ANKARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DOKTORA TEZİ

BEHÇET SENDROMUNDA miRNOM VE TRANSKRİPTOM PROFİLLERİNİN ENTEGRASYONU

SEDA TAŞIR

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

ANKARA
2022

Her hakkı saklıdır

ÖZET

Doktora Tezi

BEHÇET SENDROMUNDA miRNOM VE TRANSKRİPTOM PROFİLLERİNİN ENTEGRASYONU

Seda TAŞIR

Ankara Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Cumhur ÇÖKMÜŞ

Behçet sendromu (BS), Türkiye de dahil olmak üzere "İpek Yolu" boyunca sık görülen kronik, multisistemik ve enflamatuvar bir bozukluktur. Genetik, enfeksiyöz ve enflamatuvar bileşenlerin dahil olduğu bu süreçte BS'nin etiyopatogenezi hakkında hala pek çok şey bilinmemesinin yanısıra bahsigeçen patolojinin bir sendrom mu yoksa hastalık mı olduğuna dair literatürde bir konsensus bulunmamaktadır. Çalışmamızda bu kapsamda BS patolojisinin altında yatan moleküler mekanizmaların ve potansiyel tedavi hedeflerinin belirlenmesi için 46 BS olgusu (B) ve yaş-cinsiyet uyumlu 15 kontrol (K) bireyinde Affymetrix GeneChip miRNA 4.0 mikrodizinleri ile miRNA ifade analizi gerçekleştirilmiştir. BS olguları klinik özelliklerine göre mukokütan (M, n=15), oküler (O, n=15) ve vasküler (V, n=16) olarak gruplandırılmış ve periferik kan örneklerinde farklı ifade edilen miRNA'lar belirlenmiştir. Sınıf karşılaştırması analizleri sonucunda BxK: 44, MBxK: 32, OxK: 12, VxK: 76, MxO: 24, MxV: 30, OxV: 20 farklı ifade edilen miRNA tespit edilmiştir. Venn diyagramı analizi sonucunda MxK∩OxK∩VxK kesişiminde hsa-miR-25-5p ve hsa-miR-183-3p'nin ortak değişim gösteren miRNA'lar olduğu bulunmuştur. Kümeleme analizlerinde, BS'nin farklı klinik fenotiplerinin anlamlı bir şekilde kümelendiği gözlemlenmiştir. BS olgularının farklı hastalık fenotipleri farklı miRNA ifade profilleri sergilemiştir. Farklı klinik fenotiplere sahip BS olguları bir arada incelendiklerinde, önemli bilgi kaybı oluşturduğu gözlenmiştir. Gen ontolojisi terimleri zenginleşme analizleri, BS alt gruplarında, doğal ve adaptif bağışıklık yanıtlarıyla ilişkili biyolojik süreçleri göstermiştir. Türk BS olgularında, hsa-miR-25-5p, hsa-miR-183-3p, hsa-miR-20b-5p, hsa-miR-181a-5p ve hsa-miR-185-3p ile ilişkili ifade farklılıkları, hastalık patogenezinde rol oynuyor olarak görülmüştür. BS durumunda miRNom ve transkriptom verilerinin entegrasyonunun, tek başına ele alınacak miRNom verisinin incelenmesine oranla, özellikle gen ontolojisi analizlerinde daha detaylı ve özgül bilgiler sunmaktadır.

Ocak 2022, 104 sayfa

Anahtar Kelimeler: Behçet Sendromu, ifade analizi, mikrodizin, miRNA, entegrasyon.

ABSTRACT

Ph.D. Thesis

INTEGRATION OF miRNOM AND TRANSCRIPTOME PROFILES IN BEHCET'S SYNDROME

Seda TAŞIR

Ankara University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Biology

Supervisor: Prof. Dr. Cumhur ÇÖKMÜŞ

Behcet's syndrome (BS) is a chronic, multisystemic and inflammatory disorder frequently seen along the "Silk Road" including Turkey. In this disease process, which includes genetic, infectious and inflammatory components, much is still unknown about the etiopathogenesis and there is no consensus in the literature on whether BS is a “syndrome” or a “disease”. In this context, miRNA expression analysis was performed with Affymetrix GeneChip miRNA 4.0 microarrays in 46 BS cases (B) and 15 age & sex matched control (K) subjects to elucidate the molecular mechanisms of BS and identify any possible treatment targets. The BS cases were grouped as mucocutaneous (M, n=15), ocular (O, n=15) and vascular (V, n=16) according to their clinical features, and miRNAs expressed differentially in their peripheral blood samples were determined. As a result of the class comparison analyses, BxK:44, MxK: 32, OxK:12, VxK:76, MxO:24, MxV:30, and OxV:20 differentially expressed miRNAs were detected. The result of the Venn diagram analysis documented that hsa-miR-25-5p and hsa-miR-183-3p were the two miRNAs that showed differential expression in the MxK∩OxK∩VxK intersection. During the clustering analyses, it was observed that different clinical phenotypes of BS clustered successfully. Different disease phenotypes of BS cases exhibit different miRNA expression profiles. When BS cases with different clinical phenotypes are examined together, it is observed that there appears a significant loss of important information. Gene ontology terms enrichment analyses documented biological processes associated with innate and adaptive immune responses in subsets of BS. Expression differences of hsa-miR-25-5p, hsa-miR-183-3p, hsa-miR-20b-5p, hsa-miR-181a-5p, and hsa-miR-185-3p in Turkish BS cases seem to be operative in the molecular pathogenesis of the syndrome. In BS, the integration of the miRNome and the transcriptome data provides more detailed and specific information, especially during gene ontology analyses, compared to examining the miRNome data alone.

January 2022, 104 pages

Key Words: Behcet’s syndrome, expression analysis, microarray, miRNA, integration.

TEŞEKKÜR

"Doktora, kanlı bir süreçtir" (Prof. Dr. Hilal Özdağ Sevgili)

2004 yılında yolumun kesiştiği kendisi ile dirsek dirseğe çalışma fırsatı bulduğum, bana yolunda yürümeyi öğrettiği, çalışma prensibini her daim aşıladığı, her şeyden önce bir abla, yeri geldiğinde gözleri dolu, duygulu, disiplinli ama en önemlisi benim için çok değerli ve özel olan değerli hocam Prof. Dr. Hilal Özdağ Sevgili'ye (A. Ü. Biyoteknoloji Enstitüsü), her zaman yanımda, arkamda olduğunu hissettirdiği, aradan geçen bunca yılda bana öğrettikleri, paylaştıkları, verdikleri ve gösterdikleri için, ablalığı ve anlayışı için, bu tez çalışmasında eş danışmanlığı ve doktora eğitim sürecinde yol göstericiliği, katkıları ve desteği için,

Değerli hocam Prof. Dr. Cumhur Çökmüş'e (KGTÜ Tarım ve Doğa Bilimleri Fak.) , danışmanlığımı üzerine alarak bana bu süreçte verdiği destek ve katkıları için,

Tanıdığım ilk günden beri varlığına hep şükrettiğim, azmine, zekasına, yaşama ve insana bakışına, disiplinine hayran olduğum ve örnek aldığım çok değerli hocam Doç. Dr. Ali Kemal Oğuz'a (Başkent Ü. Tıp Fak.), bana inanıp birlikte yol aldığı için, Behçet Sendromu ile tanışma ve çalışma olanağı sağladığı için, kendi tez çalışmasının yapıldığı yıllarda ve sonrasında abiliğini esirgemediği ve bu tez çalışmasında her türlü zahmete katlandığı ve verdiği destek ve katkılar için,

2 çocuklu bir anne olduktan sonra doktora eğitimine başlamamla birlikte yaşamın zorluklarının kendini göstermesiyle her daim yanımda olan, kızlarımın babası İlker Yılmaz'a, desteğini, zamanını, inancını ve emeğini asla esirgemediği için,

Uzun zamandır aynı meslek grubunda olup, aynı yollarda birlikte yol aldığım, özel yaşamımda da "dost" kavramının tam hakkıyla karşılık bulduğu özel üç insan Doç. Dr. Evrim Güneş Altuntaş, Dr. Nevin Belder ve Dr. Semih Dalkılıç'a, bana bu sürece dahil olmamda örnek bilim insanları oldukları için, her daim dostlukları, paylaşımları, destek ve katkıları için,

2004 yılından beri adeta bir aile yapısı ile çok güzel işler ortaya koyan Biyoteknoloji Enstitüsü'nün tüm değerli çalışanlarına, yıllarca bir arada olup gülerek, eğlenerek, ağlayarak çalıştığım tüm ekip arkadaşlarıma (Dr. Funda Demirsoy, Dr. Özge Cumalıoğulları, Dr. Günseli Deniz, Doç. Dr. Yeşim Doğan, Dr. Hülya Sümer Çelebi, Dr. Reza Dastouri, Dr. Buket Demir, Dr. Aynur Karadağ Gürel ve Dr. Senem Noyan'a) varlıkları ve destekleri için,

Çok zorlu bir süreçten geçen tezimin bitirme aşamasında hayatıma giren çok değerli bilim insanı Doç. Dr. İbrahim Halil Kayral'a (TÜSEB/TÜSKA-Uluslararası programlar), paniklediğim zamanlarda sakinleştirdiği, gece gündüz demeden her sorumu yanıtladığı, tecrübelerini paylaştığı, yanımda olduğunu her daim hissettirdiği, tezime ve bana verdiği tüm destekler ve bana bu süreçte kattıkları için,

Erken yaşta ani bir şekilde ebediyete göç etmiş olan can parçam abime, bana hep güvendiği ve inandığı için, ahlakı, insan sevgisini, dayanışmayı ve paylaşmayı her daim aşıladığı için,

Canım anneme (ki onun desteğini ve inancını kelimelere dökebilmek namümkün...), canım babama ve canım ablalarım Sevgi ve Sema'ya her zaman bana destek oldukları ve inandıkları için,

Ve son olarak, minik ama kocaman yürekleri ile hep yanımda olan, varlıklarına her daim şükrettiğim kızlarım Derin ve Dora'ya, anlayışları, sevgileri, umutları ve inançları için,

Sonsuz teşekkürü bir borç bilirim.

Bu tez çalışması, Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK) tarafından 116S501 proje numarası ile desteklenmiştir.

Seda TAŞIR
Ankara, Ocak 2022

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI

ETİK i

ÖZET ii

ABSTRACT iii

ŞEKİLLER DİZİNİ viii

ÇİZELGELER DİZİNİ x

1. GİRİŞ 1

2. KURAMSAL TEMELLER ve KAYNAK ÖZETLERİ 2

2.1 Behçet Sendromu 2

2.1.1 Behçet Sendromu'nun tanımı ve tarihçesi 2

2.1.2 Behçet Sendromu'nun epidemiyolojisi 3

2.1.3 Behçet Sendromu'nun etiyopatogenezi 3

2.1.4 Behçet Sendromu'nun klinik özellikleri 7

2.1.5 Behçet Sendrom mu? Hastalık mı? 9

2.2 Omik Analizler 10

2.2.1 Mikrodizin yöntemi 11

2.3 MikroRNA (miRNA) 12

2.3.1 MikroRNA biyogenezi ve moleküler etki mekanizması 13

2.3.2 MikroRNA ve Behçet Sendromu 14

2.4 Biyoinformatik Analiz 16

2.4.1 Ön işleme (Preprocessing) 16

2.4.2 Varyans filtreleme ve farklı ifade edilen genlerin belirlenmesi 17

2.4.3 Farklı ifade edilen genlerin kümeleme ve yolak analizleri 18

2.5 Omik Veriler ve Entegrasyon 19

2.6 Gerekçe ve Amaç 20

3. MATERYAL ve YÖNTEM 21

3.1 Materyal 21

3.1.1 Behçet Sendromu ve kontrol grubu bireylerinin demografik özelliklerinin özet tablosu 23

3.1.2 Behçet Sendromu ve kontrol grubunun demografik ve klinik özelliklerinin detaylı tablosu 23

3.2 Yöntem 26

3.2.1 Periferik kandan RNA izolasyonu 26

3.2.2 Periferik kandan RNA izolasyon protokolü 27
3.2.3 Mikrodizin miRNA ifade analizi 29
3.2.4 Biyoinformatik analizler 32
4. ARAŞTIRMA BULGULARI 33
4.1 Bulgular 33
4.2 RNA Miktar ve Saflık Analiz Bulguları 33
4.3 Mikrodizin Çalışmasına Ait Bulgular 37
4.4 Biyoinformatik Analiz Bulguları 40
4.4.1 Normalizasyon sonuçları 40
4.4.2 Karşılaştırmalı miRNA ifade analizleri için kullanılan prob set sayısı 41
4.4.3 Sınıf / grup karşılaştırması analizleri ile elde edilen bulgular 41
4.4.4 Farklı ifadeye sahip miRNA moleküllerine ait olası hedef genler 49
4.4.5 BS klinik alt grupları ile yapılan kümeleme analizlerine ait bulgular 52
4.4.6 miRNom ve transkriptom bulgularının entegrasyonu 55
4.4.7 Gen ontolojisi analizlerine ait bulgular 57
5. TARTIŞMA ve SONUÇ 61
5.1 Sonuç 77
KAYNAKLAR 79
EKLER 88
EK 1 ETİK KURUL DEĞERLENDİRME FORMU 88
EK 2 OLGU RAPOR FORMU 89
EK 3 SINIF KARŞILAŞTIRMALARI miRNA LİSTELERİ 90
ÖZGEÇMİŞ 100

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1 miRNA biyogenezi. 13

Şekil 3.1 Çalışmanın genel iş akış şeması 26

Şekil 3.2 Tez çalışmasında kullanılan biyoinformatik analizlerin akış şeması 32

Şekil 4.1 Çalışmada yer alan 61 RNA örneğine ait %1'lik agaroz jel görüntüleri 34

Şekil 4.2 GeneChip miRNA 4.0 mikrodizininin tarama sonucu elde edilen görüntüsü 37

Şekil 4.3 Hibridizasyon ve taramaları tamamlanan 61 örneğe ait mikrodizinin RMA normalizasyonu sonrası kutu grafiği 40

Şekil 4.4 Sınıf / grup karşılaştırmaları 42

Şekil 4.5 BS alt grupları miRNA kesişim kümesi 47

Şekil 4.6 Tüm gruplar miRNA kesişim kümesi 48

Şekil 4.7 Behçet Sendromu alt grupları arasında gerçekleştirilen kümeleme analizleri 54

Şekil 4.8 miRNom ve Transkriptom bulgularının entegrasyonu amacıyla gerçekleştirilen "Venn" analizi diyagramları 56

Şekil 5.1 miRDIP veri tabanından elde edilen bağışıklık yanıtının düzenlenmesinde önem taşıyan miRNA moleküllerine ait set ile çalışmaya ait farklı ifadeye sahip miRNA molekülleri setine ilişkin "Venn" analizi diyagramı 63

Şekil 5.2 miRWalk veri tabanından elde edilen bağışıklık yanıtının düzenlenmesinde önem taşıyan miRNA moleküllerine ait set ile çalışmaya ait farklı ifadeye sahip miRNA molekülleri setine ilişkin "Venn" analizi diyagramı 64

Şekil 5.3 Literatür taranması sonucu elde edilen bağışıklık yanıtının düzenlenmesinde önem taşıyan miRNA moleküllerine ait set (Imm Imp miRNAs) ile çalışmaya ait farklı ifadeye sahip miRNA molekülleri setine ilişkin "Venn" analizi diyagramı 65

Şekil 5.4 Bağışıklık yanıtının düzenlenmesinde önem taşıyan ortak miRNA moleküllerine ait set ile çalışmaya ait farklı ifadeye sahip miRNA molekülleri setine ilişkin "Venn" analizi diyagramı 66

Şekil 5.5 Erre ve arkadaşlarının çalışmasında gösterilen 13 miRNA molekülü ile çalışmada belirlenen farklı ifadeye sahip miRNA moleküllerine ait “Venn” analizi diyagramı 70

Şekil 5.6 Puccetti ve arkadaşlarının çalışmasında yüksek güven anotasyonuna sahip oldukları için özel olarak seçilen 47 miRNA molekülü ile çalışmada belirlenen farklı ifadeye sahip miRNA moleküllerinin “Venn” analizi diyagramı 71

Şekil 5.7 Çizelge 5.2’de yer alan çalışmalara ait miRNA molekülleri seti (Spec miRNA Stud) ile çalışmaya ait farklı ifadeye sahip miRNA molekülleri setine ilişkin “Venn” analizi diyagramı..... 74

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1 Uluslararası Çalışma Grubu tarafından geliştirilen BS tanı kriterleri 22

Çizelge 3.2 Behçet Sendromu alt gruplarına ait kriterler 22

Çizelge 3.3 BS ve kontrol gruplarına ait özet temel demografik veri tablosu 23

Çizelge 3.4 Behçet Sendromu olguları ile sağlıklı kontrollerin demografik ve klinik bilgileri 24

Çizelge 3.5 Poly (A) kuyruk ekleme karışımı 29

Çizelge 3.6 Hibridizasyon karışımı bileşenleri 31

Çizelge 4.1 Çalışmada yer alan 61 örneğin RNA nanodrop analiz sonuçları 35

Çizelge 4.2 Affymetrix GeneChip® miRNA 4.0 mikrodizin içeriği (Affymetrix miRNA 4.0 and 4.1 bilgi kâğıdı) 38

Çizelge 4.3 Çalışmada yer alan toplam 61 örneğin tarama %P sonuçları 39

Çizelge 4.4 Tez çalışma algoritması 43

Çizelge 4.5 Grup karşılaştırması sonrası elde edilen farklı ifadeye sahip miRNA sayıları 44

Çizelge 4.6 Grupların karşılaştırması sonrasında belirlenmiş ve kat değişimi eşiklerine göre küçükten büyüğe doğru sıralanmış ilk 10 miRNA 45

Çizelge 4.7 Karşılaştırmaların en az 3'ünde ortak olan ve aynı yönde değişim gösteren miRNA'lar 49

Çizelge 4.8 miRNA moleküllerine ait olası hedef gen sayıları 50

Çizelge 4.9 Seçilen ilk 10 miRNA içinde bulunmayan miRNA moleküllerine ait olası hedef gen sayıları 52

Çizelge 4.10 Sınıf karşılaştırmalarında belirlenen miRNA moleküllerine ait olası hedef gen setlerinin incelendiği gen ontolojisi analizi bulguları[1, 2, 3] 58

Çizelge 5.1 Literatürde yer alan ve Behçet Sendromunda genom ölçekli miRNA ifade analizinin gerçekleştirildiği çalışmalarla ilgili temel bilgiler 69

Çizelge 5.2 Literatürde yer alan ve Behçet Sendromu durumunda seçilmiş miRNA moleküllerine ait ifade analizlerinin gerçekleştirildiği çalışmalarla ilgili temel bilgiler 72

Çizelge 5.3 Bu çalışmada önemli miRNA listelerinde bulunan ve CLEC12A'yı hedefleyen miRNA'lar 75

SİMGELER DİZİNİ

A_{260}	260 nm dalga boyunda absorbans değeri
A_{280}	280 nm dalga boyunda absorbans değeri
µg	Mikrogram
mg	Miligram
µl	Mikrolitre
nm	Nanometre
ng	Nanogram
°C	Derece santigrat

Kısaltmalar

RPM	Dakikadaki devir sayısı (“Revolutions per minute”)
AGO	Argonat protein
AGCC	“Affymetrix GeneChip Command Console” yazılımı
B	Tüm Behçet Sendromu olgularını içeren hasta grubu
BS	Behçet Sendromu
CEL	Cell intensity file
CD	Yüzey farklılaşma antijenleri (“Cluster of Differentiation”)
DAT	Data file
DMSO	Dimetil sülfoksit
DNA	Deoksiribonükleik asit
ETS-1	ETS proto-oncogene 1
FC	Kat değişimi (“Fold Change”)
FOXO1	Forkhead box protein O1
GO	Gen ontolojisi (“Gene Ontology”)
HLA	İnsan lökosit antijeni (“Human Leukocyte Antigen”)
HSR	Yüksek hassasiyetli etiketleme reaktifleri (High-sensitivity labeling)
ICBD	Uluslararası Behçet Hastalığı Kriterleri (“International Criteria for Behçet’s Disease”)
IFN	İnterferon (için kısaltma, örneğin, IFN- γ)
IL	İnterlökin (için kısaltma, örneğin, IL-1)
IL-1 R	Interleukin-1 receptor
Imm	
Imp miRNAs	Immunologic important miRNA
ISG	Uluslararası Çalışma Grubu (“International Study Group”)
K	Kontrol grubu
M	Mukokütan tutulum bulguları
MB	Mukokütan Behçet
MHC	Majör doku uygunluk kompleksi (“Major Histocompatibility Complex”)
miRDIP	microRNA Data Integration Portal
miRNA	MikroRNA
mRNA	Haberci RNA (Messenger RNA)
O	Oküler tutulum bulguları

OB	Oküler Behçet
P	Present Call
PCR	Polimeraz zincir reaksiyonu
PKMH	Periferik kan mononükleer hücreler
RMA	“Robust Multi-array Average” normalizasyon algoritması
RNA	Ribonükleik asit
RISC	RNA indüklenmiş susturma kompleksi
SAPE	Streptavidin-fikoeritrin
SNP	Tek nükleotid polimorfizmi (“Single nucleotide polymorphism”)
Spec miRNA Stud	Spesific miRNA studies
SSS	Santral sinir sistemi
TCR	T-hücresi reseptörü
TLR	Toll benzeri reseptör
TNF	Tümör nekroz faktörü
TRAF6	TNF receptor associated factors 6
V	Vasküler tutulum bulguları
VB	Vasküler Behçet
VKHS	Vogt-Koyanagi-Harada Sendromu

1. GİRİŞ

Behçet Sendromu (BS), tekrarlayan göz, genital ve deri lezyonları ile karakterize, nadir görülen, kronik, sistemik ve inflamatuar bir patolojidir. Değerli Türk Dermatoloğu Prof. Dr. Hulusi Behçet (1889-1948) tarafından 1937 yılında bildirilen 3 olgu nedeniyle BS olarak isimlendirilen bu bozukluk, dünya üzerinde özgün sayılabilecek bir coğrafyada oldukça sık görülmektedir. Ülkemizin de içinde bulunduğu bu coğrafya, tarihi ticaret yolu olan "İpek Yolu" coğrafyası ile örtüşmektedir.

Behçet Sendromu, bir Türk hekim tarafından dünya tıp literatürüne kazandırılmış olması ve ülkemizde göreceli olarak sık görülmesi dışında, yol açtığı sakatlıklar ve zaman zaman neden olduğu yaşam kayıpları nedeniyle de önemli bir sağlık sorunudur. Sık görüldüğü ülkelerde görme kaybı nedenlerinin başında yer alan BS'nin, özellikle genç erkek hastalarda artmış bir mortaliteye neden olduğu da bilinmektedir (Yazıcı 1996). Behçet Sendromu, güçlü ve kompleks bir genetik zeminde gelişen bağışıklık sistemi aracılıklı bir patolojidir ve moleküler düzeydeki genetik ve epigenetik özelliklerinin değişken olması nedeniyle heterojen ve karmaşık bir yapıya sahiptir. Bu nedenle BS'nin başlangıç, ilerleme ve yayılmasının altında yatan moleküler mekanizmalarda, karanlıkta kalan pek çok nokta bulunmaktadır. İnflamasyonun çözülmesine/sonlandırılmasına ilişkin bir çalışma bulunmamaktadır.

Kompleks hastalıklarda biyobelirteç ve hastalık alt gruplarının tanımlanmasına yönelik olarak giderek artan oranda genom, transkriptom, epigenom ve proteom ebadında çalışmalar gerçekleştirilmektedir. Yeni bilimsel literatürde bu çalışmalardan elde edilen verilerin doğrulanması, daha güvenilir hedef molekül ve/veya biyobelirteçlerin tanımlanmasında aynı hasta/örnek grubu üzerinden elde edilmiş farklı omik verilerin entegre analizinin etkinliği işaret edilmektedir (Pascale 2002). Böylelikle tek bir omik boyutta yapılan analizlerde gözden kaçabilecek biyobelirteçlerin, çoklu omik yaklaşımların entegrasyonu ile yüksek güvenilirlikle saptanabileceği öngörülmektedir.

2. KURAMSAL TEMELLER ve KAYNAK ÖZETLERİ

2.1 Behçet Sendromu

Behçet Sendromu (BS); oral ve genital ülserler, üveit, deri lezyonlarının yanı sıra daha az sıklıkla ancak çoğu zaman daha şiddetli merkezi sinir sistemi ve damar belirtilerinin olduğu, multiorgan tutulumu ile karakterize sistemik inflamatuvar bir bozukluktur. BS, genetik alt yapısından dolayı heterojendir (Mat 2014, Morton vd. 2016). Patogenetik mekanizmalar halen tam olarak bilinmemekle beraber genetik altyapı ve infeksiyon faktörlerin arasındaki etkileşim, bu hastalığı karakterize eden bağışıklık sistemi düzensizliğine çok belirgin bir katkıda bulunmaktadır.

2.1.1 Behçet Sendromu'nun tanımı ve tarihçesi

İlk kez 1937 yılında Türk dermatoloğu Prof. Dr. Hulusi Behçet tarafından (1889-1948), oral aft, genital ülser ve göz inflamasyonundan oluşan klasik triad olarak tanımlanmış olan BS, etiyolojisi bilinmeyen, sistemik ve immünolojik mekanizmalar tarafından tetiklenmiş vaskülitik bir sendromdur (Behçet 1937). BS'nin patogenetik mekanizmaları halen tam olarak aydınlatılamamıştır. BS; oral ülserler, deri lezyonları tutulumlarının yanı sıra göz, vasküler sistem, gastrointestinal sistem ve merkezi sinir sistemi gibi farklı organ sistemlerinin tutulduğu klinik bir spektruma sahiptir.

BS ile ilgili bilgiler özellikle son 30 yılda ilerlemiştir. BS, araştırmacılar için inflamasyon içeren, bağışıklık sistemi bozuklukları bulunduran ve bilinmeyen etiyolojili bir hastalık modeli oluşturmaktadır. BS ile ilgili ilk kayıt MÖ. 5. yy'da Hipokrat'a aittir. Adams (1849) tarafından Yunancadan çevrilen kitabının "Epidimion" bölümünün 3. kıtasında, vaka 7'de aftöz ülser, genital ülser ve iridosiklit tanımlanmıştır (Adams 1849). MS. 200 civarında, Dr. Zhong Jing Zhang tarafından "Huo Ho Bing" ismiyle, faringeal ülserler, genital ülserler, göz kırmızılığı ve deride cerahat oluşumu özelliklerini taşıyan bir hastalık tanımlanmıştır (Barnes ve Yazıcı 2020) ve 1937 yılından önce (1920-1934 yılları arasında) BS ile oftalmologlar, dahiliyeciler ve dermatologlar ilgilenmiştir.

2.1.2 Behçet Sendromu'nun epidemiyolojisi

BS'nin epidemiyolojik özellikleri oldukça iyi ortaya konmuş olmasına rağmen, sorunun etiyolojisi, patogenezi ve nasıl sınıflandırılacağı halen tam olarak aydınlatılamamıştır. Behçet Sendromu ile ilgili bilimsel çalışmalar özellikle sık görüldüğü ülkelerin bilim insanları tarafından gerçekleştirilmekte ve her şeye rağmen BS, halen nadir görülen hastalık ("orphan disease") grubu içinde yer almaktadır.

BS, tüm dünyada rapor edilmiş olmasına rağmen ayrı bir coğrafi dağılıma sahiptir. Japonya, Kore ve Çin gibi Uzak Doğu ülkeleri ile Türkiye, Yunanistan ve İran gibi Akdeniz ülkeleri ve Orta Doğu ülkelerinin bulunduğu tarihi tarihi ticaret yolu olan "ipek yolu" coğrafyasında yüksek sıklığı dikkat çekmektedir ve bu nedenle "İpek Yolu hastalığı" olarak da isimlendirilmektedir (Verity, Marr, Ohno, Wallace, & Stanford, 1999). Dünyada BS'nin en yüksek prevalansa sahip ülke sıralamasında ilk sırada yer alan Türkiye'de yapılan 5 farklı klinik araştırmaya göre, yetişkin popülasyonda 100.000 kişiden 20-421 kişinin BS'li olduğu rapor edilmiştir (Çölgeçen vd. 2015). Türkiye'de 1998-2010 yılları arasında kliniklere başvuran toplam 1028 üveit hastasının 331'inin Behçet hastası olduğu rapor edilmiştir (Hatemi 2015).

2.1.3 Behçet Sendromu'nun etiyopatogenezi

BS'nin etiyolojisi belirsizdir, ancak diğer birçok inflamatuar ve/veya immün aracılıklı hastalıklarda olduğu gibi, çevresel faktörlerin (Bakteriyal ve viral hipotez, anormal antijen sunumu gibi) genetik yatkınlığı olan kişilerde patolojiyi tetiklediği düşünülmektedir (Pineton de Chambrun vd. 2012). Prof. Dr. Hulusi Behçet, viral etiyolojiyi öne sürmüş olmakla birlikte ilerleyen yıllarda bu görüşün doğru olmadığı gösterilmiştir (Behçet 1937). Kronolojik olarak etiyolojiye ait öne sürülmüş olan teoriler şunlardır; İnfektif, kimyasallara maruziyet, immünolojik bozukluk, otoimmün ve otoinflamatuar. BS patogenezi karmaşıktır ve halen tam olarak aydınlatılamamıştır. Bununla birlikte, Behçet Sendromu gelişiminde genetik faktörlerin rol oynadığını destekleyen önemli bulgular mevcuttur. Özetlemek gerekirse; 1. HLA-B51 birlikteliği, 2. Karakteristik coğrafi dağılım, 3. Ailevi agregasyon, bu genetik yatkınlığa ait önemli

ipuçlarıdır. İlk kez Japon BS olgularında bildirilen HLA-B51 birlikteliği, izleyen yıllarda "İpek Yolu" coğrafyası ülkelerindeki ve daha sonra da BS'nin nadir görüldüğü etnik gruplardaki BS olgularında da gösterilmiştir (Ohno vd. 1982). Behçet Sendromu esas olarak sporadik bir şekilde ortaya çıksa da, olguların akrabaları arasındaki artmış BS frekansı uzun bir süredir bilinmektedir (Fietta 2005). Hastalığın ortaya çıkışında etkili olan diğer önemli bileşenleri, nötrofil lökositlerin anormal aktivasyonu, uzayan mikrobiyal ajan varlığı ve özellikle T lenfosit ağırlıklı spesifik bağışıklık sistemi cevabı oluşturmaktadır. BS'de doku hasarına neden olan bu bileşenler, farklı patogenenik yolaklarda rol oynamaktadırlar (Emmi vd. 2014).

Genetik Faktörler

HLA-B51 etkisi BS sendromu gelişiminde rol oynayan genetik faktörlerin başında gelmektedir. İnsan lökosit antijeni HLA-B51, özellikle Orta Doğu ve Akdeniz bölgesinden Doğu Asya'ya kadar uzanan tarihi İpek Yolu boyunca (İpek Yolu Coğrafyası), birçok popülasyonda BS altında yatan başlıca duyarlılık genetik faktörünü temsil etmektedir (Gül ve Ohno 2012). BS ile HLA-B51 arasındaki güçlü genetik birliktelik ilk kez Ohno tarafından 1973'de bildirilmiştir (Ohno vd. 1973). HLA-B51 alel sıklığının yanı sıra BS prevalansı/sıklığı, ABD ve Avrupalı toplumlarda, İpek Yolu coğrafyasında bulunan toplumlardan daha düşüktür. Tarihi ticaret yolu olan İpek yolu coğrafyası üzerinde BS vakalarında HLA-B51 frekansı %50-80 iken, genel popülasyonda HLA-B51 frekansı %25 olarak bildirilmiştir (Dalvi vd. 2012). HLA-B51 sıklığının coğrafik farklılığı, hastalığın prevalansını etkilemektedir (Emmi vd. 2014). Portekiz ve İtalya gibi bazı etnik toplumlarda, HLA-B51'in sıklığı, İpek Yolu coğrafyasında belirlenen sıklığa benzemektedir. Bu alel ile ilgili bilgiye sahip olunmasına rağmen BS'nin genetik alt yapısı halen tam olarak aydınlatılmamıştır. BS, HLA-B51 eşliğinin bizzat hastalığın kendisi ile değil, hastalık ciddiyeti/şiddeti ile ilgili olduğu düşünülmektedir. HLA-B51 negatif olan BS hastalarının varlığı, bu hastalığın gelişimine diğer genetik faktörlerin katkıda bulunduğunu göstermektedir (Verity vd. 1999). Türkiye'de 1998 yılında 600 sağlıklı kontrol ve 71 BS'li hasta ile yapılan bağlantı dengesizliği (linkage disequilibrium) çalışmasının verilerine göre, HLA-B51 prevalansı, sağlıklı kontrollerde %24 iken, hastalarda %70 olarak rapor edilmiştir (Alpsoy vd. 1998).

Genom boyu ilişkilendirme çalışmaları, binlerce genetik lokusu tanımlayarak karmaşık insan özelliklerinin çalışılmasında devrim yaratmıştır. Son zamanlarda yapılan genom boyu asosiyasyon (GWAS) çalışmaları ile BS için yeni aday lokuslar/ genler tespit edilmiştir. Meguro ve arkadaşları, BS hastalarında ilk GWAS çalışmasını yapmışlar ve özellikle Japon toplumunda BS için majör ikinci bir yatkınlık geni HLA-A26'yı tanımlamışlardır (Meguro vd. 2010). Diğer iki büyük GWAS çalışması ile birlikte BS gelişiminde rol oynayan toplamda 25 genomik lokus tanımlanmıştır (Karasneh vd. 2005, Meguro vd. 2010, Kirino vd. 2013).

İnfeksiyöz Faktörler

Behçet hastalarında belirlenen anormal immün cevabın gelişmesinde, esas tetikleyici faktörün infeksiyon ajanlarının olduğu düşünülmektedir (Direskeneli 2001). Günümüzde BS, genetik olarak duyarlı/yatkın bireylerde, bilinmeyen etiyolojik faktörlerle ortaya çıkan, immünolojik aracılıklı bir durum olarak kabul edilmektedir.

a. Bakteriyel Etiyoloji

BS, Akdeniz ve Orta Doğu ülkelerinden başlayıp Uzak Doğu'ya kadar uzanan antik İpek Yolu boyunca yaygındır (Yurdakul ve Yazıcı 2010). Bu farklı coğrafi özellik, olası genetik faktörlerin yanı sıra bu eski ticaret yolu boyunca yayılmış olabilecek enfeksiyonlar dahil çevresel faktörlerin de olabileceğini düşündürmüştür.

Oral ülserler hemen hemen tüm BS hastalarında görülmektedir. Bu lezyonlar BS'nin ilk belirtisidir ve diğer belirtilerden birkaç yıl önce ortaya çıkmaktadır. Bu nedenle oral mukoza, BS patogenezinde önemli bir rol oynamaktadır (Kaneko vd. 2008).

Oral mukozada belirli streptokok suşlarının artmış oranının gözlemlenmesi bu mikroorganizmaların BS patogenezindeki rolünü araştıran çeşitli çalışmalara yol açmıştır (Yoshikawa vd. 1991).

BS’de püstüler deri lezyonları steril değildir. Püstüler lezyon ve artrit kümesinin, bulaşıcı bir etiyolojiyi içeren akne ile ilişkili artrite benzer bir patogeneze sahip olabileceği öne sürülmüştür. Püstüler lezyonların mikrobiyolojisi üzerine yapılan çalışmada, kültürlenen mikroorganizmaların sıradan akne vulgarisinkinden oldukça farklı olduğu gösterilmiş ve en sık görülen mikroorganizma Staphylococcus aureus’un, akne vulgarisinin % 29'una kıyasla Behçet püstüllerinin % 58'inde büyüdüğü gösterilmiştir. Bir başka ilginç bulgu da Gram negatif anaerobik Prevotella türlerinin, akne vulgaris lezyonlarının hiçbirinde üremediği halde BS püstüllerinin % 24'ünde büyümüş olduğudur. Mikroorganizma türünden çok varlıklarının ve persistanslarının BS patogenezinde daha önemli olduğu öne sürülmüştür (Hatemi vd. 2004).

b. Viral Etiyoloji

Herpes simplex virüsü (HPV) uzun süredir BS patogenezinde rol oynamaktadır. Hulusi Behçet’in, oral ülserlerde hücre içi inklüzyon benzeri formlar gözlemlemesi BS’de viral bir etiyoloji önermesine neden olmuştur (Behçet 1937). Daha sonraki çalışmalar HSV'nin rolü ile ilgili tartışmalı sonuçlar göstermiştir. Yapılan çalışmaların bazılarında HSV, BS hastalarının periferik kan mononükleer hücrelerinde, tam kanlarında ve PCR kullanılarak periferik kan lökositlerinde, tükürükte ve gastrointestinal ve genital ülser biyopsilerinde tespit edilirken (Lee vd. 1996) diğer bazı çalışmalarda ise BS'li hastaların oral ülserlerinde ve oral smearlarında HSV varlığı doğrulanmamıştır (Studd vd. 1991).

İmmünolojik Mekanizmalar

Behçet Sendromu (BS), mukokütan, oküler, vasküler, gastrointestinal, kas-iskelet sistemi ve merkezi sinir sistemi tutulumu dahil olmak üzere çok çeşitli klinik tutulumlar sergileyen sistemik bir inflamatuar bozukluktur (Yazıcı vd. 2018). BS’nin esas patojenik mekanizmasını, proinflamatuar bir duruma yol açan kompleks bir genetik yatkınlık zemininde, çevresel veya otoantijenlere karşı başlangıçta doğal bağışıklık sisteminin ve devamında spesifik bağışıklık sistemi tarafından kuvvetlendirilen bir immün yanıt oluşturmaktadır (Direskeneli H. ve Direskeneli G. S. 2020). BS’de hem doğal hem de spesifik (adaptif) bağışıklık sistemi aktive olmaktadır. BS’de immün yanıtın tetiklenmesi

için iki olası mekanizma öne sürülmüştür. Bunlar; 1. "Danger" teorisine göre; bağışıklık sistemi, antijen sunan hücreleri aktive eden zedelenmiş konak hücrelerinin alarm sinyallerine cevap vermektedir (Matzinger 2002). 2. "Pattern-Recognition" teorisinde ise; doğal bağışıklık sistemi için esas/baskın uyaran/uyarıcı olan mikrobiyal antijenlerdir ve buna karşılık doğal bağışıklık sistemi de bir spesifik (adaptif) bağışıklık yanıtını tetiklemektedir (Medzhitov ve Janeway 2002). Nötrofil fonksiyonu ve aktivasyonu, doğal immün yanıtın başlamasında önemli rol oynamaktadır. Tipik BS lezyonları olan püstüler folikülit, paterji reaksiyonu ve hipopiyon incelemelerinde önemli nötrofil infiltratları, nötrofil fonksiyonu ve aktivasyon durumunun eşlik ettiği küçük damar vaskülitleri görüldüğü için (O'Duffy 1990), doğal immün yanıt, kapsamlı bir şekilde araştırılmıştır.

2.1.4 Behçet Sendromu'nun klinik özellikleri

Prof. Dr. Hulusi Behçet 1937 yılındaki çalışmasında 3 vaka bildirmiş ve bu vakalarda "üçlü semptom kompleksi"ne ilave olarak, eritema nodozum, folikülit, akneiform gibi lezyonlar da tanımlamıştır (Behçet 1937). Böylece BS'nin 4 majör özelliği olan oral ülser, genital ülser, inflamatuar göz hastalığı ve deri lezyonları tanımlanmıştır. O zamandan beri BS'nin esas olarak dolaşımın venöz tarafını tutan ve birçok organ sistemini etkileyen sistemik bir vaskülit olduğu kabul edilmiştir. Günümüzde BS'nin bir vaskülit olarak değil de bir vaskülopati olarak sınıflandırılması daha kabul görmektedir. Çünkü BS, her zaman kan damarlarının harabiyeti/zedelenmesi ile sonuçlanmamaktadır. BS, her boyuttaki arter ve ven tutulumunun görüldüğü (vasküler) ve immünolojik aracılıklı endotelyal fonksiyon bozukluğunun belirlendiği bir kan damarı anormalliğidir (vaskülopati).

<u>Oral Ülser/Aft</u>

Oral ülserler hastaların neredeyse tamamında görülür. BS'nin en sık belirlenen ve en erken yakınma bulgusudur. BS'li vakaların çok az bir kısmı (%2-3) oral ülser geliştirmemektedir. Behçet Hastalığı Uluslararası Çalışma Grubu majör tanı kriterlerine göre, tekrarlayan oral ülserasyona (minör aftöz, majör aftöz herpetiform ülserler, yıl

içinde en az 3 kez tekrarlanmalı) ilave olarak tekrarlayan genital ülserasyon, göz lezyonları (anterior ya da posterior üveit, vitreusda hücre pozitifliği, retinal vaskülit), deri lezyonları (eritema nodozum, psödofollikülit, akneiform nodüller, papülopüstüler lezyonlar) ve paterji testi pozitifliği'nden herhangi ikisinin bulunmasına göre BS tanısı konmaktadır (Criteria for diagnosis of Behçet's disease. International Study Group for Behçet's Disease 1990). Oral lezyonlar ağrılı olabilirler. BS'de tanısal bir tipik Behçet ülseri yoktur.

Genital Ülser

BS genital ülserlerinin histopatolojisi, oral aft histopatolojisine benzemektedir. Genital ülserler ağrılı, majör, minör, herpetiform, skar bırakma özellikleri ile oral ülserlerle ortak özellik gösterir. Erkeklerde daha çok skrotum bölgesinde (% 89) bulunurken peniste sık görülmezler (%5). Kadınlarda ise ülserler yaygın olarak labia majör (% 71) hem de labia minörde bulunurken vajina ve servikste daha az sıklıkta görülmektedir (Mat vd 2020).

Deri Tutulumu

Deri lezyonlarını, daha sık eritema nodozum benzeri lezyonlar olmak üzere, papülopüstüler lezyonlar, psödo-follikülit lezyonlar ya da BS ile uyumlu akneiform nodüller oluşturmaktadır. BS'de eritema nodozum benzeri lezyonlar en sık görülen kutanöz bulgudur. BS vakalarında klasik eritema nodozumun çoğunlukla görüldüğü yerler olan bacaklar dışında da yüz, kol ve boyun bölgesinde de görülebilmektedir (Kim ve LeBoit 2000).

Göz Tutulumu

BS'de en sık görülen oküler yakınma belirtisi panüveittir. BS hastalarının % 50-70'inde göz tutulumu görülmektedir. Oküler BS, kör edici bir bozukluktur. Gözün hem önünü hem de arkasını tutabilir ve tekrarlayan inflamatuar atakların sıklığı ve şiddeti gözün

görme prognozunu etkilemektedir. BS'li hastalarda oküler inflamasyon en yaygın olarak panüveit, retinit ve retinal vaskülittir (Özyazgan ve Tutkun 2020).

Vasküler Tutulum

BS seyrinde büyük damar tutulumu vaskülo-Behçet hastalığı olarak bilinir. En sık görülen venöz tutulum, alt ekstremite derin ven trombozudur. Bunun dışındaki bölgeler daha az etkilenmektedir. Vaskülo-BS spesifik bazı özellikleri ile diğer vaskülit tiplerinden net olarak ayrılmaktadır. Vasküler tutulumda tekrarlayan seyir durumu ve vasküler atakların yaşanması bir kuraldır. Vasküler BS'de görülen trombolitik olaylar vasküler inflamasyonla ilişkilidir. arter hastalığı daha çok anevrizma olarak ortaya çıkar ve büyük damarlarda kendini gösterir. İnflamatuar hastalıklar arasında pulmoner arter anevrizması venöz yapılara benzemesiyle nerdeyse BS'ye özgüdür. BS vakalarının büyük bir oranında görülen mukoza lezyonlarının olmadığı durumlarda da vasküler tutulum görülebilir (Özgüler vd 2020).

2.1.5 Behçet Sendrom mu? Hastalık mı?

"Behçet Hastalığı" isimlendirmesini kabul edenler bu durumu tek bir bozukluk olarak gördükleri ve kabul ettikleri için bu şekildeki ifadeyi kullanmaktadırlar. Spesifik bir hastalık olarak kabul ettikleri bu durumun, günümüzde henüz bilinmeyen bir etiyolojiye bağlı olarak ortaya çıkan ve geniş bir tutulum spektrumuna sahip olduğunu ifade etmektedirler. İlk kez Lehner (Lehner ve Batchelor 1979) tarafından öne sürülen "Behçet bir hastalık mı bir sendrom mu?" sorusu halen cevap bulmamıştır. Lehner spektural tutulum ya da sınıflandırma terimlerini kullanmıştır. Behçet için vaskülopati tanımının yapılmasından önce Lehner farklı immünolojik bulguların farklı sınıflandırma gruplarına ait olduğunu öne sürmüştür. Günümüzde Behçet hastalarının klinik olarak tanıtılmaları sırasında kullanılan Nörobehçet, Okülobehçet, Enterobehçet, Vaskülobehçet isimlendirmelerinin BS'nin alt gruplarını tanımlamadığı, bunun yerine hastayı etkileyen esas klinik problemi vurguladığı öne sürülmektedir.

Behçet etiyopatogenezi ile ilgili bilgi birikimimiz arttıkça, sorunun tek bir hastalık süreci olamayacağına dair kanaat güçlenmektedir. BS farklı tutulumları için farklı antijenik uyarılar, farklı bağışıklık yanıtları ve farklı inflamatuar ortamlar söz konusu olabilir. BS farklı tutulumları/seyirleri farklı genetik özellikler ve/veya farklı organ spesifik antijenik uyarılar zemininde gelişiyor olabilir. Behçet Sendromu ifadesi ilk kez 1979 yılında öne sürülmüştür (Shimizu vd. 1979). Bununla birlikte, bu soru 40 yıl sonra bile halen cevaplanabilmiş değildir. Behçet Sendromu şeklindeki isimlendirme önerisi (Shimizu vd. 1979) evrensel olarak kabul görmese de, etiyopatogenezde rol oynayan genetik ve çevresel faktörlerin aydınlatılmasında fayda sağlayacağı öngörülmektedir. Mevcut durum BS isimlendirmesinin daha doğru olduğunu ve bu bozukluğun, belirli klinik tutulumların bir birlikteliği olduğunu düşündürmektedir. BS'yi tanımlayan tutulumların bir araya gelmesi, hekimler tarafından BS olarak isimlendirilmektedir. Araştırma grubumuz, Portekizde gerçekleştirilmiş, Behçet hastalarını tek bir grup halinde alarak kontrollerle kıyaslayan bir Behçet Sendromu ilişkilendirme çalışmasına ait verileri "veri madenciliği (data mining)" yaklaşımını kullanarak yeniden analiz ederek halen cevap aranan bu soruya, Behçet'in bir sendrom olarak kabul edilmesinin doğru olacağına dair kuvvetli kanıtlara ulaşmış ve bunları bir makalede yayınlamıştır (Oğuz vd. 2016).

2.2 Omik Analizler

"Omik" terimi yüksek işlem hacimli teknolojilerden elde edilen veriler ile ilişkilendirilmiş genetik bir terimdir ve moleküler (gen, protein, metabolit vb.) resmin bütününü temsil eder. Mikrodizinler gibi yüksek işlem hacimli analiz yaklaşımları, görülmemiş bir çözünürlükle genomik, transkriptomik, epigenomik vb. profilleri sorgulama yeteneğine sahiptir (Chari vd. 2008). Bu analiz yaklaşımları özellikle multigenik ve multifaktöryel karaktere sahip kompleks hastalıklara yönelik olarak yeni biyobelirteçlerin keşfine yönelik güçlü ve tekrar edilebilir sonuçlar ortaya koymaktadır. Omik çalışmalarının önemli bir amacı kompleks hastalıklarda düzenlenmesi bozulan gen ve yolakların tanımlanmasıdır ki bu bilgi, hastalığın profilinin çıkarılması ve yönlendirilmesinde önemli ipuçları sağlayabilmektedir. BS ile ilgili omik veri birikimi, sendromun dünyanın değişik bölgelerinde farklılıklar göstermesi nedeni ile yavaş gerçekleşmektedir (Lewis vd. 2007). Karmaşık ve heterojen bir profile sahip olan Behçet

Sendromunda bileşenleri tek başına çalışmak, hastalığın karmaşık resminin çözümünde etkili bir yol olmamaktadır. Omik teknolojilerin gelişimi ile genom, transkriptom, epigenom, metilom ve proteom ebadında yapılan çalışmalar arttıkça, bu büyük hacimli verilerin entegre bir şekilde analiz edimelerinin, daha güvenilir biyobelirteç tanımlanmasına ve hastalık alt gruplarının daha iyi karakterizasyonuna fırsat verebileceği üzerinde vurgulamalar yapılmaktadır (Pascale 2002). Bu şekilde tek bir omik boyutta yapılan analizlerde gözden kaçabilecek biyobelirteçlerin, çoklu omik yaklaşımların entegrasyonu ile yüksek güvenilirlikle saptanabileceği ve tanı, tedavi ve hastalık takibinde kullanılabilecek spesifik moleküllerin ortaya konulabileceği öngörülmektedir (Mosca ve Milanesi 2013). miRNA ve mRNA verilerinin entegrasyonu, kompleks hastalıklarda miRNA disregülasyonuna ait karakteristik/spesifik profillerin tanımlanmasına ve olası moleküler hastalık alt tiplerine ait miRNA/mRNA hedef ikililerinin gösterilmesine izin vermektedir (Lionetti vd. 2009). miRNA/mRNA verilerinin entegrasyonu, veri tabanı üzerinden yapılacak bir analizden farklı olarak transkriptom düzeyinde ifade düzeyi artan ya da azalan olası hedeflerin, güvenilir bir şekilde ortaya çıkmasına izin verecektir.

2.2.1 Mikrodizin Yöntemi

Mikrodizin teknolojisi, katı bir yüzey (cam, naylon membran, silikon) üzerine sabitlenmiş ve prob olarak adlandırılan oligonükleotitlerin hibridizasyonu tekniğine dayanan bir teknolojidir (Gershon 2002). Bu yüksek işlem hacimli teknoloji sayesinde tüm biyolojik prosesleri kapsayan omik yaklaşımları çalışma ve uygulama potansiyeli yaratılmıştır. Mikrodizin teknolojisinin kökeni, 1975 yılında Edwin Southern tarafından bulunan ve DNA'nın naylon bir membran üzerine aktarımı ve işaretli bir probla hibridizasyonu tekniğine dayanmaktadır (Southern 1975). Son yıllarda omik kapsamda yapılan mikrodizin çalışmaları, hastalıklara artmış rezolüsyonla birlikte global bakabilmemiz açısından önemli fırsatlar sunmaktadır. Aynı zamanda omik teknolojilerin gücü ile kompleks hastalıkların başlangıç, ilerlemesi ve gelişmesiyle ilgili genetik ve epigenetik değişikliklerin ve gen ifade değişimlerinin tanımlanması mümkün hale gelmiş olup genom, transkriptom, epigenom ve proteom seviyesinde pek çok anahtar yolak ve işlev tanımlanmıştır.

2.3 MikroRNA (miRNA)

Epigenetik değişiklikler, orijinal DNA dizisinde değişiklik olmaksızın, gen ifadesi ve hücre fonksiyonunda stabil ve kalıtımsal değişiklikler olarak tanımlanan, hücresel bir fenotipteki tersinebilir ve kalıtılabilir değişikler olarak tanımlanmaktadır. Epigenetik başlığı altında miRNA'lar ile birlikte DNA metilasyonu, histon modifikasyonları, nükleozom yeniden düzenlenmesi yer almaktadır (Dawson ve Kouzarides 2012). Epigenetik düzensizlikler immün aracılıklı hastalıklarda önemli rol oynamaktadırlar.

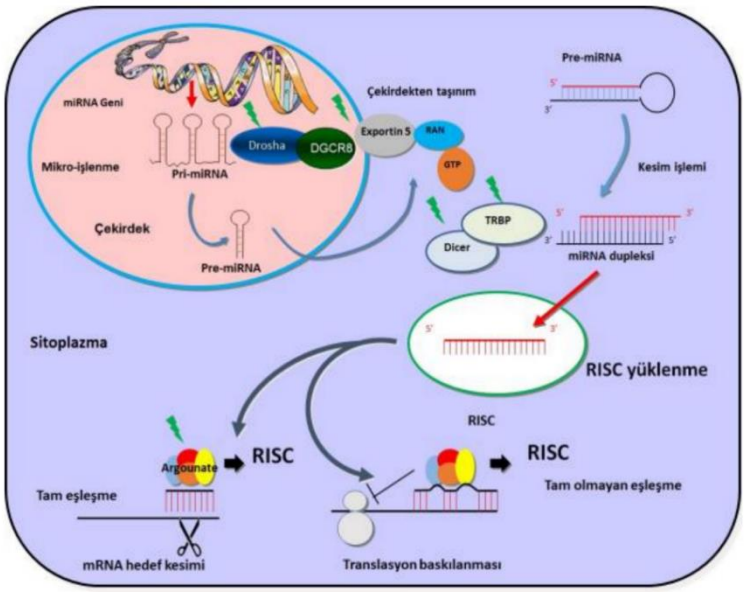
MikroRNA (miRNA)'lar, yaklaşık 20 nükleotid uzunluğunda, tek zincirli, DNA bölgelerinden kodlanan fakat proteine dönüşmeyen gen ifadesinin düzenleyicisi olan küçük RNA moleküleridir. Bu protein kodlamayan RNA molekülleri gen ifadesini 2 şekilde durdurabilirler. Tamamlayıcı diziyi içeren hedef mRNA'lara düşük özgüllükle bağlanıp translasyonu inhibe edebilirler ya da hedef mRNA'lara tam bir komplementerite ile bağlanıp mRNA'yı parçalayabilirler (Bartel 2004). miRNA'lar bu özellikleri ile hücre proliferasyonu, hücre farklılaşması, hücre ölümü, immün yanıt ve inflamasyon gibi homeostatik süreçlerde önemli roller oynamaktadır (Peacock vd. 2012).

miRNA-mRNA etkileşimlerinin sınırlı özgüllük ile ortaya çıkması nedeniyle, aynı mRNA, farklı hücre tiplerindeki farklı miRNA'lar tarafından hedeflenebilir ya da aynı miRNA farklı hedeflere sahip olabilir (Calin ve Croce 2006). İnsan gen havuzunun yaklaşık %30'u çeşitli miRNA'lar tarafından kontrol edilmektedir (Lewi vd. 2005). Bugüne kadar insan genomunda tanımlanan miRNA gen sayısı 2588'dir (http://www.mirbase.org/).

MikroRNAlar, çeşitli immün hücre alt gruplarının fonksiyon ve farklılaşmasının kontrolü de dahil olmak üzere, hem doğal hem de kazanılmış bağışıklık yanıtının moleküler yolaklarında temel düzenleyiciler olarak ortaya çıkmaktadırlar. Çeşitli otoimmün ve inflamatuar durumların patogenezinde, spesifik miRNA'ların rol oynadığını gösteren çalışmalar mevuttur (Ceribelli vd. 2011, Taganov vd. 2006, Zhou vd. 2007).

2.3.1 MikroRNA biyogenezi ve moleküler etki mekanizması

MikroRNA'ların biyogenezi çekirdekte başlar. Çekirdekte miRNA genlerinin RNA polimeraz II ile transkripsiyonu sonrası ilk olarak "primer miRNA" (pri-miRNA) oluşur. Pri-miRNA saç tokası (hairpin) yapısını, poli A kuyruğunu ve olgun miRNA dizisini içerir. RNA polimeraz III enzimi olan "Drosha" ve kofaktörü olarak görev yapan bir protein "Pasha" (DGCR8_DiGeorge Kromozomal Sendrom Bölgesi)'nın oluşturduğu kompleks "mikroişlemci" olarak isim alır. Mikroişlemci tarafından pri-miRNA kuyruk kısmından kesilir ve "prekürsör (pre-miRNA) miRNA"ya dönüştürülür. Pre-miRNA, çekirdekten taşıma reseptörü olarak adlandırılan "Exportin-5" (XPO5) ile sitoplazmaya taşınır. Pre-miRNA çekirdekte, RNA polimeraz III enzimi olan "Dicer" tarafından kesilerek 18-24 nükleotid uzunluğundaki çift zincir olan miRNA-miRNA dubleksine dönüştürülür. Dicer, "RNA indüklenmiş susturma kompleksi"nin (RNA-induced silencing complex; RISC) aktivasyonunu kolaylaştırmaktadır. RISC kompleksinin katalitik bölgesini bir RNaz olan "Argonaute (AGO) proteini" oluşturur. miRNA olgun dizisini oluşturacak olan iplik RISC'i oluşturan bu aktif parçaya yüklenir (Şekil 2.1). Yüklenen miRNA, RISC'i uyararak mRNA yıkımına ya da translasyonel baskılamaya neden olur (Bartel 2004, Gregory vd. 2005).



Şekil 2. 1 miRNA biyogenezi (Hitit vd. 2015)

2.3.2 MikroRNA ve Behçet Sendromu

BS tekrarlayan üveit, ağızda aft, genital ülser ve cilt lezyonları ile karakterize kronik ve multisistemik inflamatuar bir bozukluktur. Birçok farklı inflamatuvar yolakları içeren Behçet Sendromunda, günümüzde tanımlanmış 2588 miRNA molekülü (miRBASE veri tabanı) içinden seçilmiş sadece birkaç tanesi potansiyel etkileri açısından çalışılmıştır. Literatürdeki mevcut çalışmalar; daha önce farklı inflamatuar hastalıklarda ifade değişiklikleri gösterilmiş miRNA moleküllerinin, Behçet hastalarında eş zamanlı PCR metodu ile ifade seviye farklılıklarının araştırıldığı ya da tespit edilen polimorfizmlerin BS ile ilişkisi veya yatkınlığa etkisinin sorgulandığı çalışmalardır (Jadideslam vd. 2019).

miRNA'lar bağışıklık, hücre farklılaşması, gelişimi, hayatta kalma ve fonksiyonlarının yanı sıra hematopoez, inflamasyon ve onkogenezde de önemli rol oynamaktadırlar (Bartel 2004, Pauley vd 2009). miRNA'ların düzensiz ifadesi ve BS arasındaki ilişkiyi gösteren sınırlı sayıda çalışma mevcuttur (Zhou vd. 2012, Zhou vd 2014). İlave olarak miRNA'lar birçok hastalığın tanısı, prognozu, aktivitesi ve şiddeti ile ilgili önemli bilgiler veren potansiyel biyobelirteçlerdir (Lu vd. 2005, Volinia vd. 2006). Bu yönleriyle de Behçet Sendromunda değerlendirmeye açıktırlar.

Behçet Sendromunun gelişiminin yukarıda da değinildiği gibi bağışıklık yanıtı, nötrofillerin anormal fonksiyonları, inflamasyon gibi süreçlerle yakından ilgili olması, sendromun gelişiminde miRNA ifadesinin etkili olabileceğini güçlü bir şekilde desteklemektedir (Choi vd. 2015). miRNA'ların, fonksiyonel olarak ilişkili proteinleri veya önemli bir protein hedefini hedefleyerek in vivo fizyolojik veya patolojik süreçlerde rol aldığı düşünülmektedir. Yapılan çalışmalar miRNA'ların, çeşitli immün hücre alt tiplerinin fonksiyon ve farklılaşmasının da kontrolü dahil olmak üzere, hem doğal hem de kazanılmış bağışıklıkta ve de inflamatuar yanıtta önemli rol oynadıklarını göstermiştir (Lu vd. 2009, Taganov vd. 2006). Doğal immün yanıtta miRNA'ların rolü, daha önce TRAF6 ve IL-1 R ile ilişkili kinazları hedefleyerek, Toll benzeri reseptör sinyal (TLR) yolağında negatif düzenleyici olarak miR-146a'yı tanımlayan bir çalışmayla teyid edilmiştir (Taganov vd. 2006). miR155 inflamasyonla bağlantılı bulunan ilk miRNA'lardan biridir. Susturulmuş miR-155'in, deneysel otoimmün hastalık sırasında

inflamatuar yanıtı iyileştirdiği gösterilmiştir (Murugaiyan vd. 2011). Ayrıca, romatoid artrit (RA), sistemik lupus eritematozus gibi insan otoimmun bozukluklarında miR-155'in anormal ekspresyonu bildirilmiştir (Wang vd. 2010, Kurowska-Stolarska vd. 2011). Zhou ve arkadaşlarının, miRBase ve ilgili raporlara dayanarak immünolojik ilişkisi olduğu bilinen beş tane miRNA'yı (miR-155, miR- 146a, miR-326, miR-181a, miR-17) aday olarak seçmiş oldukları çalışmada; üveitli Behçet hastalarında (BS), üveitli Vogt-Koyanagi-Harada (VKH) hastalarında ve kontrollerde bu miRNA'ların ifadelerini araştırmışlardır. Sonuçlar yalnızca miR-155'in üveitli Behçet hastalarının dendritik ve periferal kan hücrelerinde önemli ölçüde azalmış ifadesini göstermiş buna karşın üveitli VKH hastalarında ise değişmediğini göstermiştir. Bu sonuç, farklı mekanizmaların rol oynadığı BS'nin VKH hastalığı ile karşılaştırıldığında, sadece üveitli BS'ye özgü bir durum olabileceğini düşündürmektedir (Zhou vd. 2012). Yu ve arkadaşlarının yapmış oldukları PCR-RFLP çalışmasında, Çin popülasyonundaki Behçet Sendromu (BS) ve Vogt-Koyanagi-Harada sendromu (VKHS) ile miR-182, miR-27a, FoxO1 ve IL2RA gen polimorfizmleri arasındaki ilişkiyi araştırmışlar ve miR-182'nin BS ve VKHS'nin genetik yatkınlığına katkıda bulunduğunu göstermişler; ancak BS veya VKHS ile miR-27a, FoxO1 ve IL2RA arasında anlamlı bir ilişki gözlenmemiştir (Yu vd. 2014). Qi ve arkadaşlarının yapmış oldukları çalışmada pre -miRNA SNP'lerinin Behçet Sendromu (BS) ve (VKH) sendromu ile yatkınlığının araştırılması amaçlanmıştır. miR-196a2'nin fonksiyonel bir varyantı, miR-196a2'nin gen ekspresyonunu düzenleyerek BS için bir risk faktörü iken VKHS için olmadığını rapor etmişlerdir (Qi vd. 2013). miR-146a'nın bazı immün aracılıklı hastalıklarda rol oynadığı bilinmektedir. Zhou ve arkadaşlarının Çin popülasyonunda Behçet Sendromu (BS) ve Vogt-Koyanagi-Harada (VKH) sendromu ile miR-146a ve Ets-1 gen polimorfizmi arasındaki ilişkiyi araştırmak amacıyla yapmış oldukları çalışmalarında; Çin popülasyonunda BS ile miR-146a'da bulunan rs2910164 nolu SNP ile güçlü bir ilişki tespit edilmiş ve CC genotipi taşıyan bireylerde miR-146a ve bazı proinflamatuar sitokinlerin ekspresyonunu azalmış olduğunu göstermişlerdir (Zhou vd. 2014). Erre ve arkadaşlarının 5 BS ve 3 kontrol örneğini kıyaslayarak yapmış oldukları miRNA ifade profili çalışmasının sonucunda, BS ve kontroller arasında düzensiz ifade edilen 13 miRNA arasından miR-720 ve miR-139-3p 'yi, 42 BS ve 8 kontrolden oluşan bir kohortta eş zamalı PCR ile valide etmişlerdir (Erre vd. 2015).Sonuç olarak, yapılan çalışmalar miRNA-BS ilişkisini tek boyutta

sorgulayan çalışmalar olup; mİRNA'ların etkisinin global boyutta değerlendirildiği ve yüksek işlem hacimli teknolojilerin kullanıldığı geniş kapsamlı çalışmalar bulunmamaktadır. Bu noktada gerçekte BS'nin patogenezine ait genel profilin çözümlenmesinde ve gerek teşhis gerekse tedavi hedefli yeni moleküllerin tespitine yönelik ihtiyacın giderilmesinde yeni ve daha geniş kapsamlı omik çalışmalara ihtiyaç bulunmaktadır.

2.4 Biyoinformatik Analiz

Biyoinformatik, yüksek işlem hacimli teknolojilerin kullanıldığı moleküler biyoloji çalışmalarından elde edilen karmaşık ve büyük ölçekli ham veri kümelerinin içinden, gerçek biyolojik veriye ulaşmak için kullanılan adeta bir süzgeç modelini andıran, analitik ve bilişimsel metodların uygulamalarıdır.

Yapılan çalışmalar sonucu veri üretimi üssel bir şekilde artarken, yeni diagnostik ve terapötik stratejiler geliştirmek, genomik ve transkriptomik düzensizliklerin sonuçlarını tahmin etmek ve güvenilir biyobelirteç belirlemek için bu verileri kullanışlı biyoinformatik modeller ile yorumlamak, hedefe ulaşmada çok önemli bir basamaktır.

2.4.1 Ön işleme (Preprocessing)

Mikrodizin deneylerinin son basamağı olan çiplerin taranması ile çip üzerindeki spot denilen alanlarda hibridize olan hedeflerin miktar bilgisi elde edilir ki bu ilk ham veridir ve .DAT uzantılı bir dosyaya kaydedilir. DAT uzantılı dosyadaki ışıma verisinin sayısal veriye dönüşmüş hali ise .CEL uzantılı dosyaya kaydedilir. Mikrodizin teknolojisi hibridizasyon temelli olduğundan çipler arasında varyasyonlar olabilir. Alınan sinyaller sadece gerçek veriye ait olmayabilir. İşaretli örneklerin spesifik olarak bağlanmaması, çiplerin hibridizasyon sonrası yıkama aşamasından kaynaklanan artıklar ve çiplerin taranma aşamasında, tarayıcının optik özelliklerinden dolayı gürültü oluşması gibi nedenlerden dolayı bir arka plan gürültüsü oluşabilir. Doğru ve güvenilir veri sağlanabilmesi için bu arka plan gürültüsünün giderilmesi/düzeltilmesi gerekmektedir.

Bu hataların giderilmesi arka plan çıkarımı (Backround correction), normalizasyon (Normalization) ve özetleme (Summarization) işlemlerini kapsamaktadır. Backround correction ile arka plan gürültüsü elimine edilir. Bu işlem sonucunda sadece probların bağlanması sonucu elde edilen sinyal ortaya çıkmaktadır (Russel vd 2009). Preprocessing ile arka plan gürültüsü giderilmesinden sonra bazı yazılımlar kullanılarak Probe Correction işlemi yapılır. Bu algoritmaların en sık kullanılanları MAS5, RMA, GCRMA (Robust multiarray algorithm), MBEI (dCHIP)'dir (Giorgi 2010). Mikrodizin deneylerinde çipler arasında teknik sebeplerden ve deneysel prosedürlerden dolayı gen ifade değerleri aynı koşullarda elde edilememiş olabilir bu nedenle çipler arasındaki bu farklılıkları ortadan kaldırmak ve çipleri birbirleri ile kıyaslanabilecek düzeye getirebilmek amacıyla normalizasyon işlemi yapılır. Bu tez çalışmasında Affymetrix Platformu kullanılmış ve mikrodizin miRNA ifade verisi RMA (Robust Multiarray Average) (Irizarry vd. 2003) metodu kullanılarak Affymetrix® Expression Console (v1.4.0) programında normalize edilmiştir. Son olarak Probe Summarization işlemi yapılır. Bu işlemde, bir geni temsil eden bütün problardan gelen sinyallerin ortalaması alınarak ortalama bir ekspresyon değeri elde edilir. Buna özetleme denmektedir. Ön işleme bittikten sonra normalizasyonun başarılı yapılıp yapılmadığını kontrol etmek için çiplerin kutu grafiği kontrol edilir.

2.4.2 Varyans filtreleme ve farklı ifade edilen genlerin belirlenmesi

Ön işleme analizleri yapıldıktan varyans filtreleme işlemine geçilir. Bu işlemde karşılaştırılacak gruplar arasındaki farklı ifade edilen genleri belirlemek amacıyla varyansı küçük olan problar çıkarılır. İşlem sırasında her probun çipler arasında farklı ifade düzeyi (varyansı) hesaplanır. Çipler arasında anlamlı bir farklılığa sahip olmayan problar (küçük varyans) çıkarılır. Bu işlemde anlamlı derecede varyans göstermeyen ve tüm probların da %30-40 kadarını oluşturan probların elenmesi uygundur (Hackstadt ve Hess 2009). Varyans filtrelemeden sonra belirlenen gruplar birbirleri ile karşılaştırılır. Mikrodizin çalışmalarında karşılaştırma yaparken istatistiksel olarak anlamlı ve belirli bir kat değişim eşiği esas alınarak artan ve azalan ifadeye sahip genler belirlenerek bir gen listesi oluşturulmaktadır.

2.4.3 Farklı ifade edilen genlerin kümeleme ve yolak analizleri

Biyoinformatik analizler sonucunda elde edilen hedef gen listelerinde, moleküler hikayeye ışık tutacak biyolojik bilginin çıkarılması için bu genlere ait biyolojik işlev, moleküler fonksiyon ve bulundukları yolak bilgilerinin elde edilmesi gerekmektedir. Bu analizler için "DAVID (The Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery)" (Dennis vd. 2003), "Webgestalt (The WEB-based GEne SeT AnaLysis Toolkit)" gibi veri tabanları kullanılmaktadır. Bu biyoinformatik araçlardan Webgestalt, entegre edilmiş bir veri tabanı olmakla birlikte büyük ve geniş gen veya protein listelerindeki bilgiyi görselleştirerek ve organize ederek biyolojik anlamın çıkarıldığı sistematik bir analitik araçtır (Zhang vd. 2005). Webgestalt yazılımında analizler kapsamında gen listesinde zenginleşmiş anotasyon terimleri elde edilebilir ve bu gen listesinde fonksiyonel olarak benzer terimlerin kümelenmesi üzerinden değerlendirmeler yapılabilmektedir. Bir başka deyişle listedeki genler nelerdir, listedeki major gen aileleri nelerdir, gen listesinde hangi annotasyon terimleri ve grupları zenginleşmiştir, listedeki genler için hangi yolaklar ön plandadır ve tek tek genler hangi yolaklarda yer almaktadır, listedeki genler hangi hastalıklarla ilişkilendirilmiştir gibi sorular eşliğinde anlamlı genler tespit edilebilmektedir (Zhang vd. 2005). Büyük ölçekli genetik çalışmalar için tasarlanmış olan Webgestalt, benzer veri madenciliği yapan araçlarla kıyaslandığında gen listelerini organize etmede daha fazla yol kullanması, bu listerdeki genler hakkında daha fazla bilgi alabilme yeteneği, bilgi görselleştirme ve gen kümelerinin birleşimi, kesişimi ve farklılıklarını sağlamada Boolean aritmetiğini kullanması gibi avantajlara sahiptir (Zhang vd. 2005).

Kümele analizi, mikrodizin deneylerinde benzer ifade profiline sahip genlerin gruplandırılması analizidir. Hiyerarşik kümeleme analizi ifade analizi çalışmalarında elde edilen veri setleri içinde kendi içlerinde birbirine benzer, homojen ve kendi aralarında heterojen gruplar oluşturmaya imkan veren bir analiz yöntemidir (Eisen vd.1998). Büyük ve karmaşık verinin içinden benzerlikleri ortaya çıkarması nedeniyle, bulgular kümeleme analizi tekniğinin ihtiyaca yönelik cevapları ortaya çıkarmakta etkili olduğunu göstermektedir. (Yılmaz vd. 2011).

2.5 Omik Veriler ve Entegrasyon

"Omik" terimi yüksek işlem hacimli teknolojilerden elde edilen veriler ile ilişkilendirilmiş genetik bir terimdir ve genetik resmin bütününü temsil eder. Mikrodizinler gibi yüksek işlem hacimli yaklaşımlar, görülmemiş bir çözünürlükle genomik, transkriptomik, epigenomik vb. profilleri sorgulama yeteneğine sahiptir. (Chari vd. 2008). Bu analiz yaklaşımları özellikle multigenik ve multifaktöryel karaktere sahip kompleks hastalıklara yönelik olarak yeni biyobelirteçlerin keşfine yönelik güçlü ve tekrar edilebilir sonuçlar ortaya koymaktadır. Omik çalışmalarının önemli bir amacı kompleks hastalıklarda düzenlenmesi bozulan gen ve yolakların tanımlanmasıdır ki bu bilgi, hastalığın profilinin çıkarılması ve yönlendirilmesinde önemli ipuçları sağlayabilmektedir. BS ile ilgili omik veri birikimi, sendromun dünyanın değişik bölgelerinde farklılıklar göstermesi nedeni ile yavaş gerçekleşmektedir (Lewis vd. 2007).

Karmaşık ve heterojen bir profile sahip olan Behçet Sendromunda bileşenleri tek başına çalışmak, hastalığın karmaşık resminin çözümünde etkili bir yol olmamaktadır. Omik teknolojilerin gelişimi ile genom, transkriptom, epigenom, metilom ve proteom ebadında yapılan çalışmalar arttıkça, bu büyük hacimli verilerin entegre bir şekilde analiz edimelerinin, daha güvenilir biyobelirteç tanımlanmasına ve hastalık alt gruplarının daha iyi karakterizasyonuna fırsat verebileceği üzerinde vurgulamalar yapılmaktadır. (Pascale vd. 2002). Bu şekilde tek bir omik boyutta yapılan analizlerde gözden kaçabilecek biyobelirteçlerin, çoklu omik yaklaşımların entegrasyonu ile yüksek güvenilirlikle saptanabileceği ve tanı, tedavi ve hastalık takibinde kullanılabilecek spesifik moleküllerin ortaya konabileceği öngörülmektedir. (Mosca ve Milanesi 2013). miRNA ve mRNA verilerinin entegrasyonu, kompleks hastalıklarda miRNA disregülasyonuna ait karakteristik/spesifik profillerin tanımlanmasına ve olası moleküler hastalık alt tiplerine ait miRNA/mRNA hedef ikililerinin gösterilmesine izin vermektedir (Lionetti vd. 2009). miRNA/mRNA verilerinin entegrasyonu, veri tabanı üzerinden yapılacak bir analizden farklı olarak transkriptom düzeyinde ifade düzeyi artan ya da azalan olası hedeflerin, güvenilir bir şekilde ortaya çıkmasına izin verecektir.

2.6 Gerekçe ve Amaç

Ülkemizde önemli bir sağlık sorunu olan Behçet Sendromu, yüksek görülme sıklığı ile birlikte önemli ölçüde mortalite nedenidir (Kural-Seyahi vd. 2003). BS'nin bir hastalık mı yoksa sendrom mu olduğu, olası etiyopatogenezi, moleküler mekanizmalarının altında yatan nedenler ve sınıflandırması halen cevap bulmamış sorulardır. BS'nin tek bir klinik tablo yerine birden fazla hastalık yolaklarıyla gelişmesi, (Bettiol vd. 2020, Oğuz vd. 2016) BS'yi belirlemek üzere bir biyolojik belirtecin ya da BS'ye özgül bir bulgunun olmaması, farklı coğrafyalarda farklı klinik seyir göstermesi (Leonardo ve McNeil 2015), BS olgularının klinik özelliklerine göre farklı öbeklerde toplanabiliyor olması ve BS fenotiplerinin imünogenetik heterojenitesi (Puccetti vd. 2018) gibi nedenler bu sorulara yanıt bulmayı zorlaştırmaktadır. Behçet sendromu'na ait hastalık mekanizmalarının moleküler düzeyde aydınlatılması, hem BS için henüz kesin olarak cevaplanmamış olan "Behçet bir hastalık mı bir sendrom mu?" sorusuna, analiz sonuçları içinden muhtemel yanıtların aranmasına, hem de BS için potansiyel etkin tedavi alternatiflerinin tanımlanmasına imkan sağlayacaktır.

Bu tez çalışmasında "Behçet sendromu, farklı klinik alt gruplarında farklı immün yolaklar üzerinden gelişir" hipotezi ile BS'nin ve farklı klinik alt gruplarının ortaya çıkışı ve gelişiminde miRNA'ların olası rollerinin gösterilmesi amaçlanmıştır. Bu amaç doğrultusunda; [1] daha önce Türk BS olgularında mRNA transkriptom profili çıkarılmış olan BS klinik alt gruplarında (deri tutulumlu-mukokütan, göz tutulumlu-oküler, damar tutulumlu-vasküler) miRNA profilinin çıkarılması, [2] global miRNA ve mRNA veri entegrasyonu ile bu grupların moleküler düzeyde daha güvenilir karakterizasyonu, [3] entegresyon sonrası gen listelerinin gen ontolojisi zenginleşme analizlerinin gösterilmesi ve [4] elde edilen miRNA listelerinin literatürdeki mevcut verilerle mukayese edilmesi hedeflenmiştir.

Bu entegre çalışma, nihayetinde bir yandan bu hastalığın moleküler patolojisini ortaya koyacakken diğer yandan hastalığın teşhis, tedavi ve prognozunun belirlenmesinde etkin bir araç olan yeni aday biyobelirteçlerin tanımlanmasını mümkün kılacaktır.

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1 Materyal

Tez çalışmasına, Uluslararası Çalışma Grubu (ISG) tarafından önerilen tanı kriterlerine uygun olarak Behçet sendromu tanısı alan olgular dahil edilmiştir (Criteria for diagnosis of Behçet's disease. International Study Group for Behçet's Disease 1990). Bu kapsamda, Ufuk Üniversitesi Tıp Fakültesi Deri ve Zührevi Hastalıklar Anabilim Dalı, Ankara Numune Eğitim ve Araştırma Hastanesi ve Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Romatoloji Bilim Dalı ve polikliniklerine, kontrolleri için başvurmuş 46 (26 erkek-20 kadın) hasta çalışmada değerlendirilmiştir. Her bir hastadan imzalı bilgilendirilmiş gönüllü olur formu alınmıştır. ISG'nin önerdiği ilgili tanı kriterleri Çizelge 3.1'de paylaşılmıştır. Tez çalışmasında kullanılan 15 sağlıklı kontrol grubu ise (10 erkek-5 kadın), Ufuk Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesine düzenli sağlık kontrolü ("check up") için başvuran, sağlık problemi olmayan, kendisi ve ailesinde Behçet sendromu öyküsü bulunmayan, hasta grubu ile yaş ve cinsiyet açısından uyum gösteren bireyler ile oluşturulmuştur. Bilgilendirilmiş gönüllü olur formları her bir sağlıklı kontrol grubu bireylerinden de temin edilmiştir.

Çalışma 26.02.2016 tarihinde 6022016-3 karar numarası ile "Ufuk Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulu" tarafından onaylanmıştır. Etik kurul belgesi EK 1'de sunulmuştur.

Çizelge 3. 1 Uluslararası Çalışma Grubu (ISG) tarafından geliştirilen BS tanı kriterleri

Tekrarlayıcı oral ülserler	Hekim ya da hasta tarafından tespit edilen ve 1 yıllık süre içinde en az 3 kez tekrar eden minör aftöz, majör aftöz ya da herpetiform ülserler
İlave olarak aşağıdakilerden 2 tanesi:	
Tekrarlayıcı genital ülserler	Hekim ya da hasta tarafından tespit edilen ✓ aftöz ülserasyon ya da ✓ skar varlığı
Göz lezyonları	✓ Anterior üveit, ✓ posterior üveit ya da ✓ biomikroskop ile incelemede vitreus içinde hücre varlığı; ya da ✓ oftalmolog tarafından tespit edilen retinal vaskülit
Deri lezyonları	Hekim ya da hasta tarafından tespit edilen; ✓ eritema nodozum, ✓ psödofollikülit ya da ✓ papülopüstüler lezyonlar; ya da ✓ kortikosteroid tedavisi almayan adölesans sonrası hastalarda hekim tarafından tespit edilen akneiform nodüller
Pozitif paterji testi	24.-48. saatlerde hekim tarafından okunan

(Criteria for diagnosis of Behçet's disease. International Study Group for Behçet's Disease 1990).

Çalışma kapsamında; Çizelge 3.2'de gösterilen kriterlere uygun olacak şekilde, 15 deri tutulumlu (Mukokütan), 15 göz tutulumlu (Oküler), 16 damar tutulumlu (Vasküler) Behçet olgusu ve 15 sağlıklı kontrol olmak üzere toplamda 61 örnek dahil edilmiş ve 4 alt gruba ayrılmıştır (Seyahi 2019, Battiol vd. 2019, Oğuz vd. 2016).

Çizelge 3. 2 Behçet Sendromu alt gruplarına ait kriterler

Behçet Sendromu Alt Grubu	**Tanımlayıcı Klinik Özellikler**
Mukokütan	Sadece oral ülser ile birlikte genital ülser ve/veya deri lezyonları ve/veya paterji testi pozitifliği
Oküler	Mukokütan bulgulara ek olarak, farklı klinik şekilleriyle ortaya çıkabilen oküler tutulum mevcut
Vasküler	Mukokütan bulgulara ek olarak, oküler tutulum olmadan, farklı klinik şekilleriyle ortaya çıkabilen vasküler tutulum mevcut
Diğer	Mukokütan bulgulara ek olarak, oküler tutulum ve/veya vasküler tutulum ve/veya kas-iskelet sistemi tutulumu ve/veya gastrointestinal sistem tutulumu ve/veya sinir sistemi tutulumu mevcut

Elde edilmiş sonuçlarla birlikte değerlendirilmek üzere çalışmaya dahil edilen olguların yaş, cinsiyet, yaşadıkları bölge gibi bilgileri yanı sıra uygulanan tedavi protokolleri ve tedaviye verdikleri yanıt açısından gerekli bilgileri de alınmıştır. Çalışmaya dahil edilen BS olguları ile sağlıklı kontrol grubu bireylerine ait klinik bilgiler, EK 2'de yer alan Olgu Rapor Formu ile toplanmıştır. Etik kurallar gereği Behçet hasta gruplarında hiçbir hastanın tedavisi, materyallerin toplanması sırasında kesilmemiştir. Bu çalışma için etik kurul onayı ve kan dokusu örnekleri alınan bireylerden bilgilendirilmiş onam formu alınmıştır.

3.1.1 Behçet Sendromu ve Kontrol Grubu Bireylerinin Demografik Özelliklerinin Özet Tablosu

Behçet sendromu ve kontrol grubunda bulunan bireylerin demografik özellikleri Çizelge 3.3'de bulunmaktadır.

Çizelge 3. 3 BS ve kontrol gruplarına ait özet temel demografik veri tablosu

	Tüm BS (n=46)	**Kontrol (n=15)**	**p**	**MB[1] (n=15)**	**OB[1] (n=15)**	**VB[1] (n=16)**
Yaş[2] (min-max/ortanca)	18-58/36	19-57/36	0,97	18-57	18-58	22-56
Cinsiyet (E/K)	26/20	10/5	0,49	4/11	8/7	14/2

[1] BS klinik alt gruplarının minimum ve maksimum yaşları.
[2] Yaş; çalışmaya alındığı andaki yaş
BS, Behçet Sendromu; min: minimum, max: maksimum, MB: Mukokütan Behçet, OB: Oküler Behçet, VB: Vasküler Behçet, E: Erkek, K: Kadın.

3.1.2 Behçet Sendromu ve Kontrol Grubunun Demografik ve Klinik Özelliklerinin Detaylı Tablosu

Çalışma dahilindeki Behçet sendromu ve kontrol grubu bireylerinin detaylı demografik ve klinik özellikleri Çizelge 3.4'de verilmiştir.

Çizelge 3. 4 Behçet Sendromu olguları ile sağlıklı kontrollerin demografik ve klinik bilgileri

Sıra	Grup	Cinsiyet	Yaş[1]	M	O	V	BS Alt Grubu
1	BS	E	18	+	-	-	Mukokütan
2	BS	E	40	+	-	-	Mukokütan
3	BS	E	53	+	-	-	Mukokütan
4	BS	E	56	+	-	-	Mukokütan
5	BS	K	23	+	-	-	Mukokütan
6	BS	K	27	+	-	-	Mukokütan
7	BS	K	29	+	-	-	Mukokütan
8	BS	K	35	+	-	-	Mukokütan
9	BS	K	37	+	-	-	Mukokütan
10	BS	K	42	+	-	-	Mukokütan
11	BS	K	42	+	-	-	Mukokütan
12	BS	K	44	+	-	-	Mukokütan
13	BS	K	46	+	-	-	Mukokütan
14	BS	K	48	+	-	-	Mukokütan
15	BS	K	57	+	-	-	Mukokütan
16	BS	E	18	+	+	-	Oküler
17	BS	E	18	+	+	-	Oküler
18	BS	E	32	+	+	-	Oküler
19	BS	E	33	+	+	-	Oküler
20	BS	E	33	+	+	-	Oküler
21	BS	E	36	+	+	-	Oküler
22	BS	E	42	+	+	-	Oküler
23	BS	E	47	+	+	-	Oküler
24	BS	K	19	+	+	-	Oküler
25	BS	K	19	+	+	-	Oküler
26	BS	K	26	+	+	-	Oküler
27	BS	K	35	+	+	-	Oküler
28	BS	K	45	+	+	-	Oküler
29	BS	K	47	+	+	-	Oküler
30	BS	K	58	+	+	-	Oküler

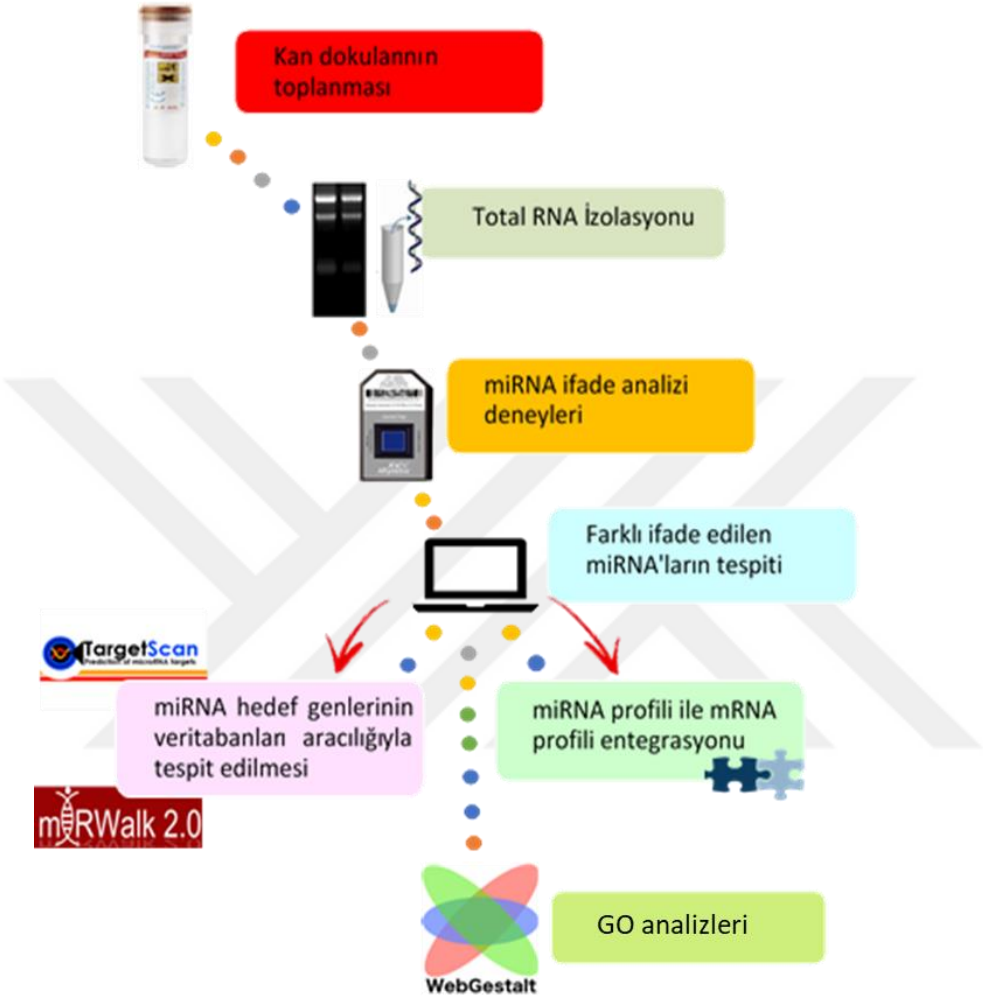
Çizelge 3. 4 Behçet Sendromu olguları ile sağlıklı kontrollerin demografik ve klinik bilgileri (devam)

Sıra	Grup	Cinsiyet	Yaş[1]	M	O	V	BS Alt Grubu
31	BS	E	22	+	-	+	Vasküler
32	BS	E	28	+	-	+	Vasküler
33	BS	E	28	+	-	+	Vasküler
34	BS	E	32	+	-	+	Vasküler
35	BS	E	32	+	-	+	Vasküler
36	BS	E	32	+	-	+	Vasküler
37	BS	E	33	+	-	+	Vasküler
38	BS	E	34	+	-	+	Vasküler
39	BS	E	35	+	-	+	Vasküler
40	BS	E	36	+	-	+	Vasküler
41	BS	E	37	+	-	+	Vasküler
42	BS	E	40	+	-	+	Vasküler
43	BS	E	43	+	-	+	Vasküler
44	BS	E	56	+	-	+	Vasküler
45	BS	K	38	+	-	+	Vasküler
46	BS	K	47	+	-	+	Vasküler
47	Kontrol	E	19	-	-	-	-
48	Kontrol	E	21	-	-	-	-
49	Kontrol	E	27	-	-	-	-
50	Kontrol	E	33	-	-	-	-
51	Kontrol	E	34	-	-	-	-
52	Kontrol	E	36	-	-	-	-
53	Kontrol	E	37	-	-	-	-
54	Kontrol	E	42	-	-	-	-
55	Kontrol	E	48	-	-	-	-
56	Kontrol	E	57	-	-	-	-
57	Kontrol	K	24	-	-	-	-
58	Kontrol	K	27	-	-	-	-
59	Kontrol	K	42	-	-	-	-
60	Kontrol	K	45	-	-	-	-
61	Kontrol	K	57	-	-	-	-

[1] Yaş: çalışmaya alınan andaki yaş, BS: Behçet Sendromu, E: Erkek, K: Kadın; M: mukokütan tutulum bulguları, O: Oküler tutulum bulguları, V: Vasküler tutulum bulguları

3.2 Yöntem

Bu tez çalışmasının genel iş akış şeması Şekil 3.1'de gösterildiği gibidir.



Şekil 3. 1 Çalışmanın genel iş akış şeması

3.2.1 Periferik Kandan RNA İzolasyonu

Paxgene silika-membran teknolojisi kullanılarak, RNA izolasyonu için stabilize olmuş kan örneklerinden miRNA'ları da içeren 18 nükleotitden büyük RNA moleküllerini içeren total RNA izole edilmiştir. Bu işlem için bu çalışmanın amacına uygun izolasyon sağlayan PaxGene miRNA İzolasyon Kiti (Qiagen, Cat. No: 763134) kullanılmış ve tüm

çalışma basamakları üretici protokolüne göre gerçekleştirilmiştir. Protokolün genel detayları aşağıdaki gibidir.

3.2.2 Periferik Kandan RNA İzolasyon Protokolü

Çalışmaya başlamadan önce yapılanlar:

- PAXgene kan RNA tüplerine alınarak -80°C'da saklanmış olan örnekler, 1 gece önceden çıkarılarak oda sıcaklığına getirilir.
- Konsantre olan BM3 ve BM4 tamponları ilk kullanımdan önce uygun miktarda etanol (%96-100, saflık derecesi p.a.) eklenerek kullanıma hazır hale getirilir.
- 550 µL RNase içermeyen su içinde katı DNase I (1500 Kunitz birimi) çözülerek DNase I stok çözeltisi hazırlanır.

1. Bir gece oda ısısında bekletilen örnekler 4500 g'de (3000-5000 g) 10 dakika santrifüj edilir.
2. Süpernatant dökülür. Pellete 4 mL RNase içermeyen su eklenir ve taze ikincil bir hemogard kapağı kullanılarak tüp kapatılır.
3. Pellet çözülene kadar vortekslenir.
4. 3000–5000 g'de 10 dakika santrifüj edilir. Tüm süpernatant boşaltılır.
5. Pellet üzerine 350 µL Buffer BM1 eklenir ve pellet gözle görülür şekilde çözülene kadar vortekslenir.
6. Örnek 1,5 mL'lik mikrofüj tüpüne aktarılır ve üzerine 300 µL BM2 tamponu ve 40 µL Proteinaz K ilave edilir. 5 saniye vorteksleyerek karıştırılır.
7. Örnek 400-1400 rpm'de çalkalayıcı-inkübatörde 55°C'de 10 dakika inkübe edilir.
8. Örnekler, 2 mL'lik toplama tüpü içerisine yerleştirilmiş lila renkli kolon üzerine aktarılır ve 3 dakika 15.000 rpm'de santrifüj edilir.
9. Alta geçen sıvı kısım pellete dokunmadan alınıp yeni bir mikrofüj tüpüne aktarılır.
10. Üzerine 700 µL izopropanol (%100) ilave edilir ve vorteksleyerek karıştırılır.
11. 700 µL örnek, 2 mL'lik toplama tüpü içerisinde bulunan kırmızı renkli kolon üzerine aktarılır.

12. 1 dakika 15.000 rpm’de santrifüj edilir. Alta geçen sıvı kısım atılır ve kolon yeni bir 2 mL’lik toplama tüpü içerisine yerleştirilir.

13. Örneğin geri kalan kısmı da kolona aktarılır ve yine 15.000 rpm’de 1 dakika santrifüj edilir.

14. Alta geçen sıvı kısım atılır ve kolon yeni bir toplama tüpü içerisine yerleştirilir.

15. Kolon üzerine 350 µL Tampon BM3 eklenir. 15.000 rpm’de 15 saniye santrifüjlenir. Alta geçen sıvı kısım atılır ve kolon yeni bir toplama tüpü içerisine yerleştirilir.

16. Bu aşamada ayrı bir 1,5 mL'lik bir mikrosantrifüj tüpünde 70 µL Tampon RDD üzerine 10 µL DNase I stok çözeltisi ilave edilir (bir örnek için). Tüpe hafifçe vurularak karıştırılır ve tüpün yan duvarlarındaki sıvıyı toplamak için kısa süre santrifüj yapılır.

17. DNase I inkübasyon karışımı (80 µL) doğrudan kolon membranı üzerine pipetle bırakılır ve tezgahta (20-30°C) 15 dakika boyunca inkübe edilir.

18. 350 µL BM3 Tamponu kolon üzerine eklenir. 15.000 rpm’de 15 saniye santrifüjlenir. Alta geçen sıvı kısım atılır ve kolon yeni bir 2 mL'lik toplama tüpüne yerleştirilir.

19. 500 µL BM4 Tamponu kolon üzerine eklenir. 15.000 rpm’de 15 saniye santrifüj edilir ve alta geçen sıvı kısım atılır. Kolon yeni bir 2 mL'lik toplama tüpüne yerleştirilir.

20. Yine 500 µL BM4 tamponu kolon üzerine eklenir ve 2 dakika 15.000 rpm’de santrifüj edilir. Alta geçen kısım atılır ve kolon 2 mL'lik yeni bir toplama tüpü içerisine yerleştirilir.

21. 1 dakika 15.000 rpm’de santrifüj edilir. Alta geçen sıvı kısım atılır ve kolon 1,5 mL’lik bir mikrofüj tüpünün içerisine yerleştirilir.

22. Kolon üzerine 40 µL BR5 Tamponu ilave edilir ve ardından 15.000 rpm’de 1 dakika santrifüj edilir.

23. 40 µL Tampon BR5 ve aynı mikrosantrifüj tüpü kullanarak elüsyon aşaması (adım 22) tarif edildiği gibi tekrar edilir.

24. Elde edilen RNA örneği ısı bloğunda 65°C'de 5 dakika inkübe edilir. İnkübasyondan sonra hemen buz üzerinde soğutulur.

25. İnkübasyondan sonra örnekler hemen buz üzerine alınarak nanodropta konsantrasyon tayinleri yapılmıştır. Ardından RNA’lar -80°C'de saklanmak üzere kaldırılmıştır.

3.2.3 Mikrodizin miRNA ifade analizi

Toplam 61 adet periferik kan örneğinden izole edilerek uygun şartlarda saklanan RNA'lar, agaroz jelde yürütülerek ve konsantrasyonları / saflıkları nanodrop ile ölçülerek çalışma için uygun oldukları teyit edildikten sonra, Affymetrix GeneChip miRNA 4.0 dizinleri üzerine, hibridizasyon öncesi hazırlık kitleri (FlashTag Biotin HSR RNA labeling kit, Affymetrix 901910) kullanılarak hazırlanmış ve hibridize edilmiştir, tamamen üreticinin tavsiye ettiği protokollere bağlı kalarak ve izleyerek de miRNA ifade analizi çalışmaları gerçekleştirilmiştir.

1) FlashTag™ Biotin HSR RNA İşaretleme Protokolü
    a) Poly (A) kuyruğunun eklenmesi
        i) Nükleaz içermeyen su ile RNA hacmi 8 uL'ye tamamlanır.
        ii) 8 uL RNA buza alındı. 2 µL RNA Spike Oligo Kontrolü (Flakon 8) eklenir ve buza alınır.
        iii) Bu aşamada uygulama buz üzerinde yapılır. Bu aşamanın amacı miRNA molekülünün 3' ucuna Poly(A) kuyruğunun eklenmesidir (Çizelge 3.5). Buz üzerindeki 500 ng/8 µL total RNA örneğine 2 µL RNA Spike Kontrol Oligo eklenir.
        iv) ATP karışımı (Flakon 3) 1 mM Tris içinde 1:500 oranında seyreltilir.
        v) Tablo 1'deki reaktifler master mix olarak hazırlanır ve her örnek için 10 µL RNA/Spike Control Oligo karışımı üzerine 5 µL master mix eklenir.
        vi) Karışım 15 dakika 37°C'de inkübasyona bırakılır.

Çizelge 3. 5 Poly (A) kuyruk ekleme karışımı

Reaktifler	Miktarlar
ATP karışımı (dilüe edilmiş)	1,0 µL
PAP Enzimi	1,0 µL
10x Reaksiyon tamponu	1,5 µL
25 mM MnCl2	1,5 µL
Toplam hacim	5 µL

b) miRNA’ların biotin ile işaretlenmesi (Ligasyon)

i) 15 µL kuyruklu RNA spin edilir ve buz üzerine yerleştirilir.

ii) Her örneğe 4 µL 5X FlashTag Biotin HSR Ligasyon Karışımı (Flakon 5) eklenir.

iii) Ligasyon karışımı ilave edildikten sonra, her örneğe 2 µL T4 DNA Ligaz (Flakon 6) eklenir.

Bu işlem sonunda miRNA’lar 3’ uçlarından biotin ile işaretlenmişlerdir. Otomatik ligasyon meydana gelebileceğinden, bu adımda ana bir karışım yapılmamıştır.

iv) Hafifçe karıştırılarak (vorteks yapılmaz) ve spin edilir.

v) 25°C'de (oda sıcaklığında) 30 dakika inkübe edilir.

vi) 2.5 µL HSR Durdurma Çözeltisi (Flakon 7) eklenerek reaksiyon durdurulur. 23.5 µL örnek karıştırılıp spin edilir.

c) Hibridizasyon kokteylinin hazırlanması, mikrodizine yüklenmesi ve hibridizasyon

Hibridizasyon fırını açılır ve sıcaklığı 48°C'a, devir değeri ise 60 rpm’e ayarlanır. Mikrodizinlerin oda sıcaklığına ulaşması (10-15 dakika) beklenir. Her mikrodizin örnek ismi ile işaretlenir.

i) Hibridizasyon kokteyli hazırlanmadan önce 20X Ökaryotik Hibridizasyon Kokteyli 0,2 mL’lik tüplere her örnek için bölünerek 5 dakika 65°C'de inkübe edilir.

ii) Array hibridizasyon kokteyli hazırlamak için 21,5 µL biyotinle işaretli örneğe Çizelge 3.6’da gösterilen bileşenler eklenir. Hibridizasyon kokteyli her örnek için ayrı olarak hazırlanır ve 21,5 µL biotinle işaretlenmiş örnek ile 110,5 µL kokteyl karıştırılır.

iii) Karışım 99°C'de 5 dakika ve 45°C'de 5 dakika inkübe edilir.

iv) 130 µL karışım pipet ile çekilerek mikrodizin üzerindeki septa denilen deliklerden yüklenir. Bu işlem her örnek için ayrı ayrı uygulanır.

v) Daha sonra septalar kapatılır ve çipler hibridizasyon fırınına alınarak 48°C'de 60 rpm'de 18 saat inkübe edilir.

Çizelge 3. 6 Hibridizasyon karışımı bileşenleri

Reaktifler	Miktarlar
2x Hibridizasyon "Mix"	66 µL
%27,5 Formamid	19,2 µL
DMSO	12,8 µL
20x Hibridizasyon Kontrolleri	6,6 µL
Kontrol Oligo B2, 3nM	2,2 µL
Nükleaz içermeyen su	3,7 µL
Toplam hacim	110,5 µL

2) Yıkama, Boyama ve Tarama

Çipler 18 saat hibridizasyon sonrasında fırından alınır ve içlerindeki hibridizasyon karışımı çıkarılır. Program ile çalışan ve bilgisayara bağlı olan yıkama istasyonuna alınarak burada ilgili tampon ve boyalarla yıkanmaları ve boyanmaları sağlanır.

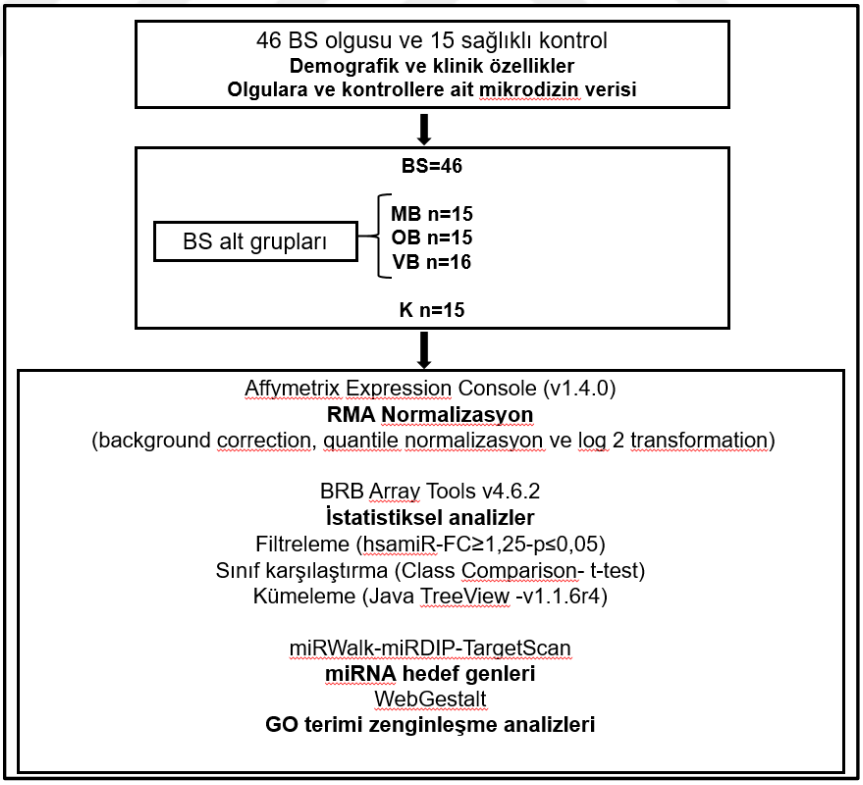
Üç adet amber renkli tüp alınarak sırasıyla 1,2 ve 3 olarak işaretlenir.

a) Birinci boyama tüpüne; Stain 1 solüsyonundan 600 µl
b) İkinci boyama tüpüne; Stain 2 solüsyonundan 600 µl
c) Üçüncü boyama tüpüne; Array Holding Buffer'dan 800 µl koyulur.

Yıkama ve boyama işlemleri bittikten sonra çipler tarayıcıya alınarak taranmıştır. Affymetrix Command Console programı tarafından elde edilen veriler işlenmiş ve CEL dosyaları oluşturulmuştur.

3.2.4 Biyoinformatik Analizler

Bu tez çalışmasında halka açık bir yazılım olan BRB-ArrayTools (v4.6.2) analiz aracı kullanılmıştır *(https://brb.nci.nih.gov/BRB-ArrayTools/download.html).* BRB-Array Tools, "R" yazılım dilinde "Bioconducter" paketini kullanarak "Microsoft Excel" eklentisi olarak mikrodizin analizi yapılmasına olanak sağlar. Bu çalışmada kullanılmış olan mikrodizin platformu "Affymetrix", "GeneChip® miRNA 4.0" çiplerinde diğer ifade analiz çiplerinde sunulan ".cdf " uzantılı çip tanımlama dosyasını sunmaması nedeniyle R-Bioconducter ve dolayısıyla BRB-Array Tools programı .CEL uzantılı dosyaları bu çip için tanıyamamakta ve programa doğrudan yükleme yapılamamaktadır. Bu nedenle bu tez çalışmasında analiz için ön-işleme ve normalizasyon işlemleri Affymetrix firması tarafından sağlanan Affymetrix Expression Console (v1.4.0) programı ile normalizasyon sonrası işlemler (istatistiksel analizler) ise BRB-ArrayTools (v4.6.2) programı ile yapılmıştır. Bu çalışmaya ait biyoinformatik analiz akış şeması Şekil 3.2'de yer almaktadır.



Şekil 3. 2 Tez çalışmasında kullanılan biyoinformatik analizlerin akış şeması BS: Behçet Sendromu; K: Kontrol grubu; M, Mukokütan Behçet, O: Oküler Behçet; V: Vasküler Behçet. GO: Gen Ontolojisi, RMA: Robust Multiarray Avarage

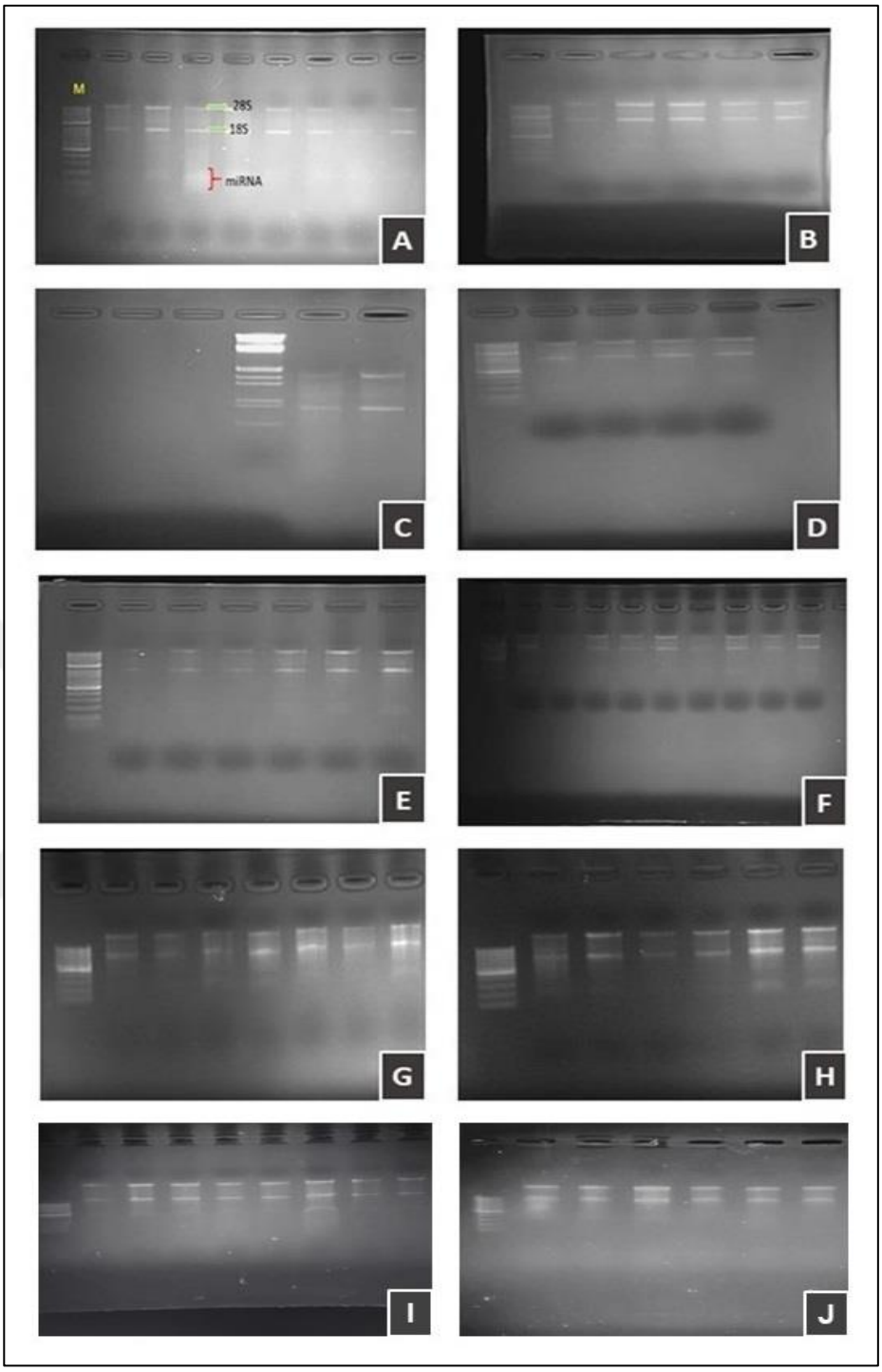
4. ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1 Bulgular

Bu çalışma toplam 61 örneğin RNA izolasyon bulguları, miRNA ifade analiz bulguları ve devamında biyoinformatik analiz bulgularını içermektedir.

4.2 RNA Miktar ve Saflık Analiz Bulguları

Periferik kandan izole edilen RNA'lar %1'lik agaroz jelde yürütülürek görüntülenmiştir (Şekil 4.1). Konsantrasyonları Nanodrop spektrofotometre ile ölçülmüştür (Çizelge 4.1). Çalışmaya uygun oldukları teyit edildikten sonra Affymetrix marka GeneChip miRNA 4.0 mikrodizinleri ve kitleri aracılığı ile ilgili kitin üretici protokolüne uygun olarak miRNA ifade analizi çalışmaları gerçekleştirilmiştir.



Şekil 4. 1 Çalışmada yer alan 61 RNA örneğine ait %1'lik agaroz jel görüntüleri A. Soldan sağa M, 18/14, 18/34, 18/39, 18/33, 18/37, 18/31, 18/30, 18/35. B. Soldan sağa M, 18/03, 18/04, 18/05, 18/06, 18/07. C. Soldan sağa M, 18/08, 18/01. D. Soldan sağa M, 18/10, 18/20, 18/21, 18/16. E. Soldan sağa M, 18/25, 18/36, 18/17, 18/28, 18/29, 18/38.F. Soldan sağa M, 18/12, 18/13, 18/15, 18/18, 18/22, 18/23, 18/24, 18/32, 18/42. G. Soldan sağa M, 18/02, 18/09, 18/11, 18/19, 18/26, 18/27, 18/40. H. Soldan sağa M, 18/41, 18/43, 20/44, 20/46, 20/47, 20/48. I. Soldan sağa M, 21/01, 21/02, 21/03, 21/04, 21/05, 21/06, 21/08, 21/09. J. Soldan sağa M, 21/10, 21/11, 21/12, 21/13, 21/14, 21/15.

Çizelge 4. 1 Çalışmada yer alan 61 örneğin RNA nanodrop analiz sonuçları

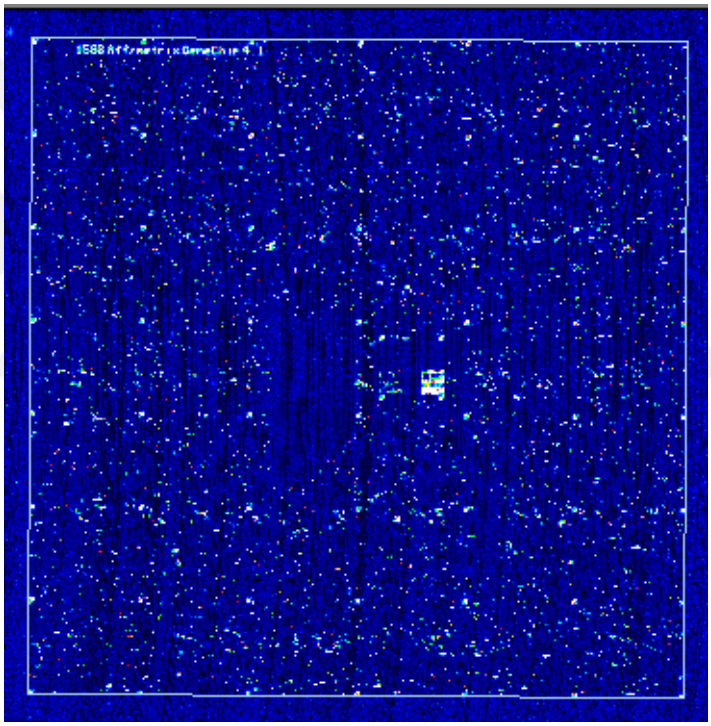
ÖRNEK NO	BEHÇET GRUP	RNA ng/ul	A260	A280	260/280	260/230
18/09	Kontrol (K)	71.73	1.793	0.8	2.24	0.52
18/01	Kontrol (K)	54.13	1.353	0.557	2.43	0.38
18/08	Kontrol (K)	161.08	4.027	1.809	2.23	0.88
18/03	Kontrol (K)	45.41	1.135	0.501	2.27	0.26
18/04	Kontrol (K)	101.99	2.55	1.142	2.23	0.67
18/05	Kontrol (K)	89.87	2.247	1.019	2.21	0.62
18/06	Kontrol (K)	43.68	1.092	0.446	2.45	0.29
18/02	Kontrol (K)	46.13	1.153	0.518	2.23	0.19
18/07	Kontrol (K)	50.56	1.264	0.54	2.34	0.33
21/10	Kontrol (K)	50.56	1.264	0.54	2.34	0.33
21/11	Kontrol (K)	57.65	1.441	0.628	2.3	0.45
21/12	Kontrol (K)	68.88	1.722	0.766	2.25	0.5
21/13	Kontrol (K)	87.24	2.181	0.969	2.25	0.6
21/14	Kontrol (K)	47.87	1.197	0.529	2.26	0.33
21/15	Kontrol (K)	92.53	2.313	1.065	2.17	0.55
18/11	Mükokütan B (MB)	40	1	0.446	2.24	0.29
18/20	Mükokütan B (MB)	46.63	1.166	0.52	2.24	0.34
18/21	Mükokütan B (MB)	61.76	1.544	0.689	2.24	0.28
18/16	Mükokütan B (MB)	50.8	1.27	0.556	2.28	0.3
18/10	Mükokütan B (MB)	63.72	1.593	0.706	2.26	0.46
18/19	Mükokütan B (MB)	57.59	1.44	0.626	2.3	0.4
18/26	Mükokütan B (MB)	118.11	2.953	1.361	2.17	0.67
18/27	Mükokütan B (MB)	93.86	2.347	1.05	2.24	0.61
18/40	Mükokütan B (MB)	58.33	1.458	0.677	2.16	0.33
18/41	Mükokütan B (MB)	34.94	0.874	0.389	2.25	0.27
20/46	Mükokütan B (MB)	49.41	1.235	0.502	2.46	0.36
20/47	Mükokütan B (MB)	52.89	1.322	0.544	2.43	0.39
20/49	Mükokütan B (MB)	54.38	1.36	0.533	2.55	0.41
20/48	Mükokütan B (MB)	55.03	1.376	0.543	2.53	0.4
20/50	Mükokütan B (MB)	99.04	2.476	1.08	2.29	0.64
18/28	Oküler B (OB)	54.13	1.353	0.56	2.42	0.41
18/17	Oküler B (OB)	32.07	0.802	0.337	2.38	0.26
18/29	Oküler B (OB)	74.27	1.857	0.809	2.29	0.48
18/38	Oküler B (OB)	112.33	2.808	1.239	2.27	0.62
18/36	Oküler B (OB)	35.25	0.881	0.344	2.56	0.28

Çizelge 4.1 Çalışmada yer alan 61 örneğin RNA nanodrop analiz sonuçları (devam)

ÖRNEK NO	BEHÇET GRUP	RNA ng/ul	A260	A280	260/280	260/230
18/25	Oküler B (OB)	22.59	0.565	0.203	2.78	0.2
20/44	Oküler B (OB)	70.26	1.756	0.74	2.37	0.51
21/01	Oküler B (OB)	70.94	1.774	0.819	2.16	1.89
21/02	Oküler B (OB)	74.67	1.867	0.869	2.15	1.62
21/03	Oküler B (OB)	85.46	2.137	1.014	2.11	1.99
21/04	Oküler B (OB)	53.53	1.338	0.658	2.03	0.39
21/05	Oküler B (OB)	49.01	1.225	0.574	2.14	0.8
21/06	Oküler B (OB)	159.77	3.994	1.935	2.06	1.79
21/08	Oküler B (OB)	50.18	1.255	0.583	2.15	0.82
21/09	Oküler B (OB)	40.86	1.022	0.459	2.23	0.81
18/14	Vasküler B (VB)	58.07	1.452	0.648	2.24	0.31
18/30	Vasküler B (VB)	27.31	0.683	0.278	2.45	0.2
18/31	Vasküler B (VB)	39.25	0.981	0.449	2.19	0.31
18/33	Vasküler B (VB)	94.06	2.352	1.072	2.19	0.47
18/34	Vasküler B (VB)	98.31	2.458	1.14	2.16	0.57
18/35	Vasküler B (VB)	48.51	1.213	0.544	2.23	0.36
18/37	Vasküler B (VB)	38.22	0.955	0.417	2.29	0.21
18/39	Vasküler B (VB)	139.13	3.478	1.673	2.08	0.82
18/12	Vasküler B (VB)	91.38	2.284	1.042	2.19	0.52
18/15	Vasküler B (VB)	46.03	1.151	0.491	2.34	0.3
18/18	Vasküler B (VB)	31.57	0.789	0.311	2.54	0.18
18/22	Vasküler B (VB)	57.06	1.427	0.627	2.28	0.37
18/24	Vasküler B (VB)	52.98	1.324	0.587	2.26	0.38
18/32	Vasküler B (VB)	35.64	0.891	0.368	2.42	0.15
18/42	Vasküler B (VB)	54.88	1.372	0.611	2.25	0.41
20/43	Vasküler B (VB)	41.99	1.05	0.424	2.48	0.35

4.3 Mikrodizin Çalışmasına Ait Bulgular

miRNA 4.0 çiplerine hibridize edilen ve daha sonra yıkama boyama işlemlerinden geçirilip tarayıcıda taranan çiplerin ilk analizi Expression Console programında yapılmıştır. miRNA ifade analizi deneyleri sonunda mikrodizinlerin taranması ile elde edilen veri, ".CEL" formatında dosyalar olarak saklanmıştır. Yine mikrodizinlerin taranması ile elde edilen ".DAT" uzantılı dosyalar ise AGCC 4.0 (Affymetrix® GeneChip Command & Console Software)® yazılımı içinde bulunan "AGCC Viewer" programı ile açılarak çiplerin hibridizasyon aşaması kontrol edilmiştir (Şekil 4.2).



Şekil 4. 2 GeneChip® miRNA 4.0 mikrodizininin tarama sonucu elde edilen görüntüsü

Affymetrix GeneChip® miRNA 4.0 mikrodizinleri, farklı organizmalar için ayrı ayrı tasarlanmayıp aynı mikrodizin üzerinde insan, fare, sıçan ve virüslerin ifade analizlerine izin verecek şekilde tasarlanmıştır (Çizelge 4.4).

Affymetrix GeneChip® miRNA 4.0 platformu için "Present Call" olarak adlandırılan ve bir hibridizasyon kontrol değeri olan sinyal yüzdesi, miRNA hibridizasyonu için cebirsel

bir oranla hesaplanmaktadır. Çizelge 4.2'de görüldüğü gibi Affymetrix GeneChip® miRNA 4.0 mikrodizinlerinde 30.434 olgun miRNA prob seti bulunmaktadır. Bu sayının 2.578 tanesi insan olgun miRNA prob setlerine, 2.025 tanesi de insan öncül miRNA prob setlerine aittir (insan olgun miRNA prob seti sayısı: 2.578, insan "pre"/öncül miRNA prob seti sayısı: 2.025, toplam sayı: 4.603). Bu çalışma kapsamında 61 örnekten elde edilen %P ("Present Call") değerleri %13-%20 arasında değişmektedir (Çizelge 4.3). Buna göre, %P değeri ortalama olarak %15 alındığında, 30.434 prob setinin %15'ine, yani 4.565 prob seti sayısına ulaşılmaktadır. Bu da Affymetrix GeneChip® miRNA 4.0 mikrodizinleri üzerinde bulunan ve insana ait olan, olgun ve öncül miRNA prob seti sayılarının toplamına (4.603) çok yakın bir sayıyı vermektedir. Bilindiği gibi pre-miRNA'ların ve olgun miRNA'ların büyük çoğunluğu aynı mevcut var / yok ("present / absent") sinyallerini paylaşmaktadır.

Çizelge 4. 2 Affymetrix GeneChip® miRNA 4.0 mikrodizin içeriği (Affymetrix miRNA 4.0 and 4.1 bilgi kâğıdı)

miRBase	20. Versiyon
Ensembl	73. Versiyon
snoRNAbase	3. Versiyon
mirTarbase	4.5. Versiyon
MicroCosm Targets	11/2013
Organizmalar	203
Toplam olgun miRNA probe setleri	30.434
Olgun miRNA için prob/prob setleri	9
Olgun insan prob setleri	2.578
Olgun fare prob setleri	1.908
Olgun sıçan/"rat" prob setleri	728
İnsan snoRNA ve scaRNA prob setleri	1.996
İnsan öncül miRNA prob setleri	2.025
Fare öncül miRNA prob setleri	1.255
Sıçan/"rat" öncül miRNA prob setleri	490

Çizelge 4. 3 Çalışmada yer alan toplam 61 örneğin tarama %P sonuçları

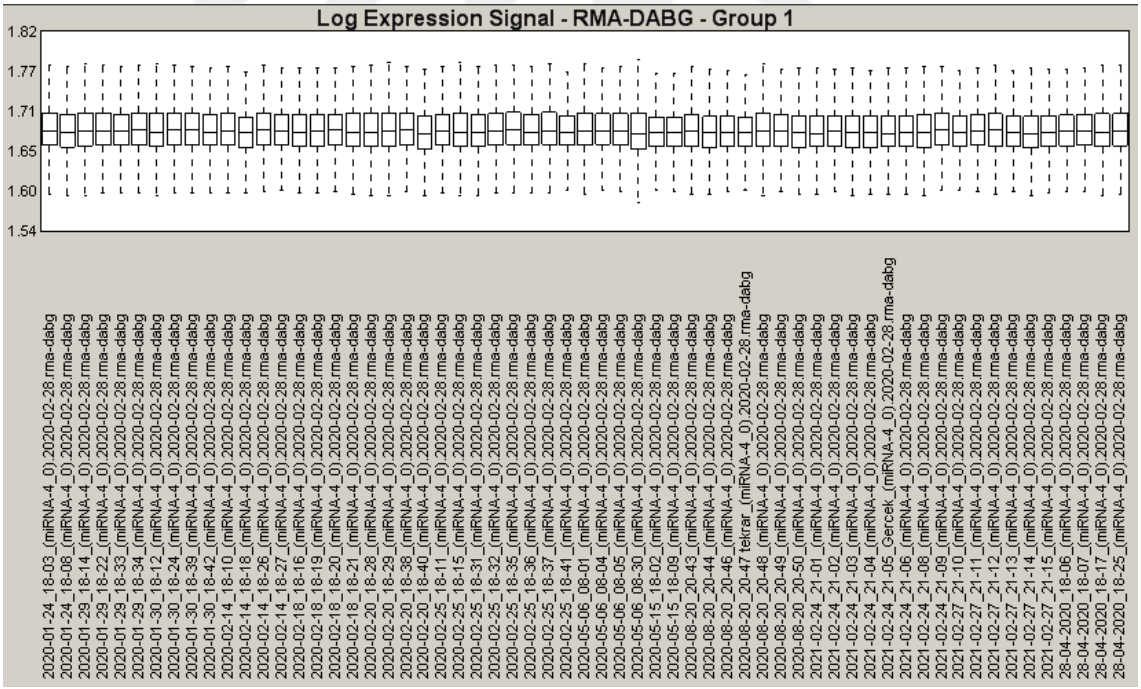
NO	%P	NO	%P
2020-01-24_18_03	18,03	2020-05-15_18-02	13,20
2020-01-24_18_08	17,13	2020-05-15_18-09	13,41
2020-01-29_18_14	18,08	2020-05-06_18-04	16,95
2020-01-29_18_22	19,33	2020-05-06_18-05	18,05
2020-01-29_18_33	18,21	2020-05-06_18-30	20,71
2020-01-29_18_34	18,80	2020-04-28_18-07	15,72
2020-01-30_18_12	16,62	2020-05-06_18-01	17,66
2020-01-30_18_24	17,39	2020-04-28_18-17	16,76
2020-01-30_18_39	17,27	2020-04-28_18-25	17,28
2020-01-30_18_42	16,02	2020-04-28_18-06	16,76
2020-02-14_18_10	16,88	2020-02-25_18_41	14,43
2020-02-14_18_18	13,15	2021-02-24_21-01	14,89
2020-02-14_18_26	16,37	2021-02-24_21-02	16,25
2020-02-14_18_27	15,66	2021-02-24_21-03	16,32
2020-02-18_18_16	18,08	2021-02-24_21-04	14,62
2020-02-18_18_19	16,67	2021-02-24_21-05	14,19
2020-02-18_18_20	19,52	2021-02-24_21-06	15,75
2020-02-18_18_21	16,22	2021-02-24_21-08	14,07
2020-02-20_18_28	16,82	2021-02-24_21-09	16,34
2020-02-20_18_29	18,71	2021-02-27_21-10	17,04
2020-02-20_18_38	17,75	2021-02-27_21-11	15,69
2020-02-20_18_40	15,42	2021-02-27_21-12	17,34
2020-02-25_18_11	17,46	2021-02-27_21-13	14,98
2020-02-25_18_15	18,48	2021-02-27_21-14	14,77
2020-02-25_18_31	18,18	2021-02-27_21-15	14,82
2020-02-25_18_32	18,14		
2020-02-25_18_35	18,62		
2020-02-25_18_36	18,08		
2020-02-25_18_37	20,59		
2020-08-20_20_43	15,89		
2020-08-20_20_46	15,99		
2020-08-20_20_49	14,73		
2020-08-20_20_50	14,95		
2020-08-20_20_48	18,20		
2020-08-20_20_44	14,07		
2020-08-20_20_47	11,76		

4.4 Biyoinformatik Analiz Bulguları

Mikrodizin deneylerinin tamamlanmasını takiben, örneklerin ilk analizleri ve ham verinin oluşturulma işlemleri cihazın yazılımında gerçekleştirilmiş ve her bir örnek için bir rapor elde edilmiştir. Bundan sonra veriler ileri analizlere tabi tutulmuştur.

4.4.1 Normalizasyon sonuçları

Hibridizasyon ve tarama işlemleri tamamlanan toplam 61 örneğin, ön işleme ("preprocessing") algoritması sonrası elde edilen RMA normalizasyonuna ait kutu grafiği Şekil 4.3'de paylaşılmıştır. Mikrodizinlere ait medyan değerlerinin çok yaklaşık olarak aynı düzlemde yer aldığı ve mikrodizinlerin izleyen analizler sırasında birbirleri ile kıyaslanabilir durumda olduğu belirlenmiştir.



Şekil 4. 3 Hibridizasyon ve taramaları tamamlanan 61 örneğe ait mikrodizinin, RMA normalizasyonu sonrası kutu grafiği

4.4.2 Karşılaştırmalı miRNA ifade analizleri için kullanılan prob set sayısı

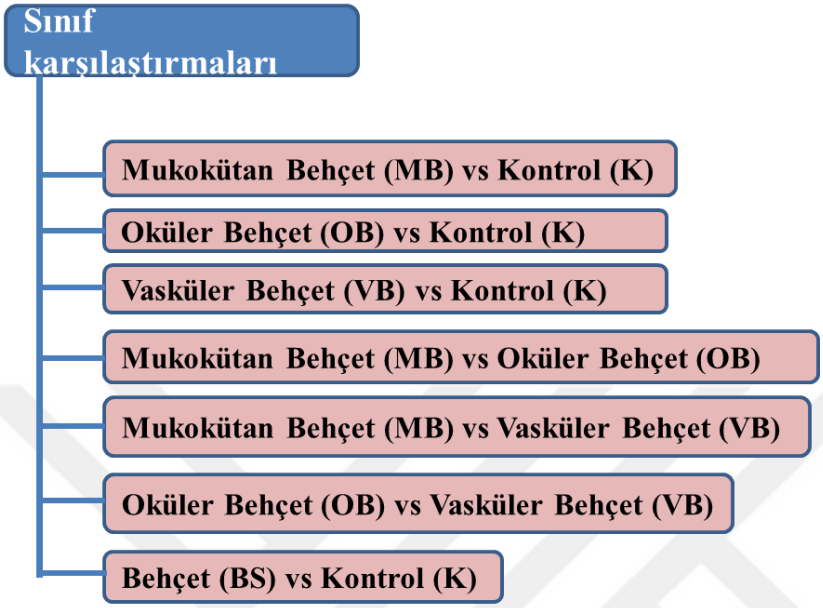
Çalışma dahilindeki 61 örneğin miRNA ifade analiz deneyleri sonucunda elde edilen .CEL dosyaları üzerinden yapılan normalizasyon sonrası, BRB Array Tools analiz programında uygulanan filtelerle, GeneChip miRNA 4.0 mikroarraylerinde bulunan toplam 4.603 insan miRNA prob seti içinden 257'si geçmiştir. Daha sonraki analiz aşamaları bu sayı üzerinden gerçekleştirilmiştir.

Grupların karşılaştırılması, farklı ifadeye sahip miRNA setleri kullanılarak gerçekleştirilen Venn (kesişim), kümeleme ve GO terimi zenginleşme analizlerinin tamamı, seçilmiş olan bu 257 prob seti üzerinden tamamlanmıştır.

4.4.3 Sınıf / grup karşılaştırması analizleri ile elde edilen bulgular

Bu tez çalışmasında, 3 Behçet Sendromu (klinik) alt grubu (mukokütan, oküler ve vasküler) ile sağlıklı kontrol grubuna ait toplam 61 örnek üzerinden elde edilen genom boyu miRNA ifadesi verisi ile: I. Öncelikle gruplar arası karşılaştırmalar yapılarak farklı ifade edilen miRNA setleri tespit edilmiştir, II. Elde edilen miRNA ifadesi verisi bir önceki çalışma sonucunda elde edilen mRNA (transkriptom) verisi ile entegre edilerek, gen ontoloji analizleri ile değerlendirilmiştir. Bu biyoinformatik analiz sonuçlarına göre, farklı ifade edildiği tespit edilen miRNA'lar içinden anlamlılık (p değeri), kat değişimi ("Fold Change") ve BS ve/veya inflamasyon ile alakalı yolaklarda yer alması gibi önemli kriterlere bakılarak seçilen miRNA moleküllerinin BS gelişimindeki önemleri tartışılmıştır. Toplam 61 adet örneğin sınıf karşılaştırma ("Class Comparison") analizleri, serbest erişimle (açık kaynak) kullanabilen biyoinformatik analiz yazılımı olan BRB-ArrayTools (v4.6.2) programı ile gerçekleştirilmiştir. Bu yazılım, "R" yazılım dilinde, "Bioconducter" paketini kullanarak ve "Microsoft Excel" eklentisi olarak çalışarak, mikrodizin analizleri yapılmasına olanak sağlamaktadır. Affymetrix GeneChip® miRNA 4.0 mikrodizinleri üzerinde insan miRNA prob setleri ile birlikte farklı organizmalara ait prob setleri de bulunduğundan, elde edilen veri üzerinde, BRB-ArrayTools programı kullanılarak insan (hsa) miRNA'ları filtrelenmiş ve izleyen

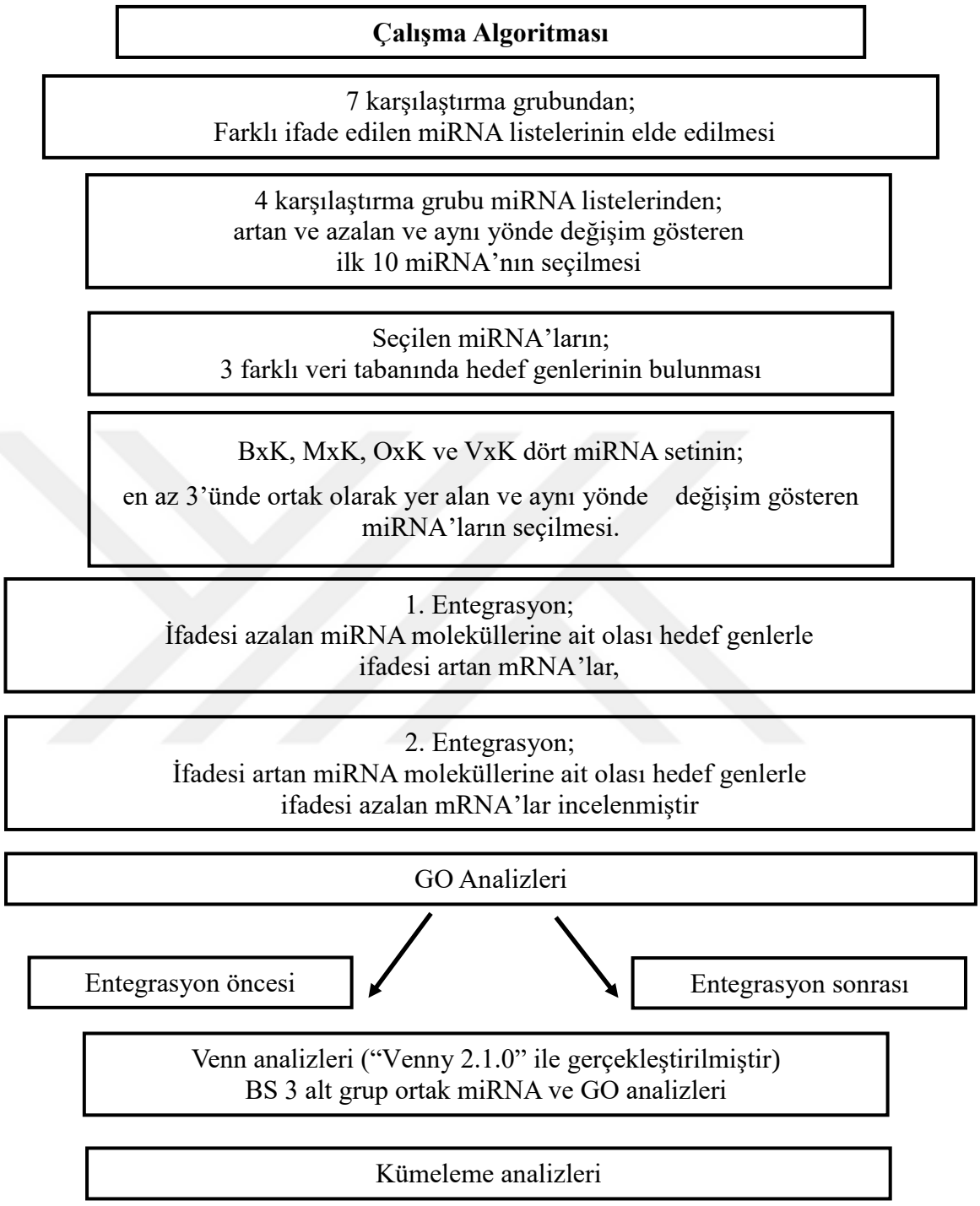
analizler sadece insana ait miRNA'lar üzerinden gerçekleştirilmiştir. Analizi gerçekleştirilen sınıf / grup karşılaştırmaları Şekil 4.4'te gösterilmiştir.



Şekil 4. 4 Sınıf / grup karşılaştırmaları

Bu tez çalışmasında biyoinformatik analizler için bir algoritma tasarlanmıştır. Biyoinformatik filtre uygulanmış söz konusu çalışma algoritması Çizelge 4.6'da yer almaktadır. Yol haritası niteliğindeki algoritmada, karşılaştırma grupları arasında miRNA listeleri oluşturulduktan sonra bu listeler üzerinde belirli biyoinformatik filtreler kullanılarak daha rafine bir miRNA listesine ulaşılmıştır. Söz konusu elde edilen rafine miRNA listeleri ile ileri analizler gerçekleştirilmiştir. (Çizelge 4.4).

Çizelge 4. 4 Tez çalışma algoritması



Grupların karşılaştırılması (“Class Comparison - unpaired t-test”) analizlerinde, tüm karşılaştırmalar 1,25 kat değişimi (artan ve azalan) (“Fold Change”) ve p≤0,05 anlamlılık düzeyi eşikleri kullanılarak gerçekleştirilmiş ve elde edilen farklı ifadeye sahip miRNA sayıları Çizelge 4.5’de gösterilmiştir. Söz konusu farklı ifadeye sahip miRNA setlerinin eksiksiz listeleri EK 3’te sunulmuştur.

Çizelge 4. 5 Grup karşılaştırması sonrası elde edilen farklı ifadeye sahip miRNA sayıları

Karşılaştırılan Gruplar	**Farklı İfade Edilen miRNA Sayıları**		
	***p*≤0,05, FC≥1,25**		
	Toplam	**Artan[1]**	**Azalan[2]**
Behçet (B) x Kontrol (K)	44	39	5
Mukokütan (M) x Kontrol (K)	32	26	6
Oküler (O) x Kontrol (K)	12	10	2
Vasküler (V) x Kontrol (K)	76	66	10
Mukokütan (M) x Oküler (O)	22	9	13
Mukokütan (M) x Vasküler (V)	31	22	9
Oküler (O) x Vasküler (V)	31	27	4

[1] Birinci grupta (örneğin, Behçet) ikinci gruba (örneğin, Kontrol) göre artmış ifade. [2] Birinci grupta (örneğin, Behçet) ikinci gruba (örneğin, Kontrol) göre azalmış ifade. Behçet, tüm Behçet Sendromu olgularını içeren grup; Kontrol, kontrol grubu; FC, “fold change”, kat değişimi; Mukokütan, mukokütan Behçet Sendromlu olguların grubu; Oküler, oküler Behçet Sendromlu olguların grubu; Vasküler, vasküler Behçet Sendromlu olguların grubu.

Behçet Sendromu alt grupları ile kontrol grubu sınıf karşılaştırmaları için p≤0,05 ve FC≥1,25 eşiklerinin seçilmesi ile elde edilen farklı ifadeye sahip miRNA setlerinde, FC değerlerine göre, küçükten büyüğe doğru sıralanmış ilk 10 gen Çizelge 4.6’da gösterilmiştir.

Çizelge 4. 6 Grupların karşılaştırması sonrasında belirlenmiş ve kat değişimi (FC) eşiklerine göre küçükten büyüğe doğru sıralanmış ilk 10 miRNA[1]

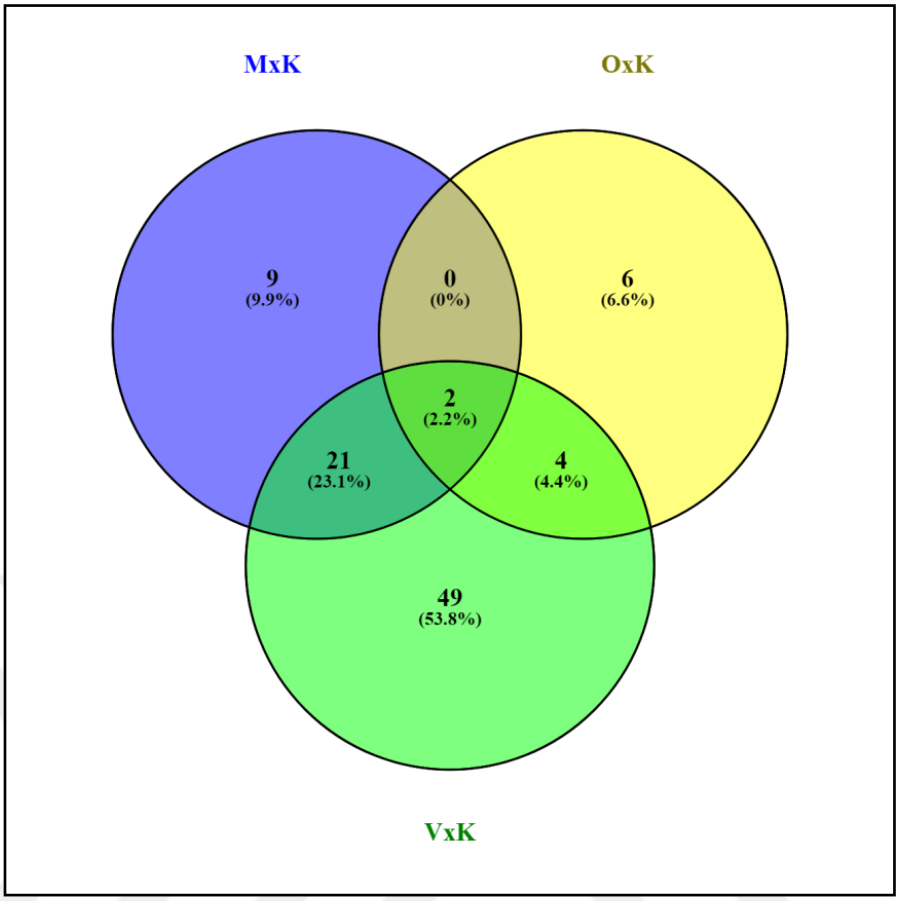
	Artan[2]				**Azalan[3]**		
	miRNA	**FC**	***p***		**miRNA**	**FC**	***p***
			MB x K				
1	hsa-miR-342-5p	1.63	0.005	**1**	hsa-mir-6722	1.38	0.010
2	hsa-miR-629-5p	1.75	0.006	**2**	hsa-miR-451a	1.49	0.025
3	hsa-miR-3184-3p	1.79	0.039	**3**	hsa-miR-6732-5p	2.12	0.030
4	hsa-miR-185-3p	1.82	0.027	**4**	hsa-miR-8075	2.85	0.002
5	hsa-miR-183-5p	1.95	0.018	**5**	hsa-miR-4668-5p	3.84	0.004
6	hsa-miR-210-3p	2	0.030	**6**	hsa-miR-3613-3p	5.55	0.000
7	hsa-miR-3200-3p	2.14	0.015	**7**			
8	hsa-miR-378a-5p	2.32	0.014	**8**			
9	hsa-miR-584-3p	2.55	0.002	**9**			
10	hsa-miR-7641	2.94	0.020	**10**			
			OB x K				
1	hsa-miR-25-5p2	1.3	0.038	**1**	hsa-miR-1268b	1.28	0.033
2	hsa-miR-500a-3p	1.38	0.043	**2**	hsa-miR-181a-5p	1.36	0.018
3	hsa-miR-4286	1.4	0.031	**3**			
4	hsa-miR-183-3p2	1.4	0.042	**4**			
5	hsa-miR-30a-5p	1.48	0.045	**5**			
6	hsa-miR-320e	1.87	0.008	**6**			
7	hsa-miR-484	1.95	0.038	**7**			
8	hsa-miR-345-5p	2.15	0.014	**8**			
9	hsa-miR-363-3p	2.21	0.039	**9**			
10	hsa-miR-193a-5p	3.09	0.009	**10**			
			VB x K				
1	hsa-miR-20b-5p	2.39	0.012	**1**	hsa-miR-4516	1.28	0.029
2	hsa-miR-210-3p	2.41	0.004	**2**	hsa-miR-6087	1.35	0.008
3	hsa-miR-1307-3p	2.47	0.001	**3**	hsa-mir-6722	1.49	0.002
4	hsa-miR-424-3p	2.51	0.000	**4**	hsa-miR-150-5p	1.5	0.002
5	hsa-miR-584-3p	2.82	0.002	**5**	hsa-miR-4497	1.53	0.013
6	hsa-miR-5100	2.83	0.012	**6**	hsa-miR-451a	1.61	0.003
7	hsa-miR-193a-5p	2.94	0.008	**7**	hsa-mir-320e	1.72	0.040
8	hsa-miR-3940-3p	3.08	0.019	**8**	hsa-miR-8075	2.43	0.006
9	hsa-miR-503-5p	3.15	0.000	**9**	hsa-miR-6732-5p	2.63	0.006
10	hsa-miR-183-5p	3.18	0.000	**10**	hsa-miR-4668-5p	2.94	0.048

Çizelge 4. 6 Grupların karşılaştırması sonrasında belirlenmiş ve kat değişimi (FC) eşiklerine göre küçükten büyüğe doğru sıralanmış ilk 10 miRNA[1](devam)

	Artan[2]				**Azalan[3]**		
	miRNA	**FC**	***p***		**miRNA**	**FC**	***p***
	B x K						
1	hsa-miR-151b	1.71	0.039	**1**	hsa-miR-150-5p	1.26	0.038
2	hsa-miR-503-5p	1.71	0.041	**2**	hsa-mir-6722	1.33	0.003
3	hsa-miR-4443	1.75	0.033	**3**	hsa-miR-451a1	1.44	0.011
4	hsa-miR-210-3p	1.78	0.040	**4**	hsa-miR-4668-5p1	2.7	0.011
5	hsa-miR-4732-5p	1.8	0.021	**5**	hsa-miR-3613-3p	3.03	0.008
6	hsa-miR-183-5p	1.97	0.008	**6**			
7	hsa-miR-193a-5p	1.99	0.048	**7**			
8	hsa-miR-378a-5p	2	0.011	**8**			
9	hsa-miR-345-5p	2.01	0.003	**9**			
10	hsa-miR-584-3p	2.40	0.005	**10**			

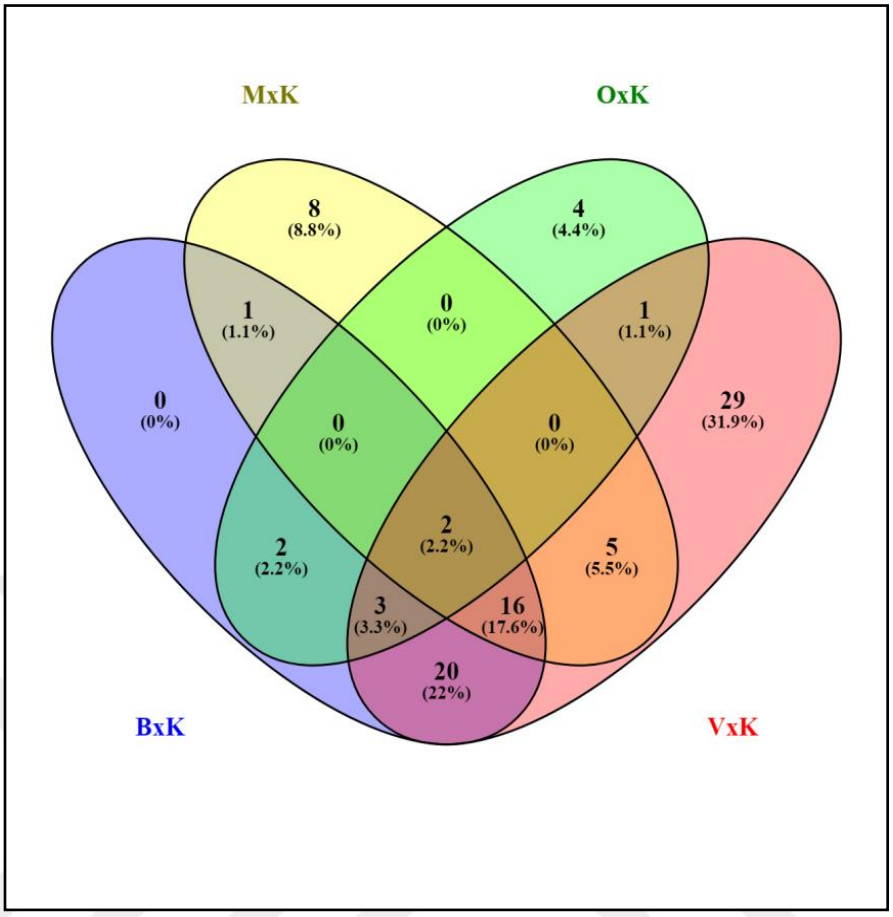
[1] Karşılaştırma grupları (MB x K, OB x K, VB x K, B xK) ($p \leq 0,05$ ve FC≥1,25).
[2] İlk grupta (örneğin, M) ikinci gruba (örneğin, C) göre artmış ifade.
[3] İlk grupta (örneğin, M) ikinci gruba (örneğin, K) göre azalmış ifade.
K: Kontrol, MB: Mukokütan Behçet, OB: Oküler Behçet, VB: Vasküler Behçet, B: tüm Behçet olgularını içeren grup, FC: Kat değişimi (fold change).

BS alt grupları ve kontrol grubu arasındaki grup karşılaştırmaları sonrasında (MB x K, OB x K ve VB x K, hepsi için $p \leq 0,05$ ve FC≥1.25) elde edilen farklı ifadeye sahip miRNA setleri ile yapılan "Venn" analizi sonuçları Şekil 4.5'de yer almaktadır. MBxK ∩ OBxK ∩ VBxK kesişim kümesinde hsa-miR-25-5p ve hsa-miR-183-3p ortak miRNA olarak bulunmuştur.



Şekil 4. 5 BS alt grupları miRNA kesişim kümesi (K, kontrol grubu; M, mukokütan Behçet sendromlu olguların grubu; O, oküler Behçet sendromlu olguların grubu; V, vasküler Behçet sendromlu olguların grubu.)

Tüm Behçet Sendromu olgularını içeren grup ile kontrol grubu arasında gerçekleştirilen sınıf karşılaştırmasında elde edilen miRNA setinin yukarıdaki "Venn" analizine dâhil edilmesi ile ulaşılan diyagram Şekil 4.6'da sunulmuştur (tüm karşılaştırmalar için $p \leq 0,05$ ve $FC \geq 1,25$).



Şekil 4. 6 Tüm gruplar miRNA kesişim kümesi (BxK ∩ MxK ∩ OxK ∩ VxK: **hsa-miR-25-5p**, **hsa-miR-183-3p**)

Gerçekleştirilen Behçet x Kontrol, Mukokütan x Kontrol, Oküler x Kontrol ve Vasküler x Kontrol sınıf karşılaştırmaları ile elde edilen dört adet farklı ifadeye sahip miRNA setinin en az 3'ünde ortak olarak yer alan ve aynı yönde değişim (ifade artışı ↑ ya da ifade azalışı ↓) gösteren miRNA'lar Çizelge 4.7'de gösterilmiştir.

Çizelge 4. 7 Karşılaştırmaların en az 3'ünde ortak olan ve aynı yönde değişim gösteren miRNA'lar

	miRNA	BxK	MxK	OxK	VxK	miRBase	Yorum
1	hsa-miR-182-5p[1]	+	+	-	+	High con.	3/4 (+)
2	hsa-miR-183-3p[1]	+	+	+	+	High con.	4/4 (+)
3	hsa-miR-183-5p[1]	+	+	-	+	High con.	3/4 (+)
4	hsa-miR-185-3p[1]	+	+	-	+	High con.	3/4 (+)
5	hsa-miR-193a-5p[1]	+	-	+	+	High con.	3/4 (+)
6	hsa-miR-199a-5p[1]	+	+	-	+	High con.	3/4 (+)
7	hsa-miR-210-3p[1]	+	+	-	+	High con.	3/4 (+)
8	hsa-miR-25-5p[1]	+	+	+	+	High con.	4/4 (+)
9	hsa-miR-3130-5p[1]	+	+	-	+	NED	3/4 (+)
10	hsa-miR-320d[1]	+	+	-	+	NED	3/4 (+)
11	hsa-miR-345-5p[1]	+	-	+	+	High con.	3/4 (+)
12	hsa-miR-378a-5p[1]	+	+	-	+	High con.	3/4 (+)
13	hsa-miR-451a[2]	+	+	-	+	NED	3/4 (+)
14	hsa-miR-4668-5p[2]	+	+	-	+	NED	3/4 (+)
15	hsa-miR-500a-3p[1]	+	-	+	+	High con.	3/4 (+)
16	hsa-miR-502-3p[1]	+	+	-	+	High con.	3/4 (+)
17	hsa-miR-550a-5p[1]	+	+	-	+	High con.	3/4 (+)
18	hsa-miR-584-3p[1]	+	+	-	+	High con.	3/4 (+)
19	hsa-miR-629-5p[1]	+	+	-	+	High con.	3/4 (+)
20	hsa-mir-6722[2]	+	+	-	+	NED	3/4 (+)
21	hsa-miR-744-5p[1]	+	+	-	+	High con.	3/4 (+)

[1] Olgu grubunda kontrol grubuna oranla artmış ifadeye sahip miRNA.
[2] Olgu grubunda kontrol grubuna oranla azalmış ifadeye sahip miRNA. B: tüm BS olguları grubu, M: Mukokütan Behçet, O: Oküler Behçet, V: Vasküler Behçet, K: Kontrol

4.4.4 Farklı ifadeye sahip miRNA moleküllerine ait olası hedef genler

Sınıf karşılaştırmaları (Behçet x Kontrol, Mukokütan x Kontrol, Oküler x Kontrol ve Vasküler x Kontrol) ile elde edilen farklı ifadeye sahip miRNA setlerinde yer alan ve FC'ye göre en düşük ve en yüksek ilk 10 içinde bulunan miRNA'lara ait olası hedef genler mirDIP, miRWalk, TargetScan veritabanları / ağ sunucuları incelenerek tespit edilmiştir (Çizelge 4.8).

Çizelge 4. 8 miRNA moleküllerine ait olası hedef gen sayıları[1]

miRNA	**Hedef gen sayıları**			**miRBase**
	mirDIP	**miRWalk**	**TargetScan**	
hsa-miR-3613-3p[2]	810	254	**8611**	High con.
hsa-miR-4668-5p[2]	869	119	**7921**	NED
hsa-miR-451a[2]	**576**	427	29	NED
hsa-mir-6722[2]	727 / 950	**1647** / 3653	1156 / **5209**	NED
hsa-miR-150-5p[2]	1100	**2456**	356	High con.
hsa-miR-151b[3]	815	**1579**	10	NED
hsa-miR-503-5p[3]	895	**2340**	311	High con.
hsa-miR-4443[3]	900	2579	**4481**	NED
hsa-miR-210-3p[3]	1100	**2162**	42	High con.
hsa-miR-4732-5p[3]	906	**4201**	2607	NED
hsa-miR-183-5p[3]	784	**1984**	509 / 805	High con.
hsa-miR-193a-5p[3]	896	**3123**	223	High con.
hsa-miR-378a-5p[3]	856	3292	**5497**	High con.
hsa-miR-345-5p[3]	856	2874	**3527**	High con.
hsa-miR-584-3p[3]	851	2442	**3858**	High con.
hsa-miR-3613-3p[2]	810	254	**8611**	High con.
hsa-miR-4668-5p[2]	869	119	**7921**	NED
hsa-miR-8075[2]	909	2766	**3405**	NED
hsa-miR-6732-5p[2]	932	**4114**	2855	NED
hsa-miR-451a[2]	**576**	427	29	NED
hsa-mir-6722[2]	727 / 950	**1647** / 3653	1156 / **5209**	NED
hsa-miR-342-5p[3]	924	3025	**4139**	High con.
hsa-miR-629-5p[3]	893	2007	**3746**	High con.
hsa-miR-3184-3p[3]	837	**3808**	3530	NED
hsa-miR-185-3p[3]	908	3249	**5145**	High con.
hsa-miR-183-5p[3]	784	**1984**	509 / 805	High con.
hsa-miR-210-3p[3]	1100	**2162**	42	High con.
hsa-miR-3200-3p[3]	796	2276	**2349**	High con.
hsa-miR-378a-5p[3]	856	3292	**5497**	High con.
hsa-miR-584-3p[3]	851	2442	**3858**	High con.
hsa-miR-7641[3]	-	-	**3505**	-
hsa-miR-181a-5p[2]	791	757	**1371**	High con.
hsa-miR-1268b[2]	932	**3980**	1790	NED
hsa-miR-25-5p[3]	909	**3838**	1878	High con.
hsa-miR-500a-3p[3]	837	**3111**	3073	High con.
hsa-miR-4286[3]	786	2250	**4674**	NED
hsa-miR-183-3p[3]	708	1048	**4672**	High con.
hsa-miR-30a-5p[3]	741	425	**1576**	High con.
hsa-miR-320e[3]	843	1631	**4219**	NED

Çizelge 4.8 miRNA moleküllerine ait olası hedef gen sayıları[1] (devam)

hsa-miR-484[3]	878	3054	**4938**	NED
hsa-miR-345-5p[3]	856	2874	**3527**	High con.
hsa-miR-363-3p[3]	733	915	**1041**	High con.
hsa-miR-193a-5p[3]	896	**3123**	223	High con.
hsa-miR-4668-5p[2]	869	119	**7921**	NED
hsa-miR-6732-5p[2]	932	**4114**	2855	NED
hsa-miR-8075[2]	909	2766	**3405**	NED
hsa-mir-320e[2]	843	1631	**4219**	NED
hsa-miR-451a[2]	**576**	427	29	NED
hsa-miR-150-5p[2]	1100	**2456**	356	High con.
hsa-miR-4497[2]	850	**2110**	985	NED
hsa-mir-6722[2]	727 / 950	**1647** / 3653	1156, **5209**	NED
hsa-miR-6087[2]	-	-	**2591**	NED
hsa-miR-4516[2]	935	3706	**5933**	NED
hsa-miR-20b-5p[3]	1099	**2217**	1385	High con.
hsa-miR-210-3p[3]	1100	**2162**	42	High con.
hsa-miR-1307-3p[3]	861	1362	**1695**	High con.
hsa-miR-424-3p[3]	726	1166	**1772**	High con.
hsa-miR-584-3p[3]	851	2442	**3858**	High con.
hsa-miR-5100[3]	838	2533	**4008**	NED
hsa-miR-193a-5p[3]	896	**3123**	223	High con.
hsa-miR-3940-3p[3]	830	**2596**	1098	High con.
hsa-miR-503-5p[3]	895	**2340**	311	High con.
hsa-miR-183-5p[3]	784	**1984**	509 / 805	High con.
hsa-miR-20b-5p[3]	1099	**2217**	1385	High con.

[1] Farklı veritabanlarındaki en yüksek olası hedef gen sayısı kalın karakterlerle gösterilmiştir.
[2] Olgu grubunda kontrol grubuna oranla azalmış ifade.
[3] Olgu grubunda kontrol grubuna oranla artmış ifade.B: tüm BS olguları grubu, M: Mukokütan Behçet, O: Oküler Behçet, V: Vasküler Behçet, K: Kontrol

Belirlenen FC değerlerine göre ifadesi en düşük ve en yüksek ilk 10 içinde bulunmadığı halde, Behçet x Kontrol, Mukokütan x Kontrol, Oküler x Kontrol ve Vasküler x Kontrol sınıf karşılaştırmalarının en az 3'ünde ortak olarak yer alan ve aynı yönde değişim (ifade artışı ya da ifade azalışı) gösteren miRNA moleküllerine ait olası hedef gen sayıları Çizelge 4.9'da yer almaktadır.

Çizelge 4. 9 Seçilen ilk 10 miRNA içinde bulunmayan miRNA moleküllerine ait olası hedef gen sayıları[1]

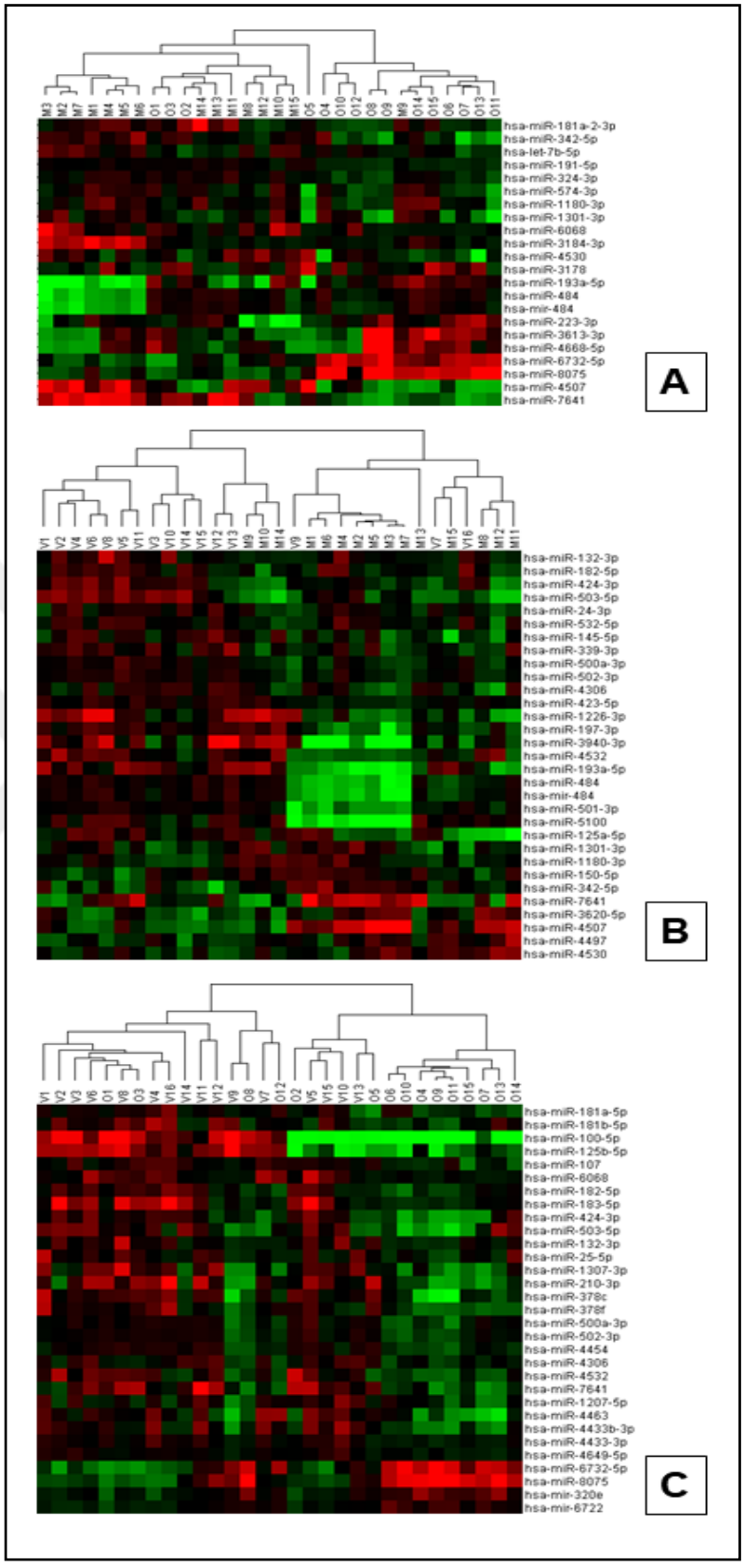
miRNA	Hedef Gen Sayıları		
	mirDIP	**miRWalk**	**TargetScan**
hsa-miR-182-5p[2]	804	**1530**	1329
hsa-miR-185-3p[2]	908	3249	**5145**
hsa-miR-199a-5p[2]	838	**2064**	634
hsa-miR-3130-5p[2]	823	2739	**3433**
hsa-miR-320d[2]	840	**2837**	847
hsa-miR-345-5p[2]	856	2874	**3527**
hsa-miR-378a-5p[2]	856	3292	**5497**
hsa-miR-500a-3p[2]	837	**3111**	3073
hsa-miR-502-3p[2]	729	**3084**	210
hsa-miR-550a-5p[2]	895	3715	**4388**
hsa-miR-629-5p[2]	893	2007	**3746**
hsa-miR-744-5p[2]	925	**3575**	48

[1] Farklı veritabanlarındaki en yüksek olası hedef gen sayısı kalın karakterlerle gösterilmiştir.
[2] Olgu grubunda kontrol grubuna oranla artmış ifade.

4.4.5 BS klinik alt grupları ile yapılan kümeleme analizlerine ait bulgular

BS klinik alt grupları arasında yapılan kümeleme analizi sonuçlarına ait ısı harita (heatmap) ve dendogram gösterimleri Şekil 4.7'de verilmiştir. Kümeleme analizleri için kullanılan *p* ve FC eşik değerleri, sırasıyla, ≤0,05 ve ≥1,25'dir. Hiyerarşik kümele analizi sonucunda elde edilen Şekil 4.7'de bulunan heatmapler, bu grupların listelerdeki farklı ifade edilen miRNA'lar yardımıyla da birbirlerinden ayrılabildiğini göstermiştir. Şekil 4.7-A'da görüldüğü üzere mukokütan x oküler grup 22, mukokütan x vasküler grup 31 ve oküler x vasküler grup ise yine 31 farklı ifade edilen miRNA ile iki ayrı grupta kümelenmiştir. Bu kümelenmeler her ne kadar % 100 olmasa da gruplar arasında bir moleküler profil elde edilebilmektedir. Bu tez çalışmasında genom ebadında miRNA ifade profillemesi yapılarak 3 grup arasında ifade düzeyleri anlamlı şekilde artan veya azalan miRNA'ların bulunması ve bulunan bu miRNA'ların kullanılmasıyla gruplar arasında spesifik bir profil olup olmadığının tespit edilmesi amacıyla yapılan hiyerarşik kümele analizi sonuçlarında, Şekil 4.7-A'da gösterilen mukokütan x oküler grubunda görülen kümelenmede; mukokütan olgularda hsa-miR-193a-5p ve hsa-miR-484 miRNA'ları ile ifade azalışı yönünde, oküler olgularda ise hsa-miR-6732-5p ve hsa-miR-8075 miRNA'ları ile ifade artışı yönünde net bir profil sunmuşlardır. Şekil 4.7-B'de

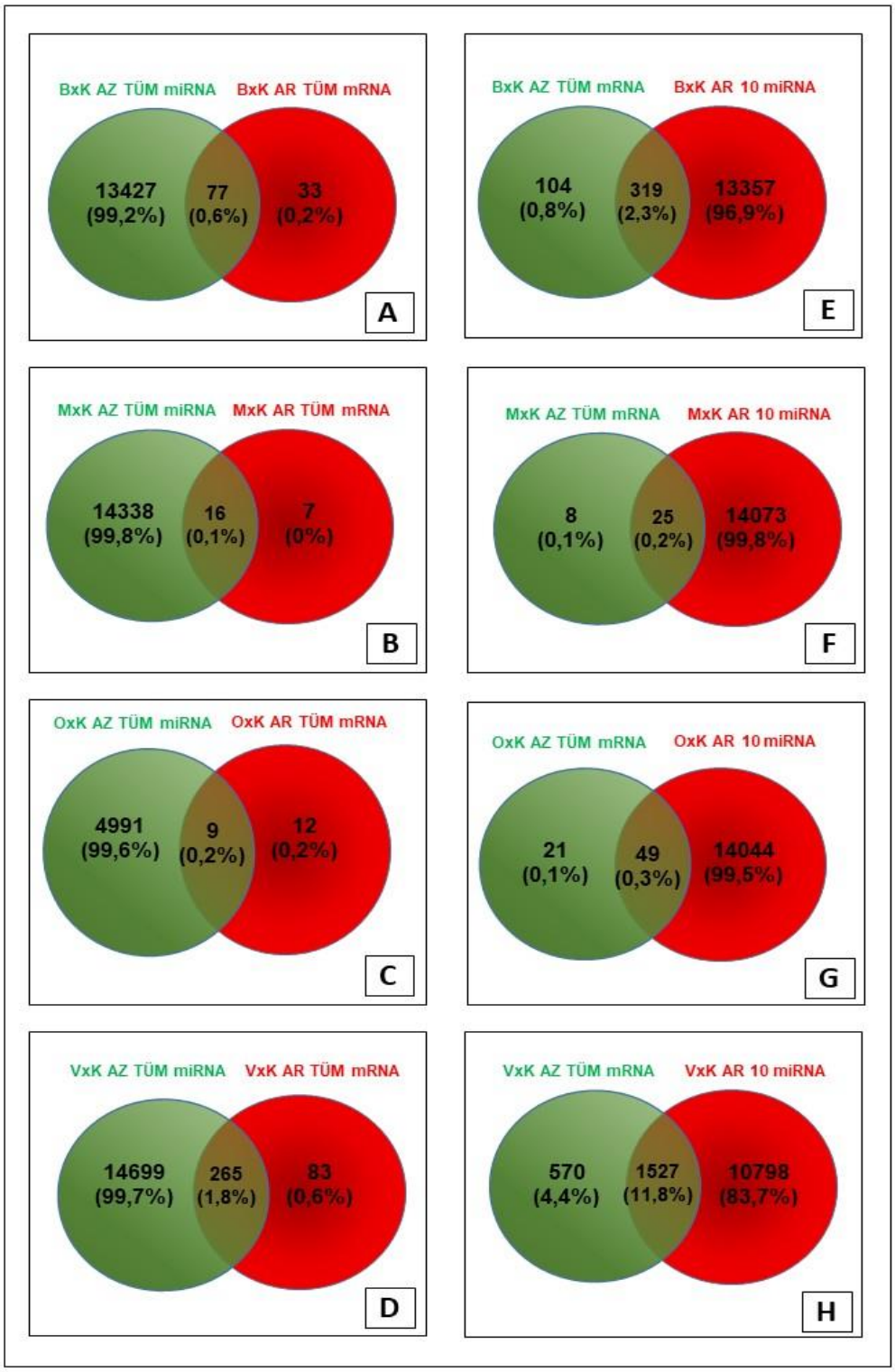
gösterilen mukokütan x vasküler grubunda görülen kümelenmede; mukokütan olgularda hsa-miR-3940-3p, hsa-miR-193a-5p, hsa-miR-484, hsa-miR-501-3p ve hsa-miR-5100 miRNA'ları ile ifade azalışı yönünde, aynı olgularda hsa-miR-7641, hsa-miR-3520-5p, hsa-miR-4507 miRNA'ları ile ifade artışı yönünde net bir profil sunmuşlardır. Şekil 4.7-C'de gösterilen oküler x vasküler grubunda görülen kümelenmede; oküler olgularda hsa-miR-6732-5p, hsa-miR-8075 miRNA'ları ile ifade artışı yönünde iken vasküler olgularda ifade azalışı yönünde, oküler olgularda hsa-miR-125b-5p ve hsa-miR-100-5p miRNA'ları ile ifade azalışı yönünde iken vasküler olgularda ise ifade artışı yönünde net bir ayırıcı profil sunmuşlardır.



Şekil 4. 7 Behçet Sendromu alt grupları arasında gerçekleştirilen kümeleme analizleri (Mukokütan x Oküler [A], Mukokütan x Vasküler [B] ve Oküler x Vasküler [C], olgular sütunlarda ve miRNA molekülleri satırlarda yer almaktadır.)

4.4.6 miRNom ve transkriptom bulgularının entegrasyonu

Türk BS olgularında gerçekleştirilmiş olan transkriptom analizi bulguları ile mevcut miRNom bulgularının entegrasyonu amacıyla yapılan "Venn" analizlerine ait diyagramlar Şekil 4.8'de sunulmuştur. Bu çalışmadaki, 4 karşılaştırma grubundan (BxK, MxK, OxK, VxK) elde edilen farklı ifade düzeyine sahip miRNA'ların in siliko ortamda çeşitli veri tabanlarından elde edilmiş olan hedef genleri ile daha önce BS olgularında gerçekleştirilmiş olan transkriptom analizi çalışmasında elde edilen genler Venn analizi ile bir araya getirilerek kesişim kümelerinde bulunan ortak genler elde edilmiştir. Entegrasyon çalışmasıyla farklı ifade edilen genlerin 3/4'ü ve 2/3'ü arasındaki oranlarda yeni ve adeta rafine edilmiş gen setleri ortaya konmuştur. Şekil 4.8'de genlere ait sayılar şeklinde özet olarak sunulmuş transkriptom analizi gen listeleri ve kesişim kümelerine ait gen listeleri, EK 4'de detaylarıyla yer almaktadır.



Şekil 4. 8 miRNom ve Transkriptom bulgularının entegrasyonu amacıyla gerçekleştirilen "Venn" analizi diyagramları diyagramları ([A], [B], [C] ve [D]'de sırasıyla, BxK, MxK, OxK ve VxK için ifadesi azalan miRNA moleküllerine ait olası hedef genlerle ifadesi artan mRNA'lar, [E], [F], [G]ve [H]'de ise sırasıyla, yine BxK, MxK, OxK ve VxK için ifadesi artan miRNA moleküllerine ait olası hedef genlerle ifadesi azalan mRNA'lar incelenmiştir)

4.4.7 Gen ontolojisi analizlerine ait bulgular

Behçet Sendromu olguları / alt grupları ile kontrol grubu arasındaki sınıf karşılaştırmalarında belirlenen farklı ifadeye sahip miRNA moleküllerinin olası hedef gen setlerinin incelendiği gen ontolojisi analizlerine ait önemli bulgular Çizelge 4.10'da gösterilmiştir.

Çizelge 4. 10 Sınıf karşılaştırmalarında belirlenen miRNA moleküllerine ait olası hedef gen setlerinin incelendiği gen ontolojisi analizi bulguları[1, 2, 3]

miRNA-mRNA Entegrasyonu Öncesi GO Analizi[4]			**miRNA-mRNA Entegrasyonu Sonrası GO Analizi[5]**		
	GO ID	**GO Terimi**		**GO ID**	**GO Terimi**
BxK					
1	GO:0043312	Nötrofil degranülasyonu	**1**	GO:2000510	Dendritik hüc. kemotaksisi (+) düzen.
2	GO:0016032	Viral süreç	**2**	GO:0039531	Viral indük. sitop. PRR sin. yol. düzen.
3	GO:0006954	Enflamatuvar yanıt	**3**	GO:0098586	Virusa hücresel yanıt
4	GO:0045087	Doğal bağışıklık yanıtı	**4**	GO:0002381	İmmunoglobulin üretimi
5	GO:0006955	Bağışıklık yanıtı	**5**	GO:0032649	İnterferon-gamma üretiminin düzen.
6	-	-	**6**	GO:0002262	Myeloid hücre homeostazisi
7	-	-	**7**	GO:0042113	B hücre aktivasyonu
8	-	-	**8**	GO:0002440	Bağışıklık yanıtı mol. mediatör. üretimi
9	-	-	**9**	GO:0050851	Antijen reseptörü aracılı sinyal yolağı
10	-	-	**10**	GO:0002449	Lenfosit aracılı bağışıklık
11	-	-	**11**	GO:0006959	Hümoral bağışıklık yanıtı
12	-	-	**12**	GO:0030098	Lenfosit farklılaşması
13	-	-	**13**	GO:0030099	Myeloid hücre farklılaşması
14	-	-	**14**	GO:0002250	Adaptif bağışıklık yanıtı
15	-	-	**15**	GO:0002521	Lökosit farklılaşması
MxK					
1	GO:0043312	Nötrofil degranülasyonu	**1**	GO:0002831	Biyotik uyarıya yanıtın düzen.
2	GO:0016032	Viral süreç	**2**	GO:0034341	İnterferon-gamma'ya yanıt
3	GO:0006954	Enflamatuvar yanıt	**3**	GO:0007249	I-kappaB kinaz / NF-kappaB sinyali
4	GO:0045087	Doğal bağışıklık yanıtı	**4**	GO:0036230	Granülosit aktivasyonu
5	GO:0006955	Bağışıklık yanıtı	**5**	GO:0034612	Tümör nekroz faktörü'ne yanıt
6	GO:0019221	Sitokin aracılı sinyal yolağı	**6**	GO:0002446	Nötrofil aracılı bağışıklık
7	GO:0000165	MAPK kaskadı	**7**	GO:0032103	Dış uyarıya yanıtın (+) düzen.
8	-	-	**8**	-	-
9	-	-	**9**	-	-
10	-	-	**10**	-	-
11	-	-	**11**	-	-
12	-	-	**12**	-	-
13	-	-	**13**	-	-
14	-	-	**14**	-	-
15	-	-	**15**	-	-

Çizelge 4. 10 Sınıf karşılaştırmalarında belirlenen miRNA moleküllerine ait olası hedef gen setlerinin incelendiği gen ontolojisi analizi bulguları[1, 2, 3] (devam)

miRNA-mRNA Entegrasyonu Öncesi GO Analizi[4]			**miRNA-mRNA Entegrasyonu Sonrası GO Analizi[5]**		
	GO ID	**GO Terimi**		**GO ID**	**GO Terimi**
OxK					
1	GO:0043312	Nötrofil degranülasyonu	**1**	GO:0002725	T hücre sitokin üretiminin (-) düzen.
2	GO:0016032	Viral süreç	**2**	GO:2000551	Th2 hücre sitokin üretiminin düzen.
3	GO:0045087	Doğal bağışıklık yanıtı	**3**	GO:0002829	Tip 2 bağışıklık yanıtın (-) düzen.
4	GO:0006954	Enflamatuvar yanıt	**4**	GO:0032703	IL-2 üretiminin (-) düzen.
5	GO:0006955	Bağışıklık yanıtı	**5**	GO:2000515	CD4(+) αβ-T hücre aktivas. (-) düzen.
6	GO:0000165	MAPK kaskadı	**6**	GO:0002828	Tip 2 bağışıklık yanıtın düzen.
7	-	-	**7**	GO:0046636	αβ-T hücre aktivas. (-) düzen.
8	-	-	**8**	GO:0042092	Tip 2 bağışıklık yanıtı
9	-	-	**9**	GO:0032663	IL-2 üretiminin düzen.
10	-	-	**10**	GO:0032623	IL-2 üretimi
11	-	-	**11**	GO:0006968	Hücresel savunma yanıtı
12	-	-	**12**	GO:0002287	Bağışık. yanıt. rol alan αβ-T hücre akt.
13	-	-	**13**	GO:0046634	αβ-T hücre aktivasyonunun düzen.
14	-	-	**14**	GO:0046632	αβ-T hücre farklılaşması
15	-	-	**15**	GO:0002456	T hücre aracılı bağışıklık
VxK					
1	GO:0043312	Nötrofil degranülasyonu	**1**	GO:0046649	Lenfosit aktivasyonu
2	GO:0016032	Viral süreç	**2**	GO:0044403	Simbiyont süreci
3	GO:0006954	Enflamatuvar yanıt	**3**	GO:0016032	Viral süreç
4	GO:0045087	Doğal bağışıklık yanıtı	**4**	GO:0044419	Organizmalar arasında türler arası etki.
5	GO:0006955	Bağışıklık yanıtı	**5**	-	-
6	GO:0000165	MAPK kaskadı	**6**	-	-
7	GO:0019221	Sitokin aracılı sinyal yolağı	**7**	-	-
8	-	-	**8**	-	-
9	-	-	**9**	-	-
10	-	-	**10**	-	-
11	-	-	**11**	-	-
12	-	-	**12**	-	-
13	-	-	**13**	-	-
14	-	-	**14**	-	-
15	-	-	**15**	-	-

[1] İmmünopatolojik önemi olduğu öngörülen ilk 15 GO kategorisi gösterilmektedir.[2] Gen Ontolojisi terimi zenginleşme analizi spesifik olarak, Biyolojik Süreç ("Biological Process") alt başlığı üzerinde odaklanmıştır.[3] Çizelgede yer alan bulguların sade bir şekilde sunulabilmesi amacıyla, *p* değeri, FDR, zenginleşme oranı gibi değişkenler çizelgede gösterilmemiştir.[4] Entegrasyon öncesi GO analizleri miRWalk veritabanı üzerindeki GSEA ("Gene Set Enrichment Analysis") aracı kullanılarak gerçekleştirilmiştir.[5] Entegrasyon sonrası GO analizleri WebGestalt ("Web-based Gene Set Analysis Toolkit") ağ aracı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. B, tüm Behçet Sendromu olgularını içeren grup; GO, gen ontolojisi; K, kontrol grubu; M, mukokütan Behçet Sendromlu olguların grubu; O, oküler Behçet Sendromlu olguların grubu; V, vasküler Behçet Sendromlu olguların grubu.

Behçet x Kontrol, Mukokütan x Kontrol, Oküler x Kontrol ve Vasküler x Kontrol sınıf karşılaştırmalarının tamamında, farklı ifadeye sahip miRNA setleri içinde ortak olarak yer alan ve yine ortak bir şekilde, olgu gruplarında kontrol grubuna oranla ifade artışı yönünde değişim gösteren iki miRNA molekülü olan hsa-miR-25-5p ve hsa-miR-183-3p'ye ait olası hedef genler kullanılarak gerçekleştirilen gen ontolojisi analizinde, 1. GO:0043312 "Nötrofil degranülasyonu", 2. GO:0016032 "Viral süreç", 3. GO:0045087 "Doğal bağışıklık yanıtı", 4. GO:0006955 "Bağışıklık yanıtı" ve 5. GO:0006954 "Enflamatuvar yanıt" terimleri önemli zenginleşme göstermiştir.

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Türk BS olgularında hastalık gelişiminde rol oynayan miRNA aracılı epigenetik hastalık mekanizmalarının aydınlatılmasının, mevcutsa, bir sendrom mu yoksa bir hastalık mı olduğu konusunda kesin bir uzlaşma bulunmayan BS'yi tanımlayabilecek karakteristik miRNA moleküler imzalarının tanımlanmasının ve hedefe yönelik tedavi yaklaşımları geliştirilmesi için değer taşıyabilecek miRNA moleküllerine ulaşılmasının amaçlandığı bu tez çalışmasında, (1) Türk BS olguları ile uyumlu seçilmiş sağlıklı kontrol grubu bireylerinde karşılaştırmalı genom ölçekli miRNA ifade analizi gerçekleştirilmiş, hasta ve kontrol grupları arasında farklı ifadeye sahip miRNA setleri belirlenmiş, (2) söz konusu miRNA setleri, biyoinformatik ve gen ontoloji analizleri ile değerlendirilmiş (3) ve mevcut genom ölçekli miRNA ifade bulguları, yine Türk BS olgularına ait, önceden elde edilmiş olan bir transkriptom verisi ile entegre edilerek yeniden incelenmiş (4) ve elde edilmiş olan miRNA listeleri literatürdeki BS durumunda yapılmış mevcut, genom ölçekli miRNA ifade analizi verileriyle mukayese edilmiştir.

Behçet bir hastalık mıdır bir sendrom mudur?

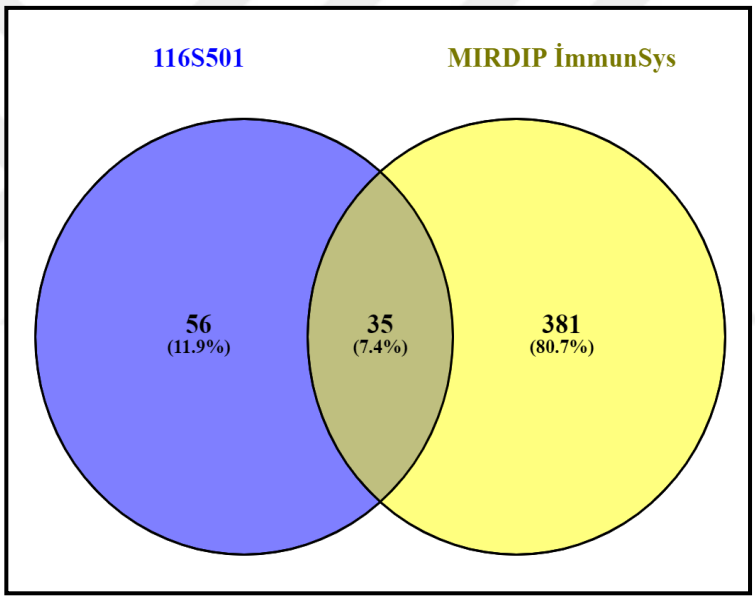
Bu tez çalışmasının tasarımı, ilgili literatür içinde bulunan ve BS'de genom ölçekli gerçekleştirilmiş olan diğer çalışmalardan farklıdır (Erre vd. 2015, Puccetti vd. 2018). BS ile ilgili yapılan genom ölçekli çalışmalarda, olgular farklı klinik özelliklerine göre gruplara ayrılmış olsalar da tek bir öbek altında araştırılmaktadır (Erre vd. 2015, Puccetti vd. 2018). Mevcut tez çalışmasında ise araştırma ekibimiz tarafından daha önce gerçekleştirilmiş BS'de transkriptom çalışması sırasında, BS olguları klinik özelliklerine göre alt gruplarına ayrılarak birbirleri ile kıyaslanmış ve bu alt gruplar arasında elde edilen gen ifadesi değişikliklerinden ve farklı moleküler hastalık mekanizmalarından yola çıkarak bir başka çalışmalarında BS olgularını klinik özelliklerine uygun olacak şekilde alt gruplara ayırarak inceledikleri bir makale yayınlamışlardır. (Oğuz vd. 2016). Bu tez çalışması sonucunda elde edilen bulgular, (1) farklı klinik özellikler sergileyen BS olguları arasında miRNA ifade farklılıkları bulunduğunu (Çizelge 4.5), (2) 21 miRNA molekülünün BS patogenezinde rol oynuyor olabileceğini (Çizelge 4.7), (3) BS durumunda miRNom ve transkriptom verilerinin entegrasyonunun, tek başına miRNom verisinin incelenmesine oranla, özellikle gen ontolojisi analizlerinde daha detaylı ve

özgül bilgiler sağladığını ve BS klinik alt gruplarının moleküler profillerinin etnik/coğrafi kökene bağlı farklılıklar gösterdiğini ortaya koymuştur.

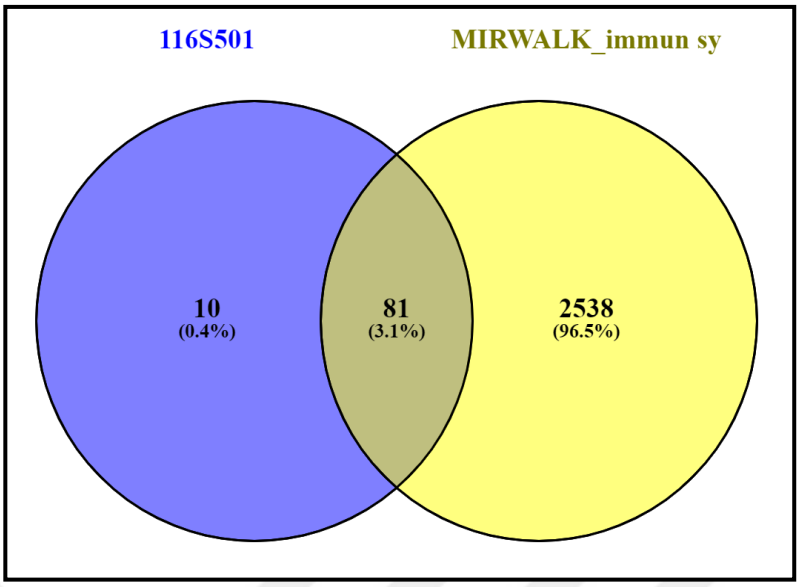
BS'nin farklı klinik öbekleri arasındaki moleküler düzeydeki heterojenitenin yanısıra bu farklı klinik gruplardaki BS olgularında ortak olan mukokütan bulgular da mevcuttur. Tüm klinik alt gruplarda, tekrarlayan oral ve genital ülserler, enflamatuvar deri lezyonları ve paterji testi pozitifliği ortak olan bulgulardır. Bu durum, BS klinik alt grupları arasında ortak bir patogenetik bileşen bulunabileceğini göstermektedir. Bu çalışmada, farklı klinik özellikler sergileyen BS olguları arasında miRNA ifade farklılıklarının değerlendirilmesi amacıyla yapılan BS klinik alt grupları ile kontrol grubu arasında yapılan sınıf karşılaştırmalarında (Mukokütan x Kontrol, Oküler x Kontrol ve Vasküler x Kontrol, hepsi için $p \leq 0,05$ ve $FC \geq 1,25$) elde edilen farklı ifadeye sahip miRNA setleri kullanılarak gerçekleştirilen "Venn" analizi diyagramı Şekil 4.5.'te sunulmuştu. Bu "Venn" analizine ait üçlü kesişim kümesinde ($M \times K \cap O \times K \cap V \times K$) sadece 2 adet miRNA molekülünün (hsa-miR-25-5p ve hsa-miR-183-3p) yer alıyor olması, klinikte ortak olarak aynı isimle (Behçet Sendromu) tanımlanan bu hastalık antitelerinin, moleküler düzeydeki ortak patolojilerinin tahmin edildiğinden daha sınırlı olduğuna ve sınırlı ortak patogenetik bileşen bulunmasına işaret etmektedir. Daha önce araştırma ekibimiz tarafından gerçekleştirilmiş olan BS durumunda transkriptom çalışması bulgularında ortaya konan, BS klinik alt gruplarının kesişim kümesinde 2 genin (CLEC12A ve IFI27) ortak olarak bulunması ve bu 2 genin doğal bağışıklık yanıtının oluşması ve düzenlenmesinde rol oynuyor olması göz önünde bulundurulduğunda, BS klinik alt grupları kesişim kümesinde bulunmaları anlamlı olarak değerlendirilmiş ve aynı zamanda sadece iki genin ortak bulunması BS klinik alt gruplarının mRNA profillerinin farklı örüntüler verdiğini ortaya koymuştur. Bu çalışmada da transkriptom çalışmasında olduğu gibi mRNA profilleri farklı örüntüler veren BS klinik alt gruplarının, miRNA profillerinin de farklı örüntüler verdiği görülmüştür.

Behçet sendromunda miRNA profilleme sonuçları BS gelişiminde immünolojik mekanizmaların önemli rol oynadığına işaret etmektedir.

BS'nin immünolojik anormalliklerin belirlendiği enflamatuvar bir sorun olmasından dolayı bağışıklık yanıtının düzenlenmesinde önem taşıyan miRNA molekülleri hem veri tabanlarında hem de literatürde araştırılarak bu çalışma bulguları ile değerlendirilmiştir. miRDIP (microRNA Data Integration Portal) ve miRWALK veritabanlarının taranması ile elde edilen immünolojik öneme sahip miRNA'ların listeleri ile bu çalışmada elde edilmiş olan farklı ifadeye sahip 91 miRNA'nın "Venn" analizlerine ait diyagramları Şekil 5.1'de ve Şekil 5.2'de yer almaktadır.

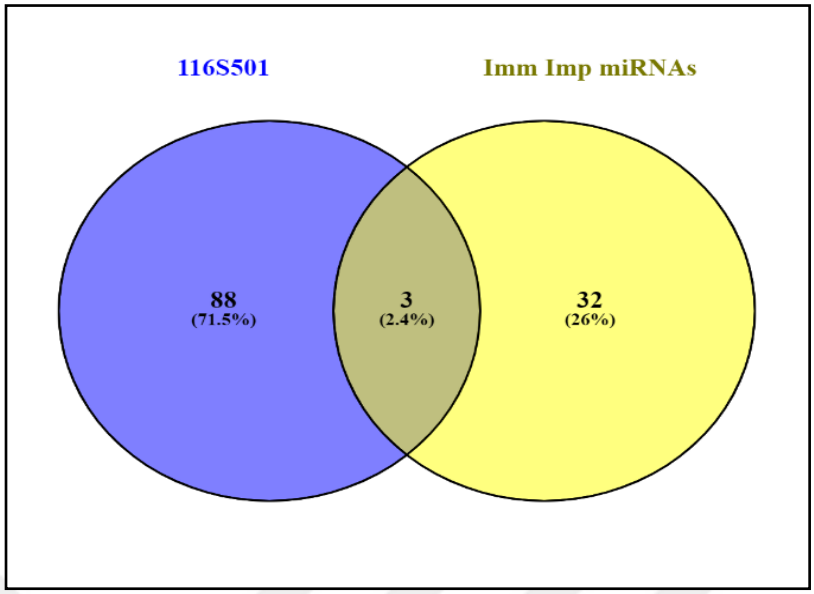


Şekil 5. 1 miRDIP veri tabanından elde edilen bağışıklık yanıtının düzenlenmesinde önem taşıyan miRNA moleküllerine ait set ile çalışmaya ait farklı ifadeye sahip miRNA molekülleri setine ilişkin "Venn" analizi diyagramı



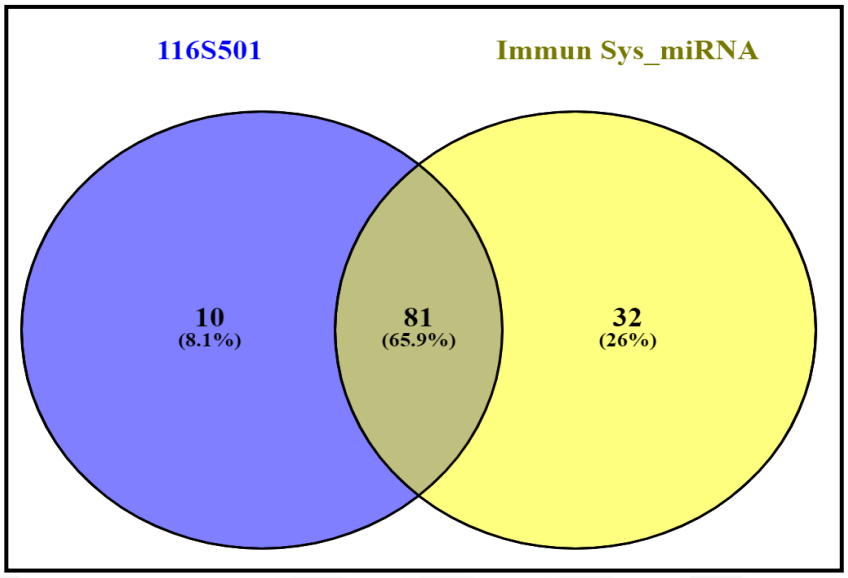
Şekil 5. 2 miRWalk veri tabanından elde edilen bağışıklık yanıtının düzenlenmesinde önem taşıyan miRNA moleküllerine ait set ile çalışmaya ait farklı ifadeye sahip miRNA molekülleri setine ilişkin "Venn" analizi diyagramı

Ayrıca eksiksiz bir liste halinde olmasalar da bağışıklık yanıtının düzenlenmesinde önem taşıyan miRNA molekülleri, değişik yayınlarda da gözden geçirilmiştir (Schickel vd. 2008, Raisch vd. 2013, Tahamtan vd. 2018). Bu yayınlarda yer alarak üzerinde durulan miRNA moleküllerini içeren set (Immunologic Important miRNAs_Imm Imp mRNAs [miR-10a, miR-124, miR-125b, miR-126, miR-132, miR-142, miR-142-3p, miR-145, miR-146, miR-146a, miR-147, miR-149, miR-150, miR-155, miR-17-3p, miR-17-5p, miR-18, miR-181, miR-181a, miR-187, miR-19a, miR-20, miR-21, miR-210, miR-221, miR-222, miR-223, miR-24, miR-31, miR-326, miR-34a, miR-9, miR-92, miR-92a, miR-99b]) ile bu çalışmada ortaya konan farklı ifadeye sahip miRNA moleküllerinin oluşturduğu seti içeren "Venn" analizine ait diyagram Şekil 5.3'de yer almaktadır. Görüleceği gibi, bu iki miRNA setinin kesişim kümesinde hsa-miR-150, hsa-miR-181a ve hsa-miR-210 molekülleri yer almaktadır.



Şekil 5. 3 Literatür taranması sonucu elde edilen bağışıklık yanıtının düzenlenmesinde önem taşıyan miRNA moleküllerine ait set (Imm Imp miRNAs) ile çalışmaya ait farklı ifadeye sahip miRNA molekülleri setine ilişkin "Venn" analizi diyagramı (116S501 ∩ Imm Imp miRNAs: hsa-miR-150, hsa-miR-181a ve hsa-miR-210)

Veri tabanlarının ve mevcut literatürün taranması sonucu elde edilen immünolojik açıdan önemli miRNA molekülleri ile yapılan "Venn" analizleri sonucunda kesişim kümelerinde bulunan ortak miRNA'lar ile bu çalışmada elde edilmiş olan farklı ifadeye sahip miRNA molekülleri ile yapılan "Venn"analizi diyagramı Şekil 5.4'de yer almaktadır.



Şekil 5. 4 Bağışıklık yanıtının düzenlenmesinde önem taşıyan ortak miRNA moleküllerine ait set ile çalışmaya ait farklı ifadeye sahip miRNA molekülleri setine ilişkin "Venn" analizi diyagramı

Bu tez çalışmasında elde edilmiş olan farklı ifadeye sahip 91 miRNA molekülünün % 89'unun (81 tanesinin) bağışıklık yanıtının düzenlenmesinden sorumlu olan miRNA molekülleri olduğu görülmektedir (Şekil 5.4). miRNA aracılıklı gen ifade düzenlenmesinin birçok hastalığın patolojisi ile ilişkilendirildiği bilinmektedir. miRNA genlerinin %50'sinden fazlasının kanserle ilişkili genomik bölgelerde bulunmasından dolayı (Calin vd, 2004), bu durum kanser patogenezinde çok fazla miRNA'nın yer aldığına işaret etmektedir. Çeşitli patolojik koşullarda deneysel olarak doğrulanmış mikroRNA-yolak ilişkileri hakkında kapsamlı bilgi sağlayan bir veri tabanı olan miRwayDB verilerine göre miRNA'lar ile ilgili en çok araştırılan ve veri girişi olan hastalıkların başında %87 oranla kanser gelmektedir. Bunu takiben viral hastalıkların %4,11, immünolojik hastalıkların ise %3,23 ve nörodejeneratif hastalıkların da %2,94 olduğunu ortaya konmuştur (http://www.mirway.iitkgp.ac.in/). miRNA'ların çoğunun kanser ile ilişkili olduğu bilgisi göz önünde bulundurulduğunda, bu çalışmada farklı ifade edilen 91 tane miRNA'nın 81 tanesinin (% 89'unun) bağışıklık yanıtından sorumlu olan miRNA olarak bulunması, Behçet Sendromu'nun patolojisi ve klinik yönetiminin/tedavisinin belirlenmesi göz önünde bulundurulduğunda, çalışma bulgularının güvenirliliği açısından oldukça değerlidir.

mRNA ve miRNA profilleme sonuçlarının entegrasyonu farklı BS klinik alt gruplarında farklı bağışıklık sistemlerinin uyarıldığını göstermektedir.

Sınıf karşılaştırmaları sırasında belirlenen miRNA moleküllerine ait olası hedef gen setlerinin incelendiği gen ontolojisi analizi bulguları Çizelge 4.12'de sunulmuştur. Gen ontolojisi analizlerine gidilirken iki farklı yol izlenmiştir, ya araştırma sırasında belirlenen miRNA moleküllerine ait olası hedef gen setleri direkt olarak analize alınmış (miRWalk veri tabanı üzerinden) ya da miRNA moleküllerine ait aynı olası hedef gen setlerinin, daha önce tamamlanmış olan transkriptom analizine ait gen setleri ile kesişim kümelerinde yer alan gen listeleri incelemeye alınmıştır (WebGestalt kullanılarak). Kullanılan ikinci yöntem, iki farklı genomik veriyi, yani miRNom ve transkriptom verilerini entegre ederek, gen ontolojisi analizine alınan gen setini adeta "rafine" etmektedir. Bu şekilde, her iki yöntemde BS gelişiminde rol oynadığı düşünülen önemli biyolojik süreç başlıklarında zenginleşme bulguları ortaya koymuş olsa da önemli bir fark dikkat çekmiştir. Entegrasyon öncesinde gerçekleştirilen gen ontolojisi analizleri, doğal bağışıklık yanıtı ile ilgili sınırlı sayıda başlıkta zenginleşme ortaya koyarken, entegrasyonu takiben gerçekleştirilen ontoloji analizleri, özellikle B x K ve O x K karşılaştırmalarında olmak üzere, adaptif bağışıklık yanıtı ile ilgili ve detaylar barındıran birçok biyolojik süreç başlığında zenginleşme göstermiştir (Çizelge 4.10). Günümüzde BS, doğal bağışıklık yanıtındaki anormallikler ile başlayan ve BS'nin ileri safhalarında adaptif bağışıklık yanıtlarının da eklenmesi ile seyreden enflamatuvar bir sorun olarak tanımlanmaktadır. Bu çalışmada BS'nin en hafif seyreden ve ılımlı formu olan mukokütan olgularında, "Nötrofil degranülasyonu", "Doğal bağışıklık yanıtı" gibi doğal bağışıklık süreçleri zenginleşme gösterirken adaptif bağışıklığa ait süreçler önemli bir zenginleşme göstermemiştir (Çizelge 4.10). Vücutta mikrobiyal giriş kapılarının en önemlileri olan oral ve genital bölgelerde mukozal yüzey lezyonlarının sık tekrar etmesi nedeniyle mukokütan Behçet olgularında sözkonusu süreçlerin zenginleşmesi anlamlı hale gelmektedir. Diğer taraftan doku zedelenmesinin şiddetli ve uzun süreli ortaya çıktığı oküler ve vasküler Behçet olgularında, çevresel mikrobiyal antijenlerin başlattığı doğal bağışıklık yanıtının yanı sıra doku zedelenmesinin devam etmesi sonucu kendi dokularında açığa çıkan antijenik determinantlar, adaptif bağışıklık sistemini uyarmaktadır. Bu çalışmada oküler ve vasküler Behçet olgularında ve tüm alt grupların

havuzlanması ile oluşturulan tüm Behçet grubu olgularında özellikle entegrasyon sonrasında "Adaptif immün yanıt", "Lenfosit aktivasyonu", "Lenfosit farklılaşması", "T hücresi aracılıklı immünite" gibi spesifik olarak adaptif bağışıklık yanıtını ile ilişkili süreçlerde zenginleşme göstermiştir (Çizelge 4.10). Burada özet olarak değinilen gen ontolojisi terimleri zenginleşme analizi bulguları, günümüzde BS için geçerli bir tanım olan ve "kompleks bir genetik zemin üzerinde, çevresel (mikrobiyal) ve/veya kendi antijenlerine karşı gelişen proenflamatuvar, *doğal bağışıklık orijinli bir aktivasyonun, adaptif bağışıklık yanıtlarıyla* sürdürülmesi" şeklinde özetlenen patogenetik hastalık mekanizması ile uyum sağlamaktadır (Direskeneli ve Saruhan-Direskeneli 2020).

BS Klinik Alt Gruplarının Moleküler Patogenezi Farklı Coğrafya ve Popülasyonlarda Farklılık Göstermektedir

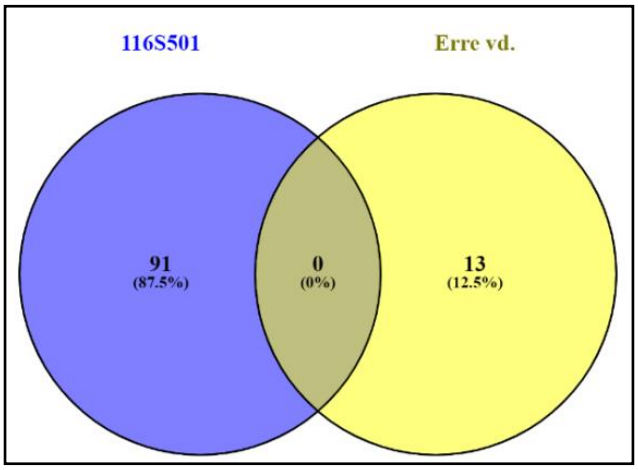
Literatürde, BS olgularında seçilmiş az sayıdaki miRNA molekülü ifadesindeki değişiklikleri araştıran göreceli daha çok sayıda araştırma yazısı olsa da tüm genom ölçekli miRNA ifade analizi gerçekleştirilen iki adet çalışmaya rastlanmıştır (Erre vd. 2015, Puccetti vd. 2018). Behçet sendromunda genom ölçekli miRNA ifade analizinin gerçekleştirildiği çalışmalara ait önemli bilgiler Çizelge 5.1'de yer almaktadır. İlgili literatürde görüldüğü ve Çizelge 5.1 de yer aldığı gibi, farklı ve bazı durumlarda birbirleriyle uyumsuz immünolojik anormalliklerin tespit edildiği, ülkeler arasında farklı klinik özelliklerin belirlendiği, aynı BS başlığı altında farklı hastalık alt gruplarının tanımlandığı ve güncel durumda hastalıktan ziyade bir "sendrom" olarak kabul edilmesinin ağırlık kazandığı BS için, ister klinik isterse moleküler düzeyde planlanan bilimsel çalışmalarda BS olguları, tek bir hasta grubu şeklinde incelenmekte ve analizler bu tek grup üzerinde gerçekleştirilmektedir (Bettiol vd. 2020). Bahsedilen bu çalışma tasarımı, gerçekleştirilen çalışmalarda ulaşılacak bulguları belirgin ölçüde etkileyerek değiştirebilecek özellikte olduğundan, çalışmamızın bulguları ile genom ölçekli olarak gerçekleştiren diğer iki çalışmaya ait bulguların karşılaştırma ve tartışılmasına başlamadan, literatüre girmiş olan ve ulaşma imkanı bulduğumuz söz konusu iki çalışmanın önemli bulguları şimdi kısaca özetlenmeye çalışılacaktır.

Çizelge 5. 1 Literatürde yer alan ve Behçet Sendromunda genom ölçekli miRNA ifade analizinin gerçekleştirildiği çalışmalarla ilgili temel bilgiler

Çalışma	**Tarih**	**Yer**	**Olgu/Kontrol Sayıları**	**Olgu Grupları**	**Metod**	**Hücre Doku**	***p*/FC**	**İlave Çalışma**
Erre vd.[1]	2015	Sardunya	5/3	Tek grup	Mikrodizin	PKMH	-/-	-
Puccetti vd.[2]	2018	Verona	6/6	Tek grup	Mikrodizin	PKMH	0,01/ 1,5	Transkriptom entegrasyon

[1] Erre vd. (2015).
[2] Puccetti vd. (2018).
FC, kat değişimi ("Fold Change"); PKMH, periferik kan mononükleer hücreleri.

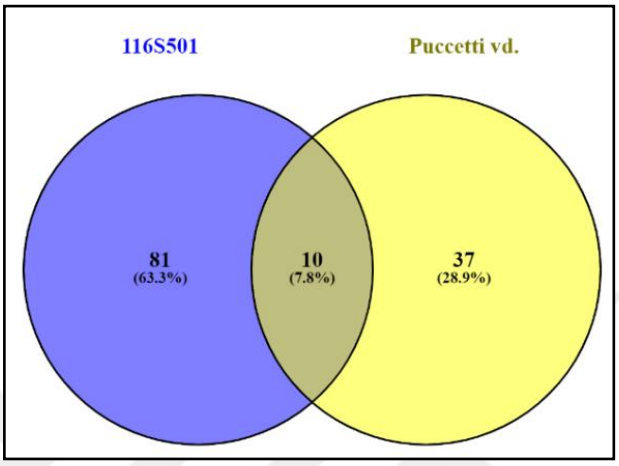
Erre ve arkadaşları (İtalya-Sardunya), 5 BS olgusu ile 3 sağlıklı kontrol bireyini inceledikleri araştırmalarında, periferik kan mononükleer hücrelerinde mikrodizin (TaqMan Low Density Array®) temelli miRNA ifade analizi gerçekleştirmiş, 13 adet farklı ifade edilen ("deregüle") miRNA molekülü göstermiş (hsa-miR-200b, hsa-miR-571, hsa-miR-127, hsa-miR-224, hsa-miR-98, hsa-miR-573, hsa-miR-770-5p, hsa-miR-199a-3p, hsa-miR-370, hsa-miR-139-3p, hsa-miR-520c-3p, hsa-miR-720, hsa-miR-330); ilave olarak, bu 13 miRNA molekülü içinden 9 tanesinin, aktif hastalığı olan BS olgularında inaktif hastalığı olanlara oranla daha yüksek bir ifade düzeyine sahip olduklarını belirlemiş ve BS olgularında, Toll benzeri reseptör (TLR) ve T-hücresi reseptörü (TCR) sinyal yolaklarının önemli bir zenginleşme gösterdiklerini bildirmişlerdir (Erre vd., 2015). Erre ve arkadaşlarının çalışmasında farklı ifadeye sahip oldukları gösterilen 13 adet miRNA molekülü ile çalışmamızda BxK, MxK, OxK ve VxK sınıf karşılaştırmalarında belirlenen, farklı ifadeye sahip miRNA moleküllerinin "Venn" analizine ait diyagram Şekil 5.5'de yer almaktadır. İki farklı popülasyonu (Türk ve İtalyan [Sardunya]) inceleyen ve iki farklı tasarımın kullanılmış olduğu bu çalışmalarda, kesişim kümesinde ortak tek bir miRNA molekülünün yer almıyor olması yine de dikkat çekici olarak değerlendirilmiştir.



Şekil 5. 5 Erre ve arkadaşlarının çalışmasında gösterilen 13 miRNA molekülü ile bu çalışmada belirlenen farklı ifadeye sahip miRNA moleküllerine ait "Venn" analizi diyagramı (farklı ifadeye sahip miRNA setlerinin kesişim kümesi boş olarak belirlenmiştir)

Literatürde yer alan ve Puccetti ve arkadaşlarına (İtalya-Verona) ait diğer çalışmada ise 6 BS olgusu ve 6 sağlıklı kontrol bireyi değerlendirilmiş, periferik kan mononükleer hücrelerinde mikrodizin (Affymetrix GeneChip® miRNA 4.0) kullanılarak global miRNA ifade analizi gerçekleştirilmiş, 269 adet farklı ifadeye sahip miRNA molekülü tespit edilmiş, miRBase (Release 21) veritabanı kullanılarak bu 269 miRNA molekülü arasından yüksek güven ("high confidence") anotasyonuna sahip olan 47 tanesi seçilmiş (hsa-miR-4505, hsa-miR-149-3p, hsa-let-7d-5p, hsa-miR-181a-5p, hsa-miR-146a-5p, hsa-miR-361-5p, hsa-miR-532-3p, hsa-miR-423-5p, hsa-miR-200c-3p, hsa-miR-30e-5p, hsa-miR-28-5p, hsa-miR-30c-5p, hsa-miR-330-3p, hsa-miR-194-5p, hsa-miR-423-3p, hsa-miR-28-3p, hsa-miR-15b-5p, hsa-miR-30d-5p, hsa-miR-193a-5p, hsa-miR-192-5p, hsa-miR-152-3p, hsa-miR-25-3p, hsa-miR-181d-5p, hsa-let-7f-5p, hsa-miR-92b-3p, hsa-miR-30a-5p, hsa-miR-223-3p, hsa-miR-505-3p, hsa-miR-128-3p, hsa-miR-148b-3p, hsa-miR-328-3p, hsa-miR-195-5p, hsa-let-7e-5p, hsa-miR-29b-1-5p, hsa-miR-628-3p, hsa-miR-92a-1-5p, hsa-miR-27b-3p, hsa-miR-671-3p, hsa-miR-151a-3p, hsa-miR-486-5p, hsa-miR-199a-3p, hsa-miR-199b-3p, hsa-miR-126-3p, hsa-miR-584-5p, hsa-miR-199a-5p, hsa-miR-139-5p, hsa-miR-143-3p), miRNom ve transkriptom verileri entegre edilmiş ve aktif BS için karakteristik miRNA imzaları tanımlanarak, Tümör nekroz faktörü (TNF), İnterferon gama (IFN-γ) ve Vasküler endotelyal büyüme faktörü - Vasküler endotelyal büyüme faktörü reseptörü (VEGF-VEGFR) sinyal yolaklarının

zenginleştikleri gösterilmiştir (Puccetti vd. 2018). Yukarıda yapılan analize benzer şekilde, Puccetti ve arkadaşlarının miRNA bulguları ile araştırmamıza ait miRNA bulguları kullanılarak gerçekleştirilen "Venn" analizi diyagramı ise Şekil 5.6'da sunulmuştur.



Şekil 5. 6 Puccetti ve arkadaşlarının çalışmasında yüksek güven anotasyonuna sahip oldukları için özel olarak seçilen 47 miRNA molekülü ile bu çalışmada belirlenen farklı ifadeye sahip miRNA moleküllerinin "Venn" analizi diyagramı (116S501 ∩ Puccetti vd.: hsa miR-423-5p, hsa-miR-671-3p, hsa-miR-199a-5p, hsa-miR-30a-5p, hsa-miR-151a-3p, hsa-miR-28-5p, hsa-miR-193a-5p, hsa-miR-181a-5p, hsa-miR-584-5p, hsa-miR-128-3p)

Bu noktada, Puccetti ve arkadaşlarının çalışmasında belirlenen farklı ifadeye sahip miRNA seti ile bu çalışmada ortaya konan farklı ifadeye sahip miRNA setinin kesişim kümelerinde yer alan 10 miRNA molekülü ile ilgili önemli bir özelliği belirtmekte yarar bulunmaktadır. Yine iki farklı popülasyonun (Türk ve İtalyan [Verona]) incelendiği bu çalışmaların kesişim kümesinde yer alan 10 ortak miRNA molekülünden 9 tanesi (hsa-miR-423-5p, hsa-miR-671-3p, hsa-miR-199a-5p, hsa-miR-30a-5p, hsa-miR-151a-3p, hsa-miR-28-5p, hsa-miR-193a-5p, hsa-miR-584-5p, hsa-miR-128-3p), Türk ve İtalyan çalışmalarında birbirlerine zıt yönde değişmiş olarak görülürken (Türk BS olgularında ifade artışı, İtalyan BS olgularında ise ifade azalışı şeklinde), sadece bir tanesi (hsa-miR-181a-5p) her iki çalışmada da BS olgularında ifade azalışı şeklinde değişiklik göstermektedir (Puccetti vd. 2018). Gerek Erre ve ark.'larının çalışması ile çalışmamızla ortak miRNA bulunmaması gerekse Puccetti ve ark. 'larının çalışması ile çalışmamızda karşılaşılan korelasyon farklılıkları, BS olgularının klinik özelliklerinin sendromun

görüldüğü coğrafyaya göre değişen özellikler göstermesine benzer şekilde, hastalığın moleküler gelişim mekanizmalarının da coğrafyaya / popülasyonun etnik özelliklerine göre farklılıklar (heterojenite) gösterebileceği görüşünü desteklemektedir.

Genom ölçekli olmasa da seçilmiş miRNA moleküllerinin ifade değişikliklerinin BS durumunda araştırıldığı çalışmalar da mevcuttur. İlginç bir şekilde, söz konusu çalışmaların çoğunluğu, Mısır'lı ve Çin'li bilim insanları tarafından gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmalara ait temel bilgiler Çizelge 5.2'de sunulmuştur.

Çizelge 5. 2 Literatürde yer alan ve Behçet Sendromu durumunda seçilmiş miRNA moleküllerine ait ifade analizlerinin gerçekleştirildiği çalışmalarla ilgili temel bilgiler

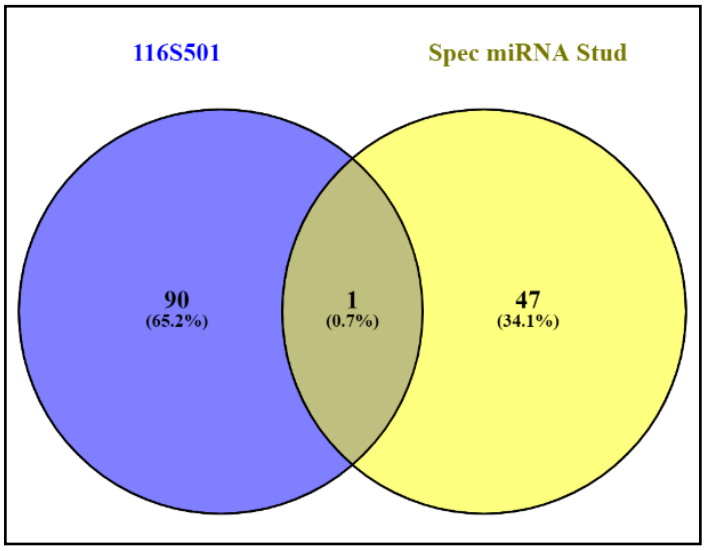
Çalışma	Tarih	Ülke	Olgu/ Kont. Sayıları	Olgu Grupları	Metod	Hücre Doku	miRNA	Not
Zhou vd.[1]	2012	Çin	42/-	Okü.	qRT-PCR	PKMH DH, Th	mir-326, -146a, -155, -181a, -17	BS ile VKH mukayesesi
Qi vd.[2]	2013	Çin	859/-	Tek grup	qRT-PCR	PKMH	miR-196a	BS, VKH, AS asosiyasyon
Onat vd.[3]	2014	Türk	65/25	Muko. Vas.	qRT-PCR	Serum	miR-17-5p, -451A, -106b-5p, -16-5p, -19b-3p, -26b-5p, -93-5p, -20b, -25-3p	Kongre özeti
Hou vd.[4]	2016	Çin	377/-	Tek grup	qRT-PCR	PKMH	miR-22, -143, -205, -9-3, -23a, -146a, -301a	BS ile VKH durumunda CNV analizi
Woo vd.[5]	2016	Çin	21/8	Tek grup	qRT-PCR	PKMH	miR-638, -4488, -3591-3p, -1915	-
Zou vd.[6]	2016	Çin	10/10	Ent.	qRT-PCR	PKMH	miR-155, -146a, -196a2, -20b-5p	-
Eissa vd.[7]	2017	Mısır	47/50	Tek grup	qRT-PCR	Serum	miR-499	Kongre özeti
Hassouna vd.[8]	2018	Mısır	33/15	Tek grup	qRT-PCR	BK	miR-155	-
Ibrahim vd.[9]	2018	Mısır	47/50	Tek grup	qRT-PCR	Serum	miR-146a	-
Jadidesl am vd.[10]	2019	Mısır	46/70	Tek grup	qRT-PCR	PKMH	miR-21, -146b, -326	-
Elessawi vd.[11]	2020	Mısır	40/40	Tek grup	qRT-PCR	Serum	miR-499	-

Çizelge 5. 2 Literatürde yer alan ve Behçet Sendromu durumunda seçilmiş miRNA moleküllerine ait ifade analizlerinin gerçekleştirildiği çalışmalarla ilgili temel bilgiler (devam)

Çalışma	Tarih	Ülke	Olgu/ Kont. Sayıları	Olgu Grupları	Metod	Hücre Doku	miRNA	Not
Eyerci vd.[12]	2020	Türk	24/30	Tek grup	qRT-PCR	PKMH	miR-20a, -34a, -197,-205, -222, -296, -302a, -302c, -372, -518b, -874, U6snRNA	Kolşisin tedavisinin miRNA ifadesine etkisi
El Khateeb vd.[13]	2020	Mısır	60/25	Tek grup	qRT-PCR	Serum	miR-146a, -155	-
Kamal vd.[14]	2021	Mısır	94/115	Tek grup	qRT-PCR PCR-RFLP	PKMH	miR-146a	Asosiyasyon
Liang vd.[15]	2021	Çin	23/28	Tek grup	-	PKMH Monosit	miR-155	Fonksiyonel analiz
Sevimoğlu[16]	2021	Türk	-/-	Tek grup	-	Serum	miR-17-5p, -603, -375, -107, -454-3p, -142-3p, -650, -765	"In-silico" analiz

[1] Zhou vd. (2012), [2] Qi vd. (2013), [3] Onat vd. (2014), [4] Hou vd. (2016), [5] Woo vd. (2016), [6] Zou vd. (2016), [7] Eissa vd. (2017), [8] Hassouna vd. (2018), [9] Ibrahim vd. (2018), [10] Jadideslam vd. (2019), [11] Elessawi vd. (2020), [12] Eyerci vd. (2020), [13] El Khateeb vd. (2020), [14] Kamal vd. (2021), [15] Liang vd. (2021), [16] Sevimoğlu (2021). AS, ankilozan spondilit; BK, beyaz küre; BS, Behçet Sendromu; CNV, kopya sayısı değişiklikleri ("Copy Number Variation"); DH, dendritik hücre; Ent., entero-Behçet; Muko., mukokütan Behçet; Okü., oküler Behçet; PKMH, periferik kan mononükleer hücreleri; qRT-PCR, kantitatif gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu ("quantitative Real-Time Polymerase Chain Reaction"); Th, CD4+ yardımcı T lenfosit; Vas., vasküler Behçet; VKH, Vogt-Koyanagi-Harada sendromu.

Çizelge 5.2'de özet bir şekilde sunulan çalışmalarda incelenen / belirlenen miRNA moleküllerine ait set (Spec miRNA Stud) ile araştırmamız sonucunda belirlenen farklı ifadeye sahip miRNA moleküllerine ait sete ilişkin "Venn" analizi diyagramı Şekil 5.7'de yer almaktadır. İki miRNA setine ait kesişim kümesinde yer alan tek miRNA molekülü hsa-miR-20b-5p olarak dikkat çekmiştir.



Şekil 5. 7 Çizelge 5.2'de yer alan çalışmalara ait miRNA molekülleri seti (Spec miRNA Stud) ile çalışmaya ait farklı ifadeye sahip miRNA molekülleri setine ilişkin "Venn" analizi diyagramı (116S501 ∩ Spec miRNA Stud: hsa-miR-20b-5p)

Yukarıda kesişim kümesinde yer aldığı görülen tek miRNA molekülü olan hsa-miR-20b-5p ile ilgili önemli bir özelliğin paylaşılması faydalı olacaktır. Bu miRNA molekülü, bu çalışmada vasküler BS grubunda kontrol grubuna oranla artmış ifade, Zou ve arkadaşlarının çalışmasında BS olguları ile kontrol grubu arasında benzer ifade ve Onat ve arkadaşlarına ait çalışmada (miR-20b) ise, aktif hastalığı olan BS olgularında kontrol grubuna oranla azalmış ifade göstermektedir (Onat vd. 2014, Zou vd. 2016). Söz konusu miRNA molekülünün çalışmalar arasında farklı bulunan ifade özellikleri için olası açıklamalar, (1) incelenen farklı popülasyonlarda moleküler hastalık gelişim mekanizmalarının olası farklılıkları, (2) incelenen olguların hastalık aktivite düzeylerindeki değişiklikler ve (3) kullanılan analiz yöntemine bağlı etkilenmeler şeklinde özetlenebilir.

İnhibitor Etkili Doğal Bağışıklık Yanıtı Reseptörü CLEC12A'yı Hedefleyen miRNA'lar Tedavi Hedefi Olabilir.

Araştırma ekibimiz daha önce gerçekleştirmiş olduğu BS'de transkriptom çalışması sırasında, BS klinik alt gruplarının tümünde ortak olarak bulunan, enflamatuvar yanıtı baskılayarak bağışıklık yanıtlarının kontrol altında tutulmasını sağlayan CLEC12

geninin, Türk BS olgularındaki gen listelerinde ifade azalması yönündeki en büyük FC değerleri ile tüm karşılaştırma gruplarında üst sıralarda yer aldığını göstermiştir. Araştırma ekibimiz sözkonusu genin azalmış ifadesinden hareket ederek, BS ve gut gelişiminde ortak bir patogenetik bileşen olabileceğini öne sürdükleri bir makale yayınlamışlardır (Oguz vd. 2015). Türk BS olgularında gerçekleştirilen transkriptom çalışmasında, farklı klinik alt grupların kesişim kümesinde ortak olarak bulunan CLEC12A geninin tüm alt gruplarda azalma yönündeki ifadesinin; CLEC12A'nın immün yanıtın düzenlenmesinden sorumlu, inhibitor fonksiyonu olan bir gen olduğu göz önünde bulundurulduğunda, BS durumunda çok iyi bilinen anormal nötrofil aktivasyonu ve abartılı doğal immün yanıt gelişiminde rol oynayabileceğini destekler niteliktedir. Transkriptom çalışmasında elde edilen ve yayınlanmış olan CLEC12A bulgusunun, bu tez çalışmasına ait bulgularla değerlendirmesini yapmak için miRWalk veri tabanı kullanılarak CLEC12 genini hedefleyen miRNA'lar belirlenmiştir. Ardından bu miRNA'ların, mevcut tez çalışmasına ait önemli olarak belirlenen miRNA setlerinin içinde olup olmadığına bakılmış ve korelasyonu kontrol edilmiştir, bu algoritmaya göre 6 tane miRNA seçilmiştir (Çizelge 5.3).

Çizelge 5.3 Bu çalışmada önemli miRNA listelerinde bulunan ve CLEC12A'yı hedefleyen miRNA'lar

miRNA (miRWalk)	**Hedef**	**en az 3 karşılaştırmada ortak olan ve aynı yönde değişim gösteren miRNA'lar**	**MxK artan ilk 10 miRNA**	**OxK artan ilk 10 miRNA**	**VxK artan ilk 10 miRNA**	**BxK artan ilk 10 miRNA**
hsa-miR-3184-3p	**CLEC12A**		✓			
hsa-miR-500a-3p	**CLEC12A**	✓		✓		
hsa-miR-20b-5p	**CLEC12A**				✓	
hsa-miR-185-3p	**CLEC12A**	✓	✓			
hsa-miR-378a-5p	**CLEC12A**	✓	✓			✓
hsa-miR-502-3p	**CLEC12A**	✓				

Kırmızı ile gösterim BS **miRNA** çalışmasında artmış miRNA ifadesi göstermektedir
Yeşil ile gösterim BS **mRNA** çalışmasında azalmış mRNA ifadesini göstermektedir

Türk BS olgularında yapılan bu tez çalışmasında ifade artışı gösteren Çizelge 5.3'de gösterilen miRNA'ların hedef gen setleri içinde CLEC12A'nın bulunması önemli bir bulgu olarak değerlendirilmektedir. miRNA-mRNA ikilisi olarak ters korelasyon gösteren (artan miRNA ifadesine karşılık azalan CLEC12A ifadesi) bu miRNA'ların

tedavi hedefi olarak seçilmesi CLEC12A ifade azalmasını engelleyerek BS gelişiminin ve hastalık ağırlığının azalmasında etkili olabilir.

Bu çalışmada ulaşılan bulgulara dayanarak, BS gelişiminde önemli rollerinin olabileceğini ve bu nedenle üzerlerinde gerçekleştirilecek ileri ve fonksiyonel çalışmalara ihtiyaç olduğu düşünülen 5 miRNA molekülü, (1) **hsa-miR-25-5p** (bu çalışmada tüm BS olgu ve kontrol grubu karşılaştırmalarında ortak olarak belirlenen ve ifade artışı gösteren miRNA molekülü), (2) **hsa-miR-183-3p** (yine benzer şekilde bu çalışmada tüm BS olgu ve kontrol grubu karşılaştırmalarında ortak olarak belirlenen ve ifade artışı gösteren miRNA molekülü), (3) **hsa-miR-181a-5p** ([1] bu çalışmada oküler BS olgularında kontrol grubuna oranla ifade düzeyinin azalmış olduğu, [2] bu çalışma ile Puccetti ve arkadaşlarına ait miRNom çalışmasında (Puccetti vd. 2018) ortak olarak ifade azalması yönünde değişiklik gösterdiğinin belirlendiği ve [3] bu çalışmaya ait farklı ifadeye sahip miRNA listesi ile birlikte aynı zamanda bağışıklık yanıtının düzenlenmesinde önem taşıyan miRNA molekülleri listesinde de yer alan miRNA molekülü), (4) **hsa-miR-20b-5p** ([1] bu çalışmada V x K karşılaştırmasında BS olgularında kontrol grubuna oranla ifade düzeyinin artmış olduğu, [2] daha önce yapılmış olan Türk BS olgularında transkriptom çalışmasında tüm karşılaştırmalarda BS olgularında kontrol grubuna oranla ifade düzeyinin azalmış olarak belirlendiği CLEC12A genini hedeflemesi, [3] bu çalışmaya ait farklı ifadeye sahip miRNA listesi ile birlikte aynı zamanda bağışıklık yanıtının düzenlenmesinde önem taşıyan miRNA molekülleri listesinde de yer alan miRNA molekülü olması ve de [4] literatürde seçilmiş miRNA'lar ile yapılan çalışmalardaki miRNA'lar ile bu çalışmaya ait miRNA'ların kesişim kümesinde bulunması) (5) **hsa-miR-185-3p** ([1] bu çalışmada B x K, M x K ve V x K karşılaştırmaları sırasında BS olgularında kontrol grubuna oranla ifade düzeyinin artmış olduğu ve [2] bu çalışmaya ait farklı ifadeye sahip miRNA listesi ile birlikte aynı zamanda bağışıklık yanıtının düzenlenmesinde önem taşıyan miRNA molekülleri listesinde de yer alan miRNA molekülü olması ve de [3] ve daha önce yapılmış olan Türk BS olgularında transkriptom çalışmasında tüm karşılaştırmalarda BS olgularında kontrol grubuna oranla ifade düzeyinin azalmış olarak belirlendiği CLEC12A genini hedeflemesi)'dir.

Transkripsiyon sonrası gen ifadesi kontrolü süreçlerinin önemli bir yolağını oluşturan miRNA sisteminin, tüm protein kodlayan genlerin üçte ikisinden fazlasının ifadelerinin kontrolüne katkıda bulunuyor olduğu tahmin edilmektedir (Tahamtan vd. 2018). Gerçekleştirilen çalışmaların sayısı hızla artıyor olsa da her bir spesifik miRNA molekülünün kesin biyolojik etkilerini tanımlamak için vakit henüz çok erken görünmektedir. Burada, fonksiyonel miRNA çalışmaları sırasında ulaşılan çelişkili sonuçlar dışında, tek bir miRNA molekülünün potansiyel olarak çok sayıdaki mRNA hedefini kontrol edebiliyor olması ve buna karşın, tek bir mRNA molekülünün de birden çok miRNA tarafından hedef alınabiliyor olması önemli rol oynamaktadır (Fabian vd. 2010). Söz konusu nedenlerle, yukarıda değinilen ve BS patogenezinde önemli rolleri olabileceği düşünülen miRNA moleküllerinin ileri tartışmalarından önce, bu çalışmanın araştırma ekibi, bu miRNA moleküllerinin in vitro (hücre kültürü) ve in vivo (rat, fare) ortamda, bağışıklık yanıtı üzerindeki fonksiyonel incelemelerinin yapılmasının doğru olacağına inanmaktadır.

5.1 Sonuç

Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK) tarafından 116S501 proje numarası ile desteklenen ve Türk BS olgularının oluşturduğu bir hasta grubu ile uyumlu olarak belirlediğimiz bir sağlıklı kontrol grubu kullanarak gerçekleştirdiğimiz genom ölçeğindeki miRNA ifade analizi ve beraberindeki analizlerin yapıldığı bu tez çalışmasında; BS durumunda transkriptom çalışmasında olduğu gibi klinik özelliklerine uygun farklı öbeklerde toplananan olgularda, farklı mRNA profiline uygun olarak farklı miRNA profillerinin sergilendiğini, BS klinik alt gruplarının moleküler patogenezinin farklı coğrafya ve popülasyonlarda farklılık gösterdiğini, BS gelişiminde immünolojik mekanizmaların önemli rol oynadığını, mRNA ve miRNA profilleme sonuçlarının entegrasyonunun, farklı BS klinik alt gruplarında farklı bağışıklık sistemlerinin uyarıldığını ortaya koyduğunu ve sonuçta, tüm BS olguları için geçerli olacak, ortak ve tek bir patogenez olasılığını zayıflatan ve BS'nin bir hastalıktan ziyade bir sendrom olabileceği görüşünü destekler nitelikte sonuçlar ortaya koymuştur. Her bilimsel araştırmada olduğu şekilde, BS durumunda genom ölçekli miRNA ifade analizinin gerçekleştirildiği çalışmamızın da belirli sınırlamaları mevcuttur. Öncelikli olarak,

çalışmamız sırasında ulaşılmış olan bulguların, bir Türk BS popülasyonu için geçerli olduğunun ve mevcut bulgularımızın bu bilgi göz önünde tutularak değerlendirme ve yorumlanmasının doğru olacağı vurgulanmalıdır. Bazı olgularda önemli organ işlevlerinin, bazı olgularda ise bireyin yaşamının tehlikede olduğu BS durumunda, güçlü etik öncelikler dikkate alındığından, çalışmamızda yer alan BS olgularının kullanmakta oldukları ilaçlara ait tedavi protokolleri hiçbir değişiklik yapılmadan sürdürülmüştür. Söz konusu durum, çalışmamızın bir diğer sınırlaması olarak ifade edilmelidir. Bu durum, ilk kez tanı alan ve henüz ilaç tedavisi başlanmamış olan BS olguları ile gerçekleştirilecek ve büyük olgu sayılarının toplanacağı yeni miRNA ifade analizi çalışmalarına ihtiyaç olduğunu ortaya koymaktadır. Behçet sendromunun sık izlenen klinik alt grupları olan mukokütan, oküler ve vasküler formları dışında, göreceli olarak daha nadir belirlenen kas-iskelet sistemi, gastrointestinal sistem ve merkezi sinir sistemi tutulumu bulunan BS olgularının araştırmamızda temsil edilmiyor olması, sınırlamalarımız içinde vurgulamamız gereken bir başka başlıktır. Yukarıda değindiğimiz sınırlamalarımıza ilave etmemizin doğru olacağı bir diğer nokta ise, çalışmamızda ulaştığımız miRNA ifade farklılığı bulgularının, yine Türk BS olgularının yer aldığı bağımsız bir başka BS popülasyonu çalışılarak valide edilmesinin, bulgularımızın değerini çok büyük ölçüde arttıracağının unutulmamasıdır.

Sonuçta, miRNA-mRNA entegrasyonu, BS'nin miRNA moleküllerini ilgilendiren moleküler hastalık mekanizmalarına ve BS'yi incelemek üzere, gelecekte planlanacak özellikle moleküler düzeydeki çalışmaların tasarımına ait, önem taşıdığına inandığımız bulgulara ulaşmamızı sağlamıştır. Behçet sendromunun literatürde tanımlanmış olan farklı klinik alt gruplarına ait, bir başka deyişle, birbirinden farklı BS hastalık kümelerinde yer alan BS olgularının tek bir hasta grubu başlığı altında toplanarak beraberce incelenmesi, özellikle moleküler düzeyde gerçekleştirilen çalışmalarda, kıymetli bilginin kaybına yol açıyor olarak görülmektedir. Özetle değindiğimiz bu çalışma bulgumuz, ileride planlanarak gerçekleştirilecek ve BS'yi konu alacak çalışmaların tasarımı aşamasında, BS'nin klinik düzeydeki heterojenitesine ilave olarak moleküler hastalık mekanizmalarını ilgilendiren heterojenitesinin de hatırlanması ve dikkate alınmasının önemine işaret etmektedir. Bu tez çalışmasının söz konusu bulguları ister mRNA, isterse miRNA bağlamında ele alınsın, BS alt grupları arasında hastalık

gelişim mekanizmaları açısından moleküler düzeyde göz ardı edilemeyecek farklılıklar bulunduğuna işaret etmektedir.

KAYNAKLAR

Adams, F. 1849. The genuine works of Hippocrates, translated from the Greek. The Sydenham Society, 403–4.

Alpsoy, E., Yilmaz, E., Coşkun, M., Savaş, A. and Yeğin, O. 1998. HLA antigens and linkage disequilibrium patterns in Turkish Behçet's patient. J Dermatol, 25: 158-62.

Barnes CG, Yazici Y. 2020. History and Diagnosis. In: Behçet Syndrome [Internet]. Cham: Springer International Publishing; p. 7–20. Available from: http://link.springer.com/10.1007/978-3-030-24131-5_2

Bartel, D. P. 2004. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. Cell, 116: 281-97.

Behçet, H. 1937. Uber rezidiverende, aphthose, durch ein virus verursachte gescgwure am mund, am auge und an den genitalen. Dermatol Wochenschr, 105: 1152–7.

Behçet, H., and Matteson, E. L. 2010. On relapsing, aphthous ulcers of the mouth, eye and genitalia caused by a virus. 1937. Clin Exp Rheumatol, 28: S2-5.

Bettiol, A., Hatemi, G., Vannozzi, L., Barilaro, A., Prisco, D., & Emmi, G. 2019. Treating the Different Phenotypes of Behçet's Syndrome. Frontiers in immunology, 10, 2830. https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.02830

Bettiol, A., Prisco, D., Emmi, G. 2020. Behçet: the syndrome. Rheumatology (Oxford), 59 (Suppl. 3), 101-107.

Calin, G. A., and Croce, C. M. 2006. MicroRNA signatures in human cancer. Nat Rev Cancer, 6: 857-66.

Ceribelli, A., Yao, B., Dominguez-Gutierrez, P. R., Nahid, M. A., Satoh, M. and Chan, E. K. 2011. MicroRNAs in systemic rheumatic diseases. Arthritis Res Ther, 13: 229.

Chari, R., Coe, B. P., Wedseltoft, C., Benetti, M., Wilson, I. M., Vucic, E. A., MacAulay, C., Ng, R. T. and Lam, W. L. 2008. SIGMA2: a system for the integrative genomic multi-dimensional analysis of cancer genomes, epigenomes, and transcriptomes. BMC Bioinformatics, 9: 422.

Çölgeçen, E., Özyurt, K., Ferahbaş, A., Borlu, M., Kulluk, P., Öztürk, A., Öner, A.Ö., Gün, İ. and Aşçıoğlu, Ö. 2015. The prevalence of Behçet's disease in a city in Central Anatolia in Turkey. Int J Dermatol, 54: 286-9.

Dalvi, S. R., Yildirim, R. and Yazici, Y. 2012. Behcet's Syndrome. Drugs, 72: 2223-41.

Dawson, M. A., and Kouzarides, T. 2012. Cancer epigenetics: from mechanism to therapy. Cell, 150: 12-27.

Dennis, G., Sherman, B. T., Hosack, D. A., Yang, J., Gao, W., Lane, H. C. and Lempicki, R. A. 2003. DAVID: Database for Annotation, Visualization, and Integrated Discovery. Genome Biol, 4: P3.

Direskeneli, H. 2001. Behçet's disease: infectious aetiology, new autoantigens, and HLA-B51. Ann Rheum Dis, 60(11): 996-1002.

Direskeneli, H., Saruhan-Direskeneli, G. 2020. Disease Mechanisms. Behçet Syndrome. Editors: Yazıcı, H., Yazıcı, Y. New York: Springer International Publishing, 209-222.

El Khateeb, E., Nassef, A., Gheith, R., et al. 2020. Expression of miR-146a and miR-155 in Egyptian patients with Behçet's disease: clinical significance and relationship with disease activity. Egyptian Journal of Medical Human Genetics, 21(43), 1-9.

Elessawi, D.F., Radwan, N.K., Nosseir, N.M., et al. 2020. Micro RNA 499 gene expression and interleukin 17 in Egyptian patients with Behçet's disease. The Egyptian Rheumatologist, 42, 135-139.

Emmi, G., Silvestri, E., Squatrito, D., D'Elios, M. M., Ciucciarelli, L., Prisco, D. and Emmi, L. 2014. Behçet's syndrome pathophysiology and potential therapeutic targets. Intern Emerg Med, 9: 257-65.

Eissa, M., Al Kaffas, M., Abdel Wahab, S., et al. 2017. MicroRNA-499 in Behcet Disease and Possible Association with Disease Activity. Annals of the Rheumatic Diseases, 76, 1048-1049.

Erre, G.L., Piga, M., Carru, C., et al. 2015. Global microRNA profiling of peripheral blood mononuclear cells in patients with Behçet's disease. Clinical and Experimental Rheumatology, 33(Suppl. 94), S72-S79.

Eyerci, N., Balkan, E., Keleş, S., et al. 2020. miRNA Expression Profile in Behcet Patients Using Colchicine. Annals of Medical Research, 27(12), 3159-3165.

Fabian, M.R., Sonenberg, N., Filipowicz, W. 2010. Regulation of mRNA Translation and Stability by microRNAs. Annual Review of Biochemistry, 79, 351-379.

Fietta, P. 2005. Behçet's disease: Familial clustering and immunogenetics. Clinical and Experimental Rheumatology, 23(4): S96–S105.

Frassanito, M. A., Dammacco, R., Cafforio,P. and Dammacco, F. 1999. Th1 polarization of the immune response in Behçet's disease: a putative pathogenetic role of interleukin-12. Arthritis Rheum, 42: 1967-74.

Gagné, V. L., Marois, J. M. Levesque, H. Galarneau, M. H. Lahoud, I. Caminschi, P. H. Naccache, P. Tessier, and M. J. Fernandes. 2013. Modulation of monosodium urate crystal-induced responses in neutrophils by the myeloid inhibitory C-type lectin-like receptor: potential therapeutic implications. Arthritis Res Ther, 15: R73.

Gershon D. 2002. Microarray technology: an array of opportunities. Nature, 416 (6883), 885–891. https://doi.org/10.1038/416885a

Giorgi, F. M., Bolger, A. M., Lohse, M. and Usadel, B. 2010. Algorithm-driven artifacts in median polish summarization of microarray data. BMC Bioinformatics, 11: 553.

Gregory, R. I., Chendrimada, T. P., Cooch, N. and Shiekhattar, R. 2005. 'Human RISC couples microRNA biogenesis and posttranscriptional gene silencing. Cell, 123: 631-40.

Gül, A., Ohno, S. 2012. HLA-B*51 and Behçet Disease. Ocul Immunol Inflam., 20(1): 37-43.

Hackstadt, A. J., and Hess, A. M. 2009. Filtering for increased power for microarray data analysis. BMC Bioinformatics, 10: 11.

Hassouna, S.S., Tayel, M.Y., ElKaffash, D.M., et al. 2018. MicroRNA155 Expression in Relation to BDCAF Scored Behçet's Disease in an Egyptian Patients Sample. The Open Rheumatology Journal, 12, 115-122.

Hatemi, G., Bahar, H., Uysal, S., Mat, C., Gogus, F., Masatlioglu, S., Altas, K. and Yazici, H. 2004. The pustular skin lesions in Behcet's syndrome are not sterile. Ann Rheum Dis, 63: 1450-2.

Hatemi, G., Seyahi, E.I., Fresko, I., Talarico, R., Hamuryudan, V. 2015. Behçet's syndrome: a critical digest of the 2014-2015 literature. Clin Exp Rheumatol, 33: S3-S14.

Hatemi, G., and Yazici, H. 2011. Behçet's syndrome and micro-organisms. Best Pract Res Clin Rheumatol, 25: 389-406.

Hitit, M., Kurar E., Güzeloğlu A. 2015. MikroRNA Biyogenezi. Atatürk Ü. Vet. Bil. Derg., 10(3):211-218

Hou, S., Ye, Z., Liao, D., et al. 2015. miR-23a, miR-146a and miR-301a confer predisposition to Vogt-Koyanagi-Harada syndrome but not to Behcet’s disease. Scientific Reports, 6:20057.

Ibrahim, W., Sakr, B.R., Obaya, E., et al. 2018. MicroRNA-146a expression and microRNA-146a rs2910164 polymorphism in Behcet’s disease patients. Clinical Rheumatology, 38, (397-402).

International Study Group for Behçet's Disease. 1990. Criteria for diagnosis of Behçet's disease. Lancet, 335: 1078-80.

Irizarry, R. A., Hobbs, B., Collin, F., Beazer-Barclay, Y. D., Antonellis, K. J., Scherf, U., and Speed, T. P. 2003. Exploration, normalization, and summaries of high density oligonucleotide array probe level data. Biostatistics, 4: 249-64.

Jadideslam, G., Ansarin, K., Sakhinia, E., et al. 2019. Expression levels of miR-21, miR-146b and miR-326 as potential biomarkers in Behcet's disease. Biomarkers in Medicine, 13(16), doi.org/10.2217/bmm-2019-0098.

Kamal, A., Elgengehy, F.T., Elawady, Z., et al. 2021. Role of miR-146a rs2910164 and UTS2 rs228648 Genetic Variants in Behçet's Disease. Immunological Investigations, doi.org/10.1080/08820139.2021.1883647.

Kaneko, F., Oyama, N., Yanagihori, H., Isogai, E., Yokota, K. and Oguma, K. 2008. The role of streptococcal hypersensitivity in the pathogenesis of Behçet's Disease. Eur J Dermatol, 18: 489-98.

Karasneh, J., Gül, A., Ollier, W. E., Silman, A. J., and Worthington, J. 2005. Whole-genome screening for susceptibility genes in multicase families with Behçet's disease. Arthritis Rheum, 52: 1836-42.

Kim, B., and LeBoit, P. E. 2000. Histopathologic features of erythema nodosum--like lesions in Behçet disease: a comparison with erythema nodosum focusing on the role of vasculitis. Am J Dermatopathol, 22: 379-90.

Kim, J., Park, J. A., Lee, E. Y., Lee, Y. J., Song, Y. W. and Lee, E. B. 2010. Imbalance of Th17 to Th1 cells in Behçet's disease. Clin Exp Rheumatol, 28: S16-9.

Kirino, Y., G., Bertsias, Y., Ishigatsubo, N., Mizuki, I., Tugal-Tutkun, E., Seyahi, Y., Ozyazgan, F. S., Sacli, B., Erer, H., Inoko, Z., Emrence, A., Cakar, N., Abaci, D., Ustek, C., Satorius, A., Ueda, M., Takeno, Y., Kim, G. M., Wood, M. J., Ombrello, A., Meguro, A., Gül, E. F. Remmers, and D. L. Kastner. 2013. Genome-wide association analysis identifies new susceptibility loci for Behçet's disease and epistasis between HLA-B*51 and ERAP1. Nat Genet, 45: 202-7.

Kural-Seyahi E., Fresko I., Seyahi N., et al. 2003. The long-term mortality and morbidity of Behçet syndrome: a 2-decade outcome survey of 387 patients followed at a dedicated center. Medicine (Baltimore), Jan;82(1):60–76.

Lee, S., Bang, D., Cho, Y. H., Lee, E. S. and Sohn, S. 1996. Polymerase chain reaction reveals herpes simplex virus DNA in saliva of patients with Behçet's disease. Arch Dermatol Res, 288: 179-83.

Leonardo, N. M., McNeil J. 2015. Behcet's Disease: Is There Geographical Variation? A Review Far from the Silk Road. Int J Rheumatol, 2015:1–7. Available from: http://www.hindawi.com/journals/ijr/2015/945262/

Lewis, B. P., Burge, C. B. and Bartel, D. P. 2005. Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. Cell, 120: 15-20.

Lewis, K. A., Graham, E. M. and Stanford, M. R. 2007. Systematic review of ethnic variation in the phenotype of Behcet's disease. Scand J Rheumatol, 36: 1-6.

Liang, L., Zhou, Q., Feng, L. 2021. Decreased microRNA-155 in Behcet's disease leads to defective control of autophagy thereby stimulating excessive proinflammatory cytokine production. Arthritis Research & Therapy, 23(135), 1-11.

Lionetti, M., Biasiolo, M., Agnelli, L., Todoerti, K., Mosca, L., Fabris, S., Sales, G., Deliliers, G. L., Bicciato, S., Lombardi, L., Bortoluzzi, S. and Neri, A. 2009. Identification of microRNA expression patterns and definition of a microRNA/mRNA regulatory network in distinct molecular groups of multiple myeloma. Blood, 114: e20-6.

Mat, M.C., Sevim, A., Fresko, I., Tüzün, Y. 2014. Behçet's disease as a systemic disease. Clin Dermatol, 32(3): 435-42.

Matzinger, P. 2002. The danger model: a renewed sense of self. Science, 296: 301-5.

Medzhitov, R., and Janeway, C. A. 2002. Decoding the patterns of self and nonself by the innate immune system. Science, 296: 298-300.

Meguro, A., Inoko, H., Ota, M., Katsuyama, Y., Oka, A., Okada, E., Yamakawa, R., Yuasa, T., Fujioka, T., Ohno, S., Bahram, S. and Mizuki, N. 2010. Genetics of Behçet disease inside and outside the MHC. Ann Rheum Dis, 69: 747-54.

Morton, L. T., Situnayake, D. and Wallace, G. R. 2016. Genetics of Behçet's disease. Curr Opin Rheumatol, 28: 39-44.

Mosca, E., and Milanesi, L. 2013. Network-based analysis of omics with multi-objective optimization. Mol Biosyst, 9: 2971-80.

Nanke, Y., Yago, T. and Kotake, S. 2017. The Role of Th17 Cells in the Pathogenesis of Behcet's Disease. J Clin Med, 6.

Neumann, K., Castiñeiras-Vilariño, M., Höckendorf, U., Hannesschläger, N., Lemeer, S., Kupka, D., Meyermann, S., Lech, M., Anders, H. J., Kuster, B., Busch, D. H., Gewies, A., Naumann, R., Groß, O. and Ruland, J. 2014. Clec12a is an inhibitory receptor for uric acid crystals that regulates inflammation in response to cell death. Immunity, 40: 389-99.

Nieves, E. C., Toubai, T., Peltier, D. C., Oravecz-Wilson, K., Liu, C., Tamaki, H., Sun, Y. and Reddy, P. 2017. STAT3 Expression in Host Myeloid Cells Controls Graft-versus-Host Disease Severity. Biol Blood Marrow Transplant, 23: 1622-30.

O'Duffy, J. D. 1990. Vasculitis in Behçet's disease. Rheum Dis Clin North Am, 16: 423-31.

Oğuz, A. K., Yılmaz, S., Akar, N., Özdağ, H., Gürler, A., Ateş, A., Oygür, Ç.Ş., Kılıçoğlu, S. S. and Demirtaş, S. 2015. C-type lectin domain family 12, member A: A common denominator in Behçet's syndrome and acute gouty arthritis. Med Hypotheses, 85: 186-91.

Oğuz, A.K., Yılmaz, S.T., Oygür, Ç.Ş., et al. 2016. Behçet's: A Disease or a Syndrome? Answer from an Expression Profiling Study. PLoS ONE, 11(2), e0149052.

Ohno, S., Aoki, K., Sugiura, S., Nakayama, E., Itakura, K. and Aizawa., M. 1973. Letter: HL-A5 and Behçet's disease. Lancet, 2: 1383-4.

Ohno, S., Ohguchi, M., Hirose, S., Matsuda, H., Wakisaka, A., Aizawa, M. 1982. Close association of HLA-Bw51 with Behçet's disease. Arch Ophthalmol, 100(9): 1455-8.

Onat, AM., Gerenli, O., Kisacik, B., et al. 2014. "Mi-RNA Profile of Active Vascular Behçet's Patients". Arthritis and rheumatology, 66:1199-S1200 Issue 4 https://acrabstracts.org/abstract/mi-rna-profile-of-active-vascular-behcets-patients.

Pascale, F.M., Jeremy, A. 2002. Application of Microarrays to the Analysis of Gene Expression in Cancer. Squire2–Clinical Chemistry, 48(8): 1170-7.

Peacock, O., Lee, A. C., Larvin, M., Tufarelli, C. and Lund, J. N. 2012. MicroRNAs: relevant tools for a colorectal surgeon?. World J Surg, 36: 1881-92.

Perazzio, S. F., Andrade, L. E. C. and de Souza, A. W. S. 2020. Understanding Behçet's Disease in the Context of Innate Immunity Activation. Front Immunol, 11: 2706 doi=10.3389/fimmu.2020.586558

Petrushkin, H., Hasan, M. S., Stanford, M. R., Fortune, F. and Wallace, G. R. 2015. Behçet's Disease: Do Natural Killer Cells Play a Significant Role?. Front Immunol, 6: 134.

Pineton de Chambrun, M., Wechsler, B., Geri, G., Cacoub, P. and Saadoun, D. 2012. 'New insights into the pathogenesis of Behçet's disease', Autoimmun Rev, 11: 687-98.

Puccetti, A., Pelosi, A., Fiore, P.F., et al. 2018. MicroRNA Expression Profiling in Behçet's Disease. Journal of Immunology Research, vol. 2018, Article ID 2405150, 18 pages.

Qi, J., Hou, S., Zhang, Q., et al. 2013. A functional variant of pre-miRNA-196a2 confers risk for Behcet's disease but not for Vogt–Koyanagi–Harada syndrome or AAU in ankylosing spondylitis. Human Genetics, 132, 1395-1404.

Raisch, J., Darfeuille-Michaud, A., Nguyen, H.T.T. 2013. Role of microRNAs in the immune system, inflammation and cancer. World Journal of Gastroenterology, 19(20), 2985–2996.

Schickel, R., Boyerinas, B., Park, S.M., et al. 2008. MicroRNAs: key players in the immune system, differentiation, tumorigenesis and cell death. Oncogene, 27, 5959–5974.

Scozzi, D., M. Ibrahim, C. Menna, A. S. Krupnick, D. Kreisel, and A. E. Gelman. 2017. The Role of Neutrophils in Transplanted Organs. Am J Transplant, 17: 328-35.

Sevimoğlu, T. 2021. Biomarker Candidates Identified in Behcet's Disease Using Integrative Analysis. Konya Journal of Engineering Sciences, 9(2), 479-489.

Seyahi E. 2019. Phenotypes in Behçet's syndrome. Internal and emergency medicine, 14(5), 677–689. https://doi.org/10.1007/s11739-019-02046-y

Southern E. M. 1975. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. Journal of molecular biology, 98(3), 503–517. https://doi.org/10.1016/s0022-2836(75)80083-0

Shimizu, T., Ehrlich, G. E., Inaba, G. and Hayashi, K. 1979. Behçet disease (Behçet syndrome). Semin Arthritis Rheum, 8: 223-60.

Studd, M., McCance, D. J. and Lehner, T. 1991. Detection of HSV-1 DNA in patients with Behçet's syndrome and in patients with recurrent oral ulcers by the polymerase chain reaction. J Med Microbiol, 34: 39-43.

Taganov, K. D., Boldin, M. P., Chang, K. J. and Baltimore, D. 2006. 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, 103: 12481-6.

Tahamtan, A., Teymoori-Rad, M., Nakstad, B., et al. 2018. Anti-Inflammatory MicroRNAs and Their Potential for Inflammatory Diseases Treatmen. Frontiers in Immunology, doi.org/10.3389/fimmu.2018.01377.

Tong, B., Liu, X., Xiao, J. and Su, G. 2019. Immunopathogenesis of Behcet's Disease. Front Immunol, 10: 665.

Verity, D. H., Marr, J. E., Ohno, S., Wallace, G. R. and Stanford, M. R. 1999. Behçet's disease, the Silk Road and HLA-B51: historical and geographical perspectives. Tissue Antigens, 54: 213-20.

Woo, MY., Yun, SJ., Cho, O., et al. 2016. MicroRNAs differentially expressed in Behçet disease are involved in interleukin-6 production. Journal of Inflammation, 13(22), 1-5.

Yazici, H., Başaran, G., Hamuryudan, V., Hizli, N., Yurdakul, S., Mat, C., Tüzün, Y., Ozyazgan, Y., Dimitriyadis. 1996. The ten-year mortality in Behçet's syndrome. Br J Rheumatol, 35 (2): 139-41.

Yazici, H., E. Seyahi, G. Hatemi, and Y. Yazici. 2018. Behçet syndrome: a contemporary view. Nat Rev Rheumatol, 14: 119.

Yoshikawa, K., Kotake, S., Sasamoto, Y., Ohno, S. and Matsuda, H. 1991. Close association of Streptococcus sanguis and Behçet's disease. Nippon Ganka Gakkai Zasshi, 95: 1261-7.

Yurdakul, S., and Yazıcı Y. 2010. Epidemiology of Behçet's Syndrome and Regional Differences in Disease Expression. in Yusuf Yazıcı and Hasan Yazıcı (eds.), Behçet's Syndrome (Springer New York: New York, NY).

Zhang, B., Kirov, S., and Snoddy, J. (2005). WebGestalt: an integrated system for exploring gene sets in various biological contexts. *Nucleic Acids Res, 33*(Web Server issue), W741-748. doi:10.1093/nar/gki475

Zhou, B., S. Wang, C. Mayr, D. P. Bartel, and H. F. Lodish. 2007. miR-150, a microRNA expressed in mature B and T cells, blocks early B cell development when expressed prematurely. Proc Natl Acad Sci U S A, 104: 7080-5.

Zhou, Q., Xiao, X., Wang, C., et al. 2012. Decreased microRNA-155 Expression in Ocular Behcet's Disease but Not in Vogt Koyanagi Harada Syndrome. Investigative Ophthalmology & Visual Science, 53(9), 5665-5674.

Zou, J., Ji, D.N., Shen, Y., et al. 2016. Association of Reduced Heme Oxygenase-1 with Decreased MicroRNA-196a2 Expression in Peripheral Blood Mononuclear Cells of Patients with Intestinal Behcet's Disease. Annals of Clinical & Laboratory Science, 46(6), 675-679.

EKLER

EK 1 ETİK KURUL DEĞERLENDİRME FORMU

UFUK ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
GİR İŞİMSEL OLMAYAN KLİNİK ARAŞTIRMA
DEĞERLENDİRME KOMİSYONU ONAY FORMU

BAŞVURU BİLGİLERİ	PROJE BAŞVURU TARİH /SAYI►	26022016-3
	ARAŞTIRMANIN ADI	Behçet Sendromu'nda miRNom ve transkriptom profillerinin entegrasyonu
	SORUMLU ARAŞTIRMACI ÜNVANI/ADI	Yard. Doç. Dr. Ali Kemal Oğuz
	ARAŞTIRMANIN YERİ	X
DEĞERLENDİ-RİLEN BELGELER00	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ	X
	GÖNÜLLÜ BİLGİLENDİRME VE ONAM FORMU	X
	OLGU RAPOR FORMU	
	ARAŞTIRMANIN BÜTÇESİ	
	ARAŞTIRICI BROŞÜRÜ (varsa)	
KARAR BİLGİLERİ	Değerlendirme amacıyla Fakültemiz İç Hastalıkları Anabilim Dalı öğretim üyelerinden Yard. Doç. Dr. Ali Kemal Oğuz sorumluluğunda tasarlanan ve yukarıda başvuru bilgileri verilen araştırma başvuru dosyası ve ilgili belgeler 26/02/2016 tarihinde Ufuk Üniversitesi Tıp Fakültesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırma Değerlendirme Komisyonun' nda çalışma esasları doğrultusunda ve araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş araştırma etiğine uygun tasarlanmış olmasından dolayı onay verilmesine karar verilmiştir.	

KOMİSYON BİLGİLERİ

ÜYELER

Unvanı / Adı / Soyadı	Uzmanlık Dalı	Kurumu	E/K	İlişki*	Katılım**
Prof.Dr. Dikmen ARIBAL	**Genel Cerrahi**	UFUK ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ	E	☐E ☒H	☒E ☐H
Prof. Dr. Ferit PEHLİVAN	**Biyofizik**	UFUK ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ	E	☐E ☒H	☒E ☐H
Prof.Dr. Halil DEĞERTEKİN	**İç Hastalıkları**	UFUK ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ	E	☐E ☒H	☒E ☐H
Prof. Dr. Recai PABUÇCU	**Kadın Hastalıkları ve Doğum**	UFUK ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ	E	☐E ☒H	☒E ☐H
Prof.Dr. Selda DEMİRTAŞ	**Biyokimya**	UFUK ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ	K	☐E ☒H	☒E ☐H
Doç. Dr. Arzu PAMPAL	**Çocuk Cerrahisi**	UFUK ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ	K	☐E ☒H	☒E ☐H
Doç.Dr. Berrin YÜKSEL	**Tıbbi Genetik**	UFUK ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ	K	☐E ☒H	☒E ☐H
Yrd. Doç.Dr. Handan DOĞAN	**Patoloji**	UFUK ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ	K	☐E ☒H	☐E ☒H
Yrd.Doç.Dr.Şahika GÜNER	**Tıbbi Farmakoloji**	UFUK ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ	K	☐E ☒H	☒E ☐H
Ecz. Nilgün SÜER	**Eczacı**	UFUK ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ	K	☐E ☒H	☒E ☐H

E/K: Cinsiyeti; *Araştırmayla ilişki; ** Toplantıda bulunma

EK 2 OLGU RAPOR FORMU

Behçet Sendromu'nda miRNom ve Transkriptom Profillerinin Entegrasyonu
TÜBİTAK 116S501

HASTA ADI SOYADI: **TARİH:** / / 201

CİNSİYET: E [ ] K [ ] **YAŞ:** **TELEFON:**

BEHÇET HASTALIĞI BAŞLANGIÇ YAŞI:

ORAL AFT: (+) [ ] **GENİTAL ÜLSER:** (+) [ ] (-) [ ]

PATERJİ: (+) [ ] (-) [ ] **DERİ LEZYONLARI:** (+) [ ] (-) [ ]

GÖZ TUTULUMU: (+) [ ] (-) [ ]

SSS TUTULUMU: (+) [ ] (-) [ ] **GİS TUTULUMU:** (+) [ ] (-) [ ]

KARDİYAK TUTULUM: (+) [ ] (-) [ ] **PULMONER TUTULUM:** (+) [ ] (-) [ ]

EPİDİDİMİT: (+) [ ] (-) [ ] **KAS-İSKELET S. TUTULUMU:** (+) [ ] (-) [ ]

MAJÖR DAMAR TUTULUMU: (+) [ ] (-) [ ]

DVT: [ ] **VCS:** [ ] **VCİ:** [ ] **HEPATİK / PORTAL VEN:** [ ] **AORT:** [ ]

DEĞERLENDİRME ANINDAN ÖNCEKİ SON 2 AY İÇİNDE ORAL AFT DIŞI

TUTULUMLA KARAKTERİZE ALEVLENME (ATAK) VARLIĞI: (+) [ ] (-) [ ]

DEĞERLENDİRME ANINDA KULLANILAN İLAÇLAR

KOLŞİSİN: [ ] **DAPSON:** [ ] **TALİDOMİD:** [ ]

GLUKOKORTİKOİD: [ ] **NSAİİ:** [ ]

AZA: [ ] **CYC-A:** [ ] **CYC:** [ ] **KLORAMBUSİL:** [ ] **MTX:** [ ]

IFN-α: [ ] **SULFASALAZİN:** [ ]

ASA: [ ] **DİPRİDAMOL:** [ ] **KLOPİDOGREL:** [ ] **DMAH:** [ ] **WARFARİN:** [ ]

TNF İNHİBİTÖRÜ: [ ] **ETANERCEPT:** [ ] **INFLIXIMAB:** [ ] **ADALIMUMAB:** [ ]

DİĞER (LÜTFEN BELİRTİNİZ):

LÜTFEN ARKA SAYFAYA GEÇİNİZ →

MB1 ← Lütfen Her 2 Tüpün Üzerine Yazınız

Lütfen Tüpleri Tam Doldurup Karıştırınız

TOTAL KLİNİK AKTİVİTE İNDEKSİ (UYGUN ŞIKKI / ŞIKLARI İŞARETLEYİNİZ)

GÖZ	0	**NORMAL** [ ]
	1	**SADECE VİTREUS VE / VEYA ÖN KAMERADA HÜCRE** [ ]
	2	**% 50 GÖRME** [ ]
	3	**% 30 GÖRME** [ ]
	4	**BİRKAÇ METREDEN PARMAK SAYIYOR** [ ]
	5	**GÖRMÜYOR** [ ]
DERİ	1	**AFTLAR** [ ]
	1	**ERİTEMA NODOZUM** [ ]
	1	**GENİTAL ÜLSERLER** [ ]
DAMAR TUTULUMU		
	1	**TEK TARAFLI YÜZEYEL TROMBOFLEBİT VEYA DVT** [ ]
	2	**ÇİFT TARAFLI YÜZEYEL TROMBOFLEBİT VEYA DVT** [ ]
	3	**YÜZEYEL TROMBOFLEBİT VE DVT** [ ]
	4	**VCS VEYA VCİ TROMBOZU** [ ]
	5	**VCS VE VCİ TROMBOZU VE / VEYA ARTERİYEL OKLÜZYON** [ ]
ARTRİT		
	1	**HER BİR EKLEM** [ ]
NÖROLOJİK TUTULUM		
	2	**İNTRAKRANİYAL HİPERTANSİYON (BASINÇ ARTIŞI)** [ ]
	4	**MULTİPL SKLEROZ BENZERİ SENDROM** [ ]
	5	**PİRAMİDAL VE / VEYA SEREBELLAR TUTULUM** [ ]

TEŞEKKÜR EDERİZ

MB1 ← Lütfen Her 2 Tüpün Üzerine Yazınız

Lütfen Tüpleri Tam Doldurup Karıştırınız

EK 3 SINIF KARŞILAŞTIRMALARI miRNA LİSTELERİ

BxK (Behçet vs Kontrol)

Parametric p-value	FDR	Fold-change	ProbeSet	MicroRNAID
0.000704	0.111	1.42	MIMAT0004775_st	hsa-miR-502-3p
0.0009546	0.111	1.48	MIMAT0002871_st	hsa-miR-500a-3p
0.0013014	0.112	1.52	MIMAT0004498_st	hsa-miR-25-5p
0.0014712	0.112	1.6	MIMAT0000259_st	hsa-miR-182-5p
0.0022538	0.112	1.26	MI0001445_st	hsa-mir-423
0.0028348	0.112	0.75	MI0022557_st	hsa-mir-6722
0.0031072	0.112	2.01	MIMAT0000772_st	hsa-miR-345-5p
0.0031264	0.112	1.53	MIMAT0004810_st	hsa-miR-629-5p
0.0044418	0.129	1.31	MIMAT0006764_st	hsa-miR-320d
0.0053502	0.138	2.4	MIMAT0022708_st	hsa-miR-584-3p
0.0060768	0.138	1.57	MIMAT0016858_st	hsa-miR-4306
0.0069783	0.138	1.67	MIMAT0004560_st	hsa-miR-183-3p
0.0071226	0.138	1.33	MIMAT0018976_st	hsa-miR-4454
0.0082822	0.146	0.33	MIMAT0017991_st	hsa-miR-3613-3p
0.008456	0.146	1.97	MIMAT0000261_st	hsa-miR-183-5p
0.0101744	0.151	1.55	MIMAT0015072_st	hsa-miR-320e
0.0105912	0.151	0.37	MIMAT0019745_st	hsa-miR-4668-5p
0.0106291	0.151	2	MIMAT0000731_st	hsa-miR-378a-5p
0.0108098	0.151	0.69	MIMAT0001631_st	hsa-miR-451a
0.0110382	0.151	1.61	MIMAT0014995_st	hsa-miR-3130-5p
0.0118507	0.158	1.61	MIMAT0019071_st	hsa-miR-4532
0.012998	0.166	1.59	MIMAT0001343_st	hsa-miR-425-3p
0.0134585	0.166	1.65	MIMAT0004611_st	hsa-miR-185-3p
0.0145816	0.174	1.26	MIMAT0004748_st	hsa-miR-423-5p
0.0158777	0.185	1.34	MIMAT0004945_st	hsa-miR-744-5p
0.016891	0.192	1.57	MIMAT0004749_st	hsa-miR-424-3p
0.0202496	0.225	1.33	MIMAT0000231_st	hsa-miR-199a-5p
0.0213767	0.227	1.42	MIMAT0000085_st	hsa-miR-28-5p
0.0214043	0.227	1.8	MIMAT0019855_st	hsa-miR-4732-5p
0.0235061	0.243	1.63	MIMAT0004774_st	hsa-miR-501-3p
0.0288672	0.277	1.31	MIMAT0031178_st	hsa-miR-7975
0.0297325	0.277	1.29	MIMAT0004819_st	hsa-miR-671-3p
0.0325113	0.297	1.75	MIMAT0018961_st	hsa-miR-4443
0.0355651	0.307	1.67	MIMAT0003294_st	hsa-miR-625-5p
0.03795	0.313	0.79	MIMAT0000451_st	hsa-miR-150-5p

0.038454	0.313	1.71	MIMAT0010214_st	hsa-miR-151b
0.040163	0.313	1.71	MIMAT0002874_st	hsa-miR-503-5p
0.0403011	0.313	1.78	MIMAT0000267_st	hsa-miR-210-3p
0.0405745	0.313	1.4	MIMAT0000757_st	hsa-miR-151a-3p
0.0414745	0.313	1.45	MIMAT0004800_st	hsa-miR-550a-5p
0.0416699	0.313	1.59	MIMAT0005951_st	hsa-miR-1307-3p
0.0422846	0.313	1.6	MIMAT0022737_st	hsa-miR-550b-2-5p
0.046738	0.325	1.35	MIMAT0000087_st	hsa-miR-30a-5p
0.047636	0.326	1.99	MIMAT0004614_st	hsa-miR-193a-5p

MxK (Mukokütan Behçet vs Kontrol)

Parametric p-value	FDR	Fold-change	ProbeSet	MicroRNAID
0.0002587	0.121	0.18	MIMAT0017991_st	hsa-miR-3613-3p
0.002217	0.239	0.35	MIMAT0031002_st	hsa-miR-8075
0.0023601	0.239	1.26	MIMAT0005792_st	hsa-miR-320b
0.0028872	0.239	2.55	MIMAT0022708_st	hsa-miR-584-3p
0.0030738	0.239	1.28	MIMAT0005793_st	hsa-miR-320c
0.0040998	0.273	0.26	MIMAT0019745_st	hsa-miR-4668-5p
0.0058517	0.286	1.63	MIMAT0004694_st	hsa-miR-342-5p
0.0067383	0.286	1.44	MIMAT0004498_st	hsa-miR-25-5p
0.0069444	0.286	1.75	MIMAT0004810_st	hsa-miR-629-5p
0.0099786	0.286	1.59	MIMAT0000064_st	hsa-let-7c-5p
0.010538	0.286	1.37	MIMAT0006764_st	hsa-miR-320d
0.0108234	0.286	0.72	MI0022557_st	hsa-mir-6722
0.0110409	0.286	1.6	MIMAT0004800_st	hsa-miR-550a-5p
0.0146228	0.324	2.32	MIMAT0000731_st	hsa-miR-378a-5p
0.0154787	0.326	2.14	MIMAT0015085_st	hsa-miR-3200-3p
0.0179396	0.336	1.43	MIMAT0000231_st	hsa-miR-199a-5p
0.0187724	0.336	1.95	MIMAT0000261_st	hsa-miR-183-5p
0.0208328	0.35	2.94	MIMAT0029782_st	hsa-miR-7641
0.0210445	0.35	1.36	MIMAT0010133_st	hsa-miR-2110
0.0227113	0.365	1.37	MIMAT0004945_st	hsa-miR-744-5p
0.0253437	0.378	1.48	MIMAT0000259_st	hsa-miR-182-5p
0.0258246	0.378	0.67	MIMAT0001631_st	hsa-miR-451a
0.0260398	0.378	1.56	MIMAT0014995_st	hsa-miR-3130-5p
0.0272102	0.378	1.82	MIMAT0004611_st	hsa-miR-185-3p
0.0279679	0.378	1.36	MIMAT0005825_st	hsa-miR-1180-3p
0.0300386	0.378	1.51	MIMAT0004560_st	hsa-miR-183-3p
0.030626	0.378	1.41	MIMAT0000063_st	hsa-let-7b-5p
0.0306739	0.378	2	MIMAT0000267_st	hsa-miR-210-3p
0.0308118	0.378	0.47	MIMAT0027365_st	hsa-miR-6732-5p
0.0332208	0.387	1.28	MIMAT0004775_st	hsa-miR-502-3p
0.0369045	0.419	1.52	MIMAT0005796_st	hsa-miR-1271-5p
0.0397433	0.441	1.79	MIMAT0022731_st	hsa-miR-3184-3p

OxK (Oküler Behçet vs Kontrol)

Parametric p-value	FDR	Fold-change	ProbeSet	MicroRNAID
0.0082443	0.349	1.87	MIMAT0015072_st	hsa-miR-320e
0.0095804	0.372	3.09	MIMAT0004614_st	hsa-miR-193a-5p
0.0140562	0.504	2.15	MIMAT0000772_st	hsa-miR-345-5p
0.0184441	0.614	0.73	MIMAT0000256_st	hsa-miR-181a-5p
0.0316441	0.771	1.4	MIMAT0016916_st	hsa-miR-4286
0.0337993	0.771	0.78	MIMAT0018925_st	hsa-miR-1268b
0.038422	0.771	1.95	MIMAT0002174_st	hsa-miR-484
0.0386882	0.771	1.3	MIMAT0004498_st	hsa-miR-25-5p
0.0397635	0.771	2.21	MIMAT0000707_st	hsa-miR-363-3p
0.0422807	0.771	1.4	MIMAT0004560_st	hsa-miR-183-3p
0.0432334	0.771	1.38	MIMAT0002871_st	hsa-miR-500a-3p
0.0452771	0.771	1.48	MIMAT0000087_st	hsa-miR-30a-5p

VxK (Vasküler Behçet vs Kontrol)

Parametric p-value	FDR	Fold-change	ProbeSet	MicroRNAID
0.0000133	0.00396	2.51	MIMAT0004749_st	hsa-miR-424-3p
0.000017	0.00396	2.13	MIMAT0000259_st	hsa-miR-182-5p
0.000051	0.00596	2.2	MIMAT0019071_st	hsa-miR-4532
0.0000827	0.00596	1.83	MIMAT0002871_st	hsa-miR-500a-3p
0.0000873	0.00596	1.58	MIMAT0018976_st	hsa-miR-4454
0.0000895	0.00596	1.7	MIMAT0004775_st	hsa-miR-502-3p
0.0001913	0.0111	3.15	MIMAT0002874_st	hsa-miR-503-5p
0.0002377	0.0123	3.18	MIMAT0000261_st	hsa-miR-183-5p
0.000289	0.0135	1.85	MIMAT0004498_st	hsa-miR-25-5p
0.0003422	0.0145	1.49	MIMAT0031178_st	hsa-miR-7975
0.000467	0.0181	2.3	MIMAT0010214_st	hsa-miR-151b
0.0005479	0.0184	1.33	MIMAT0005793_st	hsa-miR-320c
0.0005514	0.0184	2.14	MIMAT0016858_st	hsa-miR-4306
0.0008505	0.0248	2.17	MIMAT0004560_st	hsa-miR-183-3p
0.0009986	0.0274	1.29	MIMAT0005792_st	hsa-miR-320b
0.0012239	0.03	1.75	MIMAT0000085_st	hsa-miR-28-5p
0.0013965	0.0325	2.47	MIMAT0005951_st	hsa-miR-1307-3p
0.002019	0.0366	1.37	MIMAT0004697_st	hsa-miR-151a-5p
0.0020591	0.0366	1.89	MIMAT0014995_st	hsa-miR-3130-5p
0.0021367	0.0366	2.82	MIMAT0022708_st	hsa-miR-584-3p
0.0023324	0.0366	1.58	MIMAT0002888_st	hsa-miR-532-5p
0.0023338	0.0366	1.46	MIMAT0004748_st	hsa-miR-423-5p
0.0024276	0.0366	1.52	MIMAT0004945_st	hsa-miR-744-5p
0.002604	0.0371	0.65	MIMAT0000451_st	hsa-miR-150-5p
0.0026368	0.0371	1.34	MI0001445_st	hsa-mir-423
0.0029925	0.0387	0.67	MI0022557_st	hsa-mir-6722
0.0031322	0.0394	0.62	MIMAT0001631_st	hsa-miR-451a
0.0040127	0.0467	1.27	MIMAT0003256_st	hsa-miR-589-3p
0.0041903	0.0476	1.83	MIMAT0001343_st	hsa-miR-425-3p
0.0047217	0.0495	2.41	MIMAT0000267_st	hsa-miR-210-3p
0.0048644	0.0495	2.24	MIMAT0000424_st	hsa-miR-128-3p
0.006073	0.0578	0.41	MIMAT0031002_st	hsa-miR-8075
0.0064699	0.0603	0.38	MIMAT0027365_st	hsa-miR-6732-5p
0.0072561	0.0663	1.57	MIMAT0000426_st	hsa-miR-132-3p
0.0074977	0.0667	2.13	MIMAT0000731_st	hsa-miR-378a-5p
0.0080922	0.0679	2.18	MIMAT0004774_st	hsa-miR-501-3p
0.0082203	0.0679	2.08	MIMAT0000772_st	hsa-miR-345-5p
0.0086233	0.0679	0.74	MIMAT0023712_st	hsa-miR-6087

0.0087465	0.0679	1.75	MIMAT0018932_st	hsa-miR-378f
0.0088623	0.0679	1.42	MIMAT0004819_st	hsa-miR-671-3p
0.008886	0.0679	2.94	MIMAT0004614_st	hsa-miR-193a-5p
0.0095073	0.0703	1.38	MIMAT0000231_st	hsa-miR-199a-5p
0.0105942	0.076	2.3	MIMAT0016847_st	hsa-miR-378c
0.0112157	0.0771	1.55	MIMAT0000757_st	hsa-miR-151a-3p
0.0117602	0.078	1.88	MIMAT0022737_st	hsa-miR-550b-2-5p
0.0122476	0.078	1.27	MIMAT0018949_st	hsa-miR-4433-3p
0.0123246	0.078	1.98	MIMAT0030414_st	hsa-miR-4433b-3p
0.0125475	0.078	1.39	MIMAT0000080_st	hsa-miR-24-3p
0.0125641	0.078	2.39	MIMAT0001413_st	hsa-miR-20b-5p
0.0128885	0.078	2.83	MIMAT0022259_st	hsa-miR-5100
0.0136447	0.0805	0.65	MIMAT0019032_st	hsa-miR-4497
0.0144683	0.0837	1.99	MIMAT0003294_st	hsa-miR-625-5p
0.0145448	0.0837	1.47	MIMAT0005905_st	hsa-miR-1254
0.015311	0.0861	1.58	MIMAT0004611_st	hsa-miR-185-3p
0.0187414	0.101	1.62	MIMAT0004702_st	hsa-miR-339-3p
0.0190267	0.101	3.08	MIMAT0018356_st	hsa-miR-3940-3p
0.0192966	0.101	1.34	MIMAT0006764_st	hsa-miR-320d
0.0214665	0.11	2.37	MIMAT0018961_st	hsa-miR-4443
0.0225809	0.112	2.09	MI0002468_st	hsa-mir-484
0.0236947	0.116	1.91	MIMAT0019855_st	hsa-miR-4732-5p
0.0250448	0.12	1.81	MIMAT0003249_st	hsa-miR-584-5p
0.0272131	0.128	1.59	MIMAT0000437_st	hsa-miR-145-5p
0.0286591	0.132	2.03	MIMAT0002174_st	hsa-miR-484
0.0290383	0.133	0.78	MIMAT0019053_st	hsa-miR-4516
0.029815	0.133	1.37	MIMAT0004773_st	hsa-miR-500a-5p
0.0329459	0.142	1.51	MIMAT0004810_st	hsa-miR-629-5p
0.0364264	0.154	2.04	MIMAT0005796_st	hsa-miR-1271-5p
0.0381933	0.159	1.57	MIMAT0004800_st	hsa-miR-550a-5p
0.0400887	0.163	0.58	MI0014234_x_st	hsa-mir-320e
0.0402927	0.163	1.56	MIMAT0004484_st	hsa-let-7d-3p
0.0418222	0.167	1.65	MIMAT0000072_st	hsa-miR-18a-5p
0.0454439	0.177	1.75	MIMAT0000705_st	hsa-miR-362-5p
0.0459249	0.177	1.66	MIMAT0022742_st	hsa-miR-1273g-3p
0.0470646	0.178	1.34	MIMAT0027038_st	hsa-miR-1343-5p
0.0485011	0.18	1.84	MIMAT0000689_st	hsa-miR-99b-5p
0.0487235	0.18	0.34	MIMAT0019745_st	hsa-miR-4668-5p

MxO (Mukokütan Behçet vs Oküler Behçet)

Parametric p-value	FDR	Fold-change	ProbeSet	MicroRNAID
0.0001683	0.0478	0.77	MIMAT0000440_st	hsa-miR-191-5p
0.0002051	0.0478	4.82	MIMAT0031002_st	hsa-miR-8075
0.0007857	0.122	0.22	MIMAT0029782_st	hsa-miR-7641
0.0014196	0.165	3.65	MIMAT0004614_st	hsa-miR-193a-5p
0.00248	0.231	3	MIMAT0027365_st	hsa-miR-6732-5p
0.0033339	0.238	2.21	MIMAT0002174_st	hsa-miR-484
0.0039954	0.238	3.32	MIMAT0017991_st	hsa-miR-3613-3p
0.0051705	0.258	0.74	MIMAT0000762_st	hsa-miR-324-3p
0.0055456	0.258	0.26	MIMAT0019044_st	hsa-miR-4507
0.0084559	0.328	2.01	MI0002468_st	hsa-mir-484
0.0099024	0.335	0.5	MIMAT0022731_st	hsa-miR-3184-3p
0.012926	0.335	0.55	MIMAT0004694_st	hsa-miR-342-5p
0.0144887	0.355	0.69	MIMAT0000063_st	hsa-let-7b-5p
0.0156781	0.355	0.53	MIMAT0005797_st	hsa-miR-1301-3p
0.0159909	0.355	2.27	MIMAT0000280_st	hsa-miR-223-3p
0.0235627	0.399	0.54	MIMAT0019069_st	hsa-miR-4530
0.0271398	0.41	0.65	MIMAT0003239_st	hsa-miR-574-3p
0.0285639	0.41	0.59	MIMAT0023693_st	hsa-miR-6068
0.031379	0.412	0.64	MIMAT0005825_st	hsa-miR-1180-3p
0.0345067	0.412	0.61	MIMAT0004558_st	hsa-miR-181a-2-3p
0.0369165	0.42	1.68	MIMAT0015055_st	hsa-miR-3178
0.0396892	0.424	2.22	MIMAT0019745_st	hsa-miR-4668-5p

MxV (Mukokütan Behçet vs Vasküler Behçet)

Parametric p-value	FDR	Fold-change	ProbeSet	MicroRNAID
0.0002119	0.075	3.05	MIMAT0002874_st	hsa-miR-503-5p
0.0004187	0.075	2.12	MIMAT0004749_st	hsa-miR-424-3p
0.0011434	0.0838	3.47	MIMAT0004614_st	hsa-miR-193a-5p
0.0012516	0.0838	1.45	MIMAT0002871_st	hsa-miR-500a-3p
0.001259	0.0838	0.3	MIMAT0019044_st	hsa-miR-4507
0.0025054	0.118	2.3	MIMAT0002174_st	hsa-miR-484
0.0025386	0.118	2.28	MI0002468_st	hsa-mir-484
0.0052874	0.224	1.33	MIMAT0004775_st	hsa-miR-502-3p
0.0080866	0.304	0.57	MIMAT0004694_st	hsa-miR-342-5p
0.0086983	0.304	1.29	MIMAT0004748_st	hsa-miR-423-5p
0.0104426	0.304	1.82	MIMAT0000227_st	hsa-miR-197-3p
0.011196	0.307	1.79	MIMAT0004774_st	hsa-miR-501-3p
0.0132506	0.331	1.58	MIMAT0016858_st	hsa-miR-4306
0.0136278	0.331	0.67	MIMAT0005825_st	hsa-miR-1180-3p
0.014205	0.331	3.39	MIMAT0018356_st	hsa-miR-3940-3p
0.0164773	0.366	3.02	MIMAT0022259_st	hsa-miR-5100
0.0222951	0.433	0.65	MIMAT0019069_st	hsa-miR-4530
0.0233205	0.433	2.18	MIMAT0000443_st	hsa-miR-125a-5p
0.0241334	0.433	0.66	MIMAT0019032_st	hsa-miR-4497
0.0271248	0.468	0.6	MIMAT0022967_st	hsa-miR-3620-5p
0.0320009	0.478	1.44	MIMAT0000259_st	hsa-miR-182-5p
0.0337033	0.478	1.47	MIMAT0004702_st	hsa-miR-339-3p
0.034267	0.478	0.71	MIMAT0000451_st	hsa-miR-150-5p
0.0351507	0.478	1.33	MIMAT0000080_st	hsa-miR-24-3p
0.0354602	0.478	0.66	MIMAT0005797_st	hsa-miR-1301-3p
0.0370544	0.478	1.43	MIMAT0000426_st	hsa-miR-132-3p
0.0374748	0.478	1.55	MIMAT0000437_st	hsa-miR-145-5p
0.041086	0.478	1.35	MIMAT0002888_st	hsa-miR-532-5p
0.0425039	0.478	0.44	MIMAT0029782_st	hsa-miR-7641
0.0435092	0.478	1.61	MIMAT0019071_st	hsa-miR-4532
0.0481219	0.498	2.02	MIMAT0005577_st	hsa-miR-1226-3p

OxV (Oküler Behçet vs Vasküler Behçet)

Parametric p-value	FDR	Fold-change	ProbeSet	MicroRNAID
0.000312	0.0337	1.63	MIMAT0016858_st	hsa-miR-4306
0.0003312	0.0337	1.37	MIMAT0018949_st	hsa-miR-4433-3p
0.0004151	0.0337	1.25	MIMAT0019711_st	hsa-miR-4649-5p
0.0004181	0.0337	0.27	MIMAT0027365_st	hsa-miR-6732-5p
0.0004337	0.0337	0.24	MIMAT0031002_st	hsa-miR-8075
0.0012045	0.0419	2.15	MIMAT0030414_st	hsa-miR-4433b-3p
0.0021894	0.0496	2.66	MIMAT0000261_st	hsa-miR-183-5p
0.0029853	0.0516	2.32	MIMAT0005951_st	hsa-miR-1307-3p
0.0029895	0.0516	1.66	MIMAT0000259_st	hsa-miR-182-5p
0.00387	0.0547	2.02	MIMAT0004749_st	hsa-miR-424-3p
0.0065542	0.0844	0.64	MI0014234_x_st	hsa-mir-320e
0.0137617	0.149	2.04	MIMAT0018987_st	hsa-miR-4463
0.0148139	0.157	2.12	MIMAT0002874_st	hsa-miR-503-5p
0.0167547	0.167	1.64	MIMAT0000257_st	hsa-miR-181b-5p
0.0171557	0.167	4.75	MIMAT0000098_st	hsa-miR-100-5p
0.0173308	0.167	1.36	MIMAT0018976_st	hsa-miR-4454
0.0180176	0.167	1.55	MIMAT0005871_st	hsa-miR-1207-5p
0.0186332	0.167	0.78	MI0022557_st	hsa-mir-6722
0.0217484	0.191	1.32	MIMAT0004775_st	hsa-miR-502-3p
0.0256837	0.214	2.02	MIMAT0029782_st	hsa-miR-7641
0.0272347	0.221	1.5	MIMAT0023693_st	hsa-miR-6068
0.0274902	0.221	1.41	MIMAT0000256_st	hsa-miR-181a-5p
0.0308975	0.236	1.35	MIMAT0000104_st	hsa-miR-107
0.0322188	0.241	2.85	MIMAT0000423_st	hsa-miR-125b-5p
0.0330703	0.241	1.6	MIMAT0018932_st	hsa-miR-378f
0.0363133	0.255	1.43	MIMAT0004498_st	hsa-miR-25-5p
0.038004	0.256	2.1	MIMAT0000267_st	hsa-miR-210-3p
0.0389946	0.256	1.89	MIMAT0016847_st	hsa-miR-378c
0.0428153	0.273	1.33	MIMAT0002871_st	hsa-miR-500a-3p
0.0445366	0.28	1.62	MIMAT0019071_st	hsa-miR-4532
0.0462194	0.28	1.38	MIMAT0000426_st	hsa-miR-132-3p