe eder. Safra asitlerinin eksikliğinde ise tam tersi mekanizma gerçekleşerek kolesterol biyosentezi artar.
- Safra asitleri kolesterolden sentezlenirler. Vücutta fazla miktarda safra asidi olduğu durumda safra asidi sentezi inhibe olur. Safra asitlerinin sentezi inhibe olduğu durumda vücuttaki kolesterol miktarı artar. Artan kolesterol miktarı da kolesterol biyosentezini inhibe eder.
- Safra asitleri direkt olarak kolesterol biyosentezinin bazı basamaklarını etkileyerek kontrol ederler (16).



## 2.6. KISA RNA'LAR

2000'li yılların başından beri yapılan hücre ve transkriptom çalışmalarında bilinen uzun RNA'lar dışında daha kısa nükleotid dizilerinden ve farklı yapılarda olan kısa RNA dizilerinin olduğu tespit edilmiştir. Kısa RNA'lar ribonükleaz III (RNase III) tip enzimleri tarafından katalizlenen çift zincirli RNA'ların işlenmesi sonucu oluşan yaklaşık 19-28 nükleotid uzunluğunda olan protein kodlamayan RNA'lardır (46).

İnsanda hem hücre içerisinde bulunup hem de dolaşımda bulunan RNA'lar keşfedilmiştir; transfer RNA (tRNA), ribozomal RNA (rRNA), miRNA, yRNA fragmentleri. Bu RNA'lardan tRNA ve mRNA kısa RNA'lar grubunda yer almamaktadır. Yukarıda belirtilmiş kısa RNA'lar dışında insan genomu tarafından transkripte edilen diğer kısa RNA; kısa müdahale edici RNA (siRNA), piwi ile etkileşen RNA (piRNA), küçük nükleer RNA'lar (snoRNA ve snaRNA) ve bilinen en uzun kısa RNA'lar olan uzun kodlama yapmayan RNA'lar (lncRNA)'dır (47).

Kısa RNA'ların keşfedildiği yıllarda bu RNA'lar üç ana grupta toplanmış olup bunlar; siRNA'lar, piRNA'lar ve miRNA'lardır (48).

siRNA'lar miRNA'lardan sonra en çok çalışılan kısa RNA grubu olup 20-30 nükleotidden oluşurlar. Uzun çift zincirli RNA'lardan sentezlenirler (46). Somatik hücrelerde ve germline hücre hatlarında bulunurlar. Görevleri virüs, transpozon ve transgen gibi genomun stabilitesini tehlikeye sokan yapılardan genomu korumaktır. Sentezlenmeleri organizmanın bu yapılara maruz kalmasıyla tetiklenir (48).

piRNA'lar ise miRNA ve siRNA'lardan farklı olarak somatik hücrelerde bulunmayıp sadece germline hücre hatlarında bulunurlar ve tek zincirli RNA yapısına sahiptirler (48).

snoRNA'lar ise hücre çekirdeğinde bulunup RNA'nın kimyasal modifikasyonu, telomer kararlılığı, preribozomal RNA (pre-rRNA)'nın işlenmesi ve mRNA'nın alternatif kırılması gibi moleküler fonksiyonları vardır. snaRNA ise çekirdekte yer alan ve telomeraz aktivitesinde önemli role sahip Cajal cisimciğine özgü nükleer RNA'dır (49).

yRNA ise RNA polimeraz III aktivitesiyle transkripte olan yaklaşık 83-112 nükleotidden oluşan kısa RNA'dır. Hücrede deoksibonükleik asit (DNA) replikasyon kompleksinin oluşumunda, hatalı katlanan RNA'lara şaperonluk yapma, 5S rRNA'ların kalite kontrolünde görevli oldukları bilinmektedir. Bu RNA'lardan oluşan fragmentler

insan serum ve plazmasında görülüp ekstrasellüler RNA paketlerinde de görülmüştür (50).

mRNA, tRNA ve rRNA'dan sonra bilinen en uzun RNA'lar olan lncRNA'lar 200 nükleotidden fazla nükleotidden oluşan RNA'lardır. İnsan transkriptomunun en az anlaşılır kısmını oluştururlar. Keşfedildikleri zaman uzun kodlama yapmayan RNA'lar olarak adlandırılmış olsalar da kodlama yapabilen RNA'lar oldukları bilinmektedir. Çekirdekte bulunup mRNA'lara kıyasla ekspresyon seviyeleri oldukça düşüktür. Dokuya özgü oldukları için kanser için biyobelirteç olarak kullanılabilecekleri düşünülmektedir (51).

## 2.7. MİKRO RNA'LAR

mikroRNA'lar (miRNA) yaklaşık 21-25 nükleotidden oluşan kodlama yapmayan (52) tek zincirli nükleotid yapılarıdır. Bilinen biyolojik fonksiyonları hedefleri olan mRNA'larla etkileşip onların ekspresyonunu baskılamaktır (53). Birden fazla çeşitte miRNA'nın aynı mRNA'ya bağlanabilmekle birlikte tek bir miRNA çeşidinin de birden fazla mRNA'ya bağlanabilir (46). Hedefleri olan mRNA'lara 3' çevrilmeyen bölge (3' UTR= 3' untranslated region) ucundan bağlanırlar. miRNA'nın 5' ucuyla mRNA'nın 3' UTR ucu arasındaki tamamlayıcılığın oranı mRNA'nın geleceğine karar verir (54).

miRNA'lar Lee ve arkadaşlarının 1993'te (52) *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) ile yaptıkları çalışmayla keşfedilmiştir. Bulunan ilk miRNA *lin-4* geninin kodladığı miRNA'dır. Bu gendeki mutasyon ile ilgili yapılan çalışmalarda genin kopyalanması sonucu 21-22 nükleotid uzunluğunda RNA kodladığı tespit edilmiştir. 2000 yılında Ruvkun ve arkadaşları tarafından insanda da böyle bir yapı (*let-7*) olduğu keşfedilmiştir. Bu küçük RNA'lara kısa geçici RNA'lar (stRNA) adı verilmiştir (55). Daha sonra başka küçük RNA'ların tespitiyle de isimleri miRNA olarak değiştirilmiştir.

miRNA'ların embriyogenesis (56), hücre proliferasyonu, apoptoz (57), kanser (58) ve tip II diyabet, obezite, ateroskleroz gibi metabolik hastalıklarla ve karaciğer-yağ metabolizmasıyla (59) ilişkili olduğu yapılan çalışmalarla tespit edilmiştir. Örneğin miRNA-1 kalp dokusuna özgü bir miRNA olup normal sağ ventriküler gelişimi ve septasyonundan sorumlu olan ifade edilmiş kalp ve sinirsel krest türevleri 2 (HAND2=heart and neural crest derivatives expressed 2) geninin mRNA'sını baskılar. miRNA-1 dışında miRNA-133 de sağ ventriküler gelişimi ve septasyonunu düzenler. Bu

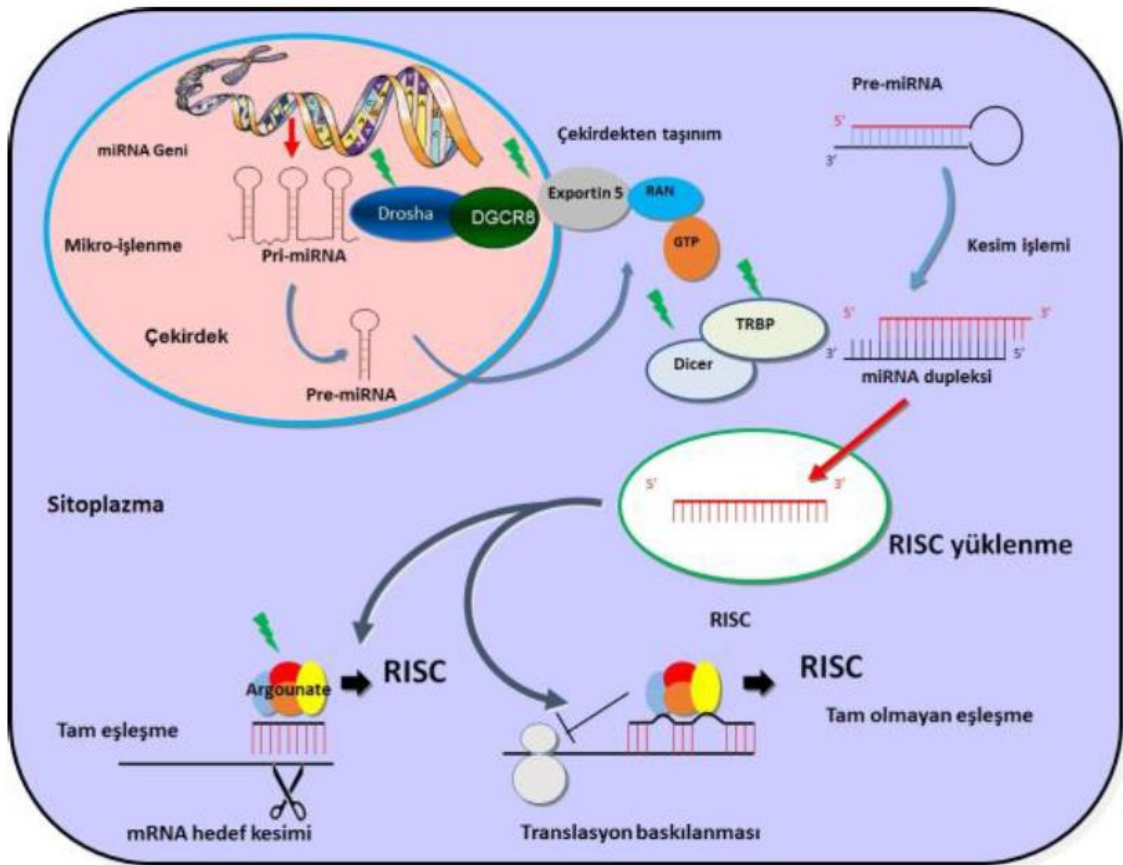
durum biyolojik mekanizmaların birden fazla miRNA tarafından kontrol edildiğini gösterir (60).

Hastalığa dair moleküler ipuçları olan biyolojik yapılara biyobelirteç denir. Hastalıklarla ilişkisi belirlenen miRNA'lar iki ayrı şekilde değerlendirilmeye başlanmıştır. Bu miRNA'ların varlığı ya da yokluğu hastalık varlığını gösterebilir. miRNA'ların da insan serum, plazma, idrar gibi biyolojik sıvılardaki varlığı biyobelirteç olarak kullanılmalarını olanaklı kılar (59, 61). Hastalıklar ve miRNA arasındaki ilişki hakkındaki çalışmaların yeni hedefi miRNA'ların hastalığın kesin tanısının konulmasında kolaylıkla yardımcı olup olamayacağını incelenmesidir ve böylelikle hastalıklara özgü biyobelirteç olarak kullanılabilen miRNA'ların tespit edilmesidir.

miRNA'ların hastalıklarla ilişkisi anlaşıldıktan sonra terapötik olarak kullanılıp kullanılmayacağı da başka bir araştırma konusu olmuştur. Örneğin; birçok miRNA'nın hipertrofi, kalp yetmezliği, ateroskleroz gibi ciddi kalp rahatsızlıklarının patofizyolojisinde görev aldıkları bilinmektedir (60, 62). Etkili miRNA ekspresyon düzeylerinin artırılması ya da azaltılması ile hastalıkların önüne geçilmesi hedeflenmektedir. Bunun için çeşitli teknolojiler geliştirilmiştir. miRNA Mimic teknolojisi yeterli sentezlenemeyen miRNA'nın sentetik sentezine dayanan ve hedefi olan mRNA'ya 3' UTR ucundan bağlanarak miRNA'nın etkisinin gösterilmesini sağlar. Bilindiği üzere aynı miRNA birden fazla mRNA'ya etki edebilir. Bu sebeple gene spesifik olmayan miRNA'ların sentetik sentezi %100 güvenilir olmaz (63). Bu teknikle yeterli eksprese olmayan miRNA'lar için bir çözüm bulunmuş olmakla birlikte fazla miRNA ekspresyonundan oluşan hastalıkların çözümü için ise anti-miRNA tekniği geliştirilmiştir. Bu teknik antisense inhibitör oligonükleotid (AMO) sentezlenmesine dayanır. AMO'ların amacı karşılıklarına gelen miRNA'yı bilinmeyen bir mekanizmayla degrade etmektir (63). AMO teknolojisi dışında 2006 (64) yılında Orom ve arkadaşları tarafından geliştirilen kilitli nükleik asit (LNA= locked nucleic acid) sisteminin amacı ise bir oksometilen aracılığıyla riboz şekerinin 2. ve 4. karbonlarından konformasyonel olarak değiştirilmesi sonucu anti-miRNA'ların nükleaz aktivitesine karşı dayanıklılığını arttırmak, engelleyecekleri miRNA'lara olan bağlanma afinitesini arttırmak ve biyolojik sistemlerde düşük toksisite olmasını sağlamaktır.

### 2.7.1. miRNA'ların Biyogenezi

Yapılan genomik çalışmalardan bilindiği üzere genom protein kodlayan ve kodlamayan bölgeler olan sırasıyla ekson ve intron olarak adlandırılan bölgelere sahiptir. mRNA transkripsiyonu sırasında intron bölgelerin den de sentezlenme yapıp alternatif kırılma işlemiyle mRNA'nın genomik intronlardan sentezlenmiş kısımları çıkartılır. Ancak miRNA'lar mRNA'ların intron kısımlarından kodlanıp RNA polimeraz II aktivasyonunda transkripte olurlar (64). miRNA'ların sentezlenmesi için öncelikle kendi promotor bölgelerini de transkripte etmesi gerekir (65).



Şekil 2.7.1-1. miRNA Biyogenezinin ve miRNA'ların mRNA'ları Düzenlemesinin Şematik Özeti (66).

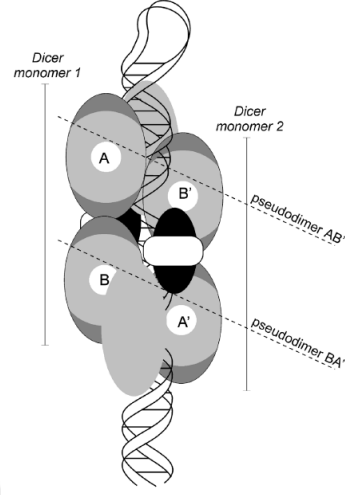
miRNA biyosentezinin ilk aşaması; mRNA'ların intronlarından çekirdekte transkripte olup miRNA'nın öncül yapısı olan primer-miRNA (pri-miRNA)'ların sentezlenmesidir. pri-miRNA'lar yaklaşık 60-80 nükleotid uzunluğunda olup kendi içerisinde katlanması nedeniyle saç tokası yapısına sahip çift zincirli RNA'lardır (67). pri-miRNA transkripte olduktan sonra çekirdekte bulunan RNase III endonükleaz ailesine

mensup 130-160 kDa ağırlığında bir enzimdir. N-terminal ucunda prolin, serin ve arjinince zengin bölgeler barındırmaktadır. Drosha, DiGeorge Sendromu Kritik Kontrol Geni 8 (DGCR8=DiGeorge Syndrome Critical Region Gene 8) ile kompleks oluşturarak saç tokası yapısına sahip çift zincirli pri-miRNA'yı keserek prekürsör miRNA'nın (pre-miRNA'nın) oluşmasını sağlar. Drosha'nın pri-miRNA'da kestiği bölgeler spesifik olup seçimin nasıl yapıldığına dair mekanizma açığa kavuşmamıştır (67). Oluşan komplekse mikroişlemci (microprocessor) denir (68). DGCR8'nin Drosha ile oluşturduğu komplekste RNA bağlayıcı molekül olarak görev yaptığı düşünülmektedir. DGCR8, insanda 22. kromozomun q11 bölgesinde bulunan DiGeorge sendromu kromozomal bölgesinde tespit edilmiştir. Drosha enziminin iki katalitik bölgesi olup bunlardan RNase III domain a (RIIIda) pri-miRNA'yı 3' ucundan keserken RIIIdb ise 5' ucundan keser. RIIIda, RIIIdb'den iki nükleotid daha az kestiği için 3' bölgesinde fazladan iki nükleotid olur ve bu bölge eşleşmemiş bölgedir. Drosha-DGCR8 kompleksi yaklaşık 650 kDa olup yapısında iki molekül Drosha, iki ya da daha fazla kopya DGCR8 bulunduğu düşünülmektedir (67). Drosha-DGCR8 kompleksinin biyogenezdeki rolü pri-miRNA birikmesinin Drosha'nın veya DGCR8'in knock down'unun sebep olabileceğinin bulunmasıyla anlaşılmıştır (68).

miRNA biyogenezinin ikinci aşaması ise mikroişlemci ile kesilme sonucunda sentezlenmiş pre-miRNA'nın sitoplazmaya aktarılmasıdır. Sitoplazmaya aktarım işlemi Ras ile ilişkili nükleer protein-guanozin trifosfat (Ran-GTP) ve karyoferin ailesine mensup (69) Exportin 5 adı verilen eksport proteini aracılığıyla gerçekleşir (65). Ran bir kofaktör olup GTP'ye bağlıdır. Yi ve arkadaşları Exportin 5'in Ran-GTP olmadan pre-miRNA'nın taşınımının yapılamadığını ile taşıma için 5' ucun olması ve 3' ucunda 5' uca kıyasla daha fazla nükleotid içermesi gerektiğini deneysel olarak kanıtlamışlardır (69). Ayrıca Exportin 5 sitoplazmaya taşınan pre-miRNA'nın çekirdekte degrade olmasını engeller (70). Taşımadaki görevi Exportin 5'in aktifleşmesini sağlamaktır. Exportin 5 aynı zamanda tRNA'nın da çekirdekten sitoplazmaya taşınmasından sorumludur (71).

miRNA biyogenezinin üçüncü aşaması ise pre-miRNA'dan olgun miRNA'nın oluşmasının sağlanmasıdır. Bu işlem Dicer adı verilen temelde iki büyük monomerden oluşan homodimer yapıları ribonükleaz III ailesine mensup enzim tarafından yapılır. Dicer 218 kDa'luk bir enzim olup adenozin trifosfataz (ATPaz), helikaz, Piwi/Argonaute/Zwille (PAZ), iki katalitik RNase III domaini ve çift zincirli RNA

bağlama domaini (dsRBD) olmak üzere altı fonksiyonel domaini vardır (72). PAZ domaini pre-miRNA'nın 5' ucundan fazla 2 nükleotide sahip 3' ucun tanınmasını sağlar (68).



**Şekil 2.7.1-2.** pre-miRNA ile Etkileşime Geçmiş Dicer Enzimi (72).

Dicer enzimi Drosha gibi spesifik kesim yapamayıp rastgele kesim yapar. Kesimi sonucu iki adet yaklaşık 22 nükleoid uzunluğunda olan miRNA'lerden oluşan çift zincirli miRNA:miRNA\* dubleksi oluşur. miRNA:miRNA\* dubleksi biyogenez sırasında oluşan geçici bir ara üründür (67, 68).

Biyosentezin dördüncü aşaması ise miRNA'ların hedefleri olan mRNA'larla etkileşim kurabilmeleri için RNA tarafından uyarılmış susturma kompleksi (RISC = RNA induced silencing complex) olarak adlandırılan kompleksin oluşmasıdır. Biyokimyasal analizler RISC yapısında Dicer enzimiyle birlikte RNA bağlayıcı bir molekül olan transaktive edici cevabı oluşturan RNA bağlanan protein (TRBP=Transaktivating Response RNA Binding Protein) ve Argonaute 2 (Ago2) proteininin olduğunu göstermektedir. Chendrimada ve arkadaşları TRBP'nin knock down edilmemesi sonucunda Dicer enziminin destabile olduğunu ve bunun sonucunda da miRNA biyogenezinin devam etmediğini deneysel olarak ispatlamışlardır. Ayrıca Ago2, TRBP ve Dicer'dan oluşan yaklaşık 500 kDa'luk kompleks yapıyı da izole etmişlerdir. Böylece RISC yapısını oluşturan proteinleri bulup bu yapının RISC'nin katalitik bölgesi olduğunu tespit etmişlerdir (73). RISC yapısında aynı zamanda GW182 adı verilen bir molekül bulunur. Bu molekülün görevi Ago2 stabilizasyonunu sağlamaktır (70). Dicer'ın oluşturmuş olduğu miRNA:miRNA\* dubleksinden sadece biri hedef mRNA'nın

ekspresyonunu azaltmak üzere RISC yapısına katılır. RISC yapısına katılan miRNA zincirinin nasıl seçildiği oldukça dikkat çeken bir araştırma konusu olmuştur. miRNA biyogeneziyle ilgişi yapılan ilk çalışmalarda miRNA:miRNA\* dubleksinden sadece birinin RISC yapısına girdiği diğerinin ise degrede olduğu belirtilmektedir (65). Teorik olarak degrede olmayacak miRNA'nın seçimi 5' ucundaki serbest enerji profili hangi miRNA'nın degrede olacağını belirler. Termodinamik olarak tercih edilmeyen zincir miRNA\* olarak gösterilip bu zincirin degrede edildiği düşünülmektedir (74). Ancak günümüze daha yakın tarihlerde yapılmış olan çalışmalar miRNA:miRNA\* dubleksinin iki tek zincirli miRNA'sının da farklı RISC'lere girerek farklı mRNA hedeflerinde aktivite gösterdiğini belirtmektedir (70). Daha önceki çalışmalarda miRNA:miRNA\* dubleksindeki miRNA\* zincirinin degrede olmasını kendisinin laboratuvarında kopyalanamaması gerekçe gösterilerek açıklanmıştı. Ancak Aravin ve arkadaşlarının meyve sineği olarak bilinen *Drosophila melanogaster*'larda yaptığı çalışmada miRNA:miRNA\* dubleksinin miRNA\* dizisinin de varlığı başka dokularda görülmüş olup dubleksi oluşturan miRNA'ların farklı dokulardaki mRNA'ları etkilediği bulunmuştur. Ayrıca dublekste birbirlerinin tamamlayıcısı olan miRNA'ların canlının farklı gelişim zamanlarında etkili olduğu da tespit edilmiştir (75).

### **2.7.2. miRNA'ların mRNA'ları Düzenlemesi**

miRNA'lar RISC kompleksinin içerisine yüklendikten sonra tek başlarına mRNA'ları düzenleyemezler. Bu kompleks ile birlikte düzenlenecek olan mRNA'ya iletilirler. Bu RISC kompleksi mRNA'nın seed adı verilen, yüksek oranda korunmuş ve 6-8 nükleotitden oluşan bir bölgesine (seed-site) bağlanarak etkileşir (54). mRNA'nın 5' ucunda yer alan bu bölgede 2-8 nükleotid eşleşmesi miRNA'nın mRNA'yı kontrol etmesi için yeterlidir (65).

miRNA'ların iki farklı mekanizmayla mRNA'ların ekspresyonunu negatif yönde düzenlediği düşünülmektedir. miRNA 5' ucuyla hedef mRNA'nın 3' ucu tam anlamıyla eşleşebildiği takdirde mRNA'nın degrede olması için komut verilmiş olur (65).

mRNA degradasyonu deadenilasyon işlemiyle başlar. CCR4-NOT ve poli(A)-nükleaz 2-3 (PAN2-PAN3) deasilaz kompleksinin RISC yapısında yer alan GW182 proteini aracılığıyla hedef mRNA'nın 3' ucundaki poli-A kuyruğunu degrede eder. İkinci aşama ise mRNA işlevsel hale getirilirken 5' ucuna eklenmiş 7-metil guanozin (m7G) başlığını degrede etmektir. DEAD-kutusu helikaz 6 (DDX6) ve CCR4-NOT kompleksi

mRNA dekapaj edici protein 2 (DCP2=decapping mRNA 2) enziminin aktivitesiyle degrede olur. mRNA degradesyonunun son aşaması ise 5'-3' ekzoribonükleaz 1 (XRN1=5'-3' exoribonuclease 1) enzimiyle kalan kısmın degrede edilmesidir (76).

Ancak bu işlem için mükemmel uyumun sağlanmış olması gerekir. TargetScan, PicTar, EMBL gibi veritabanları mRNA ve miRNA eşleşmelerini daha önce deneysel olarak bulunan eşleşmeler referans alınarak algoritmik olarak hesaplayan veri tabanlarıdır. Bu veritabanlarının yaptığı hesaplamalara göre bilinen en yüksek eşleşme 7 nükleotidden oluşmaktadır. Daha fazla sayıda eşleşebilen nükleotid sayısı mRNA-miRNA eşleşmesinin spesifitesini arttıracaktır (77). Bu sebeple ikinci mekanizma olan translasyonel baskılamanın insanlarda daha aktif olduğu düşünülmektedir. Translasyonel baskılamanın iki şekilde olduğu tahmin edilmektedir; miRNA translasyonun başlangıç aşamasından sonra baskılamayı yapar veya translasyon gerçekleşir ancak yeni sentezlenen polipeptid degrede edilir (65).

Tristetraprolin (TTP) adenin ve urasilce zengin mRNA'nın ekspresyonunu kontrol ederek hedef mRNA'nın translasyonunun baskılanmasını sağlar. Tao ve Gao'nun yaptığı çalışmada TTP'nin bu işlemi yapabilmesi için ökaryotik başlatıcı faktör 4E2 (eIF4E2)'ye ihtiyacı olduğu tespit edilmiştir (78). Sadece eIF4E2 bu işlem için yeterli olmayıp degradesyonda görev yapan CCR4-NOT ve PAN2-PAN3 deasilaz kompleksi ile RISC yapısında yer alan GW182 proteininin de olması gerekmektedir (79). Translasyonun baskılanması işleminde degradesyonunu ilk aşaması olan deadenilasyon etkilidir (76).

### **2.7.3. miRNA'ların Hücre Dışına Çıkarılması**

Mandel ve Métais 1948 (80) yılında insan plazmasında ekstrasellüler nükleik asitlerin varlığını keşfetmişlerdir. miRNA'ların da keşfedildiklerinden yaklaşık 15 sene sonra serum, plazma, idrar, amniyotik sıvı gibi insan örneklerinde de var olduğu keşfedilmiştir. miRNA'lar sentezlendikleri hücrelerden eksozom oluşturarak veya HDL gibi hücreden taşıma yapan moleküllere bağlanarak çıkabilirler. Gibbins ve arkadaşları miRNA'ların hedefleri olan mRNA'lara taşınması işlevinde görevli RISC kompleksine ait proteinleri bazı eksozomların içinde tespit etmiş olup bu yapılarla da miRNA'ların hücre dışına taşınabildiğini göstermişlerdir (81).



EXOmotif olarak isimlendirilen özel bir eksozom-sıralama RNA motifi (GGAG) bazı miRNA'ların 3' ucunda bulunup onların eksozomlara yüklenmesini sağlar. Bu motife sahip olmayan miRNA'lar ise transkripsiyon sonrası modifikasyona uğrayarak eksozoma yüklenirler. Eksozomlarda genel olarak 3' ucu uridillenmiş miRNA izoformlarına rastlanır (47).

miRNA'ların kolaylıkla ulaşılabilen insan sıvılarında bulunması onların biyobelirteç olarak kolaylıkla kullanılmasına olanak sağlar (59, 61).

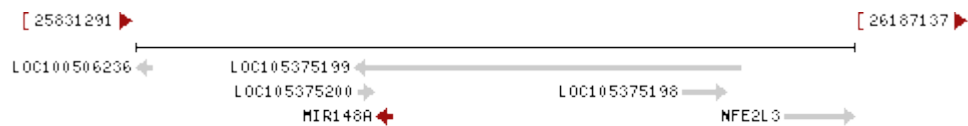
#### 2.7.4. miRNA-148a

miRNA-148a, miRNA148/152 ailesinin bir üyesi olan olgunlaşmış formu 22 nükleotidden oluşan ve ilk kez Merkerova ve arkadaşları tarafından hematopoetik kök hücrelerde bulunan bir miRNA'dır (82).



Şekil 2.7.4.-1. (a) miRNA-148a'nın Sentezlendiği pre-miRNA-148a'nın ve (b) Olgun miRNA-148a'nın Yapısı (83).

miRNA-148a insanda 7. kromozomun p15.2 bölgesinde yer alır (22, 84). miRNA-148a'nın mensup olduğu miRNA ailesi onkogen ve tümör supresör genleri gibi davranır (83).



Şekil 2.7.4.-2. miRNA-148a'nın 7. Kromozomunda Bulunduğu Bölge (84).

Yapılan çeşitli çalışmalarda miRNA-148a'nın çeşitli hastalık ve metabolizmada görev aldığı tespit edilmiştir. Cheng ve arkadaşlarının 2012 (85) yılında insan serumlarıyla yaptıkları çalışmada miRNA-148a'nın osteoklastojenezi engelleyen V-maf kas-portoneoziti fibrosarkom onkogen homologu B (MAFB= V-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog B) olarak adlandırılan genini inhibe ederek osteoklastojenezi aktive ettiği tespit edilmiştir.

2012 (86) yılında yapılan başka bir çalışmada ise miRNA-148a'nın myoblast farklılaşmasında inhibitör rol oynayan Protein kinaz 1 içeren Rho ile ilişkili sargılı sarmal (ROCK1= Rho-associated coiled-coil containing protein kinase 1) olarak adlandırılan kinazı istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde inhibe ettiği ve bu sayede myoblast farklılaşmasını arttığı tespit edilmiştir.

2013'te (87) Kozłowska ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada ise miRNA-148a'nın Huntington hastalığına neden olduğu bilenen Huntingtin (HTT) genini regüle ettiği bulunmuştur.

2013 - 2017 yılları arasında yapılmış çeşitli çalışmalarda miRNA-148a'nın kanser patofizyolojisini de düzenlediği tespit edilmiştir.

2013 (88) yılında Crohn hastalarından alınan kan örnekleriyle yapılan çalışmada miRNA-148a'nın insan lökosit antijen (HLA) ailesinin bir üyesi olan HLA-C genini regüle ettiği ve sağlıklı kişilerle hasta kişiler kıyaslandığında da miRNA-148a düzenlemesinin fazla olduğu hastalarda insan bağışıklık yetmezlik virüsünün (HIV) hastalığı oluşturma riskiyle anlamlı bir şekilde ters orantılı çıktığı tespit edilmiştir.

2015'de Li ve arkadaşlarının yaptığı çalışma (89) ile 2016'da Huang'ın (90) küçük hücreli olmayan akciğer kanseri hastalarıyla ve sağlıklı olduğu tespit edilmiş kişiler ile yaptığı çalışmada gruplar arasındaki miRNA-148a ekspresyonu arasındaki farklar istatistiksel olarak anlamlı çıkmıştır. Her iki yayın da çalışmaları sonucunda miRNA-148a'nın sağlıklı bireylere kıyasla hasta bireylerin serumlarında daha az miktarda bulduklarını tespit ettiklerini açıklamaktadır. Bu çalışmalara göre miRNA-148a'nın az ekspresyonu agresif tümör ile doğru orantılıdır.

miRNA-148a sadece küçük hücreli olmayan akciğer kanseriyle ilişkili bulunmayıp timik epitelyal tümörleriyle ve kolorektal tümörlerle de ilişkisinin olduğu araştırılmıştır (91, 92).

2013'te Willer ve arkadaşları (93) miRNA-148a'ya ait bir tek nükleotid polimorfizmini (SNP) inceleyerek bu miRNA'nın hatalı oluşmasıyla LDL, trigliserit ve total kolesterol miktarlarının etkilendiğini tespit etmişlerdir.

Goedeke ve arkadaşları 2015 (94) yılında insan hepatosit hücrelerinde (Huh7) ve farelerde yaptığı çalışmalardan birine göre miRNA-148a'nın inhibe edilmesi anlamlı bir şekilde LDL kolesterol seviyesinin arttırmaktadır. Bununla birlikte aynı zamanda ATP bağlayıcı kaset transporter'ı olan (ABCA), ABCA1'in ekspresyonunu regüle ederek serumdaki HDL kolesterol miktarının azaltılmasına neden olur.

Goedeke ve arkadaşlarının 2016 (95) yılında yayımladığı derlemeye göre miRNA-148a promotorunun sterol kontrol edici elemente bağlanan protein 1 (SREBP1= Sterol regulatory element-binding protein 1) olarak adlandırılan proteinin bağlanma bölgelerini değiştirerek kendi transkripsiyonunu düzenlendiği bilinmektedir.

En güncel yayınlardan biri olan Laffont ve Rayner'ın makalesine göre miRNA-148a'nın inhibisyonu hepatik LDLR ve ABCA1 düzeyini arttırmakla birlikte LDL kolesterol seviyesini azaltmakta ve HDL kolesterol seviyesini arttırmaktadır (96).

### 3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

#### 3.1. Örneklerin Seçimi

Çalışma, Marmara Üniversitesi Pendik Eğitim Araştırma Hastanesi Kalp ve Damar Cerrahisi Anabilim Dalı'na başvuran koroner arter hastalığı teşhisi konulmuş kişiler ve check-up kontrolü için yine aynı kliniğe başvuran sağlıklı kontrollerden oluşturulan iki grup üzerine kurulmuştur. Çalışmada miRNA-148a ekspresyon düzeyleri ile LDL kolesterol seviyesi arasındaki ilişki inceleneceğinden örnekler Mahley ve arkadaşlarının 1995 yılında Türkiye'nin lipid profili ile ilgili yaptığı çalışma (97) ve Türk Kardiyoloji Derneği'nin (98) belirtmiş olduğu referans değerleri değerlendirilerek LDL kolesterol seviyesi 130 mg/dl'den düşük (n=45) ve 130 mg/dl'den yüksek (n=45) olarak ikiye ayrılmıştır. İleriki çalışmalarda kullanılmak üzere iki grup arasındaki koroner arter hasta sayısı ile kontrol kişi sayısı eşit tutulmaya çalışılmıştır.

#### 3.2. Kullanılan Malzeme ve Cihazlar

##### 3.2.1. Kullanılan Sarf ve Ayrac Malzemeler

Bu tez çalışması sırasında kullanılan tüm sarf ve ayraç malzemeler kullanıldıkları yöntemlere göre ayrılıp başlıklar altında yazılmıştır. Tüm yöntemlerde ise otomatik pipet kullanımı için pipet ucu kullanılmıştır.

##### 3.2.1.1. miRNA İzolasyonu

mikroRNA İzolasyon Kiti (miRNeasy Serum/Plazma Kit, Qiagen): Trizol (Quiazol, Qiagen), Kloroform (Sigma Aldrich) %100 Etanol (Sigma Aldrich), miReasy Spike in kontrol (miRNA39, Qiagen). İzolasyon için kullanılan RWT Tamponu Guanidine tuzu içerir ve işlemde 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.

Tamamlayıcı DNA (cDNA=complementary DNA) reverse transkripsiyon kiti (miScript II Kit, Qiagen): RNase free su, miScript HiFlex Buffer, nükleik asit mix'i, miScript Reverse Transkripsiyon mix'i.

### **3.2.1.2. Fluometre ile miRNA Düzeyi Belirleme**

miRNA özgü Reagent ve miRNA tamponu ile çalışma solüsyonu hazırlandı. Cihaz kalibrasyonu 10 ng/μl rRNA içeren standart 1 ve 250 pg/μl rRNA standart 2 kullanılarak yapıldı. Ölçüm yapılırken çalışma solüsyonu ve ölçümü yapılacak RNA 500 μl'lik Qubit tüplerine konuldu. (Qubit 3.0 microRNA Assay kit, Invitrogen, Thermo Fisher Scientific Inc).

### **3.2.1.3. NanoDrop ile miRNA Saflık Tayini**

DNase-RNase free 18m Ω su.

### **3.2.1.4. Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) Cihazı ile miRNA Ekspresyon Düzeyi Belirleme**

microRNA Universal Primer (Qiagen), miScript SYBR Green PCR Kit (Qiagen), microRNA Primer Assay (miRNA-148a, Qiagen), microRNA Housekeeping Assay (SNORD68, Qiagen), 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**

Santrifüj (Centrifuge 22R, Beckman Coulter), NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific Inc), Fluorometre (Qubit 3.0, Invitrogen, Thermo Fisher Scientific Inc), Gerçek Zamanlı PZR (Fast Real Time 7500, Applied Biosystems), +4 °C Buzdolabı (Haier), -20 °C Buzdolabı (Haier), -80°C Buzdolabı (Haier), Vorteks (V.I. Plus Biosan), Otomatik Pipet Takımı (Thermo Fisher Scientific Inc).

## **3.3. Yöntemler**

### **3.3.1. Serumdan miRNA İzolasyonu**

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

Serum örnekleri -80 °C'den çıkarılarak oda ısısında çözünmeye bırakıldıktan sonra izolasyon kitinde belirtildiği gibi 37 °C'de inkübe edildi. İnkübe edilen serumlardan 200 μl steril ependorflara alındı, üzerlerine 1000 μl liziz çözültisinden (Qiazol Lysis Solution) eklendi ve çalkalandı. Bu işlemten sonra örnekler oda sıcaklığında 5 dk

bekletildi ve üzerine stok olarak hazırlanan 3,5 µl “miReasy Spike in kontrol” ( $1.6 \times 10^8$  kopya/µl) ilave edildi. Örnekler 200 µl kloroform eklendikten sonra örnekler 5 dk vorteks cihazı ile çalkalandı ve oda ısısında 3 dk bekletildi. Sonrasında örnekler +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 vortexle 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 µl RNA free su koyuldu. Ardından tüplerin 1 dk en yüksek hızda santrifüjlenmesiyle mikroRNA izolatları elde edildi.

### 3.3.2. cDNA Eldesi

Elde edilen miRNA izolatlarına ters transkripsiyon işlemi (Tablo 3.3.2-1) uygulanarak (miScript II Kit, Qiagen) cDNA’ya çevrildi (Tablo 3.3.2-2). RNA free su ve miElde edilen örnekler çalışmaya kadar -20°C ‘de saklandı (99).

**Tablo 3.3.2-1. cDNA Sentezi için PZR**

<i>5x miScript HiFlex Buffer</i>	4 µl
<i>10x miScript Nucleic Mix</i>	2 µl
<i>miScript Reverse Transcriptase Mix</i>	2 µl
<i>RNA free su</i>	10,5 µl
<i>miRNA</i>	1,5 µl
<b>Toplam:</b>	<b>20 µl</b>

**Tablo 3.3.2-2. cDNA Sentezi için İnkübasyon Koşulları**

60 dk	37 °C
5 dk	95 °C
∞	95 °C

### 3.3.3. miRNA Saflık Tayini

NanoDrop2000 cihazı ile DNase-RNase free 18m Ω su kullanılarak blank alındıktan sonra tüm miRNA'lerden sırayla 1'er µl alındı ve 260-280 nm dalga boylarında ölçümlerinin yapılmasıyla cihaz tarafından hesaplanmış optik yoğunluk ( $OD_{260}/OD_{280}$ ) oranı değerlendirilerek miRNA'ların saflığı belirlendi. Saflık değeri  $OD_{260}/OD_{280}$  değeri 2'den büyük olan örnekler uygun olarak kabul edildi (100).

### 3.3.4. miRNA Miktarlarının Belirlenmesi

miRNA miktarları fluometrik bir cihaz olan Qubit 3.0 (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific Inc) ile ölçülerek belirlendi. Bu işlem için Qubit microRNA Assay (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific Inc) kullanıldı. Kite ait miRNA tamponundan 199 µl ve miRNA Reagent çözeltisinden 1 µl alınarak çalışma çözeltisi hazırlandı. Ölçüm yapılması için tanıtılması gereken standart çözeltilerin hazırlanmasında hazırlanmış çalışma solüsyonundan 190 µl alınıp üzerine 10 µl standart solüsyonu 1 eklenerek ilk standart hazırlanmış olup ikinci standart için 190 µl çalışma solüsyonuna 10 µl standart solüsyonu 2 eklendi. İki standart çözeltisi oda sıcaklığında 2 dk bekletildikten sonra cihaza tanıtılmıştır.

Ölçümü yapılacak her miRNA için farklı Qubit tüplerine 198 µl çalışma çözeltisi üzerine 2 µl miRNA eklenmiştir (101).

### 3.3.5. Eş Zamanlı PZR Cihazı ile miRNA Ekspresyon Analizleri

miRNA ekspresyon çalışmaları için Fast Real Time 7500 (Applied Biosystems) cihazı kullanılmıştır. miRNA ekspresyon seviyelerini karşılaştırmak delta  $C_T$  ( $\Delta C_T$ ) ve kat değişimi farklarını hesaplamak için bir internal kontrol (housekeeping assay, SNORD68) kullanılmıştır. Livak formülünün hesaplanmasında kullanılan  $\Delta\Delta C_T$  değerinin hesaplanması için kontrol grubundaki tüm örneklerin ifade düzeyi değerlerinin ortalaması alınarak meta kontrol oluşturulmuştur. Çalışmada kullanılan tüm bireylerin  $\Delta C_T$  değerlerinden meta-kontrolün  $\Delta C_T$  değeri çıkartılarak  $\Delta\Delta C_T$  değerleri

hesaplanmıştır. miRNA ifade düzeyi belirleme hesaplamaları Livak formülü ( $2^{-(\Delta\Delta C_T)}$ ) kullanılarak yapılmıştır (102). Livak formülünün de ln tabanında logaritması ( $\ln[2^{-(\Delta\Delta C_T)}]$ ) alındığına göre miRNA ifade düzeylerinin kat değişimleri hesaplanmıştır.

Syber Green (miScript SYBR Green PCR, Qiagen) ile işaretlenmiş cDNA dizisine analiz edilecek miRNA primeri (miRNA-148a, Qiagen) ve miRNA endojen kontrol (housekeeping) primeri (SNORD68, Qiagen) bağlanması sonucunda cihaz tarafından cyber green boyasının floresan ışımaya miktarı saptanılması ile gerçekleştirilmiştir (103).

**Tablo 3.3.5-1.** miRNA Ekspresyon Analizleri için Hazırlanan İçerik

<i>SYBR Green PCR Mix</i>	12,5µl
<i>miScript Universal Primer</i>	2,5 µl
<i>miScript Primer Assay</i>	2,5 µl
<i>RNAase free su</i>	2,5 µl
<i>cDNA</i>	5 µl
<b>Toplam:</b>	<b>25 µl</b>

**Tablo 3.3.5-2.** miRNA Ekspresyon Analizleri için Gereken Döngü Koşulları

Denatürasyon	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	

### 3.3.6. Lipid Profillerinin Ölçülmesi

Plazma kolesterol, trigliserit, VLDL, LDL ve HDL düzeyleri Marmara Üniversitesi Pendik Eğitim ve Araştırma Hastanesi Biyokimya Anabilim Dalı



Laboratuvarlarında bulunan klinik otoanalizatörler ile enzimatik yöntemler kullanılarak ölçülmüştür.

### **3.3.7. İstatistiksel Analiz**

Bu tez çalışmasında LDL kolesterolü 130 mg/dl'den düşük ve yüksek değerlere sahip olmak üzere iki ayrı grup miRNA-148a ifade düzeyinin LDL kolesterol seviyesi üzerine etkisinin araştırılması için oluşturuldu. Bu iki grubun miRNA-148a ifade düzeylerinin ve lipid seviyelerinin ortalamalarının kıyaslanması için ikili bağımsız örneklem student t testi ve ifade düzeylerinin total kolesterol, trigliserit, VLDL, HDL ve LDL seviyeleri arasındaki korelasyonların belirlenmesi için uygulanan iki değişkenli Pearson korelasyon testi lisanslı SPSS 25.0 paket programında uygulanmıştır. Ayrıca gruplara ait demografik veri analizi için de aynı programdaki ikili bağımsız örneklem student t testi, ki-kare, pearson ve fisher exact testleri kullanılmıştır.

Ayrıca iki grup arasındaki miRNA-148a ifade düzeyleri Alıcı İşletim Karakteristiği (Receiver Operating Characteristic=ROC) analiziyle de incelenmiş olup bu analiz lisanslı MedCalc paket programıyla yapılmıştır.

İstatistiksel anlamlılık  $p < 0,05$  olarak belirlenmiş olup  $p$  değerinin 0,05'den küçük olduğu durumlar istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

## 4. BULGULAR

### 4.1. Çalışmaya Ait Demografik Veriler

Bu tez çalışmasına gönüllü olarak katılmış bireylere ait demografik veriler tablo 4.1.-1’de özetlenmiştir.

**Tablo 4.1.-1:** LDL 130 mg/dl Üstü ve LDL 130 mg/dl Altı (Kontrol) Gruplarına Ait Demografik Veriler

Grup		LDL<130 mg/dl (Kontrol) (n=45)	LDL > 130 mg/dl (n=45)	p değeri
Cinsiyet ( E / K )		% 71,1 / % 28,9 (n=32) / (n=13)	% 60 / % 30 (n=27) / (n=18)	0,055
Yaş (Yıl)		56,47±14,459	61,33±12,008	0,086
Vücut Kitle İndeksi (VKİ) (kg/m <sup>2</sup> )		28,5767±5,62237	27,8422±4,36233	0,491
Vücut Yüzey Alanı (VYA) (m <sup>2</sup> )		1,9127±0,18944	1,8549±0,16671	0,128
Sigara	kullanan	% 48,9 (n=22)	% 37,8 (n=17)	0,288
	kullanmayan	% 51,1 (n=23)	% 62,2 (n=28)	
Diabet	var	% 35,6 (n=16)	% 24,4 (n=11)	0,250
	yok	% 64,4 (n=29)	% 75,6 (n=34)	
KoAH	var	% 8,9 (n=4)	% 11,1 (n=5)	0,725
	yok	% 91,1 (n=41)	% 88,9 (n=40)	
Kolesterol İlacı	var	% 24,4 (n=11)	% 11,1 (n=5)	0,098
	yok	% 75,6 (n=34)	% 88,9 (n=40)	

n=örnek sayısı, ± SD (Ortalama±Standart Sapma), E/K =Erkek / Kadın

\* Gruplar arası farklılık ileri ki-kare testi (X<sup>2</sup>), ikili bağımsız örneklem student t-testi ile incelenmiştir.

Yukarıda verilmiş olan tablo incelendiğinde iki grubun demografik verilerinde istatistiksel olarak bir anlamlılık görülmemiş olup grupların demografik özelliklerinin birbirlerine oldukça yakın olduğu görülmektedir. Her iki grubun cinsiyet dağılımı

(p=0,055); yaş (p= 0,086), vücut kitle indeksi (p= 0,491), vücut yüzey alanı (p=0,128) ortalamaları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar görülmemektedir. Bu bilgilerin haricinde her iki grubun sigara kullanma oranı (p=0,288), diyabet tanısı (p=0,250), KoAH tanısı (p=0,725) ve kolesterol ilacı kullanma oranında da (p=0,098) istatistiksel olarak anlamlılığa sahip herhangi bir farklılık gözlenmemiştir (Tablo 4.1.-1).

**Tablo 4.1.-2.** Lipit Değerleri Ortalamalarının LDL 130 mg/dl Üstü ve LDL 130 mg/dl Altı (Kontrol) Grupları Arasında Kıyaslanması

	LDL 130 mg/dl üstü (n=45)	LDL 130 mg/dl altı (n=45)	p değeri	%95 Güven Aralığı
<b>Toplam Kolesterol</b>	232,33±31,292	159,40±38,781	<b>0,000*</b>	58,171 - 87,696
<b>Trigliserit</b>	184,04±81,294	129,60±83,680	<b>0,002*</b>	19,882 - 89,007
<b>VLDL</b>	36,53±15,690	26,22±16,653	<b>0,003*</b>	3,533 - 17,089
<b>HDL</b>	40,60±7,337	40,40±12,540	0,927	-4,104 - 4,504

n=örnek sayısı, ± SD (Ortalama ± Standart Sapma)

\* Gruplar arası farklılık ikili bağımsız örneklem student t-testi ile incelenmiştir.

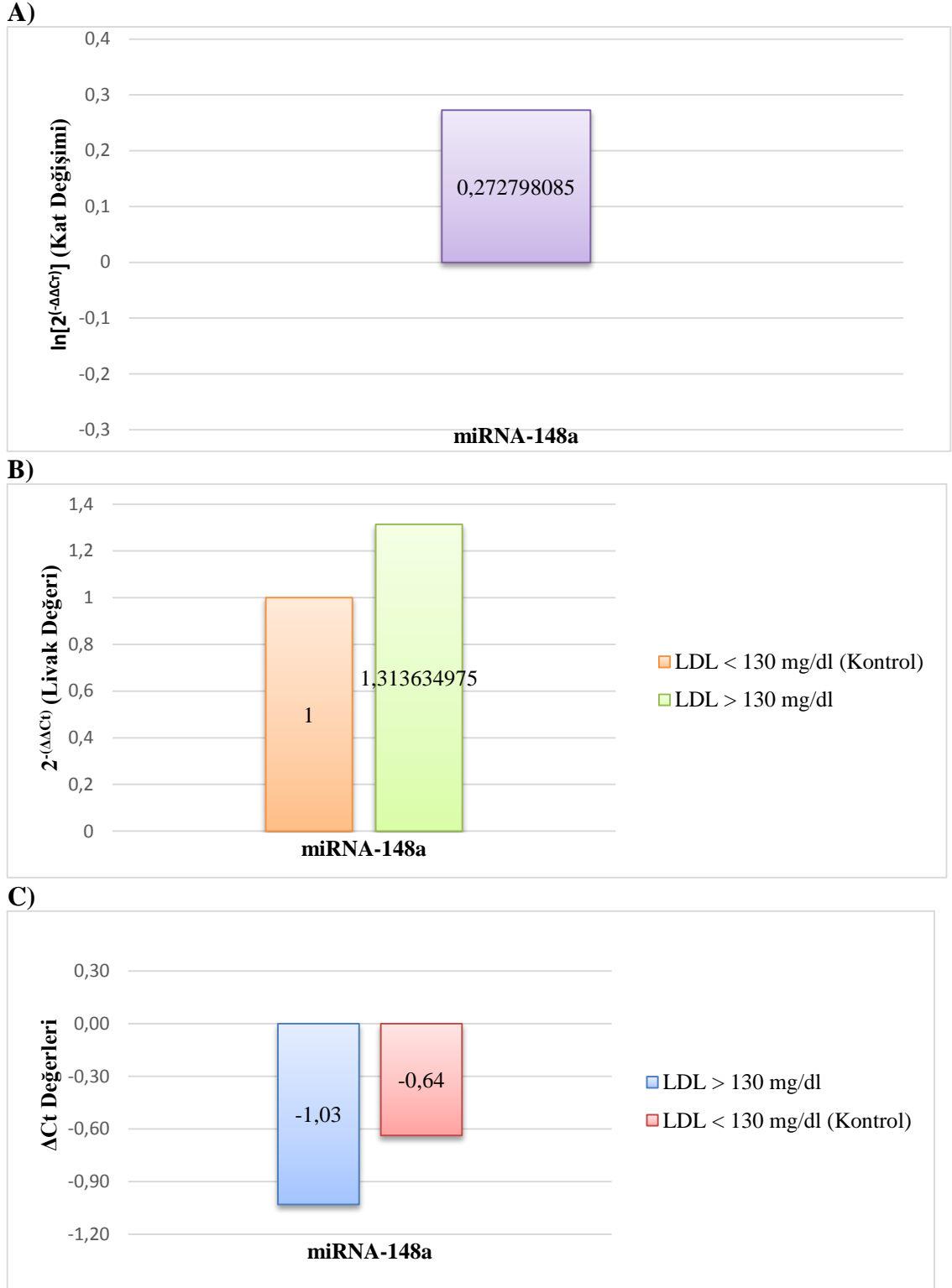
Tablo 4.1.-1.'de gösterilmiş demografik veriler haricinde bu tez çalışmasında oluşturulmuş iki grubun lipit değerleri ortalamaları da incelenmiştir. Tablo 4.1.-2.'de görüldüğü gibi iki gruba ait toplam kolesterol, trigliserit, VLDL değer ortalamalarında istatistiksel olarak anlamlı fark görülmektedir (p=0,000\*, p=0,002\*, p=0,003\*). LDL değeri 130 mg/dl olan gruba ait toplam kolesterol, trigliserit, VLDL ortalamaları anlamlı derecede yüksektir. Bununla birlikte HDL değer ortalamaları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemektedir (p=0,927).

#### 4.2. Çalışma Gruplarına Ait miRNA-148a İfade Düzeyi Sonuçları

miRNA ifade düzeyi tespit etme çalışmasının sonucunda elde edilen Cycle Threshold (C<sub>T</sub>) değerleri örneklerdeki miRNA'ların hangi döngüde ifade edildiğini belirtir. Döngüye daha geç giren miRNA'ların C<sub>T</sub> değerleri daha yüksek olur, miktarı daha az olur. İnternal kontrol olan SNORD68'in ve bu tez çalışmasında incelenen miRNA-148a'nın C<sub>T</sub> değerleri birbirlerinden çıkartılarak ΔC<sub>T</sub> değeri hesaplanmıştır (104,

105).  $\Delta C_T$  de kontrol olarak kabul ettiğimiz LDL seviyesi 130 mg/dl'nin altında olan bireylerin ve patolojik olarak kabul ettiğimiz LDL seviyesi 130 mg/dl'nin üstünde olan bireylerin miRNA-148a ifade düzeylerini kıyaslamamıza olanak tanımakla birlikte yeterli değildir. Bu sebeple Livak formülü (102) kullanılarak ( $2^{-(\Delta\Delta C_T)}$ ) kontrol (LDL 130 mg/dl altı) grubunun miRNA-148a değerleri 1'e çekilerek referans oluşturulmuş olup patolojik olan grupla kıyaslanmanın daha kolay yapılması hedeflenmiştir. Aradaki farkı daha iyi anlayabilmek adına  $\ln(2^{-(\Delta\Delta C_T)})$  formülüyle kat değişimi hesaplanmış olup kontrol (LDL 130 mg/dl altı) grubunun miRNA-148a değerleri 0'a çekilerek referans oluşturulmuştur.

miRNA-148a ifade düzeyleri tüm kontrol ile kıyaslandığında elde edilen kat değişimi ( $\ln[2^{-(\Delta\Delta C_T)}]$ ) sonuçlarına göre miRNA-148a ifade düzeylerinin 130 mg/dl'nin üstündeki grupta 0,28 kat arttığı tespit edilmiştir. Livak değerine ( $2^{-(\Delta\Delta C_T)}$ ) (102) göre değerlendirildiğinde miRNA-148a ifade düzeylerinin LDL kolesterol seviyesinin 130 mg/dl'nin üstündeki grupta ise 1,31 kat arttığı tespit edilmiştir. miRNA-148a ifade düzeyleri internal kontrol (SNORD68) ile kıyaslandığında elde edilen  $\Delta C_T$  sonuçlarına göre miRNA-148a'nın LDL kolesterol seviyesinin; 130 mg/dl'nin altındaki (kontrol) grupta 0,64 kat, 130 mg/dl'nin üstündeki grupta ise 1,03 kat azaldığı tespit edilmiştir (Şekil 4.2.-1).



**Şekil 4.2.-1 miRNA-148a Analizleri.** (A):Real Time PCR ile belirlenen plazma miRNA-148a seviyelerinin kat değişim ( $\ln[2^{(-\Delta\Delta C_t)}]$ ) dağılım grafiği kontrol (sıfır) kat değerine göre çizilmiştir, (B)  $2^{(-\Delta\Delta C_t)}$  değerlerinin dağılım grafiği kontrol (1) kat değerine göre çizilmiştir, (C):  $\Delta C_t$  değerleri dağılım grafiği kontrol (sıfır) değerine göre çizilmiştir.

Tüm hesaplamaların sonucunda çizilen grafiklere bakıldığında (Şekil 4.2.-1) LDL seviyesi 130 mg/dl'den yüksek olduğu grubun kontrol olarak kabul edilen gruba kıyasla miRNA-148a ekspresyon düzeylerinin daha fazla olduğu görülmekle birlikte ifade düzeyi ortalamalarının kıyaslanması için yapılan ikili bağımsız örneklem student t testi uygulandığında herhangi bir istatistiksel anlamlılık görülmemiştir [ $C_T$  ( $p=0,397$ );  $\Delta C_T$  ( $p=0,442$ );  $2^{-(\Delta\Delta C_T)}$  ( $p=0,368$ );  $\ln(2^{-(\Delta\Delta C_T)})$  ( $p=0,442$ )] (Tablo 4.2.-1).

**Tablo 4.2.-1.** miRNA-148a İfade Düzeylerinin Ortalamalarının LDL 130 mg/dl Üstü ve Altı Grupları Arasında Kıyaslanması

	LDL 130 mg/dl üstü (n=45)	LDL 130 mg/dl altı (n=45)	p değeri	%95 Güven Aralığı
mir148a_Ct	29,77±1,94	29,25±3,54	0,397	-0,68280 - 1,70738
mir148a_ ΔCT	-1,03±1,84	-0,64±2,89	0,442	-1,40895 - 0,62006
mir148a_Livak değeri [ $2^{-(\Delta\Delta C_T)}$ ]	3,11±5,87	8,67±40,87	0,443	-17,79677 - 6,66610
mir148a_Kat değişimi [ $\ln(2^{-(\Delta\Delta C_T)})$ ]	0,27±1,28	0,00±2,00	0,368	-0,43009 - 0,97676

n=örnek sayısı, ± SD (Ortalama±Standart Sapma)

\* Gruplar arası farklılık ikili bağımsız örneklem student t-testi ile incelenmiştir.

### 4.3. miRNA-148a İfade Düzeylerinin Lipid Seviyeleriyle Korelasyon Analizleri

Bu çalışmadaki iki grubun miRNA-148a ifade düzeylerinin ortalamaları arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmadığından daha detaylı inceleme yapılmasına karar verildi. Bu amaçla iki grubun  $C_T$ ,  $\Delta C_T$ ,  $2^{-(\Delta\Delta C_T)}$  (Livak) ve  $\ln(2^{-(\Delta\Delta C_T)})$  (kat değişimi) değerleri ile total kolesterol, trigliserit, VLDL, HDL ve LDL düzeyleri arasındaki korelasyonları iki grup için ayrı ayrı incelendi.

Lipit metabolizmasında görev alan tüm moleküller metabolizma gereği birbirlerinden ayrı düşünülmesi mümkün değildir. Bu sebeple tüm lipid değerleriyle miRNA-148a ifade düzeyleri arasındaki ilişki incelendi.

**Tablo 4.3.-1:** LDL Seviyesi 130 mg/dl'den Düşük Olan Gruba ait  $C_T$  ,  $\Delta C_T$ ,  $2^{-(\Delta\Delta C_T)}$  (Livak) ve  $\ln(2^{-(\Delta\Delta C_T)})$  (kat değişimi) Değerleri ile Total Kolesterol, Trigliserit, VLDL, HDL ve LDL Düzeyleri Arasındaki Korelasyonlar

		Kolesterol	Trigliserit	LDL	HDL	VLDL
<b>mir148a_Ct</b>	Pearson Korelasyonu	0,060	0,017	-0,280	0,257	-0,006
	p değeri	0,693	0,912	0,063	0,088	0,967
	n	45	45	45	45	45
<b>mir148a_ <math>\Delta C_T</math></b>	Pearson Korelasyonu	0,092	0,016	-0,180	<b>0,304</b>	-0,020
	p değeri	0,549	0,917	0,237	<b>0,043*</b>	0,895
	n	45	45	45	<b>45</b>	45
<b>mir148a_Livak değeri</b> <b>[<math>2^{-(\Delta\Delta C_T)}</math>]</b>	Pearson Korelasyonu	0,080	0,022	0,231	-0,190	0,029
	p değeri	0,603	0,885	0,127	0,210	0,848
	n	45	45	45	45	45
<b>mir148a_Kat değişimi</b> <b>[<math>\ln(2^{-(\Delta\Delta C_T)})</math>]</b>	Pearson Korelasyonu	-0,091	-0,016	0,180	<b>-0,303</b>	0,020
	p değeri	0,550	0,918	0,236	<b>0,043*</b>	0,894
	n	45	45	45	<b>45</b>	45

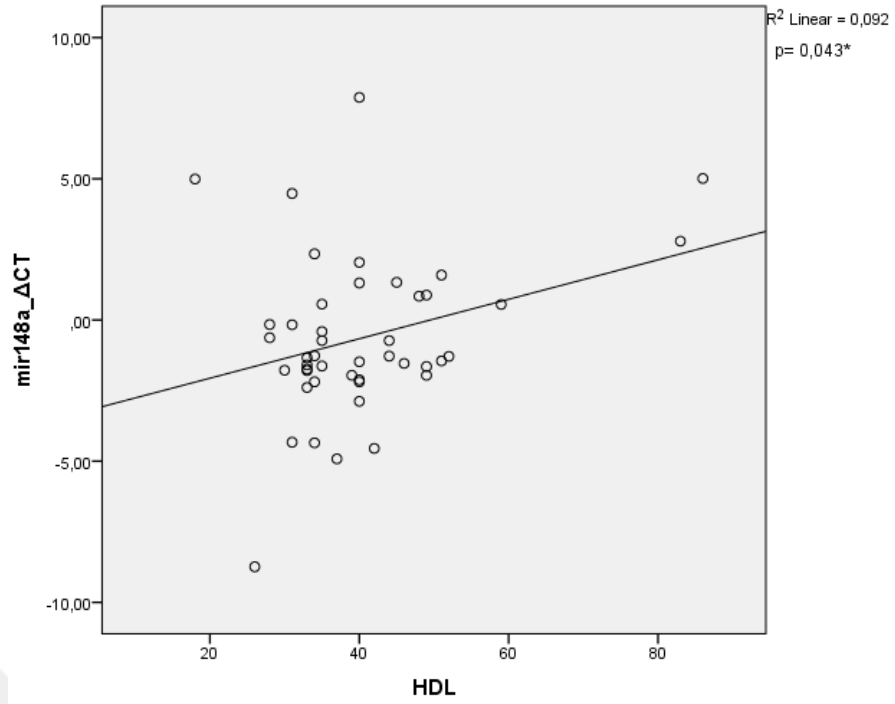
\* Pearson korelasyonu; iki değer arasındaki korelasyonun pozitif veya negatif olduğunu göstermektedir.

İstatistiksel olarak anlamlılık gösteren korelasyonların p değeri kalın yazılarak belirtilmiştir. (p<0,05)

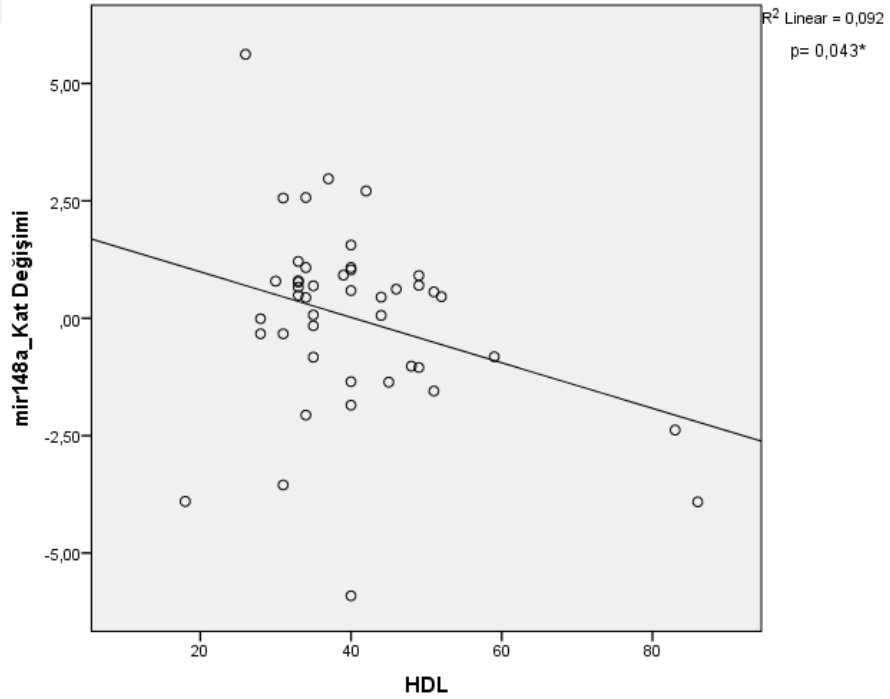
n= İncelenen gruptaki örnek sayısı

Her bir örnek için  $\Delta C_T$  değeri incelenen miRNA-148a'nın  $C_T$  değerinden internal kontrol olan SNORD68'in  $C_T$  değerinin çıkartılmasıyla hesaplanmıştır. Böylelikle miRNA-148a'nın internal kontrolden olan farkı bulunmuş ve internal kontrole göre nasıl bir değişikliğe sahip olduğu tespit edilmiştir.  $\Delta C_T$  de tıpkı  $C_T$  değeri gibi ifade düzeyini gösteren matematiksel bir değerdir.

Tablo 4.3.-1 incelendiğinde; LDL seviyesi 130 mg/dl'den düşük olan grupta miRNA-148a  $\Delta C_T$  değeri ile HDL kolesterol seviyeleri arasında istatistiksel olarak anlamlı, çok güçlü olmayan pozitif korelasyon görülmektedir (p=**0,043\***). Ayrıca miRNA-148a'nın ifade düzeyini gösteren kat değişimi [ $\ln(2^{-(\Delta\Delta C_T)})$ ] ile HDL kolesterol seviyeleri arasında istatistiksel olarak anlamlı, çok güçlü olmayan negatif korelasyon görülmektedir (p=**0,043\***).



**Şekil 4.3.-1:** LDL Kolesterol Seviyesi 130 mg/dl'nin Altında Olan Grupta miRNA-148a'ya ait  $\Delta C_T$  Değeri ile HDL Kolesterol Seviyeleri Arasındaki Korelasyon Analizi.



**Şekil 4.3.-2:** LDL Kolesterol Seviyesi 130 mg/dl'nin Altında Olan Grupta miRNA-148a'ya ait Kat Değişimi [ $\ln(2^{-(\Delta\Delta C_T)})$ ] Değeri ile HDL Kolesterol Seviyeleri Arasındaki Korelasyon Analizi.



Şekil 4.3.-1 ve şekil 4.3.-2'in gösterdiği korelasyonlar değerlendirildiğinde iki korelasyon da aynı durumu ifade etmektedir. Şekil 4.3.-1'de belirtilmiş  $\Delta C_T$  değerleri miRNA-148a ifade düzeyiyle ters orantılıdır.  $\Delta C_T$ 'nin artması ifade düzeyinin azaldığını belirtir. Bunun yanı sıra şekil 4.3.-2'de gösterilmiş kat değişimi değerleri ise miRNA-148a ifade düzeyinin daha kolay kıyaslanması için hesaplanmış bir değer olup kat değişimi değerleriyle miRNA-148a ifade düzeyleri ise doğru orantılıdır.

Şekil 4.3.-1'deki korelasyonda  $\Delta C_T$  değerleri ile HDL kolesterol seviyeleri pozitif korelasyona sahiptir. Bu korelasyona göre  $\Delta C_T$  değeri arttığında HDL kolesterol seviyelerinin de arttığı görülmektedir. Ancak  $\Delta C_T$  ile miRNA-148a ifade düzeyleri ters orantılıdır. Bu durumda  $\Delta C_T$ 'nin artması miRNA-148a ekspresyon düzeyinin az olduğunu göstermektedir.

Sonuç olarak miRNA-148a ifade düzeylerinin artmasının HDL kolesterol seviyelerini düşürdüğü anlaşılmaktadır.

Kat değişimi ifade düzeyi farklılıklarının daha kolay yorumlanmasını sağlayan matematiksel bir ifadedir. Örneğin; kat değişimi değerlerinin artması miRNA ifade düzeylerinin de arttığını gösterir. Şekil 4.3.-2 incelendiğinde de miRNA-148a'ya ait kat değişimleri ile HDL kolesterol seviyeleri arasında negatif korelasyon görülmektedir. Bu korelasyon öncekini destekler niteliktedir. Buna göre kat değişimi yani miRNA-148a ifade düzeyi arttıkça HDL kolesterol seviyeleri azalmaktadır.

Her iki sonuç da değerlendirildiğinde LDL kolesterol seviyeleri 130 mg/dl'nin altında olan (kontrol) grupta miRNA-148a ifade düzeyi ile HDL kolesterol seviyeleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir sonuç bulunmuştur. Bu sonuca göre miRNA-148a ifade düzeyi ile HDL kolesterol seviyeleri ters orantılıdır. Yani miRNA-148a'nın ifade düzeyi arttıkça HDL kolesterol seviyesi azalmaktadır.

Ancak bu tez çalışmasının esas amacı olan miRNA-148a ifade düzeyleri ile LDL kolesterol seviyeleri arasındaki korelasyonlar incelendiğinde istatistiksel olarak anlamlı herhangi bir sonuca ulaşamamıştır.

**Tablo 4.3.-2:** LDL Seviyesi 130 mg/dl'den Yüksek Gruba ait CT ,  $\Delta$ CT,  $2^{-(\Delta\Delta CT)}$  (Livak) ve  $\ln[2^{-(\Delta\Delta CT)}]$  (kat değişimi) Değerleri ile Total Kolesterol, Trigliserit, VLDL, HDL ve LDL Düzeyleri Arasındaki Korelasyonlar

		Kolesterol	Trigliserit	LDL	HDL	VLDL
<b>mir148a_Ct</b>	Pearson Korelasyonu	-0,197	-0,233	-0,197	-0,184	-0,173
	p değeri	0,195	0,124	0,195	0,227	0,257
	n	45	45	45	45	45
<b>mir148a_ <math>\Delta</math>CT</b>	Pearson Korelasyonu	-0,031	-0,195	-0,047	-0,148	-0,213
	p değeri	0,840	0,198	0,761	0,331	0,160
	n	45	45	45	45	45
<b>mir148a_ <math>2^{-(\Delta\Delta CT)}</math> (Livak değeri)</b>	Pearson Korelasyonu	-0,145	0,099	-0,043	0,120	0,158
	p değeri	0,343	0,518	0,778	0,433	0,300
	n	45	45	45	45	45
<b>mir148a_ <math>\ln(2^{-(\Delta\Delta CT)})</math> (Kat değişimi)</b>	Pearson Korelasyonu	0,030	0,195	0,046	0,148	0,213
	p değeri	0,844	0,199	0,766	0,330	0,160
	n	45	45	45	45	45

\* Pearson korelasyonu; iki değer arasındaki korelasyonun pozitif veya negatif olduğunu göstermektedir.

İstatistiksel olarak anlamlılık gösteren korelasyonların p değeri kalın yazılarak belirtilmiştir. (p<0,05)

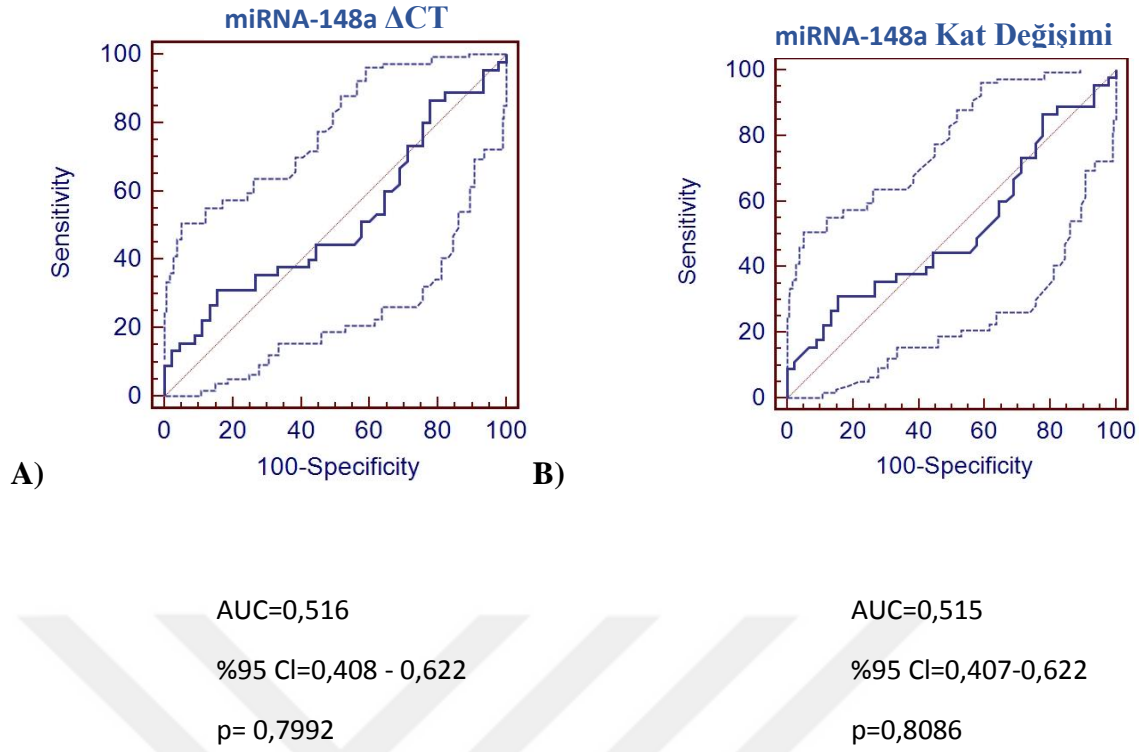
n= İncelenen gruptaki örnek sayısı

Tablo 4.3.-2 incelendiğinde; LDL seviyesi 130 mg/dl'den yüksek olan grupta miRNA-148a ifade düzeyi ile kolesterol, trigliserit, LDL, HDL ve VLDL değerleri arasında istatistiksel olarak herhangi bir anlamlı korelasyona ulaşılamamıştır.

#### 4.4. miRNA-148a İfade Düzeylerinin ROC Analizleri

miRNA-148a seviyelerinin her iki grupta tanı değerini sahip saptamak için MedCalc Programı kullanılarak Alıcı İşletim Karakteristiği (Receiver Operating Characteristic=ROC) analizi yapılmıştır.

Şekil 4.4.-1 değerlendirildiğinde miRNA-148a ifade düzeylerinin LDL açısından patolojik durum teşkil edebileceğine dair herhangi bir eşik değer tespit edilemediği görülmektedir.  $\Delta$ CT değerlerine göre AUC=0,516 olarak belirlenmiştir (p=0,7992). Kat değişimi değerlerine göre ise miRNA-148a AUC=0,515 olarak saptanmıştır (p=0,8086).



**Şekil 4.4.-1: miRNA-148a Seviyesinin LDL 130 mg/dl Üstü ve LDL 130 mg/dl Altı Gruplarına göre ROC Analizi. A)  $\Delta$ C<sub>T</sub> değerlerine göre miRNA-148a seviyesinin analizleri. B) Kat değişimine [ $\ln(2^{-\Delta\Delta C_T})$ ] göre miRNA-148a seviyesinin analizleri.**

## 5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Ülkemizde de yaygın görülen koroner arter hastalığı hem hayat kalitesini düşürmekte hem de kalp nedenli ölümlerin başında bulunmaktadır. 1990 - 2014 yılları arasındaki Türkiye'de Erişkinlerde Kalp Hastalığı ve Risk Faktörleri Sıklığı Taraması'na (TEKHARF) göre erkeklerde koroner arter hastalığı riski binde 5,95'den binde 7'ye yükselmiştir. Kadınlar da ise bu oran binde 3,9'dan binde 3,8'e gerilemiştir (2, 3).

Ateroskleroz yağ içeren moleküllerin, kolesterol artıklarının, kalsiyum vb. birtakım elementlerin arterde birikmesiyle oluşan plakların oluşumu nedeniyle görülmektedir. Aterosklerozun en tehlikeli aşaması arterin yaralanmasıdır. Arter hasarlandığı zaman tromboz tetiklenir ve trombositler hasarı onarmak için arterde birikmeye başlarlar. Ancak bu birikim arterin daralmasına ve bu nedenle kan akışının engellenmesine neden olur (106). Kandaki fazla LDL kaynaklı oluşan köpük hücreleri de trombositler gibi hasarlı damarda birikmeye başlar ve arterin daralmasına neden olurlar (4). Kan akışının normal hızda gerçekleşmemesi miyokard enfaktüsü ya da iskemilere neden olabilir (106).

Ateroskleroz koroner arter hastalığının başlıca nedeni olmakla birlikte tek nedeni değildir. Aynı zamanda diyabet, hipertansiyon, dislipidemi ve sigara kullanımı da koroner arter hastalığının nedenleri arasındadır (107).

Kolesterol, aterosklerozun oluşum mekanizmasında anahtar rol oynayan moleküldür (108). Aşırı artmış trigliserit ve LDL seviyeleri ile azalmış HDL seviyelerinin ateroskleroza bu sebeple de koroner arter hastalığına neden olduğu bilinmektedir (109). Hücrel kolesterol miktarı SREBP'ler ve endoplazmik retikulum tarafından transkripsiyonel olarak kontrol edilir. Hücrede kolesterol miktarı düşük olduğunda SREBP'ler işlenmek üzere golgiye iletilirler. Böylelikle aktif hale geçerek HMG-KoA redüktaz ve LDLR transkripsiyonunu aktive ederler. HMG-KoA redüktazın aktivasyonu ile *de novo* kolesterol sentezi ve LDLR'nin aktivasyonu ile hücre içine LDL alımı aktive edilmiş olur. Ancak yüksek kolesterol miktarı durumunda ise SREBP'ler sentezlenirken endoplazmik retikuluma gidemezler ve hedef genleri olan HMG-KoA redüktaz ve LDLR aktive edilemez bu sebeple kolesterol alımı ve sentezi engellenmiş olur (108). Hücrel kolesterol miktarını aynı zamanda LXR de kontrol eder. LXR, LDLR'nin indüklenabilir de grede edici molekülü (Idol) olarak adlandırılan bir ubiquitin ligazın transkripsiyonunu aktive ederek LDLR'nin sitoplazmik domaininin

ubikuinasyonunu tetikler. Bu mekanizmanın sonucunda LDLR degrede olur. Sonuç olarak hücreye kolesterol alınması engellenmiş olur (45).

miRNA'lar yaklaşık 21-25 nükleotidden oluşan kodlama yapmayan (52) tek zincirli nükleotid yapılarıdır. Bilinen biyolojik fonksiyonları hedefleri olan mRNA'larla etkileşip onların ekspresyonunu baskılamaktır (53).

Memeli gelişimi süresince kalp dokusunda ifade edildiği bilinen miRNA-1-1 kardiyomiyosit progenitör proliferasyonunun engellenmesinden sorumludur. Bu işlemi de HAND2 geninin translasyonunun engellemeyle gerçekleştirir (110).

Sadece kalp dokusunda ifade edilen miRNA'lar ateroskleroz ve koroner arter hastalığına neden olmaz. Bunun dışında serum ve plazmada, trombositlerde, makrofajlarda, endotel ve vasküler düz kas hücrelerinde yani ateroskleroz oluşumunda görev alan yapılarda ve aterosklerozun olduğu yapılardaki miRNA'lar oluşum mekanizmasını tetiklemekte veya engellemektedir (111).

Sadece ateroskleroz ile ilişkili miRNA'ları incelemek patofizyolojiyi anlamak adına eksik kalacaktır. Aynı zamanda ateroskleroza neden olan moleküllerin sentez ve/veya yıkımından sorumlu metabolik yolların da incelenmesi ateroskleroz patofizyolojisinin daha güçlü analiz edilmesine yardımcı olacaktır.

Xu ve arkadaşlarının 2003 (112) yılında *Drosophila melanogaster* ile yaptıkları çalışma miRNA'ların lipit metabolizmasını da etkilediğini göstermektedir. Bu çalışmada miRNA-14'ün olmadığı durumda toplam trigliserit seviyesini iki katına çıkarttığı ancak aynı miRNA'nın birden çok sayıda kopyasının olmasının herhangi bir değişime neden olmadığı tespit edilmiştir.

Bilindiği üzere serum HDL seviyelerinin düşük, LDL seviyelerinin ise yüksek olması ateroskleroz ve dolayısıyla koroner arter hastalığıyla ilişkilidir. Dolayısıyla ateroskleroz için önem arz eden bu moleküllerin anabolizma ve katabolizmalarında etkili olabilecek miRNA'ların ifade düzeylerinin bu moleküllerle kıyaslanması ateroskleroz oluşumunun incelenmesi, anlaşılması ve ileriki çalışmalarla desteklenerek buna çözüm bulunması adına önemlidir.

Son 10 yıldır yapılan çalışmalar değerlendirildiğinde çeşitli miRNA'ların kolesterol biyosentez ve trafiğinde önemli görevlere sahip olduğu görülmektedir. Bu

miRNA'lar karaciğerde görev almakla birlikte çeşitli dokularda da görev almaktadırlar. Örneğin; miRNA-122 ve miRNA-185 hepatositlerde kolesterol sentezinde görev alırken, miRNA-130b, miRNA-33a/b, miRNA-144 HDL kolesterol seviyelerini etkilemektedir (7).

Goedeke ve arkadaşlarının 2015 (94) yılında yaptığı çalışmaya göre miRNA-148a LDL ve HDL metabolizmasına etki eden miRNA'lardan biridir. Bu çalışmada Goedeke ve arkadaşları öncelikle biyoinformatik analizlerle insan hepatik hücrelerinde yoğun olarak bulunan miRNA'ları tespit etmişlerdir. İnsan hepatik hücre kültürleriyle (Huh7) yaptıkları çalışmada kültür ortamına konulacak LDL moleküllerini 3,3'-dioktadesil-3,3,3''-tetrametil-indokarbosiyanin (DiI) ile işaretlemişlerdir. Bu işaretleme sayesinde Huh7'lerce alınacak LDL moleküllerini kolaylıkla tespit etmişlerdir. Biyoinformatik analizlerle tespit ettikleri miRNA'lar ile DiI-LDL'leri Huh7'lerle 8 saat inkübe etmişlerdir. Kandaki LDL kolesterol seviyelerini düşürmeyi hedefledikleri için çalışmada LDL alımını arttıracak veya azaltacak miRNA'lar üzerine yoğunlaşmayı tercih etmişlerdir. Yapılan hücre kültürlerinin sonucunda anlamlılık arz eden 5 miRNA tespit etmişlerdir. İnsan ve fare hepatik hücrelerinde miRNA-148a'nın fazla ifade edildiğini ve yüksek karaciğer aktivitesine neden olduğunu tespit etmişlerdir. Çalışma ekibi aynı zamanda yüksek yağ içerikli diyetle beslenen fare ve Rhesus maymunlarında miRNA-148a ifade düzeyinin arttığını tespit etmiştir.

miRNA-148a'nın ifade düzeyinin karaciğerde fazla olduğunu ve LDL alımıyla ilgili olduğunu tespit ettikten sonra LDLR'yi nasıl etkilediğini göstermeyi amaçlamışlardır. Huh7 hücreleriyle yaptıkları kültür çalışmalarında miRNA-148a'nın LDLR'nin 3' UTR bölgesine bağlanarak bu reseptörü kontrol ettiğini saptamışlardır. Huh7 hücreleri miRNA-148a ile transfekte edildiğinde LDLR'ye ait mRNA'ların ve proteinlerin azaldığı tespit edilmiştir. Yukarıda elde edilen sonuca aynı deney başka bir insan hepatik hücre hattı (HepG2) kullanılarak uygulandığında da ulaşılmıştır (94).

miRNA-148a ile transfekte edilen Huh7 hücrelerinin LDL alım kapasitesi de incelendiğinde hücrel kolesterol seviyelerinin kontrole kıyasla daha az olduğu saptanmıştır. Bu sonuç miRNA-148a'nın LDL alımından sorumlu LDLR reseptörünü inhibe ettiğini göstermektedir (94).

Ayrıca araştırmacılar miRNA-148a'nın LDLR'yi nasıl etkilediğinin yanı sıra miRNA-148a transkripsiyonunun düzenlenme mekanizmasını araştırmışlardır. miRNA-148a'nın transkripsiyonunun düzenlenme mekanizmasının anlaşılması da miRNA-148a ifade düzeyinin nasıl kontrol edileceğinin anlaşılmasına ışık tutacaktır.

Goedeke ve arkadaşlarının (94) ulaştığı sonuçlara göre miRNA-148a ifade düzeyi SREBP1c tarafından kontrol edilmektedir. Araştırmacıların yaptığı hücre kültürü çalışmalarında Huh7 hücreleri nSREBP1c (nükleer SREBP1c) barındıran bir vektörle transfekte edilmektedir. Transfeksiyon işlemi yapılmayan kültürle kıyaslandığında nSREBP1c vektörü içeren Huh7 hücrelerinde nSREBP1c ifade düzeyi artacaktır. Buna bağlı olarak da miRNA-148a'nın hem prekürsör hem de olgun formlarının hücrede arttığı tespit edilmiştir.

miRNA-148a ifade düzeyinin plazma lipit değerlerinde nasıl değişikliğe sebep olduğunu anlamak için araştırmacılar miRNA-148a'nın LNA formunu geliştirerek hücredeki miRNA-148a'ları inhibe etmişlerdir. Bu işlemin sonucunda hepatik miRNA-148a'nın azaldığına ve buna bağlı olarak hepatik LDLR düzeyinin arttığına ulaşmışlardır. Hepatik LDLR düzeyinin artması ise karaciğere alınacak LDL kolesterolün artacağını yani serumdaki LDL kolesterol seviyesinin düşeceğini göstermektedir (94).

Aynı çalışmada miRNA-148a'nın inhibe edilmesinin HDL kolesterol seviyelerini de yükselttiği tespit edilmiştir. Bu sonuç değerlendirildiğinde miRNA-148a'nın HDL kolesterol seviyelerinin azalmasına ve böylelikle kalp hastalıkları için risk teşkil ettiği anlaşılmaktadır. miRNA-148a HDL seviyelerini hepatik ABCA1 ifade düzeyini etkileyerek düzenlemektedir. Aynı çalışmada miRNA-148a'nın fazla ifade edilmesi ABCA1 protein ve mRNA'larının azalmasına ve inhibe edilmesi ise ABCA1 protein ve mRNA'larının artmasına neden olduğu tespit edilmiştir (94).

Wagschal ve arkadaşlarının 2015 (113) yılında yaptıkları çalışma da Goedeke ve arkadaşlarınınkini destekler niteliktedir. Wagschal ve arkadaşları bu çalışmalarında ApoE'den yoksun fareler üretmişlerdir. ApoE proteinlerinin ApoB-100 proteinlerine göre karaciğerdeki LDL reseptörlerine olan afinitesi çok daha yüksektir (25). Bu bilgi değerlendirildiğinde normal koşullarda bu farelerde düşük HDL ve yüksek LDL seviyesi beklenmektedir. ApoE yoksunluğuna rağmen araştırmada farelerdeki miRNA-148a inhibe edildiğinde hepatik LDLR seviyesinin arttığı buna bağlı olarak hepatik LDL

seviyelerinin arttığı ve sirküle olan LDL seviyelerinin düştüğü görülmüştür. Ayrıca miRNA-148a'nın inhibisyonu hepatik ABCA1 proteinlerinin de artmasına sebep olmuştur. Buna bağlı olarak da sirküle olan HDL kolesterol seviyelerinin de arttığı görülmüştür (113).

miRNA-148a'nın lipid metabolizmasına olan etkisi ile ilgili en güncel yayını yayımlayan Cheng ve arkadaşları ise çalışmalarında knock-out yöntemiyle miRNA-148a genini genomlarından çıkarttıkları fareleri kullanmışlardır. Çalışmanın amacı miRNA-148a'nın hem hepatokarsinomaya hem de lipid metabolizmasına olan etkisini araştırmaktır. Çalışmanın sonucunda araştırmacılar miRNA-148a'nın delesyona uğradığı farelerde serumdaki ve karaciğerdeki toplam kolesterol ve trigliserit seviyelerinin yabanıl tip farelere kıyasla daha fazla olduğunu tespit etmişlerdir. Buna bağlı olarak da yabanıl tip farelere kıyasla delesyona uğrayan farelerde karaciğer yağlanması görülmüştür. Ancak araştırmada LDL ve HDL seviyelerine dair bilgi sunulmamış olup miRNA-148a'nın delesyonunun kolesterol biyosentezini arttırdığı belirtilmiştir (114).

Bu tez çalışmasında yukarıdaki çalışmalar değerlendirildiğinde miRNA-148a ifade düzeyinin sirküle olan LDL kolesterol miktarına olan etkisinin araştırılması amaçlanmıştır. Bu amaç doğrultusunda LDL kolesterol seviyesi 130 mg/dl'nin üstünde ve altında değere sahip olmak üzere 45'er kişiden oluşan iki grup oluşturulmuştur. İki grubun demografik verileri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılığa ulaşılamamıştır (Tablo 4.1.-1).

İki gruba ait miRNA-148a ifade düzeylerini belirten  $\Delta C_T$  değerleri internal kontrol olan SNORD68 ile incelediğimiz miRNA-148a'nın  $C_T$  değerleri arasındaki fark;  $\Delta C_T = [(C_T(\text{miRNA-148a})) - (C_T(\text{SNORD68}))]$  bulunarak hesaplanmıştır (104, 105). İki grup arasındaki miRNA-148a ifade düzeyleri arasındaki farkın daha iyi anlaşılması adına  $\Delta \Delta C_T$  değeri kullanılarak Livak formülü ( $2^{-(\Delta \Delta C_T)}$ ) ile ifade düzeyi hesaplaması yapılmıştır. Elde edilen değerlerin ln tabanında logaritmasının alınması kat değişimi değerini vermektedir (102). Kat değişimi hesabıyla kontrol (LDL 130 mg/dl'nin altında) grubu 0'a indirgenilerek referans olarak alınmakla birlikte patolojik olan gruba ait ifade düzeyi miktarları daha belirgin bir şekilde ifade edilmiştir. Bu çalışmada daha iyi anlaşılması adına ifade düzeyi farklılıkları hem  $\Delta C_T$  hem de kat değişim değerleri ile incelenmiştir.



miRNA-148a ifade düzeyleri tüm kontrol ile karşılaştırıldığında elde edilen kat değişimi ( $\ln[2^{-(\Delta\Delta C_T)}]$ ) sonuçlarına göre miRNA-148a ifade düzeylerinin 130 mg/dl'nin üstündeki grupta 0,28 kat arttığı gözlenmiştir. Livak değerine ( $2^{-(\Delta\Delta C_t)}$ ) (102) göre değerlendirildiğinde miRNA-148a ifade düzeylerinin LDL kolesterol seviyesinin 130 mg/dl'nin üstündeki grupta ise 1,31 kat arttığı tespit edilmiştir. miRNA-148a ifade düzeyleri internal kontrol (SNORD68) ile kıyaslandığında elde edilen  $\Delta C_T$  sonuçlarına göre miRNA-148a'nın LDL kolesterol seviyesinin; 130 mg/dl'nin altındaki (kontrol) grupta 0,64 kat, 130 mg/dl'nin üstündeki grupta ise 1,03 kat azaldığı tespit edilmiştir. (Şekil 4.2.-1) Ancak yapılan ikili bağımsız örneklem student t testi sonuçlarına göre LDL'si 130 mg/dl üstünde ve altında olan iki grup arasındaki miRNA-148a ifade düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir sonuç görülmemektedir. [ $C_T$  (p=0,397);  $\Delta C_T$  (p=0,442);  $2^{-(\Delta\Delta C_T)}$  (p=0,368);  $\ln(2^{-(\Delta\Delta C_T)})$  (p=0,442)]

İki grubun miRNA-148a ifade düzeyleri arasında herhangi bir anlamlılık bulunmamakla birlikte miRNA-148a ifade düzeyi ile total kolesterol, trigliserit, VLDL, HDL ve LDL arasındaki korelasyonlar iki değişkenli korelasyon testiyle incelenmiştir. Araştırmamızdaki iki grup ayrı ayrı incelenmiştir. Sadece LDL kolesterol seviyesi 130 mg/dl'nin altında olan grupta miRNA-148a ifade düzeyi ile HDL kolesterol seviyesi arasında istatistiksel olarak anlamlı bir korelasyon bulunmuş olup buna göre miRNA-148a ifade düzeyi ile HDL seviyesi arasında çok güçlü olmayan negatif bir korelasyon bulunmaktadır (p=0,043\*).

Goedeke ve arkadaşlarının 2015 (94) yılında yaptığı çalışmanın sonuçları ile bu tez çalışmasının HDL ile ilgili sonuçları uyum göstermektedir. Goedeke ve arkadaşlarının çalışması insan hepatik hücrelerinin hücre kültürü çalışması olup karaciğerdeki miRNA-148a ve sirküle eden HDL kolesterolü arasındaki ilişkidir. Ancak bu tez çalışmasında sirküle etmekte olan miRNA-148a ifade düzeyi ile sirküle eden HDL kolesterol ilişkilendirilmiştir. Bu sebeple bu tez çalışması özgün bir çalışma olup literatüre yeni bilgiler katmaktadır.

miRNA'lar dokuya özgü olabilmekle birlikte insan vücudunda sirküle eden yapılardır (110). Bu sebeple miRNA ifade düzeylerinin birçok hastalık ya da metabolizma bozukluğuna neden olduğu bilinmekle birlikte bu hastalık ve metabolik bozuklukların göstergesi olabileceği düşünülmektedir (59, 61). Ancak bir miRNA'nın biyobelirteç

olduğuna karar verebilmek için ilgili metabolizma ve hastalıkta insanlarda etkin olduğunun kesin bilinmesi gerekmektedir.

miRNA-148a'nın LDL seviyesi ile ilgili biyobelirteç olup olamayacağını anlayabilmek adına lisanslı MedCalc paket programıyla Alıcı İşletim Karakteristiği (Receiver Operating Characteristic=ROC) analizi yapılmıştır. Bu tez çalışmasında analizin sonuçlarında istatistiksel olarak herhangi bir anlamlılığa ulaşılamadığından ( $\Delta C_T$  için;  $p=0,7992$ , kat değişimi için;  $p=0,8086$ ). miRNA-148a'nın insanda LDL seviyesi için biyobelirteç olabileceğini söyleyemeyiz.

Goedeke ve arkadaşlarının (94) yaptığı çalışmada da miRNA-148a'nın inhibisyonunun LDL seviyelerini düşürdüğü belirtilmekle birlikte hücredeki diğer yolakları nasıl etkilediğinin tespit edilmediği belirtilmiştir.

Bir miRNA'nın terapötik olarak avantajlı olması için miRNA'nın tek bir hedefinin olması gerekmektedir. Birden fazla hedef olması durumda beklenmedik metabolik bozukluklar veya hastalıklar oluşabilir. Bununla birlikte eğer bir miRNA terapötik olarak kullanılacaksa hangi yolakları etkilediği kesin olarak bilinmelidir (106).

Ateroskleroz için düşünülecek olursa; anti-miRNA-148a'nın miRNA-148a'nın aksine hepatik LDLR seviyesini arttırması bu nedenle karaciğere alınan LDL miktarının artmasına bağlı olarak sirküle olan LDL seviyesini azaltması nedeniyle birlikte ABCA1 seviyesini de arttırarak sirküle eden ve aterosklerozda koruyucu olduğu bilinen HDL miktarını arttırması (94, 113) anti-miRNA-148a'nın terapötik gücünü arttırmaktadır. Ancak miRNA-148a ile ilgili literatür bilgisinin kısıtlı olması ve miRNA-148a'nın kanser patofizyolojisinde (88 - 92) de etkili olması anti-miRNA-148a'nın terapötik ajan olma niteliğini azaltmaktadır. Cheng ve arkadaşlarının yaptığı çalışmanın sonuçları da değerlendirildiğinde miRNA-148a'nın inhibe edilmesi toplam kolesterol ve trigliserit seviyelerini arttırdığı ve karaciğer yağlanmasına neden olması (114) sebebiyle miRNA-148a'nın terapötik ajan olabilme kapasitesinin düştüğu görölmektedir.

Sonuç olarak elde ettiğimiz sonuçlara göre miRNA-148a'nın LDL seviyesi için kesin bir biyobelirteç olması söz konusu olmamakla birlikte terapötik ajan olarak kullanılması açısından da daha kapsamlı ve daha çok örnek içeren çalışmaların yapılması gerekmektedir.

## 6. KAYNAKLAR

- 1) Küçükberber N, Özdiilli K, Yorulmaz H. Kalp hastalarında sağlıklı yaşam biçimi davranışları ve yaşam kalitesine etki eden faktörlerin değerlendirilmesi. *Anadolu Kardiyol. Derg.* 2011; 11: 619-26.
- 2) Onat A, Karabulut A, Esen AM, et al. TEKHARF Çalışması 2005 taramasına ilişkin mortalite ve koroner olay analizi. *Türk Kardiyol. Dern. Arfl. – Arch. Turk Soc. Cardiol.* 2006;34(3):149-153.
- 3) Onat A, Karakoyun S, Akbaş T, et al. TEKHARF 2014 taraması ve Türkiye’de coğrafi bölgelere göre ölüm oranı ile koroner hastalık insidansı. *Türk Kardiyol. Dern. Arş. – Arch. Turk. Soc. Cardiol.* 2015;43(4):326–332.
- 4) Isbir T, ed. *Advances in Lipoprotein Research*. Intech: USA; 2017. p.4-23. ISBN 978-953-51-3048-2, Print ISBN 978-953-51-3047-5, Published under CC BY 3.0 license.
- 5) Mahley RW, Pepin GM, Bersot TP, Palaoğlu KE, Özert K. Türk Kalp Çalışması'nda Yeni Sonuçlar: Plazma Lipidleri ve Yüksek Yoğunluklu Lipoprotein Düzeyleri Düşüklüğünde Tedavi İçin Rehber Öneriler. *Türk Kardiyol. Dem. Arş.* 2002;30:93-103.
- 6) Hammond SM. An overview of microRNAs. *Adv. Drug. Deliv. Rev.* 2015; 29(87):3–14.
- 7) Giral H, Kratzer A, Landmesser U. MicroRNAs in lipid metabolism and atherosclerosis. *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* 2016;30(5):665-676.
- 8) Aryal B, Singh AK, Rotllan N, Price N, Fernández-Hernando C. MicroRNAs and lipid metabolism. *Curr. Opin. Lipidol.* 2017;28:000–000. Doi:10.1097/MOL.0000000000000420.
- 9) <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=miRNA-148a>
- 10) Vickers KC, Remaley AT. MicroRNAs in Atherosclerosis and Lipoprotein Metabolism. *Curr. Opin. Endocrinol. Diabetes Obes.* 2010; 17(2): 150–155.
- 11) Mahley RW. *Aterogenezin Hücresel ve Moleküler Biyolojisi*. O Gökdemir, KE Palaoğlu, editors. Merck&Co. Inc.: New Jersey, USA; 1993; 33-36.
- 12) Nelson DL, Cox MM. *Lehninger Principles of Biochemistry*, 3. Baskı, Worth Publishers, Madison-Wisconsin. 2000. Çeviren: Kılıç N. Lehninger Biyokimyanın İlkeleri, Üçüncü Baskıdan Çeviri, Ankara: Palme Yayınları; 2005. p.799-803.

- 13) Adam B, Yiğitoğlu R. *Tıbbi Biyokimya Ders Kitabı*. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri; 2012. p.186,198-200.
- 14) Goldstein JL, Brown MS. The LDL Receptor and the Regulation of Cellular Cholesterol Metabolism. *J. Cell Sci. Suppl.* 1985; 131-137.
- 15) Beaumont JL, Carlson LA, Cooper GR, FEJFAR Z, Fredrickson DS, Strasser T. Classification Of Hyperlipidaemias And Hyperlipoproteinaemias. *Bull World Health Organ.* 1970;43(6):891–915.
- 16) Grundy SM. Cholesterol Metabolism in Man. *West. J. Med.* 1978; 128: 13-25.
- 17) Rodwell VW, Bender DA, Botham KM, Kennelly PJ, Weil PA. *Harpers Illustrated Biochemistry*. New York: The McGraw-Hill Education; 2015. p.253-265.
- 18) Brown MS, Kovanen PT, Goldstein JL. Regulation of plasma cholesterol by lipoprotein receptors. *Science.* 1981;212:628-635.
- 19) Ramasamy I. Recent advances in physiological lipoprotein metabolism. *Clin. Chem. Lab. Med.* 2014;52(12):1695–1727.
- 20) Mahley RW, Innerarity TL, Rall SC, Weisgraber KH. Plasma lipoproteins: apoprotein structure and function. *J. Lipid Res.* 1984;25:1277-1294.
- 21) Segrest JP, Jones MK, De Loof H, Dashti N. Structure of apolipoprotein B-100 in low density lipoprotein. *J. Lipid Res.* 2001;42:1346-1367.
- 22) Grundy SM. Role of low-density lipoproteins in atherogenesis and development of coronary heart disease. *Clin. Chem.* 1995;41(1):139-146.
- 23) Reardon, MF, and Steiner G. *The use of kinetics in investigating the metabolism of very low and intermediate density lipoproteins. In Lipoprotein Kinetics and Modeling.* M. Berman, S. M. Grundy, and B V. Howard, editors. Academic Press, New York. 1982; 99-10.
- 24) Have1 RJ. The formation of LDL: mechanisms and regulation. *J. Lipid Res.* 1984;25:1570-1576.
- 25) Brown MS, Goldstein JL. How LDL receptors Influence Cholesterol and Atherosclerosis. *Sci. Am.* 1984;58-66.
- 26) Goldstein JL, Brown MS. The low-density lipoprotein pathway and its relation to atherosclerosis. *Ann. Rev. Biochem.* 1977;46:897-930.
- 27) Anderson RGW, Brown MS, Goldstein JL. Role of the coated endocytic vesicle in the uptake of receptor-bound low density lipoprotein in human fibroblasts. *Cell.* 1977;10:351– 64.

- 28) Goldstein JL, Brown MS. The LDL receptor. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2009;29:431-438.
- 29) Goldstein JL, Brown MS. Atherosclerosis: The low-density lipoprotein receptor hypothesis. *Metabolism.* 1977;26(11):1257-1275.
- 30) Fielding CJ, Fielding RE. Intracellular Cholesterol Transport. *J. Lipid Res.* 1997;38:1503-1521.
- 31) Brown MS, Goldstein JL. Receptor-mediated endocytosis: Insights from the lipoprotein receptor system. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1979;76(7):3330-3337.
- 32) Brown MS, Anderson RGW, Goldstein JL. Recycling receptors: The round-trip itinerary of migrant membrane proteins. *Cell.* 1983; 32:663–667.
- 33) Francke U, Brown MS, Goldstein JL. Assignment of the human gene for the low density lipoprotein receptor to chromosome 19: Synteny of a receptor, a ligand, and a genetic disease. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1984;81:2826-2830.
- 34) <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/3949>
- 35) Shepherd J, Packard CJ. Lipoprotein receptors and atherosclerosis. *Clinical Science.* 1986;70:1-6.
- 36) Gent J, Braakman I. Low-density lipoprotein receptor structure and folding, *Cell. Mol. Life Sci.* 2004; 61:2461–2470.
- 37) <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/pdb/1IJQ>
- 38) Glomset JA. The plasma lecithin:cholesterol acyltransferase reaction. *J. Lipid Res.* 1968;9:155-167.
- 39) Fielding CJ, Fielding RE. Molecular physiology of reverse cholesterol transport. *J. Lipid. Res.* 1995;36:211-228.
- 40) Hames D, Hooper N. *Biochemistry.* Third Edition. Taylor & Francis Group. 2005; 358-359.
- 41) Brown MS, Goldstein JL. Lipoprotein Receptors in the Liver. *J. Clin. Invest.* 1983;72:743-747.
- 42) Brown MS, Goldstein JL. The SREBP Pathway: Regulation of Cholesterol Metabolism by Proteolysis of a Membrane-Bound Transcription Factor. *Cell.* 1997;89:331-340.
- 43) Yokoyama C, Wang X, Briggs MR, Admon A, Wu J, Hua X, Goldstein JL, Brown MS. SREBP-1, a Basic-Helix-Loop-Helix-Leucine Zipper Protein That Controls Transcription of the Low Density Lipoprotein Receptor Gene. *Cell.* 1993;75:187-197.

- 44) Calkin AC, Tontonoz P. Transcriptional integration of metabolism by the nuclear sterol-activated receptors LXR and FXR. *Nature Reviews*. 2012;13:213-224.
- 45) Zelcer N, Hong C, Boyadjian R, Tontonoz P. LXR Regulates Cholesterol Uptake Through Idol-Dependent Ubiquitination of the LDL Receptor. *Science*. 2009;325:100-104. (E)
- 46) Kim VN. Small RNA's: Classification, Biogenesis, and Function. *Mol. Cells*. 2005;28;19(1):1-15.
- 47) Fritz JV, Heintz-Buschart A, Ghosal A. Sources of functions of extracellular small RNAs in human circulation. *Annu. Rev. Nutr.* 2016; 36: 301–336.
- 48) Carthew RW, Sontheimer EJ. Origins and Mechanisms of miRNAs and siRNAs. *Cell*. 2009;136(4):642–655.
- 49) Marz M, Gruber AR, zu Siederdisen CH, et al. Animal snoRNAs and scaRNAs with exceptional structures. *RNA Biology*. 2011;8:6,938-946.
- 50) Chakraborty SK, Prakash A, Nechooshtan G, Hearn S, Gingeras TR. Extracellular vesicle-mediated transfer of proceed and functional RNY5 RNA. *RNA*. 2015;21:1966–1979.
- 51) Yarmishyn AA, Kurochkin IV. Long noncoding RNAs: a potential novel class of cancer biomarkers. *Frontiers in Genetics*. 2015;6(145).
- 52) Almeida MI, Reis RM, Calina GA. MicroRNA history: Discovery, recent applications, and next frontiers. *Mutation Research*. 2011;717:1– 8.
- 53) Grosshans H, Slack FJ. Micro-RNAs: small is plentiful. *The Journal of Cell Biology*. 2002;156(1):17-21.
- 54) Shivdasani RA. MicroRNAs: regulators of gene expression and cell differentiation. *Blood*. 2006;108(12):3646-3653.
- 55) Moss EG. MicroRNAs: Hidden in the Genome. *Current Biology*. 2002;12:R138–R140.
- 56) Alvarez-Garcia I, Miska EA. MicroRNA functions in animal development and human disease. *Development*. 2005;132(21): 4653-4662.
- 57) Hwang HV, Mendell JT. MicroRNAs in cell proliferation, cell death, and tumorigenesis. *British Journal of Cancer*. 2006;94:776 – 780.
- 58) Dalmay T. MicroRNAs and cancer. *J. Intern. Med*. 2008;263(4):366-75.
- 59) Vienberg S, Geiger J, Madsen S, Dalgaard LT. MicroRNAs in metabolism. *Acta. Physiol*. 2017;219:346–361.

- 60) Barringhaus KG, Zamore PD. MicroRNAs: Regulating a Change of Heart. *Circulation*. 2009;119:2217-2224.
- 61) Etheridge A, Lee I, Hood L, Galas D, Wang K. Extracellular microRNA: a new source of biomarkers. *Mutat Res*. 2011;717(1-2): 85–90.
- 62) Romaine SPR, Tomaszewski T, Condorelli G, Samani NJ. MicroRNAs in cardiovascular disease: an introduction for clinicians. *Heart*. 2015;101:921–928.
- 63) Pan Z, Lu Y, Yang B. MicroRNAs: a novel class of potential therapeutic targets for cardiovascular diseases. *Acta Pharmacologica Sinica*. 2010;31:1–9.
- 64) Redis RS, Berindan-Neagoe I, Pop VI, Calin GA. Non-coding RNAs as Theranostics in Human Cancer. *J. Cell Biochem*. 2012;113(5):1451-9.
- 65) Bartel DP. MicroRNAs: Genomics, Biogenesis, Mechanism, and Function. *Cell*. 2004;116,281–297.
- 66) Hitit M, Kurar E, Güzeloğlu A. MikroRNA Biyogenezi. *Atatürk Üniversitesi Vet. Bil. Derg*. 2015;10(3):211-218.
- 67) Han J, Lee Y, Yeom KH, Kim YK, Jin H, Kim VN. The Drosha-DGCR complex in primary microRNA processing. *Genes Dev*. 2004;15;18(24):3016–3027.
- 68) Gregory RI, Shiekhata R. MicroRNA biogenesis and cancer. *Cancer Res*. 2005;65(9):3509-3512.
- 69) Yi R, Qin Y, Macara IG, Cullen BR. Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs. *Genes. Dev*. 2003;17(24): 3011–3016.
- 70) Romero-Cordoba SL, Salido-Guadarrama I, Rodriguez-Dorantes M, Hidalgo-Miranda A. miRNA biogenesis: Biological impact in the development of cancer. *Cancer Biol. Ther*. 2014;15(11):1444-55.
- 71) Kong Y, Han JH. microRNA: Biological and Computational Perspective. *Genomics Proteomics Bioinformatics*. 2005;3(2):62-72.
- 72) Krol J, Krzyzosiak WJ. Structural Aspects of MicroRNA Biogenesis. *IUBMB Life*. 2004;56(2):95-100.
- 73) Chendrimada TP, Gregory RI, Kumaraswamy E, et al. TRBP recruits the Dicer complex to Ago2 for microRNA processing and gene silencing. *Nature*. 2005;4;436(7051):740–744.
- 74) Hutvagner G. Small RNA asymmetry in RNAi: Function in RISC assembly and gene regulation. *FEBS Letters*. 2005;579:5850–5857.

- 75) Aravin AA, Lagos-Quintana M, Yalcin A, Zavolan M, et al. The Small RNA Profile during *Drosophila melanogaster* Development. *Developmental Cell*. 2003;5:337–350.
- 76) Iwakawa H, Tomari Y. The functions of MicroRNAs: mRNA Decay and Translational Repression. *Trends in Cell Biology*. 2015;25(11):651-665.
- 77) Bartel DP. MicroRNAs: Target Recognition and Regulatory Functions. *Cell*. 2009; 136: 215-233
- 78) Tao X, Gao G. Tristetraprolin Recruits Eukaryotic Initiation Factor 4E2 To Repress Translation of AU-Rich Element-Containing mRNAs. *Molecular and Cellular Biology*. 2015;35(22):3921-3932.
- 79) Huntzinger E, Kuzuoğlu-Öztürk D, Braun JE, Eulalio A, Wohlbald L, Izaurralde E. The interactions of GW182 proteins with PABP and deadenylases are required for both translational repression and degradation of miRNA targets. *Nucleic Acids Research*. 2013;41(2): 978–994.
- 80) Hoy AM, Buck AH. Extracellular small RNAs: what, where, why?. *Biochem. Soc. Trans*. 2012;40(4):886-90.
- 81) Gibbins DJ, Ciaudo C, Erhardt M, Voinnet O. Multivesicular bodies associate with components of miRNA effector complexes and modulate miRNA activity. *Nature Cell Biology*. 2009;11:1143–1149.
- 82) Merkerova M, Vasikova A, Belickova M, Bruchova H. MicroRNA expression profiles in umbilical cord blood cell lineages. *Stem Cells Dev*. 2010;19(1):17-26.
- 83) Chen Y, Song YX, Wang ZN. The MicroRNA-148/152 Family: Multi-faceted Players. *Molecular Cancer*. 2013;12:43.
- 84) [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene?term=\(mir148a\[gene\]\)%20AND%20\(Homo%20sapiens\[orgn\]\)%20AND%20alive\[prop\]%20NOT%20newentry\[gene\]&sort=weight](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene?term=(mir148a[gene])%20AND%20(Homo%20sapiens[orgn])%20AND%20alive[prop]%20NOT%20newentry[gene]&sort=weight)
- 85) Cheng P, Chen C, He HB, et al. miR-148a Regulates Osteoclastogenesis by Targeting V-maf Musculoaponeurotic Fibrosarcoma Oncogene Homolog B. *J. Bone Miner. Res*. 2013;28(5):1180-90.
- 86) Zhang J, Ying ZZ, Tang ZL, Long LQ, Li K. MicroRNA-148a Promotes Myogenic Differentiation by Targeting the ROCK1 Gene. *J. Biol. Chem*. 2012;15;287(25):21093-101.



- 87) Kozłowska E, Krzyżosiak WJ, Koscińska E. Regulation of Huntingtin Gene Expression by miRNA-137, -214, -148a, and Their Respective isomiRs. *Int. J. Mol. Sci.* 2013;14:16999-17016.
- 88) Kulkarni S, Qi Y, O'Uigin C, et al. Genetic interplay between HLA-C and MIR148A in HIV control and Crohn disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2013;17;110(51):20705-10.
- 89) Li L, Chen YY, Li SQ, Huang C, Qin YZ. Expression of miR-148/152 Family as Potential Biomarkers in Non-Small-Cell Lung Cancer. *Med Sci Monit.* 2015;21:1155-1161.
- 90) Huang MX. Down- expression of circulating micro ribonucleic acid (miRNA)- 148/152 family in plasma samples of non- small cell lung cancer patients. *J. Cancer Res. Ther.* 2016;12(2):671-5.
- 91) Bellissimo T, Russo E, Ganci F, et al. Circulating miR-21-5p and miR-148a-3p as emerging non-invasive biomarkers in thymic epithelial tumors. *Cancer Biol. Ther.* 2016;17(1):79-82.
- 92) Baltruskeviciene E, Schveigert D, Stankevicius V, et al. Down-regulation of miRNA-148a and miRNA-625-3p in colorectal cancer is associated with tumor budding. *BMC Cancer.* 2017;17:607.
- 93) Willer CJ, Schmidt EM, Sengupta S, et al. Discovery and Refinement of Loci Associated with Lipid Levels. *Nat. Genet.* 2013;45(11):1274-1283.
- 94) Goedeke L, Rotllan N, Canfrán-Duque A, et al. MicroRNA-148a regulates LDL receptor and ABCA1 expression to control circulating lipoprotein levels. *Nat. Med.* 2015;21(11): 1280-1289.
- 95) Goedeke L, Wagschal A, Fernández-Hernando C, Näär AM. miRNA regulation of LDL-cholesterol metabolism. *Biochim. Biophys. Acta.* 2016;1861(12 Pt B):2047-2052.
- 96) Laffont B, Rayner KJ. MicroRNAs in the Pathobiology and Therapy of Atherosclerosis. *Can. J. Cardiol.* 2017;33(3):313-324.
- 97) Mahley RW, Palaoğlu KE, Atak Z, Dawson-Pepin J, Langlois AM, Cheung V, Onat H, Fulks P, Mahley LL, Vakar F. Turkish Heart Study: lipids, lipoproteins, and apolipoproteins. *J. Lipid Res.* 1995; 36(4):839-59.
- 98) [https://www.tkd.org.tr/lipit-calisma-grubu/sayfa/toplum\\_icin\\_bilgiler](https://www.tkd.org.tr/lipit-calisma-grubu/sayfa/toplum_icin_bilgiler)
- 99) Page K, Guttery DS, Zahra N, et al. Influence of plasma processing on recovery and analysis of circulating nucleic acids. *Plos One*, 2013; 8(10):e77963.

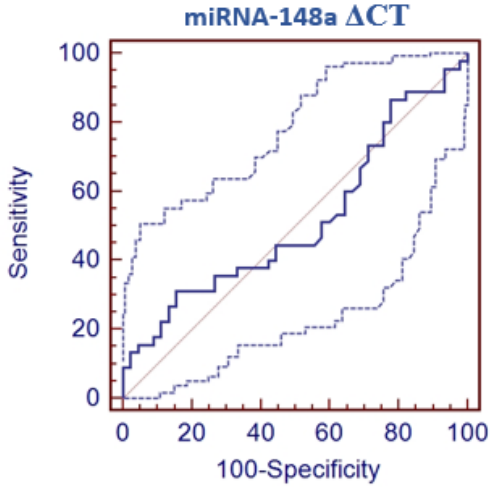
- 100) Li X, Wu Y, Zhang L, Cao Y, Li Y, Li J, Zhu L, Wu G. Comparison of three common DNA concentration measurement methods. *Anal Biochem.* 2014; 451:18-24.
- 101) Li X, Ben-Dov IZ, Mauro M, Williams Z. Lowering the quantification limit of the Qubit™ RNA HS assay using RNA spike-in. *BMC Mol Biol.* 2015;6:16-19.
- 102) Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{(-\Delta\Delta CT)}$  Method. *Methods*, 2001;25(4):402-408.
- 103) Moret I, Sánchez-Izquierdo D, Iborra M, Tortosa L, Navarro-Puche A, Nos P, Cervera J, Beltrán B. Assessing an improved protocol for plasma microRNA extraction. *Plos One*, 2013; 8(12): e82753.
- 104) Karakas M, Schulte C, Appelbaum S, et al. Circulating microRNAs strongly predict cardiovascular death in patients with coronary artery disease- results from the large AtheroGene study. *Eur. Heart J.* 2017;14;38(7):516-523.
- 105) Sun X, Zhang M, Sanagawa A, Mori C, Ito S, Iwaki S, Satoh H, Fujii S. Circulating microRNA-126 in patients with coronary artery disease: correlation with LDL cholesterol. *Thrombosis Journal.* 2012;10:16.
- 106) Jamaluddin MS, Weakley SM, Zhang L, et al. miRNAs: roles and clinical applications in vascular disease. *Expert. Rev. Mol. Diagn.* 2011;11(1):79–89.
- 107) Nishiguchi T, Imanishi T, Akasaka T. MicroRNAs and cardiovascular diseases. *Biomed Res. Int.* 2015;2015:682857.
- 108) Madrigal-Matute J, Rotllan N, Aranda JF, Fernández-Hernando C. MicroRNAs and atherosclerosis. *Curr. Atheroscler. Rep.* 2013;15(5):322.
- 109) Genetics of Triglycerides and the Risk of Atherosclerosis
- 110) Latronico MVG, Catalucci D, Condorelli G. Emerging Role of MicroRNAs in Cardiovascular Biology. *Circulation Research.* 2007;101:1225-1236.
- 111) Raitoharju E, Oksala N, Lehtimäki T. MicroRNAs in the Atherosclerotic Plaque. *Clinical Chemistry.* 2013;59(12):1708-1721.
- 112) Krützfeldt J, Stoffel M. MicroRNAs: A new class of regulatory genes affecting metabolism. *Cell Metab.* 2006;4(1):9-12.
- 113) Wagschal A, Najafi-Shoushtari SH, Wang L, et al. Genome-wide identification of microRNAs regulating cholesterol and triglyceride homeostasis. *Nat. Med.* 2015;21(11):1290-1297.

114) Cheng L, Zhu Y, Han H, et al. MicroRNA-148a deficiency promotes hepatic lipid metabolism and hepatocarcinogenesis in mice. *Cell Death and Disease*. 2017;8:e2916.



## HAM VERİLER

### ROC Analizleri $\Delta C_T$ ve Kat Değişimi

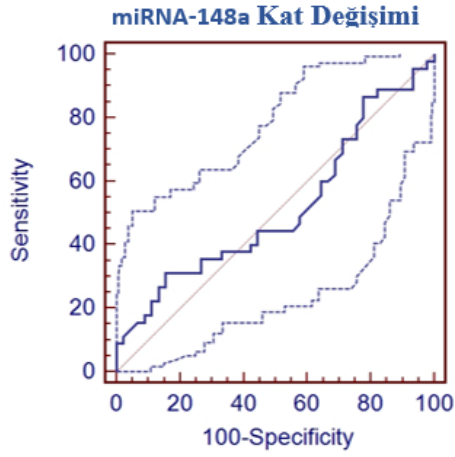


Variable	Delta_Ct Delta Ct
Classification variable	Diagnosis

Positive group	
Diagnosis	= 1
Sample size	45
Negative group	
Diagnosis	= 0
Sample size	45

Disease prevalence (%)	unknown
------------------------	---------

Area under the ROC curve (AUC)	0,516
Standard Error	0,0612
95% Confidence Interval	0,408 to 0,622
z statistic	0,254
Significance level P (Area=0.5)	0,7992



Variable	Ln
Classification variable	Diagnosis

Positive group	
Diagnosis	= 1
Sample size	45
Negative group	
Diagnosis	= 0
Sample size	45

Disease prevalence (%)	unknown
------------------------	---------

Area under the ROC curve (AUC)	0,515
Standard Error	0,0612
95% Confidence Interval	0,407 to 0,622
z statistic	0,242
Significance level P (Area=0.5)	0,8086

## FORMLAR

	YEDİTEPE ÜNİVERSİTESİ OLGU RAPOR FORMU
--	---

1. ÇALIŞMANI ADI: **mikroRNA-148a İfade Düzeyinin LDL Kolesterol 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 O<sub>2</sub><%95) gelişti mi ?

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

Yan etkiler:

- Bulantı / Kusma / Hahusinasyon / 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 CO <sub>2</sub>	O <sub>2</sub> Sat (%)
Geliş				
0. dk				
5. dk				
10.dk				
30.dk				
60.dk				
90.dk				
120.dk				

**KLİNİK ARAŞTIRMALARDA KULLANILACAK BİYOLOJİK MATERYAL  
TRANSFER ANLAŞMASI**

**Araştırmanın Açık adı : mikroRNA-148a İfade Düzeyinin LDL Kolesterol Seviyesi  
Üzerine Etkisinin Araştırılması**

Protokol Numarası :  
Araştırmanın Özeti :

Kolesterol plazma zarında bulunan yapasal bir bileşen olup hücre büyümesi ve hayati için esansiyel bir steroldür. D vitamini, safra asitleri ve steroid hormonların öncül maddesidir. Karaciğerde de novo olarak sentezlenmiş lipidler VLDL olarak salınır ve yağ asitleri dokulara aktarılır. Ardından oluşan yapı (LDL kalınır) lipoprotein lipaz (LPL) enzimi tarafından ara deneysel lipoproteinlere (LDL) ve düşük deneysel lipoproteinlere (LDL) dönüşürler. LDL'ler plazmadaki trigliseridlerin ve kolesterolün %70'ini dokulara taşıyan lipoproteinlerdir.

mRNA'lar yaklaşık 22 nükleotitten oluşan ve 1983'te keşfedilen RNA-kaynaklı sessizleştirme kompleksine (RNA-induced silencing complex (RISC)) etkileşerek ve mRNA'nın kendisine karışık gelecek dizisine (genellikle 3' UTR bölgesine) transkripsiyon sonrası bağlanarak gen ekspresyonunu düzenleyen tek zincirli RNA'larıdır. Biyolojik proliferasyon, apoptoz, epig metilasyonu, glukoz homeostazi gibi birçok biyolojik süreç etkilenir. Çeşitli mikroRNA'ların karaciğer ve/veya plakardaki lipoprotein metabolizmasında önemli rol oynayan genlerin ifadesini kontrol ettiği tespit edilmiştir.

mRNA-148a karaciğer, yağ dokusu ve makrofajlar gibi inflamatuvar hücrelerde fazlaca ifade edilen ve insanda 7. kromozomda kodlanan intergenik bir miRNA'dır. mRNA-148a'nın in vivo ve in vitro koşullarında bir sterol düzenleyici element ve bağışan proteinin (SREBP-1) aktivasyonu ile aktive edildiği tespit edilmiştir. SREBP-1 karaciğerdeki X reseptör proteinini (LXR) için transkripsiyonel hedef olup LXR aktivasyonu mRNA-148a seviyesini artırır. Aktive olan mRNA-148a yüksek hücrelerde ve fare karaciğerinde LDL'nin hücre içine alınmasını sağlayan LDL reseptör (LDLR) proteinini ilgili bilgiyi taşıyan mRNA'nın 3' UTR bölgesine bağlanarak LDLR aktivitesini sağlar. Bu durumda LDL alımı kontrol edilir. Yapılan çalışmalarda miRNA-148a'nın ifadesindeki artışın LDLR aktivitesini negatif düzenlediği ve plazmadaki LDL kolesterol miktarını artırdığı belirtilmiştir.

Bu bilime tezinde TargetScan (targetscan.org), miRanda (microrna.org) ve miRBase (miRBase.org) veritabanları aracılığıyla yapılan biyoinformatik çalışmalar ve literatürdeki bilgiler ışığında mRNA-148a ifade düzeyinin insan LDL kolesterol seviyesi üzerine etkisinin diğer miRNA'lara kıyasla daha fazla olduğu tespit edilmiş olup mRNA-148a ifade düzeyinin LDL kolesterol seviyesi üzerine etkisinin araştırılması amaçlanmıştır.

İşbu anlaşma ile biyolojik materyali gönderen araştırmacı ve kurum "mikroRNA-148a ifade düzeyinin LDL kolesterol seviyesi üzerine etkisinin araştırılması" isimli çalışmada kullanılmak üzere gönderilecek "İmri ve araştırma" amacı ile kullanılmasına üzerine 26 Ağustos Yeditepe Üniversitesi Yeditepe Üniversitesi Kayışdağı / İSTANBUL adresindeki Yeditepe Üniversitesi Moleküler Tıp Anabilim Dalı'ndaki merkezine göndermeden önce GÖNDERİCİ ve ALICI'dan aşağıdaki koşulları kabul etmesi istenmektedir.

1. Gönderilen biyolojik materyaller yalnızca yukarıda yazılı amaç için kullanılabilir. ALICI biyolojik materyallerin bilimsel amaçlardan dışında hiçbir amaç için kullanıma izinlerini GÖNDERİCİ'ye yazılı olarak bildirir.
2. Biyolojik materyaller ALICI'ya gönderilmeden önce biyolojik materyalin sağlandığı gonüllere ait

**Biyolojik Materyal Transfer Formu 1**  
(Biological Material Transfer Form)  
01.09.2015 Versiyon 1.0

**AGREEMENT FOR TRANSFER OF BIOLOGICAL MATERIAL TO BE USED IN  
CLINICAL TRIALS**

Full name of the clinical trial:  
Protocol code :  
Summary of the clinical trial:

Click here on enter text

By this agreement, the investigator and the institution who send the biological material requires the CONSIGNEE and CONSIGNOR to agree on the below terms before sending (Specify biological material type and amount) which shall be used for to be dispatched to the address of

1. Delivered biological materials shall be used only for the above-mentioned purposes. CONSIGNEE shall use those materials only for secondary purposes, which are initially approved by the CONSIGNOR in written.
2. Prior to the dispatch of the biological materials to the CONSIGNEE, Turkish Medicines and Medical Devices Agency and Ethics Committee approved informed consent forms, which belong to the persons for whom the biological material is provided, should be obtained. This consent form should explain all the purposes of use of the biological samples.
3. CONSIGNEE cannot provide the biological material to the third parties without prior written approval of the CONSIGNOR.
4. Biological materials shall be dispatched by the CONSIGNOR to the CONSIGNEE without the identity or any descriptive information of the individuals.
5. CONSIGNEE shall use the biological materials in accordance with as the United Nations Human Genome and Universal Declaration of Human Rights.
6. CONSIGNEE acknowledges and agrees that the biological materials to be dispatched under this agreement shall be utilized for research purposes and have some risks associated with their usage. Appropriate preventive actions should be taken for those risks.
7. CONSIGNOR and CONSIGNEE shall mutually agree that the biological materials cannot be used as a source for any commercial profit and the rights relating to a joint publication or a patent right that may arise may be the only exception for that. CONSIGNOR and CONSIGNEE shall mutually agree on those rights prior to trial initiation.
8. CONSIGNEE agrees to return or dispose of all materials and to evidence such acts accordingly in the event of termination of the agreement or withdrawal of written consent of the volunteer referred in Item 2.
9. This agreement shall be terminated in the event of, termination of the trial, violation on the terms of related regulations or noncompliance with agreement clauses of either of the parties.
10. CONSIGNEE and CONSIGNOR shall be responsible from the execution of this Agreement and performances hereunder. In case of conflict, both countries of the parties' courts are authorized



## Biyolojik Materyal Transfer Formu 2

(Biological Material Transfer Form)

01.09.2015 Versiyon 1.0

### INFORMATION REGARDING THE INVESTIGATOR SENDING THE BIOLOGICAL MATERIAL

Name Surname and Title :  
Specialization :  
Institution :  
Address :  
Telephone :  
Fax :  
E-mail :

### INFORMATION REGARDING THE CONSIGNEE RECEIVING THE BIOLOGICAL MATERIAL

Name Surname and Title :  
Specialization :  
Institution :  
Address :  
Telephone :  
Fax :  
E-mail :

I read and understood the terms under this agreement. I hereby agree and undertake that I will act in accordance with the terms of this agreement with respect to the dispatched materials.

	CONSIGNOR			CONSIGNEE
	Consignor Investigator	Consignor Sponsor Company Official or Legal Representative	Chief of the Department	Chief Officer of the Institution/ Director or Assigned Person
Name Surname and Title in Handwriting				
Date				
Signature				

Note: Instead of the signature of the consignee representative, a signed "end use certificate" including clauses similar to this agreement's to be issued by the consignee institution may also be accepted.

- Türkiye İlaç ve Tıbbi Cihaz Kurumu ve Etik Kurulunun onayladığı form kullanımı amaçlarına yönelik olarak düzenlenmiş bilgilerin goniullu olu formunun her bir goniuluden alınması olmasi gerekmektedir.
1. ALICI biyolojik materyali GONDERICInin yazılı izni olmadan goniulde kişikurumlarına vermeyecektir.
  2. Biyolojik materyaller GONDERICI tarafından biyeyin kulluk ve tanımlayıcı bilgileri olmaksızın ALICI'ya goniulenecektir.
  3. ALICI biyolojik materyalleri Bileşim Mlletel' İnsan Genomu ve İnsan Hakları Evrensel Beyannameğine uygun olarak kullanacaktır.
  4. Bu anlaşma ile goniulenecek biyolojik materyalin araştırma için kullanılacak olduğu ve biyolojik materyal kullanımına ait risklerin var olduğu ALICI tarafından kabul edilmektedir. Söz konusu risklere karşı uygun önlemlerin alınması gerekmektedir.
  5. GONDERICI ve ALICI goniulenden biyolojik materyalin herhangi bir şekilde ticari kazanç kaynağı olarak kullanılmayacağı ancak elde edilecek fiiki mülkiyet ve patent haklarının bu durundan istisna olduğu kabul etmektedir. GONDERICI ve ALICI söz konusunu haklarını araştırma başlangıcında karşılıklı olarak belirleyecektir.
  6. ALICI bu anlaşmanın sonlanması veya biyolojik materyalin sağlanıldığı goniulden itibaren 2. maddesinde belirtilen oluru geri çekilmesi halinde bütün materyalleri geri vermeyi veya oradan kaldırılmayı ve bunu belgelemeyi kabul eder.
  7. Bu anlaşma, araştırmanın sonlanması, ilgili mevzuat hükümlerine uyumlanması veya ilgili tarafların anlaşma hükümlerine uymaması durumlarında son bulacaktır.
  8. Bu anlaşmanın yürürlüğünde ALICI ve GONDERICI yetkileri sınırlıdır. Anlaşmazlık halinde ihtilalin çözümü için her iki ülke mahkemeleri de yetkilidir.

### BIYOLOJİK MATERYAL GÖNDEREN ARAŞTIRMACI BİLGİSİ

Adı Soyadı ve Ünvanı : Muzaffer Değertekin, Prof. Dr.  
Uzmanlık Alanı : Kardiyoloji  
Kurumu : Yeditepe Üniversitesi  
Adresi : İğerenköy Mahallesi Hastane Sokak No: 4,  
4/1 Ataşehir - İstanbul  
Telefon : 02165784000  
Faks :  
E-posta : mdegertekin@yeditepe.edu.tr

### BIYOLOJİK MATERYAL ALAN ALICI BİLGİSİ

Adı Soyadı ve Ünvanı :  
Uzmanlık Alanı :  
Kurumu :

**Biyolojik Materyal Transfer Formu 3**  
(Biological Material Transfer Form)  
01.09.2015 Versiyon 1.0

Adres :  
Telefon :  
Faks :  
E-posta :

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

Eli Yazısı İşe Adı Soyadı Unvanı Tarih İmza	GÖNDERİCİ			ALICI
	Gönderen Araştırma	Gönderen Destekleyici Firma Yetkili veya Yasal Temsilcisi	Eğitim Gerevlisi / Ana Bilim Dalı Başkanı	Kurum Amiri / Rakip veya Yetkilendiği Makam

Not: Bu anlaşmada yer alan alıcı kurum yetkilisinin imzası yerine alıcı kurum tarafından verilecek olan ve içerk olarak bu anlaşmadaki hükümlere benzer hükümleri içeren imzalı "end use certificate" son kullanım sertifikası" da 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 sahipsiniz.
- 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/tedavi 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: mikroRNA-148a İfade Düzeyinin LDL Kolesterol Seviyesi Üzerine Etkisinin Araştırılması**

**Araştırmaya Katılımcı Sayısı: 200**

#### ***Bu araştırmanın Amacı:***

Kolesterol plazma zarında bulunan yapısal bir bileşen olup hücre büyümesi ve hayatı için esansiyel bir steroldür. D vitamini, safra asitleri ve steroid hormonların öncül maddesidir. Karaciğerde de novo olarak sentezlenmiş lipidler VLDL olarak salınır ve yağ asitleri dokulara aktarılır. Ardından oluşan yapı (VLDL kalıntısı) lipoprotein lipaz (LPL) enzimi tarafından ara densiteli lipoproteinlere (IDL) ve düşük densiteli lipoproteinlere (LDL) dönüştürülür. LDL'ler plazmadaki trigliseridlerin ve kolesterolün %70'ini dokulara taşıyan lipoproteinlerdir.

miRNA'lar yaklaşık 22 nükleotidden oluşan ve 1993'te keşfedilen RNA-kaynaklı sessizleştirme kompleksiyle (RNA-Induced silencing complex [RISC]) etkileşerek ve mRNA'ların kendisine karşılık gelecek dizisine (genellikle 3' UTR bölgesine) transkripsiyon sonrası bağlanarak gen ekspresyonunu düzenleyen tek zincirli RNA'lardır. Böylelikle proliferasyon, apoptoz, lipid metabolizması, glukoz hemostazı gibi birçok biyolojik süreci etkilerler. Çeşitli miRNA'ların karaciğer ve/veya plaklardaki lipoprotein metabolizmasında önemli rol oynayan genlerin ifadelerini kontrol ettiği tespit edilmiştir.

miRNA-148a karaciğer, yağ dokusu ve makrofajlar gibi inflamatuvar hücrelerde fazlaca ifade edilen ve insanda 7. kromozomda kodlanan intergenik bir miRNA'dır. miRNA-148a'nın in vivo ve in vitro koşullarda bir sterol düzenleyici element ve bağlanan proteinin (SREBP-1) aktivasyonu ile aktive edildiği tespit edilmiştir. SREBP-1 karaciğerdeki X reseptör proteini (LXR) için transkripsiyonel hedef olup LXR aktivasyonu miRNA-148a seviyesini artırır. Aktive olan miRNA-148a hepatik hücrelerde ve fare karaciğerinde LDL'nin hücre içerisine alınmasını sağlayan LDL reseptör (LDLR) proteini ile ilgili bilgiyi taşıyan mRNA'nın 3' UTR bölgesine bağlanarak LDLR aktivitesini sağlar. Bu durumda LDL alımı kontrol edilir. Yapılan çalışmalarda miRNA-148a'nın ifadesindeki artışın LDLR aktivesini negatif düzenlediğini ve plazmadaki LDL kolesterol miktarının arttırdığı belirtilmiştir.

Bu bitirme tezinde TargetScan (targetscan.org), miRanda (microrna.org) ve miRBase (miRBase.org) veritabanları aracılığıyla yapılan biyoinformatik çalışmalar ve literatürdeki bilgiler ışığında miRNA-148a ifade düzeyinin insan LDL kolesterol seviyesi üzerine etkisinin diğer miRNA'lara kıyasla daha fazla olduğu tespit edilmiş olup miRNA-148a ifade düzeyinin LDL kolesterol seviyesi üzerine etkisinin araştırılması amaçlanmıştır.

**Süresi: 1 Yıl**

**İzlenecek Yöntem/Yöntemler:**

miRNA analizi için farklı LDL değerlerine sahip gönüllülerden (100 sağlıklı kişi, 100 ateroskleroz tanısı konulmuş kişi) alınan kan örneklerinin 4500 rpm'de 15 dakika boyunca santrifüjlenerek elde edilen serumlar çalışmaya kadar -80°C'de saklanacaktır.

iPrep DNA ekstraksiyon robotu ile +4°C'de saklanmış kan örneklerinden iPrep kandan genomik DNA izolasyon kiti (iPrep gDNA Blood kit, Invitrogen, Thermo Fisher Scientific Inc) kullanılarak DNA izolasyonu yapılacaktır.

miRNA izolasyonu, Qiagen serum plazma kiti kullanılarak yapılacaktır. Elde edilen miRNA'ların saflığı için ise Nanodrop 2000 (Thermo Fisher Scientific) ve düzeylerinin belirlenmesi için ise fluometre (Qubit 3) kullanılacaktır. cDNA sentezi için Qiagen kiti ve miRNA ekspresyon düzeylerinin belirlenmesi için de PZR (Fast Real Time 7500) kullanılarak ve 2(-Delta Delta C(T)) yöntemi ile yapılacaktır.

**Araştırma Sonunda Beklenen Fayda**

mikroRNA-148a ifade düzeyinin LDL kolesterol seviyesi üzerine etkisinin belirlenmesi

**Bu Çalışmada Herhangi Bir Alternatif Tedavi ya da 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 ayrılabilceğimi 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:

***Gerekirse 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 : 37068608-6100-15-1381  
Konu: Klinik Araştırmalar  
Etik kurul Başvurusu hk.

23/11/2017

İlgili Makama (Tuğçe Gül)

Yeditepe Üniversitesi Moleküler Tıp Anabilim Dalı Prof. Dr. Turgay İsbir'in sorumlu olduğu "**MikroRNA-148a İfade Düzeyinin LDL Kolesterol Seviyesi Üzerine Etkisinin Araştırılması**" isimli araştırma projesine ait Klinik Araştırmalar Etik Kurulu (KAEK) Başvuru Dosyası ( **1361** 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: 751** ).

Prof. Dr. Turgay ÇELİK

Yeditepe Üniversitesi  
Klinik Araştırmalar Etik Kurulu Başkanı

## ÖZGEÇMİŞ

### Kişisel Bilgiler

<b>Adı</b>	Tuğçe	<b>Soyadı</b>	GÜL
<b>Doğ.Yeri</b>	İstanbul	<b>Doğ.Tar.</b>	18.01.1994
<b>Uyruğu</b>	T.C.	<b>TC Kim No</b>	36970681178
<b>Email</b>	gultugce94@gmail.com	<b>Tel</b>	05356726191

### Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mez. Yılı
<b>Yük.Lis.</b>		
<b>Lisans</b>	Yıldız Teknik Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü	2016
<b>Lise</b>	Beylerbeyi Hacı Sabancı Anadolu Lisesi	2012

### İş Deneyimi (Sondan geçmişe doğru sıralayın)

	Görevi	Kurum	Süre (Yıl - Yıl)
1.	Stajyer	İstanbul Florence Nightingale Hastanesi – Tüp Bebek / IVF Merkezi	2015
2.	Stajyer	İstanbul Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, Tıbbi Genetik ABD. – Genetik Hastalıklar Tanı Merkezi (GETAM)	2015

Yabancı Dilleri	Okuduğunu Anlama*	Konuşma*	Yazma*	KPDS/ÜDS Puanı	(Diğer) Puanı
İngilizce	İyi	İyi	İyi		YökDil: 63,75

\*Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin:

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
<b>LES Puanı</b>			
<b>(Diğer) ALES Puanı</b>	76,61700	72,77263	61,62107

### Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma becerisi
Microsoft Office	İyi



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

1	22-25 May 2017, İstanbul-Türkiye / VI. International Congress of Molecular Medicine Investigation of Mody 2 (c7: 44183880 G>A) Polymorphism in Patients With Coronary Artery Disease. <b>Gul T.</b> , Aydemir D., Yalbir E., Gulec Yilmaz S., Ayhan H., Isbir S., Tekeli Kunt A., Findik O., Isbir T.
2	22-25 May 2017, İstanbul-Türkiye / VI. International Congress of Molecular Medicine Analysis of GCK-MODY (MODY2) Gene Polymorphism on Chr.7:44149424 in Coronary Artery Disease Patients. Aydemir D., Yalbir E., <b>Gul T.</b> , Altinkilic E.M., Gulec Yilmaz S., Isbir S., Tekeli Kunt A., Findik O., Isbir T.
3	22-25 May 2017, İstanbul-Türkiye / VI. International Congress of Molecular Medicine Effects of GCK-MODY (MODY2) Gene Polymorphism on Chr.7:44163407 in Patients with Coronary Artery Disease. Yalbir E., Aydemir D., <b>Gul T.</b> , Gulec Yilmaz S., Duman S., Isbir S., Tekeli Kunt A., Findik O., Isbir T.