

ANKARA ÜNİVERSİTESİ
BİYOTEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ

TEMEL BİYOTEKNOLOJİ
YÜKSEK LİSANS TEZİ

KARACİĞER FİBROZİSİNDE ETKEN OLABİLECEK ADAY miRNA'LARIN
HEPATİK STELLAT HÜCRELERİNDE ARAŞTIRILMASI

Güniz Cengiz

Danışman Öğretim Üyesi

Yrd. Doç. Dr. Senem Ceren Özen Karataylı

Ekim

2017

ETİK BEYAN

Bu tez çalışmasının; akademik kural ve etik ilkelere bağı kalınarak hazırlandığını, çalışmada yararlanılan ve bu çalışma ürünü olmayan bütün bilgiler için kaynak yayınlara atıfta bulunulmuş olduğunu beyan ederim.

Güniz Cengiz

İmzası

ONAY

Yrd. Doç. Dr. Senem Ceren Özen Karataylı danışmanlığında Güniz Cengiz tarafından hazırlanan bu çalışma 09/10/2017 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Temel Biyoteknoloji Anabilim Dalı'nda yüksek lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan: Prof. Dr. Rengül ÇETİN ATALAY

İmza:

Üye: Doç. Dr. Bala GÜR DEDEOĞLU

İmza:

Üye: Yrd. Doç. Dr. Senem Ceren ÖZEN KARATAYLI İmza:

Yukarıdaki sonucu onaylarım.

Prof. Dr. Aykut ÖZKUL

Enstitü Müdürü

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

Karaciğer Fibrozisinde Etkin Olabilecek Aday miRNA'ların Hepatik Stellat Hücrelerinde
Araştırılması

Güniz Cengiz

Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü

Yrd. Doç. Dr. Senem Ceren Özen Karataylı

Karaciğer fibrozisi, karaciğerde meydana gelen kronik yaralanmanın iyileşmemesi durumunda ilerleyerek, siroza, hepatosellüler karsinomaya ve karaciğer yetmezliğine neden olabilecek ciddi bir rahatsızlıktır. Karaciğer fibrozisinin oluşmasında ve devamlılığında hepatik stellat hücrelerinin programlı bir şekilde sessiz hallerinden aktif hallerine geçmeleri oldukça etkilidir. miRNA'lar yaklaşık olarak 22 nükleotit uzunluğunda kodlanmayan kısa RNA parçalarıdır. miRNA'ların sahip oldukları biyolojik karakterlerinden dolayı hastalıklarda terapötik ajanlar olarak düşünülebilmektedirler. Karaciğer fibrozisinin önüne geçebilmek için miRNA'ların hepatik stellat hücreleri arasındaki etkileşimlerine yönelik çalışmalar yapılmaktadır. Fakat karaciğer fibrozisine olan etkisi açıklığa kavuşturulmamış olan fazla sayıda miRNA da bulunmaktadır.

Bu tez çalışmasında karaciğer fibrozisi üzerine etkisi olabileceği düşünülen miR-132, miR-138, miR-758, miR-130a ve miR-223 miRNA'lar ve bu miRNA'ların hedef genleri ile olan ilişkisi ilk kez insan hepatik stellat hücre hattı olan LX-2'de araştırılmıştır.

Belirlenen aday miRNA'lar ve hedef genleri ile olan ilişki eş zamanlı PZR deneyleri ile araştırılmış, elde edilen verilere göre yalnızca miR-138'in LX-2 hücre hattında pro-fibrotik etkiye sahip olduğu istatistiksel açıdan anlamlı bulunmuştur. Diğer miRNA'ların fibrozise olan etkisi istatistiksel açıdan anlamlı bulunamamıştır. miR-138 ve hedef geni SIRT1 arasındaki ilişki aynı zamanda western blot analizi ile irdelenmiş ve istatistiksel açıdan anlamlı sonuçlara ulaşılmıştır.

2017, 78 sayfa

Anahtar kelimeler: Karaciğer fibrozisi; hepatik stellat hücreler; miRNA

ABSTRACT

M.Sc. Thesis

Searching For The Candidate MiRNAs Of Liver Fibrosis In Hepatic Stellate Cells

Güniz Cengiz

Ankara University Biotechnology Institute

Asst. Prof. Senem Ceren Özen Karataylı

Liver fibrosis is a severe disease that can lead to cirrhosis, hepatocellular carcinoma and liver failure if the chronic injury in liver does not heal. The occurrence and persistence of liver fibrosis is highly influenced by the programmed transformation of hepatic stellate cells from quiescent to active state. miRNAs are non-coding short RNAs around 22 nucleotides. Because of their biological characteristics, miRNAs can be considered as therapeutic agents in diseases. In order to prevent liver fibrosis, studies regarding the interactions between miRNAs and hepatic stellate cells have been conducted. However, there are a large number of miRNAs whose effect on liver fibrosis have not been elucidated yet.

In this thesis, involvement of miR-132, miR-138, miR-758, miR-130a and miR-223, which are thought to have a role in liver fibrosis, and their target genes in human hepatic stellate cell line, LX-2, was investigated.

The candidate miRNAs and their relationships with the related target genes were determined by real time PCR experiments. It was found that only miR-138 had statistically significant pro-fibrotic activity in the LX-2 cell line. The fibrosis effect of other miRNAs was not determined as statistically significant. The relationship between miR-138 and its target gene SIRT1 was also shown by western blot analysis and statistically significant results were obtained.

2017, 78 pages

Keywords: Liver fibrosis, hepatic stellate cells, miRNA

TEŞEKKÜR

Çok sevgili değerli hocam Yrd. Doç. Dr. Senem Ceren Özen Karataylı'ya (Ankara Üniversitesi, Hepatoloji Enstitüsü) yol göstericiliği, hayattaki dostluğu, yardımseverliği ve sabrı için,

Değerli hocam Prof. Dr. A. Mithat Bozdayı'ya (Ankara Üniversitesi, Hepatoloji Enstitüsü) desteği için,

Değerli hocam Doç. Dr. Ersin Karataylı'ya (Ankara Üniversitesi, Hepatoloji Enstitüsü) desteği, yardımseverliği ve gösterdiği sabır için,

Sevgili eşim Murat Cengiz'e bu tez çalışmasının hazırlanmasının her aşamasında bana olan desteğini hiç esirgemediği ve sonsuz sabır gösterdiği için,

Çok değerli canım arkadaşım Esra Yurdcu'ya sorduğum her soruya sabırla cevap verdiği, yardımını hiçbir zaman esirgemediği, kusursuz arkadaşlığı için,

Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu'na tez çalışmamı 115S335 nolu proje kapsamında desteklediği için,

Ankara Üniversitesi Hepatoloji Enstitüsü çalışanlarına sevgileri ve destekleri için,

Canım anneannem Safure'ye, çok değerli annem Şerife'ye, teyzelerim Serpil'e ve Fatoş'a hiçbir zaman sevgilerini, emeklerini, sabırlarını, inançlarını esirgemedikleri için,

Teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

ETİK BEYAN	i
ÖZET	iii
ABSTRACT	iv
TEŞEKKÜR.....	v
İÇİNDEKİLER.....	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	ix
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xii
SİMGELER DİZİNİ	xiii
1. GİRİŞ	1
2. KURAMSAL TEMELLER.....	3
2.1. KARACİĞER FİBROZİSİ	3
2.1.1. HEPATİK STELLAT HÜCRELERİ	4
2.1.2. KARACİĞER FİBROZİSİNDE HEPATİK STELLAT HÜCRELERİNİN AKTİVASYONU	6
2.2. MİKORNA'LAR.....	14
2.2.1. MİKORNA BİYOGENEZİ.....	14
2.3. MİKORNA'LAR VE HEPATİK STELLAT HÜCRELERİ	16
2.3.1. ANTİ-FİBROTİK MİKORNA'LAR	16
2.3.2. PRO-FİBROTİK MİKORNA'LAR	18
2.4. ADAY MİKORNA'LAR VE HEDEF GENLERİNİN KARACİĞER FİBROZİSİ İLE İLİŞKİLENDİRİLMESİ	19

3. GEREKÇE VE AMAÇ	21
4. MATERYAL VE YÖNTEM	22
4.1. MATERYAL	22
4.1.1. HÜCRE HATTI.....	22
4.1.2. KİMYASALLAR	22
4.1.3. KİTLER	22
4.1.4. TAMPONLAR.....	23
4.1.5. MRNA PRİMER-PROB DİZİLERİ	23
4.1.6. MİRNA PRİMERLERİ.....	24
4.1.7. BİRİNCİL VE İKİNCİL ANTİKORLAR.....	24
4.2. YÖNTEM	25
4.2.1. HEDEF GENLERİN BELİRLENMESİ	25
4.2.2. HÜCRE KÜLTÜRÜ ÇALIŞMASI.....	25
4.2.3. LX-2 HÜCRELERİNDE FİBROZİS ORTAMININ OLUŞTURULMASI.....	26
4.2.4. TRANSFEKSİYON.....	27
4.2.5. TOTAL RNA İZOLASYONU VE EŞ ZAMANLI PZR ÇALIŞMASI	27
4.2.6. PROTEİN İZOLASYONU	28
4.2.7. PROTEİN MİKTARLARININ BELİRLENMESİ.....	29
4.2.8. WESTERN BLOT ANALİZİ	29
4.2.9. İSTATİKSEL ANALİZ	31
5. ARAŞTIRMA BULGULARI	32
5.1. TRANSFEKSİYON	32
5.2. EŞ ZAMANLI PZR SONUÇLARI	33
5.2.1. MİR-223 SONUÇLARI.....	33

5.2.2. MİR-138 SONUÇLARI.....	36
5.2.3. MİR-132 SONUÇLARI.....	37
5.2.4. MİR-130A SONUÇLARI.....	41
5.2.5. MİR-758 SONUÇLARI.....	42
5.3. WESTERN BLOT SONUÇLARI.....	45
6. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	48
7. KAYNAKLAR	53
8. ÖZGEÇMİŞ.....	62
9. TEZDEN ÇIKAN YAYINLAR	63

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Sessiz fenotipe sahip HSH'ler ([16]'dan yeniden düzenlenmiştir).....	5
Şekil 2.2. Aktifleşen HSH'ler ve ESM birikimi ([16]'dan yeniden düzenlenmiştir).....	7
Şekil 2.3. miRNA biyogenezi [88].....	15
Şekil 4.1. Aday miRNA'lar ve hedef gen eşleşmeleri.....	25
Şekil 5.1. Transfeksiyonu gerçekleştirilen miR-138-5p ve pGFP'nin 24 saat sonunda floresan mikroskobundan elde edilen görüntüsü.....	32
Şekil 5.2.1. miR-223-3p eş zamanlı PZR sonuçlarının LC 480 1.5 yazılımı kullanılarak ileri rölatif kantifikasyon analiz ("advanced relative quantification analysis") sonuçları ile çizilen grafiği.....	33
Şekil 5.2.2. miR-223-3p eş zamanlı PZR sonuçlarının LC 480 1.5 yazılımı kullanılarak ileri rölatif kantifikasyon analiz ("advanced relative quantification analysis") sonuçları ile çizilen grafiği.....	34
Şekil 5.3.1. miR-223-5p eş zamanlı PZR sonuçlarının LC 480 1.5 yazılımı kullanılarak ileri rölatif kantifikasyon analiz ("advanced relative quantification analysis") sonuçları ile çizilen grafiği.....	35
Şekil 5.3.2. miR-223-5p eş zamanlı PZR sonuçlarının LC 480 1.5 yazılımı kullanılarak ileri rölatif kantifikasyon analiz ("advanced relative quantification analysis") sonuçları ile çizilen grafiği.....	35
Şekil 5.4.1. miR-138-5p eş zamanlı PZR sonuçlarının LC 480 1.5 yazılımı kullanılarak ileri rölatif kantifikasyon analiz ("advanced relative quantification analysis") sonuçları ile çizilen grafiği.....	36
Şekil 5.4.2. miR-138-5p eş zamanlı PZR sonuçlarının LC 480 1.5 yazılımı kullanılarak ileri rölatif kantifikasyon analiz ("advanced relative quantification analysis") sonuçları ile çizilen grafiği.....	37

Şekil 5.5.1. miR-132-3p eş zamanlı PZR sonuçlarının LC 480 1.5 yazılımı kullanılarak ileri rölatif kantifikasyon analiz ('advanced relative quantification analysis') sonuçları ile çizilen grafiği.....	38
Şekil 5.5.2. miR-132-3p eş zamanlı PZR sonuçlarının LC 480 1.5 yazılımı kullanılarak ileri rölatif kantifikasyon analiz ('advanced relative quantification analysis') sonuçları ile çizilen grafiği.....	39
Şekil 5.6.1. miR-132-5p eş zamanlı PZR sonuçlarının LC 480 1.5 yazılımı kullanılarak ileri rölatif kantifikasyon analiz ('advanced relative quantification analysis') sonuçları ile çizilen grafiği.....	40
Şekil 5.6.2. miR-132-5p eş zamanlı PZR sonuçlarının LC 480 1.5 yazılımı kullanılarak ileri rölatif kantifikasyon analiz ('advanced relative quantification analysis') sonuçları ile çizilen grafiği.....	40
Şekil 5.7.1. miR-130a-5p eş zamanlı PZR sonuçlarının LC 480 1.5 yazılımı kullanılarak ileri rölatif kantifikasyon analiz ("advanced relative quantification analysis") sonuçları ile çizilen grafiği.....	41
Şekil 5.7.2. miR-130a-5p eş zamanlı PZR sonuçlarının LC 480 1.5 yazılımı kullanılarak ileri rölatif kantifikasyon analiz ("advanced relative quantification analysis") sonuçları ile çizilen grafiği.....	42
Şekil 5.8.1. miR-758-3p eş zamanlı PZR sonuçlarının LC 480 1.5 yazılımı kullanılarak ileri rölatif kantifikasyon analiz ('advanced relative quantification analysis') sonuçları ile çizilen grafiği.....	43
Şekil 5.8.2. miR-758-3p eş zamanlı PZR sonuçlarının LC 480 1.5 yazılımı kullanılarak ileri rölatif kantifikasyon analiz ('advanced relative quantification analysis') sonuçları ile çizilen grafiği.....	43
Şekil 5.9.1. miR-758-5p eş zamanlı PZR sonuçlarının LC 480 1.5 yazılımı kullanılarak ileri rölatif kantifikasyon analiz ("advanced relative quantification analysis") sonuçları ile çizilen grafiği.....	44

Şekil 5.9.2. miR-758-5p eş zamanlı PZR sonuçlarının LC 480 1.5 yazılımı kullanılarak ileri rölatif kantifikasyon analiz (“advanced relative quantification analysis”) sonuçları ile çizilen grafiği.....	45
Şekil 5.10.1. Farklı ortam şartlarında COL1A1 protein yoğunlukları ile çizilen sütun grafiği	46
Şekil 5.10.2. Farklı ortam şartlarında SIRT1 protein yoğunlukları ile çizilen sütun grafiği	46
Şekil 5.10.3. Farklı ortam koşullarında SIRT1(A), COL1A1(B) ve ACTB(C) bant yoğunluklarını gösteren Western Blot görüntüsü.....	47



ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 4.1. Kullanılan primer-prob dizileri 23

Çizelge 4.2. Kullanılan miRNA dizileri 24



SİMGELER DİZİNİ

µg	Mikrogram
µl	Mikrolitre
A	Amper
ABCA1	ATP-bağlayıcı kaset taşıyıcı A1
APS	Amonyum persülfat
CO ₂	Karbon dioksit
COL1	Tip I kolajen
ddH ₂ O	Çift distile su
dk	Dakika
DMEM	Dulbecco's modified eagle besiyeri
DMSO	Dimetil sülfoksit
DTT	Dikloro difenil trikloroethan
EGF	Epidermal büyüme faktörü
FBS	Fetal sığır serumu
HBV	Hepatit B virüs
HCV	Hepatit C virüs
LRAT	Lesitin retinol asil transferaz
miRNA veya miR	Mikro RNA
ml	Mililitre
MMP	Matriks metalloproteinaz
mRNA	Mesajcı RNA
ng	Nanogram
nm	Nanometre
nM	Nanomolar

°C	Santigrat derece
PARP1	Poli (ADP-riboz) polimeraz 1
PBS	Fosfat tamponlu tuz
PDGF	Platelet kökenli büyüme faktörü
PPARG	Peroksizom proliferatör aktive reseptör gama
PZR	Polimeraz zincir reaksiyonu
SDS	Sodyum dodesil sülfat
SIRT1	Sirtuin tip I
TBS	Tris tamponlu tuz
TBST	Tris tamponlu tuz/ Tween 20
TEMED	Tetrametiletildiamin
TGF- β	Dönüştürücü büyüme faktörü beta
TGS	Tris/glisin/SDS
TIMP	Matriks metalloproteinaz doku inhibitor
TRAIL	Fas ve tümör nekrozis faktör ilişkili apoptozis indükleyici ligand
UTR	Translasyonu yapılmayan bölge
V	Volt
VEGF	Vasküler endotelyal hücre büyüme faktörü
α -SMA	Alfa düz kas aktin
β	Beta
γ	Gama

Kısaltmalar

ESM	Ekstra sellüler matriks
HSH	Hepatik stellat hücre
ROS	Reaktij oksijen türleri

1. GİRİŞ

Karaciğer fibrozisi aslında karaciğer dokusundaki yaralanmaya karşı geliştirilen bir yara iyileşme cevabı olarak düşünülebilir. Normal bir iyileşme süresinde yara dokusunun oluşması oldukça yavaş bir şekilde gerçekleşir fakat karaciğerde sirozun ortaya çıkmasıyla bu yara dokusunun oluşmasının geri döndürülebilirliği azalır ve karaciğerde birtakım komplikasyonlar ortaya çıkar. Karaciğer fibrozisin ilerlemesinde genetik polimorfizmler, obezite veya alkol kullanımı gibi epigenetik faktörler etkili olabilir. Karaciğer fibrozisine sebep olan etken ortadan kaldırılmazsa fibrozis ilerleyerek siroza, hepatosellüler karsinomaya neden olabilir. Bu aşamaya gelindiğinde tek çare karaciğer nakli olarak düşünülebilir (1). Karaciğer fibrozisi, karaciğer dokusunda meydana gelen kronik bir yaralanma sonucu ekstra sellüler matriks (ESM) proteinlerinin aşırı miktarda artması ile tanımlanabilen dinamik bir süreçtir. Karaciğer fibrozisindeki en önemli basamak hepatik stellat hücrelerinin (HSH) buldukları sessiz hallerinden aktif hallerine geçmeleridir (2). Aktifleşen HSH'lerden salgılanan alfa düz kas aktini (α -SMA) ve tip 1 kolajeni (col1) ESM oluşumunda oldukça önemli olmalarıyla birlikte ayrıca fibrozis çalışmalarında fibrozis belirteci olarak kullanılmaktadırlar.

LX-2 hücre hattı, aktif özellik taşıyan insan HSH'lerin *in vivo* fenotipini taşıyan hücrelerdir ve transfekte edilebilme özelliğinin oldukça fazla olmasıyla karaciğer fibrozisi çalışmaları için oldukça önemlidir. Ayrıca LX-2 hücre hattı fibronektin, kolajen tip IV, col1, dönüştürücü büyüme faktörü beta (TGF- β) reseptörü tip II ve tip I, α -SMA, bağ doku büyüme faktörü (CTGF), gibi proteinleri ifade etmesiyle aktifleşen HSH'lerin anahtar özelliklerini sergilemektedir (3).

MikroRNA'lar (miRNA) yaklaşık olarak 22 nükleotid uzunluğunda olan kısa kodlanmayan RNA parçaları olup hücre dışında da kararlı bir yapıya sahip olmaları ve serum, idrar gibi biyolojik materyallerde kolay tayin edilebilmelerinden ötürü hastalıklarda terapötik ajan olarak değerlendirilme potansiyeline sahiptirler (4-6).

Karaciğer fibrozisi üzerine yapılan çok sayıda çalışmayla miRNA'ların karaciğer fibrozisinde kilit rol oynayan HSH'ler üzerinde anti-fibrotik ya da pro-fibrotik rol oynadıkları gösterilmiştir. miRNA'ların HSH'ler üzerindeki etkisi oldukça farklı yollar

aracılığıyla gerekleŖebilmektedir. miRNA'ların ifade düzeylerindeki deđiŖiklikler yapılan alıŖmalar ıŖıđında karaciğer fibrozisi tedavisine yeni bir pencereden bakılmasına neden olmuŖtur.

Bu tez alıŖmasında, LX-2 hücre hattında insan HSH'lerinde etkili olabileceği dŖnlen miR-132, miR-138, miR-223, miR-758 ve miR-130a'nın fibroziste veya karaciğer metabolizmasında rol oynayan ilgili genleri sirtuin tip I (SIRT1), Poli (ADP-riboz) polimeraz 1 (PARP1), ATP-bağlayıcı kaset taŖıyıcı A1 (ABCA1) ve peroksizom proliferatör aktive reseptör γ (PPARG) ile olan iliŖkileri araŖtırılmıŖtır.



2. KURAMSAL TEMELLER

2.1. KARACİĞER FİBROZİSİ

Karaciğer fibrozisi dünya genelinde oldukça hızlı bir şekilde yaygınlaşan önemli bir problem haline gelmiştir. Hepatit B (HBV), hepatit C (HCV) gibi kronik viral enfeksiyonlar, aşırı alkol tüketimi, şistozomiyaz parazit kurtlarının neden olduğu enfeksiyonlar, dokuda demir birikimi olarak tanımlanan Wilson hastalığı gibi genetik tabanlı rahatsızlıklar, konjenital bozukluklar, otoimmün hastalıklar, ilaç zehirlenmeleri karaciğer fibrozisine neden olan başlıca rahatsızlıklardır. Asya ve Afrika kıtalarında kronik viral hepatitler karaciğer fibrozisi için en önemli etken olurken, batı ülkelerinde kronik alkol tüketimi ve alkole bağlı olmayan steatohepatit oldukça etkilidir (1,7,8).

Karaciğer fibrozisinde, ESM'nin hem miktarında hem de yapısında oldukça önemli değişiklik meydana gelmektedir. Karaciğer fibrozisinin ileri aşamalarında ESM miktarı normal bir karaciğere kıyasla 6 kat fazla olmaktadır. ESM miktarının bu kadar artmasının sebebi hem oldukça fazla salgılanması hem de yıkımının azalmasından kaynaklanmaktadır (9,10).

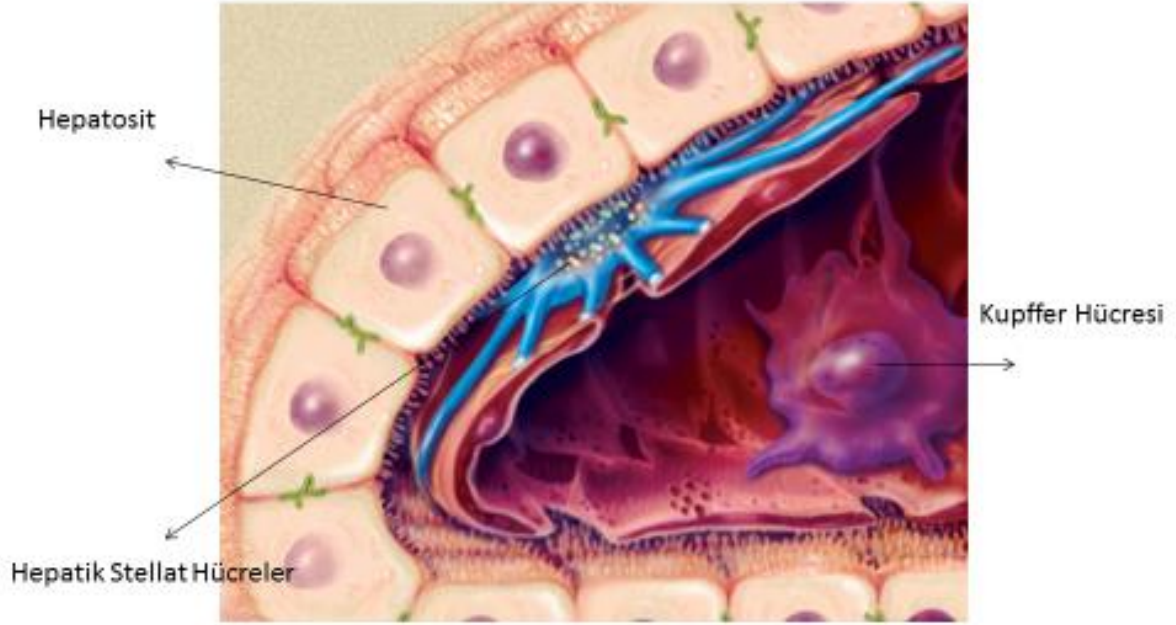
Karaciğer fibrozisinin erken safhaları "başlama" olarak adlandırılmaktadır. Başlama ya da diğer bir ifadeyle preinflamatuvar aşamasında hem gen ifade düzeylerinde hem de fenotiplerde hızlı değişimler gözlenmektedir. Bu değişimler, hücrelerin sitokinlere ve diğer çevresel uyarılara karşı verdikleri cevap olarak değerlendirilebilir. Başlama evresi genlerin hızlı bir şekilde uyarılması ile yakından ilişkilidir. Genlerin uyarılması; inflamatuvar hücrelerin, safra kanalı hücrelerinin ve zarar görmüş hepatositlerin parakrin stimülasyonuna sebep olmasından ve ESM kompozisyonundaki erken değişimlerden kaynaklanmaktadır. Başlama aşamasını, hücrel cevapların etkin olduğu ve perpetuasyon olarak adlandırılan devam aşaması izlemektedir. Bu aşamada aktifleşmiş fenotiplerde artış gözlenmektedir ve bu aktifleşme otokrin ve parakrin uyarılardan ve ESM'nin hızlı bir şekilde yeniden düzenlenmesinden kaynaklanmaktadır. En son olarak da stellat hücrelerinin aktivasyonunun çözülmesi karaciğer fibrozisinin geri döndürülebilirliği açısından oldukça önemlidir (2).

2.1.1. HEPATİK STELLAT HÜCRELERİ

HSH'lerin ilk tanımlanması, Kupffer tarafından altın klorid metodu kullanarak karaciğerdeki nöronal hücreleri belirlemek istediği sırada 1876 yılında gerçekleşmiştir. HSH'lerin sahip olduğu yıldızlı yapılarından dolayı Kupffer bu hücrelere Almanca'da "yıldız hücre" anlamına gelen "sternzellen" adını vermiştir. 1898 yılına gelindiğinde Kupffer yapmış olduğu çalışmalarla bu hücreleri "fagositik kapasiteye sahip sinüzoidlerin özel endotel hücreleri" şeklinde tanımlamıştır. Böylece bu hücrelerin şimdilerde Kupffer hücresi olarak adlandırılan makrofajlarla karıştırılmasına neden olmuştur (11,12). Fakat Ito ve Nemato bu hücrelerin hem makrofajlardan hem de sinüzoidal endotel hücrelerden farklı olduğunu göstermiştir (13).

Hepatositlerin bazolateral yüzeyleri ile sinüzoidal endotel hücrelerin antilüminal bölgesi arasında Disse'nin subendotel boşluğunda bulunan HSH'ler, buldukları bu özel lokasyondan ve sahip oldukları dendritik sitoplazmik yapılarından dolayı etraflarında bulunan hepatositleri, endotel hücreleri, diğer stellat hücreleri ve Kupffer hücreleri gibi karaciğerin diğer hücreleri ile etkileşim halindedirler (14,15). Karaciğerin yerleşik hücrelerinin %10'luk bir kısmını HSH'ler oluşturmaktadır (14). HSH'ler, hem normal hem de hastalıklı karaciğerde sahip oldukları önemli ve çeşitli görevlerine rağmen toplam karaciğerin hacimce sadece yaklaşık %1,5'lik kısmını oluşturmaktadırlar (16).

Şekil 2.1.'de şematik görüntüsü verilen HSH'ler normal karaciğerde, iğ şeklinde hücre gövdesine, perikaryonlara, oval ve uzun çekirdeğe sahiptirler. HSH sitoplazmasının en göze çarpan özelliği içerisinde A vitamini damlacıkları buldurmalarıdır. Ayrıca iyi gelişmiş bitişik çekirdekli Golgi aygıtına ve granüllü endoplazmik retikuluma sahiptirler (17).



Şekil 2.1. Sessiz fenotipe sahip HSH'ler ((16)'dan yeniden düzenlenmiştir)

Her ne kadar karaciğer fibrozisi için HSH aktivasyonu önemli olsa da aktifleşmemiş sessiz halde bulunan HSH'lerin normal karaciğerde birtakım görevleri bulunmaktadır. Örneğin, stellat hücre öncülleri olan $ALCAM^+$ submezotelyal hücrelerden salgılanan pleiotrophin karaciğer organogenesisine ve karaciğer yenilenmesine katkı sağlamaktadır (18,19). İzole edilen fetal stellat hücre öncülleri oldukça fazla miktarda çoğalma aktivitesine sahiptirler. Ayrıca, hepatosit büyüme faktörünün (HGF), CXCL12'nin ve homeobox transkripsiyon faktörlerinin ifadesine neden olarak hem karaciğer gelişmesine hem de hematopoeze katkı sağlamaktadırlar (20).

HSH'ler retinoid metabolizmasının düzenlenmesinde de rol oynamaktadırlar. Sahip olunan toplam retinoid miktarının yaklaşık %50-80'i karaciğerde ve bunların da yaklaşık %80-90'ı HSH'lerde depolanmaktadır (21-23). Beslenme ile alınan retinoidler bağırsaklar tarafından emilir ve retinil esterler olarak hepatositlere taşınırlar. Hepatositlere taşınan retinil esterler burada serbest retinole hidrolize edilirler, daha sonra stellat hücrelerine taşınarak burada yeniden esterlenirler (22).

ESM kompozisyonunun karaciğerde dengeli bir şekilde bulunmasında hepatositler ve endotel hücrelerinin yanında HSH'lerin de katkısı bulunmaktadır. Disse boşluğunda yer alan bu hücreler ESM komponentlerinin salgılanmasından sorumludurlar (16). ESM dengesinin sağlanabilmesi için ESM komponentlerinin üretime paralel olarak degradasyonunun sağlanması gerekmektedir. Matriks metalloproteinaz doku inhibitörleri (TIMPs) tarafından kontrolleri sağlanan matriks metalloproteinazlar (MMPs) ESM yıkımında oldukça etkilidirler (24,25). TIMPs etkisini elimine edebilen ve coll'in üretiminde oldukça etkili olan TGF- β aktivasyonuna katkı sağlayan distegrin ve metalloproteinaz domain proteinler (ADAMs), stellat hücreleri tarafından salgılanmaktadır (26-29).

2.1.2. KARACİĞER FİBROZİSİNDE HEPATİK STELLAT HÜCRELERİNİN AKTİVASYONU

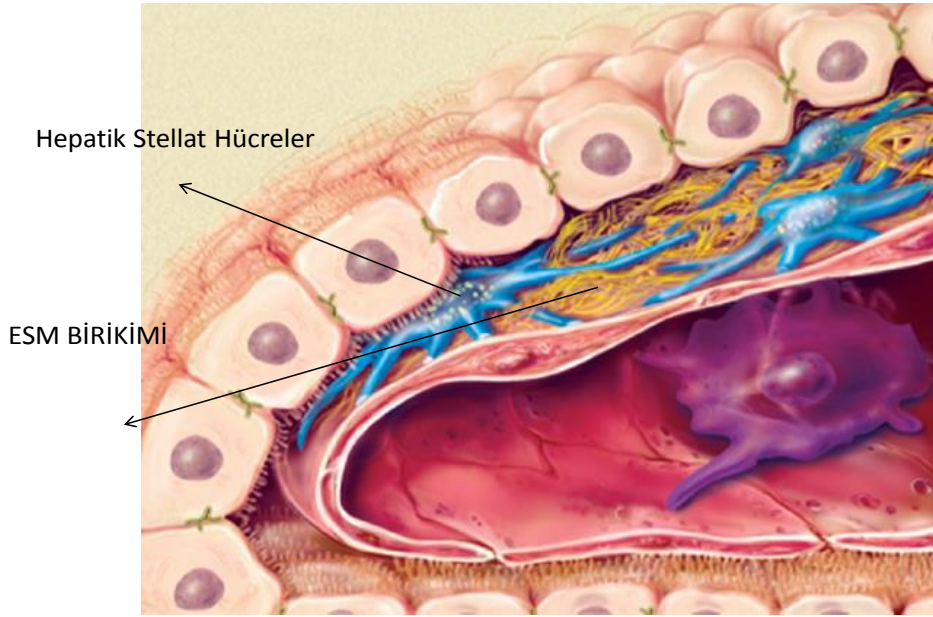
Reaktif oksijen türleri (ROS), karaciğer hasarı yaratıp karaciğer fibrozisinin başlamasında etkilidir. Oluşan oksidatif stres sonucu hepatositlerde nekrosis ve apoptosis gözlenmektedir. ROS'lar aynı zamanda HSH'lerin fibrojenik ve proliferatif bir karakter sergilemelerinde doğrudan etkiye sahiptirler (30,31).

Kanda oksijen eksikliği olarak bilinen hipoksiya da yine karaciğer fibrozisinin başlamasına neden olan etmenlerden biri olarak değerlendirilebilir. Hipoksiyanın oluşmasıyla, fibrogenezis düzenleyicisi olan HIF-1 α 'nın HSH'ler tarafından ifade düzeyinde artış meydana gelmektedir. Hipoksiyanın oluşmasıyla ayrıca, vasküler endotel hücre büyüme faktörü (VEGF) ve reseptörleri indüklenmekte ve HSH'lerde coll sentezinde artış meydana gelmektedir (32,33).

Doğuştan bağışıklığa ve adaptif bağışıklığa ait inflamatuvar hücreler de karaciğer hasarında ve fibrogeneziste etkili olmaktadır (34).

Pro-inflamatuvar ve fibrojenik uyarıcı olarak değerlendirilen programlı hücre ölümü apoptozis, kronik karaciğer hastalıklarının ortak özelliğidir (35). Meydana gelen ölü hücrelerin HSH'ler tarafından yutulması ile oksidatif radikallerde, TGF- β 1 ve coll ifadesinde artış meydana gelmektedir (36,37).

Yukarıda bahsedilen etmenler sonucu karaciğerde meydana gelen yaralanmalar HSH aktivasyonunu başlamasına neden olmaktadır. Aktifleşen HSH'lerin sergiledikleri fenotip Şekil 2.2.'de gösterilmektedir. HSH aktivasyonu temel anlamda iki kısımdan oluşmaktadır. Bunlar “başlama” ve “devam ettirme” aşamalarıdır. Eğer meydana gelen yaralanmada azalma olursa o zaman “rezolüsyon” aşaması oluşmaktadır (35).



Şekil 2.2. Aktifleşen HSH'ler ve ESM birikimi ((16)'dan yeniden düzenlenmiştir)

2.1.2.1. Başlama

Endotelial hücreler, plateletler, immün hücreler ve hepatositler gibi komşu hücre popülasyonlarından kaynaklı parakrin uyarılar HSH aktivasyonunun başlamasına ve ESM kompozisyonunda değişikliklere neden olmaktadır (16). Özellikle endotelial hücreler, erken evrede oldukça önemli bir role sahiptir. Fibronektin salgılayarak HSH aktivasyonunu arttırdıkları gibi TGF- β 'nın durgun halinden pro-fibrotik haline dönüşmesini de sağlamaktadır (35,38). Fibrojenik bir etkiye sahip olmayan fibronektinin fibrozise olan etkisi HSH'lerin hücre göçünü etkileyerek olmaktadır (39). Karaciğerdeki birçok hücre tarafından durgun halde salgılanan TGF- β , fibroziste oldukça etkili bir sitokindir (40). TGF- β bağlayıcı ve tip 1 reseptörün fosforilasyonu sonucu SMAD

proteinlerinin, genelde SMAD3 proteinin, downstream bölgesinin fosforilasyonu artmaktadır. HSH aktivasyonu ile birlikte SMAD3 proteininin aktivasyonu ile tip 1 ve tip 3 kolajenin transkripsiyonunda artış meydana gelmektedir (41,42).

Kupffer hücreleri, özellikle TGF- β 1 sitokini ve reaktif oksijen ara oksitleri/lipid peroksidaz kaynaklı matriks sentezine, hücre çoğalmasına ve HSH'lerden retinoid kaybına neden olmaktadır (43).

Plateletler, TGF- β salgılanmasına katkı sağlamakla birlikte epidermal büyüme faktörü (EGF) ve en güçlü HSH mitojeni olarak tanımlanan platelet kökenli büyüme faktörü (PDGF) gibi sitokinlerin de salgılanmasını sağlamaktadır (44,45).

HSH aktivasyonuna makrofajlar da katkı sağlamaktadır. Makrofajlar, TGF- β , tümör nekrozis faktör alfa (TNF- α), MMP-9 salgılayarak; ROS ve lipid peroksidaz üreterek matriks sentezini, hücre çoğalmasını ve retinoid kaybını tetiklemektedir (46).

Karaciğer yaralanmasını takiben zarar gören hepatositler, lipid peroksidaz ve apoptotik cisimler üreterek Fas ve tümör nekrozis faktör ilişkili apoptozis indükleyici ligand (TRAIL) aracılığıyla HSH aktivasyonunu başlatmaktadır (47).

ESM yapısı ve sertliği HSH aktivasyonuna etki göstermektedir. HSH'ler integrin ve diskoidin domain reseptörler (DDR's) olmak üzere iki farklı kolajen reseptörünün ekspresyonunu sağlamaktadır. Eksprese olan bu reseptörlerden her biri ESM'den gelen sinyalleri alarak hücre adhezyonuna, farklılaşmaya, çoğalmaya ve göçe neden olmaktadır (48-50).

2.1.2.2. Devam Ettirme

Karaciğer yaralanmasının başlamasıyla aktiveleşen HSH'ler daha sonra devam ettirme aşamasına girmektedirler. Bu aşamada ESM birikimi ve skar doku yapısı oldukça fazlaşmaktadır. HSH aktivasyonunun devam aşaması oldukça sistematik bir süreç olmakla birlikte çoğalma, fibrojeniz, matriks bozunması, retinoid kaybı, kemotaksis, kontraktilite ve immun düzenleme gibi ana olaylardan oluşmaktadır (16).

•Çoğalma

PDGF'nin HSH'lerdeki reseptöre bağlanmasıyla reseptör alt ünitesi dimerize olmaktadır. Bunun sonucunda Ras-MAPK yolak aktivasyonu, PI3K-AKT/PKB yolağı aracılığıyla sinyalizasyon ve hücre içi kalsiyum iyonlarının hareketiyle PKC ailesi aktivasyonu gerçekleşmektedir. Meydana gelen bu değişimler HSH çoğalmasına neden olmaktadır (51).

HSH aktivasyonunda etken olan bir başka sitokin ise VEGF'tir. Karaciğer sinüzoidal endotelial hücrelerden (LSECs) ve HSH'lerden salgılanan VEGF, HSH çoğalmasını arttırdığı gibi hepatik parankima dokusunda yaralanmadan kaynaklı damarlanmaya neden olmaktadır. VEGF her ne kadar pro-fibrotik bir etki yaratsa da aynı zamanda hepatik doku tamiri ve fibrosis rezolüsyonu için gerekli sitokindir (52,53).

HSH'ler tarafından salgılanan önemli epitelyal büyüme faktörü dönüştürücü büyüme faktörü alfa (TGF- α) ve EGF de HSH çoğalmasında uyarıcı etkiye sahiptir. Bu iki büyüme faktörünün salgılanması ayrıca karaciğer yenilenmesi süresince hepatosit çoğalması için önemlidir (54-56).

•Fibrogenez

ESM, özellikle tip 1 kolajen üretimi aktive olmuş HSH'ler için ayırıcı bir özelliktir. Tip 1 kolajeni ve diğer matriks yapıtaşlarının HSH'ler tarafından üretilmesinde etkili olan en önemli sitokin TGF- β 'dir (16,57).

Önemli fibrojenik sitokin olan CTGF, normal karaciğerde oldukça düşük bir seviyede bulunmaktadır. Karaciğer fibrosisinde ifade düzeyi artan CTGF, ESM oluşumuna katkı sağlamaktadır (58).

Adipoz dokular tarafından salgılanan adipokinlerden leptinin karaciğer yaralanmasında downstream etkisi Kupffer hücrelerinden TGF- β 1 salgılanmasına neden olmaktadır. Leptin eksikliğinin ortaya çıkmasıyla nörepinefrin aktivitesinde azalma meydana gelmekte daha sonra doğal katil hücrelerinin aktivesinde düşüş gözlenmektedir. Bunun sonucunda profibrojenik sitokin salınımında ve ESM üretiminde azalma meydana gelmektedir (59).

•Matriks Bozunması

Fibrotik süreçte kolajen tip IV'ten oluşan normal membran yapısı, kolajen tip I'in oluşturduğu yaralı yapıya dönüşmektedir. Fibroziste meydana gelen erken matriks bozunması oldukça önemli bir basamaktır. Ayrıca HSH'lerin yaralı bölgeye göç etmeleri için gerekli olabilmektedir (16).

Artan fibril yapısının ya da yaralı matriksin parçalanmasında oluşan aksama karaciğer fibrozisin oluşumunda belirleyici faktör olarak değerlendirilmektedir. Karaciğer fibrozisinde tip I kolajenin yıkımında rol oynayan ana proteaz MMP-1'dir. Tip IV kolajen yıkımından sorumlu olan MMP-2'nin ve MMP-9'un kaynağı bilinmesine rağmen MMP-1'in kaynağı tam olarak bilinmemektedir. HSH'ler çok az bir miktarda MMP-1 mesajcı RNA (mRNA) ifadesine neden olmaktadır (60).

Matriks bozunmasına neden olan proteazların TIMP'lere bağlanmaları sonucu inaktive olmaları kontrol mekanizması için oldukça önemlidir. TIMP'lerin karaciğer yaralanması süresince sürekli ifadeleri doku içi kolajenazların aktivitesini engellemektedir. Böylece biriken matriks bozunumunda azalma meydana gelmektedir (60,61). Stellat hücreleri TIMP-1 ve TIMP-250 üretimine neden olmaktadır. TIMP-1 ayrıca HSH'ler için anti-apoptotik bir etki yaratarak karaciğer yaralanmasında aktif HSH popülasyonunun artışına katkı sağlamaktadır (35).

•Retinoid Kaybı

HSH'ler vücuttaki retinoidin yaklaşık %60 'lık bir kısmını bulundurarak en geniş retinoid rezervini oluşturmaktadır. Retinolün retinil esterlere dönüşmesi HSH aktivasyonu için karakteristik bir özelliktir (16). Tip I kolajen ifadelerine göre izole edilen sessiz HSH'lerde retinoid kataboli sitokrom CYP251 miktarında artış, retinil ester miktarında azalış gözlenmektedir (62).

Karaciğerde bulunan tek asiltransferaz olan lesitin retinol asiltransferaz (LRAT), retinolün retinil estere esterifikasyonunu katalizlemektedir. HSH'lerin aktivasyonu ile birlikte LRAT ifadesi kaybolmaktadır. İnterlökin 1 (IL-1) uygulanması da LRAT ifadesinde azalmaya sebep olmaktadır (63).

Her ne kadar LRAT'ın HSH aktivasyonundaki rolü açık bir şekilde ortaya konmuş olsa da, LRAT eksikliği bulunan farelerde ne kendiliğinden fibrogenesis oluşumu ne de karaciğer yaralanmasında artan fibrogenesis gözlenmiştir. Böylece HSH'lerdeki retinoid kaybı sadece aktivasyon belirteci olup HSH'lerin aktive olmaları için gerekli olmadığı sonucu çıkarılabilmektedir (64).

Retinoid metabolizması ile HSH aktivasyonu arasındaki ilişkiye bakıldığında hücrel otofajinin bu süreçte gerekli olduğu anlaşılmıştır. Özellikle β -oksidasyon ile metabolize edilen retinil esterlerin hidrolizi, yağ asitlerinin açığa çıkmasına neden olmaktadır. Bu süreç de hücrel aktivasyon için gerekli enerjinin elde edilmesinde rol oynamaktadır (16,65).

•Kemotaksis

Stellat hücrelerinin kemotaksisi aktif HSH'lerin yara olan bölgeye dizilimleri için oldukça önemlidir. Stellat hücreleri öncelikli olarak kemoatraktan sitokinlere (kemokinler) doğru göç etmektedirler. Ayrıca HSH'ler çeşitli kemokin reseptörlerin ve kemokin ligandların ifadesine de neden olmaktadır (16). PDGF (66), monosit kemoatraktan protein-1 (67) ve CXCR3 (68) HSH'ler için önemli kemoatraktanlardır.

PDGF uyarılı kemotaksi, hücrelerin uçtan yayılımı, hücre gövdesinin uyarıcı maddeye karşı hareketi ve hücre protrusyonunun kısa süreli miyozin fosforilasyonu ile giderilmesi ile ilişkilidir (69).

Stellat hücrelerinin göç etmesinde etkili olan diğer bir faktör ise hipoksiyadır. Hipoksik şartların tetiklenmesiyle mitokondri tarafından ROS üretimi gerçekleşir. Üretilen ROS ERK1/2 ve JNK1/2 yollarını aktive ederek stellat hücre göçüne neden olur. Ortamda hipoksiyanın devam etmesi sonucu stellat hücreler tarafından VEGF üretimi ve salınımı gerçekleşerek HSH'lerin hareketliliklerinde artış meydana gelir (70).

Stellat hücrelerin mobilizasyonu ayrıca doku yara iyileşmesi için de gerekli bir olaydır. Disse boşluğundaki mikrortam tek başına stellat hücrelerinin göç etmesinde düzenleyici bir rol oynamaktadır. ESM bileşenlerinden MMP-2 ve tip I kolajen de yine stellat hücre göçünü arttırmaktadır (71,72).

•Kontraktilite

Stellat hücrelerinin kasılması, karaciğer hastalıklarının geç dönemlerinde oluşan portal hipertansiyon için birincil etkindir. İntrahepatik direnç, kan akışındaki artış ve karaciğer dokusunda meydana gelen bozulmalar portal hipertansiyona neden olmaktadır. Yaralanma süresince hepatik sinüzoidler HSH'ler tarafından düzenlenen morfolojik ve fonksiyonel değişimler altındadırlar. Kolajen matriks birikimi, kontraktil HSH'lerde artış ve fenestrasyon kaybı oluşan karakteristik değişimlerdir (16,73). Endotelin-1, nitrik oksit, angiotensinojen II, karbon monoksit HSH kontraktilitesi üzerinde etkilidir (74). Etki gösteren bütün bu faktörler, portal hipertansiyonun ve sinüzoidal direncin artmasına neden olmaktadır (16).

Hüresel kasılmayı arttıran başka bir olayda kalsiyum bağımlı ve kalsiyum duyarlı yollar aracılığıyla MLC-2 fosforilasyonudur. Kalsiyum duyarlı yollar HSH aracılı kasılmada ana yoldur (75).

HSH farklılaşmasında, çoğalmasında ve tip I kolajen üretiminde önemli rol sahibi olan adozin, aktin stres fiberlerinin kaybına neden olarak HSH kasılmasını engellemektedir (16).

•İmmun Düzenleme

Stellat hücreler, birbiriyle ilişkili üç farklı mekanizma ile bağışıklık hücre fonksiyonunu kontrol etmektedir (76,77). Bunlardan ilki kemokinlerin hücre yüzey ifadeleri ve / veya kemokinlerin endotelial hücrelere taşınması sonucunda lenfosit adezyonu ve ardından göçü meydana gelmektedir. Ayrıca aktif HSH'ler ICAM-1 ve VCAM-1 bağımlı adezyon ve göçe neden olmaktadır (78). Diğer bir mekanizma ise stellat hücreler tarafından üretilen kemokinler periferik kan ile karaciğer arasında kemoatraktan gradiyentinin oluşumuna neden olarak bağışıklık hücrelerinin karaciğere hareketine neden olmaktadır. Son mekanizma ise stellat hücreleri ile bağışıklık hücreleri arasındaki ilişki bu hücrelerin karaciğerde olgunlaşmaları üzerinde direkt bir etki yaratmaktadır (16). Örneğin, temas bağımlı CD54 mekanizması ile stellat hücreleri naif T hücrelerinin aktivasyonunu engeller (16).

Kalıp tanıma reseptörlerinden TLR4 ligandları ile uyarılan stellat hücreleri TGF- β sinyalizasyonunu yanı sıra inflamatuvar ve kemotaktik sitokin olan IL-6 üretimini de

arttırmaktadır (79). Portal hipertansiyonun olduğu geç fibroziste intestinal geçirgenliğin artmasıyla bağırsaklardan karaciğere doğru bakteri geçişi meydana gelmektedir. Bunun sonucunda da HSH'ler tarafından lipopolisakkarit ve TLR4 aktivasyonunda artış meydana gelmektedir (16).

Karaciğerde meydana gelen inflamatuvar tepki stellat hücrelerin aktivasyonunu ve fibrogenезisi module edebilmektedir. İnflamatuvar hücreler ile fibrojenik hücrelerin birbirlerini uyarmaları sonucu fibroziste artış meydana gelmektedir (16). Örneğin makrofajlar TGF- β 1, PDGF, MMP'ler ve TIMP'lerin salgılanmasını ve düzenlenmesine neden olarak fibroziste hem pro-fibrotik hem de anti-fibrotik bir etkiye sahiptir (46,80).

2.1.2.3. Çözünürlük

ESM sentezi ve yıkımı arasındaki dengesizlik sonucu ESM kompozisyonunda meydana gelen değişiklik karaciğer fibrozisinde oldukça önemlidir. Fibrozis süresince çapraz bağlarda artış ve fibrotik septumda kalınlaşma gözlenmektedir. Yapıda meydana gelen bu değişikliklerden dolayı ESM'nin çözünmesi zorlaşmakta ve proteazlara karşı direnç oluşmaktadır (34,81).

HSH'ler karaciğer fibrozisinde ESM'nin şekillenmesinde oldukça etkin olduğundan dolayı fibrozisin gerilemesinde HSH'lerin sessiz fenotiplerine dönmeleri, apoptozise ve senesense uğramaları oldukça önemlidir (16).

Kültür çalışmalarında, stellat hücrelerinin CD95-L ve TRAIL kaynaklı apoptozise karşı duyarlı oldukları gösterilmiştir. Ayrıca doğal katil hücreler de TRAIL aracılığıyla HSH'lerin apoptozisine indüklemektedir (82).

Sessiz HSH'lerde de ifade olan NF- κ B proteinin seviyesi, HSH aktivasyonundan sonra önemli ölçüde artış göstermektedir. Meydana gelen bu artış sonucunda proinflamatuvar ve pro-fibrotik genler olan IL-6, IL-8, MCP-1 ve ICAM1 ifadelerinde artış meydana gelmektedir. Ayrıca HSH'lerin apoptozise uğramaları da engellenmektedir (83). NF- κ B transkripsiyon faktörünün HSH'leri apoptozisten koruduğundan dolayı bu proteinlerin inhibisyonu karaciğer fibrozisinin iyileşmesi sürecini hızlandırıcı bir etki göstermektedir (84).

Telomer kısaltması ve DNA hasar cevabından kaynaklı hücre döngüsü tutuklanmasındaki kalıcılık hücresel senesens olarak tanımlanmaktadır. Senesense uğrayan HSH'ler β -galaktosidaz'ın ifadesine; p53, p21 ve p16'nın indüklenmesine; matriks üretiminin azalmasına; matriks parçalayıcı enzimlerin artışına neden olmaktadır (85,86).

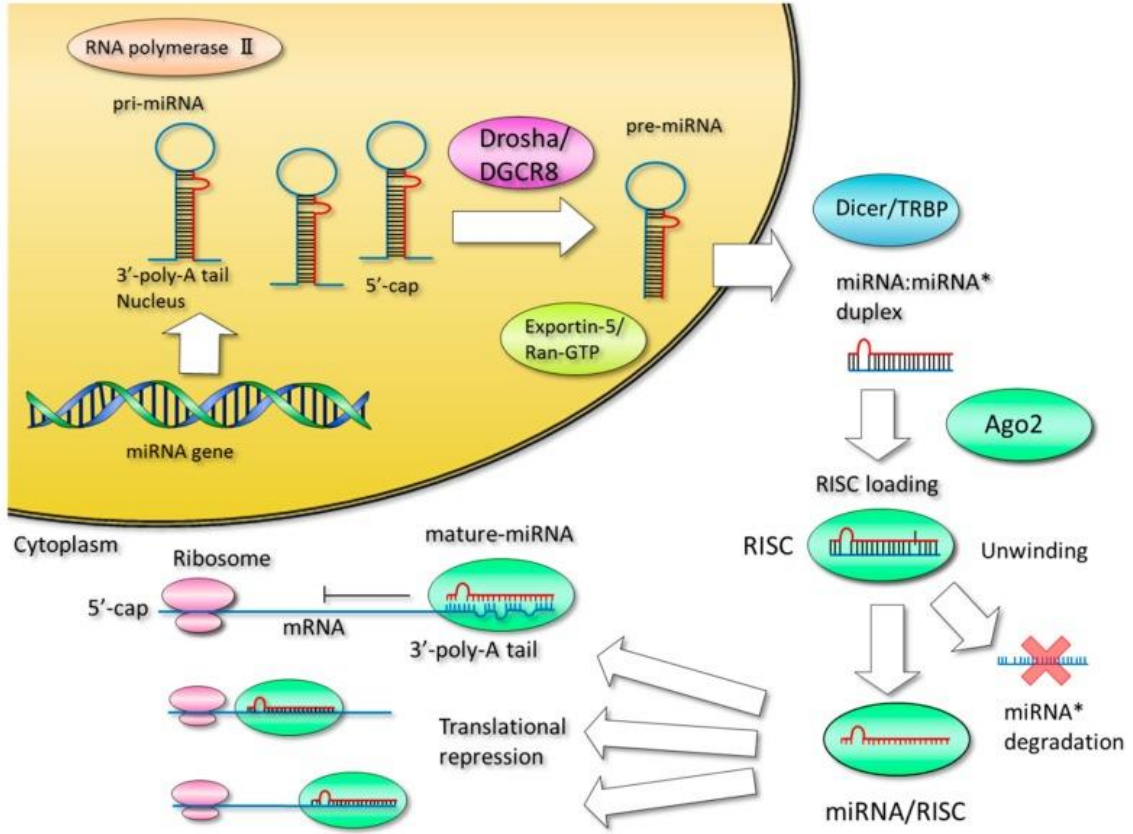
2.2. MikroRNA'LAR

Ambros ve arkadaşları 1993 yılında lin-4 genine ait olan küçük kodlanmayan transkriptin lin-14 mRNA'sını etkileyerek *C.elegans*'ın post-embroyonik gelişimini etkilediğini göstermişlerdir. Böylece miRNA kavramı ilk kez ortaya çıkmıştır (87).

miRNA'lar yaklaşık olarak 18-25 nükleotit uzunluğunda olan kısa kodlanmayan RNA parçalarıdır. Hedef mRNA'sının "3'-untranslated region" (3'-UTR) bölgesi ve çok yaygın olmamakla birlikte 5'-UTR bölgesi ile bağ kurarak mRNA'nın translasyonun baskılanmasını ya da mRNA'nın parçalanmasına neden olmaktadır. mRNA'ların yaklaşık %60'nı 3'UTR bağlanma bölgesine sahipken birçoğu birden fazla potansiyel bağlanma bölgesi içermektedir. Mevcut durumda miRBase data verilerine göre 2588 olgun insan miRNA'sı ve 1881 öncül kayıtlı bulunmaktadır (88).

2.2.1. MikroRNA BİYOGENEZİ

200 nükleotit uzunluğundaki birincil transkriptin 19-25 nükleotit uzunluğundaki olgun miRNA'ya dönüşebilmesi için birçok işlemde geçmesi gerekmektedir (89). Şekil 2.3.'te olgun miRNA'nın oluşabilmesi için gerçekleşen olaylar gösterilmiştir.



Şekil 2.3. miRNA biyogenezisi (88)

mRNA'larla benzer bir şekilde 5-cap (şapka) ve poli-A kuyruğuna sahip, birincil transkript, "hairpin" (saç tokası) yapısında olup pri-miRNA olarak adlandırılmaktadır. Drosha olarak adlandırılan RNAaz III tarafından bu yapı kesilerek 70-100 nükleotit uzunluğunda olan öncül miRNA'ya yani pre-miRNA'ya dönüşür (90). Oluşan pre-miRNA yapısı daha sonra nükleositooplazmik faktör olan Eksportin-5 tarafından çekirdekten sitoplazmaya taşınır. Eksportin-5'in taşınması Ran-guanin-trifosfat (GTP) bağımlı mekanizma ile gerçekleşmektedir. RanGTP, Eksportin-5 ve pre-miRNA'nın oluşturduğu bu üçlü yapı sitoplazmada GTP'nin hidrolize uğramasıyla ayrışır. Taşıma görevini tamamlayan Eksportin-5 daha sonra sitoplazmadan tekrar çekirdeğe döner. Sitoplazmada pre-miRNA yapısının "hairpin" ilmiği sitoplazmik Dicer enzimi tarafından kesilerek olgun miRNA dubleksisi oluşturulur. Daha sonra termodinamik kararlılıklarına göre çift zincirli miRNA'da bir zincir olgun miRNA yapısını oluşturur (91). Seçilen zincir Argonat 2 (AGO2) ile birleşerek RNA-indüklü susturma kompleksini (RISC) oluşturur. Yolcu zincir olarak adlandırılan (miRNA*), yapıya katılmayan zincir ise degradasyona uğrar (88).

miRNA'ların sahip oldukları termodinamik kararlılık RNA interferansı için oldukça önemlidir. miRNA'da bulunan yanlış eşleşmeler, boşluklar düşük iç enerjiye sahip olmalarına neden olmaktadır. Sahip oldukları bu özellik dubleksin çözünmesinde, hangi zincirin olgun miRNA olması gerektiğinde ve RNAi yolağında etkili bir hale gelmektedir. Olgun miRNA oluşumunda zincirdeki kararsızlık ve sekansta meydana gelen asimetri "sense" zincirinin seçilmesinde ve RISC kompleksi ile yapı oluşturulmasında etkilidir (89).

Hayvanlarda miRNA'ların hedef proteinlerin ifadelerini baskılamaları RNA translasyonunun hem başlama aşamasında hem de uzama aşaması süresince gerçekleşmektedir (92).

2.3. MikroRNA'LAR ve HEPATİK STELLAT HÜCRELERİ

HSH aktivasyonu, HSH çoğalması, ESM olgunlaşması gibi farklı yollarla karaciğer fibrozisinde oldukça çeşitli miRNA'lar tanımlanmıştır. Karaciğer fibrozisinde etki gösteren miRNA'lardan pro-fibrotik olanlar fibrozis süresince yüksek, anti-fibrotikler ise fibrozis süresince düşük miktarlarda bulunmaktadır (88).

HSH'lerin karaciğer fibrozisinde sahip oldukları kritik rollerinden ve miRNA'ların biyolojik eylemlerinden dolayı miRNA'lar ve HSH'ler arasındaki ilişkinin aydınlatılması oldukça önem kazanmıştır. Potansiyel anti-fibrotik miRNA'ların açığa kavuşturulması ve HSH aktivasyonundaki etkilerini saptayabilmek için yaygın olarak kullanılan yöntem aktif HSH'ler ile sessiz HSH'ler arasındaki miRNA ifade profillerinin belirlenmesidir (7).

2.3.1. ANTI-FİBROTİK MikroRNA'LAR

Sentetik oligodeoksinükleotidlerin kullanılmasıyla anti-fibrotik etkiye sahip miRNA'ların ifadelerinde artış oluşturulmaktadır. Hücreye giren mimik anti-fibrotik miRNA'nın bir zinciri oldukça kararlı bir yapıya sahip olup miRISC yapısıyla kompleks oluşturarak hedef mRNA'nın inhibisyonuna neden olmaktadır (89).

Karaciğer fibrozisinde NF- κ B yoluyla miktarı azalan miR-29, HSH aktivasyonunda artışa neden olmaktadır. HSH aktivasyonunda meydana gelen bu artış sonucu ESM miktarı artmaktadır. Fakat hepatosit büyüme faktörü TGF- β mRNA miktarını azaltarak miR-29 ifadesini indüklemektedir. miR-29a, b ve c olmak üzere bu aileye ait toplam üç çeşit miR

bulunmaktadır. Yapılan analizler sonucunda tip I kolajen ve tip IV kolajen mRNA'larının 3'-UTR bölgesinin miR-29 için hedef bölge olduğu anlaşılmıştır. Ayrıca Akt, SP-1 ve laminin gibi fibroziste önemli olan genler de yine miR-29'un hedef genleridir (89,93).

miR-150'nin ve miR-194'ün fazla miktarda ifade olması sonucu HSH çoğalmasında azalma meydana gelmektedir. Bununla birlikte fibrozis belirteci olan α -SMA ve tip I kolajen miktarlarında da düşüş gözlenmiştir. miR-150'nin C-myb ve miR-194'ün rac 1 olarak belirlenen hedef genlerinin inhibisyonu sonucunda HSH aktivasyonunda ve ESM üretiminde azalma meydana gelmektedir (94).

HSH'ler ile ilgili çoğu çalışma hayvan modelleri ve *in vitro* ortamlarda gerçekleştirilmiş olsa da hasta örnekleri kullanılmış çalışmalar da bulunmaktadır. İnsan fibrotik ve normal karaciğer dokusunda yapılan çalışmada miR-144 ile TGF- β 1 seviyeleri araştırılmıştır. Ortamda TGF- β 1 seviyesinde artış olduğunda miR-144 ifadesinde azalma meydana gelmektedir. Böylece hepatik fibrogenesis süresince miR-144'ün TGF- β 1 seviyesinde değişikliğe neden olarak HSH aktivasyonunu etkilediği anlaşılmıştır (95).

Anti-fibrotik etkiye sahip olan diğer bir miRNA da miR-146a'dır. miR-146a için SMAD4 hedef mRNA'dır. Böylece pro-fibrotik TGF- β yolağının etkisinde azalma meydana gelmektedir. Ayrıca HSH çoğalmasında düşüşe ve HSH apoptozisinde artışa neden olmaktadır. miR-17-92 kümesine ait 19a, 19b ve 92a miRNA'lar da fibroziste oldukça etkilidir. Bu miRNA'ların ifadesi aktif HSH'lerde oldukça düşüktür. miR-19b ile transfekte edilen hücrelerde TGF- β reseptör II miktarında azalma meydana gelmektedir. Ayrıca miR-19b'nin SMAD3 ifadesinde düşüşe neden olmasıyla da TGF- β sinyali inhibe olmaktadır. miR-19b'nin bu etkileri sonucu HSH farklılaşması etkilenecek miyofibroblast belirteci α -SMA ifadesinde azalma meydana gelmektedir (89).

İnsan karaciğerinde en yaygın bulunan miRNA, miR-122'dir. Aktif HSH'lerde ve fibrotik karaciğerde miktarı azalan miR-122'nin hedef mRNA'sı olan P4HA1 kolajen olgunlaşmasında düzenleyici bir role sahiptir. miR-122'nin fazla miktarda ifade olması HSH aktivasyonu ve çoğalmasını engellemektedir. Ayrıca kolajen üretiminin de inhibisyonuna neden olmaktadır (89).

2.3.2. PRO-FİBROTİK MikroRNA'LAR

Normal düzeyinden fazla miktarda ortamda bulunan miRNA biyolojik yollarda oldukça önemli değişikliklere neden olmaktadır. Hedef miRNA'ların inhibisyonu antagomir veya anti-miR olarak adlandırılan sentetik dizilerle spesifik bağlanma ilkesine dayanmaktadır. Anti-miR'ler hedef miRNA'nın komplementeri şeklindedir. Ayrıca Ago2 ayrılma bölgesinde yanlış eşleşme veya Ago2 ayrılıminin engellenmesi için baz modifikasyonlarına neden olmaktadır. Anti-miR'lerin hedef miRNA'lar üzerindeki bu etkisi onların karaciğer fibrozisinde önemli rolleri olduğunu göstermektedir (89).

Yapılan bir çalışmada aktif HSH'lerde miR-222 ifadesinin oldukça fazla miktarda olduğu gözlenmiştir. miR-222'nin miktarı ile biliyer atrezi rahatsızlığı arasında ilişki olduğu saptanmıştır. Bu hastalığın erken safhasında safra kanalının normal açıklıkta olmaması ile birlikte inflamasyon ve hepatik portal bölgede fibrozis meydana gelmektedir. miR-122 ifadesinin artması Akt yolağının aktivasyonuna neden olmaktadır. Fosforlanmış Akt mitokondriyel sitokrom-c'nin salınımını engellemekte ve kaspaz-9'un aktive olmasını sağlamaktadır. Meydana gelen bu olaylar sonucu HSH apoptozisi engellenmekte ve HSH çoğalması sağlanmaktadır (96).

PDGF-BB indüklü karaciğer fibrozisinde miR-21 ifadesinde artış meydana gelmektedir. miR-21 karaciğer fibrozisi dışında çeşitli organlarda da fibrozise neden olmaktadır. miR-21'in karaciğer fibrozisindeki etkisinin PTEN/Akt yolağını düzenlemek olduğu yapılan bir çalışmada gösterilmiştir (89). Ayrıca başka bir çalışmada TGF- β sinyalinin negatif olarak düzenleyen SMAD7 miR-21'in hedef mRNA'sını oluşturmaktadır. Bu nedenle miR-21'in ortamda aşırı miktarda bulunması TGF- β sinyalinin artmasına neden olarak fibrojenезisi geliştirmektedir (89).

HSC-T hücre hattı ile yapılan bir çalışmada TGF- β 1 ile indüklenmiş hücrelerde miR-181a ve miR-181b miktarının arttığı gözlenmiştir. Çoğalma düzenleyicisi olan miR-181b hücre döngüsünü etkileyerek HSC-T6 hücrelerinin çoğalmasını indüklemektedir. Hücre döngüsünün gelişiminde etkili olan p27 proteininin 3'-UTR bölgesinde miR-181a ve miR-181b için bağlanma bölgesi bulunmaktadır. miR-181b p27 mRNA'sına bağlanarak HSC-T6 hücrelerinde ifade miktarında azalmaya neden olmaktadır (97).

2.4. ADAY MikroRNA'LAR ve HEDEF GENLERİNİN KARACİĞER FİBROZİSİ İLE İLİŞKİLENDİRİLMESİ

Belirlenen aday miRNA'lerden bir kısmı karaciğer fonksiyonları üzerinde etki gösterebilecek olan kolesterol ve lipid metabolizmasında rol oynarken bir kısmı da karaciğer morfolojisi ve fonksiyonu üzerinde etki göstermektedir.

Öncelikli olarak inflamasyonla ilişkili olan miR-223 hücrel kolesterolün düzenlenmesinde rol oynamaktadır. Yüksek yoğunluklu lipoprotein-kolesterol (HDL-C) alımını ve kolesterol biyosentezinin inhibisyonunda etki göstermektedir. Ayrıca kolesterol metabolizmasında etkili olan ABCA1'i de indirekt yoldan etkileyerek kolesterol akışını etkilemektedir (98). miR-223 ve hücre içi demir metabolizmasında düzenleyici olan IRP1 geni ile yapılan çalışmada miR-223 ifadesinin artışıyla hepatik IRP1 ifadesinde azalma meydana gelmiştir. Demir metabolizmasında meydana gelen bu değişim karaciğer fibrozisinin artmasına neden olmuştur (99). miR-223 için belirlenen hedef geni PARP1 arasındaki ilişki Barrett özofagus hastalığında gösterilmiş ve PARP1'in hedef alınmasıyla kemoterapiye duyarlılık incelenmiştir. Bu çalışmaya göre miR-223 ifadesinin artması sonucu PARP1 ifadesinde azalma meydana gelmekte ve hücrelerde kemoterapi duyarlılığında artış meydana gelmektedir (100).

RNA interferans yolağında önemli bir role sahip olan Dicer enzimi embriyo gelişiminde ve tümörlerde bozulmalara neden olmaktadır. Dicer'in mRNA ve protein ifadelerinin inhibisyonu sağlanarak HSH aktivasyonu ile ilişkisi ortaya çıkartılmıştır. Dicer'in inhibisyonu sonucunda miR-138 miktarında azalma meydana gelmektedir. Ayrıca HSH aktivasyonunda inhibisyon oluşarak fibrozis ilişkili genlerde azalma meydana gelmektedir (101). miR-138 ile hedef geni SIRT1 arasındaki ilişki fare çalışmalarında gösterilmiştir. Yapılan bu çalışmaya göre miR-138'in SIRT1 genini baskılaması sonucunda yumuşak kas hücrelerinin çoğalmasında ve göç etmesinde artışa neden olmaktadır (102).

Hepatik miyofibroblastlarda meydana gelen transdiferansiyon karaciğer fibrogenesisini tetiklemektedir. HSH'lerin miyofibroblast transdiferansiyonu miR-132'nin de içinde bulunduğu birçok düzenleyici faktörün rol oynadığı yolak aracılığıyla gerçekleşmektedir. miR-132 miktarında meydana gelen artış karaciğer fibrozisinde azalmaya sebep olmaktadır (103). Adipositlerde miR-132 miktarının SIRT1 regülasyonunda etkili olduğu

gösterilmiştir. miR-132 miktarında meydana gelen artış sonucu SIRT1 ifadesinde azalma meydana gelerek IL-8 ve MCP-1 indüksiyonuna neden olur böylece glukoz metabolizmasını etkilemektedir (104).

Normal HSH'lerde oldukça fazla miktarda bulunan transkripsiyonel faktör PPARG, HSH aktivasyonunda ve fenotip değişiminde rol oynamaktadır. HSH aktifleşmesi süresince PPARG miktarında ciddi bir düşüş gözlenmektedir. Bunun sonucunda da HSH'lerde miyofibroblast fenotipine transdiferansiyon meydana gelmektedir. HSC-T6 hücre hattında miR-130a, PPARG mRNA'sının 3'-UTR kısmını hedef alarak PPARG ifadesini azaltmaktadır. Bunun sonucunda da ESM genlerinde artış gözlenmektedir (105).

miRNA'ların anormal ifadeleri hastalık durumları ile yakından ilgilidir. HCV'li hastalarda yapılan çalışmada miR-758 ifadesinde patojen tanıma reseptörleri TLR3'e ve TLR7'ye bağlı olarak bir artış gözlenmiştir (106). miR-758, makrofajlar, hepatositler ve astrosit gibi farklı hücre hatlarında ABCA1'in post-transkripsiyonel düzenlemesinde rol oynamaktadır. Böylece apolipoprotein A1'e kolesterol akışını engellemektedir (107).

3. GEREKÇE ve AMAÇ

Karaciğer fibrozisi, hasta yaşam kalitesini oldukça düşüren ve ilerlemesi durumunda ciddi problemleri de beraberinde getiren önemli bir rahatsızlıktır. Yapılan çalışmalarda karaciğer fibrozisinde kritik role sahip olan HSH'ler üzerine odaklanılmıştır. miRNA'ların hücre biyolojisindeki etkilerinin keşfedilmesiyle birlikte, miRNA ve HSH arasındaki ilişkiye dayanan oldukça fazla sayıda çalışma yapılmıştır. miRNA'ların HSH'ler üzerindeki etkisi anti-fibrotik ve pro-fibrotik olmakla birlikte etki mekanizması farklı genler ve farklı yollar üzerinden olduğu için oldukça çeşitlilik göstermektedir (1,16,88,89). Veri tabanlarında belirlenen miRNA'lardan halen HSH'ler üzerine olan etkisi tam olarak açıklığa kavuşturulmayan oldukça fazla sayıda miRNA bulunmaktadır. Bu bağlamda bu tez çalışmasında karaciğer fibrozisi çerçevesinde miR-132'nin, miR-138'in, miR-223'ün, miR-130a'nın ve miR-758'in etkisi ilk kez insan HSH hücre hattı olan LX-2'de çalışılması amaçlanmıştır. Bu tez çalışmasının diğer bir amacı da seçilen bu miRNA'ların belirlenen SIRT1, PARP1, PPARG ve ABCA1 hedef genleri olan ilişkileri yine karaciğer fibrozisi açısından değerlendirilmesidir.

4. MATERYAL ve YÖNTEM

4.1. MATERYAL

4.1.1. HÜCRE HATTI

Çalışmada insan hepatik stellat hücre hattı LX-2 kullanılmıştır. LX-2 hücre hattı Prof. Dr. Scott L. Friedman'dan (Icahn School of Medicine at Mount Sinai, New York) yazılı izin alınarak temin edilmiştir.

4.1.2. KİMYASALLAR

DMEM (Millipore, Kat no: SLM-021B-B)

OPTİ-MEM (Gibco, Kat no: 31985070)

FBS (Biowest, Kat no: S181G-500)

PBS (Biochrom, Kat no: L1825)

DMSO (AppliChem, Kat no: A3672,0250)

Penisilin-Streptomisin (Sigma, Kat no: P4333)

Lipofectamine 2000 (ThermoFisher Scientific, Kat no: 11668019)

Prestained Protein Marker (Cell Signaling, Kat no: 13953)

Yağsız Süt Tozu "Nonfat Dry Milk" (Cell Signaling, Kat no: 9999)

TGF- β (Cell Signaling, Kat no: 8915)

4.1.3. KİTLER

miRNeasy Mini Kit (Qiagen, Kat no: 217004)

Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit (Roche, Kat no:04897030001)

LightCycler® 480 Probes Master (Roche, Kat no:04707494001)

Pierce™ BCA Protein Assay Kit (ThermoFisher, Kat no: 23225)

TGX Stain-Free™ FastCast™ Akrilamid Kit, %10 (Bio-Rad, Kat no:1610183)

Trans-Blot® Turbo™ RTA Mini Nitrocellulose Transfer Kit (Bio-Rad, Kat no: 1704270)

4.1.4. TAMPONLAR

RIPA 10X (Cell Signaling, Kat no: 9806)

TGS 10X (Bio-Rad, Kat no: 1610732)

Blue Loading Buffer Pack (Cell Signaling, Kat no: 7722)

TBST 10X (Cell Signaling, Kat no: 9997S)

4.1.5. mRNA PRİMER-PROB DİZİLERİ

Eş zamanlı PZR araştırmasında kullanılan primerlerin gen adları, forward (ileri), geri (reverse) dizileri ile probe dizileri Çizelge 4.1.'de gösterilmektedir.

Çizelge 4.1. Kullanılan primer-prob dizileri

Gen	Primer-Prob dizisi (5'>3')	Referans
COL1A1	F: CAATCACCTGCGTACAGAACGCC	(108)
	R: CGGCAGGGCTCGGGTTTC	
	Prob: CAGGTACCATGACCGAGACGTG	
PPARG	F: TGTGTGGAGACCGGCCA	(109)
	R: CGCAGAATGGTGTCTGGA	
	Prob: GCCTCATGAATGTGCCCCAGGTAGAA	
SIRT1	F: AGAGCCTCACATGCAAGCTCTAG	(110)
	R: GCCAATCATAAGATGTTGCTGAAC	
	Prob: ACTGGACTCCAAGGCCACGGATAGGT	
ABCA1	F: CCTGACCGGGTTGTTCCC	(111)
	R: TTCTGCCGGATGGTGCTC	
	Prob: ACATCCTGGGAAAAGACATTCGCTCTGA	
α-SMA	F: GGAATGGGACAAAAAGACA	Tasarım
	R: GTTGGTGATGATGCCATGTT	
	Prob: GGGTGACGAAGCACAGAGCA	

Çizelge 4.1. (devam)

PARP1	'custom single' primer prob Kat no: 05532957001	Roche
ACTB	'custom single' primer prob Kat no: 05532957001	Roche

4.1.6. miRNA PRİMERLERİ

LX-2 hücrelerine transfekte edilen miRNA dizileri Çizelge 4.2.'de gösterilmiştir.

Çizelge 4.2. Kullanılan miRNA dizileri

miRNA	Dizisi (5'>3')	Üretici Firma
Has-miR-138-5p	AGCUGGUGUUGUGAAUCAGGCCG	Qiagen
Hsa-miR-758-5p	GAUGGUUGACCAGAGAGGAGCACAC	Dharmacon
Hsa-miR-758-3p	UUUGUGACCUGGUCCACUAACC	Qiagen
Hsa-miR-223-3p	UGUCAGUUUGUCAAAUACCCCA	Qiagen
Hsa-miR-223-5p	CGUGUAUUUGACAAGCUGAGUU	Dharmacon
Hsa-miR-132-5p	ACCGUGGCUUUCGAUUGUUACU	Dharmacon
Hsa-miR-132-3p	UAACAGUCUACAGCCAUGGUCG	Qiagen
Hsa-miR 130a-3p	CAGUGCAAUGUUAAAAGGGCAU	Qiagen
miRNA mimik negatif kontrol	Kat no: CN0010000105	Dharmacon

4.1.7. BİRİNCİL ve İKİNCİL ANTİKORLAR

Western blot araştırmasında kullanılan birincil antikolar; β -aktin fare monoklonal antikoru (Cell Signaling, Kat no: 3700), SIRT1 fare monoklonal antikoru (Cell Signaling, Kat no: 8469 ve kolajen 1 tavşan monoklonal antikoru (ABCAM, Kat no: ab138492) kullanılan

ikincil antikolar; IRDye® 680RD goat anti mouse IgG (LI-COR, Kat no: 926-68070) ve IRDye ® 800RD goat anti rabbit IgG (LI-COR, Kat no: 926-32211) poliklonal antikolarıdır.

4.2. YÖNTEM

4.2.1. HEDEF GENLERİN BELİRLENMESİ

Yapılan literatür taraması ve <http://www.targetscan.org> adresinden yararlanılarak aday miRNA'ların hedef genleri belirlenmiştir. Belirlenen miRNA'lar hedef genlerinin eşleşmesi Şekil 4.1.'de verilmiştir.

	Predicted consequential pairing of target region (top) and miRNA (bottom)
Position 244-251 of PARP1 3' UTR hsa-miR-223-3p	5' ...UUGCCAGGUAGAUAAAACUGACA... 3' ACCCCAUAAACUGUUUGACUGU
Position 32-39 of SIRT1 3' UTR hsa-miR-138-5p	5' ...GUACAGGAAUUGUUC-CACCAGCA... 3' GCCGGACUAAGUGUUGUGGUCGA
Position 1680-1686 of SIRT1 3' UTR hsa-miR-132-3p	5' ...GGCAUAUGUUUUGUAGACUGUUU... 3' GCUGGUACCGACAUCUGACAAU
Position 272-279 of PPARG 3' UTR hsa-miR-130a-3p	5' ...UUUCCUUCUCCAGUUGCACUA... 3' UACGGGAAAAUUGU-AACGUGAC
Position 3272-3279 of ABCA1 3' UTR hsa-miR-758-3p	5' ...GUUGUAAUAAUAGAGUCACAAA... 3' CCAUCACCGUCCAGUGUUU

Şekil 4.1. Aday miRNA'lar ve hedef gen eşleşmeleri

4.2.2. HÜCRE KÜLTÜRÜ ÇALIŞMASI

Hücre kültürü çalışmasına başlamadan önce Faster BH 2004 hava akımlı kabin çalıştırıldı. Memmert su banyosu 37°C'ye ayarlanarak DMEM, FBS, penisilin-streptomisin ve glutamin ısıtıldı. Besiyerinin hazırlanması için gereken solüsyonlar hava akımlı kabin içine alınmadan %70'lik etil alkolle temizlendi. 500ml olan DMEM'den 60ml çekilip atıldı ve 440ml DMEM elde edildi. Bu DMEM'in içerisine 50ml FBS (%10), 5ml penisilin-streptomisin (1X) ve 5ml glutamin (1X) eklendi. 440ml DMEM, 5ml glutamin (1X), 5ml

penisilin-streptomisin (1X), 50ml %10'luk FBS ile hazırlanan çözme besiyerinin sıcaklığı hücrelere uygulanmadan önce 37°C olarak ayarlandı.

LX-2 hücreleri kriyotüpler içinde sıvı azottan çıkarıldıktan sonra 37°C'de su banyosunda çözüldü. Çözme aşamasında az bir miktar katı kütle bırakıldı. Daha sonra vakit kaybetmeden etrafı %70'lik etil alkolle silindi ve hava akımlı kabin içine alındı. 1ml'lik pipetle 15ml'lik tüpe köpürtmeden taşındı. Üzerine yavaşça 9ml çözme besiyeri eklendi. Daha sonra yavaşça al ver yapıldı. 300g'de 3dk santrifüj edildi. Sıvı kısım dikkatlice alındı. Çökelti tekrar çözme besiyeri içinde çözüldü. Daha sonra T75 flasklara alındı ve 37°C'de %5'lik CO₂ içeren Sanyo inkübatöre bırakıldı. Ertesi gün hücrelere önceden sıcaklığı 37°C'ye getirilmiş büyüme besiyeri verildi. Büyüme besiyeri hazırlamak için 500ml DMEM üzerinden 20ml çekilip atıldı üzerine 10ml FBS (%2), 5ml penisilin-streptomisin (1X), 5ml glutamin (1X) eklendi. Hücreler kontrol edilerek besiyeri değiştirildi.

Hücreler yüzey alanını %80 oranında kapladığında pasajlama işlemi yapıldı. Pasajlama için flasklar inkübatörden hava akımlı kabine alındı. Büyüme besiyeri hücrelerin yüzeylerinden çekildi üzerine 3ml PBS eklendi ve hücre yüzeyi yıkandı. PBS ortamdan uzaklaştırıldı ve 1ml tripsin eklendi Tripsinin hücrelerin tüm yüzeylerine değmesi için flask sağa sola eğilerek tripsin gezdirildi. 5dk 37°C'lik inkübatörde bekletildi. Daha sonra flaskın yan tarafına hafifçe vuruldu ve hücrelerin yapıştıkları yüzeyden ayrılmalari sağlandı. Önceden 37°C'ye gelmesi beklenmiş büyüme besiyeri 8ml eklendi. Pipetleme ile hücreler dikkatlice yüzeyden kaldırıldı ve 15ml'lik tüplere alındı. 300g'de 3dk santrifüj edildi ve üstte kalan sıvı kısım atıldı. 2ml büyüme besiyeri ile çökelti dikkatlice çözüldü ve flasklara alındı. Üzeri büyüme besiyeri ile tamamlandı. Her bir T75 flask için ekim sırasında 3×10^5 hücre kullanılmış ve hücreler faz kontrast mikroskopuyla Thoma lamı kullanılarak sayılmıştır.

4.2.3. LX-2 HÜCRELERİNDE FİBROZİS ORTAMININ OLUŞTURULMASI

Normal HSH'lerde karaciğer fibrozis ortamının oluşturulabilmesi için hücrelere 0ng, 5ng, 15ng, 50ng ve 100ng olmak üzere farklı konsantrasyonlarda TGF- β verilmiştir. TGF- β ile muameleden sonra 24, 48 ve 72 saatlik farklı sürelerde hücreler toplanarak eş zamanlı PZR analizi ile fibrozis belirteci olan COL1A1 ifade düzeyi ölçülmüştür. Elde edilen ölçümler

sonucunda COL1A1’de en düşük Ct değerine yani en yüksek amplifikasyona 50ng TGF- β ile muamele edilen ve 24 saat sonra toplanan hücrelerde ulaşılmıştır.

4.2.4. TRANSFEKSİYON

T75 flasklarda büyümesi gerçekleşen hücrelere araştırılacak miRNA’ların transfeksiyon işleminden önce transfeksiyon süresi ve uygulanacak derişimler optimize edilmiştir. Transfeksiyon işleminin başarılı bir şekilde gerçekleşip gerçekleşmediğini belirleyebilmek için yeşil florasan protein (GFP) ekspresyonu gerçekleştirebilme kapasitesine sahip plasmid olan pGFP, Lipofectamine 2000 ile hücrelere transfekte edilmiştir. Optimizasyon çalışmasında 3’erli tekrarlar şeklinde 0nM, 50nM, 60nM, 75 nM, 100nM ve 200nM şeklinde farklı derişimlerle miRNA transfeksiyonu yapılmıştır. Seçilen miRNA’ların hedef genleri ve fibrozis belirteçlerinin eş zamanlı PZR sonuçlarında ‘delta delta Ct’ ($\Delta\Delta Ct$) değerleri yorumlanarak uygulanacak miRNA derişimi 200nM olarak belirlenmiş ve çalışmaya bu derişim uygulanarak devam edilmiştir.

Thoma lamı kullanılarak gerçekleştirilen hücre sayımı sonucunda her bir kuyucukta 5×10^4 hücre olacak şekilde ekim yapıldı. 24 saat %10’luk FBS bulunduran DMEM ortamında hücreler çoğaltıldı. 24 saatin sonunda Lipofectamine 2000 ile hücrelere pGFP transfeksiyonu yapıldı. Transfeksiyon aşamasında besiyeri OPTI-MEM besiyeri ile değiştirildi ve 6 saat sonra ortamdaki OPTI-MEM kuyucuklardan uzaklaştırılarak yerine %5’lik FBS bulunduran DMEM verilmiş ardından 24 saat beklenmiştir. Optimize edilen bu şartlar altında araştırılması amaçlanan tüm miRNA mimiklerinin transfeksiyonu yapılmıştır. Transfeksiyonlar, pGFP’nin transfeksiyonu ile birlikte kotransfeksiyon şeklinde gerçekleştirilmiştir.

4.2.5. TOTAL RNA İZOLASYONU ve EŞ ZAMANLI PZR ÇALIŞMASI

Sessiz halde bulunan LX-2 hücrelerine TGF- β verilerek aktivasyonları sağlanmıştır. Aktivasyonu gerçekleşen stellat hücrelerinin fibrozis belirteci olarak belirlenen α -SMA ve tip I kolajen ifadelerini arttırdığı bilinmektedir. Çalışmada kullanılacak TGF- β miktarının belirlenmesi için optimizasyon çalışması yapılmıştır. α -SMA ve tip I kolajen ifade düzeyleri eş zamanlı PZR’de değerlendirilmiş ve tip I kolajen mRNA düzeyinin daha tutarlı sonuçlar verdiği anlaşılmış ve çalışmanın devamında fibrozis belirteci olarak tip I

kolajeni değerlendirilmiştir. Optimizasyon çalışması için 6 kuyucuklu deney plakalarına farklı konsantrasyonlarda (0ng, 5ng, 15ng, 30ng, 50ng ve 100ng) TGF- β verilmiş ve uygun sürenin belirlenebilmesi için 24, 48 ve 72 saat sonra hücreler toplanmıştır. Toplanan hücreler daha sonra Qiagen firmasına ait RNeasy mini kit kullanılarak üretici firma protokolüne uygun olarak Hettich Mikro 200R santrifüj cihazı kullanılarak hücrelerden total RNA izolasyonu yapılmıştır. Elde edilen total RNA'dan daha sonra Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit (Roche, Almanya) kullanılarak yine üretici firma protokolüne uygun olarak Applied Biosystems 2720 Thermal Cycler cihazında cDNA sentezi yapılmıştır. Daha sonra LightCycler® 480 Probes Master (Roche, Almanya) kiti üretici firma protokolüne uygun kullanılarak Roche LightCycler480 cihazında optimize edilmiş koşullarda amplifikasyonu gerçekleştirilmiştir. Eş zamanlı PZR çalışmasında internal kontrol olarak aktin geni kullanılmıştır. Optimizasyon çalışmasında her bir koşul 2'li tekrarlar şeklinde çalışılmıştır. Yapılan analizlerde 50ng konstrasyon TGF- β uygulamasının ve deney süresinin 24 saat olarak belirlenmesi sonucunda fibrozis belirteci tip I kolajenin en düşük Ct değerine yani en yüksek amplifikasyona sahip olduğu görülmüştür. Bu yüzden ileriki deneylerde bu koşullar kullanılmıştır.

miR-223'ün hedef geni PARP1, miR130a'nın hedef geni PPAR γ , miR-138'in ve miR-132'nin hedef geni SIRT1, miR-758'in hedef geni ABCA1 olarak eş zamanlı PZR analizi yapılmıştır. Tüm çalışmalarda negatif miRNA mimik ve ilgili miRNA'lar 3'er tekrar şekilde uygulanmıştır. Çalışmada referans olarak TGF- β ve herhangi bir miRNA ile muamele edilmemiş örnekler kullanılmıştır.

4.2.6. PROTEİN İZOLASYONU

TGF- β ile indüklenmiş LX-2 hücreleri %5'lik FBS içeren DMEM besiyerinde 72 saat bekletildikten sonra RIPA tamponu kullanılarak hücrelerin toplanması gerçekleştirildi. Toplama işleminde hücreler ilk önce 1X PBS tamponu ile yıkandı. 6 kuyucuklu deney plakalarının her bir kuyusuna 200 μ l 1X RIPA tamponu koyuldu ve 5dk buz üzerinde bekletildi. Hücreler daha sonra hücre kazıyıcı olan 'scraper' (Sarstedt, Kat no: 83.1830) ile kaldırıldı ve MagNA Lyser Green Beads (Roche) tüplerine alındı. Tüplere alınan hücreler daha sonra snMagNA Lyser (Roche) cihazı kullanılarak 7-10sn hücrelerin parçalanması

sağlandı. Ekstrat daha sonra Hettich Mikro 200R cihazında +4°C’de 10dk 14000g’de santrifüj edildi. Oluşan sıvı kısım alınarak analiz edilene kadar -20°C’de bekletildi.

4.2.7. PROTEİN MİKTARLARININ BELİRLENMESİ

Analiz edilecek proteinlerinin miktarlarının belirlenebilmesi için Pierce™ BCA Protein Assay Kit kullanıldı. Üretici firmanın kullanma protokolüne uygun olarak deney gerçekleştirildi. Standart grafiği elde edebilmek için farklı miktarlarda BSA ve çift distile su (ddH₂O) kullanılarak 9 adet farklı konsantrasyonlarda dilüsyonlar elde edildi. Oluşturulan standart sayısı, çalışılacak protein sayısı ve tekrar sayısına bağlı olarak ve her bir mikropak kuyusuna örnek başına 200µl çalışma reaktifi koyacak şekilde hesaplama yapılarak stok çalışma reaktifi hazırlandı. Çalışma reaktifinin hazırlanmasında 50:1 oranında kit içinde bulunan reaktif A solüsyonu ile reaktif B solüsyonu karıştırıldı. Mikropak kuyucuklarına 25µl miktarında standartlar ve araştırılacak proteinler koyuldu. Üzerlerine 200µl çalışma reaktifi eklendi. Daha sonra deney plakası 30dk boyunca çalkalayıcıda çalkalandı ardından üzeri kapatılarak 37°C’de 30dk inkübe edildi. Deney plakası analiz için Perkin Elmer 1420 Multilabel Counter Victor 3V cihazına yüklendi ve 562nm dalga boyunda okuma gerçekleştirildi. Belirlenen BSA konsantrasyonlarına karşı elde edilen absorbans değerleri kullanılarak standart doğrusal grafik oluşturuldu. Bu grafikten elde edilen eğim değerine göre miktarı bilinmeyen proteinlerin miktar tayini yapıldı.

4.2.8. WESTERN BLOT ANALİZİ

TGX Stain-Free™ FastCast™ Akrilamid ticari kiti kullanılarak %10’luk jel hazırlandı. ‘Stacking’ olarak adlandırılan üst jel istifleme jeli 1ml istifleme solüsyonu A, 1ml istifleme solüsyonu B, 10µl %10’luk APS ve 2µl TEMED ile hazırlandı. ‘Resolver’ jel olarak adlandırılan alt jel çözücü jeli 3ml çözücü A solüsyonu, 3ml çözücü B solüsyonu, 30µl %10’luk APS ve 3µl TEMED ile hazırlandı. Hazırlanan solüsyon 1mm’lik cam levhaya yüklendi ve uygun tarak yerleştirildikten sonra jelin donması için yaklaşık 45dk kadar beklenildi. Daha sonra jel yürütme için Mini-PROTEAN® Tetra System (Bio-Rad) tankına yüklendi. Hazırlanan 1X TGS solüsyonu yürütme tamponu olarak kullanıldı. Yürütme işlemi 100V’ta yaklaşık 120dk gerçekleştirildi.

4.2.8.1. Örneklerin Hazırlanması

Analiz edilecek proteinlerin protein miktar tayini yapıldıktan sonra her kuyucukta 25µg olacak şekilde hesaplamalar yapıldı ve uygun miktarda yükleme tamponu ile karıştırılarak 95°C’de 5dk Applied Biosystems 2720 Thermal Cycler cihazında proteinlerin denatürasyonu gerçekleştirildi. 3X indirgeyici SDS yükleme tamponu hazırlamak için Blue Loading Pack içinde yer alan 30X DTT indirgeyici ajandan 1/10 hacim ve 3X SDS yükleme tamponundan 1 hacim karıştırılmıştır. Elde edilen tampon daha sonra ddH₂O ile 2X olacak şekilde seyreltilmiştir. Denatürasyonu gerçekleştirilen proteinler daha sonra 16000g’de 1dk santrifüj edilmiştir. 20µl hacim örnek 5µl hacim prestained protein belirteci kuyucuklara yüklendi.

4.2.8.2. Proteinlerin Nitroselüloz Membrana Transferi

Jelin nitroselüloz membrana transferinin gerçekleştirilmesi için Trans-Blot® Turbo™ RTA Mini Nitrocellulose Transfer kiti kullanıldı. Kit içerisinde bulunan 10X transfer tamponu 1X olarak hazırlandı. Ardından yine kit içerisinde bulunan nitroselüloz membran 30ml 1X transfer tamponunda 3dk bekletildi. Benzer şekilde kit içerisinde bulunan transfer yığını 50ml 1X transfer tamponunda 3dk bekletildi. “Trans-Blot® Turbo™ Transfer System” cihazının transfer kasetine altta bir adet transfer yığını, üstüne nitroselüloz membran, üstüne jel ve en üste tekrar transfer yığını oluşacak şekilde katman hazırlandı. Transfer koşulu tip I kolajen ve β-Aktin için 1.0A, 25V, 17dk, SIRT1 ve β-Aktin için 1.3A, 25V, 7dk olacak şekilde belirlenmiştir. Transfer işlemi tamamlandıktan sonra ponceau S boyası ile membran boyanıp ilgili bantlar kontrol edildi. Membran daha sonra ddH₂O ile yıkandı.

4.2.8.3. Membran Bloklaması

Membranla antikolar arasında oluşabilecek spesifik olmayan bağlanmaları en aza indirebilmek için transfer işleminden sonra membran yönü değiştirilmeden alındı ve 1X TBST ile hazırlanan %5’lik yağsız süt tozu içinde oda sıcaklığında 1 saat boyunca Heidolph Unimax 1010 çalkalayıcısında bloklandı.

4.2.8.4. Birincil Antikorların Uygulanması

Kullanılacak birincil antikorlardan SIRT1 ve β -Aktin için 1/1000 oranında, tip I kolajen için 1/5000 oranında %5'lik yağsız süt tozu ile dilüsyonlar hazırlandı ve +4°C'de 16 saat hafif çalkalanarak inkübe edildi. Ardından membranlar 3'er kez 10dk 1X TBST solüsyonu ile yıkandı.

4.2.8.5. İkincil Antikorların Uygulanması

Spesifik olmayan bağlanmaların önüne geçebilmek için gerçekleştirilen yıkama aşamasından sonra birincil antikor için hangi hayvan türünden elde edilen antikor kullanıldıysa ikincil antikor için de aynı hayvan türünden elde edilen antikorlar kullanıldı. %0,2 Tween 20 içeren TBS solüsyonu ile 1/15000 oranında dilüsyon yapılarak oda sıcaklığında 1 saat hafifçe çalkalanarak inkübe edildi. Ardından 3'er kez 10 dk süreyle membran 1X TBST solüsyonu ile yıkandı. İkincil antikorların uygulanması ve yıkama aşamalarında membranın ışıktan korundu.

4.2.8.6. Membranın Görüntülenmesi

Membranlardan florasan görüntüleme elde edilebilmesi için ODYSSEY CLx (Li-Cor) cihazına yüklendi ve Image Studio Lite Versiyon 5.2 programı kullanılarak görüntülerin bant yoğunlukları değerlendirildi. β -Aktin proteini bant yoğunluklarının değerlendirilmesinde internal kontrol olarak kullanıldı.

4.2.9. İSTATİKSEL ANALİZ

Genlerin ifade düzeyleri Light Cyler 480 cihazında relatif kantitasyon yapılarak $\Delta\Delta C_t$ değerleri ölçülerek analiz edilmiştir. İstatistiksel analiz için Student's t-testi uygulanmıştır. $P < 0,05$ olan sonuçlar anlamlı kabul edilmiştir.

5. ARAŞTIRMA BULGULARI

5.1. TRANSFEKSİYON

Hücre kültürü çalışmasında kurulan her deney düzeneğinde transfeksiyonun başarılı bir şekilde gerçekleştiği araştırılacak miRNA'lar ile birlikte GFP DNA transfeksiyonu yapılarak gösterildi. Elde edilen floresan mikroskobunun görüntüsü Şekil 5.1.'de gösterilmektedir.



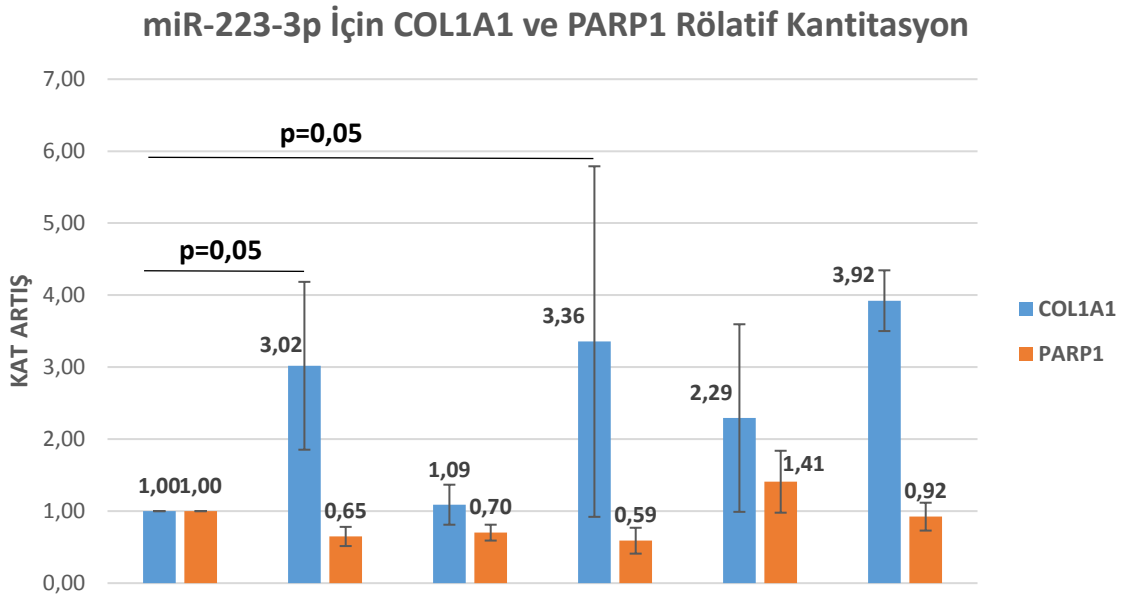
Şekil 5.1. Transfeksiyonu gerçekleştirilen miR-138-5p ve pGFP'nin 24 saat sonunda floresan mikroskobundan elde edilen görüntüsü

5.2. EŞ ZAMANLI PZR SONUÇLARI

Seçilen miRNA'ların hedef mRNA'larına olan etkilerinin değerlendirilebilmesi için TGF- β ve miRNA'nın bulunmadığı ortam koşulu ve aynı deney koşullarının uygulanarak hedef dışı miRNA'ların (miR negatif) kontrol olarak kullanıldığı fibrozissiz (miR negatif +, TGF- β -) ortam koşulu baz alınarak iki farklı analiz gerçekleştirildi.

5.2.1. MİR-223 SONUÇLARI

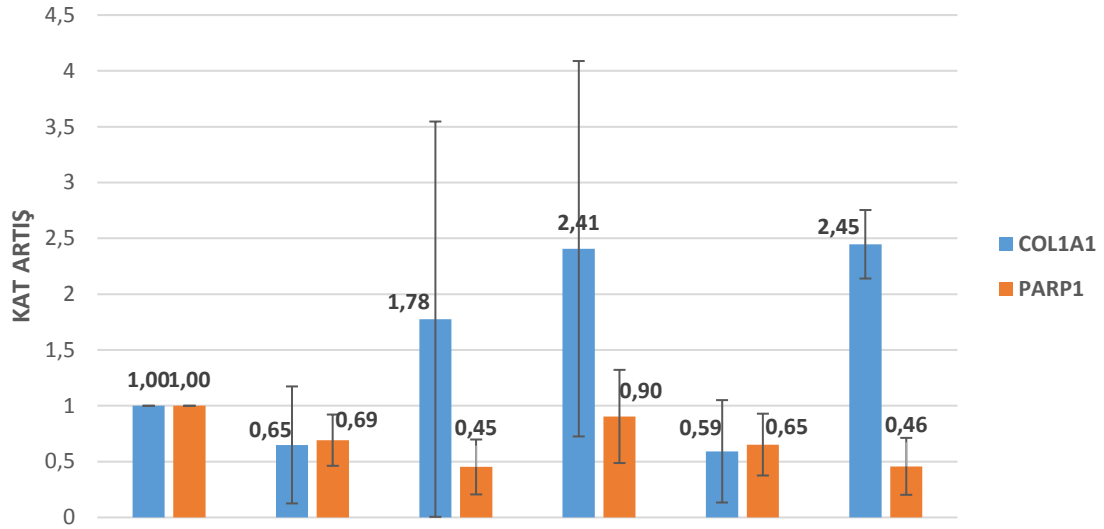
miR-223'ün hedef geni olan ilişkisi ve fibroze olan etkisi eş zamanlı PZR çalışmasında değerlendirilmiştir. miR-223-3p analizi için deneyler 4 kere yapılmış ve her bir deney koşulu 2'li tekrarlar şeklinde çalışılmıştır. Şekil 5.2.1.'de gösterildiği gibi PARP1 ifade düzeyinde istatistiksel açıdan anlamlı olmayan bir azalma görülmüştür ($p>0,05$). PARP1 ifadesinde meydana gelen azalmanın COL1A1 ifadesi üzerinde herhangi bir etkisi bulunmamıştır. Şekil 5.2.2.'de miR negatifin bulunduğu fibrozissiz ortam baz alınarak yapılan analiz gösterilmiştir. Yapılan analiz sonucunda ortam koşulları arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir farklılık bulunamamıştır ($p>0,05$).



TGF- β	-	+	-	+	-	+
miR	-	-	+	+	-	-
miR negatif	-	-	-	-	+	+

Şekil 5.2.1. miR-223-3p eş zamanlı PZR sonuçlarının LC 480 1.5 yazılımı kullanılarak ileri rölatif kantifikasyon analiz ("advanced relative quantification analysis") sonuçları ile çizilen grafiği

miR-223-3p için COL1A1 ve PARP1 Rölatif Kantitasyon

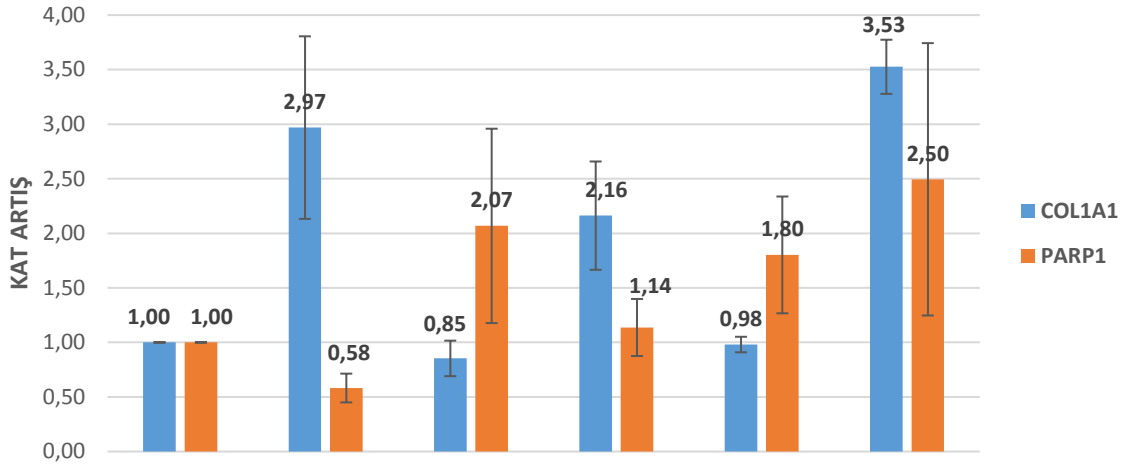


TGF-β	-	-	+	+	-	+
miR	-	-	-	-	+	+
miR negatif	+	-	-	+	-	-

Şekil 5.2.2. miR-223-3p eş zamanlı PZR sonuçlarının LC 480 1.5 yazılımı kullanılarak ileri rölatif kantifikasyon analiz (“advanced relative quantification analysis”) sonuçları ile çizilen grafiği

miR-223-5p için analiz 3 kere ve her bir koşul 2’li çalışılmıştır. Şekil 5.3.1.’de elde edilen analizler gösterilmiştir. Bu veriler sonucu miR-223-5p’nin PARP1 ve COL1A1 ifadesi üzerine istatistiksel açıdan anlamlı bir etkisi bulunamamıştır. Ayrıca miR negatif bulunduğu fibrozissiz ortam koşulu baz alınarak ikinci bir analiz daha gerçekleştirilmiştir. Şekil 5.3.2.’de gösterilen sonuçlara göre miR-223-5p COL1A1 ve PARP1 ifadesi üzerinde istatistiksel açıdan anlamlı bir etkisi bulunmamıştır ($p>0,05$).

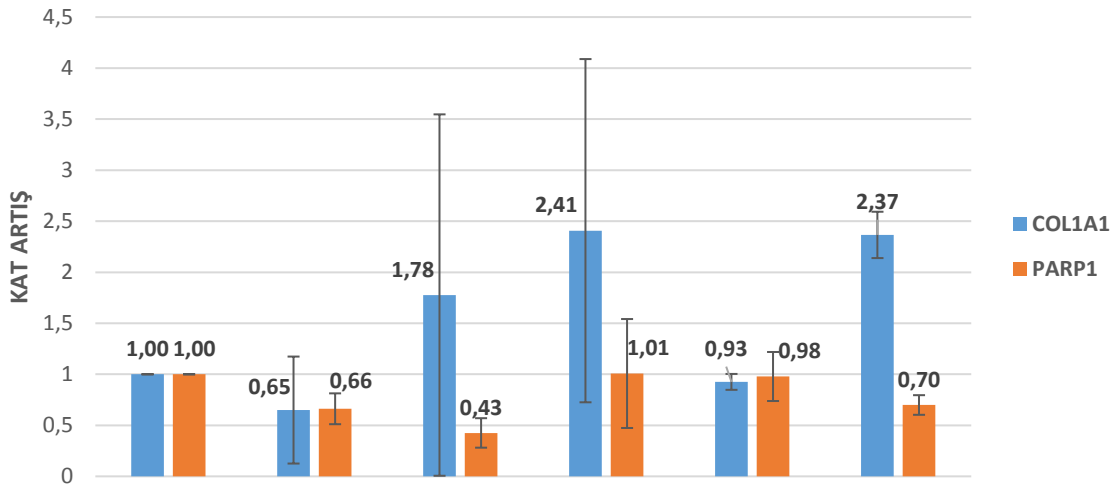
miR-223-5p İçin COL1A1 ve PARP1 Rölatif Kantitasyon



TGF-β	-	+	-	+	-	+
miR	-	-	+	+	-	-
miR negatif	-	-	-	-	+	+

Şekil 5.3.1. miR-223-5p eş zamanlı PZR sonuçlarının LC 480 1.5 yazılımı kullanılarak ileri rölatif kantifikasyon analiz ('advanced relative quantification analysis') sonuçları ile çizilen grafiği

miR-223-5p İçin COL1A1 ve PARP1 Rölatif Kantitasyon

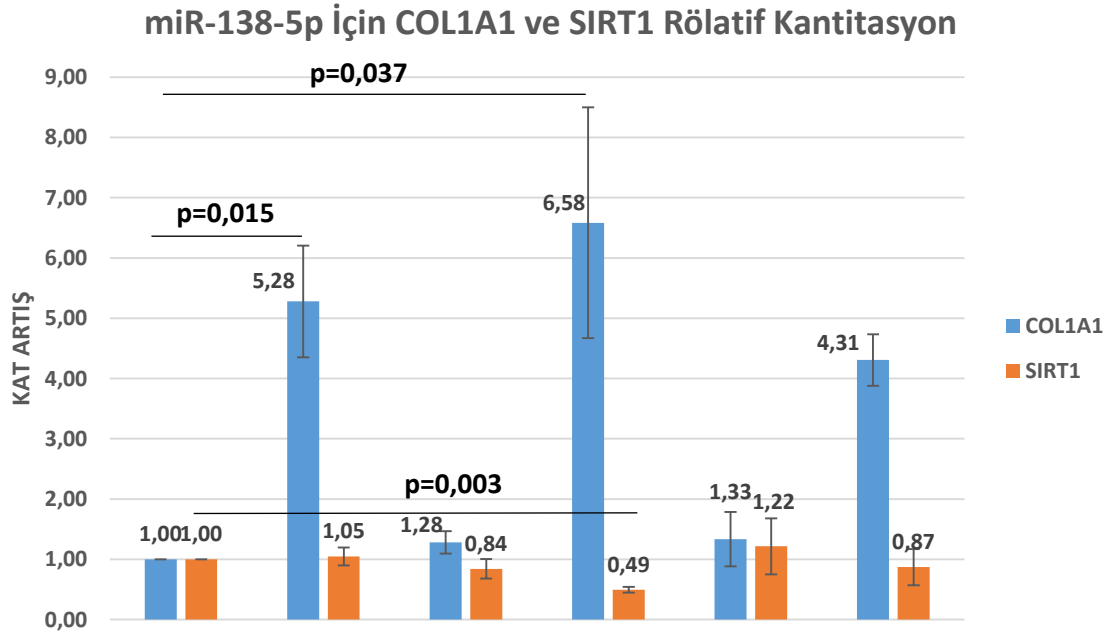


TGF-β	-	-	+	+	-	+
miR	-	-	-	-	+	+
miR negatif	+	-	-	+	-	-

Şekil 5.3.2. miR-223-5p eş zamanlı PZR sonuçlarının LC 480 1.5 yazılımı kullanılarak ileri rölatif kantifikasyon analiz ('advanced relative quantification analysis') sonuçları ile çizilen grafiği

5.2.2. MİR-138 SONUÇLARI

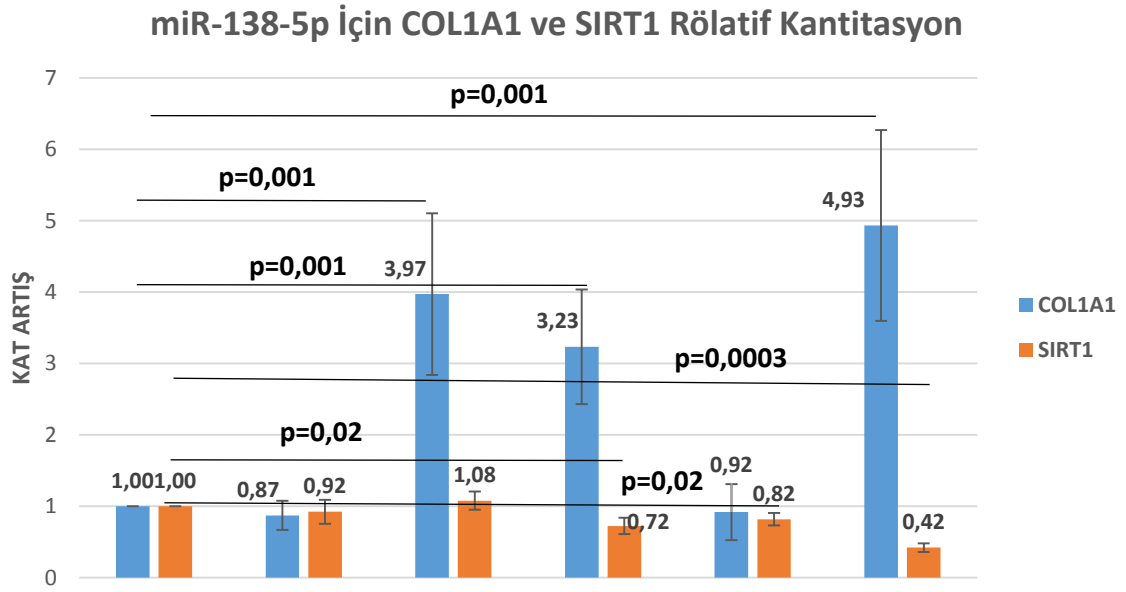
miR-138'in hedef geni SIRT1 ile olan ilişkisi ve fibrozise olan etkisi farklı ortam koşullarında değerlendirilmiştir. Elde edilen sonuçlar LC 480 1.5 yazılımı ile değerlendirilmiştir. Deney çalışmalarına başlarda miR-138-3p ile başlanmış fakat istatistiksel olarak anlamlı sonuçlar elde edilemediği için analize miR-138-5p ile devam edilmiştir. miR-138-5p için 4 deney yapılmış ve her bir deneyde analiz edilecek ortam koşulları 2'li tekrarlar şeklinde çalışılmıştır. Tüm analizlerde normalizasyon için aktin geni kullanılmıştır. TGF- β 'nın ve miRNA'nın bulunmadığı ortam baz alınarak miR-138-5p için gerçekleştirilen analiz sonucu Şekil 5.4.1.'de gösterilmiştir. Sonuçlara göre TGF- β ile indüklenen LX-2 hücrelerinde COL1A1 ifadesinde artış olduğu gözlenmiştir ($p < 0,05$). TGF- β ve miR-138-5p ile indüklenen hücrelerde SIRT1 geninin azaldığı bununla ilişkili olarak da COL1A1 ifadesindeki artışın 6,58 kat olduğu görülmüştür. Benzer şekilde fibrozis modelinin oluşturulduğu ortamda miR-138-5p ile transfekte edilen hücrelerde SIRT1 geninin %51 oranında baskılandığı görülmüştür ($p = 0,003$).



TGF- β	-	+	-	+	-	+
miR	-	-	+	+	-	-
miR negatif	-	-	-	-	+	+

Şekil 5.4.1. miR-138-5p eş zamanlı PZR sonuçlarının LC 480 1.5 yazılımı kullanılarak ileri rölatif kantifikasyon analiz ("advanced relative quantification analysis") sonuçları ile çizilen grafiği

Şekil 5.4.2.'de miR-138-5p için miR negatifin bulunduğu ve TGF-β'nin bulunmadığı ortam koşulu baz alınarak gerçekleştirilen analiz sonucu gösterilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre COL1A1 ifadesi TGF-β ile indüklenen ortamda istatistiksel açıdan anlamlı bir artış göstermiştir (p=0,001). Benzer şekilde hem TGF-β hem de miR-138-5p bulunan ortamda da COL1A1 değeri istatistiksel açıdan anlamlı bir artış sergilemiştir (p=0,001). SIRT1 ifadesi miR-138-5p transfekte edilen fibrozissiz ortamda istatistiksel açıdan anlamlı bir düşüş sergilemiştir (p=0,02). Benzer şekilde hem fibrozis hem de miRNA bulunan ortamda da SIRT1 ifadesinde azalma meydana gelmiştir (p=0,0003).



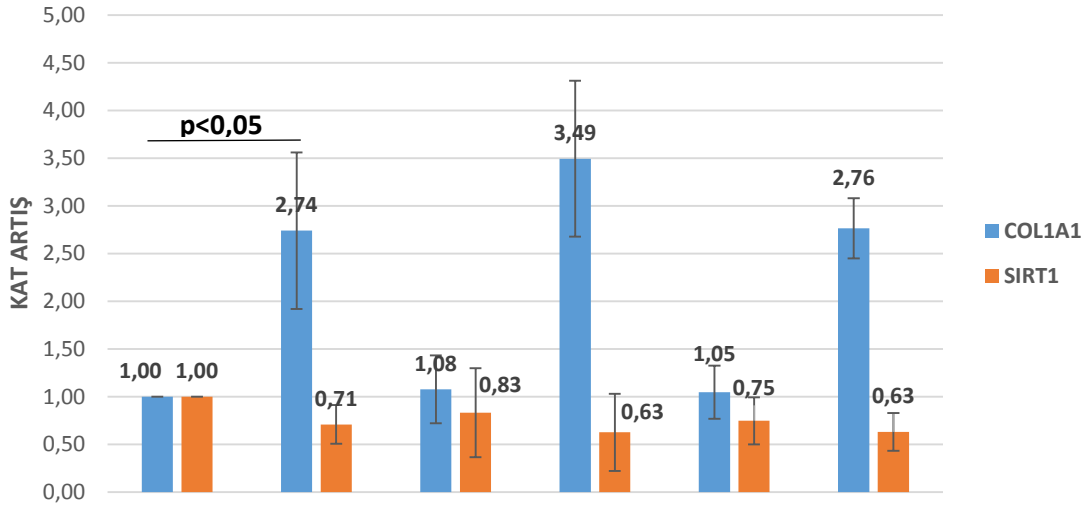
TGF-β	-	-	+	+	-	+
miR	-	-	-	-	+	+
miR negatif	+	-	-	+	-	-

Şekil 5.4.2. miR-138-5p eş zamanlı PZR sonuçlarının LC 480 1.5 yazılımı kullanılarak ileri rölatif kantifikasyon analiz ("advanced relative quantification analysis") sonuçları ile çizilen grafiği

5.2.3. MİR-132 SONUÇLARI

miR-132'nin hedef geni olan SIRT1 ile olan ilişkisi ve karaciğer fibrozisine olan etkisi araştırılmış ve miR-132-3p için sonuçlar Şekil 5.5.1.'de gösterilmiştir. miR-132-3p için 3 defa deney yapılmıştır ve araştırılacak ortam şartları 2'li tekrarlar şeklinde çalışılmıştır. TGF-β ile indüklenmiş ortamda SIRT1 geninde baskılanmanın olduğu gözlenmiştir. Ortamda aynı anda bulunan miR-132-3p'nin ise bu baskılamada istatistiksel olarak anlamlı bir etkisinin olmadığı görülmüştür (p>0,05).

miR-132-3p için COL1A1 ve SIRT1 Rölatif Kantitasyon

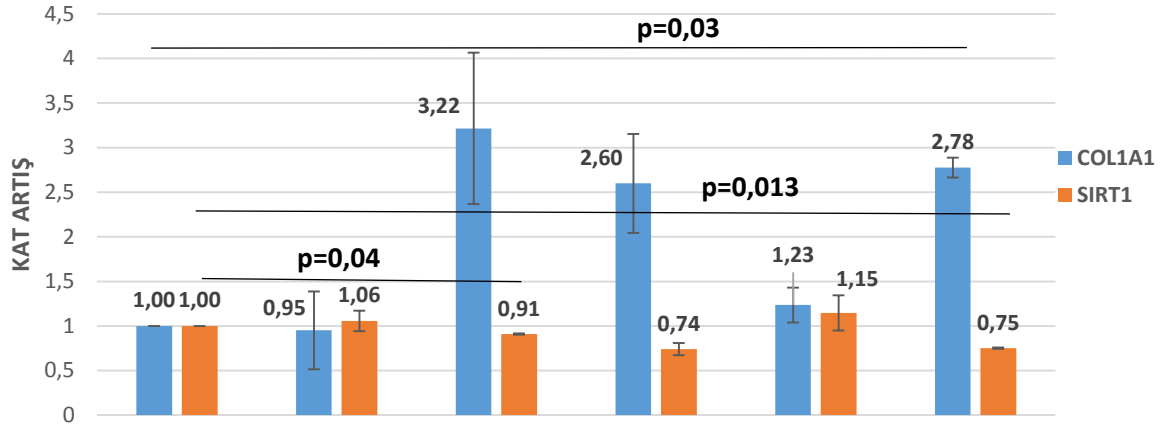


TGF-β	-	+	-	+	-	+
miR	-	-	+	+	-	-
miR negatif	-	-	-	-	+	+

Şekil 5.5.1. miR-132-3p eş zamanlı PZR sonuçlarının LC 480 1.5 yazılımı kullanılarak ileri rölatif kantifikasyon analiz ('advanced relative quantification analysis') sonuçları ile çizilen grafiği

Şekil 5.5.2.'de miR-132-3p için fibrozissiz ortamda sadece miR negatifin bulunduğu ortam koşulu baz alınarak farklı bir analiz sonucu gösterilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre hem fibrozisin hem de miRNA'nın bulunduğu ortam koşulunda COL1A1 ifadesinde istatistiksel açıdan anlamlı bir artış gözlenmiştir ($p=0,03$). Sadece TGF-β'nin bulunduğu ortamda SIRT1 ifadesinde istatistiksel açıdan anlamlı bir azalma meydana gelmiştir ($p=0,04$). Benzer şekilde hem fibrozis hem de miRNA'nın bulunduğu ortamda da SIRT1 ifadesinde azalma gözlenmiştir ($p=0,013$).

miR-132-3p İçin COL1A1 ve SIRT1 Rölatif Kantitasyon

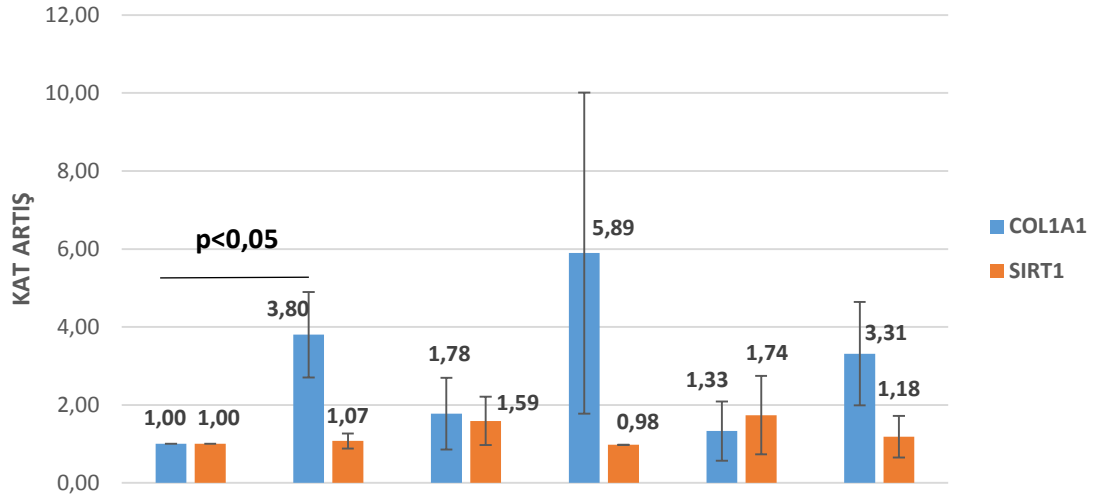


TGF-β	-	-	+	+	-	+
miR	-	-	-	-	+	+
miR negatif	+	-	-	+	-	-

Şekil 5.5.2. miR-132-3p eş zamanlı PZR sonuçlarının LC 480 1.5 yazılımı kullanılarak ileri rölatif kantifikasyon analiz ('advanced relative quantification analysis') sonuçları ile çizilen grafiği

miR-132-5p için elde edilen sonuçlar Şekil 5.6.1.'de gösterilmiştir. miR-132-5p için deneyler 3 defa gerçekleştirilmiş olup değerlendirilecek koşullar yine 2'li tekrarlar şeklinde çalışılmıştır. Elde edilen sonuç miR-132-3p ile aynı şekilde bulunmuştur. Her iki miRNA TGF-β ile indüklenen ortamda COL1A1 ifade düzeyinin istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde artışına neden olmuştur ($p < 0,05$). Şekil 5.6.2.'de miR-132-5p için miR negatifin bulunduğu fibrozissiz ortam baz alınarak gerçekleştirilen farklı analiz sonucu gösterilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre sadece TGF-β'nın bulunduğu fibrozisli ortamda COL1A1 ifadesinde istatistiksel açıdan anlamlı bir artış gözlenmiştir ($p = 0,045$). Yine hem TGF-β hem miR negatifin bulunduğu ortama COL1A1 ifadesinde artış meydana gelmiştir ($p = 0,03$). Fakat SIRT1 ifadesinde hiçbir ortam için anlamlı değişiklik gözlenmemiştir ($p > 0,05$).

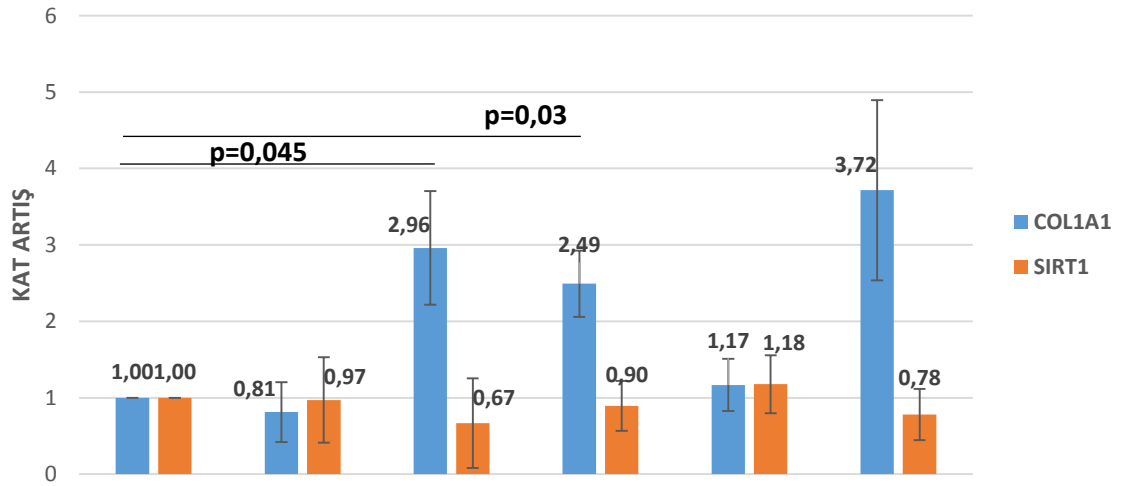
miR-132-5p için COL1A1 ve SIRT1 Rölatif Kantitasyon



TGF-β	-	+	-	+	-	+
miR	-	-	+	+	-	-
miR negatif	-	-	-	-	+	+

Şekil 5.6.1. miR-132-5p eş zamanlı PZR sonuçlarının LC 480 1.5 yazılımı kullanılarak ileri rölatif kantifikasyon analiz ('advanced relative quantification analysis') sonuçları ile çizilen grafiği

miR-132-5p için COL1A1 ve SIRT1 Rölatif Kantitasyon

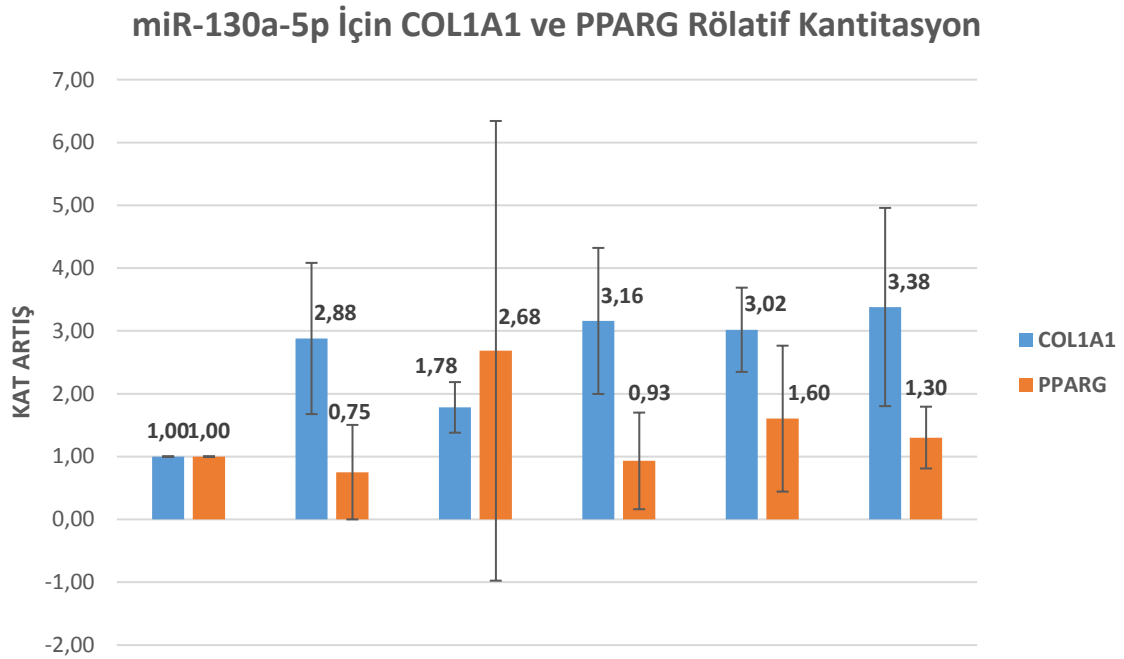


TGF-β	-	-	+	+	-	+
miR	-	-	-	-	+	+
miR negatif	+	-	-	+	-	-

Şekil 5.6.2. miR-132-5p eş zamanlı PZR sonuçlarının LC 480 1.5 yazılımı kullanılarak ileri rölatif kantifikasyon analiz ('advanced relative quantification analysis') sonuçları ile çizilen grafiği

5.2.4. MİR-130A SONUÇLARI

miR-130a'nın hedef geni PPARG ile olan ilişki ve bu ilişkinin fibrozise olan etkisi araştırılmış ve elde edilen sonuçlar Şekil 5.7.1.'de gösterilmiştir. miR-130a-5p ile 4 defa deneyler yapılmış ve yine her bir ortam koşulu 2'li tekrarlar şeklinde çalışılmıştır. Yapılan çalışma sonucunda miRNA'nın PPARG genini baskılaması gözlenmemiş hedef genin baskılanması COL1A1 aracılığı ile olduğu gözlenmiştir. Fakat bu bulgu da istatistiksel açıdan anlamlı bulunamamıştır ($p>0,05$).

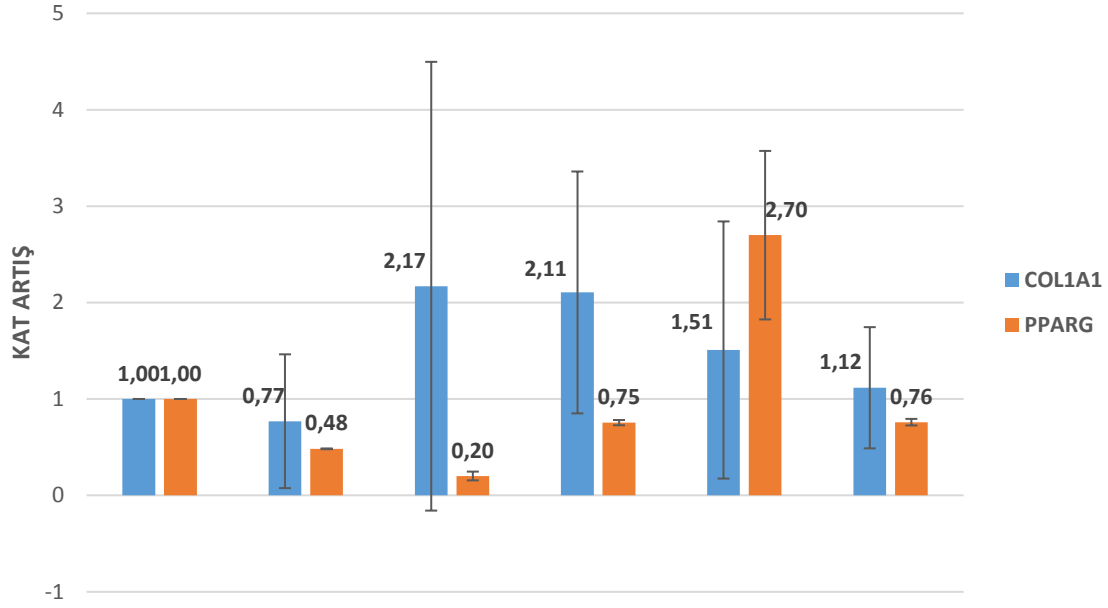


TGF- β	-	+	-	+	-	+
miR	-	-	+	+	-	-
miR negatif	-	-	-	-	+	+

Şekil 5.7.1. miR-130a-5p eş zamanlı PZR sonuçlarının LC 480 1.5 yazılımı kullanılarak ileri rölatif kantifikasyon analiz ("advanced relative quantification analysis") sonuçları ile çizilen grafiği

Şekil 5.7.2.'de miR-130a-5p için TGF- β 'nın bulunmadığı sadece miR negatifin bulunduğu ortam baz alınarak farklı bir analiz sonucu gösterilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre ortamlar arasında COL1A1 ve PPARG ifadelerinde anlamlı farklılıklar bulunamamıştır ($p>0,05$).

miR-130a İçin COL1A1 ve PPARG Rölatif Kantitasyon



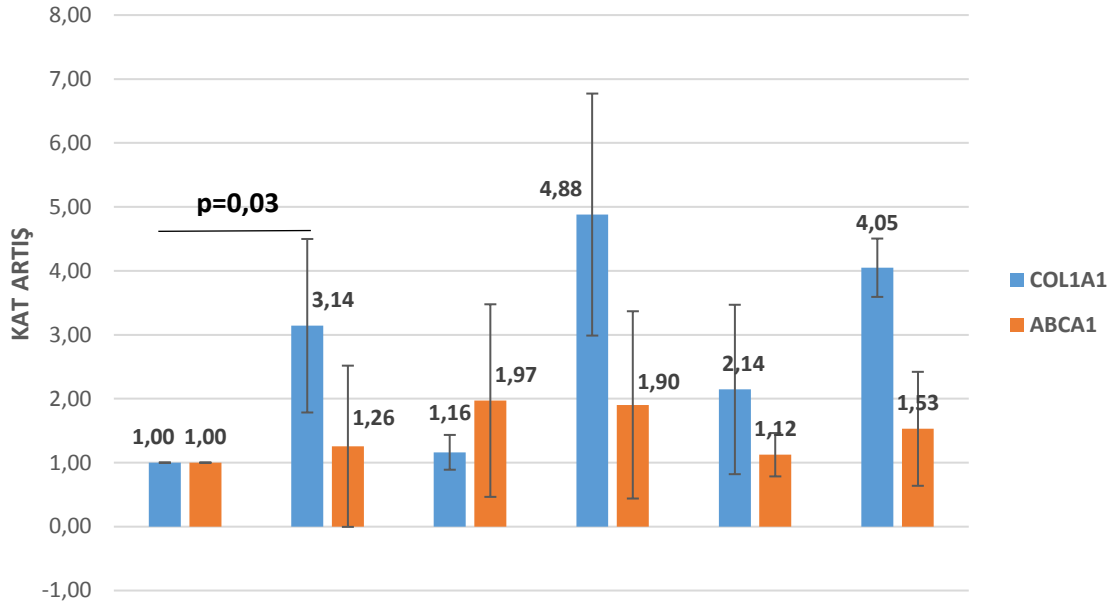
TGF-β	-	-	+	+	-	+
miR	-	-	-	-	+	+
miR negatif	+	-	-	+	-	-

Şekil 5.7.2. miR-130a-5p eş zamanlı PZR sonuçlarının LC 480 1.5 yazılımı kullanılarak ileri rölatif kantifikasyon analiz (“advanced relative quantification analysis”) sonuçları ile çizilen grafiği

5.2.5. MİR-758 SONUÇLARI

miR-758-3p ve belirlenen hedef geni ABCA1 ile olan ilişkisi ve bunun karaciğer fibrozisine olan etkisi Şekil 5.8.1.’de ve sadece miR negatifin bulunduğu ortam baz alınarak yapılan analiz Şekil 5.8.2.’de gösterilmiştir. miR-758-3p için toplamda 4 deney gerçekleştirilmiş ve analiz edilecek şartlar 2’li tekrarlar şeklinde çalışılmıştır. Yine normalizasyon için aktin geni kullanılmıştır. miR-758-3p ile hücrelerin muamele sonucunda ABCA1 gen ifadesinde herhangi bir azalma meydana gelmemiştir. Fakat Şekil 5.8.1.’deki analizde sadece TGF-β ile indüklü hücrelerde kolajen ifadesinde istatistiksel olarak anlamlı artış gözlenmiştir (p=0,03). Şekil 5.8.2.’deki analizde COL1A1 ve ABCA1 ifadelerinde anlamlı bir değişme gözlenmemiştir (p>0,05).

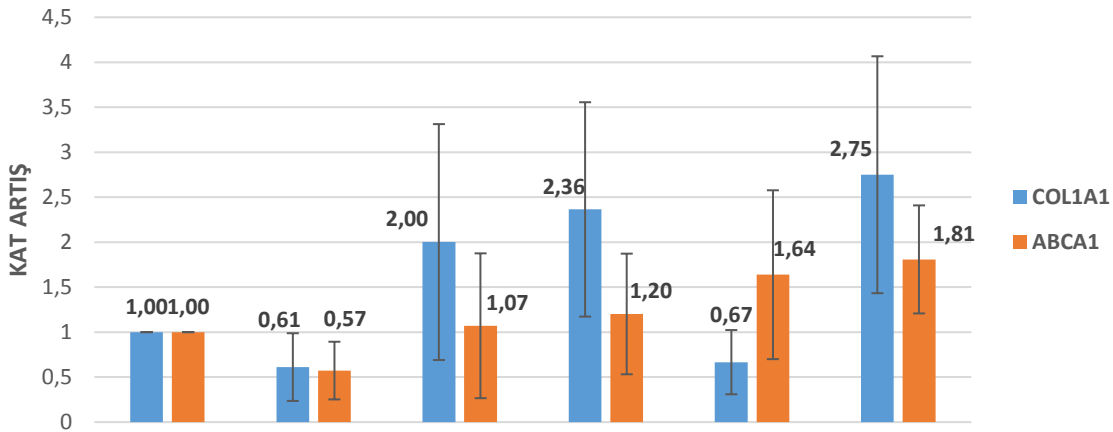
miR-758-3p için COL1A1 ve ABCA1 Rölatif Kantitasyon



TGF-β	-	+	-	+	-	+
miR	-	-	+	+	-	-
miR negatif	-	-	-	-	+	+

Şekil 5.8.1. miR-758-3p eş zamanlı PZR sonuçlarının LC 480 1.5 yazılımı kullanılarak ileri rölatif kantifikasyon analiz ('advanced relative quantification analysis') sonuçları ile çizilen grafiği

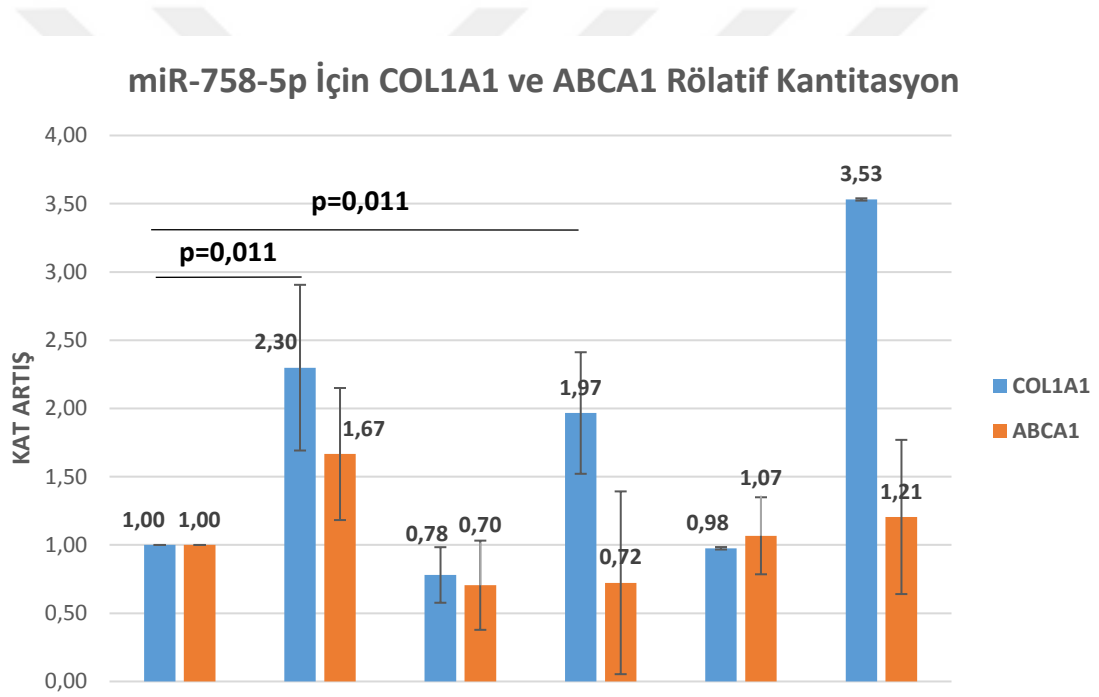
miR-758-3p için COL1A1 ve ABCA1 Rölatif Kantitasyon



TGF-β	-	-	+	+	-	+
miR	-	-	-	-	+	+
miR negatif	+	-	-	+	-	-

Şekil 5.8.2. miR-758-3p eş zamanlı PZR sonuçlarının LC 480 1.5 yazılımı kullanılarak ileri rölatif kantifikasyon analiz ('advanced relative quantification analysis') sonuçları ile çizilen grafiği

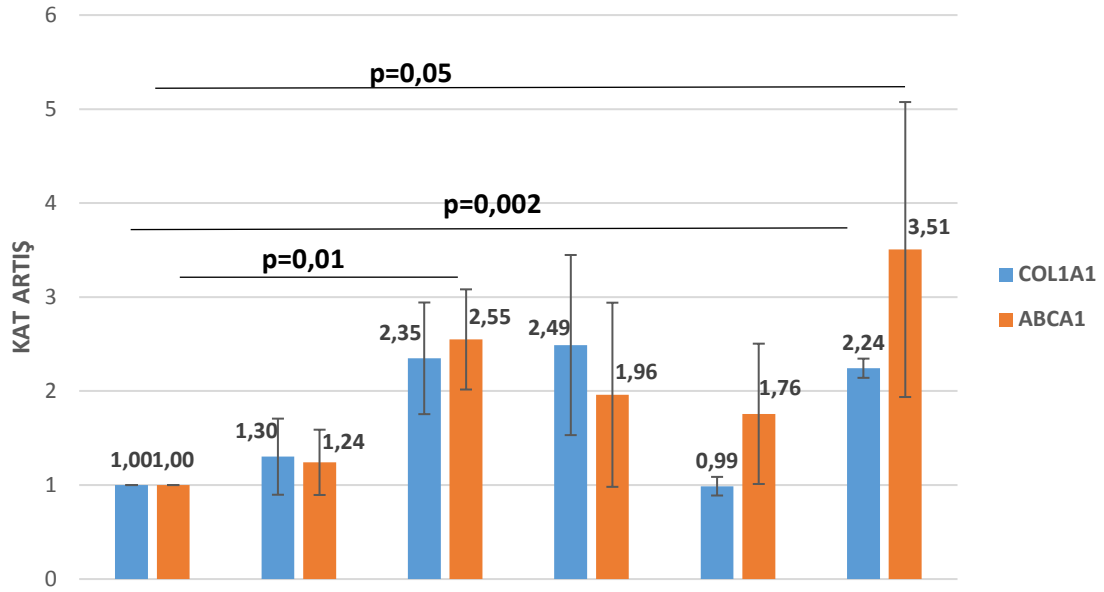
miR-758-3p ile anlamlı sonuçlara ulaşılamayınca miR-758-5p ile toplamda 3 deney yapılmış ve yine çalışılacak ortam koşulları 2'li tekrarlar şeklinde araştırılmıştır. Şekil 5.9.1'de elde edilen sonuçlar gösterilmiştir. miR-758-5p transfekte edilen hücrelerde ABCA1 gen ifadesinde azalma meydana gelse de bu azalma istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p>0,05$). Fakat TGF- β ile indüklenmiş hücrelerde COL1A1 ifade düzeyinde artış meydana gelmiş ve bu değişim istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p=0,03$). Şekil 5.9.2.'de sadece miR negatif baz alınarak gerçekleştirilen analiz sonucu gösterilmiştir. Bu analiz sonucuna göre hem TGF- β 'nin hem de miRNA'nın bulunduğu ortam koşulunda COL1A1 ifadesinde anlamlı bir artış gözlenmiştir ($p=0,002$). ABCA1 ifadesinde ise sadece fibrozisin oluşturulduğu ortam ($p=0,01$) ile hem fibrozisin hem de miRNA'nın bulunduğu ortamda istatistiksel bir artış gözlenmiştir ($p<0,05$).



TGF- β	-	+	-	+	-	+
miR	-	-	+	+	-	-
miR negatif	-	-	-	-	+	+

Şekil 5.9.1. miR-758-5p eş zamanlı PZR sonuçlarının LC 480 1.5 yazılımı kullanılarak ileri rölatif kantifikasyon analiz ("advanced relative quantification analysis") sonuçları ile çizilen grafiği

miR-758-5p İçin COL1A1 ve ABCA1 Rölatif Kantitasyon



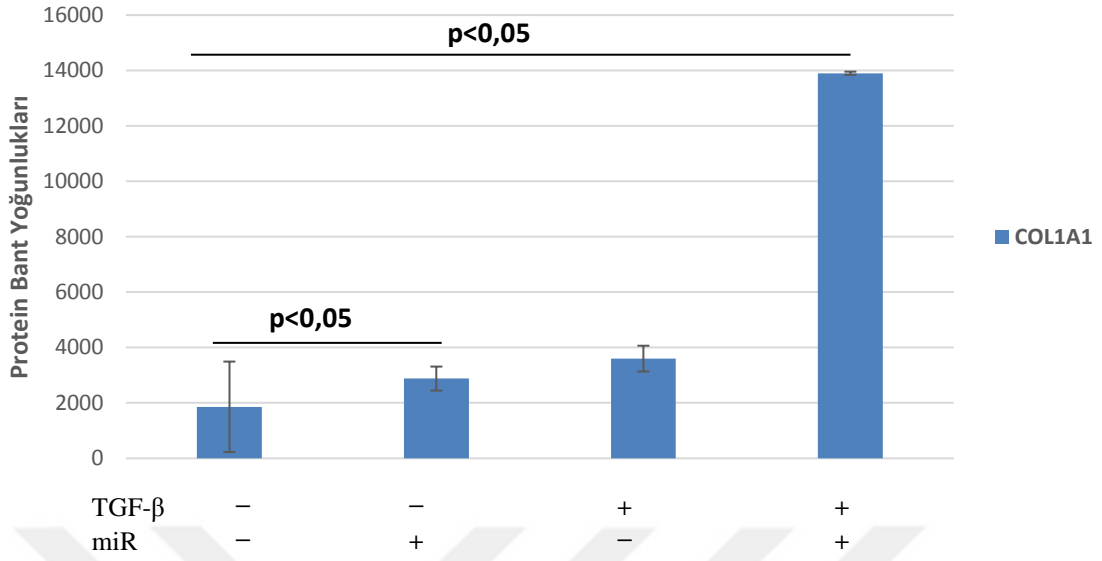
TGF-β	-	-	+	+	-	+
miR	-	-	-	-	+	+
miR negatif	+	-	-	+	-	-

Şekil 5.9.2. miR-758-5p eş zamanlı PZR sonuçlarının LC 480 1.5 yazılımı kullanılarak ileri rölatif kantifikasyon analiz (“advanced relative quantification analysis”) sonuçları ile çizilen grafiği

5.3. WESTERN BLOT SONUÇLARI

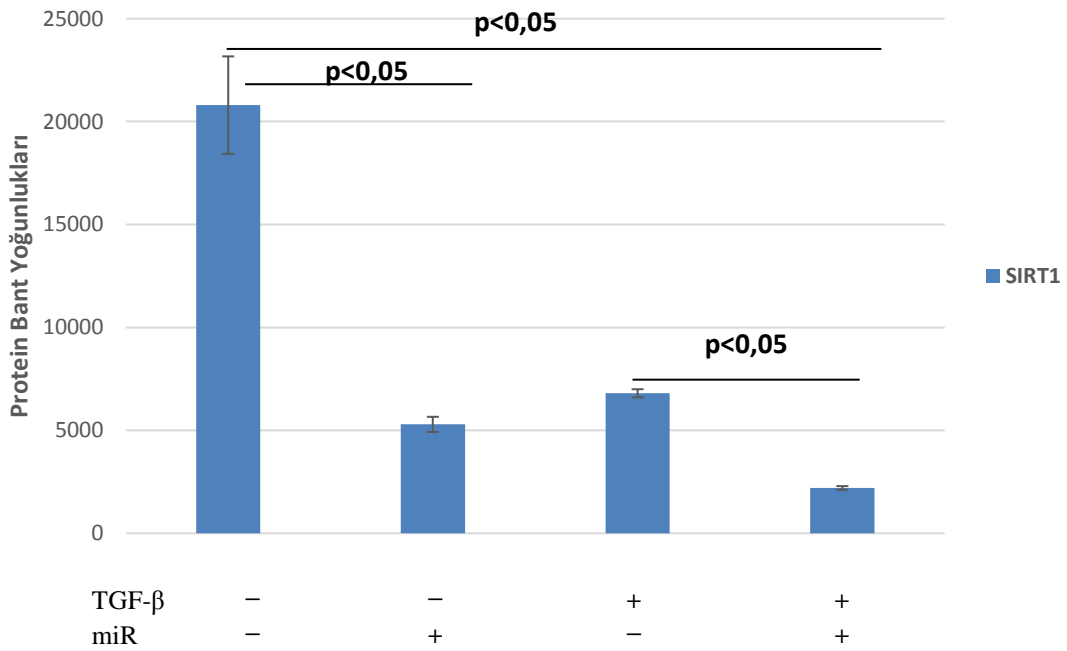
miR-138 ve hedef geni SIRT1 ile arasındaki ilişki ve bu ilişkinin fibrozise olan etkisi eş zamanlı PZR çalışmasında istatistiksel olarak anlamlı sonuçlar elde edildiği için protein düzeyinde analiz yapılmıştır. Şekil 5.10.1.’de 2 defa tekrarlanan deney sonuçlarına göre ortamda TGF-β bulunmadığı halde sadece miR-138 ile transfekte edildiğinde SIRT1’in baskılanmasına paralel olarak COL1A1 ifadesinde artış görülmüştür ($p < 0,05$). Ayrıca Şekil 5.10.2.’de SIRT1 protein miktarının lölmesi için yapılan analiz sonucunda TGF-β ile birlikte miR-138 ile transfekte edilen hücrelerde SIRT1 protein ifadesinin istatistiksel açıdan anlamlı bir Şekilde baskılandığı görülmüştür ($p < 0,05$). Şekil 5.10.3.’te ilgili proteinlerin ve kontrol olarak kullanılan β-Aktinin bant yoğunlukları gösterilmiştir.

miR-138-5p İçin COL1A1 Western Blot Analizi

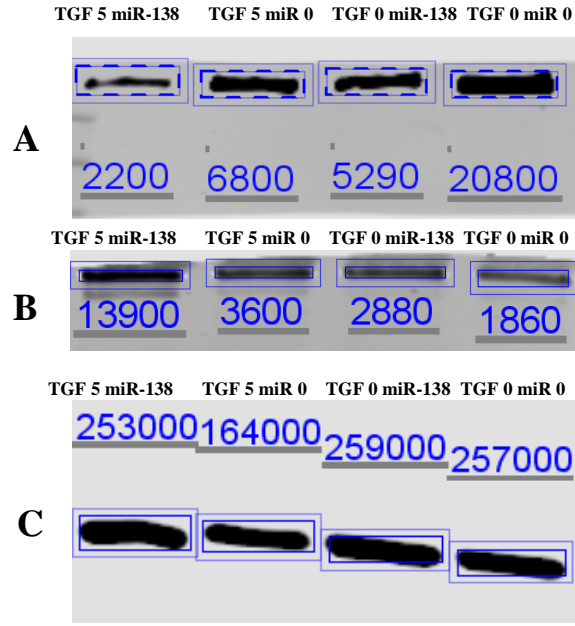


Şekil 5.10.1. Farklı ortam şartlarında COL1A1 protein yoğunlukları ile çizilen sütun grafiği

miR-138-5p İçin SIRT1 Western Blot Analizi



Şekil 5.10.2. Farklı ortam şartlarında SIRT1 protein yoğunlukları ile çizilen sütun grafiği



Şekil 5.10.3. Farklı ortam koşullarında SIRT1(A), COL1A1(B) ve ACTB(C) bant yoğunluklarını gösteren Western Blot görüntüsü

6. TARTIŞMA ve SONUÇ

Karaciğer fibrozisinin meydana gelmesinde ve gelişiminde HSH'lerin kilit rol oynadığı yapılan birçok çalışmayla açıklığa kavuşturulmuştur (16,89). HSH'lerin karaciğer fibrozisinde sahip oldukları bu önemli işlevleri fibrozis tedavisinde HSH odaklı çalışmalara sebebiyet vermiştir. HSH'ler ve onları etkileyen miRNA çalışmaları gün geçtikçe artış göstermektedir. miRNA'ların sahip oldukları anti-fibrotik ve pro-fibrotik etkileri onları karaciğer fibrozisinde terapötik bir etkiye sahip olabileceklerini göstermiştir (89).

Farklı hücre hatlarında ve *in vivo* ortamda karaciğer fibrozisi çalışmaları olsa da bu çalışmada belirlenen aday miRNA'lar ve bunların hedef genleri arasındaki ilişki ilk defa LX-2 hücre hattında araştırılmıştır.

Çalışmada aday miRNA olarak belirlenen miR-223'ün hedef geni PARP1 seçilmiş ve ikisi arasındaki ilişki karaciğer fibrozisi açısından değerlendirilmiştir. Shaker ve arkadaşlarının HCV ile ilişkili karaciğer hastalığına sahip bireylerin serum örnekleri ile yaptığı bir çalışmada miR-223'ün karaciğer fibrozisinin artan evrelerinde miktarının arttığı gösterilmiştir (112). Bu çalışmanın ışığında miR-223 ile indüklenen hücrelerde kolajen miktarının artması beklenmektedir. Fakat bizim çalışmamızda Şekil 5.2.1.'de ve Şekil 5.3.1.'de de görüldüğü gibi miR-223'ün 3p ve 5p kolları için kolajen miktarında istatistiksel açıdan anlamlı ($p>0,05$) bir artış görülmemiştir. Yine bizim çalışmamızda TGF- β 'nin ortamda bulunmadığı fakat miR negatifin bulunduğu ortam koşulu baz alınarak diğer ortamlar için COL1A1 ifade düzeylerindeki farklılıklarda istatistiksel açıdan bir değişim gözlenmemiştir (Şekil 5.2.2. ve Şekil 5.3.2.). Çalışmamızda karaciğer fibrozisine miR-223'ün etkisinin hedef geni PARP1'in baskılanması sonucunda olabileceği araştırılmıştır. Fakat yine sonuçlara bakıldığında PARP1 üzerinde anlamlı bir baskılanma gözlenmemiştir. Eş zamanlı PZR sonuçlarından elde edilen veriler sonucunda anlamlı bir fark görülmediği için protein düzeyinde araştırma yapılmamıştır. Transfekte edilecek miR-223'ün deney çalışmalarında dondurup çözündürme işlemine maruz kaldığı için etkisini yitirdiğinden veya baskılanmanın mRNA düzeyinden ziyade protein düzeyinde olabileceğinden dolayı bu şekilde anlamlı olmayan bir sonuç elde edilmesine neden olmuş olabilir.

SIRT1 genini baskılayarak LX-2 hücrelerini etkileyebileceği düşünülen miR-138'in SIRT1 ile olan ilişkisi Xu ve arkadaşlarının fare ile yapılan çalışmasında gösterilmiştir (102). Ayrıca yapılan başka bir çalışmada da HCV indüklü karaciğer fibrozisinde miR-138 miktarının arttığı tespit edilmiştir (113). Bu çalışmalar sonucunda LX-2 hücrelerinde miR-138 ile indüklenen hücrelerde kolajen miktarının artması ve SIRT1 ifadesinin baskılanması beklenmektedir. Çalışma sonucunda miR-138-5p transfekte edilen TGF- β ile indüklenmiş LX-2 hücrelerinde literatüre paralel olarak kolajen miktarında istatistiksel olarak anlamlı ($p<0,05$) bir artış gözlenmiştir (Şekil 5.4.1.). Şekil 5.4.2.'de miR-138-5p'nin fibrozise olan etkisi TGF- β 'nın bulunmadığı miR negatifin bulunduğu ortam baz alınarak değerlendirilmiştir. Sonuçlar irdelendiğinde sadece TGF- β 'nin bulunduğu ortamda COL1A1 ifadesinde görülen istatistiksel açıdan anlamlı artış fibrozis modelinin başarılı bir şekilde oluşturulduğunun göstergesidir ($p=0,001$). Yine Şekil 5.4.2.'de hem fibrozisin hem de miRNA'nın bulunduğu ortam koşulunda COL1A1 ifadesinde kontrole göre yaklaşık 5 kat bir artış gözlenmiştir ($p=0,001$). Elde edilen bu sonuç miR-138-5p'nin LX-2 hücrelerinde pro-fibrotik bir etkiye sahip olduğunu göstermektedir. Ayrıca yine eş zamanlı PZR sonucu incelendiğinde yine miR-138-5p transfekte edilen TGF- β ile indüklenmiş LX-2 hücrelerinde SIRT1'in baskılanmasının en yoğun olduğu görülmektedir ($p=0,003$). Şekil 5.4.2.'de gösterilen sonuçlara göre SIRT1 ifadesinde fibrozis ortamından bağımsız sadece miRNA bulunan ortamda istatistiksel açıdan anlamlı bir azalma gözlenmiştir ($p=0,02$). Hem fibrozisin hem de miRNA bulunan ortamda da kontrole göre gözlenen azalma istatistiksel açıdan anlamlıdır ($p=0,0003$). Hipotezi destekleyici eş zamanlı PZR sonuçlarının elde edilmesi ile protein düzeyinde de farkın gözlenmesi için Western blot analizi yapılmıştır. Western blot analizlerinde hücrelerdeki kolajen proteinin yoğunluğunun TGF- β ile fibrozis oluşumundan bağımsız olarak miR-138-5p transfekte edilmeyen hücelere kıyasla miR-138-5p transfeksiyonu yapılan hücrelerde arttığı görülmüştür (Şekil 5.10.1. ve Şekil 5.10.3.) ($p<0,05$). Literatürden elde edilen bilgiler ışığında SIRT1 protein yoğunluğunun miR-138-5p ile transfekte edilen hücrelerde transfekte edilmeyenlere kıyasla daha az olması beklenmektedir. Western blot analizinde TGF- β ile indüklenmemiş fakat miR-138-5p ile transfekte edilen ortam şartında SIRT1 yoğunluğunun TGF- β ve miRNA'nın bulunmadığı ortam koşuluna göre istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azaldığı gözlenmiştir ($p<0,05$). Ayrıca miR-138-5p transfekte edilen TGF- β ile indüklenmiş ortam koşulunda da SIRT1 protein miktarının istatistiksel olarak

anlamli şekilde azaldığı gözlenmiştir (Şekil 5.10.2. ve Şekil 5.10.3) ($p < 0,05$). Elde edilen bu veriler LX-2 hücrelerinde miR-138-5p'nin pro-fibrotik bir etkiye sahip olduğunu desteklemiştir.

Miyofibroblast farklılaşmasında etkin role sahip olan PPARG ile miR-132 arasındaki etkileşim karbon tetraklorür ile gerçekleştirilen karaciğer fibrozis modelinde fareler üzerinde Mann ve arkadaşlarının 2010 yılında yaptıkları çalışma ile gösterilmiştir (103). Yapılan bu çalışmada ortamdaki miR-132 miktarında oluşan azalma sonucunda metil-CpG bağlayıcı protein (MeCP2) miktarında artış meydana gelir ve PPARG ifadesinde azalma oluşur. PPARG ifadesinde meydana gelen azalış fibrozis belirteci tip I kolajen miktarının artmasına neden olmaktadır. Bu tez çalışmasında miR-132 ve hedef geni SIRT1 arasındaki ilişki LX-2 hücre hattında eş zamanlı PZR çalışmalarında araştırılmıştır (Şekil 5.5.1. ve Şekil 5.6.1.) miR-132 transfekte edilmiş hücrelerde SIRT1 ifadesinin miR-132 ile transfekte edilmemiş hücrelerdeki SIRT1 ifadesine kıyasla daha az olması bunun sonucunda da ortamdaki tip I kolajen miktarında artış meydana gelerek karaciğer fibrozisinde ilerlemenin görülmesi beklenmektedir. Elde edilen eş zamanlı PZR sonuçlarına göre istatistiksel açıdan anlamlı bir baskılanma gözlenmemiştir ($p > 0,05$). Ayrıca miR-132-3p için TGF- β 'nin bulunmayıp miR negatifin bulunduğu ortam koşulu baz alınarak farklı bir analiz yapılmıştır. Şekil 5.5.2.'de gösterilen sonuçlara göre hem fibrozisin hem de miRNA'nın bulunduğu ortamda hedef gen olarak belirlenen SIRT1'de istatistiksel açıdan anlamlı bir baskılanma gözlenmiştir ($p = 0,013$). Ayrıca sadece fibrozisli ortamda da SIRT1 ifadesinde azalma meydana gelmiştir ($p = 0,04$). Hem fibrozisin hem de miRNA'nın bulunduğu ortamda fibrozis belirteci COL1A1 ifadesinde de artış gözlenmiştir ($p = 0,03$). Bu şekilde yapılan analiz sonucuna göre miR-132-3p için pro-fibrotik bir etkiye sahip olabileceği düşünülebilir. Fakat diğer analizde elde edilen verilerle tutarlılık gösterip gösteremeyeceğinin anlaşılması için deneylerin tekrarlanması gerekecektir. Şekil 5.6.2.'de miR-132-5p için gerçekleştirilen ikinci analiz sonuçlarına göre TGF- β 'nin bulunduğu ortam koşulunda fibrozis belirteci COL1A1'de istatistiksel açıdan anlamlı bir artış görülmesi fibrozis modelinin başarılı bir şekilde gerçekleştiğini göstermektedir ($p = 0,045$). Fakat SIRT1'de istatistiksel açıdan anlamlı bir baskılanmanın görülmemesi transfekte edilecek miRNA'nın dondurulup çözülme işlemlerinde etkisinden kaynaklanıyor olabilir. Ayrıca miRNA'nın baskılama etkisinin mRNA düzeyinden ziyade protein düzeyinde

gösterebileceğinden dolayı bu şekilde bir sonuç elde edilmiş olabilir. mRNA aşamasında elde edilen bu sonuçlardan dolayı protein düzeyinde analiz yapılmamıştır.

Lu ve arkadaşlarının 2015 yılında yaptıkları çalışmada miR-130a'nın ve miR-130b'nin hedef geni olarak belirlenen PPARG ile olan ilişkisi karbon tetraklorür ve ana safra kanalı bağlama ile karaciğer fibrozisi modeli oluşturularak ve fare deneyinde araştırılmıştır. Aktifleşen fare HSH'lerde miR-130a ve miR-130b miktarlarında artış gözlenmiştir. miR-130a ve miR-130b transfekte edilen HSC-T6 hücre hattında yapılan eş zamanlı PZR analizi sonucunda PPARG miktarında ciddi bir azalma meydana geldiği görülmüştür (105). Bu tez çalışmasında miR-130a ve PPARG arasındaki ilişkinin LX-2 hücrelerinde ne şekilde olacağı eş zamanlı PZR çalışmasında araştırılmıştır (Şekil 5.7.1. ve Şekil 5.7.2.). miR-130a transfekte edilen insan HSH'lerinde PPARG mRNA miktarında oluşan azalma istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p>0,05$). Fakat TGF- β ile LX-2 hücrelerinin indüklenmesi sonucu PPARG miktarında azalma olduğu gözlenmiştir. Elde edilen eş zamanlı PZR sonuçları değerlendirilip istatistiksel açıdan anlamlı bir sonuç elde edilemediğinden ($p>0,05$) western blot analizi gerçekleştirilmemiştir. Bu şekilde bir sonucun elde edilmesinde transfekte edilecek miR-130a'nın dondurulup çözülme işlemlerinde etkisini yitirmesinden veya baskılama işleminin protein düzeyinde olabileceğinden kaynaklı olabilir.

ABCA1, fazla kolesterolün taşınmasında görev alarak vücuttaki kolesterol dengesinin sağlanmasında etkilidir. Ramirez ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada miR-758 ile ABCA1 arasındaki ilişki beyin dokusunda irdelenmiştir (107). Bu çalışmaya göre miR-758 varlığında ABCA1 ifadesi baskılanmakta ve kolesterol taşıma mekanizması askıya alınmaktadır. Ahn ve arkadaşlarının 2014 yılında gerçekleştirdikleri çalışmada ise HSH'lerin aktivasyonunda anti-fibrotik bir role sahip olan karaciğer reseptör X geni (LXR) ile ABCA1 arasında pozitif korelasyon saptanmıştır (114). Bu tez çalışmasında miR-758 ile hedef geni ABCA1 arasındaki ilişkinin karaciğer fibrozisine olan etkisi LX-2'de eş zamanlı PZR çalışmaları ile irdelenmiştir (Şekil 5.8.1.ve Şekil 5.9.1.). Hem miR-758-3p hem de miR-758-5p için gerçekleştirilen deneylerde ABCA1 ifadesi istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde baskılanamamıştır ($p>0,05$). miR-758-3p için gerçekleştirilen ilk analizde sadece TGF- β 'nin bulunduğu ortamda COL1A1 ifadesinde görülen artış fibrozis modelinin başarılı bir şekilde gerçekleştirildiğini göstermektedir ($p=0,03$) (Şekil 5.8.1.).

miR-758-5p için gerçekleştirilen ilk analizde de hem sadece TGF- β 'nin bulunduğu hem de TGF- β ile birlikte miRNA'nın bulunduğu ortamda COL1A1 ifadesinde istatistiksel açıdan anlamlı bir artış gözlenmiştir ($p=0,011$) (Şekil 5.9.1.). miR-758-5p için TGF- β 'nin bulunmayıp miR negatifin bulunduğu ortam baz alınarak gerçekleştirilen ikinci analiz sonucuna göre hem TGF- β 'nin hem de miRNA'nın bulunduğu ortamda COL1A1 ifadesinde anlamlı bir artış gözlenmiştir ($p=0,02$) (Şekil 5.9.2.). Ayrıca her ne kadar sadece TGF- β 'nin ve hem TGF- β 'nin hem miRNA'nın bulunduğu ortamlarda ABCA1 ifadesinde anlamlı bir artış gözlenirse de elde edilen bu sonuçların deneysel hatadan kaynaklandığı düşünülmektedir ($p>0,05$) (Şekil 5.9.2.). Elde edilen bu eş zamanlı PZR verilerinden dolayı araştırmanın protein analizi basamağı gerçekleştirilmemiştir. Bu şekilde istatistiksel açıdan anlamlı sonuçların elde edilememesi transfekte edilen miR-758'in hücre kültürü ortamında hedef mRNA'ya bağlanamamasından veya miR-758'in ABCA1 üzerinde gerçekleştireceği baskılanmanın protein düzeyinde gözlenebileceğinden kaynaklanabileceğini düşündürmüştür.

Bu tez çalışması sonucunda literatür araştırmasından elde edilen bilgiler ışığında karaciğer fibrozisine etkisi olabileceği düşünülen aday miRNA'lardan miR-138'in karaciğer fibrozisinin oluşumunda ve gelişiminde pro-fibrotik etkiye sahip olduğu insan HSH'lerinde ilk kez gösterilmiştir. Diğer aday miRNA'lar ile yapılan deneysel analizlerde ise anlamlı bir etki saptanamamıştır.

Eş zamanlı PZR sonuçlarından elde edilen veriler ışığında miR-138'in pro-fibrotik etkisinin başka hangi hedef genlerle ya da yolaklar aracılığıyla olabileceği yine eş zamanlı PZR çalışmaları ve western blot analizi ile irdelemek ileride yapılacak çalışmalar arasında düşünülebilir. Literatür taraması ve biyoinformatik analizler yapılarak karaciğer fibrozisinde anti-fibrotik veya pro-fibrotik etkiye sahip olabilecek başka aday miRNA'ların belirlenmesi ve etkilerinin araştırılması yine ileri çalışmalar için değerlendirilebilir.

7. KAYNAKLAR

1. Pellicoro A, Ramachandran P, Iredale JP, Fallowfield JA. Liver fibrosis and repair: immune regulation of wound healing in a solid organ. *Nature reviews Immunology*. 2014;14(3):181.
2. Friedman SL. Liver fibrosis—from bench to bedside. *Journal of hepatology*. 2003;38:38-53.
3. Xu L, Hui A, Albanis E, et al. Human hepatic stellate cell lines, LX-1 and LX-2: new tools for analysis of hepatic fibrosis. *Gut*. 2005;54(1):142-151.
4. Kim VN. MicroRNA biogenesis: coordinated cropping and dicing. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2005;6(5):376-385.
5. Gallo A, Tandon M, Alevizos I, Illei GG. The majority of microRNAs detectable in serum and saliva is concentrated in exosomes. *PloS one*. 2012;7(3):e30679.
6. Du J, Niu X, Wang Y, et al. MiR-146a-5p suppresses activation and proliferation of hepatic stellate cells in nonalcoholic fibrosing steatohepatitis through directly targeting Wnt1 and Wnt5a. *Scientific reports*. 2015;5:16163.
7. Chen S-L, Zheng M-H, Shi K-Q, Yang T, Chen Y-P. A New Strategy for Treatment of Liver Fibrosis. *BioDrugs*. 2013;27(1):25-34.
8. Jansen PL. Non-alcoholic steatohepatitis. *European journal of gastroenterology & hepatology*. 2004;16(11):1079-1085.
9. Benyon R, Iredale J. Is liver fibrosis reversible? *Gut*. 2000;46(4):443-446.
10. Arthur MJ. Fibrogenesis II. Metalloproteinases and their inhibitors in liver fibrosis. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*. 2000;279(2):G245-G249.
11. Wake K. “Sternzellen” in the liver: perisinusoidal cells with special reference to storage of vitamin A. *Developmental Dynamics*. 1971;132(4):429-461.
12. Wake K. Perisinusoidal stellate cells (fat-storing cells, interstitial cells, lipocytes), their related structure in and around the liver sinusoids, and vitamin A-storing cells in extrahepatic organs. *International review of cytology*. 1980;66:303-353.
13. Ito T, Nemoto M. Kupfer's cells and fat storing cells in the capillary wall of human liver. *Okajimas folia anatomica Japonica*. 1952;24(4):243.

14. Giampieri M, Jezequel A, Orlandi F. The lipocytes in normal human liver. *Digestion*. 1981;22(4):165-169.
15. Jezequel A, Novelli G, Venturini C, Orlandi F. Quantitative analysis of the perisinusoidal cells in human liver: the lipocytes. In: *Liver Cirrhosis*. Vol 8. Karger Publishers; 1984:85-90.
16. Puche JE, Saiman Y, Friedman SL. Hepatic stellate cells and liver fibrosis. *Comprehensive Physiology*. 2013.
17. Enzan H, Hayashi Y, Miyazaki E, et al. Morphological aspects of hepatic fibrosis and Ito cells (hepatic stellate cells), with special reference to their myofibroblastic transformation. In: *Liver Diseases and Hepatic Sinusoidal Cells*. Springer; 1999:219-231.
18. Asahina K, Sato H, Yamasaki C, et al. Pleiotrophin/heparin-binding growth-associated molecule as a mitogen of rat hepatocytes and its role in regeneration and development of liver. *The American journal of pathology*. 2002;160(6):2191-2205.
19. Asahina K, Tsai SY, Li P, et al. Mesenchymal origin of hepatic stellate cells, submesothelial cells, and perivascular mesenchymal cells during mouse liver development. *Hepatology*. 2009;49(3):998-1011.
20. Kubota H, Yao H, Reid LM. Identification and characterization of vitamin A-storing cells in fetal liver: implications for functional importance of hepatic stellate cells in liver development and hematopoiesis. *Stem Cells*. 2007;25(9):2339-2349.
21. Blomhoff R, Green MH, Berg T, Norum KR. Transport and storage of vitamin A. *Science*. 1990;250(4979):399-404.
22. Hendriks H, Verhoofstad W, Brouwer A, De Leeuw A, Knook D. Perisinusoidal fat-storing cells are the main vitamin A storage sites in rat liver. *Experimental cell research*. 1985;160(1):138-149.
23. Hendriks HF, Blaner WS, Wennekers HM, et al. Distributions of retinoids, retinoid-binding proteins and related parameters in different types of liver cells isolated from young and old rats. *The FEBS Journal*. 1988;171(1-2):237-244.
24. Arthur M, Friedman SL, Roll FJ, Bissell DM. Lipocytes from normal rat liver release a neutral metalloproteinase that degrades basement membrane (type IV) collagen. *Journal of Clinical Investigation*. 1989;84(4):1076.
25. Knittel T, Mehde M, Kobold D, Saile B, Dinter C, Ramadori G. Expression patterns of matrix metalloproteinases and their inhibitors in parenchymal and non-parenchymal cells of rat liver: regulation by TNF- α and TGF- β 1. *Journal of hepatology*. 1999;30(1):48-60.
26. Gressner AM, Weiskirchen R, Breitkopf K, Dooley S. Roles of TGF-beta in hepatic fibrosis. *Front Biosci*. 2002;7(1):d793-807.

27. Inagaki Y, Kushida M, Higashi K, et al. Cell type-specific intervention of transforming growth factor β /Smad signaling suppresses collagen gene expression and hepatic fibrosis in mice. *Gastroenterology*. 2005;129(1):259-268.
28. Tsukada S, Westwick JK, Ikejima K, Sato N, Rippe RA. SMAD and p38 MAPK signaling pathways independently regulate $\alpha 1$ (I) collagen gene expression in unstimulated and transforming growth factor- β -stimulated hepatic stellate cells. *Journal of Biological Chemistry*. 2005;280(11):10055-10064.
29. Bourd-Boittin K, Bonnier D, Leyme A, et al. Protease profiling of liver fibrosis reveals the ADAM metallopeptidase with thrombospondin type 1 motif, 1 as a central activator of transforming growth factor beta. *Hepatology*. 2011;54(6):2173-2184.
30. Svegliati Baroni G, D'Ambrosio L, Ferretti G, et al. Fibrogenic effect of oxidative stress on rat hepatic stellate cells. *Hepatology*. 1998;27(3):720-726.
31. Galli A, Svegliati-Baroni G, Ceni E, et al. Oxidative stress stimulates proliferation and invasiveness of hepatic stellate cells via a MMP2-mediated mechanism. *Hepatology*. 2005;41(5):1074-1084.
32. Ankoma-Sey V, Wang Y, Dai Z. Hypoxic stimulation of vascular endothelial growth factor expression in activated rat hepatic stellate cells. *Hepatology*. 2000;31(1):141-148.
33. Corpechot C, Barbu V, Wendum D, et al. Hypoxia-induced VEGF and collagen I expressions are associated with angiogenesis and fibrogenesis in experimental cirrhosis. *Hepatology*. 2002;35(5):1010-1021.
34. Henderson NC, Iredale JP. Liver fibrosis: cellular mechanisms of progression and resolution. *Clinical Science*. 2007;112(5):265-280.
35. Ghiassi-Nejad Z, Friedman SL. Advances in antifibrotic therapy. *Expert review of gastroenterology & hepatology*. 2008;2(6):803-816.
36. Canbay A, Friedman S, Gores GJ. Apoptosis: the nexus of liver injury and fibrosis. *Hepatology*. 2004;39(2):273-278.
37. Zhan SS, Jiang JX, Wu J, et al. Phagocytosis of apoptotic bodies by hepatic stellate cells induces NADPH oxidase and is associated with liver fibrosis in vivo. *Hepatology*. 2006;43(3):435-443.
38. Jarnagin WR, Rockey DC, Koteliansky VE, Wang S-S, Bissell DM. Expression of variant fibronectins in wound healing: cellular source and biological activity of the EIIIA segment in rat hepatic fibrogenesis. *The Journal of cell biology*. 1994;127(6):2037-2048.
39. Olsen AL, Sackey BK, Marcinkiewicz C, Boettiger D, Wells RG. Fibronectin extra domain-A promotes hepatic stellate cell motility but not differentiation into myofibroblasts. *Gastroenterology*. 2012;142(4):928-937. e923.

40. Hellerbrand C, Stefanovic B, Giordano F, Burchardt ER, Brenner DA. The role of TGF β 1 in initiating hepatic stellate cell activation in vivo. *Journal of hepatology*. 1999;30(1):77-87.
41. Breitkopf K, Godoy P, Ciucan L, Singer M, Dooley S. TGF- β /Smad signaling in the injured liver. *Zeitschrift für Gastroenterologie*. 2006;44(01):57-66.
42. Friedman SL. Hepatic stellate cells: protean, multifunctional, and enigmatic cells of the liver. *Physiological reviews*. 2008;88(1):125-172.
43. Bilzer M, Roggel F, Gerbes AL. Role of Kupffer cells in host defense and liver disease. *Liver International*. 2006;26(10):1175-1186.
44. Bachem M, Melchior R, Gressner A. The role of thrombocytes in liver fibrogenesis: effects of platelet lysate and thrombocyte-derived growth factors on the mitogenic activity and glycosaminoglycan synthesis of cultured rat liver fat storing cells. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*. 1989;27(9):555-566.
45. Borkham-Kamphorst E, van Roeyen CR, Ostendorf T, Floege J, Gressner AM, Weiskirchen R. Pro-fibrogenic potential of PDGF-D in liver fibrosis. *Journal of hepatology*. 2007;46(6):1064-1074.
46. Ramachandran P, Iredale JP. Macrophages: central regulators of hepatic fibrogenesis and fibrosis resolution. *Journal of hepatology*. 2012;56(6):1417-1419.
47. Canbay A, Higuchi H, Bronk SF, Tani M, Sebo TJ, Gores GJ. Fas enhances fibrogenesis in the bile duct ligated mouse: a link between apoptosis and fibrosis. *Gastroenterology*. 2002;123(4):1323-1330.
48. Olaso E, Ikeda K, Eng FJ, et al. DDR2 receptor promotes MMP-2-mediated proliferation and invasion by hepatic stellate cells. *Journal of Clinical Investigation*. 2001;108(9):1369.
49. Wells RG. The role of matrix stiffness in hepatic stellate cell activation and liver fibrosis. *Journal of clinical gastroenterology*. 2005;39(4):S158-S161.
50. Maher J, Sheppard D. Targeting of α v integrin identifies a core molecular pathway that regulates fibrosis in several organs. 2013.
51. Kelly JD, Haldeman B, Grant FJ, et al. Platelet-derived growth factor (PDGF) stimulates PDGF receptor subunit dimerization and intersubunit transphosphorylation. *Journal of Biological Chemistry*. 1991;266(14):8987-8992.
52. Yang L, Kwon J, Popov Y, et al. Vascular endothelial growth factor promotes fibrosis resolution and repair in mice. *Gastroenterology*. 2014;146(5):1339-1350. e1331.
53. Kantari-Mimoun C, Castells M, Klose R, et al. Resolution of liver fibrosis requires myeloid cell-driven sinusoidal angiogenesis. *Hepatology*. 2015;61(6):2042-2055.

54. Meyer DH, Bachem MG, Gressner AM. Modulation of hepatic lipocyte proteoglycan synthesis and proliferation by Kupffer cell-derived transforming growth factors type β 1 and type α . *Biochemical and biophysical research communications*. 1990;171(3):1122-1129.
55. Win KM, Charlotte F, Mallat A, et al. Mitogenic effect of transforming growth factor- β 1 on human ito cells in culture: Evidence for mediation by endogenous platelet-derived growth factor. *Hepatology*. 1993;18(1):137-145.
56. Mullhaupt B, Feren A, Fodor E, Jones A. Liver expression of epidermal growth factor RNA. Rapid increases in immediate-early phase of liver regeneration. *Journal of Biological Chemistry*. 1994;269(31):19667-19670.
57. Inagaki Y, Okazaki I. Emerging insights into transforming growth factor β Smad signal in hepatic fibrogenesis. *Gut*. 2007;56(2):284-292.
58. Huang G, Brigstock DR. Regulation of hepatic stellate cells by connective tissue growth factor. *Front Biosci*. 2012;17(2):2495-2507.
59. Li Z, Oben JA, Yang S, et al. Norepinephrine regulates hepatic innate immune system in leptin-deficient mice with nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology*. 2004;40(2):434-441.
60. Friedman SL. Mechanisms of hepatic fibrogenesis. *Gastroenterology*. 2008;134(6):1655-1669.
61. Iredale JP. Models of liver fibrosis: exploring the dynamic nature of inflammation and repair in a solid organ. *Journal of clinical investigation*. 2007;117(3):539.
62. D'Ambrosio DN, Walewski JL, Clugston RD, Berk PD, Rippe RA, Blaner WS. Distinct populations of hepatic stellate cells in the mouse liver have different capacities for retinoid and lipid storage. *PLoS one*. 2011;6(9):e24993.
63. Kida Y, Xia Z, Zheng S, et al. Interleukin-1 as an injury signal mobilizes retinyl esters in hepatic stellate cells through down regulation of lecithin retinol acyltransferase. *PLoS One*. 2011;6(11):e26644.
64. Kluwe J, Wongsiriroj N, Troeger JS, et al. Absence of hepatic stellate cell retinoid lipid droplets does not enhance hepatic fibrosis but decreases hepatic carcinogenesis. *Gut*. 2011;60(9):1260-1268.
65. Hernández-Gea V, Ghiassi-Nejad Z, Rozenfeld R, et al. Autophagy releases lipid that promotes fibrogenesis by activated hepatic stellate cells in mice and in human tissues. *Gastroenterology*. 2012;142(4):938-946.
66. Ikeda K, Wakahara T, Wang YQ, Kadoya H, Kawada N, Kaneda K. In vitro migratory potential of rat quiescent hepatic stellate cells and its augmentation by cell activation. *Hepatology*. 1999;29(6):1760-1767.

67. Marra F, Romanelli RG, Giannini C, et al. Monocyte chemotactic protein-1 as a chemoattractant for human hepatic stellate cells. *Hepatology*. 1999;29(1):140-148.
68. Bonacchi A, Romagnani P, Romanelli RG, et al. Signal Transduction by the Chemokine Receptor CXCR3 activation of ras/erk, src, and phosphatidylinositol 3-kinase/akt controls cell migration and proliferation in human vascular pericytes. *Journal of Biological Chemistry*. 2001;276(13):9945-9954.
69. Melton AC, Yee HF. Hepatic stellate cell protrusions couple platelet-derived growth factor-BB to chemotaxis. *Hepatology*. 2007;45(6):1446-1453.
70. Novo E, Povero D, Busletta C, et al. The biphasic nature of hypoxia-induced directional migration of activated human hepatic stellate cells. *The Journal of pathology*. 2012;226(4):588-597.
71. Yang C, Zeisberg M, Mosterman B, et al. Liver fibrosis: insights into migration of hepatic stellate cells in response to extracellular matrix and growth factors. *Gastroenterology*. 2003;124(1):147-159.
72. Olaso E, Arteta B, Benedicto A, Crende O, Friedman SL. Loss of discoidin domain receptor 2 promotes hepatic fibrosis after chronic carbon tetrachloride through altered paracrine interactions between hepatic stellate cells and liver-associated macrophages. *The American journal of pathology*. 2011;179(6):2894-2904.
73. Thabut D, Routray C, Lomber G, et al. Complementary vascular and matrix regulatory pathways underlie the beneficial mechanism of action of sorafenib in liver fibrosis. *Hepatology*. 2011;54(2):573-585.
74. Rockey DC. Vascular mediators in the injured liver. *Hepatology*. 2003;37(1):4-12.
75. Liu Z, Van Rossen E, Timmermans J-P, Geerts A, van Grunsven LA, Reynaert H. Distinct roles for non-muscle myosin II isoforms in mouse hepatic stellate cells. *Journal of hepatology*. 2011;54(1):132-141.
76. Su Y-H, Shu K-H, Hu C, et al. Hepatic stellate cells attenuate the immune response in renal transplant recipients with chronic hepatitis. Paper presented at: Transplantation proceedings 2012.
77. Tacke F, Weiskirchen R. Update on hepatic stellate cells: pathogenic role in liver fibrosis and novel isolation techniques. *Expert review of gastroenterology & hepatology*. 2012;6(1):67-80.
78. Holt AP, Haughton EL, Lalor PF, Filer A, Buckley CD, Adams DH. Liver myofibroblasts regulate infiltration and positioning of lymphocytes in human liver. *Gastroenterology*. 2009;136(2):705-714.
79. Guo J, Loke J, Zheng F, et al. Functional linkage of cirrhosis-predictive single nucleotide polymorphisms of toll-like receptor 4 to hepatic stellate cell responses. *Hepatology*. 2009;49(3):960-968.

80. Ramachandran P, Pellicoro A, Vernon MA, et al. Differential Ly-6C expression identifies the recruited macrophage phenotype, which orchestrates the regression of murine liver fibrosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2012;109(46):E3186-E3195.
81. Issa R, Zhou X, Constandinou CM, et al. Spontaneous recovery from micronodular cirrhosis: evidence for incomplete resolution associated with matrix cross-linking. *Gastroenterology*. 2004;126(7):1795-1808.
82. Radaeva S, Sun R, Jaruga B, Nguyen VT, Tian Z, Gao B. Natural killer cells ameliorate liver fibrosis by killing activated stellate cells in nkg2d-dependent and tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-dependent manners. *Gastroenterology*. 2006;130(2):435-452.
83. Tergaonkar V. NFκB pathway: A good signaling paradigm and therapeutic target. *The international journal of biochemistry & cell biology*. 2006;38(10):1647-1653.
84. Oakley F, Meso M, Iredale JP, et al. Inhibition of inhibitor of κB kinases stimulates hepatic stellate cell apoptosis and accelerated recovery from rat liver fibrosis. *Gastroenterology*. 2005;128(1):108-120.
85. Krizhanovsky V, Yon M, Dickins RA, et al. Senescence of activated stellate cells limits liver fibrosis. *Cell*. 2008;134(4):657-667.
86. Schrader J, Fallowfield J, Iredale JP. Senescence of activated stellate cells: not just early retirement. *Hepatology*. 2009;49(3):1045-1047.
87. Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*. 1993;75(5):843-854.
88. Hayes CN, Chayama K. MicroRNAs as biomarkers for liver disease and hepatocellular carcinoma. *International journal of molecular sciences*. 2016;17(3):280.
89. Kumar V, Mahato RI. Delivery and targeting of miRNAs for treating liver fibrosis. *Pharmaceutical research*. 2015;32(2):341-361.
90. Gomes AQ, Nolasco S, Soares H. Non-coding RNAs: multi-tasking molecules in the cell. *International journal of molecular sciences*. 2013;14(8):16010-16039.
91. He L, Hannon GJ. MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation. *Nature reviews Genetics*. 2004;5(8):631.
92. Valencia-Sanchez MA, Liu J, Hannon GJ, Parker R. Control of translation and mRNA degradation by miRNAs and siRNAs. *Genes & development*. 2006;20(5):515-524.

93. Kwiecinski M, Noetel A, Elfimova N, et al. Hepatocyte growth factor (HGF) inhibits collagen I and IV synthesis in hepatic stellate cells by miRNA-29 induction. *PLoS one*. 2011;6(9):e24568.
94. Venugopal SK, Jiang J, Kim T-H, et al. Liver fibrosis causes downregulation of miRNA-150 and miRNA-194 in hepatic stellate cells, and their overexpression causes decreased stellate cell activation. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*. 2010;298(1):G101-G106.
95. Liu Z, Yi J, Ye R, et al. miR-144 regulates transforming growth factor- β 1 induced hepatic stellate cell activation in human fibrotic liver. *International journal of clinical and experimental pathology*. 2015;8(4):3994.
96. Shen W-j, Dong R, Chen G, Zheng S. microRNA-222 modulates liver fibrosis in a murine model of biliary atresia. *Biochemical and biophysical research communications*. 2014;446(1):155-159.
97. Wang B, Li W, Guo K, Xiao Y, Wang Y, Fan J. miR-181b promotes hepatic stellate cells proliferation by targeting p27 and is elevated in the serum of cirrhosis patients. *Biochemical and biophysical research communications*. 2012;421(1):4-8.
98. Vickers KC, Landstreet SR, Levin MG, et al. MicroRNA-223 coordinates cholesterol homeostasis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2014;111(40):14518-14523.
99. Shpyleva S, Pogribna M, Cozart C, et al. Interstrain differences in the progression of nonalcoholic steatohepatitis to fibrosis in mice are associated with altered hepatic iron metabolism. *The Journal of nutritional biochemistry*. 2014;25(12):1235-1242.
100. Streppel MM, Pai S, Campbell NR, et al. MicroRNA 223 is upregulated in the multistep progression of Barrett's esophagus and modulates sensitivity to chemotherapy by targeting PARP1. *Clinical Cancer Research*. 2013;19(15):4067-4078.
101. Yu F, Lin Z, Zheng J, Gao S, Lu Z, Dong P. Suppression of collagen synthesis by Dicer gene silencing in hepatic stellate cells. *Molecular medicine reports*. 2014;9(2):707-714.
102. Xu J, Li L, Yun H-f, Han Y-s. MiR-138 promotes smooth muscle cells proliferation and migration in db/db mice through down-regulation of SIRT1. *Biochemical and biophysical research communications*. 2015;463(4):1159-1164.
103. Mann J, Chu DC, Maxwell A, et al. MeCP2 controls an epigenetic pathway that promotes myofibroblast transdifferentiation and fibrosis. *Gastroenterology*. 2010;138(2):705-714. e704.
104. Yamakuchi M. MicroRNA regulation of SIRT1. *Frontiers in physiology*. 2012;3.

105. Lu L, Wang J, Lu H, et al. MicroRNA-130a and-130b enhance activation of hepatic stellate cells by suppressing PPAR γ expression: A rat fibrosis model study. *Biochemical and biophysical research communications*. 2015;465(3):387-393.
106. Yang Q, Fu S, Wang J. Hepatitis C virus infection decreases the expression of Toll-like receptors 3 and 7 via upregulation of miR-758. *Archives of virology*. 2014;159(11):2997-3003.
107. Ramirez CM, Dávalos A, Goedeke L, et al. MicroRNA-758 regulates cholesterol efflux through posttranscriptional repression of ATP-binding cassette transporter A1. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2011;31(11):2707-2714.
108. Pham BT, van Haaften WT, Oosterhuis D, Nieken J, de Graaf IAM, Olinga P. Precision-cut rat, mouse, and human intestinal slices as novel models for the early-onset of intestinal fibrosis. *Physiological reports*. 2015;3(4):e12323.
109. Vivas Y, Martínez-García C, Izquierdo A, et al. Early peroxisome proliferator-activated receptor gamma regulated genes involved in expansion of pancreatic beta cell mass. *BMC medical genomics*. 2011;4(1):86.
110. Shang L, Zhou H, Xia Y, et al. Serum withdrawal up-regulates human SIRT1 gene expression in a p53-dependent manner. *Journal of cellular and molecular medicine*. 2009;13(10):4176-4184.
111. Singaraja RR, Bocher V, James ER, et al. Human ABCA1 BAC transgenic mice show increased high density lipoprotein cholesterol and ApoAI-dependent efflux stimulated by an internal promoter containing liver X receptor response elements in intron 1. *Journal of biological chemistry*. 2001;276(36):33969-33979.
112. Shaker OG, Senousy MA. Serum microRNAs as predictors for liver fibrosis staging in hepatitis C virus-associated chronic liver disease patients. *Journal of Viral Hepatitis*. 2017.
113. El-Ahwany E, Nagy F, Zoheiry M, et al. Circulating miRNAs as predictor markers for activation of hepatic stellate cells and progression of HCV-induced liver fibrosis. *Electronic physician*. 2016;8(1):1804.
114. Ahn SB, Jang K, Jun DW, Lee BH, Shin KJ. Expression of liver X receptor correlates with intrahepatic inflammation and fibrosis in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Digestive diseases and sciences*. 2014;59(12):2975-2982.

8. ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı: Güniz CENGİZ

Doğum Yeri: Ankara

Doğum Tarihi: 13.10.1988

Medeni Hali: Evli

Yabancı Dili: İngilizce

Eğitim Durumu

Lise: Kanuni Süper Lisesi, Ankara (2002-2006)

Lisans: Hacettepe Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji, Ankara (2006-2012)

İş Tecrübesi

Kurumu: TÜBİTAK 115S335

‘Aday miRNA’ların Karaciğer Fibrozisindeki Etkilerinin İnsan Hepatik Stellat Hücrelerinde Araştırılması’

Görevi: Araştırmacı

Yılları:2016-2017

Kurumu: Türk Patent ve Marka Kurumu

Görevi: Sınai Mülkiyet Uzman Yardımcısı

Yılları: 2015-

9. TEZDEN ÇIKAN YAYINLAR

Ulusal Kongrelerde Sunulan Sözlü Bildiri

11. Ulusal Hepatoloji Kongresi, 2017, “miR-138 ve miR-758’in karaciğer fibrozisi üzerindeki etkisinin insan hepatik stellat hücrelerinde (LX) araştırılması”, Poster Sunum

