

**T.C.
BÜLENT ECEVİT ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ GENETİK ANABİLİM DALI**

**SUBAKUT SKLEROZAN PANENSEFALİT
PATOGENEZİNDE IL 28 VE IL 29'UN ROLÜ**

Dr. Güneş ÇAKMAK GENÇ

TIPTA UZMANLIK TEZİ

**TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. Ahmet DURSUN**

**ZONGULDAK
2016**

TEZ ONAY TUTANAĞI

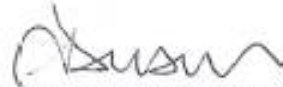
Tezin Teslim Edildiği Üniversite/Fakülte: Bülent Ecevit Üniversitesi Tıp Fakültesi

Tez Başlığı : Subakut Sıklerozan Panensefalit Patogenezinde IL 28 ve IL 29'un Rolü

Tez Yazarı : Arş. Gör. Dr. Gülneş ÇAKMAK GENÇ

Tez Savunma Tarihi: 13/04/2016

Tez Danışmanı : Prof.Dr. Ahmet DURSUN



Prof.Dr. Ahmet DURSUN
Jüri Başkanı



Prof.Dr. Mehmet Ali ERGÜN
Üye



Doç.Dr. Cumhur AYDEMİR
Üye

UYGUNDUR



ÖNSÖZ

Tıbbi Genetik alanında yetişmemde büyük emeği geçen, uzmanlık eğitimim boyunca bana sevgi ve anlayışla yaklaşan, her alanda yol gösterici olan, tezimin tamamlanması sürecinde de desteğini esirgemeyen değerli hocam Prof. Dr. Ahmet Dursun'a en içten teşekkürlerimi sunarım. Bilgi ve deneyimlerinden yararlanma fırsatı bulmak ve BEÜ Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik AD'nın bir üyesi olmak benim için büyük şans. Eğitimim süresince birlikte çalışmaktan zevk aldığım sevgili hocam Doç. Dr. Sevim Karakaş Çelik'e bilgi ve tecrübelerini benden esirgemediği, tezimin her aşamasında bana yol gösterdiği için çok teşekkür ederim. Eğitimim boyunca çok şey paylaştığım, birlikte çalışmaktan mutluluk duyduğum çalışma arkadaşlarım Tuğba Aktaş ve Nihan Yanık'a her konuda bana yardımcı oldukları için teşekkür ederim.

Tez çalışmamdaki katkılarından dolayı BEÜ Çocuk sağlığı ve Hastalıkları AD'dan Doç. Dr. İbrahim Etem Pişkin'e, asistan doktor arkadaşlarım Coşkun Ekemen, Mevlüt Salım, Melike Kefeli'ye, BEÜ Biyoistatistik AD'dan Yrd. Doç. Dr. Füzün Köktürk'e teşekkür ederim.

Hayatımın her aşamasında bana en büyük özveriyle gösteren, doğru yolda ilerlememi sağlayan ve sonsuz destek veren annem, babam ve kardeşime; her zaman olduğu gibi eğitimim ve tez çalışmalarım süresince anlayışını ve desteğini benden esirgemeyen, en büyük yardımcım olan, hayat arkadaşım Mehmet'e ve eğitimimin son döneminde aramıza katılarak hayatımızı anlamlandıran canım kızım Nefes'e minnet ve sevgilerimi sunarım.

Bilimin ışığıyla aydınlanan bir gelecek dileğiyle...

Dr. Güneş Çakmak GENÇ

Zonguldak, 2016

ÖZET

ÇAKMAK GENÇ G. Subakut Sklerozan Panensefalit patogeneğinde IL 28 ve IL 29'un rolü. Bülent Ecevit Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Genetik Anabilim Dalı, Uzmanlık Tezi, Zonguldak 2016.

Subakut sklerozan panensefalit (SSPE), defektif kızamık virusunun persistan infeksiyonunun sebep olduğu, sıklıkla çocuk ve genç erişkinleri etkileyen, ilerleyici nörodejeneratif bir hastalıktır. SSPE gelişiminde viral faktörlerin yanı sıra, hastanın bağışıklık sistemi ile ilgili faktörlerin de önemli rol oynadığı düşünülmektedir. Çalışmamızda SSPE hastalarında ve sağlıklı gönüllülerde *IL28B* rs12979860 ile rs8099917 ve *IL29* rs30461 gen polimorfizm frekansları, IL-28B, IL-29 serum düzeyleri ve miR-548b, miR-548c ve miR-548i'nin ekspresyon düzeyleri belirlenmiştir. Bu çalışmada söz konusu parametrelerin SSPE patogeneğindeki rollerinin araştırılması amaçlanmıştır. SSPE tanısı konan 64 çocuk ile 68 sağlıklı çocuk çalışmaya dahil edilmiştir. Gruplar arasında serum IL-28B düzeyleri için istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık saptanmazken, serum IL-29 düzeylerinin SSPE grubunda, kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde yüksek olduğu belirlenmiştir. *IL28B* rs12979860 gen polimorfizmi için genotip ve alel frekansları dağılımı açısından hasta ve kontrol grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunamamıştır. *IL28B* rs8099917 gen polimorfizmi için genotip dağılımı açısından hasta ve kontrol grubu arasında istatistiksel açıdan anlamlı farklılık bulunamazken, alel frekansları dağılımının istatistiksel olarak anlamlı farklılık gösterdiği saptanmıştır. G alelini taşımak SSPE hastalığı açısından 2.183 kat riskli bulunmuştur. *IL29* rs30461 polimorfizmi için genotip ve alel frekansları dağılımı açısından hasta ve kontrol grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunamamıştır. Serum IL-28B ve IL-29 düzeyleri ile gen polimorfizmleri arasında anlamlı ilişki bulunamamıştır. MiR-548b-5p, miR-548c-5p, miR-548i ekspresyon düzeylerinin SSPE hastalarında kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek olduğu tespit edilmiştir. SSPE hastalarında IL-29 düzeyinin kontrole göre dramatik bir biçimde arttığı gözlenmiştir. miR-548 ekspresyonunun IL-29 düzeyini dengelemek için artmış olabileceği düşünülmüştür. MiRNA ekspresyon düzeylerindeki artış, bağışıklık sisteminin bir uyum yanıtı ya da hastalığın nedeninden çok etkisi olarak değerlendirilmiştir. Gelecekte daha geniş popülasyonlar üzerinde yapılacak olan çalışmalar ile IL-28B ve IL-29'un SSPE patogeneğindeki rolünün, polimorfizmler ve miR548 ailesinin *IL28B* ve *IL29* ile ilişkilerinin daha net olarak anlaşılması beklenmektedir.

Anahtar kelimeler: Subakut sklerozan panensefalit, IL 28B, IL 29, gen polimorfizmi, miRNA 548

ABSTRACT

CAKMAK GENÇ G. The role of IL 28 and IL 29 in the pathogenesis of SSPE. Bulent Ecevit University Faculty of Medicine, Department of Medical Genetics, Thesis, Zonguldak, 2016.

Subacute sclerosing panencephalitis (SSPE) is a progressive neurodegenerative disease primarily affects children and young adults, caused by a persistent infection of defective measles virus. It is thought that factors relating to the immune system of the patient have an important role in the development of SSPE right along with viral factors. In our study gene polymorphism frequencies of *IL28B* rs12979860, rs8099917 and *IL29* rs30461, serum levels of IL-28B, IL-29 and expression levels of mi-548b, miR-548c and miR-548i were determined in SSPE patients and healthy volunteers. In this study, we aimed to investigate the role of the pathogenesis in the SSPE of these parameters. 64 children with diagnosis of SSPE and 68 healthy children were included in the study. While there was not any statistically significant differences between the groups about serum levels of IL-28B. Serum IL-29 levels were significantly higher in SSPE group than the control group. There was not any statistically significant differences between patients and controls about genotype and distribution of allele frequencies of *IL28B* rs12979860 gene polymorphism. Although there was not any statistically significant difference between patients and controls about genotype distribution of *IL28B* rs8099917 gene polymorphism, allele distribution was significantly different in SSPE patients and the control group. G allele was found to increase 2.183-fold risk of SSPE. There was not any statistically significant difference for the *IL29* rs30461 polymorphism genotype and distribution of allele frequencies between patients and controls. There was not any significant correlation between serum levels of IL-28B, IL-29 and gene polymorphisms. The expression levels of miR-548b-5p, miR-548c-5p, miR-548i were found to be significantly higher in SSPE patients than the control group. The level of IL-29 was observed to increase dramatically in SSPE patients, compared to the control group. The expression of miR-548 is thought to be increased to compensate for the level of IL-29. Increase of miRNA expression levels are considered as an adaptation of the immune system response or as an affect of disease more than a reason of it. It is expected that the role of IL-28 and IL-29 in SSPE pathogenesis, the relations between miR548 and *IL28B*, *IL29* and polymorphisms will be straightforward by the help of other studies with wider participations in the future.

Keywords: Subacute sclerosing panencephalitis, IL 28B, IL 29, gene polymorphism, miRNA 548

İÇİNDEKİLER

Sayfalar

ÖNSÖZ	i
ÖZET	ii
ABSTRACT	ii
İÇİNDEKİLER	iv
KISALTMALAR DİZİNİ	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ	viii
TABLolar DİZİNİ	ix
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Subakut Sklerozan Panensefalit	3
2.1.1. Epidemiyoloji	3
2.1.2. Patoloji	4
2.1.3. Klinik Bulgular	5
2.1.4. Tanı	6
2.1.5. Tedavi	7
2.1.6. Prognoz	7
2.2. İNTERFERONLAR	7
2.3. POLİMORFİZM	11
2.3.1. IFN- λ (IFNL) Gen Polimorfizmleri:	13
2.4. MikroRNA	15
2.4.1 MikroRNA Biyogenezi	16
2.4.2. İmmün Sistem Fonksiyonu ve Gelişiminde miRNA'ların Rolü	18
2.4.3. Antiviral savunmada miRNA'lar	19
3. GEREÇ VE YÖNTEM	22
3.1. Hasta Grubu	22
3.2. Kontrol Grubu	22

3.3. Metod.....	22
3.3.1. Periferik kandan DNA elde edilmesi	22
3.3.2. PCR İle İlgili Gen Bölgesinin Amplifikasyonu.....	23
3.3.3. Jelin Hazırlanması ve Jel Elektroforezde Görüntüleme.....	25
3.3.4. Değerlendirme	25
3.4. MiRNA Ekspresyon Analizi İçin Örneklerin Hazırlanması ve Analiz	27
3.4.1. RNA İzolasyonu.....	27
3.4.2. MiRNA Reverse Transkripsiyon (RT) Reaksiyonu (cDNA eldesi)	28
3.4.3. TaqMan miRNA RT Protokol	28
3.4.4. Real Time PCR ile miRNA Ekspresyon Düzeylerinin Belirlenmesi.....	29
3.5. IL-28B ve IL-29 Serum Düzeylerinin Analizi.....	30
3.5.1. IL-28B Ölçümü.....	30
3.5.2. IL-29 Ölçümü	30
3.6. İstatistiksel Analiz	30
4. BULGULAR	32
4.1. Hasta Grubunun Özellikleri	32
4.2. Hasta ve Kontrol Gruplarının Polimorfik Alel Dağılım Sıklığının Karşılaştırması	32
4.2.1. <i>IL28B</i> rs12979860 (<i>IL28</i> C/T) Gen Polimorfizmi	32
4.2.2. <i>IL28B</i> rs8099917 (<i>IL28</i> G/T) Gen Polimorfizmi.....	32
4.2.3. <i>IL29</i> rs30461 (<i>IL29</i> T/C) Gen Polimorfizmi	33
4.3. MiRNA Ekspresyon Düzeylerinin Karşılaştırılması.....	35
4.4. Serum IL-28B düzeyinin değerlendirilmesi.....	36
4.5. Serum IL-29 düzeyinin değerlendirilmesi	37
5. TARTIŞMA.....	39
6. SONUÇLAR.....	45
7. KAYNAKLAR.....	47
8.EKLER.....	59
Ek.1. Etik Kurul Onayı.....	59

KISALTMALAR DİZİNİ

3'UTR	: 3' translasyona uğramamış bölge
AGO	: Argonaute proteini
BBT	: Bilgisayarlı beyin tomografisi
BOS	: Beyin omurilik sıvısı
Bp	: Baz çifti
C	: Sitozin
CCL2	: C-C motif ligand 2
CCR4-NOT	: Karbon katabolit baskılayıcı protein 4-Genel transkripsiyon negatif düzenleyici
CXCL10	: C-X-C motif kemokin 10
DNA	: Deoksiribonükleik asit
dNTP	: Deoksinükleotit trifofat
EEG	: Elektroensefalografi
G	: Guanin
GWAS	: Genom boyu bağlantı çalışması
HCV	: Hepatit C Virüsü
IFN	: İnterferon
IFNAR1	: İnterferon alfa ve beta reseptör alt ünitesi 1
IFNAR2	: İnterferon alfa ve beta reseptör alt ünitesi 2
IFN-λ	: İnterferon lambda
IgG	: İmmunglobulin G
IL-10	: İnterlökin-10
IL10R2	: İnterlökin 10 reseptör 2
IL-12	: İnterlökin-12
IL-28A	: İnterlökin 28A
IL-28B	: İnterlökin 28B

IL-28RA(IFN-λR1)	: İnterferon lambda reseptör 1
IL-29	: İnterlökin 29
IRF 9	: İnterferon reseptör faktör 9
ISG	: İnterferon ile uyarılan gen
ISGF	: İnterferon ile uyarılan gen faktörü
Jak-STAT	: Janus kinaz-sinyal transdüksiyon
MRG	: Manyetik rezonans görüntüleme
miRNA	: mikroRNA
mRNA	: Mesajcı RNA
PAMPs	: Patojen-ilişkili moleküler paternler
piwiRNA	: Piwi ile etkileşen RNA
PPD	: Pürifiye protein türevi
RISC	: RNA ile tetiklenmiş susturma kompleksi (RNA-induced silencing complex)
rRNA	: Ribozomal RNA
siRNA	: Küçük müdahaleci RNA
SNP	: Tek nükleotid polimorfizmleri
SSPE	: Subakut Sklerozan Panensefalit
SSS	: Santral sinir sistemi
T	: Timin
Th1	: T helper1
TLR	: Toll benzeri reseptörler
tRNA	: Taşıyıcı RNA
TYK2	: Tirozin kinaz 2
VZV	: Varisella zoster virüs

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Sekil</u>	<u>Sayfa</u>
1. IFN- λ reseptör sinyal yolağı.....	10
2. miRNA'nın Biyogenezi.....	17
3. <i>IL28</i> rs12979860 gen polimorfizmi jel elektroforez görüntüsü.....	25
4. <i>IL28</i> rs8099917 gen polimorfizmi jel elektroforez görüntüsü.....	26
5. <i>IL29</i> rs30461 gen polimorfizmi jel elektroforez görüntüsü.....	27
6. miR548b-5p, miR548c-5p ve miR548i ekspresyon düzeyleri.....	36

TABLolar DİZİNİ

TabloSayfa

1.SSPE'nin tanı kriterleri.	6
2. MiR-548'lerin IFN- λ 1'in 3'UTR bölgesinde hedefledikleri bölge.....	20
3.Kantitatif Real Time PCR ile analiz edilen miRNA'lar ve dizileri.....	29
4.SSPE hastalarında ve sağlıklı kontrollerde <i>IL28B</i> ve <i>IL29</i> gen polimorfizmlerinin genotip frekansları	34
5.SSPE hastalarında ve sağlıklı kontrollerde <i>IL28B</i> ve <i>IL29</i> gen polimorfizmlerinin alel frekansları.	34
6.SSPE hastalarında ve sağlıklı kontrollerde periferik kandaki miR548b-5p, miR548c-5p ve miR548i ekspresyon düzeyleri.	36
7.SSPE hastalarında ve sağlıklı kontrollerde serum IL-28B ve IL-29 düzeyleri.	37
8. Çalışmaya dahil edilerek serum IL-28B düzeyi ölçülen tüm bireylerde rs12979860 ve rs80999917 polimorfizmleri için alellere göre IL-28B serum düzeyi.....	38
9. Çalışmaya dahil edilerek serum IL-29 düzeyi ölçülen tüm bireylerde rs30461 polimorfizmleri için alellere göre IL-29 serum düzeyi.....	38



1. GİRİŞ VE AMAÇ

Subakut Sklerozan Panensefalit (SSPE), defektif ya da mutasyona uğramış kızamık virüsünün neden olduğu, santral sinir sisteminin (SSS) yavaş ilerleyen bir virüs enfeksiyonudur. Yaygın demiyelinizasyon ve inflamasyonla seyreder (1). Belirtiler kızamık enfeksiyonu geçirilmesinden 5–8 yıl sonra ve ortalama 8–10 yaş civarında ortaya çıkar (2). Başlangıç klinik bulgusu kişilik değişiklikleri, takiben miyoklonik nöbetler ve progresif mental-motor gerilik olup, hastalarda 2–3 yılda ölümle sonuçlanan nörodejeneratif bozukluk görülür (3). Hastalığın tanısı tipik klinik bulgularla beraber beyin omurilik sıvısı (BOS) incelemesi ve elektroensefalografi (EEG) bulguları ile konur (1). Gelişmiş ülkelerde kızamık ve SSPE insidansının aşılama ile birlikte belirgin azalma gösterdiği ve ortalama SSPE görülme yaşının da 9'dan 14'e çıktığı bildirilmiştir (4). Ülkemizde ulusal çapta aşılama programının uygulanmasıyla, 1975–1987 yılları arasında milyonda 0.827 olan SSPE insidansı 1997-1999 yılları arasında milyonda 0.461'e kadar düşmüştür. (5). Mekanizması henüz açıklığa kavuşturulamamış olmakla birlikte SSPE'de kızamık virüsünün hastalık semptomları başlamadan önce SSS'de yerleştiği ve burada persiste olduğu kabul edilmektedir. SSPE gelişiminde hem viral faktörlerin, hem de konakla ilgili faktörlerin rol oynadığına dair bulgular vardır (6,7).

İnterferon lambda (IFN- λ ya da Tip III IFN) yakın dönemde keşfedilmiş, antiviral etkinlik gösterdiği saptanan interferon grubudur. IFN- λ 1 (IL-29), IFN- λ 2 (IL-28A) ve IFN- λ 3 (IL-28B) olmak üzere fonksiyonel olarak tanımlanmış üç alt grubu vardır. Son zamanlarda yapılan çalışmalarla *IL28B* ve *IL29* genleri üzerinde tanımlanmış fonksiyonel birçok tek nükleotid polimorfizmi (SNP) belirlenmiştir. Literatürde *IL28B* ve *IL29* genlerinde tanımlı rs8099917, rs12979860 ve rs30461 polimorfizmlerinin viral ve inflamatuvar hastalıklarla ilişkisini gösteren çalışmalar mevcuttur (8,9,10,11). Biz de rs8099917, rs12979860 ve rs30461 polimorfizmlerinin SSPE hastalığı ile ilişkisini araştırmayı amaçladık.

Mikro-ribonükleik asitler (miRNA) yaklaşık 18-25 nükleotidden oluşan, mRNA stabilitesini ve translasyon aktivasyon ya da inhibisyonunu etkileyerek post-transkripsiyonel düzenlemeye aracılık eden, kısa, tek zincirli ve protein kodlamayan RNA molekülleridir. Hedef mRNA'ların 3'UTR bölgelerine bağlanırlar ve gen

ekspresyonunu transkripsiyon sonrası mekanizmayla baskırlar (12). MiRNA'lar hücre proliferasyonu, farklılaşması, gelişmesi, hücre ölümü, virüs ve konak hücre etkileşimi gibi çeşitli işlemlerde temel düzenleyicilerdir. MiRNA'ların birçok kanser türüyle, viral hastalıklarla, immün sistem gelişimiyle ve otoimmün hastalıklarla ilişkili olduğunu kanıtlayan pek çok çalışma bulmak mümkündür (13,14,15,16).

Bu çalışmada IL-28B ve IL-29'un, bu sitokinlerle ilişkili bazı polimorfizmlerin ve miR-548'in SSPE ile ilişkisini araştırmak amaçlanmıştır. Bu amaçla SSPE hastalarında ve sağlıklı gönüllülerde; IL-28B, IL-29 serum düzeyleri, *IL28B* rs12979860 ile rs8099917 ve *IL29* rs30461 gen polimorfizmleri ve miR-548b, miR-548c, miR-548i ekspresyon düzeyleri çalışılmıştır.



2. GENEL BİLGİLER

2.1. Subakut Sklerozan Panensefalit

Subakut Sklerozan Panensefalit (SSPE), defektif ya da mutasyona uğramış kızamık virüsünün neden olduğu, SSS'nin yavaş ilerleyici virüs enfeksiyonlarından birisidir. Yaygın demiyelinizasyon ve inflamasyonla seyreder (1). Hastalık tipik lezyonların oluşum sürecinin en az 9 ay olması, patolojik lezyonların doğası gereği sklerotik oluşu ve tüm beyin dokusunun etkilenmesi nedeniyle, 'subakut sklerozan panensefalit' olarak adlandırılmıştır (17).

SSPE'de kızamık virüsünün patogenezdaki rolü tam olarak bilinmemektedir (7,18). Yapılan çalışmalarda SSPE hastalarının beyin dokusunda defektif kızamık virüsü izole edilmiştir. Kızamık virüsünün yapısal proteinlerini kodlayan viral genlerdeki değişikliğin persistan merkezi sinir sistemi enfeksiyonu patogenezinde önemli rol oynadığı düşünülmektedir (3,19). SSPE öncelikle çocuk ve genç erişkinleri etkiler ve hastaların genellikle 2 yaşından önce bir kızamık geçirme öyküsü vardır (20).

2.1.1.Epidemiyoloji

Dünyada her yıl yaklaşık 30.000.000 yeni vaka ve 800.000 ölüme yol açan kızamık enfeksiyonu halen önemli bir sağlık sorunu olmaya devam etmektedir (21). SSPE insidansı kızamık aşılama kapsamı ile ters orantılıdır. Gelişmiş ülkelerde, SSPE görülme sıklığı 1960'larda kızamık aşısı yapılmaya başlanmasından itibaren giderek azalmıştır. Yıllık insidansı ülkeden ülkeye değişiklik göstermektedir. SSPE insidansı Kanada'da milyonda 0.06, Japonya'da milyonda 11, Hindistan'da milyonda 21 vaka olarak bildirilmiştir (17).

Ülkemizde ulusal çapta aşılama programının uygulanmasıyla, insidans 1975–1987 yıllarında milyonda 0.827 iken 1997-1999 yılları arasında milyonda 0.461'e kadar düşmüştür(5). 2003-2004 yılları arasında İstanbul'da yapılan bir çalışmada, SSPE görülme oranı 2.5/1.000.000 olarak hesaplanmıştır. Bu oran rutin aşılama programı uygulayan ülkelerdeki 0,06-1/1.000.000 oranına göre yüksek fakat rutin aşılama programı uygulamayan ülkelerdeki 10-100/1.000.000 oranıyla kıyaslandığında düşük bir orandır (22).

Aşılı bireylerde de SSPE görüldüğü bildirilmiştir. Bu tür vakalar hatalı aşıya bağlı olabilir ve aşılamanın %100 etkili olmadığı gerçeğiyle açıklanabilir. Son epidemiyolojik ve virolojik veriler kızamık aşısının SSPE'ye karşı koruyucu olduğunu ve kızamık aşısı virüsünün SSPE'ye neden olmadığını göstermektedir. Bunun yanı sıra kızamık aşısı uygulanması, bağışıklama olmadan hastalık gelişmiş bireyde SSPE seyrini değiştirmez veya tetiklemez (23).

Primer kızamık enfeksiyonunda cinsiyet farkı görülmemesine karşın SSPE erkeklerde 3 kat daha fazla görülür. Kırsal kesimde yaşayan, iki veya daha fazla kardeşi olan, mental geriliği olan, düşük doğum ağırlığına sahip ve kalabalık çevrelerde yaşayan çocuklarda daha sık görülmektedir (1).

2.1.2. Patoloji

Kızamık virüsü; Paramiksovirus ailesinin Morbilivirus genusundan, tek zincirli negatif sarmallı bir RNA virüsüdür. Zarf parçacıkları ve merkezi bir sarmal içeren küresel bir yapıya sahiptir. Proteolitik enzimler, eter, aseton, formalin gibi kimyasal maddeler ve ultraviyole ile kısa sürede etkinliğini kaybeder. Düşük ısılarda uzun süre canlı kalabildiği için özellikle kış sonu ve ilkbaharda epidemiler yapar (24,25).

Kızamık virüsü altı temel protein kodlar. Fosfoprotein (P-proteini), large (L) proteini ve nükleoprotein (N) RNA ile birleşerek nükleokapsidi oluşturur. Diğer üç protein viral zarf ile birleşen matriks proteini (M) ve yüzey proteinleri olan hemaglutinin (H) ve füzyon (F) proteinleridir. Zarf proteinlerinin fonksiyonları virülans için önemlidir. Yabani tipteki kızamık virüsü bu proteinlerin tümünü içerir ve genellikle virülandır. Aynı zamanda etkili bir immün antikor yanıtı karşı çok duyarlıdır. Etkili bir bağışıklık yanıtı, proteinlerin hepsine karşı antikorlar oluşturulur ve çoğu durumda hücre dışında serbest yüzen virüs, aşırı duyarlılık reaksiyonu ile elimine edilir. Yetersiz bağışıklık yanıtı ise yabani virüs kurtulur ve hasar vermeye devam eder. Eğer, konak organizma tarafından yetersiz bağışıklık nedeniyle virüslerin yalnızca yaşamsal olmayan proteinleri elimine edilir ise, değişim geçirmiş, persistan ve yavaş virüsler oluşmaktadır. Eğer yalnızca M-proteini hasara uğrar ya da tamamen yok edilirse değişime uğrayan virüs uyku fazına girer. Sinir sistemine yerleşmiş olan uyku fazındaki virüs bir süre sonra hastalık oluşturma yetisine yeniden kavuşur ve sonuçta konakta harabiyete yol açar. M proteini hasarlı

virüslerin sinir sistemi dışında yaşaması ya da yayılması muhtemel değildir. Bu uyku döneminden 7-10 yıl sonra inflamasyon, tahriş ve yıkım yoluyla SSPE nörolojik belirti ve bulguları görülmeye başlar (25,26,27).

Son çalışmalar, viral enfeksiyonun direkt bir etkisi olarak ya da sitokin aracılı yanıtlarla oluşan çeşitli hücre tiplerinin apoptozunun, insan merkezi sinir sisteminde kızamık virüsü enfeksiyonunda görülen oligodendroglial ve nöronal hücre ölümü ile sonuçlanan SSPE patogenezinde katkıda bulunabileceğini düşündürmektedir (1,26,27,28).

SSPE hastalarında periferik kan mononükleer hücrelerinin spontan proliferasyonunun sağlıklı erişkin kontrollere göre daha düşük olduğu görülmüştür. Yapılan çalışmalarda SSPE hastalarında T hücre yanıtının gelişmediğini ya da defektif olduğunu düşündüren bulgular mevcuttur (29,30). SSPE hastalarının T hücre işlevlerini ayrıntılı olarak araştıran çalışmalar SSPE oluşumundaki patogenetik mekanizmaları aydınlatmakta faydalı olacaktır.

SSPE hastalarında yapılan beyin biyopsileri incelendiğinde dikkati çeken bulgular nöronlarda yaygın dejenerasyon ve kortikal yapılarda bozulmadır. Beynin en çok etkilenen bölgesi parieto-okspital bölgedir (31). Aksonlardan sonra en sık etkilenen hücreler oligodendrositlerdir. Nöronlarda ve oligodendrositlerde değişen miktarlarda eozinofilik, kızamık virüs antijen pozitif, intranükleer inklüzyon cisimcikleri (Cowdry tip A) görülmektedir. Virüs yayılımı transsinaptik yolla olur (32). Yapılan çalışmalar SSPE’de astrositler, makrofajlar ve endotelial hücrelerde IFN- γ ve tümör nekroz faktör- α ekspresyonunun varlığını göstermiştir (33,34).

2.1.3. Klinik Bulgular

SSPE belirtileri kızamık enfeksiyonu sonrasında tam iyileşme ile sessiz geçen latent dönemin ardından 6-15 yaş arasında ortaya çıkar. Kızamık enfeksiyonunu bir yaşından önce geçiren çocuklarda hastalık daha erken görülebilmekte ve latent dönem daha kısa olabilmektedir. Bunun sebebi SSS ile bağışıklık sisteminin immaturitesi olabilir. Başlangıç belirtileri genellikle belirsizdir. Çocuklarda irritabilite, dikkat süresinde kısalma, kısa süreli öfke atakları, geçici unutkanlık gibi belirtiler gözlenir. Okul performansında düşme gözlenir. Nadiren tek bir epilepsi

nöbeti hastalığın ilk belirtisi olabilir. Bu belirti ve bulgular SSPE'nin ilk evresi için tipiktir (4).

Hastalık ilerledikçe motor fonksiyonlarda bozukluklar ortaya çıkmaya başlar ve periyodik stereotipik miyoklonik nöbetler gelişir. Hastalığın ileri dönemlerinde piramidal ve ekstrapiramidal bulgular görülebilir. Hastalığın ileri aşamalarında hastalarda miyoklonus kaybolarak, spastisite artışı ve kuadriparezi, koma aşamasında ise duyularda progresif bozulma görülür. Hastalığın terminal aşamalarında, hastalarda aralıklı hipertermi, aşırı terleme, nabız ve kan basıncı anormallikleri şeklinde ortaya çıkan hipotalamik yetmezlik gelişebilir (26,35).

2.1.4. Tanı

SSPE tanısı klinik ve laboratuvar bulguları ile konmaktadır. SSPE tanı kriterleri Tablo 1'de gösterilmiştir. Beş kriterden 3'ün üzerinde pozitif kriter varsa kesin tanı, 3 pozitif kriter varsa olası tanı konur (36). Miyoklonus ve bazı progressif nörolojik bozukluklar gibi klinik belirtilerle ortaya çıkan çeşitli nörodejeneratif hastalıklardan ayırt edilmesi gerekmektedir (1).

Tablo 1:SSPE'nin tanı kriterleri.

1. Klinik:	Miyoklonusla beraber progressif, subakut mental kötüleşme
2. EEG:	Periyodik, stereotipik, yüksek voltajlı deşarjlar
3. BOS:	Yüksek gamaglobülin ya da oligoklonal pattern
4.Kızamık antikoları:	Serumda (>1:256) ve/veya BOS'ta (>1:4) yüksek titrasyon
5. Beyin biyopsisi:	Panensefalitin gösterilmesi

SSPE'de BOS değerlendirmesi genellikle normal olmakla birlikte, artmış protein konsantrasyonu gözlenebilir. Serebrospinal sıvıda protein artışının nedeni artmış gamaglobulindir (1). Serumda kızamık antikor titresinin 1/256 ya da daha yüksek ve BOS'ta 1/4 ya da daha yüksek olması SSPE tanısını düşündürür. BOS ve

serum oranlarının albumin ve diğ er viral antikorlar için normal olması, kan beyin bariyerinin normal olduğunu, artmış kıızamık antikorları miktarının SSS'deki sentezden kaynaklandığını göstermektedir (37,38).

Tipik EEG paterni miyoklonik fazda görülür ve hemen hemen tanı koydurucudur. EEG görüntüsü bilateral, simetrik, senkronize, yüksek voltajlı (200-500mV) polifazik, stereotipik delta dalgaları içeren periyodik komplekslerle karakterizedir (35,39).

SSPE tanısında görüntüleme yöntemlerinin yeri sınırlıdır. Görüntüleme yöntemleri tanı için gerekli olmayıp ayırıcı tanı ve hastalığın gidişi hakkında bilgi verir. Manyetik rezonans görüntüleme, SSPE hastalarında beyaz cevher anormalliklerini göstermede günümüzde en duyarlı görüntüleme yöntemidir (35).

Beyin biyopsisi, SSPE tanısı konulması için nadiren gerekli iken klinik ya da laboratuvar özellikleri ile atipik karakterde olan vakalarda bu tetkik tanı için önemli olmaktadır. Patolojik dokuda yaygın nöron kaybı ve gliozis, demiyelinizasyon, mikrogliya proliferasyonu, nörofibriler yumaklar dikkati çeker. Beyaz cevherde köpüksü makrofajlar; kortikal nöronlarda, oligodentrositlerde ve astrositlerde eozinofilik intranükleer inklüzyonlar (cowdry tip A) gözlenir. Biyopsi materyalinde kıızamık virüs antijenleri ve RNA'sı saptanabilir (4,36).

2.1.5. Tedavi

Günümüzde SSPE'nin etkin bir tedavisi mevcut değildir. Randomize olmayan bazı çalışmalarda uzun süreli tedavi verildiğinde bazı antiviral ve imm nomodulat r ajanların yaşam süresini ve kalitesini arttırdığı bildirilmiştir (35,40).

2.1.6. Prognoz

SSPE genellikle 1-3 yıl içinde ölümle sonuçlanan ilerleyici bir hastalıktır (35). Vakaların yaklaşık %5'inde spontan remisyon vardır, bu iyileşme hastalığın herhangi bir evresinde olabilir ve uzun dönem remisyon sürebilir (41).

2.2. İNTERFERONLAR

IFN'lar antiviral aktiviteyi indükleme yetenekleri ile bilinen sitokinlerdir. Bu etkiyi hedef hücrelerdeki ortak kökenli reseptör kompleksleri üzerinden gerçekleştirirler.

Aslında, bu sitokin ailesi adını konak hücreleri içinde viral replikasyona müdahale (interfere) etme yeteneğinden almıştır (42). Yapısal özellikleri, reseptör kullanımı ve biyolojik aktivitelerine göre üç farklı tip IFN tanımlanmıştır. Her tip IFN doğal ve adaptif bağışıklık mekanizmalarını uyararak viral enfeksiyonların temizlenmesine katkıda bulunmasına rağmen, sadece tip I ve tip III IFN'lar doğrudan virüs enfeksiyonlarına yanıt olarak üretilir (43).

Tip I IFN'lar Isaacs ve Lindemann tarafından 1957 yılında keşfedilen ve pek çok alt tipi tanımlanmış büyük bir sitokin ailesidir. Tip I IFN'lar pek çok viral enfeksiyona karşı ilk savunma hattını oluştururlar. Virüs ile enfekte edilmiş hücreler, tip I IFN'ları sentezleyip salgılayarak konakçı hücrelerde antiviral yanıtın oluşmasını sağlarlar. Çok çeşitli hücre türlerinde eksprese olurlar ve interferon stimüle eden gen faktörü (ISGF) tarafından kontrol edilen bir dizi geni etkinleştirerek ortak sinyal yolağını aktive ederler. Bahsi geçen genler apoptoz, büyüme karşıtı, doğal ve adaptif immün hücre aktivasyonunda rol oynayan ürünleri sentezletir (44,45).

Tip II IFN grubu sadece esas olarak T lenfositler, doğal katil hücreler ve monositler, histiositler, dendritik hücreler gibi antijen sunan hücreler tarafından salgılanan IFN- γ 'dan oluşur. IFN- γ , Tip I IFN'ların antiviral etkinliğinin uyarılmasını güçlendirebilmektedir. Fakat antiviral aktivite IFN- γ 'nın primer biyolojik fonksiyonu değildir. Tip I ve tip II IFN'lar genellikle etkili bir antitümör immünitenin uyarılması ve viral enfeksiyonların ortadan kaldırılması ile sonuçlanan çeşitli doğal ve adaptif bağışıklık tepkileri etkinleştirmek için birlikte çalışırlar (44,45).

2003 yılında iki grup bilim adamı birbirinden bağımsız olarak yeni bir sitokin benzeri interferon türünün (IFNL, IFN- λ) keşfini rapor ettiler. IFN- λ 1 (IL-29), IFN- λ 2 (IL-28A) ve IFN- λ 3 (IL-28B) olmak üzere 3 alt tipi tanımlanmıştır (46,47).

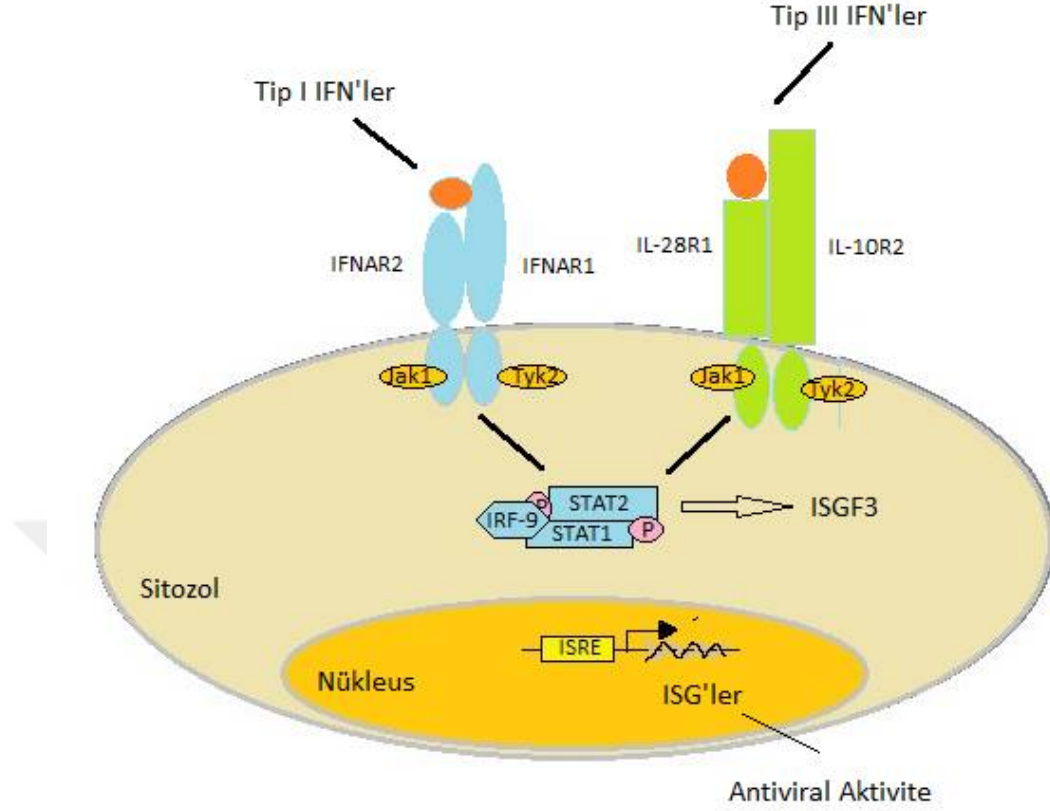
Filogenetik olarak tip III IFN'ların genleri tip I IFN ve IL-10 gen aileleri arasında bir yerde bulunur. Tip III IFN'lar, Tip I IFN ailesi ile 15-19%, IL-10 ile %11-13 oranında aminoasit dizi benzerliğine sahiptir. Tip III IFN sentezleyen genler 19 nolu kromozomda kümelenmiş halde bulunurlar. Ayrıca insan genomu, bu üç fonksiyonel gene ek olarak IFN- λ 4 psödogenini de içerir. Bu üç genin promoterleri arasındaki benzerlik nedeniyle benzer şekilde düzenlenmeleri muhtemeldir (44).

IL28B, 734 bp uzunluğunda, 6 eksonlu, *IL29* 857 bp uzunluğunda, 5 eksonlu bir gendir. İkisi de kromozom 19q13 üzerinde lokalizedir.

Tip III IFN'lar, iki zincirden oluşan bir hücre yüzey reseptörü aracılığıyla etki gösterir. İlki IL-28RA olarak da bilinen interferon lambda reseptör 1 (IFN- λ R1)'dir ve Tip III IFN'a spesifik olarak bilinir. IFN- λ reseptör alt birimlerini kodlayan genler, 1 nolu kromozom (1p36.11 bölge) üzerinde yer almaktadır. Diğeri IL-10, IL-22 ve IL-26 sitokinlerinin de ortak olarak kullandığı interlökin 10 reseptör 2 (IL10R2)'dir. Tip III IFN'ların her iki reseptör zinciri de hücre dışı, transmembran ve hücre içi kısımlardan oluşur. Tip I IFN reseptörleri her yerde bulunan reseptörler olarak ifade edilirken, IFN- λ R1 sadece belirli hücrelerin alt gruplarında bulunmaktadır. IFN- λ R1 kodlayan mesajcı RNA (mRNA) birçok hücre tipinde tespit edilemez. Bu nedenle özellikle fibroblast ve endotel hücreleri, Tip III IFN'lara karşı yanıtızsızdır. IFN- λ R1'in karaciğer, kolorektal, pankreas karsinomlarından türetilen hücre serilerinde ekspresse olduğu bilinmektedir. Ayrıca BioGPS ve GTEx veri tabanlarına göre tam kan, beyin, spinal kord, kalp ve iskelet kası, iç organlar, pankreas, tiroid ve adrenal bezlerde, deri ve iç genital organlarda ekspresse olmaktadır (48,49).

Uygun sinyal iletimi için IFN- λ R1'nin IL-10R2 ile etkileşimi gereklidir. Tip III IFN'lar sinyalizasyon için IFN- α reseptör kompleksini kullanmazlar. Fakat IFN- λ ya da IFN- α reseptör kompleksleri aracılığıyla üretilen sinyaller aynı janus kinaz-sinyal (Jak-STAT) kaskadının aktivasyonu ile sonuçlanır (48,50,51).

IFN- α Tip I IFN reseptörlerine (IFNAR1 ve IFNAR2) ve IFN- λ Tip III IFN reseptör kompleksine (IFN- λ R1 ve IL-10R2) bağlanarak JAK1 ve tirozin kinaz 2 (TYK2)'ı aktifleştirirler. Bu çapraz fosforillenme STAT1 ve STAT2'yi fosforile ederek heterodimer oluşturmalarını sağlar. Dimere interferon reseptör faktör 9 (IRF9) bağlanır ve oluşan ISGF3 kompleksi çekirdeğe göç eder. ISGF3 kompleksi IFN ile uyarılmış yanıt elemanlarını bağlar ve IFN ile uyarılan genlerin (ISG) transkripsiyonunu artırır (52) (Şekil 1).



Şekil 1: IFN- λ reseptör sinyal yolağı. IFN- α ve IFN- λ antiviral yanıtta farklı reseptörler üzerinden JAK/STAT yolağını aktive ederler ve ISG'lerin transkripsiyonunu artırırılar (52).

Üç farklı IFN- λ 'nın biyolojik aktivitesini karşılaştıran sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır. Farklı IFN- λ 'ların fonksiyonel olarak da farklı olduğu düşünölmekle birlikte farklı hücre tipleri arasındaki reseptör dağılım paterni de farklıdır. IFN- λ 'ların antiviral etkileri açık olmakla birlikte immün hücre fonksiyonu üzerindeki etkileri, karmaşık ve çeşitli görünmektedir. IL-28B/IFN- λ 3 ekspresyonunun IL-28 reseptör kompleksi üzerinden güçlü doğal antiviral yanıtı indüklediğı lenfositler dahil olmak üzere çeşitli hücreler ile in vitro olarak yapılan çalışmalarda gösterilmiştir. Ayrıca, in vivo olarak yapılan çalışmalar IL-28B'nin yardımcı T hücre1 (Th1) üzerinden adaptif hücresel bağışıklık tepkilerini uyarma potansiyeline sahip olduğunu göstermiştir (53).

Yapılan bir çalışmada, IL-28A, IL-28B ve IL-29'un doza ve zamana bağımlı bir şekilde HCV replikasyonunu baskıladığı in vitro olarak gösterilmiştir. IL-28B'nin

etkisinin daha güçlü olduğu görülmüştür. Aynı çalışmada sonuçlar IL-28A, IL-28B, ve IL-29'un anti-HCV etkisinin sağlam IFN-λ reseptörlerine bağımlı olduğunu göstermektedir (54).

2.3. POLİMORFİZM

Aynı türün bireylerinde belli bir lokus için birçok farklı alelin bulunmasına DNA polimorfizmi denir. Populasyonda %1 veya daha fazla sıklıkta görülen DNA dizi alternatifleri polimorfizm olarak, %1'den daha az sıklıkta görülenler ise mutasyon olarak değerlendirilir. Polimorfizmler DNA dizisindeki tek baz değişimi, delesyonu, duplikasyonu veya insersiyonu sonucu oluşabilmektedirler. Bu değişimler her zaman protein yapısında veya işlevinde değişikliğe yol açmazlar (55,56).

Dizideki tek bir nükleotid değişikliği sonucunda oluşan polimorfizmler tek nükleotid polimorfizmleridir (SNP). Bireyler arasındaki genetik varyasyonun en büyük sorumlusu olan SNP'ler en yaygın polimorfizmlerdir. Yaşayan tüm bireylerin genomları toplamını referans alarak beklenen SNP frekansı %1'dir. Dolayısıyla 10 milyon SNP olduğu öngörülmektedir ve bunların 1 milyonu tanımlanmıştır (55,57). Polimorfizmler genomun her yerinde olabilmekle birlikte en sık karşımıza çıkanlar genin promotor bölgelerinde ve intronlarında yer alanlardır (58). Promotor bölgesinde olanlar genellikle transkripsiyon düzeyinde etki yaparken kodlanmayan DNA bölgelerinde ve intronlarda yer alan polimorfizmlerin etki mekanizması henüz tam olarak bilinmemektedir (59).

Son yıllarda hastalık ile ilişkilendirilen polimorfizm sayısı giderek artmaktadır. Sitokinler pek çok hastalığın patogeneğinde yer almaktadır. Dolayısıyla bu hastalıklarla sitokin gen polimorfizmlerinin ilişkisini araştıran pek çok çalışma yapılmıştır. Yapılan çalışmalarda sitokin gen polimorfizmlerinin sitokin düzeylerine etki ederek hastalığı etkileyebildiği gösterilmiştir (60,61). Enfeksiyon, allerji, otoimmün hastalık, kanser gibi bazı hastalıkların sitokin gen polimorfizmi ile ilişkisini gösteren çalışmalarda, sitokinlerin serum düzeyini etkileyen polimorfizmlerin hastalığın şiddetini öngörmede yardımcı olduğu görülmektedir. Hem in vitro hem de in vivo olarak polimorfizm sonucu gen ekspresyonunun ve sitokin sekresyonunun değiştiğini gösteren çalışmalar mevcuttur (61,62).

Gen polimorfizmlerinin saptanmasında günümüze kadar birçok yöntem tanımlanmış olsa da en sık klasik polimeraz zincir reaksiyonu (polymerase chain reaction; PCR) ve takibinde uygulanan tamamlayıcı yöntemler kullanılmaktadır. Polimeraz zincir reaksiyonu, herhangi bir organizmaya ait genomik DNA' daki özgül bölgelerin enzimatik olarak sentezlenmesini ve çoğaltılmasını sağlayan çok başarılı bir in vitro DNA sentezi yöntemidir (63,64). 1980'li yıllarda Kary Mullis tarafından geliştirilen PCR hiç kuşkusuz ki genetik çalışmalarımızlandıran en önemli tekniklerden biridir. PCR; ilk defa, orak hücre anemisinin tanısının konulmasında uygulamaya konmuş ve 1993 yılında bu çalışma Kary Mullis'e Nobel ödülünü kazandırmıştır.

Yöntemin temeli, çoğaltılmak istenen bölgenin iki tarafına özgü, bu bölgedeki baz dizilerine tamamlayıcı olan, ideali 18-20 baz uzunluğunda bir çift sentetik oligonükleotid primer kullanılarak, bu iki primer ile sınırlandırılan bölgenin enzimatik olarak sentezlenmesine dayanmaktadır (63,65). PCR'in en önemli avantajı çok az miktarda DNA ile çalışmaya olanak sağlamasıdır. Bir PCR döngüsü için gerekli olan beş ana madde vardır: kalıp olarak kullanılan DNA örneği (genelde genomik DNA), çoğaltılacak bölgeyi 5' ve 3' tarafından çevreleyen bir çift sentetik primer, deoksi-nükleotit-trifosfatlar (dNTP), yüksek ısıya dayanıklı DNA polimeraz enzimi, uygun pH ve iyon koşullarını (Mg^{+2}) sağlayan tampon karışımı (65).

Primer; amplifiye edilmek istenen bölgeye özgü, ideal olarak 18-24 bp boyutunda, pürin:pirimidin içeriği %40-60 olan oligonükleotid dizileridir. Primer çiftinin, baz içeriklerine göre hesaplanan erime dereceleri (T_m) birbirine yakın veya en fazla 5°C farklı olmalıdır. T_m 'den 5°C düşüğü bağlanma derecesi olarak seçilmelidir (65).

DNA polimeraz enzimleri; kalıp DNA zincirine uygun olarak dNTP'den DNA zincirinin sentezini katalize ederler. Günümüzde yaygın olarak kullanılan ve *Thermus aquaticus*'tan elde edilen Taq DNA polimeraz enzimi, optimal sıcaklıkta (72-78°C) aktivite göstermektedir. Kullanılan enzime uygun pH ve iyon koşullarını sağlayan tampon çözeltiler seçilir (65,66).

Döngüsel bir reaksiyon olan PCR üç basamaktan oluşur: birinci basamak DNA'nın iki zincirinin yüksek sıcaklıkta (92-95°C) birbirinden ayrıldığı denatürasyon basamağıdır. İkinci basamak sentetik oligonükleotidlerin hedef

DNA'ya bağlandığı (annealing) ve DNA polimeraz için serbest 3'OH ucu oluşturduğu basamaktır. Üçüncü ve son basamak zincirin yeni çift zincirli DNA'lar oluşturacak şekilde uzaması aşamasıdır. Aynen doğal hücre bölünmesinde olduğu gibi PCR ile yaklaşık 30 döngü sonra hedeflenen DNA dizisinin yaklaşık bir milyar katını kopyalamaktadır (65).

DNA'nın PCR sonrası enzimatik kesilmesi restriksiyon endonükleazlar kullanılarak yapılır. Restriksiyon endonükleazlar bakteriden köken alan; çift iplikli sarmal DNA'da özgül bir diziyi tanıyarak bu dizi içinden DNA'yı her iki ipliğinden kesebilen enzimlerdir (67,68). Restriksiyon enzimlerinin çoğu 37°C'de aktivite göstermektedir. RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) yönteminde enzim kesimi sonrası ortaya çıkan farklı uzunluktaki DNA parçaları, jel elektroforezi ile ayrılmaktadır (65). Jel elektroforezi aynı elektrik yüklü moleküllerin jel matrisi içerisinde büyüklüklerine göre ayrılması tekniğidir. Kırmızı bir alg türü olan *Agar agar*'dan izole edilen ve lineer polisakkarid olan agaroz, kuvvetli bir jelleşme özelliğine sahiptir. Agaroz, sıcak Tris Borik Asit EDTA (TBE) tampon çözeltide çözünmekte ve soğutulduğu zaman polimerde karşılıklı hidrojen bağlarının oluşumu ile jel yapısı oluşmaktadır. Genomik DNA 0.5-1xTBE içinde yapılmış % 0.5-1.5'lik bir jelde 0.5 µg/ml etidyum bromür kapsayacak şekilde elektroforeze tabi tutulur. Agaroz konsantrasyonu değiştirilerek jelin por çapı ayarlanabilmektedir. Küçük DNA parçaları için yüksek; büyük DNA parçaları için düşük agaroz konsantrasyonu kullanılarak DNA'nın jelde uygun bir biçimde yürütülerek görüntülenmesi sağlanabilir. Jele mutlaka moleküler ağırlık standardı oluşturacak bilinen ağırlıklı bir DNA örneği kontrol olarak konmalıdır. DNA'nın jelde görünür hale gelebilmesi, etidyum bromürün DNA bağları arasına bağlanarak 300 veya 360 nm'de ışığı absorblaması sonucu floresan etki göstermesi ile olmaktadır. Fosfat içeriği nedeniyle negatif yüklü olan DNA'nın negatif kutuptan pozitif kutuba doğru yürütülmesi tamamlandıktan sonra jelin fotoğrafı UV ışığı altında çekilir ve değerlendirmeye alınır (65,69).

2.3.1. IFN-λ (IFNL) Gen Polimorfizmleri:

Son zamanlarda yapılan birçok bağımsız genom boyu bağlantı çalışması (GWAS) kromozom 19 içinde *IL28* genlerinin yakınında tek nükleotid polimorfizmleri (SNP)

rapor etmişlerdir. *IL28* çevresindeki SNP'ler ile IFN- λ üretimi arasındaki ilişki henüz netleşmemiştir. Ancak bu polimorfizmlerin HBV ve HCV hastalarında spontan klirens ve tedavi ilişkili yanıtta etkisini araştıran pek çok çalışma mevcuttur.

Daha önceki GWAS çalışmaları ile tanımlanarak *IL28B* ile ilişkilendirilen ve bizim bu tezde de araştırdığımız rs8099917 ve rs12979860 polimorfizmleri, *IL28B* ve *IL28A* arasındaki intergenik bölgede bulunmaktadır. Kromozom 19:39252525 lokasyonundaki Timin (T) bazının yerine Guanin (G) bazının geçmesi ile oluşan varyant rs8099917 (*IL28* G/T) polimorfizmi olarak tanımlanmıştır. Hepatit C tedavisine yanıt ile ilişkili genomik lokusları tespit etmek için yapılan gen ekspresyon analizleri ve GWAS çalışmalarında *IL28B* ile ilişkili rs8099917 polimorfizminin Hepatit C'nin tedaviye bağlı viral klirensini etkilediği görülmüştür (70,71,72).

Kromozom 19:39248147 lokasyonundaki T bazının yerine Sitozin (C) bazının geçmesi ile oluşan varyant rs12979860 (*IL28* C/T) polimorfizmi olarak tanımlanmıştır. Hepatit C hastalarında IFN- λ düzey ve *IL28* genotiplerini karşılaştıran bir çalışma, IFN- λ serum düzeyinin rs12979860 C alleli taşıyıcılarında yüksek olduğunu göstermiştir. HCV enfeksiyonunda Tip III IFN'ların önemli antiviral etkinliğini doğrulayarak, IFN- λ düzeylerinin ve rs12979860 polimorfizminde C alleli taşıyıcılığının, HCV hastalarında tedaviye olumlu yanıtla ilişkili olduğu gösterilmiştir. Ayrıca, in vitro bulgular HCV'nin dendritik hücrelerde tip III IFN üretimini azaltmak için mekanizmalar geliştirmiş olduğunu göstermektedir (9). Bugüne kadar yapılan bir çok çalışmada HCV hastalarında rs12979860 polimorfizminde CC genotipi erken virolojik yanıtla oldukça ilişkili bulunmuş ve HCV hastalarında interferon ve ribavirin tedavisine yanıtı önceden belirleyebileceği düşünülmüştür (10,73,74). rs12979860 CC genotipinin karaciğerde antiviral ISGF ekspresyonunu baskıladığı, supresör (baskılayıcı) ISGF ekspresyonunu artırdığı görülmüştür. Bu durum *IL28B*'nin ISGF ekspresyonunun intrahepatik düzenlenmesinde potansiyel bir rolü olduğunu göstermiştir. Bu hastalarda, IFN uygulamasından sonra ISGF ekspresyonundaki büyük artış, interferon sinyalizasyonunu baskılayan genlerinin artmış ekspresyonu ile ilişkili olabilir (75).

Kromozom 19:39298475 lokasyonundaki C bazının yerine T bazının geçmesi ile oluşan varyant *IL29* ile ilişkili rs30461 polimorfizmi olarak tanımlanmıştır. Bu SNP protein dizisinde asparajinin yerine aspartik asitin geçtiği mutasyona neden olan yanlış anlamlı bir varyanttır. Literatürde rs30461 polimorfizmi ile hastalıklar arasındaki ilişkiyi inceleyen çok fazla çalışma mevcut değildir. Hindistan'da diş eti hastalarında yapılan bir çalışmada, diş eti oluştuktaki sıvıda ve plazmada IL-29 düzeyleri yüksek bulunmuş ve periodontit patogeneğinde IL-29'un etkin rol oynadığı düşünülmüş fakat rs30461 polimorfizmi ile hastalığa yatkınlık arasında herhangi bir ilişki saptanamamıştır (76). Rusya'da iki farklı etnik gruptan psoriasis hastalarıyla yapılan çalışmada ise rs30461 polimorfizmi için CC haplotipi Ruslarda psoriasis hastalığına karşı koruyucu etkili bulunmuştur (11).

2.4. MikroRNA

Uzun yıllar insan genomunun çoğunluğunun transkribe olduğu tahmin edilmesine rağmen bugün artık %2'den az bir kısmının proteine çevrildiği bilinmektedir. Tüm transkribe olan RNA'ların en azından yarısının protein kodlamayan RNA molekülleri olduğu gösterilmiştir. Bugün RNA ailesine ait mesajcı RNA (mRNA), taşıyıcı RNA (tRNA), ribozomal RNA (rRNA) moleküllerinin dışında birçok biyolojik süreçte etkili olan mikroRNA (miRNA), küçük müdahaleci RNA (siRNA) ve piwi ile etkileşen RNA (piwiRNA) molekülleri bilinmektedir. Bu küçük RNA'lar kromatin yapısını etkileyerek, transkripsiyonel seviyede düzenlenmede; mRNA stabilitesini ya da translasyonu etkileyerek posttranskripsiyonel düzenlenmede etkili olabilirler (77).

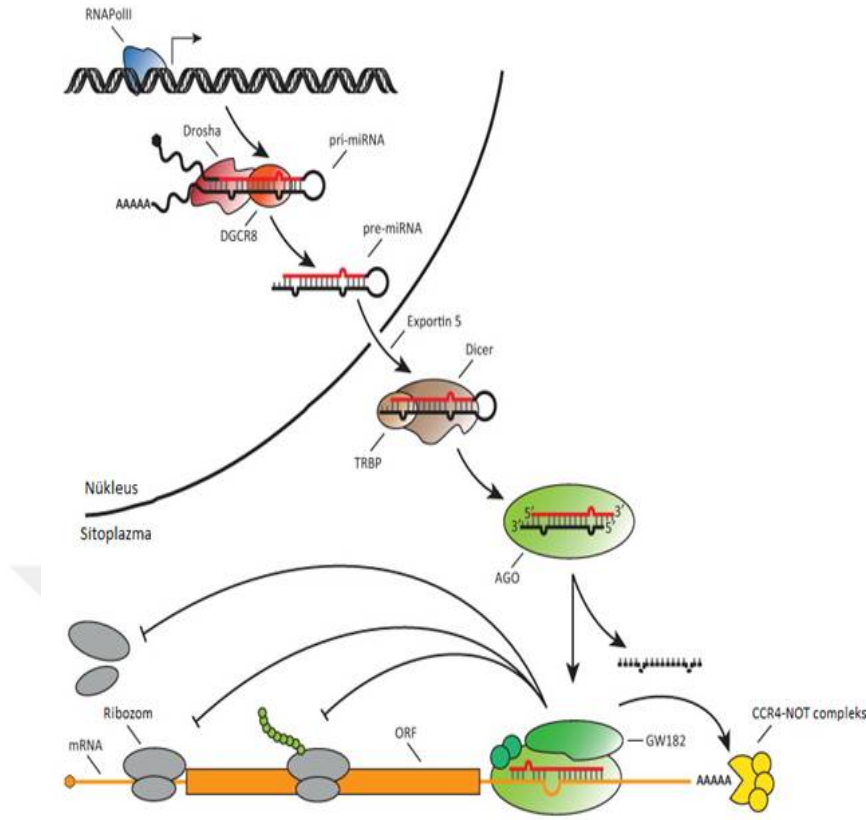
miRNA'lar ilk kez 1993 yılında *Caenorhabditis elegans*'ta (*C. Elegans*) keşfedilmiş ve mRNA stabilitesini ve translasyon aktivasyon ya da inhibisyonunu etkileyerek post-transkripsiyonel düzenlemeye aracılık eden, kısa ve protein kodlamayan RNA molekülleri olarak tanımlanmışlardır (78). 2000-2001 yıllarında *C. Elegans*'a ait birçok miRNA geni belirlenmiş ve miRNA'ların diğer türlerde de yaygın olarak mevcut olduğu gösterilmiştir. O zamandan bu yana, gen ifadesi üzerindeki etkileri göz önüne alınarak, miRNA'larla ilgili pek çok çalışma yapılmıştır. Biyoinformatik analizler insan genlerinin %30'undan fazlasının ekspresyonunun regülasyonunda miRNA'ların etkili olduğunu öngörmektedir. Tüm

türlerdeki yeni miRNA genleri bazı merkezi miRNA veri tabanlarında toplanmaya devam edilmektedir (14).

Son yıllardaki bulgular hücre çoğalması, apoptoz, gelişme, farklılaşma ve metabolizma gibi önemli süreçlerin düzenlenmesinde miRNA'ların kuvvetli rolleri olduğunu göstermiştir (79,80,81,82,83).

2.4.1 MikroRNA Biyogenezi

MikroRNA'lar, genomik DNA'dan RNA polimeraz II enzimi tarafından binlerce baz uzunluğundaki primer transkript (pri-miRNA) olarak sentezlenirler. Pri-miRNA'lar saç tokası şeklinde olup , “cap” ve “poli A” kuyruğuna sahip sap-ilmik yapısındadır. Birbirini izleyen iki süreç ile matür miRNA oluşumu gerçekleşir. İlk aşamada pri-miRNA yaklaşık 70 nükleotidlik prekürsör miRNA (pre-miRNA) haline getirilir. Bu aşama bir tür nükleer RNaz III enzimi olan Drosha ve kofaktörü olan Di George Sendromu Kritik Bölge 8 homoloğu (DGCR8, Pasha) tarafından nükleusta gerçekleştirilir. Drosha ve Pasha birlikte Mikro işlemci protein kompleksi olarak adlandırılır. Oluşan Pre-miRNA, Exportin 5 tarafından çekirdekte dışarıya çıkarılır. İkinci aşamada ise bu prekürsör, RnazIII enzim ailesinin başka bir üyesi olan Dicer tarafından sitoplazmada işlenerek yaklaşık 19-24 nükleotidlik çift iplikli RNA molekülü olan matür miRNA'ya çevrilir. Dicer, aynı zamanda RNA ile tetiklenmiş susturma kompleksi (RNA-induced silencing complex; RISC) oluşumunu başlatır. Dicer tarafından işlendikten sonra meydana gelen miRNA dupleks, birçok alt birimden oluşan miRNA kaynaklı susturma kompleksinin (miRISC) bir bileşeni olan Argonaute (AGO) proteini tarafından bağlanır. AGO tarafından bu iki iplikten 5' ucu daha kararlı olanı seçilip komplekse dahil edilir. Daha sonra, çift iplikten yolcu iplik olarak adlandırılan serbest bırakılır ve degrade olur. Kılavuz iplik olarak adlandırılan diğer iplik ise miRISC içinde korunur. Kılavuz iplik mRNA ile kısmen komplementer diziyeye sahip olan miRISC'i hedefler ve mRNA susturulmasında etkili olur (84) (Şekil 2).



Şekil 2: miRNA'nın Biyogenezini (12).

MiRNA'nın 5'-ucundan itibaren 2-8 nükleotidlik kısım tohum bölgesi olarak adlandırılır ve özellikle hedef tanınması için oldukça önemlidir. Bu nedenle, tohum bölgesini paylaşan ama onun dışında farklılıkları olan ve genellikle hedefleri büyük ölçüde örtüşen miRNA'lar miRNA aileleri olarak kabul edilir.

MiRNA'lar hedeflerinin 3'-translasyonu yapılmayan bölgeleri (3'UTR) ile tamamlayıcılık derecesine göre, mRNA'ya bağlanarak protein sentezinin inhibisyonuna veya mRNA'nın yıkımına neden olur. Hedef ve miRNA 3'UTR arasında tam olmayan baz eşleşmesi, hedefin genellikle translasyonel susturulmasına ya da hedef mRNA miktarının azaltılmasına neden olurken tam baz eşleşmesi hedef mRNA'nın RISC tarafından parçalanmasıyla sonuçlanır. mRNA'ya bağlı miRISC, esas olarak translasyonun başlamasının önlenmesini ya da karbon katabolit baskılayıcı protein 4-genel transkripsiyon negatif düzenleyici (CCR4-NOT) kompleksi tarafından degradasyon ve takiben deadenilasyon yapılarak translasyonel baskılamayı sağlar (12).

MiRNA genleri insanlarda Y kromozomu hariç bütün kromozomlarda dağılmıştır. Tüm miRNA'ların yaklaşık %50'si protein kodlayan genlerin ya da kodlayıcı olmayan RNA transkriptlerinin intronlarında yerleşmiştir (85,86).

MiRNA'ların RISC kompleksine bağlandıktan sonra transkripsiyon sonrası düzenlenme fonksiyonlarını, işleme cisimleri (P-body, P-cismi) içerisinde gerçekleştirdiklerine dair görüşler artmaktadır. P-cisimleri AGO ile etkileşen GW182 proteini ve mRNA degradasyonunda görevli diğer enzim ve proteinler açısından zenginleştirilmiştir. Hedef mRNA'lar P-cisimlerinde saklanabilir ve translasyon için sitoplazmaya tekrar serbest bırakılabilir (87).

Son yıllarda yapılan çalışmalar P-cisimlerinin biyolojisinin daha iyi anlaşılmasını sağlamıştır. P-cisimlerinin çeşitli biyolojik süreçlerde mRNA dönüşümünün düzenlendiği özel bir hücre bileşeni olduğu ortaya çıkmıştır ve bu cisimlerin oluşturulmasının spesifik protein faktörlerine ve RNA'ya özellikle de miRNA'lara bağlı olduğu görülmektedir (88).

MiRNA'lar hücre proliferasyonu, farklılaşması, gelişmesi, hücre ölümü, virüs ve konak hücre etkileşimi gibi çeşitli işlemlerde temel düzenleyicilerdir. Buna bağlı olarak kanser de dahil olmak üzere çeşitli insan hastalıkları miRNA'ların ekspresyonlarının düzenlenmesindeki bozukluklar veya miRNA biogenezindeki yetersizlikler ile ilişkilidir (13).

2.4.2. İmmün Sistem Fonksiyonu ve Gelişiminde miRNA'ların Rolü

Son birkaç yıl içinde yapılan çalışmalar miRNA'ların bağışıklık sisteminin gelişimi ve fonksiyonu için kritik öneme sahip olduğunu göstermektedir (16). Granülositler, monosit kökenli makrofajlar ve dendritik hücreler doğal bağışıklık sistemini oluşturan temel hücrelerdir. Monositlerin zarları üzerinde bulunan Toll benzeri reseptörler (TLR) patojen-ilişkili moleküler paternler (PAMPs) diye adlandırılan spesifik mikrobiyal ürünleri tanır, bağlanır ve enflamatuar yanıtları başlatan sinyal yolağını tetikler (89). PAMPs'ların algılanması TLR ya da diğer hücre içi reseptörleri yoluyla sinyal transdüksiyonunu teşvik eder ve interferon ve sitokinlerin transkripsiyonu indüklenir. Bazı pri-miRNA'ların transkripsiyonu (örneğin miR-146a/b) da uyarılır ve işlenerek matür miRNA'lar oluşturulur. Sitokin ve interferon transkriptleri P-cisimlerinde miRNA'lar tarafından degradasyona veya

translasyonel inhibisyona uğrayabilir ya da protein translasyonu teşvik edilebilir. Doğal bağışıklık yanıtının miRNA'lar tarafından düzenlenmesi bu şekilde özetlenebilir (90).

Bütün bu çalışmalar birlikte ele alındığında miRNA'ların vücutta aşırı inflamasyon yanıtı engellemek için doğal bağışıklık hücre gelişiminin ve yanıtının düzenlenmesi üzerindeki önemini göstermektedir (16). Ayrıca Lenfosit progenitörlerindeki miRNA biyogenezi bozukluklarının, adaptif bağışıklığın ana hücresel bileşenleri olan T ve B lenfositlerin gelişimini olumsuz etkilediğini tespit eden çalışmalar, adaptif bağışıklık düzenlenmesinde miRNA'ların önemini net bir şekilde ortaya koymuştur. T lenfosit gelişiminin erken evrelerinde Dicer enziminin azalmasına ya da yokluğuna bağlı olarak miRNA sentezinin bozulması T hücre gelişimini etkiler. Sonuçta timusta ve periferal lenfoid organlarda T hücre sayısının azalmasına ve atipik Th hücre farklılaşmasına ve sitokin üretimine neden olur (91). Bu konuda yapılan birçok çalışma miRNA'ların uygun sentezlenmesi ve işlevlerinin T ve B hücre gelişimi, farklılaşma ve fonksiyonu için gerekli olduğunu göstermektedir (92,93,94). Bu nedenle immün homeostazisin sürdürülebilmesi için miRNA ekspresyonunun sıkı bir şekilde düzenlenmesi gereklidir. Ayrıca miRNA disregülasyonu otoimmüniteyi de indükleyebilir (16). Yapılan çalışmalar mekanizmaları net bir şekilde ortaya koyamamakla birlikte, miRNA disregülasyonunun Sistemik Lupus Eritematosus (95), Romatoid Artrit (96), Multiple Skleroz (97) gibi otoimmün hastalıkların oluşumuyla ilişkili olduğunu kanıtlamıştır.

2.4.3. Antiviral savunmada miRNA'lar

Viral enfeksiyonlarda miRNA mekanizmalarının yeri ile ilgili çeşitli senaryolar vardır. Bu miRNA yolları viral enfeksiyonlar ile mücadele etmek için konak immün savunma mekanizmalarının regülasyonunda yer alabilirler (98). MiRNA'ların antiviral etkisini araştıran bir çalışmada elde edilen sonuçlar, miRNA'ların memeli hücrelerinin viral enfeksiyonu üzerinde büyük ölçüde rol oynayabileceği fikrini desteklemektedir. Ayrıca hem virüslerin hem de konak hücrelerinin miRNA kodladıkları bilinmektedir (99).

MiR-122 HCV replikasyonu için gerekli olduğu gösterilmiş olan karaciğere spesifik bir miRNA'dır. HCV ile enfekte hücre serileriyle yapılan bir çalışmada IFN- β tedavisinin miR-122 ekspresyonunda belirgin bir azalmaya yol açtığı gösterilmiştir. Bu çalışma interferon sistemi üzerinden viral enfeksiyonlarla mücadele etmek amacıyla, memelilerde de, hücrel miRNA'ların kullanılması görüşünü desteklemektedir (100).

Yapılan başka bir çalışma, miR-197, miR-363, miR-629, miR-132 ve miR-122'nin varisella zoster virüs (VZV) enfeksiyonu sırasında sağlıklı bireylerle karşılaştırıldığında, VZV ile enfekte bireylerde farklı şekilde eksprese olduğunu göstermiştir. Bu beş serum miRNA'sının, VZV enfeksiyonu tanısı için biyomarkır olarak büyük bir potansiyele sahip olduğu düşünülmüştür (101).

Ayrıca, viral enfeksiyonların hem IFN- λ 1 promotör aktivitesini hem de IFN- λ 1 ekspresyonunu post-transkripsiyonel seviyede düzenleyen 3'UTR aktivitesini indüklediği keşfedilmiştir. Tablo 2'de görüldüğü gibi miRNA 548 ailesi üyelerinden miR-548b, miR-548c ve miR-548i, IFN- λ 1'in 3'UTR bölgesini hedeflemektedir. Ayrıca HepG2 hücre serilerinde yapılan çalışmalar miRNA 548'in IFN- λ 1 aracılı antiviral yanıtı düzenlediğini göstermiştir ve miRNA 548 antiviral tedavi için potansiyel bir aday olarak önerilmiştir (102).

Tablo 2 : MiR-548'lerin IFN- λ 1'in 3'UTR bölgesinde hedefledikleri bölge

IFN-λ1 3'UTR cDNA	GCTGAGTTTATTGTTTTACTTTT
IFN-λ1 3'UTR mRNA	5'-GCUGAGUUUAUUGUU <u>UUACUUUU</u> -3'
hsa-miR-548b-5p	3'-CCGGUUUUGGUGUU <u>AAUGAAAA</u> -5'
hsa-miR-548c-5p	3'-CCGUUUUUGGCGUU <u>AAUGAAAA</u> -5'
hsa-miR-548i	3'-CCGUUUUAGGCGUU <u>AAUGAAAA</u> -5'

Geçirilmiş kızamık enfeksiyonunun geç komplikasyonu olan SSPE ülkemizde gelişmiş ülkelere oranla daha sık görülmektedir. SSPE patogeneğinde etkili olduğu düşünülen konağa ait bağışıklık faktörlerinin daha iyi anlaşılmasına katkıda bulunmak amacıyla hastalarda ve sağlıklı gönüllülerde; *IL28B* geninde tanımlı rs8099917 ile rs12979860 ve *IL29* geninde tanımlı rs30461 gen polimorfizmlerinin frekansları, IL-28B, IL-29 sitokin serum düzeyleri ve IL-29 ekspresyonunu anlamlı olarak etkilediği gösterilen miRNA 548 ailesinin üyeleri olan miR-548b, miR-548c, miR-548i ekspresyon düzeyleri çalışılmıştır.

Antiviral yanıtta etkili olduğu bilinen *IL28B* ve *IL29* ile ilişkili bu polimorfizmlerin sitokin düzeyleri üzerindeki etkisini, hastalıkla ilişkisini ve miR-548b, miR-548c, miR-548i'nin kandaki ekspresyon düzeylerinin, IL-29 sitokin düzeyi üzerine etkisini ve hastalıkla ilişkisini araştırmak amaçlanmıştır.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Hasta Grubu

Bülent Ecevit Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıklarında SSPE tanısı konan ve takip edilen 40 erkek, 24 kız toplam 64 hasta çalışmaya dahil edildi. SSPE tanısı tipik klinik bulgular, karakteristik EEG bulguları ile serum ve BOS'ta kızamık antikor titrelerindeki anlamlı artışın gösterilmesi ile kondu. Tüm vakalarda hastaların yaşı, cinsiyeti, kızamık geçirme ve aşılama öyküsü, klinik evre kaydedildi. Hasta çocukların ailelerine, araştırmanın amacı ve içeriği ile ilgili bilgilendirme ve onam formu okutulup imzalatıldı. Çocuğunun çalışmaya katılmasını kabul eden ailelerin çocuklarından rutin kontrolleri sırasında verdikleri kandan 2 ml'si alınarak IL-28B, IL-29 serum düzeyleri, *IL28B* rs8099917, rs12979860, *IL29* rs30461 gen polimorfizmleri ve miR-548b, miR-548c ve miR-548i düzeyleri çalışıldı. Çalışmalar Bülent Ecevit Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik AD.'da yapıldı.

3.2. Kontrol Grubu

Bülent Ecevit Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları AD'nda herhangi bir kronik, enflamatuvar ya da infeksiyöz hastalığı olmayan, sağlıklı çocuk polikliniğine rutin kontrolleri için başvuran 34 erkek ve 34 kız toplam 68 sağlıklı çocuk kontrol grubuna dahil edilmiştir. Çocuğunun çalışmaya katılmasını kabul eden ailelerin çocuklarından rutin kontrolleri sırasında verdikleri kandan 2 ml alınarak IL-28 ve IL-29 serum düzeyleri, gen polimorfizmleri ve miRNA düzeyleri çalışıldı. Çalışmalar Bülent Ecevit Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik AD.'da yapıldı.

3.3. Metod

3.3.1. Periferik kandan DNA elde edilmesi

Hasta ve kontrollerden tam kan tüpüne 2 cc kan alındı ve DNA, E.Z.N.A[®] Blood DNA İzolasyon Kiti kullanılarak elde edildi. Kit içinde bulunan ve 1.5 ml hacme sahip tüplerin içine konan 250 µl kan üzerine; 250 µl Buffer BL, 5 µl RNase A ve 15 µl proteaz enzimi eklendi ve bu karışım 10 saniye vorteksledikten sonra önceden

42°C'ye ayarlanmış su banyosunda 25 dakika inkübe edildi. Süre bitiminde su banyosundan alınan tüplerin üzerine 260 µl saf alkol eklendi ve HiBind® DNA spin kolona aktarıldı. Dakikada 10.000 devir hız ile 1 dakika santrifüj edildikten sonra, alttaki tüp atılarak yeni tüp kondu ve spin kolondaki içeriğin üzerine 500 µl HB Buffer ilave edildi. Santrifüj aşaması tekrarlandıktan sonra 650 µl Wash Buffer eklendi ve 1 dakika santrifüj edildi. Wash Buffer ile yıkama aşaması tekrarlandıktan ve spinler yeni tüpe yerleştirildikten sonra önceden 70°C'ye ayarlanmış inkübatörde ısıtılmış 100 µl Elution Buffer eklendi. Dakikada 10.000 devir hız ile 1 dakika yapılan santrifüj sonrası tüpler değiştirilmeden yine 100 µl Elution Buffer eklendi ve son kez 10.000 devir/dak ile 1 dakika santrifüj edildi. Üstteki spin kolon atılarak alttaki tüpte bulunan DNA yeni tüpe aktarıldı ve bu aşamaların sonucunda yaklaşık 40-60 ng/µl konsantrasyonda 200 µl DNA elde edildi.

3.3.2. PCR İle İlgili Gen Bölgesinin Amplifikasyonu

3.3.2.1. *IL28B* rs12979860 (*IL28* C/T) Gen Polimorfizmi

Kromozom 19:39248147 lokasyonundak T bazının yerine C bazının geçmesi ile oluşan rs12979860 (*IL28* C/T) polimorfizmi çalışıldı. Araştırılmakta olan gen bölgesi 5'- GCT TAT CGC ATA CGG CTA GG-3'(F) ve 5'-AGG CTC AGG GTC AAT CAC AG-3'(R) primer çiftleri kullanılarak amplifiye edildi (ThermoFisher S.). Toplam 25 µL hacim içinde her primerden 1.5 pmol, 30 mmol/L Tris-HCl (pH 8.3), 80 mmol/L KCl, 1.0 mmol/L MgCl₂ (Bioron, cat. no: 103001), her bir dNTP'den 0.6 mmol/µL, 4 unit Taq DNA polimeraz (Bioron, cat. no: 101005) ve 4 µL DNA'dan oluşan PCR miksi kullanıldı, "the MWG primus thermal cyclers-Primus 96 PCR system" cihazı ile 95°C'de 3 dakikalık ilk denatürasyondan sonra 35 döngü; 95°C'de 90 saniye denatürasyon, 57°C'de 90 saniye bağlanma ve 72°C'de 60 saniye uzama ve döngüden sonra 72°C'de 7 dakika uzama sağlandı; 242 bp ürün elde edildi. Amplifiye edilen ürünler %1.5'lik agaroz jelde koşturularak bant boyları görüntülendi.

3.3.2.2. *IL28B* rs8099917 (*IL28* G/T) Gen Polimorfizmi

Kromozom 19:39252525 lokasyonundaki T bazının yerine G bazının geçmesi ile oluşan rs8099917 (*IL28* G/T) polimorfizmi çalışıldı. Araştırılmakta olan gen bölgesi 5'- CAT CCC TCA TCC CAC TTC TGG-3'(F) ve 5'- CTG GGC CAC CAC AAT TCA TC -3'(R) primer çiftleri kullanılarak amplifiye edildi (ThermoFisher S.). Toplam 25 µL hacim içinde her primerden 1.5 pmol, 30 mmol/L Tris-HCl (pH 8.3), 80 mmol/L KCl, 1.0 mmol/L MgCl₂ (Bioron, cat. no: 103001), her bir dNTP'den 0.6 mmol/µL, 4 unit Taq DNA polimeraz (Bioron, cat. no: 101005) ve 4 µL DNA'dan oluşan PCR miksi kullanıldı, "the MWG primus thermal cyclers-Primus 96 PCR system" cihazı ile 95°C'de 3 dakikalık ilk denatürasyondan sonra 35 döngü; 95°C'de 90 saniye denatürasyon, 56°C'de 60 saniye bağlanma ve 72°C'de 60 saniye uzama ve döngüden sonra 72°C'de 7 dakika uzama sağlandı; 609 bp ürün elde edildi. Amplifiye edilen ürünler %1.5'lik agaroz jelde koşturularak bant boyları görüntülendi.

3.3.2.3. *IL29* rs30461 (*IL29* T/C) Gen Polimorfizmi

Kromozom 19:39298475 lokasyonundaki C bazının yerine T bazının geçmesi ile oluşan varyant *IL29* rs30461 *IL29* (T/C) polimorfizmi çalışıldı. Araştırılmakta olan gen bölgesi 5'-TGA ACA TGC ACA GTT ACG CAC -3'(F) ve 5'-GAG CCA ATA GGA GCC CAG AC -3'(R) primer çiftleri kullanılarak amplifiye edildi (ThermoFisher S.). Toplam 25 µL hacim içinde her primerden 1.5 pmol, 30 mmol/L Tris-HCl (pH 8.3), 80 mmol/L KCl, 1.0 mmol/L MgCl₂ (Bioron, cat. no: 103001), her bir dNTP'den 0.6 mmol/µL, 4 unit Taq DNA polimeraz (Bioron, cat. no: 101005) ve 4 µL DNA'dan oluşan PCR miksi kullanıldı, "the MWG primus thermal cyclers-Primus 96 PCR system" cihazı ile 95°C'de 3 dakikalık ilk denatürasyondan sonra 35 döngü; 95°C'de 90 saniye denatürasyon, 55°C'de 60 saniye bağlanma ve 72°C'de 60 saniye uzama ve döngüden sonra 72°C'de 7 dakika uzama sağlandı; 546 bp ürün elde edildi. Amplifiye edilen ürünler %1.5'lik agaroz jelde koşturularak bant boyları görüntülendi.

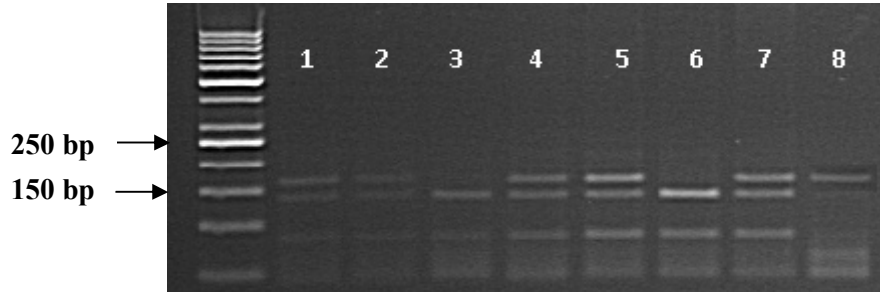
3.3.3. Jelin Hazırlanması ve Jel Elektroforezde Görüntüleme

Bir litre distile suyun içine 0.55 gram borik asit, 1.40 gram Tris Aminometan ve 0.074 gram EDTA konarak tampon çözelti hazırlandı. Konsantrasyonu, PCR sonrası ürünler için %1.5'lik; enzim kesimi sonrası ürünler için %3'lük olacak şekilde tampon çözelti ve agar karıştırılarak mikrodalga fırında 80°C'de ısıtıldı. Karışım, 60°C'ye soğutulduktan sonra üzerine %7'lik olacak şekilde etidyum bromid (Amresco, cat. no: 126K317) eklendi, jel kabına aktarılıp uygun taraklar yerleştirildikten sonra jelin oda ısısında donması sağlandı. Jel donduktan sonra taraklar çıkartıldı. İncelenecek örnekten 5 µL alındı ve daha önceden 5 kat distile su ile sulandırılarak 1X olarak hazırlanmış olan 5 µL jel yükleme solusyonu (DZJY001, lot: 0610J12) ile karıştırılarak her bir kuyucuğa yüklendi. Jel tankında (Blue marine serva 200) 120 mV güç kaynağı ile 40 dakika yürütülen örneklerin fotoğrafı, jel görüntüleme cihazı ile (SYNGENE, GeneGenius Bio Imaging System) alındı.

3.3.4. Değerlendirme

3.3.4.1. *IL28B* rs12979860 (*IL28* C/T) Gen Polimorfizmi

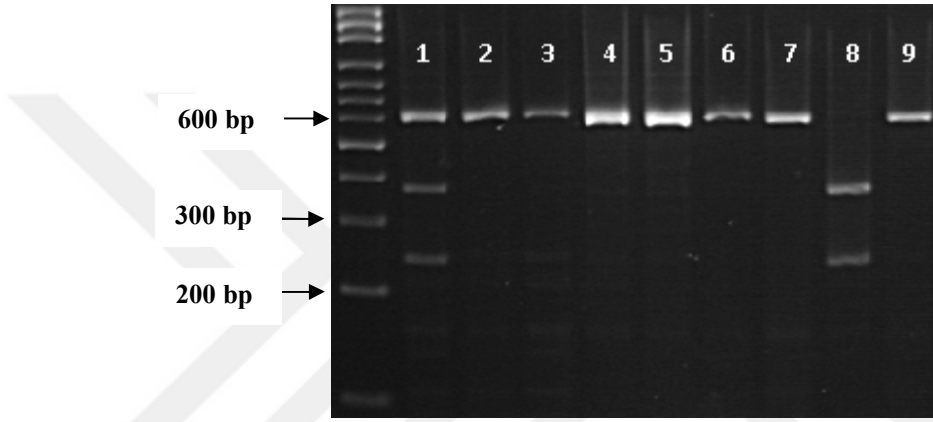
PCR sonrası elde edilen 242 bp uzunluğundaki amplifikasyon ürünü %1.5'lik agaroz jel elektroforezi ile görüntüledikten sonra 4 ünite BstU-1enzimi ile kesilmesi için 16 saat 37°C'lik kuru etüvde inkübe edildi. Enzim kesimi sonrası %3'lük agaroz jelde 120 mV güç ile yaklaşık bir saat yürütülerek; T aleli için 160 ve 82 bp, C aleli için 135 ve 82 bp boylarında bantlar elde edildi (Şekil 3).



Şekil 3: *IL28* rs12979860 gen polimorfizmi jel elektroforez görüntüsü. 50 bp'lık DNA belirtecinin yanındaki 1, 2, 4, 5, 7 nolu örnekler CT; 3,6 nolu örnekler CC ve 8 nolu örnek TT genotipindedir.

3.3.4.2. *IL28B* rs8099917 (*IL28* G/T) Gen Polimorfizmi

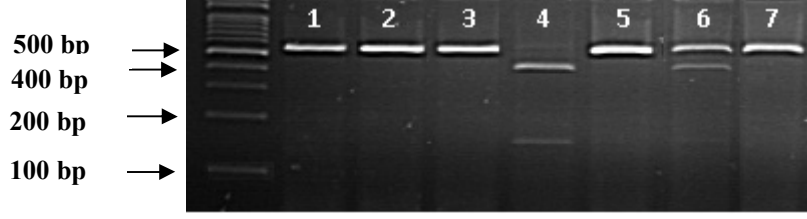
PCR sonrası elde edilen 609 bp uzunluğundaki amplifikasyon ürünü %1.5'lik agaroz jel elektroforezi ile görüntüledikten sonra 4 ünite BsrDI enzimi ile kesilmesi için 16 saat 37°C'lik kuru etüvde inkübe edildi. Enzim kesimi sonrası %3'lük agaroz jelde 120 mV güç ile yaklaşık bir saat yürütüldükten sonra T aleli için 609 bp, G aleli için 370 ve 239 bp boylarında bantlar elde edildi (Şekil 4).



Şekil 4: *IL28* rs8099917 gen polimorfizmi jel elektroforez görüntüsü. 100 bp'lık DNA belirtecinin yanındaki 1 nolu örnek GT; 2, 3, 4, 5, 6, 7, 9 nolu örnekler TT ve 8 nolu örnek GG genotipindedir.

3.3.4.3. *IL29* rs30461 (*IL29* T/C) Gen Polimorfizmi

PCR sonrası elde edilen 546 bp uzunluğundaki amplifikasyon ürünü %1.5'lik agaroz jel elektroforezi ile görüntüledikten sonra 4 ünite AvaII (Eco471) enzimi ile kesilmesi için 16 saat 37°C'lik kuru etüvde inkübe edildi. Enzim kesimi sonrası %3'lük agaroz jelde 120 mV güç ile yaklaşık bir saat yürütüldükten sonra T aleli için 546 bp, C aleli için 403, 143 bp boylarında bantlar elde edildi (Şekil 5).



Şekil 5: *IL29* rs30461 gen polimorfizmi jel elektroforez görüntüsü. 100 bp'lık DNA belirtecinin yanındaki 1, 2, 3, 5 ve 7 nolu örnekler TT; 4 nolu örnek CC; ve 6 nolu örnek CT genotipindedir.

3.4. MiRNA Ekspresyon Analizi İçin Örneklerin Hazırlanması ve Analiz

Elli hasta ve 50 sağlıklı gönüllünün EDTA'lı tüpe alınmış tam kan örneklerinden RNA izolasyonu yapıldı. Elde edilen örneklerin Qubit cihazı ile RNA miktar ve saflığı ölçüldü. Total RNA'lar ilgili miRNA'ya spesifik primerler kullanılarak cDNA'ya çevrildi ve Taq-Man probaları kullanılarak Kantitatif Real-Time $2^{-\Delta C_t}$ yöntemi (Applied Biosystems, ABI, 7500 Real Time PCR System) kullanılarak hasta ve kontrol grubu miRNA-548 ekspresyon düzeyleri belirlendi.

3.4.1. RNA İzolasyonu

500 μ L kan üzerine 1mL (1000 μ L) Trizol eklendi ve ara sıra vortekslenerek oda ısısında 15 dakika bekletildi. 1 mL Trizol başına 0.2 mL (200 μ L) Kloroform eklendi ve 15 saniye vortekslendi. 13 000 rpm hızla 10 dakika santrifüj edildi. Üstteki sıvı faz başka bir tüpe alınarak sıvı fazın üzerine 1mL Trizol başına 0,5 mL (500 μ L) İsoopropanol (izopropil alkol) eklendi. Oda sıcaklığında 10 dakika bekletilip 13 000 rpm hızla 10 dakika santrifüj edildi. Süpernatant dökülüp Pelet 1mL trizol başına 1 mL %80'lik EtOH (Etil alkol) ile yıkandı ve vortekslendi. 13 000 rpm hızla 10 dakika santrifüj edildi. Süpernatant dökülüp pelet içindeki alkol uçana kadar tüpün ağzı açık bir şekilde bekletildi (yaklaşık 15-20 dakika). Kuruyan peletin üzerine 30 μ L distile su eklendi. Hafif pipetaj ve vorteksin ardından izole edilmiş olan RNA - 80°C' de kullanılmaya kadar saklandı.

Çalışmaya dahil edilen tüm RNA'ların miktarları QUBIT 3.0 fluorometre ile ölçülmüştür. Her örnek için 199 μ L Buffer ve 1 μ L Reagent koyarak gerekli

miktarda Working solution hazırlanmış ve her tüpe 2 µL örnek ve 198 µL Working solution koyularak örnek konsantrasyonları belirlenmiştir.

3.4.2. MiRNA Reverse Transkripsiyon (RT) Reaksiyonu (cDNA eldesi)

İzole edilen total RNA'lar TaqMan MicroRNA Reverse Transcription (RT) Kit, 200 Katalog no: 4366596 (Applied Biosystems) (ABI) kullanılarak cDNA'ya dönüştürüldü ve analiz gününe kadar -20°C'de saklandı. cDNA eldesi, Pre-amplifikasyon ve amplifikasyon protokolleri üretici firmanın (Applied Biosystems) önerdiği protokollerle gerçekleştirildi.

3.4.3. TaqMan miRNA RT Protokol

-80°C'den çıkarılan ve erimeye bırakılan RNA örnekleri pipetajla karıştırıldı ve cDNA protokolü hazırlanana kadar buz üzerinde bekletildi. RT reaksiyonu aşağıdaki malzemelerle hazırlandı. Ana karışım 15 µL'lik her reaksiyon için 7 µL kullanıldı. Gerekli ölçüler aşağıda verilmiştir.

10 X RT Buffer	1,5 µL
dNTP Mix	0,15 µL
RNase İnhibitör	0,19 µL
MultiScribe RT enzim	1,0 µL
Nükleaz içermeyen su	4,16 µL
Toplam	7 µL

Tüm malzemeler yavaşça karıştırıldı, santrifüj edildi ve RT reaksiyon için tüpler hazırlanana kadar ana karışım buzda bekletildi. 15 µL'lik her reaksiyon için 7 µL ana karışım, 5 µL total RNA kullanıldı. Toplamda 15µL hacimli RT reaksiyonu 'MWG primus thermal cycler-Primus 96 PCR system' cihazı ile 16°C'de 30 dakika, 42°C'de 30 dakika, 85°C'de 5 dakika programında gerçekleştirildi. Elde edilen cDNA'lar miRNA ekspresyon düzeyleri ölçülene kadar -20°C'de saklandı.

3.4.4. Real Time PCR ile miRNA Ekspresyon Düzeylerinin Belirlenmesi

Quantitative-Comparative CT ($\Delta\Delta Ct$) Real Time PCR, SDS 2.0.6 yazılımı kullanılarak ABI Prism 7500 Real-Time PCR System cihazı ile gerçekleştirilmiştir. Real Time PCR ile miRNA-548 ekspresyon düzeylerinin belirlenmesi için Taqman Universal Master Mix no UNG ve Taqman MiRNA assay 20x kullanıldı. 20 μ L'lik reaksiyon için her bir RNA örneğinde aşağıdaki malzemeler belirtilen miktarda kullanıldı.

Taqman Universal Master Mix no UNG	10 μ L
Nükleaz içermeyen su	5 μ L
cDNA	4 μ L
Taqman MiRNA assay 20x	1 μ L
Toplam	20 μ L

Endojen kontrol olarak hsa-miR-26b kullanıldı. Kontrol grubundaki RNA'lerden oluşturulan RNA karışımı referans RNA örneği olarak kullanıldı ve referans RNA her plate içinde çalışıldı. Bütün reaksiyonlar, üç kez gerçekleştirildi. 96'lık plateler (Applied Biosystems MicroAmp optical 96-Well reaction plate) MicroAmp Optical Adhesive Film ile kapatıldı. Rölatif miRNA ekspresyonu $2^{-\Delta\Delta Ct}$ yöntemi kullanılarak hesaplandı. Kantitatif Real Time PCR ile analiz edilen miRNA'lar ve dizileri Tablo 3'te gösterilmiştir.

Tablo 3 : Kantitatif Real Time PCR ile analiz edilen miRNA'lar ve dizileri

miRNA	Assay ID	Gene ID	NCBI referans dizi numarası	miRNA dizisi
hsa-miR-26b	000406	407017	NR_029500.1	5'-UUCAAGUAAUUCAGGAUAGGUU-3'
hsa-miR-548b-5p	002408	693128	NR_030315.1	5'-AAAAGUAAUUGUGGUUUUGGCC-3'
hsa-miR-548c-5p	002429	693129	NR_030347.1	5'-AAAAGUAAUUGCGGUUUUGGCC-3'
hsa-miR-548i	002909			5'-AAAAGUAAUUGCGGAUUUUGGCC-3'

3.5. IL-28B ve IL-29 Serum Düzeylerinin Analizi

Hastalardan ve sağlıklı gönüllülerden IL-28B ve IL-29 düzeylerinin araştırılması için sabah 12 saatlik açlık süresinin ardından; pıhtı aktivatörü içeren jel seperatörlü tüpe 5 ml venöz kan örneği alındı. Jel seperatörlü tüpte pıhtılaşmanın oluşması için 30 dakika beklendi. Pıhtılaşma tamamlandıktan sonra örnek, oda sıcaklığında 3500 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi. Ayrılan serum örnekleri eppendorf tüplerinde çalışılana kadar -80°C'de muhafaza edildi. IL-28B ve IL-29 ölçümleri Enzym-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) yöntemiyle Bülent Ecevit Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı'nda yapıldı.

3.5.1. IL-28B Ölçümü

Çalışmada serum IL-28B düzeyleri Sandwich Enzim Linked Immunosorbent Assay (ELISA) yöntemiyle ölçüldü. Ölçümler için Elabscience firmasının ticari Human IL-28B (Wuhan, PRC, Katalog No: E-EL-H5508) kiti kullanıldı. Kullanılan kit, prosedürüne göre çalışma öncesindeki inkübasyonlar yapıldıktan sonra 450 nm dalga boyunda absorbans ölçüm ve çizilen standart eğri grafiğinden, çalışılan örneklerin IL-28B konsantrasyonları hesaplandı.

3.5.2. IL-29 Ölçümü

Çalışmada serum IL-29 düzeyleri Sandwich Enzim Linked Immunosorbent Assay (ELISA) yöntemiyle ölçüldü. Ölçümler için Boster firmasının ticari Human IL-29 kiti (Ca, ABD, Katalog No: EK0964) kullanıldı. Kullanılan kit, prosedürüne göre çalışma öncesindeki inkübasyonlar yapıldıktan sonra 450 nm dalga boyunda absorbans ölçüm ve çizilen standart eğri grafiğinden, çalışılan örneklerin IL-29 konsantrasyonları hesaplandı.

3.6. İstatistiksel Analiz

İstatistiksel değerlendirme SPSS 19.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) programı kullanılarak yapıldı. Sayısal değişkenlerin normal dağılıma uygunlukları Shapiro-Wilk testi ile incelendi. Sayısal değişkenler için tanımlayıcı istatistikler ortanca, kategorik yapıdaki veriler için sayı ve yüzde olarak ifade edildi. Sayısal değişkenler

bakımından iki grubun karşılaştırılmasında Mann-Whitney U testi kullanıldı. Sayısal değişkenler bakımından üç ve daha fazla grubun karşılaştırılmasında Kruskal-Wallis varyans analizi kullanıldı. Risk faktörlerinin belirlenmesi için Lojistik Regresyon analizi yapıldı. Sonuçlar % 95 güven aralığında değerlendirildi ve $p < 0.05$ değeri anlamlı kabul edildi.



4. BULGULAR

4.1. Hasta Grubunun Özellikleri

Çalışmaya yaşları 7-17 arasında değişen (ortalama yaş 12.50 ± 1.777) 40'ı erkek (% 65,5) ve 24'ü kız (% 37,5) toplam 64 SSPE tanılı hasta alınmıştır. Kontrol grubu olarak ise yaşları 6-18 arasında (ortalama yaş 13.0 ± 3.292) değişen 34'ü erkek (% 50.0) ve 34'ü kız (% 50.0) toplam 68 sağlıklı çocuk çalışmaya dahil edilmiştir. Her iki grup arasında cinsiyet dağılımı ($p=0.148$) ve ortalama yaş ($p=0.200$) yönünden istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı.

4.2. Hasta ve Kontrol Gruplarının Polimorfik Alel Dağılım Sıklığının Karşılaştırması

4.2.1. *IL28B* rs12979860 (*IL28* C/T) Gen Polimorfizmi

SSPE hastaları ve sağlıklı kontrol grubu rs12979860 (*IL28* C/T) gen polimorfizmi açısından incelendiğinde kontrol grubunun 9'unun (13,4%) TT genotipinde, 28'sinin (41,8%) CT genotipinde, 30'unun (44,8%) CC genotipinde olduğu saptandı. Hasta grubunun ise 8'inin (12,5%) TT genotipinde, 30'unun (46,9%) CT genotipinde, 26'sinin (40,6%) CC genotipinde olduğu saptandı. Genotip dağılımı açısından iki grup arasında istatistiksel açıdan anlamlı farklılık bulunamadı ($p=0.842$, OR=1,236; CI=0,592-2,580) (Tablo 4).

rs12979860 (*IL28* C/T) gen polimorfizmi için kontrol ve hasta grupları alel frekansları açısından karşılaştırıldığında C aleli kontrol grubunda 134 alelin 88'inde (%65.7), hasta grubunda ise 128 alelin 82'sinde (%64.1) bulundu. T aleli ise kontrol grubunda 134 alelin 46'sinde (%34,3), hasta grubunda ise 128 alelin 46'sinde (%35.9) bulundu. Alel frekansları açısından kontrol ve hasta grubu arasında anlamlı bir farklılık bulunamadı ($p=0.785$; OR=1.073; CI=0.646-1.783) (Tablo 5).

4.2.2. *IL28B* rs8099917 (*IL28* G/T) Gen Polimorfizmi

SSPE hastaları ve sağlıklı kontrol grubu rs8099917 (*IL28* G/T) gen polimorfizmi açısından incelendiğinde kontrol grubunun 55'inin (%80.9) TT genotipinde, 13'ünün

(19,1%) GT genitipinde olduğu saptandı. Kontrol grubunda GG genotipine rastlanmadı. Hasta grubunun ise 45'inin (70,3%) TT genotipinde, 14'ünün (%21.9) GT genotipinde, 5'inin (%7.8) GG genotipinde olduğu saptandı. Genotip dağılımı açısından iki grup arasında istatistiksel açıdan anlamlı farklılık bulunamadı ($p=0.052$, gruplarda tüm genotipler elde edilemediğinden Odds oranı hesaplanamadı) (Tablo 4).

rs8099917 (*IL28* G/T) gen polimorfizmi için kontrol ve hasta grupları alel frekansları açısından karşılaştırıldığında T aleli kontrol grubunda 136 alelin 123'ünde (%90.4), hasta grubunda ise 128 alelin 104'ünde (%81.3) bulundu. G aleli ise kontrol grubunda 136 alelin 13'ünde (%9.6), hasta grubunda ise 128 alelin 24'ünde (%18.8) bulundu. Kontrol ve hasta grupları arasında alel frekansları dağılımının istatistiksel olarak anlamlı farklılık gösterdiği saptanmıştır ($p=0.049$; OR=2.183; CI=1.059-4.502) (Tablo 5).

4.2.3. *IL29* rs30461 (*IL29* T/C) Gen Polimorfizmi

SSPE hastaları ve sağlıklı kontrol grubu rs30461 (*IL29* T/C) gen polimorfizmi açısından incelendiğinde kontrol grubunun 54'ünün (%79.4) TT genotipinde, 14'ünün (%20.6) CT genotipinde olduğu saptandı. Kontrol grubunda CC genotipine rastlanmadı. Hasta grubunun ise 54'ünün (%84.4) TT genotipinde, 8'inin (12,5%) CT genotipinde, 2'sinin (3,1%) CC genotipinde olduğu saptandı. Genotip dağılımı açısından iki grup arasında istatistiksel açıdan anlamlı farklılık bulunamadı ($P=0.198$, gruplarda tüm genotipler elde edilemediğinden Odds oranı hesaplanamadı) (Tablo 4).

rs30461 (*IL29* T/C) gen polimorfizmi için kontrol ve hasta grupları alel frekansları açısından karşılaştırıldığında T aleli kontrol grubunda 136 alelin 122'sinde (%89.7), hasta grubunda ise 128 alelin 116'sında (%90.6) bulundu. C aleli ise kontrol grubunda 136 alelin 14'ünde (%10.3), hasta grubunda ise 128 alelin 12'sinde (%9.4) bulundu. Alel frekansları açısından kontrol ve hasta grubu arasında anlamlı bir farklılık bulunamadı ($p=0.965$; OR=0.901; CI=0.400-2.030) (Tablo 5).

Tablo 4: SSPE hastalarında ve sağlıklı kontrollerde *IL28B* ve *IL29* gen polimorfizmlerinin genotip frekansları

SNP	Genotip	Sağlıklı kontroller n=68	SSPE hastaları n=64	P Value	OR (95 % CI)
rs12979860 (<i>IL28 C/T</i>)	TT	9 (13,4%)	8 (12,5%)	0.842	1,236 (0,592-2.580)
	CT	28 (41,8%)	30 (46,9%)		
	CC	30 (44,8%)	26 (40,6%)		
rs8099917 (<i>IL28 G/T</i>)	TT	55 (80,9%)	45 (70,3%)	0.052	*
	GT	13 (19,1%)	14 (21,9%)		
	GG	0 (0%)	5 (7,8%)		
rs30461 (<i>IL29 T/C</i>)	CC	0 (0%)	2 (3,1%)	0.198	*
	CT	14 (20,6%)	8 (12,5%)		
	TT	54 (79,4%)	54 (84,4%)		

(*: Gruplarda tüm genotipler elde edilemediğinden OR hesaplanamadı)

Tablo 5: SSPE hastalarında ve sağlıklı kontrollerde *IL28B* ve *IL29* gen polimorfizmlerinin alel frekansları.

SNP	Alel	Sağlıklı kontroller n=68	SSPE hastaları n=64	P Value	OR (95 % CI)
rs12979860 (<i>IL28 C/T</i>)	C	88 (%65.7)	82 (%64.1)	0.785	1,073 (0.646-1.783)
	T	46 (%34.3)	46 (%35.9)		
rs8099917 (<i>IL28 G/T</i>)	T	123 (%90.4)	104 (%81.3)	0.049	2183 (1.059-4.502)
	G	13 (%9.6)	24 (%18.8)		
rs30461 (<i>IL29 T/C</i>)	T	122 (%89.7)	116 (%90.6)	0.965	0.901 (0.400-2.030)
	C	14 (%10.3)	12 (%9.4)		

4.3. MiRNA Ekspresyon Düzeylerinin Karşılaştırılması

Periferik kandaki miR548b-5p, miR548c-5p ve miR548i ekspresyon düzeyleri için $2^{-\Delta\Delta Ct}$ yöntemi kullanılarak hesaplanan miRNA ekspresyonu rölatif kantifikasyon (RQ) değerleri kullanıldı. Kontrol ve hasta grubu için ayrı ayrı minimum, maksimum ve ortanca RQ değerleri hesaplandı. Kontrol ve hasta grubu arasındaki karşılaştırma ortanca RQ değeri üzerinden yapıldı ve p değerleri bunlara göre hesaplandı.

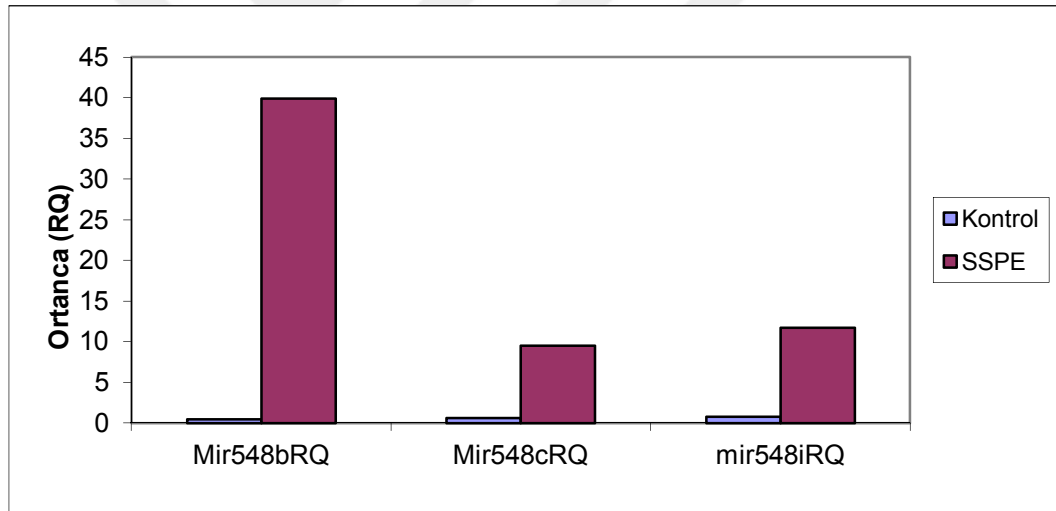
SSPE hastaları ve sağlıklı kontrol grubu periferik kandaki miR548b-5p ekspresyon düzeyi açısından incelendiğinde kontrol grubunda minimum RQ 0,0259, maksimum RQ 20,0138, ortanca RQ 0,4394 olarak bulundu. Hasta grubunda ise minimum RQ 0,1138, maksimum RQ 2230,8720, ortanca RQ 39,9352 olarak saptandı. miR548b-5p ekspresyon düzeyleri SSPE hastalarında kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek saptandı ($p<0.001$) (Tablo 6) (Şekil 6).

SSPE hastaları ve sağlıklı kontrol grubu periferik kandaki miR548c-5p ekspresyon düzeyi açısından incelendiğinde kontrol grubunda minimum RQ 0,0518, maksimum RQ 65,6951, ortanca RQ 0,638600 olarak bulundu. Hasta grubunda ise minimum RQ 0,0306, maksimum RQ 1342,7100, ortanca RQ 9,4846 olarak saptandı. miR548c-5p ekspresyon düzeyleri SSPE hastalarında kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek saptandı ($p<0.001$) (Tablo 6) (Şekil 6).

SSPE hastaları ve sağlıklı kontrol grubu periferik kandaki miR548i ekspresyon düzeyi açısından incelendiğinde kontrol grubunda minimum RQ 0,052, maksimum RQ 35,019, ortanca RQ 0,79080 olarak bulundu. Hasta grubunda ise minimum RQ 0,067, maksimum RQ 1047,860, ortanca RQ 11,72400 olarak saptandı. miR548i ekspresyon düzeyleri SSPE hastalarında kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek saptandı ($p<0.001$) (Tablo 6) (Şekil 6).

Tablo 6: SSPE hastalarında ve sağlıklı kontrollerde periferik kandaki miR548b-5p, miR548c-5p ve miR548i ekspresyon düzeyleri.

	Kontrol (n=50)			Hasta (n=50)			p
	Minimum	Maksimum	Ortanca	Minimum	Maksimum	Ortanca	
Mir548b-5p RQ	0,0259	20,0138	0,4394	0,1138	2230,8720	39,9352	<0.001*
Mir548c-5p RQ	0,0518	65,6951	0,6386	0,0306	1342,7100	9,4846	<0.001*
Mir548i RQ	0,0520	35,0190	0,7908	0,0670	1047,8600	11,7240	<0.001*



Şekil 6: miR548b-5p, miR548c-5p ve miR548i ekspresyon düzeyleri.

4.4. Serum IL-28B düzeyinin değerlendirilmesi

Ortalama serum IL-28B düzeyleri SSPE hasta grubunda $39,617 \pm 102,4977$ ng/ml, kontrol grubunda $19,043 \pm 26,5961$ ng/ml bulundu. Kontrol ve hasta grubu için ayrı ayrı minimum, maksimum ve ortanca IL-28B düzeyleri saptandı. Kontrol ve hasta grubu arasındaki karşılaştırma ortanca değeri üzerinden yapıldı ve p değerleri buna göre hesaplandı. SSPE hastaları ve sağlıklı kontrol grubu periferik kandaki serum IL-

28B düzeyleri açısından incelendiğinde kontrol grubunda minimum 0,5 ng/ml, maksimum 121,6 ng/ml, ortanca 10,3 ng/ml olarak bulundu. Hasta grubunda ise minimum 3,4 ng/ml, maksimum 449,0 ng/ml, ortanca 14,1 ng/ml olarak bulundu. Gruplar arasındaki serum IL-28B düzeyleri karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmadı ($p=0.184$) (Tablo 7).

4.5. Serum IL-29 düzeyinin değerlendirilmesi

Ortalama serum IL-29 düzeyleri SSPE hasta grubunda $5517,5 \pm 3183,0$ ng/ml, kontrol grubunda $40,1 \pm 33,0$ ng/ml bulundu. Kontrol ve hasta grubu için ayrı ayrı minimum, maksimum ve ortanca IL-29 düzeyleri saptandı. Kontrol ve hasta grubu arasındaki karşılaştırma ortanca değeri üzerinden yapıldı ve p değerleri buna göre hesaplandı. SSPE hastaları ve sağlıklı kontrol grubu periferik kandaki serum IL-29 düzeyleri açısından incelendiğinde kontrol grubunda minimum 10,0 ng/ml, maksimum 170,0 ng/ml, ortanca 32,0 ng/ml olarak bulundu. Hasta grubunda ise minimum 108,0 ng/ml, maksimum 7843,0 ng/ml, ortanca 7627,0 ng/ml olarak bulundu. SSPE grubunda serum IL-29 düzeyleri, kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek saptandı ($p<0.001$) (Tablo 7).

Tablo 7: SSPE hastalarında ve sağlıklı kontrollerde serum IL-28B ve IL-29 düzeyleri.

	Kontrol (n=28)			Hasta (n=18)			p
	Minimum	Maksimum	Ortanca	Minimum	Maksimum	Ortanca	
IL-28B (ng/ml)	0,5	121,6	10,3	3,4	449,0	14,1	0.184
IL-29 (ng/ml)	10,0	170,0	32,0	108,0	7843,0	7627,0	<0.001*

Tüm hastalar için minimum, maksimum ve ortanca IL-28B düzeyleri saptanarak karşılaştırma ortanca değerleri üzerinden yapıldı ve p değerleri buna göre hesaplandı. rs12979860 (*IL28 C/T*) gen polimorfizminde C aleli için IL-28B serum düzeyleri; minimum 0,5 ng/ml, maksimum 449 ng/ml, ortanca 14,1 ng/ml olarak, T aleli için; minimum 0,5 ng/ml, maksimum 53,0 ng/ml, ortanca 9,2 ng/ml olarak

saptanmıştır. Serum IL-28B düzeyi bakımından C ve T alelleri arasında anlamlı fark bulunamadı (p=0.101) (Tablo 8).

rs8099917 (*IL28 G/T*) gen polimorfizminde G aleli için IL-28B serum düzeyleri; minimum 0,5 ng/ml, maksimum 24,8 ng/ml, ortanca 10,3 ng/ml olarak, T aleli için; minimum 0,5 ng/ml, maksimum 449,0 ng/ml, ortanca 12,1 ng/ml olarak saptanmıştır. Serum IL-28B düzeyi bakımından G ve T alelleri arasında anlamlı fark bulunamadı (p=0.187) (Tablo 8).

Tablo 8 : Çalışmaya dahil edilerek serum IL-28B düzeyi ölçülen tüm bireylerde rs12979860 ve rs8099917 polimorfizmleri için alellere göre IL-28B serum düzeyi

		IL-28B Serum Düzeyi			
		Minimum	Maksimum	Ortanca	p
rs12979860	C	0,5	449,0	14,1	0.101
(<i>IL28 C/T</i>)	T	0,5	53,0	9,2	
rs8099917	G	0,5	24,8	10,3	0.187
(<i>IL28 G/T</i>)	T	0,5	449,0	12,1	

Tüm hastalar için minimum, maksimum ve ortanca IL-29 düzeyleri saptanarak karşılaştırma ortanca değerleri üzerinden yapıldı ve p değerleri buna göre hesaplandı. rs30461 (*IL29 T/C*) gen polimorfizminde T aleli için IL-29 serum düzeyleri; minimum 14,0 ng/ml, maksimum 2047,0 ng/ml, ortanca 60,0 ng/ml olarak, C aleli için; minimum 10,0 ng/ml, maksimum 7843,0 ng/ml, ortanca 60,0 ng/ml olarak saptanmıştır. Serum IL-29 düzeyi bakımından C ve T alelleri arasında anlamlı fark bulunamadı (p=0.412) (Tablo 9).

Tablo 9 : Çalışmaya dahil edilerek serum IL-29 düzeyi ölçülen tüm bireylerde rs30461 polimorfizmleri için alellere göre IL-29 serum düzeyi

		IL-29 Serum Düzeyi			
		Minimum	Maksimum	Ortanca	p
rs30461	T	14,0	2047,0	60,0	0.412
(<i>IL29 T/C</i>)	C	10,0	7843,0	60,0	

5. TARTIŞMA

SSPE oluşumunun nedenleri net olarak aydınlatılamamıştır. Patogenezde daha çok kızamık virüsündeki yapısal proteinleri kodlayan viral genlerdeki değişikliklerin üzerinde durulmuştur (3,19). Patogenezde üzerinde durulan bir diğer önemli konu ise konağın bağışıklık yanıtıdır. Konağın yetersiz bağışıklık yanıtının, virüsün tamamen yok edilemeyerek değişime uğramasına ve vücutta persiste olmasına katkıda bulunduğunu gösteren çalışmalar mevcuttur (25,26,27). SSPE hastalarında T hücre yanıtının yetersiz ya da defektif olduğunu gösteren çok sayıda çalışma bulunmaktadır (6,34,103). 2000'li yıllarda keşfedilen IFN- λ doğrudan virüs enfeksiyonlarına yanıt olarak sentezlenen ve antiviral aktivite gösterdikleri bilinen sitokin grubudur (43,53). Son yıllarda yapılan çalışmalarda bazı RNA ve DNA virüslerinin (HSV-2 ve CMV) IFN- λ ekspresyonunu indüklediği gösterilmiştir (104,105). Literatürde viral hastalıklarda IFN- λ ekspresyonu ya da düzeyinin arttığını gösteren çalışmalar olmakla birlikte, alt tiplerini ayrı ayrı değerlendiren çok fazla çalışma mevcut değildir. Biz de çalışmamızda SSPE tanısı almış hastalarda ve kontrol grubunda serum IL-28B ve IL-29 düzeylerini ölçerek, mutant kızamık virüsüne karşı bağışıklık yanıtında IFN- λ ekspresyonunun değişimini değerlendirdik. Gruplar arasındaki serum IL-28B düzeyleri karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık olmadığı görülürken ($p=0.184$), SSPE grubunda serum IL-29 düzeylerinin, kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek olduğu belirlenmiştir ($p<0.001$).

Dellgren ve arkadaşları 2009 yılında IFN- λ alt tiplerinin antiviral aktivitesini karşılaştırmak amacıyla yaptıkları hücre kültürü çalışmasında IL-28B'nin IL-29'a göre daha düşük miktarlarda etkili olduğunu göstermişler. Bu nedenle, IL-28B'nin HepG2 hücrelerinde en etkin IFN- λ türü olduğunu ileri sürmüşlerdir (106). Başka bir çalışmada serum IL-29 düzeylerinin spontan iyileşme göstermiş akut hepatit C hastalarında yüksek olduğu rapor edilmiştir (9). Hasegawa ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada yabancı kızamık virüsü ve SSPE'ye neden olan mutant kızamık virüsü ile enfekte edilmiş B95a (marmoset B lenfoblastoid hücre hattı) hücre hattında IFN- α , IFN- β , IFN- γ ve IL-29 konsantrasyonları ölçülüp karşılaştırılmıştır. Mutant

kızamık virüsü ile enfekte hücrelerde IL-29 düzeyinin, enfekte edilmeyen hücrelere ve yabancı kızamık virüsü ile enfekte edilmiş hücrelere oranla anlamlı düzeyde yüksek olduğu tespit edilmiştir (107). Bizim sonuçlarımız da Hasegawa ve arkadaşlarının sonuçlarını destekler niteliktedir. Bu bulgular göz önünde bulundurulduğunda serum IL-29 düzeyinin SSPE hastalığının tanısı için kullanılıp kullanılmayacağı sorusu gündeme gelmektedir. Serum IL-29 düzeyinin güvenilir bir biyolojik gösterge (biyomarkır) olarak geliştirilmesi için kızamık ve SSPE hastalarında yapılacak karşılaştırmalı in vivo insan çalışmaları bu çalışmanın bir sonraki basamağı olabilir. Ayrıca bu alandaki çalışmalar değerlendirildiğinde IFN- λ 'ların antiviral etki ve etkinliklerinin in vitro ve in vivo ortamlarda farklılıklar gösterdikleri görülmektedir (108). Bu açıdan çalışmamızın SSPE hastalarında serum IL-29 düzeyinin yüksek olduğunu gösteren ilk in vivo çalışma olması da önemlidir.

IL-29'un HCV replikasyonu üzerindeki antiviral etkilerini araştıran in vitro bir çalışmada, IL-29'un ISG düzeylerinde artışa neden olarak ve IFN-a'nın antiviral etkinliğini güçlendirerek doza ve zamana bağımlı olarak HCV inhibisyonu yaptığı gösterilmiştir. Ancak IFN-a tedavisinin HCV inhibisyonuna etkisi IFN- λ 'ya göre belirgin olarak daha yüksek bulunmuştur. Bu antiviral etkinlik farkından, IFN-a ile karşılaştırıldığında fonksiyonel IFN- λ reseptör komplekslerinin daha düşük düzeylerde olmasının sorumlu olabileceği düşünülmüştür (108). IFN- λ 'nın tedavi amaçlı kullanımı ile ilgili yapılacak gelecek çalışmalarda IFN- λ reseptör komplekslerinin daha yoğun olarak bulunduğu dokular ön planda düşünülmelidir.

Jordan ve arkadaşlarının 2007 yılında yaptıkları çalışmada IL-29 tedavisine yanıt olarak periferik kan mononükleer hücrelerinden yüksek miktarda IL-6, IL-8 ve IL-10 ekspresyonunun indüklendiği gösterilmiştir. IL-29'un, viral enfeksiyonlara tepki olarak üretildiği, monosit ve makrofajları aktive ederek sitokin üretimini sağladığı ortaya konmuştur. Sonuç olarak, IL-29'un viral enfeksiyonlara yanıtta doğal bağışıklık yanıtın aktive edilmesinde önemli rol oynadığı gösterilmiştir. Buna ek olarak doğal bağışıklıkla adaptif bağışıklığı birbirine bağlayan ve adaptif bağışıklığı da düzenleyen bir rolü olduğu ileri sürülmüştür (109). SSPE tanılı hastaların serum ve BOS'unda sitokin düzeylerinin araştırıldığı bir çalışmada serum ve BOS'ta IL-6 ve IL-10 düzeylerinde artış görülmüştür (110).

Mevcut çalışmalar göz önünde bulundurularak bizim sonuçlarımız değerlendirildiğinde, çok yüksek IL-29 düzeylerinin inflamatuvar yanıtta artışa neden olarak SSPE patogeneğinde etkili olduğu düşünülebilir.

Günümüze dek yapılan çalışmalarda *IL28B* geninde tanımlı rs8099917 ve rs12979860 polimorfizmlerinin birçok viral hastalıkla ilişkili olduğu tespit edilmiştir. Özellikle Hepatit C hastalarıyla yapılan çalışmalar Tip III IFN'ların önemli antiviral etkinliğini doğrulayarak, bu polimorfizmlerin Hepatit C Virüsü (HCV) ile enfekte hastalarda tedaviye yanıtı etkilediğini göstermiştir (8,9,10).

Çalışmamızda *IL28B* rs12979860 gen polimorfizmi için genotip ($p=0.842$) ve alel frekansları dağılımı ($p=0.785$) açısından SSPE hastaları ve sağlıklı kontrol grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunamamıştır. Duggal ve arkadaşlarının 2013 yılında HCV hastalarında yaptığı bir çalışmada rs12979860 polimorfizminde T aleli, HCV enfeksiyonunda virüsün persiste olması ile ilişkili bulunmuş ve *IL28B* genotipinin HCV'nin spontan rezolüsyonu ile bağlantılı olduğu gösterilmiştir (111). Başka bir çalışmada da rs12979860 polimorfizminin de içinde bulunduğu bir grup *IL28B* gen varyantının, IL-28B protein üretimini etkilediği ileri sürülmüştür (112). *IL28B* genotipinin IL-28B mRNA düzeyi ile ilişkili bulunamamasına rağmen ISGF ekspresyon düzeyi ile ilişkili bulunduğu başka bir çalışmada, polimorfizmlerin *IL28B* sinyalizasyonunun biyolojik gücü üzerinde etkili olabileceği düşünülmüştür. Sonuç olarak *IL28B* polimorfizmlerinin IFN tedavisi üzerindeki etkisinin altında yatan biyolojik mekanizma belirsizliğini korumaktadır (113). Bizim çalışmamızda SSPE hastaları ve sağlıklı kontrol grubunda rs12979860 gen polimorfizmi ile serum IL-28B düzeyleri karşılaştırıldığında anlamlı fark bulunamamıştır ($p=0.101$).

IL28B rs8099917 gen polimorfizmi değerlendirildiğinde de genotip dağılımı açısından SSPE hastaları ve sağlıklı kontrol grubu arasında istatistiksel açıdan anlamlı farklılık bulunamamıştır ($p=0.052$). Alel frekansları açısından karşılaştırıldığında ise kontrol ve hasta grupları arasında dağılımın istatistiksel olarak anlamlı farklılık gösterdiği saptanmıştır ($p=0.049$). G alelini taşımak SSPE hastalığı açısından 2.183 kat riskli bulunmuştur (OR=2.183; CI=1.059-4.502). Guojiang ve arkadaşlarının kronik HCV ile *IL28B* ve reseptörlerinde tanımlı polimorfizmlerle ilişkisini araştırmak amacıyla 2014 yılında yaptıkları çalışmada, rs8099917 gen

polimorfizmi için bizimkine benzer olarak alel frekansları açısından gruplar arasında anlamlı farklılık saptanmıştır ($p=0.00276$). G alelini taşımak kronik HCV açısından 2.10 kat riskli bulunmuştur (OR=2.10; CI= 1.28–3.44). rs8099917 polimorfizminin enhancer (güçlendirici) protein bağlayıcı bölgenin bir parçası olduğu ve bundan dolayı IFN ile uyarılan genlerin ekspresyonunun düzenlenmesinde etkili olduğu hipotezi ortaya atılmıştır. Bu polimorfizmin proteini bağlayarak, IL28B ve ISG ekspresyonunu artırdığı ileri sürülmüştür (112,114). Ancak bizim çalışmamızda SSPE hastaları ve sağlıklı kontrol grubunda serum IL-28B düzeyleri ile rs8099917 gen polimorfizmi (T ve G alelleri) karşılaştırıldığında anlamlı fark bulunamamıştır ($p=0.187$).

Elde ettiğimiz sonuçlara göre *IL29* ile ilişkili rs30461 polimorfizmi için genotip ($p=0.198$) ve alel frekansları dağılımı ($p=0.965$) açısından SSPE hastaları ve sağlıklı kontrol grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunamamıştır. Literatür tarandığında *IL29* için tanımlı polimorfizmlerle hastalıkların ilişkilerini araştıran fazla sayıda yayına rastlanmamaktadır. Bu konudaki iki çalışmadan ilkinde Galimova ve arkadaşları Rus populasyonunda psoriasis ile *IL29* rs30461 polimorfizmi arasındaki ilişkiyi araştırmışlardır. Çalışma sonucunda *IL29* rs30461 polimorfizminin psoriasis patogenezinde rolü olabileceğini belirtmişlerdir (11). 2015 yılında Shivaprasad ve arkadaşlarının Hindistan’da yapmış oldukları diğer çalışmada ise diş eti hastalarında diş eti oluğundaki sıvıda ve plazmada IL-29 düzeyleri yüksek bulunmuş ve periodontit patogenezinde IL-29’un etkin rol oynadığı düşünülmüş fakat bizim çalışmamızla benzer şekilde rs30461 polimorfizmi ile hastalığa yatkınlık arasında herhangi bir ilişki saptanamamıştır (76). Ayrıca çalışmamızda SSPE hastaları ve sağlıklı kontrol grubunda serum IL-29 düzeyleri ile rs30461 (*IL29* T/C) gen polimorfizmi (T ve C alelleri) karşılaştırıldığında anlamlı fark bulunamamıştır ($p=0.412$).

MiRNA’lar viral kaynaklı enfeksiyonlarda yeni ilaç hedefleri haline gelme potansiyeline sahip olduklarından, SSPE patogenezinde miRNA’ların rollerinin ayrıntılı olarak araştırılması gerekmektedir. Çalışmamız kapsamında IFN- λ 1 (IL-29)’in 3’UTR bölgesini hedeflediği tahmin edilen miR-548b, miR-548c, miR-548i’nin SSPE ile ilişkisini araştırmak amaçlanmıştır. SSPE hastaları ve sağlıklı kontrol grubu periferik kandaki hsa-miR-548b-5p, hsa-miR-548c-5p, hsa-miR-548i

ekspresyon düzeyi açısından incelendiğinde, bu miRNA'ların ekspresyon düzeylerinin SSPE hastalarında kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek olduğu tespit edilmiştir ($p < 0.001$).

Yongkui ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada, virüs enfeksiyonlarının IL-29 ekspresyonunu direkt olarak 3'UTR üzerinden transkripsiyonel ve posttranskripsiyonel düzeylerde düzenlediği in vitro olarak gösterilmiştir. Aynı çalışmada virüsle indüklenen IL-29 mRNA, IL-29 protein düzeylerinin ve ISG'lerin verilen miR-548b-5p, miR-548c-5p, miR-548i ve miR-548j mimikleri ile inhibisyona uğradığı, bu miRNA'ların inhibitörleri verildiğinde IL-29 düzeylerinin yükseldiği gösterilmiştir. Bu sonuçlara dayanarak, miR-548'in endojen IL-29 ve ISG'lerin düzenlenmesinde etkili olarak antiviral yanıtı regüle ettiği ve sentetik miRNA inhibitörlerinin antiviral terapi için potansiyel mekanizma oldukları ileri sürülmüştür (102). Bizim çalışmamızda bu çalışmadan farklı olarak; hem serum IL-29 düzeyleri ($p < 0.001$), hem de periferik kandaki miR548b-5p, miR548c-5p ve miR548i ekspresyon düzeyleri ($p < 0.001$), SSPE hasta grubunda kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksek bulunmuştur. SSPE hastalarında IL-29 düzeyinin kontrole göre dramatik bir biçimde arttığı, artan IL-29 düzeyini dengelemek için miR-548'in bu denli artmış olabileceği düşünülmüştür. Değişen miRNA ekspresyon düzeyleri, bağışıklık sistemi tarafından bir uyum yanıtı olabilir ya da hastalığın nedeninden çok etkisi olarak oluşabilir.

Yiş ve arkadaşlarının 2014 yılında Türkiye'de SSPE hastaları ile yaptıkları çalışmada miRNA 146a, 181a, ve 155'in periferik kan mononükleer hücrelerinde ekspresyonu hastalarda istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunmuştur. Sonuç bu miRNA'ların SSPE patogenezinde rol oynayan anormal immün yanıtın bir parçası ya da göstergesi olabileceği şeklinde yorumlanmıştır (115).

Viral kökenli hastalıklarda miR548 ekspresyonunu, IFN- λ düzeylerini ve birbirleri ile etkileşimlerini inceleyen çok az sayıda çalışma olması, çalışma sonuçlarının objektif kıyaslanması imkanını kısıtlamaktadır. Ayrıca SSPE'nin patogenezinin oldukça karmaşık ve henüz netleşmemiş olması, diğer viral hastalıklarla kıyaslanmasını da zorlaştırmaktadır. Öte yandan SSPE'nin diğer viral kökenli hastalıklarla kıyaslandığında tüm dünyada oldukça nadir görülen bir hastalık oluşu, genellikle çocuklarda görülmesi ve beyin gibi üzerinde işlem yapılması

oldukça zor bir dokuda hasar oluşturması, geniş olçekli in-vivo ve doku spesifik çalışmaların yapılmasını güçleştirmektedir. Fakat IFN- λ 'ların bu hastalığın mekanizmasındaki rollerinin ve miR548 ile ilişkilerinin daha net olarak anlaşılabilmesi için hem daha büyük popülasyonlarla yapılan klinik çalışmalara, hem de fonksiyonel çalışmalara ihtiyaç olduğu görölmektedir. *IL28B* ve *IL29* üzerinde tanımlı polimorfizmlerin SSPE hastalığı ile ve protein düzeyi ile ilişkisini netleştirmek ise olabildiğince çok etnik grubu içeren daha geniş popülasyonlar üzerinde çalışmakla mümkün olabilir.



6. SONUÇLAR

Geçirilmiş kızamık enfeksiyonundan sonra oluşan ve mortalitesi yüksek olan SSPE, ülkemizde gelişmiş ülkelere oranla sık görülmektedir. Hastalığın patogenezi tam olarak aydınlatılamamış olmakla birlikte hastaların bağışıklık sistemi ile ilgili faktörlerin etkili olduğu düşünülmektedir.

Çalışmamızda antiviral etkinlik gösterdiği bilinen IL-28B ve IL-29 ile bu sitokinlerle ilişkili bazı polimorfizmlerin ve miR-548'in SSPE ile ilişkisini araştırmak amaçlanmıştır. Bu doğrultuda hastalarda ve sağlıklı gönüllülerde; IL-28B, IL-29 serum düzeyleri, *IL28B* rs12979860 ile rs8099917 ve *IL29* rs30461 gen polimorfizmleri ve miR-548b, miR-548c, miR-548i ekspresyon düzeyleri çalışılmıştır. Elde edilen sonuçlar aşağıda sıralanmıştır:

1. Hasta ve kontrol grupları arasında serum IL-28B düzeyleri karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık olmadığı görülürken ($p=0.184$), serum IL-29 düzeylerinin SSPE grubunda, kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek olduğu saptanmıştır ($p<0.001$).
2. *IL28B* rs12979860 gen polimorfizmi için genotip ($p=0.842$) ve alel frekansları dağılımı ($p=0.785$) açısından SSPE hastaları ve kontrol grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunamamıştır.
3. *IL28B* rs8099917 gen polimorfizmi için genotip dağılımı açısından SSPE hastaları ve kontrol grubu arasında istatistiksel açıdan anlamlı farklılık bulunamamıştır ($p=0.052$). Alel frekansları açısından karşılaştırıldığında ise hasta ve kontrol grupları arasında dağılımın istatistiksel olarak anlamlı farklılık gösterdiği saptanmış ($p=0.049$), G alelini taşımak SSPE hastalığı açısından 2.183 kat riskli bulunmuştur (OR=2.183; CI=1.059-4.502).
4. *IL29* rs30461 polimorfizmi için genotip ($p=0.198$) ve alel frekansları dağılımı ($p=0.965$) açısından SSPE hastaları ve kontrol grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunamamıştır.
5. Serum IL-28B düzeyleri ile rs12979860 (C ve T alelleri) ve rs8099917 (T ve G alelleri) gen polimorfizmleri karşılaştırıldığında anlamlı fark bulunamamıştır (sırasıyla $p=0.101$, $p=0.187$).

6. Serum IL-29 düzeyleri ile rs30461 gen polimorfizmi (T ve C alelleri) karşılaştırıldığında anlamlı fark bulunamamıştır (p=0.412).
7. MiR-548b-5p, miR-548c-5p, miR-548i'nin kandaki ekspresyon düzeylerinin SSPE hastalarında kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek olduğu saptanmıştır (p<0.001).

Sonuçlar, IL-29'un ve miR-548'in, SSPE patogeneğinde rol oynayan anormal immün yanıtın bir parçası ya da göstergesi olabileceği şeklinde yorumlanmıştır. Kızamık ve SSPE hastaları ile yapılacak in vivo insan çalışmaları serum IL-29 düzeyinin SSPE için güvenilir bir biyolojik gösterge olarak geliştirilmesini sağlayabilir. MiRNA'lar viral kaynaklı enfeksiyonlarda yeni ilaç hedefleri haline gelme potansiyeline sahip olduklarından, miR-548'in SSPE patogeneindeki rolünün ayrıntılı olarak araştırılması önemlidir. IL-28 ve IL-29'un SSPE oluşumundaki rollerinin ve miR-548 ile ilişkilerinin daha net olarak anlaşılabilmesi için hem daha büyük popülasyonlarla yapılan klinik çalışmalara, hem de fonksiyonel çalışmalara ihtiyaç olduğu görülmektedir.

Ayrıca farklı etnik grupları da kapsayan daha geniş popülasyonlar üzerinde yapılacak çalışmalar, *IL28B* ve *IL29* gen polimorfizmlerinin IL-28B ve IL-29 protein düzeyleri ve SSPE ile ilişkisinin açıklığa kavuşmasına yardımcı olacaktır.

7. KAYNAKLAR

1. Garg RK. Subacute sclerosing panencephalitis. *Postgrad Med J* 78: 63-70, 2002.
2. Aicardi J, Bax M, Gillberg C, Ogier H. *Diseases of the Nervous System in Childhood* (2nd ed). London: Mac Keith Press, 1998.
3. Jahnel M. Subacute sclerosing panencephalitis presenting initially as schizophrenic psychosis in a 19-year old man. *Psychiatr Prax* 30:70-72, 2003.
4. Gascon GG. Subacute Sclerosing Panencephalitis. *Seminars in Pediatric Neurology* 3(4):260-269, 1996.
5. İrdem A, Ecer S, Özbek MN, Yaramış A, Devecioğlu C. Subakut Sklerozan Panensefalit Hastalarının Epidemiyolojik Özellikleri. *Dicle Tıp Dergisi* Cilt:31, Sayı:1, (31-35), 2004.
6. Saruhan-Direskeneli G, Gürses C, Demirbilek V, Yentür SP, Yılmaz G, Onal E, Yapıcı Z, Yalçinkaya C, Cokar O, Akman-Demir G, Gökyiğit A. Elevated interleukin-12 and CXCL10 in subacute sclerosing panencephalitis. *Cytokine* Oct 21;32(2):104-10, 2005
7. Tasdemir N, Ece A, Tekes S, Dikici S, Günes A, Balık H. Angiotensin-converting enzyme and angiotensin II type 1 receptor gene polymorphisms in children with subacute sclerosing panencephalitis. *Am J Med Genet Part B (Neuropsychiatric Genetics)* 141:445-448, 2006
8. Honda M, Sakai A, Yamashita T, Nakamoto Y, Mizukoshi E, Sakai Y, Yamashita T, Nakamura M, Shirasaki T, Horimoto K, Tanaka Y, Tokunaga K, Mizokami M, Kaneko S; Hokuriku Liver Study Group. Hepatic ISG expression is associated with genetic variation in interleukin 28B and the outcome of IFN therapy for chronic hepatitis C. *Gastroenterology* Aug;139(2):499-509, 2010.
9. Langhans B, Kupfer B, Braunschweiger I, Arndt S, Schulte W, Nischalke HD, Nattermann J, Oldenburg J, Sauerbruch T, Spengler U. Interferon-lambda serum levels in hepatitis C. *J Hepatol* May;54(5):859-65, 2011.
10. Jabłonowska E, Wójcik K, Koślińska-Berkan E, Szymańska B, Omulecka A,

- Piekarska A. Expression of selected genes in liver biopsy specimens in relation to early virological response in patients with chronic hepatitis C with HCV mono- and HIV/HCV co-infection. *Arch Virol Jun*;159(6):1365-71, 2014.
11. Galimova E, Akhmetova V, Latipov B, Kingo K, Rätsep R, Traks T, Kõks S, Khusnutdinova E. Analysis of genetic variants of class II cytokine and their receptor genes in psoriasis patients of two ethnic groups from the Volga-Ural region of Russia. *J Dermatol Sci Oct*;68(1):9-18, 2012.
 12. Rügger S, Großhans H. MicroRNA turnover: when, how, and why. *Trends Biochem Sci Oct*;37(10):436-46, 2012.
 13. Kusenda B, Mraz M, Mayer J, Pospisilova S. MicroRNA biogenesis, functionality and cancer relevance. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub Nov*;150(2):205-15, 2006.
 14. Cammaerts S, Strazisar M, De Rijk P, Del Favero J. Genetic variants in microRNA genes: impact on microRNA expression, function, and disease. *Front Genet. May 21*;6:186, 2015.
 15. McDermott AM, Miller N, Wall D, Martyn LM, Ball G, Sweeney KJ, Kerin MJ. Identification and validation of oncologic miRNA biomarkers for luminal A-like breast cancer. *PLoS One Jan 31*;9(1):e87032, 2014.
 16. Dai R, Ahmed SA. MicroRNA, a new paradigm for understanding immunoregulation, inflammation, and autoimmune diseases. *Transl Res Apr*;157(4):163-79, 2011.
 17. Gutierrez J, Issacson RS, Koppel BS. Subacute sclerosing panencephalitis: an update. *Dev Med Child Neurol Oct*;52(10):901-7, 2010.
 18. Güngör S, Anlar B, Turan N, Yilmaz H, Helps CR, Harbour DA. Antibodies to Bornavirus in subacute sclerosing panencephalitis. *Pediatr Infect Disease 24*:833-834, 2005.
 19. Wight C, Jin L, Nelson CS, Cosby SL, Padfield CJH. Scientific correspondence. Case report: An autopsy-proven case of fulminant subacute sclerosing panencephalitis. *Neuropathol Appl Neurobiol 29*:312-320, 2003.
 20. Colpak AI, Erdener SE, Ozgen B, Anlar B, Kansu T. Neuro-ophthalmology of subacute sclerosing panencephalitis: two cases and a review of the

- literature. *Curr Opin Ophthalmol* Nov;23(6):466-71, 2012.
21. Kühne M, Brown DWG, Jin L. Genetic variability of measles virus in acute and persistent infections. *Infect Genet Evol* 6: 269-276, 2006.
 22. Onal AE, Gurses C, Direskeneli GS, Yilmaz G, Demirbilek V, Yentur SP, Ozel S, Yapici Z, Tumerdem Y, Gökyigit A. Subacute sclerosing panencephalitis surveillance study in Istanbul. *Brain Dev* Apr;28(3):183-9, 2006.
 23. Campbell H, Andrews N, Brown KE, Miller E. Review of the effect of measles vaccination on the epidemiology of SSPE. *Int J Epidemiol* Dec;36(6):1334-48, 2007.
 24. Dhiman N, Jacobson RM, Poland GA. Measles virus receptors: SLAM and CD46. *Rev Med Virol* 14: 217-229, 2004.
 25. Baczko K, Lampe J, Liebert UG, Brinckmann U, ter Meulen V, Pardowitz I, Budka H, Cosby SL, Iserete S, Rima BK. Clonal expansion of hypermutated measles virus in a SSPE brain. *Virology* Nov 197(1):188-95, 1993.
 26. Dyken PR. Neuroprogressive disease of post-infectious origin: a review of a resurging subacute sclerosing panencephalitis (SSPE). *Ment Retard Dev Disabil Res Rev* 7(3):217-25, 2001.
 27. Rima BK, Duprex WP. Molecular mechanisms of measles virus persistence. *Virus Res* Aug 111(2):132-47, 2005.
 28. Hotta H, Nihei K, Abe Y, Kato S, Jiang DP, Nagano-Fujii M, Sada K. Full-length sequence analysis of subacute sclerosing panencephalitis (SSPE) virus, a mutant of measles virus, isolated from brain tissues of a patient shortly after onset of SSPE. *Microbiol Immunol* 50(7):525-34, 2006.
 29. Yentür SP, Direskeneli GS ve SSPE çalışma grubu. SSPE hastalarında immün yanıt. *Clinic Peditr* 1:21-25, 2006.
 30. Yentür SP, Gürses C, Demirbilek V, Yilmaz G, Onal AE, Yapici Z, Yalçinkaya C, Cokar O, Gökyiğit A, Saruhan-Direskeneli G. Alterations in cell-mediated immune response in subacute sclerosing panencephalitis. *J Neuroimmunol* Dec 30;170(1-2):179-85, 2005.
 31. Scully RE, Mark EJ, McNeely BU. Case records of the Massachusetts General Hospital. Weekly clinicopathological exercises. Case 25-1986. A 24

- year-old woman with a three-month history of progressive mental deterioration. *N Engl J Med* 314:1689-1700, 1986.
32. Allen IV, McQuaid S, McMahon J, Kirk J, McConnell R. The significance of measles virus and genome distribution in the CNS in SSPE for mechanisms of viral spread and demyelination. *J Neuropathol Exp Neurol* 55: 471-480, 1996.
 33. Hoffman FM, Hinton DR, Baemayr J, Weil M, Merrill JE. Lymphokines and immunoregulatory molecules in subacute sclerosing panencephalitis. *Clin Immunol Immunopathol* 58: 331-42, 1991.
 34. Anlar B, Soylemezoglu F, Aysun S, Kose G, Belen D, Yalaz K. Tissue inflammatory response in subacute sclerosing panencephalitis. *J Child Neurol* 16: 895-900, 2001.
 35. Garg RK. Subacute sclerosing panencephalitis. *J Neurol Dec* 255(12):1861-71, 2008.
 36. Dyken PR. Subacute sclerosing panencephalitis. *Neurol Clin* 3: 179-195, 1985.
 37. Salmi AA, Norrby E, Panelius M. Identification of different measles virus specific antibodies in serum and cerebrospinal fluid from patients with subacute sclerosing panencephalitis and multiple sclerosis. *Infection and Immunity* 6: 248-54, 1972.
 38. Abdelnoor AM, Dhip-Jalbut SS, Haddad FS. Different virus antibodies in serum and cerebro-spinal fluid of patients suffering from subacute sclerosing panencephalitis. *J Neuroimmunol* 2: 27-34, 1982.
 39. Blume WT, Kibara M. Atlas of pediatric electroencephalography. (2nd ed). Philadelphia, Lippincott-Raven 370, 1999.
 40. Otaki M, Sada K, Kadoya H, Nagano-Fujii M, Hotta H. Inhibition of measles virus and subacute sclerosing panencephalitis virus by RNA interference. *Antiviral Res* 70:105-11, 2006.
 41. Santoshkumar B, Radhakrishnan K. Substantial spontaneous long-term remission in subacute sclerosing panencephalitis (SSPE). *J Neurol Sci* 154: 83-88, 1998.
 42. O'Brien TR, Prokunina-Olsson L, Donnelly RP. IFN- λ 4: the paradoxical new

- member of the interferon lambda family. *J Interferon Cytokine Res* Nov;34(11):829-38, 2014.
43. Kotenko SV. IFN- λ s. *Curr Opin Immunol* Oct;23(5):583-90, 2011.
44. Lopusná K, Režuchová I, Betáková T, Skovranová L, Tomašková J, Lukáčiková L, Kabát P. Interferons lambda, new cytokines with antiviral activity. *Acta Virol* 57(2):171-9, 2013.
45. Donnelly RP, Kotenko SV. Interferon-lambda: a new addition to an old family. *J Interferon Cytokine Res* Aug;30(8):555-64, 2010.
46. Kotenko SV, Gallagher G, Baurin VV, Lewis-Antes A, Shen M, Shah NK, Langer JA, Sheikh F, Dickensheets H, Donnelly RP. IFN-lambdas mediate antiviral protection through a distinct class II cytokine receptor complex. *Nat Immunol* Jan;4(1):69-77, 2003.
47. Sheppard P, Kindsvogel W, Xu W, Henderson K, Schlutsmeyer S, Whitmore TE, Kuestner R, Garrigues U, Birks C, Roraback J, Ostrander C, Dong D, Shin J, Presnell S, Fox B, Haldeman B, Cooper E, Taft D, Gilbert T, Grant FJ, Tackett M, Krivan W, McKnight G, Clegg C, Foster D, Klucher KM. IL-28, IL-29 and their class II cytokine receptor IL-28R. *Nat Immunol* Jan;4(1):63-8, 2003.
48. Uzé G, Monneron D. IL-28 and IL-29: newcomers to the interferon family. *Biochimie* Jun-Jul;89(6-7):729-34, 2007.
49. Gene Cards, Human Gene Database. mRNA expression in normal human tissues for IFNLR1 Gene.
<http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=IFNLR1&keywords=IL-28RA#expression>. Erişim tarihi: 10 Ağustos 2015.
50. Hamming OJ, Gad HH, Paludan SR, Hartmann R. Lambda Interferons: New Cytokines with Old Functions. *Pharmaceuticals* 3, 795-809, 2010.
51. Donnelly RP, Kotenko SV. Interferon-lambda: a new addition to an old family. *J Interferon Cytokine Res* Aug;30(8):555-64, 2010.
52. Donnelly RP, Dickensheets H, O'Brien TR. Interferon-lambda and therapy for chronic hepatitis C virus infection. *Trends Immunol* Sep;32(9):443-50, 2011.
53. Bellanti F, Vendemiale G, Altomare E, Serviddio G. The impact of interferon

- lambda 3 gene polymorphism on natural course and treatment of hepatitis C. *Clin Dev Immunol* 2012:849373, 2012.
54. Zhang L, Jilg N, Shao RX, Lin W, Fusco DN, Zhao H, Goto K, Peng LF, Chen WC, Chung RT. IL28B inhibits hepatitis C virus replication through the JAK-STAT pathway. *J Hepatol* Aug;55(2):289-98, 2011.
 55. Nussbaum RL, Mcinnes RR, Willard HF. *Tıbbi Genetik (Çev:Emre S) s.79-94, Güneş Kitabevi, İstanbul, 2005.*
 56. Franekova M, Halasova E, Bukovska E, Luptak J, Dobrota D. Gene polymorphisms in bladder cancer. *Urol Oncol* 26(1):1-8, 2008.
 57. Lewin B. *Genes VIII. Pearson Prentice Hall, Section 1.3.3; 1-4, 2004.*
 58. Garcia-Closas M, Malats N, Real FX, Yeager M, Welch R. Large-scale evaluation of candidate genes for cancer identifies associations between VEGF polymorphisms and bladder cancer risk. *PLoS Genet* 3(2):e29, 2007.
 59. Kroeger KM, Carville KS, Abraham LJ. The -308 Tumor Necrosis Factor-A Promoter Polymorphism Effects Transcription. *Molecular Immunology* 34(5):391-399, 1997.
 60. Bid HK, Manchanda PK, Mittal RD. Association of interleukin-1Ra gene polymorphism in patients with bladder cancer: case control study from North India. *Urology* 67(5):1099-1104, 2006.
 61. Warle MC, Farhan A, Metselaar HJ, Hop WCJ, Perrey C, Zondervan PE. Are cytokine gene polymorphisms related to in vitro cytokine production profiles? *Liver Transpl* 9:170-181, 2003.
 62. Awad RA, Webber S, Boyle G, Sturchioc C, Ahmed M, Martell J. The effect of cytokine gene polymorphisms on pediatric heart allograft outcome. *J Heart Lung Transplant* 20:265, 2001.
 63. Mullis KB, Faloona FA. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol* 155:335-350, 1987.
 64. Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, Arnheim N. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 20;230(4732):1350-1354, 1985.
 65. Temizkan G, Yılmaz S, Öztürk M, Arı Ş, Ertan, Sarıkaya AT, Arda N.

- Moleküler Biyolojide Kullanılan Yöntemler s.102-109, Nobel Tıp Kitabevi, Ankara, 2004.
66. Tindall KR, Kunkel TA. Fidelity of DNA synthesis by the *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Biochemistry* 9;27(16):6008, 1988.
67. Nussbaum RL, McInnes RR, Willard HF. Tıbbi Genetik. (Çev: Yılmaz E) s.33-50, Güneş Kitabevi, İstanbul, 2005.
68. Temizkan G, Yılmaz S, Öztürk M, Arı Ş, Ertan H, Sarıkaya AT, Arda N. Moleküler biyolojide kullanılan yöntemler s.55-80, Nobel Tıp Kitabevi, Ankara, 2004.
69. Cooper GM, Hausman RE. Hücre Moleküler Yaklaşım (Çev.Ed: Sakızlı M, Atabey N.) s.89-95, İzmir Tıp Kitabevi, İzmir, 2006.
70. Thomas DL, Thio CL, Martin MP, Qi Y, Ge D, O'Huigin C, Kidd J, Kidd K, Khakoo SI, Alexander G, Goedert JJ, Kirk GD, Donfield SM, Rosen HR, Tobler LH, Busch MP, McHutchison JG, Goldstein DB, Carrington M. Genetic variation in IL28B and spontaneous clearance of hepatitis C virus. *Nature* Oct 8;461(7265):798-801, 2009.
71. Ge D, Fellay J, Thompson AJ, Simon JS, Shianna KV, Urban TJ, Heinzen EL, Qiu P, Bertelsen AH, Muir AJ, Sulkowski M, McHutchison JG, Goldstein DB. Genetic variation in IL28B predicts hepatitis C treatment-induced viral clearance. *Nature* Sep 17;461(7262):399-401, 2009.
72. Tanaka Y, Nishida N, Sugiyama M, Kurosaki M, Matsuura K, Sakamoto N, Nakagawa M, Korenaga M, Hino K, Hige S, Ito Y, Mita E, Tanaka E, Mochida S, Murawaki Y, Honda M, Sakai A, Hiasa Y, Nishiguchi S, Koike A, Sakaida I, Imamura M, Ito K, Yano K, Masaki N, Sugauchi F, Izumi N, Tokunaga K, Mizokami M. Genome-wide association of IL28B with response to pegylated interferon-alpha and ribavirin therapy for chronic hepatitis C. *Nat Genet* Oct;41(10):1105-9, 2009.
73. Tanaka Y, Nishida N, Sugiyama M, Tokunaga K, Mizokami M. lambda-Interferons and the single nucleotide polymorphisms: A milestone to tailor-made therapy for chronic hepatitis C. *Hepatol Res* May;40(5):449-60, 2010.
74. Lange CM, Zeuzem S. IL28B single nucleotide polymorphisms in the treatment of hepatitis C. *J Hepatol* Sep;55(3):692-701, 2011.

75. Abe H, Hayes CN, Ochi H, Tsuge M, Miki D, Hiraga N, Imamura M, Takahashi S, Kubo M, Nakamura Y, Kamatani N, Chayama K. Inverse association of IL28B genotype and liver mRNA expression of genes promoting or suppressing antiviral state. *J Med Virol* Sep;83(9):1597-607, 2011.
76. Shivaprasad BM, Pradeep AR. Correlation of the interleukin-29 levels in crevicular fluid and plasma with the genetic polymorphism in chronic and aggressive periodontitis patients. *Arch Oral Biol* Jan;60(1):37-44, 2015.
77. Ambros V, Chen X. The regulation of genes and genomes by small RNAs. *Development* May;134(9):1635-41, 2007.
78. Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The *C. Elegans* heterochromic gene *Lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *Lin-14*. *Cell* 3;75(5):843-54, 1993.
79. Cheng AM, Byrom MW, Shelton J, Ford LP. Antisense inhibition of human miRNAs and indications for an involvement of miRNA in cell growth and apoptosis. *Nucleic Acids Res* Mar 1;33(4):1290-7, 2005.
80. Xu P, Guo M, Hay BA. MicroRNAs and the regulation of cell death. *Trends Genet* Dec;20(12):617-24, 2004.
81. Karp X, Ambros V. Developmental biology. Encountering microRNAs in cell fate signaling. *Science* Nov 25;310(5752):1288-9, 2005.
82. Chen CZ, Li L, Lodish HF, Bartel DP. MicroRNAs modulate hematopoietic lineage differentiation. *Science* Jan 2;303(5654):83-6, 2004.
83. Poy MN, Eliasson L, Krutzfeldt J, Kuwajima S, Ma X, Macdonald PE, Pfeffer S, Tuschl T, Rajewsky N, Rorsman P, Stoffel M. A pancreatic islet-specific microRNA regulates insulin secretion. *Nature* Nov 11;432(7014):226-30, 2004.
84. Garzon R, Fabbri M, Cimmino A, Calin GA, Croce CM. MicroRNA expression and function in cancer. *Trends Mol Med*. 12(12):580-587, 2006.
85. Kim VN, Nam JW. Genomics of microRNA. *Trends Genet* Mar;22(3):165-73, 2006.
86. Rodriguez A, Griffiths-Jones S, Ashurst JL, Bradley A. Identification of mammalian microRNA host genes and transcription units. *Genome Res*

Oct;14(10A):1902-10, 2004.

87. Pontes O, Pikaard CS. siRNA and miRNA processing: new functions for Cajal bodies. *Curr Opin Genet Dev* Apr;18(2):197-203, 2008.
88. Jakymiw A, Pauley KM, Li S, Ikeda K, Lian S, Eystathioy T, Satoh M, Fritzier MJ, Chan EK. The role of GW/P-bodies in RNA processing and silencing. *J Cell Sci* 120, 1317-1323, 2007.
89. Kawai T, Akira s. TLR signaling. *Seminars in Immunology* 19, 24–32, 2007.
90. Gantier MP, Sadler AJ, Williams BRG. Fine-tuning of the innate immune response by microRNAs. *Immunology and Cell Biology* 85, 458–462, 2007.
91. Cobb BS, Nesterova TB, Thompson E, Hertweck A, O'Connor E, Godwin J, Wilson CB, Brockdorff N, Fisher AG, Smale ST, Merkenschlager M. T cell lineage choice and differentiation in the absence of the RNase III enzyme Dicer. *J Exp Med* May 2;201(9):1367-73, 2005.
92. Xiao C, Srinivasan L, Calado DP, Patterson HC, Zhang B, Wang J, Henderson JM, Kutok JL, Rajewsky K. Lymphoproliferative disease and autoimmunity in mice with increased miR-17-92 expression in lymphocytes. *Nat Immunol* Apr;9(4):405-14, 2008.
93. Ventura A, Young AG, Winslow MM, Lintault L, Meissner A, Erkeland SJ, Newman J, Bronson RT, Crowley D, Stone JR, Jaenisch R, Sharp PA, Jacks T. Targeted deletion reveals essential and overlapping functions of the miR-17 through 92 family of miRNA clusters. *Cell* Mar 7;132(5):875-86, 2008.
94. Rouas R, Fayyad-Kazan H, El Zein N, Lewalle P, Rothé F, Simion A, Akl H, Mourtada M, El Rifai M, Burny A, Romero P, Martiat P, Badran B. Human natural Treg microRNA signature: role of microRNA-31 and microRNA-21 in FOXP3 expression. *Eur J Immunol* Jun;39(6):1608-18, 2009.
95. Dai Y, Huang YS, Tang M, Lv TY, Hu CX, Tan YH, Xu ZM, Yin YB. Microarray analysis of microRNA expression in peripheral blood cells of systemic lupus erythematosus patients. *Lupus* 16 (12):939-46, 2007.
96. Murata K, Yoshitomi H, Tanida S, Ishikawa M, Nishitani K, Ito H, Nakamura T. Plasma and synovial fluid microRNAs as potential biomarkers of rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *Arthritis Res Ther* 12(3):R86, 2010.
97. Cox MB, Cairns MJ, Gandhi KS, Carroll AP, Moscovis S, Stewart GJ,

- Broadley S, Scott RJ, Booth DR, Lechner-Scott J; ANZgene Multiple Sclerosis Genetics Consortium. MicroRNAs miR-17 and miR-20a inhibit T cell activation genes and are under-expressed in MS whole blood. *PLoS One* Aug 11;5(8):e12132, 2010.
98. Lodish HF, Zhou B, Liu G, Chen CZ. Micromanagement of the immune system by microRNAs. *Nat Rev Immunol*; 8: 120-130, 2008.
99. Lecellier CH, Dunoyer P, Arar K, Lehmann-Che J, Eyquem S, Himber C, Saïb A, Voinnet O. A cellular microRNA mediates antiviral defense in human cells. *Science* Apr 22;308(5721):557-60, 2005.
100. Pedersen IM, Cheng G, Wieland S, Volinia S, Croce CM, Chisari FV, David M. Interferon modulation of cellular microRNAs as an antiviral mechanism. *Nature* Oct 18;449(7164):919-22, 2007.
101. Qi Y, Zhu Z, Shi Z, Ge Y, Zhao K, Zhou M, Cui L. Dysregulated microRNA expression in serum of non-vaccinated children with varicella. *Viruses* Apr 22;6(4):1823-36, 2014.
102. Li Y, Xie J, Xu X, Wang J, Ao F, Wan Y, Zhu Y. MicroRNA-548 down-regulates host antiviral response via direct targeting of IFN- λ 1. *Protein Cell* Feb;4(2):130-41, 2013.
103. Hara T, Yamashita S, Aiba H, Nihei K, Koide N, Good RA, Takeshita K. Measles virus-specific T helper 1/T helper 2-cytokine production in subacute sclerosing panencephalitis. *J Neurovirol* Apr;6(2):121-6, 2000.
104. Ank N, West H, Bartholdy C, Eriksson K, Thomsen AR, Paludan SR. Lambda interferon (IFN-lambda), a type III IFN, is induced by viruses and IFNs and displays potent antiviral activity against select virus infections in vivo. *J Virol* May;80(9):4501-9, 2006.
105. Brand S, Beigel F, Olszak T, Zitzmann K, Eichhorst ST, Otte JM, Diebold J, Diepolder H, Adler B, Auernhammer CJ, Göke B, Dambacher J. IL-28A and IL-29 mediate antiproliferative and antiviral signals in intestinal epithelial cells and murine CMV infection increases colonic IL-28A expression. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* Nov;289(5):G960-8, 2005.
106. Dellgren C, Gad HH, Hamming OJ, Melchjorsen J, Hartmann R. Human interferon-lambda3 is a potent member of the type III interferon family.

Genes Immun Mar;10(2):125-31, 2009.

- 107.Hasegawa S, Mori N, Satomi M, Jiang DP, Hotta H, Matsushige T, Ichiyama T. Interferon production by cells infected with subacute sclerosing panencephalitis (SSPE) virus or measles virus. *Cytokine Dec*;56(3):676-9, 2011.
- 108.Marcello T, Grakoui A, Barba-Spaeth G, Machlin ES, Kotenko SV, MacDonald MR, Rice CM. Interferons alpha and lambda inhibit hepatitis C virus replication with distinct signal transduction and gene regulation kinetics. *Gastroenterology Dec*;131(6):1887-98, 2006.
- 109.Jordan WJ, Eskdale J, Boniotto M, Rodia M, Kellner D, Gallagher G. Modulation of the human cytokine response by interferon lambda-1 (IFN-lambda1/IL-29). *Genes Immun Jan*;8(1):13-20, 2007.
- 110.Ichiyama T, Siba P, Suarkia D, Reeder J, Takasu T, Miki K, Maeba S, Furukawa S. Analysis of serum and cerebrospinal fluid cytokine levels in subacute sclerosing panencephalitis in Papua New Guinea. *Cytokine Jan* 7;33(1):17-20, 2006.
- 111.Duggal P, Thio CL, Wojcik GL, Goedert JJ, Mangia A, Latanich R, Kim AY, Lauer GM, Chung RT, Peters MG, Kirk GD, Mehta SH, Cox AL, Khakoo SI, Alric L, Cramp ME, Donfield SM, Edlin BR, Tobler LH, Busch MP, Alexander G, Rosen HR, Gao X, Abdel-Hamid M, Apps R, Carrington M, Thomas DL. Genome-wide association study of spontaneous resolution of hepatitis C virus infection: data from multiple cohorts. *Ann Intern Med Feb* 19;158(4):235-45, 2013.
- 112.Jin G, Kang H, Chen X, Dai D. Evaluation of the relationship between IL28B, IL10RB and IL28RA single-nucleotide polymorphisms and susceptibility to hepatitis C virus in Chinese Han population. *Infect Genet Evol Jan*;21:8-14, 2014.
- 113.Urban TJ, Thompson AJ, Bradrick SS, Fellay J, Schuppan D, Cronin KD, Hong L, McKenzie A, Patel K, Shianna KV, McHutchison JG, Goldstein DB, Afdhal N. IL28B genotype is associated with differential expression of intrahepatic interferon-stimulated genes in patients with chronic hepatitis C. *Hepatology Dec*;52(6):1888-96, 2010.

114. Smith KR, Suppiah V, O'Connor K, Berg T, Weltman M, Abate ML, Spengler U, Bassendine M, Matthews G, Irving WL, Powell E, Riordan S, Ahlenstiel G, Stewart GJ, Bahlo M, George J, Booth DR; International Hepatitis C Genetics Consortium (IHCGC). Identification of improved IL28B SNPs and haplotypes for prediction of drug response in treatment of hepatitis C using massively parallel sequencing in a cross-sectional European cohort. *Genome Med* Aug 31;3(8):57, 2011.
115. Yiş U, Tüfekçi UK, Genç Ş, Çarman KB, Bayram E, Topçu Y, Kurul SH. Expression patterns of micro-RNAs 146a, 181a, and 155 in subacute sclerosing panencephalitis. *J Child Neurol* Jan;30(1):69-74, 2015.



8.EKLER

Ek.1. Etik Kurul Onayı



T.C.
BÜLENT ECEVİT ÜNİVERSİTESİ
Klinik Araştırmalar Etik Kurul Başkanlığı

TOPLANTI TARİHİ : 25/02/2014
TOPLANTI NO : 2014/04

KARARLAR :

- 10-**B.E.Ü. Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı öğretim üyesi Prof. Dr. Ahmet DURSUN'un sorumluluğunda yürütülecek olan 2014-53-25/02 Protokol no'lu "Subakut Sklerozan Panensefalit Patogenezinde IL 28 ve IL 29'un Rolü" konulu çalışmanın Etik Kurul İlkelerine uygun olduğuna,

Oy birliği ile karar verilmiştir.

A S L I G İ B İ D İ R

Doç. Dr. Günnur ÖZBAKIŞ DENGİZ
B.E.Ü. Klinik Araştırmalar Etik Kurul Başkanı