

T.C.
ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

ÇUKUROVA BÖLGESİNDEKİ AKCİĞER TÜBERKÜLOZLU HASTALARIN MONONÜKLEER HÜCRELERİNDEKİ MİKRORNA DÜZEYLERİNİN İNCELENMESİ

Fırat KARSLI

TIBBİ MİKROBİYOLOJİ TEZLİ YÜKSEK LİSANS PROGRAMI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMANI
Prof. Dr. Fatih KÖKSAL

ADANA-2015

T.C.
ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

ÇUKUROVA BÖLGESİNDEKİ AKCİĞER TÜBERKÜLOZLU HASTALARIN MONONÜKLEER HÜCRELERİNDEKİ MİKRORNA DÜZEYLERİNİN İNCELENMESİ

Fırat KARSLI

TIBBİ MİKROBİYOLOJİ TEZLİ YÜKSEK LİSANS PROGRAMI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMANI
Prof. Dr. Fatih KÖKSAL

Bu tez, Çukurova Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi
tarafından TYL-2014-3331 nolu proje olarak desteklenmiştir.

Tez no:.....
ADANA-2015

KABUL VE ONAY

Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

Tezli Yüksek Lisans Programı Çerçevesinde yürütölmüş olan

**“Çukurova Bölgesindeki Akciğer Tüberkülozlu Hastaların
Mononökleer Hücrelerindeki mikroRNA Düzeylerinin İncelenmesi”**
adlı çalışma, aşğıdaki jüri tarafından **Yüksek Lisans Tezi** olarak kabul edilmiştir.

Tarihi: 18 / 08 / 2015

TEZ SINAV JÜRİSİ


Prof. Dr. Fatih KÖKSAL
Çukurova Üniversitesi
Başkan


Prof. Dr. Eüen YARKIN
Çukurova Üniversitesi
Üye


Prof. Dr. Gönöl ASLAN
Mersin Üniversitesi
Üye

Yukarıdaki Tez, Yönetim Kurulunun / / tarih ve
edilmiştir.

sayılı kararı ile kabul

Prof.Dr. Behice DURGUN
Sağık Bilimleri Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Öğrencisi olmaktan gurur duyduğum, yüksek lisans eğitimim boyunca değerli bilgi ve tecrübelerinden faydalanma imkânı bulduğum, beni her konuda sabırla destekleyen, cesaretlendiren saygıdeğer hocam, tez danışmanım Sayın Prof. Dr. Fatih KÖKSAL'a, eğitimim süresince bilgi ve deneyimlerini benimle paylasan değerli bölüm hocalarım Sayın Prof. Dr. Fügen YARKIN, Sayın Prof. Dr. Akgün YAMAN ve Sayın Prof. Dr. Macit İLKİT'e, yüksek lisans eğitimim boyunca birlikte her konuda yardımcı olan Sayın Öğr. Gör. Dr. Begüm KAYAR olmak üzere Tropikal Hastalıklar Araştırma ve Uygulama Merkezi Tüberküloz Çalışma Grubu ve Ç.Ü Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalındaki tüm çalışma arkadaşlarıma, eğitimim boyunca hiçbir yardımı esirgemeyen bölüm sekreterimiz Sayın Suna GÖKMEN, Enstitü sekreterimiz Sayın Ferhat DİKEL ve öğrenci işleri sorumlusu Sayın Kader ORDU başta olmak üzere tüm Sağlık Bilimleri Enstitüsü çalışanlarına değerli katkılarından, desteklerinden dolayı sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Özellikle eğitim dönemimde beni sabırla her konuda destekledikleri için ve bana güvenip sabrettikleri için hayatımın anlamı anneme, ve aileme teşekkürlerimi sunarım.

Fırat KARSLI

İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
KABUL ONAY	ii
TEŞEKKÜR	iii
İÇİNDEKİLER	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ	vii
TABLolar DİZİNİ	viii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	ix
ÖZET	xii
ABSTRACT	xiii
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Tüberkülozun Tarihçesi	4
2.2. Mikobakterilerin Bakteriyolojisi ve Hücre Duvar Yapısı	6
2.3. Tüberkülozun Patogenezi	8
2.4. Klinik Tablolar	9
2.4.1. Primer Akciğer Tüberkülozu	10
2.4.2. Miliyer Tüberküloz	10
2.4.3. Post Primer Akciğer Tüberkülozu	11
2.4.3.1. Endojen Reaktivasyon	11
2.4.3.2. Ekzojen Reaktivasyon	11
2.4.3.3. Ekstrapulmoner Tüberküloz	11
2.5. Tüberküloz İmmünolojisi	12
2.5.1. Doğal İmmün Cevap	12
2.5.1.1. Nötrofiller	12
2.5.1.2. Dendritik Hücreler	12
2.5.1.3. Naturel Killer Hücreler	13
2.5.1.4. Mast Hücreleri	13
2.5.1.5. Makrofajlar	14
2.5.2. Kazanılmış İmmün Cevap	15
2.5.2.1. Humoral İmmün Cevap	15

2.5.2.2. Hücresel İmmün Cevap	15
2.5.2.2.1. T lenfositlerin Rolü	16
2.5.2.2.1.1. CD4+ T lenfositler	16
2.5.2.2.1.2. CD8+ T Hücreleri	17
2.5.2.2.2. Sitokinler	18
2.6. Kodlanmayan RNA'lar	19
2.6.1. MikroRNA'lar	20
2.6.1.1. MikroRNA'ların Tarihçesi	20
2.6.1.2. MikroRNA'ların Adlandırılması	21
2.6.1.3. MikroRNA'ların Biyogenezi	22
2.6.1.4. MikroRNA'ların İşlevleri	23
2.6.1.5. MikroRNA'ların Etkileri	25
2.6.1.6. MikroRNA'ların Hastalıklarla İlişkisi ve Klinik Önemi	25
2.6.1.7. İmmün Sisteminin Düzenlenmesinde miRNA' lar	26
2.6.1.8. MikroRNA'ların Terapotik Kullanımı	26
2.6.1.9. MikroRNA Analiz Teknolojileri	27
2.6.1.9.1. Real -Time PCR	28
2.6.1.9.1.1. SYBR Green I	28
2.6.1.9.1.2. TaqMan prob yöntemi	29
2.6.1.9.1.3. Moleküler Boncuk Yöntemi	30
2.6.1.9.1.4. Hibridizasyon Prob Yöntemi	30
2.7. Tüberküloz ve MikroRNA	30
3. GEREÇ VE YÖNTEM	33
3.1. Kan örneklerinin toplanması	33
3.2. MikroRNA eldesi	33
3.2.1.Fycoll ile mononükleer hücre eldesi	33
3.2.2. Mononükleer hücrelerin saklanması	34
3.2.3. Mononükleer hücrelerden miRNA eldesi	34
3.2.4. Plazma eldesi	35
3.2.5. Plazmadan miRNA eldesi	36
3.3. MikroRNA düzeylerinin RealTime PCR ile ölçümü	37
3.3.1. cDNA hazırlanması	37

3.3.2. PreAmplifikasyon Hazırlanması	38
3.3.3. Exonuclease Hazırlanması	39
3.3.4. Dynamic Array Hazırlanması	40
3.3.4.1. Dynamic Array'in PRIME edilmesi	41
3.3.4.2. Assay Plate'inin Hazırlanması	41
3.3.4.3. Örneklerin Hazırlanması	41
3.3.4.4. Dynamic Array'e Pipetlemelerin Yapılması	42
3.3.4.5. IFC Controller da Dynamic Array'in Load edilmesi	42
3.3.4.6. Dynamic Array'in BioMark da çalışılması	42
3.3.5. miRNAların düzeylerinin istatistiksel analizi	43
4. BULGULAR	44
5. TARTIŞMA	47
6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER	52
KAYNAKLAR	54
ÖZGEÇMİŞ	62

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa No
Şekil 2.1. Mikobakteri hücre duvar yapısı	7
Şekil 2.2. Hücresel, sıvısal ve regülatör cevabın ortaya çıkışı	18
Şekil 2.3. miRNA biyogenezi	23
Şekil 2.4. mikroRNA 'nın hedef mRNA'ya bağlanması	25
Şekil 2.5. SYBR Green boya tekniği	29
Şekil 4.1. Mononükleer miRNA karşılaştırılmalı grafiği	45
Şekil 4.2. Plazma miRNA kontrol ve hasta gruplarının karşılaştırılmalı grafiği	46

TABLÖLAR DİZİNİ

	<u>Sayfa No</u>
Tablo 2.1. Küçük kodlanmayan RNA'ların işlevler	20
Tablo 4.1. Kontrol ve hasta gruplarının mononükleer miRNA cycle threshold değerlerinin karşılaştırılması	44
Tablo 4.2. hsa-mir-146 çalışması p değeri	45
Tablo 4.3. Kontrol ve hasta gruplarının plazma miRNA cycle threshold değerlerinin karşılaştırılması	45
Tablo 4.4. hsa-mir-424 ve hsa-mir-1144 çalışması p değeri	46

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Ago2	: Argonaute 2
AraLAM	: Arabinan terminaline mannoz bağı olmanın lipoarabinomannan
ARB	: Aside dirençli bakteri
Anti-TB	: Anti-Tüberküloz
BCG	: Bacille Calmette Guerin
Bcl-2	: B hücre lenfoma -2
CCR7	: Kemokin reseptör 7
CCL3	: C-C motif ligand-3
CD	: Cluster of Differentiation
CFP	: Culture Filtrate Protein
CXL2	: C-X-C motif ligand2
DGCR8	: DiGeorge Syndrome Critical Region Gene 8
DGT-DOTS	: Doğrudan Gözetimli Tedavi Stratejileri
DSÖ	: Dünya Sağlık Örgütü
dsRNA	: Çift Sarmal RNA
EMB	: Etambutol
ESAT-6	: Early Secretory Antigenic Target
FcεR	: Fragment constant epsilon Receptor
FRET	: Fluorescence Resonance Energy Transfer
HIV	: Human Immune Deficiency Virus
Hİ	: Hücresel İmmünite
IgE	: İmmünglobulin E
IL	: İnterlökin
INF-γ	: İnterferon gama
INH	: İzoniazid
iNOS	: indüklenebilir Nitrikoksit Sentaz
IRAK-1	: İnterlökin -1 Reseptör İle İlişkili Kinaz- 1
Let-7	: Lethal-7
LNA	: Low-Noise Amplifier - Kilitlenmiş Nükleik Asitler

LPS	: Lipopolisakkarit
LT-C4	: Leukotriene C4
MCL1	: Myeloid cell leukemia 1
MCP-1	: Monosit Kemoatraktan Protein-1
MHC	: Major Histo-Compatibility Complex
miRNA	: mikro Ribonükleik Asit
mRNA	: Messenger RNA
MTK	: <i>Mycobacterium tuberculosis</i> Kompleks- <i>Mycobacterium tuberculosis</i> Complex
NcRNA	: Noncoding RNA-Kodlanmayan RNA
NF-kB	: Nükleer faktör kB
NK	: Naturel Killer
ORF	: Open Reading Frame- Açık Okuma Çerçevesi
PAMP	: Pathogen Associated Molecular Pattern- Patojen İlişkili Moleküler Kalıplar
PAS	: Para-amino Salisilik asit
PGD2	: Prostaglandin D2
PiRNA	: Piwi RNA
PPD	: Purified Protein Derivative-Saflaştırılmış protein derivesi
pre-miRNA	: Prekürsör Mikro RNA
pri-miRNA	: Primer Mikro RNA
PRR	: Pathogen Recognition Receptor
RİF	: Rifampisin
RISC	: RNA-İnduced Silencing Complex- RNA ile İndüklenmiş Susturma Kompleksi
RNAi	: RNA interference
siRNA	: small interfering RNA
sRNA	: small RNA
STR	: Streptomycin
TCR	: T Hücre Reseptörü
TGF-β	: Transforming Growth Factor-beta- Transforme Edici Büyüme Faktörü- beta

Th-1	: T helper-1
Th-2	: T helper-2
TLR	: Toll Like Receptor
TNF-α	: Tümör Nekrozis Faktör- alfa
TRAF-6	: Tümör Nekroz Faktör Reseptörü İlişkili Faktör 6
TRBP	: Transactivating Response RNA Binding Protein
UTR	: Untranslated Region



ÖZET

Çukurova Bölgesindeki Akciğer Tüberkülozlu Hastaların Mononükleer Hücrelerindeki MikroRNA Düzeylerinin İncelenmesi.

Tüberküloz, hayatı tehdit eden en eski enfeksiyonlardan birisi olup, tüm dünyada hala mortalitenin en önemli sebepleri arasında yer almaktadır. Dünyada her yıl yaklaşık olarak 8.7 milyon kişinin tüberküloza yakalandığı ve en az 2 milyon kişinin de tüberküloz sebebi ile hayatını kaybettiği dünya sağlık örgütü (DSÖ) tarafından bildirilmektedir.

Multisistemik bir hastalık olan tüberkülozda olguların çoğunda akciğer ve plevra tutulumu mevcuttur. Ancak *M.tuberculosis* ile enfekte kişilerin %5-10'unda aktif tüberküloz gelişmektedir. Aktif tüberküloz gelişimi, kronik enfeksiyon, reaktivasyonlar ve asemptomatik taşıyıcılığın sebepleri tam olarak aydınlatılamamış olmakla birlikte aktif tüberküloz gelişiminde konağın immün yapısının önemli rol oynadığına inanılmaktadır.

Son yıllarda mikroRNA'ların (miRNA) immün sistemdeki rolünün belirlenmesine yönelik çalışmalara ilgi artmıştır. Birçok grup tarafından yapılan çalışmalarda miRNA'ların çeşitli bağışıklık hücreleri alt gruplarının yanı sıra bunların immünolojik işlevlerinin de farklılaşmasını etkileyerek hem kazanılmış, hem doğal immunitede önemli olduğu belirlenmiştir. miRNA'lar ayrıca, kanser, gibi önemli hastalıkların ve özellikle *M. tuberculosis*, ve *H. pylori* enfeksiyonları gibi geniş bir hastalık grubu ile ilişkilidir.

Bu araştırmada; Çukurova Üniversitesi Tropikal Hastalıkları Merkezi Bölge Tüberküloz Laboratuvarına gönderilen, mikrobiyolojik olarak tüberküloz tanısı konmuş, tedavi almamış 50 hasta ve 30 sağlıklı bireyden izole edilen mononükleer hücre ve plazma miR146a, miR424, miR365, miR223, miR144, miR421 miRNA'ları, yüksek kapasiteli real-time PCR cihazı ile değerlendirildi.

Hasta ve kontrol grubu karşılaştırıldığında plazmada miRNA144, miRNA424, mononükleer hücrede miRNA146a ekspresyonları ile istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki mevcut idi. ($p < 0,005$)

Sonuç olarak, aktif tüberküloz hastalarının mononükleer hücrelerdeki mikroRNA düzeyleri farklılıkları incelenerek tüberküloz tanısında, takibinde ve aynı zamanda konağa yönelik direk immün terapide mikroRNA'ların biyomarker olarak kullanımı irdelenmiştir.

Anahtar kelimeler: Akciğer Tüberkülozu, İmmün Cevap, MikroRNA, Mononükleer Hücre, *Mycobacterium tuberculosis*

ABSTRACT

Detection of MicroRNA Levels in Mononuclear Cells from Patients with Pulmoner Tuberculosis in Cukurova Region

Tuberculosis (TB) is one of the oldest diseases known to the mankind; remains a major cause of mortality worldwide. The World Health Organization (WHO) estimates that more than 8.7 million new cases of active TB occur annually and the estimated global annual mortality from TB is close to 2 million people.

Tuberculosis is a multi-systemic disease, and involment of lungs and plevra is seen in majority of patients. However, only 5–10% infected people develop active tuberculosis in their lifetime. *Although* the exact *reasons* of active tuberculosis, chronic infection, reactivation and asymptomatic carriage are not well understood, believed that host immune mechanisms have crucial role in devoloping active tuberculosis.

During the last few years there has been an increased interest in studying the role of miRNAs in the immune system. Studies conducted by many groups have demonstrated that miRNAs are important in both adaptive and innate immunity, by influencing the differentiation of various immune cell subsets as well as their immunological functions. miRNAs are also involved in a wide variety of important diseases such as cancer and infections especially *M. tuberculosis* and *H. pylori*.

In this study 50 patients with microbiologically proven tubeculosis who did not receive antituberculosis therapy and 30 healthy volunteers were enrolled. miRNA's of mononuclear cells and plasma isolated from the clinical materials which will be send to Tropical Disease Center Region Tuberculosis Laboratory and miR146a, miR424, miR365, miR223, miR144, miR421 evaluated by high capacity Real-Time PCR divice.

When stratified into the patient and control group showed a statistically significant association with expressions of the miRNA146a in mononuclear celles and plasmas miRNA144 and miRNA424 were present. ($p<0.005$)

In conclusion; miRNA levels differentiations in active tuberculosis patients mononuclear cells evaluated and uses of miRNA's examined for diagnosis, observations and also host spesific direct immunotherapy.

Keywords: Pulmonary Tuberculosis, Immune Response, MicroRNA, Mononuclear Cells, *Mycobacterium tuberculosis*

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Tüberküloz (TB) *Mycobacterium tuberculosis* kompleks (MTBK) grubuna ait mikroorganizmalar tarafından oluşturulan, ülkemizde ve dünyada halen önemini koruyan insanlık tarihi kadar eski kronik, granülamatöz, nekrozitan bir hastalıktır^{1,2}.

Tüberküloz, tarihin ilk çağlarından beri insanoğlunun yaşadığı en önemli sağlık problemi olma özelliğini korumuştur. Akciğer tüberkülozu prevalansında; sıkı kontrol programları, kişi ve çevre hijyenindeki nispi düzeltilmeler, yeni anti-tüberküloz ilaçların keşfi ve aşılama çalışmaları ile 20. yy'ın ilk yarısında azalma eğilimi görülmüştür. Ancak, özellikle gelişmekte olan ülkelerde yeterli mali kaynakların bulunamaması ve bağlı olarak kontrol programlarının esnetilmesi sonucu ikinci yarının başlarından itibaren, yani son 50 yılda, önce gelişmekte olan ülkelere daha sonra HIV ilişkili immun yetmezlik sendromu pandemisi ile birlikte gelişmişlik farkı gözetmeksizin bütün dünyada prevalans yeniden artış trendine girmiştir. Artan trend karşısında yeni ilaçların keşfedilememiş olması ve mevcut ilk seçenek ilaçlarında sıklıkla irrasyonel kullanımına bağlı olarak önce çoklu ilaç dirençli(MDR) ve sonrasında ikinci seçenek ilaçlara da direnç geliştirmiş genişletilmiş ilaç dirençli (XDR) *M.tuberculosis* suşlarının ortaya çıkışı pulmoner tüberküloz morbidite ve mortalitesini artırmıştır.

Halen dünya nüfusunun yaklaşık üçte birinin *M.tuberculosis* kompleksi suşlar ile infekte olduğu, ancak infekte bireylerin sadece %5-10'unda aktif tüberküloz geliştiği bilinmektedir. Dünya Sağlık Örgütü'nün (DSÖ) ve CDC gibi uluslararası otoriteler 2012 yılında tahminen 8 milyon kişiden fazla insanın tüberküloza yakalandığını ve 1,3 milyon insanın tüberküloz nedeniyle hayatını kaybettiğini rapor etmiştir^{4,5,6}. DSÖ 2014 Küresel Tüberküloz Raporu'na göre 2013 yılında 9 milyon yeni TB vakası tespit edilmiş ve bu vakaların 1,5 milyonu ölümlle sonuçlanmıştır. Ölenlerin en az 400.000'ini Human Immunodeficiency Virus (HIV) ile infekte hastaların oluşturduğu tahmin edilmektedir^{7,8}.

Anti- tüberküloz ilaçların kullanımına paralel olarak immunizasyon yolu ile salgının kontrol altına alınması çabalarında tam olarak başarıya ulaşamamış ve

tüberkülozun moleküler patogenezi ve immunopatolojik olaylar tam olarak aydınlatılamamıştır⁹.

Aktif tüberküloz gelişiminde, hastalığın klinik seyrinde konak savunması son derece önemli rol oynamaktadır. Tüberküloza karşı koruyucu immunitede sitotoksik T hücreleri ve yardımcı T hücreleri oldukça önemli rol oynamakta ve bu hücrelerin farklılaşması ve işlevlerinin düzenlenmesi sıkı bir şekilde mikroRNA'lar tarafından kontrol edilmektedir¹⁰.

Son yıllarda mikroRNA'ların (miRNA) immün sistemdeki rolünün belirlenmesine yönelik çalışmalara olan ilgi artmıştır. Birçok araştırmacı tarafından yapılan çalışmalarda miRNA'ların çeşitli bağışıklık hücreleri alt gruplarının yanı sıra bunların immünolojik işlevlerinin de farklılaşmasını etkileyerek hem kazanılmış, hem doğal immunitede önemli rol oynadığı belirlenmiştir¹¹.

MikroRNA'lar, genom üzerinde protein kodlayan (intron veya ekzon) ve protein kodlamayan bölgelerdeki RNA genlerinden transkribe edilen, fakat proteine çevrimi gerçekleşmeyen, fonksiyonel RNA molekülleridir. Bu dolaşımda bulunan miRNA'lar kanda oldukça kararlı bir yapı göstermektedir ve klinikte hastalıkların tanısı ve prognozunda önemli bir biyomarker olarak kullanılabileceği gösterilmiştir. miRNA'lar plazmada bulunan RNAaz'lara oldukça dirençlidir, bununla birlikte yüksek ve düşük pH, uzun süreli depolama, dondurup çözündürme gibi ekstrem koşullara da oldukça dayanıklıdır. Bu sebeple invazif yöntemlere ihtiyaç olmaksızın serum ve plazma örnekleri ile çalışmayı mümkün kılmaktadırlar^{12,13}.

miRNA'lar, organizmada birçok biyolojik olayda belirleyici rol oynadıkları için mutasyonları ve/veya ekspresyon farklılıklarının başta kanser olmak üzere kardiyovasküler ve inflamatuvar hastalıklar, musküler bozukluklar, nörodejeneratif hastalıklar gibi çok çeşitli hastalıklarla ilişkili olabileceği iddia edilmiştir¹⁴.

Bu çalışmada; akciğer tüberkülozlu hastalar ile klinik ve laboratuvar testleri sonucunda tüberküloz yakınma ve bulgusu olmayan hastaların mononükleer hücrelerinde, daha önce yapılan çalışmalarla aktif tüberkülozlu hastalarda seviyelerinin önemli derecede değiştiği bilinen miR146a, miR424,

miR365, miR223, miR144, miR421 olmak üzere 6 farklı mikroRNA ifade düzeylerindeki değişimin yüksek kapasiteli real-time PCR cihazı ile değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla Ç.Ü Rektörlüğü Tropikal Hastalıklar Araştırma ve Uygulama Merkezi - Adana Bölge Tüberküloz Laboratuvarı'na (THAUM) 2014-2015 tarihleri arasında Karşıyaka Verem Savaş Dispanseri, Çifteminare Verem Savaş Dispanseri ve Çukurova Aşım Tüfekçi Devlet Hastanesinden Akciğer tüberkülozu şüphesi ile balgam ve periferik kan örneği gönderilen ve tanı amaçlı yapılan laboratuvar işlemleri sonucunda balgam örneklerinde MTK basillerin varlığı tespit edilen ve edilemeyen bütün hastalara ait alınan örneklerden mononükleer hücre izolasyonu gerçekleştirilmiştir.

Çalışmamızın öncelikli hedefi, aktif tüberküloz hastalarının mononükleer hücrelerindeki mikroRNA düzeyleri farklılıklarını inceleyerek ekspresyon düzeylerindeki değişimin anlamlı olup olmadığının tespit edilmesi ve tüberküloz tanısında, takibinde ve konağa yönelik direkt immünterapi de yukarıda belirtilen farazi mikroRNA'ların biyomarker olarak kullanımının irdelenmesidir. Aynı zamanda çalışmamız tüberküloz patogeneğinde mikroRNA'ların rolünü anlamaya yönelik ülkemizde ilk çalışma olup bundan sonraki bilimsel çalışmalara veri olarak katkı sunması ve tüberküloz takip merkezlerinde tanı ve tedavi rehberlerinin değişmesi ve/veya modifiye edilmesine katkı sağlayacaktır. Hasta ve ekonomik kayıpların azaltılmasını sağlamak uzun vadeli beklentimizdir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Tüberkülozun Tarihçesi

Tüberküloz; tarihi oldukça eski zamanlara dayanan, dünyada her yıl sekiz milyonu aşkın yeni vaka ve yaklaşık iki milyon ölümlle günümüzde hala çok önemli bir halk sağlığı sorunu olmaya devam eden bir enfeksiyon hastalığıdır¹⁵.

Mikobakteriyel enfeksiyonların ilk kez insanların yerleşik düzene geçtikleri M.Ö 8000 yıllarında sığırları evcilleştirmeye başlamasıyla birlikte ortaya çıktığı düşünülmektedir. M.Ö. 4000-2400 yıllarında eski Mısır'da Firavunlar döneminden kalma Thebus bölgesinde bulunan 85 mumyadan alınan organik materyallerde tüberküloz basilinin varlığı ARB, PCR ve IS6110- RFLP ile ispatlanmış, spoligotiplleme ile de suş tayini yapılabilmektedir^{16,17}. Yine Mısır'da, M.Ö. 5000 yıllarına, Hindistan'da M.Ö. 3300 yıllarına ve Çin'de M.Ö. 2300 yıllarına ait kaynaklarda tüberküloz hastalığını düşündüren ifadeler bulunmaktadır. M.S. 700 civarında Peru'da ve Mısır'da bulunan mumyalarda Pott hastalığına dair bulgular tespit edilmiştir. Hipokrat (M.Ö. 460-377) hastalık için erime, tükenme anlamına gelen "*phtisis*" deyimini kullanmış ve hastalığı yunan literatürüne tüberkülozu yerleştirmiştir. M.S. 174 yılında Galen, kendisinden sonra 1000 yıl boyunca değişmeyen tedavi önerilerini ortaya koymuştur. Bu öneriler süt içmek, temiz dağ havası, istirahat, öksürüğün kesilmesi, göğüs yakıları, venden kan alımı, sülük uygulaması, kusturucular, müshiller, kabartıcı maddelerle ciltte yaralar oluşturmak şeklinde özetlenebilir^{16,18,19}.

Gözlem ve deneylerin rönesansla birlikte artış göstermesiyle tüberküloz konusunda yeni bilgiler ortaya çıkmıştır. Andreas Vesalius (M.S. 1478) fitizisli hastaların otopsilerinde kaviter lezyonların bulunduğunu bildirmiştir. F. Sylvius (1614-1672) ise tüberkülozdan ölen hastaların akciğerlerinde tüberkül adını verdiği küçük sert nodüllerin bulunduğunu göstermiştir. Eski Avrupa'da da son derece yaygın olan tüberküloz 15-17 yüzyıllarında Avrupa Toplumunun %25'ini enfekte ettiği Litvanya'da toplanan kemik ve diş materyallerinde IS6110 RFLP yöntemiyle MTBK'ine ait bakteri varlığının kanıtlanmasıyla ispatlanmıştır. 17. ve

18. yüzyıllarda ise sanayi devrimi, fakirlik, yetersiz beslenme ve kalabalık yaşam gibi elverişsiz koşullar tüberküloz salgınının yayılmasına neden olmuştur. Hastalık İngiltere’den tüm batı ülkelerine, batı Avrupalılarda tüm dünyaya yayıldıkça tüberküloz da yaygınlık kazanmıştır. 19.yy hastalığın kavranmasında çok önemli gelişmelere sahne olmuştur. A. Willemin 1865 yılında tüberkülozlu hastaların kavitelerinden alınan materyali tavşanlara inoküle ederek tüberküloz geliştiğini göstermiştir. Robert Koch 1882’de tüberkülozun *M. tuberculosis* basili ile oluşan bir infeksiyon olduğunu kanıtlamıştır^{17,20}. 1921 yılında Fransız araştırmacılar Albert Calmette ve Camile Guérin sığır TB basili 230 kez pasaj yaparak ilk TB aşısı olan *Bacillus Calmette-Guérin* (BCG)’i geliştirmişlerdir. Seibert ve Glenn 1939 yılında “old tuberculin”’in saflaştırılmasıyla elde edilen tüberkülinin saflaştırılmış protein türevi olan “Purified Protein Derivative” (PPD)’i hazırlamıştır ve elde edilen saflaştırılmış protein türevi ile birlikte tüberküloz infeksiyonunun varlığı belirlenmeye başlanmıştır^{18,21,22,23}.

1940’larda ABD’de Streptomycin (STR), İsveç’te Para-amino salisilik asitin (PAS) bulunması ile tüberküloz tarihinde yeni bir dönem başlamıştır. İlaçların tek başına kullanımı sonucu kısa zaman içinde direnç gelişiminin gözlenmesi yeni ilaç bulma çabalarını zorunlu kılmıştır. 1952 yılında Robizek ve Selikof tarafından izoniazid (INH)’in bulunmasından sonra üç ilaçla kombine tedavi uygulanması 18-24 ay süren tedavi süreci sonucunda tüberküloz tedavi edilebilir bir hastalık haline gelmiştir. 1954 yılında pirazinamid (PZA), 1962 yılında etambutol (EMB) ve 1966 yılında rifampisin (RIF) bulunmuştur. Yetmişli yılların başlarında batı ülkelerinde artık tüberküloz sorununun bittiği düşünülürken 1985 yılından itibaren bu ülkelerde tüberküloz insidansının ilk kez artmaya başlamasıyla hastalığın yeniden ortaya çıkması büyük şaşkınlık yaratmış ve 1980’li yıllardan sonra dünyada giderek artan HIV infeksiyonuna bağlı olarak TB sorunu yeni bir boyut kazanmıştır. Çünkü HIV infeksiyonuna bağlı immün sistemin baskılanması TB basili ile infekte kişilerde klinik TB’nin ortaya çıkmasına sebep olmaktadır. Nitekim Afrika’da HIV-1 ile infekte her üç kişiden birinde TB tespit edilmiştir^{24,25}.

Tedavi başarısı ve direnç gelişiminin önlenmesi ile mortalitenin azaltılması başarılı bir tüberküloz kontrol programlarının uygulanabilmesi ile mümkündür. Tedavinin başarısını etkileyen iki önemli faktör; hasta uyumu ve ilaç direncidir. Tüberküloz kontrolünde istenen başarıyı ulaşmak için Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ); Dünya nüfusunun %55'ini ve dünyadaki tüberküloz olgularının % 27'sini içeren 148 ülkede “doğrudan gözetimli tedavi stratejisi (DGT-DOTS)” uygulamasını başlatmıştır²⁶.

2.2. Mikobakterilerin Bakteriolojisi ve Hücre Duvar Yapısı

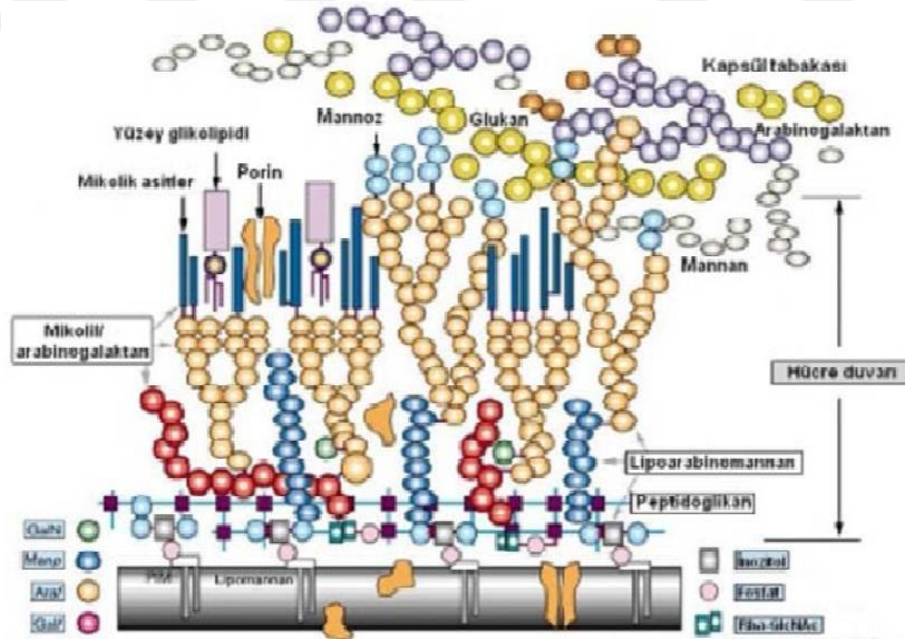
Mikobakteriler Mycobacteriaceae ailesinin tek cinsi olup, aerop, sporsuz, katalaz aktifliği gösteren, hafif kıvrık veya düzgün çomak şeklinde, dallanabilen, 0.2 - 0.6 µm eninde, 1.0- 10 µm boyunda ince basillerdir. Bölünme süreleri 12-18 saat olup yavaş üreyen, pleomorfik çomaklardır. Optimum üreme şartları 5-6 pH ve %5-10 CO₂'dir. 37°C üreme için uygun bir sıcaklık olmasına karşın bu sıcaklık türden türe değişmektedir. Uygun şartlar altında 10-15 günde koloniler gözle görülmeye başlar²⁷.

Bakteriyolojik özellik ve DNA benzerlikleri yönünden yakın ilişkili türlere 'kompleks' adı verilmekte ve *M. tuberculosis* kompleks (MTBK) olarak tanımlanmaktadır. MTBK içerisinde *M. tuberculosis*, *M. africanum*, *M. bovis* ve BCG suşu, *M. microti*, *M. canettii*, *M. caprae*, *M. pinnipedii*, *M. mungi* ve son olarak da henüz daha tanımlanma aşamasında olan *M. orygis* türleri bulunmaktadır. Bunlar dışında kalan ailenin diğer üyeleri, tüberküloz dışı mikobakteriler veya atipik mikobakteriler olarak adlandırılır²⁸. Tüberküloz hastalığının oluşumunda % 97 oranında *M. tuberculosis* basili sorumludur.

Tüberküloz basili 2-4 µ uzunluğunda, düz veya eğri çubuklar şeklindedir. Hücre duvarının yüksek lipid içeriği nedeniyle %95 etil alkol ve %3 hidroklorik asit tarafından dekolarize edilemezler, dolayısı ile aside dirençli basil (ARB) olarak adlandırılırlar²⁹. Basilin büyüklüğü ve şekli, üreme ortamına ve süresine bağlı olarak değişkenlik gösterebilir. Makrofaj içerisinde aktif çoğalan basillerin sıvı besiyerlerinde bulunan basillerden daha uzun olduğu ve tomurcuklanma benzeri yapı sergiledikleri gösterilmiştir. Hidrofobik karakterleri sebebi ile patojen basillerin bölünmeden sonra birbirlerinden ayrılmadan büyük kümeler

şeklinde çoğaldıkları görülmüş ve oluşan bu kümeler kord faktör (serpentine cord) olarak tanımlanmıştır²⁸.

Mikobakterilerin hücre duvarı yapısı diğer bakterilere nazaran oldukça karmaşık bir yapı içermektedir ve üç ana tabakadan oluşmuştur. Plazma zarının üzerinde bulunan en iç tabaka peptidoglikan (murein) kısa peptid zincirleri, çapraz bağlarla sıkıca bağlanan uzun polisakkarit zincirleri içerir ve hücrenin sert yapısını sağlayan tabakadır. İkinci tabaka hücre duvarının %35'ini oluşturan arabinogalaktan olup peptidoglikan tabakasına fosfodiester koprüleriyle bağlıdır. Mikolik asitler arabinogalaktanlara kovalent olarak bağlanarak hücre duvar kalınlığından ve büyük oranda da hücrenin aside dirençli olmasından sorumludur. Mikolik asitler, trehaloz gibi şekerlere bağlanarak kord faktörü (6-6'-dimikolat- α -D-trehaloz) oluştururlar. Mikoizidler olarak adlandırılan en dış tabaka ise bir grup heterojen peptidoglikolipid ve/veya fenolik glikolipidden oluşmuştur. Hücre duvarı ağırlığının %60'ını oluşturan lipidlerin çoğu uzun zincirli yağ asitleridir^{28,30,31}.



Şekil 2. 1. Mikobakteri hücre duvarı yapısı³¹.

2.3. Tüberküloz Patogenezi

M. tuberculosis sahip olduğu çok sayıda virulans özelliği ile zaman zaman konağın bağışıklık sisteminden kurtulabilen bir enfeksiyon etkenidir. Enfeksiyonun nasıl sonuçlanacağını, konağın savunma mekanizmaları ve basilin virulans faktörlerinin etkileşimi belirlemektedir. Son yıllarda bu etkileşimler sırasında, konak ve patojene ait bazı genlerin ekspresyon düzeylerindeki değişimleri ve bu genlerin işlevlerini ortaya koymayı amaçlayan çalışmalara olan ilgi giderek artmaktadır.³²

Akciğer tüberkülozunda solunum damlacıkları yolu ile alınan basil alveollerde makrofajlar, nötrofiller, mast hücreleri, tip II pnömositlerin ve dentritik hücrelerin yüzeylerinde bulunan reseptörlere tutunarak kolonize olur^{33,34}. Akciğer tüberkülozunda 5 µm'den büyük partiküller, lizozim, laktoferrin gibi antibakteriyel sekresyon içeren üst solunum yollarının siliyalı epitelyumu tarafından tutulurken, daha küçük partiküller alveollere ulaşarak alveolar makrofajlar tarafından fagosit edilmektedir^{35,36}. Alveoler epitel hücre üzerinde opsonize edici proteinler (kompleman veya spesifik antikorlar) tarafından işaretlenen basiller fagositik hücreler tarafından fagosit edilerek, fagolizozomal füzyon içerisinde sindirilip yok edilirler. Ancak bakteri çeşitli mekanizmalar ile fagositik hücre içerisinde çoğalmaya devam edebilir. Tüberküloz basili opsonize edici proteinlerden farklı olarak başka işlevsel özellikte proteinlere bağlanarak immun sistem mediatörlerinin basili algılamada yetersiz kalmasına neden olabilmekte, aynı zamanda mediatörleri aracılığı ile fagolizozomal füzyon modifiye edilerek ve genetik faktörlere bağlı konak savunmasında meydana gelen yetersizlikler ile basil tamamen ortadan kaldırılamamakta ve çoğalmaya devam edebilmektedir.³²

Fagositik endozomlarda çoğalmaya devam eden basiller ESAT-6 (Early Secretory Antigenic Target) ve CFP-10 (Culture Filtrat Protein) ile oluşturdukları kararlı kompleks ile membrandaki lipid bariyerlerde por formasyonu oluşturarak hücreleri lizize uğratırlar. Parçalanan hücreden alveoler boşluğa düşen basiller fagositik hücre endozomu içerisinde latent fazda çoğalmadan yaşamaya devam eder. Latent dönemin oluşumunda mikolik asitler, sigma faktörler önemli rol oynamaktadır. Parçalanan fagositik hücrelerin sekrete ettiği kemotaktik

faktörler, monositlerin ve diğer inflamatuvar hücreler infeksiyon bölgesine gelmesini sağlar ve granülom oluşumu başlar. Aktive edilmemiş makrofajlar tarafından alveolar boşluktan geçen basiller fagosite edilseler dahi makrofaj aktivasyonu henüz gerçekleşmediği için çoğalmaya devam ederler ve lenfohematojen yolla tüm vücuda yayılım yeni granülomlar oluştururlar. Lenfohematojen yolla yayılım gösteren basiller en çok akciğerler (apeks), böbrekler, uzun kemikler ve vertebralara yerleşir. Sağlıklı bireylerde lenfohematojen yolla vücuda dağılan basillerin oluşturduğu küçük kazeöz odaklar makrofajlarca temizlenmektedir. Büyük kazeöz odaklar ise fibröz bir kapsül ile çevrilerek (tüberkülom) izole edilmektedir^{37, 38, 39, 40, 41, 36, 42}.

2.4. Klinik Tablolar

Dünyada en çok karşılaşılan tüberküloz infeksiyonu akciğer tüberkülozudur. Tüberkülozlu hastanın öksürmesi ve aksırması sonucu damlacıklar içinde dış ortama salınan basiller birkaç saat asılı halde havada kalabilir ve duyarlı kişiler tarafından solunum yolu ile alınarak akciğer alveollerine ulaşırlar. Ancak her infeksiyon hastalıkla sonlanmaz, infekte olan kişilerin ancak % 5-10'unda hastalık tablosu ortaya çıkmaktadır. Infekte bireylerin büyük bir kısmında hastalık hiç gelişmez ve mikroorganizma vücut içinde uzun bir zaman dormant (aktif olmayan) halde kalabilir. Böyle kişiler hayatlarının geri kalan kısmında hastalık riski taşıyarak yaşarlar.

Basilin aktif olarak çoğaldığı hastalarda klinik tablo farklı şekillerde ortaya çıkabilir⁴³. Tüberkülozda semptomlar sinsi bir başlangıç gösterir. Primer tüberkülozda genellikle semptom ve bulgu oluşturmada primer lezyon ve hiler adenopati gelişir. Ateş, öksürük, kilo kaybı ve gece terlemesi en sık görülen semptomlardır. Ancak bu semptomlar daha çok büyük çocuk erişkinlerde görülür. Küçük çocuklarda ise 4 haftadan daha uzun süren kilo alamama, 2-3 ay ve daha uzun süren kuvvet kaybı, terleme, öksürük, wheezing, bir haftadan daha uzun süren sebebi açıklanamayan ateş ve effüzyon görülebilir. İnfeksiyonunun 3- 8. haftalarında gecikmiş tip aşırı duyarlılık reaksiyonu nedeni ile eritema nodozum görülebilir.

Sekonder tüberkülozda ise en sık görülen semptomlar ise; iştahsızlık, yorgunluk, kilo kaybı, özellikle öğleden sonraları artan ateş, gece terlemeleridir⁴⁴.

2.4.1. Primer Akciğer Tüberkülozu

Tüberküloz basilinin insana bulaşmasında en önemli yol, solunum ile basilin alınmasıdır. Bulaşın en önemli kaynağı ise basil çıkaran hastalardır. Hastaların konuşması, öksürmesi ve hapşırması esnasında ortama basil bulunan damlacıklar saçılmaktadır ve bu damlacıkların büyüklükleri farklılık göstermektedir. Büyük damlacıklar hızla yere düşerken, daha küçük olanların düşüşü daha uzun zaman almaktadır. Böylece 1 mm ve altında çapı küçük çaplı damlacıklar daha uzun süre havada asılı kalmakta, çok yavaş olarak yere düşmekte ve aynı ortamda bulunan insanlar tarafından inhale edilme olasılığı artmaktadır. Her bir damlacığın içinde yaklaşık 3-10 arası basil bulunabilmektedir⁴⁵. Basille daha önce karşılaşmamış duyarlı bireyler, havada asılı bu damlacıkları inhale ettiklerinde çapları alveollere ulaşmak için büyük olan bu damlacıkların büyük bir kısmı üst hava yollarının lokal koruyucu mekanizmaları tarafından tutulmakta ve damlacıkların sadece bir kısmı alveoler yüzeye erişebilmekte ve infeksiyon oluşturabilmektedir⁴⁶ fakat alveollere ulaşan damlacıklar ile taşınan basil konağın ilk savunma mekanizmasını yenerek hayatta kalır ise; akciğer parankiminde pnömoni odağı (Ghon odağı), komşu hiler lenf bezinde granülomatöz inflamasyon ve bu iki oluşum arasındaki lenfanjit ile karakterize primer kompleksin (Ranke kompleksi) meydana gelmesine neden olur. İmmün sistemin yetersiz kaldığı durumlarda primer odak ve ilgili lenf bezindeki inflamasyon ilerler, primer tüberküloz meydana gelir^{45,46,47}.

2.4.2. Miliyer Tüberküloz

Hematojen yayılımı sırasında damarlara yerleşen basillerin kana karışması miliyer tüberkülozun gelişmesine neden olur. İmmün sistemi henüz tam gelişmemiş dört yaş altı çocuklarda primer infeksiyonun erken komplikasyonu olarak görülebilir⁴⁷. Bol miktarda TB basilinin hematojen

yayılması sonucu yüksek kan akımlı organlar (akciğer, karaciğer, dalak, kemik iliği, gözler, bobrekler, surrenaller) başta olmak üzere her organ değişik oranda tutulabilmektedir. Miliyer TB'un tanıtıcı histopatolojik bulgusu makroskopik olarak tüberkül, mikroskopik olarak ise makrofajlar ve Th1 lenfositlerinin etkileşimi ve işbirliği sonucunda oluşan granülomdur⁴⁸.

2.4.3. Post Primer Akciğer Tüberkülozu

Post primer akciğer tüberkülozu, erişkin hastalarda en sık rastlanan tüberküloz tipidir. Reaktivasyon tüberkülozu aynı zamanda erişkin tüberkülozu olarak da adlandırılmaktadır.

Tüberkülozun kontrolünün iyi olduğu ülkelerde hastalık giderek orta ve ileri yaşlara kaymasına rağmen hastalığın henüz kontrol altında olmadığı ülkelerde erişkin tüberkülozu daha çok genc erişkinlerde görülmektedir⁴⁹. Post primer tüberküloz primer infeksiyon sonrası latent halde kalan basillerin çoğalmaya başlaması ile ve/veya basil yayan aktif tüberkülozlu bir hastadan çok sayıda virülen bir basilin almasıyla gelişebilir⁴⁷.

2.4.3.1. Endojen Reaktivasyon

Akciğerin apikal-subapikal bölgelerine yerleşen (Simon odağı) ve latent halde kalan basillerin hücrel immün cevapta meydana gelen supresyon nedeniyle aktif hale geçmesi ile hayatın herhangi bir döneminde meydana gelir.^{47,50}

2.4.3.2. Ekzojen Reaktivasyon

Primer infeksiyon geçirmiş bireyin, basil yayan aktif tüberkülozlu bir hastadan çok sayıda virülen basil alması sonucu meydana gelir.^{47,50,51}

2.4.3.3. Ekstrapulmoner Tüberküloz

Akciğer dışında ki odaklarda (plevra, perikard, kemik, böbrek, genital, gastrointestinal, merkezi sinir sistemi) tüberküloz hastalığının oluşması durumudur⁵¹.

2.5. Tüberküloz İmmünolojisi

M. tuberculosis enfeksiyonunun oluşmasında konağa ait immün cevap önemli rol oynamaktadır. İmmün sistemin çok sayıdaki enfeksiyona karşı etkinliği bilinmektedir ve buna en iyi örnek olarak tüberküloz olguları verilebilir. Tüberkülozla infekte bireylerin %90'ın da aktif tüberküloz gelişmemekte ve tüberküloz basiliyle infekte olmalarına karşın hayatları boyunca hastalık oluşmamaktadır. Ancak immün sisteminin baskılanmasına neden olan HIV enfeksiyonu gibi altta yatan hastalıkların eşliğinde tüberküloz gelişme riski artmaktadır. Yine günümüzde mevcut olan BCG aşısının pulmoner tüberkülozda korunmada tam olarak etkili olmaması nedeniyle tüberküloza karşı mücadelede etkin bir aşı geliştirilmesi için araştırmacıların konağın immün sistemi ile tüberküloz basili arasındaki ilişkiyi çok daha iyi anlamaları gerekmektedir.⁵²

2.5.1. Doğal İmmün Cevap

Alveollere ulaşan *M.tuberculosis* basilleri, doğal savunma yollarıyla yok edilebilir veya doğal savunma sisteminin yetersiz kalması durumunda klinik görünümleri oluşturabilirler. Üst solunum yolunun fiziksel engeli, fagositoz, fagositik hücrelerin reaktif nitrojen ve oksijen ürünleri, inflamatuvar hücreler ve salgıladıkları sitokinler, apoptoz ve genetik faktörler konağın doğal savunmasında rol oynarlar.⁵³

2.5.1.1. Nötrofiller

Nötrofiller zararlı patojenlerle ilk karşılaşan kemokinlerin salınımını ve inflamatuvar cevabı tetikleyen hücreler arasındadır. Tüberküloz enfeksiyonunda genellikle yetersiz kalsalar da fagositoz aktiviteleri, oksijene bağımlı öldürme mekanizmaları ile konak bağışıklık sistemine katkı sağlarlar.⁵²

2.5.1.2. Dendritik Hücreler

Dendritik hücreler kazanılmış bağışıklığın geliştirilmesinde önemli bir yere sahiptir. Yapısında bulunan C-tipi lektin, Fcγ ve FcεR reseptörleri ile reseptör bağımlı endositoz yoluyla hücre içine aldıkları *M. tuberculosis*'e ait antijenik

yapıları işlemleyerek maturasyonlarını tamamlarlar ve CCR7 kemokin reseptörleri ile en yakın lenf noduna doğru göç eder, işlemledikleri antijenleri, MHC-I, MHC-II ve CD1 molekülleri aracılığı ile T lenfositlere sunarlar^{54,55}. Özellikle lenfatik bezlerde yoğun olarak bulunan dendritik hücreler antijen sunan hücre grubundan olup, antijenik molekülleri lenf bezlerine taşır ve lenf bezlerinde basile özgü T lenfosit farklılaşmasını sağlamaktadır⁵⁶.

2.5.1.3. Naturel Killer Hücreler

Tüberküloza karşı doğal savunma sisteminin efektör hücreleri olan naturel killer (doğal öldürücü - NK) hücreleri, infekte hücre ile birlikte patojeni de liziz yoluyla öldürme yeteneğine sahiptirler. Ayrıca enfeksiyonun erken dönemlerinde fagositik hücreleri aktive etme özelliği taşımaktadırlar⁵⁷. İnterferon- γ (IFN- γ) salgılayarak makrofajları aktive etmekte ve fagosite edilmiş mikroorganizmaların ölümüne katkıda bulunmaktadırlar. Öte yandan, NK hücreler, T lenfositlerden açığa çıkan IL-2 ve antijen sunumu yapan hücrelerden salınan IL-12 ile aktive olup sitotoksik etkilerini hedef hücre apoptozisini indükleyerek gerçekleştirmekte ayrıca IFN- γ sentezleyerek basil ile enfekte hedef hücrelerin ölümüne neden olmaktadır.⁵⁸

2.5.1.4. Mast Hücreleri

Solunum, gastrointestinal ve üriner sistem mukozaları ile kan ve lenf damarlarının yakın çevresinde yerleşim gösteren, T-helper 2 hücre cevabının oluşmasını sağlayan, genellikle allerjik reaksiyonlara neden olan hücrelerdir. İmmünglobulin E (IgE) tipindeki antikörlara sahip olduğu yüksek afiniteli IgE reseptörleri (Fc ϵ RI) ile bağlanırlar.

Mast hücreleri CD48 yüzey molekülleri ile *M. tuberculosis* ile etkileşime girmekte ve PAMP (Pathogen Associated Molecular Pattern-patojen ilişkili meleküler ürünler) Toll Like Reseptor-4 (TLR-4) , TLR-2 aracılığı ile tanıyarak mast hücreleri uyarılmakta bunun sonucunda mast hücreleri histamin, triptaz, kimaz, karboksipeptidaz, heparin, Leukotriene C4 (LT-C4), Prostaglandin D2 (PGD2), platelet aktive edici faktör (PAF), tümör nekrozis faktör -alfa (TNF- α), transforme edici büyüme faktörü- beta (TGF- β), İnterlökin-4 (IL-4), IL-5, IL-6 ve

IL-8 gibi kemoatraktan moleküller, kemokinler ve sitokinleri salgılayarak inflamatuvar cevap oluşumuna katkı sağlarlar⁵⁹.

2.5.1.5. Makrofajlar

Tüberküloz basilinin yok edilmesi ve etkin bir bağışık cevap gelişiminde rol oynayan en önemli hücrelerdir. Makrofajların tüberküloz basili ile yüzeylerinde bulunan farklı reseptörler aracılığı ile etkileşimi gerçekleşmektedir.

Makrofaj reseptörlerinin en önemlileri Fc, kompleman, mannoz, sürfaktan, CD43, TLR-2 ve TLR-4 reseptörleridir⁶⁰. Alveollere ulaşan *M. tuberculosis* basili makrofajlar tarafından fagosite edilir. Eğer basilin virulansı yüksekse hücre duvarındaki bileşikler makrofajların lizozomal enzimlerini inhibe ederek hücre parçalayıcı işlevlerini kaybetmelerine neden olurlar. Böylelikle makrofajlar tarafından fagosite edilen basiller yok edilmez ve makrofajlar içinde çoğalmaya devam eder.

Basil makrofaj lizozomal enzimlerini inhibe edecek kadar virulan değilse, makrofajlar fagosite ettikleri mikobakteriyel antijenleri işler ve T-lenfositlere sunar. İnfekte makrofajlar İnterloklin-1 (IL-1) salgılayarak T- lenfositlerin inflamasyon bölgesine gelmesine ve burada çoğalmalarına neden olurlar. T- lenfositler tarafından salınan İnterferon-gama (IFN- γ) sitokini makrofajlarda fagozom yeteneğinin olgunlaşmasına ve reaktif oksijen ve nitrojen ara ürünlerinin oluşumuna neden olmaktadır. Çoğu zaman interferon-gama salınımıyla makrofaj aktivasyonu basili tam olarak ortadan kaldırmada yetersiz kalmaktadır. Bu nedenle basil metabolik aktivitesini yavaşlatarak sessiz halde yaşamını sürdürmeye devam eder⁶¹.

Ortamda bulunan Tümör Nekrotizan Faktor-alfa (TNF- α) da IFN- γ ile sinerjistik etki göstererek reaktif oksijen ve nitrojen ara ürünlerinin oluşumunu artırarak mikobakterilere karşı makrofajların mikrobisidal etkinliğini destekler, güçlendirir. Ayrıca dendritik hücreler ve makrofajların zarlarında yer alan bir membran geçiş proteini olan ve antijen sunumunun gerçekleşmesi için bir kilit benzeri görev gören Toll- Like Reseptör (TLR) aracılığı ile mikobakteriyel antijenler tanınmaktadır. TLR aktivasyonu nükleer faktor- κ B (NF- κ B) bağlayan

kinazları aktive ederek proinflamatuvar sitokinlerin sentezi için makrofaj DNA'sında transkripsiyonu başlatmaktadır⁶².

2.5.2. Kazanılmış İmmün Cevap

Kazanılmış immün cevap doğuştan kazanılmış bağışıklık sisteminden farklı olarak yabancı antijenlerin spesifik olarak tanınmasını gerektirir. Kazanılmış immün cevap; T hücre aktivasyonu ve efektör mekanizmaları içeren hücresel immün cevap ve B hücre olgunlaşması ve antikor üretimini içeren humoral immün cevaptan oluşur⁶³.

2.5.2.1. Humoral İmmün Cevap

Tüberküloz basili hücre içi patojen olduğu için basilin tamamen yok edilmesinde humoral immün cevap tek başına yeterli olamamaktadır. Ancak infeksiyonun henüz yeni oluşmaya başladığı ilk zamanlarında oluşan antikorlar, opsonizasyon, kompleman aktivasyonu, sitokin cevabının artırılması, antikor bağımlı sitotoksiste, artmış antijen sunumu sayesinde tüberküloz basilinin özellikle mukozal yolla alınmasını önleyebilmektedirler⁶⁴.

2.5.2.2. Hücresel İmmün Cevap

Hücresel immün cevapla kontrol edilebilen bir hücre içi infeksiyon olan tüberkülozda hücresel immünite (Hİ); makrofaj, dentritik hücre, sitokin ve T lenfositler ile sağlanır. Mikobakteriler doğrudan alveoler makrofaj ve lenf bezi dentritik hücrelere penetre olurlar. *M.tuberculosis* hücre duvarında bulunan arabinan terminaline mannoz bağlı olmayan lipoarabinomannan (AraLAM) makrofaj, monosit, nötrofil ve T lenfositlerin kemotaksisinde görev alan IL-8 (İnterloklin-8), monosit kemoatraktan protein1 (MCP- 1) kemokinlerin üretilmesini sağlar. Tüberkülozda hücresel immün cevap makrofajların veya dentritik hücrelerin *M.tuberculosis*'e ait antijenleri MHC-I/II veya CD1 molekülleri aracılığı ile T lenfositlere sunmasıyla başlar⁶⁵.

2.5.2.2.1. T lenfositlerin Rolü

Tüberküloz hücrel immün cevabın en iyi tanımlandığı hastalıklardandır. T-lenfositlerin makrofajlarda yaşayan tüberküloz basilinin yok edilmesinde efektör fonksiyonları kritik öneme sahiptir. Tüberkülozda hücrel immün cevap, *M. tuberculosis* antijenlerinin makrofaj veya dendritik hücrelerin Major Doku Uygunluk Molekülleri (Major Histocompatibility Molecules Class I/II; MHCI/II) veya CD1 molekülleri aracılığı ile T-lenfositlere sunulmasıyla başlar.

T hücre reseptörleri (TCR) yoluyla antijeni tanıyan T-lenfositler, antijene özgü olarak aktive olurlar. T lenfositlerin %90'ından fazlası α ve β zincirinden oluşan bir TCR'ne sahiptir. α/β T hücreleri de kendi aralarında CD4+ ve CD8+ T lenfositler olarak alt gruplara ayrılırlar. CD4+ T lenfositler MHC-II molekülleri ile ilişkili olarak antijeni tanıırken CD8+ T lenfositler ise MHC-I molekülleri aracılığıyla antijeni tanırlar. CD4+T lenfositler kendi içinde ürettikleri sitokinler ile T helper-1 (Th-1) ve T helper-2 (Th-2) lenfositler olarak iki alt gruba ayrılırlar. T helper-1 (Th-1) alt grubu IFN- γ , IL-2, TNF- α salgılar ve geç tip aşırı duyarlılık reaksiyonun oluşumunda rol alırlar. T helper-2 (Th-2) lenfositler IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 salgırlar. Makrofajın MHC-I veya MHC-II moleküllerine, infekte makrofajların fagolizozomlarında proteolitik enzimlerle ayırt edilen patojene ait antijenik peptid veya lipidler bağlanmakta ve hücre membranına taşındıktan sonra farklı lenfosit alt gruplarının proliferasyonuna neden olmaktadır ⁶⁶.

2.5.2.2.1.1. CD4+ T lenfositler

CD4+ yardımcı T lenfositler makrofajlar ve dendritik hücreler gibi antijen sunucu hücrelerin MHC II molekülleriyle sunduğu antijeni tanıyarak tüberküloz (TB) savunmasında en önemli sitokin olan IFN- γ ve çeşitli sitokinler salarak makrofajları aktive ederler. Makrofajların aktive olması ile içerdikleri basilleri yok etme yetenekleri artar. Bunun yanında CD4+ T lenfositler CD95 Fas ligandı yoluyla da enfekte hücrelerin apoptozunu sağlamaktadırlar⁶⁷. Makrofajlar CD4+ T lenfositlere yüzeylerinde bulunan özellikle iki molekül ile bağlanırlar. Makrofajların yüzeyinde bulunan MHC-II molekülü, CD4+,Th1 lenfositlerin T hücre reseptörüne (TCR) bağlanırken makrofajların yüzeyinde bulunan CD80 (B7.1)'nin CD4+ Th1 lenfositlerinde bulunan CD28 reseptörüne bağlanmasıyla

T lenfositin yüzeyinde CD40 Ligand (CD40L) reseptörü oluşmakta ve antijene özgü Th1 proliferasyonu başlamaktadır. CD40L ile makrofajlarda bulunan CD40 reseptörünün birleşmesi sonucu antijene özgün olarak uyarılan CD4+ Th1 lenfositlerden, IL-2, IL-3, IFN- γ , TNF- α , ve major katyonik protein (MCP-1) gibi sitokinler ve kemokinlerin salınımı gerçekleşmekte ve bunun sonucunda; doku makrofajlarının aktivasyonunu ve lezyon bölgesine makrofaj ve monositlerin gelmesi sağlanmaktadır. CD4+ Th1 lenfositlerden salınan INF- γ makrofaj aktivasyonunu IL-2 ise CD8+ T lenfositleri aktive eder. MHC-II molekülleri mikobakteriyel antijenleri CD4+ Th2 lenfositlere sunduğu zaman ortama IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 ve TGF- β gibi anti-inflamatuvar sitokinler salınmaktadır. IL-4 ve IL-5, B-lenfositleri aktive ederek humoral immun cevap gelişimine neden olur. IL-4 ve IL-10 makrofajların, TGF- β ise Th1 lenfositlerin aktivasyonunu ve çoğalmasını engelleyerek hücrel immunitiyi baskılamaktadır. Basil organizmaya girdikten sonra Th1/Th2 oranında meydana gelen değişikliklerin enfeksiyonun seyrinde belirleyici nitelikte olduğu bilinmektedir⁶⁶.

2.5.2.2.1.2. CD8+ T Hücreleri

Lenf düğümlerinde CD4+ yardımcı T lenfositlerle dendritik hücreler ekileşmesi sonucunda CD8+ sitotoksik T lenfositler de işlevsel hale gelmektedirler. CD8+ sitotoksik T lenfositler MHC-I aracılı antijen sunumuna cevap olarak, başta IFN- γ olmak üzere çeşitli sitokinler salgırlar. Ayrıca perforin, granzim ve granülizinleri ile enfekte hücreler ve tüberküloz basiline karşı sitolitik aktivite gösterirler⁶⁸. Aktive sitotoksik CD8+ T lenfositler perforin ve granülizin gibi sitolitik granül içeriklerini hedef hücreye aktararak enfekte makrofaj yüzeyinde “por” isimli deliklerin oluşumuna neden olur. Oluşan bu porlardan granülizin enziminin enfekte makrofajlara ulaşarak kaspaz aktivasyonu ile hedef hücrenin apoptozisini başlattığı gösterilmiştir⁶⁶. CD4+ hücreler içerisinde CD25 molekülünü yüksek düzeyde sentezleyen regülatör T lenfositler bulunmaktadır. Regülatör T lenfositler yüzey temasıyla CD4+ ve CD8+ T lenfositleri baskılanmakta, IFN- γ sentezini ve T hücre proliferasyonunu durdurmaktadırlar. Çoğunlukla CD4+ CD25+ fenotipik özellik gösteren bu T

çalışmalarda IL-12 eksik olan farelerin mikobakteri infeksiyonlarına karşı duyarlılıklarının artması IL-12'nin koruyucu rolü olduğunu göstermektedir⁷⁴.

TB infeksiyonu sırasında oluşan proinflamatuvar cevap, anti inflamatuvar mekanizmalarla antagonize edilir. Anti-inflamatuvar sitokinlerden IL-10, CD4+ T hücreleri, monositler, CD8+ T hücreleri, gibi birçok hücre tarafından üretilir. IFN- γ , TNF- α ve IL-12'nin üretimini azaltarak antagonist etki gösterirler. TGF- β ise, T hücrelerinde IFN- γ üretimini ve T lenfositlerinin proliferasyonunu baskılıyarak hücreyel immüneyi süprese eder. IL-4, İNOS (indüklenebilir Nitrikoksit Sentaz) düzeylerini aşağıya çekerek ve TLR-2 ile sinyalizasyonu engelleyip makrofaj aktivasyonunu engeller⁷⁵.

2.6. Kodlanmayan RNA'lar

Yüksek organizmalı canlıların kalıtım materyali DNA (deoksiribonükleikası)'dır. DNA'daki bilgi RNA (ribonükleikası)'ya transkribe edildikten sonra RNA'nın da işlevi bu şifreyi proteine çevirmektir. RNA; proteine çevrilebilen mRNA ile kodlanamayan RNA (ncRNA) yani proteine traslasyonu gerçekteşmeyen RNA olarak ifade edilen kısımlardan meydana gelir. RNA'nın %98'den fazlasının proteine çevrilemez ve bu kısımların da %70'ini intronlar oluşturur.

Kodlanmayan RNA'lar büyüklüklerine ve işlevlerine göre ikiye ayrılırlar. 200 nükleotitten büyük olan kodlanmayan RNA'lar uzun kodlanmayan RNA olarak adlandırılırken 200 nükleotitten daha kısa olanlara ise küçük kodlanmayan RNA olarak isimlendirilir. Uzun kodlanmayan RNA'lar gen ekspresyonunun düzenlenmesinde rol alırlar. Çift sarmal RNA'lardan (dsRNA) oluşan Küçük RNA'lar (sRNAs), yaklaşık 19-28 nükleotid (nt) uzunluğunda, kodlama yapmayan ve günümüzde halen tam olarak bütün işlevleri aydınlatılamamış RNA'lardır. En önemli işlevleri gen susturulmasında rol oynamalarıdır. Proteine çevrimi gerçekteşmeyen RNA'lara örnek olarak miRNA, small interfering RNA (siRNA) ve Piwi-interacting RNA (piRNA) verilebilir.⁷⁶

Tablo 2. 1. Küçük kodlanmayan RNA'ların işlevleri ⁷⁶.

Sınıf	Tanım	Biogenez ve genomik orjini	İşlevi
miRNA	Micro RNA	DİCER ve RNAazIII benzeri enzimlerle daha büyük öncüllerden kesim sonucu oluşur	Pek çok genin transkripsiyon sonrası regülasyonundan sorumludur
siRNA	Small Interfering RNA	dsRNA'nın DİCER enzimi tarafından kesilmesi sonucu oluşur	Transkripsiyon sonrası regülasyondan ve heterokromatin oluşumundan sorumludur
piRNA	Piwi RNA	DİCER'den farklı Argonat-bağımlı enzim kesimi sonucu oluşur	Sinek ve memelilerin eşey hücrelerinde Transpozon ve retroelementlerin baskılanmasından sorumludur

2.6.1. MikroRNA'lar

MikroRNA'lar yaklaşık 20-25 nükleotid uzunluğunda transkripsiyonel ve posttranskripsiyonel seviyede gen ekspresyonunun negatif düzenleyicileri olarak görev alan, proteine traslasyonu gerçekleşmeyen, tek zincirli RNA molekülleridirler⁷⁷. Kendi nükleotid dizilerinin tamamlayıcısı olan hedef genleri tanıma özelliğine sahip miRNA'lar, baz eşleşme özelliği ile messenger RNA (mRNA)'ya bağlandıktan sonra traslasyonal inhibisyona ya da mRNA'nın yıkımına sebep olurlar¹².

İnsan genomunun yaklaşık olarak %3'lük küçük bir bölümünü oluşturan miRNA'lar protein kodlayan genlerin %30'unun düzenlenmesinde rol oynarlar⁷⁸. Büyük çoğunluğu protein kodlayan genlerin intronik bölgelerinde bulunmakla birlikte genler arası bölgelerde ya da ekzonlarda da yerleşim gösterebilmektedirler. MikroRNA genleri mutasyonun sık gerçekleştiği kırılgen gen bölgelerinde ve kanserle ilişkili genomik bölgelerde bulunmaktadır⁷⁹.

Günümüze kadar yapılan çok sayıda deneysel stratejiler ve kullanılan güçlü hesaplama tahminleri ile 142 türde 17.341 olgun miRNA tanımlanmıştır⁸⁰.

2.6.1.1. MikroRNA'ların Tarihçesi

MikroRNA'lar ilk defa (1993) Victor ambros laboratuvarında Lee ve arkadaşlarının *Caenorhabditis elegans*'ın gen içeriğini taradıkları çalışmada keşfedilmiş olup, bu çalışmada Lee ve arkadaşları larval gelişimin zamanlanmasını kontrol ettiği bilinen lin-4 (linage-4) olarak isimlendirilen genin

hiçbir protein kodlamamasına rağmen yaklaşık 22 nükleotid uzunluğunda bir çift küçük RNA transkribe ettiğini rapor etmişlerdir⁸¹.

Lin-4'ün kendi eşleniği olan lin-14 mRNA'sının 3'-untranslated region (3'UTR) bölgesiyle baz eşleşmesi yaparak lin-14'ün translasyonunu baskıladığını göstermişlerdir. Bundan 7 yıl sonra 2000 yılında Reinhart ve arkadaşları tarafından *C.elegans*'da lethal-7 (let-7) adı verilen, canlılarda gelişim zamanlamasını düzenleyen farklı bir mikroRNA daha keşfedilmiştir.

Bu araştırmacılar let-7 miRNA'sının lin-41, lin-28, lin42 ve daf12 mRNA'larının fonksiyonlarını baskıladığını ileri sürmüşlerdir⁸². Yapılan çalışmalar ile Let-7'nin *Drosophila* ve insanları da içine alan türler arasında da korunmuş olduğu ve dolayısı ile önemli bir biyolojik fonksiyona sahip olduğu gösterilmiştir⁸³. 2001 yıllarına gelindiğinde lin-4 ve let-7'ye benzeyen çok sayıda küçük RNA molekülü hemen hemen bütün çok hücreli organizmalarda keşfedilmeye başlanmış olup mikroRNA terimi ilk kez bu yıllarda kullanılmaya başlanmıştır⁸⁴. 2006 yılında Andrew Fire ve Craig Mello adı iki bilim insanı mikroRNA'ların da rol aldığı gen ifadesinin susturulmasını sağlayan doğal bir biyolojik süreç olan RNA interferans (RNAi) mekanizmasını keşfederek Nobel ödülüne layık görülmüşlerdir⁸⁵.

2.6.1.2. MikroRNA'ların Adlandırılması

miRNA'ların isimlendirilmesinde 'mir' ön ekinden önce gelen üç harf hangi organizmaya ait olduğunu göstermek için kullanılmaktadır. Örneğin hsa-miR-12 (*hsa-Homo sapiens*). miRNA isimlendirilmesinde büyük R harfi olgun miRNA olduğunu belirtmekte (miR-121) r harfinin küçük olması (mir-121) miRNA'nın prekürsor miRNA olduğunu bizlere belirtmektedir. Dizi homolojisi olan mikroRNA'ları belirtmek için miR adından sonra son ek kullanılır. Örneğin miR121a ve miR121b sırasıyla prekürsor miR121a ve miR121b'den sentezlenen dizileri benzer miRNA'lardır. Sekans dizilimi ve genomdaki yerleşimi farklılık gösteren prekürsor miRNA'lardan özdeş olgun mikrorna sentezlenebilmektedir. Bu yerleşimi belirtmek için ayrıca bir ön ek ve sayısal adlandırmaya ihtiyaç vardır. Örneğin hsa-mir-121-1 ve hsa-mir-121-2 aynı olgun mikrorna ile sonuçlanan fakat genomda farklı yerleşim gösteren prekürsor

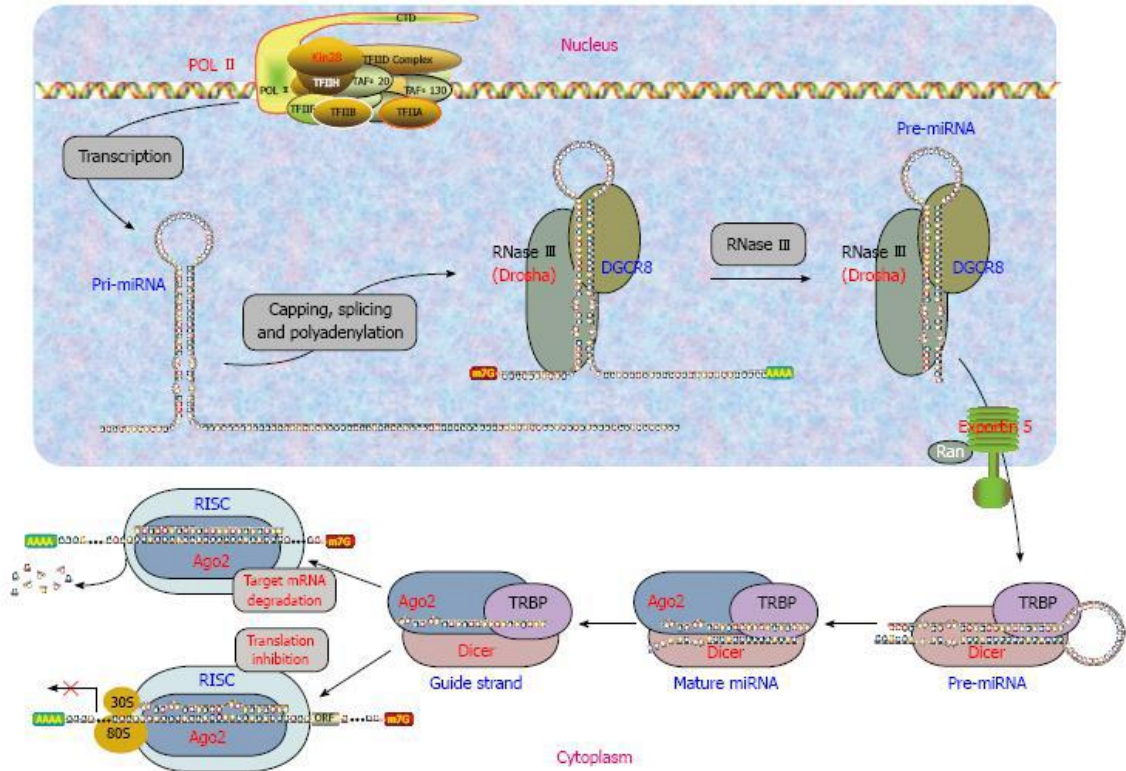
miRNA'lardır. Olgun miRNA'nın ağırlıklı olarak hangi koldan sentezlendiğini göstermek için daha az işlevsel kol '*' işareti ile belirlenir. miR-56* prekürsörün sentezde baskın rol oynamayan karşı kolunu ifade eder. Olgun miRNA sentezinde eğer hangi kolun daha aktif rol oynadığı belirtilmemişse miR142 örnek verilecek olursa miR-142-5p (5' kolundan) miR-142-3p (3' kolundan) şeklinde isimlendirilmektedir.

2.6.1.3. miRNA'ların Biyogenezi

miRNA'ların oluşumu birbirini izleyen üç temel süreç sonucunda gerçekleşmektedir. İlk olarak miRNA genlerinden primer miRNA (pri-miRNA)'ların transkripsiyonu gerçekleşir. Daha sonra nükleus içerisinde pri-miRNA'ların prekürsör miRNA (pre-miRNA)'lara dönüşümü gerçekleşir. Son olarak da sitoplazma içerisinde olgun mikroRNA'ların oluşumu gerçekleşir⁸⁶.

miRNA RNA'ların RNA polimeraz II enzimi aracılığı ile genomik DNA'dan pri-miRNA adı verilen 1 kb'dan daha büyük diziler halinde ve 5' cap ve 3' poli A kuyruğuna sahip sap-ilmik yapısı şeklinde sentezlenmesi ile miRNA oluşumunun ilk adımı gerçekleşmiş olur⁸⁷. Daha sonra nükleusta çift zincirli pri-miRNA, RNAaz III enzim ailesinin bir endonükleazı olan Drosha ve kofaktörü DGCR8 (DiGeorge syndrome critical region gene 8)/Pasha'nın oluşturduğu mikroişlemci kompleks (Microprocessor complex) adı verilen yapı tarafından yaklaşık olarak 70 nükleotid uzunluğunda hairpin yapıda olan pre-miRNA'ya dönüştürülür⁸⁸. Oluşan pre-miRNA molekülü sitoplazmaya nükleer taşıma reseptörü olan Exportin 5 tarafından tanınıp nükleer bir protein olan RAN-GTP'ye bağımlı bir şekilde taşınır. Sitoplazmada pre-miRNA'lar RNAaz III enzim ailesininden bir endonükleaz olan Dicer enzimi ile kesilerek 18-24 nükleotid uzunluğunda çift zincirli miRNA: miRNA dubleksine çevrilir⁸⁹. Dicer enzimi aynı zamanda TRBP (transactivating response RNA binding protein), Argonaute proteini olan argonaute 2 (Ago2) ve muhtemelen diğer Ago proteinleri ile etkileşime girerek RNA ile indüklenmiş susturma kompleksi (RNA-induced silencing complex; RISC) adı verilen bir ribonükleoprotein kompleks oluşumunu başlatır. Dicer enzimi ile pre-miRNA'nın sap-ilmliği kestikten sonra, miRNA: miRNA dubleksinden 5' ucu daha kararlı olanı Ago2 proteini tarafından

seçilip RISC kompleksine dâhil olur. Bu iplik kılavuz iplik (guide strand) olarak adlandırılır. Rölatif olarak baz eşleşmesinde daha düşük stabiliteye sahip olan diğer zincir anti-kılavuz veya yolcu iplik olarak adlandırılır, RISC kompleksinin substratı olarak parçalanır. Sonuç olarak miRNA dubleksinden sadece biri RISC kompleksine dahil olur. Aktif RISC kompleksine mikroRNA'ların dahil olması ile birlikte mikroRNA'lar RISC kompleksinde bulunan argonaute proteinleri yardımıyla ya mRNA'nın yıkımına ya da protein translasyonunun baskılanmasına neden olurlar^{90,91}.



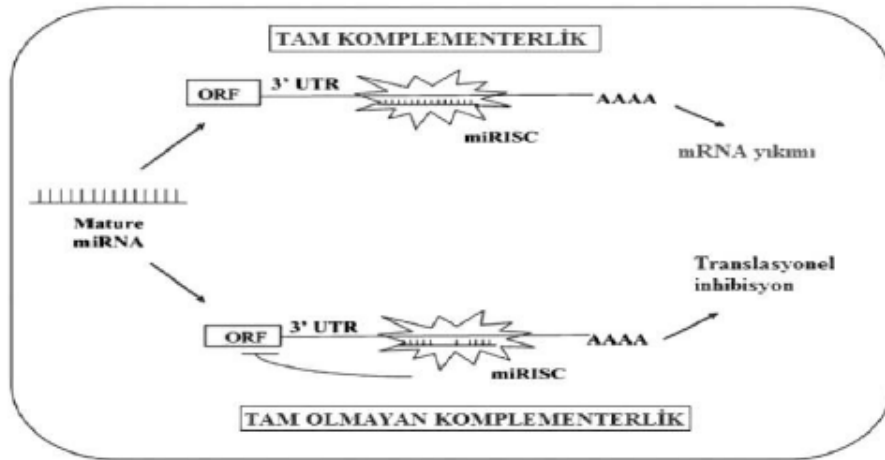
Şekil 2.3. miRNA biyogenezi

2.6.1.4. MikroRNA'ların İşlevleri

Günümüze kadar keşfedilen miRNA'ların sadece çok az bir kısmının biyolojik rolleri aydınlatılabilmektedir. Olgun miRNA'lar, Hedef genlerin ekspresyonunu azaltan protein sentezinin düzenlenmesinde rol oynarlar. RISC ile kompleks oluşturup kendi nükleotid dizilerine komplementer hedef genleri

tanıma özelliğine sahip miRNA'lar baz çiftleşme özelliği ile hedef genin mRNA'sına bağlandıktan sonra protein translasyonunun inhibisyonuna ya da mRNA'nın yıkımına sebep olur¹².

miRNA'lar yüksek seviyede korunmuş seed adı verilen 6- 8 nükleotidlik bir bölge (seed-site) aracılığı ile hedef mRNA'ları ile etkileşime girerler. Hedefin belirlenmesi açısından mRNA ile miRNA'nın seed dizisi olan 5'ucunun 2.-8. nükleotitleri arasında baz eşlenikliğinin olması son derece önemlidir. miRNA'lar hedef mRNA'ya kısmi veya tam eşleniklik göstererek bağlanabilirler. Eşlenikliğin seviyesi miRNA'nın hedefini hangi seviyede ve ne şekilde baskılayacağını belirler⁹². miRNA'lar çoğunlukla hedef mRNA'nın 3'UTR bölgesine bağlanırlar ancak 5'UTR'yi veya açık okuma çerçevesini (ORF-open reading frame) hedef aldıkları durumlarda da gen ifadesini baskılayabilirler⁹³. miRNA'lar genellikle post transkripsiyonel seviyede düzenlenmeyi; translasyonu baskılayarak veya mRNA hedeflerinin yıkımını sağlayarak yapar. Eşlenikliğin çok yüksek seviyede olduğu durumlarda RISC içindeki miRNA'lar aracılığı ile miRNA'ların poli A kuyruklarının ve 5'-cap yapılarının yok edilip hedef miRNA'ları parçalanır⁹⁴. Tam eşleşmenin olmadığı kısmi eşleşme durumlarında ise traslasyonel baskılanma gerçekleşir. Bu mekanizma tam olarak aydınlatılmamış olmakla birlikte yapılan birçok çalışmada miRNA'ların traslasyonel baskılamayı çeşitli transkripsiyon faktörleri ile etkileşerek protein translasyonunun başlangıç ve uzama aşamalarını engelleyerek gerçekleştirdiği gösterilmiştir^{95,96}



Şekil 2.4. MikroRNA'nın hedef mRNA'ya bağlanması

2.6.1.5. miRNA'ların Etkileri

Günümüze artık birçok fizyolojik sürecin miRNA'lar tarafından kontrol edildiği bilinmektedir. Bu yüzden, miRNA'ların ifade düzeylerindeki anormallikler hücre biyolojisinde önemli birçok mekanizmayı etkileyebilmekte ve bunun sonucunda da başta kanser olmak üzere enfeksiyöz, kardiyovasküler, nörodejeneratif hastalıklar gelişebilmektedir. miRNA'lar, viral enfeksiyonlarda, konak savunmasında, immün hücre popülasyonunun gelişmesinde, olgunlaşmasında, hayatta kalmasında ve fonksiyonel olmasında düzenleyici olarak yer alabilirler⁹⁷.

miRNA'lar hücre farklılaşması, neoplastik formasyon, hücre rejenerasyonu ve replikasyonu gibi hayati önem taşıyan hücresel süreçlerde rol almaktadır ve bu fonksiyonlarından dolayı birçok hastalık durumlarında ifade düzeylerinde anormallikler görülmesi şaşırtıcı olmamalıdır. miRNA'lar onkogenik veya tümör süpresör özellik gösterebilmekte ve bu özellikleri yeni kanser tedavi stratejileri geliştirilmesine olanak sağlamaktadır. miRNA taklitleri ve antagonistleri kullanılarak istenilen miRNA ifadesi deaktif edilebilmekte ya da susturulabilmektedir⁷⁹.

2.6.1.6. MikroRNA'ların Hastalıklarla İlişkisi ve Klinik Önemi

Dolaşımda bulunan miRNA'ların kanda oldukça kararlı bir yapı göstermesi nedeniyle klinikte hastalıkların tanısında ve prognozunda önemli bir biyobelirteç olarak kullanılabilirliği gösterilmiştir. Plazmada bulunan mikroRNA'ların RNAaz'lara oldukça dirençli olması, bunun yanında yüksek ve düşük pH, uzun süreli depolama, dondurup çözündürme gibi ekstrem koşullara da dayanıklı olması nedeniyle invazif yöntemlere gerek kalmadan serum ve plazma örnekleri ile çalışmayı mümkün kılmaktadır. miRNA'lar organizmada birçok biyolojik süreçte rol oynayan mutasyonlar ve ifade düzeylerindeki farklılıklarının başta kanser olmak üzere kardiyovasküler ve inflamatuvar hastalıklar, kas bozuklukları, nörodejeneratif hastalıklar gibi çok çeşitli hastalıklarla ilişkisi olduğu yapılan çalışmalarda gösterilmiştir^{13,14}.

2.6.1.7. İmmün Sisteminin Düzenlenmesinde miRNA' lar

İmmün sistemin doğal bağışıklık hücre elemanlarını granülositler, monosit kökenli makrofajlar ve dendritik hücreleri oluşturmaktadır. Periferik beyaz kan hücreleri olan nötrofillerin büyük bir yüzdesini oluşturan granülositler patojenlere karşı ilk hücrel cevapta rol oynamaktadırlar. Monosit membranındaki Toll Like Reseptör'ler (TLR) aracılığı ile patojen ilişkili moleküler kalıplar (PAMPs) olarak adlandırılan mikrobiyal ürünler tanır ve bağlanır ve inflamatuvar cevabın oluşması için gerekli sinyal yolağı tetiklenir^{98,99}. TLR sinyalizasyonu, in vivo olarak negatif düzenleyicilerin farklı sınıfları tarafından, şiddetli inflamasyonu önlemek için kontrol edilir¹⁰⁰.

miRNA' lar, hem doğal hemde kazanılmış bağışıklık sisteminde hücre gelişimini düzenler ve böylece TLR sinyalleşmesinin negatif düzenleyicileri olarak rol oynarlar¹⁰¹. Yapılan çalışmalarda miR-223, transkripsiyon faktörü olan miyosit spesifik genişletici faktör 2C' yi hedef alarak granülosit farklılaşmasının negatif bir düzenleyicisi olarak davrandığı gösterilmiştir ¹⁰². Yine Taganov ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada MiR-146' nın lipopolisakkarit (LPS) stimülasyonuna cevap olarak insan monositik hücrelerinde hızla ifade seviyesinde artış göstererek tümör nekroz faktör reseptörü ilişkili faktör 6 (TRAF6) ve interlökin (IL) -1 reseptör ile ilişkili kinaz 1' i (IRAK-1) hedef alarak TLR sinyalizasyonunun negatif regülatörü olarak görev aldığı gösterilmiştir¹⁰³. Doğal bağışıklıktaki rollerinin yanısıra mikroRNA biyogenezinin bozulması T ve B lenfosit gibi kazanılmış immün cevapta son derece önemli olan hücrelerinde timüs ve lenfoid dokularda farklılaşmasını ve gelişimini etkilediği yapılan çalışmalarla gösterilmiştir^{104,105,106}.

2.6.1.8. miRNA'ların Terapotik Kullanımı

Gen ifadesinin susturulma mekanizması olarak bilinen RNA interference (RNAi) miRNA ve small interfering (siRNA)'lar tarafından düzenlenen ökaryotik hücrelerde dizi spesifik mRNA'nın yıkımına ya da translasyonel baskılanmaya neden olan doğal bir süreçtir. siRNA'lar endojen olarak kodlanırlar ya da tranfeksiyonla ve çeşitli vektörler aracılığı ile transkribe edililen uzun çift iplikli RNA'dan elde edilen moleküllerdir. MikroRNA'lar ise ilmi yapısı şeklinde konak

genomundan kodlanan endojen sınıfı küçük RNA molekülleridirler¹⁰⁷. Organizmada birçok patolojik süreç anormal gen ekspresyonu, mutasyonu gibi nedenlerle hücreler arası sinyal yollarının bozulması, apoptozis ve hücre proliferasyonu sonucu meydana gelmektedir. Aynı zamanda bir viral infeksiyon yabancı bir genin eksprese olmasına neden olarak hastalık oluşturabilmektedir. RNAi mekanizması ile yabancı genlerin susturulması temeline dayanan tedavi yaklaşımlarına olan ilgi giderek artmaktadır. Günümüzde gelişmekte olan mikroRNA tabanlı tedaviler için antogonist miRNA'lar, miRNA mimikleri, mikroRNA süngerleri adı verilen miRNA'lar kullanılarak istenilen mikroRNA ifade düzeyinin oluşturulması hedeflenmektedir. Antogonist mikroRNA'lar hastalıklı dokularda fonksiyon gösteren miRNA'ları etkisizleştirmek için kullanılırken miRNA mimikleri sağlıklı hücrelerde normalde eksprese edilen miRNA'ların fonksiyon eksikliğini gidermek için kullanılır⁷⁹.

2.6.1.9. miRNA Analiz Teknolojileri

Hücre çeşitlerindeki miRNA profillerini belirlemek ve miRNA'ları analiz etmek amacıyla mikrodiziler, boncuk tabanlı diziler ve Real-time PCR gibi çeşitli yöntemler kullanılmaktadır. Nükleik asitlerin Watson-Crick modeline dayalı eşleştirilme mekanizmasına dayanan hücre dizileme yöntemi ile çok sayıda mikroRNA eş zamanlı olarak belirlenebilmektedir. Bu yöntemde cam tabakalara (slide) oligonükleotid yakalama uçları konur ve küçük molekül RNA'ları da içeren RNA ekstrakt örneğinin yakalama uçları ile hibritlenmesine izin verilir. miRNA'lar kısa olduklarından uç kısımların erime sıcaklığını normal bir şekilde standardize etmek oldukça zordur. Ancak bu durum kilitlenmiş nükleik asitler (LNA) kullanılarak çözülmüştür. En azından bir adet LNA monomeri içeren kilitlenmiş nükleik asitler kısa nükleik asit dublekslerinin sıcaklığını 2-10°C artırmaktadır. miRNA uzunluğunun kısa olmasına rağmen LNA monomerlerinin sayısını ayarlayarak dizideki bütün uçların sıcaklığı normalleşebilmektedir. Real-time PCR miRNA profillerinin analizinde sıklıkla kullanılan bir başka yöntemdir¹⁰⁸.

2.6.1.9.1. Real -Time PCR

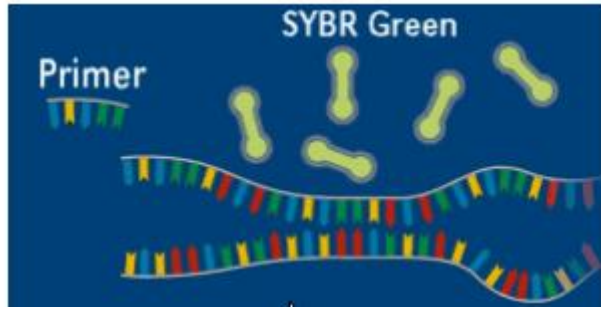
“Real-time PCR” yöntemi tek bir tüp içerisinde DNA’nın ya da miRNA örneklerinin çoğaltılması ve ürünlerinin miktarını belirleyip tespit edebilen son yıllarda oldukça sık kullanım alanı bulan bir yöntemdir.

Moleküler genetik yöntemlerde floresan ışımaya tekniklerinin kullanıma girmesi ile birlikte bilinen klasik “PCR” geliştirilerek oluşturulan yeni teknikler gen anlatım çalışmalarının hızına ivme kazandırmıştır.¹⁰⁹

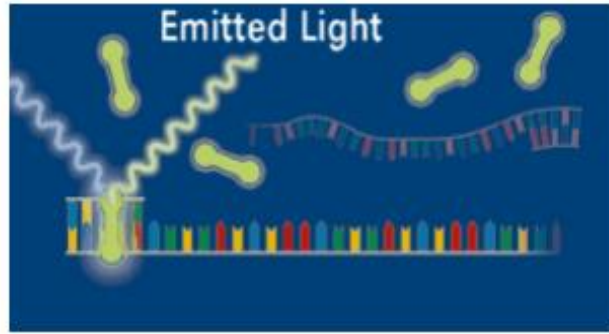
“Real-time PCR” PCR sırasında oluşan ürünleri görünür hale getiren ve monitörize edebilen floresan işaretli prob ve boyaların kullanıldığı, floresan ışımaya oluşan amplifikasyon ürünü ile doğru orantılı olarak arttığı bir çoğaltma yöntemidir¹¹⁰. RT-PCR yönteminde DNA’ya bağlanabilen özgül olmayan flouorforlar (SYBR Green) kullanılır ve bu yöntem “özgül olmayan belirleme sistemi” adı verilir. Diğer taraftan DNA parçasının istenilen özel bir bölgesini çoğaltmak için ise floresan işaretli problemler kullanılır. Bu problemlerin başında TaqMan prob, moleküler boncuk yöntemi, scorpion primer gibi floresan işaretli problemler gelir.¹¹¹

2.6.1.9.1.1. SYBR Green I

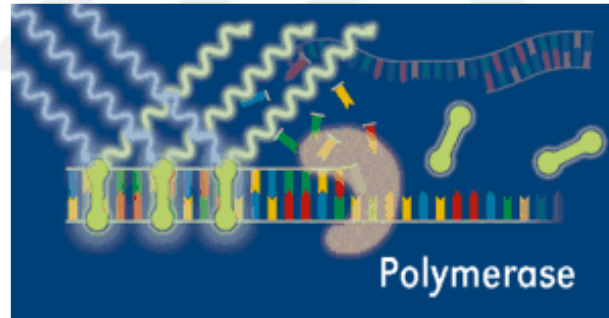
SYBR Green I spesifik olmayan çift zincirli DNA’nın çoğaltımında en fazla kullanılan boya çeşitidir. 497 nm dalga boyunda yükseltgenir ve 520 nm dalga boyunda indirgenir. Bu yöntemde kullanılan floresan boya sadece çift zincirli DNA’ya bağlandığından çoğalan DNA miktarındaki artışa paralel olarak “Real-Time” PCR cihazında okunan floresanın miktarı da eş zamanlı olarak artar. Reaksiyon karışımı içerisinde çift zincirli DNA molekülü, primerler ve “SYBR Green I” boyası bulunmaktadır. İlk döngülerde sinyal zayıfken uzama aşamasında primerlerin bağlanmasındaki artışla birlikte floresan miktarı hızla artar ve bu artış “Real-Time” cihazının monitöründen izlenebilir.^{112,113}



DNA çift sarmalı birbirinden ayrıldığında SYBR green boya serbest hale geçer.



SYBR Green boya DNA çift iplikli olduğunda DNA'ya bağlanabilir.



Polimerizasyon tamamlandığında SYBR Green boya çift iplikli DNA'ya bağlanır ve floresan ışımaya yapar.

Şekil 2.5. SYBR Green boya tekniği

2.6.1.9.1.2. TaqMan prob yöntemi

TagMan probe yöntemi çoğaltılmak istenilen DNA'ya komplementer olan ve floresan işaretlenmiş tek zincirli bir prob içerir. Floresan işaretli probun 5' ucunda "fluorophore" (6-karboksifloresin= 6-FAM) ve 3' ucunda "quencher" (6-karboksitetrametil-rodamin= TAMRA). 3' uçtaki basılayıcı TAMRA boyası 5' uçtaki FAM boyasının sinyal oluşturmalarını engellemektedir. Prob hedef DNA'ya

bağlanma durumunda bile floresan sinyal ölçümü düşüktür. Çoğaltılma sırasında hedef nükleik asit dizisi üzerinde primerler bağlanma bölgeleri arasında “Taq Man” prob lar bağlanırlar. Primerlerin bağlanmasının ardından yeni zincir oluşmaya baslar. Probun bağlı olduğu bölgeye gelindiğinde Taq DNA polimeraz enzimi 5'→3 nükleaz aktivitesi ile FAM'ı probdan ayırır. Serbest hale geçen FAM sinyal oluşturur. DNA zincir sentezi uzamaya devam eder. Her bir döngüde ürün çoğalımı arttıkça floresanda ona bağlı olarak artmaya devam eder ¹¹⁴.

2.6.1.9.1.3. Moleküler Boncuk Yöntemi

Moleküler boncuk metodu TagMan probe ve SYBR Green I yöntemlerinden hem yapısal hemde çalışma prensibi olarak farklılık göstermektedir. Saç tokası şeklindeki bu yapı düz olan uç kısımlarında 2 adet florokrom boya içerir ve yapının yuvarlak uç kısmı çoğaltılacak DNA ile komplementer tek zincirli DNA dizisini içerir.

Bunlardan baskılayıcı florofor diğer boyanın floresanını engeller. Serbest halde Moleküler boncuk probu solüsyon içerisinde ışımaya yapmaz. Hedef DNA dizisine göre tasarlananan prob çoğaltılmak istenilen DNA bölgesi PCR ile çoğalmaya başladığında birbirleri ile karşılaştıklarında konformasyonu değişir ve düz iken çift zincirli hale geçer. Bu yapı termodinamik olarak saç tokası şeklinden daha kararlıdır. Moleküler boncuk hedef nükleik asit dizisi ile hibridize olur olmaz boncuk molekülünün yapısı değiştiğinden ve boyalarda birbirlerinden uzaklaştığından floresan miktarı artar^{115,116}.

2.6.1.9.1.4. Hibridizasyon Prob Yöntemi

Bu yöntem Roche tarafından “LightCycler®” PCR cihazında kullanılmak üzere geliştirilmiştir. Bu yöntemde 3' ucunda floresans isaretli boya (donör), 5' ucunda alıcı boya (acceptor) iki farklı prob dizayn edilmiştir.

Reaksiyon sırasında bu iki prob hedef nükleik asit dizisine bağlanıp birbirine yaklaştığında bir enerji yayılımı olur (FRET: Fluorescence Resonance Energy Transfer). Enerji “donor” boyadan “acceptor” boyaya transfer olur. Bu

enerji transferi sonucunda oluşan floresans miktarı PCR süresince oluşan ürün miktarı ile doğru orantılı bir şekilde artar^{117,118}.

2.7. Tüberküloz ve miRNA RNA

İntrasellüler yerleşim gösteren tüberküloz basili, infeksiyon esnasında konağa ait hücresel çevrede besin, oksijen yetersizliği gibi stres koşullarıyla günümüzde tam olarak aydınlatılamamış bir takım mekanizmalarla ile başa çıkabilmekte ve fagozomlar içerisinde bu koşullarla mücadele edip yaşamını sürdürebilmektedir¹²⁰.

Bu gibi stres koşullarında *M. tuberculosis*'in gen profillerindeki değişimi incelemeye yönelik çok sayıda çalışma yapılmıştır¹²¹. Ancak konak-patojen etkileşiminde mikroRNA'ların rolüne yönelik çalışmalar az sayıdadır.

miRNA'lar gen ekspresyonunu post-transkripsiyonel seviyede düzenleyen ökaryotik hücrelerde birçok gelişimsel ve hücresel süreçte rol oynayan yaklaşık 20-25 nükleotid uzunluğunda RNA molekülleridirler.

miRNA'ların viral ve parazitik infeksiyonlardaki rolüne yönelik çalışmalar bakteriyel infeksiyonlarda patojen-konak etkileşimindeki rolüne yönelik çalışmalara göre çok daha öncedir.

Fu ve arkadaşlarının aktif tüberkülozlu hastalar ile sağlıklı bireyleri karşılaştırdığı bir çalışmada ciddi derecede seviyeleri değişen mikroRNA profilleri belirlenmiştir. Yine yapılan bir çalışmada miR-29'un mikobakteriyel infeksiyonlarda aşırı eksprese olması bireyin tüberküloza olan duyarlılığını artırdığı ve T hücrelerinde interferon gama üretimini inhibe ettiği sonucuna varılmıştır.

Tüberküloz patogeneğinde miRNA'ların rolünü anlamaya yönelik yapılmış bir başka çalışmada anti tüberküloz immünitede son derece önemli rol oynayan TNF- α ve INF- γ üretiminin mikobakteriyel infeksiyonlarda mikroRNA'lar tarafından etkilendiği gösterilmiştir. Silvana ve arkadaşlarının 2012 yılında yapmış olduğu bir çalışmada periferik kan mononükleer hücreler ve plevral sıvı mononükleer hücrelerde Aktif tüberkülozlu hastalarda seviyelerinin ciddi derecede değiştiği bilinen miR146a, miR424, miR365, miR223, miR144, miR421 olmak üzere 6 farklı mikroRNA tespit edilmiştir ¹²¹.

Mycobacterium tuberculosis'in tüm genomu deşifre edilmesine karşılık günümüzde halen moleküler patogenezi tam olarak aydınlatılamamıştır. Protein-protein etkileşimleri, DNA-protein etkileşimleri, konak-patojen arasındaki etkileşimlerin daha iyi anlaşılıp bilinmesi hastalığın daha erken evrede tanı konmasına, daha iyi tedavi stratejilerin geliştirilmesi için son derece önemlidir.

miRNA'lar bilim dünyası için henüz oldukça yeni ve önü açık bir araştırma alanıdır ve sağlıklı bireyler ile hasta bireyler arasındaki miRNA ifade düzeyleri incelenip belirlendikçe miRNA'ların biyobelirteç olarak kullanılabilirliği daha iyi irdelenecektir¹²².



3. GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmamızda Çukurova bölgesindeki akciğer tüberkülozlu hastalardan izole edilecek mononükleer hücreler ve plazmada daha önce yapılan çalışmalarda aktif tüberkülozlu hastalarda seviyelerinin ciddi derecede değiştiği bilinen miR146a, miR424, miR365, miR223, miR144, miR421 olmak üzere 6 farklı mikroRNA ifade düzeylerindeki değişim incelenmesi amaçlanmıştır.

3.1. Kan örneklerinin toplanması

Çalışmaya Mart 2014 – Mart 2015 tarihleri arasında Adana Bölge Tüberküloz Laboratuvarına gönderilen; Adana ilindeki hastane ve dispanserlere (beş dispanser ve iki yataklı hastane) başvuran tüberküloz ön tanılı hastalara ait klinik örneklerden ARB pozitifliği veya kültür pozitifliği tespit edilmiş fakat tedavi almamış ya da henüz tedavinin 1. ayında olan hastalardan çalışma anlatıldıktan ve onam formları okutulup imzalandıktan sonra alınan 8cc kan örnekleri çalışmaya dahil edilmiştir. Laboratuvara gelen tüm kan örneklerin bilgileri gizli ve sadece yetkililer tarafından erişilebilen bir veri tabanında saklanmıştır. Bu bilgiler, hastayı ve/veya ailesi, hekim ve klinik dışında üçüncü şahıslara kesinlikle aktarılmamıştır ve ancak mahkeme kararı ile yetkili kişilere aktarılabilir şekilde korunmuştur.

3.2. miRNA eldesi

3.2.1. Fycoll ile mononükleer hücre eldesi

Fycoll paque üretici firma (GE healthcare Bio-Sciences AB) tarafından sağlandı. 10 ml'lik EDTA'lı tüpe alınan kan örneklerinden 4 ml kan örneği ile “Fycoll paque yoğunluk gradienti santifügürasyon yöntemi” ile aşağıdaki adımlar uygulanarak mononükleer hücre izolasyonu yapıldı.

- 4 ml 'lik kan 4 ml PBS ile 15 ml 'lik conical tüp içerisinde dilue edildi.
- Bir başka konikal tüp içerisine 6 ml fycoll eklendi.
- Dilue kanın yavaşça fycoll ile karışmamasına dikkat edilerek tüp duvarından yavaş yavaş tüp içerisine eklendi.
- 400g (1480 rpm) de 30 dakika santrifüj edildi.

Santrifüj sonrasında en altta eritrositler/granülositler çöker, eritrositlerin ve granülositlerin üzerinde yoğunluğu yüksek olan fycoll ve en yukarıda PBS ve plazma vardır. Fycoll ve PBS'nin birleşim yerinde adeta bir bulut şeklinde mononükleer hücreler yer almaktadır.

- Pastör pipeti ile yavaşça tüp içerisine girilerek içerisinde mononükleer hücreler olan bu toz bulutu şeklinde gözlenen sıvı toplandı. Bu toplanan hücreler 12 ml denge solüsyonu ile yıkandı. 10 dakika 300g (1280 rpm) santrifuj edildi.
- Santrifüj sonrası üst kısım doküldü ve daha sonra tekrar 12 ml denge solüsyonu ile yıkanarak 10 dakika 200g (1045 rpm) de santrifüj edildi.
- Üst kısım tekrar döküldü ve mononükleer hücreler 1,5'lik ependorf tüpü içerisine alınarak bir sonraki adıma geçildi.

3.2.2. Mononükleer hücrelerin saklanması

Hücreler elde edildikten sonra, aşağıdaki adımlar uygulanarak -80°C'ye kaldırıldı ve RNA izolasyonlarının yapılacağı tarihe kadar bekletildi.

1. 350 µl lysis solüsyonunu yavaş yavaş hücreler üzerine eklenip, pipetle alt üst edilerek karıştırıldı.
2. Hücreler tamamen süspanse olduktan ve bir kısmı da parçalandıktan sonra en az 15 saniye vortekslendi. 10 dakika oda sıcaklığında bekletildi ve bu süre içerisinde vorteksleme işlemi 3-4 kez daha tekrarlandı.

3.2.3. Mononükleer hücrelerden miRNA eldesi

Mononükleer hücrelerden miRNA eldesi ekstaksiyon kiti (ExiQon miRCURY RNA Isolation Kit-Cell&Plant, Cat No: 584382) kullanılarak üretici firmanın önerileri doğrultusunda aşağıdaki basamaklar uygulanarak yapılmıştır.

Çalışmaya başlamadan önce yıkama solüsyonu tüpünün içerisine 90 ml %96-100'lük ethanol eklendi. Ethanol eklenmesi sonrası son hacim 128 ml oldu.

1. İzole edilen hücreler üzerine 350 µl lizis solüsyonu eklendi, pipetaj yapılarak karıştırıldı.
2. Hücreler tamamen süspansiyon haline geldikten sonra en az 15 sn. vortekslendi, oda sıcaklığında 10 dk. bekletilip bu sürede vorteksleme işlemi 3-4 kez tekrarlandı. (RNA izolasyonunun bu ilk iki adımı mononükleer hücre izolasyonu sonrası gerçekleştirildi ve hücreler lizis solüsyonu içerisinde -80°C'de saklandı.)
3. Lizat üzerine 200 µl %96-100'lük ethanol eklendi, 10 sn. vortekslendi.
4. Ethanol eklenmiş hücre lizat, toplama tüpü içerisine yerleştirilmiş kolon üzerine eklendi (maksimum 650 µl) 3,500 g'de 1dk santrifüj edildi ve süzüntü atıldı. Kolon tekrar atık kabına yerleştirildi.
5. Yıkama solüsyonundan 400 µl kolona eklendi ve 14,000 g'de 2 dk santrifüj edildi. Süzüntü atıldı, kolon atık kabına tekrar yerleştirildi.
6. Her bir örnek için 4 µl DNase solüsyonu 28 µl DNase tamponu ile karıştırıldı ve kolon üzerine pipetlendi. Kolonlar temiz bir ortamda, oda sıcaklığında üzerleri açık olarak 30 dakika inkübe edildi.
7. Yıkama solüsyonundan 400 µl kolona eklendi ve 14,000 g'de 2 dk santrifüj edildi. Süzüntü atıldı, kolon atık kabına tekrar yerleştirildi. Bu adım bir kez daha tekrarlandı. Yıkama adımı tamamlandıktan sonra toplama kabı atıldı.
8. Kolon yeni elüsyon tüpüne alındı, kolondaki filtre üzerine 50 µl DNase-RNase free su eklendi.
9. 200 g'de 2 dk santrifüj edildi, daha sonra 14,000 g'de 1 dk tekrar santrifüj edildi.
10. Elüye edilen Total RNA kısa süreli saklama için -20°C, uzun süreli saklama için -70 °C muhafaza edildi.

3.2.4. Plazma Eldesi

10 ml'lik EDTA'lı tüpe alınan kan örneklerinden 3 ml alınarak plazma hücrelerindeki miRNA ifade düzeyleri sağlıklı bireylerle karşılaştırıldığında anlamlı bir fark olup olmadığını belirlemek amacı ile plazmadan da miRNA

analizi çalışmamıza dahil edilmiştir. Periferal kandan plazma eldesi aşağıdaki adımlar uygulanarak gerçekleştirilmiştir.

1. Kan örneği alındıktan sonra en az 5-10 kez yavaşça alt-üst edilerek karıştırıldı.
2. Oda sıcaklığında bekleyen kan örneklerinin 2 saat içerisinde plazmaları ayrıldı.
3. Tüpler 2.000 g'de 10 dakika santrifüj (santrifüj'de fren seçeneği varsa kapatılmalı, kendi kendine yavaş yavaş durmalıdır) edildi.
4. Santrifüj işlemi sonunda tüpler sarsılmadan dikkatlice santrifüjden çıkarıldı ve yavaşça kapakları açılarak ve plazmanın en üst kısmından 200 µl'lik pipetlerle (DNase, RNase Free, filtreli pipet uçları kullanılarak) 5 kez toplamda 1.000 µl olacak şekilde plazma steril ependorf tüplere toplandı.
5. Toplanan 1.000 µl'lik bu plazma örneği 2.000 g'de 10 dakika santrifüj edildi ve plazmanın üst kısmından (en üstte bir miktar zor görülen lipid birikir ona değmeden) 250 µl lik kısım steril bir ependorf tüpe alındı. Bu işlem alttaki hücresel kısım rahatsız edilmeden (DNase, RNase Free, filtreli pipet uçları kullanılarak) pipet ile yapıldı.
6. Bu şekilde ayrılan plazma örnekleri barkotlama işlemi sonrası RNA izolasyonuna geçene kadar -80 °C'lik derin dondurucuda saklandı.

3.2.5. Plazmadan miRNA eldesi

Plazmadan miRNA eldesi ekstaksiyon kiti (Roche High Pure miRNA Isolation Kit, Cat No: 05080576001) kullanılarak üretici firmanın önerileri doğrultusunda aşağıdaki basamaklar uygulanarak yapılmıştır.

Çalışmaya başlamadan önce yıkama solüsyonu tüpünün içerisine 40 ml %96-100'lük ethanol eklendi.

1. 150 µL lizat süpernatantı içerisine;
 - a. 312 µL Binding Buffer
 - b. 200 µL Binding Enhancer eklendi.
2. Karışım iyice çalkalandı ve bir high pure filtreli bir tüpe uygulandı.

3. 13000 x g hızında 30-60s. santrifüj edildi, süzüntü atıldı.
4. 500 µL yıkama solüsyonu eklendi.
5. 13000 x g hızında 30s. santrifüj edildi, süzüntü atıldı.
6. 300 µL yıkama solüsyonu eklendi.
7. 13000 x g hızında 30s. santrifüj edildi, süzüntü atıldı.
8. 13000 x g hızında 1 dk. santrifüj edildi, toplama tüpü atıldı.
9. Filtre yeni bir 1.5 mL'lik santrifüj toplama tüpüne alındı.
10. 30 µL oda sıcaklığında (+15-25 °C) DNase-RNase free su filtreye uygulandı.
11. Oda sıcaklığında 1 dakika tüp kapağı açık şekilde inkübe edildi.
12. 13000 x g hızında 1 dk. santrifüj edildi.
13. Tüplere süzülen RNA'lar -20/-80'e kaldırıldı.

3.3. miRNA düzeylerinin RealTime PCR ile ölçümü

3.3.1. cDNA Hazırlanması:

RNA izolasyonu sonrası elde edilen total RNA (Exiqon miRCURY LNA™ universal cDNA synthesis kit) ile complementer DNA elde edildi.

cDNA eldesi için aşağıdaki karışım hazırlandı. (Bu karışım 96 örneğin cDNA reaksiyonu için yeterlidir, ekstra hacimler hesaplamaya dahil edilmiştir)

5x Reaction Buffer 230 µl

Enzyme mix 115 µl

TOPLAM 345 µl

Bu karışım bir 8'li strip tüpün tüm kuyularına 41'er µl olarak transfer edildi. Buradan 8 kanallı pipet yardımı ile 3'er µl alınarak temiz bir 96'lık piko Plate'in tüm kuyularına pipetlendi.

RNA örnekleri de her kuyuya, yukarıda transferi yapılan karışımların üzerine 7 şer µl olmak üzere pipetlendi. Plate film ile kaplandı, plate karıştırıcıda elle bastırılarak 10 saniye karıştırıldı. Plate santrifüj de 1 dakika santrifüj edildi

ve Thermal Cycler'a (Thermo Scientific pikoReal 96 Real-Time PCR System) konularak aşağıdaki program çalıştırıldı.

42°C 60 dakika

95°C 5 dakika

4°C ∞

Thermal programın sonunda plate'in oda sıcaklığına gelmesi beklendi (deney bitiminde yüzeyi sıcak olabilir). Plate santrifüj de 1 dakika santrifüj edildi. Preamplifikasyon hemen gerçekleştirilmeyecekse -20°C de saklandı.

3.3.2. PreAmplifikasyon Hazırlanması:

Preamplifikasyon primer karışımı (Pool Primer Mix) tüm örnekler için bir kez aşağıdaki şekilde hazırlandı.

1. Primer tüpleri mikro santrifüjde maksimum hızda 2 dakika santrifüj edildi. Tüpler açıldı ve her tüpe 55 µl DNase, RNase Free su eklendi. Tüpler kapatıldı ve sallanarak karıştırıldı. Tüpler 4C° de 30 dakika bekletildi ve mikro santrifüj de maksimum hızda 2 dakika santrifüj edildi.
2. Temiz bir tüp içerisine her bir primerden 4.5'er µl primer konularak hepsi birbirine karıştırıldı. Primer sayısı ile 4.5 çarpılınca elde edilen rakam 450 µl den çıkarıldı. Elde edilen rakam kadar DNase, RNase Free su bu karışıma eklendi. İyice karıştırıldı ve 150 şer µl olacak şekilde 3 ayrı SafeLock Eppendorf tüpüne konularak uygun şekilde etiketlendi. (Bu tüplerin her biri 1 adet 96 lık örneğin preamplifikasyonu için yeterlidir)
3. Primer tüpleri Dynamic Array hazırlanması kısmına kadar 4°C de ya da -20°C de saklandı.
4. cDNA plate'i bir plate taşıyıcı üzerine konuldu (plate'in kaymaması ve kırılmaması için gereklidir). Film açıldı. Elde edilen cDNA örneklerinden yeni bir plate açılarak tüm kuyularına 2'şer mikrolitre aktarıldı ve her bir kuyuya 8 mikrolitre kadar DNase, RNase-free su konularak dilue edildi. Yeni bir film ile plate kaplandı plate karıştırıcıda 2000 rpm de 3 dakika

karıştırıldı. Plate santrifüj de 1 dakika santrifüj edildi. Preamplifikasyon deneyi için aşağıdaki karışım hazırlandı. (Bu karışım 96 örneğin PreAmplifikasyon reaksiyonu için yeterlidir, ekstra hacimler hesaplamaya dahil edilmiştir.)

TaqMan PreAmp Master Mix 300 µl (Life Technologies P/N 4361128)

Pool Primer Mix 150 µl

TOPLAM 450 µl

- Bu karışım bir 8'li strip tüpün tüm kuyularına 54'er µl olarak transfer edildi. Buradan 8 kanallı pipet yardımı ile 3.75'er µl alınarak temiz bir 96'lık piko Plate'in tüm kuyularına pipetlendi.
- Sulandırılmış olan cDNA örneklerinden her kuyuya 1.25'er µl olmak üzere pipetlendi. Plate, film ile kaplandı, plate karıştırıcıda 3000 rpm de 3 dakika karıştırıldı. Plate 1 dakika santrifüj edildi ve Plate Thermal Cycler'a konularak aşağıdaki PreAmp thermal protokolü çalıştırıldı.

PreAmp Protokolü

95° C	10 dakika	Başlangıç Dentürasyonu
95° C	15 saniye	15 döngü
60° C	4 dakika	
4° C	∞	

Thermal programın sonunda plate'in oda sıcaklığına gelmesi beklenir (deney bitiminde yüzeyi sıcak olabilir). Plate 1 dakika santrifüj edildi. Exonuclease adımı ile devam edildi.

3.3.3. Ekzonükleaz Hazırlanması:

Preamplifikasyon adımı sonrası bağlanmayan primerlerin ve PCR artıklarının uzaklaştırılması için ekzonükleaz adımı uygulandı.

Aşağıdaki karışım hazırlandı. Bu karışım 96 örneğin exonuclease reaksiyonu için yeterlidir. (ekstra hacimler hesaplamaya dahil edilmiştir)

Exonuclease Buffer 24µl (BioLabs P/N 191502)

Exonuclease I 48µl (BioLabs P/N 11502)

Dnase-Rnase Free su 168µl

TOPLAM 240 µl

Bu karışım bir 8'li strip tüpün tüm kuyularına 30 µl olarak transfer edildi. Buradan 8 kanallı pipet yardımı ile 2.00 şer µl alınarak PreAmplifiye ürünlerin üzerine pipetlendi. Plate, film ile kaplandı, plate karıştırıcıda 3000 rpm de 3 dakika karıştırıldı. Plate santrifüj de 1 dakika santrifüj edildi ve Plate Thermal Cycler'a konularak aşağıdaki Exonuclease thermal programı çalıştırıldı.

Exonuclease Thermal Protokol

37° C 30 dakika

80° C 15 dakika

4° C ∞

Thermal programın sonunda plate'in oda sıcaklığına gelmesi beklendi (deney bitiminde yüzeyi sıcak olabilir). Plate santrifüj de 1 dakika santrifüj edildi ve film açıldı. Her kuyudan 2'şer µl alınarak yeni bir 96'lık piko plate'in kuyularına transfer edildi. Her kuyuya 8'er µl DNase, RNase free su eklendi. Yeni bir film ile plate kaplandı, plate karıştırıcıda 3000 rpm de 3 dakika karıştırıldı. Plate santrifüj de 1 dakika santrifüj edildi.

3.3.4. Dynamic Array Hazırlanması:

Bu aşama da 6 ayrı adım vardır;

1. Dynamic Array'in PRIME edilmesi,
2. Assay Plate'inin hazırlanması,

3. Örneklerin hazırlanması,
4. Dynamic Array'e pipetlemelerin yapılması,
5. IFC Controller da Dynamic Array'in Load edilmesi,
6. Dynamic Array'in BioMark da çalışılması.

3.3.4.1. Dynamic Array'in PRIME edilmesi:

Bir adet Dynamic Array'e control fluid lar enjekte edildi ve Dynamic Array IFC Controller da PRIME edildi. Bu işlem tam 20 dakika sürdü. PRIME işlemi devam ederken aşağıdaki aşamaya geçildi.

3.3.4.2. Assay Plate'inin Hazırlanması:

Her bir primerden boş bir 96 lık piko plate in kuyularına 1.75 µl pipetlendi. Üzerine 3.50 µl Assay Loading Reagent ve 1.75 µl DNase, RNase Free su eklendi. Plate film ile kaplandı. Plate karıştırıcıda 2000 rpm de 3 dakika karıştırıldı. Plate santrifüj de 1 dakika santrifüj edildi.

Hazırlanan bu karışım Dynamic Array lere pipetlemeye hazırdır ve 3 adet Dynamic Array için yeterlidir. (Kullanılmayan primer plate inin hemen -20°C de saklanması gerekir)

3.3.4.3. Örneklerin Hazırlanması:

Aşağıdaki karışım hazırlandı. Bu karışım bir set (96 örnek) için yeterlidir (ekstra hacimler hesaplamaya dahil edilmiştir).

2x TaqMan Gene Expression Master Mix 360 µl
20x DNA Binding Dye Sample Loading Reagent 36 µl
20x EvaGreen 36 µl
RNase-free water 108 µl
TOPLAM 540 µl

Bu karışım bir 96 lık plate in ilk kolonunun 8 kuyusuna 65 er µl olarak transfer edildi. Bu karışımdan 4.5'er µl temiz bir 96'lık plağın tüm kuyularına pipetlendi. Sulandırılmış olan preamplifiye ürünlerin üzerindeki film açıldı. Herbir

preamplifiye örnek den 1.5'er µl bu plate' e transfer edildi. Plate yeni bir film ile kaplandı. Plate, plate karıştırıcıda 2000 rpm de 3 dakika karıştırıldı. Plate santrifüj de 30 saniye santrifüj edildi.

3.3.4.4. Dynamic Array'e Pipetlemelerin Yapılması:

Örnek pipetlemeleri için Viaflo Voyager (12.5 µl) de şu program yapıldı. Aspirate 4.75 µl, Dispense 4.50 µl. Tüm kuyulardaki Assayler bu şekilde Dynamic Array e transfer edildi. Örnek pipetlemeleri için Viaflo Voyager (12.5 µl) de Assay için yapılan program kullanıldı. Tüm kuyulardaki örnekler bu şekilde Dynamic Array e transfer edildi.

3.3.4.5. IFC Controller da Dynamic Array'in Load edilmesi:

Dynamic Array IFC kontrolere yerleştirildi ve LOAD Seçeneği seçilerek LOAD işlemi başlatıldı. Bu işlemi başlattıktan sonra BioMark Data Collection yazılımı başlatıldı ve "Double Click to Turn Lamp On" kısmına çift tıklanarak BioMark'ın lambası çalıştırıldı.

3.3.4.6. Dynamic Array'in BioMark Real-time PCR (fluidigm, USA) ile Çalışılması:

Dynam ic Array IFC kontrollerden alındı. Dynamic Array altındaki mavi filmin uzaklaştırıldığından emin olundu. Çip yüzeyinin temiz olup olmadığı kontrol edildi. Dynamic Array BioMark'a barkod kısmı dışarı bakacak şekilde yerleştirildi.

BioMark Data Collection yazılımı yardımı ile Dynamic Array çalıştırıldı. Verilerin kaydedileceği yer ve dosya adı seçildikten sonra diğer sayfada sırası ile "Gene Expression", Passive Reference Dye olarak "ROX" ve "Probe Type" kısmında "EvaGreen" seçildi.

Sonraki ekranda protokoller arasından "Exiqon miRNA Protokol" seçilerek program başlatıldı. Thermal programın sona ermesi ile cihaz software'i ile sonuç verileri exel tablosu halinde elde edildi. (Fluidigm Realtime Data Analyses Software)

3.3.5. miRNAların düzeylerinin istatistiksel analizi

MikroRNA'ların düzeylerinin istatistiksel analizinde;

<http://pcrdataanalysis.sabiosciences.com/mirna/arrayanalysis.php?target=upload> sitesi kullanılarak sonuçlar excell tablosu halinde analiz sistemine yüklenmiş, kontrol miRNA'larına göre sonuçlar hesaplanmıştır. Mononükleer hücre için 5S rRNA kontrol olarak, plazma örnekleri için miR-30e-5p internal kontrol olarak kullanılmıştır.



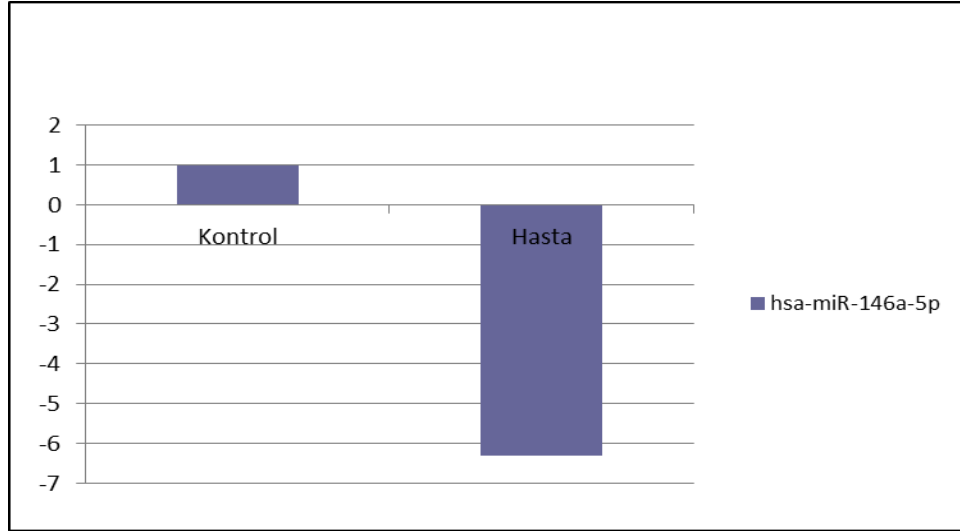
4. BULGULAR

Çalışmaya tüberküloz tanısı almış, tedavi almamış ya da tedavisinin 1. ayında olan 50 hasta ve herhangi bir tüberküloz öyküsü olmayan 30 sağlıklı birey kontrol grubu olarak alındı. Hasta ve kontrol grubunun yaş ve cinsiyetleri benzer olarak seçildi. Kontrol ve hasta grupları cinsiyet açısından karşılaştırıldığı zaman erkek hastalar %37,4, kadın hastalar ise %40,3 idi. Kontrol grubunda ise erkekler % 62,6, kadınlar ise %59,7 idi. Her iki grup cinsiyet açısından karşılaştırıldığı zaman ise istatistiksel olarak anlamlı fark tespit edilmedi. (p: 0,682)

Tablo 4.1. Kontrol ve hasta gruplarının mononükleer miRNA cycle threshold değerlerinin örnek karşılaştırılması

MikroRNA	Hasta Grubu ^a			Kontrol Grubu ^{a, b}			NK ^c
	3-M	11-M	7-M	S5-M	S6-M	S12-M	
hsa-miR-146a-5p	12,55801	14,08065	13,52502	9,216026	9,902641	9,062733	999
hsa-miR-421	15,22846	16,01766	16,96306	13,53939	15,15809	14,42436	999
hsa-miR-223-3p	6,253504	6,549398	7,536172	4,484944	4,443203	4,673863	999
hsa-miR-424-5p	13,09372	14,94364	15,30202	12,02393	10,84107	12,06693	999
hsa-miR-365a-3p	16,59064	17,35698	22,15185	16,31155	14,05359	16,08201	999
hsa-miR-144-3p	22,59254	23,91154	16,98089	18,77363	15,41623	22,50394	999
hsa-miR-30a-5p	17,28838	17,87223	17,71476	15,57229	14,24019	17,3116	999
5S	3,444446	3,493528	4,13822	2,5	3,938127	7,85911	999

^aM; Mononükleer hücre, ^bS; Sağlıklı, ^cNK; Negatif kontrol



Şekil 4. 1. Mononükleer miRNA Karşılaştırmalı Grafiği

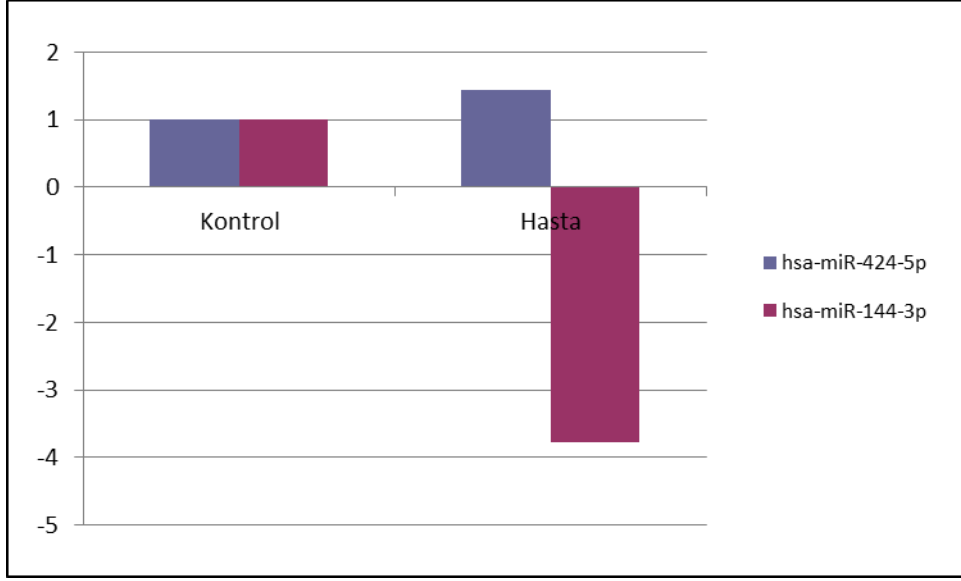
Tablo 4.2. hsa-miR-146 çalışması p değeri

miRNA	Kontrol	Hasta	p Değeri
hsa-miR-146a-5p	1	-6,3085	0,046437

Tablo 4.3. Kontrol ve hasta gruplarının plazma miRNA cycle threshold değerlerinin örnek karşılaştırılması

MikroRNA	Hasta Grubu ^a			Kontrol Grubu ^{a,b}			NK ^c
	17-P	18-P	5-P	S14-P	S9-P	S3-P	
hsa-miR-146a-5p	21,81436	22,49157	20,21919	20,89612	20,9463	21,6758	999
hsa-miR-421	24,72557	25,79025	20,8651	20,92239	23,40192	21,34788	999
hsa-miR-223-3p	13,35429	13,2993	9,946063	11,08731	11,43489	12,22405	999
hsa-miR-424-5p	18,62179	18,35633	15,29608	15,61338	17,18754	16,83276	999
hsa-miR-365a-3p	25,08627	20,93037	19,5382	22,17295	20,26574	22,40977	999
hsa-miR-144-3p	20,55564	16,76535	12,85475	13,18687	14,1125	14,36497	999
hsa-miR-30a-5p	19,33381	21,25788	18,61398	19,25544	18,84566	19,22168	999
hsa-miR-30e-5p	16,2852	14,62949	12,37763	13,20305	13,05504	13,35373	999
hsa-miR-99a-5p	20,73948	20,99318	19,56105	18,06003	18,57368	20,4092	999

^a P; Plazma, ^b S; Sağlıklı bireyler, ^c NK; Negatif kontrol



Şekil 4. 2. Plazma miRNA Kontrol ve Hasta Gruplarının Karşılaştırılmalı Grafiği

Tablo 4. 4. hsa-miR-424 ve hsa-miR-1144 çalışması p değeri

miRNA	Kontrol	Hasta	p Değeri
hsa-miR-424-5p	1	1,4413	0,034614
hsa-miR-144-3p	1	-3,7746	0,000518

Mononükleer hücrelerde mikroRNA ifade düzeylerindeki değişimin hasta ve kontrol grubunda kıyaslamasında istatistiksel olarak anlamlı eksprese olan hsa-miR-146-a ($p < 0.05$) bulunmuştur. Plazmada mikroRNA ekspresyon analizi sonucunda ise kontrol ve hasta örnekler arası yapılan kıyaslamada iki miRNA (hsa-miR-424-5p, hsa-miR-144-3p) istatistiksel olarak anlamlı sonuç vermiştir.

5. TARTIŞMA

miRNA lar yüksek seviyede korunan DNA bölgelerinden kodlanan fakat proteine translasyonu gerçekleştirilmeyen, yaklaşık 18-24 nükleotid uzunluğunda küçük RNA molekülleridir. miRNA'lar protein kodlayan genleri post-transkripsiyonel seviyede etkileyen small RNA'ların endojen sınıfında yer alan negatif regülatörlerdir. Bu küçük moleküller gelişim, farklılaşma, homeostazi gibi birçok fizyolojik süreçte rol oynarlar ve memeli genlerinin %60'ından fazlasının düzenlenmesinde rol oynadığı tahmin edilmektedir. Aynı zamanda çeşitli kanser tiplerinde miRNA'ların klinik önemi ve biyobelirteç olarak kullanılabilirliği yapılan çalışmalarla gösterilmiştir. Ancak enfeksiyon hastalıklarındaki rolünü anlamaya yönelik çalışmalar henüz daha çok yenidir¹²³.

Yapılan çok sayıda çalışmalar ile miRNA'ların tüberkülozda konak-patojen etkileşiminde büyük rol oynadığı gösterilmiş, aktif tüberkülozlu, latent tüberkülozlu ve sağlıklı bireylerin naturel killer, dentritik hücrelerinde ve makrofajlarında anti-mikrobakteriyel savunmada rol oynayan genlerin ifadelerinde değişim gözlenmiştir. Bu değişimden büyük olasılıkla miRNA'ların etkinliği olduğu tahmin edilmektedir. miRNA'lar T hücre farklılaşması ve işlevini, NK, dentritik hücreler ve makrofajların doğal işlevlerini etkilemektedirler¹²⁴.

TB patogeneğinde; enfeksiyonun latent olarak mı ya da klinik tablolar oluşturarak evrelerin ilerleyip aktif tüberküloz hastalığının gelişip gelişmeyeceğini konağın immun cevabı belirler. Yapılan çalışmalar enfeksiyon hastalıklarda dahil bir çok hastalıkla ile miRNA'ların ilişkili olduğunu ve bu hastalıklarda biomarker olarak kullanılabileceğini göstermiştir.

miRNA'lardaki ekspresyon anormallerinin yarattığı fonksiyonel bozukluklar birçok hastalığın gelişimine katkı sunmaktadır. Söz konusu anormal ekspresyonlar; mikroRNA'daki bir mutasyon downregülasyona, gen amplifikasyonu ve aşırı transkripsiyon, miRNA'ların aşırı eksprese olmasına, hedef genin 3' UTR bağlanma bölgesinde bir mutasyon, o bölgeye bağlanmanın engellenmesine ya da yeni bağlanma alanları oluşmasına yol açabilir ¹²⁵.

Bakteriyel infeksiyonlarda miRNA'lar bakterinin karakteristiğine bağılı olarak farklı mekanizmalar geliştirirler. miRNA'lar bakteriyel patojenleri hedef alarak memeli hücrelerinde inflamatuvar faktörlerin aktivasyonunda rol oynarlar.

Hem in vitro hemde klinik çalışmalar sonucunda virulan mikobakteri türleri ile enfeksiyon sonrasında miR-29 upregüle olduğu ve 3'-UTR interferon gama miRNA'sının hedef alınıp immun cevabın baskılandığı, aynı zamanda anti-apoptotik proteinler Bcl-2 (B hücre lenfoma -2) Mcl-1, kinazP85 α ve GTP bağlayan protein cdc42'yi hedef alınarak tüberküloz savunmasında rol oynayan hücrelerin apoptozuna, INF- γ salınımını baskılamasına ve makrofajlarda fagosite edilmiş M.tuberculosis'in sindirimden kaçmasına fırsat verildiği gösterilmiştir. İlginç bir şekilde avirulan mikobakterilerle enfeksiyon esnasında miR-29'u downregüle etmekte ve INF- γ salınımını indüklemektedir. Yani miR-29'un ekspresyonunu mikobakterilerin spesifik virulans faktörleri etkilemektedir^{126,127}.

Silvana V. Spinelli ve arkadaşları tarafından Akciğer ve plevral tüberkülozlu hastaların mononükleer hücrelerinde değişmiş miRNA ifade düzeylerinin incelendiği 2012 yılında yapmış oldukları çalışmada enfeksiyon bölgesinde meydana gelen olayları anlamak için çoğu immun sistem düzenlenmesinde rol oynayan genlerin regülasyonunu düzenleyen altı farklı mikroRNA (miR-223, miR-144*, miR-421, miR-424, miR-146a, miR-365) ifade düzeylerindeki değişimi incelemişlerdir¹²⁸. Çalışmada HIV ile koinfekte olmayan ve henüz tanı almış tedaviye başlamamış 24 hasta ve 20 gönüllü birey dahil etmişler ve bu hastalardan periferel kan mononükleer hücreler ve plevral sıvı mononükleer hücreler elde edilerek sağlıklı bireylerle hasta bireylerin mononükleer hücrelerinde altı farklı mikroRNA'nın ifade düzeylerini incelemiş ve aynı zamanda anti tüberküloz immunitede son derece önemli rol oynayan IL-6 seviyesinde tedavi sürecinde nasıl bir değişime uğradığını da araştırmışlardır. Sonuç olarak mir-146a hem periferel kanda hemde plevral sıvıda sağlıklı bireylere kıyasla ciddi derecede downregüle olurken monositler makrofaj farklılaşmasında rol oynayan miR-424 sadece periferel kan mononükleer hücreler (PBMC)'de istatistiksel olarak anlamlı derecede ifade düzeyinde artış belirlenmiştir. Periferel kan mononükleer hücrede diğer 4 mikroRNA'nın

istatistiksel olarak ifade düzeyinde bir farklılık ortaya çıkmamış ancak plevrall sıvıda diğler 3 mikroRNA (miR-223, miR-144*, miR-421) periferall kan mononükleer hücreye göre plevrall sıvıda daha düşük eksprese olmuştur. Hasta bireyler ile sağlıklı bireylerin periferall kan mononükleer hücrelerinde çok güçlü bir fark olmaması periferde mikroRNA'ların geniş varyasyonlarını baskılayan kompleks bir etkileşim ağı tarafından sıkı bir şekilde kontrol edildiğı anlamına gelmektedir. Sağlıklı bireylerle kıyaslandığında küçük farklılıkların ise analiz altındaki bireylerin immün yapısına, tüberküloza olan duyarlılığına bağı olabileceğı düşünölmektedir

Birbirinden bağımsız iki farklı grup tarafından yürütölen başka bir çalışmada Çin'li hastaların PBMC'in de, Liu ve arkadaşları T hücre farklılaşması ve proliferasyonunda sitokin üretiminde rol oynayan miR-144'ün ifade düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı bir artış olduğunu gösterilirken, Wang ve arkadaşları farklı bir mikroRNA seti ile çalışıp miR-365, miR-424'ün de PBMC'de aşırı upregöle olduğunu göstermişlerdir. Sonuçların farklılık göstermesi analiz altındaki grubun ırksal varyasyonu, genetik yatkınlığı ve altta yatan başka sebeplerle ilişkili olabileceğı fikrini doğurmuştur^{123,124}.

Yanhua Liu, Xinjing Wang ve arkadaşları; 2011 yılında MikroRNA'ların insanda *Mycobacterium tuberculosis* enfeksiyonunda immün cevapta rolünü anlamaya yönelik yapmış olduğı başka bir çalışmaya 21 akciğler tüberkülozlu hasta ve 21 sağlıklı birey dahil edilmiştir. Yapılan çalışmada akciğler tüberkülozlu hasta bireyler ve sağlıklı bireylerin periferall kan mononükleer hücrelerinde mikroRNA seviyeleri belirlenmiştir. 30 mikroRNA'nın aktif tüberkülozlu hastalarla, sağlıklı bireylerle karşılaştırıldığında kaydadeğer farklılıklar tespit edilmiştir. Bunlardan 28'nin ifadesinde artış gözlenirken 2 mikroRNA ifadesinde düşüş gözlenmiştir. Seviyesinde en belirgin artış gözlenen mikroRNA'lardan birinin miR-144 olduğı tespit edilmiştir. Prekürsor miR-144'ün T hücrelerine transferi ile miR144'ün T hücre farklılaşmasında çoğalmasında interferon gama ve TNF- α üretiminde rol oynadığı sonucuna varılmıştır¹²⁵.

Yine Wang ve arkadaşları yapmış oldukları çalışmada aktif tüberkülozlu ve latent tüberkülozlu hastaların periferall kan mononükleer hücrelerinde miR-223'ün aşırı eksprese olduğunu göstermişlerdir. Fareler üzerinde yapılan bir

çalışmada miR-223'ün işlevsel kaybının morfolojik olarak hipermatüre ve uyarılarla karşı aşırı duyarlı ve fungusidal aktivitesi yüksek granülosit oranında artışa neden olduğu belirtilmiştir¹²⁹.

Başarılı bir tüberküloz kontrolü ve tedavisi için erken tanı son derece önemlidir. Su anki mevcut tanısal yaklaşımlar klinik örnekte patojenin tanınması esasına dayanmaktadır. Bu yüzden, akciğer ve akciğer dışı tüberkülozda latent tüberküloz hastalığının/aseptomatik taşıyıcılığın, aktif tüberküloz hastalığının heterojen klinik özellikler taşımasından dolayı tüberküloz tanısında daha etkin ve olguların mikrobiyal olarak doğrulanmasını beklemeksizin hastalığın daha erken evrede tanısını koyabilmek için konağa ait biyobelirteçler kullanılarak ticari olarak tanısal testler geliştirilmesi acil ihtiyaçtır. Özellikle latent tüberküloz mekanizması ve onun aktif tüberküloza geçiş süreci tam olarak bilinmemektedir.

Yapılan çalışmalar ışığında bu geçiş sürecinde konağa ait immun cevabın son derece önemli rol oynadığına dair kanıtlar mevcuttur. Daha önce yapılan çalışmalarda aktif tüberkülozlu ve latent tüberkülozlu bireylerin makrofajlarında, natürel killer ve dentritik hücrelerinde immun cevapla ilişkili genlerin ekspresyonunda değişiklikler gözlenmiştir ve bu değişimlerin latent infeksiyonla aktif tüberküloz hastalığının ayırımında kullanılabilirliği vurgulanmıştır. mikroRNA'ların balgam, plazma, serum ve diğer vücut sıvılarında kolay bir şekilde elde edilebilmesi noninvazif yöntemlerle mikroRNA analizini kolaylaştırmıştır.

Çeşitli hastalıklarda (infeksiyöz hastalıklar ve kanser gibi) noninvazif ve tanısal biyomarkerlar olarak kullanılabilirliği yeni bir bilimsel alandır. Bu rutin alınan numuneler ve robot methodlarla mikroRNA analizi hastalıkların tanısında mikroRNA'ları ideal bir biyomarker yapmaktadır. Serum mikroRNA'ları endojen RNAaz aktivitesinden korunabilen oldukça stabil bir yapıdadır. İlk serum bazlı çalışmada 92 farklı miRNA'nın aktif tüberkülozlu hastalarda sağlıklı bireylere göre ifade düzeylerinde anormallikler gözlenmiştir. 59 mikroRNA upregüle olurken 33 mikroRNA downregüle olmuştur¹³⁰.

Yapılan bir başka çalışmada sadece aktif tüberkülozlu hastalar ve *Bordetella pertussis*, enterovirus, Varicella Zoster virüs ile infekte bireylerde mikroRNA ifade düzeylerindeki değişim incelenmiş ve miR361-5p, miR889,

miR576-3p sadece aktif tüberkülozlu hastalarda aşırı eksprese olduğu gözlenmiştir. Sonuç olarak yapılan bu çalışmaların sonuçları bu mikroRNA'ların tüberkülozu diğer mikrobiyal hastalıklardan ayırmada tanısal amaçlı kullanılabileceği fikrini ortaya çıkarmıştır. Daha sonra yapılan çalışmalarda bu mikroRNA'ların immun sistem gelişiminde rol oynayan genleri hedef aldığı belirlenmiştir^{131,132}.

Diğer bir çalışmada akciğer tüberkülozlu hastaların kanlarında miR-223'ün aşırı eksprese olduğu bulunmuştur. miR-223'ün işlevini anlamak için Dorhoi ve arkadaşlarının yaptığı miR-223'ün ekspresyonunu inhibitör deneyleriyle susturduklarında farelerin tüberküloza karşı savunma mekanizmasının zayıfladığını gözlemliyorlar. miR-223'ün C-X-C motif ligand2 (CXL2) ve C-C motif ligand-3 (CCL3)'ü hedef almakta ve inflamasyonun son evresinde lökosit kemotaksisinin negatif regülatörü olarak rol oynamakta ve aşırı polimorfonükleer lökosit göçünü engellemektedir^{133,134}.

Bizim çalışmamızda ise tüberküloz tanısı almış, tedavi almamış ya da tedavisinin 1. ayında olan 50 hasta ve kontrol grubu olarak da tüberküloz öyküsü olmayan 30 sağlıklı bireyde miRNA ifade düzeylerine meydana gelen gelişimin tüberküloz patogenezi ile ilişkisini araştırılmıştır. Çalışmada alınan periferik kan mononükleer hücreleri ve plazmadan miRNA elde edilerek altı farklı mikroRNA'nın ifade düzeylerini incelemiştir. Sonuç olarak miR-146a mononükleer hücrelerde sağlıklı bireylere kıyasla ciddi derecede downregüle olurken, monositler makrofaj farklılaşmasında rol oynayan miR-424 sadece plazmada istatistiksel olarak anlamlı derecede ifade düzeyinde artış belirlenmiş, miR-144'de ise anlamlı bir azalma tespit edilmiştir. Periferik kan mononükleer hücrelerinde sadece miR-146a'nın istatistiksel olarak ifade düzeyinde anlamlı bir farklılık ortaya çıktığı görülürken, plazmada 2 mikroRNA'nın (miR-424 ve miR-144) ekspresyonunda anlamlı derecede farklılık tespit edilmiş ve tanıya biyomarker olarak kullanılabileceği düşünülmüştür, fakat daha fazla sayıda hasta içeren araştırmalara ihtiyaç vardır.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Tüberküloz patogeneğinde mikroRNA'ların rolüne yönelik yapılan çalışmalardan elde edilen mevcut bilimsel veriler bundan sonraki çalışmalara katkı sunarak hastalığın tanı ve kontrolünde mikroRNA'ların potansiyel biomarkerlar olarak kullanılabilirliğinin araştırıldığı çalışmaların geliştirilmesi önerilmektedir.

Bu çalışmada mevcut literatür bilgileri ışığında bazı m.RNA türlerinin tüberküloz tanısı almış fakat tedavi almamış ya da tedavinin 1. ayında olan hastalar ile ispatlanmış tüberküloz enfeksiyonu olmayan kişilerdeki ekspresyon düzeyleri kıyaslanmıştır. Elde edilen sonuçlara dayanarak;

1. Mononükleer hücrelerden elde edilen miRNA-146a'nın aktif tüberkülozlu hastalar ile kontrol grubu kıyaslandığında ifade düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunduğu,
2. Plazmadan elde edilen miRNA-424/144 aktif tüberkülozlu hastalar ile kontrol grubu kıyaslandığında ifade düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunduğu,
3. Gösterilen ekspresyon farklılıklarının cinsiyet faktöründen bağımsız olduğu
4. Hasta ve kontrol grubu olarak kıyaslandığı zaman mononükleer hücrelerde miR-146a plazmada ise miR-144 ve miR-424 ekspresyonlarında anlamlı fark bulunduğu ($p < 0,05$) görülerek :

a-Mononükleer hücrelerden izole edilen miRNA146'nın ve plazmadan elde edilen miRNA424/144 ekspresyon düzeylerinde sağlıklı bireyler ve tüberküloz hastaları arasında belirgin farklılıklar görülmesi hızlı tanıda kullanımı umut vaatetse de çalışmanın genişletilerek daha fazla sayıda hasta ile çalışma yapılması gerektiği,

b- Bu alanda yapılmış olan az sayıdaki çalışmaya önemli katkı sağlar nitelikte olup, bu amaçla ülkemizde de ilk çalışma niteliği taşıyan çalışmamıza ait lokal sonuçların, ülke genelinde daha geniş pulmoner ve ekstra pulmoner tüberkülozlu hasta örneklerinde yapılacak çalışılmalar ile

desteklenerek miR-146a, miR-144 ve miR-424'ün tanısal prediktif değerinin daha da iyi anlaşılmasına katkı sağlayacağı görüşüne varılmıştır..



KAYNAKLAR

1. **Djelouadji Z, Raoult D, Drancourt M.** Palaeogenomics of *Mycobacterium tuberculosis*: epidemic bursts with a degrading genome. *Lancet Infect Dis*, **2011**; 11: 641-650
2. **Kurtoğlu MG, Özdemir M, Keşli R, Özkalp B, Baysal B.** Tüberküloz Şüpheli Hastalardan *Mycobacterium tuberculosis* Kompleks İzolasyon Oranı ve Suşların BACTEC™ NAP ve immünokromatografik TB Ag MPT64 Rapid™ Testleri ile Tanımlanması. *Mikrobiyol Bul*, **2011**; 45(2): 266-273.
3. **Zuger A.** Tuberculosis. In: Scheld WM, Whitley RI, Marra CM. Eds. *Infections Nervous System of Central*. 3th. Ed. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins; **2004**:451-59.
4. **Singh PK, Singh AV, Chauhan DS.** Current understanding on microRNAs and its regulation in response to Mycobacterial infections. *J Biomed Sci*, **2013**; 20: 14.
5. **Galagan JE.** Genomic insights into tuberculosis. *Nat Rev Genet*, **2014**; 15(5): 307-320.
6. **Iannaccone M, Dorhoi A, Kaufmann SHE.** Host-directed therapy of tuberculosis: what is in it for microRNA? *Expert Opin Ther Targets*, **2014**; 18(5): 491-494.
7. **World Health Organization.** Global Tuberculosis Report 2013. Geneva, WHO/HTM/TB/2013. 11.
8. **World Health Organization.** Global Tuberculosis Report 2014. Geneva, WHO/HTM/TB/2014. 8.
9. **Guo W, Li JT, Pan X, et al.** Candidate *Mycobacterium tuberculosis* genes targeted by human microRNAs. *Protein Cell*, **2010**; 1: 419-21.
10. **Alam MM, O'Neill LA.** MicroRNAs and the resolution of inflammation in macrophages. *Eur J Immunol*, **2011**; 41: 2482–2485.
11. **Baltimore D, Boldin M.P, O'Connell R.M, Rao D.S, Taganov K.D.** MicroRNAs: new regulators of immune cell development and function. *Nature Immunology* 9, **2008**; 839–845.
12. **Shenouda SK, Alahari SK.** MicroRNA function in cancer: oncogene or a tumor suppressor? *Cancer Metastasis Rev*, **2009**; 28: 369–378.
13. **Mitchell PS, Parkin RK, Kroh EM, Fritz BR, Wyman SK, Pogosova-Agadjanyan EL, Peterson A, Noteboom J, O'Brian KC, Allen A, Lin DW, Urban N, Drescher CW, Knudsen BS, Stirewalt DL, Gentleman R, Vessella RL, Nelson PS, Martin DB, Tewari M.** Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. *Proc Natl Acad Sci*, **2008**; 29;105(30):10513-8.
14. **Lu M, Zhang Q, Deng M, Miao J, Guo Y, Gao W, Cui Q.** An analysis of human microRNA and disease associations. *PLoS One*, **2008**; 3(10): e3420.
15. **Van Der Zanden, Te Koppele-Vije A.G. E.M. Vijaya Bhanu N., Van Soolingen D., and Schouls L.M.** Use of DNA extracts from Ziehl-Neelsen stained slides for molecular detection of rifampin resistance and spoligotyping of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol*, 2003; 41(3): 1101-8.

16. **Daniel TM.** The History of Tuberculosis. *Respiratory Medicine*. **2006**; 100:1862-1870.
17. **Köksal F.** Tüberküloz basiliinin kaynak ve evrimi. *Tüberküloz Sempozyum kitapçığı*, Malatya: **2003**; 34-47.
18. **Karlıkaya C.** Tüberküloz Ders Notları. <http://celalkarlikaya.trakya.edu.tr/TBdernot.htm>. **1998**.
19. **Sotomayor H, Burgos J, Arango M.** Demonstration of tuberculosis by DNA ribotyping of *Mycobacterium tuberculosis* in a Colombian prehispanic mummy. *Biomedica*, **2004**; 24: 18-26.
20. **Zorluer E.** Yöremizde İzole Edilen *Mycobacterium Tuberculosis* Suşlarında Direnç Profili. Yüksek lisans tezi, Adana, **2010**.
21. **Baris Yİ.** Dünya'da Tüberkülozun Tarihcesi. *Toraks Dergisi*, 2002; 3(3): 338-340.
22. **Clark GA, Kelley MA, Grange JM, Hill MC.** The evolution of mycobacterial disease in human populations: a reevaluation. *Curr Anthropol*, **1987**; 28(1): 45-62.
23. **Leao SC.** History in Tuberculosis. In: Palomino JC, Leao SC, Ritacco V Eds. *Tuberculosis*. Brazil: **2007**; 25-52.
24. **Bloom BR, Murray CJL.** Tuberculosis: Commentary on a reemergent killer. *Science*, **1992**; 257:1055-64.
25. **Harries AD.** Tuberculosis and human immuno deficiency virus infection in developing country. *Lancet* 335, **1990**; 387-389.
26. <http://www.who.int/tb/publications/globalreport/2012/pdf/fullreportcorrectedversion.pdf>.
27. **Bozkurt H.** Çok İlaça Dirençli *Mycobacterium tuberculosis* Kökenlerinde Artmış İlaç Direncinin Tespiti. Uzmanlık tezi, İzmir, **2009**.
28. **Köksal F, Yaman A.** Farklı bir bakteri topluluğu mikobakterilerde hücre duvarı yapısı. *21. Yüzyılda Tüberküloz Sempozyumu*, Samsun. **2003**; 34-47.
29. **McNeil M, Brennan PJ.** Structure, function, and biogenesis of the cell envelope of mycobacteria in relation to bacterial physiology, pathogenesis, and drug resistance: Some thoughts and possibilities arising from recent structural information. *Research in Microbiology*, **1991**; 142: 451.
30. **Brennan PJ.** Structure, function, and biogenesis of the cell wall of *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberculosis*, **2003**; 83(1-3): 91-7.
31. **Çakır S.** Tüberküloz Plörezide Serum Ve Plevral Sıvı Örneklerinde Early Secreted Antigenic Target- 6 (Esat-6) ve Culture Filtrate Protein- 10 (Cfp-10) Antijenlerine Spesifik T- Lenfositleri Analizinin Tanısal Değeri. Doktora Tezi, Başkent Üniversitesi Tıp Fakültesi Göğüs Hastalıkları Anabilim Dalı, Ankara, **2009**.
32. **Rachman H, Strong M, Schaible U, Schuchhardt J, Hagens K, Mollenkopf H, Eisenberg D, Kaufmann SH.** *Mycobacterium tuberculosis* gene expression profiling within the context of protein networks. *Microbes Infect*. **2006** ; 8(3):747-57.
33. **Giacomini E, Iona E, Ferroni L, Miettinen M, Fattorini L, Orefici G, Julkunen I, Coccia EM.** Infection of human macrophages and dendritic cells with *Mycobacterium*

tuberculosis induces a differential cytokine gene expression that modulates T cell response. *J Immunol.* **2001**; 166(12):7033- 41.

34. **Thurnher M, Ramoner R, Gastl G, Radmayr C, Bock G, Herold M, Klocker H, Bartsch G.** Bacillus Calmette-Guerin mycobacteria stimulate human blood dendritic cells. *Int. J. Cancer*, **1997**; 70:128–134.
35. **Wilfret C, Hotez P.** Tuberculosis In: Gershon AA, Hotez PJ, Katz SL. Krugman's Infectious Disease of Children. (Çeviri:Kanra G.) 11th. edition St. Louis Missouri: Mosby. **2006**; 731-762.
36. **Özbal Y.** Tüberküloz İmmünolojisi. *Erciyes Tıp Dergisi*, **2006**; 28 (1): 25-34.
37. **Braunstein M, Espinosa BJ, Chan J, Belisle JT, Jacobs WR.** Jr: SecA2 functions in the secretion of superoxide dismutase A and in the virulence of *Mycobacterium tuberculosis*. *Mol Microbiol*, **2003**; 48:453-464.
38. **Guinn KM, Hickey MJ, Mathur SK, Zakel KL, Grotzke JE, Lewinsohn DM, Smith S, Sherman DR.** Individual RD1-region genes are required for export of ESAT-6/CFP-10 and for virulence of *mycobacterium tuberculosis*. *Mol Microbiol*, **2004**; 51:359-370.
39. **Esen N.** Tüberkülozda Mikobakteriyel Persistans Mekanizmaları. 4.Tüberküloz Sempozyumu Kitabı, Malatya, **2005**; 58-64.
40. **Smith CV, Huang CC, Miczak A.** Biochemical and structural studies of malate synthase from *Mycobacterium tuberculosis*. *J Biol Chem*, **2003**; 278:1735-1743.
41. **Geisel RE, Sakamoto K, Russell DG, Rhoades ER.** In vivo activity of released cell wall lipids of *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette–Guerin is due principally to trehalose mycolates. *J Immunol*, **2005**; 174:5007-5015.
42. **FÖ Eyüboğlu.** Tüberküloz patogenezi. *Toraks Kitapları* **2010**; 11:67-66.
43. www.rshm.gov.tr. *Tüberkülozda Bakteriyolojik Tanı* kitabı. **2010**.
44. **Kocabaş A.** Akciğer tüberkülozu. İçinde Willke TA, Söyletir G, Doğanay M, editör. *İnfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi*. 3.Baskı, İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri **2002**; 538-591.
45. **Rieder HI.** : Epidemiologic Basis of Tuberculosis Control. First Ed.,Paris: International Union Against Tuberculosis and Lung Disease, **1998**.
46. **Smith P.G. Moss A.** : Epidemiology of tuberculosis. In:Tuberculosis. In: Barry Bloom Ed. Pathogenesis, Protection and Control. Washington: ASM Pres; **1994**: 47-59.
47. **Babacan F, Över U.** Mikobakterilerin Genel Özellikleri ve *Mycobacterium tuberculosis* complex. Rota S. Tüberküloz dışı mikobakteriler ve *Mycobacterium leprae*. İçinde Wilke Topçu, Söyletir G, Doğanay M(ed), *İnfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi Cilt 2*. **2002**; 1675-1698.
48. **Mert A.** Miliyer Tüberküloz. *Toraks Kitapları*, **2010**; 11: 298.
49. **Çağlar E.** Akciğer Tüberkülozu Klinik Bulguları. *Toraks Kitapları*, 11:176.
50. **Vapur M.** Tüberkülozlu Hastaların Çeşitli Parametreler Eşliğinde Değerlendirilmesi. Uzmanlık tezi, İstanbul, **2008**.

51. **Yaman M.** Tüberküloz Patogenezi, Erifkin ve Çocukta Tüberküloz Sempozyumu,30 Nisan **1999**, İstanbul, 15-20.
52. **Urban CF, Lourido S, Zychlinsky A .** How do microbes evade neutrophil killing? *Cell Microbiol*, **2006**; 8: 1687-1696.
53. **Kıyan M:** Mycobacteriaceae, In: Ustaçelebi Ş (Ed), Temel ve Klinik Mikrobiyoloji, Güneş Kitabevi, Ankara, 1999; 419-455.
54. **Kriehuber E, Breiteneder-Geleff S, Groeger M, Soleiman A, Schoppmann SF, Stingl G, Kerjaschki D, Maurer D.** Isolation and characterization of dermal lymphatic and blood endothelial cells reveal stable and functionally specialized cell lineages. *J Exp Med*, **2001**; 194(6):797-808.
55. **Gumperz JE, Brenner MB.** CD1-specific T cells in microbial immunity. *Curr Opin Immunol*. **2001**; 13(4):471-8.
56. **Dannenberg AM Jr, Tomashefski JF Jr.** Pathogenesis of pulmonary Tuberculosis. Fishman AP. Fishman's pulmonary diseases and disorders 4th Edition. New York, Mc Graw- Hill Company. **2008**; 2247-71.
57. **Li B, Bassiri H, Rossman MD, et al.** Involvement of the Fas/Fas ligand pathway in activation-induced cell death of mycobacteria-reactive human gamma-delta T cells: a mechanism for the loss of gamma-delta T cells in patients with pulmonary tuberculosis. *The Journal of Immunol* , **1998**; 161: 1558-67.
58. **Raja A.** Immunology of tuberculosis. *Indian J Med Res* **2004**; 120: 213-32.
59. **Zeytinli ÜÖ.** Çukurova Bölgesinde Akciğer Tüberkülozlu Hastalardan İzole Edilen *mycobacterium tuberculosis* Suşlarının Spoligotyping ve MIRU-VNTR (Mycobacterial Interspersed Repetitive Unit-Variable Number of Tandem Repeat) Yöntemiyle Tiplendirilmesi. Uzmanlık Tezi, Adana, **2010**.
60. **Ernst, J. D.** 1998. Macrophage receptors for *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect. Immun.* 66:1277–1281.
61. **Kaufmann SH.** How can immunology contribute to the control of tuberculosis? *Nature Reviews Immunol* 2001; 1: 20-30.
62. **Flynn JL, Chan J.** Immunology of tuberculosis. *Annu Rev Immunol* **2001**; 19: 93-129
63. **Collins HL, Kaufmann SHE (2002).** Chapter 15: *Acquired Immunity against Bacteria*. In: *Immunology of Infectious Diseases*. Eds: SHE Kaufmann, A Sher & R Ahmed. ASM Press, Washington DC pp 207-221.
64. **Çakır M.** Tüberküloz İmmünolojisi, *Türkiye Klinikleri Tıp Bilimleri Dergisi*, **1994**; 6: 409-415.
65. **Özbal Y.** Tüberküloz İmmünolojisi, *Erciyes Tıp Dergisi*, **2006**; 28 (1) 025-034.
66. **FÖ Eyüboğlu.** Tüberküloz İmmünolojisi. *Toraks Kitapları* **2010**; 11: 73-75.
67. **Oddo M, Renno T, Attinger A, Bakker T, MacDonald HR, Meylan PR.** Fas ligand-induced apoptosis of infected human macrophages reduces the viability of intracellular *Mycobacterium tuberculosis*. *J Immunol*. **1998** Jun 1;160(11):5448-54.
68. **Palomino JC, Leão SC, Ritacco V.** Tuberculosis **2007**.

69. **Barcelos W, Martins-Filho OA, Guimaraes TM, Oliveira MH, Spindola-de-Miranda S, Carvalho BN, Toledo VP.** Peripheral blood mononuclear cells immunophenotyping in pulmonary tuberculosis patients before and after treatment. *Microbiol Immunol.* **2006**;50(8):597- 605.
70. **Liu G, Ren H, Sun XJ, Shi JS.** Distribution of natural killer cells and T-lymphocyte subsets in Peripheral blood, gallbladder cancer and surrounding tissue. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int.* **2007**; 6(1):81-6.
71. **Clark R, Kupper T.** Old meets new: the interaction between innate and adaptive immunity. *J Invest Dermatol.* **2005** Oct;125(4):629-37.
72. **Co DO, Hogan LH, Kim SI, Sandor MM** Mycobacterial granulomas: keys to a long-lasting host pathogen relationship. *Clin Immunol*, **(2004)**. 113, 130-136.
73. **Zhang M, Gately MK, Wang E, Gong J, Wolf SF, Lu S, Modlin RL, Barnes PF.** Interleukin 12 at the site of disease in tuberculosis. *J Clin Invest*, **(1994)**, 93, 1733-1739
74. **Cooper AM, Magram J, Ferrante J, Orme IM** Interleukin 12 (IL-12) is crucial to the development of protective immunity in mice intravenously infected with Mycobacterium tuberculosis. *J Exp Med*, **(1997)**. 186, 39-45.
75. **Van Crevel R, Ottenhoff TH, Van Der Meer JW** innate immunity to Mycobacterium tuberculosis. *Clin Microbiol Rev*, **(2002)**. 15, 294-309.
76. **Güzelgöl, F., & Aksoy, K.** Function and application areas in medicine of non-coding RNA. *Archives Medical Review Journal*, **(2009)**. 18(3), 141-155.
77. **Ambros V.** The functions of animal microRNAs. *Nature.* **2004**;431: 350–355.
78. **Lim LP, Lau NC, Garrett-Engle P, Grimson A, Schelter JM, Castle J, Bartel DP, Linsley PS, Johnson JM.** Microarray analysis shows that some microRNAs downregulate large numbers of target mRNAs. *Nature* **2005**; 433: 769-773
79. **Görür A ,Tamer L.** MikroRNA'ların Terapotik Kullanımı. *Mersin Ünv Sağlık Bilim Derg* , **2011**; 4(2) .
80. **Griffiths-Jones S, Grocock RJ, van Dongen S, Bateman A, Enright AJ.** miRBase: microRNA sequences, targets and gene nomenclature. *Nucleic Acids Res* **2006**;34:D140–4.
81. **Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V.** The C. elegans heterochronic gene lin-4 encodes small RNAs with antisense complementarity to lin-14. *Cell* **1993**; 75: 843–854.
82. **Reinhart BJ, Slack FJ, Basson M, et al.** The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* **2000**;403, 901–906.
83. **Pasquinelli AE, Reinhart BJ, Slack F, et al.** Conservation of the sequence and temporal expression of let-7 heterochronic regulatory RNA. *Nature* **2000**;408(6808):86–89
84. **Lagos-Quintana M, Rauhut R, Lendeckel W, Tuschl T.** Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. *Science* **2001**;294:853–858

85. **Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC.** Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *nature* **1998**; 391 (6669)-806-811.
86. **Kwak PB, Iwasaki S, Tomari Y.** The microRNA pathway and cancer. *Cancer Sci* **2010**; 101: 2309-2315 .
87. **Cai X, Hagedorn CH, Cullen BR.** Human microRNAs are processed from capped, polyadenylated transcripts that can also function as mRNAs. *RNA* **2004**;10(12):1957-66.
88. **Lee Y, Ahn C, Han J, et al.** The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature* **2003**; 425:415-419.
89. **Lund E, Guttinger S, Calado A, Dahlberg JE, Kutay U.** Nuclear export of microRNA precursors. *Science* **2004**; 303:95-98
90. **Gregory RI, Chendrimada TP, Cooch N, Shiekhattar R.** Human RISC couples microRNA biogenesis and posttranscriptional gene silencing. *Cell* **2005**;123:631-640.
91. **Wang Z.** MicroRNA: A matter of life or death. *World J Biol Chem.* **2010** Apr 26;1(4):41-54. doi: 10.4331/wjbc.v1.i4.41. PubMed PMID: 21537368; PubMed Central PMCID: PMC3083949.
92. **Karginov FV, Conaco C, Xuan Z, Schmidt BH, Parker JS, Mandel G, et al.** Biochemical approach to identifying microRNA targets. *Proc Natl Acad Sci USA* **2007**;104(49):19291-6.
93. **Lewis BP, Shih IH, Jones-Rhoades MW, Bartel DP, Burge CB.** Prediction of mammalian microRNA targets. *Cell* **2003**;115(7):787-98.
94. **Wu L, Fan J, Belasco JG.** MicroRNAs direct rapid deadenylation of mRNA. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **2006** Mar 14;103(11):4034-9. Epub 2006 Feb 22. PubMed PMID: 16495412; PubMed Central PMCID: PMC1449641.
95. **Nissan T, Parker R.** Computational analysis of miRNA-mediated repression of translation: implications for models of translation initiation inhibition. *RNA* **2008**;14(8):1480-91.
96. **Paranjape T, Slack FJ, Weidhaas JB.** MicroRNAs: tools for cancer diagnostics. *Gut.* 2009 Nov;58(11):1546-54. doi: 10.1136/gut.2009.179531. PubMed PMID: 19834118; PubMed Central PMCID: PMC2802653.
97. **Lacellier CH, Dunoyer P, Arar K, et al.** A cellular microRNA mediates antiviral defense in human cell. *Science* **2005**;308:557-60
98. **Kawai T, Akira S.** TLR signaling. *Cell Death Differ* 2006;13:816–25.
99. **Takeda K, Akira S.** Toll-like receptors in innate immunity. *Int Immunol* **2005**;17:1–14.
100. **Liew FY, Xu D, Brint EK, O'Neill LA.** Negative regulation of toll-like receptor-mediated immune responses. *Nat Rev Immunol* **2005**;5:446–58
101. **Rujuan Dai, and S, Ansar Ahmed.** MicroRNA, A new paradigm for understanding immunoregulation, inflammation and autoimmune diseases. *Translational Research.* **2011**;157:163–179.
102. **Johnnidis JB, Harris MH, Wheeler RT, et al.** Regulation of progenitor cell proliferation and granulocyte function by micro- RNA-223. *Nature* **2008**;451:1125–9

103. **Taganov KD, Boldin MP, Chang KJ, Baltimore D.** NF-kappaB-dependent induction of microRNA miR-146, an inhibitor targeted to signaling proteins of innate immune responses. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2006**;103:12481–6.
104. **Tam W.** Identification and characterization of human BIC, a gene on chromosome 21 that encodes a noncoding RNA. *Gene* **2001**;274:157–167. [PubMed: 11675008]
105. **Cobb BS, Nesterova TB, Thompson E, et al.** T cell lineage choice and differentiation in the absence of the RNase III enzyme Dicer. *J Exp Med* **2005**;201:1367–73
106. **Muljo SA, Ansel KM, Kanellopoulou C, Livingston DM, Rao A, Rajewsky K.** Aberrant T cell differentiation in the absence of Dicer. *J Exp Med* **2005**;202:261–9
107. **Chiba Y, Hijikata T.** MikroRNAs and their therapeutic potential for human diseases: preface. *J Pharmacol Sci*, **2010**;114(3):262-3.
108. **Giray BG.** Serum miRNA Profillerinin Hepatit B Virüs (HBV) Enfeksiyonu ve Kronik HBV ile ilişkili Hepatoseüler Karsinomanın Erken Tanısındaki Biyomarker Olma Potansiyelinin Araştırılması.Yüksek Lisans Tezi , Mersin , **2012**.
109. **Klein, D..** Quantification using real-time PCR technology: Applications and limitations. *TrendsMol. Med*, **20028**: 257–260.
110. **Kubista M. . M.** Emerging real-time PCR applications. *Drug Discovery Word summer*, **2008**57-66.
111. **Bustin S A.** Real-Time PCR. *Encyclopedia of Diagnostic Genomics and Proteomics*, **2005**: 1118-1120
112. **Kubista M, Andrade JM, Bengtsson M, Forootan A, Jonák J, Lind K, et al.** The real-time polymerase chain reaction *Mol Aspects Med* **2006**; 27:95-125.
113. <http://www.gene-quantification.de/chemistry.html#sybrgreen> Erişim Tarihi: 25.01.2012
114. **Cacherill FR, Uhl JR.** Applications and challenges of Real- Time PCR for the Clinical Microbiology Laboratory. In: Reischl U, Wittwer C, Cockerill FR, eds. *Rapid Cycle Real-Time PCR. Methods and Applications*. 1st ed. Germany: Heidelberg; **2001**. p.11
115. **Günel T.** Gen Anlatımının Kantitatif Analizi “ Real Time PCR”. *Türkiye Klinikleri J Med Sci*, **2007**: 27; 763-767
116. **Giesendorf B A J, Vet J A M, Tyagi S, Mensink E J M, trijbels F J M, Blom H J.** Molecular beacons: a new approach for semiautomated mutation analysis. *Clin Chemistry*, **1998**: 44; 482-486.
117. **Chaplin BE, Rasmussen RP, Bernard PS, Wittwer CT.** LightCycler™ hybridization probes the most direct way to monitor PCR amplification and mutation detection. *Biochemica* **1999**; 1:5-8.
118. **Wittwer CT, Herrmann MG, Moss AA, Rasmussen RP.** Continuous fluorescence monitoring of rapid cycle DNA amplification. *Biotechniques* **1997**; 22: 130-1, 134-8.
119. **Gunal S, Yang Z, Agarwal M, Koroglu M, Arici ZK, et al.** Demographic and microbial characteristics of extrapulmonary tuberculosis cases diagnosed in Malatya, Turkey, 2001-2007. *BMC Public Health* (**2011**) 11: 154.
120. **Zeng J, Cui T, He ZG)** A Genome-Wide Regulator–DNA Interaction Network in the Human Pathogen *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. *J Proteome Res* (**2012** 11(9): 4682–4692

121. **Rohde KH, Veiga DFT, Caldwell S, Balázsi G, Russell DG** Linking the Transcriptional Profiles and the Physiological States of Mycobacterium tuberculosis during an Extended Intracellular Infection. *PLoS Pathog* (2012) 8(6): e1002769.
122. **Kurt AG, Acar C.** MicroRNAs in Tuberculosis: Do They Have A Functional Role In TB?. *MOJ Proteomics Bioinform* 2015, 2(1): 00034.
123. **Liu Z, Zhou G, Deng X, Yu Q, Hu Y, Hu Sun H, Wang Z, Chen H, Jia C, Wang D.** Analysis of miRNA expression profiling in human macrophages responding to Mycobacterium infection: Induction of the immune regulator miR-146a. *Journal of Infection* ,2014 ;68, 553e561.
124. **Jazdzewski K, Liyanarachchi S, Swierniak M, Pachucki J, Ringel MD, Jarzab B, et al.** Polymorphic mature microRNAs from passenger strand of pre-miR-146a contribute to thyroid cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009;106:1502e5.
125. **Liu Z, Xiao B, Tang B, Li B, Li N, Zhu E, et al.** Upregulated microRNA-146a negatively modulate Helicobacter pylori induced inflammatory response in human gastric epithelial cells. *Microbes Infect* 2010;11:854e63.
126. **Taganov KD, Boldin MP, Chang KJ, Baltimore D.** NF-kappaB dependent induction of microRNA miR-146, an inhibitor targeted to signaling proteins of innate immune responses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006;103:12481e6.
127. **Bhaumik D, Scott GK, Schokrpur S, Patil CK, Campisi J, Benz CC.** Expression of microRNA-146 suppresses NF-kappaB activity with reduction of metastatic potential in breast cancer cells. *Oncogene* 2008;27:5643e7.
128. **Spinelli SV, Diaz A, D'Attilio L, Marchesini MM, Bogue C, Bay ML, Bottasso OA.** Altered microRNA expression levels in mononuclear cells of patients with pulmonary and pleural tuberculosis and their relation with components of the immune response in Argentina. *Molecular Immunology* 2013; 53: 265-269.
129. **Liu Y, Wang X, Jiang, J, Cao Z, Yang B, Cheng X.** Modulation of T cell cytokine production by miR-144* with elevated expression in patients with pulmonary tuberculosis. *Molecular Immunology*, 2011; 48: 1084–1090.
130. **Wang C, Yang S, Sun G, Tang X, Lu S, Neyrolles O, et al.** Comparative miRNA expression profiles in individuals with latent and active tuberculosis. *PLoS One* 6, 2011; e25832.
131. **Liu Y, Wang X, Jiang J, Cao Z, Yang B, Cheng X.** Modulation of T cell Production by miR-144* with elevated expression in patients with pulmonary tuberculosis in China. *Molecular Immunology* 2011; 48: 1084-1090.
132. **Harapan H, Fitra F, Ichsan I, Mulyadi M, Miotto P, Hasan N.A, Calado M, Cirillo D.M.** The roles of microRNAs on tuberculosis infection: Meaning or myth? *Tuberculosis*, 2013; 93: 596e605
133. **Schulte LN, Eulalio A, Mollenkopf HJ, Reinhardt R, Vogel J.** Analysis of the host microRNA response to Salmonella uncovers the control of major cytokines by the let-7 family. *EMBO J* 2011; 30:1977e89.
134. **Wallis RS, Pai M, Menzies D, Doherty TM, Walzl G, Perkins MD, Zumla A.** Biomarkers and diagnostics for tuberculosis: progress, needs, and translation into practice. *Lancet* 2010; 375 (9729):1920e37.

ÖZGEÇMİŞ

09.13.1987 tarihinde Adana ili Seyhan ilçesinde doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini Adana’da tamamladı. 2012 yılında Mersin Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümünden mezun oldu. 2013 yılında Çukurova Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı’nda Yüksek Lisans eğitimine başladı.

