



**T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**



DOKTORA TEZİ

**AORT DİSEKSİYONU OLAN HASTALARDA *MMP2* ve *TIMP2*
GENLERİNİN ANLATIM ANALİZİ**

Tuğba KÖSE

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Moleküler Biyoloji ve Genetik Programı

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Tuba GÜNEL**

Haziran, 2022

İSTANBUL

Bu çalışma, 21.06.2022 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, Moleküler Biyoloji ve Genetik Programında Doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Jürisi

Prof. Dr. Tuba GÜNEL(Danışman)
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi

Prof. Dr. E. Ş. Nazlı ARDA
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi

Prof. Dr. Ayşegül TOPAL SARIKAYA
Yeni Yüzyıl Üniversitesi
Fen Edebiyat Fakültesi

Prof. Dr. Evren ÖNAY UÇAR
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi

Doç. Dr. Öyküm Esra YİĞİT
Yıldız Teknik Üniversitesi
Fen Edebiyat Fakültesi

İntihal Programı Beyanı

20.04.2016 tarihli Resmi Gazete’de yayımlanan Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin 9/2 ve 22/2 maddeleri gereğince; Bu Lisansüstü teze, İstanbul Üniversitesi’nin abonesi olduğu intihal yazılım programı kullanılarak Fen Bilimleri Enstitüsü’nün belirlemiş olduğu ölçütlere uygun rapor alınmıştır.

Proje Destekleri

Bu tez, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yürütücü Sekreterliğinin 34118 numaralı projesi ile desteklenmiştir.

Tezden Üretilmiş Yayınların Künye Bilgileri

--

ÖNSÖZ

Her anlamda eğitici ve öğretici olan Doktora eğitimim boyunca geniş tecrübesi ile her zaman yanımda olan, akademik birikimi, disiplini ve çalışma prensibi ile daima örnek aldığım danışmanım Sayın Prof. Dr. Tuba GÜNEL'e,

Doktora tez dönemi süresince tecrübeleri ve birikimleri ile desteklerini esirgemeyen Tez İzleme Komisyonu üyelerim Prof. Dr. Nazlı ARDA ve Prof. Dr. Ayşegül TOPAL SARIKAYA'ya,

Hasta materyallerinin sağlanması sürecindeki tüm özverili çalışmaları için Uzm. Dr. Arzu ANTAL'a,

İstanbul Üniversitesi Genetik Hastalıklar ve Moleküler Analiz Birimi Laboratuvarı'nda deneylerim sırasında destek ve yardımlarını hiç esirgemeyen laboratuvar arkadaşlarıma,

İstanbul Bilgi Üniversitesi Genetik ve Biyomühendislik Bölümü'nde araştırma görevlisi olarak çalıştığım süre boyunca her zaman desteklerini hissettiğim, başta Prof. Dr. Hatice GÜLEN ve Dr. Öğr. Üyesi Yuk YİN NG olmak üzere saygıdeğer hocalarıma ve birlikte emek verirken zamanla en yakınlarım olan başta Semra ÖZDEMİR SALİHOĞLU, Melike BELENLİ GÜMÜŞ, Çiğdem SEZER ZHMUROV ve Müge KESİCİ olmak üzere sevgili asistan arkadaşlarıma,

Lisans eğitimimden bu yana yanımda olan, desteklerini hep yanımda hissettiğim dostlarım Özlem YILDIRIM, Gülhün ATALAN ve Semih ATALAN'a,

Birlikte büyüdüğüm yoldaşım, sırdaşım canım arkadaşım Zehra OLUZ YAZLAK'a,

Ömür boyunca birbirimize destek olacağımız, güzel kızlarım, kardeşlerim Özge KÖSE, Burcu KÖSE ve Yaren KÖSE'ye

Ve son olarak biriciklerim annem ve babama bu uzun ve yorucu yolda yanımda oldukları için çok teşekkür ederim.

Haziran 2022

Tuğba KÖSE

İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
ÖNSÖZ	iv
İÇİNDEKİLER	v
ŞEKİL LİSTESİ	viii
TABLO LİSTESİ	xii
SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ	xv
ÖZET	xviii
SUMMARY	xx
1. GİRİŞ	1
1.1 ARAŞTIRMANIN AMACI	1
1.2 MATERYAL VE YÖNTEM	2
1.3 BULGULAR VE TARTIŞMA	3
2. GENEL KISIMLAR	4
2.1 AORT	4
2.2 AORT DİSEKSİYONU	6
2.2.1 Aort Diseksiyonunun Anatomik Sınıflandırması	8
2.3 MATRİKS METALLOPROTEİNAZ	9
2.3.1 Matriks Metalloproteinaz Gen Ailesi	10
2.3.1.1 MMP2	12
2.3.1.2 MMP9	14
2.4 MATRİKS METALLOPROTEİNAZLARIN DOKU İNHİBİTÖRLERİ	15
2.4.1 TIMP1	15
2.4.2 TIMP2	16
2.4.3 TIMP3	16
2.4.4 TIMP4	17
2.5 MATRİKS METALLOPROTEİNAZ VE METALLOPROTEİNAZLARIN DOKU İNHİBİTÖRLERİNİN AORT DİSEKSİYONU İLE İLİŞKİSİ	18
2.6 MATRİKS METALLOPROTEİNAZLAR VE METALLOPROTEİNAZLARIN DOKU İNHİBİTÖRLERİNİN EPİGENETİK DÜZENLENMESİ	20
2.7 DAMLACIKLI DİJİTAL POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU	23
2.8 METİL SENSİTİF YÜKSEK ÇÖZÜNÜRLÜKLÜ ERİME	24

3. MALZEME VE YÖNTEM.....	26
3.1 HASTA VE KONTROL GRUBUNUN SEÇİMİ.....	26
3.2 HEDEF GENLERİN SEÇİMİ	27
3.3 HASTA VE KONTROL GRUBU ÖRNEKLERİNİN ELDE EDİLMESİ	28
3.3.1 Aort Damar Dokusu Eldesi	28
3.3.2 Periferik Kandan Monosit Hücre Eldesi.....	28
3.4 AORT DAMAR DOKUSU VE MONSİT HÜCRELERDEN TOTAL RNA İZOLASYONU	30
3.5 İZOLE EDİLEN RNA'LARIN KALİTE VE MİKTAR TAYİNİ.....	32
3.6 CDNA SENTEZİ	32
3.7 DAMLACIKLI DİJİTAL POLİMERAZ REAKSİYONU UYGULAMASI.....	33
3.8 METİLASYON SENSİTİF YÜKSEK ÇÖZÜNÜRLÜKLÜ ERİME EĞRİSİ ANALİZİ İÇİN PRİMER TASARIMI	36
3.9 METİLASYON POZİTİF VE NEGATİF KONTROLÜ OLARAK “JURKAT” HÜCRELERİNİN BÜYÜTÜLMESİ.....	39
3.9.1 Metilasyon Pozitif Kontrolü Olarak “ <i>Jurkat</i> ” Hücrelerinin Büyütülmesi.....	39
3.9.2 Metilasyon Negatif Kontrolü Olarak “ <i>Jurkat</i> ” Hücrelerine 5-Aza-2'-deoksisitidin Uygulaması.....	39
3.9.2.1 5-Aza-2'-deoksisitidin Solüsyonunun Hazırlanması	39
3.9.2.2 “ <i>Jurkat</i> ” Hücrelerine Günlük 5-Aza-2'-deoksisitidin Uygulaması	40
3.9.3 Metilasyon Pozitif ve Negatif Kontrol “ <i>Jurkat</i> ” Hücrelerinin DNA İzolasyonu Öncesi Canlılık ve Miktar Tayini.....	40
3.10 AORT DAMAR DOKUSU VE “ <i>JURKAT</i> ” HÜCRE KÜLTÜRÜNDEN DNA İZOLASYONUNU.....	41
3.10.1 Aort Damar Dokusundan DNA İzolasyonu	41
3.10.2 “ <i>Jurkat</i> ” Hücre Kültüründen DNA İzolasyonu.....	42
3.10.3 İzole Edilen DNA'ların Kalite ve Miktar Tayini	43
3.11 METİLASYON POZİTİF KONTROLÜ OLAN “ <i>JURKAT</i> ” HÜCRERİNE “CPG METHYLTRANSFERASE-M.SSSI” UYGULAMASI	43
3.12 HASTA VE KONTROL GRUBU ÖRNEKLERİNE BİSÜLFİT MODİFİKASYON İŞLEMİ.....	44
3.13 POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU İLE HEDEF BÖLGENİN ÇOĞALTILMASI	45
3.14 METİLASYON SENSİTİF YÜKSEK ÇÖZÜNÜRLÜKLÜ ERİME ANALİZİ UYGULAMASI	46
3.14.1 Metilasyon Negatif (Metillenmemiş) Kontrolünün CpG Metillenme Yüzdesinin Kontrolü.....	47

3.14.2 Metilasyon Pozitif (Metillenmiş) Kontrolünün CpG Metillenme Yüzdesinin Kontrolü	48
3.14.3 MS-HRM Analizi ile Metilasyon Standartlarının Elde Edilmesi.....	48
3.14.4 Hasta ve Kontrol Grubunda Metilasyon Sensitif Yüksek Çözünürlüklü Erime Uygulaması	48
4. BULGULAR.....	49
4.1 HASTA VE KONTROL GRUBUNUN DEMOGRAFİK ÖZELLİKLERİ.....	49
4.2 MOLEKÜLER ANALİZLER.....	49
4.2.2 cDNA Sentezi İçin Kullanılan RNA Miktarları	50
4.2.3 ddPZR Sonucunda Elde Edilen Değerler ve Sonuçların Normalizasyonu.....	52
4.2.4 mRNA Anlatım Analizi.....	54
4.2.5 Metilasyon Pozitif ve Negatif Kontrolü Olarak “ <i>Jurkat</i> ” Hücrelerinin Büyütülmesi ve Kontrolü.....	66
4.2.6 Metilasyon Sensitif Yüksek Çözünürlüklü Erime Analizi İçin Tasarlanan Primelerin Optimizasyonu	67
4.2.7 Bisülfid Modifikasyon İşlemi Yapılan Örneklerin Kontrol Edilmesi	67
4.2.8 Metilasyon Negatif (Metillenmemiş) Kontrolünün CpG Metillenme Yüzdesinin Kontrol Edilmesi	69
4.2.9 Metilasyon Pozitif (Metillenmiş) Kontrolünün “CpG Metiltransferaz” Uygulaması Öncesindeki Metillenme Yüzdesinin Kontrolü	72
4.2.10 Hedef Genler İçin Metilasyon Kontrol Örnekleriyle Metilasyon Düzeyi Standardı Elde Edilmesi	74
4.2.11 <i>MMP2</i> ve <i>TIMP2</i> Genleri ile Yapılan MS-HRM Analizi	77
4.2.12 TAD Hasta ve Kontrol Grubu Örneklerinde <i>MMP9</i> ve <i>TIMP3</i> Genlerinin MS-HRM Yöntemi ile Metilasyon Düzeylerinin Belirlenmesi.....	79
4.2.12.1 <i>MMP9</i>	79
4.2.12.2 <i>TIMP3</i>	81
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	85
KAYNAKLAR.....	96
EKLER	103
ÖZGEÇMİŞ	106

ŞEKİL LİSTESİ

	Sayfa No
Şekil 2.1: Aort damarının yapısı ve tabakaları ¹	4
Şekil 2.2: Aort damarında yırtığın meydana gelmesiyle yalan lümen oluşumunun şematik gösterimi ¹	6
Şekil 2.3: Aort diseksiyonunun sınıflandırılması ¹	9
Şekil 2.4: Matriks metalloproteinazların genel yapısal elemanlarının şematik gösterimi.	9
Şekil 2.5: <i>MMP2</i> geninin 16. kromozom üzerindeki yeri ¹	12
Şekil 2.6: <i>MMP9</i> geninin 20. kromozom üzerindeki yeri ¹	14
Şekil 2.7: <i>MMP</i> -substrat ve <i>MMP</i> - <i>TIMP</i> etkileşiminin şematik gösterimi.	15
Şekil 2.8: <i>TIMP1</i> geninin X kromozom üzerindeki yeri ¹	15
Şekil 2.9: <i>TIMP2</i> geninin 17. kromozom üzerindeki yeri ¹	16
Şekil 2.10: <i>TIMP3</i> geninin 22. kromozom üzerindeki yeri ¹	17
Şekil 2.11: <i>TIMP4</i> geninin 3. kromozom üzerindeki yeri ²	17
Şekil 2.12: <i>MMP</i> ve <i>TIMP</i> 'ların hücredeki yerleri ve birbirleri ile olan etkileşimleri ¹	18
Şekil 2.13: <i>TGF-β</i> ve <i>AngII</i> aracılığı ile <i>MMP2</i> ve <i>MMP9</i> anlatımının düzenlenmesi ¹	19
Şekil 2.14: Hücrede meydana gelen epigenetik modifikasyonların gösterimi ¹	21
Şekil 2.15: DNA metilasyonunun şematik gösterimi.	22
Şekil 2.16: ddPZR yönteminin uygulama basamaklarının şematik gösterimi.	24
Şekil 2.17: Bisülfıt çevrim ve PZR işlemleri sonrasında oluşan yeni dizinin şematik gösterimi.	25
Şekil 2.18: MS-HRM sonucunda elde edilen erime eğrileri	25
Şekil 3.1: Tez kapsamında planlanan deney akış şeması.	27
Şekil 3.2: Hedef genlerin birbirleri ile olan fonksiyonel ilişkilerinin şematik gösterimi ¹	28
Şekil 3.3: Fikol yardımı ile monosit hücrelerin total kan hücrelerinden ayrılması.	30

Şekil 3.4: MS-HRM analizi için primer tasarımı akış şeması ¹ .	38
Şekil 3.5: “ <i>Jurkat</i> ” hücrelerinin canlılık ve miktar tayini. A: “ <i>Jurkat</i> ” hücre kültürü. B: Hücre-boya karışımının “Dual-Chamber”a alınması. C: Hücre sayımının gerçekleştirilmesi.	41
Şekil 4.1: Aort damar dokusunda TAD hastası ve kontrol grubu örneklerine ait ddPZR grafikleri. Grafikler hedef genlere göre ayrı ayrı gösterilmiştir. Pozitif ve negatif damlacıklar farklı alanlarda kümelenmiş olup renk kodu ile ayırt edilmiştir. Mavi damlacıklar hedef genin kopya cDNA’sını içerirken siyah damlacıklar içermemektedir (negatif damlacık). Damlacık kümelerinin ayırımını netleştiren pembe yatay çizgi dışarıdan müdahale ile çizilebildiği gibi sistem otomatik olarak da atayabilmektedir.	55
Şekil 4.2: Kan (monosit) hücrelerinde TAD hastası ve kontrol grubu örneklerine ait ddPZR grafikleri. Grafikler hedef genlere göre ayrı ayrı gösterilmiştir. Pozitif ve negatif damlacıklar farklı alanlarda kümelenmiş olup renk kodu ile ayırt edilmiştir. Mavi damlacıklar hedef genin kopya cDNA’sını içerirken siyah damlacıklar içermemektedir (negatif damlacık). Damlacık kümelerinin ayırımını netleştiren pembe yatay çizgi dışarıdan müdahale ile çizilebildiği gibi sistem otomatik olarak da atayabilmektedir.	56
Şekil 4.3: Aort dokusu <i>MMP2</i> , <i>TIMP2</i> , <i>MMP9</i> ve <i>TIMP3</i> genlerinin ROC analizleri.	58
Şekil 4.4: Kan monosit hücrelerinde <i>MMP2</i> , <i>TIMP2</i> , <i>MMP9</i> ve <i>TIMP3</i> genlerinin ROC analizleri.	58
Şekil 4.5: Aort dokusu MMP/TIMP değerinin ROC analizleri.	59
Şekil 4.6: Monosit hücrelerinde MMP/TIMP değerinin ROC analizleri.	59
Şekil 4.7: <i>MMP2</i> , <i>TIMP2</i> , <i>MMP9</i> ve <i>TIMP3</i> genlerinin aort dokusundaki gen anlatım seviyeleri. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$	60
Şekil 4.8: <i>MMP2</i> , <i>TIMP2</i> , <i>MMP9</i> ve <i>TIMP3</i> genlerinin kandaki (monosit hücre) gen anlatım seviyeleri.	61
Şekil 4.9: Aort damar dokusunda MMP/TIMP gen anlatımı oranları. * $p < 0.05$.	61
Şekil 4.10: Kandaki (monosit hücre) MMP/TIMP gen anlatımı oranları.	62
Şekil 4.11: <i>MMP2</i> , <i>TIMP2</i> , <i>MMP9</i> ve <i>TIMP3</i> genlerinin aort dokusundaki gen anlatım seviyeleri. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$	63
Şekil 4.12: <i>MMP2</i> , <i>TIMP2</i> , <i>MMP9</i> ve <i>TIMP3</i> genlerinin periferik kandaki (monosit hücre) gen anlatım seviyeleri.	63
Şekil 4.13: Metilasyon pozitif kontrolü “ <i>Jurkat</i> ” hücrelerinin ışık mikroskobu (100X) altındaki görünüşleri. Soldan sağa doğru; 1. gün ve 7.gün	66

Şekil 4.14: Metilasyon negatif kontrolü, her gün 2µM DAC uygulaması yapılmış “ <i>Jurkat</i> ” hücrelerinin ışık mikroskobu (100X) altındaki görünüşleri. Soldan sağa doğru; 1. gün ve 7.gün.	66
Şekil 4.15: Tasarlanan primerlerin C-T dönüşümü yapılmış DNA ile yapılan gradient PZR sonucu ¹	67
Şekil 4.16: CT dönüşümü yapılmamış ve CT dönüşümü yapılmış TAD hasta doku örneklerinin N- <i>MMP9</i> primeri ile gerçekleştirilen PZR sonucu. Üst sıra: CT dönüşümü yapılmamış DNA, N- <i>MMP9</i> primeri ile çoğaltılabilmektedir. Alt sıra: CT dönüşüm gerçekleştirilen DNA örneklerinde N- <i>MMP9</i> primeri ile çoğalma gözlenmemiştir. DNA cetveli 100 baz, N- <i>MMP9</i> primerinin ürün uzunluğu 120 bazdır.	68
Şekil 4.17: CT dönüşümü yapılmamış ve CT dönüşümü yapılmış kontrol doku örneklerinin N- <i>MMP9</i> primeri ile gerçekleştirilen PZR sonucu. Üst sıra: CT dönüşümü yapılmamış DNA, N- <i>MMP9</i> primeri ile çoğaltılabilmektedir. Alt sıra: CT dönüşüm gerçekleştirilen DNA örneklerinde N- <i>MMP9</i> primeri ile çoğalma gözlenmemiştir. DNA cetveli 100 baz, N- <i>MMP9</i> primerinin ürün uzunluğu 120 bazdır.	68
Şekil 4.18: “Metillenmiş DNA” ve “Metillenmemiş DNA”nın farklı dilüsyon oranlarında karıştırılarak ara metilasyon yüzdesi değerlerini temsil eden örnekler elde edilmesi.	69
Şekil 4.19: Negatif kontrol (%0 Metillenmiş) olarak kullanılan “ <i>Jurkat</i> ” DNA’sının yaklaşık %50 metillenmiş olduğunun gösterilmesi.	70
Şekil 4.20: Metilasyon negatif kontrolün (DAC uygulanmış) metilasyon yüzdesi tahmininin gösterilmesi.	71
Şekil 4.21: “ <i>CpG Methyltransferase</i> ” uygulaması yapılan “ <i>Jurkat</i> ” hücrelerinin metilasyon düzeyinin, uygulama yapılmayan hücrelere göre arttığının gösterilmesi.	73
Şekil 4.22: “ <i>CpG Methyltransferase</i> ” uygulanmamış örneğin metilasyon yüzdesinin gösterilmesi.	74
Şekil 4.23: <i>MMP9</i> geni için tüm kontrol örneklerinde metilasyon oranlarına göre elde edilen erime eğrileri.	75
Şekil 4.24: <i>MMP9</i> geninde metilasyon standart örnekleri ve NTC kontrol ile elde edilen amplifikasyon eğrisi.	75
Şekil 4.25: <i>TIMP3</i> geni için kontrol örneklerinde metilasyon oranlarına göre elde edilen erime eğrileri.	76
Şekil 4.26: <i>TIMP3</i> geni için kontrol örneklerinde elde edilen amplifikasyon eğrisi.	77
Şekil 4.27: <i>MMP2</i> ve <i>TIMP2</i> genlerinin farklı PZR hazırlama solüsyonları ile amplifikasyon denemesi. Üst sıra; <i>MMP2</i> geninin sırasıyla “ <i>ThermoScientific PCR</i> ”	

<i>MM</i> ” ve “ <i>HOT FIREPol</i> ® <i>EvaGreen HRM Mix (Solis BioDyne)</i> ” ile PZR sonuçları. Alt sıra; <i>TIMP2</i> geninin sırasıyla “ <i>ThermoScientific PCR MM</i> ” ve “ <i>HOT FIREPol</i> ® <i>EvaGreen HRM Mix (Solis BioDyne)</i> ” ile PZR sonuçları.	78
Şekil 4.28: <i>TIMP2</i> geni için tasarlanan her iki primer seti kullanılarak “ <i>ThermoScientific MM</i> ” ve “ <i>HOT FIREPol</i> ® <i>EvaGreen HRM Mix (Solis BioDyne)</i> ” karışımı ile yapılan PZR çalışılması sonuçları.	79
Şekil 4.29: <i>MMP9</i> geni için tüm hasta ve kontrol örneklerinde metilasyon oranlarına göre elde edilen erime eğrileri.	79
Şekil 4.30: <i>MMP9</i> geni için tüm TAD hasta ve kontrol örnekleri ve DNA’sız kontrol (NTC) ile elde edilen amplifikasyon eğrisi.	80
Şekil 4.31: <i>TIMP3</i> geni için tüm TAD hasta ve kontrol örneklerinde metilasyon oranlarına göre elde edilen erime eğrileri.	81
Şekil 4.32: <i>TIMP3</i> geni için tüm TAD hasta ve kontrol örnekleri ve DNA’sız kontrol (NTC) ile elde edilen amplifikasyon eğrisi.	82
Şekil 4.33: <i>TIMP3</i> geni için HD2 (Hasta-Doku-2) ve kontrol örneklerinde metilasyon oranlarına göre elde edilen erime eğrileri.	82

TABLO LİSTESİ

	Sayfa No
Tablo 2.1: MMP’lerin sınıflandırılması.....	11
Tablo 3.1: “ <i>iScript cDNA Synthesis Kit</i> ” kullanılarak yapılan cDNA sentezi protokolü.	32
Tablo 3.2: cDNA sentez programı.....	33
Tablo 3.3: Hedef genlerin primer dizileri, Tm dereceleri ve oluşacak ürün boyları.	33
Tablo 3.4: ddPZR uygulamasında kullanılan reaksiyon karışımı için gereken bileşen miktarları.	34
Tablo 3.5: ddPZR termal döngüsü.....	35
Tablo 3.6: Hedef genlerin primer dizileri, Tm dereceleri, oluşacak ürün boyları ve ürünlerin içerdiği CpG sayısı ve promotör motifleri.	37
Tablo 3.7: Negatif kontrol olarak kullanılacak “ <i>Jurkat</i> ” Hücrelerine eklenen DAC miktarları ve elde edilen son konsantrasyonlar.	40
Tablo 3.8: “ <i>CpG Methyltransferase</i> ” uygulamasında kullanılan reaksiyon karışımı için gereken bileşen miktarları.	43
Tablo 3.9: “ <i>CpG Methyltransferase</i> ” uygulamasında uygulanan inkübasyon süreleri.....	43
Tablo 3.10: Bisülfid modifikasyonu işlemi termal döngüsü.	44
Tablo 3.11: PZR uygulamasında kullanılan reaksiyon karışımı için gereken bileşen miktarları.	45
Tablo 3.12: ddPZR termal döngüsü.....	46
Tablo 3.13: MS-HRM uygulamasında kullanılan reaksiyon karışımı için gereken bileşen miktarları.	46
Tablo 3.14: MS-HRM termal döngüsü.	47
Tablo 4.1: Çalışmada kullanılan hasta ve kontrol grubu örneklerinin genel özellikleri ¹	49
Tablo 4.2: Hasta ve kontrol grubu örneklerinin total RNA “ <i>Nanodrop</i> ” ölçüm sonuçları.	50
Tablo 4.3: Hasta ve kontrol grupları aort doku örneklerinin cDNA sentezi için kullanılan RNA miktarları.....	51

Tablo 4.4: Hasta ve kontrol grupları kan-monosit örneklerinin cDNA sentezi için kullanılan RNA miktarları.	51
Tablo 4.5: ddPZR sonucunda elde edilen normalize edilmemiş anlatım değerleri.	52
Tablo 4.6: MMP2, TIMP2, MMP9 ve TIMP3 genlerine ait normalize edilmiş anlatım değerleri.	53
Tablo 4.7: Aort damar dokusu ve periferik kan örneklerinde ddPZR ile yapılan mRNA anlatım analizlerinin istatistiksel sonuçları.	57
Tablo 4.8: <i>MMP2</i> , <i>TIMP2</i> , <i>MMP9</i> ve <i>TIMP3</i> genlerinin hasta grubunda kontrol grubuna kıyasla anlatım miktarlarındaki değişim ¹	64
Tablo 4.9: “Spearman” korelasyon analizi sonu elde edilen “p” ve “r” değerleri ¹	65
Tablo 4.10: Pozitif ve negatif kontrol olarak kullanılan “ <i>Jurkat</i> ” hücrelerinin miktar ve kalite tayini ¹	66
Tablo 4.11: MS-HRM analizinde kullanılan metilasyon standart dilüsyonlarının metilasyon yüzdesi ve -dF/dT değerleri.	71
Tablo 4.12: MS-HRM analizinde metilasyon yüzdesi ve -dF/dT arasındaki doğrusallık ilişkisinin <i>Spearman</i> korelasyonu ile gösterilmesi.	71
Tablo 4.13: MS-HRM analizinde “ <i>CpG Methyltransferase</i> ” uygulanmış ve uygulanmamış örneklerin metilasyon yüzdesi ve -dF/dT değerleri.	73
Tablo 4.14: Metilasyon pozitif kontrolün hesaplanan metilasyon yüzdesi ve -dF/dT değeri arasındaki doğrusallık ilişkisinin “ <i>Spearman</i> ” korelasyonu ile gösterilmesi.	74
Tablo 4.15: MS-HRM analizinde <i>MMP9</i> geni için metilasyon standartlarının metilasyon yüzdesi ve -dF/dT değerleri.	76
Tablo 4.16: MS-HRM analizinde <i>MMP9</i> geni için metilasyon yüzdesi ve -dF/dT arasındaki doğrusallık ilişkisinin <i>Spearman</i> korelasyonu ile gösterilmesi.	76
Tablo 4.17: MS-HRM analizinde <i>TIMP3</i> geni için metilasyon standartlarının metilasyon yüzdesi ve -dF/dT değerleri.	77
Tablo 4.18: MS-HRM analizinde <i>TIMP3</i> geni için metilasyon yüzdesi ve -dF/dT arasındaki doğrusallık ilişkisinin <i>Spearman</i> korelasyonu ile gösterilmesi.	77
Tablo 4.19: TAD hasta ve kontrol grupları <i>MMP9</i> geni MS-HRM analizinde kullanılan metilasyon standartlarının metilasyon yüzdesi ve -dF/dT değerleri.	80
Tablo 4.20: <i>MMP9</i> geni için MS-HRM analizinde metilasyon yüzdesi ve -dF/dT arasındaki ilişkinin <i>Spearman</i> korelasyonu ile gösterilmesi.	80
Tablo 4.21: TAD hasta ve kontrol grupları <i>MMP9</i> geni MS-HRM analizinde elde edilen metilasyon yüzdesi ve -dF/dT değerleri.	81

Tablo 4.22: TAD hasta ve kontrol grupları MMP9 geni MS-HRM analizinde kullanılan metilasyon standartlarının metilasyon yüzdesi ve -dF/dT değerleri.....	83
Tablo 4.23: MS-HRM analizinde metilasyon yüzdesi ve -dF/dT arasındaki doğrusallık ilişkisinin Spearman korelasyonu ile gösterilmesi.	83
Tablo 4.24: TAD hasta ve kontrol grupları <i>TIMP3</i> geni MS-HRM analizinde elde edilen metilasyon yüzdesi ve -dF/dT değerleri.	84
Tablo 4.25: <i>TIMP3</i> geni metilasyon yüzdesine göre TAD hasta ve kontrol gruplarında istatistiksel anlamlılık sonuçları.	84



SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ

Simgeler	Açıklama
$^{\circ}\text{C}$	: Santigrat Derece
dk	: Dakika
<i>g</i>	: Bağlı Santrifüj Kuvveti (<i>“Relative Centrifugal Force”</i> , RCF)
gr	: Gram
ml	: Mililitre
mM	: Milimolar
μM	: Mikromolar
μl	: Mikrolitre
ng	: Nanogram
rpm	: Dakikadaki Devir Sayısı (<i>“Revolutions per Minute”</i>)
U	: Ünite
V	: Volt
w/v	: Ağırlık/Hacim (<i>“Weight/Volume”</i>)
%	: Yüzde

Kısaltmalar	Açıklama
3'UTR	: 3' Translasyon Olmayan Bölge
5'UTR	: 5' Translasyon Olmayan Bölge
5mC	: 5 Metil Sitozin
AD	: Aort Diseksiyonu
ADAM	: Disintegrin ve Metalloproteinaz
ADAMTS	: Trombospondin motifli disintegrin e metalloproteinaz
Ang II	: Anjiyotensin II (Ang II)
AUC	: Eğri altında kalan alan
BKİ	: Beden Kitle İndeksi
cDNA	: Komplementer DNA
DAC	: 5-Aza-2'-deoksisitidin
ddPZR	: damlacıklı dijital polimeraz zincir reaksiyonu

DMSO	: Dimetil Sülfoksit
DNA	: Deoksiribo Nükleik Asit
ECM	: Hücreler Arası Matriks
EDTA	: Etilendiamintetraasetik Asit
ELISA	: Enzim Bağlantılı İmmunosorbent Testi
FBS	: Fetal Bovine Serum
GAPDH	: Gliseraldehit 3 Fosfat Dehidrogenaz
H3K23ac	: Lizin 23. Pozisyondan Asetillenmiş Histon H3 Proteini
JNK	: C-JUN N terminal Kinaz
lnc-RNA	: Uzun Kodlanmayan Ribo Nükleik Asit
M. SssI	: CPG Metiltransferaz
miRNA	: Mikro Ribo Nükleik Asit
MMP	: Matriks Metalloproteinaz
MMP-2	: Matriks Metalloproteinaz-2
MMP-9	: Matriks Metalloproteinaz-9
mRNA	: Mesajcı Ribo Nükleik Asit
MS-HRM	: Metilasyon Sensitif Yüksek Çözünürlüklü Erime
MT-MMP	: Membran Tip Matriks Metalloproteinaz
NTC	: DNA İçermeyen Kontrol
PBS	: Fosfat Salin Tampon Çözeltisi
Pen/Strep	: Penisilin/Streptomisin
ROC	: Receiver Operating Characteristics
ROS	: Reaktif Oksijen Türleri
RPMI 1640 plus	: Roswell Park Memorial Institute 1640 Plus Besi Yeri
SAM	: S-adenosylmethionine
SH	: Sistein Sülfhidril
Ski	: Sloan-Kettering Institute
Smad	: Suppressor of Mothers against Decapentaplegic
SMC	: Düz Kas Hücresi
SnoN	: Ski-yeni (Ski-Novel)
SH	: Standart Hata
T	: Timin
TAD	: Torasik Aort Diseksiyonu
TAE	: Tris-Asetik Asit- EDTA

TGFBR1/2	: Dönüştürücü Büyüme Faktörü β Reseptörü
TGF-β	: Dönüştürücü Büyüme Faktörü β
TIMP	: Metalloproteinazların Doku İnhibitörleri
TIMP-2	: MMP'lerin Dokudaki İnhibitörü-2
TIMP-3	: MMP'lerin Dokudaki İnhibitörü-3
TNF-A	: Tümör Nekroz Faktörü A
UTR	: Çevrilmeyen Bölge (Untranslated Region)
VSMC	: Vasküler Düz Kas Hücresi



ÖZET

DOKTORA TEZİ

AORT DİSEKSİYONU OLAN HASTALARDA *MMP2* ve *TIMP2* GENLERİNİN ANLATIM ANALİZİ

Tuğba KÖSE

İstanbul Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Danışman : Prof. Dr. Tuba GÜNEL

Toraksik Aort Diseksiyonu (TAD) aort damarında meydana gelen son derece ölümcül bir hastalıktır. İnsan vücudunda bulunan en büyük atar damar olan aortun iç tabakasında başlayan bir yırtığın, damar boyunca uzanarak tabakaları birbirinden ayırması ile karakterizedir. Ayrılan tabakalar arasında gerçek damar boşluğuna paralel olarak yalancı bir lümen oluşumu gözlenir. Aort damarının orta tabakası olan medya tabakasında aort damarına dayanıklılığını ve esnekliğini veren hücreler arası matriks (ECM) bulunur. Elastik fiberler ve peptidoglikan yapılar ECM'nin bileşenleridir. TAD vakalarında aort damarında bulunan hücreler arası matriks parçalanmış durumdadır. TAD patogenezinde damarın esnekliğini sağlayan liflerin yapısı ve miktarlarında değişim, hücreler arası matriks proteinlerini parçalayan enzimlerin ve regülatörlerinin arasındaki dengenin bozulması ve bunlara bağlı olarak hücredeki parçalanma faaliyetlerinde artış görülmektedir.

Matriks metalloproteinazlar (MMP) aktif bölgelerinde Zn^{2+} bulunan geniş bir endopeptidaz ailesidir. Endotel hücre, düz kas hücresi, vasküler düz kas hücresi, fibroblast, enflamatuvar hücreler ve aort damar duvarı gibi birçok hücre çeşidinde üretilebilirler. MMP'lerin hücreler arası matriks proteinlerinin yıkılması, ECM devamlılığının sağlanması, kontrolü ve sinyal iletiminin regülasyonu gibi görevleri vardır. MMP'ler dokuda kendi doğal inhibitörleri ile eşzamanlı olarak bulunurlar. Metalloproteinazların doku inhibitörleri (TIMP) MMP'lerin hem aktivasyon hem de inhibisyonlarında aktif bir şekilde rol alırlar.

Bu tez çalışmasındaki ilk amacımız 10 adet TAD hastası ve 10 adet kontrol bireyinden elde edilen aort damar dokusunda TAD patogenezinde önemli rolü olduğu düşünülen *MMP2*, *MMP9*, *TIMP2* ve *TIMP3* genlerinin mRNA düzeyinde anlatım farklılıklarını belirlemektir. İkinci amacımız, çalışma gruplarından elde edilen periferik kan kökenli monosit hücrelerinde *MMP2*, *MMP9*, *TIMP2* ve *TIMP3*'ün gen anlatım analizlerini aort damar dokusundaki gen anlatımı ile karşılaştırmaktır. Üçüncü amacımız ise hedef genlerin promotör bölgelerindeki metilasyon düzenlerinin metilasyon sensitif yüksek çözünürlüklü erime (MS-HRM) yöntemi ile belirlenerek aynı genlerin aort damar dokusundaki gen anlatım miktarları ile olan ilişkisini araştırmaktır.

MMP2, *MMP9*, *TIMP2* ve *TIMP3* genlerinin gen anlatımı analizleri damlacıklı dijital polimeraz zincir reaksiyonu (ddPZR) yöntemi ile gerçekleştirilmiştir. Elde edilen sonuçların TAD hastası ve kontrol grupları arasındaki değişimlerinin istatistiksel anlamlılık düzeyleri parametrik olmayan “*Mann Whitey U*” testi kullanılarak değerlendirilmiştir. Hasta ve kontrol grubu arasında duyarlılık ve özgüllük kontrolü için “*Receiver Operating Characteristics*” (ROC) eğrisi analizi kullanılmıştır. Gerçekleştirilen analizler sonucunda *MMP2*'nin gen anlatımının ($p=0.85$) TAD hastalarının aort damar dokularında kontrol grubuna göre değişmediği, *MMP9*'un ($p=0.043$), *TIMP2*'nin ($p=0.0089$) ve *TIMP3*'ün ($p=0.028$) anlamlı düzeyde azaldığı bulunmuştur. Monosit hücrelerde gerçekleştirilen *MMP2* ($p=0.15$), *MMP9* ($p=0.11$), *TIMP2* ($p=0.25$) ve *TIMP3* ($p=0.37$) gen anlatımı analizinde TAD hastalarında, kontrol grubuna göre anlamlı bir değişikliğin gözlenmediği bulunmuştur. Ayrıca aort damar dokusu ve monosit hücrelerde *MMP/TIMP* oranları da incelenmiştir. Aort damar dokusunda *MMP2/TIMP2* oranı ($p=0.063$) artış göstermiştir ancak istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. *MMP2/TIMP3* oranı ($p=0.012$) TAD örneklerinde kontrollere göre anlamlı düzeyde farklı bulunurken *MMP9/TIMP2* ($p=0.25$) ve *MMP9/TIMP3* ($p=0.80$) oranlarında anlamlı bir artış gözlemlenmemiştir. Monosit hücrelerde ise *MMP2/TIMP2* ($p=0.45$), *MMP2/TIMP3* ($p=0.68$), *MMP9/TIMP2* ($p=0.80$) ve *MMP9/TIMP3* ($p=0.28$) olarak bulunmuştur. Hedef genlerin promotör bölgelerindeki metilasyon düzeninin araştırılması için kullanılan MS-HRM yöntemi sonucunda *MMP9* geninde hedeflenen bölgede TAD hastalarında ve kontrol grubunda metillenme yüzdesi %0 olarak belirlenmiştir. *TIMP3* geninde ise TAD hastalarında promotör bölgesinin ortalama metillenme düzeyi %10 olarak bulunurken kontrol grubunda %12.5 olarak belirlenmiştir. Ek olarak hedef genlerin metilasyon düzenleri ile ilgili TAD hastası ve kontrol grubu arasında anlamlı bir fark olmadığı ($p=0.91$) bulunmuştur.

Yapılan tez çalışması sonucunda TAD hastalarında kontrol dokulara kıyasla elde edilen istatistiksel olarak anlamlı bir düzeyde anlatımı azalmış *MMP9*, *TIMP2* ve *TIMP3* genleri ve istatistiksel anlamlılık düzeyinde artış göstermiş *MMP2/TIMP3* ve istatistiksel anlamlılık düzeyine çok yakın olarak artış göstermiş olan *MMP2/TIMP2* oranları, seçilen hedef genlerin TAD patogenezinde önemli olduğunu düşündürmektedir. Ek olarak istatistiksel anlamlılık düzeyine ulaşmasa da monosit hücrelerde azalan *MMP9* ve *TIMP3* gen anlatımı ve aort damar dokusunda artmış *MMP9/TIMP2*, *MMP9/TIMP3* gen anlatımı oranları da TAD tablosu ile uyumludur. Ayrıca yapılan metilasyon analizinde TAD vakalarında *MMP9* ve *TIMP3* genlerinin gen anlatımlarının düzenlenmesinde DNA metilasyonunun katkısının olmadığı söylenebilir.

Haziran 2022, 127 sayfa.

Anahtar kelimeler: Aort diseksiyonu, MMP, TIMP, ddPZR, MS-HRM

SUMMARY

Ph.D. THESIS

EXPRESSION ANALYSIS of *MMP2* and *TIMP2* GENES IN PATIENTS WITH AORTIC DISSECTION

Tuğba KÖSE

İstanbul University

Institute of Graduate Studies in Sciences

Department of Molecular Biology and Genetics

Supervisor : Prof. Dr. Tuba GÜNEL

Thoracic aortic dissection (TAD) is an extremely lethal disease that occurs inside the aorta. It is characterized by the separation of the layers from each other by a tear starting in the inner layer of the aorta, the largest artery in the human body, extending along the vessel. Between the separated layers, false lumen formation is observed that is parallel to the true lumen. The media layer, which is the middle layer of the aorta, contains the extracellular matrix (ECM) which provides flexibility and strength to the aorta. Elastic fibers and the peptidoglycans structures are the components of ECM. In the TAD cases, the extracellular matrix in the aorta is fragmented. In the TAD pathogenesis, the changes in the structure and amount of fiber that provide the flexibility to the aorta, an imbalance between the enzymes and regulators that break down the ECM proteins, and an increase in cell fragmentation activities are observed accordingly. Matrix metalloproteinases (MMP) are a large endopeptidase family having the Zn^{2+} in their active site. They can be synthesized by the cell types such as endothelial cells, smooth muscle cells, vascular smooth muscle cells, fibroblast, inflammatory cells, and the wall of aorta. MMPs have functions such as the degradation of extracellular matrix proteins, the maintenance and control of ECM, and the regulation of signalling. MMPs are found in the tissue with their natural inhibitors. Tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs) are actively involved in both activation and inhibition of MMPs. Our first aim in this thesis study is to

determine the mRNA level expression differences of the *MMP2*, *MMP9*, *TIMP2* and *TIMP3* genes, which are thought to have an important role in the pathogenesis of TAD, in aortic vascular tissue obtained from 10 TAD patients and 10 control individuals. The second aim of the study is to compare the gene expression levels of *MMP2*, *MMP9*, *TIMP2* and *TIMP3* genes in peripheral blood-derived monocyte cells obtained from the study groups with the gene expression in aortic vascular tissue. Our third aim is to determine the methylation patterns in the promoter regions of target genes by using methylation sensitive high-resolution melting (MS-HRM) method, and to investigate the relation between the target gene expression levels and the methylation pattern in the aortic vascular tissue. The gene expression analysis of the *MMP2*, *MMP9*, *TIMP2* and *TIMP3* genes are conducted by using the digital droplet polymerase chain reaction (ddPCR) method. The statistical significance levels of the changes in the obtained gene expression results between TAD patients and control groups were evaluated with the non-parametric “*Mann Whitey U*” test. “*Receiver Operating Characteristics*” (ROC) curve analysis was used to control the sensitivity and specificity between the patient and control group. As a result of the analyses performed, it is observed that the gene expression of *MMP2* ($p=0.85$) has no change in the aortic tissue of TAD patients compared to the control group, and that *MMP9* ($p=0.043$), *TIMP2* ($p=0.0089$) and *TIMP3* ($p=0.028$) was found to be significantly reduced. In the gene expression analysis performed in monocyte cells, it was found that *MMP2* ($p=0.15$), *MMP9* ($p=0.11$), *TIMP2* ($p=0.25$) and *TIMP3* ($p=0.37$) did not show a significant change in TAD patients compared to the control group. In addition, MMP/TIMP ratios in aortic vascular tissue and monocyte cells were also investigated. *MMP2/TIMP2* ratio ($p=0.063$) increased in aortic vascular tissue, but it was not statistically significant. While the ratio of *MMP2/TIMP3* ($p=0.012$) was found to be significantly different in TAD samples compared to controls, no significant increase was observed in the ratios of *MMP9/TIMP2* ($p=0.25$) and *MMP9/TIMP3* ($p=0.80$). In monocyte cells, *MMP2/TIMP2* ($p=0.45$), *MMP2/TIMP3* ($p=0.68$), *MMP9/TIMP2* ($p=0.80$) and *MMP9/TIMP3* ($p=0.28$) were found. As a result of the MS-HRM method used to investigate the methylation pattern in the promoter regions of target genes, the percentage of methylation in the targeted region of the *MMP9* gene was determined as 0% in TAD patients and in the control group. In the *TIMP3* gene, the mean methylation level of the promoter region was found to be 10% in TAD patients, while it was 12.5% in the control group. Additionally, it was found that there was no significant difference ($p=0.91$) between the TAD patient and the control group regarding the methylation patterns of target genes.

In the conducted thesis, in TAD patients compared to control tissues the statistically significant decrease in the expression of *MMP9*, *TIMP2* and *TIMP3* genes, the statistically significant increase in the ratio of *MMP2/TIMP3*, and an increase in *MMP2/TIMP2* ratio that is very close to the statistical significance level show that selected target genes may have an important role in the pathogenesis of TAD. In addition, decreased *MMP9* and *TIMP3* gene expression in monocyte cells and increased *MMP9/TIMP2*, and *MMP9/TIMP3* gene expression rates in aortic vascular tissue are also compatible with the TAD scenario although the results could not reach statistical significance. Furthermore, as a result of the methylation analysis, it can be said that DNA methylation has no contribution on the regulation of gene expression of *MMP9* and *TIMP3* genes in TAD cases

June 2022, 127 pages.

Keywords: Aortic dissection, MMP, TIMP, ddPCR, MS-HRM

1. GİRİŞ

Aort damarının tabakalarının birbirinden ayrılması ile ortaya çıkan torasik aort diseksiyonu (TAD) her yıl yaklaşık 3/100.000 kişide görülmektedir [1]. TAD vakalarının %50 sinin ilk üç gün içerisinde, %80'inin de iki hafta içerisinde ölümle sonuçlanması beklenmektedir [2, 3]. Torasik aort diseksiyonunda akut ve kronik olmak üzere iki faz bulunmaktadır. Aortun intima ve medya tabakasında ani yırtığın oluşması ile başlayan süreç akut faz olarak adlandırılır. Yırtığın başlangıcı ile damar içerisindeki kan akışı için yeni bir yol oluşur ve aortu oluşturan tabakalar damar boyunca birbirinden ayrılır. Akut diseksiyon, aort dış duvarında incelmeye, yangısal tepkiye ve damar duvarında yüksek miktarda hassasiyete sebep olur. Ayrıca aort damarından dallanan arterlerdeki kan akışında da sorun yaratabileceğinden akut fazda hayati tehlike oluşturan komplikasyonlar sık görülür. Akut fazı takip eden ilk 14 günden sonraki süreç kronik faz olarak adlandırılır. Aort yavaş yavaş iyileşmeye başlar. Ancak eski gücüne dönemeyen dış duvar aort damarında genişleme ve yırtılmaya eğilim gösterir. Bu noktada cerrahi tedavi uygulaması gerekli olur [4]. TAD, aortun medya tabakasında meydana gelen parçalanma ile ilişkilendirilmektedir. Parçalanmış medyada düz kas hücresi kaybı, elastik fiberlerin parçalanması, proteoglikan ve glikozaminoglikan birikimi görülür [5]. Tüm bu süreçte damar sürekliliğinde önemli rol oynayan parçalayıcı enzimlerden olan matriks metalloproteinazlar ve onların regülatörleri aktif rol alır [4].

1.1. ARAŞTIRMANIN AMACI

Tez çalışması kapsamında öncelikli olarak TAD hasta grubuna ait 10 aort damar dokusu ile 10 periferik kan örneğinden elde edilen monosit hücrelerde ve aynı şekilde kontrol grubuna ait 10 aort damar dokusu ile 10 periferik kan örneğinden elde edilen monosit hücrelerde TAD'da önemli rolü olduğu düşünülen *MMP2*, *MMP9*, *TIMP2* ve *TIMP3* genlerinin anlatımlarının analiz edilmesi amaçlanmıştır. Ayrıca hedef genlerin aort damar dokusu ve monosit hücrelerdeki gen anlatımları karşılaştırılarak, TAD'ın kökenlendiği aort damar dokusundaki gen anlatımının, dolaşımdaki monosit hücrelerinde eşdeğer düzeyde bir temsilinin olup olmadığının ortaya koyulması hedeflenmiştir. Son olarak gen anlatımları analiz edilen *MMP2*, *MMP9*, *TIMP2* ve *TIMP3* genlerinin promotör bölgelerindeki metilasyon düzeninin elde edilen

gen anlatımı miktarları ile ilişkilendirilmesi ve hedef genlerin TAD patogenezindeki rollerinin detaylı bir şekilde araştırılması hedeflenmiştir.

1.2. MATERYAL VE YÖNTEM

Tez projesi kapsamında İstanbul Kartal Koşuyolu Yüksek İhtisas Eğitim ve Araştırma Hastanesi Kalp ve Damar Cerrahisi Kliniği'nde tanı almış 10 TAD hastası ve kontrol grubu olarak koroner arter hastalığı sebebiyle opere olan bireylerden alınan örnekler (n=10) ile çalışılmıştır. Hem hasta hem de kontrol grubuna dahil olan bireylerden aort damar dokusu (20 örnek) ve periferik kan örneği (20 örnek) alınmıştır. Toplamda 40 örnek üzerinde çalışılmıştır. Çalışmaya dahil edilen bireyler öncesinde görevli hekim tarafından bilgilendirilmiş ve onam formu imzalatılmıştır.

TAD hasta grubu ve kontrol grubundan alınan periferik kan örneklerinden öncelikle “*RosetteSep™ Human Monocyte Enrichment Cocktail*” ve “*Ficoll-Paque® PLUS*” kitleri kullanılarak CD14⁺ monosit hücreler ayrılmıştır. Aort damar dokusu ve monosit hücrelerden “*PureLink RNA Mini Kit*” kullanılarak RNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Elde edilen RNA örneklerinden daha sonraki gen anlatımı analizinde kullanılmak üzere “*iScript cDNA Synthesis Kit*” kullanılarak cDNA sentezi yapılmıştır. Hedef genlerin gen anlatımı analizleri damlacıklı dijital polimeraz zincir reaksiyonu (ddPZR) yöntemi ile gerçekleştirilmiştir.

Hedef genlerin metilasyon düzeni analizi için TAD hasta ve kontrol grubundan elde edilen aort damar dokularından “*QIAamp DNA Mini Kit*” kullanılarak DNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Metilasyon pozitif ve negatif kontrollerin elde edilmesi için “*Jurkat*” hücre hattına 5-Aza-2'-deoksisitidin (DAC) ve “*CpG Methyltransferase (M. SssI)*” uygulaması yapılmıştır. Hedef genlerin metilasyon düzenleri, metilasyon sensitif yüksek çözünürlüklü erime (MS-HRM) yöntemi ile analiz edilmiştir.

Elde edilen sonuçların istatistiksel analizleri “*Graphpad Prism 9.3.1*” programı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Hasta ve kontrol grubunun özgüllük ve seçiciliğinin kontrol edilmesi için “*Receiver Operating Characteristics*” (ROC) eğrişi analizi yapılmıştır. Ayrıca hasta ve kontrol grubu ortalamalarının karşılaştırılması için parametrik olmayan “*Mann Whitney U Test*” uygulanmıştır. Tüm analizlerde P<0.05 anlamlı kabul edilmiştir. Aort damar dokusu ve periferik kandan elde edilen monosit hücrelerdeki gen anlatım değerlerinin birbiri ile ilişkileri

Spearman korelasyon analizi yapılarak kontrol edilmiştir. Son olarak hedef genlerin elde edilen metilasyon düzenleri ile gen anlatımları arasındaki farkın, istatistiksel anlamlılık gözetilerek belirlenmesi için parametrik olmayan “*Mann Whitney U Test*” ve *Spearman* korelasyon analizi kullanılmıştır.

1.3. BULGULAR VE TARTIŞMA

Tez çalışması kapsamında aort damar dokusunda TAD hastalarında kontrol grubuna göre *MMP2* gen anlatımının değişmediği ($p=0.85$), *MMP9* gen anlatımının 2.5 kat azaldığı ($p=0.043$), *TIMP2* gen anlatımının 1.7 kat azaldığı ($p=0.0089$) ve *TIMP3* gen anlatımının 3.1 kat azaldığı ($p=0.028$) bulunmuştur. Hem TAD hasta grubu hem de sağlık kontrol grubundan elde edilen monosit hücrelerde ise; TAD hastalarında kontrol grubuna göre *MMP2* gen anlatımının 1.1 kat azaldığı ($p=0.15$), *MMP9* geninin 2.8 kat azaldığı ($p=0.11$), *TIMP2* gen anlatımının 1.1 kat arttığı ($p=0.25$) ve *TIMP3* gen anlatımının 4.6 kat azaldığı ($p=0.37$) ancak bu değişikliklerin istatistiksel olarak anlamlı olmadığı belirlenmiştir.

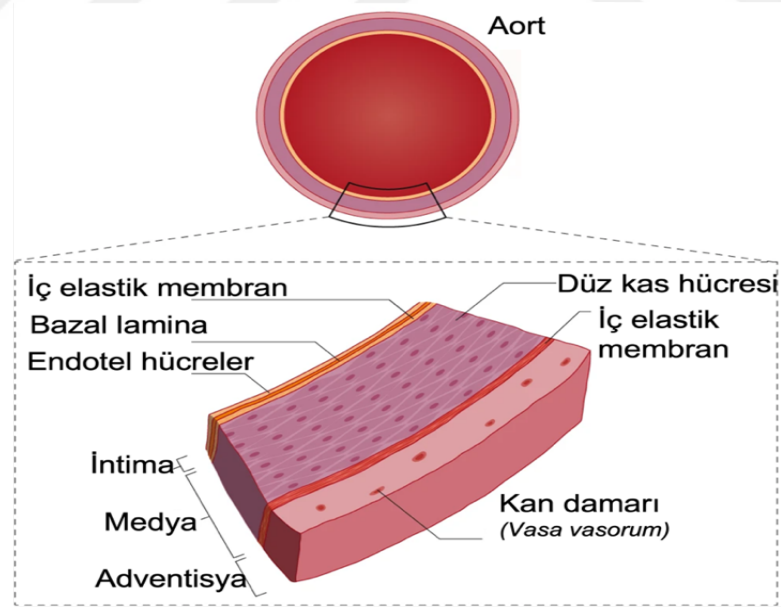
MMP9 geninde MS-HRM analizi sonucunda elde edilen verilere göre TAD hastası ve kontrol örneklerinin hiçbirinde metillenme gözlenmemiştir. Tüm örnekler için metilasyon yüzdesi “0” olarak bulunmuştur. *TIMP3* geninin promotör bölgesinde TAD hasta grubunda ortalama metillenme düzeyi %10, kontrol grubunda ise %12.5 olarak belirlenmiştir. TAD ve kontrol gruplarının metilasyon düzenleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı ($p=0.91$) bulunmuştur. Aort damar dokusunda gen anlatımları incelenen *MMP2* ve *TIMP2* genlerinin promotör bölgesindeki metilasyon düzeni MS-HRM yöntemi ile belirlenememiştir. Farklı primer setleri ile yapılan denemeler ile de sonuç alınamamıştır.

Çalışmamız sonucunda aort damar dokusunda *MMP9*, *TIMP2* ve *TIMP3* genlerinin istatistiksel olarak anlamlı değişimleri göz önüne alındığında hem bireysel gen anlatımlarının hem de *MMP/TIMP* oranlarında meydana gelen artışın TAD patogenezi ile uyumlu olduğu görülmüştür.

2. GENEL KISIMLAR

2.1. AORT

Aort, insan vücudunda bulunan en büyük atar damardır. Kalbin üst orta kısmından başlayan aort damarı vücudun her bölgesine oksijence zengin kan iletiminden sorumludur. Aort damarı başlıca dört anatomik bölgeye ayrılır; kalpten ilk çıkışı yapan ve koroner arterlerin dallanma gösterdiği kısım olan çıkan aort (asendan aort), çıkan aortun sola dönük olarak 180°C'lik bir dönüş yaptığı ve U şeklinde aşağıya doğru kıvrıldığı bölge olan aortik kemer (ark), göğüs boşluğu boyunca ve omurgaya yakın olarak aşağıya doğru uzanan inen aort (desendan aort) ve başlıca abdominal arterlerin dallanma gösterdiği diyaframın alt bölgesinde kalan abdominal aortdur [6]. Aort damarı dıştan içe doğru adventisya, medya ve intima olmak üzere üç ana tabakadan meydana gelir. Her bir tabakanın yapısı, esnekliği, dayanıklılığı ve hücresel içeriği birbirinden farklıdır (Şekil 2.1). Çıkan aort medya tabakasının en kalın ve kan basıncının en yüksek olduğu bölgedir. Aortik medya, aort abdomen bölgesine doğru indikçe incelmeye başlamaktadır. Aortik kök ve çıkan aort diğer kısımlara göre daha fazla düz kas hücresi ("SMC") ve elastik lamina içerir.



Şekil 2.1: Aort damarının yapısı ve tabakaları¹.

¹Bossone, E. ve Eagle, K.A., 2021, Epidemiology and management of aortic disease: aortic aneurysms and acute aortic syndromes, *Nature Reviews Cardiology*, 18(5), 331-348

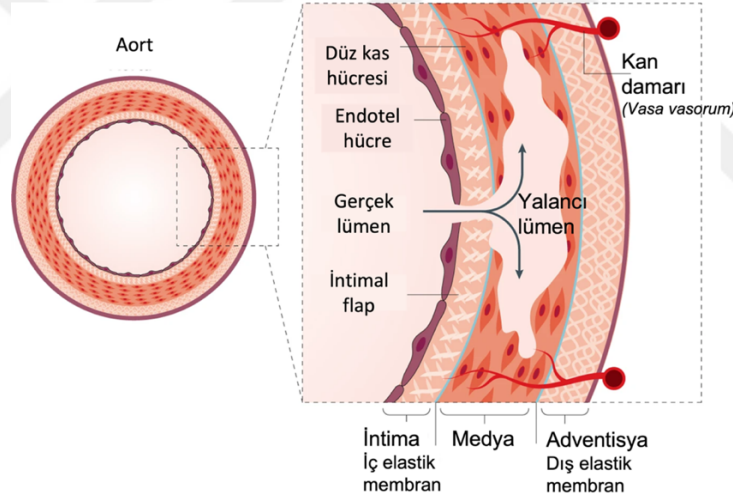
Elastinin fazlalığı kardiyak döngü içerisinde atım kuvvetine karşı koyar ve daha esnek ve genişleyebilir bir yapı oluşmasına destek olur. Kanın hızı, inen aortta kat edilen mesafe artıkça azalır. Aynı şekilde inen aortun hücreler arası matriks bileşenleri de aortun diğer kısımlarına göre farklılık göstermektedir. Adventisya aort damarının en dış tabakasıdır. Fibroblast ve adiposit hücreleri, kolajen ve elastin içeren hücreler arası matriks, aort damarını besleyen damarlar (vasa vasorum-damarın damarı) ve periferel sinirler bu tabakada bulunur. Yerleşimi iç elastik membranın hemen üst kısmındadır. Aort tabakalarının orta kalınlıktaki katmanıdır [4]. Aort damarının en kalın tabakası olan medya vasküler düz kas hücreleri (*VSMC*), elastik ve kolajen fiberler ve peptidoglikanlardan oluşmaktadır. Medya tabakasında bulunan fiberler ve peptidoglikan yapıları aynı zamanda hücreler arası matriksi (*ECM*) meydana getirir. Elastik fiberler ECM'nin ana yapı birimlerinden olup aort damarına esneyebilme yeteneği sağlamaktadır [5].

Aort damarının en iç tabakası intima'dır. Damar iç boşluğu (lümen) ve medya tabakası arasında bulunur. Intima tabakasının kan akışının olduğu lümen tarafında tek sıra epitel hücreler bulunur. Tek sıralı bu epitel tabaka hem akan kan ile aort duvarı arasında bir bariyer görevi görür hem de vasküler fonksiyon regülasyonunda görev alır. Medya tabakası ile intima tabakası iç elastik membran aracılığı ile birleşmiştir. Kan ile aort damarı arasındaki madde alışverişi intima tabakası aracılığı ile olur [4, 7].

Aort tabakalarını oluşturan bileşenler fonksiyonel olarak bir araya gelerek alt birimler oluşturmaktadır. Lamelar birim, medya tabakasının en basit yapısal ve fonksiyonel birimidir. Her bir lamelar birim kolajen demetleri ile çevrelenmiş iki sıra elastik fiber arasında bulunan SMC'lerden oluşur. Elastin kasılma birimi; elastik fiberler, fokal adhezyon (SMC membranında bulunan integrin proteinleri ile elastin fiberdeki fibrilin proteinlerinin birleşimi) ve hücre içerisindeki kontraktıl filamentlerden oluşur. Bu birim elastik fiberlerden alınan gücü SMC'ye iletir ve aort duvarı için adeta bir mekanik sensör olarak işlev görür. Mekanik uyarılar, SMC membranındaki fokal adhezyon yoluyla ve aktin bağlantı proteinleri aracılığıyla elastik liflerden alınır ve kasılma birimlerine iletilir. Bu şekilde sağlıklı aort duvarında SMC kasılması aktive edilmiş olur. Mekanik sinyaller ayrıca hücre içerisindeki kalsiyum akışını da etkiler [8].

2.2. AORT DİSEKSİYONU

Aort damarının intima tabakasında meydana gelen bir yırtığı takiben, aort tabakalarının damar duvarı boyunca birbirinden ayrılması durumu aort diseksiyonu (AD) olarak tanımlanmaktadır. Oldukça ölümcül olan aort diseksiyonu görülme sıklığı 3-35/1000.000 arasında değişirken en çok 65-75 yaşları arasında yaygındır. Onaylanmış AD vakalarının yalnızca %15 ile %43'ü doğru tanı ile tedavi edilmektedir. Hastalar AD tanısı ile ilk 48 saat içerisinde tedavi edilmediğinde ölüm oranı %50'yi bulmaktadır [2, 3]. Aort diseksiyonunda intima tabakasında oluşan yırtığın, başlangıç noktasından ileri ya da geriye doğru ilerlemesiyle damar içerisinde akan kan için yeni bir yol ortaya çıkar. Yırtık noktasında tabakalar arasında dolmaya başlayan kan, yırtık boyunca ilerleyebilir ya da damarda kanama meydana gelebilir. Kanın doğal olarak aktığı gerçek lümenine paralel olarak, damar içinde oluşan tabakalar arası yeni boşluk yalancı lümen olarak adlandırılır [9, 10] (Şekil 2.2).



Şekil 2.2: Aort damarında yırtığın meydana gelmesiyle yalancı lümen oluşumunun şematik gösterimi¹.

Aort diseksiyonu, aort damarının farklı segmentlerinde meydana gelebilmekte ve yırtığın etkili olduğu bölgeye göre isimlendirilmektedir. Diyaframın üst kısmında kalan bölgenin etkilendiği vakalar Torasik Aort Diseksiyonu (TAD) olarak tanımlanmaktadır. Görülen tüm AD vakalarının %60'ı aort kökü, çıkan aort ya da her ikisini birden etkilemekte, %40'ı da inen aort kaynaklı olmaktadır [6].

¹Nienaber, C.A., Clough, R., Sakalihasan, N., Suzuki, T., Gibbs, R., Mussa, F., Jenkins, M. P., Thompson, M. M., Evangelista, A., Yeh, J. S. M., Cheshire, N., Rosendahl, U. ve Pepper, J., 2016, Aortic dissection, *Nature Reviews Disease Primers*, 2, 16053

Sağlıklı bir aort fonksiyonu için elastin kasılma birimlerinin yapılarının bozulmamış olması ve aort hücrelerinin fonksiyonlarını kontrol eden sinyallerin etkili bir şekilde gerçekleşmesi gerekir. Bu yapısal ve fonksiyonel birimlerde meydana gelebilecek bozukluklar aort homeostazını bozar ve zayıflatır. Genetik geçişli TAD, elastin kasılma birimini oluşturan, yapı ve fonksiyonunu kontrol eden proteinler ve sinyal yolağı proteinleri kodlayan genlerde meydana gelen mutasyonlar ile ilişkilendirilmiştir. Aort diseksiyonu genetik geçişli olabileceği gibi sporadik olarak da ortaya çıkabilmektedir. Sporadik AD genetik AD'ye göre daha sık görülmekte olup genellikle ileri yaşlarda ortaya çıkmaktadır. Sigara, cinsiyet, yaş, hipertansiyon, genetik yatkınlık, enflamatuvar hastalık varlığı, dislipidemi ve ateroskleroz, anevrizma hikayesi, ya da Marfan sendromu ve Ehler-Danlos sendromu gibi kalıtsal bağ doku bozuklukları TAD için bilinen risk faktörlerindendir. Risk faktörlerine ters olarak diyabet ve TAD arasında negatif bir ilişki olduğu da bildirilmiştir. TAD hastalarında diyabet görülme sıklığı kontrol bireylere göre daha azdır [6] [11]. Hiçbir belirti göstermeksizin sporadik olarak görülen vakaların altında yatan bozukluklar hakkında yeterli bilgi bulunmamaktadır. Görülen TAD vakalarının %70'inden fazlasını sporadik vakalar oluşturmaktadır. Risk faktörlerinin ve sporadik TAD'ların patogenezinin anlaşılması öncelikli olarak TAD'ı önlemeye yönelik potansiyel hedefler sağlayabileceği için oldukça önemlidir [6].

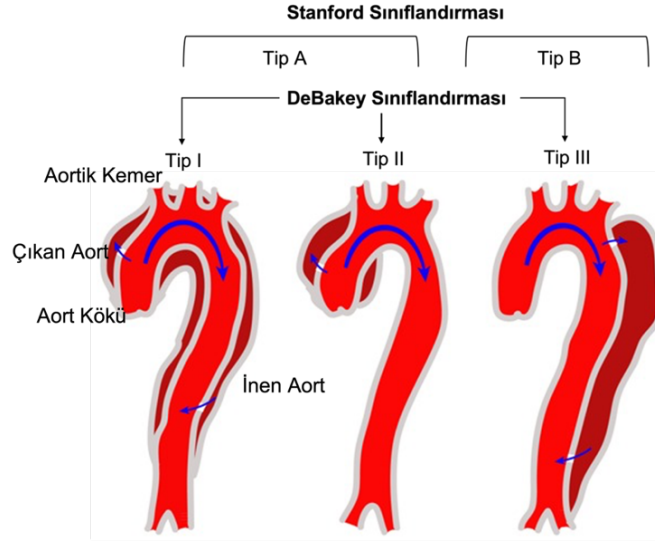
TAD tablosunda aort damarının medya tabakasında bulunan SMC apoptozu ve ECM'nin yıkımına ek olarak artmış bir enflamasyon da görülür. Yırtık olan bölgeye yoğun olarak göç eden T lenfositleri, makrofaj, mast hücreleri ve nötrofillerin varlığı diseksiyon sürecindeki enflamasyonu kanıtlamaktadır. Enflamasyonun aort duvarının homeostazını regüle ederek aort diseksiyonunun patogenezinde rol oynadığı düşünülmektedir [5]. Söz konusu enflamatuvar hücreler, hücreler arası matriksi yıkarak aortun zayıflamasına sebep olan proteazların da potansiyel kaynaklarından [12]. Ayrıca enflamasyonla aktif hale gelen protezları etkisiz hale getirerek koruma sağlayan yolaklar da TAD'da işlevsel değildir. TAD vakalarında serin protez inhibitörü olan $\alpha 1$ -antitripsin düzeyinin azaldığı bilinmektedir. Normal şartlar altında dokuları, parçalayıcı enzimlerden koruyan ve proenflamatuvar sitokinleri düzenleyen inhibitör, TAD'da etkisiz kaldığı için dokuda parçalanma gerçekleşmektedir. Bu şekilde protezlar ve inhibitörleri arasındaki dengenin ortadan kalkması aort diseksiyonunda doku hasarı ile sonuçlanabilmektedir [13]. Aort damarına esneklik veren önemli bir yapı olan hücrelerarası matriksin yeniden düzenlenmesi de enflamatuvar hücrelerin gen anlatımlarını etkileyebilmektedir. Monosit ve makrofajların ECM ile olan etkileşimlerinin, immün yanıt

oluşturan genlerin gen anlatımını değiştirmesi sonucu monosit ve makrofaj fonksiyonun etkilenmesi bu duruma örnek olarak verilebilir [14].

Hipoksi ve oksidatif stresin aortun medya tabakasının parçalanmasında etkili olduğu düşünülmektedir. Yapılan çalışmalarda elde edilen TAD hastalarında oksidatif markırların düzeylerinin artışı ve tam tersi olarak hücreler arası süper oksit dismutaz enzim düzeyinin azalması bu görüşü destekler niteliktedir [15]. TAD’da aort damarının tabakaları birbirinden ayrılırken medya tabakasında bulunan SMC’lerin de ölümleri söz konusudur. SMC’lerin apoptozu hem oksidatif stresi hem de enflamasyonu arttıran bir durumdur. Proteazlar ve inhibitörleri arasındaki bozulan denge, proteazların daha fazla çalışması ile sonuçlanır. Artmış oksidatif stres ve enflamasyon, proteazlar ve inhibitörleri arasındaki bozulmuş denge sonucu proteaz aktivitesindeki artış ve SMC apoptozu ile aort duvarında görülen yeniden şekillenme, diseksiyon öncesinde aort dokusundaki yıkım faaliyetlerini arttırıyor olabilir. Süregelen bu düzensizlik aort damar dokusunda normalin dışında düzensiz liflerin oluşması ile sonuçlanır. Bu durumun, aort damar dokusunun yapısı ve fonksiyonel özelliklerinin azalmasına ve diseksiyonun meydana gelmesine sebep olabileceği düşünülmektedir [16].

2.2.1. Aort Diseksiyonunun Anatomik Sınıflandırması

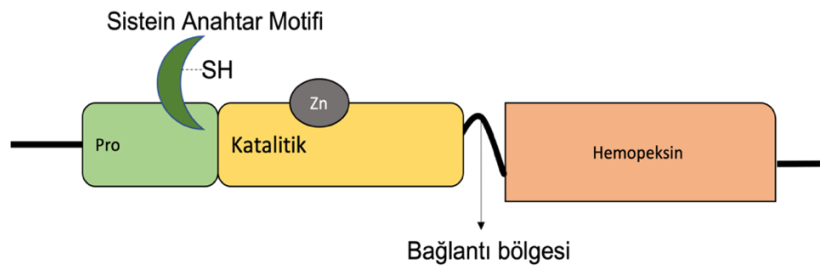
Aort diseksiyonunda temel olarak kabul edilen, DeBakey ve Stanford olmak üzere iki sınıflandırma sistemi bulunmaktadır. DeBakey sınıflandırmasında üç alt tip bulunur [17]. Tip I ve Tip II’de yırtığın başlangıç noktası asendan aortta iken Tip III’te ise yırtık başlangıç noktası desendan aortta bulunmaktadır. Stanford sınıflandırması günümüze daha yakın bir tarihte ortaya koyulmuş olup daha basit bir sınıflandırmadır. Stanford sınıflandırmasında iki alt tip bulunur [18] [19]. Tip A’da diseksiyon asendan aortta başlar. Asendan aortun etkilendiği tüm vakalar Tip A olarak sınıflandırılır. Tip B’de ise diseksiyon desendan aortta meydana gelir ve asendan aorta etkilenmemiştir. Her iki sınıflandırma türü birbiri ile karşılaştırıldığında Stanford Tip A’nın DeBakey Tip I ve Tip II’ye, Stanford Tip B’nin ise DeBakey Tip III’e karşılık geldiği görülmektedir (Şekil 2.3). AD vakalarının yaklaşık olarak üçte ikisi Tip A iken (TAD) geri kalanını Tip B oluşturmaktadır [2].



Şekil 2.3: Aort diseksiyonunun sınıflandırılması¹.

2.3. MATRİKS METALLOPROTEİNAZ

Matriks metalloproteinazlar (MMP) çinko bağımlı, aort duvarında endotel hücre, düz kas hücresi, vasküler düz kas hücresi, osteoblast, fibroblast ve enflamatuvar hücreler tarafından üretilen büyük bir endopeptidaz ailesidir. MMP'lerin ECM proteinlerinin yıkımı, ECM homeostazının kontrolü ve sinyal iletiminin regülasyonu gibi birçok görevleri vardır [6]. İnsan genomunda 23 üyesi bulunan MMP'ler yapısal olarak birbirlerine oldukça benzemektedir. Genel olarak 80 amino asitlik bir propeptit, hemen onun arkasında 170 amino asitlik bir katalitik metalloproteinaz bölgesi, uzunluğu değişebilen bir bağlantı bölgesi ve son olarak 200 amino asitlik bir hemopeksin bölgesi içerirler [20, 21] (Şekil 2.4).



Şekil 2.4: Matriks metalloproteinazların genel yapısal elemanlarının şematik gösterimi.

¹Jiang, D.S., Yi, X., Zhu, X. H. ve Wei, X., 2016, Experimental, *Am J Transl Res*, 8(12), 5125-5140. De Baykey sınıflandırmasında Tip I'de yırtığın başlangıcı asendan aortadır. Aort kökü, çıkan aort, aortik kemer ve inen aort olmak üzere diğer bölgeler de etkilenebilir. Tip II'de de yırtığın başlangıcı asendan aortadır ancak yırtığın ilerlediği bölge aortik kemeri geçmez. Tip III'de ise yırtığın başlangıç noktası inen ortadır. Stanford sınıflandırmasında Tip A; Debakey Tip I ve Tip II'yi kapsamaktadır. Çıkan aortun etkilendiği tüm vakalar Stanford Tip A olarak sınıflandırılır. Stanford Tip B ise Debakey Tip III'e karşılık gelir. Stanford Tip B'de yırtığın başlangıç noktası inen aorttur.

MMP'lerin kontrolü ve düzenlenmesi kanser, artirit ve kardiyovasküler hastalıklarda istenmeyen aktivitelerin önlenmesi açısından son derece önemli ve gereklidir. MMP anlatımı birçok hormon, sitokin ve büyüme faktörleri tarafından indüklenebilmektedir. Ek olarak bazı MMP'ler bulundukları doku özelinde de düzenlenebilirler. Dokudaki bu düzenleme, birbirinden farklı transkripsiyon faktörlerinin birlikte fonksiyon göstermesi ile sağlanmaktadır [22, 23]. Ek olarak, DNA metilasyonu, histon asetilasyonu gibi epigenetik mekanizmalar da MMP düzenlenmesine katkı sağlamaktadır [24].

MMP'ler pre-proMMP formunda üretilirler. N terminal bölgesinde bulunan ve sinyal peptidi olan “pre” kısmı translasyonda ayrılır ve proMMP oluşur. Propeptit bölgelerinde bulunan sistein anahtarı motifi (sistein sülfhidril (-SH) grubu yardımıyla) katalitik bölgedeki Zn^{2+} 'yı kontrol ederek MMP'nin inaktif kalmasını sağlar. proMMP'ler zimojendir ve fonksiyonlarını göstermek için aktif hale gelmeleri gerekir. Aktifleşme için sistein anahtarı; serin proteaz, furin, plazmin, farklı bir MMP gibi bir başka proteolitik enzim tarafından kesilir ve aktif hale getirilir. Görüldüğü gibi MMP'ler arasında birbirini aktive etme fonksiyonu da vardır [20]. MMP aile üyeleri arasında kompleks bir pozitif geri besleme ağı söz konusudur ve bunun ECM degradasyonunu tetikleme potansiyeli de yüksektir [25]. Normal fiziksel şartlarda MMP'lerin aktivitesi transkripsiyon, zimojen prekürsörlerin aktivasyonu, ECM'de bulunan özel bileşenler ile etkileşim ve MMP'lerin doku inhibitörleri aracılı inhibisyon olmak üzere 4 farklı şekilde düzenlenir [26, 27].

2.3.1. Matriks Metalloproteinaz Gen Ailesi

Matriks metalloproteinazlar, 23 gen içeren büyük bir çinko endopeptidaz ailesidir [22]. Gerek fizyolojik gerekse patolojik birçok olaylarda görev alırlar. MMP'lerin anlatımı birçok farklı hücre tipinde olmaktadır. Bunlar; bağ dokusu, fibroplast, monosit, makrofaj, nötrofil ve endotel hücresidir [28]. MMP ailesi üyeleri yapılarında çinko içerirler ve fonksiyon göstermeleri için kalsiyuma ihtiyaçları vardır. ECM'yi oluşturan proteinleri parçalayabilme yetenekleri ile ECM'nin hem yıkım hem de yeniden düzenlenmesinde aktiftirler.

MMP ailesindeki üyeler, Uluslararası Biyokimya ve Moleküler Biyoloji Birliği (“IUBMB”) tarafından isimlendirilmiştir ve her bir üyeye birer numara atanmıştır (*MMP1*, *MMP2*...). Bir enzimin MMP ailesinin üyesi olarak tanımlanabilmesi için belirli şartları sağlaması gerekmektedir.

Bu şartlar;

1. ECM bileşenlerinden en az bir tanesinin yıkımını sağlaması,
2. Enzimin aktif bölgesinde katalizin çinkoya bağlı olması,
3. Proteinaz ya da organomerküryaller (cıva içeren organik bileşik) tarafından aktive edilmesi,
4. Etilendiamintetraasetik asit (EDTA), 1,10 fenantrolin ve metalloproteinazların doku inhibitörleri (TIMP) üyelerinden biri tarafından inhibe edilmesi,
5. cDNA dizisinin *MMP1* ile homoloji göstermesidir.

MMP'ler dizi benzerlikleri ve ECM'de hedefledikleri substratlarına göre kolajenaz, jelatinaz, stromelisin, matrilizin, membran tip ve diğer olmak üzere altı alt gruba ayrılmışlardır (Tablo 2.1) [28-30].

Tablo 2.1: MMP'lerin sınıflandırılması

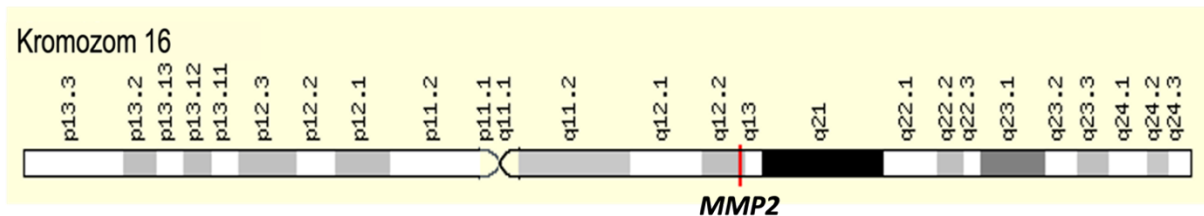
Geleneksel Sınıflandırma İsmi	Nümerik Sınıflandırma İsmi
Kolajenaz	
Kolajenaz 1	<i>MMP1</i>
Kolajenaz 2	<i>MMP8</i>
Kolajenaz 3	<i>MMP13</i>
Jelatinaz	
Jelatinaz A	<i>MMP2</i>
Jelatinaz B	<i>MMP9</i>
Stromelisin	
Stromelisin 1	<i>MMP3</i>
Stromelisin 2	<i>MMP10</i>
Stromelisin 3	<i>MMP11</i>
Matrilizin	
Matrilizin 1	<i>MMP7</i>
Matrilizin 2	<i>MMP26</i>
Membran Tip	
MT-MMP-1	<i>MMP14</i>
MT-MMP-2	<i>MMP15</i>
MT-MMP-3	<i>MMP16</i>
MT-MMP-4	<i>MMP17</i>
MT-MMP-5	<i>MMP24</i>
Diğer	
Metaloelastaz	<i>MMP12</i>
	<i>MMP19</i>
Enamelisin	<i>MMP20</i>
	<i>MMP23</i>
	<i>MMP27</i>
Epilizin	<i>MMP28</i>

Kolajenazlar *MMPI*, *MMP8* ve *MMP13* olmak üzere 3 tanedir. ECM’de bulunan belirli tip kolajenlerin yıkımını sağlarlar. Fibriler kolajen tip I, tip II ve tip III substratlarıdır. Genellikle uzun fragmentin N terminal ucunda olduğu $\frac{1}{4}$ ve $\frac{3}{4}$ uzunluğunda parçalar oluştururlar. Jelatinazlar grubunda *MMP2* ve *MMP9* bulunur. Farklı tipteki kolajenleri parçalama yeteneklerinin yanında ECM’yi oluşturan protein bileşenlerini de degrades edebilirler. *MMP3*, *MMP10*, *MMP11* stromelinin grubunda sınıflandırılmış MMP’lerdir. ECM’de bulunan birçok proteini yıkıma uğratabilirler. *MMP3* ve *MMP10* proteoglikan, laminin, fibronektin, vitronektin ve bazı tip kolajenleri yıkabilmektedir. Bununla birlikte *MMP11*, ECM proteinlerine oldukça düşük afinite göstermektedir [25].

MMP7 ve *MMP26* matrilizin grubunda bulunan MMP’lerdir. En önemli karakteristik özellikleri yapılarında hemopeksin bölgesinin bulunmamasıdır. Her iki MMP’de ECM bileşenlerini degrades edebilirken ek olarak *MMP7* bazı hücre yüzey moleküllerini de degrades edebilir [25]. *MMP14*, *MMP15*, *MMP16*, *MMP17*, *MMP24* ve *MMP25* membran tip MMP’ler grubundadır. Bu grupta olan tüm MMP üyelerinde furin benzeri protein konvertaz tanıma dizisi bulunur. *MT4-MMP17* dışında kalan tüm membran tip MMP’ler pro-MMP2’yi aktive edebilirler [25, 31]. Kategorik olarak gruplandırılmayan diğer MMP’lerden *MMP12*, metalloelastaz olarak da bilinir. SMC, fibroblast, makrofaj da sentezlenir. Tip IV kolajen ve jelatin, elastin fibronektin ve laminini parçalayabilir. *MMP19* ağırlıklı olarak karaciğer hücreleri tarafından sentezlenir. Tip I, IV kolajen, jelatin ve laminin gibi molekülleri parçalayabilmektedir. Enamelisin olarak da isimlendirilen *MMP20* tip V kolajene spesifiktir. *MMP23*, yumurtalık ve testislerde üretilir ve substratı jelatindir. *MMP27* kalp, lökosit, makrofaj, böbrek, endometrium, kemik gibi birçok dokuda sentezlenirken epilizin olarak da isimlendirilen *MMP28*’in anlatımı daha çok deride yapılır [21].

2.3.1.1. *MMP2*

İnsan *MMP2* geni 16. kromozomun 16q12.2 bölgesinde konumlanmıştır [32] (Şekil 2.5).



Şekil 2.5: *MMP2* geninin 16. kromozom üzerindeki yeri¹.

¹*MMP2* geni için <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=MMP2&keywords=MMP2> adresinden 07.05.2022 tarihinde alınmıştır.

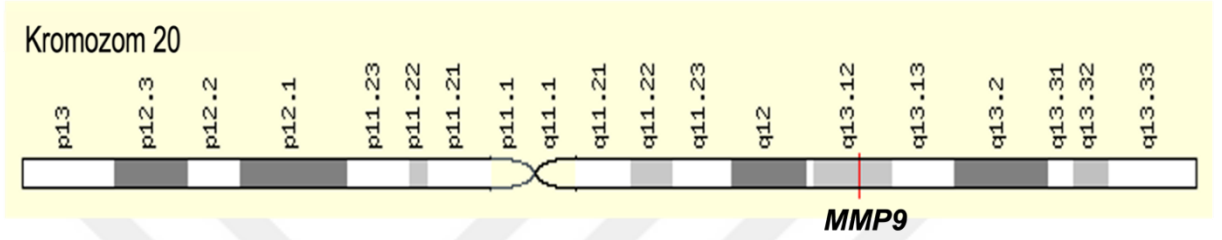
Bir çinko endopeptidaz ailesi olan MMP'lerin jelatinaz alt grubunda sınıflandırılır ve Jelatinaz A olarak da isimlendirilir. *MMP2*, hücreler arası matrikste fonksiyon gösteren, ECM'nin önemli bileşenlerinden olan jelatin, laminin, agrekanı denatüre edebilen, çinko bağlı bir endopeptidazdır.

Normal fizyolojik şartlarda, transkripsiyon, zimojen aktivasyonu ve endojen inhibitörler aracılığı ile regüle edilir [26]. *MMP2* tip I, tip II ve tip III kolajenleri parçalayabilse de kolajenolitik (kolajen yıkımı) aktivitesi, kolajenazlar kadar fazla değildir [25]. *MMP2* geni ECM'nin sentezi ve yeniden düzenlenmesi ile yakından ilişkili olduğu da bilinen dönüştürücü büyüme faktörü β (TGF- β), Anjiyotensin II (Ang II) [4] ve relaksin yolağında düzenlenen ya da etkilenen genler arasındadır. Relaksin yolağı çeşitli hastalıklarda fibrozu engelleme, fazla miktarda kolajen birikimini önleme ya da sürecin tersine işletilmesinde aktiftir [33]. TAD'da damar dokusunda tip I, tip II, ve tip III kolajen birikimi sonucu fibroz oluşumuyla damar yapısının bozulması ve bu durumun da yırtılma ile sonuçlanabilmesi *MMP2*'nin, birçok yönden TAD oluşumunda etkili olduğunu düşündürmektedir [4].

MMP2 hücre içerisinde farklı yollarla aktive edilebilir. *MMP2*'nin inaktif formu olan pro-*MMP2* hücre yüzeyine tutunarak membran tip MMP (MT1) tarafından aktif formuna dönüştürülebilir. Bu sayede hücre dışında birikerek lokal olarak daha yüksek bir kolajenolitik aktivite gösterme potansiyeli sergiler [34, 35]. MMP'lerin doku inhibitörleri (TIMP) de inhibisyon fonksiyonundan farklı olarak MMP aktivasyonunda görev alabilirler. Diğer MMP'lerden farklı olarak *MMP2* hem *MT1-MMP* (*MMP14*) hem de *TIMP2*'nin rol aldığı özel bir aktivasyon mekanizmasına sahiptir. proMMP/TIMP/MT-MMP kompleksi olarak gerçekleşen bu aktivasyon için TIMP2 öncelikle proMMP2'nin C terminal bölgesindeki hemopeksin bölgesine bağlanır ve proMMP2'nin membrandaki yerleşik olarak bulunan aktif MT1-MMP'ye ulaşmasını sağlar. Membrandaki proMMP/TIMP/MT-MMP kompleksi sayesinde kesim gerçekleşir ve pro-MMP2'den MMP2 oluşmuş olur [21]. Düşük ya da orta seviyedeki TIMP2 varlığı pro-MMP2'yi aktive ederken, yüksek seviyedeki TIMP2 varlığı MT1-MMP'yi doyurur ve bu şekilde pro-MMP2 aktivasyonu baskılanmış olur. Ek olarak pro-MMP2'nin diğer membran tip MMP'ler tarafından da aktiveleştirildiği bilinmektedir [36-38].

2.3.1.2. *MMP9*

İnsan *MMP9* geni 20. Kromozomun 20q13.12 bölgesinde konumlanmıştır [39] (Şekil 2.6). Bir çinko endopeptidaz ailesi olan MMP'lerin jelatinaz alt grubunda sınıflandırılır ve Jelatinaz B olarak da isimlendirilir. *MMP9* çok sayıda farklı hücre çeşidi tarafından sentezlenmektedir. Bunlar; kardiyomiyosit, endotel hücre, nötrofil, makrofaj ve fibroblasttır. *MMP9* sitokin ve kemokinleri aktive ederek doku yeniden düzenlenmesini kontrol eder [40].



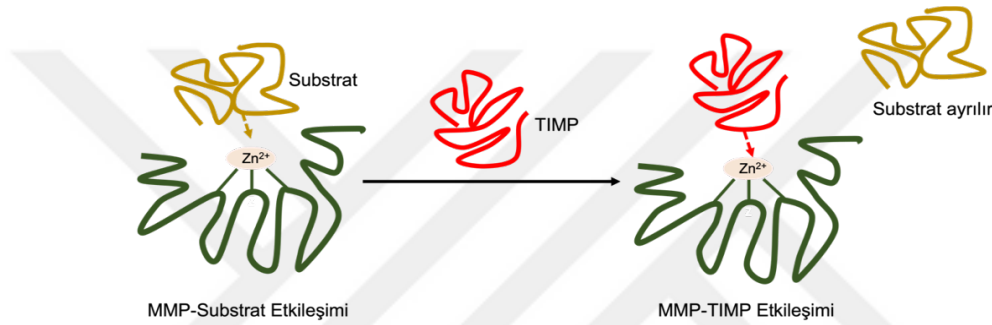
Şekil 2.6: *MMP9* geninin 20. kromozom üzerindeki yeri¹.

MMP9 geni matriks yeniden düzenlenmesi ile ilgili olan TGF- β ve Ang II ile relaksin yolağında işlevseldir [4, 33]. *MMP9* doğal kolajen tip-IV, -V ve -XI'ü parçalayabilir ve denature kolajenleri yıkabilir [25]. *MMP9* da yapısal olarak *MMP2* ile benzer bölgeler taşır. Hücre içerisindeki plazmin ve serin proteazları gibi proteolitik enzimler “pro” bölgesi kesimi yaparak *MMP9*'u aktive edebilirler. *MMP9* ayrıca diğer MMP'ler tarafından da aktive edilebilir (*MMP2*, *MMP3*, *MMP13*, *MMP17*, *MMP26*). Jelatinaz ailesinden olan *MMP2*, MT1-MMP tarafından hücre zarında aktif formuna dönüştükten sonra pro-*MMP9*'u aktive edebilir. *MMP9* için metalloproteinazların doku inhibitörleri aracılığı ile aktivasyon da mümkündür. Pro*MMP9*'un hemopeksin bölgesine TIMP1 ya da TIMP3 kendi C terminalleri aracılığı ile bağlanır ve aktivasyon için kararlı yapı oluşturulmuş olur [40]. Aktif haldeki *MMP9*, embriyonik gelişim, hücre göçü, kemik gelişimi, anjiyogenez, nötrofil fonksiyonu ve yara iyileşmesinde ECM proteinlerinin yıkımı ile ilgili süreçlerde görev alır. Ayrıca *MMP9* aynı grupta bulunduğu *MMP2*'ye benzer olarak TAD'da parçalanmış olan hücreler arası matriks proteinlerini yıkabilme özelliğine de sahiptir. TAD'da gerçekleşen ECM yıkımı ve damarın yırtılması ile meydana gelen parçalanma, *MMP9*'un fonksiyon gösterebileceği alanlardır [41].

¹*MMP9* geni için <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=MMP9&keywords=mmp9> adresinden 07.05.2022 tarihinde alınmıştır.

2.4. MATRİKS METALLOPROTEİNAZLARIN DOKU İNHİBİTÖRLERİ

Matriks metalloproteinazlar dokuda genel olarak kendi doğal inhibitörleri olan ile birlikte (TIMP) bulunurlar. İnsan genomu TIMP'ları kodlayan 4 adet paralog gen içermektedir (TIMP1-4). Yapısal olarak birbirine benzeyen TIMP'ların her birinde yan yana paketlenmiş iki bölge bulunur; N ve C terminal bölgeleri [42]. TIMP'lar MMP'ler ile 1:1 sitokiyometride bağlanırlar. MMP'nin katalitik bölgesinde bulunan Zn^{2+} üzerinden etkileşime girerler. TIMP'lar tıpkı substrata benzer şekilde MMP'nin aktif bölgesine yerleşir ve MMP-substrat etkileşimini engellerler (Şekil 2.7) [21].

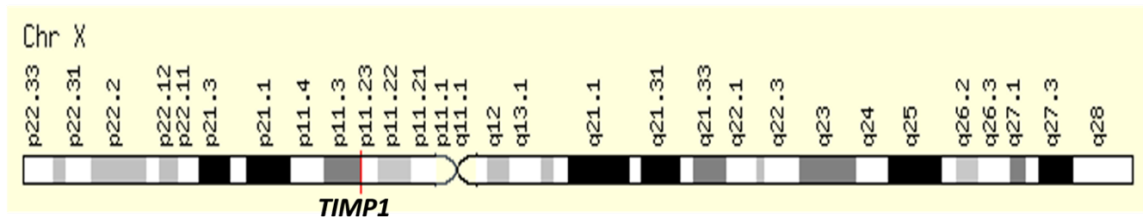


Şekil 2.7: MMP-substrat ve MMP-TIMP etkileşiminin şematik gösterimi.

TIMP'ların doğrudan hücre yüzey reseptörlerine bağlandığı, MMP'lerden tamamen bağımsız fonksiyonları da vardır. Hücreler arası matriksin dönüşümü, doku yeniden modellenmesi ve hücresel davranışlar açısından önemli regülatörlerdir [23]. TIMP'lar hedef moleküllerine N ya da C terminal bölgelerinden bağlanarak fonksiyon gösterirler. N terminal bölgesi genellikle inhibisyon bölgesi olarak da adlandırılır (Şekil 2.12) [43].

2.4.1. TIMP1

İnsan *TIMP1* geni X kromozomunun Xp11.3 bölgesinde konumlanmıştır (Şekil 2.8) [44].



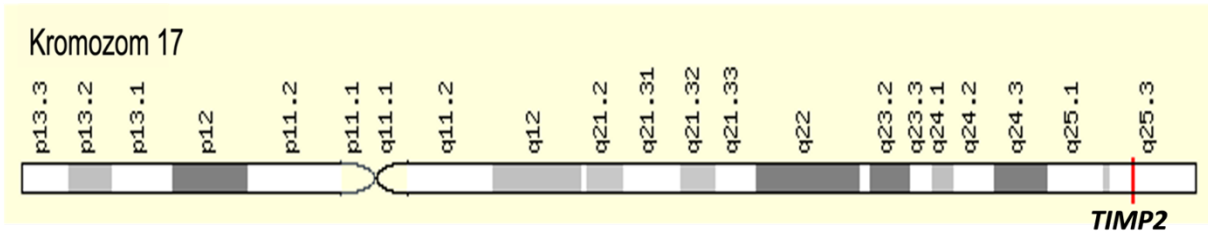
Şekil 2.8: *TIMP1* geninin X kromozom üzerindeki yeri¹.

¹*TIMP1* geni için <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=TIMP1> adresinden 20.04.2022 tarihinde alınmıştır.

TIMP1 membran bağı olan MMP'lere (*MMP-14*, *MMP-16*, *MMP-24* ve *MMP-19*) düşük afinite göstermesi ile diğer üç TIMP üyesine göre daha kısıtlı inhibe etme alanına sahiptir [22]. Örneğin *TIMP1* pro-*MMP9* ile C terminali bölgesi üzerinden etkileşime geçtiği bildirilmiştir. Bu durumda sadece C terminali etkileşime girmekte boşta kalan N terminali ise başka bir MMP ile etkileşime geçebilmektedir [20, 21].

2.4.2. *TIMP2*

İnsan *TIMP2* geni 17. kromozomun 17q25.3 bölgesinde konumlanmıştır [45] (Şekil 2.9). Temel olarak çoğu dokuda sentezlenen *TIMP2*, TIMP'lar arasında özellikle hücre yüzeyindeki *MT1-MMP* ve pro-*MMP2* ile etkileşime giren tek enzimdir. Bu etkileşimi pro-*MMP2*'nin aktive olması için yapmaktadır. Bu sebeple *TIMP2*, *MMP2*'yi hem aktive etmesi hem de inhibe etmesi açısından diğer TIMP'lardan farklıdır. *TIMP2*'nin, *MMP2* inhibisyonunda oldukça etkin olduğu bildirilmiştir [22]. Her biri üzerindeki etki düzeyleri farklılık gösterse de *TIMP2*, tüm MMP'ler üzerinde etkilidir [46]. *TIMP2* hücre yüzeyine yerleşebildiği gibi hücreler arası matrikste çözünür formda da bulunabilir [25, 26]. *TIMP2* aktivasyon görevini pro-*MMP2* ile C terminali üzerinden bağlanarak gerçekleştirir. Aynı zamanda boşta kalan N ucu inhibisyon görevi için farklı bir MMP'ye de bağlanabilir. [20, 21].



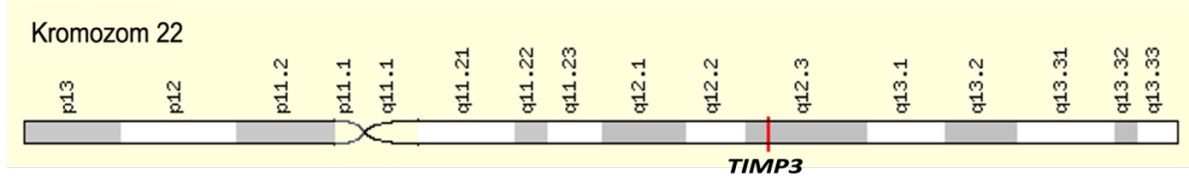
Şekil 2.9: *TIMP2* geninin 17. kromozom üzerindeki yeri¹.

2.4.3. *TIMP3*

İnsan *TIMP3* geni 22. kromozomun 22q12.3 bölgesinde konumlanmıştır [47] (Şekil 2.10). *TIMP3*'ün *MMP2* ve *MMP9*'u başarı ile inhibe ettiği bulunmuştur [22]. Örnek olarak *TIMP3*, pro-*MMP9* ile C terminali üzerinden etkileşime geçer, N terminal ucu boşta kalır.

¹*TIMP2* geni için <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=TIMP2&keywords=TIMP2> adresinden 20.04.2022 tarihinde alınmıştır.

Gerekli olması halinde N terminal bölgesi ile de farklı bir MMP'ye bağlanarak inhibisyon görevini yerine getirebilir [20, 21]. Tıpkı *TIMP2*'de olduğu gibi etki etme düzeyleri farklılık göstermekle birlikte *TIMP3*'ün de tüm MMP'ler üzerinde etkili olduğu bilinmektedir. *TIMP3* göz ve böbrek dokularının bazal membranında matriks proteini olarak üretilir.

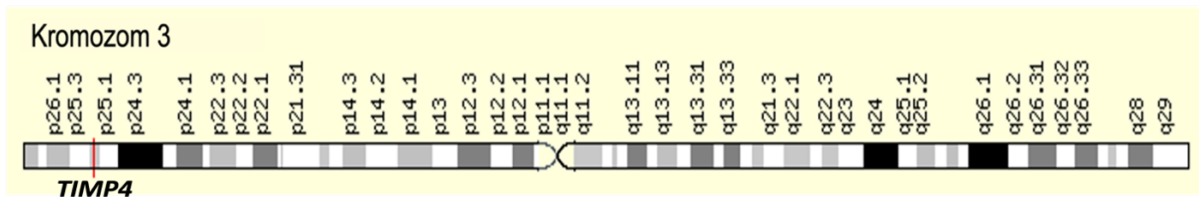


Şekil 2.10: *TIMP3* geninin 22. kromozom üzerindeki yeri¹.

TIMP3 memelilerde oldukça özeldir çünkü hem MMP'ler üzerinden geniş bir etki alanı vardır hem de disintegrin ve metalloproteinaz (ADAM) ve trombospondin motifli disintegrin ve metalloproteinaz (ADAMTS) proteinleri ailesi üyelerinden bazılarını inhibe edebilir [46]. *TIMP3*'ün hem hücre yüzeyine konumlanabilme hem de matrikse tutunabilme özelliği vardır (Şekil 2.12) [25, 26].

2.4.4. *TIMP4*

İnsan *TIMP4* geni 3. kromozomun 3p25.2 bölgesinde konumlanmıştır [48] (Şekil 2.11). *TIMP4* kalp, yumurtalık, böbrek, pankreas, kalın bağırsak, testis, beyin ve adipoz doku olmak üzere birçok dokuda sentezlenir. *TIMP4*'ün etki alanı *TIMP2* ve *TIMP3*'e göre daha kısıtlıdır. *TIMP4* çözünür formda bulunabilir [25, 26]. *TIMP4*, pro MMP2 ile C terminali üzerinden etkileşim göstererek aktivasyon sağlarken N terminal ucu açıkta kalır [20, 21].



Şekil 2.11: *TIMP4* geninin 3. kromozom üzerindeki yeri².

TIMP'ların hem hücre yüzeyinde hem matrikse tutunmuş halde hem de çözünebilir formda hücrede bulunabilmeleri onları çok yönlü sinyal regülatörleri yapmaktadır (Şekil 2.12) [49].

¹*TIMP3* geni için <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=TIMP3&keywords=TIMP3> 20.04.2022 tarihinde alınmıştır.

²*TIMP4* geni için <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=TIMP4&keywords=TIMP4> 20.04.2022 tarihinde alınmıştır.

TIMPlar kendi özel dokularında, sitokinler, büyüme faktörleri ve kemokinler tarafından transkripsiyonel düzeyde düzenlenebilir şekilde ekspresyon gösterirler [26, 50].

	Yer	İnhibisyon	Bağlanma
TIMP-1	Hücre yüzeyi ve çözünür halde	MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-7, MMP-8, MMP-9	ProMMP-9
TIMP-2	Hücre yüzeyi ve çözünür halde	MMP-2, MMP-9, MMP-14, MT1-MMP	ProMMP-2
TIMP-3	Hücreler arası matriks ve hücre yüzeyi	MMP-2, MMP-9	ProMMP-2, ProMMP-9
TIMP-4	Hücre yüzeyi ve çözünür halde	MMP-2, MMP-26, MT1-MMP	ProMMP-2

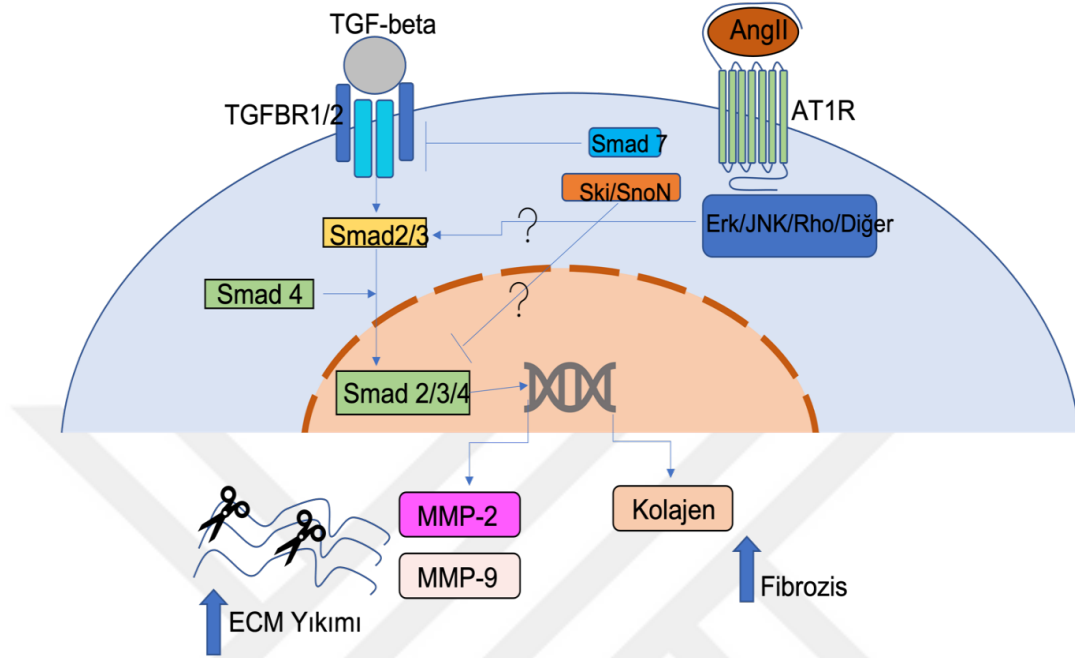
Şekil 2.12: MMP ve TIMP'ların hücredeki yerleri ve birbirleri ile olan etkileşimleri¹.

2.5. MATRİKS METALLOPROTEİNAZ VE METALLOPROTEİNAZLARIN DOKU İNHİBİTÖRLERİNİN AORT DİSEKSİYONU İLE İLİŞKİSİ

Aort diseksiyonunda aort damarının tabakaları birbirinden ayrılmış durumdadır. Ayrılmış aort duvarında karakteristik olarak proteazlar çok miktarda bulunmaktadır. Bir çinko endopeptidaz ailesi olan MMP'ler aort damar dokusunda aktif olarak görev yapmaktadır. TAD vakalarında MMP'ler çoğu zaman aort damarına esnekliğini kazandıran ECM bileşenleri üzerinde proteaz olarak aktivasyon göstermektedir. Özellikle *MMP1*, *MMP2*, *MMP7* ve *MMP9* başta olmak üzere bir çok çalışma MMP'lerin TAD vakalarında anlatımlarının değiştiği bildirilmiştir [51-53]. TAD'da parçalanmış olan ECM'nin sentezi sürecinde birçok faktör, dönüştürücü büyüme faktörü β (TGF- β) tarafından regüle edilmektedir.

¹Cabral-Pacheco, G.A., Garza-Veloz, I., Castruita-De şa Rosa, C., Ramirez-Acuna, J., Perez-Romero, B. A., Guerrero-Rodriguez, J. F., Martinez-Avila, N. ve Martinez-Fierro, M. L., 2020, The Roles of Matrix Metalloproteinases and Their Inhibitors in Human Diseases, *International Journal of Molecular Sciences*, 21(24)

Diğer yandan TGF- β genellikle matriks senteziyle ilgili olarak bilinse de *MMP2* ve *MMP9*'un anlatımlarını arttıracak şekilde düzenlemesi ECM yıkımıyla da ilişkilendirilmektedir (Şekil 2.13).



Şekil 2.13: TGF- β ve AngII aracılığı ile MMP2 ve MMP9 anlatımının düzenlenmesi¹.

Aort anevrizması ve aort diseksiyonu oluşumunda risk faktörleri olan Marfan sendromu gibi birçok kalıtsal bağ dokusu hasarı bozukluğunda patolojik TGF- β aktivitesinin varlığı bildirilmiştir. Ek olarak TGF- β aktivitesini düzenleyen bazı proto-onko proteinlerindeki (Ski ve SnoN) değişikliklerin TAD gelişimine katkı sağlayabileceği öne sürülmüştür [54]. ECM'nin sentezi, kararlılığı ve yıkımını etkileyen bu süreçlerde *MMP2*, *MMP9* kilit konumda bulunmaktadır. Ayrıca anjiyotensin II (Ang II) de TGF- β ile ilişki içerisinde olarak ECM'in kolajen içeriğini belirleyen, fibroz oluşumunu sağlayan sürece eşlik edebilmektedir. TAD vakalarında farklı tiplerdeki kolajenlerin damar içerisinde birikerek fibrozis meydana getirmesi, bunun damar yapısını ve esnekliğini bozması ve nihayetinde damar içerisinde yırtılmanın görülebilmesi olasıdır [4]. ECM'yi oluşturan bileşenlerin oranındaki değişme (Örn: fibroz) damar yapısını doğrudan etkiler.

¹TGF- β bağlanır ve reseptörünü aktive eder. Aktif kompleks Smad2 ve Smad3'ün fosforillenmesini sağlar. Bu sayede ortama Smad4 çekilir ve Smad2/3-Smad4 kompleksi oluşur. Bu kompleks çekirdeğe geçer ve hücre çoğalması, hücre ölümü, kolajen fiber artışı, hücreler arası matriksin yıkımında görev alacak TGF- β hedef genlerinin transkripsiyonunu aktive eder. TGF- β sinyal iletimi reseptörüne bağlanabilen Smad 7, iletimi negatif etkileme potansiyeline sahiptir. Proto onkoproteinler Ski ve SnoN'da doğrudan Smad2/3-Smad4 kompleksine bağlanarak TGF- β 'yı negatif yönde regüle edebilirler. Anjiyotensin II'de Smad2/3-Smad4 kompleksi üzerinden ECM'nin kolajen içeriğini belirleyen ve sürece dahil olabilmektedir.

Relaksinin çeşitli hastalık tablolarında fibrozu ortadan kaldırma, anormal kolajen birikimini önleme ya da süreci tersine çevirme yetenekleri olduğu bilinir. TGF- β 1 sinyal aktarımını engelleyebiliyor olması fibrozu önleme mekanizmalarından biridir. Ek olarak relaksinin farklı organlarda MMP'ye bağlı matriks yıkımını arttırdığı ve TIMP'ları da inhibe ettiği bildirilmiştir. MMP:TIMP oranında bir artış sağlayarak hücre içerisindeki dengenin proteolitik yöne doğru kaymasını sağladığı bulunmuştur [33].

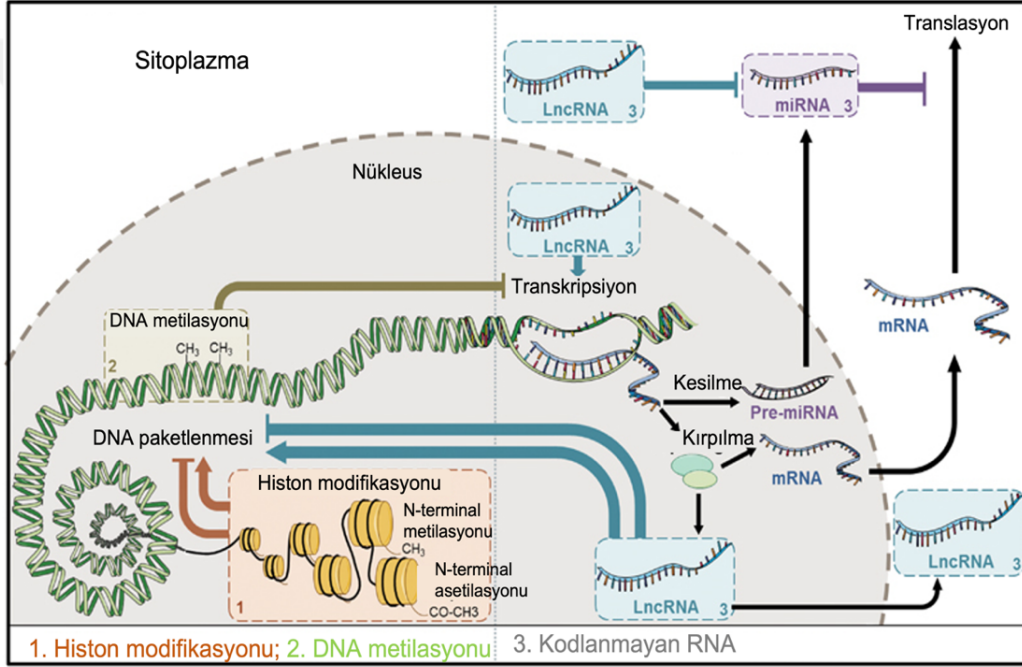
ECM'nin düzenlenmesi ile ilgili süreçlerde MMP ve TIMP'ların birlikte fonksiyon gösterdikleri açıktır. MMP'lerin genel regülasyonunda TIMP'lar büyük rol oynamaktadır. Tabakaları ayrılmış aort medyasında TIMP'ların ekspresyon seviyesinin düşmesinin, parçalanmayı gerçekleştiren MMP'lerin artışını açıklanması beklenir [55]. Ancak TAD'da TIMP'ların anlatımlarının arttığını gösteren yayınlar da mevcuttur [52, 56]. Teorik olarak TIMP'larda görülen bu artışın MMP'leri baskılaması gerekirken bazı MMP'lerin ekspresyonlarının da arttığı bildirilmiştir. Bu sebeple TAD vakalarında MMP ve TIMP gen anlatımlarının ve aralarındaki dengenin araştırılması hastalık patogenezi ile ilgili önemli bilgiler ortaya çıkartabilir. Ek olarak bozulmuş olan MMP/TIMP dengesi sonucu hücrede yerine getirdikleri fonksiyonun proteolitik düzeye doğru kaymakta olduğu da bilinmektedir [4, 33]. Bu da TAD vakalarındaki degradasyon tablosu ile örtüşmektedir.

2.6. MATRİKS METALLOPROTEİNAZLAR VE METALLOPROTEİNAZLARIN DOKU İNHİBİTÖRLERİNİN EPİGENETİK DÜZENLENMESİ

Epigenetik düzenlemeler, DNA dizisi hiçbir değişime uğramadan meydana gelen ve gen anlatımının düzenlenmesinde rol oynayan ve kalıtsal olabilen değişikliklerdir. Yapılan birçok çalışma DNA metilasyonu gibi epigenetik değişikliklerin tümör oluşumundan, metabolik hastalıklara kadar geniş bir alanda etkili olduğunu ortaya koymuştur [57]. Ayrıca DNA metilasyonunun kalp yetmezliği, atipik karviyovasküler gelişim, aort kapağının mineralizasyonu gibi birçok kardiyovasküler hastalıkta rol oynadığını gösteren çalışmalar mevcuttur [58-60]. Ancak TAD'ı merkeze alarak yapılan özellikle DNA metilasyonu çerçevesinde tasarlanmış çok az çalışma vardır [57].

Epigenetik modifikasyonlar farklı mekanizmalarla meydana gelirler. DNA'ya bağlı histon proteinlerinin modifikasyonu, DNA metilasyonu ve miRNA ve uzun kodlanmayan RNA (lnc-RNA) gibi kodlanmayan RNA'larla eşleşmiş modifikasyonlar epigenetik düzenlemelerdir

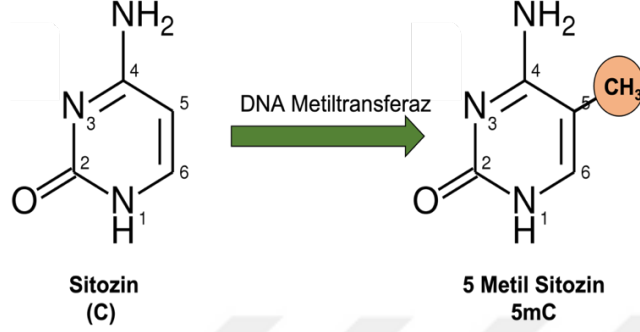
(Şekil 2.14). Bu mekanizmalar DNA molekülünün kendisini, transkripsiyon sürecini, transkripsiyon ürünlerinden birini hedef alarak gen anlatımında ve nihayetinde hedef proteinin üretiminde değişikliğe yol açarlar [61, 62]. Histonlar kromatin paketlenmesinden sorumlu DNA ile ilişki kuran proteinlerdir. N uçlarındaki belirli bir aminoasit üzerinde gerçekleşen (arjinin ve lizin) asetilasyon, metilasyon, fosforilasyon, adenozin difosfat ribozilasyon ve sumolasyon (*“Small Ubiquitin-related modifier protein”*) modifikasyonlarına açıktırlar. Histon asetilasyonu kromatin yapısının gevşeyerek açılması ve transkripsiyonun aktivasyonu ile ilişkiliyken histon metilasyonu transkripsiyonun hem aktivasyonu he de baskılanması ile ilişkilendirilmiştir [63, 64].



Şekil 2.14: Hücrede meydana gelen epigenetik modifikasyonların gösterimi¹.

¹Liu, Liu, P., Zhang, J., Du, D., Zhang, D., Jin, Z., Qui, W., Zhou, X., Dong, S., Zhou, M., Zhao, H., Zhang, W., Ma, J., Sun, S., Fu, W., Liu, Y. ve Wang, L., 2021, Altered DNA methylation pattern reveals epigenetic regulation of Hox genes in thoracic aortic dissection and serves as a biomarker in disease diagnosis, *Clinical Epigenetics*, 13(1), 124

DNA metilasyonunda DNA’da bulunan sitozin (C) bazı ile bir metil grubu arasında kovalent ancak geri dönüşümlü bir bağ meydana gelir ve bunun sonucunda 5-metil sitozin oluşur (Şekil 2.15). Bu bağlanma DNA metiltransferaz tarafından gerçekleştirilir. DNA metilasyonu genellikle transkripsiyonun baskılanması ile ilişkilendirilir [65].



Şekil 2.15: DNA metilasyonunun şematik gösterimi.

Kodlanmayan RNA’lar protein kodlama özellikleri olmayan RNA molekülleridir. Genellikle boylarına göre sınıflandırılırlar. 200 bazdan daha az uzunlukta olanlar kısa, 200 ve üzeri baza sahip olanlar ise uzun olarak kategorize edilmektedir. Farklı boyutta çeşitli kısa RNA tanımlanmış olsa da en çok baskın olanları 20 nükleotit uzunluğundaki miRNA’lardır. miRNA’lar hedef genlerinin 3’ UTR (*untranslated region*) lerinde bulunan 6-8 nükleotit ile homoloji gösteren bir dizi içerirler. Baz eşleşmesine bağlı olarak hedef genlerine bağlanan miRNA’lar bu şekilde transkripsiyonu baskırlarlar [66, 67]. Uzun kodlanmayan RNA’lar (lncRNA) tarafından gerçekleştirilen gen anlatımı regülasyonu daha karmaşık ve miRNA’dan farklıdır. LncRNA’lar çok farklı rollerle gen anlatımını düzenleyebilirler. Bunlar; sinyal molekülü olarak davranmak, sahte bağlanma noktası yaratmak , moleküllere rehberlik etmek, iskelet ya da arttırıcı olarak davranmaktadır[68].

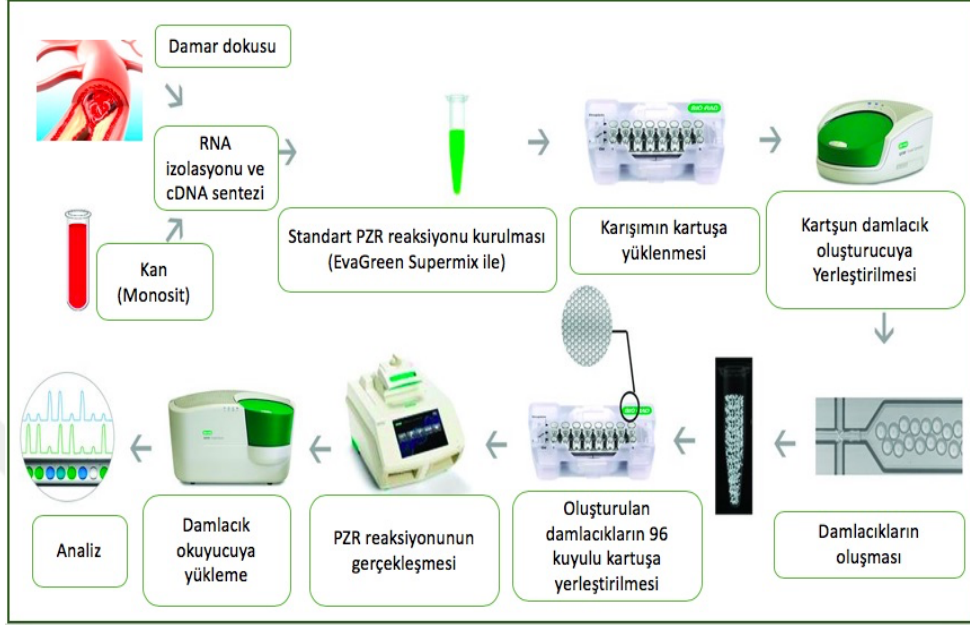
TAD vakalarında *MMP2*, *MMP9*, *TIMP2* ve *TIMP3* genlerinin gen anlatımlarındaki değişikliğin epigenetik bir arka planı olması beklenen bir durumdur. İki farklı etiyojiye sahip (biküspit ve triküspit aortik kapak) anevrizma vakalarında yapılan genom boyu DNA metilasyon çalışması kardiyovasküler gelişimde önemli bazı genlerin normalin dışında bir metillenme düzeni gösterdiğini açığa çıkarmıştır. Aort anevrizması TAD için de önemli bir risk faktörüdür [69]. Bu sebeple DNA metilasyonunun aort anevrizması ve aort diseksiyonu gelişiminde etkili bir parametre olabileceği düşünülmektedir. Yine de TAD özelinde yapılmış DNA metilasyonunu araştıran çok az çalışma vardır [57]. Histon düzeyinde, TAD vakarında

yapılmış epigenetik çalışmalar sonucu H3 histon proteinin 23. pozisyonundaki lizin aminosidinin asetillenmesinin (H3K23ac) arttığı bildirilmiştir. H3K23ac özellikle *MMP2* ve *TIMP2* gibi hücreler arası matrikste aktivasyon gösteren proteinlere bağlanmaktadır. Bu süreç TAD oluşumunda rol oynayan genlerin (*MMP2* ve *TIMP2* gibi) ve doğal regülatörlerinin histon düzeyinde epigenetik olarak düzenlenebildiğini açıkça göstermektedir [70]. Buradan yola çıkarak TAD patogenezinde ECM yıkımında merkezi bir rolde olan *MMP2*, *MMP9* ve dokudaki doğal regülatörleri olan *TIMP2* ve *TIMP3*'ün de epigenetik olarak düzenleniyor olması gayet mümkündür. Bu alanda yapılmış fazla çalışmanın olmaması *MMP2*, *MMP9*, *TIMP2* ve *TIMP3* genlerinin epigenetik düzenlenmesi ile ilgili elde edilecek bilgilerin değerini arttırmaktadır.

2.7. DAMLACIKLI DİJİTAL POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU

Damlacıklı dijital polimeraz reaksiyonu (ddPZR) her bir hedef DNA dizisinin nanolitre boyutunda bir yağ damlacığının içerisine transfer edilmesi, ve PZR reaksiyonunun ayrık yağ damlacığı içerisinde gerçekleşmesi prensibine dayanmaktadır. Reaksiyon için kullanılan özel yağdan, ekipmanlar aracılığı ile yaklaşık 20.000 farklı yağ damlacığı oluşturulur. Hedef DNA molekülleri ile yağ damlacıkları sistem sağlayıcının önerdiği protokol çerçevesinde bir araya getirilir ve PZR reaksiyonu yağ damlacığının içinde gerçekleşir. Yağ damlacıkları hedef DNA'ya ortamdan ve diğer hedef DNA moleküllerinden izole bir ortam sağlar. Her bir yağ damlacığı normal PZR'de hazırlanan bir reaksiyonun nanolitre mertebesinde gerçekleşen halidir, böylece tek bir reaksiyonda 20.000 eş reaksiyonun kurulması ile eş değer bir sonuç elde edilir. Bu durum ddPZR sonuçlarının güvenilirliğini arttıran en önemli etkidir. ddPZR'ın uygulama basamakları Şekil 2.16'da verilmiştir. ddPZR ile seçilen hedef gen anlatımındaki çok küçük değişimler yakalanabilmekte ve frekansı 1/1000 alleller tanımlanabilmektedir [71]. ddPZR ile hedef genlerin gen anlatımı bağıl olarak değil mutlak bir şekilde ölçülmektedir [72]. ddPZR 'de reaksiyon sırasında oluşturan yağ damlacıklarının içerisine farklı kopya sayısında hedef DNA molekülü alınır (0,1,2,3...). Hedef DNA içermeyen negatif damlacıklar, farklı kopya sayısında hedef DNA içeren pozitif damlacıklardan floresan ölçüm ile ayrılır. Reaksiyon bileşenlerinde bulunan floresan boya sayesinde gerçekleştirilen bu ölçümde damlacığın içerisinde bulunan DNA miktarı ile doğru orantılı olacak şekilde floresan ışıma değeri alınır. Her bir damlacığın içerisine denk gelmiş olabilecek kopya sayısı da ddPZR sistemi tarafından "Poisson" dağılımı kullanılarak hesaplanır. ddPZR sisteminin analizleri "QuantaSoft™"

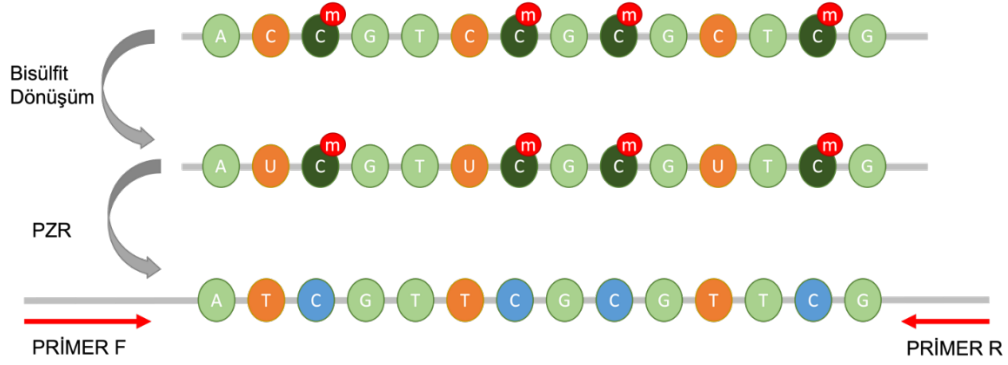
yazılımı aracılığı ile yapılır. Bu yazılım sayesinde hedef genlere ait gen anlatım düzeyleri her örnek için kopya sayısı/μl olarak elde edilir [71].



Şekil 2.16: ddPZR yönteminin uygulama basamaklarının şematik gösterimi.

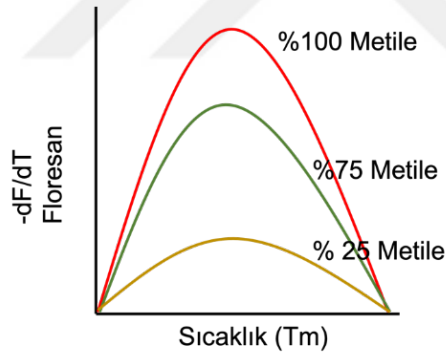
2.8. METİL SENSİTİF YÜKSEK ÇÖZÜNÜRLÜKLÜ ERİME

Metilasyon çalışmaları, sodyum bisülfite ile modifiye edilen DNA'nın dizisinde meydana gelen değişikliklerin belirlenmesi üzerine kurulmuştur. MS-HRM yöntemi hedef DNA bölgesinin PZR ile çoğaltılması sonrasında oluşan ürünlerin metillenme durumlarına göre erime sıcaklıkları farkından birbirinden ayrılması prensibine göre çalışır. PZR işlemi öncesinde metillenmiş C'lerin (Sitozin) belirlenebilmesi için bisülfitleme işlemi yapılır. Bisülfite muamelesi sonrasında metillenmiş "C" nükleotitleri aynı kalırken metillenmemiş "C" nükleotitleri "U" (Urasil)'e dönüşür (Şekil 2.17).



Şekil 2.17: Bisülfid çevrim ve PZR işlemleri sonrasında oluşan yeni dizinin şematik gösterimi.

Hedef dizide meydana gelen bu farklılık da metillenmiş ve metillenmemiş DNA'nın ayrıştırabilmesini sağlar. Bisülfid işlemi uygulanmış, metillenmiş ve metillenmemiş DNA ile yapılan PZR sonucunda oluşan ürünlerin "C" ve "T" içeriği farklı oranda olduğu için farklı erime profilleri göstermektedir. Şekil 2.18'de gösterildiği gibi her eğri içerdiği metilasyon yüzdesine göre farklı uzunlukta piklere sahiptir.



Şekil 2.18: MS-HRM sonucunda elde edilen erime eğrileri

Metillenmiş DNA, "C" nükleotidlerine zengin metillenmemiş DNA'da ise "T" nükleotidleri ağırlıktadır. Baz içeriğindeki bu oran farklılığı sonucunda aynı ampikonun metillenmiş ve metillenmemiş versiyonları birbirinden erime eğrileri ile ayrılabilir. MS-HRM uygulaması için metilasyon durumundan bağımsız olarak tasarlanan primerlerle yapılan PZR sonrasında erime profillerine bakılmaktadır. MS-HRM hassas, fiyat avantajı sunan ve tek lokus metilasyon çalışmaları için uygun bir yöntem olarak seçilmiştir [73].

3. MALZEME VE YÖNTEM

3.1. HASTA VE KONTROL GRUBUNUN SEÇİMİ

Tez projesi kapsamında çalışmaya dâhil edilecek örneklerin kapsamı, İstanbul Kartal Koşuyolu Yüksek İhtisas Eğitim ve Araştırma Hastanesi Kalp ve Damar Cerrahisi Kliniği biriminden Uzm. Dr. Arzu Antal ile birlikte belirlenmiştir. Çalışma başlangıcında kriterlere uyan hastalara hekim tarafından detaylı bilgilendirme yapılmış ve bilgilendirilmiş onam formu imzalatılmıştır. Bilgilendirmeyi takiben tedavilerinin bir parçası olarak cerrahi müdahaleye alınan kişilerden aort damar dokusu örnekleme yapılmıştır. Ek olarak cerrahi müdahale sırasında periferik kan örneği de alınmıştır. Söz konusu cerrahi müdahale, hastaların tedavi süreçlerinin doğal bir uygulaması olup, tez çalışması için özellikle planlanmamıştır.

Çalışma grupları hasta ve kontrol grubu olmak üzere iki ana grup olarak planlanmıştır. Hasta grubu olarak aort diseksiyonu tanısı ile kliniğe başvuran kişilerden örnekleme yapılmıştır. Kontrol grubu olarak da koroner arter hastalığı sebebiyle opere olan ve damar proksimal anastamozları asendan aortaya implante edilen hastaların proksimal anastamoz için asendan aortada hazırlanan bölgesinden alınan dokular kullanılmıştır. Güç analizi ile, anlamlılık seviyesi %5, grup standart sapmaları 1.00 olacak şekilde hesaplanarak %90 güç için hasta ve kontrol grubundan çalışmaya 10'ar kişi dahil edilmiştir.

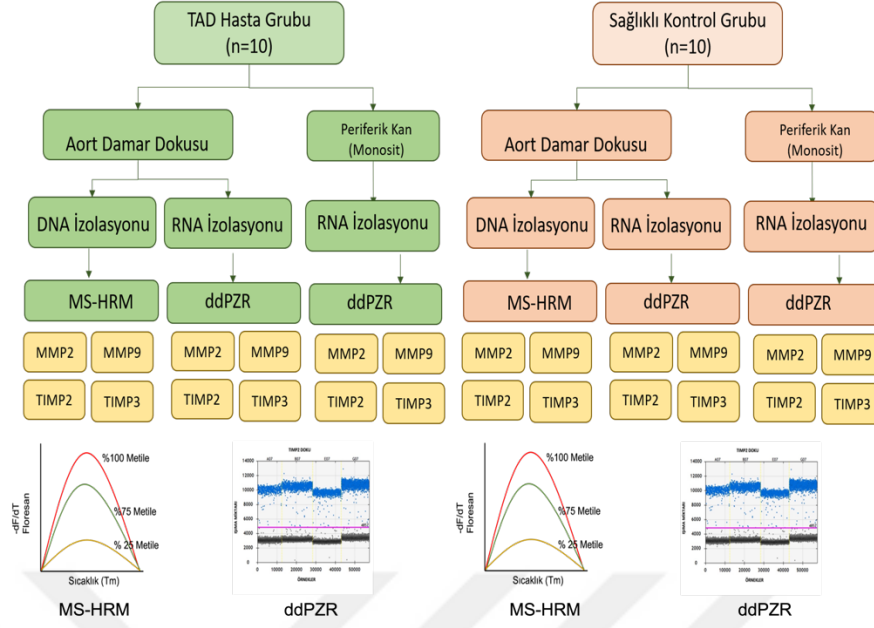
Hasta grubu kabul etme ve dışlama kriterleri;

- Torasik Aort Diseksiyonu (TAD) tanısı almış ve acil cerrahi müdahaleye alınacak olmak
- Marfan sendromu, Ehler-Danlos sendromu gibi kalıtsal bağ doku bozuklukları bulunmamak
- Anevrizma kaynaklı diseksiyon öyküsü bulunmamak

Kontrol grubu kabul etme ve dışlama kriterleri;

- Koroner arter hastalığı sebebiyle opere olacak olmak
- Marfan sendromu, Ehler-Danlos sendromu gibi kalıtsal bağ doku bozuklukları bulunmamak

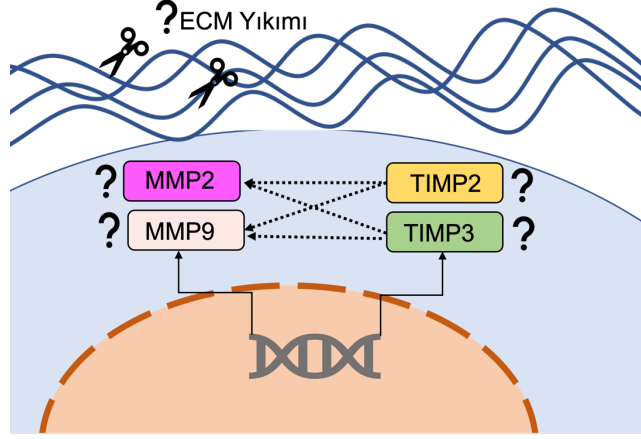
Tez kapsamında izlenen deneysel çalışmalar şekil 3.1'de verilmiştir.



Şekil 3.1: Tez kapsamında planlanan deney akış şeması.

3.2. HEDEF GENLERİN SEÇİMİ

Bu tez çalışması kapsamında gen seçiminin ilk aşaması olarak sorunlu olan süreçler içerisinde TAD'ın parçalanmış damar dokusu tablosu ile de uyumlu olması sebebiyle matriks metalloproteinazların (MMP) TAD'daki rolleri üzerine yoğunlaşmıştır. MMP'ler hücreler arası matriks bileşenleri üzerinde parçalama etkisi göstermekte ve matriks metalloproteinazların doku inhibitörleri de (TIMP) MMP'lerin inhibisyonunda aktif görev almaktadır (Şekil 3.2). *MMP2* ve *MMP9*'un TAD vakalarında gen anlatımının değişiklik gözlemlendiğini belirten çalışmalar bulunması, *MMP2* gen polimorfizmlerinin TAD için genetik yatkınlığa sebep olduğunun da bildirilmesi ve *MMP2*'nin TAD vakalarında gen anlatımında değişiklik bildiren çalışmaların yanında değişmediğini bildiren çalışmaların da olması göz önüne alınarak bu iki gen çalışmaya dahil edilmiştir. Ayrıca *TIMP2* ve *TIMP3* genlerinin, tüm MMP'ler üzerinde düzenleme etkileri olduğu için TAD vakalarında *MMP2* ve *MMP9* ile birlikte incelenmeleri uygun bulunmuştur [26][75][76]. Bu sayede *MMP2* ve *MMP9*'un TAD vakalarındaki etkisinin inhibitörleri varlığında incelenmesi sonucu elde edilen bilgilerle literatüre katkı sağlanması amaçlanmıştır.



Şekil 3.2: Hedef genlerin birbirleri ile olan fonksiyonel ilişkilerinin şematik gösterimi¹.

Bu bilgiler ışığında TAD hastalarında aort damar dokusunda ve sirkülasyondaki monosit hücrelerde gen anlatımının incelenmesi ve hedef genlerin promotör bölgelerindeki metilasyon düzenlerinin araştırılması amacıyla *MMP2*, *MMP9*, *TIMP2* ve *TIMP3* genleri seçilmiştir.

3.3 HASTA VE KONTROL GRUBU ÖRNEKLERİNİN ELDE EDİLMESİ

3.3.1. Aort Damar Dokusu Eldesi

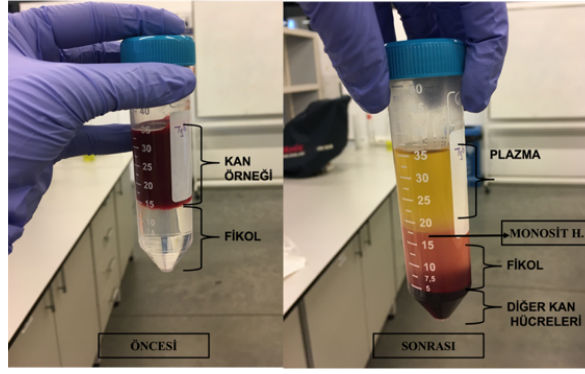
İstanbul Kartal Koşuyolu Yüksek İhtisas Eğitim ve Araştırma Hastanesi Kalp ve Damar Cerrahisi Kliniği biriminde cerrahi müdahale sırasında alınan aort dokusu örneklerinin her birinin boyutu yaklaşık olarak 0,5 cm'dir. Alınan doku örnekleri içerdikleri nükleik asitlerin yapılarının korunabilmesi için gerekli özel bir solüsyon (*RNA Later*) içerisinde muhafaza edilmiştir. Doku örnekleri izolasyon tarihine kadar bozulmanın engellenmesi için -80°C'de saklanmıştır.

3.3.2. Periferik Kandan Monosit Hücre Eldesi

Hem hasta hem de kontrol grubundan alınan periferik kan örnekleri 10 ml'lik EDTA'lı mor kapaklı tüpte toplanmış ve monosit hücre izolasyonu yapılana kadar +4°C'de bekletilmiştir. Monosit hücrelerin izolasyonu için "*RosetteSep™ Human Monocyte Enrichment Cocktail*" kiti kullanılmıştır. Kitin önerisiyle aşağıda verilen protokol takip edilmiştir:

¹Tez kapsamında öncelikli olarak hücreler arası matriksin parçalanmış olduğu TAD vakalarında aort damar dokusunda ve monosit hücrelerdeki *MMP2*, *MMP9*, *TIMP2* ve *TIMP3* genlerinin anlatımlarının incelenmesi hedeflenmiştir. *TIMP2* ve *TIMP3*'ün her iki *MMP* ile olan ilişkisini belirtmek için kesikli çizgili ok kullanılmıştır. Parçalanma fonksiyonu için hedef *MMP*'lerin, *TIMP*'ların bireysel anlatımları ve oranlarının incelenmesi amaçlanmıştır.

1. 10 ml periferik kan 50 ml'lik falkon tüpe alınır.
2. Üzerine 100 µl 0.1 M EDTA eklenir.
3. 500 µl “*RosetteSep™ Human Monocyte Enrichment Cocktail*” solüsyonundan eklenir (50µl /ml örnek) ve 20 dakika oda sıcaklığında ara ara karıştırılarak beklenir.
4. 10 ml PBS solüsyonu eklenerek yavaşça karıştırılır.
5. 50 ml'lik falkona 15 mL “*Ficoll-Paque® PLUS*” solüsyonu eklenir.
6. Fikol eklenen tüp eğik tutularak oluşan solüsyon yüzeyine yavaşça kan örneği yayılır. Bu aşama çok yavaş uygulanır. Kan örneği ile fikolün karışmaması sağlanır (Şekil 3.2).
7. 1200g'de 20 dakika düşük fren ayarında santrifüj edilir.
8. Fikol ve serum fazının arasında, bulut gibi yerleşen ve monosit hücrelerini içeren faz (Şekil 3.1) dikkatlice alınarak temiz bir falkon tüpe aktarılır.
9. Üzerine 10 ml PBS (*Phosphate Buffer Saline*) eklenerek hücrelerin yıkama işlemi gerçekleştirildi ve 300g'de 10 dakika düşük fren ayarında santrifüj edilir.
10. Üst sıvı faz atılarak yıkama ve santrifüj işlemi tekrarlanır.
11. Sıvı faz atıldı. Tüpün taban kısmına çökmüş monosit hücrelerinin üzerine 600 µl “*RNA Later*” solüsyonu eklenir. Pipet yardımıyla iyice karıştırılarak 1.5 ml'lik ependof tüpe alınır.
12. “*RNA Later*” solüsyonu içerisinde 24 saat +4°C'de bekletildikten sonra uzun süre saklanması için önce -20°C'ye, takip eden gün içerisinde de -80°C'ye kaldırılır.



Şekil 3.3: Fikol yardımı ile monosit hücrelerin total kan hücrelerinden ayrılması.

3.4. AORT DAMAR DOKUSU VE MONSİT HÜCRELERDEN TOTAL RNA İZOLASYONU

Aort damar dokusu örneklerinden total RNA izolasyonu için “*PureLink RNA Mini Kit*” kullanılmıştır. Kitin önerisiyle aşağıda verilen protokol takip edilmiştir:

1. -80°C 'de saklanan aort damar dokuları çıkarılarak buz üzerinde çözümleri sağlanır. Her bir damar örneğinden steril neşter yardımı ile 50 mg doku kesilir ve önceden tartılmış steril bir ependof içerisine alınır. Tartılan doku üzerine gerekiyorsa ekleme yapılır. Her örnekten 60 mg olacak şekilde izolasyona başlanır.
2. Her 1 ml “*Lysis Buffer*”a 10 μl β -merkaptotanol eklenerek hücreleri parçalama solüsyonu hazırlanır. 1 dakika oda sıcaklığında beklendikten sonra “vorteks” yapılır.
3. Kite göre her 30 mg doku için 600 μl “*Lysis Buffer*” eklenmesini önerilmektedir. Buna göre her örnek için 1.2 ml “*Lysis Buffer*” ve 12 μl β -merkaptotanol kullanılır.
4. 1. Aşamada tartılan aort dokusu daha önce -20°C 'de bekletilen steril havan içerisine alınır. Üzerine sıvı azot eklenerek ezilir. Toz haline gelen doku steril neşter ucu yardımı ile ependorf tüpün içerisine transfer edilir.
5. 1.2 ml “*Lysis Buffer*” eklenerek pipet yardımı ile homojen bir karışım elde edene kadar karıştırılır ve 5 dakika oda sıcaklığında bekletilir.
6. 2600g'de 5 dakika santrifüj edilir ve süpernatant temiz bir 2 ml'lik ependorf tüpün içerisine transfer edilir.

7. Süpernatant miktarı kadar %70'lik (v/v) etanol eklenir. “*Vorteks*” ile homojen bir karışım elde edilir.
8. <700 µl örnek “*Spin Cartridge*” üzerine eklenir. 1200g’de oda sıcaklığında 15 saniye santrifüj edilir ve toplama tüpünde kalan sıvı atılır.
9. 8. basamaktaki işlem 2 ml’lik ependorftaki solüsyon bitinceye kadar tekrarlanır.
10. “*Spin Cartridge*” yeni bir toplama tüpüne yerleştirilir. 700 µl “*Wash Buffer 1*” eklenerek 1200g’de 15 saniye santrifüj edilir.
11. Toplama tüpü atılır ve “*Spin Cartridge*” yeni bir toplama tüpüne yerleştirilir.
12. 500 µl “*Wash Buffer 2*” eklenerek 1200g’de 15 saniye santrifüj edilir. Toplama tüpündeki sıvı atılır.
13. 12. basamakta yapılan işlemler tekrar edilir.
14. “*Spin Cartridge*” 12000g’de 1 dakika boş olarak santrifüj edilir.
15. “*Spin Cartridge*”, “*Spin Cartridge Recovery*” tüpe takılır.
16. 30 µl “*RNase Free Water*” filtreye değmeden tam orta kısma gelecek şekilde eklenir.
17. Oda sıcaklığında 5 dakika bekledikten sonra 12000g’de 2 dakika santrifüj edilerek total RNA elde edilir.
18. “*Nanodrop*” cihazında yapılacak miktar tayini için 2 µl ayrıldıktan sonra kalan RNA daha sonraki aşamalarda kullanılıncaya kadar -80°C’ye kaldırılır.

Monosit hücrelerinden total RNA izolasyonu için “*PureLink RNA Mini Kit*” kullanılmıştır. Kitin önerisiyle aşağıda verilen protokol takip edilmiştir:

1. “*RNA Later*” solüsyonu içerisinde saklanan hücreler buz üzerinde eritilir.
2. Her örnek tüpünde bulunan “*RNA Later*” solüsyonuna eş hacimde PBS solüsyonu eklenerek örnek seyreltilir.
3. 1500g’de 15 dakika santrifüj edilerek “*RNA Later*” solüsyonu uzaklaştırılır.

4. Kite göre her 1 ml “*Lysis Buffer*”a 10 µl β -merkaptotanol eklenerek hücreleri parçalama solüsyonu hazırlanır. 1 dakika oda sıcaklığında beklendikten sonra vorteks yapılır.
5. Kit önerisine göre her örnek için 600 µl “*Lysis Buffer*” ve 6 µl β -merkaptotanol kullanılır.
6. 600 µl “*Lysis Buffer*”, “*RNA Later*” solüsyonunun uzaklaştırıldığı tüpteki hücrelerin üzerine eklenir ve pipet yardımı ile homojen bir karışım elde edene kadar karıştırılır ve 5 dakika oda sıcaklığında bekletilir.
7. Aort damar dokusundan total RNA izolasyonu yapılırken izlenen protokol 7. adımdan itibaren bire bir uygulanır.

3.5. İZOLE EDİLEN RNA’LARIN KALİTE VE MİKTAR TAYİNİ

Aort damar dokusu ve monosit hücrelerden elde edilen total RNA’nın kalite ve miktar tayini “Nanodrop” cihazında yapılmıştır. Her ölçüm için kullanılan RNA miktarı 1.5 µl’dir. Ölçümü yapılan her örneğin miktarı ng/ µl olarak belirlenmiştir. Kalite tayini için ise A260/A280 ve A260/A230 değerleri kaydedilmiştir.

3.6. CDNA SENTEZİ

Aort damar dokusu ve monosit hücrelerinden elde edilen total RNA’lardan cDNA sentezlenmesi için “*iScript cDNA Synthesis Kit*” kullanılmıştır. Kit içeriğinde gerekli olan RNA miktarı 1µg–1 fg aralığında belirtilmiştir. Her bir örnek için gerekli olan reaksiyon içeriği Tablo 3.1’de verilmiştir. Reaksiyona eklenecek RNA ve su miktarı toplamda 15 µl olacak şekilde başlangıç RNA miktarına göre ayarlanmaktadır.

Tablo 3.1: “*iScript cDNA Synthesis Kit*” kullanılarak yapılan cDNA sentezi protokolü.

İçerik	Miktar (µl/reaksiyon)
5X <i>iScript</i> Reaksiyon Karışımı	4
<i>iScript Reverse Transcriptase</i>	1
Nükleaz İçermeyen Su	değişken
RNA (100 fg- 1µg total RNA)*	değişken
Toplam Hacim	20

Çalışma kapsamında hasta ve kontrol grubu örneklerinden elde edilen RNA'ların miktarları farklılık göstermektedir. Reaksiyon veriminin yüksek olması için kullanılan RNA miktarları olabildiğince yüksek tutulmuştur. Doku örnekleri için her reaksiyon için 200 ng, kan örnekleri de her reaksiyon 100 ng RNA içerecek şekilde kullanılmıştır. Reaksiyon kit sağlayıcının önerdiği programa uyularak gerçekleştirilmiştir. Program Tablo 3.2'de verilmiştir.

Tablo 3.2: cDNA sentez programı.

Süre	Sıcaklık	Döngü Sayısı
5 Dakika	25°C	1
20 Dakika	46°C	1
1 Dakika	95°C	1

3.7. DAMLACIKLI DİJİTAL POLİMERAZ REAKSİYONU UYGULAMASI

Anlatım analizi için damlacıklı dijital polimeraz zincir reaksiyonu (ddPZR) yöntemi uygulanmıştır. Gerekli protokollerin uygulanması için “Bio-Rad” marka “Droplet Digital PCR” cihazı kullanılmıştır. *MMP2*, *MMP9*, *TIMP2*, *TIMP3* ve “Gliseralehit-3 Fosfat Dehidrogenaz” *GAPDH* genlerinin anlatım analiz için kullanılan primer dizileri Tablo 3.3'te verilmiştir.

Tablo 3.3: Hedef genlerin primer dizileri, Tm dereceleri ve oluşacak ürün boyları.

Hedef Gen Adı	Oligonükleotit Dizisi (5'-3')	Tm (°C)	Ürün Boyutu (bp)
<i>MMP2</i>	F:GCTACGATGGAGGCGCTAATG	61.26	188
	R:GGGCAGCCATAGAAGGTGTTC	61.02	
<i>MMP9</i>	F:TTTGGTGTCGCGGAGCAC	60.97	155
	R:CGAGTTGGAACCGACGCGC	61.65	
<i>TIMP2</i>	F:CTGGACGTTGGAGGAAAGAAGG	60.87	147
	R:CATCTGGTACCTGTGGTTCAGG	60.36	
<i>TIMP3</i>	F:GCAACTCCGACATCGTGATCC	61.39	117
	R:TGGTGAAGCCTCGGTACATCTTC	62.24	
<i>GAPDH</i>	F:GCACCGTCAAGGCTGAGAAC	61.57	138
	R:TGGTGAAGACGCCAGTGGA	61.14	

Kit sağlayıcının önerdiği protokol takip edilerek uygulama yapılmıştır. Yapılan uygulama aşamaları aşağıda verilmiştir.

1. Doku RNA örnekleri konsantrasyonları 5 ng/ µl olacak şekilde sulandırılır. Kan örnekleri sulandırılmadan doğrudan cDNA ana stok tüpünden kullanılır. Doku örnekleri için her reaksiyon 5 ng RNA içerecek şekilde kurulurken kan örnekleri yapılan optimizasyon çalışmalarına dayanarak 30-80 ng arasında çalışılmıştır.
2. Kullanılan her bir primer çifti için (*MMP2*, *MMP9*, *TIMP2*, *TIMP3* ve *GAPDH*) üreticinin önerdiği miktarlara göre reaksiyon karışımı hazırlanarak steril 8'li "strip" PZR tüplerine dağıtılır. Reaksiyon karışımı için kullanılan bileşenlerin miktarları Tablo 3.4'te verilmiştir

Tablo 3.4: ddPZR uygulamasında kullanılan reaksiyon karışımı için gereken bileşen miktarları.

İçerik	Miktar (µl)
"QX200TM ddPCRTM EvaGreen® Supermix"	10,5
Primer F (2.5 µM)	1.6 (Son konsantrasyon 200nM)
Primer R (2.5 µM)	0.8 (Son konsantrasyon 100nM)
cDNA	Örneğe göre değişken
Nükleazsız Su	Örneğe göre değişken
Toplam	21

3. Reaksiyon karışımlarını içeren 8'li "strip" tüplerin içerisine daha önce konsantrasyonları ayarlanmış cDNA örnekleri sırasıyla eklenir ve pipetle tüp içerisindeki tüm sıvının karışması sağlanır. Ancak köpük oluşturulmamaya dikkat edilir. Her primer için cDNA örneği içermeyen "No Template Control"ler (NTC) hazırlanır.
4. "Strip" tüpler kısa santrifüj edilerek tüplerin alt kısmındaki köpükler yok edilir.
5. Damlacıkların oluşabilmesi için 70 µl "Droplet Generator Oil", 8 kuyucuklu "DG8 cartridge" kartuşun "yağ" kuyucuğuna eklenir.
6. Hazırlanmış olan PZR örnekleri 8 kanallı pipet yardımı ile "DG8 cartridge" ın "sample" kuyusuna 21 µl olacak şekilde eklenir.
7. ddPZR reaksiyonunda gerekli damlacıkların oluşturulabilmesi için örneklerin yüklenmiş olduğu "DG8 cartridge", "QX200TM Droplet Generator" cihazına yerleştirilir ve cihaz çalıştırılır.

8. Yaklaşık 2 dakika süren işlem sonucunda “DG8 cartridge”ın “droplets” kuyularında damlacık oluşumu sağlanır.
9. Oluşan damlacıklar 8 kanallı pipet yardımıyla damlacıkların kırılmamasına da dikkat edilerek yavaşça 96 kuyucuklu “plate”e aktarılır.
10. “Plate”in üzeri yöntem için özel geliştirilmiş folyo kağıt ile kapatılır.
11. Folyo kâğıdın tam olarak yapışabilmesi için “plate”, “PX1TM PCR Plate Sealer” (Bio-Rad) cihazına yerleştirilir ve 180 °C’de çalıştırılır. Bu şekilde folyonun “plate” üzerine tam olarak yapışması sağlanır.
12. Üstü kapatılan “plate”, “T100TM Thermal Cycler” (Bio-Rad) cihazına yerleştirilir ve primer bağlanma sıcaklığına uygun olacak şekilde hazırlanmış program (Tablo 3.5) çalıştırılarak reaksiyonun gerçekleşmesi sağlanır.

Tablo 3.5: ddPZR termal döngüsü.

Aşama	Sıcaklık	Süre	Sıcaklık Değişim Süresi “ramp rate”	Döngü Sayısı
Enzim Aktivasyonu	95 ⁰ C	5 dk		1
Denatürasyon	95 ⁰ C	30 sn		39
Bağlanma/Uzaman	*60 ⁰ C	1.25 dk	2 ⁰ C/sn	39
Sinyal Stabilizasyonu	4 ⁰ C	5 dk		1
	90 ⁰ C	5dk		1
Bekleme	4 ⁰ C	∞		1

13. PZR işlemi tamamlandıktan sonra 96 kuyulu “plate”, PZR cihazından çıkarılarak “QX200TM Droplet Reader” cihazına yerleştirilir.
14. Daha önce cihaza tanıtılan örnek dosyasına göre (kuyucuktaki örnek no, çalışılan gen bilgisini içeren) cihazın kuyucuklardaki pozitif (hedef cDNA’yı içeren) ve negatif (hedef cDNA’yı içermeyen) damlacıkları okuması sağlanır. Elde edilen verilerin analizi yapılır.

3.8. METİLYASYON SENSİTİF YÜKSEK ÇÖZÜNÜRLÜKLÜ ERİME EĞRİSİ ANALİZİ İÇİN PRİMER TASARIMI

Metilasyon Sensitif Yüksek Çözünürlüklü Erime (MS-HRM) uygulaması için kullanılacak primerlerin tasarımında literatüre uygun olarak aşağıdaki kriterler kullanılmıştır [73].

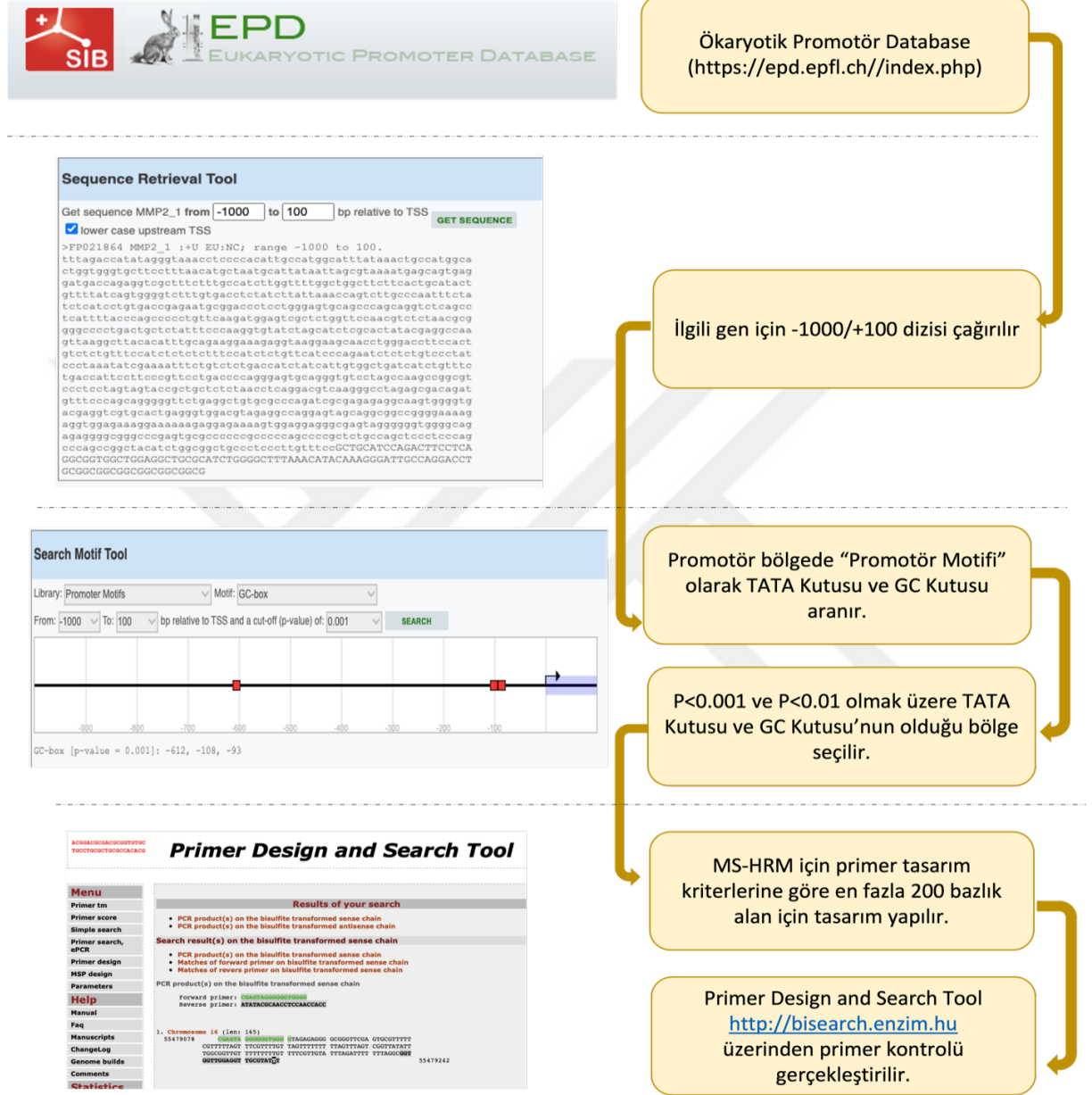
1. Her bir primer, mümkün olduğunca 5' ucuna yakın bir ya da iki adet CpG içermelidir. Bu şekilde metillenmemiş zincirin lehine olan PZR yanlılığı önlenmiş olur.
2. Her bir set için primerlerin erime sıcaklıkları birbirine yakın olmalıdır.
3. Primerlerin 3' ucu kalıp zincirde CpG dışında kalan C'ye komplementer olan bir ya da iki adet T içermelidir. Bu şekilde çoğaltmanın bisülfite çevrimi yapılmış DNA üzerinden gerçekleştiği garanti altına alınmış olur.
4. Çoğaltılacak bölgenin uzunluğu kompleks erime profillerinden kaçınılması için 100 baz çifti dolaylarında olmalıdır.

MS-HRM uygulamasında hasta ve kontrol grubu örneklerinin bisülfite çevrimi oranının kontrol edilebilmesi için ayrıca bisülfite dönüşümü yapılmamış DNA dizisine göre tasarlanmış olan ikinci bir *MMP9* primeri de çalışmaya dahil edilmiştir. Metilasyon düzeni belirlenecek *MMP2*, *MMP9*, *TIMP2* ve *TIMP3* genleri için tasarlanan primerler Tablo 3.6'da verilmiştir.

Tablo 3.6: Hedef genlerin primer dizileri, T_m dereceleri, oluşacak ürün boyları ve ürünlerin içerdiği CpG sayısı ve promotör motifleri.

Gen Adı	Oligonükleotit Dizisi (5'-3')	T _m (°C)	Ürün Boyutu (bp)	Bölgedeki CpG Sayısı	Bölgedeki Promotör Motifi
C-MMP2	F1: CGAGTAGGGGGGTGGGGT	62.41	167	8	GC Kutusu
	R1: CCATATACGCAACCTCCAACCAC	61.54			
	F2: TAGGCGGTGGTTGGAGGT	60.20	126	11	GC Kutusu
	R2: CCCGACTCAACGACTCATAAT	57.56			
C-MMP9	F: AGGACGGGTTTTTGGTATA	53.28	96	6	-
	R: CGCCCTTACCCAAAAAC	53.25			
C-TIMP2	F1: GTTAGGTCGGGTATAATAAAAG	51.88	147	10	GC Kutusu
	R1: CCGAACCGCAATTTTATTAC	53.26			TATA
	F2: TCGCGTTGAGTTAGGGATTT	57.25	126	14	Kutusu
	R2: AAAACTTCCCGCACCACCTA	59.52			GC Kutusu
C-TIMP3	F: AATGCGGTTTTGTTATTGGTTTGA	58.64	126	10	GC Kutusu
	R: CGCCGCCTACCTACTACC	58.96			TATA Kutusu
N-MMP9	F: GAGACGGGTATCCCTTCGAC	59.33	107	-	
	R: CGACCACAACCTCGTCGTCGT	62.71			

MS-HRM analizinde kullanılmak üzere yapılan primer tasarımı için takip edilen süreç Şekil 3.4'te verilmiştir.



Şekil 3.4: MS-HRM analizi için primer tasarımı akış şeması¹.

¹Hedef genlerin promotör bölgeleri <https://epd.epfl.ch//index.php> ("Eukaryotic Promoter Database") adresi üzerinden tespit edilir. Her hedef gen için taranacak alan transkripsiyon başlangıç bölgesine göre -1000/+100 olacak şekilde sınırlandırılır. "Promotör motifi ara" aracı kullanılarak hedef bölgede TATA kutusu ve GC kutusu aranır. Motiflerin olasılık değerleri $p<0.01$ ve $p<0.001$ olarak kontrol edilir. Her iki motifin de olduğu bölge üzerine yoğunlaşarak en fazla 200 bazlık bir ürün için primer tasarımı yapılır. Tasarlanan primer çiftlerinin <http://bisearch.enzim.hu> ("Primer Design and Search Tool") adresinden bisüflit çevrimi yapılmış dizi üzerinde kontrolü sağlanır.

3.9. METİLASYON POZİTİF VE NEGATİF KONTROLÜ OLARAK “JURKAT” HÜCRELERİNİN BÜYÜTÜLMESİ

3.9.1. Metilasyon Pozitif Kontrolü Olarak “*Jurkat*” Hücrelerinin Büyütülmesi

Metilasyon pozitif kontrolü olarak kullanılacak “*Jurkat*” hücreleri aşağıda verilen protokol basamakları takip edilerek büyütülmüştür.

1. Isı ile inaktive edilmiş %10 FBS (Fetal Bovine Serum), %1 Pen/Strep (Penisilin/Streptomisin) içeren “RPMI 1640 plus” besi yerinden 5 ml alınarak 25 cm² lik hücre “flask”ına transfer edilir.
2. Hücre sayısı 3.22×10^6 hücre/ml , canlılık oranı %96 olarak ölçülen “*Jurkat*” hücre kültüründen 250 µl alınarak yeni besi yerinin üzerine eklenir.
3. “Flask”ın kapağı sıkıştırılmadan kapatılır ve %5 CO₂ içeren atmosferde 37°C sıcaklıkta inkübasyona bırakılır.

3.9.2. Metilasyon Negatif Kontrolü Olarak “*Jurkat*” Hücrelerine 5-Aza-2'-deoksisitidin Uygulaması

Jurkat hücrelerinin büyümesi sırasında DNA’da bulunan metil gruplarının uzaklaştırılması için 5-Aza-2'-deoksisitidin (DAC) uygulaması yapıldı. Uygulama için uygun konsantrasyonun belirlenebilmesi adına literatür taraması yapıldı. Ticari firmalar tarafından “negatif kontrol” olarak kullanıma sunulan “5-Aza-dc Treated *Jurkat* Genomic DNA-New England Biolabs” protokolü uyarınca 2 µM ve 4µM son konsantrasyon olmak üzere 7 gün boyunca uygulama yapıldı.

3.9.2.1. 5-Aza-2'-deoksisitidin Solüsyonunun Hazırlanması

1. 5mg stok DAC ile, üretici tarafından önerildiği üzere dimetil sülfoksit (DMSO) kullanılarak 22 mM olacak şekilde D1 ana stok hazırlanır.
2. D1 stok kullanılarak 1 mM’lık D2 stok tüpleri hazırlanır. Tüm seyreltmeler sırasında çözücü olarak DMSO kullanılır. 1mM’lık solüsyon tek kullanımlık olacak şekilde 20’şer µL olarak PZR tüplerine paylaştırıldı ve -20°C’ye kaldırılır.
3. DAC kararsız bir molekül olduğu için büyütülmekte olan “*Jurkat*” hücrelerine her gün DAC eklemesi yapılır.

3.9.2.2. “Jurkat” Hücrelerine Günlük 5-Aza-2'-deoksisitidin Uygulaması

1. Isı ile inaktif edilmiş %10 “Fetal Bovine Serum” (FBS), %1 “Pen/Strep” (Penisilin/Streptomisin) içeren “RPMI 1640 plus” besi yerinden 5 ml alınarak 25 cm² lik hücre “flask”ına transfer edilir.
2. Hücre sayısı 3.22 X 10⁶ hücre/ml, canlılık oranı %96 olarak ölçülen “Jurkat” hücre kültüründen 250 µl alınarak yeni besi yerinin üzerine eklenir.
3. Hücrelerin üzerine Tablo 3.7’de verilen miktarda DAC eklemesi yapılır.

Tablo 3.7: Negatif kontrol olarak kullanılacak “Jurkat” Hücrelerine eklenen DAC miktarları ve elde edilen son konsantrasyonlar.

Başlangıç DAC Konsantrasyonu	“Jurkat” Hücre Kültürüne Eklenen DAC Miktarı	Son Konsantrasyon (5ml besi yeri içerisinde)
1mM	10 µl	2 µM

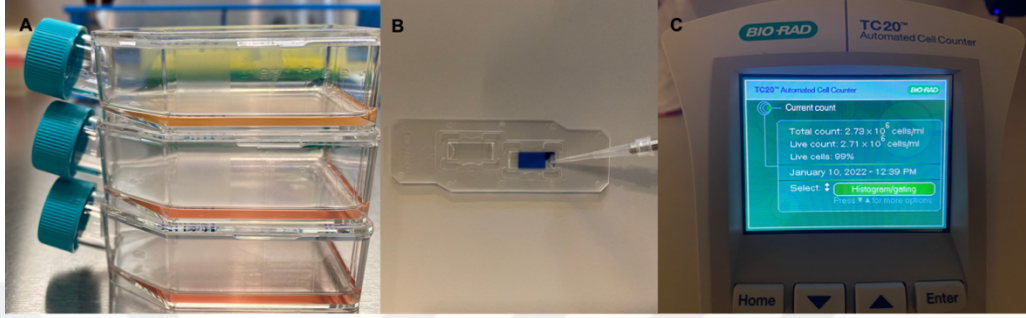
4. “Flask”ın kapağı sıkıştırılmadan kapatıldı ve %5 CO₂ içeren atmosferde 37°C sıcaklıkta inkübasyona bırakılır.
5. 20-22 saatte bir DAC uygulamasının tekrarlanması için hücre “flask”ı inkübatörden çıkarılır. Tablo 3.7’de verilen uygun miktarda DAC besi yerinin üzerine eklenir.
6. “Flask”ın kapağı sıkıştırılmadan kapatılır ve %5 CO₂ içeren atmosferde 37°C sıcaklıkta inkübasyona bırakılır.
7. DAC ekleme işlemi 7 gün süre ile devam ettirilir.

3.9.3. Metilasyon Pozitif ve Negatif Kontrol “Jurkat” Hücrelerinin DNA İzolasyonu Öncesi Canlılık ve Miktar Tayini

Hücre kültüründe büyütülen (Şekil 3.5A) “Jurkat” hücrelerinin DNA izolasyonu öncesinde canlılık ve miktar tayinleri “TC 20 Automated Cell Counter (Bio-Rad)” cihazında yapıldı. Aşağıdaki protokol takip edildi.

1. 10 µl hücre örneği PZR tüpüne alınır. Üzerine 10 µl boyar madde olarak “Trypan blue” eklendi ve pipet yardımıyla karıştırılır.

2. Hazırlanan hücre-boya karışımından 10 µl alınarak “Dual-chamber”ın A kuyucuğuna yavaşça eklenir (Şekil 3.5B).
3. “Dual-chamber”ın A yönü cihazın yuvasına denk gelecek şekilde takıldı ve hücrelerin sayımı gerçekleştirilir (Şekil 3.5C).



Şekil 3.5: “Jurkat” hücrelerinin canlılık ve miktar tayini. A: “Jurkat” hücre kültürü. B: Hücre-boya karışımının “Dual-Chamber”a alınması. C: Hücre sayımının gerçekleştirilmesi.

3.10. AORT DAMAR DOKUSU VE “JURKAT” HÜCRE KÜLTÜRÜNDEN DNA İZOLASYONUNU

Aort damar dokusu ve “Jurkat” hücrelerinden DNA izolasyonu için “QIAamp DNA Mini Kit” kullanılmıştır. İzolasyon aşamalarında kitin önerdiği protokol takip edilmiştir.

3.10.1. Aort Damar Dokusundan DNA İzolasyonu

1. Aort dokusu 25mg olacak şekilde ince parçalar halinde steril bistüri ile kesilip 1.5 ml’lik tüpe alınır.
2. Üzerine 180 µl “Buffer ATL” ve 20 µl “Proteinaz K” eklenir. “Vorteks” yapıldıktan sonra 56°C’de 3 saat bekletilir.
3. Bekleme süresinin sonunda tüpler kapakta oluşabilecek damlacıkların giderilmesi için 10 saniye “spin” edilir.
4. 200 µl “Buffer AL” eklenir. 15 saniye “vorteks” ile karıştırılır.
5. 70°C’de 10 dakika bekletilir. Kapakta oluşabilecek damlacıkların giderilmesi için 10 saniye “spin” edilir.

6. 200 µl etanol (%96-%100) eklenir. 15 saniye “vorteks” ile karıştırılır. Kapakta oluşabilecek damlacıkların giderilmesi için 10 saniye “spin” edilir.
7. Oluşan karışım “QIAamp Mini spin column”a transfer edilir. 6000 g’de 1 dakika santrifüj edilir. Toplama tüpü ve içerisindeki solüsyon atılır.
8. “QIAamp Mini spin column” yeni bir toplama tüpüne takılır ve filtrenin üzerine 500 µl “Buffer AW1” eklenir. 6000 g’de 1 dakika santrifüj edilir. Toplama tüpü ve içerisindeki solüsyon atılır.
9. “QIAamp Mini spin column” yeni bir toplama tüpüne takılır ve filtrenin üzerine 500 µl “Buffer AW2” eklenir. 20.000 g’de 3 dakika santrifüj edilir. Toplama tüpü ve içerisindeki solüsyon atılır.
10. “QIAamp Mini spin column” yeni bir toplama tüpüne takılır. “Buffer AW2” taşınmasını engellemek için filtre boş bir şekilde 1 dakika yüksek hızda santrifüj edilir.
11. “QIAamp Mini spin column” yeni bir 1.5 ml’lik tüpe takılır. 100 µl “Buffer AE” eklenir. Oda sıcaklığında 1 dakika beklenir. 6000 g’de 1 dakika santrifüj edilerek DNA elde edilir.
12. “Nanodrop” cihazında yapılacak miktar tayini için 2 µl ayrıldıktan sonra kalan DNA daha sonraki aşamalarda kullanılıncaya kadar -20°C’ye kaldırılır.

3.10.2. “Jurkat” Hücre Kültüründen DNA İzolasyonu

1. “Jurkat” hücreleri büyütüldükleri “flask”tan serolojik pipet yardımı ile alınarak 15ml’lik falkon tüpe alınır.
2. 1500 rpm’de 5 dakika santrifüj edilir. Alttaki pelete dokunmadan besiyeri atılır.
3. Hücre peletinin üzerine 200 µl PBS solüsyonu eklenerek karıştırılır.
4. 1.5ml’lik tüpe 20µl “Proteinaz K”, PBS ile karıştırılmış 200 µl hücre solüsyonu ve 200 µl “Buffer AL” eklenir. 15 saniye “vorteks” ile karıştırılır.
5. 5. basamaktan itibaren “3.9.1 Aort Damar Dokusundan DNA İzolasyonu” protokolü takip edilir.

3.10.3. İzole Edilen DNA'ların Kalite ve Miktar Tayini

Aort damar dokusu ve “*Jurkat*” hücre kültüründen elde edilen DNA'nın kalite ve miktar tayini “*Nanodrop*” cihazında yapılmıştır. Her ölçüm için kullanılan DNA miktarı 1.5 µl'dir. Ölçümü yapılan her örneğin miktarı ng/ µl olarak belirlenmiştir. Kalite tayini için ise A260/A280 ve A260/A230 değerleri kaydedilmiştir.

3.11. METİLASYON POZİTİF KONTROLÜ OLAN “*JURKAT*” HÜCRLERİNE “CPG METHYLTRANSFERASE-M.SSSI” UYGULAMASI

Metilasyon düzeni analizinde pozitif kontrol olarak kullanılacak örnekler “*CpG Methyltransferase (M. SssI)*” uygulaması ile elde edildi. DNA'da bulunan tüm CpG noktalarının herhangi bir ayırım olmadan metillenmesi için “*CPG Methyltransferase (M. SssI)*” enzimi kullanıldı. Uygulama için aşağıdaki protokol takip edildi.

1. Tablo 3.8'de verilen miktarlarda reaksiyon karışım hazırlanır.
2. Reaksiyonda toplamda 1000ng olacak şekilde 1.87 µl DNA (536ng/µl) 1.5 ml'lik tüpe eklenir.
3. 1. Basamakta hazırlanan karışım DNA örneğinin üzerine eklenir ve Tablo 3.9'da verilen sürelerle uygun olarak inkübe edilir.

Tablo 3.8: “*CPG Methyltransferase*” uygulamasında kullanılan reaksiyon karışımı için gereken bileşen miktarları.

İçerik	Miktar (µl)
“ <i>Supplied Methyltransferase Reaction Buffer (10X)</i> ”	5.00
“ <i>S-adenosylmethionine</i> ” (SAM-1600 µM)	10.00
DNA	Örneğe göre değişken
“ <i>M.SssI MethylTransferase</i> ”	1.00 (4U)
Nükleaz içermeyen su	Örneğe göre değişken
Toplam	50

Tablo 3.9: “*CpG Methyltransferase*” uygulamasında uygulanan inkübasyon süreleri.

Sıcaklık	Süre
37°C	3 saat
65°C	20 dakika

4. İnkübasyon süresinin sonunda tüpler kapakta oluşabilecek damlacıkların giderilmesi için 10 saniye “spin” edilir. Daha sonra kullanılmak üzere -20°C’ye kaldırılır.

3.12. HASTA VE KONTROL GRUBU ÖRNEKLERİNE BİSÜLFİT MODİFİKASYON İŞLEMİ

Yapılan işlem sonrasında çalışma ve kontrol grubu örneklerinden elde edilen DNA’nın sodyum bisülfid ile inkübe edilmesi sonucu metillenmeyen sitozinlerin urasile dönüşmesi (C→U) ve metillenen sitozinlerin değişmeden kalması sağlanmıştır. Bisülfid modifikasyonu için “EZ DNA Methylation Gold Kit” kullanılmıştır. İşlem öncesinde çalışılacak tüm örneklerin DNA’sı 25ng/μl olacak şekilde sulandırılmıştır. Kit sağlayıcının önerdiği protokol takip edilmiştir.

1. 130 μl “CT Conversion Buffer” PZR tüpünün içerisine aktarılır. Üzerine 20 μl DNA (25ng/μl) eklendikten sonra pipet yardımı ile karıştırılır.
2. Hazırlanan tüpler PZR cihazına yerleştirilir ve Tablo 3.10’daki programa göre inkübe edilir.

Tablo 3.10: Bisülfid modifikasyonu işlemi termal döngüsü.

Sıcaklık	Süre	Döngü Sayısı
98°C	10 dk	1
64°C	2.5 sa	1

3. “Zymo-Spin IC Column” toplama tüpüne yerleştirilir ve üzerine 600 μl “M-Binding Buffer” eklenir.
4. 2. Aşamada hazırlanan örnek inkübasyon süresinin sonunda “M-Binding Buffer” içeren “Zymo-Spin IC Column” a eklenir. Pipet yardımı ile karıştırılır.
5. 10.000 g’de 30 saniye santrifüj edilir. Toplama tüpündeki sıvı atılır.
6. Filtreye 100 μl “M-Wash Buffer” eklenir. 10.000 g’de 30 saniye santrifüj edilir. Toplama tüpündeki sıvı atılır.
7. 200 μl “M-Desulphonation Buffer” eklenir ve oda sıcaklığında 20 dakika inkübe edilir.
8. 10.000 g’de 30 saniye santrifüj edilir. Toplama tüpündeki sıvı atılır.

9. 200 µl “*M-Wash Buffer*” eklenir. 10.000 g’de 30 saniye santrifüj edilir. Toplama tüpündeki sıvı atılır.
10. 9. Basamak tekrarlanır.
11. Filtre içeren kolon 1.5 ml’lik tüpe yerleştirilir. 10 µl “*Elution Buffer*” eklenir. Yüksek hızda 30 saniye santrifüj edilerek C-T dönüşümü yapılmış DNA elde edilir.
12. Daha sonra kullanılmak üzere -20⁰ C’ye kaldırılır.

3.13. POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU İLE HEDEF BÖLGENİN ÇOĞALTILMASI

MS-HRM analizi için tasarlanan primerlerin en uygun bağlanma sıcaklıklarının bulunabilmesi için normal PZR kuruldu ve sonuçlar agaroz jel elektroforezinde kontrol edildi. PZR reaksiyonu için “*T100 Thermal Cycler-(Bio-Rad)*” cihazı kullanıldı. Agaroz jel elektroforezi uygulaması için “*Cleaver Scientific CS-500*” güç kaynağı ve “*Quantum Wilbert Lourmat*” görüntüleme sistemi kullanıldı.

MS-HRM analizinde kullanılacak C-MMP2, C-MMP9, C-TIMP2, C-TIMP3 ve N-MMP9 primerleri için yapılan PZR’de kullanılan bileşenler ve miktarları Tablo3.11’de verilmiştir. PZR reaksiyonu için bisülfıt modifikasyon işlemi uygulanmış DNA örnekleri kullanılmıştır.

Tablo 3.11: PZR uygulamasında kullanılan reaksiyon karışımı için gereken bileşen miktarları.

İçerik	Miktar (µl)
“ <i>DreamTaq PCR Master Mix (2X)</i> ”	10
Primer F (2.5 µM)	2
Primer R (2.5 µM)	2
DNA (CT dönüşümü yapılmış)	1
Nükleazsız Su	Örneğe göre değişken
Toplam	20

Primer bağlanma sıcaklığı için kullanılan termal döngü programı Tablo 3.12’de verilmiştir

Tablo 3.12: ddPZR termal döngüsü.

Aşama	Sıcaklık	Süre	Döngü Sayısı
Ön İnkübasyon	94 ⁰ C	3 dk	1
Denatürasyon	94 ⁰ C	40 sn	39
Bağlanma	53-60 ⁰ C	40 sn	
Uzama	72 ⁰ C	50 sn	
Son Uzama	72 ⁰ C	5dk	1
Bekleme	4 ⁰ C	∞	1

PZR sonucunda elde edilen ürünlerin değerlendirilmesi ve görüntülenmesi için agaroz jel elektroforezi kullanılmıştır. Agaroz jelin görüntüleme işlemleri için “*Quantum Wilbert Lourmat*” görüntüleme sistemi ve “*Quantum STS*” yazılımı kullanılmıştır.

3.14. METİLASYON SENSİTİF YÜKSEK ÇÖZÜNÜRLÜKLÜ ERİME ANALİZİ UYGULAMASI

Seçilen hedef genlerin promotör bölgelerindeki metilasyon düzeninin belirlenmesi için MS-HRM yöntemi uygulanmıştır. Gerekli protokollerin uygulanması için “*Roche*” marka “*LightCycler® 96*” cihazı kullanılmıştır. Elde edilen verilerin analizi “*LightCycler® 96 Application Software Version 1.1*” yazılımı ile yapılmıştır. Kit sağlayıcının önerdiği protokol takip edilerek uygulama yapılmıştır. Yapılan uygulama aşamaları aşağıda verilmiştir.

1. Kullanılan her bir primer çifti için (C-MMP2, C-MMP9, C-TIMP2, C-TIMP3) üreticinin önerdiği miktarlara göre reaksiyon karışımı hazırlanarak 96 kuyulu “*plate*”e aktarılır (Tablo 3.13).

Tablo 3.13: MS-HRM uygulamasında kullanılan reaksiyon karışımı için gereken bileşen miktarları.

İçerik	Miktar (µl)
“ <i>HOT FIREPol® EvaGreen® HRM Mix</i> ”	2
Primer F (2.5 µM)	0.5
Primer R (2.5 µM)	0.5
DNA (CT dönüşümü yapılmış)	1
Nükleazsız Su	6
Toplam	10

2. Bisülfıt modifikasyon işlemi uygulanmış DNA örneklerinden 1µl eklenir ve pipetle “plate” kuyusundaki tüm sıvının karışması sağlanır. Çalışılan her primer için DNA örneği içermeyen NTC (“No Template Control”)’ler hazırlanır.
3. “Plate” in üzerine dikkatlice “Sealing Film” yapıştırılır. Kuyucuklar arasında hava kabarcığı kalmamasına dikkat edilir.
4. Kuyulardaki tüm sıvının tabana çökmesi için “plate” çok kısa santrifüj edilir.
5. Hazırlanan “plate”, “LightCycler® 96” cihazına yerleştirilerek Tablo 3.14’te verilen termal döngü başlatılır.

Tablo 3.14: MS-HRM termal döngüsü.

Aşama	Sıcaklık	Süre	Döngü Sayısı
Ön İnkübasyon	95°C	12 dk	1
Denatürasyon	95°C	15 sn	45
Bağlanma	60°C	20 sn	
Uzama	72°C	20 sn	
Ön İnkübasyon	95°C	60 sn	1
Ön İnkübasyon	75°C	60 sn	1
Erime (Melting)	95°C	60 sn	1
	40°C	60 sn	1
	65°C	1 sn	1
	97°C	5 sn	1
Bekleme	4°C	∞	1

6. Reaksiyon tamamlandıktan sonra oluşan veri taşınabilir bellek yardımı ile cihazdan alınır ve “LightCycler® 96 Application Software Version 1.1” ile analiz edilir.

3.14.1. Metilasyon Negatif (Metillenmemiş) Kontrolünün CpG Metillenme Yüzdesinin Kontrolü

Çalışma grubunun MS-HRM analizinde metilasyon negatif (metillenmemiş) kontrolü olarak kullanılacak DNA’nın metilasyon düzeni, aşağıdaki örneklerle birlikte hazırlanan MS-HRM uygulaması ile kontrol edilmiştir.

- a. “CpG Methyltransferase (*M. SssI*)” uygulaması yapılmış DNA (Metillenmiş Kontrol)
- b. 2 µM DAC uygulaması yapılmış DNA (Metillenmemiş Kontrol)
- c. Bağımsız negatif kontrol (MS-HRM analizinde metillenmediği gösterilmiş)

- d. 1:1 oranda metillenmiş ve bağımsız negatif kontrol karışımı (a ve c)
- e. DNA içermeyen kontrol (NTC)

3.14.2. Metilasyon Pozitif (Metillenmiş) Kontrolünün CpG Metillenme Yüzdesinin Kontrolü

Çalışma grubunun MS-HRM analizinde pozitif kontrol (%100 metillenmiş) olarak kullanılacak DNA'nın metilasyon düzeyi, aşağıdaki örneklerle birlikte hazırlanan MS-HRM uygulaması ile kontrol edilmiştir.

- a. “*CPG Methyltransferase (M. SssI)*” uygulaması yapılmış DNA (Metillenmiş Kontrol)
- b. “*CPG Methyltransferase (M. SssI)*” uygulaması yapılmamış DNA
- c. 2 µM DAC uygulaması yapılmış DNA (Metillenmemiş Kontrol)
- d. 1:1 oranda metillenmiş ve metillenmemiş kontrol karışımı (a ve c)
- e. DNA içermeyen kontrol (NTC)

3.14.3. MS-HRM Analizi ile Metilasyon Standartlarının Elde Edilmesi

MS-HRM analizi için hedef genlerin primerleri kullanılarak her gen için ayrı metilasyon düzeyi standardı elde edilmiştir. MS-HRM analiziyle elde edilen standartta aşağıdaki örnekler kullanılmıştır.

- a. “*CPG Methyltransferase (M. SssI)*” uygulaması yapılmış DNA (Metillenmiş Kontrol)
- b. 2 µM DAC uygulaması yapılmış DNA (Metillenmemiş Kontrol)
- c. 1:1 oranda metillenmiş ve metillenmemiş kontrol karışımı (a ve c)
- d. DNA içermeyen kontrol (NTC)

3.14.4. Hasta ve Kontrol Grubunda Metilasyon Sensitif Yüksek Çözünürlüklü Erime Uygulaması

Aort damar dokusunda yapılacak MS-HRM analizi için her bir primer bağlanma sıcaklığına göre çalışılmıştır. Her gen için hazırlanan reaksiyonda çalışma grubu (HD1-HD10, KD1-KD10) örneklerinin yanı sıra metilasyon düzeyi bilinen “metilasyon kontrol örnekleri” de çalışılmıştır. Pozitif ve negatif metilasyon kontrol örnekleri farklı oranlarda karıştırılarak ara dilüsyonlar elde edilmiştir. Bu sayede çalışma gruplarında elde edilebilecek farklı metilasyon yüzdelерinin kıyaslanabilmesi sağlanmıştır. Metilasyon kontrolü olarak kullanılacak örnekler şu şekildedir; %100 metillenmiş kontrol, %75 metillenmiş kontrol, %50 metillenmiş kontrol.

4. BULGULAR

4.1. HASTA VE KONTROL GRUBUNUN DEMOGRAFİK ÖZELLİKLERİ

Çalışma grubunun demografik özellikleri TAD Hasta ve kontrol grubu arasında kıyaslanmış ve anlamlı bir fark olup olmadığı araştırılmıştır. Sürekli değişkenler için kullanılan “*Mann Whitney U*” testi ve kategorik değişkenler için kullanılan “*Fisher’s Exact Test*” sonuçları Tablo 4.1’de verilmiştir.

Tablo 4.1: Çalışmada kullanılan hasta ve kontrol grubu örneklerinin genel özellikleri¹

	TAD Grubu	Kontrol Grubu	P değeri
Yaş (Ort±SH)	53.80 ± 3.15	55.10 ± 1.95	0.49
Boy (cm) (Ort±SH)	167.30 ± 2.26	167.60 ± 2.08	0.90
Kilo (kg) (Ort±SH)	84.20± 3.60	80.80± 2.24	0.25
BKI (kg/m²± SH)	30.29 ± 1.67	28.99 ± 1.42	0.39
Sigara İçen (%)	% 60 (n=6)	% 80 (n=8)	0.63
Cinsiyet (Kadın/Erkek) (%)	% 20 (n=2) / % 80 (n=8)	% 20 (n=2)/ % 80 (n=8)	0.99
Hipertansiyon Öyküsü (%)	% 100 (n=10)	% 80 (n=8)	0.47

4.2. MOLEKÜLER ANALİZLER

Hasta ve kontrol grubundan elde edilen aort damar dokusu ve periferik kan örneklerinden RNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Elde edilen RNA miktarının kantitasyonu için “*Nanodrop*” cihazı kullanılmıştır. Hasta ve kontrol grubuna ait ölçümler Tablo 4.2’de verilmiştir.

¹SH: Standart hata, Ort: Ortalama, sürekli değişkenler için “*Mann Whitney U*”, Kategorik değişkenler için “*Fisher’s Exact Test*” kullanılmıştır.

Tablo 4.2: Hasta ve kontrol grubu örneklerinin total RNA “*Nanodrop*” ölçüm sonuçları.

Hasta Grubu				Kontrol Grubu			
Örnek Adı	Konsantrasyon (ng/μl)	260/280	260/230	Örnek Adı	Konsantrasyon (ng/μl)	260/280	260/230
HD1	143.8	2.08	1.69	KD1	24.6	1.99	0.75
HD2	133.2	2.08	1.73	KD2	11.4	2.11	0.12
HD3	137.9	2.06	1.84	KD3	7.2	2.01	0.44
HD4	83.8	2.00	1.01	KD4	26	2.00	0.83
HD5	106.8	1.62	1.23	KD5	5.1	1.84	0.3
HD6	58.4	2.01	1.27	KD6	11.8	1.72	0.1
HD7	198.8	2.07	0.84	KD7	8.3	1.80	0.1
HD8	252.1	2.10	1.8	KD8	4.2	2.03	0.1
HD9	17.2	1.93	0.94	KD9	2.9	2.01	0.2
HD10	119.9	2.06	1.46	KD10	10.4	2.30	0.2
HK1	8.4	1.83	1.02	KK1	6.5	1.96	0.78
HK2	6.8	1.69	1.19	KK2	9.2	1.55	0.4
HK3	11.6	1.53	0.63	KK3	14.3	1.81	0.2
HK4	7.3	1.45	1.01	KK4	12.6	1.94	0.2
HK5	4.7	1.69	1.21	KK5	15.3	1.98	0.33
HK6	3.2	2.03	0.57	KK6	15.4	2.00	0.9
HK7	30.2	1.48	0.67	KK7	26.6	1.94	0.99
HK8	11.4	2.31	0.81	KK8	63	2.01	1.67
HK9	4.6	2.25	0.77	KK9	38.3	1.96	1.47
HK10	13.4	1.62	0.5	KK10	34.1	2.00	1.15

4.2.2. cDNA Sentezi İçin Kullanılan RNA Miktarları

Hasta ve kontrol grubu total RNA’larından cDNA sentezi için “*iScript cDNA Synthesis Kit*” kullanılmıştır. Her örnek için elde edilen total RNA miktarı farklı olduğu için çalışmanın belirli bir standart ile yürütülebilmesi adına doku örnekleri için 200 ng, kan örnekleri için de 100 ng RNA kullanılacak şekilde hesaplama yapılmıştır. Doku ve kan örnekleri için kullanılan RNA miktarları sırasıyla Tablo 4.3 ve Tablo 4.4’te verilmiştir. Kullanılan kitin önerdiği kullanım şartları gereği RNA ve su karışımı için ayrılan miktar maksimum 15 μl olabildiği için, hacim olarak bu miktarda 200 ng’a ulaşamayan örneklerde 15 μl hacimin tamamı RNA örneği olarak alınmıştır.

Tablo 4.3: Hasta ve kontrol grupları aort doku örneklerinin cDNA sentezi için kullanılan RNA miktarları.

Örnek	RNA (ng/ µl)	200 ng RNA için gereken örnek miktarı (µl)	Kullanılan RNA Miktarı (µl)	cDNA'da bulunan RNA miktarı (ng/20ul)
HD1	143.8	1.39	1.39	200.00
HD2	133.2	1.50	1.50	200.00
HD3	137.9	1.45	1.45	200.00
HD4	83.8	2.39	2.39	200.00
HD5	106.8	1.87	1.87	200.00
HD6	58.4	3.42	3.42	200.00
HD7	198.8	1.01	1.01	200.00
HD8	252.1	0.79	0.79	200.00
HD9	17.2	11.63	11.63	200.00
HD10	119.9	1.67	1.67	200.00
KD1	24.6	8.13	8.13	200.00
KD2	11.4	17.54	15	171.00
KD3	7.2	27.78	15	108.00
KD4	26.6	7.52	7.52	200.00
KD5	5.1	39.22	15	76.50
KD6	11.8	16.95	15	177.00
KD7	8.3	24.10	15	124.50
KD8	4.2	47.62	15	63.00
KD9	2.9	68.97	15	43.50
KD10	10.4	19.23	15	156.00

Tablo 4.4: Hasta ve kontrol grupları kan-monosit örneklerinin cDNA sentezi için kullanılan RNA miktarları.

Örnek	RNA (ng/ µl)	200 ng RNA için gereken örnek miktarı (µl)	Kullanılan RNA Miktarı (µl)	cDNA'da bulunan RNA miktarı (ng/20ul)
HK1	6.5	15.38	15	97.50
HK2	5.7	17.54	15	85.50
HK3	5.7	17.54	15	85.50
HK4	5.7	17.54	15	85.50
HK5	6	16.67	15	90.00
HK6	5.3	18.87	15	79.50
HK7	30.2	3.31	3.31	99.96
HK8	15.6	6.41	6.41	100.00
HK9	6.6	15.15	15	99.00
HK10	5.6	17.86	15	84.00
KK1	4.2	23.81	15	63.00
KK2	9.2	10.87	10.87	100.00
KK3	14.3	6.99	6.99	100.00
KK4	12.6	7.94	7.94	100.00
KK5	15.3	6.54	6.54	100.00

Tablo 4.4: Hasta ve kontrol grupları kan-monosit örneklerinin cDNA sentezi için kullanılan RNA miktarları (Devam)

KK6	15.4	6.49	6.49	100.00
KK7	26.6	3.76	3.76	100.00
KK8	63	1.59	1.59	100.00
KK9	38.3	2.61	2.61	100.00
KK10	34.1	2.93	2.93	100.00

4.2.3. ddPZR Sonucunda Elde Edilen Değerler ve Sonuçların Normalizasyonu

Gen anlatım analizi yapılacak hedef genlerin ddPZR sonucunda elde edilen anlatım değerleri referans (*GAPDH*) bir gen kullanılarak normalize edilmiştir. *MMP2*, *MMP9*, *TIMP2*, *TIMP3* genlerine ait ddPZR verisinin normalizasyonu için hedef genlerin anlatım değeri aynı genin *GAPDH* anlatım değerine bölünmüştür. Hedef genlerin normalize edilmemiş ve normalize edilmiş anlatım değerleri sırası ile Tablo 4.5 ve Tablo 4.6’da verilmiştir.

Tablo 4.5: ddPZR sonucunda elde edilen normalize edilmemiş anlatım değerleri.

	Gen anlatım değeri (kopya/μl)				
	GAPDH	MMP2	TIMP2	MMP9	TIMP3
HD1	600.235986	13.830716	187.014246	1.271429	0.073955
HD2	860.562695	3.344076	50.830884	5.040000	0.065788
HD3	714.716162	11.844111	151.883228	38.200000	0.077982
HD4	374.724585	6.738660	128.967737	44.800000	0.052251
HD5	1294.657715	35.065997	458.110938	20.833333	0.076545
HD6	507.424805	5.515221	101.650934	61.400000	0.054256
HD7	251.234961	3.409550	44.357367	11.125000	0.076865
HD8	91.545001	4.867786	28.783762	14.080000	0.169116
HD9	67.600000	0.146667	3.460670	0.266667	0.042381
HD10	433.984766	7.776879	103.284253	28.000000	0.075296
HK1	37.540424	0.000000	0.386357	0.072000	0.000000
HK2	12.092784	0.154463	0.110188	0.000000	1.401810
HK3	20.349146	0.072290	0.427676	0.003600	0.169031
HK4	0.047531	0.000000	0.018500	0.000000	0.000000
HK5	14.109386	0.000000	6.650000	0.010400	0.000000
HK6	23.655821	0.121986	0.925192	0.017600	0.131850
HK7	47.462582	0.012750	6.391214	0.008333	0.001995
HK8	169.097607	0.133833	13.337000	0.028000	0.010035
HK9	13.118948	0.068096	0.396292	0.010400	0.171833
HK10	4.814343	0.000000	0.086445	0.008800	0.000000
KD1	121.932800	2.258000	46.877594	3.840000	0.048168
KD2	174.508386	5.729237	72.860925	19.800000	0.078632

Tablo 4.5: ddPZR sonucunda elde edilen normalize edilmemiş anlatım değerleri (Devamı)

KD3	94.271234	0.687119	16.127490	5.380000	0.042605
KD4	36.231079	0.893704	21.018000	4.680000	0.042521
KD5	32.820605	0.173163	13.187464	16.280000	0.013131
KD6	44.427539	0.452731	21.197464	4.966667	0.021358
KD7	47.326202	0.676295	21.560449	13.600000	0.031367
KD8	38.333333	1.333333	19.833333	0.000000	0.067227
KD9	55.970282	2.090231	22.886858	15.733333	0.091329
KD10	24.231993	0.055344	1.641259	3.460000	0.033720
KK1	12.671683	0.152647	0.907843	0.000000	0.168142
KK2	109.268164	0.000000	7.110198	0.021600	0.000000
KK3	288.455664	0.000000	23.329942	0.120000	0.000000
KK4	32.550000	0.000000	0.463333	0.830000	0.000000
KK5	91.917920	0.000000	14.997016	0.080000	0.000000
KK6	113.698315	0.003314	18.850637	0.030000	0.000176
KK7	90.955387	0.003695	7.183743	0.238462	0.000514
KK8	390.000000	0.014436	56.614217	0.155000	0.000255
KK9	65.946948	0.000000	16.500000	0.200000	0.000000
KK10	60.435527	0.000000	3.395968	0.044706	0.000000

Tablo 4.6: MMP2, TIMP2, MMP9 ve TIMP3 genlerine ait normalize edilmiş anlatım değerleri.

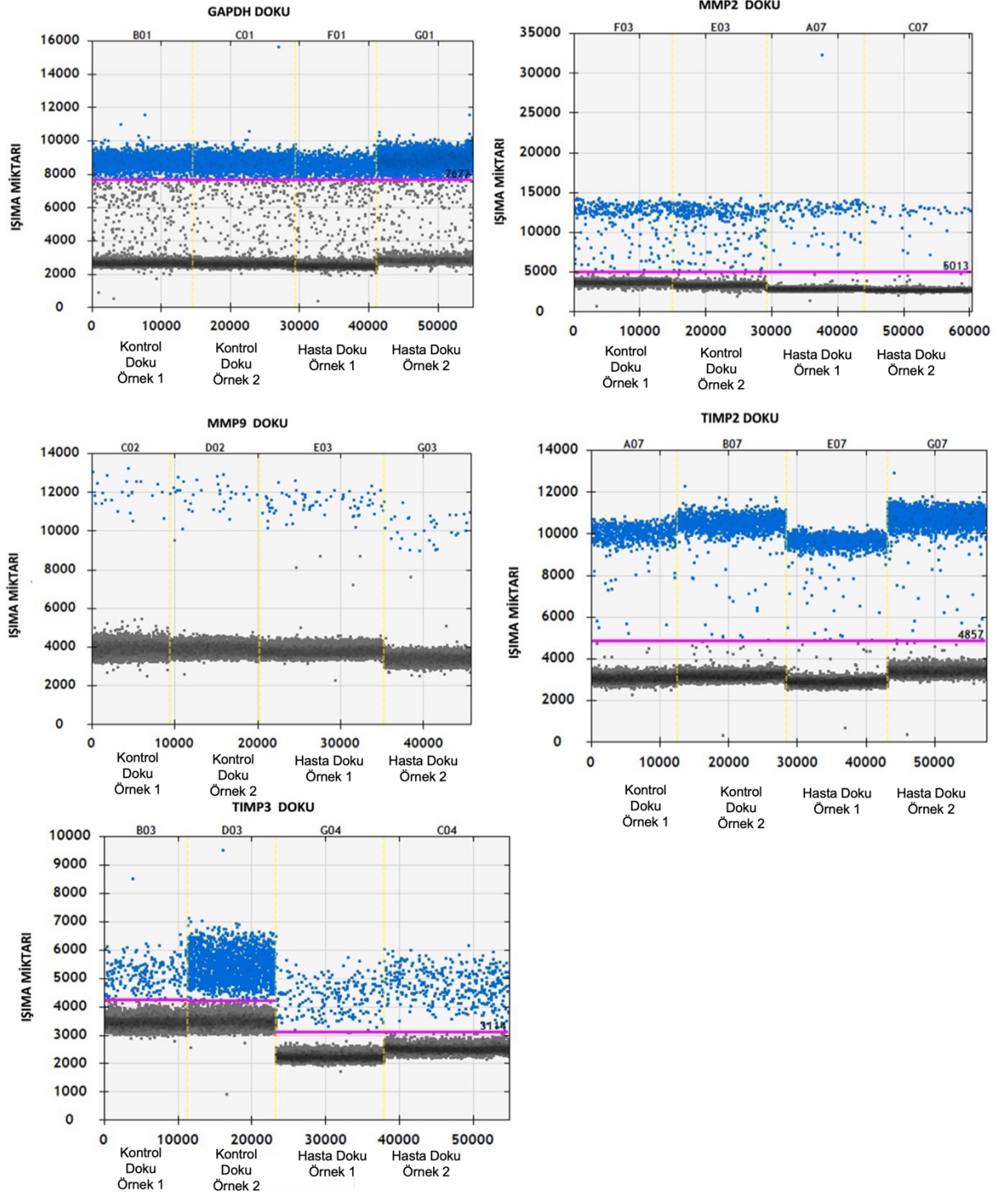
	Gen anlatım değeri (kopya/μl)			
	MMP2	TIMP2	MMP9	TIMP3
HD1	0.023042	0.311568	0.002432	0.002118
HD2	0.003886	0.059067	0.000496	0.005857
HD3	0.016572	0.212508	0.000289	0.053448
HD4	0.017983	0.344167	0.000640	0.119554
HD5	0.027085	0.353847	0.002884	0.016092
HD6	0.010869	0.200327	0.010110	0.121003
HD7	0.013571	0.176557	0.000823	0.044281
HD8	0.053174	0.314422	0.003641	0.153804
HD9	0.002170	0.051193	0.012327	0.003945
HD10	0.017920	0.237991	0.001966	0.064518
HK1	0.000000	0.010292	0.009412	0.001918
HK2	0.012773	0.009112	0.003369	0.000000
HK3	0.003553	0.021017	0.005096	0.000177
HK4	0.000000	0.389222	0.000000	0.000000
HK5	0.000000	0.471317	0.010753	0.000737
HK6	0.005157	0.039111	0.001301	0.000744
HK7	0.000269	0.134658	0.000843	0.000176
HK8	0.000791	0.078872	0.002665	0.000166
HK9	0.005191	0.030208	0.027632	0.000793

Tablo 4.6: *MMP2*, *TIMP2*, *MMP9* ve *TIMP3* genlerine ait normalize edilmiş anlatım değerleri (Devamı)

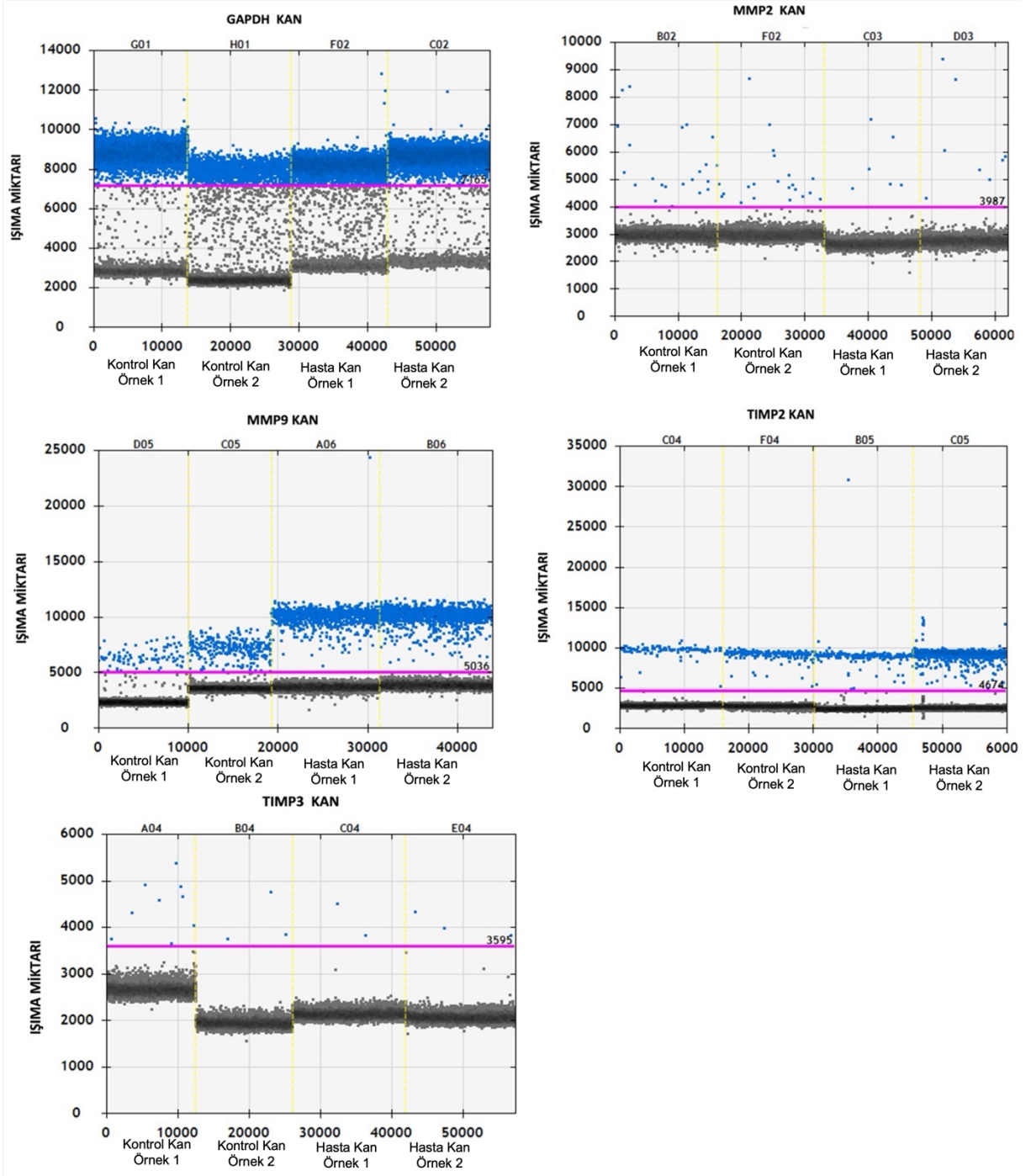
HK10	0.000000	0.017956	0.005385	0.001828
KD1	0.018518	0.384454	0.002296	0.031493
KD2	0.032831	0.417521	0.004279	0.113462
KD3	0.007289	0.171075	0.001061	0.057069
KD4	0.024667	0.580110	0.010672	0.129171
KD5	0.005276	0.401804	0.031891	0.496030
KD6	0.010190	0.477124	0.005552	0.111793
KD7	0.014290	0.455571	0.003099	0.287367
KD8	0.034783	0.517391	0.016522	0.000000
KD9	0.037345	0.408911	0.009172	0.281102
KD10	0.002284	0.067731	0.003714	0.142786
KK1	0.012046	0.071643	0.013416	0.000000
KK2	0.000000	0.065071	0.008054	0.000198
KK3	0.000000	0.080879	0.007363	0.000416
KK4	0.000000	0.014235	0.000000	0.025499
KK5	0.000000	0.163157	0.048739	0.000870
KK6	0.000029	0.165795	0.051012	0.000264
KK7	0.000041	0.078981	0.040459	0.002622
KK8	0.000037	0.145165	0.012889	0.000397
KK9	0.000000	0.250201	0.001577	0.003033
KK10	0.000000	0.056192	0.001787	0.000740

4.2.4. mRNA Anlatım Analizi

Hedef genlerin aort damar dokusu ve periferik kandan izole edilen monosit hücrelerindeki gen anlatım analizini yapmak için ddPZR yöntemi kullanılmıştır. Deneysel aşama sonrasında veriler “*QuantaSoft*” yazılımı aracılığı ile incelenmiştir. Şekil 4.1 ve Şekil 4.2’de örnek olarak her gen için hasta ve kontrol olmak üzere 4 örneğin temsil edildiği grafikler verilmiştir. Verilerin incelemesi sistem sağlayıcının önerileri doğrultusunda yapılmıştır. Damlacık grafiklerinde pozitif ve negatif damlacıklar ışıma miktarlarına göre ayırt edilmektedir. Maksimum ışıma değeri her gen için değişken olmakla birlikte pozitif ve negatif damlacıkların birbirinden uzaklaştığı ve kümeleşmenin rahatlıkla gözlenebildiği durumlar güvenilir olarak değerlendirilmektedir. Bu ayırım Şekil 4.1 ve Şekil 4.2’de yatay pembe çizgi ile gösterilmiştir.



Şekil 4.1: Aort damar dokusunda TAD hastası ve kontrol grubu örneklerine ait ddPZR grafikleri. Grafikler hedef genlere göre ayrı ayrı gösterilmiştir. Pozitif ve negatif damlacıklar farklı alanlarda kümelenmiş olup renk kodu ile ayırt edilmiştir. Mavi damlacıklar hedef genin kopya cDNA'sını içerirken siyah damlacıklar içermemektedir (negatif damlacık). Damlacık kümelerinin ayırımını netleştiren pembe yatay çizgi dışarıdan müdahale ile çizilebildiği gibi sistem otomatik olarak da atayabilmektedir.



Şekil 4.2: Kan (monosit) hücrelerinde TAD hastası ve kontrol grubu örneklerine ait ddPZR grafikleri. Grafikler hedef genlere göre ayrı ayrı gösterilmiştir. Pozitif ve negatif damlacıklar farklı alanlarda kümelenmiş olup renk kodu ile ayırt edilmiştir. Mavi damlacıklar hedef genin kopya cDNA'sını içerirken siyah damlacıklar içermemektedir (negatif damlacık). Damlacık kümelerinin ayırımını netleştiren pembe yatay çizgi dışarıdan müdahale ile çizilebildiği gibi sistem otomatik olarak da atayabilmektedir.

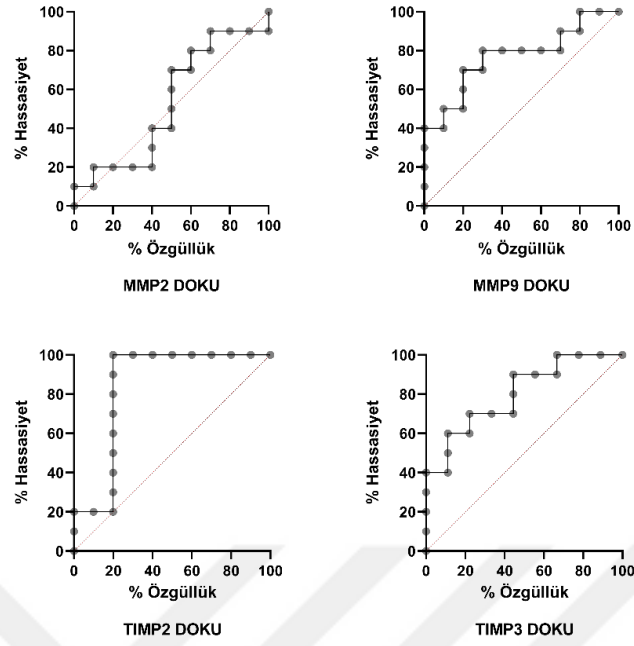
“QuantaSoft” yazılımı kullanılarak her örnek ve hedef gen için elde edilen kopya sayısı/mikro litre değerleri (1ng başlangıç RNA için) istatistiksel analizde kullanılmak üzere “Excel” formatında kaydedilmiştir. Referans gen olarak kullanılan *GAPDH* değerleri ile normalize edilmiş verilerin istatistiksel analizi için “Graphpad Prism version 9.3.1” programı kullanılmıştır. Hasta ve kontrol grubu örneklerinin gen anlatımı değerlerinin kıyaslanması ve anlamlı bir fark olup olmadığının test edilmesi için parametrik olmayan “Mann Whitney U Test” i kullanılmıştır. Veri setinin analizi sonucunda $p < 0.05$ olması durumunda anlamlı olarak kabul edilmiştir. Uygulanan “Mann Whitney U Test” sonucunda elde edilen p değerleri Tablo 4.7’de verilmiştir.

Tablo 4.7: Aort damar dokusu ve periferik kan örneklerinde ddPZR ile yapılan mRNA anlatım analizlerinin istatistiksel sonuçları.

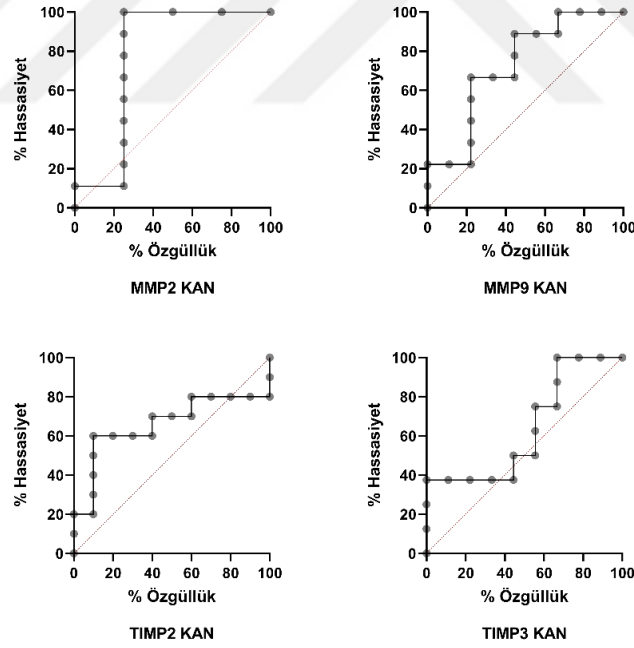
Mann Whitney Testi		ROC Analizi			
		DOKU			
Gen	P Değeri ¹	AUC	Standart Hata	P Değeri ¹	%95 Güven Aralığı
MMP2	0.85	0.53	0.14	0.82	0.26-0.80
TIMP2	0.0089**	0.84	0.11	0.01*	0.63-1.00
MMP9	0.043*	0.77	0.11	0.04*	0.49-0.97
TIMP3	0.028*	0.80	0.10	0.03*	0.60-0.99
MMP2/TIMP2	0.063	0.75	0.12	0.06	0.52-0.99
MMP2/TIMP3*	0.012*	0.83	0.09	0.01*	0.64-1.00
MMP9/TIMP2	0.25	0.66	0.13	0.22	0.40-0.91
MMP9/TIMP3	0.80	0.54	0.15	0.76	0.26-0.82
		KAN			
	P Değeri	AUC	Standart Hata	P Değeri	%95 Güven Aralığı
MMP2	0.15	0.77	0.19	0.12	0.39-1.00
TIMP2	0.25	0.66	0.13	0.23	0.40-0.92
MMP9	0.11	0.72	0.12	0.10	0.48-0.97
TIMP3	0.37	0.64	0.14	0.34	0.36-0.91
MMP2/TIMP2	0.45	0.61	0.15	0.41	0.31-0.90
MMP2/TIMP3	0.68	0.57	0.15	0.63	0.27-0.87
MMP9/TIMP2	0.80	0.54	0.14	0.76	0.25-0.83
MMP9/TIMP3	0.28	0.67	0.14	0.25	0.39-0.96

TAD hastaları ve kontrol grupların karşılaştırıldığı, *MMP2*, *MMP9*, *TIMP2*, *TIMP3*, *MMP2/TIMP2*, *MMP2/TIMP3*, *MMP9/TIMP2*, *MMP9/TIMP3* sonuçlarının özgüllük ve duyarlılığın belirlenebilmesi için “Graphpad Prism version 9.3.1” kullanılarak gerçekleştirilen, hedef dokuya göre kategorize edilmiş ROC eğrileri Şekil 4.3, 4.4, 4.5 ve 4.6’da verilmiştir. ROC analizi sonucunda elde edilen eğri altında kalan alan (AUC), p değeri ve güven aralığı değerleri de Tablo 4.7’de verilmiştir.

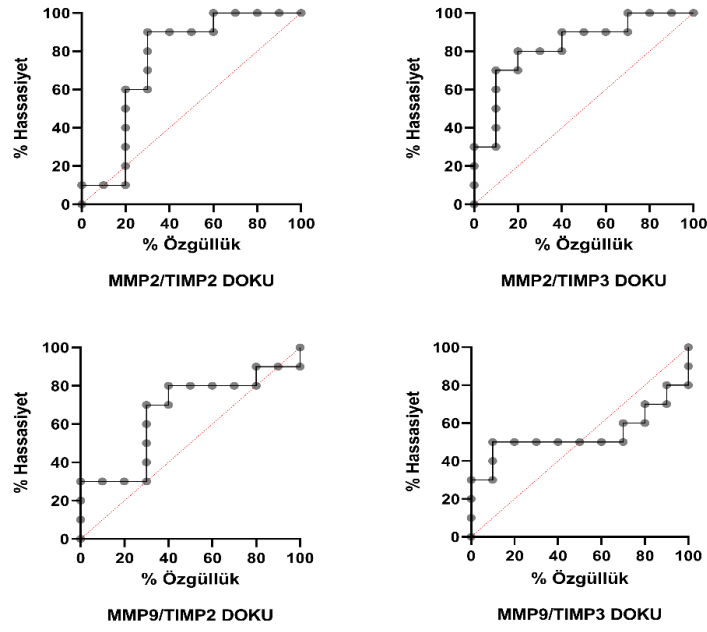
¹ * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ olmak üzere $p < 0.05$ anlamlı olarak kabul edilmiştir. İstatistiksel olarak anlamlı değerler koyu olarak belirtilmiştir. AUC: ROC eğrisinin altında kalan alan.



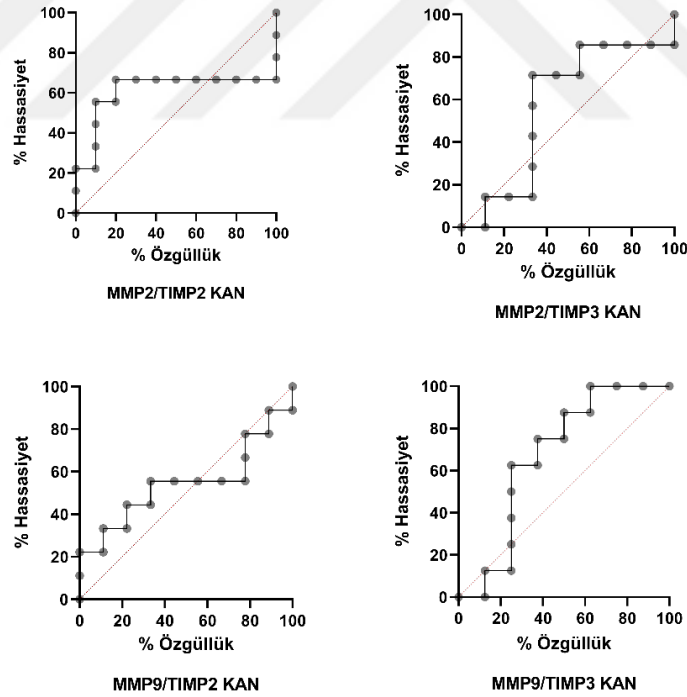
Şekil 4.3: Aort dokusu *MMP2*, *TIMP2*, *MMP9* ve *TIMP3* genlerinin ROC analizleri.



Şekil 4.4: Kan monosit hücrelerinde *MMP2*, *TIMP2*, *MMP9* ve *TIMP3* genlerinin ROC analizleri.

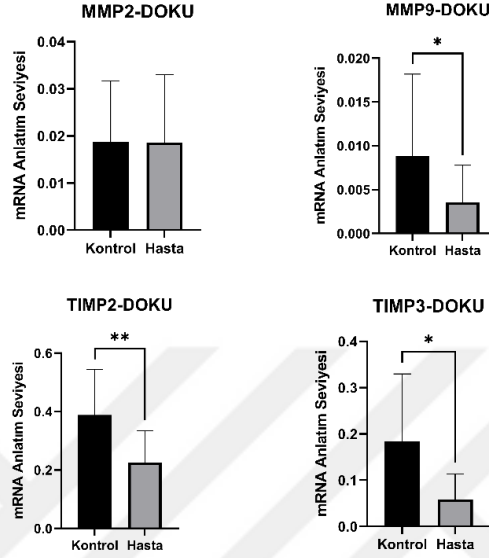


Şekil 4.5: Aort dokusu MMP/TIMP değerinin ROC analizleri.



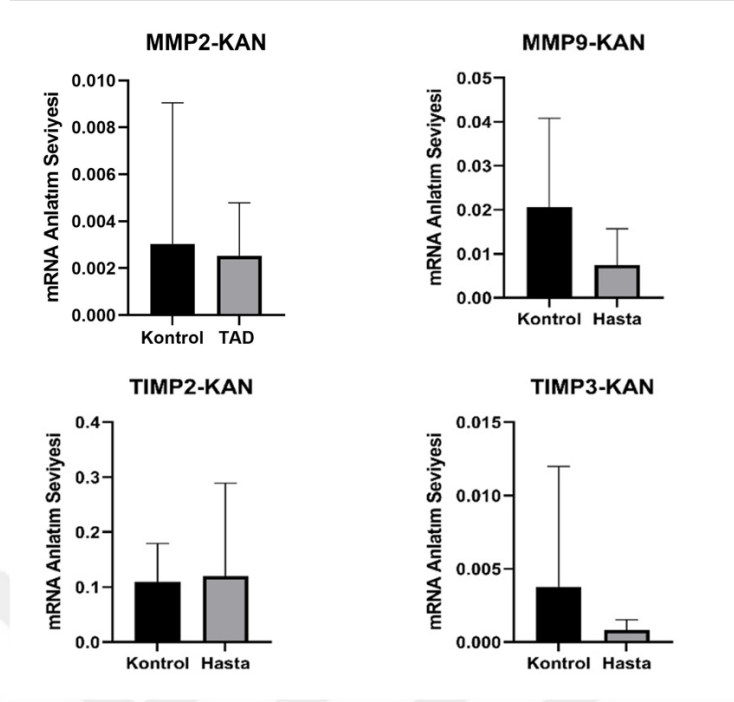
Şekil 4.6: Monosit hücrelerinde MMP/TIMP değerinin ROC analizleri.

TAD hasta ve kontrol grubu aort damar dokusunda *MMP2*, *TIMP2*, *MMP9* ve *TIMP3* genlerinin ddPZR yöntemi ile elde edilen gen anlatım seviyelerinin kolon grafikleri Şekil 4.7’de verilmiştir.



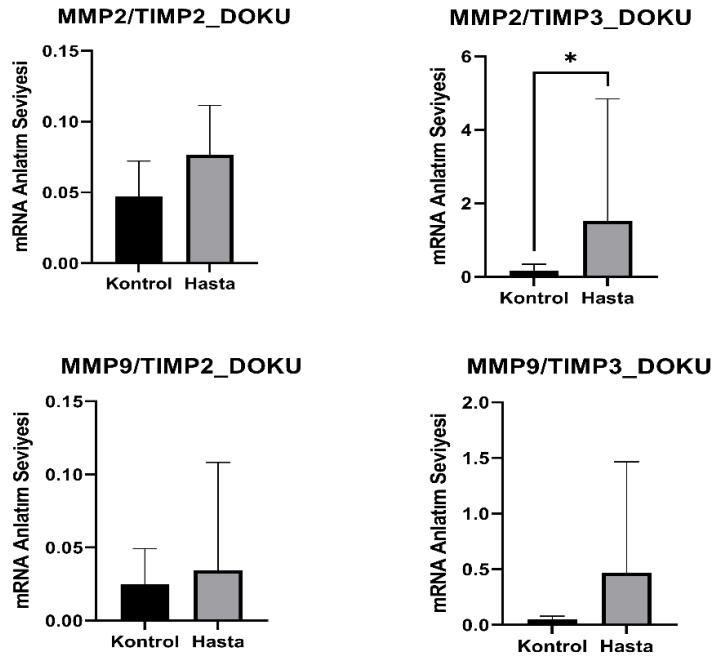
Şekil 4.7: *MMP2*, *TIMP2*, *MMP9* ve *TIMP3* genlerinin aort dokusundaki gen anlatım seviyeleri.
* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$

TAD hasta ve kontrol grubu monosit hücrelerde *MMP2*, *TIMP2*, *MMP9* ve *TIMP3* genlerinin ddPZR yöntemi ile elde edilen gen anlatım seviyelerinin kolon grafikleri Şekil 4.8’de verilmiştir.



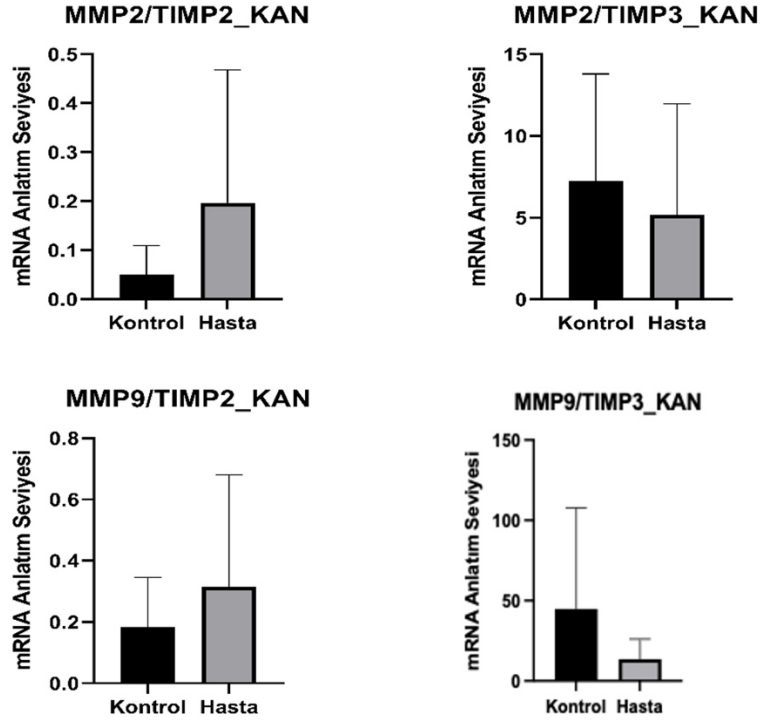
Şekil 4.8: *MMP2*, *TIMP2*, *MMP9* ve *TIMP3* genlerinin kandaki (monosit hücre) gen anlatım seviyeleri.

TAD hasta ve kontrol grubu aort damar dokusunda *MMP2/TIMP2*, *MMP9/TIMP2*, *MMP2/TIMP3* ve *MMP9/TIMP3* gen anlatımı oranlarının kolon grafikleri Şekil 4.9’da verilmiştir.



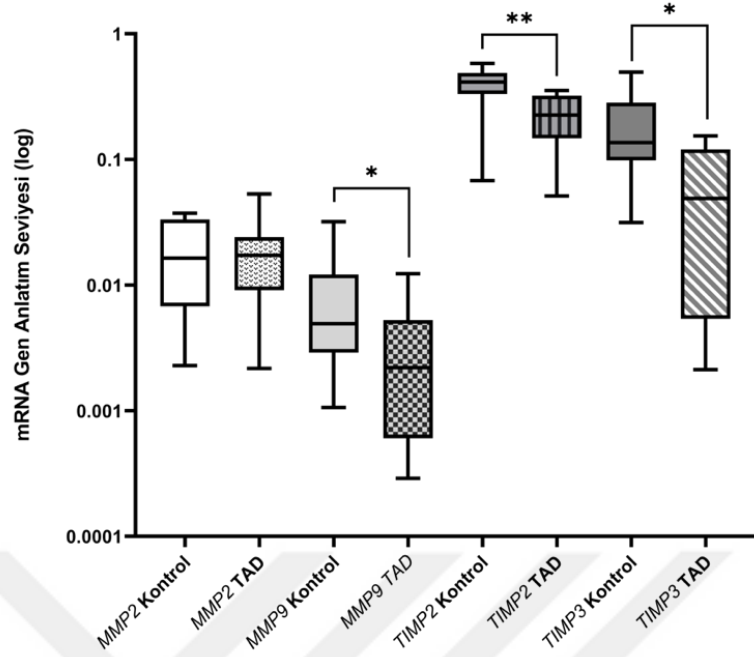
Şekil 4.9: Aort damar dokusunda MMP/TIMP gen anlatımı oranları. * $p < 0.05$.

TAD hasta ve kontrol grubu monosit hücrelerde *MMP2/TIMP2*, *MMP9/TIMP2*, *MMP2/TIMP3* ve *MMP9/TIMP3* gen anlatımı oranlarının kolon grafikleri Şekil 4.10’da verilmiştir.



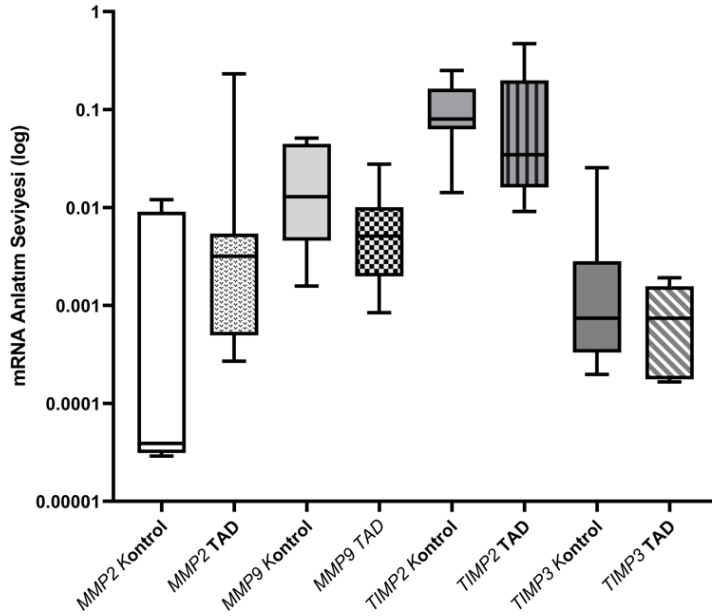
Şekil 4.10: Kandaki (monosit hücre) MMP/TIMP gen anlatımı oranları.

TAD hasta ve kontrol gruplarında *MMP2*, *TIMP2*, *MMP9* ve *TIMP3* genlerinin aort damar dokusundaki gen anlatım seviyeleri karşılaştırmalı olarak Şekil 4.11’de verilmiştir.



Şekil 4.11: *MMP2*, *TIMP2*, *MMP9* ve *TIMP3* genlerinin aort dokusundaki gen anlatım seviyeleri.
*p<0.05, **p<0.01

TAD hasta ve kontrol gruplarında *MMP2*, *TIMP2*, *MMP9* ve *TIMP3* genlerinin kan (monosit) hücrelerindeki gen anlatım seviyeleri karşılaştırmalı olarak Şekil 4.12’de verilmiştir.



Şekil 4.12: *MMP2*, *TIMP2*, *MMP9* ve *TIMP3* genlerinin periferik kandaki (monosit hücre) gen anlatım seviyeleri.

MMP2, *MMP9*, *TIMP2* ve *TIMP3* genlerinin gen anlatım düzeylerinin TAD hasta ve kontrol grubunda orantısal olarak değişim miktarları ve değişimin yönü Tablo 4.8’de verilmiştir. Ek olarak Tablo 4.8’de *MMP2/TIMP2*, *MMP9/TIMP2*, *MMP2/TIMP3* ve *MMP9/TIMP3* oranlarının değişim miktarı ve yönü de verilmiştir.

Tablo 4.8: *MMP2*, *TIMP2*, *MMP9* ve *TIMP3* genlerinin hasta grubunda kontrol grubuna kıyasla anlatım miktarlarındaki değişim¹.

AORT DOKUSU			KAN DOKUSU		
Gen Adı	Anlatım Değişimi*	Oran	Gen Adı	Anlatım Değişimi*	Oran
MMP2	↔	1.00	MMP2	↓	-1.10
TIMP2**	↓	-1.70	TIMP2	↑	1.10
MMP9*	↓	-2.50	MMP9	↓	-2.80
TIMP3*	↓	-3.10	TIMP3	↓	-4.60
MMP2/TIMP2	↑	1.62	MMP2/TIMP2	↑	3.90
MMP2/TIMP3*	↑	2.92	MMP2/TIMP3	↓	-1.40
MMP9/TIMP2	↑	1.38	MMP9/TIMP2	↑	1.70
MMP9/TIMP3	↑	7.90	MMP9/TIMP3	↓	-3.30

Anlatım analizleri yapılan genlerin birbirleri ile olan ilişkilerini ve bu ilişkinin yönünü tayin etmek amacıyla korelasyon analizi yapılmıştır. Veri seti özelliklerine uygun olarak seçilen parametrik olmayan “*Spearman*” korelasyon testinin analiz sonuçları Tablo 4.9’da verilmiştir. -1 ile 1 arasında değer olan r korelasyon katsayısıdır. Sahip olduğu işaret (-/+) ilişkinin yönünü belirtirken 0’dan uzaklaşan değerler güçlü ilişki anlamına gelir.

¹↔:Değişim yok, ↓: Azalış, ↑: Artış, * “*Mann Whitney Testi*”nde p<0.05 , ** *Mann Whitney Testi*”nde p<0.01 bulunmuştur.

Tablo 4.9: “Spearman” korelasyon analizi sonu elde edilen “p” ve “r” değerleri¹.

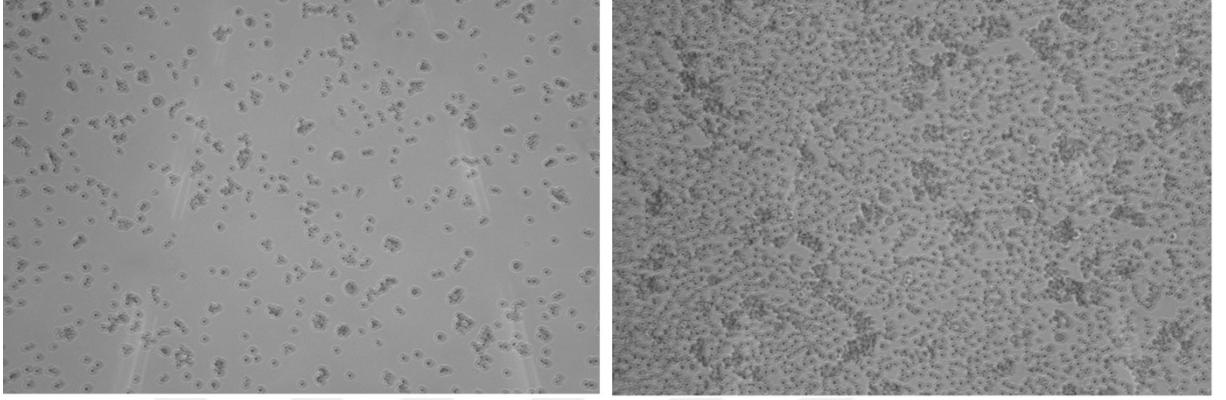
	<i>MMP2-DOKU</i>		<i>TIMP2-DOKU</i>		<i>MMP9-DOKU</i>		<i>TIMP3-DOKU</i>	
	r	p	r	p	r	P	r	P
<i>MMP2-DOKU</i>	1.0000		0.9273	0.0003**	0.0182	0.9730	0.2970	0.4069
<i>TIMP2-DOKU</i>	0.9273	0.0003**	1.0000		-0.0303	0.9460	0.3333	0.3487
<i>MMP9-DOKU</i>	0.0182	0.9730	-0.0303	0.9460	1.0000		0.0424	0.9184
<i>TIMP3-DOKU</i>	0.2970	0.4069	0.3333	0.3487	0.0424	0.9184	1.0000	
<i>MMP2-KAN</i>	-0.7710	0.1028	-0.6000	0.2417	0.1431	0.8031	-0.5430	0.2970
<i>TIMP2-KAN</i>	0.3818	0.2788	0.5030	0.1440	0.2364	0.5135	0.4061	0.2475
<i>MMP9-KAN</i>	0.0501	0.9116	0.1500	0.7081	0.2670	0.4931	-0.6000	0.097
<i>TIMP3-KAN</i>	-0.2140	0.6191	-0.0710	0.8820	0.1670	0.7030	-0.5240	0.197

Aort damar dokusu ve periferik kandan izole edilen monosit hücrelerindeki gen anlatımlarının kıyaslanması için gerçekleştirilen “*Spearman*” korelasyon analizinde $MMP2_{doku} - TIMP2_{doku}$ ikilisi için $r=0.9273$, $p=0.0003$ olarak bulunmuştur. Söz konusu ikili için elde edilen p değeri istatistiksel olarak anlamlı doğrusal bir ilişkiyi işaret etmektedir. Yani $MMP2_{doku} - TIMP2_{doku}$ arasında pozitif yönde yüksek korelasyon bulunmuştur. İstatistiksel olarak anlamlılık ifade etmeyen diğer tüm r ve p değerleri Tablo 4.9’da verilmiştir.

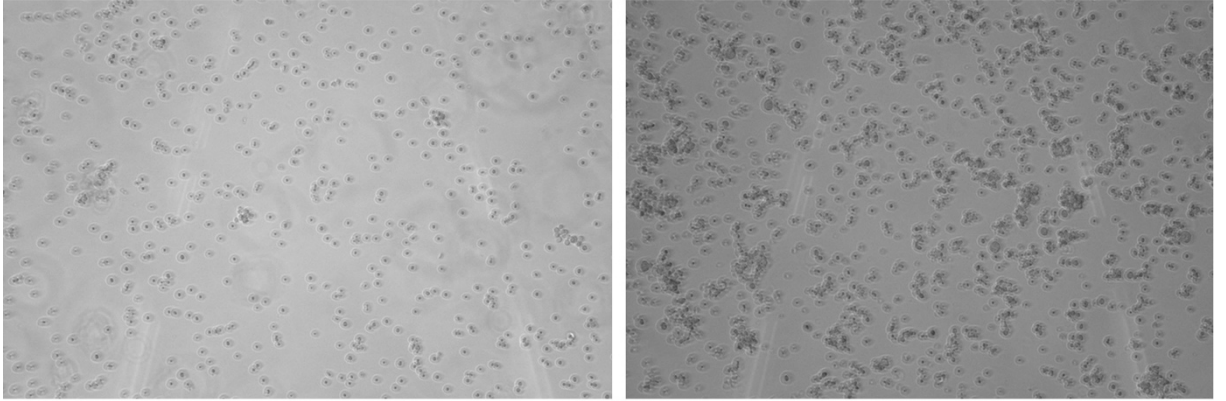
¹ * $p<0.05$ ve ** $p<0.01$ olmak üzere $p<0.05$ anlamlı olarak kabul edilmiştir.

4.2.5. Metilasyon Pozitif ve Negatif Kontrolü Olarak “*Jurkat*” Hücrelerinin Büyütülmesi ve Kontrolü

Metilasyon pozitif ve negatif kontrol olarak kullanılmak üzere hücre kültüründe büyütülen “*Jurkat*” hücrelerinin 1. ve 7. gün fotoğrafları Şekil 4.13, 4.14’te verilmiştir.



Şekil 4.13: Metilasyon pozitif kontrolü “*Jurkat*” hücrelerinin ışık mikroskobu (100X) altındaki görüntüleri. Soldan sağa doğru; 1. gün ve 7.gün



Şekil 4.14: Metilasyon negatif kontrolü, her gün 2µM DAC uygulaması yapılmış “*Jurkat*” hücrelerinin ışık mikroskobu (100X) altındaki görüntüleri. Soldan sağa doğru; 1. gün ve 7.gün.

Metilasyon pozitif ve negatif kontrolü olarak kullanılmak üzere büyütülen “*Jurkat*” hücrelerinden 7. günün sonunda öncelikle hücre sayımı yapılmış daha sonrasında da DNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir. DNA miktar ve kalite tayini “*Nanodrop*” ile yapılmıştır. Metilasyon kontrol örneklerine ait bilgiler Tablo 4.10’da verilmiştir.

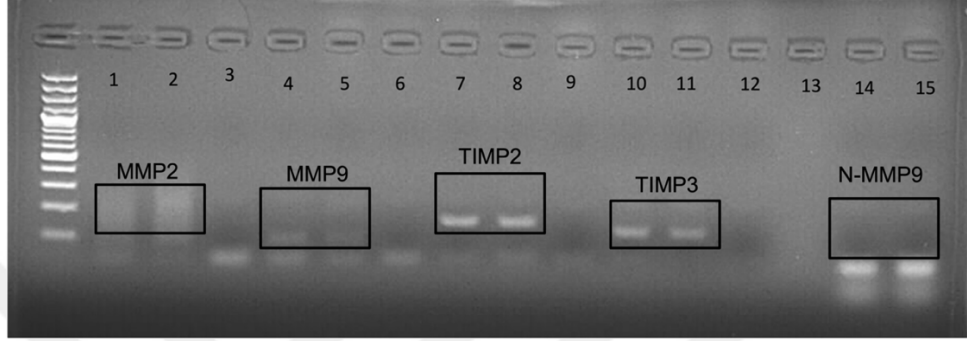
Tablo 4.10: Pozitif ve negatif kontrol olarak kullanılan “*Jurkat*” hücrelerinin miktar ve kalite tayini¹.

Örnek	Hücre Sayısı (hücre/ml)	Canlılık (%)	DNA Miktarı (ng/µl)	260/280
¹ +K “ <i>Jurkat</i> ”	2.40 x 10 ⁶	96	536,1	1,96
- K “ <i>Jurkat</i> ”/2µM DAC	7.7 x 10 ⁵	94	90,4	1,97

¹+K: Pozitif kontrol, -K: Negatif kontrol, DAC: 5-Aza-2’ deoksitisitidin

4.2.6. Metilasyon Sensitif Yüksek Çözünürlüklü Erime Analizi İçin Tasarlanan Primelerin Optimizasyonu

Bisülfid modifikasyon işlemi yapılan DNA örneğine ve işlem yapılmış DNA'ya özel tasarlanan primerler için farklı bağlanma sıcaklıklarında PZR gerçekleştirilmiştir. PZR sonucu agaroz jel ile kontrol edilmiştir (Şekil 4.15).

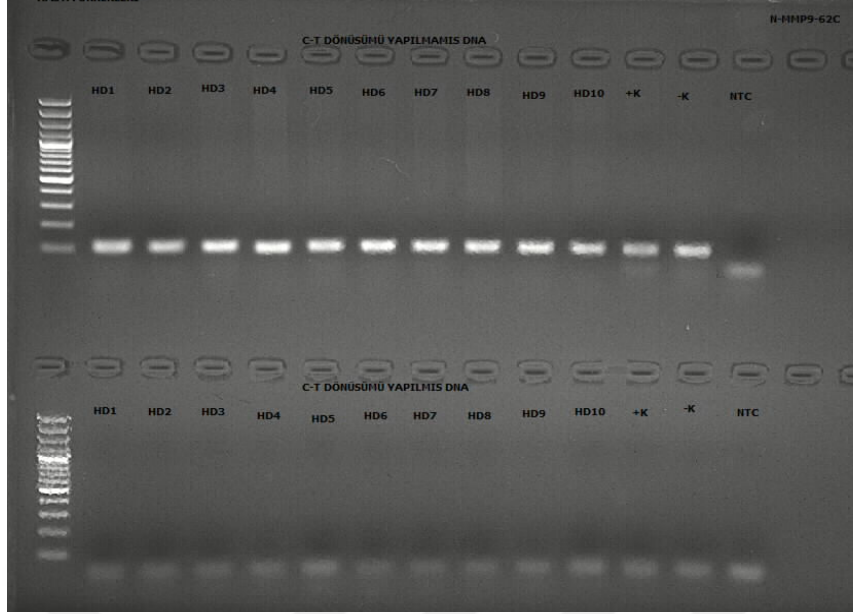


Şekil 4.15: Tasarlanan primerlerin C-T dönüşümü yapılmış DNA ile yapılan gradient PZR sonucu¹.

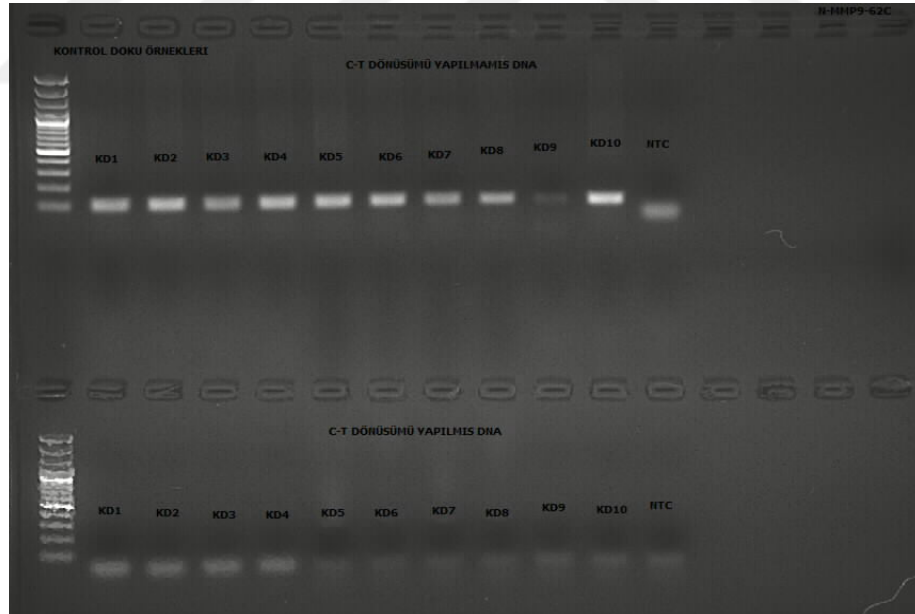
4.2.7. Bisülfid Modifikasyon İşlemi Yapılan Örneklerin Kontrol Edilmesi

Aort dokusundan elde edilen TAD hastası ve kontrol grubu örneklerine *EZ DNA Methylation-Gold Kit (Zymo Research)* kullanılarak bisülfid modifikasyon işlemi uygulanmıştır. İşlem sırasında DNA dizisinde metillenmiş olan C (sitozin) değişmeden kalırken, metillenmeyen C ise U'ya (urasil) dönüşmüştür. Dönüşümü yapılan hedef dizideki U'ların yerini PZR ile çoğalma sırasında T (timin) alır. *EZ DNA Methylation-Gold Kit (Zymo Research)* kullanılarak yapılan C-T dönüşümün gerçekleşme oranının kontrol edilmesi gerekmektedir. Bunun için bisülfid modifikasyon yapılmış örneklerle (hasta ve kontrol grubu örnekleri) C-T dönüşümü yapılmamış DNA'ya göre tasarlanan N-MMP9 primeri kullanılarak PZR gerçekleştirilmiştir. PZR sonucu agaroz jelde kontrol edilmiştir (Şekil 4.16, Şekil 4.17).

¹ 1	C-MMP2	62°C	7	C-TIMP2	56°C	13	-	
2	C-MMP2	60°C	8	C-TIMP2	53°C	14	N-MMP9	59°C
3	C-MMP2-NTC	60°C	9	C-TIMP2-NTC	53°C	15	N-MMP9-NTC	59°C
4	C-MMP9	56°C	10	C-TIMP3	58°C			
5	C-MMP9	53°C	11	C-TIMP3	56°C			
6	C-MMP9 NTC	53°C	12	C-TIMP3-NTC	56°C			



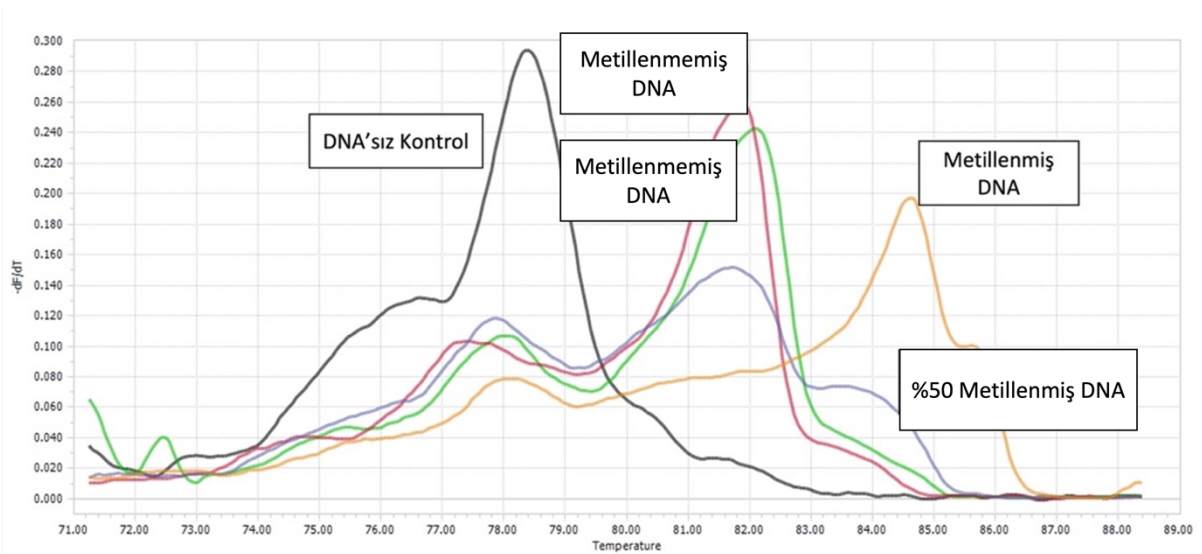
Şekil 4.16: CT dönüşümü yapılmamış ve CT dönüşümü yapılmış TAD hasta doku örneklerinin N-MMP9 primeri ile gerçekleştirilen PZR sonucu. Üst sıra: CT dönüşümü yapılmamış DNA, N-MMP9 primeri ile çoğaltılabilmektedir. Alt sıra: CT dönüşüm gerçekleştirilen DNA örneklerinde N-MMP9 primeri ile çoğalma gözlenmemiştir. DNA cetveli 100 baz, N-MMP9 primerinin ürün uzunluğu 120 bazdır.



Şekil 4.17: CT dönüşümü yapılmamış ve CT dönüşümü yapılmış kontrol doku örneklerinin N-MMP9 primeri ile gerçekleştirilen PZR sonucu. Üst sıra: CT dönüşümü yapılmamış DNA, N-MMP9 primeri ile çoğaltılabilmektedir. Alt sıra: CT dönüşüm gerçekleştirilen DNA örneklerinde N-MMP9 primeri ile çoğalma gözlenmemiştir. DNA cetveli 100 baz, N-MMP9 primerinin ürün uzunluğu 120 bazdır.

4.2.8. Metilasyon Negatif (Metillenmemiş) Kontrolünün CpG Metillenme Yüzdesinin Kontrol Edilmesi

Pozitif metilasyon kontrolü örneği, 2 μ M DAC uygulaması yapılan metilasyon negatif örneği, 2 ayrı bağımsız kontrol örneği, 1:1 oranda metilasyon dilüsyon örneği (metillenmiş:metillenmemiş (bağımsız kontrol örneği)) birlikte çalışıldığı MS-HRM analizi sonucu Tablo 4.18’de verilmiştir. Bağımsız kontrol örneklerinin 81-82 $^{\circ}$ C’de ve metilasyon pozitif kontrolün de 84 $^{\circ}$ C’de tek bir erime eğrisi verdiği deney öncesinde teyit edilmiştir. Şekil 4.18’de görüldüğü üzere, 1:1 oranında karışım (metillenmiş:metillenmemiş) örneğin hem metillenmiş hem de metillenmemiş bölgede pik vermektedir.

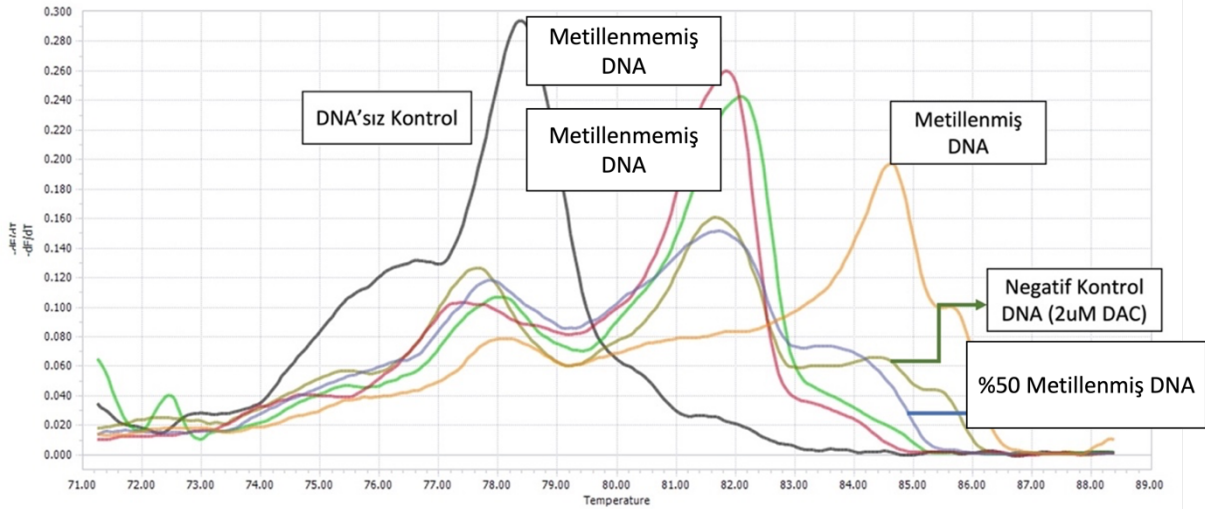


Şekil 4.18: “Metillenmiş DNA” ve “Metillenmemiş DNA”nın farklı dilüsyon oranlarında karıştırılarak ara metilasyon yüzdesi değerlerini temsil eden örnekler elde edilmesi.

Aynı reaksiyonda çalışılan 2 μ M DAC uygulaması yapılan örneğin vermiş olduğu erime eğrisi Şekil 4.19’da verilmiştir. Buna göre 2 μ M DAC uygulaması yapılan metilasyon negatif örneğinin hem metilasyon pozitif hem de metilasyon negatif derecesinde pik oluşturması, metilasyon seviyesinin hedeflendiği gibi %0 olmadığı şeklinde yorumlanmıştır. Metillenme olmadığı için daha düşük sıcaklıkta erime eğrisi elde edilmesi beklenirken, metillenmiş DNA’nın erime eğrisinin olduğu 84 $^{\circ}$ C’de de düşük de olsa pik elde edilmiştir. Bu sebeple 2 μ M DAC uygulaması yapılan örneğin metilasyon yüzdesinin belirlenmesi için ek örnekler kullanılmıştır. Metilasyon sensitif yüksek çözünürlüklü erime (MS-HRM) analizi sonucunda metillenmiş DNA ve bağımsız metillenmemiş DNA (düşük sıcaklıkta tek pik elde edilen örnek) kullanılarak hazırlanan 1:1 dilüsyon örnekleri aynı reaksiyonda çalışılmış ve Şekil 4.19’daki sonuçlar elde edilmiştir. %100 metillenmiş DNA (sarı) 85 $^{\circ}$ C’de erime eğrisi verirken,

bağımsız metillenmemiş DNA (Kırmızı) 81.5 °C’de erime eğrisi vermiştir. Metillenmiş ve metillenmemiş DNA’nın bisülfid modifikasyon işlemi sonrası C-T oranı değiştiği için metillenmeyen örnekler daha düşük sıcaklıkta erime eğrisi vermektedir. 1:1 dilüsyon yapılarak kullanılan örnek %100 metillenmiş kontrole göre daha az metillenme göstermiştir .

MS-HRM yöntemi ile metillenmiş ve metillenmemiş kontroller kullanılarak (Şekil 4.19’da gösterilen sarı ve kırmızı eğriler) hazırlanan dilüsyon serisinin sonuçları, hazırlanan metilasyon negatif kontrolünün (2 µM DAC uygulaması yapılan-Şekil 4.19 mavi eğri) sonuçları ile karşılaştırılmıştır. Şekil 4.19’da DAC uygulaması ile elde edilen DNA’nın , dilüsyon sonucu yaklaşık %50 metillenmiş olması beklenen (mavi eğri) ile benzer bir erime eğrisi verdiği gözlemlenmiştir.



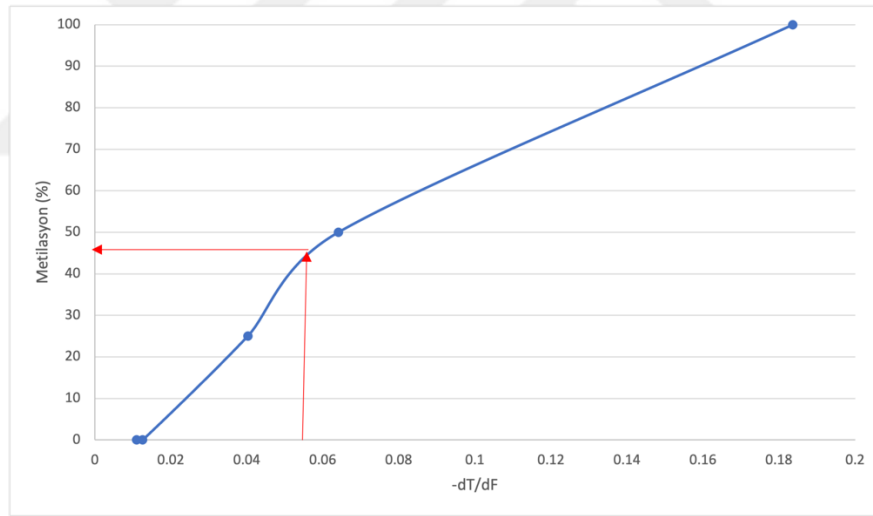
Şekil 4.19: Negatif kontrol (%0 Metillenmiş) olarak kullanılan “*Jurkat*” DNA’sının yaklaşık %50 metillenmiş olduğunun gösterilmesi.

MS-HRM analizinde metillenmiş DNA (sarı eğri) ve bağımsız metillenmemiş DNA (kırmızı eğri) kullanılarak hazırlanan dilüsyonların ve metilasyon negatif kontrolünün (DAC ile hazırlanmış) floresan okuma değeri (-dF/dT) ile, hesaplanan metilasyon yüzdesi arasındaki ilişkinin doğrusallığı *Spearman* korelasyonu ile kontrol edilmiştir. Metilasyon yüzdesi ve floresan değerleri Tablo 4.11’de, metilasyon yüzdesinin floresan değerlerine karşı çizilen grafik Şekil 4.20’de ve elde edilen değerlerin *Spearman* korelasyon analizi Tablo 4.12’de verilmiştir.

Tablo 4.11: MS-HRM analizinde kullanılan metilasyon standart dilüsyonlarının metilasyon yüzdesi ve $-dF/dT$ değerleri.

Metilasyon Yüzdesi	$-dF/dT$
100	0.1835
50	0.0640
50*	0.0550
25	0.0402
0	0.0125

Hesaplanan metilasyon yüzdesinin MS-HRM sonucu elde edilen floresan değerine ($-dF/dT$) karşı çizilen X-Y grafiği Şekil 4.20’de verilmiştir. DAC ile muamele edilen “*Jurkat*” hücrelerinden elde edilen metilasyon negatif kontrolünün, metilasyon yüzde değerlerine göre yaklaşık olarak %50 metillenmiş olduğu öngörülmüştür. DAC ile muamele edilen DNA örneğinin floresan değerinin metilasyon yüzdesi ile yaklaşık kesiştiği bölge Şekil 4.20’de kırmızı ok ile gösterilmiştir.



Şekil 4.20: Metilasyon negatif kontrolün (DAC uygulanmış) metilasyon yüzdesi tahmininin gösterilmesi.

Tablo 4.12: MS-HRM analizinde metilasyon yüzdesi ve $-dF/dT$ arasındaki doğrusallık ilişkisinin *Spearman* korelasyonu ile gösterilmesi.

<i>Spearman</i> r Değeri	Güven Aralığı	P Değeri	Yorum
0.9747	%95	0.033	Yüksek pozitif korelasyon

*DAC ile muamele edilen negatif metilasyon kontrolü

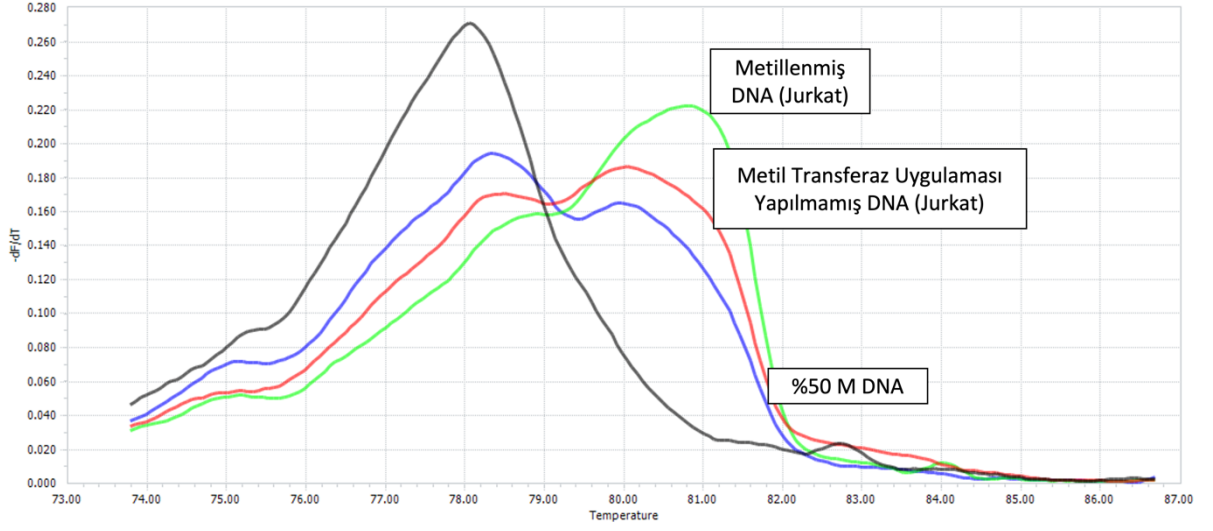
Tablo 4.11’de gösterildiği gibi hesaplanan metilasyon yüzdesi değerleri ile Şekil 4.20’de her örnek için elde edilen piklerin tepe noktalarına karşılık gelen floresan değeri ($-dF/dT$) karşılıklı olarak incelenmiştir. Hazırlanan metilasyon standartlarının oluşturduğu eğride (Şekil 4.19) metilasyon negatif kontrolünün yaklaşık %50 metilasyon bölgesine denk geldiği öngörülmüştür. Bu kabulün test edilmesi için *Spearman* korelasyon analizi kullanılmıştır. Tablo 4.12’de verilen metilasyon yüzdesi ve floresan okuma değerleri arasında yüksek pozitif korelasyon olduğu görülmüştür ($r=0.9747$, $p=0.033$) (Tablo 4.12).

Bu sonuç metilasyon standardı olarak hesaplanan “%” değerlerin isabetli oluşuna işaret etmektedir. *Spearman* korelasyon analizine göre (Tablo 4.15) metilasyon negatif kontrolü olarak kullanılan (2 μ M DAC uygulanmış) metilasyon negatif kontrolünün %50 metilasyon değerine sahip olduğu gösterilmiş ($p=0.033$), bu değerler bir standart olarak kabul edilmiş ve sonraki hesaplamalarda bu şekilde kullanılmıştır. Buna göre çalışmada kullanılan metilasyon kontrol örnekleri aşağıda verilmiştir.

- %100 Metillenmiş DNA: CpG Metil Transferaz uygulaması yapılmış “*Jurkat*” hücrelerinde elde edildi.
- %50 Metillenmiş DNA: 2 μ M DAC uygulaması yapılan “*Jurkat*” hücrelerinden elde edildi
- %88 Metillenmiş DNA: %100 ve %50 metillenmiş DNA’dan dilüsyon yolu ile elde edilmiştir.
- %63 Metillenmiş DNA: %100 ve %50 metillenmiş DNA’dan dilüsyon yolu ile elde edilmiştir.

4.2.9. Metilasyon Pozitif (Metillenmiş) Kontrolünün “CpG Metiltransferaz” Uygulaması Öncesindeki Metillenme Yüzdesinin Kontrolü

MS-HRM analizinde kullanılan metilasyon pozitif kontrol örneği “*CpG Methyltransferase*” uygulaması ile elde edilmiştir. “*CpG Methyltransferase*” etkisinin gösterilmesi için “*CpG Methyltransferase*” uygulaması yapılmış ve yapılmamış örnekler aynı reaksiyonda çalışılmış ve sonuçları Şekil 4.21’de gösterilmiştir.



Şekil 4.21: “*CpG Methyltransferase*” uygulaması yapılan “*Jurkat*” hücrelerinin metilasyon düzeyinin, uygulama yapılmayan hücelere göre arttığının gösterilmesi.

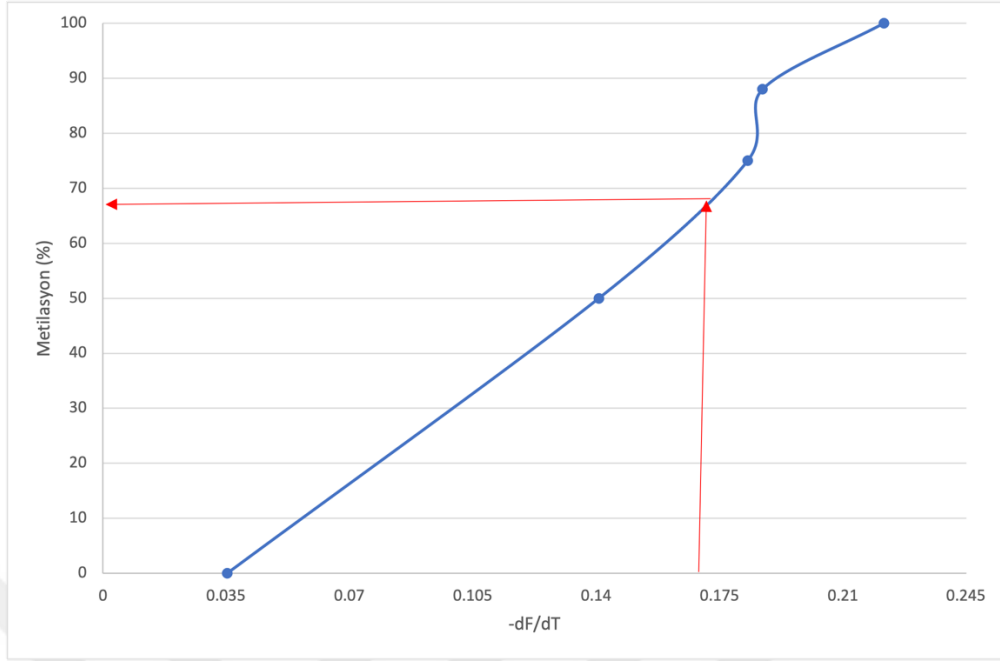
Her örnek için elde edilen piklerin tepe değerleri ile standart olarak kabul edilen metilasyon yüzdelerinin Tablo 4.13’te verilmiştir.

Tablo 4.13: MS-HRM analizinde “*CpG Methyltransferase*” uygulanmış ve uygulanmamış örneklerin metilasyon yüzdesi ve $-dF/dT$ değerleri.

Metilasyon Yüzdesi	$-dF/dT$
100	0.2216
88	0.1885
75	0.1830
70*	0.1715
50	0.1407
0	0.0167

Tablo 4.13’te gösterildiği gibi hesaplanan metilasyon yüzdesi değerleri ile Şekil 4.21’de her örnek için elde edilen piklerin tepe noktalarına karşılık gelen floresan değeri ($-dF/dT$) karşılıklı olarak incelenmiştir. Hazırlanan metilasyon standartlarının oluşturduğu eğride (Şekil 4.22) “*CpG Methyltransferase*” uygulanmamış DNA örneğinin yaklaşık %70 metilasyon bölgesine denk geldiği öngörülmüştür.

*“*CpG Methyltransferase*” uygulanmamış DNA örneği



Şekil 4.22: “CpG Methyltransferase” uygulanmamış örneğin metilasyon yüzdesinin gösterilmesi.

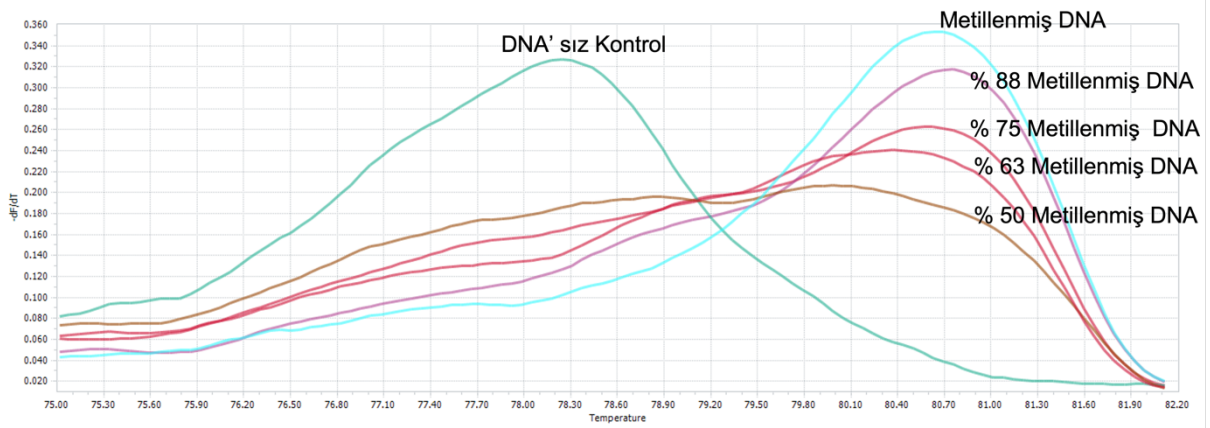
Bu kabulün test edilmesi için *Spearman* korelasyon analizi kullanılmıştır. Tablo 4.13’te verilen metilasyon yüzdesi ve floresan okuma değerleri arasında yüksek pozitif korelasyon olduğu görülmüştür ($r=1$, $p=0.0028$) (Tablo 4.14).

Tablo 4.14: Metilasyon pozitif kontrolün hesaplanan metilasyon yüzdesi ve $-dF/dT$ değeri arasındaki doğrusallık ilişkisinin “*Spearman*” korelasyonu ile gösterilmesi.

<i>Spearman</i> r Değeri	Güven Aralığı	P değeri	Yorum
1.0	%95	0.0028	Yüksek pozitif korelasyon

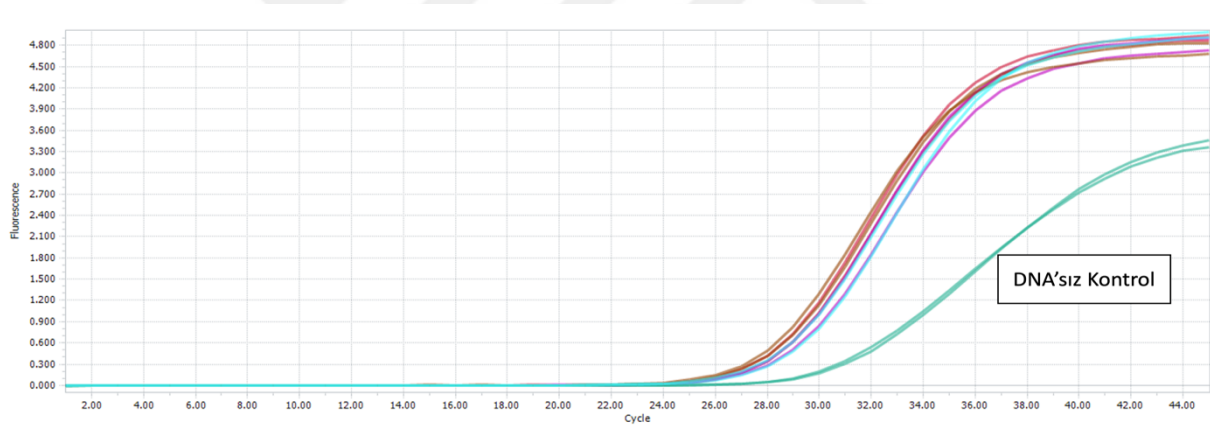
4.2.10. Hedef Genler İçin Metilasyon Kontrol Örnekleriyle Metilasyon Düzeyi Standardı Elde Edilmesi

MMP9 ve *TIMP3* geni için hazırlanan MS-HRM reaksiyonlarında farklı metilasyon yüzdelere sahip örneklerin (pozitif ve negatif kontrol) farklı sıcaklıklarda erime eğrisi sunması beklenmektedir. *MMP9* ve *TIMP3* genleri için yapılan metilasyon standart çalışması sonuçları Şekil 4.23 ve Şekil 4.25’de verilmiştir.



Şekil 4.23: *MMP9* geni için tüm kontrol örneklerinde metilasyon oranlarına göre elde edilen erime eğrileri.

DNA'sız kontrol (NTC) ile metilasyon negatif kontrollerin eğrilerinin çakışması durumunda reaksiyonun amplifikasyon eğrisi kontrol edilmiştir ve NTC'de amplifikasyon olmadığı gösterilmiştir (Şekil 4.24).



Şekil 4.24: *MMP9* geninde metilasyon standart örnekleri ve NTC kontrol ile elde edilen amplifikasyon eğrisi.

MMP9 geni için MS-HRM analizi sonucunda elde edilen $-dF/dT$ grafiği piklerinin tepe değerleri ve beklenen metilasyon yüzdeleri *Spearman* korelasyon analizi ile kontrol edilmiş ve metilasyon yüzdesi değerlerinin doğruluğu ($p=0.0167$) gösterilmiştir (Tablo 4.15, 4.16).

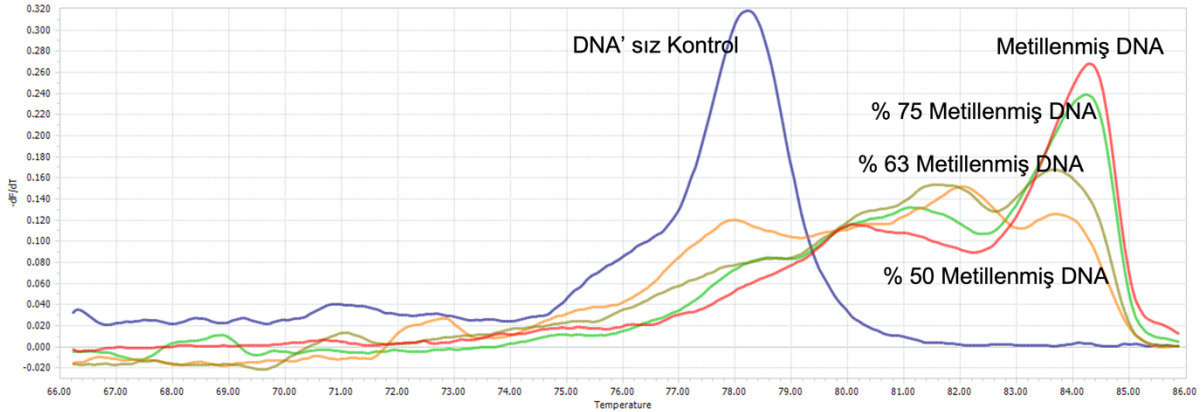
Tablo 4.15: MS-HRM analizinde *MMP9* geni için metilasyon standartlarının metilasyon yüzdesi ve -dF/dT değerleri.

Metilasyon Yüzdesi	-dF/dT
100	0.3291
88	0.2934
75	0.2376
63	0.2255
50	0.1918

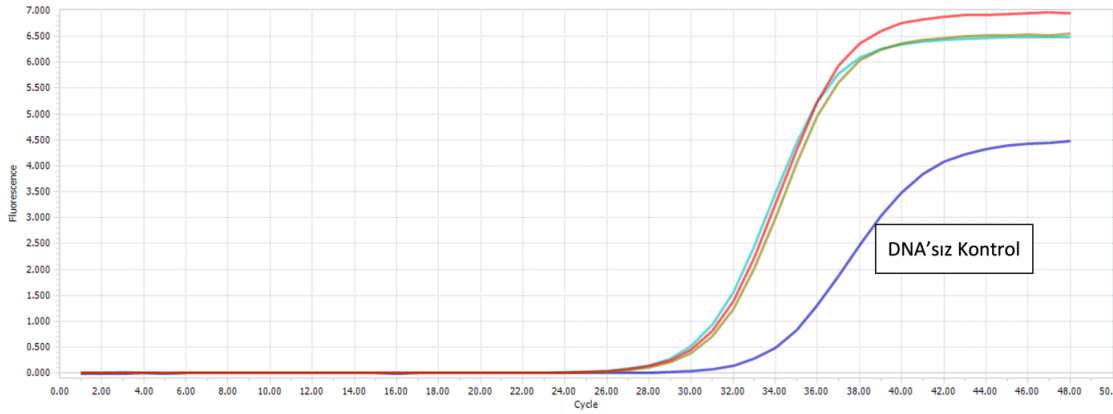
Tablo 4.16: MS-HRM analizinde *MMP9* geni için metilasyon yüzdesi ve -dF/dT arasındaki doğrusallık ilişkisinin Spearman korelasyonu ile gösterilmesi.

Spearman r Değeri	Güven Aralığı	P Değeri	Yorum
1.0	%95	0.0167	Yüksek pozitif korelasyon

TIMP3 geni için yapılan metilasyon standart çalışması sonuçları ve amplifikasyon eğrisi Şekil 4.25 ve 4.26’da verilmiştir.



Şekil 4.25: *TIMP3* geni için kontrol örneklerinde metilasyon oranlarına göre elde edilen erime eğrileri.



Şekil 4.26: *TIMP3* geni için kontrol örneklerinde elde edilen amplifikasyon eğrisi.

TIMP3 geni için MS-HRM analizi sonucunda elde edilen $-dF/dT$ grafiği piklerinin tepe değerleri ve beklenen metilasyon yüzdeleri *Spearman* korelasyon analizi ile kontrol edilmiş ve metilasyon yüzdesi değerlerinin doğruluğu ($p=0.033$) gösterilmiştir (Tablo 4.17, 4.18).

Tablo 4.17: MS-HRM analizinde *TIMP3* geni için metilasyon standartlarının metilasyon yüzdesi ve $-dF/dT$ değerleri.

Metilasyon Yüzdesi	$-dF/dT$
100	0.2604
75	0.2335
63	0.1424
50	0.1033
0	0.0027

Tablo 4.18: MS-HRM analizinde *TIMP3* geni için metilasyon yüzdesi ve $-dF/dT$ arasındaki doğrusallık ilişkisinin *Spearman* korelasyonu ile gösterilmesi.

<i>Spearman r</i> Değeri	Güven Aralığı	P Değeri	Yorum
0.9747	%95	0.033	Yüksek pozitif korelasyon

4.2.11. *MMP2* ve *TIMP2* Genleri ile Yapılan MS-HRM Analizi

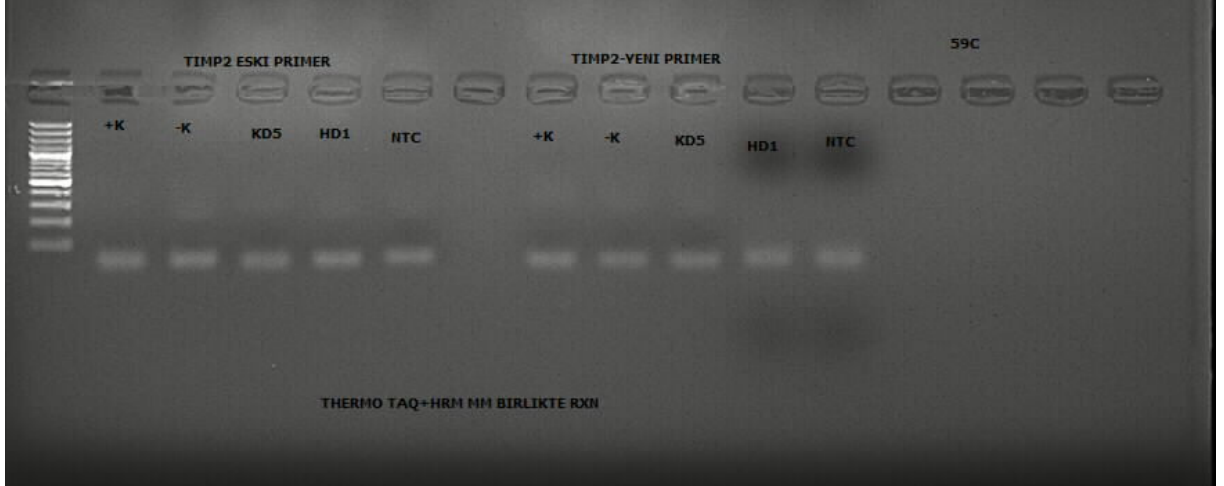
MMP2 ve *TIMP2* genlerinin MS-HRM analizinde erime eğrisi ve amplifikasyon eğrisi elde edilememiştir. Her gen için iki ayrı set primer kullanılmıştır. Her iki primer setiyle de MS-HRM uygulama aşamaları tekrar edilmiştir. Ancak *MMP2* ve *TIMP2* genleri için amplifikasyon eğrisi elde edilememiştir. *MMP2* ve *TIMP2* genleri ile yapılan MS-HRM analizinde sonuç alınamaması sebebiyle farklı PZR hazırlama solüsyonları ile deneme yapılmıştır. Sonuçlar agaroz jelde kontrol edilmiştir. “*ThermoScientific PCR MM*” ve “*HOT FIREPol® EvaGreen*

HRM Mix (Solis BioDyne)” karşılaştırması Şekil 4.27’de verilmiştir. MS-HRM analizleri için kullanılan solüsyon “*HOT FIREPol® EvaGreen HRM Mix*”dir.



Şekil 4.27: *MMP2* ve *TIMP2* genlerinin farklı PZR hazırlama solüsyonları ile amplifikasyon denemesi. Üst sıra; *MMP2* geninin sırasıyla “*ThermoScientific PCR MM*” ve “*HOT FIREPol® EvaGreen HRM Mix (Solis BioDyne)*” ile PZR sonuçları. Alt sıra; *TIMP2* geninin sırasıyla “*ThermoScientific PCR MM*” ve “*HOT FIREPol® EvaGreen HRM Mix (Solis BioDyne)*” ile PZR sonuçları.

TIMP2 geninin “*ThermoScientific PCR MM*” ile yapılan PZR’si sonucunda jelde bant gözlemlenmiştir. “*ThermoScientific PCR MM*” floresan boya içermeyen standart bir solüsyondur. MS-HRM analizinde kullanılan “*HOT FIREPol® EvaGreen HRM Mix (Solis BioDyne)*” ile standart PZR’de de sonuç alınamamasının ardından her iki solüsyonun birlikte kullanıldığı bir MS-HRM reaksiyonu hazırlanmış, *TIMP2* için tasarlanan iki primer seti de kullanılmıştır. Reaksiyon sonucunda elde edilen ürünler agaroz jelde yürütülmüştür. Sonuçlar Şekil 4.28’de verilmiştir.

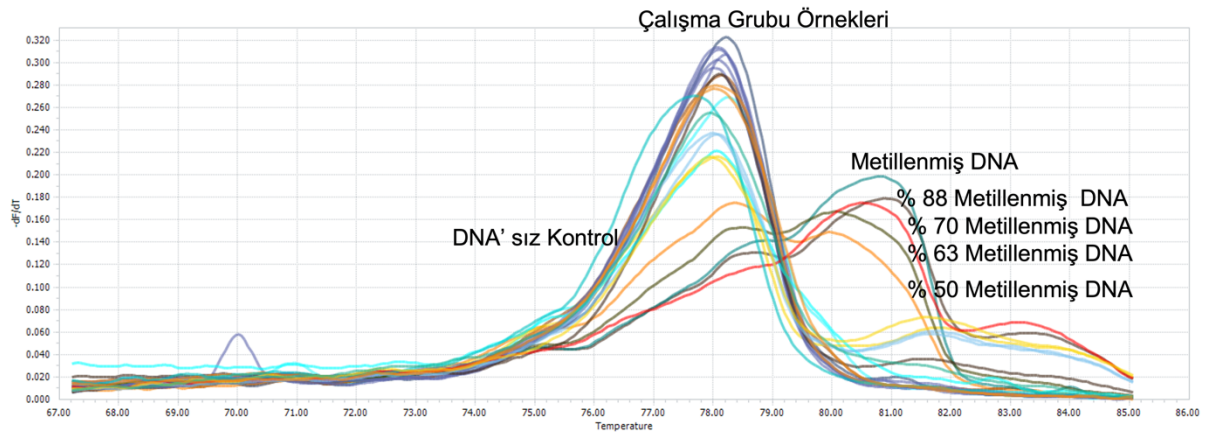


Şekil 4.28: *TIMP2* geni için tasarlanan her iki primer seti kullanılarak “*ThermoScientific MM*” ve “*HOT FIREPol® EvaGreen HRM Mix (Solis BioDyne)*” karışımı ile yapılan PZR çalışılması sonuçları.

Şekil 4.28’de görüldüğü gibi iki PZR hazırlama solüsyonun birlikte kullanıldığı PZR sonucunda kullanılan örneklerde herhangi bir bant elde edilememiştir.

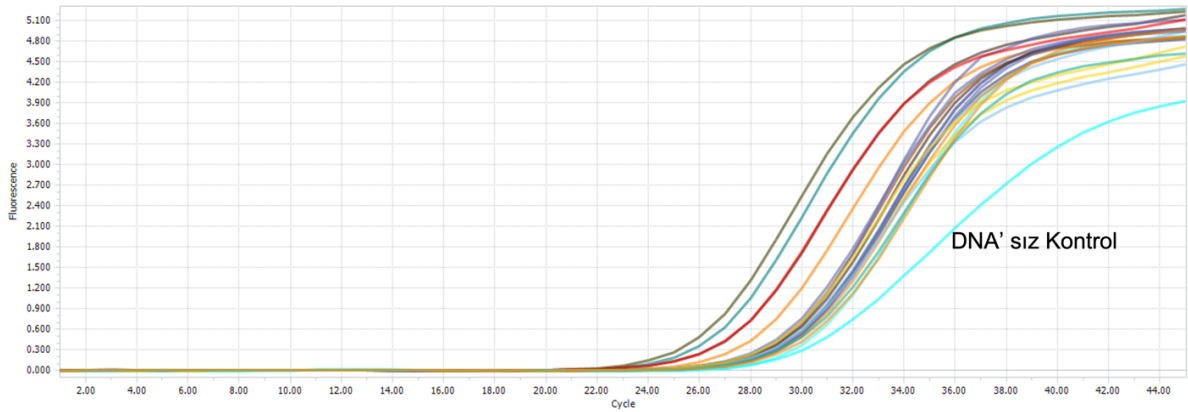
4.2.12. TAD Hasta ve Kontrol Grubu Örneklerinde *MMP9* ve *TIMP3* Genlerinin MS-HRM Yöntemi ile Metilasyon Düzeylerinin Belirlenmesi

4.2.12.1. *MMP9*



Şekil 4.29: *MMP9* geni için tüm hasta ve kontrol örneklerinde metilasyon oranlarına göre elde edilen erime eğrileri.

TAD hasta ve kontrol grupları ve metilasyon standartları ile yapılmış olan, *MMP9* geni MS-HRM analizinde elde edilen erime ve amplifikasyon eğrisi Şekil 4.29 ve Şekil 4.30’da verilmiştir.



Şekil 4.30: *MMP9* geni için tüm TAD hasta ve kontrol örnekleri ve DNA'sız kontrol (NTC) ile elde edilen amplifikasyon eğrisi.

TAD hasta ve kontrol grupları, *MMP9* geni MS-HRM analizinde elde edilen metilasyon kontrol standartlarının istatistiksel anlamlılık analizleri Tablo 4.19 ve Tablo 4.20'de verilmiştir.

Tablo 4.19: TAD hasta ve kontrol grupları *MMP9* geni MS-HRM analizinde kullanılan metilasyon standartlarının metilasyon yüzdesi ve $-dF/dT$ değerleri.

Metilasyon Düzeyi (%)	$-dF/dT$
100	0.2166
88	0.1808
70	0.1822
63	0.1780
50	0.1506
25	0.0800
0	0.0500

Tablo 4.20: *MMP9* geni için MS-HRM analizinde metilasyon yüzdesi ve $-dF/dT$ arasındaki ilişkinin Spearman korelasyonu ile gösterilmesi.

Spearman r Değeri	Güven Aralığı	P Değeri	Yorum
0.9429	%95	0.0167	Yüksek pozitif korelasyon

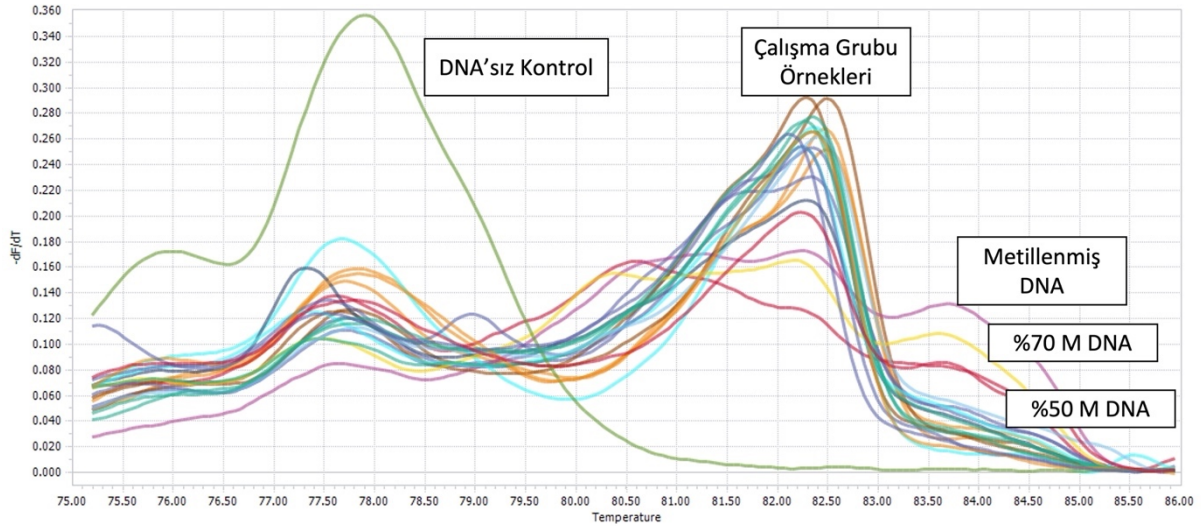
TAD hasta ve kontrol grubu örneklerinin *MMP9* geni için yapılan MS-HRM analizinde elde edilen ve “*LightCycler® 96 Application Software Version 1.1*” tarafından hesaplanan $-dF/dT$ (amplifikasyona bağlı ışımanın zamana göre türevi) değerleri metilasyon kontrol örneklerinden (pozitif ve negatif) oluşturulan standartlar (Tablo 4.19) ile kıyaslanmıştır.

Metilasyon kontrol standartlarının oluşturduğu değerlerle kıyaslandığında tüm TAD hasta ve kontrol grubu örneklerinin metilasyon yüzdesi “0” olarak belirlenmiştir (Tablo 4.19 ve Tablo 4.21). TAD hasta ve kontrol grubu örnekleri çift olarak çalışılmıştır. Elde edilen $-dF/dT$ değerleri ortalama değerdir.

Tablo 4.21: TAD hasta ve kontrol grupları *MMP9* geni MS-HRM analizinde elde edilen metilasyon yüzdesi ve $-dF/dT$ değerleri.

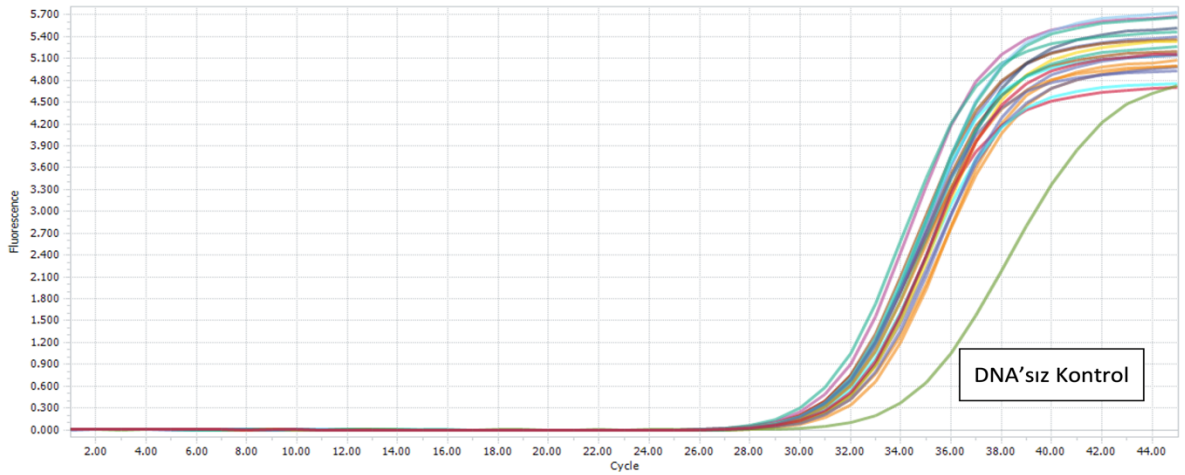
TAD Hasta Grubu	$-dF/dT$	Metilasyon Düzeyi (%)	Kontrol Grubu	$-dF/dT$	Metilasyon Düzeyi (%)
HD1	0.0208	0	KD1	0.0461	0
HD2	0.0320	0	KD2	0.0247	0
HD3	0.0207	0	KD3	0.0325	0
HD4	0.0183	0	KD4	0.0355	0
HD5	0.0452	0	KD5	0.0356	0
HD6	0.0337	0	KD6	0.0211	0
HD7	0.0195	0	KD7	0.0578	0
HD8	0.0354	0	KD8	0.0262	0
HD9	0.0552	0	KD9	0.0167	0
HD10	0.0625	0	KD10	0.0317	0

4.2.12.2. *TIMP3*



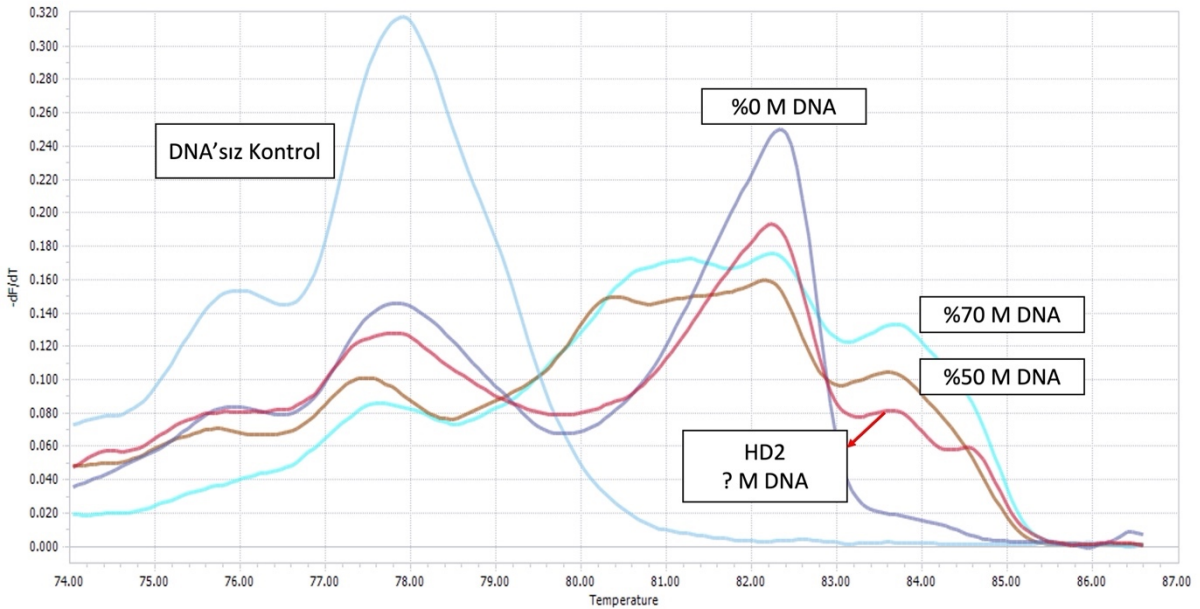
Şekil 4.31: *TIMP3* geni için tüm TAD hasta ve kontrol örneklerinde metilasyon oranlarına göre elde edilen erime eğrileri.

TAD hasta ve kontrol grupları ve metilasyon standartları ile yapılmış olan, *TIMP3* geni MS-HRM analizinde elde edilen erime ve amplifikasyon eğrisi Şekil 4.31 ve Şekil 4.32’de verilmiştir.



Şekil 4.32: *TIMP3* geni için tüm TAD hasta ve kontrol örnekleri ve DNA'sız kontrol (NTC) ile elde edilen amplifikasyon eğrisi.

TAD hasta ve kontrol grubu *TIMP3* geni MS-HRM analizi sonuçlarında elde edilen HD2'nin metilasyon pozitif kontrol örnekleriyle kıyaslamalı grafiği örnek olarak Şekil 4.33'te verilmiştir. Hasta ya da kontrol grubunda meydana gelen farklı piklerin görünümüne örnek olması açısından HD2 sonucu verilmiştir.



Şekil 4.33: *TIMP3* geni için HD2 (Hasta-Doku-2) ve kontrol örneklerinde metilasyon oranlarına göre elde edilen erime eğrileri.

TAD hasta ve kontrol grupları, *TIMP3* geni MS-HRM analizinde elde edilen metilasyon kontrol örneklerinin istatistiksel anlamlılık analizleri Tablo 4.22 ve Tablo 4.23'de verilmiştir.

Tablo 4.22: TAD hasta ve kontrol grupları MMP9 geni MS-HRM analizinde kullanılan metilasyon standartlarının metilasyon yüzdesi ve -dF/dT değerleri.

Metilasyon Düzeyi (%)	-dF/dT
100	0.1800
75	0.1203
50	0.0615
50	0.0497
25	0.0381
0	0.0106

Tablo 4.23: MS-HRM analizinde metilasyon yüzdesi ve -dF/dT arasındaki doğrusallık ilişkisinin Spearman korelasyonu ile gösterilmesi.

Spearman r Değeri	Güven Aralığı	P Değeri	Yorum
0.9856	%95	0.0056	Yüksek pozitif korelasyon

TAD hasta ve kontrol grubu örneklerinin TIMP3 geni için yapılan MS-HRM analizinde elde edilen ve “*LightCycler® 96 Application Software Version 1.1*” tarafından hesaplanan -dF/dT (amplifikasyona bağlı ışımanın zamana göre türevi) değerleri metilasyon kontrol örneklerinden (pozitif ve negatif) oluşturulan standartlar (Tablo 4.22) ile kıyaslanmıştır.

TAD hasta ve kontrol grubu örnekleri, *TIMP3* geni için kurulan MS-HRM reaksiyonunda metilasyon kontrol örneklerinden yalnızca %70 metillenmiş ve %50 metillenmiş örnekten sonuç alınabilmektedir. Bu sebeple metilasyon düzeyi kıyaslaması yapılması için farklı bir reaksiyonda sonuçları alınan metilasyon kontrol standardı sonuçları kullanılmıştır. Her iki reaksiyonda elde edilen eş metilasyon kontrol standardı değerleri birbirleri ile normalize edilerek kullanılmıştır. Metilasyon kontrol örneklerinin oluşturduğu değerlerle kıyaslanarak TAD hasta ve kontrol grubu örneklerinin metilasyon yüzdesi belirlenmiş ve Tablo 4.24’te verilmiştir.

Tablo 4.24: TAD hasta ve kontrol grupları *TIMP3* geni MS-HRM analizinde elde edilen metilasyon yüzdesi ve -dF/dT değerleri.

Hasta Grubu	-dF/dT	Metilasyon Düzeyi (%)	Kontrol Grubu	-dF/dT	Metilasyon Düzeyi (%)
HD1	0.03023	0	KD1	0.03665	0
HD2	0.06565	50	KD2	0.03957	25
HD3	0.03622	0	KD3	0.03691	0
HD4	0.04036	25	KD4	0.03987	25
HD5	0.03176	0	KD5	0.02834	0
HD6	0.03195	0	KD6	0.03237	0
HD7	0.03569	0	KD7	0.06353	50
HD8	0.02932	0	KD8	0.03672	0
HD9	0.04336	25	KD9	0.03007	0
HD10	0.03355	0	KD10	0.04104	25

TIMP3 geni için MS-HRM analizi sonucunda elde edilen metilasyon değerlerinin TAD hasta ve kontrol grubu arasında anlamlı bir fark gösterip göstermediğinin belirlenebilmesi yapılan “*Mann Whitney U*” testinin sonuçları Tablo 4.25’te verilmiştir. Ayrıca *TIMP3*’ün metilasyon düzeyinin diyagnostik olarak kullanım değerinin kontrol edilmesi için yapılan ROC analizi sonucu da Tablo 4.25’te verilmiştir.

Tablo 4.25: *TIMP3* geni metilasyon yüzdesine göre TAD hasta ve kontrol gruplarında istatistiksel anlamlılık sonuçları.

Gen	Mann Whitney Testi		ROC Analizi		
	P Değeri	AUC	Standart Hata	P Değeri	%95 Güven Aralığı
<i>TIMP3</i>	0.90	0.54	0.13	0.73	0.28-0.80

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

İnsan vücudunda bulunan en büyük atar damar olan aort, kalbin üst kısmından çıkış yapan ve tüm vücuda oksijenle zengin kanı ulaştırmakla görevli olan damardır ve dıştan içe doğru 3 tabakadan meydana gelir; adventisya, medya ve intima. Torasik aort diseksiyonu (TAD), aortun intima ve medya tabakasında yırtık ile ortaya çıkan, kısa süre içerisinde tedavi edilmezse ölümle sonuçlanabilen tehlikeli bir durumdur. TAD’da intima tabakasında meydana gelen yırtık, damar boyunca ilerleyerek tabakaların birbirinden ayrılmasına, damar içerisindeki kanın oluşan bu yeni yalancı lümen içerisine dolmasına ve aort damarının ciddi bir şekilde zayıflamasına sebep olur [6]. TAD için, sigara kullanımı, yaş, cinsiyet, hipertansiyon, kalıtsal bağ doku bozuklukları ile karakterize hastalıkların varlığı belirlenmiş olan risk faktörlerindendir. TAD genetik geçişli olabileceği gibi sporadik olarak da görülmektedir. Kayıt altına alınan TAD vakalarının büyük bir bölümü (>%70) sporadik vakalar oluşturmaktadır. Hem genetik geçişli hem de sporadik vakalarda reaktif oksijen türleri (ROS) üretimi, stres sinyal aktivasyonu gibi yolların fonksiyonlarını arttıracak şekilde pozitif yönde düzenlenmesi sonucunda düz kas hücrelerinin (SMC) yanlış fonksiyon göstermesi ve hücre ölümü, hücreler arası matriks (ECM) yıkımı ve aort bölgesinde enflamasyon görülmektedir. Görülen bu değişik düzenlenmeler TAD’ın ortaya çıkmasına katkı sağlamaktadır [6]. Tez kapsamında torasik aort diseksiyonu (TAD) tanısı almış hastaların ameliyatları sırasında literatür ile uyumlu olarak çıkan aortta, yırtığın başladığı bölgeden alınan >5mm boyutundaki damar dokusu [52][55][74][78] ve periferik kan dokusu örnekleri ile çalışılmıştır. Kontrol grubu örnekleri yine literatür ile uyumlu olarak koroner arter hastalığı sebebiyle opere olan ve damar proksimal anastamozları asendan aortaya implante edilen hastaların proksimal anastamoz için asendan aortada hazırlanan bölgesinden alınarak oluşturulmuştur [55].

Tez çalışmasında, TAD grubu ve kontrol grubunun, yaş, boy, kilo, beden kitle endeksi (BKİ), sigara kullanımı, cinsiyet ve hipertansiyon açısından değerlendirilmiştir. Hasta ve kontrol gruplarında sırası ile yaş; 53.80 ± 3.15 , 55.10 ± 1.95 , boy; 167.30 ± 2.26 , 167.60 ± 2.08 , kilo; 84.20 ± 3.60 , 80.80 ± 2.24 , BKİ; 30.29 ± 1.67 , 28.99 ± 1.42 , sigara; %40 kullanmıyor, %20 kullanmıyor, cinsiyet; %20 kadın, %20 kadın; hipertansiyon; %100 var, %80 var şeklinde elde edilmiştir. Sürekli ve sürekli değişkenler için parametrik olmayan “*Mann Whitney U*” testi ve kategorik değişkenler için ise uygulanan “*Fisher’s Exact Test*” sonucunda kontrol edilen parametrelerin hasta ve kontrol grubu arasında anlamlı bir fark içermediği bulunmuştur (Yaş;

$p=0.49$, Boy; $p=0.90$, Kilo; $p=0.25$, BKİ; $p=0.39$, Sigara kullanımı; $p=0.63$, Cinsiyet; $p=0.99$, Hipertansiyon öyküsü; $p=0.47$). Elde edilen bu sonuçlara göre söz konusu parametrelerin incelenen çalışma grubunda TAD için bir risk faktörü olarak değerlendirilemeyeceği söylenebilir.

Matriks metalloproteinazlar (MMP) büyük bir çinko endopeptidaz ailesidir. Çok farklı hücre tipinde anlatımı gerçekleştirilen bu hücre içi enzimlerin ECM'yi oluşturan proteinleri parçalayabilme yetenekleri vardır. Ayrıca ECM'nin yeniden düzenlenmesinde ve yara iyileşmesinde de aktif rol oynamaktadırlar [28]. MMP'lerin aktivite gösterdiği dokulardan bir tanesi de aort damarıdır. Aorta esneklik ve dayanıklılığını sağlayan ECM'nin ana bileşenlerinden olan kolajen gibi elastik fiberler ve peptidoglikanlar MMP'lerin substratı oldukları için MMP'ler bu molekülleri parçalayabilirler. MMP'lerin aort damar dokusunda ECM bileşenlerini parçalaması ile dayanıklılığını kaybeden aortta bulunan düz kas hücreleri, hücreler arası matrikse tutunamaz duruma gelir. Bu tutunamama hali dokuda fonksiyon kaybına ve nihayetinde hücre ölümüne ve aort damarında yırtığa yol açarak TAD oluşumuna sebep verir [3, 29]. Literatürde yer alan çalışmalarda MMP'lerin gen anlatım düzeylerinin TAD vakalarında farklılaştığı gösterilmiştir [51, 52, 53, 55]. TAD patofizyolojisinde önemli bir yeri olan MMP'lerin dokudaki degradasyon fonksiyonu MMP'lerin doku inhibitörleri (TIMP) tarafından da düzenlenebilmektedir [25, 26]. TAD vakalarında ECM degradasyonunun artışı sebebiyle artmış fonksiyon gösterdikleri düşünülen MMP'lerin, bu fonksiyonlarını TIMP'lar tersine çevirebilir [43].

TAD vakalarında aort damarının medya tabakasında karakteristik olarak meydana gelen SMC'lerin apoptozu ve ECM degradasyonuna artmış bir enflamasyon da eşlik etmektedir. İntima tabakasında yırtığın ilk başladığı bölgede göç etmiş olan T lenfosit, makrofaj ve nötrofil gibi hücrelerin bulunması TAD tablosunda enflamasyonun varlığını doğrular niteliktedir. TAD vakalarında damar dokusunda fazla miktarda makrofaj bulunur. Monositler makrofajların olgunlaşmadan önce sirkülasyonda bulunan öncül hücreleridir. Monositler de TAD tablosunda aort damarına çekilmektedir. Bunun sebebinin TAD'da parçalanmış olan ECM kalıntıları olabileceği bildirilmiştir. Ek olarak TAD'ın risk faktörlerinden olan aort anevrizmasında hastaların dolaşımlarındaki monositlerin aort damarına daha fazla çekildiği ve MMP9 üretimini arttırdığı bildirilmiştir [6, 79]. Lu ve diğ. (2020) yaptığı çalışmada öncelikle CD14+ monositlerin TAD hastalarında kontrol grubuna göre artmış olduğunu ve TAD tablosunda

gözlenen ECM degradasyonundan sorumlu genlerin ifadelerinde de değişiklik gözlemlendiğini bildirmişlerdir [80]. Ek olarak TAD hastalarında kontrol grubuna göre monositlerin hücre yüzey reseptörlerine göre ayrıldıkları alt popülasyonlarda da farklılıklar olduğu, “klasik” olarak isimlendirilen $CD14^+/CD16^-$ popülasyonunun hasta bireylerde kontrollere oranla arttığı bildirilmiştir [81]. Monositlerin TAD vakalarında sirkülasyondan aort duvarına çekildikleri, ECM degradasyonu ve aort anevrizmasında MMP ifadesi ile ilişkilendirildikleri bilinmektedir [6][79]. Monositler periferik kanda kolay elde edilebilmeleri sebebiyle TAD tanısı açısından kolay ulaşılabilir bir bilgi kaynağıdır. Tüm bu özellikleri monositleri TAD tablosunda önemli bir hücre grubu yapmaktadır. TAD vakalarında gösterdikleri artış ve aort damarında meydana gelen moleküler değişikliklerin yansımaları gösterebilme potansiyelleri monositleri TAD için yapılan biyobelirteç çalışmaları açısından iyi bir aday konumuna getirebilir. Tez çalışması kapsamında aort damar dokusunun yanında hem TAD vakaları hem de kontrol grubu örneklerinden kan dokusu da elde edilerek çalışmada incelenecek kaynak dokulara eklenmiş ve tez kapsamı genişletilmiştir. TAD grubunda 10 hastadan alınan aort dokusu ve kan dokusu (10 aort damar dokusu ve 10 periferik kan örneği) ve kontrol grubu için 10 kişiden alınan aort dokusu ve kan dokusu (10 aort damar dokusu ve 10 periferik kan örneği) ile çalışılmıştır. Tez çalışmasındaki amaçlarımız:

1. TAD grubunun aort damar dokusu ile kontrol bireylerden oluşturulan kontrol grubunun damar dokusunda bulunan *MMP2*, *MMP9*, *TIMP2* ve *TIMP3* hedef genlerin mRNA düzeyinde anlatımlarını belirlemek,
2. Çalışma gruplarından elde edilen periferik kan kökenli monosit hücrelerdeki *MMP2*, *MMP9*, *TIMP2* ve *TIMP3*’ün gen anlatımlarını belirleyip, TAD tablosunda aort damar dokusundaki gen anlatımı miktarları ile karşılaştırarak parçalanmış aorttaki gen anlatımının periferik kanda moleküler düzeyde bir yansımalarının olup olmadığını incelemek,
3. Gen anlatımı incelenen *MMP2*, *MMP9*, *TIMP2* ve *TIMP3* genlerinin promotör bölgelerindeki metilasyonları analiz ederek, metilasyon düzenlerinin genlerin gen anlatımı miktarları ve TAD tablosu ile olan ilişkisini araştırmaktır.

Tez çalışması kapsamında TAD vakalarından alınan aort damar dokusu örneklerinde, kontrol grubu örneklerine kıyasla *MMP2* gen anlatımının değişmediği ($p=0.85$); TAD vakalarından elde edilen $CD14^+$ monosit hücre örneklerinde, kontrol grubu örneklerine kıyasla *MMP2* gen

anlatımının 1.1 kat azaldığı ($p=0.15$) belirlenmiştir. Ancak istatistiksel anlamlılığa ulaşamamıştır. Monositlerdeki *MMP2* değerinin damar dokusundan elde edilen gen anlatım değerini yansıtip yansıtmadığının incelenmesi için yapılan *Spearman* korelasyon analizi sonucunda ($MMP2_{doku}$, $MMP2_{kan}$) $r = -0.77$ ve $p=0.10$ olarak elde edilmiştir. Elde edilen p değerine bakıldığında monosit hücrelerdeki *MMP2* anlatımı ile aort damarında bulunan *MMP2* anlatımı arasında bir korelasyon elde edilememiştir. Buna bağlı olarak monosit hücrelerdeki *MMP2* anlatımının, aort damarındaki *MMP2* gen anlatımını yansıttığı söylenememektedir.

TAD vakalarında dokuda yapılan çalışmalar incelendiğinde Manabe ve diğ. (2004) tarafından yapılan, ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) yönteminin kullanıldığı, 30 TAD hastası ve 16 sağlıklı kontrol aort damarı örneğine ait çalışmada *MMP2* ekspresyonunun aort damarında anlamlı düzeyde azaldığı bildirilmiştir [55]. TAD hastalarında görülen azalmış *MMP2* anlatımının hastalarda yırtılma öncesinde medya tabakasının yenilenme kapasitesindeki kronik bir azalışı temsil ettiğini bildirmişlerdir [55]. Zang ve diğ. (2014) tarafından ELISA yöntemi ile TAD hastalarında yapılan çalışmada da *MMP2* anlatımının aort damar dokusunda anlamlı düzeyde azaldığı belirlenmiştir [82]. *MMP2* üretiminin aort damar dokusundaki düz kas hücrelerinde gerçekleşiyor olması [52] ve TAD başlangıcında hücreler arası matriksin yıkımı ile bağlantılarını kaybeden düz kas hücrelerinin apoptoza gitmesiyle meydana gelen düz kas hücresi kaybı, Zang ve arkadaşları tarafından TAD vakalarında azalan *MMP2* gen anlatımının bir sebebi olarak görülmektedir. Ayrıca literatürde TAD hastalarında hem artmış hem de azalmış *MMP2* anlatım seviyeleri elde eden çalışmaların olmasının, kullanılan hasta örneklerinin hastalığın farklı aşamalarında elde edilmiş olması ile ilgili olabileceği vurgulanmıştır[82]. Akiyama ve diğ. (2006) tarafından aort diseksiyonu hastalarında yapılan çalışmada hastalığın farklı evrelerinde elde edilmiş 3 grup ile çalışılmıştır (akut (0-4 gün), ara dönem (13 gün-4 ay), iyileşme görülen (> 4 ay)). *MMP*'lerin doku yeniden düzenlenmesindeki etkilerini göstermek için yaptıkları bu çalışmada her üç grupta *MMP2* anlatımının tip 1 prokolajen ve platelet kaynaklı büyüme faktör reseptörü- β (PDGF R β -“*platelet-derived growth factor receptor β* ”) proteini ile ilişkisine bakmışlardır. Diğer gruplarla kıyaslandığında ara dönem grubunda *MMP2* anlatımının intima tabakasında ve adventisya tabakasında iç şeklinde hücreler içinde gerçekleştiğini ve bu anlatımın tip 1 prokolajen anlatımı ve PDGF-R β proteini ile eşleştiğini bulmuşlardır. Buradan hareketle Akiyama ve diğ. (2006) *MMP2*'nin sadece aortik dokunun yıkımı ile ilgili olmadığını, iyileşme süreci ile bağdaştırılabilecek doku yeniden düzenlenmesiyle de ilişkisinin olduğunu göstermişlerdir [83]. Tez çalışması sonucunda elde

edilen TAD hastalarının aort damar dokularında anlamlı bir fark göstermeyen *MMP2* anlatımı da hasarlı damarda yenilenme kapasitesinin azalmış olması, oluşan yırtığın tamir edilemeyerek büyümesi ve nihayetinde TAD tablosunun ortaya çıkması ile ilişkilendirilebilir.

Tez çalışması kapsamında TAD vakalarından alınan aort damar dokusu örneklerinde, *MMP9* gen anlatımının kontrol grubu örneklerine kıyasla 2.5 kat azaldığı ($p=0.043$); monosit hücre örneklerinde ise 2.8 kat azaldığı ($p=0.11$) belirlenmiştir. *MMP9* geni için aort damar dokusunda yapılan ROC eğrisi analiziyle elde edilen yüksek AUC =0.77 ve anlamlı düzeydeki $p=0.04$ değerleri *MMP9*'un TAD vakalarında biyobelirteç adayı olabileceğini göstermektedir. Aort damar dokusu ile monosit hücrelerde elde edilen gen anlatım değerlerinin birbirlerini yansıtma düzeylerinin belirlenmesi için yapılan *Spearman* korelasyonu analizi sonucu (*MMP9_{doku}*, *MMP9_{kan}*) $r=0.27$, $p=0.49$ olarak elde edilmiştir. Elde edilen p değeri istatistiksel olarak anlamlı bulunmamış ve aort damar dokusundaki *MMP9* gen anlatımı ile monosit hücrelerde bulunan *MMP9* gen anlatımı arasında korelasyonun var olmadığı belirlenmiştir.

TAD vakalarında aort damar dokusunda Sangiorgi ve diğ (2006) tarafından gerçekleştirilen çalışmada *MMP9* konsantrasyonu araştırılmıştır ve akut fazda aort damar dokusunun intima ve medya tabakasında yapılan immunohistokimya ve “*westernblot*” analizlerinde düşük/orta ekspresyon gösterdiği tespit edilmiştir. [53]. Sangiorgi ve arkadaşlarına göre *MMP9*'un mekanik hasara duyarlı olarak artış göstermesi, yırtığın başlangıcındaki ve ilerleyen zamanlardaki *MMP9* değişimini açıklayabilir niteliktedir. Hücreler arası matrikste meydana gelen değişimler TAD vakalarında aortta basınç ve tansiyonun yüksek olduğu hassaslaşmış bir bölgede meydana gelir. Bu mekanik sinyal yırtık ile sonuçlanabilecek ilk oluşum aşamasında *MMP9*'un anlatımında meydana gelen değişiklikleri açıklayabilir. Yırtık oluşumundan sonra mekanik uyarının ortadan kalkması ile TAD vakalarında görülen azalan *MMP9* düzeyi ilişkilendirilebilir [53]. Manabe ve diğ. (2004) tarafından TAD vakalarında aort damarında *MMP9* anlatımının ELISA yöntemiyle incelendiği çalışmada, *MMP9*'un TAD vakalarında anlamlı bir değişiklik göstermediği ortaya koyulmuştur. Manabe ve arkadaşlarına göre *MMP9* geni, aort diseksiyonu başlamasıyla parçalanması gerçekleşen medya tabakasının yara iyileşmesi sürecinde (“*wound-healing*”) aktivite göstermektedir. TAD'da medya tabakasının parçalanması ve kaybedilmesi, azalan *MMP9* anlatımını açıklayabilir. Ayrıca *MMP9*'un doku hasarlarında akut fazda farklı bir kaynak olarak makrofajlar tarafından sentezlendiği de vurgulanmıştır [55]. Tez çalışması sonucunda TAD hastalarının aort damar dokularında azalan

MMP9 anlatımı, TAD başlangıcında yırtığın ilk meydana geldiği andan sonra hastalığın ilerleme seyrinde *MMP9* anlatımının azalması ile ilişkilendirilebilir. Buna bağlı olarak tez çalışması kapsamında aort damar örneklerinin yırtılmanın olduğu akut fazda (yırtılmanın meydana geldiği faz) alındığı zaman aralığının, *MMP9* geninin elde edilen azalmış gen anlatımını açıklayan bir etken olabileceği düşünülmektedir. *MMP9*'un TAD vakalarındaki anlatımının, diseksiyon sırasında parçalanan medya tabakasının iyileşmesi ("wound-healing") ile de ilişkilendirilmiş olması ve bu tabakanın aort diseksiyonunda kısmen de olsa kaybedilmiş olması ve iyileşmenin akut fazda henüz başlamamış olması *MMP9* anlatımında tez çalışması kapsamında elde edilen azalmayı açıklayabilir. Ayrıca *MMP*'lerin tek başlarına değil diğer *MMP*'ler ve düzenleyicileri olan *TIMP*'lar ile koordineli bir şekilde fonksiyon göstermelerinin, TAD vakalarında elde edilen gen anlatım miktarlarını doğrudan etkilediği düşünülmüştür.

Yapılan tez çalışmasında TAD vakalarından alınan aort damar dokusu örneklerinde, kontrol grubu örneklerine kıyasla *TIMP2* gen anlatımının 1.7 kat azaldığı ($p=0.0089$), *TIMP3* gen anlatımının 3.1 kat azaldığı ($p=0.028$) tespit edilmiştir. TAD vakalarından elde edilen monosit hücre örneklerinde, kontrol grubu örneklerine kıyasla *TIMP2* gen anlatımının 1.1 kat arttığı ($p=0.25$), *TIMP3* geninin 4.6 kat azaldığı ($p=0.37$) tespit edilmiştir. Ancak monosit hücrelerde *TIMP2* ve *TIMP3* geninin p değerleri için istatistiksel anlamlılık düzeyine ulaşamamıştır. Aort damar dokusu ve monosit hücrelerdeki gen anlatımları için yapılan "Spearman" korelasyon analizi sonucu $TIMP2_{doku} - TIMP2_{kan}$ için $r=0.50$, $p=0.14$; $TIMP3_{doku} - TIMP3_{kan}$ için $r=-0.52$, $p=0.20$ olarak bulunmuştur. Elde edilen p değerleri istatistiksel olarak anlamlı bulunmamış ve aort damar dokusundaki *TIMP2* ve *TIMP3* gen anlatımları ile monosit hücrelerde bulunan *TIMP2* ve *TIMP3* gen anlatımları arasında korelasyonun olmadığı belirlenmiştir. *TIMP2* ve *TIMP3* genleri için aort damar dokusunda yapılan ROC eğrisi analizleri sonucunda elde edilen yüksek AUC =0.84, AUC =0.80 ve anlamlı düzeydeki $p=0,01$, $p=0,03$ değerleri *TIMP2* ve *TIMP3*'ün TAD vakalarında biyobelirteç adayı olarak değerlendirilebileceklerini düşündürmektedir.

Manabe ve diğ. (2004) tarafından ELISA yöntemi kullanılarak 30 aort diseksiyonu hastası ve 16 sağlıklı kontrol örneği ile yapılmış bir çalışmada, *TIMP2* ekspresyonunun hasta dokularda sağlıklı kontrol dokulara göre anlamlı düzeyde azaldığı belirtilmiştir. Manabe ve arkadaşları *TIMP2*'nin azalan anlatımının TAD'da yıkım sonrasında yara iyileşmesi için ortaya çıkan bir tepkiyi değil, yıkım öncesi durumu temsil ediyor olabileceğine dikkat çekmiştir. Ayrıca azalmış

olan TIMP2 miktarının hücre içerisindeki proteolitik dengeyi matriks yıkımı yönüne kaydırıldığını belirtmiştir [55]. Kimura ve diğ. (2017) tarafından yapılan bir çalışmada MMP'ler üzerinde geniş düzenleme etkisi olan *TIMP3*'ün TAD hastalarında mRNA düzeyinde anlamlı olarak azaldığı gösterilmiştir. Ayrıca *TIMP3* anlatımının TNF- α (Tümör nekroz faktörü α) ve TGF- β (Dönüştürücü büyüme faktörü β) sitümülasyonu altında in vitro olarak aortik düz kas hücrelerinde azaldığı bildirilmiştir. In vitroda *TIMP3* anlatımının TGF- β sitümülasyonu ile azalması sebebiyle TAD vakalarında elde edilen azalmış *TIMP3* anlatımının da TGF- β sitümülasyonu ile açıklanabileceği düşünülmüştür. TGF- β tarafından düzenlenen azalmış *TIMP3* gen anlatımı ve buna bağlı olarak etkilenebilecek MMP'ler arasındaki MMP ve TIMP düzensizliklerinin, diseksiyon öncesi medya tabakasında meydana gelen bozulma ile ilişkili olabileceği bildirilmiştir [78]. TGF- β 'nın ECM'nin kolajen içeriğinin oluşumundaki rolü, fibroz oluşumundaki etkisi ve buna bağlı olarak *MMP2* ve *MMP9* anlatımını arttıran sürece dahil olması [4] göz önüne alındığında, *TIMP3* anlatımını etkileyen TGF- β sitümülasyonunun aynı zamanda *MMP2* ve *MMP9* anlatımlarını da etkileyebilme potansiyeli olduğu görülmüştür. Tez kapsamında aort damarında elde edilen anlamlı düzeyde azalmış *TIMP2* ve *TIMP3* gen anlatımı seviyeleri söz konusu çalışmalar ile uyumludur [55, 78]. TAD vakalarında *TIMP2* ve *TIMP3* genlerinin aort damar dokusunda mRNA düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azalmış olmasının, diseksiyon öncesinde gerçekleşen TGF- β düzenlemesi ile ilgili olabileceği düşünülmüştür. Azalan *TIMP2* ve *TIMP3* gen anlatımının hücre içerisindeki proteolitik dengeyi matriks yıkımı lehine çevirmesi de, TAD tablosu ile ilişkilendirilmiştir.

Lu ve diğ. (2020) tarafından yapılan çalışmada Stanford Tip B aortik diseksiyon vakalarının monosit hücrelerindeki *MMP2*, *MMP9* ve *TIMP2* genlerinin mRNA düzeyindeki ifadeleri incelenmiştir. Yapılan çalışmada *MMP2* ve *MMP9* gen anlatımları, monosit hücrelerde TAD grubunda kontrol grubuna göre değişiklik göstermezken, *TIMP2* geninin gen anlatımının TAD vakalarında anlamlı düzeyde azaldığı bildirilmiştir [80]. TGF β , hücreler arası matriksin yapısında bulunan kolajen I, II, III 'ü de içeren birçok faktörün anlatımını arttıracak şekilde düzenler. TGF β sinyali ayrıca TAD oluşumunu destekleyebilecek *MMP2* ve *MMP9* anlatımını arttırarak ECM'nin yıkımını da gerçekleştirebilir [4, 54]. Lu ve arkadaşları yaptıkları çalışmada, Stanford Tip B diseksiyon hastalarından elde ettikleri monosit hücrelerde hem *MMP2* ve *MMP9* genlerinin anlatımlarının TAD vakalarında kontrol gruba göre değişmediğini hem de aortik damar bozukluklarını tetikleyen TGF β -SMAD3 (Dönüştürücü Büyüme Faktörü β - "Suppressor of Mothers against Decapentaplegic3") anlatımlarının azalmış olduğunu

bildirmiştir. Elde edilen monosit hücrelerde anlatımı azalmış olarak bulunan TGFβ'nın TAD hastalarında *MMP2* ve *MMP9* genlerinin değişmeyen anlatımlarını açıklayabileceği düşünülmüştür [80]. Yapılan tez çalışmasında TAD vakalarından elde edilen monosit hücrelerde *MMP2* geni kontrol dokulara göre istatistiksel olarak anlamlı olmamakla birlikte 1.1 kat azalmış olarak bulunmuştur. *MMP9* geninin TAD vakalarından elde edilen monosit hücrelerde istatistiksel olarak anlamlı olmasa da 2.8 kat azaldığı belirlenmiştir. Lu ve diğ. (2020) tarafından yapılan çalışmada monosit hücrelerde elde edilen anlatımı azalmış TGFβ-SMAD3 ve bu sinyal yolağının MMP'ler üzerindeki düzenleme etkisi dikkate alındığında, tez çalışmasında elde edilen *MMP2* ve *MMP9* genlerinin TAD vakalarında anlamlı olarak değişmeyen anlatım değerlerinin, TAD vakalarında azalan TGFβ-SMAD3 sinyali ile ilişkili olabileceği düşünülmüştür. Yürütülen tez çalışmasında *TIMP2* geni kontrol dokulara göre istatistiksel olarak anlamlı olmamakla birlikte 1.1 kat artmış, *TIMP3* geni ise 4.6 kat azalmış olarak bulunmuştur. *TIMP2* ve *TIMP3* genlerinin tez çalışmasındaki istatistiksel olarak anlamlı düzeyde değişmeyen anlatımları da TAD vakalarında azalmış olan TGFβ-SMAD3 sinyali ile ilişkili olabilir. Lu ve arkadaşları yaptıkları çalışmada Stanford Tip B hastalarını kullanmışlardır. Yürütülen tez çalışmasının hasta grubu olan Stanford Tip A diseksiyon hastaları kullanılmamıştır. Ancak elde edilen sonuçların TAD patogenezi düşünüldüğünde benzer olabileceği düşünülmektedir.

TAD'da görülen doku parçalanması ile ilişkilendirilen MMP'lerin, dokuda kendilerinin doğal inhibitörleri olan TIMP'lar ile eş zamanlı olarak bulundukları bilinmektedir. TAD tablosunda yalnızca MMP ve TIMP'larda görülen anlatım değişikliğinin değil aynı zamanda vasküler duvardaki MMP/TIMP dengesinin de hücreler arası matriksin parçalanması ve sentezlenmesi sürecinde düzenleyici rol oynadığı ve MMP/TIMP oranındaki artışla hücre içerisinde parçalanma faaliyetlerinin arttığı bildirilmiştir [4, 33]. Bu tez çalışması kapsamında gen anlatım miktarları analiz edilen *MMP2*, *MMP9*, *TIMP2* ve *TIMP3* genlerinin hem aort damar dokusunda hem de periferik kandan elde edilen monosit hücrelerde birbirleri ile olan anlatım oranları da incelenmiştir. Yürütülen tez çalışması sonucu aort damar dokusunda, TAD hasta grubunda kontrol grubuna göre *MMP2/TIMP2* oranının arttığı ($p=0.063$), *MMP9/TIMP2* oranının arttığı ($p=0.25$), *MMP2/TIMP3* oranının anlamlı düzeyde arttığı ($p=0.012$) ve *MMP9/TIMP3* oranının arttığı ($p=0.80$) bulunmuştur.

Manabe ve diğ. (2004) tarafından ELISA yöntemi kullanarak aort damar dokusunda gerçekleştirilen çalışmada MMP2 ve TIMP2'nin ekspresyonunun anlamlı düzeyde azaldığı, MMP9 anlatımının da istatistiksel olarak anlamlı düzeyde değişmediğini ortaya koyulmuştur. Buna bağlı olarak TIMP2/MMP2 ve TIMP2/MMP9 oranlarının kontrol dokuya kıyasla hastalarda önemli ölçüde azaldığını ve bu azalışın damar dokusunda yırtılma ile sonuçlanan bir hassasiyet oluşturmuş olabileceğini bildirmişlerdir [55]. Tez kapsamında elde edilen, istatistiksel anlamlılık düzeyine ulaşmasa da artmış *MMP2/TIMP2* ve *MMP9/TIMP2* oranları Manabe ve diğ. (2004) tarafından yapılan çalışmada bulunan TIMP/MMP oranları ile uyumludur. MMP/TIMP oranı için tez çalışması kapsamında seçilen hedef genlerin *TIMP3* ile oranlarının TAD vakalarında incelendiği çalışmaya literatürde rastlanmamıştır. TAD hastalarında aort damar dokusunda artmış olan *MMP2/TIMP2* ($p=0.063$), *MMP9/TIMP2* ($p=0.25$), *MMP2/TIMP3* ($p=0.012$), *MMP9/TIMP3* ($p=0.80$) oranlarının aort damarında hücre içindeki yıkım dengesini parçalanma lehinde değiştirerek TAD tablosunun oluşumuna katkı sağladığı düşünülmüştür. Aort damar dokusunda kontrollere göre anlatımı değişmeyen *MMP2*, aort damar dokusunda kontrollere göre anlatımı azalan *TIMP2* ile birlikte değerlendirildiğinde, *MMP2/TIMP2* oranındaki artışın TAD tablosundaki ECM parçalanmasını açıklayacak yönde olduğu görülmüştür. Ayrıca “*Spearman*” korelasyon analizi sonucunda elde edilen (*TIMP2_{doku}* – *MMP2_{doku}*) $r=0.93$ ve $p=0.0003$ değerleri *MMP2* ve *TIMP2*'nin TAD vakalarının aort damar dokusunda birlikte azaldığını göstermektedir. *MMP2* değişiminin TAD vakalarında anlamlı olmaması, hem *TIMP2*'deki azalmanın TAD üzerinde daha dramatik bir etkisinin olduğunu göstermekte hem de MMP/TIMP oranını arttıran bir etken olarak TAD oluşumunu desteklemektedir. Birbirleri arasında inhibisyon ilişkisi olan *MMP2* ve *TIMP3* 'ün aort damar dokusundaki gen anlatımlarının birlikte değerlendirilmesi (*MMP2/TIMP3* ($p=0.012$)) TAD tablosunda MMP/TIMP oranına göre proteolitik yöne kayan dengeyi açıklayabilir niteliktedir. Ayrıca *MMP2/TIMP3* oranı için aort damar dokusunda yapılan ROC eğrisi analizi sonuçlarında elde edilen yüksek AUC =0.83 ve anlamlı düzeydeki $p=0,01$ değerlerine göre *MMP2/TIMP3* oranının TAD vakalarında biyobelirteç adayı olarak kullanılabileceği düşünülmüştür.

Periferik kandan elde edilen monosit hücrelerde ise *MMP2/TIMP2* ($p=0.45$) ve *MMP9/TIMP2* ($p=0.80$) oranları hasta grubunda kontrol grubuna göre artmış, *MMP2/TIMP3* ($p=0.68$) ve *MMP9/TIMP3* oranları ($p=0.28$) hasta grubunda kontrol grubuna göre azalmıştır. Tez çalışması kapsamında MMP/TIMP oranlarının monosit hücrelerdeki sonuçlarına bakıldığında ise, *MMP2/TIMP2* ve *MMP9/TIMP2* oranlarının aort dokusu ile paralel olarak artış gösterdiği

bulunmuştur. Bu durum monosit hücrelerdeki gen anlatımının aort damar dokusunu temsil etmesi açısından önemli olmakla birlikte, oranların p değerlerinin istatistiksel anlamlılık sınırının dışında kalması ve *MMP2* ve *MMP9* gen anlatımlarında “*Spearman*” korelasyon analizinde monosit-doku arasında herhangi bir ilişkinin gözlemlenememiş olması, monositlerin TAD vakalarında aort damar dokusunu temsil edebilir bir konumda olmadığını düşündürmektedir. *MMP2/TIMP3* ve *MMP9/TIMP3* oranlarının TAD’ın moleküler patogeneze ters bir şekilde monosit hücrelerde azalmış olması monositlerin TAD’da aort damar dokusunu temsil edebilir bir konumda olmadığını desteklemektedir.

DNA dizisinde herhangi bir değişiklik meydana gelmeden gen anlatımının düzenlendiği ve kalıtsal olabilen değişiklikler epigenetik olarak adlandırılır. Literatür incelendiğinde kalp yetmezliği, normalin dışında kardiyovasküler gelişim gibi birçok kardiyovasküler hastalıkta DNA metilasyonunun düzenleyici olduğunu gösteren çalışmalar mevcuttur [58][59][60]. Aort damarı hastalığı olarak incelenebilecek TAD için ise özellikle DNA metilasyonu özelinde yapılmış fazla çalışma bulunmadığı belirtilmiştir [57].

Tez çalışması kapsamında aort damar dokusunda gen anlatımları incelenen *MMP2*, *MMP9*, *TIMP2* ve *TIMP3* genlerinin promotör bölgelerindeki metillenme düzeyi metil sensitif yüksek çözünürlüklü erime (MS-HRM) yöntemi ile incelenmiştir. *MMP9* geninin promotör bölgesinde incelenen 96 bazlık bölgede 10 TAD hastası ve 10 sağlık kontrol örneklerinin hiçbirinde metillenme gözlenmemiştir. *TIMP3* geninin promotör bölgesinde incelenen 126 bazlık bölgede TAD hasta grubunda ortalama metillenme düzeyi %10 olarak bulunurken, kontrol grubunda %12.5 olarak belirlenmiştir. TAD ve kontrol gruplarının metilasyon düzenleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı ($p=0.91$) bulunmuştur. Hasta özelinde sonuçlar incelendiğinde ise bir TAD hastasının *TIMP3* geninin promotör bölgesinde %50; iki TAD hastasında %25 oranında metillenme olduğu görülmüştür. Kontrol grubundaki metillenme oranları bir kişide %50; üç kişide ise %25 olarak belirlenmiştir. Literatürde TAD vakalarında etkin olabileceği düşünülen genlerin metilasyon düzenlerini araştıran çalışmalar oldukça kısıtlıdır. Skorvanova ve diğ. (2020) tarafından yapılan çalışmada TAD için belirtilen risk faktörlerinden biri olan aort anevrizması gösteren hastalarda; *MMP2*, *TIMP2*, *MMP9* ve *TIMP1* genlerinin promotör bölgelerinde metilasyon durumları metilasyon spesifik polimeraz zincir reaksiyonu (MS-PZR) ile incelenmiştir. Çalışma sonucunda hedeflenen genlerin TAD vakalarındaki metilasyon düzeylerinin kontrol grubu ile anlamlı bir fark göstermediği

bildirilmiştir [84]. Buna bağılı olarak TAD risk faktörlerinden olan anevrizma oluşumunda, incelenen hedef genlerin epigenetik olarak düzenlenmediklerini vurgulamışlardır. Tez çalışması kapsamında aort damar dokusunda gen anlatımı azalan *MMP9* geninin promotör bölgesinde yapılan metilasyon analizinde *MMP9* geninin metilasyon düzeyinin TAD hastaları ve kontrol grubunda anlamlı bir fark göstermediği bulunmuştur. Buna göre *MMP9* geninin TAD hastalarında çalışılan bölge özelinde epigenetik olarak düzenlenmiyor olabileceğini düşünülmüştür. *TIMP3* geni için TAD özelinde DNA metilasyonu ile ilgili yapılmış bir çalışmaya literatürde rastlanmamıştır. Tez çalışması sonucunda *TIMP3* geninde, farklı TAD hastalarında elde edilen değişik orandaki metilasyon yüzdeleri bireylerin genetik farklılıklarından kaynaklanıyor olabilir. TAD hastası ve kontrol grubu arasında metilasyon düzeni açısından anlamlı bir fark olmaması *TIMP3* geninin incelenen bölgesi özelinde TAD patogenezinde epigenetik olarak düzenlenmediğini düşündürmektedir.

Tez çalışması sonucunda elde edilen veriler moleküler düzeyde TAD'ın oluşma sürecinin çok bileşenli kompleks bir süreç olduğunu doğrular niteliktedir. Parçalayıcı enzimler olan *MMP2* ve *MMP9* genlerindeki değişmeyen ya da azalan anlatım TAD tablosu ile zıt görünse de eş zamanlı olarak *TIMP2* ve *TIMP3* gen anlatımlarının azalması MMP/TIMP oranını arttırmakta ve hücrede degradasyon süreci yaşandığını göstermektedir. Bu açıdan bakıldığında yürütülen tez çalışması literatürdeki bilgilere destek olarak MMP/TIMP oranlarının TAD vakalarındaki artışını mRNA düzeyinde göstermiştir.

Hem aort damar dokusu hem de monosit hücrelerde elde ettiğimiz sonuçlara göre TAD patogenezinin anlaşılmasında MMP'lerin olduğu kadar regülatörleri olan TIMP'ların da kilit bir görevde olduğu düşünülmektedir. İş birliği içerisinde fonksiyon gösteren MMP ve TIMP'ların TAD vakalarında birlikte değerlendirilmesinin, hastalık patogenezinin anlaşılmasında önemli bir yaklaşım olduğu görülmüştür. Yapılan tez çalışması kapsamında, aort damarındaki değişmeyen gen anlatımı düzeyi sebebiyle *MMP2* ($p=0.85$) geninin tek başına TAD tanısında biyobelirteç adayı olarak değerlendirilemeyeceği sonucuna varılmıştır. Ancak *MMP9* ($p=0.043$), *TIMP2* ($p=0.0089$) ve *TIMP3* ($p=0.028$) genlerinin anlatım seviyelerindeki istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar, bu hedef genlerin ve dokudaki anlatım oranlarının uzun vadede TAD tanısında birer moleküler biyobelirteç adayı olabileceklerini düşündürmektedir .

KAYNAKLAR

- [1] Golledge, J. ve Eagle, K.A., 2008, Acute aortic dissection, *The Lancet*, 372(9632), 55-66.
- [2] Criado, F.J., 2011, Aortic dissection: a 250-year perspective, *Tex Heart Institute Journal*, 38(6), 694-700.
- [3] Coady, M.A., Rizzo, J. A., Goldstein, L. J. ve Elefteriades, J. A., 1999, Natural history, pathogenesis, and etiology of thoracic aortic aneurysms and dissections, *Cardiol Clin*, 17(4), 615-35
- [4] Wu, D., Shen, Y. H., Russell, L., Coselli, J. S. ve LeMaire, S. A., 2013, Molecular mechanisms of thoracic aortic dissection, *Journal of Surgical Research*, 184(2), 907-24
- [5] He, R., Guo, D. C., Estrera, A. L., Safi, H. J., Huynh, T. T., Yin, Z., Cao, S.N., Lin, J., Kurian, T., Buja, L. M., Geng, Y. J. ve Milewicz D. M., 2006, Characterization of the inflammatory and apoptotic cells in the aortas of patients with ascending thoracic aortic aneurysms and dissections, *The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery*, 131(3), 671-8
- [6] Shen, Y.H. ve LeMaire, S.A., 2017, Molecular pathogenesis of genetic and sporadic aortic aneurysms and dissections, *Current Problems in Surgery*, 54(3), 95-155
- [7] Bossone, E. ve Eagle, K.A., 2021, Epidemiology and management of aortic disease: aortic aneurysms and acute aortic syndromes, *Nature Reviews Cardiology*, 18(5), 331-348
- [8] Humphrey, J.D., Schwartz, M. A., Tellides, G. ve Milewicz. D., 2015, Role of mechanotransduction in vascular biology: focus on thoracic aortic aneurysms and dissections. *Circulation Research*, 116(8), 1448-61
- [9] Nienaber, C.A., Clough, R., Sakalihasan, N., Suzuki, T., Gibbs, R., Mussa, F., Jenkins, M. P., Thompson, M. M., Evangelista, A., Yeh, J. S. M., Cheshire, N., Rosendahl, U. ve Pepper, J., 2016, Aortic dissection, *Nature Reviews Disease Primers*, 2, 16053.
- [10] Levy D., G.A., Grigorova Y., et al., Aortic Dissection. 2022, *StatPearls* .
- [11] Prakash, S.K., Pedroza, C., Khalil, Y. A. ve Milewicz D. M., 2012, Diabetes and reduced risk for thoracic aortic aneurysms and dissections: a nationwide case-control study, *Journal of the American Heart Association*, 1(2)
- [12] Allaire, E., Schneider, F., Saucy, F., Dai, J., Cochenne, F., Michineau, S., Zidi, M., Becquemin, J. P., Kirsch, M. ve Gervais, M., 2010, New insight in aetiopathogenesis of aortic diseases, *European Journal of Vascular and Endovascular Surgery*, 37(5), 531-7

- [13] Schachner, T., Golderer, G., Sarg, B., Lindner, H. H., Bonaras, N., Mikuži G., Laufer, G. ve Werner, E. R., 2010, The amounts of alpha 1 antitrypsin protein are reduced in the vascular wall of the acutely dissected human ascending aorta, *European Journal of Cardiothoracic Surgery*, 37(3), 684-90
- [14] de Fougerolles, A. R. ve Koteliansky, V. E., 2002, Regulation of monocyte gene expression by the extracellular matrix and its functional implications, *Immunological Reviews*, 186, 208-20
- [15] Liao, M., Liu, Z., Bao, J., Zhao, Z., Hu, J., Feng, X., Feng R., Lu, Q., Mei, Z., Liu, Y., Wu, Q. ve Jing, Z., 2008, A proteomic study of the aortic media in human thoracic aortic dissection: implication for oxidative stress, *The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery*, 136(1), 65-72, 72.e1-3.
- [16] Nagashima, H., Sakomura, Y., Aoka, Y., Uto, K., Ki, K., Ogawa, M., Aomi, S., Koyagani, H., Ishizuka, N., Naruse, M., Kawana, M. ve Kasanuki, H., Angiotensin II type 2 receptor mediates vascular smooth muscle cell apoptosis in cystic medial degeneration associated with Marfan's syndrome, *Circulation*, 104, 1282-7
- [17] DeBakey, M. E., Henly, W. S., Cooley, D. A., Morris Jr, G. C., Crawford, E. S. ve Beall Jr, A. C., Surgical management of dissecting aneurysms of the aorta, *The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery*, 130-49
- [18] Daily, P.O., Trueblood, H. W., Stinson, E. B., Wuerflein, R. D. ve Shumway, N. E., 1970, Management of acute aortic dissections, *The Annals of Thoracic Surgery*, 10(3), 237-47
- [19] Jiang, D.S., Yi, X., Zhu, X. H. ve Wei, X., 2016, Experimental, *Am J Transl Res*, 8(12), 5125-5140
- [20] Nagase, H., Visse R. ve Murphy, G., 2006, Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs, *Cardiovascular Research*, 69(3), 562-73
- [21] Wang, X. ve Khalil, R. A., 2018, Matrix Metalloproteinases, Vascular Remodeling, and Vascular Disease, *Advances in Pharmacology*, 81, 241-330
- [22] Bourboulia, D. ve Stetler-Stevenson, W. G., 2010, Matrix metalloproteinases (MMPs) and tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs): Positive and negative regulators in tumor cell adhesion, *Seminars in Cancer Biology*, 20(3), 161-8
- [23] Cabral-Pacheco, G.A., Garza-Veloz, I., Castruita-De la Rosa, C., Ramirez-Acuna, J., Perez-Romero, B. A., Guerrero-Rodriguez, J. F., Martinez-Avila, N. ve Martinez-Fierro, M. L., 2020, The Roles of Matrix Metalloproteinases and Their Inhibitors in Human Diseases, *International Journal of Molecular Sciences*, 21(24)
- [24] Fanjul-Fernández, M., Folgueras, A., R., Cabrera, S. ve Lopez-Otin, C., 2010, Matrix metalloproteinases: evolution, gene regulation and functional analysis in mouse models, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1803(1), 3-19

- [25] Djuric, T. ve Zivkovic, M., 2017, Overview of MMP Biology and Gene Associations in Human Diseases. The Role of Matrix Metalloproteinase in Human Body Pathologies. IntechOpen.
- [26] Brew, K. ve Nagase, H., 2010, The tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs): an ancient family with structural and functional diversity, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1803(1), 55-71
- [27] Galis, Z. S. ve Khatri, J. J., 2020, Matrix metalloproteinases in vascular remodeling and atherogenesis: the good, the bad, and the ugly, *Circulation Research*, 90(3), 251-62
- [28] Jabłońska-Trypuć, A., Matejczyk, M. ve Rosochacki, S., 2016, Matrix metalloproteinases (MMPs), the main extracellular matrix (ECM) enzymes in collagen degradation, as a target for anticancer drugs, *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 31, 177-183
- [29] Iyer, R.P., Patterson, N. L., Fields, G., B. ve Lindsey, M. L., 2012, The history of matrix metalloproteinases: milestones, myths, and misperceptions, *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 303(8), H919-30
- [30] Osenkowski, P., Toth, M. ve Fridman, R., 2004, Processing, shedding, and endocytosis of membrane type 1-matrix metalloproteinase (MT1-MMP), *Journal of Cellular Physiology*, 200(1), 2-10
- [31] English, W.R., Holtz, B., Vogt, G. ve Knäuper V., 2001, Characterization of the role of the "MT-loop": an eight-amino acid insertion specific to progelatinase A (MMP2) activating membrane-type matrix metalloproteinases, *Journal of Biological Chemistry*, 276(45), 42018-26
- [32] Gene Cards, MMP2, <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=MMP2&keywords=MMP2> [Ziyaret tarihi: 08 Mayıs 2022].
- [33] Chow, B. S. M., Chew, E. G. Y., Zhao, C., Bathgate, R. A. D., Hewitson, T. D. ve Samuel, C. S., 2012, Relaxin signals through a RXFP1-pERK-nNOS-NO-cGMP-dependent pathway to up-regulate matrix metalloproteinases: the additional involvement of iNOS, *PLoS One*, 7(8), e42714
- [34] Aimes, R.T. ve Quigley, J.P., 1995, Matrix metalloproteinase-2 is an interstitial collagenase. Inhibitor-free enzyme catalyzes the cleavage of collagen fibrils and soluble native type I collagen generating the specific 3/4- and 1/4-length fragments, *Journal of Biological Chemistry*, 270(11), 5872-6
- [35] Patterson, M.L., Atkinson, S. J., Knäuper, V. ve Murphy, G., 2001, Specific collagenolysis by gelatinase A, MMP-2, is determined by the hemopexin domain and not the fibronectin-like domain, *FEBS Letters*, 503(2-3), 158-62
- [36] Strongin, A.Y., Collier, I., Bannikov, G., Marmer, B. L., Grant, G. A. ve Goldberg, G. I., 1995, Mechanism of cell surface activation of 72-kDa type IV collagenase. Isolation of the activated form of the membrane metalloprotease, *Journal of Biological Chemistry*, 270(10), 5331-8

- [37] Visse, R. ve Nagase, H., 2003, Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry, *Circulation Research*, 92(8), 827-39
- [38] Nie, J. ve Pei, D., 2003, Direct activation of pro-matrix metalloproteinase-2 by leukolysin/membrane-type 6 matrix metalloproteinase/matrix metalloproteinase 25 at the asn(109)-Tyr bond, *Cancer Research*, 63(20), 6758-62
- [39] Gene Cards, MMP9, <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=MMP9&keywords=mmp9> [Ziyaret tarihi: 07 Mayıs 2022].
- [40] Yabluchanskiy, A., Ma, Y., Iyer, R. P., Hall, M. E. ve Lindsey M. L., 2013, Matrix metalloproteinase-9: Many shades of function in cardiovascular disease, *Physiology (Bethesda)*, 28(6), 391-403
- [41] Malemud, C.J., 2006, Matrix metalloproteinases: role in skeletal development and growth plate disorders, *Frontiers in Bioscience*, 11(1), 1702-15
- [42] Stetler-Stevenson, W.G., 2008, The tumor microenvironment: regulation by MMP-independent effects of tissue inhibitor of metalloproteinases-2, *Cancer and Metastasis Reviews*, 27(1), 57-66
- [43] Hernandez-Barrantes, S., Toth, M., Bernardo, M. M., Yurkova, M., Gervasi, D. C., Raz, Y., Sang, Q. A. ve Fridman, R., 2000, Binding of active (57 kDa) membrane type 1-matrix metalloproteinase (MT1-MMP) to tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP)-2 regulates MT1-MMP processing and pro-MMP-2 activation, *Journal of Biological Chemistry*, 275(16), 12080-9
- [44] Gene Card, TIMP1, <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=TIMP1> [Ziyaret tarihi: 20 Nisan 2022].
- [45] Gene Card, TIMP2, <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=TIMP2&keywords=TIMP2> [Ziyaret tarihi: 20 Nisan 2022].
- [46] Arpino, V., Brock, M. ve Gill, S.E., 2015, The role of TIMPs in regulation of extracellular matrix proteolysis, *Matrix Biology*, 44-46, 247-54
- [47] Gene Card, TIMP3, <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=TIMP3&keywords=TIMP3> [Ziyaret tarihi: 20 Nisan 2022].
- [48] Gene Card, TIMP4, <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=TIMP4&keywords=TIMP4> [Ziyaret tarihi: 20 Nisan 2022].
- [49] Jackson, H.W., Defamie, V., Waterhouse, P. ve Khokha, R., 2017, TIMPs: versatile extracellular regulators in cancer, *Nature Reviews Cancer*, 17(1), 38-53
- [50] Rivera, S., Khrestchatisky, M., Kaczmarek, L., Rosenberg, G. A. ve Jaworski, D. M., 2010, Metzincin proteases and their inhibitors: foes or friends in nervous system physiology?, *The Journal of Neuroscience*, 30(46), 15337-57

- [51] Weis-Müller, B.T., Modlich, O., Drobinskaya, I., Unay, D., Huber, R., Bojar, H., Schipke, J. D., Feindt, P., Gams, E., Müller, W., Goecke, T. ve Sandmann, W., 2006, Gene expression in acute Stanford type A dissection: a comparative microarray study, *Journal of Translational Medicine*, 4, 29
- [52] Koullias, G.J., Ravichandran, P., Korkolis, D. P., Rimm, D. L. ve Elefteriades, J. A., 2004, Increased tissue microarray matrix metalloproteinase expression favors proteolysis in thoracic aortic aneurysms and dissections, *The Annals of Thoracic Surgery*, 78(6), 2106- 2110
- [53] Sangiorgi, G., Trimarchi, S., Mauriello, A., Rhnini, P., Bossone, E., Suzuki, T., Rampoldi, V., Eagle, K., A., 2006, Plasma levels of metalloproteinases-9 and -2 in the acute and subacute phases of type A and type B aortic dissection. *J Cardiovasc Med* (, 7(5), 307-15.
- [54] Doyle, A.J., Doyle, J. J., Bessling, S. L., Maragh, S., Lindsay, M. E., Schepers, D., Gillis, E., Mortier, G., Homfray, T., Sauls, K., Norris, R. A., Huso, N. D., Leahy, D., Mohr, D. W., Caulfield, M. J., Scott, A. F., Destrée, A., Hennekam, R. C., Arn, P. H., Curry, C. J., Laer, L. V., McCallion, A. S., Loeys, B. L. ve Dietz H. C., 2012, Mutations in the TGF- β repressor SKI cause Shprintzen-Goldberg syndrome with aortic aneurysm, *Nature Genetics*, 44(11), 1249-54
- [55] Manabe, T., Imoto, K., Uchida, K., Doi, C. ve Takanashi, Y., 2004, Decreased tissue inhibitor of metalloproteinase-2/matrix metalloproteinase ratio in the acute phase of aortic dissection, *Surgery Today*, 34(3), 220-5
- [56] Lesauskaite, V., Tanganelli, P., Sassi, C., Neri, E., Diciolla, F., Ivanoviene, L., Epistolato, M. C., Lalinga, A. V., Alessandrini, C. ve Spina, D., 2001, Smooth muscle cells of the media in the dilatative pathology of ascending thoracic aorta: morphology, immunoreactivity for osteopontin, matrix metalloproteinases, and their inhibitors, *Human Pathology*, 32(9), 1003-11
- [57] Liu, P., Zhang, J., Du, D., Zhang, D., Jin, Z., Qui, W., Zhou, X., Dong, S., Zhou, M., Zhao, H., Zhang, W., Ma, J., Sun, S., Fu, W., Liu, Y. ve Wang, L., 2021, Altered DNA methylation pattern reveals epigenetic regulation of Hox genes in thoracic aortic dissection and serves as a biomarker in disease diagnosis, *Clinical Epigenetics*, 13(1), 124
- [58] Butts, B., Gary, R. A., Dunbar, S. B. ve Butler, J., 2016, Methylation of Apoptosis-Associated Speck-Like Protein With a Caspase Recruitment Domain and Outcomes in Heart Failure, *Journal of Cardiac Failure*, 22(5), 340-6
- [59] Chang, C.P. ve Bruneau, B.G., 2012, Epigenetics and cardiovascular development, *Annual Review of Physiology*, 74(1), 41-68
- [60] Hadji, F., Boulanger, M. C., Guay, S. P., Gaudreault, N., Amellah, S., Mkannez, G., Bouchareb, R., Marchand, J. T., Nsaibia, M. J., Guauque-Olarte, S., Pibarot, P., Bouchard, L., Bossé, Y. ve Mathieu, P., 2016, Altered DNA Methylation of Long Noncoding RNA H19 in Calcific Aortic Valve Disease Promotes Mineralization by Silencing NOTCH1, *Circulation*, 134(23), 1848-1862

- [61] Egger, G., Liang, G., Aparicio, A. ve Jones, P. A., 2004, Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy, *Nature*, 429(6990), 457-63
- [62] Boileau, A., Lindsay, M. E., Michel, J. B. ve Devaux, Y., 2018, Epigenetics in Ascending Thoracic Aortic Aneurysm and Dissection, *Aorta (Stamford)*, 6(1), 1-12
- [63] Lee, K.K. ve Workman, J.L., 2007, Histone acetyltransferase complexes: one size doesn't fit all, *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 8(4), 284-95
- [64] Geiman, T.M. ve Robertson, K.D., 2002, Chromatin remodeling, histone modifications, and DNA methylation-how does it all fit together?, *Journal of Cellular Biochemistry*, 87(2), 117-25
- [65] Bestor, T.H., 2000, The DNA methyltransferases of mammals, *Human Molecular Genetics*, 9(16), 2395-402
- [66] Devaux, Y., 2017, Transcriptome of blood cells as a reservoir of cardiovascular biomarkers, *Biochimica et Biophysica Acta Molecular Cell Research*, 1864(1), 209-216
- [67] He, L. ve Hannon, G.J., 2004, MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation, *Nature Reviews Genetics*, 5(7), 522-31
- [68] Devaux, Y., Zangrando, J., Schroen, B., Creemers, E. E., Pedrizzini, T., Chang, C.P., Dorn, G. W., Thum, T., Heymans, S., 2015, Long noncoding RNAs in cardiac development and ageing, *Nature Reviews Cardiology*, 12(7), 415-25
- [69] Shah, A.A., Gregory, S. G., Krupp, D., Feng, S., Dorogi, A., Haynes, C., Grass, E., Lin, S. S., Hauser, E. R., Kraus, W. E., Shah, S. H. ve Hughes, G. C., 2015, Epigenetic profiling identifies novel genes for ascending aortic aneurysm formation with bicuspid aortic valves, *The Heart Surgery Forum*, 18(4), E134-9
- [70] Guo, X., Fang, Z. M., Wei, X., Huo, B., Yi, X., Cheng, C., Chen, J., Zhu, X. H., Bokha, A. O. K. A. ve Jiang, D. S., 2019, HDAC6 is associated with the formation of aortic dissection in human, *Molecular Medicine*, 25(1), 10
- [71] Hindson, B.J., Ness, K. D., Masquelier, D. A., Belgrader, P., Heredia, N. J., Makarewicz, A. J., Bright, I. J., Lucero, M. Y., Hiddessen, A. L., Legler, T. C., Kitano, T. K., Hodel, M. R., Petersen, J. F., Wyatt, P. W., Steenblock, E. R., Shah, P. H., Bousse, L. J., Troup, C. B., Mellen, J. C., Wittmann, D. K., Erndt, N. G., Cauley, T. H., Koehler, R. T., So, A. P., Dube, D. P., Hodges, S. P., Romine, S., Milanovich, F. P., White, H. E., Regan, J. F., Karlin-Neumann, G. A., Hindson, C. M., Saxonov, S. ve Colston, B. W., 2011, High-throughput droplet digital PCR system for absolute quantitation of DNA copy number, *Analytical Chemistry*, 83(22), 8604-10
- [72] Takahashi, K., Yan, I. K., Kim, C., Kim, J. ve Patel, T., 2014, Analysis of extracellular RNA by digital PCR, *Frontiers in Oncology*, 4, 129
- [73] Wojdacz, T.K., Dobrovic, A. ve Hansen, L.L., 2008, Methylation-sensitive high-resolution melting, *Nature Protocols*, 3(12), 1903-8

- [74] Ishii, T. ve Asuwa, N., 2000, Collagen and elastin degradation by matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of matrix metalloproteinase in aortic dissection, *Human Pathology*, 31(6), 640-6
- [75] Liu, O., Li, J., Xin, Y., Qin, Y., Li, H., Gong, M., Liu, Y., Wang, X., Li, J. ve Zhang, H., 2016, Association of MMP-2 gene haplotypes with thoracic aortic dissection in chinese han population, *BMC Cardiovascular Disorders*, 16, 11
- [76] Ferrans, V.J., 2002, New insights into the world of matrix metalloproteinases, *Circulation*, 105(4), 405-7
- [77] Watanabe, M. ve Sawai, T., 1999, Alteration of cross-linking amino acids of elastin in human aorta in association with dissecting aneurysm: analysis using high performance liquid chromatography, *The Tohoku Journal of Experimental Medicine*, 187(4), 291-303
- [78] Kimura, N., Futamura, K., Arakawa, M., Okada, N., Emrich, F., Okamura, H., Sato, T., Shudo, Y., Koyano, T. K., Yamaguchi, A., Adachi, H., Matsuda, A., Kawahito, K., Matsumoto, K., Fischbein, M. P., 2017, Gene expression profiling of acute type A aortic dissection combined with in vitro assessment, *European Journal of Cardiothoracic Surgery*, 52(4), 810-817
- [79] Samadzadeh, K.M., Chun, K.C, Nguyen, A.T., Baker P.M., Bains, S., Lee, E.S., 2014 Monocyte activity is linked with abdominal aortic aneurysm diameter. *J Surg Res*, 190(1), 328-34.
- [80] Lu, L., Tong, Y., Wang, W., Hou, Y., Dou, H. ve Liu, Z., 2020, Characterization and Significance of Monocytes in Acute Stanford Type B Aortic Dissection, *Journal of Immunology Research*, 2020, 9670360
- [81] Cifani, N., Proietta, M., Taurino, M., Tritapepe, L. ve Del Portoi F., 2019, Monocyte Subsets, Stanford-A Acute Aortic Dissection, and Carotid Artery Stenosis: New Evidences, *Journal of Immunology Research*, 9782594
- [82] Zhang, X., Wu, D., Choi, J. C., Minard, C. G., Hou, X., Coselli, J. S., Shen, Y. H., ve LeMaire, S. A., 2014, Matrix metalloproteinase levels in chronic thoracic aortic dissection. *The Journal of surgical research*, 189(2), 348–358.
- [83] Akiyama, M., Ohtani, H., Sato, E., Nagura, H., ve Tabayashi, K., 2006, Up-regulation of matrix metalloproteinase-2 and membrane-type 1-matrix metalloproteinase were coupled with that of type I procollagen in granulation tissue response after the onset of aortic dissection. *Virchows Archiv : an international journal of pathology*, 448(6), 811–821.
- [84] Skorvanova, M., Matakova, T., Skerenova, M., Sarlinova, M., Drobkova, H., Petras, M., Janickova, M., Halasa, M., Repiska, V. ve Halasova, E., 2020, Methylation of MMP2, TIMP2, MMP9 and TIMP1 in abdominal aortic aneurysm, *Bratisl Med J*, 121(10), 717-721

EKLER

EK-1 ETİK KURUL BELGESİ



T.C
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ
KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU



Sayı : 545

Tarih: 16.04.2019

Konu: Doç. Dr. Tuba GÜNEL hk.

Sayın Doç. Dr. Tuba GÜNEL

Fen Fakültesi

İlgili: Fen Fakültesi Dekanlığının 28/03/2019 gün ve 54887 sayılı yazısı

Sorumlu araştırmacılığını üstlendiğiniz ve Doktora Öğrencisi Tuğba KÖSE'nin yürüteceği 2019/525 dosya numaralı "Aort Diseksiyonu Olan Hastalarda MMP2 ve TIMP2 Genlerinin Anlatım Analizi" başlıklı çalışma kurulumuzun 12/04/2019 tarih ve 07 sayılı toplantısında görüşülerek etik yönden uygun bulunmuş olup, tutanaklar ekte sunulmuştur.

Bilgilerinizi rica ederim.

Prof. Dr. A. Yağız ÜRESİN
İstanbul Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar
Etik Kurul Başkanı

İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALARI ETİK KURULU KARAR FORMU

ETİK KURUL BİLGİLERİ	ETİK KURULUN ADI	İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALARI ETİK KURULU
	AÇIK ADRESİ	İ.Ü İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ HULUSİ BEHÇET KÜTÜPHANESİ KAT:3 FATİH/İSTANBUL
	TELEFON	0 (212) 414 21 53
	FAX	0 (212) 414 21 53
	E-POSTA	itfetikkurul@istanbul.edu.tr

BAŞVURU BİLGİLERİ	ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	“Aort Diseksiyonu Olan Hastalarda MMP2 ve TIMP2 Genlerinin Anlatım Analizi”		
	ARAŞTIRMA PROTOKOL KODU	---		
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACI UNVANI/ADI/SOYADI	Doç.Dr. Tuba GÜNEL		
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ UZMANLIK ALANI	İnsan Genetiği		
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ BULUNDUĞU MERKEZ	İstanbul Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü		
	DESTEKLEYİCİ	İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar ve Projeler Birimi		
	DESTEKLEYİCİNİN YASAL TEMSİLCİSİ	----		
	ARAŞTIRMANIN FAZİ	Faz 1	☐	
		Faz 2	☐	
		Faz 3	☐	
		Faz 4	☐	
	ARAŞTIRMANIN TÜRÜ	Yeni Bir Endikasyon	☐	
		Yüksek Doz Araştırması	☐	
		Diğer ise belirtiniz;		
	ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	TEK MERKEZ ☒	ÇOK MERKEZLİ ☐	ULUSAL ☒
				ULUSLAR ARASI ☐

İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALARI ETİK KURULU KARAR FORMU

ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Aort Diseksiyonu Olan Hastalarda MMP2 ve TIMP2 Genlerinin Anlatım Analizi
-----------------------	---

DEĞERLENDİRİLEN BELGELER	Belge Adı	Tarihi	Versiyon Numarası	Dili
	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ	01.04.2019		Türkçe ☒ İngilizce ☐ Diğer ☐
	BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU	☒		Türkçe ☒ İngilizce ☐ Diğer ☐
	OLGU RAPOR FORMU	☐		Türkçe ☐ İngilizce ☐ Diğer ☐
	ARAŞTIRMA BROŞÜRÜ	☐		Türkçe ☐ İngilizce ☐ Diğer ☐
DEĞERLENDİRİLEN DİĞER BELGELER	Belge Adı	Açıklama		
	TÜRKÇE ETİKET ÖRNEĞİ	☐		
	ŞİGORTA	☐		
	ARAŞTIRMA BÜTÇESİ	☒		
	BIYOLOJİK MATERYAL TRANSFER FORMU	☐		
	HASTA KARTI/GÜNLÜKLERİ	☐		
	İLAN	☐		
	YILLIK BİLDİRİM	☐		
	SONUÇ RAPORU	☐		
	GÜVENLİK BİLDİRİMLERİ	☐		
	DİĞER	☒	Anabilim Dalı Başkanlığından Üst Yazı ve Akademik Kurul Kararı, Literatür Kaynağı, Sorumluluk Paylaşım Belgesi, Olgular Raporu, İlgili Elemanların Bilgilendirildiğine Dair Belge, CV, CD	
KARAR BİLGİLERİ	Karar No: 07	Tarih: 12/04/2019		
	İstanbul Üniversitesi Fen Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümünde Görevli Doç. Dr. Tuba GÜNEL'in sorumluluğunda ve Doktora öğrencisi Tuğba KÖSE'nin yürüteceği yukarıda bilgileri verilen araştırma başvuru dosyası ile ilgili belgeler araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş, gerçekleştirilmesinde etik ve bilimsel sakınca bulunmadığına toplantıya katılan ETİK KURUL üye tam sayısının salt çoğunluğu ile karar verilmiştir.			

İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALARI ETİK KURULU						
ÇALIŞMA ESASI		19.08.2011 tarihli, 28030 sayılı Resmi Gazetede yayınlanan Klinik Araştırmalar hakkındaki Yönetmelik				
BAŞKANIN UNVANI/ADI/ SOYADI:		Prof. Dr. A. Yağız ÜRESİN				
Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyeti	Araştırma ile İlişki*	Katılım**	İmza
Prof. Dr. A. Yağız ÜRESİN	Farmakoloji ve Klinik Farmakoloji	İstanbul Tıp Fakültesi (Etik Kurul Başkanı)	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Prof. Dr. Berrin UMMAN	Kardiyoloji	İstanbul Tıp Fakültesi (Etik Kurul Başkan Yardımcısı)	E ☐ K ☒	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Prof. Dr. Ahmet GÜL	Romatoloji	İstanbul Tıp Fakültesi	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Prof. Dr. Oğuzhan ÇOBAN	Nöroloji	İstanbul Tıp Fakültesi	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Dr. Sevda ÖZEL YILDIZ	Biyoistatistik	İ.Ü İstanbul Tıp Fakültesi	E ☐ K ☒	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	

* : Araştırma ile ilişki

** : Toplantıda Bulunma

İ.Ü İstanbul Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu 13.04.2013 tarih, 28617 sayılı Resmi Gazetede yayınlanan Klinik Araştırmalar Hakkında Yönetmelik Çerçevesinde kurulmuş ve T.C. Sağlık Bakanlığı Türkiye İlaç ve Tıbbi Cihaz Kurumu tarafından onaylanmıştır. İlgili Yönetmelik kapsamında kalan araştırmalar Sağlık Bakanlığından izin almak zorundadır. Yönetmelik Kapsamı dışında kalan araştırmalar ise Etik Kurul bünyesinde oluşturulmuş 5 kişilik alt komisyon tarafından değerlendirilmekte olup Sağlık Bakanlığının iznine tabi değildir.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler	
Adı Soyadı	Tuğba KÖSE
Doğum Yeri	
Doğum Tarihi	.
Uyruğu	☒ T.C. ☐ Diğer:
E-Posta Adresi	
Web Adresi	

Eğitim Bilgileri	
Lisans	
Üniversite	İstanbul Teknik Üniversitesi
Fakülte	Fen Edebiyat Fakültesi
Bölümü	Moleküler Biyoloji ve Genetik
Mezuniyet Yılı	22.06.2011

Yüksek Lisans	
Üniversite	İstanbul Üniversitesi
Enstitü Adı	Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Anabilim Dalı	Genetik
Programı	Genetik

Doktora	
Üniversite	İstanbul Üniversitesi
Enstitü Adı	Fen Bilimleri Enstitüsü
Anabilim Dalı	Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı
Programı	Moleküler Biyoloji ve Genetik Programı

Makale ve Bildiriler	