

TOBB EKONOMİ VE TEKNOLOJİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**NÖROFİBROMATOZİS TİP 1 TÜMÖR DOKU ÖRNEKLERİNDE
MİTOKONDRIYEL MİRNA VERİLERİNİN ANALİZİ VE
DEĞERLENDİRİLMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Şeyma ÖZGÜR

Moleküler Tıp Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Dr. Öğr. Üyesi Parisa SHARAFI

ARALIK 2021

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Onayı

.....
Prof. Dr. Ediz DEMİRPEŒE

Müdür

Bu tezin Yüksek Lisans derecesinin tüm gereksinimlerini sağladığımı onaylarım.

.....
Prof. Dr. Jülide Sedef GÖÇMEN
Anabilimdalı Başkanı

TOBB ETÜ, Sağlık Bilimleri Enstitüsü'nün 195211001 numaralı Yüksek Lisans Öğrencisi **Şeyma ÖZGÜR** 'nın ilgili yönetmeliklerin belirlediği gerekli tüm şartları yerine getirdikten sonra hazırladığı "**NÖROFİBROMATOZİS TİP 1 TÜMÖR DOKU ÖRNEKLERİNDE MİTOKONDRIYEL MİRNA VERİLERİNİN ANALİZİ VE DEĞERLENDİRİLMESİ**" başlıklı tezi **16.12.2021** tarihinde aşağıda imzaları olan jüri tarafından kabul edilmiştir.

Tez Danışmanı : **Dr. Öğr. Üyesi Parisa SHARAFI**
TOBB Ekonomi ve Teknoloji Üniversitesi

Jüri Üyeleri : **Prof. Dr. Ediz DEMİRPEŒE (Başkan)**
TOBB Ekonomi ve Teknoloji Üniversitesi

Prof. Dr. Asuman SUNGUROĞLU
Ankara Üniversitesi

TEZ BİLDİRİMİ

Tez içindeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edilerek sunulduğunu, alıntı yapılan kaynaklara eksiksiz atıf yapıldığını, referansların tam olarak belirtildiğini ve ayrıca bu tezin TOBB ETÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlandığını bildiririm.

Şeyma ÖZGÜR

İMZA

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

NÖROFİBROMATOZİS TİP 1 TÜMÖR DOKU ÖRNEKLERİNDE MİTOKONDİRİYEL MİRNA VERİLERİNİN ANALİZİ VE DEĞERLENDİRİLMESİ

Şeyma Özgür

TOBB Ekonomi ve Teknoloji Üniversitesi
Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Moleküler Tıp Anabilim Dalı

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Parisa Sharafi

Tarih: Aralık 2021

Nörofibromatozis tip 1 (NF1, von Recklinghausen), toplumda 1/2500 insidansı ile ortaya çıkan bir otozomal dominant hastalık olup ciltte sütlü kahve lekeler (café au lait - CALM), çillenmeler, nörofibrom olarak isimlendirilen farklı boyutlarda iyi huylu tümörler ve malin periferik sinir kılıfı tümörleri (MPNST) gibi belirtiler verir. Bunun yanı sıra omurilikte, kafa sinirlerinde, beyinde tümörler gelişebilmekte ve omurga eğriliği gibi kemik şeklinde bozukluklar meydana gelebilmektedir. NF1 hastalarında saptanan mutasyonlar ile hastalığın fenotipi arasında bir ilişki mevcut değildir. Klinik çok değişkenlik gösterir. Hatta aynı aile içinde bile aynı mutasyonu gösteren bireylerin farklı klinik tablo gösterdiği de bilinen bir durumdur. Bu klinik değişkenliğin ortaya çıkmasındaki görüşlerden biri *NF1* geni üzerindeki modifiye edici faktörlerin varlığıdır. Bu aday modifiye edici faktörlerden bir tanesi mikroRNA'lardır (miRNA). Ayrıca son yıllarda yapılan çalışmalar mitokondrilerin fonksiyonundaki değişikliklerin de bir modifiye edici faktör olarak NF1 hastalarının farklı fenotipler göstermesinde rol oynayabileceğini göstermektedir.

Mitokondriler, kendine özgü sinyal yollarının varlığı ve hücrenin enerji üretim merkezi olmaları nedeniyle önemli organellerdir. Son yıllarda mitokondrilerle yapılan çalışmalar büyük oranda artmıştır. Mitokondrilerin, atasal bir anaerobik ökaryotik hücre tarafından hücre içine alınan bir bakteriden köken aldığı bilinmektedir, karşılaştırmalı analizler ile mitokondriyel fizyolojik süreçler ve bakterilerin olası katılımı gözden geçirilmektedir.

Küçük kodlanmayan RNA'lardan olan miRNA'lar, gen ifadesinin post transkripsiyonel düzenleyicileri olarak fonksiyon gösteren RNA'lardır. Son zamanlarda, mitokondriyel miRNA'ların (mitomiR), mitokondriyel genomun translasyonel aktivitesini modüle ettiği ve mitokondriyel protein ifadesini ve fonksiyonunu düzenlediği gösterilmiştir. Mitokondrinin gelişim için gerekli olduğu doğrulanmış olsada, mitomiR'lerin enerji metabolizması, oksidatif stres, inflamasyon ve apoptoz dâhil önemli biyolojik süreçlerin düzenlenmesindeki rolleri daha yeni anlaşılmaya başlamıştır.

Bu tez çalışmasında, NF1 hastalarından elde edilen kütanöz ve pleksiform nörofibrom tümör dokularındaki mitomiR'lerin ifadelerinin kontrol dokuya (CALM) göre değerlendirilmesi amaçlandı. Bunun için taze dondurulmuş 11 doku seçildi (Bir kontrol (CALM), beş kütanöz nörofibrom ve beş pleksiform nörofibrom tümör dokusu) ve bu dokularda seçilen 11 mitomiR'in ifadesi kantitatif gerçek zamanlı PZR (kRT-PZR) yöntemi ile değerlendirildi. Yapılan analiz sonucunda seçilen mitomiR'lerde anlamlı bir ifade artışı görülse de kütanöz ve pleksiform nörofibromlar arasında istatistiksel olarak bir fark görülmedi. Araştırılan mitomiR'lerin sayısının az olması nedeniyle daha geniş kapsamlı araştırmalar yapılması gerektiği öngörüldü.

Anahtar Kelimeler: Nörofibromatozis tip I, Mitokondri, Mitokondriyel mikro RNA.

ABSTRACT

Master of Science in Molecular Medicine

ANALYSIS AND EVALUATION OF MITOCHONDRIAL MIRNA'S IN NEUROFIBROMATOSIS TYPE 1 TUMOR TISSUE SPECIMENS

Şeyma Özgür

TOBB University of Economics and Technology
Institute of Health Sciences
Department of Molecular Medicine
Master of Science (MSc) Program

Supervisor: Assist. Prof. Parisa Sharafi

Date: December 2021

Neurofibromatosis type 1 (NF1, von Recklinghausen), is an autosomal dominant disease with 1/2500 incidence and occurs symptoms such as café au laits spots, axillary and inguinal freckling, benign tumors with different sizes which are called neurofibroma, and malignant peripheral nerve sheath tumors (MPNST). In addition, tumor development may happen in the spinal cord, cranial nerves, and brain, also bone deformities such as scoliosis. There is no correlation between mutations in NF1 patients and disease phenotype. It shows quite a variety of clinical manifestations. It is also known that the same mutation in the same family has different clinical manifestations. One of the views about these clinical variations is the existence of modifier factors in the NF1 gene. MicroRNAs (miRNAs) are one of these modifier factors. Also, studies in recent years show that changes in mitochondrial function may play a role as modifier factors to NF1 patients' different phenotypes.

Mitochondria are important organelles due to their unique signaling pathways and being the energy production center of the cell. In recent years, studies with mitochondria have increased greatly.

Mitochondria are known to originate from a bacterium that was taken into the cell by an ancestral anaerobic eukaryotic cell. Mitochondrial physiological processes and possible involvement of bacteria are reviewed with comparative analyses.

One of the small non-coding RNA, miRNAs are functioning as post-transcriptional regulators of gene expression. It has been shown that mitochondrial miRNAs (mitomiRs) modulate the mitochondrial genome's translational activation, and regulate mitochondrial protein expression and function. Although mitochondria have been confirmed to be vital for the development, the role of mitomiRs in the crucial biological processes including energy metabolism, oxidative stress, inflammation, and apoptosis has been understood recently.

This thesis study aimed to compare the selected 11 mitomiR's isolated from fresh frozen tissues obtained from 11 NF1 patients (1 CALM as a control tissue, 5 cutaneous and 5 plexiform neurofibroma tumor tissues). The expression of these selected mitomiR's were evaluated by quantitative PCR (qRT-PCR) analysis. Even though the results showed an increase in the expression of some mitomiRs based on tumor tissue samples, no significant difference has been detected between cutaneous and plexiform neurofibromas. Regarding the small number of mitomiRs in our study, we concluded that a more elaborated research is required for future studies.

Keywords: Neurofibromatosis type I, Mitochondrion, Mitochondrial micro RNA.

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim ve tez çalışmam boyunca değerli yardım ve katkılarıyla beni yönlendiren, bilimsel birikimini ve maddi manevi hiçbir yardımı esirgemeyen, kendisiyle çalışmanın büyük keyif verdiği ve çalışmaktan onur duyduğum danışmanım sayın Dr. Öğr. Üyesi Parisa SHARAFI'ye,

Yüksek lisans tezimi oluşturan projemizin diğer yürütücüsü sayın Prof. Dr. Fatih BÜYÜKSERİN'E,

Yardımlarını esirgemeyerek immüfloresan boyama yöntemini öğrenmemi sağlayan ve floresan mikroskopi deneyimiyle tezime yapmış olduğu katkılardan dolayı sayın Dr. Öğretim Üyesi Elham BAHADOR ZIRH'a,

Bilgi ve deneyimini esirgemeyerek tezimin istatistiksel analizlerini yapmamı sağlayan sayın Dr. Öğr. Üyesi Mesut AKYOL'a,

Tezimde yardımlarını esirgemeyen sayın Prof. Dr. Şükriye AYTER'e,

TOBB Ekonomi ve Teknoloji Sağlık Eğitimi Uygulama ve Araştırma Merkezi Hastanesi PCR Laboratuvarı'nda değerli bilgi ve birikimleriyle deneyim kazanmamı sağlayan sayın Prof. Dr. Jülide Sedef GÖÇMEN, sayın Dr. Öğr. Üyesi Nazife Yasemin AKIŞIN ARDIÇOĞLU ve laboratuvar personeline,

Bilgi ve birikimlerini esirgemeyerek yüksek lisans eğitimime yapmış oldukları katkılardan TOBB ETÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü öğretim üyelerine,

Her türlü konuda yardımcı olan TOBB ETÜ Tıp Fakültesi Morfoloji Laboratuvarları personeline,

“Nörofibromatozis Tip 1 Tümör Doku Örneklerinde Mitokondriyel miRNA Verilerinin Analizi ve Değerlendirilmesi” adlı Disiplinlerarası Araştırma Fonu 2021/001 numaralı projemizi finanse eden TOBB Ekonomi ve Teknoloji Üniversitesi Teknoloji Transfer Ofisi'ne ve projemiz konusunda her zaman yardımcı olan sayın Doğan TERZİ'ye,

Bu süreçte maddi manevi hiçbir yardımı esirgemeyen, destekleriyle bana güç veren ve sabırla yanımda olan sevgili aileme ve arkadaşlarıma,

En içten duygularıyla teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET.....	iv
ABSTRACT.....	vi
TEŞEKKÜR.....	viii
İÇİNDEKİLER.....	ix
ŞEKİL LİSTESİ.....	xi
ÇİZELGE LİSTESİ.....	xii
KISALTMALAR.....	xiii
RESİM LİSTESİ.....	xv
1. GİRİŞ.....	1
1.1 Çalışmanın Amacı.....	3
1.2 Nörofibromatozis Tip 1 Nedir?.....	3
1.2.1 Kütanöz nörofibromlar.....	5
1.2.2 Pleksiform nörofibromlar.....	6
1.2.3 Nörofibromatozis tip 1'in klinik özellikleri ve tanı kriterleri.....	7
1.2.4 <i>NF1</i> geni ve nörofibromin.....	9
1.2.5 Nörofibromatozis tip 1 tedavisi.....	10
1.3 Nörofibromatozis tip 1'de Modifiye Edici Genlerin Rolü.....	11
1.3.1 Mitokondri.....	11
1.3.2 MikroRNA'lar.....	13
1.3.2.1 miRNA biyogenezi.....	14
1.3.2.2 miRNA'ların mRNA translasyonu hedef alması.....	15
1.3.3 Mitokondriyel miRNA'lar.....	17
2.GEREÇ VE YÖNTEMLER.....	27
2.1 Çalışmada Kullanılan Gereçler, Kimyasallar ve Çözeltiler.....	27
2.1.1 Doku kesiti malzemeleri.....	27
2.1.2 İmmünfloresan boyama malzemeleri.....	27
2.1.3 Mitokondri izolasyonu.....	28
2.1.3.1 Mitokondri izolasyonunu doğrulamak için yapılan PZR.....	28
2.1.4 Mitokondriyel miRNA izolasyonu ve konsantrasyon ölçümü.....	28
2.1.5 Komplementer DNA sentezi.....	28
2.1.6 Kantitatif gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu.....	28
2.1.7 DNA agaroz jel elektroforez malzemeleri.....	29
2.2 Yöntemler.....	29
2.2.1 Bireylerin klinik özellikleri NF1 tümör dokularının elde edilmesi, alımı ve dondurulması.....	29
2.2.2 Taze dondurulmuş doku kesiti.....	31
2.2.3 İmmünfloresan boyama.....	31
2.2.4 Sıvı azotta doku parçalanması.....	32
2.2.5 Mitokondri izolasyonu.....	32
2.2.5.1 Mitokondri tRNA ^{Leu (UUR)} primer PZR.....	33
2.2.6 Mitokondriyel miRNA izolasyonu.....	34

2.2.7 Komplementer DNA sentezi	35
2.2.8 Kantitatif gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu	35
2.2.9 Agaroz jel elektroforezi	36
2.2.10 İstatistiksel analizler	36
3. BULGULAR	37
3.1 Tümör Dokularında Schwann Hücrelerinin Varlığı ve Yerleşiminin Gösterilmesi.....	37
3.2 Mitokondri İzolasyonu ve Doğrulanması.....	38
3.3 Tümör Dokularındaki Mitokondrilerde Seçilen miRNA'ların Gen İfadesinin Nicel Analizi.....	39
4. TARTIŞMA	55
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	63
KAYNAKLAR	65
EKLER	71



ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

Şekil 3.1: tRNA ^{leu(UUR)} primerleri ile gerçekleştirilmiş gerçek zamanlı PZR görüntüsü.....	39
Şekil 3.2: cDNA miktarı için optimizasyon çalışmasına ait kRT-PZR.....	40
Şekil 3.3: U6 primeri erime eğrileri ve amplifikasyon eğrileri.....	41
Şekil 3.4: cNF-1 için U6 primeri ve seçilen mitomiR'lerin erime ve amplifikasyon eğrileri.....	42
Şekil 3.5: miR-217 primeri erime eğrileri ve amplifikasyon eğrileri.....	42
Şekil 3.6: miR-107 erime eğrileri ve amplifikasyon eğrileri.....	43
Şekil 3.7: miR-122-5p erime eğrileri ve amplifikasyon eğrileri.....	43
Şekil 3.8: miR-34a-5p erime eğrileri ve amplifikasyon eğrileri.....	44
Şekil 3.9: miR-3934-5p erime eğrileri ve amplifikasyon eğrileri.....	44
Şekil 3.10: miR-484 erime eğrileri ve amplifikasyon eğrileri.....	45
Şekil 3.11: miR-29a-3p erime eğrileri ve amplifikasyon eğrileri.....	45
Şekil 3.12: miR-1290 erime eğrileri ve amplifikasyon eğrileri.....	46
Şekil 3.13: miR-22-3p erime eğrileri ve amplifikasyon eğrileri.....	46
Şekil 3.14: miR-21-5p erime eğrileri ve amplifikasyon eğrileri.....	47
Şekil 3.15: miR-133a-3p erime eğrileri ve amplifikasyon eğrileri.....	47
Şekil 3.16: Kontrol dokuya ait seçilen mitomiR'lerin %2.5 agaroz jel elektroforez görüntüleri.....	48
Şekil 3.17: Tümör doku örneklerinin seçilen mitomiR'lerde $2^{-\Delta\Delta Ct}$ değerleri (LN dönüşümü sonrasında)	51
Şekil 3.18: kRT-PZR analizine göre mitomiR'lerin NF1 tümör dokularında analizi.....	51
Şekil 3.19: kRT-PZR analizine göre miR-34a-5p'nin NF1 tümör dokularında analizi.....	52
Şekil 3.20: NF1 tümör doku örneklerinde miR-21-5p, miR-22-3p, miR-29a-3p, miR-34a-5p, miR-107, miR-133a-3p, miR-484 ve miR-1290 için ortalama değeri.....	53
Şekil 3.21: kRT-PZR analizine göre miR-122-5p'nin NF1 tümör dokularında analizi.....	53
Şekil 3.22: kRT-PZR analizine göre miR-217'nin NF1 tümör dokularında analizi.....	54
Şekil 3.23: kRT-PZR analizine göre miR-3934-5p'nin NF1 tümör dokularında analizi.....	54

ÇİZELGE LİSTESİ

Sayfa

Çizelge 1.1: Nörofibromatozlar.....	4
Çizelge 1.2: NF1 tanı kriterleri.....	9
Çizelge 1.3: Araştırılmak üzere seçilen miRNA'lar.....	25
Çizelge 2.1: Hastaların klinik özellikleri.....	30
Çizelge 3.1: İzole edilen mitomiR'lerin konsantrasyonları ve saflık değerleri.....	40
Çizelge 3.2: Tümör doku örneklerinin seçilen miRNA'larda $2^{-\Delta\Delta Ct}$ değerleri.....	49
Çizelge 3.3: NF1 Tümör doku türlerinde miRNA ortanca değerleri (Min-Maks ile birlikte).....	50

KISALTMALAR

AGO	: Argonaute proteini
ALL	: Akut lenfoblastik lösemi
AML	: Akut miyeloid lösemi
Apaf-1	: Apoptotik proteaz aktive edici faktör
BSA	: Sığır serum albumini
CALM	: Café-au-lait lekeleri
cDNA	: Komplementer DNA
CIN	: Servikal intraepitelyal neoplazi
cNF	: Kutanöz nörofibrom
DAPI	: 4',6-diamidino-2-fenilindol
DGCR8	: DiGeorge Sendromu kritik bölge 8
DNMT3A	: DNA metil transferaz 3A
dsRNA	: Çift zincirli RNA
ETZ	: Elektron taşıma zinciri
FDA	: ABD gıda ve ilaç dairesi
Fis1	: Mitokondriyel fisyon 1
FISH	: Floresan <i>in situ</i> hibridizasyon
GAP	: GTPaz aktive edici protein
HPV	: İnsan papilloma viürüsü
JML	: Juvenil miyelomonositik lösemi
kRT-PZR	: Kantitatif gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu
LIG3	: DNA ligaz 3
LOH	: Heterozigotluk kaybı
MACS	: Manyetik hücre ayırma
miRNA	: mikroRNA
mitomiR	: mitokondriyel miRNA
MSS	: Merkezi sinir sistemi
MOMP	: mitokondriyel dış zar geçiçliği
MPNST	: Malign periferik sinir kılıfı tümörü
mPTP	: Mitokondriyel permeabilite geçiş gözeneği
mRNA	: Mesajcı RNA
mtDNA	: Mitokondriyel DNA
mtSNP	: Mitokondriyel tek nükleotid polimorfizmi
NIH	: Ulusal Sağlık Enstitüleri
NF1	: Nörofibromatozis tip 1
NF2	: Nörofibromatozis tip 2
PAP-PEN	: Dakocytomation Pen
PBS	: Phosphate-Buffered Saline
PDAC	: Pankreatik duktal adenokarsinom
PI3K	: Fosfoinositid 3 kinaz
pNF	: Pleksiform nörofibrom
pre-miRNA	: primer-miRNA

pri-miRNA	: prekürsör-miRNA
RISC	: RNA ile uyarılan susturma kompleksi
RNAi	: RNA interferansı
ROS	: Reaktif oksijen türleri
rRNA	: Ribozomal RNA
shRNA	: Kısa saç tokası RNA
SLE	: Sistemik lupus eritematoz
snoRNA	: Küçük çekirdekçik RNA
snRNA	: Küçük çekirdek RNA
TERT	: Telomeraz ters transkriptaz
tRNA	: Transfer RNA
UTR	: Translasyona uğramayan bölge



RESİM LİSTESİ

Sayfa

Resim 3.1: Kutanöz nörofibrom tümör doku örneğinin insan Schwann hücrelerinin immünfloresan boyaması.....	37
Resim 3.2: Pleksiform nörofibrom tümör doku örneğinin insan Schwann hücrelerinin immünfloresan boyaması.....	38



1. GİRİŞ

Nörofibromatozis tip 1 (NF1, von Recklinghausen, *OMIM#162200*), insan sinir sistemiyle beraber çoklu organ sistemlerini etkileyen en sık gözlenen tek gen hastalığıdır (Sharafi ve Ayter, 2018). NF1 hastalığı, iskelet (skolyoz) ve kardiyovasküler sistem bozuklukları (hipertansiyon), deride pigmentasyon bozuklukları (Café au lait lekeleri-CALM, koltuk altı ve kasık bölgelerinde çillenme), sinir sisteminde tümörleşmeye yatkınlık, Lisch nodülü gibi çeşitli klinik özelliklere sahip, görülme sıklığı 1/2500 olan (Wilson ve diğ., 2021), otozomal dominant bir hastalıktır (Le ve Parada, 2007; Gutmann ve diğ., 2017). Bununla birlikte NF1, merkezi sinir sisteminde (MSS) optik gliom, periferik sinir sisteminde nörofibrom ve malign periferik sinir kılıf tümörü (MPNST), ayrıca astrositom ve lösemi gibi farklı tümör ve kanserlere sebep olmaktadır (Le ve Parada, 2007; Brems ve diğ., 2009). NF1 hastalarının spinal kanal ve beyin tümörlerini geliştirme riskleri normal toplumdan 40 kat daha fazlayken optik gliom geliştirme riski 1000 kat fazladır. Ayrıca akut lenfoblastik lösemi (ALL) riski 5, yumuşak doku sarkomlarını geliştirme riski 50 kat, juvenil miyelomonositik lösemi (JML) riski ise 200 kat daha fazladır (Cichowski ve Jacks, 2001).

NF1 hastalığı, *NF1* geninde oluşan mutasyonlar sonucunda meydana gelir. Bu mutasyonların *NF1* gen ürünü olan nörofibromin proteininin sentezini etkilemesiyle NF1 hastalığı ortaya çıkar (Le ve Parada, 2007; Brems ve diğ., 2009). Nörofibromin, en fazla sinir sisteminde bulunmaktadır. Aynı zaman yetişkin bireylerde nöronlarda, oligodendrositlerde ve Schwann hücrelerinin yanı sıra keratinositler, adrenal medulla ve beyaz kan hücrelerinde bulunmuştur (Gottfried ve diğ., 2006). Ayrıca, nörofibromin bir tümör baskılayıcı olarak RAS sinyal yolağını negatif regüle eder (Masliah-Planchon ve diğ., 2013).

NF1, tam penetrasyon gösteren basit bir Mendel bozukluğudur ancak oldukça değişken bir ekspresyon göstermektedir. NF1 hastalarının kliniği hastalar arasında, hatta aynı mutasyonu gösteren aile bireyleri arasında bile farklı olabilmektedir.

Bu konu ile ilgili çok sayıda çalışma mevcut olup görüşlerden birisi de, kişilerin epigenetik farklılıklarının *NF1* geni üzerine modifiye edici faktör olarak etkili olabilmesi, dolayısıyla *NF1* gen ifade düzeyindeki değişiklikler olarak düşünülmektedir. *NF1* ile ilgili literatürde birçok aday modifiye edici gen bulunmaktadır (Ratner ve Miller, 2015; Sharafi ve Ayter, 2018). Bu aday modifiye edici genlerden biri mikroRNA'lardır (miRNA) (Ratner ve Miller, 2015).

miRNA'lar hastalıklarda potansiyel birer biyobelirteç görevi görmektedirler. Ancak mitokondriyel fonksiyon bozukluklarındaki durumlarına dair araştırmalar diğer hastalık ve işlev bozukluklarına göre nispeten azdır (Sekar ve diğ., 2020). miRNA'lar tümör gelişimi ve progresyonunda, gen ifadesinin düzenlenmesinde kritik bir role sahiptirler (Masliah-Planchon ve diğ., 2013).

Son yıllarda sayıları hızla artan mitokondri üzerine çalışmalarda, hücrenin enerji üretim merkezi olan ve kendilerine özgü sinyal yollarına sahip olan mitokondrilerin kanser başta olmak üzere birçok hastalık patofizyolojisinde önemli oyuncular olarak görev aldıkları gösterilmiştir (Pagliarini ve Rutter, 2013; Wallace, 2018).

Bu yeni gelişmeler mitokondriler hakkındaki mevcut bilgilerimizi yeniden gözden geçirme ihtiyacını ortaya çıkarmıştır. Mitokondrilerin ilk hücre içerisine alınmasının, atasal bir anaerobik ökaryotik hücre tarafından hücre içine alınan bir bakteri yoluyla oluştuğu bilinmektedir. Ökaryotik hücre ve bakteri arasında yapılan karşılaştırmalı analizlerde, mitokondriyel fizyolojik süreçler ve bakterilerin bu süreçlerdeki olası katılımı gözden geçirilmiştir. Tüm bu karşılaştırmalar, günümüzde "ikinci beyin" olarak adlandırılacak kadar önemli olan "mikrobiyota"nın patofizyolojideki rolü ile birleştiğinde "mitobiyota" terimini gündeme getirmiştir. Mitobiyota; mitokondriyel genomda ortaya çıkan değişikliklerin, mitokondrilerin fenotipine ve dolayısıyla organizmalardaki patofizyolojiye olan yansımaya verilen addır. "Bakteri eşittir mitokondri" tanımı kabul edildiğinde, bakteriyel ve mitokondriyel kanser teorileri arasında da eşitlik bulunabileceği hipotezi "bakteriyel enfeksiyon" yerine "mitokondriyel enfeksiyon"dan bahsetmek gerektiğini önermektedir. Eğer bu hipotez doğru ise son günlerde yoğun biçimde bahsedildiği gibi mitobiyota homeostazisi, mikrobiyota homeostazisi kadar fizyolojik öneme sahiptir (Zorov ve diğ., 2013). Mitokondrinin gelişim için gerekli olduğu doğrulanmış olsa da mitokondriyel miRNA'ların (mitomiR'ler) enerji metabolizması, oksidatif stres, inflamasyon ve apoptoz dahil önemli biyolojik süreçlerin düzenlenmesindeki rolleri daha yeni yeni anlaşılmaya başlanmıştır.

Son zamanlarda, mitobiyota homeostazisinde miRNA'ların rolü üzerinde durulmaktadır ve mitomiR'lerin, mitokondriyel genomun translasyonel aktivitesini modüle ettiği ve mitokondriyel protein ekspresyonunu ve fonksiyonunu düzenlediği gösterilmiştir (Song ve diğ., 2019).

1.1 Çalışmanın Amacı

miRNA'ların çekirdekte transkribe edildiği ve sitoplazmaya taşındığı iyi bilinmektedir (Wang ve Springer, 2015). Ancak artan kanıtlar miRNA'ların aynı zamanda mitokondri, endoplazmik retikulum, P cisimcikleri, stres granülleri, multiveziküler cisimcikler, ekzozomlar gibi sitoplazmik bölgelerde bulunduğunu veya ilişkili olduğunu göstermektedir. miRNA aracılı gen düzenlenmesi farklı hücresel kompartmanlarca kontrol edilebilir veya miRNA-organel arasındaki iletişim spesifik hücresel ihtiyaçlara daha seçici tepkiler verebilir. Çeşitli çalışmalar MSS dahil olmak üzere çeşitli doku ve hücre türlerinden izole edilen mitokondrilerde miRNA'ların var olduğunu göstermiştir. MitomiR'lerin çoğunluğunun nükleer kodlu olduğu bilinirken, birkaçının mitokondriyel genomdan kodlandığı tahmin edilmektedir (Wang ve Springer, 2015).

Daha önce birkaç araştırma grubu tarafından NF1 ilişkili malignansilerde miRNA'ların rolü araştırılmıştır (Sedani ve diğ., 2012). miR-155, miR-204, miR-21, miR-29c gibi bazı miRNA'lar NF1 tümörogenezinde belirlenmiştir (Sharafi ve Ayter, 2018; Na ve diğ., 2021). Ayrıca miR-107, miR-214, miR-10b ve miR-34a'nın da rolü bildirilmiştir (Sharafi ve Ayter, 2018). Bununla birlikte literatüre göre daha önce NF1'de mitomiR'lerle ilgili yapılmış bir çalışma bulunmamaktadır. NF1 hastalığının klinik değişkenliği, mitokondrilerin hücredeki önemi, hastalıklardaki rolü, miRNA'ların ise düzenleyici rolleri göz önüne alındığında mitomiR'lerin araştırılması önemli görünmektedir. Dolayısıyla bu yüksek lisans tezinde farklı NF1 tümörlerinde mitomiR'lerin ifadesinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

1.2 Nörofibromatozis Tip 1 Nedir?

NF1 hastalığı, *NF1* (OMIM# 613113; kromozom 17q11.2) geninin kalıtsal otozomal dominant ya da *de novo* mutasyonlarla fonksiyonunu kaybetmesiyle meydana gelmektedir (Wegscheid ve diğ., 2018).

Nörofibromini kodlayan *NF1* geni 1990 yılında tanımlanmıştır (Gutmann ve diğ., 2017). Etnik farklılıklar hastalık penetransında ve ekspresivitede farklılıklar oluşturabilir (Wilson ve diğ., 2021).

NF1 hastalığı; nörofibromatozlar olarak adlandırılan NF1, nörofibromatozis tip 2 (NF2) ve schwannomatozu içeren bir grup nörojenetik bozukluktan biridir. Bu nörojenetik bozukluklar hem genetik hem de klinik anlamda birbirinden farklıdır ve hepsi otozomal dominant kalıtsal birer bozukluktur (Gutmann ve diğ., 2017; Cimino ve Gutmann, 2018). Bununla birlikte bu bozuklukların tamamının klinik fenotiplerinde periferik sinir kılıfı tümörleri ortaktır. Aynı zamanda NF1 bu üç durumdan en yaygın olanıdır. NF1 otozomal dominant bir sendrom olmasına rağmen vakaların yarısında *NF1* geninde *de novo* mutasyonlar meydana gelmektedir ve bu bireylerin ailesel öykülerinde NF1 geçmişi bulunmamaktadır (Cimino ve Gutmann, 2018). Çizelge 1.1’de nörofibromatozlar gruplandırılmıştır (Cimino ve Gutmann, 2018).

Çizelge 1.1: Nörofibromatozlar (Cimino ve Gutmann, 2018).

Hastalık	Gen	Neoplastik olmayan klinik fenotip	Kanser fenotipi
Nörofibromatozis Tip 1	<i>NF1</i>	Öğrenme, davranışsal ve dikkat eksiklikleri	Optik gliom
		Uzun kemik displazisi	Beyin sapı gliomu
		Pigment abnormaliteleri (CALMs, çillenme, Lisch nodülleri)	Kütanöz nörofibromlar
Nörofibromatozis Tip 2	<i>NF2</i>	Juvenil katarakt	Vestibüler schwannoma
		Retinal hamartomlar, epiretinal membranlar	Periferik ve kranial schwannoma
		Büyük CALM’lar (ancak NF1’den az)	Menenjiom
Schwannomatoz	<i>LZTR1</i>	-	Spinal tümör glioma
	<i>SMARCB1</i>		Schwannomatozlar

Tarihsel olarak bakıldığında 1300'lere hatta belki de Helen zamanlarına dayanan, NF1 belirtileri olan bireylerin belgelenmiş tanımları ve tasvirleri bulunmaktadır. Ancak NF1 ilk olarak 1881'de Friedrich von Recklinghausen tarafından tanınmış ve hastalığa “nörofibroma” adını vermiştir (Cimino ve Gutmann, 2018; Wilson ve diğ., 2021). Yirminci yüzyılın sonunda bu bozukluk NF1 ve NF2 olmak üzere iki sınıfa ayrılmıştır (Wilson ve diğ., 2021). İlk yayınlanan monograflar bu hastalığın kalıtsal doğasını vurgularken, 1988'de Ulusal Sağlık Enstitüleri (NIH) Konsensus Geliştirme Konferansı (Consensus Development Conference) kullanımında olan NF1 tanı kriterlerini bir araya getirmiştir (Cimino ve Gutmann, 2018; Wilson ve diğ., 2021).

NF1'in tanımlayıcı özelliği nörofibromlardır. Nörofibromlar periferel sinir sisteminde gelişen iyi huylu sinir kılıfı tümörleridir. Nörofibromların çeşitli klinik görünimleri bulunmaktadır. Ayrıca nörofibromlar farklı bireylerde önceden tahmin edilemeyen farklı sayılarda ve büyüklüklerde bulunabilir. Kütanöz (cNF) ve pleksiform (pNF) nörofibromlar olmak üzere iki ana alt tipe ayrılmaktadırlar (Jiang ve diğ., 2021). En yaygın NF1 ilişkili tümörler cNF ya da pNF olabilen benign tümörlerdir (Pasmant ve diğ., 2011). Nörofibromlar, spinal, periferel ya da kranyal sinirlerle yakından ilişkili bir sinir kılıfı tümürüdür (Gutmann ve diğ., 2017). Etkilenen bireylerde farklı klinik semptomlar gözlemlenebilmektedir. Klinik belirtiler pigment bozuklukları (CALM'lar, deri kıvrımları-skinfold freckling, Lisch nodülleri), periferel (nörofibromlar, MPNST'ler) ve merkezi (optik gliomlar ve beyin sapı gliomları) sinir sistemi tümörleri, kemik abnormaliteleri, vaskülopati ve diğer kanserleri içeren belirtilerdir. Bunlara ek olarak NF1'li çocukların %80'inden fazlasında öğrenme güçlükleri, sosyal algı bozuklukları (otizm spektrum bozukluğu) veya dikkat eksikliği bulunmaktadır (Wegscheid ve diğ., 2018).

Nörofibromlar neoplastik Schwann hücreleri, nöronlar, fibroblastlar, immün hücreler ve endotelial hücrelerle birlikte kollajen, fibronektin, laminin ve hyolüronik asit gibi ekstraselüler matriks bileşenlerini içeren heterojen tümörlerdir (Jiang ve diğ., 2021).

Nörofibromları oluşturan en büyük faktör NF1+/- hücrelerin heterozigotluk kaybına (loss of heterozygosity-LOH) uğramasıdır. LOH'a uğrayan NF1+/- hücreler NF1-/- hücrelere dönüşmektedirler (Le ve Parada, 2007; Bottillo ve diğ., 2009). Schwann hücreleri nörofibromların neoplastik hücreleri olarak kabul edilmektedir. pNF'lerin, nöral krest hücrelerinden gelişen Schwann hücrelerinden, cNF'lerin ise "Skin-Derived Precursor" hücrelerinden köken aldığı hayvan modelleriyle yapılan çalışmalarla gösterilmiştir (Brossier , ve Carroll, 2012).

1.2.1 Kütanöz nörofibromlar

cNF'ler dermal sinir dalları boyunca gelişen ve bu nedenle vücudun hemen hemen her bölgesinde ciddi şekilde rahatsızlık ve/veya şekil bozukluğu oluşturan çok sayıda yumuşak nodüllerdir. cNF'ler NF1 hastalarının çoğunda gelişmektedir ve NF1 hastalığının en yaygın özelliklerinden biridir. cNF'ler tipik olarak erken adölesan dönemde başlamakta, sayıları ve büyüklükleri farklı bireylerde değişiklik göstermektedir. cNF'ler büyümediklerinden malign dönüşüme uğramazlar.

Ancak, NF1 hastalığına sahip hamile kadınlar sıklıkla yeni cNF'ler geliştirmektedirler ve bu durum cNF'lerin östrojen hormonları tarafından düzenlendiğini düşündürmektedir (Jiang ve diğ., 2021).

1.2.2 Pleksiform nörofibromlar

pNF'ler, cNF'lerden farklı klinik özellikler göstermektedir. pNF'ler doğumda çeşitli sinir pleksuslarında gelişirler ve yaşla birlikte büyürler (Jiang ve diğ., 2021). Genellikle konjenitaldir ya da NF1 hastalarının %30-50'sinde erken çocukluk döneminde görülmektedir. pNF'lerin sayısı ve büyüklüğü aynı aile içerisinde bile hastadan hastaya farklılık göstermektedir (Pasmant ve diğ., 2011). Bazı pNF tümörler küçüktür ve sadece klinik görüntüleme ile belirlenebilirler ancak bazıları büyüyerek kilolarca ağırlıkta olan tümörlere dönüşebilmektedir. Bu tür pNF'ler buldukları çevreyi sıkıştırarak fazla miktarda ağrı oluşumuna, nörolojik fonksiyon bozukluğuna ve kemik deformasyonuna neden olabilmektedir (Jiang ve diğ., 2021).

pNF'ler hücresel düzeyde heterojen, esas olarak nörofibromların patojenik hücre tipi olan Schwann hücrelerinden, fibroblastlardan, mast hücrelerinden, nöronlardan, vasküler elemanlar ve perinöral hücrelerden oluşan tümörlerdir. pNF'ler iyi huylu tümörlerdir ancak iç organlara yakın olmaları nedeniyle yaşamsal tehdit oluşturabilir ve yaşam kalitesini düşürebilirler (Pasmant ve diğ., 2011). Ayrıca pNF'lerin yaşam boyunca malign transformasyona uğrayıp MPNST'ye dönüşme riski %8-13 arasındadır (Jiang ve diğ., 2021). İnternal pNF'ler ile MPNST'ler arasında oldukça güçlü bir ilişki bulunmaktadır ve internal pNF'e sahip hastaların, olmayan hastalara göre MPNST geliştirme ihtimalleri 20 kat daha fazladır (Pasmant ve diğ., 2011). MPNST'ler tedavi edilmesi en zor sarkom maligniteleri arasında yer almaktadır ve NF1 hastaları arasında önde gelen ölüm sebebidir (Jiang ve diğ., 2021).

MPNST'ler yüksek oranda metastatiktir ve genellikle prognozu kötüdür (Pasmant ve diğ., 2011). Knudson'nun iki vuruş hipotezine göre tümörögenез oluşabilmesi için *NF1* geninin kalan fonksiyonel kopyasında oluşan bir somatik mutasyonun genin işlevselliğini bozması gerekmektedir (Pasmant ve diğ., 2011; Masliah-Planchon ve diğ., 2013). pNF'ler ve MPNST'lerden izole edilen Schwann hücrelerinde *NF1* geninde LOH bulunmaktadır (Pasmant ve diğ., 2011). *NF1* geninin iki kopyasının da mutasyonlarla inaktif hale gelmesi RAS sinyal yolağının indüklenmesine neden olmaktadır ve tümörögenез için gerekli görünmektedir ancak tümörögenез için yeterli değildir (Masliah-Planchon ve diğ., 2013).

pNF'lerde, *CDKN2A/B* lokus delesyonları dahil olmak üzere ek mutasyonlar bildirilmiştir. MPNST'lerde ise *TP53*, *RBI*, *CDKN2A*, *TWIST1*, *BIRC5*, *TOP2A* ve *SOX9* gibi Schwann hücre farklılaşmasında yer alan genlerde farklı ekspresyon profili olduğu bildirilmiştir (Masliah-Planchon ve diğ., 2013).

1.2.3 Nörofibromatozis tip 1'in klinik özellikleri ve tanı kriterleri

NF1 otozomal dominant bir hastalıktır ve eşey germ hücrelerinde (germline) oluşan NF1 mutasyonuna sahip tüm insanlar bu hastalığa sahiptir. Ancak, aynı mutasyona sahip ailelerdeki bireyler de dahil olmak üzere hastalar farklı klinik özellikler gösterebilmektedir. NF1'in yanı sıra bazı kişiler segmental ya da mozaik NF1 olarak adlandırılan sendroma sahiptir ve vücutlarının sadece bir kısmında hastalığın belirtilerini gösterebilmektedir. Segmental ya da mozaik NF1 muhtemelen fetal gelişim sırasındaki bir somatik NF1 mutasyonundan kaynaklanmaktadır. Hem NF1 hem de mozaik NF1'de *NF1* geninin mutasyona uğrayan alellinde nörofibrominin kaybıyla sonuçlanmaktadır (Gutmann ve diğ., 2017).

NF1 hastaları geniş bir spektrumda çeşitli klinik özellikler göstermektedirler. Ancak bu özellikler 3 ana kategori altında toplanabilir (Jiang ve diğ., 2021):

- i. Malign olmayan klinik özellikler cNF ve pNF'ler, optik gliom ve beyin sapı gliomları, pigment abnormaliteleri, kemik deformiteleri, kardiyovasküler abnormaliteler ve öğrenme eksikliklerini kapsamaktadır.
- ii. Sinir sisteminin malign tümörleri glioblastomlar ve MPNST içermektedir.
- iii. Sinir sistemi ile ilgili olmayan malign tümörler meme kanseri, lösemi, lenfoma, gastrointestinal stromal tümörler, feokromasitoma ve rabdomyosarkomdur.

Tüm bu klinik özelliklerin yanı sıra nörofibromlar NF1 hastalığı için ayırt edicidir (Jiang ve diğ., 2021). NF1 için henüz bir genotip-fenotip korelasyonu bulunmasa bile bazı istisnalar bulunmaktadır:

- i. Tüm *NF1* geninde 1,4 Mb delesyona sahip bireyler tipik olarak yüz dismorfizmi, zihinsel yeteneklerde azalma ve kanser insidansında artış göstermektedirler (Gutmann ve diğ., 2017).
- ii. NF1 hastalarının yaklaşık %1'inde kodon 1809 etkilenmektedir ve bu hastalar tipik olarak CALM'lara, kısa boya ve pulmoner stenoza sahiplerdir ancak dışarıdan görülebilen pleksiform veya dermal nörofibromları bulunmamaktadır (Gutmann ve diğ., 2017).

- iii. 17. ekzonda 3 bp çerçeve delesyonuna (c0.2970-2972 delAAT) sahip hastalar hafif bir fenotip gösterirler ve cNF'leri veya klinik olarak belirlenebilen pNF'leri bulunmamaktadır (Sharafi ve Ayter, 2018).
- iv. *NF1* geninin 844-848 kodon bölgesinde meydana gelen yanlış anlamlı mutasyonlar NF1 hastalarında daha şiddetli bir fenotiple ilişkilidir (Sharafi ve Ayter, 2018).
- v. "Splicing" bölgesi germline mutasyonları MPNST ve santral sinir sistemi gliomları geliştirme eğiliminde artışla ilişkilidir (Wilson ve diğ., 2021).
- vi. Ekzon 28 çerçevesinde duplikasyon (in-frame duplication), 80 kb delesyon mutasyonları, Watson sendromu olarak da bilinen çoklu CALM'lar, pulmonik stenoz ve mental retardasyon ile ilişkilidir ancak Lisch nodülleri ve nörofibrom geliştirme sıklığı düşüktür (Wilson ve diğ., 2021).
- vii. Kromozom 15'teki *SPRED1* mutasyonları Leguis sendromu olarak da bilinmektedir, CALM varlığı ve çillenme vardır fakat periferik sinir tümörleri veya göz ile ilgili bulgular yoktur. Makrosefali ve lipomlar daha yaygındır (Wilson ve diğ., 2021).

NF1 kliniğinin altında yatan mekanizmalar değişebilmektedir. Bazı belirtiler *NF1* haployetmezliğinden (haploinsufficiency) kaynaklanırken bazı semptomlar biallelik *NF1* geni inaktivasyonu ya da hormonlar veya diğer genetik değişiklikler gibi modifiye edici faktörlerin eklenmesini gerektirebilir. Örneğin CALM'ların ve nörofibromların gelişimi için biallelik *NF1* geni inaktivasyonu gerekirken, MPNST gelişimi için *TP53* mutasyonu gereklidir (Gutmann ve diğ., 2017).

Çizelge 1.2'de NIH tarafından belirlenmiş NF1 hastalığının tanı kriterleri verilmiştir. Çizelgedeki kriterlerden en az iki tanesine sahip olmak NF1 tanısı almak için yeterlidir (Cimino ve Gutmann, 2018).

Ancak, çizelge 1.2'deki kriterlerin yanı sıra NF1 genindeki mutasyonu gösteren mutasyon analizinin de tanı kriterlerine eklenmesi önerilmektedir (Wilson ve diğ., 2021).

Çizelge 1.2: NF1 tanı kriterleri (Cimino ve Gutmann, 2018).

NF1 teşhisi için aşağıdaki kriterlerden 2 veya daha fazlası gereklidir:

- 6 veya daha fazla CALM (ergenlikten önce >0,5 cm; ergenlikten sonra >1,5 cm)
- Aksiller veya inguinal çillenme
- 2 veya daha fazla Lisch nodülü
- Kemik deformiteleri
- Optik gliomlar
- Nörofibromlar (herhangi bir türde 2 veya daha fazla ya da 1 pNF)
- NF1 tanısı almış 1. derece akraba

1.2.4 *NF1* geni ve nörofibromin

NF1 geni 17q11.2 bölgesinde yer almakta ve RAS-GTPaz aktive edici (RAS-GAP) bir protein olan nörofibromini kodlamaktadır. Nörofibromin RAS sinyal yolağının negatif düzenleyicisidir. RAS sinyal yolağı, MAPK ve PI3K/AKT/mTOR kaskadları üzerinden hücre proliferasyonu, sağkalım ve farklılaşmayı düzenleyen yolaktır (Masliah-Planchon ve diğ., 2013).

Nörofibromin nöronlar, glial hücreler, immün hücreler, endotelial hücreler ve adrenal medullanın içindeki hücreler gibi birçok hücre tipinde ifade edilmektedir ancak farklı hücrelerdeki fonksiyonları muhtemelen farklıdır (Gutmann ve diğ., 2017).

NF1 geni 350 kb'lık DNA üzerine dağılmış 61 ekzondan oluşmaktadır. Başlangıçta *NF1* geni 57 ekzon olarak tanımlanmıştır ancak ilerleyen yıllarda geçici olarak 9a, 10a-2, 23a ve 48a olarak adlandırılan 4 tane alternatif "splicing" ekzonu keşfedilmiştir. Fakat bu numaralandırma sisteminin yol açtığı kafa karışıklığı ve tutarsızlıkların giderilmesi adına *NF1* geninin ekzonları buldukları yere göre tekrar isimlendirilmiştir. Dolayısıyla bu ekzonlar 11alt12 (önceden 9a), 12alt13 (önceden 10a-2), 30alt31 (önceden 23a) ve 56alt57 (önceden 48a) olarak isimlendirilmişlerdir (Anastasaki, ve diğ., 2017; Sharafi ve Ayter, 2018).

NF1 genindeki mutasyonların moleküler anlamda tanımlanması zor olmaktadır (Gutmann ve diğ., 2017). Bu durum genin büyüklüğü, mutasyona yatkın bölgelerin (hotspot) olmaması ve mutasyon çeşitliliğinden kaynaklanmaktadır (Gutmann ve diğ., 2017; Sharafi ve Ayter, 2018).

Ancak, Koczkowska ve arkadaşları (2018) tarafından *NF1* geninde meydana gelen bir yanlış anlamlı mutasyon için, mutasyona yatkın bir bölge göstermişlerdir. Bu yanlış anlamlı mutasyonlar akrabalığı olmayan probandların yaklaşık %0,8'ini etkilemektedir.

NF1 geninin büyük boyutu nedeniyle %85-90 nokta mutasyonu, %5-10 mikrolelesyonlar ve %2 ekzon duplikasyonları veya delesyonları olmak üzere çeşitli mutasyonlara eğilimlidir. 1485 tanımlanmış mutasyonun %80'i erken sonlanma kodonu oluşması veya "truncated" nörofibromin oluşumuyla sonuçlanmaktadır. Örneğin *NF1* geninin 5' ucunda meydana gelen mutasyon kümesi hasta bireyleri optik sinir gliomlarına yatkın hale getirebilmektedir (Wilson ve diğ., 2021).

Nörofibrominin 360 amino asitlik bir bölgesi memeli GTPaz aktive edici proteininin (GAP) katalitik bölgesiyle homoloji göstermektedir. Proteinin bu bölgesi NF1-GAP ilişkili "domain" olarak bilinmektedir ve *NF1* geninin merkezi kısmından kodlanmaktadır. GAP proteini, intrinsik GTPaz aktivitesini stimüle ederek Ras onkoproteininin aktivitesini azaltmaktadır. Bu nedenle nörofibromin Ras aracılı sinyal iletim mekanizmasının parçasıdır (Upadhyaya ve diğ., 2003; Sharafi ve Ayter, 2018).

1.2.5 Nörofibromatozis tip 1 tedavisi

NF1 belirtileri, belirtilerin şiddeti ve prognoz büyük ölçüde değişkenlik gösterse de bireylerin yaşamı boyunca kademeli olarak ilerlemektedir. Şu an için kesin bir tedavi bulunmamakla birlikte klinik yönetim hastaların gözlemlenmesi ve genellikle cerrahi yöntemler olmak üzere semptomatik tedavilerle sınırlıdır (Gutmann ve diğ., 2017).

Cerrahi yöntemler nörofibromların başlıca tedavi şekli olsa da büyük pNF'ler kısmen çıkartıldıktan sonra nüksetme oranları yüksektir. NF1 ile ilişkili tümörlerin büyümesinde çok sayıda hücreyel yolak yer almaktadır bu nedenle bir fikir birliğine varılamamıştır. Bununla birlikte hedefe yönelik tedaviler etki gösterebilmektedir. Nörofibromlarda Ras-GTP ifadesi arttığından anti-Ras tedaviler idealdir. pNF'lerde Ras sinyal yolağını ve diğer yolakları hedefleyen Tipifarnib, Pirfenidon, Sirolimus, Pegile interferon alfa-2b ve İmatinib gibi ajanlar faz II klinik çalışmalarda kullanılmıştır. MEK ve fosfoinositid 3 kinazı (PI3K) inhibe eden ajanlar gibi Ras sinyal yolağının "downstream" efektörlerini etkileyen terapötik stratejiler umut vericidir. ABD Gıda ve İlaç Dairesi (FDA), bir MEK inhibitörü olan Selumetinib'i (Koselugo, AstraZeneca), ameliyat edilemeyen pNF'leri olan en az 2 yaşındaki pediyatrik NF1 hastalar için Nisan 2020'de onaylamıştır.

Bunun yanı sıra mTOR yolağının bir inhibitörü olan Rapamisin, AKT aktivasyonunu indüklediğinden terapötik kullanımı sınırlıdır (Tamura , 2021).

1.3 Nörofibromatozis Tip 1’de Modifiye Edici Genlerin Rolü

NF1 hastalarının kliniği hastalar arasında, hatta aynı mutasyonu gösteren aile bireyleri arasında bile farklı olabilmektedir. Bu konu ile ilgili çok sayıda çalışma mevcut olup görüşlerden birisi de modifiye edici genlerin etkili olabileceğidir. Çeşitli semptomlar için farklı modifiye edici genler çalışılmaktadır. Son yıllarda birçok hastalığın ortaya çıkmasında mitokondrideki hasarların rolü olduğu bilinmektedir. Böylece mitokondrilerin kanser ve diğer hastalıkların erken habercisi olarak değerlendirilme olasılıkları ortaya çıkmaktadır (Wallace ve Chalkia, 2013). Bununla birlikte pek çok kanser ve nörodejeneratif hastalıklarda mitomiR’lerin hastalığın üzerindeki etkisi araştırılıp tanımlanmıştır.

NF1 ile ilgili literatürde birçok aday modifiye edici gen bulunmaktadır (Ratner ve Miller, 2015; Sharafi ve Ayter, 2018). Bu aday modifiye edici genlerden biri miRNA’lardır (Ratner ve Miller, 2015). Son yıllarda mitokondrilerle yapılan çalışmalar mitokondrilerin fonksiyonundaki değişikliklerin de bir modifiye edici faktör olarak NF1 hastalarının farklı fenotipler göstermesinde rol oynayabileceğini düşündürmektedir (Sharafi ve Ayter, 2018).

Vitamin D ve vitamin D reseptörü, apoptotik proteaz aktive edici faktör 1 (Apaf-1), *NF1* geninde gömülü olan *OMGP*, *EVI2A* ve *EVI2B* genleri, Ras ve Spred1, süksinat dehidrogenaz ve TRAP1 proteinleri, ve telomeraz enzimi (telomeraz ters transkriptaz-TERT mRNA’sı ve telomeraz aktivitesi) ile miR-10b, miR-21, miR-107, miR-34a, miR-204, miR-214, ve miR-29c gibi bazı miRNA’lar NF1 hastalarında önemli olabilecek modifiye edici genlerden bazılarıdır (Ratner ve Miller, 2015; Sharafi ve Ayter, 2018).

1.3.1 Mitokondri

Mitokondriler, protistlerde, bitkilerde, funguslarda ve hayvanlarda bulunan bir organeldir. İlk olarak bazı ökaryotlarda mitokondri bulunmadığı düşünülmüştür ancak daha sonra yapılan araştırmalarla tüm ökaryotların ya mitokondriye sahip olduğu veya hiç değilse geçmişte sahip olmuş oldukları gösterilmiştir. Tüm yaşayan ökaryotların ortak atasının bir endosimbiyont taşımakta olduğu düşünülmektedir (Allison, 2014:107).

Mitokondri, kas hücreleri başta olmak üzere birçok hücrede oksidatif fosforilasyon yoluyla ATP ihtiyacını karşılayan oldukça önemli bir organeldir. Diğer bir rolü ise intrinsik apoptotik yolu başlatmasıdır (Barrey ve diğ., 2011). Ayrıca mitokondriler, hücrenin canlılığı, hücre ölümü, otofaji, kalsiyum trafiği gibi birçok önemli hücresel süreçte rol oynamaktadırlar. Ayrıca, hem ve bazı steroid hormonlar burada sentezlenmektedir (Barrey ve diğ., 2011; Borralho ve diğ., 2015). Mitokondrilerin bütün bu fonksiyonları yerine getirebilmesi için birçok yolak, sayısız enzim ve düzenleme gerekmektedir. Mitokondriler kendi genomik, transkriptomik ve proteomik materyallerine sahiptir fakat fonksiyonel bir şekilde işleyebilmesi için gerekli tüm proteinleri sentezleyememektedir (Barrey ve diğ., 2011).

Mitokondriyel fonksiyon veya regülasyon bozuklukları kardiyomiyopati, metabolik sendrom, obezite, nörodejeneratif hastalıklar ve kanser gibi çeşitli hastalıklarla ilişkilidir (Borralho ve diğ., 2015).

İnsan mitokondrisi mitokondriyel DNA (mtDNA) olarak bilinen bir DNA'ya sahiptir. mtDNA, yaklaşık 16,6 kb uzunluğundadır, intron içermemektedir ve kodlanmayan RNA'larla birlikte 13 elektron taşıma zinciri (ETZ) protein alt ünitesini kodlamaktadır (Borralho ve diğ., 2015). mtDNA replikasyonu ve başlangıcı "D loop" olarak adlandırılan küçük kodlanmayan bir bölgede başlamaktadır ve çekirdek genomundan sentezlenip mitokondriye aktarılan proteinler tarafından düzenlenmektedir. mtDNA transkripsiyonu, translasyonu ve transkriptlerin süreci çeşitli kodlanmayan RNA'lar tarafından düzenlenir; bunlardan bazıları çekirdek genomu tarafından sentezlenip mitokondriye taşınırken bazıları mitokondriyel genom tarafından kodlanmaktadır. MitomiR'ler her iki DNA zincirinden uzun, polisistronik, öncül transkriptler olarak transkribe edilir ve ardından mesajcı RNA'lar (mRNA), transfer RNA'lar (tRNA) ve ribozomal RNA'lar (rRNA) dahil olmak üzere tüm kodlanan ve kodlanmayan RNA'lar olarak salınırlar (Borralho ve diğ., 2015).

Mitokondri tümör hücrelerinin apoptozdan kaçınmalarında rol oynamaktadır. Mitokondri aracılı apoptozda en önemli olaylardan biri, mitokondriyel permeabilite geçiş gözenağı (mPTP) oluşumudur. Bu porlar membran potansiyelinin kaybolmasına ve mitokondriyel dış zar geçirgenliği (MOMP) olarak bilinen bir süreçle bazı moleküllerin mitokondriden çıkışına yol açmaktadır (Ortega ve diğ., 2020). mtDNA, kantitatif gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (kRT-PZR) yöntemiyle belirlenebilir. Bu amaç için nadiren delesyona uğrayan bazı primerler kullanılabilir.

Mitokondriyel tRNA^{leu(UUR)} gen bölgesi nadiren delesyona uğrar ve sadece birkaç nadir mitokondriyel tek nükleotit polimorfizmi (mtSNP) içermektedir. Bu durum tRNA^{leu(UUR)}'yi primer tasarımı için uygun bir bölge haline getirmektedir.

Benzer şekilde mtDNA'nın "D-loop" bölgesi de nadiren delesyona uğramaktadır fakat bu bölge bireyler arasında oldukça polimorfiktir ve potansiyel olarak primerlerin yanlış eşleşmelerine neden olabilir (Venegas ve diğ., 2011).

1.3.2 MikroRNA'lar

miRNA'lar uzunlukları 19-25 bp arasında değişen, endojen saç tokası şeklindeki transkriptlerden üretilen küçük RNA'lardır. Hedefledikleri mRNA bölgelerinin 3' UTR bölgelerine hibridize olarak mRNA'nın baskılanması veya parçalanmasına yol açarlar ve bu şekilde gen ekspresyonunun post transkripsiyonel düzenleyicileri olarak fonksiyon göstermektedirler (Sedani ve diğ., 2012). Tek bir miRNA tüm fonksiyonel ağları düzenleyerek kompleks fizyolojik ya da hastalık fenotiplerini modüle edebilmektedir (Wang ve diğ., 2012).

miRNA'lar ilk kez 1990 yılının başlarında, Victor Ambros ve meslektaşları *C. elegans* adı verilen bir nematoda gelişimsel süreci değiştiren mutasyonları araştırırken keşfedilmiştir. Bu mutasyon mRNA translasyonunu artırmaktadır. Araştırmalar sonucunda meydana gelen mutasyonun protein kodlayan gende değil, küçük bir RNA molekülünü kodlayan bir gende olduğu görülmüştür (Allison, 2014:438).

Daha sonraki yıllarda let-7 keşfedilmiştir ve böylece düzenleyici sistemin tek olmadığı görülmüştür. Ancak RNA interferansının (RNAi) keşfinden sonra bu RNA'lar ilgi odağı haline gelmiştir. İncelenen bütün çok hücreli ökaryotlar ve bütün hayvan sistemlerinde miRNA'lar belirlenmiştir ve bazı miRNA'lar türler arasında oldukça korunmuştur (Allison, 2014:439; O'Brien ve diğ., 2018).

Tanımlanan insan miRNA'ları arasında *C.elegans*'da korunan birkaç tane miRNA da yer almaktadır (Allison, 2014:439). Günümüzde hâlâ yeni miRNA'lar keşfedilmekte ve gen düzenlemeleri tanımlanmaktadır (O'Brien ve diğ., 2018).

miRNA'ların post transkripsiyonel düzenleyici rolleri genellikle mRNA'nın 3' UTR bölgesinde yer alan mikroRNA yanıt elemanına bağlanmasıyla gerçekleşmektedir ancak miRNA'ların 5' UTR bölgeleri, kodlayan sekanslar ve gen promotörleri gibi bölgelerle de etkileşime girdiği bildirilmiştir (O'Brien ve diğ., 2018; Ortega ve diğ., 2020). Bazı çalışmalar miRNA'ların eksprese edilmiş bir proteine bağlanarak işlevini değiştirebildiğini göstermiştir.

Tek bir miRNA yaklaşık 200 farklı transkripti düzenleyebilmekte ve tek bir mRNA da birkaç farklı miRNA tarafından düzenlenebilmektedir. miRNA'lar insan genomunun yaklaşık %2-3'ü kadardır ve bunların yarısı kadarı kümeler halinde gruplanmakta olup polisistronlar gibi transkriptleri vardır. Genellikle her küme iki olgun miRNA'dan oluşmaktadır. miRNA aracılı düzenleme çok korunmuş bir süreç olup insan proteinlerini kodlayan genlerin %60'tan fazlası bu tür düzenlemeye açıktır (Ortega ve diğ., 2020). miRNA'lar normal hayvan gelişimi için ve çeşitli biyolojik süreçler için kritik öneme sahiptir. miRNA'ların anormal ifadesi çeşitli hastalıklarla ilişkilidir (O'Brien ve diğ., 2018).

1.3.2.1 miRNA biyogenezi

miRNA'lar yerel saç toka yapıları oluşturan gen transkriplerinden oluşmaktadır. Çoğu insan miRNA'sı genoma dağılmış haldedir ancak bazıları miRNA kümeleri halinde bulunmaktadır ve birlikte transkripsiyona uğramaktadırlar. Bazı miRNA'lar, protein kodlayan mRNA intronlarının içine yerleşmiş durumdadırlar fakat diğer miRNA'lar kodlamayan RNA'ların intron veya ekzonlarında yer almaktadırlar. İntronik miRNA'lar, bazı küçük çekirdekçik RNA'larla (snoRNA) benzer olarak intron halkaları dışından oluşturulmaktadır. Bunların ifadesi, büyük ihtimalle komşu mRNA'ların ekspresyonu ile düzenlenmektedir. Fakat bazı intronik miRNA'lar, komşu mRNA'lara göre antisens durumda yerleşmişlerdir. Bu nedenle bazı miRNA'lar kendi promotöründen transkribe edilebilir (Allison, 2014:439,440).

miRNA biyogenezi, miRNA'nın ilgili genden büyük bir primer transkript (primer-miRNA, pri-miRNA) oluşturulmasıyla başlamaktadır. Pri-miRNA'nın 5'-7-metilguanozin şapkası ve 3' poli (A) kuyruğu bulunmaktadır. Bu durum miRNA'ların RNA polimeraz II tarafından transkribe edildiğini göstermektedir.

Pri-miRNA, bir mikroşlemci kompleksi (microprocessor complex) tarafından parçalanır. Bu mikroşlemci kompleksi RNA-bağlama proteini olan DGCR8 (DiGeorge Sendromu kritik bölge 8) ve bir RNaz III olan "Drosha" dan oluşmaktadır. Pri-miRNA'dan, mikroşlemci kompleksi tarafından yaklaşık 85 nükleotitlik sap-ilmek yapısı oluşturulur ve bu yapı prekürsör-miRNA (pre-miRNA) olarak adlandırılmaktadır. Pre-miRNA'nın iki nükleotitlik serbest 3' uzantısı bulunmaktadır ve Ran/GTP/Exportin 5 (Exportin 5, nükleositoloplazmik taşıma faktörü proteinlerinden karyoferin ailesinin üyelerindendir) kompleksi ile çekirdek dışına taşınmaktadır.

Pre-miRNA sitoplazmaya taşındığında farklı bir RNaz III olan “Dicer” sayesinde yaklaşık 20-22 nükleotitlik miRNA:miRNA dupleksi oluşturulmaktadır. Dupleks çözüldükten sonra olgun miRNA, RNA ile uyarılan susturma kompleksine (RISC) dahil edilmektedir. RISC miRNA’yı, mRNA’yı hedeflemeye yönlendirmektedir (Allison, 2014:440; Peng ve Croce, 2016).

miRNA biyogenezinin başka yolları da bulunmaktadır. Genel olarak Drosha/DGCR8’den bağımsız olan ve Dicer’dan bağımsız olan yollar olarak gruplandırılabilir. Drosha/DGCR8’den bağımsız olan yoldan üretilen pre-miRNA’lar Dicer substratlarına benzemektedirler. mRNA intronlarından üretilen mirtronlar ve 7-metilguanozin (m⁷G) ucu olan pre-miRNA’lar bu grubun bir örneği olarak verilebilir. Bunlar Drosha tarafından kesilmeye ihtiyaç duymadan exportin 1 aracılığıyla sitoplazmaya taşınmaktadır. Dicer’dan bağımsız olarak işlenenler ise Drosha tarafından kısa saç tokası RNA (shRNA) transkriptlerinden işlenmektedir. Bu tür pre-miRNA’lar Dicer’in substratı olmak için yeterli uzunlukta olmadıklarından olgun miRNA’ların oluşabilmesi için Argonaute 2’ye (AGO2) ihtiyaç duymaktadırlar. Böylece AGO2 aracılı olarak 3p zinciri kesilir. 5p zincirinin 3’-5’ yönünde kesilmesiyle olgun miRNA’lar oluşur (O’Brien ve diğ., 2018).

1.3.2.2 miRNA’ların mRNA translasyonunu hedef alması

RNAi diziye özgü bir gen susturma işlemidir ve post transkripsiyonel bir olaydır. Bu işlem çift zincirli RNA’ların oluşmasıyla (dsRNA) başlatılmaktadır. MiRNA’lar “heterosilencing” yaparak birbirinden çok farklı genlerin baskılanmasında susturma işlemini yapabilmektedirler (Allison, 2014:434,435). RNAi mekanizmasının miRNA vasıtası ile gerçekleşebilmesinin avantajı hücrelerin kendi içerisinde gen regülasyonunu sağlayabilmesidir. miRNA’lar saç tokası şeklinde katlanarak dsRNA’yı oluşturup, RNAi mekanizmasını başlatmaktadırlar (Allison, 2014:436).

Pre-miRNA çekirdekten sitoplazmaya taşındıktan sonra Dicer tarafından işlenerek olgun miRNA dupleksi oluşturulur. Bu dupleksin iki zinciri de AGO protein ailesine ATP bağımlı olarak yüklenir ve miRNA dupleksinin bir zinciri seçilerek RISC’e yüklenir. Buradaki genel görüş RISC’in yüklenmesinde RNA dupleksinin tercihen 5’ ucunun yüklenmesidir. 5’ ucu termodinamik olarak daha az karardır. Bu “asimetri kuralı” olarak bilinmektedir. Genellikle, 5’ ucu daha az kararlı baz eşleşmesi yapan miRNA zinciri “kılavuz” olarak seçilmektedir, 5’ ucu daha kararlı olan “yolcu” miRNA zinciri ise çıkarılarak parçalanmaktadır.

RISC, protein kodlayan hedef mRNA'ları ya translasyonunu engelleyerek veya keserek parçalar ve bu şekilde baskılar. Hedef mRNA kesildikten sonra miRNA bozulmadan kalarak başka mRNA'ların tanınmasını veya yıkılmasını sağlamaktadır (Allison, 2014:440, 441; O'Brien ve diğ., 2018).

Eğer tamamen komplementer olma durumu söz konusu değilse mRNA translasyonel olarak baskılanmaktadır. Ancak miRNA'ların ana fonksiyonu mRNA'yı parçalayarak gen regülasyonunu sağlamak gibi görünmektedir. Nadir de olsa miRNA'lar gen promotör bölgelerinin histon modifikasyonu ve DNA metilasyonunu sağlayarak hedef genlerin ifadesini dolaylı olarak değiştirebilir (Sedani ve diğ., 2012). Tek bir miRNA veya miRNA ailesi yüzlerce genin post transkripsiyonel ifadesini düzenleyebilir (Wang ve Springer, 2015). Birçok çalışma miRNA'ların gen ekspresyonunu nasıl inhibe ettiğine odaklanmış olsa da bazı çalışmalarda miRNA'ların gen ekspresyonunu artırdığı da bildirilmiştir (O'Brien ve diğ., 2018).

miRNA genlerinin %50'den fazlası, kanserle ilişkili amplifikasyon, delesyon ve translokasyon bölgelerinde yer almaktadır. miRNA'ların anormal ifadesinin kanserde rol oynadığını gösteren pek çok kanıt bulunmaktadır (Allison, 2014:557).

Lin He, J. Michael Thomson ve diğerleri 2005 yılında, miRNA gen kümesinin aşırı ifadesinin biyolojik sonucunu ve önemini araştırmak için, B hücre lenfoması taşıyan transgenik bir fare modeli kullanmışlardır. Transgenik fareleri kontrol farelerle karşılaştırdıklarında, lösemi gelişiminin kontrol hücrelerinde 3-6 ay sürerken, transgenik farelerde 51 günde tamamlandığını gözlemlemişlerdir. Dahası, bu farelerde kanser oranının anlamlı olarak arttığını (%30'dan %100'e yükseldiği) görmüşlerdir. Buradan elde edilecek sonuç ekspresyonu değişen spesifik miRNA genlerinin kanserin başlamasına ve ilerlemesine katkıda bulunmasıdır (Allison, 2014:557,558).

Kanser hücreleri karakteristik olarak kontrolsüz büyümeye sahip hücrelerdir ve birçok durumda miRNA'ların onkogenlerin ekspresyonunu baskılayan tümör baskılayıcılar veya tam tersi tümör baskılayıcı genleri inhibe eden onkomiRNA'lar olarak davrandığı görülmüştür (Sedani ve diğ., 2012; Ortega ve diğ., 2020). miRNA ekspresyon profili çeşitli kanser türlerinde ve prognostik tahminler yaparken yardımcı olabilecek miRNA'ları tanımlarken kullanılabilir. Bu amaçla başlangıçta "Northern blot" yöntemi kullanılarak pre-miRNA'lar ve olgun miRNA'lar belirlenerek miRNA biyogenezinde rol alan enzimlerin regülasyonu hakkında bilgi sağlanabilir.

Gerçek zamanlı PZR ve “microarray” teknikleri de SYBR Green boyası ya da Taqman problemleri kullanılarak pre-miRNA’lar ve olgun miRNA’ların belirlenebilmesi için optimize edilebilirler (Sedani ve diğ., 2012).

1.3.3 Mitokondriyel miRNA’lar

Mitokondrilerin kanserdeki önemleri ilk olarak Otto Warburg tarafından tanımlanmıştır. Ancak mitokondrinin hasar görmek yerine değişikliğe uğradığı ve bu değişikliklerin çeşitli tümörlerin karsinogenezinde anahtar rol oynadığı bilinmektedir. Hanahan ve Weinberg metabolik yeniden programlanma (metabolic reprogramming), apoptozdan kaçınma, inflamasyon, genomik instabilite veya tümör metastazı gibi kanser hücrelerinin en belirgin özelliklerini taşıyan çeşitli kanser özelliklerini tanımlamışlardır (Ortega ve diğ., 2020).

Çalışmalar mitokondri fonksiyonu ve miRNA aktivitesi arasında dinamik bir ilişki olduğunu göstermektedir (Wang ve Springer, 2015). İnsan hastalıklarında ayırıcı ve karakterize edilmiş olan birçok miRNA bulunmaktadır. Bununla birlikte mitokondride yerleşim gösteren miRNA’lar, mitomiR olarak adlandırılmaktadır (Khorsandi ve ark., 2018).

MitomiR’lerin büyük çoğunluğu çekirdekte transkribe olmaktadır ve mitokondriye taşınmaktadırlar fakat miR-1974, miR-1977 ve miR-1978 gibi bazıları mtDNA’dan kodlanmaktadır (Khorsandi ve ark., 2018; Ortega ve ark., 2020). miRNA’lar gen ifadesini düzenleyebilmektedir; bu nedenle mitokondriye taşındıktan sonra mitomiR’lerin bir mitokondriyel genin 3’ ucuna bağlanarak regülasyonunu değiştirebileceği öne sürülmektedir (Sekar ve diğ., 2020). Dahası miRNA işleyişi ile ilgili proteinler AGO ve Dicer’in mitokondride var olduğu belirlenmiştir ve bu aktif bir miRNA ribonükleoprotein kompleksinin mitokondrilerdeki varlığını göstermektedir (Wang ve Springer, 2015).

miRNA’lar direkt olarak hücrelerden, dokulardan veya kan plazması, tükürük, beyin omurilik sıvısı, gözyaşı, idrar gibi sıvılardan çalışılabilmektedir. Ancak mitomiR ile çalışmak için hücreler ve dokular tercih edilmektedir çünkü diğer hücresel kompartmanlardan mitokondrilerin izole edilmesi önemlidir. MitomiR izolasyonu için diferansiyel santrifüjleme basit bir yöntemdir. Bununla birlikte Barrey ve arkadaşları manyetik hücre ayırma (MACS) yöntemini kullanarak mitomiR izolasyonu için bir metot tanımlamışlardır (Barrey ve diğ., 2011; Ortega ve diğ., 2020).

In situ hibridizasyon, mikroarray ve RNA sekanslama gibi farklı stratejiler de miRNA'ların belirlenmesinde kullanılabilir. MitomiR izolasyonunda MACS yöntemi bu yöntemler kadar kullanışlı ve önemlidir. Diferansiyel santrifüjleme ve ultrasantrifüj yöntemleri MACS ile karşılaştırıldığında mitokondri izolasyonu için MACS'in en verimli sonucu verdiği bildirilmiştir (Ortega ve diğ., 2020).

miRNA belirlenmesinde kullanılan stratejilerden biri kRT-PZR yöntemidir. Bu yöntem duyarlı, hızlı, basit olduğu ve az miktarda kalıp RNA gerektirdiğinden yaygın olarak kullanılmaktadır. Başlangıç kalıp RNA miktarını, RNA kalitesi gibi değişkenleri düzeltmek için analizden elde edilen veriler devamlı olarak ifade edilen ve ifade miktarı değişmeyen iç kontrollerle normalize edilmektedir. miRNA'ların belirlenmesi ve ifadelerinin doğru ve güvenilir bir şekilde yapılabilmesi için uygun bir iç kontrol seçimi ilk adımdır. Bu amaç için miR-18a, miR-191, miR-16, let-7f ve miR-15a gibi bazı miRNA'lar iç kontrol genleri olarak kullanılmıştır. Ayrıca rRNA'lar (5S ve 18S rRNA) ve küçük çekirdek RNA da (snRNA, U6-RNU6-1) iç kontrol genleri olarak kullanılmıştır. U6 farklı doku ve hücrelerde devamlı olarak ifade olduğundan çeşitli çalışmalarda dokulardaki miRNA'ların U6 ile normalizasyonu önerilmektedir (Lou ve diğ., 2015).

Barrey ve diğerleri (2011) yapmış oldukları bir çalışmada insan primer iskelet kas hücrelerinde (human skeletal primary muscle cell) mitokondride lokalize olan miRNA'ların bulunmasını amaçlamışlardır. Çalışma sırasında yapılan kRT-PZR analizlerine göre ifadesi belirlenen miRNA'lardan bazıları hsa-miR-484, hsa-miR-133a, hsa-miR-29a, hsa-miR-107, hsa-miR-21, hsa-miR-22, hsa-miR-34a'dır.

Khorsandi ve diğerleri (2018) kardiyak ölüm sonrası donörden alınan karaciğerdeki primer işlev bozukluğu modelinde mitomiR'lerin rolünü ve bunların mitokondriyel proteom ile etkileşimlerini belirlemek için hesaplamalı biyoloji yöntemlerini kullanarak bir çalışma yürütmüşlerdir.

Yapılan *in silico* analizlerde olgun miRNA'lar "Mirbase" ile tanımlanmıştır. Çalışmaya göre miR-22-3p, miR-122-5p ve miR-107 önceden mitokondriden deneysel olarak izole edilmiş ve mitomiR olarak tanımlandığı belirtilmiştir. Grubun önceden primer işlevsizlikte miRNA ifadesi ile ilgili bir çalışmada miR-22'nin mitokondri merkezli metabolik ve apoptotik yollarda tahmini bir etkiye sahip olan önemli bir miRNA olduğunu göstermişlerdir.

Liu ve diğeri (2019) miR-122-5p ifadesinin nazofarengeal karsinom hücre hatlarında anlamlı derecede azaldığını göstermişlerdir. Aynı zamanda miR-122-5p'nin SATB1'i hedeflediği ve koloni formasyonu, hücre göçü ve invazyonunu inhibe edebileceği gösterilmiştir.

miR-107, çeşitli nörodejeneratif hastalıklar ve MSS yaralanmalarıyla ilişkili bir miRNA'dır (Wang ve Springer, 2015). miR-107'nin hücre bölünmesi, metabolizma, strese cevap ve anjiyogenezde önemli bir rolü olduğu bildirilmiştir. miR-107'nin düzensizliği çoklu tümör gelişimi ve progresyonu ile ilişkilidir. Akciğer kanseri ve gliomda *CDK6* ifadesini azaltarak tümör baskılayıcı görevi görmektedir. Bununla birlikte meme kanseri ve mide kanserinde tümör invazyonu ve metastazı teşvik ederek onkogen görevi görmektedir. Gastrik kanserde ise NF1'i hedeflediği ve miR-107 ifadesinin baskılanmasının proliferasyon, hücre göçü ve invazyonu artırırken NF1 ifadesinin baskılanmasının bu fenotipi desteklediğini bildirmişlerdir (Wang ve diğ., 2016).

Itani ve arkadaşları 2012 yılında 12 MPNST, 11 nörofibrom, 5 normal sinir ve 3 MPNST hücre hattında mRNA ekspresyon profilini analiz etmişlerdir. Nörofibrom veya MPNST hücre hatlarıyla karşılaştırdıklarında MPNST'lerde miR-21 ifadesinin daha yüksek olduğunu belirtmişlerdir. miR-21 inhibitörü transfeksiyonu kaspaz aktivitesini artırıp, hücre büyümesini durdururken PCD4 seviyelerini artırmıştır. miR-21 ifadesinin artması PCD4 ifadesini baskılayarak apoptozun azalmasına ve bir onkogen olarak hücre proliferasyonunun artmasına neden olabilir. Bu sonuçlardan yola çıkarak miR-21'in PCD4 aracılığıyla MPNST progresyonunda rol oynayabileceği belirtilmiştir (Itani ve diğ., 2012; Sedani ve diğ., 2012).

miR-21 çeşitli nörodejeneratif hastalıklar ve MSS yaralanmalarıyla ilişkili bir miRNA'dır (Wang ve Springer, 2015). Galvan ve diğeri 2017 yılındaki bir makalelerinde çeşitli böbrek hastalıkları olan bireyler ve kronik böbrek hastalığı olan hayvan modellerinde ifadesinin arttığı iyi bilinen miR-21'i araştırmışlardır. Mitokondriyel yağ asidi oksidasyonunu artırarak ve PPAR α 'yı hedefleyerek farelerde miR-21 eksikliğinin böbrek fibrozuna karşı koruyucu olduğu sonucuna varmışlardır (Galvan ve diğ., 2017; Sekar ve diğ., 2020).

Su ve diğeri (2018) sistemik lupus eritematoz (SLE) hastalarında mitokondri aracılı apoptozda miRNA'ların rolünü araştıran bir çalışma yapmışlardır.

Yapılan kRT-PZR analizinde miR-221-3p , miR-150-5p ve miR-21-5p'nin kontrol grubuna göre sistemik lupus eritematoz SLE hastalarının plazmasında önemli miktarda arttığı ancak miR-22-3p'nin kontrol grubuyla benzer olduğu görülmüştür. Ancak miR-21-5p ve miR-22-3p'nin kaspaz 10 protein seviyeleri ile negatif korelasyon gösterdiği belirtilmiştir.

Zhu ve diğerleri (2018) miR-21-5p ve miR-34a ve hTERC'in serviks kanserinde ilişkisini araştırdıkları bir çalışma yürütmüşlerdir. Çalışmada sağlıklı serviks, servikal intraepitelyal neoplazi (CIN) I, CIN II/III ve servikal skuamöz hücreli karsinomdan örnekler kullanarak gerçek zamanlı PZR ile miR-21-5p ve miR-34a ifade seviyelerini ve “dual-color interphase” floresan *in situ* hibridizasyon (FISH) ile hTERC amplifikasyonunu belirlemişlerdir. Daha sonra ise miRNA ve hTERC ifadelerini sitolojik ve histolojik incelemelerle karşılaştırmışlardır. Sonuçlarda servikal lezyonunun ciddiyetine bağlı olarak miR-21-5p ifadesinin kademeli olarak arttığını ve miR-34a ifadesinin kademeli olarak azaldığını, hTERC amplifikasyonunun ise servikal lezyonların şiddetine göre artma eğiliminde olduğunu ve bu miRNA'ların ifadesinin ve hTERC amplifikasyonunun düşük dereceli servikal bozuklukları yüksek dereceli olanlardan ayırmada insan papilloma virüsü (HPV) pozitifliğinden daha spesifik olduğunu bildirmişlerdir. Dolayısıyla miR-21-5p ifadesinin artmasının, miR-34a ifadesinin azalmasının ve hTERC amplifikasyonunun serviks kanserinde agresif progresyonla ilişkili olduğunu bildirmişlerdir.

Subramanian ve arkadaşlarının yapmış olduğu genom çapında analizler (genome-wide analysis) nörofibromların malignansi geliştirerek MPNST'ye dönüşümlerinin bir dizi genin fonksiyonunu kaybetmesiyle gerçekleştiğini açığa çıkartmıştır. Nörofibromlarla karşılaştırıldığında çoğu MPNST'de miR-34a ifadesinin azaldığını göstermişlerdir. miR-34a ifadesinin bu tür bir kaybı malignansi oluşumuna yol açabilmektedir. Ayrıca miR-34a kolorektal karsinom ve nöroblastoma gibi çeşitli neoplazmlarda p53'ü direkt olarak hedeflemektedir. Bu neoplazmlarda miR-34a'nın düşük ifadesinin apoptozun baskılanmasıyla ilişkili olduğu bilinmektedir (Subramanian ve diğ., 2010; Sedani ve diğ., 2012).

miR-34a akut miyeloid lösemi (AML)'de *HMGB1* genini hedefleyerek hücre apoptozu ve otofajinin inhibisyonunda rol oynayan bir tümör baskılayıcı olarak davranmaktadır. miR-34a aşırı ifadesi *PD-L1* genini hedefleyerek spesifik T hücrelerinin apoptozunu azaltıp tümör baskılayıcı görevi görmektedir (Mardani ve diğ., 2018).

Rippo ve arkadaşları 2014 yılında replikatif yaşlanma için iyi bir model olan endotelial hücrelerle çalışmışlardır. Çalışmaları miR-34a, miR-181a ve miR-146a'nın ifadesinin arttığını ancak bu miRNA'ların hedefledikleri Bcl-2'nin ifadesinin azaldığını göstermiştir. Bcl-2 mitokondriyel bütünlüğü sağlayarak mitokondri fisyon/füzyonu ve otofajide kritik rol oynayan bir antiapoptotik faktördür ve hücre yaşlanma sırasında mitokondriyel fonksiyon ve fonksiyon bozukluklarını kontrol etmektedir. Çalışmaları yaşlanmayla ilgili olarak mitomiR'lerin mitokondriyel protein ifadesini regüle ederek düzenleyici bir rollerinin olabileceği sonucuna varmıştır (Rippo ve diğ., 2014; Sekar ve diğ., 2020).

İnsan lens epitel hücrelerinde miR-34a'nın apoptozdaki düzenleyici rolünün araştırıldığı bir çalışma yapılmıştır. miR-34a ifadesinin artmasının kaspaz-9 aktivasyonu, mitokondriyel membran potansiyelinin bozulması, mitokondriyel enerji metabolizmasının engellenmesi ve sitokrom C salınımı ile mitokondri aracılı apoptozu indüklediği bildirilmiştir. Aynı zamanda miR-34a'nın Notch1 ve Notch2'yi hedefleyebileceği ancak sadece Notch2'nin mitokondri aracılı apoptozu tetikleyebileceği doğrulanmıştır. Çalışma sonucunda miR-34a'nın ifadesinin arttığı, mitokondri aracılı apoptoz ve oksidatif stresi Notch2'yi baskılayarak tetiklediği gösterilmiştir (Fan ve diğ., 2017).

miR-217, farklı hücre tipine özgü olarak onkogenleri veya tümör baskılayıcı genleri hedefleyebilmektedir. Örneğin miR-217, endotelial hücre yaşlanmasını modüle eden ve bir onkogen olarak işlev gören SirT1'i hedefleyebilmektedir. Aynı zamanda miR-217, böbrek bozukluklarında tümör baskılayıcı gen *PTEN*'i de hedefleyebilir. Pankreatik duktal adenokarsinom (PDAC) hücrelerinde miR-217'nin ekspresyonu ve muhtemel rolünü araştırmak için bir çalışma yapılmıştır. "Locked nucleic acid" *in situ* hibridizasyonu ve PZR analizleri miR-217'nin PDAC dokuları ve test edilen PDAC hücre hatlarında ifadesinin azaldığını göstermiştir. miR-217, PDAC hücrelerinde tümör hücre büyümesini ve "anchorage" bağımsız koloni oluşumunu inhibe etmiş ve "nude" fare ksenograftlarında tümör büyümesini *in vivo* olarak azaltmıştır. *In silico* çalışmalarla KRAS, miR-217'nin potansiyel hedefi olarak tanımlanmıştır. "Dual-luciferase reporter gene assay" ise miR-217'nin, *KRAS*'i direkt hedeflediğini göstermiştir. Dahası miR-217 ifadesi ile KRAS protein ifadesinin PDAC hücre hatlarında negatif korelasyon gösterdiği gözlenmiştir. Bu nedenle miR-217 ifadesinin azalması, PDAC hücre hatlarında KRAS'ı düzenleyebilir ve miR-217 miRNA temelli PDAC terapisinde faydalı bir terapötik ajan olarak kullanılabilir (Zhao ve diğ., 2010).

miR-217, AML'de *KRAS* genini hedefleyerek apoptozda rol oynar ve tümör baskılayıcı olarak davranmaktadır (Mardani ve diğ., 2018).

Venkatadri ve diğ. (2016) bir çalışmada meme kanseri hücre hatları olan MDA-MB-231, ve MCF7'de ve resveratrol etkisi ile miRNA modülasyonunun anti-proliferatif etkisini araştırmışlardır. Çalışma sonucunda resveratrol tarafından modüle edilen miRNA'lar belirlenmiştir. Çalışma sonucunda MCF7 hücre hattında miR-542-3p'nin, MDA-MB-231 hücre hattında ise miR-122-5p'nin resveratrol aracılığıyla miRNA modülasyonunda önemli bir role sahip olduğu belirtilmiştir.

miR-3934-5p'nin, küçük hücreli olmayan akciğer kanserinde tümör baskılayıcı olarak, hücre proliferasyonunun baskılanması ve apoptozun desteklenmesi ile ilişkili TP53INP1'i hedefleyerek hücrelerin sisplantine duyarlılığını artırabildiği gösterilmiştir (Ren ve diğ., 2019).

Ye ve diğ. (2019) yapmış olduğu bir çalışmada ise miR-3934-5p'nin nöroblastom dokuları ve hücre hatlarındaki rolü araştırılmıştır. miR-3934-5p'nin nöroblastom dokuları ve hücre hatlarında ifadesinin önemli miktarda arttığını ve TP53INP1'i direkt olarak hedefleyerek negatif korelasyon gösterdiğini bildirmişlerdir. TP53INP1 ifadesinin azaldığı gösterilmiştir. Ayrıca miR-3934-5p'nin ifadesinin azalması apoptozu ve nöroblastom sağkalımını artırabileceği bildirilmiştir.

Liu ve diğ. (2019) "dual-luciferase reporter assay" ile miR-29'un *PTEN*'i hedeflediği, miR-29 mimiği ile ifadesinin azaldığı fakat miR-29 inhibitörü ile ifadesinin arttığını göstermişlerdir. *PTEN* ifadesinin artması osteosarkom hücre proliferasyonu ve göçünü inhibe ederek miR-29'un osteosarkom progresyonu üzerindeki etkisini azaltabilir. Çalışma sonucunda miR-29'un osteosarkom metastazında *PTEN*'i hedefleyerek tümör oluşumunu destekleyebileceği ve miR-29/*PTEN* yolağının osteosarkom tedavisinde potansiyel terapötik hedef olabileceği bildirilmiştir.

miR-29 çeşitli nörodejeneratif hastalıklar ve sinir sistemi yaralanmalarında gösterilmiştir (Wang ve Springer, 2015). Aynı zamanda miR-29a ve miR-29b, *Bcl-2* ve *Mcl-1* genlerini hedeflemektedir. Dolayısıyla myeloid lösemide antiapoptotik mekanizma ile tümör baskılayıcı görevi görmektedirler (Mardani ve diğ., 2018).

miR-29a-3p ve miR-30-5p'nin doğrudan DNA metil transferaz 3A'yı (DNMT3A) hedeflediği ve reaktif oksijen türleri (ROS) oluşumunu, mitokondriyel disfonksiyonu ve hücre yaşlanmanın erken başlangıcını düzenlediği gösterilmiştir (Jung ve diğ., 2020).

Yapılan bir çalışmada, küçük hücreli olmayan akciğer kanseri progresyonunda tümör başlatıcı hücrelerde miR-1290 ve miR-1246'nın tümör başlangıcı ve metastazda önemli rolü olduğu ve miR-1290 ile miR-1246'nın tümör başlatıcı hücrelerde ifadesinin arttığı gösterilmiştir (Zhang ve diğ., 2016).

miR-1290 ve miR-196b, *IGFBP3* genini hedefleyerek hücre proliferasyonu ve antiapoptotik mekanizmalarla onkogen gibi davranmaktadır (Mardani ve ark., 2018).

miR-22 AML'de *CRTC1*, *FLT3* ve *MYCBP* genlerini hedefleyip CREB ve MYC yollarını baskılayarak tümör baskılayıcı olarak davranmaktadır. miR-22, *PTEN* ifadesinin azalması ve PI3K aktivasyonu ile onkogen olarak davranmaktadır (Mardani ve diğ., 2018).

miR-22-3p, 17. kromozomda (17p13.3) bulunur ve *p53* genine bitişiktir. Araştırmalar miR-22-3p'nin meme, rektum, pankreas, hepatoselüler ve mide kanserleri dahil olmak üzere farklı kanser türlerinde önemli bir rolü olduğunu göstermiştir (Xiao ve ark., 2018).

Xiao ve diğerleri (2018) mesane kanseri hücrelerinin kemoterapötik ajanlara direnç göstermesi ile ilgili bir çalışma yapmıştır. Çalışmada miR-22-3p kullanılmış ve çeşitli biyoinformatik analizlerle miR-22-3p'nin NET1'i hedeflediği gösterilmiştir. Daha sonra miR-22-3p'nin NET1'i hedeflediği kRT-PZR, "Western blot" ve "luciferase reporter assay" kullanılarak doğrulanmıştır. miR-22-3p'nin mesane kanseri hücre hatlarında çoklu ilaç direnci etkisi miR-22-3p mimiği ve miR-22-3p antagomirleri kullanılarak belirlenmiştir. Çalışma sonunda miR-22-3p'nin NET1'i hedefleyerek mesane kanseri hücre hatlarında ilaç direnci oluşturabileceği gösterilmiştir.

miR-22 çeşitli hücrelerde önemli roller oynamaktadır. Ancak hem tümör baskılayıcı hem de onkogenik miRNA olarak davranabilir, bu nedenle çeşitli malignitelerde farklılık göstermektedir. Bir çalışmada multipl myelom hücrelerinde miR-22-3p'nin *in vivo* ve *in vitro* olarak DNA ligaz 3'ü (LIG3) hedefleyerek tümör baskılayıcı olarak davrandığı gösterilmiştir.

miR-22-3p'nin ektopik olarak ekspresyonu, LIG3 aracılı nükleer ve mtDNA tamirini önemli derecede inhibe ederek multipl myelom hücrelerinin apoptotik ölümüne neden olan DNA onarım bozukluğu hasarını artırmaktadır. Çalışma sonucunda miR-22-3p'nin ektopik ifadesi multipl myelom hücrelerinde yeni genetik değişikliklerin oluşmasını önlemiştir. Böylece miR-22-3p'nin ilaç direncine sebep olan genomik instabiliteye karşı koruyucu etkisi gösterilmiştir (Caracciolo ve diğ., 2019).

Hrdličková ve diğerleri (2014) yaptıkları bir çalışmada let-7g, miR-541-3p, miR-138, miR-342-5p, miR-491-5p ve miR-133a'nın hTERT'i direkt olarak düzenleyebildiğini göstermişlerdir. Dahası miR-133a, let-7g, miR-138 ve miR-491 telomeraz aktivitesini azaltmıştır.

Yuan ve diğerleri 2015 yılında, miR-133a ifadesinin azalması ile UCP-2 ifadesinin artmasının direkt ilişkili olduğunu bildirmişlerdir. UCP-2, UCP ailesine aittir ve bu proteinin aşırı ifadesi çeşitli kanserlerle ilişkilendirilmiş olup aynı zamanda tümör hücrelerinin metabolik yeniden programlanmasında büyük rol oynamaktadırlar. Benzer olarak miR-133a/UCP artışının MCF-7 meme kanseri hücre hatlarında "doxorubicin" direnciyle ilişkili olduğu bildirilmiştir (Yuan ve diğ., 2015; Ortega ve diğ., 2020).

Bazı mitomiR'lerin mitokondri biyogenezini düzenleyerek kas kök hücrelerinin fonksiyonel kas hücrelerine farklılaşmasını modüle ettiği gösterilmiştir. miR-1'in ifadesi protein sentezi ve ATP üretimini artırmaktadır ve bu durum hücre farklılaşmasının doğru bir şekilde gerçekleşmesi için önemlidir. Ancak *in vitro* ortamda yetişkin kas hücrelerinde miR-1, miR-133a ile susturulduğunda bazı mitokondriyel genlerin ifadesi azalmakta ve atipik mitokondri oluşmaktadır. Dahası miR-1/133a çift nakavt (double-knockout) fare modelinde *in vivo* olarak yapılan bir paralel deneyde mitokondriyel fonksiyon bozukluğu ve metabolik olgunlaşmanın bir sonucu olarak kas performansının zayıfladığı doğrulanmıştır (Rodrigues ve diğ., 2020).

Masliah-Planchon ve diğerleri (2013), 9 DNF, 41 PNF, 15 MPNST örneğinde 377 miRNA'nın ekspresyonunu ölçmek için kRT-PZR yöntemini kullanmışlardır. Ayrıca tümörojenik olmayan kontrol dokusu olarak 2 yetişkin periferik sinir örneğini, malign kontrol olarak ise 2 MPNST hücre hattı (ST88.14 ve 90-8) kullanmışlardır. Çalışmada 113 miRNA PNF ve MPNST'ler arasında farklı şekilde ifade olmuştur. miR-21 dahil olmak üzere 103 tanesinin MPNST'lerde PNF'lere göre ifadeleri artmıştır.

10 miRNA'nın ifadesi ise azalmıştır. miR-484 dahil olmak üzere 103 miRNA'dan 28 tanesinin MPNST'lerde PNF'lere göre anlamlı şekilde ifadesi artmıştır.

Wang ve diğerleri (2012) yapmış oldukları bir çalışmada miR-484'ün, mitokondriyel fisyon 1'in (Fis1) amino asit kodlayan sekansına bağlanarak translasyonunu baskılayıp mitokondriyel fisyonu azaltabileceğini ve kardiyomiyositler ile adrenokortikal kanser hücrelerinde Fis1 aracılı fisyon ve apoptozu inhibe edebileceğini göstermişlerdir.

Ayrıca bu çalışmada Fis1'in mitokondriyel fisyon ve apoptoz için gerekli olduğu ve anoksi sırasında miR-484 ifadesinin azalmasına karşılık Fis1 ifadesinin arttığı gösterilmiştir.

Çizelge 1.3: Araştırılmak üzere seçilen mitomiR'ler.

mitomiR'lerin Rolü	mitomiR'lerin listesi	Fonksiyonları
	U6	İnternal kontrol
Apoptoz	miR-22	Mitokondri merkezli metabolik ve apoptotik yollarda bir etkiye sahip olduğu düşünülmektedir
	miRNA-34a	Mitokondriyel fonksiyon bozukluğuna neden olarak hücre apoptozuna neden olmaktadır
	miR-484	Mitokondriyal fizyon protein 1'i hedefler ve bu proteinin mitokondriyal fizyon ve apoptoz için gerekli olduğu düşünülmektedir
Tümör Baskılayıcı	miR-3934-5p	İfadesinin azalması TP53INP1'i düzenleyerek nöroblastoma hücrelerinin canlılığını azaltmış ve apoptozu teşvik etmiştir.
	miR-217	K-RAS yolağını hedefleyerek pankreatik duktal adenokarsinomda potansiyel tümör baskılayıcı olarak etki gösterir.
	miR-122-5p	Nazofarengeal karsinom hücre hatlarında koloni formasyonu, hücre göçü ve invazyonunu inhibe edebilir
Proliferasyon	miR-107	Gastrik kanserde NF1'i hedefler baskılanması hücre göçü, proliferasyon ve invazyonu artırır.
	miR-29	İfadesinin artması osteosarkom hücre proliferasyonunu teşvik eder ve PTEN'i hedefler
	miR-1290	Küçük hücreli olmayan akciğer kanserinde tümör başlangıcı ve metastazda önemlidir
	miR-21	İfadesinin artması MPNST'lerde PDCD4 fonksiyonunu baskılayabilir bu durum apoptozu azaltır ve hücre proliferasyonunu artırır
Telomeraz	miR-133a	TERT geninin düzenlenmesinde rolü vardır

MitomiR'ler mitokondride yerleşim gösteren miRNA'lar olarak mitokondriyel süreçlerin düzenlenmesinde yer almaları bakımından NF1 hastalığı için önemli modifiye edici adaylar olabilir. Bu nedenle bu tez çalışmasında seçilen mitomiR'lerin farklı NF1 tümör doku örneklerinde (cNF ve pNF) kontrol doku (CALM) örneğine göre ifadesinin değerlendirilmesi amaçlandı. Araştırılmak üzere seçilen miRNA'lar çizelge 1.3'te verildi. Bu miRNA'ların kanserde rol oynadığı bilinmektedir. Bu amaç için 5 cNF, 5 pNF ve 1 kontrol doku örneği kullanılarak kRT-PCR analizi ile değerlendirilmiştir. Bu tez çalışmasının NF1 tümör dokularında mitomiR'lerin varlığı ve fonksiyonlarının araştırılması ile ilgili öncü bir çalışma olabileceği düşünülmektedir.



2. GEREÇ VE YÖNTEMLER

2.1 Çalışmada Kullanılan Gereçler, Kimyasallar ve Çözeltiler

2.1.1 Doku kesiti malzemeleri

Bistüri ucu no: 20

RPMI1640 taşıma besi yeri (Gibco)

90X15 mm tek kullanımlık şeffaf plastik petri kabı

Sıvı azot

15 ml'lik tek kullanımlık tüp

2.1.2 İmmünfloresan boyama malzemeleri

Tuzlu fosfat tamponu

(Phosphate-Buffered Saline, PBS) : pH: 7,4, 1X (Sigma)

Sığır serum albumini (BSA) : %3 / PBS (a/h)

Keçi serumu (Sigma) : %10 / PBS (h/h)

DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol) : 1mg/ml stok

Birincil antikor : Tavşan anti-S100 poliklonal antikor
(DAKO)

Floresan işaretli ikincil antikor : Anti-tavşan Alexa Fluor 568
(Molecular Probes)

Lamel kapatma solüsyonu : Fluoromount™ Aqueous Mounting
Medium (Lot# SLBR5174V) (Sigma)

Doku dondurma ortamı (OCT/JUNG)

Oje

Dakocytomation Pen (PAP-PEN)

Kriyotom (Leica CM1860 UV)

Leica DM2000 LED floresan mikroskop

2.1.3 Mitokondri izolasyonu

“Qiagen TissueRuptor II” cihazı

Qproteome mitokondri izolasyon kiti Katalog No: 37612, Lot No: 169024979

Sodyum klorür (Sigma) : %0,9 / Distile su (a/h)

Sıvı azot

Sıvı azota dayanıklı seramik havan

2.1.3.1 Mitokondri izolasyonunu doğrulamak için yapılan PZR

“Qiagen Rotor-Gene Q” cihazı

QuantiTect SYBR® green PCR kit Katalog No: 204143/204163

Distile su

Sentebiolab tRNA^{leu (UUR)} primer-forward : 5'-CACCCAAGAACAGGGTTTGT-3'

Sentebiolab tRNA^{leu (UUR)} primer-reverse : 5'-TGGCCATGGGTATGTTGTTA-3'

2.1.4 Mitokondriyel miRNA izolasyonu ve konsantrasyon ölçümü

miRNeasy mini kit (50) Katalog No: 217004, Lot No: 169014193

Qiazol lysis reagent 50 ml Mat. No: 1023537, Lot No: 56901226

Thermo Scientific NanoDrop® ND-1000 Spektrofotometre cihazı

2.1.5 Komplementer DNA sentezi

miRCURY LNA RT Kit Katalog No: 339345, Lot No: 7690968

Nükleaz içermeyen distile su

2.1.6 Kantitatif gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu

Qiagen Rotor-Gene Q

miRCURY LNA SYBR green PCR kit Katalog No: 339345, Lot No: 7690968

miRCURY miRNA assay (U6 snRNA) Lot No: 20103903-5

miRCURY miRNA assay (hsa-miR-22-3p) Lot No: 201803080053-5

miRCURY miRNA assay (hsa-miR-1290) Lot No: 20400424-1

miRCURY miRNA assay (hsa-miR-122-5p) Lot No: 11001668-2

miRCURY miRNA assay (hsa-miR-107) Lot No: 20201934-3

miRCURY miRNA assay (hsa-miR-29a-3p) Lot No: 201803080024-3

miRCURY miRNA assay (hsa-miR-3934-5p) Lot No: 10805582-1

miRCURY miRNA assay (hsa-miR-484)	Lot No: 201910030001-2
miRCURY miRNA assay (hsa-miR-217)	Lot No: 201812130267-1
miRCURY miRNA assay (hsa-miR-34a-5p)	Lot No: 10806865-2
miRCURY miRNA assay (hsa-miR-133a-3p)	Lot No: 202002270023-3
miRCURY miRNA assay (hsa-miR-21-5p)	Lot No: 201906130014-5

2.1.7 DNA agaroz jel elektroforez malzemeleri

Agaroz	Katalog No: A9539-500G; Lot # SLBD4156V (Sigma)
--------	--

Yükleme tamponu:

Gliserol (Merck)	5,5 ml
1X TAE tamponu	4,5 ml
Orange G boya (Merck)	0,01 g
Tris-asetat tamponu (pH 8.0):	
Tris baz (Merck)	2 M
Glasiyel asetik asit (Merck)	1,14 ml
Na ₂ EDTA (Merck)	0,5 M
EasyStain III (20,000X, Safe Alternative to EB)	Katalog No: A4209 (Biomatik)
Moleküler ağırlık belirleyicisi (Biyomatik)	: 100bp DNA "ladder"

2.2 Yöntemler

2.2.1 Bireylerin klinik özellikleri, NF1 tümör dokularının elde edilmesi alımı ve dondurulması

Hacettepe Üniversitesi İhsan Doğramacı Çocuk Hastanesi Pediatrik Nöroloji Ünitesine başvurup NF1 tanısı almış hastalardan kendi istekleri ile Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Plastik, Rekonstrüktif ve Estetik Cerrahi Anabilim Dalında cerrahi operasyonla çıkartılmış cNF ve pNF tümör dokuları bu tez çalışmasında kullanıldı. Doku örneklerinin bir kısmı Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Patoloji Anabilim Dalına gönderilirken kalan kısmı RPMI 1640 taşıma besiyerleri (Gibco) içerisinde kısa bir süre içerisinde TOBB ETÜ Tıp Fakültesi Morfoloji Laboratuvarları'na ulaştırıldı.

Bu dokular 90x15 mm'lik petri kaplarına aktarıldıktan sonra 20 no'lu bistüriler yardımı ile 1 cm³'lük parçalara bölündü. Bu parçaların bir kısmı sıvı azotta taze dondurulup (fresh frozen) daha sonra kullanılmak üzere -80°C'de saklandı. Dokuların kalan diğer parçaları doku dondurma ortamı içerisinde daha sonra kesit almak amacıyla donduruldu ve -80°C'de saklandı. Kalan parçalar ise trizol içerisinde alınarak -80°C'de saklandı.

Çalışmada biri kontrol doku, beşi cNF ve beşi pNF doku örneği olmak üzere toplam 11 örnekle çalışıldı. Hasta bireylerin kişisel bilgilerinin gizlemek adına hastalar K (Kontrol, CALM doku örneği), cNF (kütanöz tümör örneği) ve pNF (pleksiform tümör örneği) olarak isimlendirildi ve numaralandı.

CALM'lar, NF1 hastalarında en yaygın neoplastik olmayan pigment bozukluklarıdır. Biallelik *NF1* gen inaktivasyonuna sahip melanosit hücrelerinin yoğun bir şekilde birikmesiyle oluşmaktadır (Gutmann ve diğ., 2017).

Çizelge 2.1'de tez çalışmasında yer alan hastalara ait klinik özellikler verilmektedir.

Çizelge 2.1: Hastaların klinik özellikleri.

Hasta	Cinsiyet	Allesel	NF Odakları	Lezyon	Nodüller	Café-au-lait	Nevüz anemicus	Aksiller Çillenme	İnguinal Çillenme	Kutanöz NF	Pleksiform NF	Ksantogram	Atrakoid Kist	Hamartom	Lisch Nodülü	Öğeme Güçlüğü	Unutkanlık	Konusma Güçlüğü	Omurga Eğriliği	İştme Kaybı	Diğer
K	K		x	x		x				x											
cNF-1	K	x	x			x				x									x		
cNF-2	K	x		x		x				x											
cNF-3	E				x	x				x					x						
cNF-4	E			x						x	x										
cNF-5	E			x						x										x	
pNF-1	K		x	x							x		x				x				Kan kusma
pNF-2	E	x	x			x			x		x		x								Sol böbrek agenezisi, beyinde (sol orbita) NF uyumlu kitle, Yüz: Sol taraf asimetri, sol göz kapağı düşüklüğü
pNF-3	E	x		x		x				x	x	x									Sağ tibial psödoartrozu
pNF-4	E					x	x				x									x	Böbreklerde heterojenite, yaygın kaşınmaz izleri, gövde ön-arka yüzde kserozis
pNF-5	K	x		x		x		x	x		x					x	x	x			Büyüme geriliği, kemik yaşı ileri, sol memede ağrı ve şişlik, sağ göğüste şişlik

Tüm çalışmalar TOBB-ETÜ Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'nun onayı alınarak (KA EK-118/088) gerçekleştirilmiştir (EK-1).

2.2.2 Taze dondurulmuş doku kesiti

Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Plastik, Rekonstrüktif ve Estetik Cerrahi Anabilim Dalından alınıp -80°C 'de saklanan doku örneklerinin Tıbbi Patoloji Anabilim Dalında patolojik tanıları doğrulandıktan sonra -80°C 'de dondurma ortamı içerisinde saklanan örneklerden immünboyama için kesit alındı.

Bu amaç için doku -80°C 'den çıkarılıp çözünmeden ortasından Leica CM1860 UV cihazı yardımıyla 5 mikron kalınlığında "frozen" kesitler alındı ve elde edilen bu seri kesitler immünfloresan boyama için adeziv mikroskop lamaları üzerine alındı. Boyama işlemine kadar -80°C 'de saklandı.

2.2.3 İmmünfloresan boyama

İmmünfloresan boyamanın amacı, florokrom olarak isimlendirilen kimyasal, renk veren maddelerle doku ve hücrelerdeki moleküllerin görünür hale getirilmesidir.

Bu çalışmada önceden kesit alınmış örnekler kullanıldı. Lamlardan biri negatif kontrol amaçlı kullanıldı. Bu deneyde ilk olarak lamalar -80°C 'den çıkarılıp 30 dakika kurumaları için oda sıcaklığında bekletildi. Lamlar -20°C 'de soğutulan aseton içerisine konarak 4°C 'de 15 dk bekletildikten sonra asetondan çıkartılarak 3-4 dk oda sıcaklığında bekletildi. Doku kesitlerinin kurumaması için bir lam saklama kutusu içerisine musluk suyu konduktan sonra kalan asetonun uzaklaştırılması için lamalar bu suya hafifçe daldırılarak yıkandı ve lamalar suya değmeyecek şekilde kutuya yerleştirildi. Daha sonra doku kesitlerinin çevresi PAP-PEN ile çizildi. Doku kesitlerinin üzerlerini tamamen kapatacak şekilde %3 BSA-PBS içerisinde %10 oranında sulandırılmış keçi serumundan 50 μl her kesit üzerine eklendi. Kutunun kapağı kapatılarak 4°C 'de 30 dk bekletilerek kesitler bloke edildi. Bekleme işleminden sonra kesitlerin üzerindeki %3 BSA / PBS içerisinde %10 keçi serumundan oluşan solüsyon uzaklaştırılıp yıkama yapılmadan %3 BSA-PBS ile 1/1000 oranında sulandırılmış primer antikordan (Tavşan anti-S100 poliklonal antikoru (DAKO)) 50 μL kesitlerin üzerine eklendi. Kontrol amaçlı kullanılan lama 50 μl %3 BSA-PBS çözeltisi eklendi ve gece boyu 4°C 'de bekletildi. Reaksiyonun hızlanması için gece boyu 4°C 'de bekletilen kesitler oda sıcaklığında 1 saat bekletildi. Primer antikor uzaklaştırıldı ve musluk suyu ile yıkama yapılarak her kesitin üzerine 50 μl %3 BSA-PBS ile 1/1000 oranında sulandırılmış floresan işaretli sekonder antikor (poliklonal tavşan anti-S100 antikoru, Alexa Flour 488) eklendi ve lamaların bulunduğu kutu ışık girmemesi için alimünyum folyoya sarılarak karanlıkta 45 dk bekletildi.

Daha sonra sekonder antikor uzaklaştırıldı, kesitler lam saklama kutusundaki musluk suyuna hafifçe daldırılarak yıkandı ve hücre çekirdeklerinin görünür hale gelebilmesi için üzerlerine 50 µl 1/1000 oranında PBS ile sulandırılmış DAPI eklenerek 5 dk karanlıkta bekletildi. Son olarak DAPI uzaklaştırılıp yıkama yapıldı ve kesitlere “Fluoromount™ Aqueous Mounting Medium” (Sigma) konularak lam ile üzerleri kapatıldı. Doku kesitlerinin fotoğrafları TOBB ETÜ Tıp Fakültesi Morfoloji Laboratuvarları’nda bulunan Leica DM2000 LED floresan mikroskop ile çekildi.

2.2.4 Sıvı azotta doku parçalanması

Mitokondri izolasyonu yapılmadan önce dokular parçalanmak zorundadır. Bu amaç için ilk olarak kullanılacak havan, tüpler ve diğer malzemeler sıvı azot dökülerek soğutuldu. Daha sonra doku parçacıkları tek kullanımlık petrilere alındı. Tümör dokularının beyaz renkli ve sert kısımlarından yaklaşık 100 mg alındı ve doku 1 ml %0,9 sodyum klorür ile yıkandı. Sodyum klorür uzaklaştırıldıktan sonra dokular bistüri ile olabildiğince küçük parçalandı. Doku parçaları havan içerisine alınıp üzerine sıvı azot eklenerek toz haline gelene kadar ezildi. Toz haline gelmiş doku parçaları 50 ml’lik tüpe alındı.

2.2.5 Mitokondri izolasyonu

Mitokondri izolasyonu için Qiagen Qproteome mitokondri izolasyon kiti üreticinin talimatlarına göre optimize edilerek kullanıldı (Katalog No: 37612, Lot:169024979). İzolasyon yapılmadan önce “distruption” ve “lysis” solüsyonlarına 1/100 oranında proteaz inhibitör solüsyonu eklendi.

Sıvı azotta parçalanan dokular 50 ml’lik tüpe alındıktan sonra üzerlerine 500’er µL lizis tamponu eklenerek “Qiagen Tissue Ruptor II” ile tekrar homojenize edildi. Homojenizasyon buz üzerinde cihazın orta hız ayarı kullanılarak gerçekleştirildi. Homojenatların üzerine 1,5 ml “lysis” solüsyonu eklendi ve 4°C’de karıştırıcı üzerinde cihazın 4 numaralı hız ayarında 40 dk karıştırıldı. Daha sonra örnekler 1000xg’de 10 dk 4°C’de santrifüj edildi. Santrifüjden sonra süpernatant atıldı ve her pelletin üzerine 1,5 ml “distruption” solüsyonu eklenerek tekrar “Qiagen Tissue Ruptor II” cihazı yardımıyla homojenize edildi. Örnekler 1000xg’de 10 dk 4°C’de santrifüj edildi. Süpernatantlar 2 ml’lik tüplere aktarıldı ve tekrar 1000xg’de 10 dk 4°C’de santrifüj edildi. Santrifüjden sonra süpernatantlar farklı 2 ml’lik tüplere alınarak 6000xg’de 10 dk 4°C’de santrifüj edildi. Süpernatantlar atıldı.

Bu aşamadan sonra üreticinin talimatlarına göre yüksek saflıkta (high purity) mitokondri izolasyon protokolü takip edildi. Bu amaç için santrifüjden sonra elde edilen pelletlerin her birine 750 µl mitokondri saflaştırma solüsyonu eklendi. Bu sırada farklı 2 ml'lik tüplerin her birine 750 µl mitokondri saflaştırma solüsyonu eklendi. 750 µl mitokondriyel saflaştırma solüsyonu eklenen 2 ml'lik tüplerin tam altına yavaşça 500 µl “distruption” solüsyonu eklendi. Daha sonra pellet-mitokondri saflaştırma solüsyonundan oluşan karışım diğer tüpteki mitokondri saflaştırma solüsyonunun tam üzerine yavaşça eklenerek faz oluşumu sağlandı ve örnekler 14000xg'de 15 dk 4°C'de santrifüj edildi.

Santrifüjden sonra her süpernatanın 1,5 ml'si atıldı. Kalan, mitokondri pelletini içeren 0,5 ml karışımlar ise farklı 2 ml'lik tüplere aktarıldı. Pelletler 1,5 ml mitokondri “storage” solüsyonuyla seyreltildi ve 8000xg'de 10 dk 4°C'de santrifüj edildi. Tekrar her süpernatanın 1,5 ml'si atıldı, kalan 0,5 ml'lik pellet ve süpernatan karışımının üzerine 1,5 ml mitokondri “storage” solüsyonu eklendi. Tekrar 8000xg'de 10 dk 4°C'de santrifüj yapıldı. Santrifüjden sonra 2 ml'lik tüpte yaklaşık 20 µl mitokondri “storage” solüsyonu kalacak şekilde süpernatan atıldı ve örnekler bir sonraki aşama için -20°C'de saklandı.

2.2.5.1 Mitokondri tRNA^{Leu(UUR)} primer PZR

Tümör doku örneklerinden mitokondri izole edildiğini doğrulayabilmek adına bir gerçek zamanlı PZR reaksiyonu kuruldu. İzole edilen mitokondri örnekleri -20°C'den alındı ve buz üzerinde çözüldü. Bu amaç için 1.3.1 numaralı bölümde bahsedilen tRNA^{Leu(UUR)} primeri kullanıldı. Primer dizileri 2.1.3.1 numaralı bölümde verildi.

Gerçek zamanlı PZR reaksiyon şartları:

Qiagen QuantiTech Master Mix	: 5 µL
tRNA ^{Leu(UUR)} Forward Primer	: 0,8 µL
tRNA ^{Leu(UUR)} Reverse Primer	: 0,8 µL
DNA	: 1,5 µL
dH ₂ O	: 1,9 µL
	<hr/>
	10 µL

Tepkime koşulları:

95°C'de	2 dk	
95°C'de	15 sn	} X 40 döngü
50°C'de	30 sn	
72°C'de	40 sn	
72°C'de	40 sn	

2.2.6 Mitokondriyel miRNA izolasyonu

Çalışmanın bu kısmında gerçek zamanlı PZR analizi ile mitokondri izolasyonunun yapıldığı doğrulandıktan sonra Qiagen miRNeasy mini kit (50) (Katalog No:217004, Lot No:169014193) kullanılarak mitomiR izolasyonu gerçekleştirildi. İzolasyon üreticinin talimatlarına uygun bir şekilde gerçekleştirildi. Önceden izole edilip -20°C'de muhafaza edilen mitokondrilerin üzerine 700 µl Qiazol eklenerek 5 dk oda sıcaklığında bekletildi. Örnekler 140 µl kloroform eklenerek 15 sn çalkalandı. Örnekler oda sıcaklığında 3 dk bekletildikten sonra, 12000xg'de 15 dk 4°C'de santrifüj edildi ve bundan sonraki tüm aşamalar için santrifüj 25°C'ye ayarlandı. Santrifüjden sonra tüplerin en üstünde oluşan sulu (aqueous) faz yeni RNaz içermeyen 2 ml'lik tüplere aktararak üzerlerine 1'er hacim %70 etanol eklenip vorteks yardımıyla karıştırıldı. Örnekler maksimum 700 µl olacak şekilde mini "spin" kolona kondu. 8000xg'de 15 sn 25°C'de santrifüj edildi. Hacmi fazla olan örnekler için bu iki işlem tekrarlandı. Kolondan geçen solüsyon RNaz içermeyen 2 ml'lik tüplere aktarıldı. 2 ml'lik tüplere aktarılan solüsyonlara 450 µl %100 etanol eklenip vorteks yardımıyla karıştırıldı. Farklı birer mini "spin" kolona 700 µl örnek kondu ve 8000xg'de 15 sn, 25°C'de santrifüj edildi. Hacmi fazla olan örnekler için bu iki işlem tekrarlandı. Kolondan geçen solüsyon uzaklaştırıldı ve santrifüj aynı değerlerle tekrarlandı. Mini "spin" kolonlara 500 µl RPE solüsyonu eklenip, 8000xg'de 15 sn, 25°C'de santrifüj edildi. Kolonlardan geçen solüsyon uzaklaştırıldı. Daha sonra mini "spin" kolonlara 500 µl %80 etanol eklenip 8000xg'de, 2 dk, 25°C'de santrifüj edildi. Kolonlar yeni birer koleksiyon tüpüne yerleştirilip kapakları açık şekilde 8000xg'de 5 dk, 25°C'de santrifüj edildi. Mini "spin" kolonlar RNaz içermeyen 1.5 ml'lik tüplere yerleştirildi. Üzerlerine 14 µl RNaz içermeyen su kolon membranının tam üzerine eklendi.

Tüplerin kapakları kapatılıp 1 dk beklendi. Daha sonra 8000xg'de 1 dk, 25°C'de iki defa santrifüj edildi. Örnekler kullanılacakları zamana kadar -20°C'de saklandı.

2.2.7 Komplementer DNA sentezi

MitomiR izolasyonu yapılan 11 örnekten cDNA sentezi yapmak için miRCURY LNA RT Kit (Katalog No: 339345, Lot No: 7690968) kullanıldı. Bu amaç için üreticinin talimatları uygulandı. Reaksiyon biter bitmez örnekler gerçek zamanlı PZR analizi için -20°C'de saklandı. Başlamadan önce üreticinin talimatlarına uygun olarak kit içersinde bulunan "UniSp6 RNA spike-in"e 80 µl nükleaz içermeyen distile su eklenip vorteks yardımıyla karıştırıldı. 30 dk buzda bekletildikten sonra tekrar vorteks ile karıştırıldı ve porsiyonlanarak -20°C'de muhafaza edildi.

cDNA sentezi için PZR reaksiyon şartları:

5X miRCURY RT reaction buffer	: 2 µl
Nükleaz içermeyen distile su	: 4,5 µl
10X miRCURY RT enzyme mix	: 1 µl
RNA spike-in	: 0,5 µl
Kalıp RNA (5 ng/uL)	: 2 µl
<hr/>	
	10 µl

Tepkime koşulları:

Reaksiyon revers transkripsiyon	: 42°C'de	60 dk
Reaksiyonun inaktivasyonu	: 95°C'de	5 dk

2.2.8 Kantitatif gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu

cDNA sentezi yapılan mitomiR'lerin ifadesini analiz etmek için "miRCURY LNA SYBR Green PCR" kit ve kRT-PZR yöntemi kullanıldı Bu amaç için PZR primerleri önce hafifçe vorteks ile karıştırıldı ve santrifüj edildikten sonra üzerine 220 µl nükleaz içermeyen su eklenip oda sıcaklığında 20 dk inkübe edildi.

Daha sonra tekrar vorteks ile karıştırılıp, santrifüj edildikten sonra, porsiyonlandı ve -20°C'de muhafaza edildi. cDNA'lar reaksiyondan önce 1:15 oranında sulandırılarak kullanıldı.

Gerçek zamanlı PZR reaksiyon şartları:

2X miRCURY SYBR Green Mix	: 5 µl
PZR Primer Karışımı	: 1 µl
Kalıp cDNA (1:15)	: 4 µl
	<hr/>
	10 µl

Tepkime koşulları:

Başlangıç ısı aktivasyonu	: 95°C'de	2 dk	} X 40 döngü
Denatürasyon	: 95°C'de	10 sn	
Bağlanma ve uzama aşamaları	: 56°C'de	60 sn	
Erime eğrisi analizi	: 60-95°C		

2.2.9 Agaroz jel elektroforezi

kRT-PZR analizi sonucunda elde edilen mitomiR'ler %2,5'luk agaroz jel elektroforezinde yürütüldü. Bunun için 150 ml %2,5 agaroz (Sigma) /TAE hazırlandı ve DNA bantlarını görünür hale getirebilmek için 5µl "EasyStain III" (Biomatik) eklendi. Bant büyüklüklerini saptayabilmek için markör olarak 100 bp markör (Biomatik) kullanıldı.

2.2.10 İstatistiksel analizler

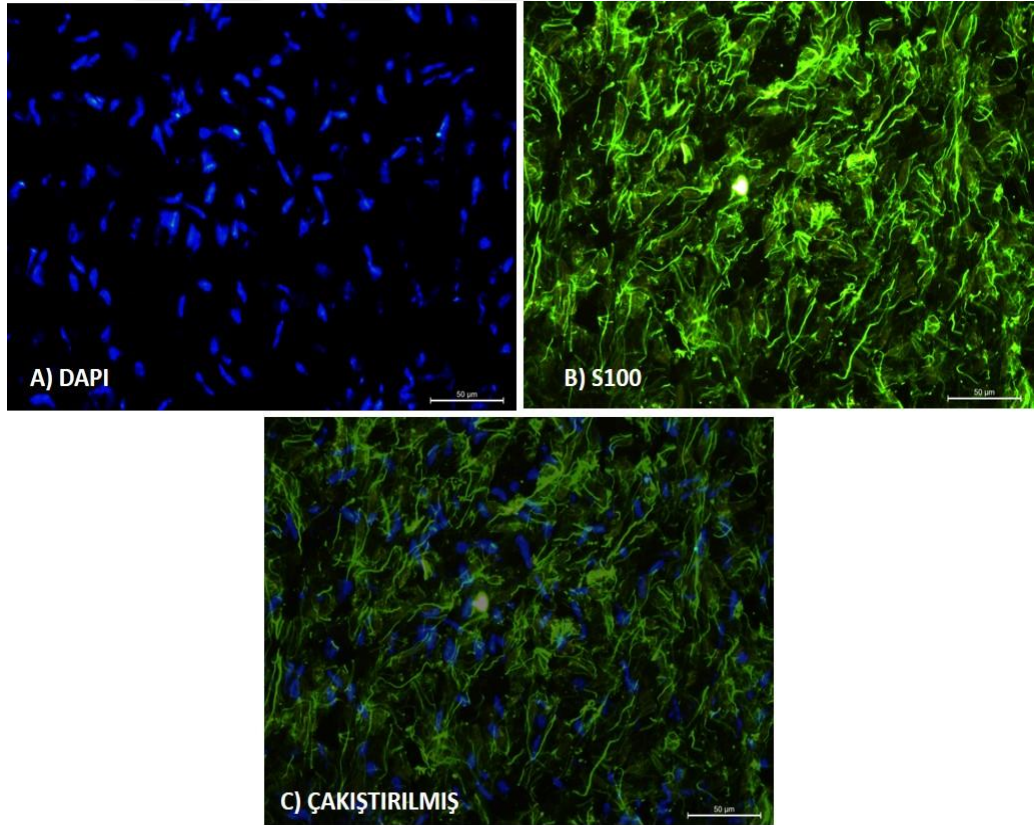
Elde edilen verilerin normal dağılıma uygunluğu grafiksel olarak ve Shapiro-Wilk testi ile incelendi. İncelenen tüm miRNA değerlerinin aşırı değerler içerdiği, çarpık olduğu (normal dağılmadığı) belirlendi. miRNA değerlerini tanımlamak için ortanca (min-maks) değerleri ile birlikte anlaşılabilirliği arttırmak ve literatür ile karşılaştırılabilmesi için ortalama değerleri de gösterildi. Normal dağılmayan miRNA değerlerini tümör türüne göre karşılaştırmak için Mann-Whitney testi kullanıldı. miRNA değerlerine logaritmik (LN) dönüşüm uygulandı.

LN dönüşümü sonrasında tüm miRNA değerlerinin normal dağılıma uydukları görüldü. LN miRNA değerlerini tümör türlerine göre karşılaştırmak için student's t testi kullanıldı. İstatistiksel analiz, hesaplamalar ve grafik çizimi için Ms-Excel 2016 ve IBM SPSS Statistics 22.0 (IBM Corp. Released 2013. IBM SPSS Statistics for Windows, Version 22.0. Armonk, NY, IBM Corp.) programları kullanıldı. İstatistiksel kararlarda $p < 0.05$ anlamlı farklılığın göstergesi olarak kabul edildi.

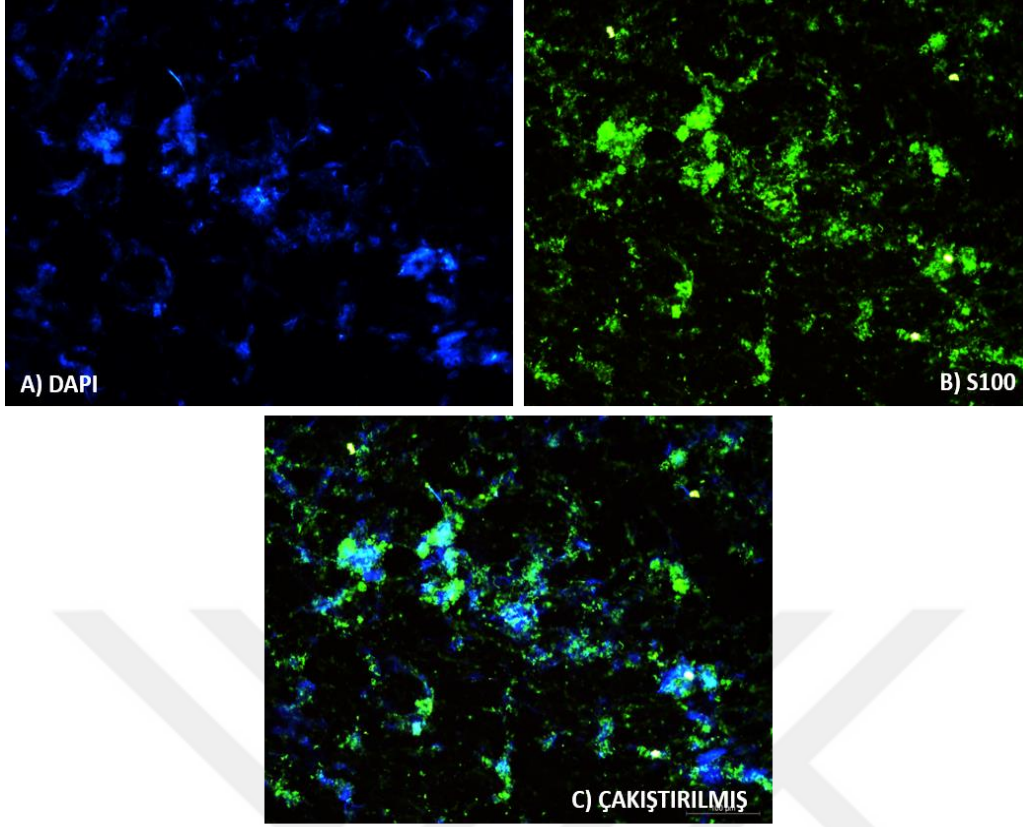
3. BULGULAR

3.1 Tümör Dokularında Schwann Hücrelerinin Varlığı ve Yerleşiminin Gösterilmesi

NF1 tümör dokularının ana bileşeni Schwann hücreleridir. Bu nedenle NF1 tanısı almış hastalardan Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Plastik ve Rekonstrüktif ve Estetik Cerrahi Anabilim Dalı tarafından cerrahi yöntemlerle çıkarılan tümör doku örneklerinin tümör dokusu olup olmadıklarının tespit edilmesi amacıyla örnekler Schwann hücre belirteci olan anti-S100 antikoruna boyandı (Resim 3.1, resim 3.2).



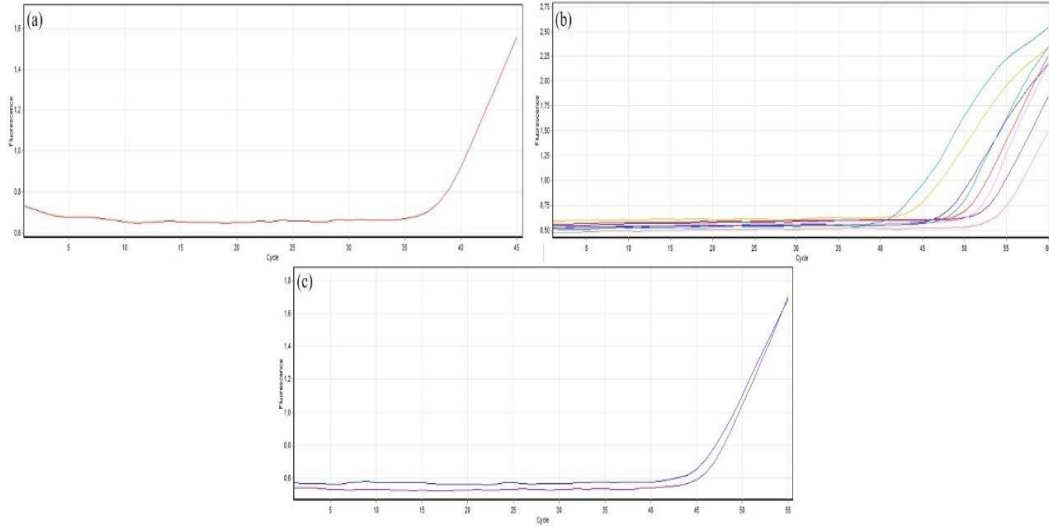
Resim 3.1: Kütanöz nörofibrom tümör doku örneğinin insan Schwann hücrelerinde immünfloresan boyaması A) Mavi nükleer, DAPI, B) anti-S100 ile boyanmış Schwann hücreleri, C) Çakıştırılmış (40X).



Resim 3.2: Pleksiform nörofibrom tümör doku örneğinin insan Schwann hücrelerinde immünfloresan boyaması A) Mavi nükleer, DAPI, B) anti-S100 ile boyanmış Schwann hücreleri, C) Çakıştırılmış (40X).

3.2 Mitokondri İzolasyonu ve Doğrulanması

Hastalardan alınan doku örneklerinin tümör dokusu oldukları doğrulandıktan sonra tüm doku örneklerinden bir parça alınıp uygun şartlar altında “Qiagen Qproteome” mitokondri izolasyon kiti kullanılarak mitokondri izolasyonu yapıldı. Mitokondri izolasyonunun doğru ve başarılı bir şekilde gerçekleştiğini tespit etmek için Sentebiolab firması tarafından sentezlenen tRNA^{leu(UUR)} primerleri ve “Qiagen Quantitect master mix” kullanılarak gerçek zamanlı PZR yapıldı. Örneklerle ait gerçek zamanlı PZR görüntüleri Şekil 3.1’de verildi.



Şekil 3.1: tRNA^{leu(UUR)} primerleri ile gerçekleştirilmiş gerçek zamanlı PZR görüntüsü (a) cNF-1 kodlu doku örneği (b) K, cNF-2, cNF-3, pNF-1 pNF-2, pNF-3, pNF-4, pNF-5 kodlu doku örnekleri (c) cNF-4, cNF-5 kodlu doku örnekleri.

Gerçek zamanlı PZR analiz sonuçları, tüm örneklerde tRNA^{leu(UUR)} primerlerinin mtDNA'ına bağlandığını, dolayısıyla mitokondri izolasyonunun başarılı bir şekilde gerçekleştiğini gösterdi (Şekil 3.1).

3.3 Tümör Dokularındaki Mitokondrilerde Seçilen miRNA'ların Gen İfadesinin Nicel Analizi

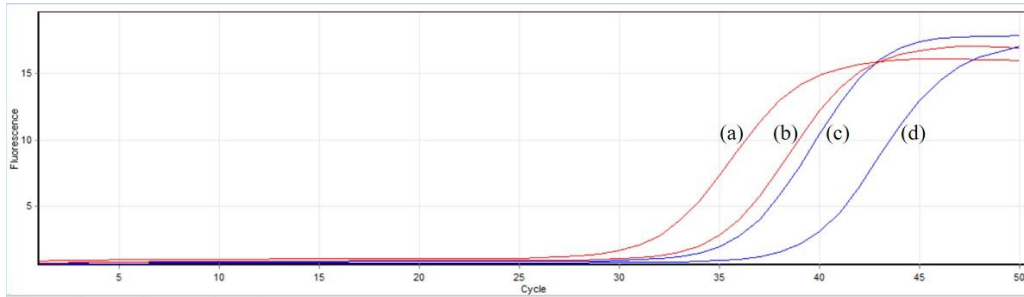
Tümör doku örneklerindeki mitomiR verilerinin analizi için mitokondrilerden miRNA izolasyonu miRNeasy mini kit (Qiagen) kullanarak gerçekleştirildi. Elde edilen mitomiR'lerin derişimleri Thermo Scientific NanoDrop® ND-1000 spektrofotometre cihazı ile ölçüldü. NanoDrop cihazında elde edilen absorbans değerleri ve mitomiR miktarı Çizelge 3.1'de verildi. MitomiR örneklerinin 260/230 oranlarının düşük olması, fenol kontaminasyonunun varlığını göstermektedir.

Çizelge 3.1: İzole edilen mitomiR'lerin konsantrasyonları ve saflık değerleri.

Hasta No	Konsantrasyon (ng/μL)	A260/A280	A260/A230
K	5,208	1,480	0,505
cNF1	156,036	1,568	0,320
cNF2	201,145	1,689	0,204
cNF3	14,773	1,423	0,496
cNF4	295,910	1,903	0,289
cNF5	91,969	1,536	0,509
pNF1	7,867	1,644	0,937
pNF2	30,252	1,577	0,962
pNF3	44,006	1,476	0,268
pNF4	17,152	1,422	0,147
pNF5	106,953	1,534	0,207

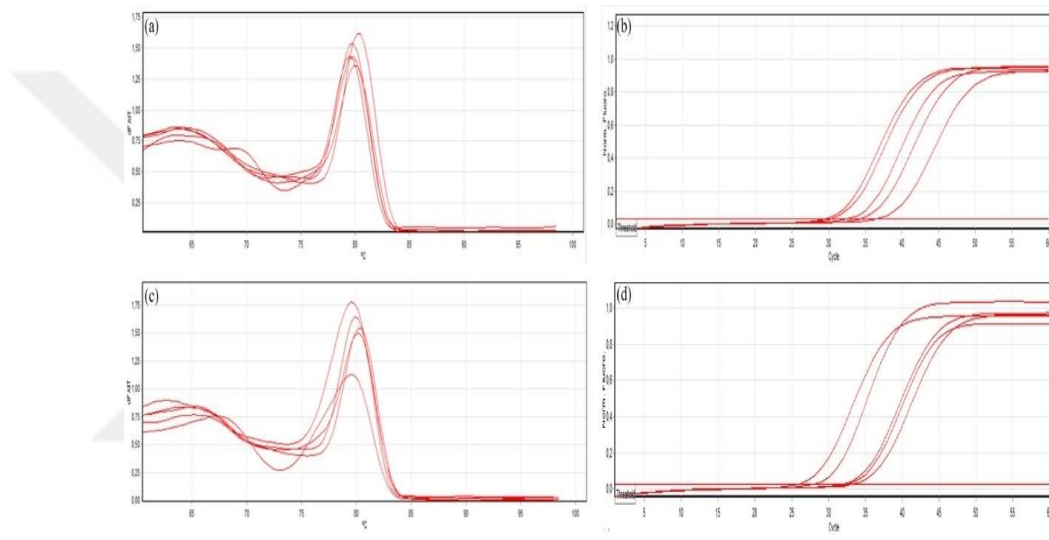
miRNA'ların uzunluğu ortalama 22 nükleotid olduğundan izole edilen mitomiR'lerin kalite kontrolü için agaroz jel elektroforez yöntemi kullanılmadı. Onun yerine miRNA'ların kantitatif gerçek zamanlı PZR analizlerinde iç kontrol geni olarak en çok kullanılan U6 (RNU6-1) snRNA'nin ifadesi analiz edildi.

Dokulardan elde edilen mitomiR örnekleri miRCURY LNA RT kiti (Qiagen) ile cDNA'ya çevrildi ve Qiagen miRCURY LNA SYBR Green PCR kiti ile sentezlenen cDNA'lardan ilk olarak U6 primerinin gen ifadesi analiz edilerek cDNA'ların doğru bir şekilde sentezlenip sentezlenmedikleri tespit edildi. Dondurulmuş dokulardan izole edilen mitomiR'lerin miktarı az olduğundan U6 primerleri kullanarak gereken cDNA miktarı için optimizasyon çalışması yapıldı. Bu çalışma sonucunda sentezlenen cDNA'ların 1/15 olarak sulandırılmasına karar verildi (Şekil 3.2).



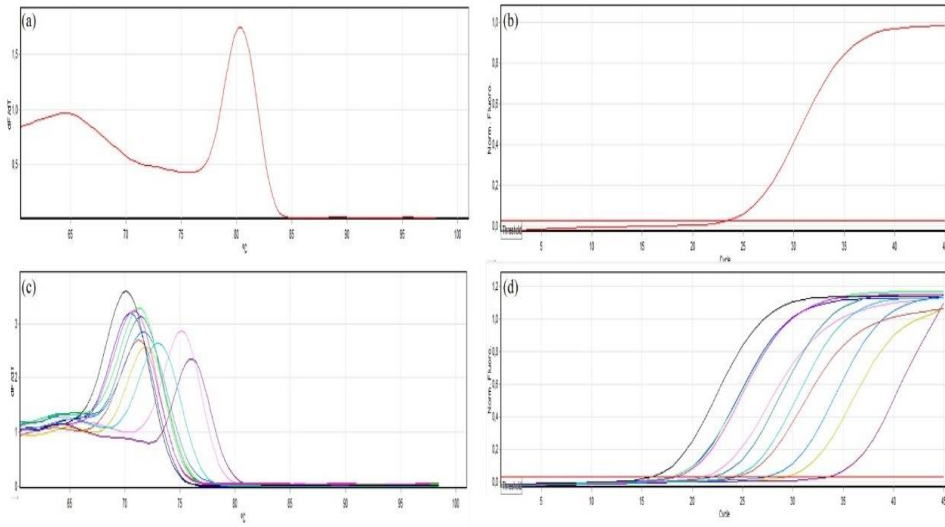
Şekil 3.2: cDNA miktarı için optimizasyon çalışmasına ait kRT-PZR (a) 1/15 seyreltme, (b) 1/30 seyreltme, (c) 1/45 seyreltme, (d) 1/60 seyreltme.

Bu optimizasyon çalışması sonucunda mitomiR'lerden sentezlenen tüm cDNA örnekleri 1/15 seyreltilerek kRT-PZR analizi için kullanıldı (Şekil 3.2). Bu örneklerde normalizatör gen olarak U6 snRNA primeri ile beraber 12 farklı mitomiR ifadesi kRT-PZR yöntemi kullanılarak analiz edildi. Hem U6 snRNA hem de seçilen tüm mitomiR'lerin ifadelerinin çalışıldığı reaksiyonlar için erime eğrisi analizi yapıldı (Şekil 3.3, 3.4, 3.5, 3.6, 3.7, 3.8, 3.9, 3.10, 3.11, 3.12, 3.13, 3.14, 3.15). Erime eğrilerine bakıldığında da her reaksiyon için tek bir tepe noktası (peak) görülmesi, hedef transkriptlerin özgül bir şekilde amplifiye edildiğini gösterdi. Tüm bu analizler Qiagen Rotor Gene Q analiz programı ile gerçekleştirildi.

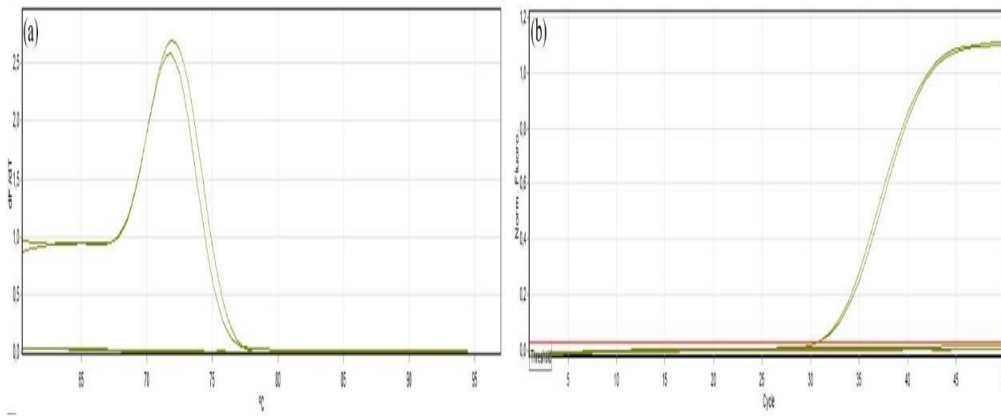


Şekil 3.3: U6 primeri erime eğrileri ve amplifikasyon eğrileri (a) K, cNF-2, pNF-1, pNF-3, pNF-4 erime eğrisi analizi; (b) K, cNF-2, pNF-1, pNF-3, pNF-4 amplifikasyon eğrisi; (c) cNF-3, cNF-4, cNF-5, pNF-2, pNF-5 erime eğrisi analizi; (d) cNF-3, cNF-4, cNF-5, pNF-2, pNF-5 amplifikasyon eğrisi analizi.

Şekil 3.3'e bakıldığında örneklerin tepe noktalarının aynı yerde olduğu görüldü. Aynı zamanda tüm örneklerin tepe noktaları gözlemlendi. Bu bulgular hedef transkriptlerin özgül bir şekilde amplifiye olduğunu gösterdi.

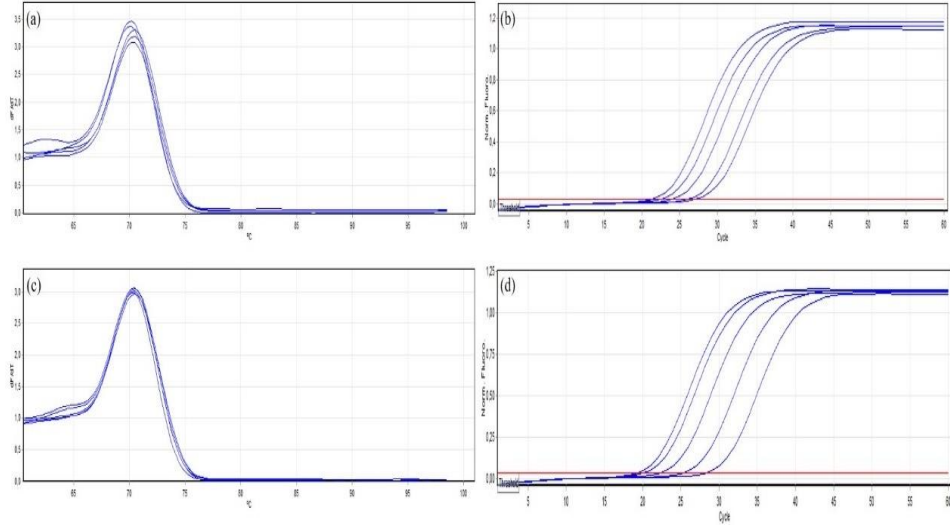


Şekil 3.4: cNF-1 için U6 primeri ve seçilen mitomiR'lerin erime ve amplifikasyon eğrileri (a) cNF-1 U6 primeri erime eğrisi analizi; (b) cNF-1 U6 primeri amplifikasyon eğrisi; (c) cNF-1, miR-217, miR-107, miR-122-5p, miR-34a-5p, miR-3934-5p, miR-484, miR-29a-3p, miR-1290, miR-22-3p, miR-21-5p, miR-133a-3p erime eğrisi analizi; (d) cNF-1, miR-217, miR-107, miR-122-5p, miR-34a-5p, miR-3934-5p, miR-484, miR-29a-3p, miR-1290, miR-22-3p, miR-21-5p, miR-133a-3p amplifikasyon eğrisi analizi.



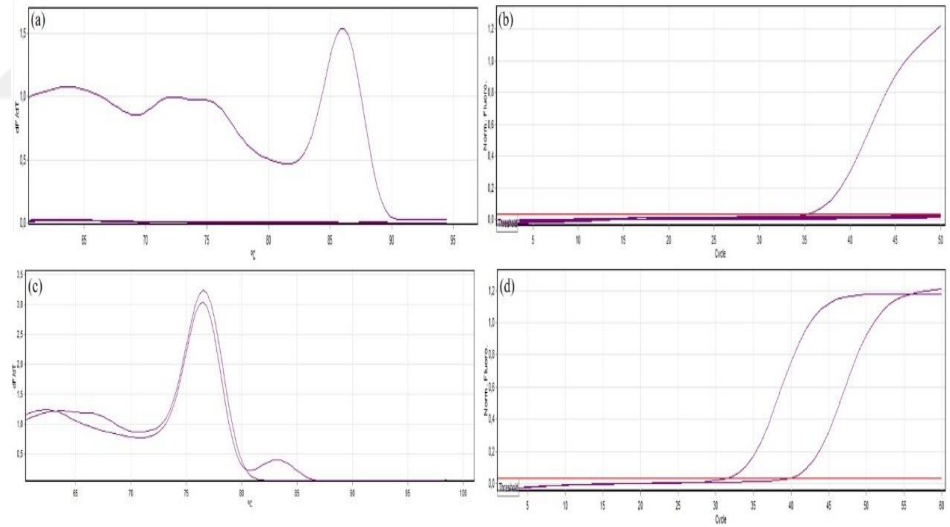
Şekil 3.5: miR-217 primeri erime eğrileri ve amplifikasyon eğrileri (a) cNF-5, pNF-4 erime eğrisi analizi; (b) cNF-5, pNF-4 amplifikasyon eğrisi analizi.

Şekil 3.5'te miR-217'nin bulgularına bakıldığında ise sadece cNF-5 ve pNF-4'te ifade olduğu gözlemlendi. Erime eğrilerine bakıldığında ise iki örneğin tepe noktaları aynı yerdedi ve iki örnekte tek birer tepe noktası bulunuyordu. Dolayısıyla örneklerin özgül bir şekilde amplifiye olduğu görüldü.



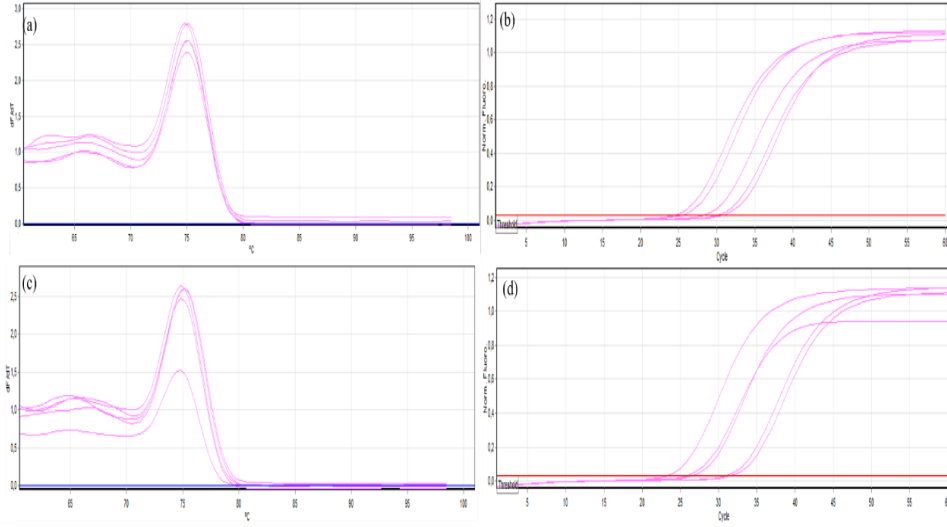
Şekil 3.6: miR-107 erime eğrileri ve amplifikasyon eğrileri (a) K, cNF-2, pNF-1, pNF-3, pNF-4 erime eğrisi analizi; (b) K, cNF-2, pNF-1, pNF-3, pNF-4 amplifikasyon eğrisi analizi; (c) cNF-3, cNF-4, cNF-5, pNF-2, pNF-5 erime eğrisi analizi; (d) cNF-3, cNF-4, cNF-5, pNF-2, pNF-5 amplifikasyon eğrisi analizi.

Şekil 3.6 miR-107'ye bakıldığında tüm örneklerin ifade edildiği ve erime eğrilerinde tepe noktalarının aynı yerde olduğu görüldü.



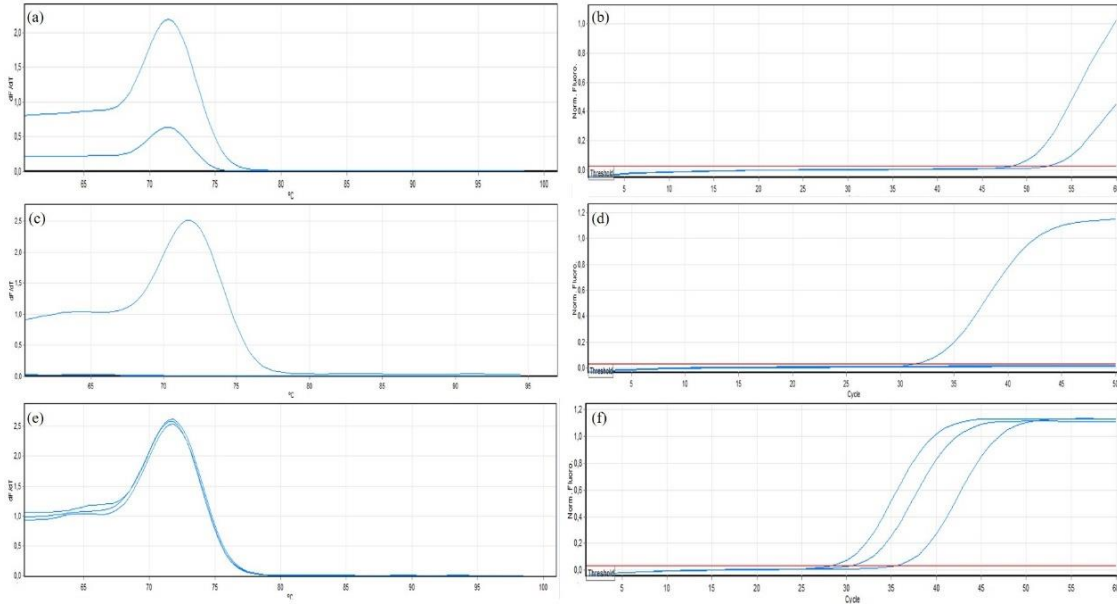
Şekil 3.7: miR-122-5p erime eğrileri ve amplifikasyon eğrileri (a) cNF-2 erime eğrisi analizi; (b) cNF-2 amplifikasyon eğrisi; (c) cNF-4, pNF-2 erime eğrisi analizi; (d) cNF-4, pNF-2 amplifikasyon eğrisi analizi.

Şekil 3.7 miR-122-5p'nin analizinde cNF-2, cNF-4 ve pNF-2 ifade oldu. Erime eğrilerine bakıldığında ise cNF-4 ve pNF-2'nin hedef transkriptinin özgül bir şekilde amplifiye olduğu görüldü. cNF-2'nin erime eğrisine bakıldığında ise 86°C'de tepe noktası bulunduğu görüldü.



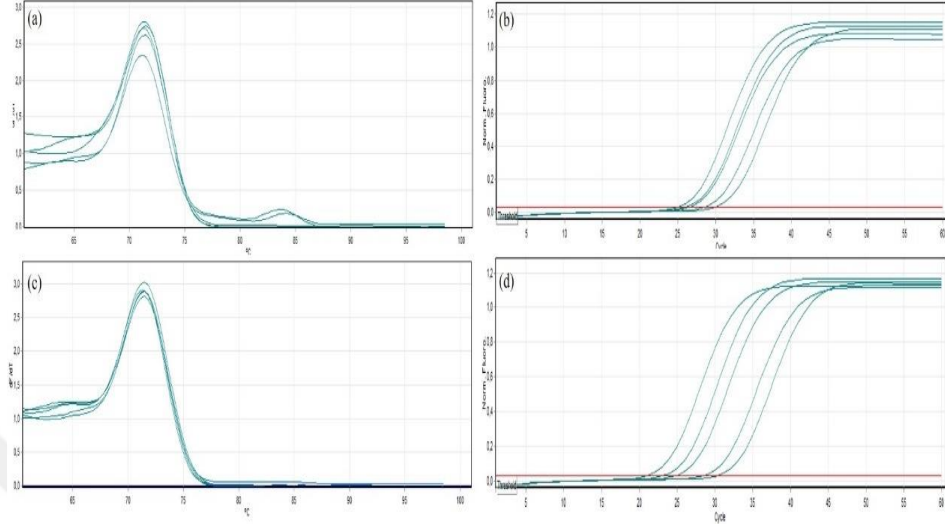
Şekil 3.8: miR-34a-5p erime eğrileri ve amplifikasyon eğrileri (a) K, cNF-2, pNF-1, pNF-3, pNF-4 erime eğrisi analizi; (b) K, cNF-2, pNF-1, pNF-3, pNF-4 amplifikasyon eğrisi; (c) cNF-3, cNF-4, cNF-5, pNF-2, pNF-5 erime eğrisi analizi; (d) cNF-3, cNF-4, cNF-5, pNF-2, pNF-5 amplifikasyon eğrisi analizi.

Şekil 3.8 miR-34a-5p'ye bakıldığında ise tüm örneklerin ifade olduğu ve erime eğrilerinin tepe noktalarının aynı yerde olduğu görüldü. Bu bulgular miR-34a-5p'nin özgül olarak amplifiye olduğunu gösterdi.

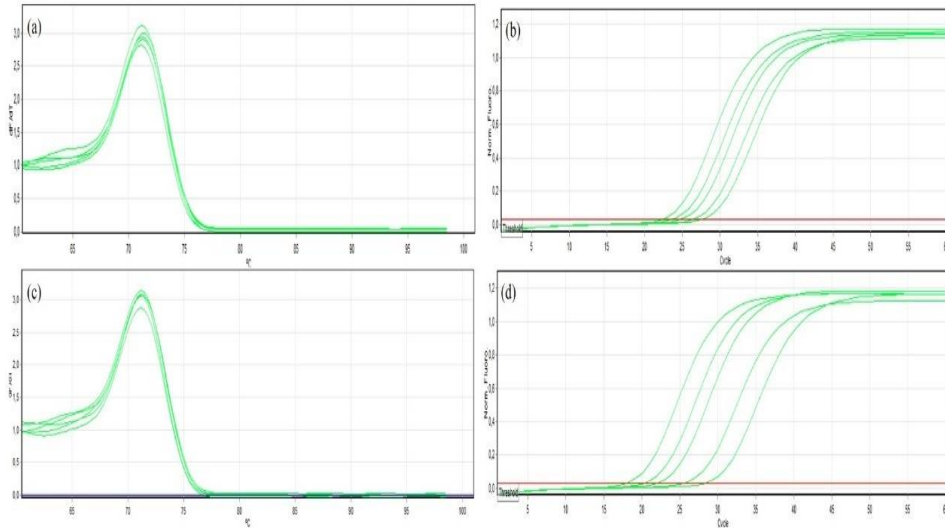


Şekil 3.9: miR-3934-5p erime eğrileri ve amplifikasyon eğrileri (a) K ve pNF-3 erime eğrisi analizi; (b) K ve pNF-3 amplifikasyon eğrisi; (c) cNF-2 erime eğrisi analizi; (d) cNF-2 amplifikasyon eğrisi analizi; (e) cNF-4, cNF-5, pNF-2 erime eğrisi analizi; (f) cNF-4, cNF-5, pNF-2 amplifikasyon eğrisi analizi.

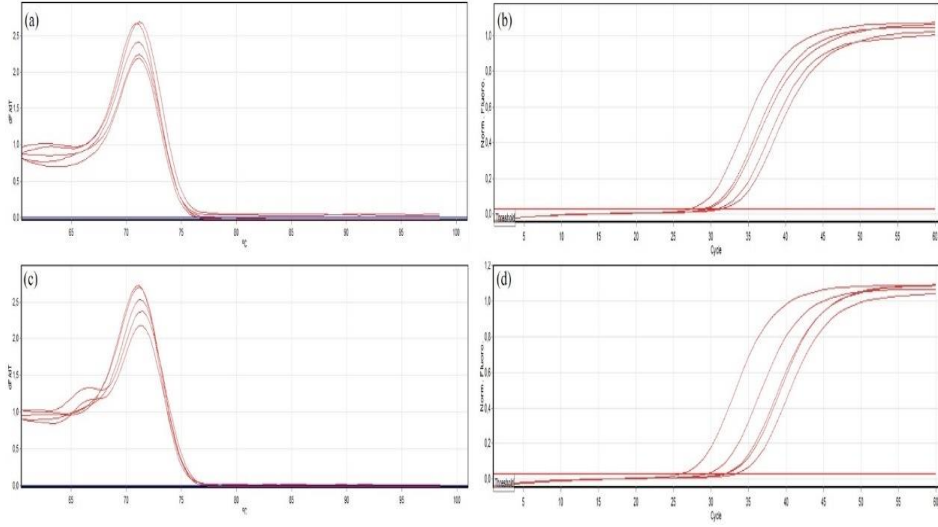
Şekil 3.9 miR-3934-5p'nin bulguları K, cNF-2, cNF-4, cNF-5, pNF-2 ve pNF-3'ün ifade olduğunu gösterdi. Bu örneklerin erime eğrisi analizleri ise miR-3934-5p'nin özgül bir şekilde amplifiye olduğunu gösterdi.



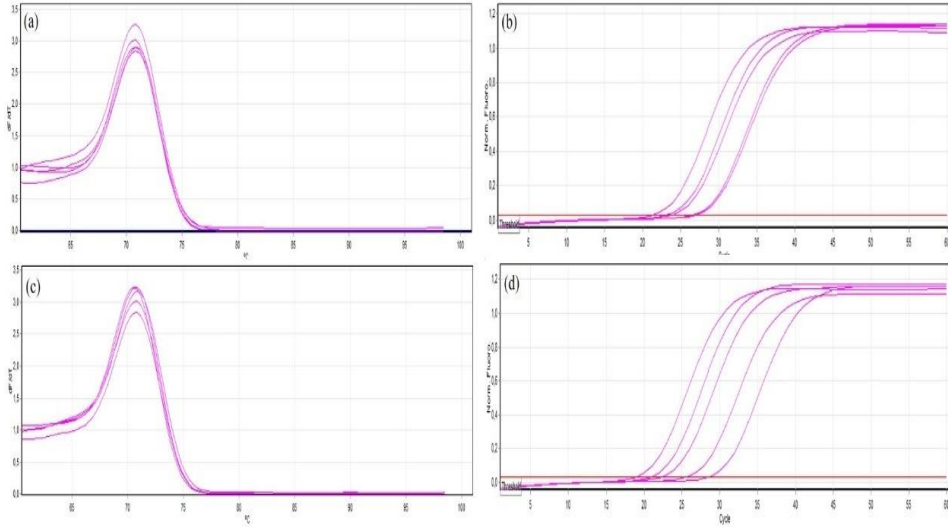
Şekil 3.10: miR-484 erime eğrileri ve amplifikasyon eğrileri (a) K, cNF-2, pNF-1, pNF-3, pNF-4 erime eğrisi analizi; (b) K, cNF-2, pNF-1, pNF-3, pNF-4 amplifikasyon eğrisi; (c) cNF-3, cNF-4, cNF-5, pNF-2, pNF-5 erime eğrisi analizi; (d) cNF-3, cNF-4, cNF-5, pNF-2, pNF-5 amplifikasyon eğrisi analizi.



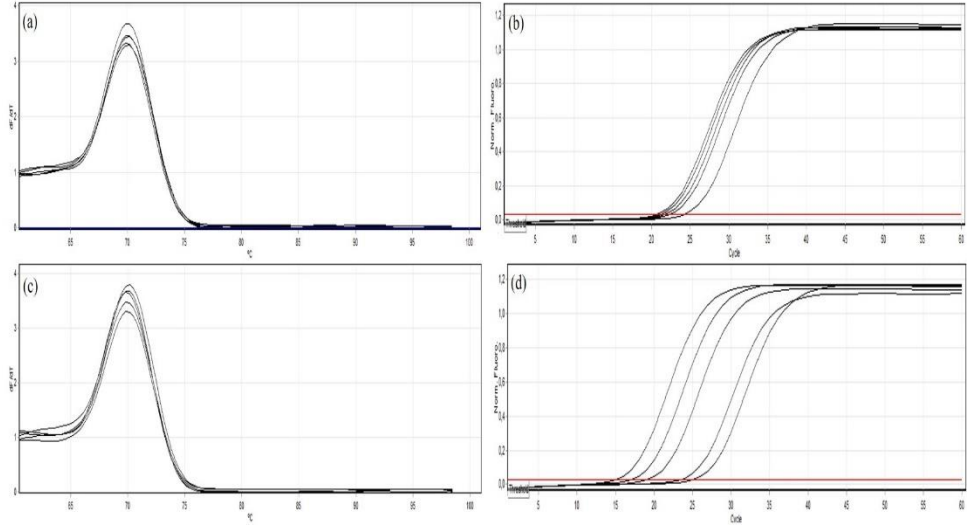
Şekil 3.11: miR-29a-3p erime eğrileri ve amplifikasyon eğrileri (a) K, cNF-2, pNF-1, pNF-3, pNF-4 erime eğrisi analizi; (b) K, cNF-2, pNF-1, pNF-3, pNF-4 amplifikasyon eğrisi; (c) cNF-3, cNF-4, cNF-5, pNF-2, pNF-5 erime eğrisi analizi; (d) cNF-3, cNF-4, cNF-5, pNF-2, pNF-5 amplifikasyon eğrisi analizi.



Şekil 3.12: miR-1290 erime eğrileri ve amplifikasyon eğrileri (a) K, cNF-2, pNF-1, pNF-3, pNF-4 erime eğrisi analizi; (b) K, cNF-2, pNF-1, pNF-3, pNF-4 amplifikasyon eğrisi; (c) cNF-3, cNF-4, cNF-5, pNF-2, pNF-5 erime eğrisi analizi; (d) cNF-3, cNF-4, cNF-5, pNF-2, pNF-5 amplifikasyon eğrisi analizi.

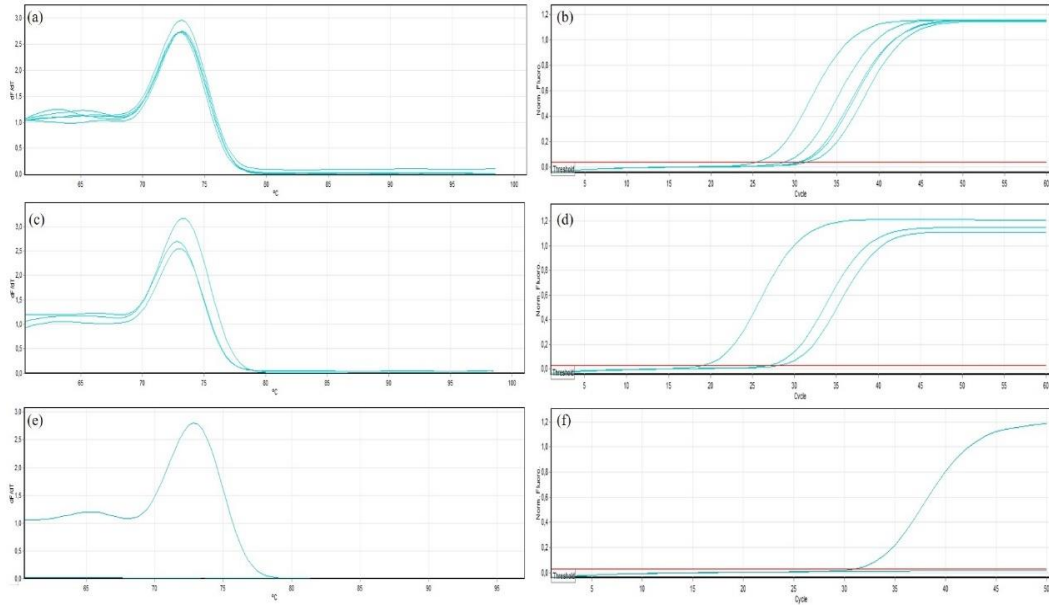


Şekil 3.13: miR-22-3p erime eğrileri ve amplifikasyon eğrileri (a) K, cNF-2, pNF-1, pNF-3, pNF-4 erime eğrisi analizi; (b) K, cNF-2, pNF-1, pNF-3, pNF-4 amplifikasyon eğrisi; (c) cNF-3, cNF-4, cNF-5, pNF-2, pNF-5 erime eğrisi analizi; (d) cNF-3, cNF-4, cNF-5, pNF-2, pNF-5 amplifikasyon eğrisi analizi.



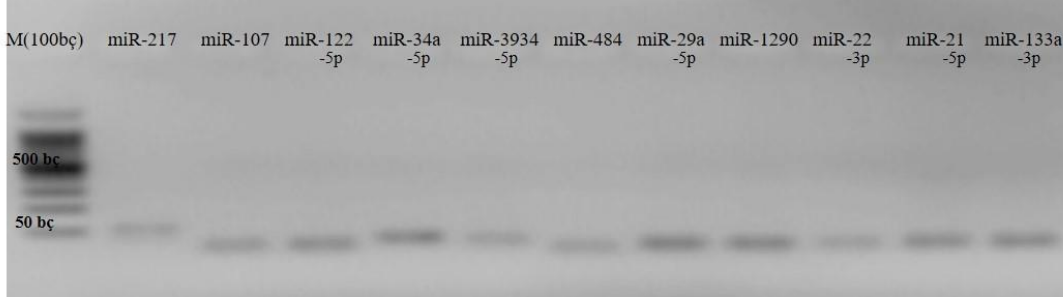
Şekil 3.14: miR-21-5p erime eğrileri ve amplifikasyon eğrileri (a) K, cNF-2, pNF-1, pNF-3, pNF-4 erime eğrisi analizi; (b) K, cNF-2, pNF-1, pNF-3, pNF-4 amplifikasyon eğrisi; (c) cNF-3, cNF-4, cNF-5, pNF-2, pNF-5 erime eğrisi analizi; (d) cNF-3, cNF-4, cNF-5, pNF-2, pNF-5 amplifikasyon eğrisi analizi.

miR-484 (Şekil 3.10), miR-29a-3p (Şekil 3.11), miR-1290 (Şekil 3.12), miR-22-3p (Şekil 3.13) ve miR-21-5p'nin (Şekil 3.14) erime eğrisi ve amplifikasyon eğrisi analizleri tüm örneklerin özgül bir şekilde ifade olduğunu gösterdi.



Şekil 3.15: miR-133a-3p erime eğrileri ve amplifikasyon eğrileri (a) K, cNF-2, pNF-1, pNF-3, pNF-4 erime eğrisi analizi; (b) K, cNF-2, pNF-1, pNF-3, pNF-4 amplifikasyon eğrisi; (c) cNF-4, cNF-5, pNF-2 erime eğrisi analizi; (d) cNF-4, cNF-5, pNF-2 amplifikasyon eğrisi analizi; (e) pNF-5 erime eğrisi analizi; (f) pNF-5 amplifikasyon eğrisi analizi.

miR-133a-3p'nin (Şekil 3.15) bulguları ise cNF-3 dışındaki örneklerde özgül bir şekilde amplifiye olduğunu gösterdi. Elde edilen PZR ürünleri %2,5'luk agaroz hazırlanarak agaroz jel elektroforezinde yürütüldü. Örnek olarak kontrol dokuya ait agaroz jel elektroforezi görüntüsü Şekil 3.16'da verildi.



Şekil 3.16: Kontrol dokuya ait seçilen mitomiR'lerin %2,5 agaroz jel elektroforez görüntüleri.

Kantitatif analize başlamadan önce eşik değeri (treshold) 0,03 olarak belirlendi ve $2^{-\Delta\Delta Ct}$ metoduyla analiz gerçekleştirildi. Bu amaç için her örneğin mitomiR'leri kendi iç kontrolü olan U6 snRNA'sı ile kendi içerisinde normalize edildi. Daha sonra bu sonuçlar kontrol doku sonuçlarına göre tekrar normalize edilerek $\Delta\Delta Ct$ değeri hesaplandı. Elde edilen bu değerler $2^{-\Delta\Delta Ct}$ formülünde kullanılarak incelenen miRNA örneklerinin kontrol doku örneğine göre ifade miktarı bulundu. Çizelge 3.2'de kontrol ve tümör doku örneklerinin $2^{-\Delta\Delta Ct}$ verileri verildi.

Çizelge 3.2: Tümör doku örneklerinin seçilen mitomiR'lerde $2^{-\Delta\Delta Ct}$ değerleri.

Hasta No	miR-217	miR-107	miR-122-5p	miR-34a-5p	miR-3934-5p	miR-484	miR-29a-3p	miR-1290	miR-22-3p	miR-21-5p	miR-133a-3p
K	0,00	1,00	0,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
cNF-1	1,00	0,20	2936,74	0,57	1530,73	0,13	0,45	0,03	0,27	0,19	0,05
cNF-2	0,00	4,86	0,00	2,03	44146,15	4,82	5,28	0,50	4,50	2,07	1,59
cNF-3	0,00	0,06	0,00	0,21	0,00	0,15	0,13	0,06	0,09	0,12	0,00
cNF-4	126,24	25,99	21469,49	12,38	94629,34	32,22	54,19	0,44	29,65	49,52	3,71
cNF-5	357,05	9,71	0,00	12,30	5673,41	18,77	28,84	0,16	5,35	19,97	2,64
pNF-1	0,00	0,03	0,00	0,10	0,00	0,17	0,14	0,33	0,08	0,23	0,04
pNF-2	13,27	0,45	60724,88	0,68	4269,94	1,32	2,55	0,04	1,04	1,79	7,67
pNF-3	0,00	25,81	28,05	221,32	0,33	55,72	38,59	2,43	47,18	44,63	6,96
pNF-4	25,63	1,16	1,00	3,25	11505,21	1,21	1,51	0,01	1,87	0,48	1,61
pNF-5	0,00	0,03	0,00	0,01	0,00	0,04	0,05	0,00	0,04	0,02	0,01

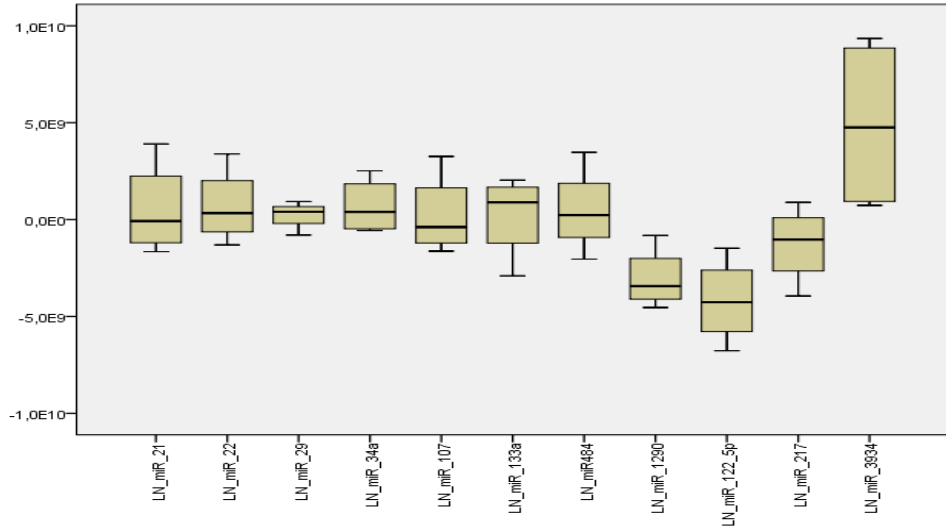
Çizelge 3.2’de bulunan verilere bakıldığında pNF-1 ve pNF-5 örneklerinde neredeyse U6 snRNA dışında hiçbir miRNA ya hiç ifade edilmedi, ya da yok derecede az ifade edildiği tespit edildi. Bununla birlikte kontrol dokuda miR-217 ve miR-122-5p’nin hiç ifade edilmediği görüldü. Ayrıca miR-34a-5p’nin pNF-3’te, miR-3934-5p’nin ise cNF-3, pNF-1 ve pNF-5 dışındaki örneklerde çok yüksek miktarda ifade olduğu görüldü. Diğer seçilen miRNA’ların hemen hemen tüm örneklerde ifade edildiği tespit edildi. Bu nedenle miR-217, miR-122-5p, miR-34a-5p ve miR-3934-5p dışındaki diğer mitomiR’ler aynı grafikte analiz edildi (Şekil 3.18).

Çizelge 3.3: NF1 Tümör doku türlerinde miRNA ortanca değerleri (Min-Maks ile birlikte).

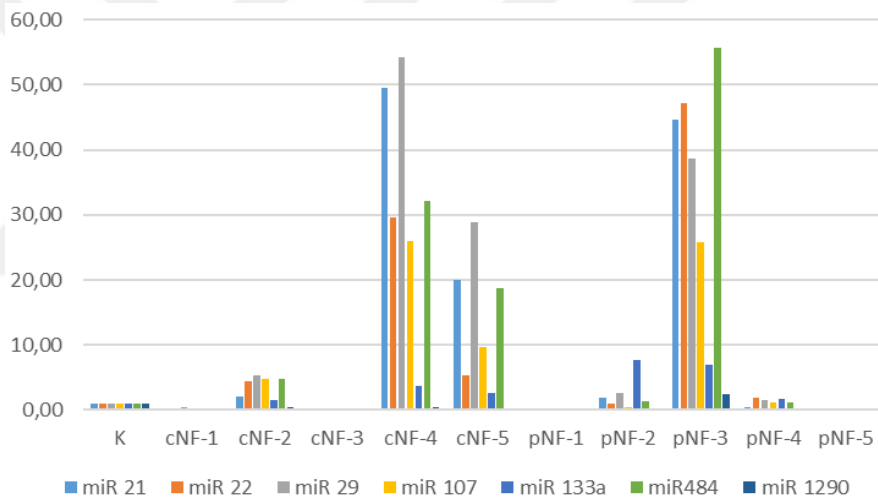
miRNA	cNF Ortanca (Min-Maks)	pNF Ortanca (Min-Maks)
miR 21	24.8564 (0.1908-49.5221)	1.1348 (0.4796-1.7901)
miR 22	14.9613 (0.2717-29.6508)	1.4543 (1.0425-1.8661)
miR 29	27.3212 (0.4506-54.1917)	2.0272 (1.5052-2.5491)
miR 34a	6.4755 (0.5704-12.3805)	1.966 (0.683-3.249)
miR 107	13.0941 (0.1961-25.9921)	0.8092 (0.4538-1.1647)
miR 133a	1.8806 (0.0548-3.7064)	4.6437 (1.6133-7.6741)
miR 484	16.1764 (0.1303-32.2226)	1.2669 (1.2142-1.3195)
miR 1290	0.2334 (0.0254-0.4414)	0.0258 (0.0107-0.0409)
miR 122-5p	0.0048 (0.0011-0.0084)	0.0118 (0-0.0237)
miR 217	1.2323 (0.0194-2.4453)	0.3768 (0.257-0.4965)
miR 3934	48080.0347 (1530.7256-94629.3438)	7887.5761 (4269.9398-11505.2124)

Çizelge 3.3’deki miRNA ortancaları incelendiğinde; cNF tümör türündeki hemen hemen tüm ortancaların pNF tümör türünden daha büyük olduğu, buna karşın hiçbir miRNA’da NF1 tümör doku türüne göre istatistiksel olarak anlamlı farklılık olmadığı bulundu ($p>0.05$).

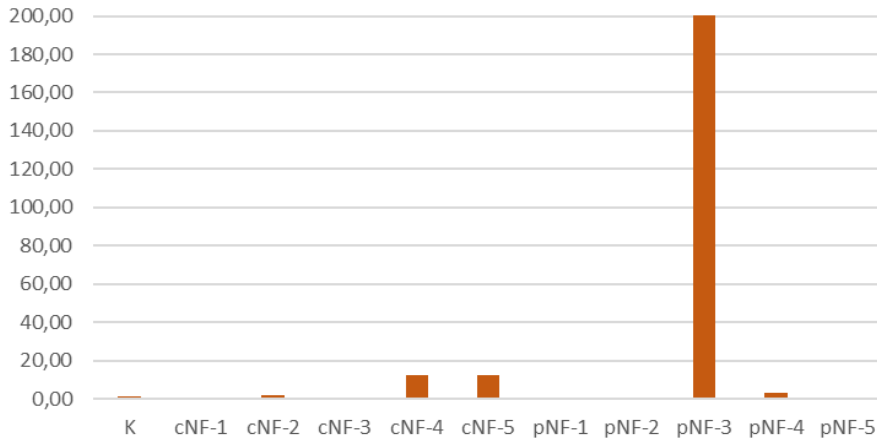
Çizelge 3.2’deki değerlerin aşırı gözlemler içermesi nedeni ile değerlerin doğal logaritması (LN) alınarak logaritmik dönüşüm uygulandı. Logaritmik dönüşüm sonrasında miRNA değerlerine ilişkin “box-plot” grafiği çizildi (Şekil 3.17). Logaritmik (LN) dönüşümü sonrasında yapılan analizlerde de tümör türüne göre miRNA ortancaları arasında anlamlı farklılık olmadığı, tüm miRNA’larda tümör türünden bağımsız olarak istatistiksel anlamda benzer ortancalar görüldüğü ($p>0.05$) belirlendi.



Şekil 3.17: Tümör doku örneklerinin seçilen mitomiR'lerde $2^{-\Delta\Delta C_t}$ değerleri (LN dönüşümü sonrasında).

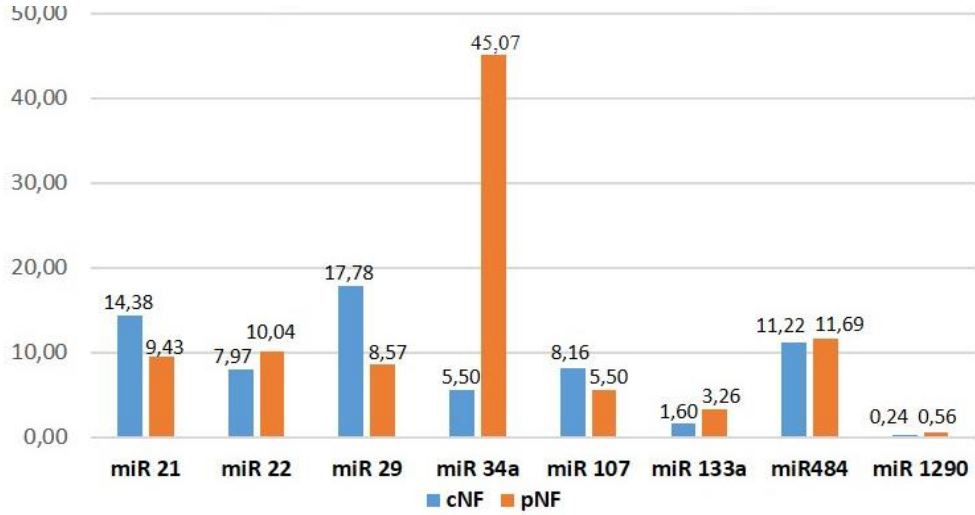


Şekil 3.18: kRT-PZR analizine göre mitomiR'lerin NF1 tümör dokularında analizi.



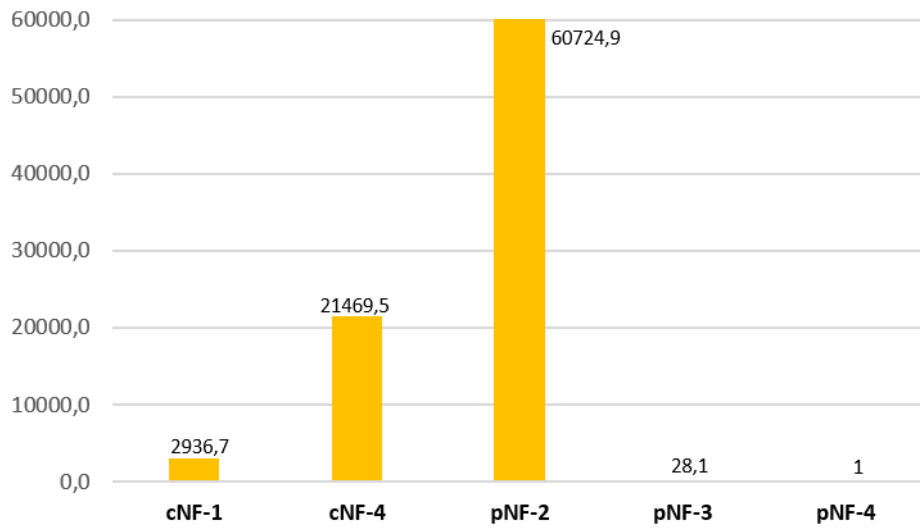
Şekil 3.19: kRT-PZR analizine göre miR-34a-5p'nin NF1 tümör dokularında analizi.

Şekil 3.18'e bakıldığında cNF-4, cNF-5 ve pNF-3'te miRNA ifadelerinin diğer örneklerle göre daha fazla olduğu görüldü. Şekil 3.19'ta pNF-3'te miR-34a-5p'nin ifadesinin yüksek olduğu görüldü. Bu sonuçlara göre cNF ve pNF örneklerinin her mitomiR için ortalaması hesaplandı ve buna göre cNF ve pNF arasında mitomiR ifadeleri arasında bir fark olup olmadığı değerlendirildi (Şekil 3.20). Buradaki verilere göre miR-21-5p, miR-29a-3p ve miR-107 ifadesinin cNF doku örneklerinde; miR-22-3p, miR-34a-5p, miR-133a-3p, miR-484 ve miR-1290 ifadesinin ise pNF doku örneklerinde yüksek olduğu görüldü. miR-34a-5p'nin ifadesi pNF doku örneklerinde cNF'lere göre anlamlı derecede yüksekken, miR-484 ve miR-1290 ifadesinin iki grupta da birbirine çok yakın olduğu görüldü.

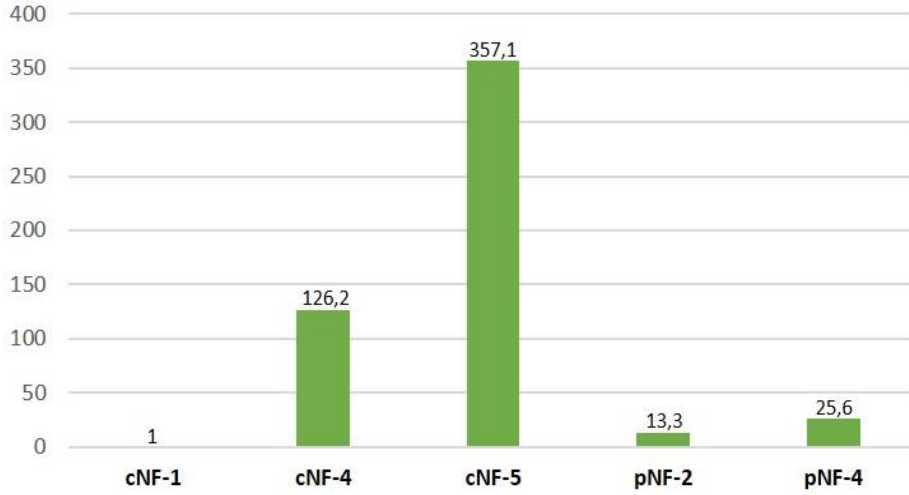


Şekil 3.20: NF1 tümör doku örneklerinde miR-21-5p, miR-22-3p, miR-29a-3p, miR-34a-5p, miR-107, miR-133a-3p, miR-484 ve miR-1290 için ortalama değeri.

Kontrol dokusunda miR-122-5p ve miR-217 ifade edilmediklerinden dolayı, ifade edilen örnekler arasında en az ifadeye sahip olan sırasıyla pNF-4 ve cNF-1 örnekler normalizatör olarak seçildi ve miR-122-5p ve miR-217 ifadeleri bulunan örnekler bu iki örneğe göre değerlendirildi (Şekil 3.21 ve Şekil 3.22). Şekil 3.21’deki verilere göre pNF-2 örneği en yüksek miR-122-5p ifadesine sahipti. Aynı zamanda cNF-4 örneğinin ifadesi de diğer örneklerle kıyasla daha yüksekti. Şekil 3.22’deki verilere göre cNF-5 örneği en yüksek miR-217 ifadesine sahipti. Bununla birlikte cNF-4 örneğinin miR-217 ifadesi de cNF-1, pNF-2 ve pNF-4 örneklerine kıyasla daha yüksekti.

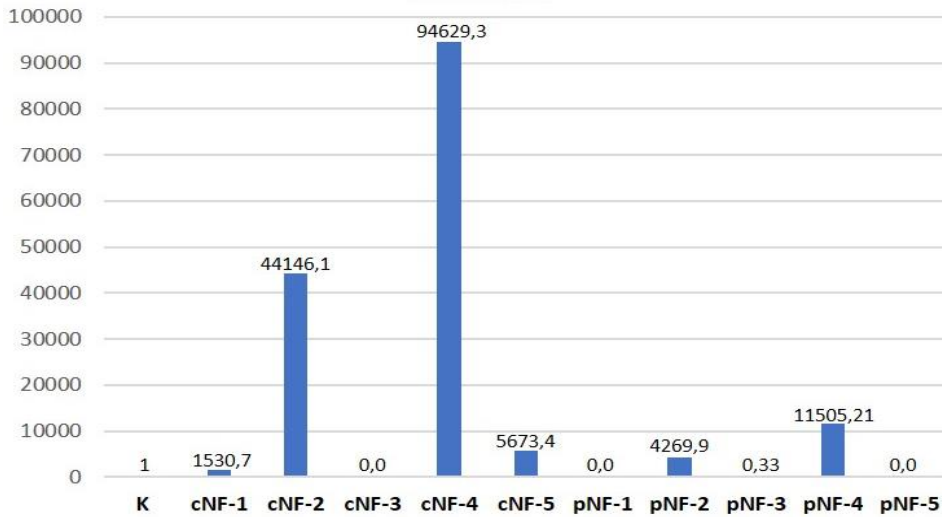


Şekil 3.21: kRT-PZR analizine göre miR-122-5p’nin NF1 tümör dokularında analizi.



Şekil 3.22: kRT-PZR analizine göre miR-217'nin NF1 tümör dokularında analizi.

Son olarak miR-3934-5p'nin gerçek zamanlı PZR analizi yapıldı. miR-3934-5p'nin cNF-3, pNF-1 ve pNF-5 dışındaki örneklerde çok yüksek miktarda ifade olduğu görüldüğünden miR-122-5p ve miR-217 (sırasıyla şekil 3.21 ve şekil 3.22) gibi diğer mitomiR'lerden ayrı değerlendirildi. Şekil 3.23'e bakıldığında cNF-4 örneğinin miR-3934-5p ifadesi en yüksekti. Bununla birlikte cNF-2 örneğinde de miR-3934-5p ifadesi diğer örneklerle kıyasla daha yüksekti. Ancak cNF-3, pNF-1 ve pNF-5 örneklerinde ifade olmadığı görüldü.



Şekil 3.23: kRT-PZR analizine göre miR-3934-5p'nin NF1 tümör dokularında analizi.

4. TARTIŞMA

Bu tez çalışmasında, NF1 tümör doku örneklerinde seçilen birkaç mitomiR'in ifadelerinin sağlıklı dokuya göre değişip değişmediği, varlığının araştırılması amaçlandı. Bunun için ilk olarak taze dondurulmuş tümör doku örneklerinden mitokondri izolasyonu yapıldı ve daha sonra izole edilen mitokondrilerden mitomiR izolasyonu gerçekleştirilerek kRT-PZR analizi ile analiz edildi.

NF1, 1/2500 (Wilson ve diğ., 2021) görülme sıklığı olan otozomal dominant, multisistemik ve kansere yatkınlık ile giden bir nörokütanöz hastalıktır. Çiller, CALM oluşumu ve nörofibrom adı verilen iyi huylu tümörler hastalığın belirtilerindedir. NF1 geni protein ürünü olan nörofibromin, tümör baskılayıcı gen olarak fonksiyon görmekte ve kaybı proliferasyon ve tümör oluşumu ile sonuçlanmaktadır. Hastaların %15-20'si pNF, MPNST ve diğer malignansileri geliştirebilir. NF1 klinik olarak birinci derecede periferik sinir sistemi olmak üzere, vücudun çeşitli organ ve sistemlerini tutan bir hastalıktır. Temel karakteristik bulguları nörofibrom oluşumu, CALM'lar, aksiller ve inguinal çillenme, Lisch nodülleri, kemik deformiteleri, öğrenme güçlüğü ve tümör gelişimine yatkınlıktır (von Deimling vd., 1995). Bu kriterlerden en az ikisini gösteren hastalar NF1 tanısı almaktadır. NF1 hastalığı için bir takım genotip-fenotip korelasyonları belirlenmiş olsa da henüz kesin bir ilişki belirlenmemiştir. Aynı aile içinde NF1 tanısı almış bireylerde bile farklı klinik özellikler görülebilmektedir (Pasmant ve diğ., 2011; Gutmann ve diğ., 2017). Ayrıca hastalığın kesin bir tedavisi bulunmamaktadır ve tedaviler semptomatiktir (Gutmann ve diğ., 2017). Bu konu ile ilgili çok sayıda çalışma mevcut olup görüşlerden birisi de modifiye edici genlerin etkili olabileceğidir. Çeşitli semptomlar için farklı modifiye edici genler çalışılmaktadır. Bu nedenle NF1 hastalığında rol oynayabilecek regülatör moleküllerin varlığının ve rollerinin araştırılması oldukça önemlidir ve literatüre büyük bir katkı sağlayabilir. Son yıllarda gelişen mitokondri bilimi ile birlikte yapılan çalışmalar mitokondrilerin fonksiyonundaki değişikliklerin de bir modifiye edici faktör olarak NF1 hastalarının farklı fenotipler göstermesinde rol oynayabileceğini düşündürmektedir (Sharafi ve Ayter, 2018).

Mitokondri fonksiyonunu etkileyen faktörlerden biri de kısaca mitomiR olarak isimlendirilen, mtDNA'da kodlanan veya çekirdekten mitokondrilere taşınan miRNA'lardır (Khorsandi ve ark., 2018; Ortega ve ark., 2020). NF1 bir tümör predispozisyon bozukluğudur ve NF1 hastaları birçok kanser türü için daha yüksek riske sahiptir (Kresak ve Walsh, 2016). miRNA'ların hücrelerdeki regülatör rollerinin yanı sıra kanser başlatıcı rolleri göz önüne alındığında miRNA'lar NF1 hastalığı için tanı ve tedavi bakımından ideal moleküller olabilirler.

Mitokondrielerin hücrelerdeki rolleri, hastalıklarla ilişkisi anlaşılmaya başladıkça yoğun çalışılan bir alan haline gelmiştir. miRNA'ların mitokondrideki rollerini anlamak oldukça önemlidir ve mitomiR'ler mitokondriyel hastalıklar veya mitokondri ilişkili hastalıklarda yeni prognostik, diagnostik ve terapötik anlamda yeni kapılar açabilir. Birçok çalışma miRNA'ların mitokondriyel disfonksiyon için bir biyobelirteç olarak potansiyel etkisinin ve moleküler yollarla etkileşiminin olduğunu göstermektedir (Sekar ve ark., 2020). Bu bağlamda NF1 hastalığında miRNA'ların mitokondrideki rollerini araştırmak önemlidir ve bu tür araştırmalar NF1 hastalığının mekanizmalarının aydınlatılmasına katkı sağlayabilir, genotip-fenotip korelasyonunun belirlenmesine yardımcı olabilir ve hastalığın kendisinin tedavisinin bulunmasına katkı sağlayabilir. Literatürde mitomiR'lerin özellikle kanser üzerindeki etkileri ile ilgili birçok yayın bulunmaktadır (Wallace, 2018) ancak NF1 ile ilişkisini gösteren bir çalışma yoktur. Bu tez çalışması bu konu ile ilgili ilk çalışma olacaktır ve tamamen özgündür.

Nörofibromların ana bileşenini Schwann hücreleri oluşturmaktadır ve S100, Schwann hücre belirteci olduğundan bu tez çalışmasında ilk olarak kullanılan dokuların NF1 tümör dokusu olduğunu gösterebilmek için immünofloresan boyama yapılmış ve boyamada anti-S100 antikoru kullanılmıştır (Resim 3.1, resim 3.2). Daha sonra tümör dokuları kullanılarak mitokondri izolasyonu yapılmıştır. Donmuş dokulardan mitokondri izolasyonu ile ilgili literatürde pek fazla çalışma bulunmamaktadır. Literatürdeki çalışmalardan birinde donmuş post-mortem insan beyin dokusundan mtDNA izolasyonu için farklı yöntemler karşılaştırılmış, en iyi sonucun MACS yöntemini kullanan bir ticari kit ile mitokondri izolasyonu yapıldıktan sonra DNA izolasyonu sonrasında alındığı belirtilmiştir (Devall ve diğ., 2015). Buna ek olarak MACS yöntemiyle mitokondri izolasyonunun diğer yöntemlerden daha iyi sonuç verdiğini belirten güncel çalışmalar da bulunmaktadır (Barrey ve ark., 2011; Ortega ve ark., 2020).

Ancak bu çalışma kapsamında, yapılan değişikliklerle birlikte MACS metodunu kullanmayan ticari kitler kullanılarak donmuş dokulardan başarılı bir şekilde mitokondri izole edilebileceği ve bu mitokondrilerden de miRNA izolasyonu yapılabileceği gösterilmiştir. Bu durum da literatüre bir anlamda katkı sağlayabilir ve donmuş dokulardan mitokondri izolasyonunda alternatif bir yöntem oluşturabilir. Fakat bu yöntemin de bazı kısıtlılıkları bulunmaktadır ve optimizasyon gerekebilir.

tRNA^{leu(UUR)} primerleri kullanılarak yapılan gerçek zamanlı PZR sonucunda örneklerin tepe noktası yapması primerlerin mtDNA'ya bağlandığını ve mitokondri izolasyonunun doğru bir şekilde gerçekleştiğini göstermiştir (Şekil 3.1).

Mitokondrilerin izole edildiği gösterildikten sonra tezin son aşaması olan miRNA izolasyonu ve analizi kısmına geçilmiştir. İzole edilen mitokondrilerden miRNA izolasyonu yapılmıştır. İzole edilen miRNA'ların konsantrasyonu ve saflıkları ölçülmüştür (Çizelge 3.1). Bu sonuçlara bakıldığında yüksek bir fenol kontaminasyonu bulunduğu fark edilmiştir. Bunun nedeni ise miRNA izolasyonu için kullanılan kitin fenol içermesidir. Her ne kadar total RNA izole etmek yerine sadece miRNA izolasyonu yapılsa da ve bunun için defalarca yıkama yapılsa da fenol kontaminasyonu tamamen önlenememiştir. Yapılan literatür çalışmalarında, kitlerle yapılan RNA izolasyonu sonucunda bu tip fenol kontaminasyonlarının oluşabileceği saptanmıştır (Matlock, 2015). Bununla birlikte kullandığımız "Qiagen miRNeasy" kitinin miRNA izolasyonunda çok başarılı olduğu ve pikogram seviyede izole edilen miRNA'larda bile başarılı ve doğru sonuç verdiği kullanma kılavuzunda belirtilmiştir. Kitin performansını belirlemek amacıyla örneklerimizden elde edilen mitomiR örneklerinde U6 snRNA primeri ile test yapılmış ve tüm örneklerde U6 snRNA'nın başarılı bir şekilde ifade edildiği tespit edilmiştir. Ancak dondurulmuş doku kullandığımızdan ve mitomiR'lerin konsantrasyonu düşük olduğundan kitin önerdiği seyreltme miktarı kullanıldığında kRT-PZR'de reaksiyonun çok geç gerçekleştiği, dolayısıyla reaksiyonun çok geç sikluslarda yükseldiği gözlemlenmiştir. Bu nedenle U6 snRNA ifadesi üzerine bir optimizasyon çalışması yapılmış (Şekil 3.2) ve bu çalışma sonucunda kitin önerdiği 1/60 seyreltme oranı yerine 1/15 seyreltme yapılmasına karar verilmiştir. Tez çalışması NF1 hastalığında mitomiR'lerin araştırılması bakımından ilk çalışma niteliğinde olduğundan birkaç miRNA seçilmiş ve analiz edilmiştir.

Bu tez çalışmasında araştırılmak üzere seçilen miRNA'lar apoptozda (Wang ve diğ., 2012; Fan ve diğ., 2017; Khorsandi ve diğ.; 2018;) proliferasyonda (Itani ve diğ., 2012; Wang ve diğ., 2016; Zhang ve diğ., 2016; Liu ve diğ., 2019), tümör baskılamadaki rolleri (Zhao ve diğ., 2010; Liu ve diğ.; 2019; Ye ve diğ., 2019) ve telomeraz (Hrdličková ve diğ., 2014) ile ilişkileri göz önüne alınarak çizelge 1.3'te dört ana başlık altında bir araya getirilmiştir. Burada seçilen miRNA'ların, mitokondride lokalize olabildiği mitokondriyal hastalık ve disfonksiyonlarda rol aldığı, kanserde rolü bulunduğu ve NF1 hastalığında rol oynadığı bilinmektedir. Bu bağlamda seçilen miRNA'ları araştırmanın önemli olduğu düşünülebilir.

NF1 tümör dokularından izole edilen mitomiR'lerin ifade edildiği gösterilmiş, ancak bu ifadelerin doğruluğunu tespit etmek için tüm mitomiR'ler için erime eğrisi analizi yapılmıştır. Bu analiz sonucunda yanlış sıcaklıkta yükselme gösteren örnekler seçilerek tekrar kRT-PZR reaksiyonu kurulmuş ve yine yanlış yerde yükselme yapan mitomiR'ler, NF1 örneklerinde hiç ifade edilmeyen mitomiR grubuna eklenmiştir. Bu nedenle cNF-2 örneğinin miR-122-5p ifadesi için tekrar kRT-PZR reaksiyonu kurulmasına rağmen erime eğrisinin 86°C'de tepe noktası oluşturduğu gözlenmiş ve hiç ifade edilmeyen mitomiR grubuna eklenmiştir (Şekil 3.7). Ayrıca pNF-3 örneğindeki miR 3934-5p'in erime eğrisi analizinde tepe noktasının düşük seviyede olduğu görülmüştür (Şekil 3.9). Ancak bu örnek agaroz jel elektroforezine yüklenip yürütüldüğünde diğer örneklerle aynı yerde bant verdiği gözlemlendi. Bu nedenle ifade edilen miRNA'nın az miktarda olduğu anlaşıldı.

Erime eğrisi analizi sonrasında tüm ürünlerin doğruluğunu ve primerlerin özgül bir şekilde amplifikasyon gerçekleştirdiğini göstermek amacıyla agaroz jel elektroforezi yapılmıştır (Şekil 3.16). Erime eğrisi analizi sonrasında kalan diğer örneklerin ifadeleri $2^{-\Delta\Delta Ct}$ değeri üzerinden analiz edilmiştir. Bu sonuçlara göre miR-122-5p ve miR-217'nin kontrol doku ile birlikte bir çok örnekte ifade edilmedikleri tespit edilmiştir. Bununla birlikte miR-3934-5p bazı örneklerde ifade edilmese de, bazı örneklerde kontrol dokuya göre çok yüksek bir ifadeye sahip olduğu tespit edilmiştir. miR-34a-5p'nin ise pNF-3'te ifadesinin yüksek olduğu görülmüştür (Çizelge 3.2). Dolayısıyla bu dört miRNA dışında kalan diğer mitomiR'ler aynı grafikte analiz edildi (Şekil 3.18). Çizelge 3.2 ve şekil 3.18 birlikte değerlendirildiğinde seçilen miRNA'ların az miktarda olsa da mitokondride lokalize olabileceği söylenebilir.

miR122-5p, miR 217 ve miR 3934-5p dışındaki diğer mitomiR'lerin ifadelerine bakıldığında (Çizelge 3.2) cNF-3, pNF-1 ve pNF-5 örneklerinde tüm seçilen mitomiR'lerin ifadelerinin yok denecek kadar az olduğu tespit edilmiştir.

Diğer örneklerdeyse miR-34a-5p'nin pNF-3'te çok yüksek olduğu tespit edilmiştir (Şekil 3.19). Diğer mitomiR'lerin ifadelerinde ise anlamlı bir fark olmadığı görülmüştür (Şekil 3.18). Bu 8 mitomiR için cNF ve pNF'ler arasında karşılaştırma yapıldığında (Şekil 3.20) miR-34a-5p ifadesinin pNF örneklerinde cNF'lerden daha fazla olduğu görülmüştür. Bunun sebebi pNF-3'ün miR-34-5p ifadesinin diğerlerine göre çok yüksek olmasıdır. Diğer örnekler için ise seçilen mitomiR'ler cNF'lerde pNF örneklerine göre daha yüksek bir ifade gözlemlendi ancak bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (Çizelge 3.3 ve Şekil 3.17). Şekil 3.21'de miR-122-5p ve Şekil 3.22'de miR-217 ifadesinin sırasıyla pNF-2 ve cNF-5'te diğer örneklerden daha fazla ifade olduğu görülmektedir. miR-122-5p ve miR-217'nin kontrol dokuda ifade olmadığı, $2^{-\Delta\Delta Ct}$ değerlerinin ise diğerlerine göre daha düşük olduğu görülmüştür (Çizelge 3.2). Bu nedenle analizin doğruluğu açısından diğer miRNA'larla değerlendirmeye alınmayarak kendi içerisinde değerlendirilmişlerdir. Çizelge 3.2'deki $2^{-\Delta\Delta Ct}$ değerleri ve sırasıyla miR-122-5p ve miR-217'nin pNF-2 ve cNF-5'te diğerlerine göre çok daha yüksek miktarda ifade edilmiş olması (Şekil 3.21 ve Şekil 3.22) bu miRNA'ların mitokondride lokalize olabileceğini göstermiştir. miR-34a-5p'de pNF-3'ün, miR-3934-5p ise cNF-2 ve cNF-4'ün $2^{-\Delta\Delta Ct}$ değeri diğerlerinden çok daha yüksek olduğu için ayrı değerlendirilmiştir (Çizelge 3.2, Şekil 3.19 ve Şekil 3.23).

miR-122-5p kontrol dokuda ifade edilmediğinden, ifade edilen örnekler arasında en düşük ifadeye sahip olan pNF-4 normalizatör olarak seçilmiştir (Şekil 3.21). pNF-4 örneğine göre en çok miR 122-5p ifadesi sırasıyla pNF-2, cNF-4 ve cNF-1 örneklerinde gözlemlenmiştir. Kontrol dokuda ifade edilmeyen diğer bir miRNA, miR-217'dir. Burada da miR-217 kontrol dokuda ifade edilmediğinden, cNF-1 normalizatör olarak seçilmiştir (Şekil 3.22). Burada en çok miR-217 ifadesine sahip olan sırasıyla cNF-5 ve cNF-4 örnekleridir.

miR-122-5p, kanser hücrelerinde en çok rastlanan ve fonksiyonu bilinen miRNA'lardan biridir. miR-122-5p, hücre proliferasyonu, migrasyonu ve invazyonunu inhibe ettiğinden dolayı tümör baskılayıcı olarak fonksiyon göstermektedir. Bu nedenle kanser hücrelerinde miR122-5p'nin ifadesinin azaldığı tespit edilmiştir (Liu ve diğ., 2019; Dai ve diğ., 2020).

Aynı zamanda yapılan çalışmalarla miR-217'nin kanser hücrelerinde tümör baskılayıcı olduğu gösterilmiştir (Zhao ve diğ., 2010). Bu sonuçlara göre miR-122-5p ve miR-217 ifadesi bulunan örneklerde tümörlerin büyüklüklerinin veya sayılarının daha az olabileceği düşünülmektedir. Ancak bu hastaların dosyalarında bu konu ile ilgili bir bilgiye rastlanmamıştır. Bununla birlikte dört doku örneğimizde (cNF-1, cNF-4, pNF-2, pNF-4) hem miR-122-5p hem de miR-217'de ifade edildiği görülmüştür.

Ancak hastaların belirtileri karşılaştırıldığında diğer örneklerden farklı hiçbir ortak belirtiyeye rastlanmamıştır (Çizelge 2.1). Bu nedenle hastaların semptomları ve miRNA'ların ifade seviyeleri arasında hiçbir bağlantı kurulamamıştır. miR-3934-5p'nin ifadesine bakıldığında diğer seçilen miRNA'lara göre çok farklı ve çok yüksek ifadeye sahip olduğu tespit edilmiştir. miR-3934-5p'nin; cNF-3, pNF-1 ve pNF-5 örneklerinde hiç ifade edilmemekle birlikte diğer örneklerde özellikle sırasıyla cNF-4 ve cNF-2'de çok yüksek bir ifadeye sahip olduğu gözlenmiştir (Şekil 3.23). Literatür taramasında, miR-3934-5p'nin de, miR-122-5p ve miR-217 gibi proliferasyonu inhibe ettiği ve bununla birlikte apoptozun başlamasında rol oynadığı belirtilmiştir (Ye ve diğ., 2019). Bununla birlikte yapılan bir çalışmada bir EGFR inhibitörü olan gefitinibe direnç gösteren hastalarda miR-3934-5p ifadesinin çok yüksek olduğu gözlenmiştir (Hu ve diğ., 2017). Sonuçları bu üç miRNA için karşılaştırdığımızda için cNF-4 örneğinde yüksek bir ifadeye sahip oldukları gözlenmiştir (Şekil 3.21, şekil 3.22, şekil 3.23). Hastanın belirtileri diğer hastalara göre karşılaştırıldığında ise, bu hastanın sporadik bir vaka olup, hem pNF hem de cNF tümöre sahip olduğu görülmüştür. Her iki tümör türüne de sahip olan bir diğer örnek ise pNF-3 hastasıdır. pNF-3 bir ailesel vaka olup cNF-4 hastasına göre daha çok semptoma sahiptir, ancak bu tümör dokusunda bahsedilen miR-122-5p, miR-217 ve mir-3934-5p'nin ifade edilmediği ya da çok az miktarda ifade edildiği gözlenmiştir. Ayrıca pNF-3'te miR-34a ifadesinin çok yüksek olduğu görülmüştür (Çizelge 3.2, Şekil 3.19). Literatüde miR-34a'nın mitokondriyel fonksiyon bozukluğuna sebep olarak hücrenin apoptozuna neden olduğu gösterilmiştir (Fan ve diğ., 2017). İfade edilen diğer mitomiR'lerde ise kayda değer bir gen ifadesi tespit edilmemiştir. Bu durum, bu üç mitomiR'in pNF ve cNF tümör oluşumunda rolü olmadığını, ancak diğer semptomların oluşmasında rolü olabileceğini gösterebilir.

Son olarak bu çalışma taze dondurulmuş dokular üzerinden yapıldığından örneklerde NF1 tümör hücrelerinin temelini oluşturan Schwann hücreleri dışında farklı hücreler de bulunmaktadır. Bu nedenle burada elde edilen sonuçlar hücre kültüründe saf Schwann hücre popülasyonu oluşturulduğunda daha güvenilir bir sonuç elde edilebilir. Özetle elde edilen bulgular ışığında NF1 tümörlerindeki mitomiR'lerin NF1 hastalığının fenotip-genotip ilişkilendirilmesinde, ilaçlara karşı direnç (Hu ve diğ., 2017) veya yatkınlık yaratmakta rolü olabileceği konusunda iyi bir başlangıç olabileceği düşünülmektedir. Ancak gelecekteki araştırmalarla bu miRNA'ların NF1 üzerindeki muhtemel rollerinin araştırılması desteklenmelidir. Bu bulgular NF1 hastalığı için miRNA'ların mitokondrideki rollerinin aydınlatılmasına katkı sağlayabilir.





5. SONUÇ VE ÖNERİLER

- Literatürde mitomiR'lerin insan NF1 cNF ve pNF'lerde gen seviyesindeki ifadesi üzerine bir çalışma bulunmamaktadır. Bu nedenle çalışmamız bu konuda literatüre katkı sağlayacaktır.
- Taze dondurulmuş yumuşak dokulardan mitokondri izolasyonu için kullanılan yöntem bakıldığında ticari kitler yeterli görülmektedir ancak tümör gibi sert dokular için uygun bir optimizasyon yapılarak başarılı bir şekilde kırılgen yapıya sahip olan miRNA'lar izole edilmiştir. Bu nedenle bu çalışma sert dokulardan mitokondri ve akabinde mitomiR izolasyonu için optimize bir metot oluşturulmasında literatüre katkı sağlayacaktır.
- Elde edilen bulgular ışığında cNF ve pNF tümör grupları arasında hiçbir farklılık bulunamamıştır. Ancak örnek bazında aşırı ifadesi olan miRNA'lar bulunmuştur.
- İfade seviyeleri araştırılan mitomiR'ler arasında miR-34a, miR-122-5p, miR-217 ve miR-3934-5p'nin farklı gen ifadelerine sahip oldukları gözlenmiştir. Ancak hastaların belirtileri arasında bir korelasyona rastlanmamıştır. Bu nedenle hastaların soy geçmişleri, daha detaylı demografik özellikleri, anamnez ve muayene sonucu gerekmektedir.
- Bu tez çalışması NF1 hastalığında mitomiR'leri araştıran literatürdeki ilk çalışmadır. Dolayısıyla gerek hasta sayısı gerek araştırılması istenen miRNA sayısı nedeniyle bir ön çalışma niteliği taşımaktadır. Bu nedenle NF1 hasta örnek sayısı artırılarak tüm mitomiR'ler RNA-seq yöntemiyle analiz edilebilir.
- Bu çalışma sadece cNF ve pNF tümör dokuları üzerinde yapılmıştır. Ancak daha sağlıklı ve karşılaştırılabilir sonuçlar elde etmek için MPNST gibi başka NF1 tümör tipleri de çalışmaya alınmalıdır.

- Bu çalışmada taze dondurulmuş dokular kullanılmıştır. Bu nedenle farklı hücre tiplerinden oluşan bir hücre popülasyonundan mitomiR analizi yapılmıştır. Bu da değerlendirme sonucunu etkilemektedir. Bu nedenle aynı araştırma hücre kültüründe NF1 tümör hücrelerinin temelini oluşturan saf Schwann hücre popülasyonu oluşturularak tekrarlanmalıdır. Bu şekilde elde edilen sonuçlarla NF1’de genotip-fenotip ilişkilendirilmesinde daha güvenilir sonuç alınabilir.
- RNA-seq yöntemi sayesinde tüm mitomiR’ler analiz edildiğinde sadece 11 mitomiR değil, mitokondride bulunan tüm miRNA’ların ifadeleri araştırılmalıdır.



KAYNAKLAR

- Allison, L.A.,**(2014).*Temel Moleküler Biyoloji* (A.O. Beldüz, Çeviri Ed.) Ankara:Palme Yayıncılık.
- Anastasaki, C., Le, L.Q., Kesterson, R.A., Gutmann, D.H.,**(2017).Updated nomenclature for human and mouse neurofibromatosis type 1 genes. *Neurol Genet*, 3(4), e169.
- Barrey, E., Saint-Auret, G., Bonnamy, B., Damas, D., Boyer, O., Gidrol, X.,**(2011).Pre-microrna and mature microrna in human mitochondria. *PLoS one*, 6(5), e20220.
- Borrhalho, P.M., Rodrigues, C.M., Steer, C.J.,**(2015).MicroRNAs in mitochondria: An unexplored niche. In *Microrna: Basic science* (pp. 31-51): Springer.
- Bottillo, I., Ahlquist, T., Brekke, H., Danielsen, S.A., van den Berg, E., Mertens, F., Lothe, R.A., Dallapiccola, B.,**(2009).Germline and somatic nf1 mutations in sporadic and nf1-associated malignant peripheral nerve sheath tumours. *J Pathol*, 217(5), 693-701.
- Brems, H., Beert, E., de Ravel, T., Legius, E.,**(2009).Mechanisms in the pathogenesis of malignant tumours in neurofibromatosis type 1. *Lancet Oncol*, 10(5), 508-515.
- Brossier, N.M., Carroll, S.L.,**(2012).Genetically engineered mouse models shed new light on the pathogenesis of neurofibromatosis type i-related neoplasms of the peripheral nervous system. *Brain Res Bull*, 88(1), 58-71.
- Caracciolo, D., Di Martino, M.T., Amodio, N., Morelli, E., Montesano, M., Botta, C., Scionti, F., Talarico, D., Altomare, E., Gallo Cantafio, M.E., Zuccalà, V., Maltese, L., Todoerti, K., Rossi, M., Arbitrio, M., Neri, A., Tagliaferri, P., Tassone, P.,**(2019).Mir-22 suppresses DNA ligase iii addiction in multiple myeloma. *Leukemia*, 33(2), 487-498.
- Cichowski, K., Jacks, T.,**(2001).Nf1 tumor suppressor gene function: Narrowing the gap. *Cell*, 104(4), 593-604.
- Cimino, P.J., Gutmann, D.H.,**(2018).Neurofibromatosis type 1. *Handbook of clinical neurology*, 148, 799-811.
- Dai, C., Zhang, Y., Xu, Z., Jin, M.,**(2020).MicroRNA-122-5p inhibits cell proliferation, migration and invasion by targeting ccng1 in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Cancer Cell Int*, 20, 98.
- Devall, M., Burrage, J., Caswell, R., Johnson, M., Troakes, C., Al-Sarraj, S., Jeffries, A.R., Mill, J., Lunnon, K.,**(2015).A comparison of mitochondrial DNA isolation methods in frozen post-mortem human brain tissue--applications for studies of mitochondrial genetics in brain disorders. *Biotechniques*, 59(4), 241-242, 244-246.
- Fan, F., Zhuang, J., Zhou, P., Liu, X., Luo, Y.,**(2017).MicroRNA-34a promotes mitochondrial dysfunction-induced apoptosis in human lens epithelial cells by targeting notch2. *Oncotarget*, 8(66), 110209-110220.
- Galvan, D.L., Green, N.H., Danesh, F.R.,**(2017).The hallmarks of mitochondrial dysfunction in chronic kidney disease. *Kidney Int*, 92(5), 1051-1057.

- Gottfried, O.N., Viskochil, D.H., Fults, D.W., Couldwell, W.T.,**(2006).Molecular, genetic, and cellular pathogenesis of neurofibromas and surgical implications. *Neurosurgery*, 58(1), 1-16; discussion 11-16.
- Gutmann, D.H., Ferner, R.E., Listernick, R.H., Korf, B.R., Wolters, P.L., Johnson, K.J.,**(2017).Neurofibromatosis type 1. *Nat Rev Dis Primers*, 3, 17004.
- Hrdličková, R., Nehyba, J., Bargmann, W., Bose Jr, H.R.,**(2014).Multiple tumor suppressor micrnas regulate telomerase and tcf7, an important transcriptional regulator of the wnt pathway. *PLoS one*, 9(2), e86990.
- Hu, Y., Qin, X., Yan, D., Cao, H., Zhou, L., Fan, F., Zang, J., Ni, J., Xu, X., Sha, H., Liu, S., Yu, S., Wu, J., Ma, R., Feng, J.,**(2017).Genome-wide profiling of micro-rna expression in gefitinib-resistant human lung adenocarcinoma using microarray for the identification of mir-149-5p modulation. *Tumour Biol*, 39(3), 1010428317691659.
- Itani, S., Kunisada, T., Morimoto, Y., Yoshida, A., Sasaki, T., Ito, S., Ouchida, M., Sugihara, S., Shimizu, K., Ozaki, T.,**(2012).Microrna-21 correlates with tumorigenesis in malignant peripheral nerve sheath tumor (mpnst) via programmed cell death protein 4 (pdc4). *J Cancer Res Clin Oncol*, 138(9), 1501-1509.
- Jiang, C., McKay, R.M., Le, L.Q.,**(2021).Tumorigenesis in neurofibromatosis type 1: Role of the microenvironment. *Oncogene*, 1-7.
- Jung, Y.-d., Park, S.-K., Kang, D., Hwang, S., Kang, M.-H., Hong, S.-W., Moon, J.H., Shin, J.S., Jin, D.H., You, D., Lee, J.Y., Park, Y.Y., Hwang, J.J., Kim, C.S., Suh, N.,**(2020).Epigenetic regulation of mir-29a/mir-30c/dnmt3a axis controls sod2 and mitochondrial oxidative stress in human mesenchymal stem cells. *Redox biology*, 37, 101716.
- Khorsandi, S.E., Salehi, S., Cortes, M., Vilca-Melendez, H., Menon, K., Srinivasan, P., Prachalias, A., Jassem, W., Heaton, N.,**(2018).An in silico argument for mitochondrial micrna as a determinant of primary non function in liver transplantation. *Sci Rep*, 8(1), 3105.
- Kresak, J.L., Walsh, M.,**(2016).Neurofibromatosis: A review of nf1, nf2, and schwannomatosis. *J Pediatr Genet*, 5(2), 98-104.
- Le, L.Q., Parada, L.F.,**(2007).Tumor microenvironment and neurofibromatosis type i: Connecting the gaps. *Oncogene*, 26(32), 4609-4616.
- Liu, Q., Geng, P., Shi, L., Wang, Q., Wang, P.,**(2019).Mir-29 promotes osteosarcoma cell proliferation and migration by targeting pten. *Oncol Lett*, 17(1), 883-890.
- Liu, Y.H., Liu, J.L., Wang, Z., Zhu, X.H., Chen, X.B., Wang, M.Q.,**(2019).Mir-122-5p suppresses cell proliferation, migration and invasion by targeting satb1 in nasopharyngeal carcinoma. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 23(2), 622-629.
- Lou, G., Ma, N., Xu, Y., Jiang, L., Yang, J., Wang, C., Jiao, Y, Gao, X.,**(2015).Differential distribution of u6 (rnu6-1) expression in human carcinoma tissues demonstrates the requirement for caution in the internal control gene selection for micrna quantification. *Int J Mol Med*, 36(5), 1400-1408.
- Mardani, R., Jafari Najaf Abadi, M.H., Motieian, M., Taghizadeh-Boroujeni, S., Bayat, A., Farsinezhad, A., Hayat, S.M., Motieian, M., Pourghadamyari, H.,**(2019).Micrnain leukemia: Tumor suppressors and oncogenes with prognostic potential. *Journal of cellular physiology*, 234(6), 8465-8486.

- Masliah-Planchon, J., Pasmant, E., Luscan, A., Laurendeau, I., Ortonne, N., Hivelin, M., Varin, J., Valeyrie-Allanore, L., Dumaine, V., Lantieri, L., Leroy, K., Parfait, B., Wolkenstein, P., Vidaud, M., Vidaud, D., Bièche, I.,**(2013).MicroRNAome profiling in benign and malignant neurofibromatosis type 1-associated nerve sheath tumors: Evidences of pten pathway alterations in early nf1 tumorigenesis. *BMC genomics*, 14(1), 1-11.
- Matlock, B.,**(2015).Assessment of Nucleic Acid Purity. <https://assets.thermofisher.com/TFSAssets/CAD/Product-Bulletins/TN52646-E-0215M-NucleicAcid.pdf> alındığı tarih: 01.12.2021
- Na, Y., Hall, A., Choi, K., Hu, L., Rose, J., Coover, R.A., Miller, A., Hennigan, R.F., Dombi, E., Kim, M.O., Subramanian, S., Ratner, N., Wu, J.,**(2021).MicroRNA-155 contributes to plexiform neurofibroma growth downstream of mek. *Oncogene*, 40(5), 951-963.
- O'Brien, J., Hayder, H., Zayed, Y., Peng, C.,**(2018).Overview of microRNA biogenesis, mechanisms of actions, and circulation. *Frontiers in endocrinology*, 9, 402.
- Ortega, M.A., Fraile-Martínez, O., Guijarro, L.G., Casanova, C., Coca, S., Álvarez-Mon, M., Buján, J., García-Honduvilla, N., Asúnsolo, Á.,**(2020).Thereregulatory role of mitochondrial micromirns (mitomirs) in breast cancer: Translational implications present and future. *Cancers*, 12(9), 2443.
- Pagliarini, D.J., Rutter, J.,**(2013).Hallmarks of a new era in mitochondrial biochemistry. *Genes Dev*, 27(24), 2615-2627.
- Pasmant, E., Sabbagh, A., Masliah-Planchon, J., Ortonne, N., Laurendeau, I., Melin, L., Ferkal, S., Hernandez, L., Leroy, K., Valeyrie-Allanore, L., Parfait, B., Vidaud, D., Bièche, I., Lantieri, L., Wolkenstein, P., Vidaud, M., NF France Network.,**(2011).Role of noncoding rna anril in genesis of plexiform neurofibromas in neurofibromatosis type 1. *Journal of the National Cancer Institute*, 103(22), 1713-1722.
- Peng, Y., Croce, C.M.,**(2016).The role of micromirns in human cancer. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 1(1), 15004.
- Ratner, N., Miller, S.J.,**(2015).A rasopathy gene commonly mutated in cancer: The neurofibromatosis type 1 tumour suppressor. *Nat Rev Cancer*, 15(5), 290-301.
- Ren, A., Wen, Z., Zheng, L.,**(2019).Downregulation of mir-3934-5p enhances a549 cell sensitivity to cisplatin by targeting tp53inp1. *Experimental and therapeutic medicine*, 18(3), 1653-1660.
- Rippo, M.R., Olivieri, F., Monsurrò, V., Prattichizzo, F., Albertini, M.C., Procopio, A.D.,**(2014).Mitomirs in human inflamm-aging: A hypothesis involving mir-181a, mir-34a and mir-146a. *Exp Gerontol*, 56, 154-163.
- Rodrigues, S.C., Cardoso, R.M.S., Duarte, F.V.,**(2020).Mitochondrial micromirns: A putative role in tissue regeneration. *Biology (Basel)*, 9(12).
- Sedani, A., Cooper, D.N., Upadhyaya, M.,**(2012).An emerging role for micromirns in nf1 tumorigenesis. *Human genomics*, 6(1), 1-9.
- Sekar, D., Johnson, J., Biruntha, M., Lakhmanan, G., Gurunathan, D., Ross, K.,**(2020).Biological and clinical relevance of micromirns in mitochondrial diseases/dysfunctions. *DNA and cell biology*, 39(8), 1379-1384.
- Sharafi, P., Ayter, S.,**(2018).Possible modifier genes in the variation of neurofibromatosis type 1 clinical phenotypes. *Journal of neurogenetics*, 32(2), 65-77.
- Song, R., Hu, X.-Q., Zhang, L.,**(2019).Mitochondrial mirna in cardiovascular function and disease. *Cells*, 8(12), 1475.

- Su, Y.-J., Tsai, N.-W., Kung, C.-T., Wang, H.-C., Lin, W.-C., Huang, C.-C., Chang, Y.T., Su, C.M., Chiang, Y.F., Cheng, B.-C.,**(2018).Investigation of microRNA in mitochondrial apoptotic pathway in systemic lupus erythematosus. *BioMed research international*, 2018.
- Subramanian, S., Thayanithy, V., West, R.B., Lee, C.H., Beck, A.H., Zhu, S., Downs-Kelly, E., Montgomery, K., Goldblum, J.R., Hogendoorn, P.C., Corless, C.L., Oliveira, A.M., Dry, S.M., Nielsen, T.O., Rubin, B.P., Fletcher, J.A., Fletcher, C.D., van de Rijn, M.,**(2010).Genome-wide transcriptome analyses reveal p53 inactivation mediated loss of mir-34a expression in malignant peripheral nerve sheath tumours. *J Pathol*, 220(1), 58-70.
- Tamura, R.,**(2021).Current understanding of neurofibromatosis type 1, 2, and schwannomatosis. *Int J Mol Sci*, 22(11).
- Upadhyaya, M., Majounie, E., Thompson, P., Han, S., Consoli, C., Krawczak, M., Cordeiro, I., Cooper, D.N.,**(2003).Threedifferent pathological lesions in the nf1 gene originating de novo in a family with neurofibromatosis type 1. *Hum Genet*, 112(1), 12-17.
- Venegas, V., Wang, J., Dimmock, D., Wong, L.J.,**(2011).Real-time quantitative pcr analysis of mitochondrial DNA content. *Current protocols in human genetics*, 68(1), 19.17. 11-19.17. 12.
- Venkatadri, R., Muni, T., Iyer, A., Yakisich, J., Azad, N.,**(2016).Role of apoptosis-related mirnas in resveratrol-induced breast cancer cell death. *Cell death & disease*, 7(2), e2104-e2104.
- von Deimling, A., Krone, W., Menon, A.G.,**(1995).Neurofibromatosis type 1: Pathology, clinical features and molecular genetics. *Brain Pathol*, 5(2), 153-162.
- Wallace, D.C.,**(2018).Mitochondrial genetic medicine. *Nat Genet*, 50(12), 1642-1649.
- Wallace, D.C., Chalkia, D.,**(2013).Mitochondrial DNA genetics and the heteroplasmy conundrum in evolution and disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 5(11), a021220.
- Wang, K., Long, B., Jiao, J.-Q., Wang, J.-X., Liu, J.-P., Li, Q., Li, P.-F.,**(2012).Mir-484 regulates mitochondrial network through targeting fis1. *Nature communications*, 3(1), 1-9.
- Wang, S., Ma, G., Zhu, H., Lv, C., Chu, H., Tong, N., Wu, D., Qiang, F., Gong, W., Zhao, Q., Tao, G., Zhou, J., Zhang, Z., Wang, M.,**(2016).Mir-107 regulates tumor progression by targeting nf1 in gastric cancer. *Sci Rep*, 6, 36531.
- Wang, W.-X., Springer, J.E.,**(2015).Role of mitochondria in regulating microRNA activity and its relevance to the central nervous system. *Neural regeneration research*, 10(7), 1026.
- Wegscheid, M.L., Anastasaki, C., Gutmann, D.H.,**(2018).Human stem cell modeling in neurofibromatosis type 1 (nf1). *Experimental neurology*, 299, 270-280.
- Wilson, B.N., John, A.M., Handler, M.Z., Schwartz, R.A.,**(2021).Neurofibromatosis type 1: New developments in genetics and treatment. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 84(6), 1667-1676.
- Xiao, J., Niu, S., Zhu, J., Lv, L., Deng, H., Pan, D., Shen, D., Xu, C., Shen, Z., Tao, T.,**(2018).Mir-22-3p enhances multi-chemoresistance by targeting net1 in bladder cancer cells. *Oncology reports*, 39(6), 2731-2740.

- Ye, W., Liang, F., Ying, C., Zhang, M., Feng, D., Jiang, X.,**(2019).Downregulation of microrna-3934-5p induces apoptosis and inhibits the proliferation of neuroblastoma cells by targeting tp53inp1. *Exp Ther Med*, 18(5), 3729-3736.
- Yuan, Y., Yao, Y.F., Hu, S.N., Gao, J., Zhang, L.L.,**(2015).Mir-133a is functionally involved in doxorubicin-resistance in breast cancer cells mcf-7 via its regulation of the expression of uncoupling protein 2. *PloS one*, 10(6), e0129843.
- Zhang, W.C., Chin, T.M., Yang, H., Nga, M.E., Lunny, D.P., Lim, E.K., Sun, L. L., Pang, Y.H., Leow, Y.N., Malusay, S.R., Lim, P.X., Lee, J.Z., Tan, B.J., Shyh-Chang, N., Lim, E.H., Lim, W.T., Tan, D.S., Tan, E.H., Tai, B.C., Soo, R.A, Tam, W.L., Lim, B.,**(2016).Tumour-initiating cell-specific mir-1246 and mir-1290 expression converge to promote non-small cell lung cancer progression. *Nat Commun*, 7, 11702.
- Zhao, W.-G., Yu, S.-N., Lu, Z.-H., Ma, Y.-H., Gu, Y.-M., Chen, J.,**(2010).The mir-217 microrna functions as a potential tumor suppressor in pancreatic ductal adenocarcinoma by targeting kras. *Carcinogenesis*, 31(10), 1726-1733.
- Zhu, Y., Han, Y., Tian, T., Su, P., Jin, G., Chen, J., Cao, Y.,**(2018).Mir-21-5p, mir-34a, and human telomerase rna component as surrogate markers for cervical cancer progression. *Pathol Res Pract*, 214(3), 374-379.
- Zorov, D.B., Isaev, N.K., Plotnikov, E.Y., Silachev, D.N., Zorova, L.D., Pevzner, I.B., Morosanova, M.A., Jankauskas, S.S., Zorov, S.D., Babenko, V.A.,**(2013).Perspectives of mitochondrial medicine. *Biochemistry (Mosc)*, 78(9), 979-990.



EKLER

EK-1: NF1 Tumor Doku Örneklerinde Mitokondriyel MiRNA Verilerinin Analizi ve Değerlendirilmesi Etik Kurul İzni



Ek-1

ETİK KURUL BİLGİLERİ	ETİK KURULUN ADI	TOBB ETÜ TIP FAKÜLTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU
	ETİK KURULUN ADRESİ	TOBB ETÜ TIP FAKÜLTESİ SUAM YAŞAM CAD. NO.5 06510 SÖĞÜTÖZÜ/ANKARA
	TELEFON	0 (312) 292 99 95
	FAX	0 (312) 220 13 44
	E-POSTA	tobbetutip.kaeik@etu.edu.tr

BAŞVURU BİLGİLERİ	ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	NÖROFİBROMATOSEZ TIP 1 TÜMÖR DOKU ÖRNEKLERİNDE MİTOKONDRIYEL miRNA VERİLERİNİN ANALİZİ VE DEĞERLENDİRİLMESİ			
	ARAŞTIRMA PROTOKOL NO	KAEK-118/088			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACI ÜNİVANİ ADI SOYADI	PROF. DR. İBRAHİM VARGEL, DR. ÖĞR. ÜYESİ PARİSA SHARAFİ			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ UZMANLIK ALANI	PLASTİK REKONSTRÜKTİF VE ESTETİK CERRAHI, TIBBİ BİYOLOJİ			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ BULUNDUĞU MERKEZ	HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ, TOBB ETÜ ÜNİVERSİTESİ			
	DESTEKLEYİCİ ÜNİVANİ /YASAL TEMSİLCİSİ	TÜBİTAK 3501			
	ARAŞTIRMANIN FAZİ VE TÜRÜ	Faz			
		Gözlemsel ilaç çalışması			
		Tıbbi cihaz klinik araştırması			
		In vitro tıbbi tanı cihazları ile yapılan performans değerlendirme çalışmaları			
İlaç dışı klinik araştırma					
Diger ise belirtiniz	BİYOLOJİK ÜRÜNLER İLE YAPILAN KLİNİK ARAŞTIRMA				
ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	TEK MERKEZ <input type="checkbox"/>	ÇOK MERKEZLİ <input checked="" type="checkbox"/>	ULUSAL <input checked="" type="checkbox"/>	ULUSLAR ARASI <input type="checkbox"/>	

	DEĞERLENDİRİLMİŞ ÖZNEMLİ OLUR FORMU	23.09.2020		Türkçe <input checked="" type="checkbox"/> İngilizce <input type="checkbox"/> Diğer <input type="checkbox"/>
	OLGU RAPOR FORMU			Türkçe <input type="checkbox"/> İngilizce <input type="checkbox"/> Diğer <input type="checkbox"/>
	ARAŞTIRMA BROŞÜRÜ			Türkçe <input type="checkbox"/> İngilizce <input type="checkbox"/> Diğer <input type="checkbox"/>
DEĞERLENDİRİLEN DİĞER BELGELER	BELGE ADI		AÇIKLAMA	
	TUNAÇE ETİKET ÖRNEĞİ			
	SİGORTA			
	ARAŞTIRMA BÜTÇESİ		TÜBİTAK 3501 PROJESİNE BAŞVURULACAKTIR. 360.000,00 TL.	
	REVOLÜKİ METERYEL TRANSFER FORMU			
	HASTA KART/GÖNÜLLEMLERİ			
	İLAN			
	YILLIK BİLDİRİM			
	SONUÇ RAPORU			
	ÖZETLER BİLDİRİMLERİ			
KARAR BELGELERİ	KARAR NO: 070		TARİHİ: 23.09.2020	
	NÖROFİBRİNOMATÖZ TİP 1 TÜMÖR DOKU ÖRNEKLERİNDE MITOKONDRİYEL DNA VERİLERİNİN ANALİZİ VE DEĞERLENDİRİLMESİ KONUSU ARAŞTIRMA DOSYASI İNCELENMİŞ VE KAEK 'CE DORVA <u>ONAYLANMIŞTIR.</u>			

KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU							
ETİK KURULU ÇALIŞMA ESAS	T088 ETU TIP FAKÜLTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU STANDART ÇALIŞMA YÖNTEMİ ELASLARI						
BAŞKANIN İSİMİ VE KURUMU	Doç. Dr. Fehmi FİRERMANCI						
Üyeleri/ Adı Soyadı	Üzvanları	Kurum	Özellik	Araştırma ile ilgili	Kesim	İmza	
Prof. Dr. N. Gedhan Tulunoay	Kadın Hastalıkları ve Doğum	T088 ETU Tıp Fakültesi	<input checked="" type="checkbox"/> K1	<input type="checkbox"/> E1	<input checked="" type="checkbox"/> E2	<input type="checkbox"/> H1	
Prof. Dr. Günsel Eroglu	Biyomedikal Mühendisliği	T088 ETU Mühendislik Fakültesi	<input checked="" type="checkbox"/> K1	<input type="checkbox"/> E1	<input checked="" type="checkbox"/> E2	<input type="checkbox"/> H1	Tıp Fakültesi Kahraman
Prof. Dr. Meriç Çelik	Biyokimya	BASGENT Ünl. Sağlık Fakültesi (Kuram Dışı Üye)	<input type="checkbox"/> K1	<input checked="" type="checkbox"/> E1	<input checked="" type="checkbox"/> E2	<input type="checkbox"/> H1	
Prof. Dr. Beşir Güner	T088 Farmakoloji	T088 ETU Tıp Fakültesi	<input type="checkbox"/> K1	<input checked="" type="checkbox"/> E1	<input checked="" type="checkbox"/> E2	<input type="checkbox"/> H1	
Doç. Dr. Digan Doğramacı	Orta Hukuku	T088 ETU Hukuk Fakültesi	<input checked="" type="checkbox"/> K1	<input type="checkbox"/> E1	<input checked="" type="checkbox"/> E2	<input type="checkbox"/> H1	
Doç. Dr. F. Erol Ersoy	Tıp Tarihi ve Etik	T088 ETU Tıp Fakültesi	<input type="checkbox"/> K1	<input checked="" type="checkbox"/> E1	<input checked="" type="checkbox"/> E2	<input type="checkbox"/> H1	ayrıntılı M. Ersoy

23.09.2020

Sayın Araştırmacı,

TOBB-ETÜ Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kuruluna sunmuş olduğunuz NÖROFİBROMATOSIZ TIP 1 TÜMÖR DOKU ÖRNEKLERİNDE MİTOKONDRIYEL miRNA VERİLERİNİN ANALİZİ VE DEĞERLENDİRİLMESİ başlıklı, 29.06.2020 tarih ve KAEK-118/088 sayılı araştırmanız/projeniz kurumumuz tarafından etik aēdan onaylanmıştır.

Projenizin/araştırmanızın makale haline getirilmesi durumunda "Bu proje/araştırma TOBB-ETÜ Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu tarafından onaylanmıştır, (kayıbı sayısa/tarih)" cümlesine; eğer makaleniz İngilizce yazılacaksa "This Project/study is approved by TOBB-ETÜ Clinical Research (approval number/date)" cümlesine yer verilmesi gereklidir.

Prof. Dr. M. Devrim GÜNER
TOBB ETÜ Tıp Fakültesi
KAEK Bşk. Yrd.