

**T.C.**  
**İZMİR KÂTİP ÇELEBİ ÜNİVERSİTESİ**  
**SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**  
**TIBBİ BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI**

**HK-2 HÜCRE HATTINDA ANTI-HLA**  
**ANTİKORLARININ MİRNA EKSPRESYONU**  
**ÜZERİNE ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

**ASLI ELDEM**  
**ORCID ID: 0000-0003-3510-6748**  
**DOKTORA TEZİ**

**DANIŞMAN**  
**PROF. DR. TÜLAY KILIÇASLAN AYNA**

**Bu tez İzmir Kâtip Çelebi Üniversitesi Bilimsel Araştırma**  
**Projeleri Yönetim Birimi tarafından 2022-TDR-SABE-0009**  
**proje numarası ile Bilimsel Araştırma Projeleri**  
**Koordinatörlüğü tarafından desteklenmiştir.**

**İZMİR-2023**



T.C.  
İZMİR KÂTİP ÇELEBİ ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
TIBBİ BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

**HK-2 HÜCRE HATTINDA ANTI-HLA ANTİKORLARININ  
MİRNA EKSPRESYONU  
ÜZERİNE ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

**ASLI ELDEM**  
**ORCID ID: 0000-0003-3510-6748**  
**DOKTORA TEZİ**

**DANIŞMAN**  
**PROF. DR. TÜLAY KILIÇASLAN AYNA**

**Bu tez İzmir Kâtip Çelebi Üniversitesi Bilimsel Araştırma  
Projeleri Yönetim Birimi tarafından 2022-TDR-SABE-0009 proje  
numarası ile Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü  
tarafından desteklenmiştir.**

**İZMİR-2023**

## **KABUL ONAY SAYFASI**

## YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI

Enstitü tarafından onaylanan lisansüstü tezimin/raporumun tamamını veya herhangi bir kısmını, basılı (kağıt) ve elektronik formatta arşivleme ve aşağıda verilen koşullarla kullanıma açma iznini İzmir Katip Çelebi Üniversitesi'ne verdiğimi bildiririm. Bu izinle Üniversiteye verilen kullanım hakları dışındaki tüm fikri mülkiyet haklarım bende kalacak, tezimin tamamının ya da bir bölümünün gelecekteki çalışmalarda (makale, kitap, lisans ve patent vb.) kullanım hakları bana ait olacaktır.

Tezin kendi orijinal çalışmam olduğunu, başkalarının haklarını ihlal etmediğimi ve tezimin tek yetkili sahibi olduğumu beyan ve taahhüt ederim. Tezimde yer alan telif hakkı bulunan ve sahiplerinden yazılı izin alınarak kullanılması zorunlu metinlerin yazılı izin alınarak kullandığımı ve istenildiğinde suretlerini Üniversiteye teslim etmeyi taahhüt ederim.

- Tezimin/Raporumun tamamı dünya çapında erişime açılabilir ve bir kısmı veya tamamının fotokopisi alınabilir. (Bu seçenekte teziniz arama motorlarında indekslenebilecek, daha sonra tezinizin erişim statüsünün değiştirilmesini talep etmeniz ve kütüphane bu talebinizi yerine getirirse bile, teziniz arama motorlarının önbelleklerinde kalmaya devam edebilecektir.)
- Tezimin/Raporumun ..... tarihine kadar erişime açılmasını ve fotokopi alınmasını istemiyorum (İç kapak, Özet, İçindekiler ve Kaynakça hariç) (Bu sürenin sonunda uzatma için başvuruda bulunmadığım takdirde tezimin/raporumun tamamı her yerden erişime açılabilir, kaynak gösterilmek şartıyla bir kısmı veya tamamının fotokopisi alınabilir.)
- Tezimin/Raporumun..... tarihine kadar erişime açılmasını istemiyorum ancak kaynak gösterilmek şartıyla bir kısmı veya tamamının fotokopisinin alınmasını onaylıyorum.
- Serbest Seçenek/Yazarın Seçimi

07/08/2023

İmza

ASLI ELDEM

## **ETİK BEYAN**

Bu çalışmadaki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi, görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu, kullandığım verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı, yararlandığım kaynaklara bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu, tezimin kaynak gösterilen durumlar dışında zgn olduğunu, Tez Danışmanım Prof. Dr. Tülay KILIÇASLAN AYNA danışmanlığında tarafımdan üretildiğini ve İzmir Katip elebi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kılavuzuna göre yazıldığımı beyan ederim.

**Tarih:07/08/2023**

**İmza**

**Ad-Soyad: Ash ELDEM**

## TEŞEKKÜR

Doktora tez çalışmam boyunca beni destekleyen her deney sonucumda benimle aynı heyecanı ve ilgiyi gösterip, bilgi ve tecrübelerini benimle paylaşan; mesleki ve manevi açıdan iyi bir bilim insanı olarak yetişmem için emek harcayan değerli danışman hocam Prof. Dr. Tülay KILIÇASLAN AYNA'ya; saygıdeğer hocalarım Prof. Dr. İbrahim PİRİM, Prof. Dr. MUSTAFA SOYÖZ'e; Doç. Dr. Melek PEHLİVAN'a; çalışma sürecinde desteklerini esirgemeyen çalışma arkadaşlarım H. İlayhan K. ÖVEN, Aslı Ö. KOÇYİĞİT, Burcu . ALKA, Tuba ÖZ, Fikriye Fulya KAVAK ve Kübra EREN 'e teőekkürlerimi sunarım.

Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi genetik bölümünden Doç. Dr. Onur TOKGÜN hocama tez çalışmasında kullandığım HK-2 hücre hattını benimle paylaştığı için teşekkür ederim.

Bu uzun ve zorlu süreçte yanımda olan ve desteklerini esirgemeyen, Annem, Babam ve Ablam'a teőekkürlerimi sunarım.

Doktora eğitimim süresince akademik anlamda gelişmem için desteklerini esirgemeyen projeme verdikleri desteklerden dolayı İK Bilimsel Araştırma Proje Koordinatörlüğü'ne ve Moleküler Biyoloji ve Genetik ncelikli alanda 100/2000 YÖK doktora bursu için YÖK'e çok teşekkür ederim.

**Ash ELDEM**  
**AğUSTOS-2023**

## ÖZET

### HK-2 HÜCRE HATTINDA ANTI-HLA ANTİKORLARININ MİRNA EKSPRESYONU ÜZERİNE ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

Aslı ELDEM

İzmir Kâtip Çelebi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı/Doktora Tezi, İzmir, Türkiye, 2023

#### Amaç:

Son dönem böbrek hastalarının en kesin tedavi yöntemi böbrek nakli olarak bilinmektedir. Bu hastalarda kan transfüzyonu, nakil geçmişi ve gebelik öyküsüyle meydana gelen anti-insan lökosit antijeni (HLA) antikorumları oluşabilmektedir. Anti-HLA antikorumları vericiye özgü (DSA) ise antikor aracılı rejeksiyona (AAR) sebep olmaktadır. Kompleman proteinleri AAR gelişiminde ve organ kaybının ortaya çıkmasında önemlidir. Son yıllarda, miRNA olarak adlandırılan kısa RNA dizilerinin hücrelerde gen ifadesinin (ekspresyonunun) düzenlenmesine katkı sağladığı saptanmıştır. Böbrek naklinde bazı miRNA'ların rejeksiyon veya naklinden sonra hastalık nüksü gibi patolojik süreçlerde yer aldığı bulunmuştur. Önerdiğimiz tez projesinde çaprazlama (cross match-XM) testi yaparak bu süreçte bazı miRNA'ların let-7c-5p, miR-21, miR-28-3p, miR-29b-3p, miR-125a-5p, miR-142-5p, miR-145, miR-155, miR-217, miR-520e, miR-885 ve bu miRNA'ların ilişkili olduğu genlerin (C1q ve TGF- $\beta$ , TNF- $\alpha$ , Kaspaz 3) mRNA ifade düzeyleri belirlenerek in vitro AAR'deki rolü araştırıldı.

#### Yöntem:

Bu çalışma kapsamında insan proksimal tübüler epitel hücreleri (HK-2) ile bu hücrelere özgü DSA(+) ve kontrol olarak antikor içermeyen DSA(-) serum örnekleri kullanıldı. Komplemana Bağlı Sitotoksik XM (CDC-XM) koşulları sağlanarak, HK-2 hücreleri ve serum örnekleri ile in vitro AAR modeli oluşturuldu. Belirlenen süre sonunda örneklerden RNA ve miRNA izolasyonu gerçekleştirildi. cDNA (komplementer DNA) sentezi gerçekleştirildikten sonra gerçek zamanlı PCR (qRT-PCR) yöntemi ile belirlenen genlerin ekspresyon düzeyleri araştırıldı.



**Bulgular:**

Tez çalışması sonucunda in vitro AAR modelinde DSA(-)'e göre DSA(+) 'de TGF- $\beta$ , TNF- $\alpha$ , C1qA, C1qC, Kaspaz 3 genlerinin ve let-7c-5p, miR-28-3p, miR-125a-5p, miR-142-5p, miR-155, miR-520e miRNA'ların ekspresyon düzeylerinde anlamlı derecede artış görüldü. C1qB, miR-21, miR-29b-3p, miR-145, miR-217, miR-885 anlamlı azalış görüldü. Ayrıca DSA(+) CDC C(-) örneklerinin DSA (-) CDC C(-)'e göre kat değişimleri incelendiğinde miR-21, miR-28-3p , miR-29b-3p, miR-145, miR-217, miR-520e ve TGF- $\beta$ , C1qA, C1qB, C1qC ve Kaspaz 3 genlerinde istatistiksel olarak anlamlı kat artışı görülmüştür.

**Sonuçlar:**

Tez çalışmasından elde ettiğimiz sonuçlar bazı miRNA'ların (let-7c-5p, miR-28-3p, miR-125a-5p, miR-142-5p, miR-155, miR-520e) ekspresyonlarındaki artışın TGF- $\beta$ , TNF- $\alpha$ , C1qA, C1qC, Kaspaz 3 genlerinin ekspresyonlarının artışı ile paralellik gösterirken, C1qB gen ekspresyonu ile zıt etki gösterdiği yönündedir. miR-21, miR-29b-3p, miR-145, miR-217, miR-885 ekspresyonları ise in vitro AAR'de literatürle uyumlu olarak anlamlı azalma göstermektedir.

AAR da moleküler mekanizmanın daha iyi anlaşılması için miRNA'lar ve ilişkili olabilecekleri mRNA paneli genişletilerek in vivo AAR için bir biyobelirteç oluşturabilir. Bu sayede nakil sonrasında rejeksiyon riskli olan hastalarda bu miRNA'ların ve hedef genlerinin ekspresyon düzeylerinin takibi yeni tedavilere de katkı sağlayacaktır.

**Anahtar Kelimeler:** Böbrek nakli, Kompleman, miRNA, mRNA, Antikor aracılı rejeksiyon

## **ABSTRACT**

### **INVESTIGATION OF THE EFFECT OF ANTI-HLA ANTIBODIES ON MIRNA EXPRESSION IN HK-2 CELL LINE**

**Aslı ELDEM**

**Izmir Kâtip Celebi University, Graduate School of Health Sciences Medical  
Biology and Genetics/Doctoral Degree Thesis, İzmir, Türkiye, 2023**

#### **Aim:**

The most definitive treatment method for end-stage renal disease is known as kidney transplantation. Anti-human leukocyte antigen (HLA) antibodies may occur in these patients due to blood transfusion, transplant history and pregnancy history. If anti-HLA antibodies are donor-specific (DSA), they cause antibody-mediated rejection (AAR). Complement proteins are important in the development of AAR and the occurrence of organ loss. In recent years, it has been determined that short RNA sequences called miRNA contribute to the regulation of gene expression in cells. Some miRNAs in kidney transplantation have been found to be involved in pathological processes such as rejection or disease recurrence after transplantation. In the proposed thesis project, by performing a cross match-XM test, some miRNAs in this process let-7c-5p, miR-21, miR-28-3p, miR-29b-3p, miR-125a-5p, miR-142- 5p, miR-145, miR-155, miR-217, miR-520e, miR-885, and the mRNA expression levels of genes associated with these miRNAs (C1q and TGF- $\beta$ , TNF- $\alpha$ , Caspase 3) were determined and their role in in vitro AAR was investigated

#### **Methods:**

In this study, serum samples containing human renal tubule epithelial cells (HK-2) and specific for these cells (DSA) and (DSA (+)) and without antibodies (DSA (-)) as controls were used. An in vitro AAR model was established with HK-2 cells and serum samples by providing Complement-Dependent Cytotoxic XM (CDC-XM) conditions. At the end of the specified time, RNA and miRNA isolation were performed from the samples. After performing cDNA (complementary DNA) synthesis, the expression levels of genes determined by real-time PCR (qRT-PCR) method were investigated..

**Results:**

As a result of the thesis study, TGF- $\beta$ , TNF- $\alpha$ , C1qA, C1qC, Caspase 3 genes and let-7c-5p, miR-28-3p, miR-125a-5p, miR-142-5p, miR-155, miR-520e miRNAs were significantly increased. C1qB, miR-21, miR-145, miR-217, miR-885 were significantly decreased. In addition, when the fold changes of DSA(+) CDC C(-) samples were examined according to DSA (-) CDC C(-), miR-21, miR-28-3p, miR-29b-3p, miR-145, miR-217 a fold increase was observed in miR-520e and TGF- $\beta$ , C1qA, C1qB, C1qC and Caspase3 genes.

**Conclusion:**

Our results from the thesis study showed that the expression of some miRNAs (let-7c-5p, miR-28-3p, miR-125a-5p, miR-142-5p, miR-155, miR-520e) increased TGF- $\beta$ , TNF- $\alpha$ , C1qA, C1qC, Caspase 3 genes show parallelism with the increase in their expression, while it has the opposite effect with C1qB gene expression. The expressions of miR-21, miR-145, miR-217, and miR-885 show a significant decrease in AAR in vitro, which is in line with the literature, and inversely correlate with the expressions of TGF- $\beta$ , TNF- $\alpha$ , C1qA, C1qC, Caspase 3 genes. In order to better understand the molecular mechanism of AAR, miRNAs and the mRNA panel they may be related to can be expanded to form a biomarker for AAR in vivo. In this way, monitoring the expression levels of these miRNAs and their target genes in patients at risk of rejection after transplantation will also contribute to new treatments.

**Keywords:** Kidney Transplant, Complement, miRNA, mRNA, Antibody mediated rejection

# İÇİNDEKİLER

KABUL ONAY SAYFASI.....	i
YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI.....	ii
ETİK BEYAN.....	iii
TEŞEKKÜR.....	iv
ÖZET.....	v
ABSTRACT.....	vii
İÇİNDEKİLER.....	ix
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xiii
TABLolar DİZİNİ.....	xiv
1 GİRİŞ.....	1
2 GENEL BİLGİLER.....	3
2.1 Böbrek Nakli.....	3
2.2 Böbrek Nakli Öncesindeki İmmünolojik Faktörler.....	3
2.2.1 HLA Uyumu.....	3
2.2.2 Panel Reaktif Antikor (PRA) Testi.....	4
2.2.3 Cross match-Donöre Spesifik Antikor (DSA) Testleri.....	4
2.2.4 Kompleman Sistemi.....	5
2.3 Böbrek Nakli Sonrası Olası Rejeksiyon Çeşitleri.....	6
2.4 Böbrek Naklinde Rol Oynayan Genler ve miRNA'lar.....	7
2.4.1 Genler.....	7
2.4.2 Mikro RNA (miRNA)'lar.....	9
3 GEREÇ ve YÖNTEM.....	17
3.1 Araştırmanın Türü.....	17
3.2 Araştırmanın Yeri ve Zamanı:.....	17
3.3 Araştırmanın Örnekleme:.....	17
3.4 Deney Kurgusu.....	17
3.5 İnsan Böbrek (HK-2) Hücrelerin Kültürlenmesi:.....	19
3.6 Hücre Canlılığı ve Tripan Mavisi ile CDC Sonuçlarının Değerlendirilmesi.....	20
3.7 HK-2 Hücrelerinin Yüksek Çözünürlüklü Doku Tipleme.....	21
3.7.1 DNA İzolasyonu.....	21
3.8 Serum Örneklerinin Belirlenmesi.....	21
3.8.1 Serumdan miRNA İzolasyonu.....	22
3.9 CDC Testi.....	23
3.9.1 Total RNA ve miRNA İzolasyonu.....	23

3.10.	cDNA Sentez.....	25
3.12.	Gerçek Zamanlı (RT)-PCR ile Gen İfade Analizi.....	26
3.13.	İstatistiksel Analizler .....	28
3.14.	Etik İzinler.....	28
4.	BULGULAR.....	29
5.	TARTIŞMA.....	44
6.	SONUÇ VE ÖNERİLER.....	51
7.	KAYNAKÇA.....	52

## SİMGELER VE KISALTMALAR

- AAR:** Antikor aracılı rejeksiyon  
**XM:**Çaprazlama cross match  
**CDC:** Komplemana bağlı cross match  
**cDNA:** Komplementer Deoksiribonükleik Asit  
**CO<sub>2</sub>:** Karbondioksit  
**Ct:** Eşik döngüsü  
**DMSO:** Dimetil sülfoksit  
**DNA:** Deoksiribonükleik asit  
**EDTA:** Etilendiamintetraasetik asit  
**FC:** Kat değişimi  
**FR:** Fold regulation-Fc'nin Biyolojik Karşılığı  
**GAPDH:** Gliseraldehit 3-Fosfat Dehidrogenaz  
**HLA:** İnsan lökosit antijeni  
**IFN:**İnterferon  
**IL:**İnterlökin  
**kDa:**Kilodalton  
**kb:**Kilobaz  
**MHC:** Majör Histokompatibilite kompleksi  
**miRNA:** mikro RNA  
**NF-κB:** Nüklear faktör kappa B  
**PBS:** Fosfat tampon çözeltisi  
**PCR:** Polimeraz zincir reaksiyonu  
**PRA:** Panel Reaktif Antikor  
**Pre-miRNA :** Prekürsör miRNA  
**Pri-miRNA :** Primer-miRNA  
**RNA:** Ribonükleik asit  
**SDBY:** Son dönem böbrek yetmezliği  
**Tc:** Sitotoksik T hücre  
**TGF-β:** Tümör büyüme faktörü-beta

**TNF- $\alpha$** : Tumor nekroz faktör-alfa

**UTR**: Çevrilmemiş bölge

**$\alpha$** : Alfa

**$\beta$** : Beta

**$\gamma$** : Gamma

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. Klasik yolda kompleman aktivasyonu .....	6
Şekil 2. miRNA'ların olgunlaşma süreci .....	11
Şekil 3. İş akış şeması .....	18
Şekil 4. HK-2 hücre hattının mikroskopik görüntüsü (10X).....	29
Şekil 5. CDC testi ön çalışmaları .....	30
Şekil 6. Real time PCR analiz grafikleri .....	31
Şekil 8. miRNA'ların HK-2 hücresi, DSA (-) ve DSA (+) serumlardaki $\Delta$ Ct değerleri .....	32
Şekil 9. mRNA'ların DSA (-) ve DSA (+) örneklerde CDC C (-) ve CDC C (+) koşullarında $\Delta$ Ct değerleri.....	33
Şekil 10. miRNA'ların DSA (-) ve DSA (+) örneklerde CDC C(-) ve CDC C(+) koşullarında $\Delta$ Ct değerleri.....	34
Şekil 11. Serum örneklerinde genlerin kat değişim grafiği .....	34
Şekil 12. CDC C (-) örneklerde genlerin kat değişim grafiği .....	35
Şekil 13. CDC C (+) örneklerde genlerin kat değişim grafiği .....	36
Şekil 14. Serum örneklerde miRNA'ların kat değişim grafiği.....	37
Şekil 15. CDC C(-) örneklerde miRNA'ların kat değişim grafiği .....	38
Şekil 16. CDC C (+) örneklerde miRNA'ların kat değişim grafiği.....	39
Şekil 17. Heatmap (Kümeleme) analizi .....	40
Şekil 19. mRNA-miRNA'ların böbrek inflamasyonundaki etkileşimi .....	42



## TABLULAR DİZİNİ

<b>Tablo 1.</b> Deneysel çalışmalarda kullanılan ekipmanlar ve cihazlar .....	19
<b>Tablo 2.</b> Reaktifler ve karışımdaki miktarlar .....	25
<b>Tablo 3.</b> cDNA sentezi için PCR koşulları .....	25
<b>Tablo 4.</b> Gen İfadesi için kullanılan primer dizileri ve özellikleri .....	26
<b>Tablo 5.</b> Real-Time PCR koşulları .....	27
<b>Tablo 6.</b> Real time PCR protokolü .....	28
<b>Tablo 7.</b> CDC C(-) ve CDC C(+) durumlarında miRNA'lardaki değişimler ve hedef genleri .....	43

# 1 GİRİŞ

Son dönem böbrek yetmezliğinin (SDBY) tedavisinde hemodiyaliz yer alsa da fizyolojik olarak en uygun tedavi yöntemi böbrek nakli olarak kabul edilmektedir. Böbrek nakil başarısını etkileyen bazı etmenler vardır. Bu etmenlerde ABO alıcı-verici(donör) kan grubu, insan lökosit antijeni (HLA) uyumu, alıcıda donöre karşı oluşan antikorlar (DSA)-özellikle donör HLA'larına özgü oluşan antikorlar yer almaktadır.

Böbrek nakli alıcılarındaki gebelik öyküsü, kan transfüzyonu veya önceki nakil öyküsü HLA'ya karşı antikor oluşumuna sebep olmaktadır. Hastalarda bu antikorlar Panel Reaktif Antikor (PRA) testleri ile saptanmaktadır. SDBY hastalarında PRA testleri sayesinde HLA antikorları ile ilgili bilgi sahibi olurken, çaprazlama (cross-match-XM) testleri ile bu antikorların DSA olup olmadığı araştırılır. DSA (+) olan hastalara mevcut donörden nakil yapılması nakledilen organın reddedileceği anlamına gelir. XM testleri bu özelliğinden dolayı organ nakillerindeki en önemli testlerdir. Antikor aracılı rejeksiyon (AAR), böbrek nakli hastalarına yönelik en ciddi tehditlerden biri olarak ortaya çıkmaktadır. AAR'lardaki hücresel mekanizmalar tam olarak aydınlatılamamıştır. Bu süreçte genetik ve epigenetik faktörlerin rol oynadığı düşünülmektedir.

Doktora tez çalışmasında XM (komplemana bağlı sitotoksik XM-CDC) testi ile in vitro ARR modeli oluşturularak bu yolakta önemli olan bazı mRNA (C1qA, C1qB, C1qC, TGF- $\beta$ , TNF- $\alpha$  ve Kaspaz 3) ve miRNA'ların (let-7c-5p, miR-21, miR-28-3p, miR-29b-3p, miR-125a-5p, miR-142-5p, miR-145, miR-155, miR-217, miR-520e, miR-885) ekspresyonlarını değerlendirdik. Bu amaçla çalışmamızda donörü temsilen insan böbrek tübül epitelyum (HK-2) hücreleri kullanıldı. HK-2'nin HLA tiplmesi yapıldı. Böbrek nakli bekleme listesinde bu HLA'ya özgü DSA'sı olan SDBY hastası belirlenerek serum örneği alındı. Böylece CDC testi ile organ naklinden sonraki durum kültür ortamında taklit edildi. Testin kontrolü olarak, sağlıklı bir gönüllüden serum örneği alınarak PRA testleri yapıldı. Anti-HLA antikorunu içermeyen bu serum DSA (-) olarak ifade edildi. DSA (+) ve DSA (-) olan serumlar ve HK-2 hücreleri kullanılarak eşzamanlı olarak CDC testleri yapıldı.

Ayrıca kompleman proteinlerinin bu mekanizmadaki etkisini araştırmak amacıyla örneklere kompleman eklenerek CDC (C+) ve eklenmeden CDC (C-) iki koşul oluşturuldu. Tüm örneklere seçmiş olduğumuz genlerin ifade dzeyeleri belirlendi.

Bu çalışmada, in vitro AAR modelinde anti-HLA antikorlarının miRNA ve ilişkili mRNA'ların ekspresyonuna etkisi vardır hipotezi kuruldu. Bu hipotez doğrultusunda in vitro AAR modeli oluşturularak bu süreçte bazı miRNA'ların let-7c-5p, miR-21, miR-28-3p, miR-29b-3p, miR-125a-5p, miR-142-5p, miR-145, miR-155, miR-217, miR-520e, miR-885 ve bu miRNA'ların ilişkili olduğu genlerin (C1q ve TGF-β, TNF-α, Kaspaz 3) ekspresyonlarının belirlenmesi amaçlandı.

## 2 GENEL BİLGİLER

### 2.1 Böbrek Nakli

SDBY olan hastalar için tercih edilen tedavi yöntemidir. Başarılı bir böbrek nakli yaşam kalitesini artırır, ölüm riskini azaltır. Böbrek nakli ya canlı donörden genellikle-yakın akrabalarından- ya da kadavra donörden yapılmaktadır (1). Başarılı bir böbrek nakli için hasta ve donör arasında immünolojik açıdan uyum olması önemlidir.

### 2.2 Böbrek Nakli Öncesindeki İmmünolojik Faktörler

Böbrek nakli sonrasında rejeksiyonun önlenmesinde ve organ sağ kalımında immünolojik değerlendirme büyük önem taşır. İmmünolojik değerlendirmeler arasında; alıcı ve donör arasındaki HLA uyumu, alıcıda nakil öncesi donör HLA'larına özgü anti-HLA antikorları (donöre spesifik antikor:DSA) ve nakil sonrası dönemde de *de novo* DSA gelişimi önemlidir. Anti-HLA antikorların alıcıda tespit edilmesi için iki farklı test yapılır. Bunlardan birincisi nitel olarak serumdaki tüm anti-HLA antikorlarını değerlendiren PRA testleri, ikincisi DSA varlığını gösteren XM testleridir (2).

#### 2.2.1 HLA Uyumu

Bağışıklık sisteminin kendini ve kendi olmayanı tanıması için gerekli olan doku antijenlerini kodlayan gen bölgesine majör histokompatibilite kompleksi (MHC) denir. İnsanlarda MHC molekülleri HLA olarak adlandırılır. Böbrek nakli öncesi donör HLA grubu ile hasta HLA grubunun uyumunun değerlendirilmesi gereklidir. HLA antijenlerinin sentezinden sorumlu genler, 6. kromozomun kısa kolundaki HLA kompleksi içinde yer alır ve sınıf I, II ve III olmak üzere üç kısımdan oluşur. HLA sınıf I antijenleri arasında HLA-A, HLA-B, HLA-C bulunur. Bu antijenler tüm çekirdekli hücrelerde bulunur ve yabancı proteinlerin peptit partiküllerini CD8 (+) sitotoksik T lenfositlere (Tc) sunar. HLA sınıf II antijenleri, HLA-DR, HLA-DQ ve HLA-DP'yi içerir. Bunlar dentritik hücreler, monositler ve makrofajlar ve gibi antijen sunan hücrelerde bulunur (3).

Hücre membranında yerleşik yapılar olan HLA kompleksi çok polimorfik özelliği olan genler tarafından kodlanır. Bu genlerin kodladığı proteinler hücre membranlarında yer alırlar. Bu proteinlerin organ /doku naklinde rejeksiyonda önemli belirleyici rolleri bulunur. HLA lokusları farklı olan hasta ve donör arasındaki nakillerde rejeksiyon gelişme riski daha yüksektir. Hücre yüzeyindeki HLA işlenmiş peptit antijenlerini T lenfositlere sunarlar. T lenfositler HLA ile birleşmiş ve işlenmiş peptit antijenleri tanırlar. HLA-peptid kompleksini taşıyan hücreler, antijeni T hücrelerine sunarlar. Eksojen kaynaklı peptitler HLA sınıf II molekülleriyle sunulurken, endojen kaynaklı peptidler HLA sınıf I molekülleriyle birleşerek sunulurlar. Hücre içi ve dışı proteinlerden sentezlenen peptid antijenler birbirinden farklı T lenfositler tarafından tanınırlar. T lenfositler yabancı peptid antijenleri tanıyıp bir immün yanıt oluştururken, kendi proteinlerinden kaynaklı peptid antijenlere immün yanıt oluşturmazlar (4).

### **2.2.2 Panel Reaktif Antikor (PRA) Testi**

PRA, organ nakli alıcılarının serumunda HLA antijenlerine karşı üretilen tüm sınıf I ve sınıf II anti-HLA antikorlarını ifade eder (5). Anti-HLA antikorlarının oluşumu için en önemli risk faktörü daha önceden geçirilmiş bir organ nakli, kan transfüzyonu ve gebeliktir. Alıcı adayında anti-HLA antikorlarının varlığının ölçüldüğü testtir. Anti-HLA antikorlarını araştırmak amacıyla yapılan PRA testleri bu antikorlarla ilgili kalitatif ve kantitatif bilgi verir. HLA antijenlerine duyarlılık, bir başka ifade ile PRA pozitifliği, XM sonuçları hakkında ön bilgi verebilir (2).

### **2.2.3 Cross Match-Donöre Spesifik Antikor (DSA) Testleri**

Böbrek nakli bekleyen hastalarda DSA'ları araştıran testler XM testleri olarak isimlendirilir. Farklı yöntemlerle DSA tespiti yapılabilirken yüksek spesifitesinden dolayı sadece CDC testinin pozitifliği, bir başka ifade ile CDC yöntemi belirlenen DSA'ların varlığı durumunda nakile izin verilmez.

CDC ilk olarak 1969'da Patel ve Terasaki tarafından açıklanan çaprazlama testidir (6). Bu test ile alıcının dolaşımındaki donör böbreğine bağlanabilen ve ona karşı tepki verebilen kompleman sabitleyici antikorların fonksiyonel potansiyelini

saptayan ve hiper akut rejeksiyonla sonuçlanabilecek olası patojenik allo antikorların varlığına ilişkin doğrudan kanıt sağlayan bir testtir. Bu test, alıcı serumunun, canlı donörlerin periferik kanından veya kadeverik donörlerin lenf düğümleri ya da dalaktan elde edilen donör lenfositleri ile karıştırıldığı in vitro bir testtir. Daha sonra hücrelerin ve serum birlikteliği üzerine kompleman (genellikle tavşan serumundan) eklenir. Test sonucu, donör hücre ölüm oranlarının mikroskop aracılığı ile değerlendirilmesi ile verilir (7).

## **2.2.4 Kompleman Sistemi**

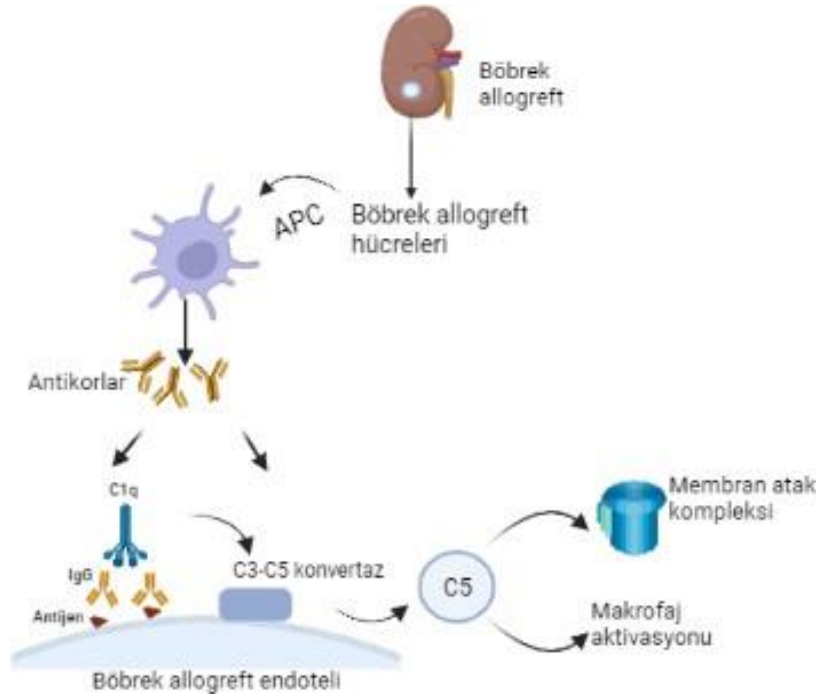
Kompleman Paul Ehrlich tarafından 1890'larda keşfedilmiştir. Kompleman sistemi, doğuştan gelen bağışıklık sisteminin önemli bir bileşenidir (8). Kandaki ve hücre yüzeyindeki yabancı maddeleri ve ölü hücreleri tanıyan ve bunların temizlenmesine yardımcı olan ~ 40 protein kümesini ifade eder (9). Bunların çoğu proteolitik enzimlerdir. Hücre membranında ve dolaşımında bulunurlar. Makrofaj, lenfosit, monosit, dalak, akciğer, kemik iliği ve lenfoid dokuda sentezlenirler (8).

### **2.2.4.1. Kompleman Aktivasyon Yolları**

Kompleman proteinleri, 3 farklı yolla immün yanıtı tetikler. Alternatif ve lektin yolları doğal immün sistem, klasik kompleman yolu ise edinsel immün sistem mekanizmasıdır (10). Alternatif yol, spesifik antikor yokluğunda mikrobiyal yüzeyde ilerleyebilir ve klasik ve lektin yollarındaki C3 konvertazın aksine, C3bBb olarak adlandırılan farklı bir C3 konvertaz oluşumuna yol açar. Bu yolaktaki aktivasyon C3'ün kendiliğinden hidrolizi ile başlar (11). Lektin yolunda antikorlar yerine yüzey tanıma moleküllerini, mannoz bağlayıcı lektin (MBL) ve fikolinleri kullanır. Sonrasında klasik yolakla aynı şekilde kompleman aktivasyonunu başlatır ve C4b'nin C2b'ye bağlanmasıyla C3 konvertaz oluşur (12).

Klasik kompleman yolağı antijen-antikor kompleksinin oluşumu ile aktive olur. Böbrek naklinde donör hücreleri yüzeyindeki HLA moleküllerine alıcıdaki anti-HLA antikorları –DSA- bağlanır. Alıcıdaki C1q kompleman proteini, DSA'nın Fc kısmına bağlanır ve C1s ile C1r aktive olur. C1s ile C1r aktive olur (13). C1r ve C1s

proteazlarının, C1q yüzeyine bağlanarak C1'i aktive eder. Bu aktivasyon ile C4'ü C4a ve C4b, C2'yi de C2a ve C2b olmak üzere parçalar (14). C4b, C2b'ye bağlanır. Böylece C3'ü parçalayabilen klasik yol C3 konvertaz (C4b2b) proteini oluşur. Klasik yol ve lektin yolundaki C3 konvertaz, C4b2b olarak adlandırılmıştır. C4b2b kompleksi C3 konvertaz özelliği sayesinde C3' ü C3a ve C3b ayırır. C3b, C4b2b'ye bağlanır. C4b2b3b kompleksini oluşturur. Oluşan kompleks C5 konvertaz aktivitesi kazanır ve C5'i C5a ve C5b olarak ayırır (15). Başarılı kompleman aktivasyonu, donör endotel hücreleri ve böbrek allogreftinde yüzeyinde gözenek oluşturucu bir proteinin (zar atak kompleksi veya MAC olarak bilinmektedir) bir araya gelmesiyle sonuçlanır ve allogreftin lizisine aracılık eder (Şekil 1) (16).



Şekil 1. Klasik yolda kompleman aktivasyonu (17) Biorender ile modifiye edilmiştir.

### 2.3 Böbrek Nakli Sonrası Olası Rejeksiyon Çeşitleri

Böbrek naklinden sonra ortaya çıkan en önemli immünolojik komplikasyon rejeksiyondur. Rejeksiyon, alıcının immün sisteminin donör hücrelerine karşı tepki göstermesiyle ortaya çıkar. Diğer bir ifade ile vücudun nakledilen böbreği kabul

etmeyip yabancı olarak algılaması olarak da tanımlanabilir. Rejeksiyonun ortaya çıkma zamanına göre sırasıyla üç tip rejeksiyondan bahsedilir. Bunlar hiper akut, akut ve kronik rejeksiyondur. Hiper akut rejeksiyon, nakilden dakikalar veya saatler sonrasında ortaya çıkan rejeksiyon tipidir. Anti-HLA antikorların varlığında veya ABO uyumsuzluğu nedeniyle görülmektedir. Akut rejeksiyon, nakilden günler ve aylar sonra ortaya çıkar. Hücresel ve AAR olarak görülür. Hücresel rejeksiyonda, T lenfositleri aktif rol alırken AAR'de genelde dolaşımdaki donöre özgü alloantikörlerin rol alması ya da önceden hastada var olan antikorlar nedeniyle ortaya çıkar. Kronik rejeksiyon ise nakilden aylar veya yıllar sonra görülen rejeksiyon tipidir. En önemli nedeni immünsüpresif ilaçlara uyumsuzluktur (12-21). İmmünsüpresif ilaçların kullanımı ile hücresel rejeksiyonlar kontrol altına alınabilirken AAR kontrolü oldukça güçtür ve organ nakli sonrası allogreft disfonksiyonunun ve kaybının önemli bir nedenidir. AAR'ların çoğu allogreft HLA'larına, az bir kısmı da HLA olmayan moleküllere bağlanan antikorlar ile ilişkilidir (22).

Kompleman, AAR'de çoğunlukla klasik yol üzerinde önemli rol oynar. C1 kompleksinin anti-HLA antikoruna bağlanması, membran atak kompleksi (MAC) oluşumuna ve endotel hücre zarlarında doğrudan hasara yol açar (23). C3a ve C5a, güçlü anafilatoksinlerdir ve fagositik hücrelerin toplanması ve daha fazla iltihaplanma yoluyla doğuştan gelen bağışıklık tepkisini güçlendirir (24). Feucht ve arkadaşları allogreft biyopsilerinde kompleman C4d ve C3d'nin yıkılmış ürünlerinin biriktiğini göstermiştir (25). AAR mekanizmalarında komplemanın önemi doğrulanmış ve 2001'de C4d'nin Banff allogreft reddi kriterlerine dahil edilmeye başlanmıştır (26). Komplemana bağımlı antikor aracılı hasarın, esas olarak, DSA'ların Fc bölgesi tarafından klasik kompleman kaskadının aktivasyonu yoluyla sitotoksiteden kaynaklandığı görülmüştür (27).

## **2.4 Böbrek Naklinde Rol Oynayan Genler ve miRNA'lar**

### **2.4.1 Genler**

Günümüzde fizyolojik ve patolojik olaylarda hücrelerdeki sinyal mekanizmasının önemi ve bu mekanizmanın gen ifadesindeki (gen ekspresyonu) etkisi bilinmektedir. Böbrek nakli sonrası uzun vadeli greft sağkalımı ile ilgili pek



çok gen ilişkilendirilmiştir. CTLA-4 ve PD-1 genleri hücrel ve AAR'de nakil sonrası takip için biyobelirteç olabilecek aday genler olarak gösterilmişlerdir (28). Başka bir çalışmada ise CD4, CD8, CTLA4, GZMB, FOXP3, IL10, IL4, IL2A, NOTCH, PDCD1, PRF1, TGF- $\beta$  ve TNF- $\alpha$  genlerinin ilişkili olabileceği bulunmuştur (29). AAR patogeneğinde yer alan en önemli faktörlerden birisi de kompleman sistemidir. DSA'lar, donör HLA moleküllerine bağlanır ve klasik yolu başlatır. DSA, allogreftteki donör HLA'larına bağlayarak, klasik kompleman yolunu aktive eden immün kompleksler oluşturur (30). Bu komplekslere bağlanan C1q proteini yolağın aktivasyonunda önemlidir. DSA'ların potansiyel sitotoksitesini değerlendirmek için önemli bir belirteç olan kompleman proteininin kullanıldığı boncuk temelli testler de bazı laboratuvarlarca yapılmaktadır (31).

C1q sırasıyla C1qA, C1qB ve C1qC genleri tarafından kodlanan A, B ve C olmak üzere 3 alt birimden oluşan 18 alt birimli glikoproteinden oluşan 460 kilodalton (kDa)'lık bir proteindir. C1q geni, A (28 kDa), B (25 kDa), C (24 kDa) kromozom 1'de bulunur (32) ve C1qA-C1qB-C1qC sıralarını düzenler. C1q makrofajlar tarafından üretilmektedir. İnterferon (IFN)- $\gamma$  ve IL-6'nın makrofajlar tarafından C1q üretimini teşvik ettiği, IL-1'in ise makrofajlar tarafından üretimini engellediği bildirilmiştir (33). Klasik yol aktivasyonu, IgG veya IgM antikor aynı kökenli ligandına bağlandığında ve bu antikorların Fc alanı içindeki C1q bağlanma bölgelerini açığa çıkardığında başlatılır. C1q, her biri antikor ağır zincirlerindeki spesifik bölgelere- IgG'nin C $\gamma$ 2 bölgesi veya IgM'nin C $\mu$ 3 bölgesi- bağlanabilen altı küresel başlığa sahip bir proteindir. C1q, hedef antijenle veya antijene bağlanan ve bir hedef yüzey üzerinde kümelenen altı IgG molekülüyle kompleks oluşturan pentamerik veya heksamerik IgM moleküllerine iyi bağlanır, tüm Fc bölgeleri tek bir C1q ile birleştirilebilir. Antikorum ve hedef antijenlerin yoğunluğu, C1q'nin antikora bağlanma afinitesini ve klasik yolun aktive edilmesini etkiler (34).

TGF- $\beta$ , böbrek hasarından sonra kronik olarak farklılaşmış proksimal tübül hücresi tarafından üretilmektedir. TGF- $\beta$ , epitelyal farklılaşmayı, hücre döngüsü durmasını teşvik eder ve epitel hücrelerini yaralanma sırasında apoptoza duyarlı hale getirmektedir (35). TGF- $\beta$  hücrelerin çoğalmasını, farklılaşmasını, apoptozunu ve göçünü düzenleyen birçok hücreden salgılanan bir sitokindir. Bu sitokinin fazla ifade

edilmesi birçok böbrek hastalığıyla ilişkilidir (36). Böbrek nakillerinde iskemi/reperfüzyon hasarının iyileştirilmesi için büyüme ve canlılık faktörü olması ile Treg hücreleriyle birlikte nakledilen organa karşı verilen immün yanıtı baskılaması bulunurken aynı zamanda uzun dönemde kronik organ reddiyle ilişkili olmaktadır (37). TGF- $\beta$ 1'in renal tübüler epitel hücre tarafından aşırı ekspresyonunun, otofajiyi şiddetli tübüler dejenerasyonu ve peritübüler fibrozu arttırdığı görülmüştür (38).

Tümör nekroz faktör alfa (TNF- $\alpha$ ), inflamatuvar sitokinlerden geniş TNF süper ailesinin en önemli üyesidir (39). TNF- $\alpha$  proteinini kodlayan gen, 6p21.3 pozisyonunda kromozom 6'nın kısa kolunda bulunur (40). HLA genlerinin sınıf III bölgesinde yer alır. TNF- $\alpha$  geni 4 ekzon ve 3 kilobaz (kb) çiftini kapsayan promotör bölge içerir. Ekzon 1, genin 5' çevrilmemiş bölgesini (UTR) kodlayan nükleotitlerle başlar ve ekzon 4, 3' UTR'yi kodlayan nükleotitlerle biter, kalan ekzon nükleotitleri ise gerçek TNF- $\alpha$  proteinini kodlar (Posch, 2003). TNF- $\alpha$  sitokini böbrek nakillerinden sonra organ reddi olaylarına katkıda bulunan inflamasyonu arttırıcı bir sitokindir. Makrofajlardan ve monositlerden salgılanmaktadır. Ayrıca inflamasyona, apoptoza sebep olmaktadır (41).

Terminal kompleman yolu, C5b'nin C6, C7 ve C8 ile birleştirilmesini ve C9'un polimerizasyonunu içerir. Böylece MAC veya terminal kompleman kompleksinin (TCC) oluşumuna ve transmembran gözenekleri oluşur. TCC'nin etkisi ise zar bütünlüğünün doğrudan kaybına yol açar (42,43)

Kaspazlar, apoptoza aracılık etmede merkezi bir rol oynayan hücre içi sistemin proteazlarıdır. Hem ekstrinsik hem de intinsik apoptotik yolda son ortak yol, kaspaz 3 aktive olur. İn vivo renal iskemi/reperfüzyon (I/R) hasarı, anti-C5 antikoru ve C5a reseptör antagonistleri gibi kompleman inhibitörleri ile tedavi edilerek ortadan kaldırılabileceği düşünülmüştür. Organ hasarını azaltmak için birçok apoptoz inhibitörü kullanılmıştır (44).

#### **2.4.2. Mikro RNA (miRNA)'lar**

Son dönem çalışmalarda pek çok hastalıkların teşhisi ve takibinde bir belirteç olan mikro RNA'lar (miRNA) üzerinde odaklanmıştır. Polimeraz-III tip protein olan Drosha ve Dicer tarafından üretilen olgun hali 18-22 nükleotit uzunluğunda olan

miRNA'lar birçok farklı temel biyolojik ve patolojik süreçte rol oynarlar. miRNA'lar mRNA'yı 3' UTR bölgelerindeki dizilerden tanıyıp bu kısımlara bağlanabilme yeteneğinde olan ve genlerin ekspresyon düzeylerini etkileyebilen küçük kodlama yapmayan RNA'lardır. miRNA'lar gen ekspresyonunu post-transkripsiyonel olarak düzenlerler. Hüresel ve immünolojik olaylarda rol oynamaları sebebiyle miRNA'lar organ rejeksiyonunda ya da toleransın gelişmesinde de etkili olan moleküllerdir. Ayrıca miRNA'lar varlığı kan, serum ve idrar gibi sıvılarda tespit edilmiştir. Böbrek nakli sonrasında da çeşitli biyolojik sıvılarda miRNA araştırmaları yapılmıştır. (45,46). Böbrek nakli sonrası rejeksiyonlu hastalardan alınan PBMC'den miR-191-5p, miR-223-3p, miR-346, miR-423-5p, miR-574-3p ve miR-181d ekspresyonu bakıldığında miR-150-5p ekspresyonu azalmıştır (47). Böbrek nakli sonrası gecikmiş greft fonksiyonunun takibi için idrar örneğinde miR-9, miR-10a, miR-21, miR-29a, miR-221 ve miR-429 ekspresyonuna bakılmış ve biyobelirteç olarak kullanılacağı gösterilmiştir (48).

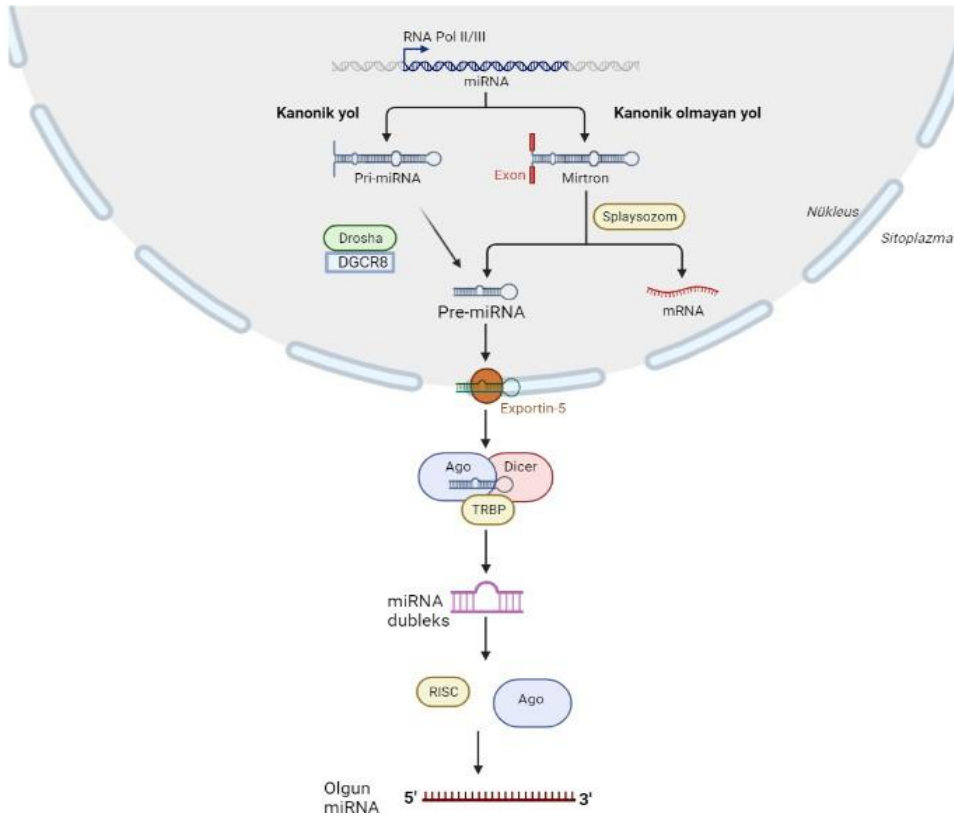
#### **2.4.2.1. miRNA'ların Olgunlaşma Süreci ve İsimlendirilmesi**

miRNA ilk olarak çekirdek içerisinde DNA dan kodlanır, miRNA'ların olgunlaşma süreci sitoplazmada sonlanır. miRNA'ların oluşumlarında iki farklı yol bulunmaktadır: Bunlardan kanonik yolda miRNA'lar çekirdekte öncelikle transkripte olduktan sonra, ilk olarak RNA Pol II tarafından uzunluğu 1kb-3kb olan RNA'lar pri-miRNA olarak isimlendirilir. Pri-miRNA'lar, RNase III Droscha ve çift zincirli RNA ya bağlanan protein DGCR8 ile kırılır. pri-miRNA'nın kırılmasıyla pre-miRNA olarak bilinen yaklaşık 60-100 nükleotit uzunluğunda saç tokası yapısında miRNA'lar oluşur. Pre-miRNA zincirinin 3' ve 5' uçlarındaki fosfatın ve 2 nükleotidin oluşturduğu yapı (49), exportin 5 ve Ran-GTP denilen proteinler tarafından tanınır. miRNA'lar GDP nin GTP ye dönüşümü sayesinde Exportin 5 aracılığıyla çekirdekten sitoplazmaya taşınır.

Böylece RNase III Dicer aracılığıyla kırılarak yaklaşık 21-23 nükleotit uzunluğunda miRNA/miRNA yapısını oluşturur. Dicer enzimi, iki protein TRBP (transactivation Response RNA-Binding Protein) ve PACT/PRKRA (Protein ACTivator of the interferon-induced protein kinase) ile kompleks yapı oluşturur.

Dicer-RNase II çift zincirli miRNA/miRNA yapısını oluşturduktan miRNA/miRNA kompleksi Ago (Argonaute) proteinine gönderir. miRNA/miRNA yapısı Ago ile etkileşime girerek RISC (RNA-Induced Silencing Complex) kompleks yapısını oluşturur (50). Bu yapı pre-RISC adlandırılır (49). Bu yapı Ago proteininin bağlandığı zincir 'kılavuz zincir' olarak diğer zincir 'geçici zincir' (passenger strand/miRNA) olarak ifade edilir. Çift zincirli miRNA/miRNA yapısından tek zincir uzaklaştırılarak RISC kompleksi oluşur. miRNA'nın seçiminde çift zincirin ilk 4 nükleotidi tarafından belirlenir (51).

Kanonik olmayan yolda (Mirtron yolağı da denilir); pre-miRNA'nın çekirdekte oluşması için Drosha/DGCR8 kompleksine ihtiyaç duyulmamaktadır. Oluşan miRNA ise kısa intron boyutlu pre-miRNA olarak adlandırılır (52). Çekirdekte, bu intronlardan uç birleştirme (spliceosome) ve gruplaşmayı bozucu enzimler ile saç tokası şeklindeki miRNA oluşturulur. Exportin 5 ile çekirdekten gönderilebilir olgunlaşmamış olan miRNA çekirdekte gönderilir. Daha sonra kanonik yol gibi devam eder.



Şekil 2. miRNA'ların olgunlaşma süreci (53) (Biorender ile modifiye edilmiştir.)

Yaptığımız literatür araştırmalarına göre AAR patojenezinde rol oynadığı belirlenen ve CDC yolağındaki genleri regüle edebileceğini dűşündüğümüz miRNA'ları tez çalışmasına dahil ettik.

miRNA'ları kodlayan genler, harfli son eklerle gösterilir (örneğin, *mir-125a* ve *mir-125b*). miRNA'ların isimlendirilmeleri köken aldıkları uca göre olmaktadır. Eğer 5'ucundan oluşturulmuş ise miR-X-5p ya da 3'ucundan oluşturulmuş ise miR-X-3p olarak adlandırılır. Aynı olgun miRNA birden fazla ayrı lokustan üretilirse, miRNA lokuslarının adlarının sonuna sayısal ekler eklenir (örneğin, *mir-125b-1* ve *mir-125b-2*). Her lokus iki olgun miRNA üretir (54).

### **Let-7c-5p**

*Let-7* miRNA, *Caenorhabditis elegans*'ta keşfedilen ilk miRNA'lardan birisidir (55). *Let-7*, insan kanserlerinde sıklıkla silinen genomik konumlarda bulunan, evrimsel olarak korunmuş 13 homolog miRNA ailesini kodlar (56). *let-7* ailesi üyeleri hücre proliferasyonunu düzenleyen ve temel tümör baskılayıcı miRNA'dır. *Let-7*, hem normal gelişimde hem de kanserde yer alan kilit bir düzenleyicidir (57). *Let-7* ailesinin bir üyesi olarak *let-7c-5p*, hücre büyümesi ve proliferasyonu için önemlidir (58). *Let-7c-5p* 'nin hedef genleri TGF- $\beta$ 1 ve HMGA2'dir (59).

### **miR-21**

17q23.2 kromozom bölgesinde yer alan miR-21 geni onkomir olarak görev yapmaktadır (60). miR-21, pro-fibrotik bir faktör olarak hareket eder ve yukarı regülasyonu, TGF- $\beta$  sinyal yolu regülasyonu yoluyla böbrek fibrozunu indükler (61). miR-21, böbrek hastalıklarında tutarlı bir şekilde yukarı regüle edilen, hipoksi kontrollü bir miRNA'dır. Metabolik yolların transkripsiyon sonrası susturulması yoluyla renal fibrozu teşvik eder ve nükleer faktör kappa B (NF- $\kappa$ B) aktivasyonu ve sitokin ifadesi ile ilişkili inflamatuvar yanıtların bilinen bir aracısıdır (62). miR-21, proinflamatuvar veya immünsüpresif durumlarda dinamik bir role sahiptir. Ayrıca her iki durumun dengesi ve geçişi arasında önemli bir arabulucu görevi görür (63). miR-21'in in vitro ve in vivo yıkılması, albüminüriyi, böbrek iltihabını, podosit kaybını ve interstisyel fibrozu azaltmıştır ve potansiyel terapötik bir hedef olabileceği görülmüştür (64).

### **miR-28-3p**

miR-28, kromozom 3q28'de bulunan lipomda LIM alanı içeren tercih edilen translokasyon ortağı (LPP) geninin intron 6'sı tarafından kodlanan intragenik bir miRNA'dır (65). miR-28, STAT5 ve promotörüne bağlanan p53 tarafından düzenlenir. Tümör gelişiminde çok önemli bir rol oynayabileceği düşünülmektedir. Ayrıca miR-28'in proliferasyonu modüle edici özelliğinin olduğu bildirilmiştir (66).

### **miR-29b-3p:**

İnsan miR-29 ailesi, 3 üyeden oluşur. miR-29a, miR-29b ve miR-29c. İki gen kümesi (7q32.3 ve kromozom 1q32.2) tarafından kodlanır, ortak bir çekirdek bölge dizisini paylaşır ve örtüşen gen kümelerini hedeflemektedirler. Bu nedenle olgun miR-29b, her iki kromozomda, bir pre-miR-29b1 ve pre-miR-29b2 gövdesi üzerinde iki farklı öncü dizisi (pre-miRNA) tarafından kodlanır. İki pre-miR-29b gövdesinin sekansları farklı olsa da, bu iki gövde yapısından kaynaklanan olgun miR-29b'ler aynıdır. miR-29b, gen düzenleme işlevini miR-29 ailesinin diğer üyeleriyle birlikte yapar. Tüm miR-29 aile üyelerinin ekspresyonu, malign hücrelerde anormaldir ve hepsi anti-tümör işlevi gösterir (67). Proksimal tübüler hücrelerde, primer mezangiyal hücrelerde ve TGF- $\beta$ 1 ile tedavi edilen podositlerde miR-29b seviyesinde azalma olduğu görülmüştür (68,69). Renal hücreli karsinomda miR-29b onkomir olarak rol oynamıştır (70).

### **miR-125a-5p**

16. kromozomda yer alır. Endotel hücrelerinde ifade edilmektedir. NF $\kappa$ B yolunu aktive eder (71). Liang ve arkadaşları miR-125a-5p'nin tümör hücresi büyümesi, farklılaşması baskılama ile ilişkili olduğunu göstermiştir (72). Ancak miR-125a-5p'nin biyolojik ve immünolojik mekanizmalar üzerindeki etkileri belirsizliği korumaktadır.

### **miR-142-5p**

miR-142-5p kromozom 17'nin uzun kolunda (q) bulunan bir gen tarafından kodlanır. Tümör baskılayıcı olarak bilinir (73). CD8+ Sitotoksik T lenfosit

aktivasyonunda negatif regülasyonda rol oynadığı düşünülmektedir (74). Stabil böbrek nakli hastalarından alınan periferik kan mononükleer hücreleri (PBMC) ve antikor aracılı rejeksiyona sahip hastalardan alınan PBMC karşılaştırıldığında miR-142-5p'nin ifadesinin arttığı görülmüştür (75). Biyoinformatik analizler sonunda renal fibrozda rol alabilecek aday miRNA olarak gösterilmiştir (76).

### **miR-145**

miR-145 ilk önce küçük RNA klonlama teknikleri kullanılarak farelerin kalp dokusunda tanımlanmıştır (77). miRNA-145'in ifade edilmesi p53 ve diğer transkripsiyonel faktörler tarafından düzenlenen 5p.32 kromozomal bölgesinde bulunur (78). 2549 baz uzunluğundaki miR-145 geninden ifade edilmektedir (79). Hipertansif sıçanlarda C3 komplemanının ekspresyonundaki artışların, miR-145'in baskılanması ile ilişkili olduğu bulunmuştur (80). p53'ün mir-145'in promotörü ile etkileşime girerek mir-145'in ifadesini arttırdığı belirtilmiştir (81). Hücre proliferasyonda görevli ve tümör baskılayıcı olarak görev yapmaktadır (82).

### **miR-155**

İnsanda miR-155'in ekspresyonu böbrek, dalak, timüs, karaciğer ve akciğer rapor edilmiştir. miR-155, 21q21 kromozom bölgesinde yer alır ve onkogen olarak bulunan ilk miRNA'dır (83). T ve B hücresi olgunlaşmasının ve doğuştan gelen bağışıklık tepkisinin düzenleyicisi olarak bilinir (84). miR-155, inflamasyonun ana düzenleyicisi olarak kabul edilir. Doğal ve adaptif immün yanıtlarla ilgili hücrelerin farklılaşmasına ve uyarılmasına katılır (62). miR-155'in meme, akciğer kanseri, pankreatik tümörler, AML, KLL, Hodgkin hastalığı ve pediatrik Burkitt lenfoma gibi pek çok hastalıkta ekspresyonunun arttığı gösterilmiştir. miR-155 sitokin üretimini düzenleyerek T-hücrelerine bağlı optimum antikor yanıtı üretmede rol oynar ve yardımcı T hücrelerinin farklılaşmasının düzenlenmesinde temel bir fonksiyona sahiptir (83). miR-155, hipoksik durumda, HIF-1 $\alpha$  transkriptinin RISC aracılı degradasyonunu kolaylaştırır. HIF-1 $\alpha$  mRNA'sında, transkripsiyonel aktivitede bir azalmaya sebep olur. Bu nedenle miR155 indüksiyonu, hipoksi sırasında HIF-1 $\alpha$  aktivitesi için izoform-spesifik negatif geri besleme döngüsüne bağlıdır (85). Ayrıca miR-155, mTOR yoluyla otofajiyi indükler (86). Böbrek fonksiyonunda ve vasküler

düz kasın kasılmasında yer alan önemli bir molekül olan tip 1 Anjiyotensin II reseptörünün (AT1R) düzenlenmesinde rol oynar (87).

### **miR-217**

23 nükleotit içerir ve 2. kromozom üzerinde yer alır. miR-217 hücre tipine bağlı tümör baskılayıcı gen veya onkogen olarak rol oynamaktadır (88). Hücre yaşlanmasında etkili olarak bilinmektedir (89). miR-217'nin kronik enflamasyonu, renal fibrozu ve anjiyogenezi teşvik ederek diyabetik böbrek hastalığının gelişiminde rol oynadığı ortaya çıktı.

### **miR-520e**

miR-520e, altı üyeden oluşan miR-515 ailesine aittir. Bu miRNA'yı kodlayan gen bölgesi 19q13.42 kromozomu üzerinde bulunmaktadır. (90,91) miR-520e'nin kanser ile ilişkili çalışmalarda rol oynadığı bilinmektedir. miR-520e, in vitro meme kanseri hücre göçünü desteklemiş ve aşırı ekspresyonu apoptozu baskılamıştır (92). miR-520b ve miR-520e'nin, CD46'nın 3'UTR'sini doğrudan hedefleyerek meme kanseri hücrelerinin CDC'ye duyarlılığını arttırdığı gösterilmiştir (93). Zhang ve arkadaşları miR-520e'nin hepatokarsinogenez süreci ile ilişkili olduğunu bildirmiştir. Hepatosellüler karsinom çalışmasında miR-520e ekspresyonu ve bununla ilişkili hedef gen olan NFkB yolunu doğrudan etkilediği görülmüştür. NFkB'yi indükleyen kinazın inhibe edilmesiyle hepatomanın indüklendiği görülmüştür (94). miR-520b ve miR-520e'nin aşırı ekspresyonunun kontrol hücrelerine göre meme kanseri hücrelerinin yüzeyinde C3b birikimini arttırdığı saptanmıştır (93). Heinemann ve arkadaşları yaptıkları renal glomerüler endotel hücreleri ile yapılmış bir çalışmada etkileri detaylı olarak araştırılmamış, ancak anti HLA sınıf I serumu ile muamele edilen ve kompleman serumu eklenen grubun kontrol grubuna göre ifadesinin arttığı gösterilmiştir (71).

### **miR-885**

3p25.3 kromozom bölgesinde bulunur (95). Hedef genleri arasında apoptozun önemli bir yürütücüsü olan CASP3 yer alır. miR-885 TP53'i etkinleştirir. miR-88,



pankreas kanseri, hepatoselüler karsinom (HCC), osteosarkom ve böbrek kanseri dahil olmak üzere birçok malignitede ifade düzeyi azalmıştır (96). Ancak antikör aracılı rejeksiyon ile literatürde detaylı bilgi bulunmamakla birlikte tek bir yayında ekspresyon düzeyinin azaldığı belirtilmiştir (71).

### 3 GEREÇ ve YÖNTEM

#### 3.1 Araştırmanın Türü:

Araştırma deneysel özellikte in vitro bir çalışmadır.

#### 3.2 Araştırmanın Yeri ve Zamanı:

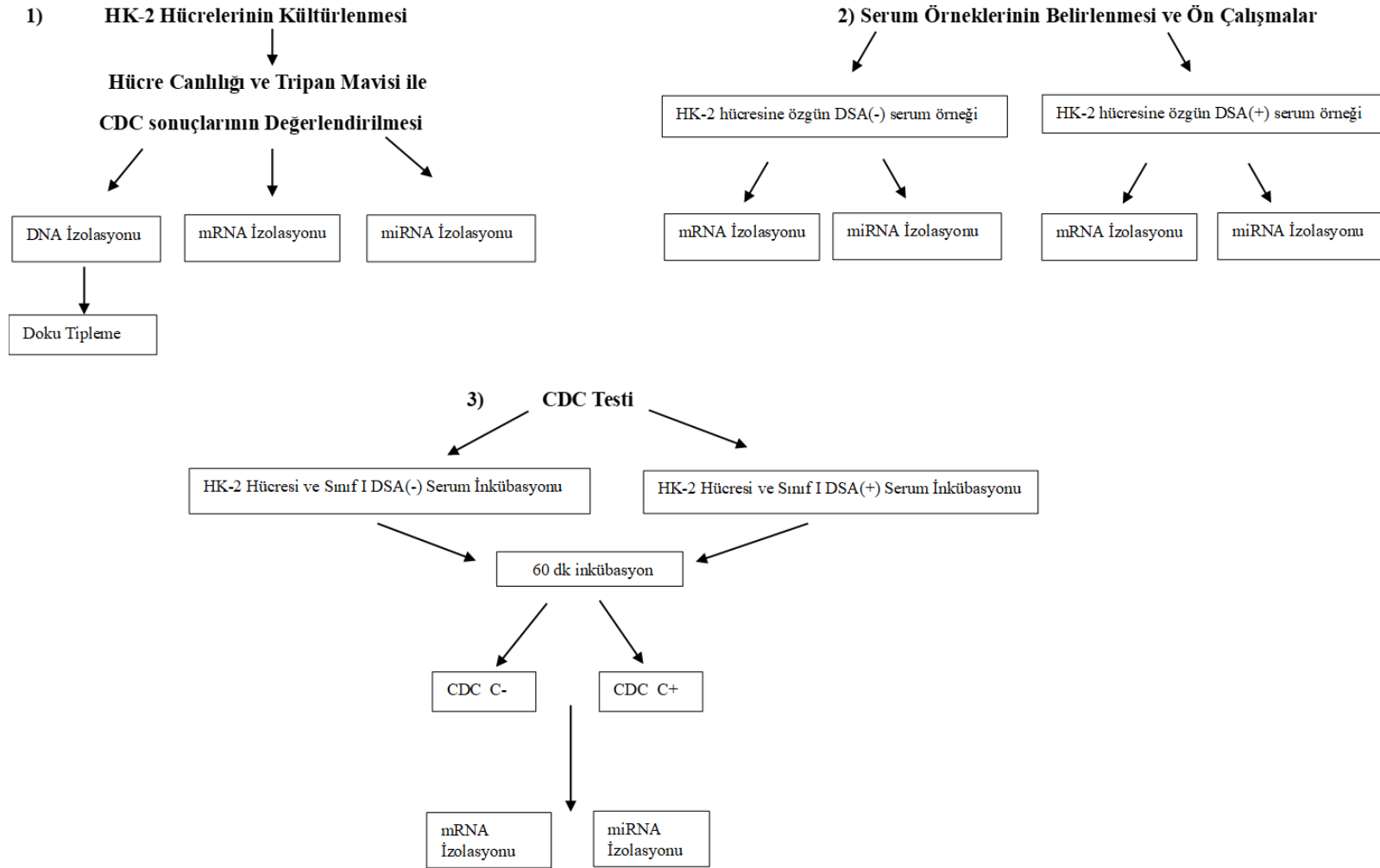
Bu çalışma, 2022 Haziran-2023 Haziran yılları arasında İzmir Kâtip Çelebi Üniversitesi Tıp Fakültesi Merkezi Araştırma laboratuvarında gerçekleştirilmiştir.

#### 3.3 Araştırmanın Örneklemi:

Araştırmanın örneklemi HK-2 hücre hattı ve 2 adet gönüllü serumudur. Bu serumlardan bir tanesi kadaverik böbrek nakli için bekleme listesindeki kayıtlı ve HK-2 hücrelerine özgü HLA sınıf I DSA'ya sahip olan bir hasta serumu ve anti-HLA antikoruna olmayan sağlıklı serum çalışmaya dahil edildi.

#### 3.4 Deney Kurgusu

Doktora tez çalışması İzmir Kâtip Çelebi Üniversitesi Merkezi Araştırma Laboratuvarı'nda gerçekleştirildi. İlk olarak HK-2 hücrelerinin kültürü yapılarak hücre canlılığı kontrol edildi. Bu hücrelerden DNA izolasyonu yapılarak HLA tipleni belirlendi. Aynı hücre grubundan mRNA ve miRNA izolasyonu yapıldı. İkinci olarak HK-2 hücre HLA 'sına spesifik HLA antikoruna sahip (DSA(+)) SDBY hastası PRA test sonuçları değerlendirilerek belirlendi. Kontrol olarak alloimmünizasyon öyküsü olmayan PRA testi negatif olan sağlıklı gönüllü belirlendi. İki gönüllüden alınan serum örneklerinden in vitro deney koşullarından mRNA ve miRNA izolasyonları gerçekleştirildi. Çalışmanın iş akış şeması Şekil 1'de gösterildi. Tablo 1'de ise deneysel çalışmalarda kullanılan ekipmanlar ve cihazlar görülmektedir.



Şekil 3. İş akış şeması

**Tablo 1.** Deneysel çalışmalarda kullanılan ekipmanlar ve cihazlar

<b>Cihazlar</b>	<b>Marka ve Model</b>
CO <sub>2</sub> li İnkübatör	Labor İldam
Biyogüvenlik Kabini (Class II A2)	Thermo Scientific
Mikroplaka Okuyucu	Biotek Synergy HTX
Inverted Mikroskop (Floresan Özellikli)	Olympus CKX41
PCR cihazı	Applied biosystem
Nanodrop	Thermo Scientific, A.B.D
UV Transsmillator	Vilber Lourmat
Real Time PCR	Thermo Scientific-Pikoreal
Mikro Santrifüj	Thermo Scientific Micro CL-21R
Santrifüj	Hettich
-20 °C Derin Dondurucu	Arçelik
-80 °C Dondurucu	EvoSafe™ VF620-86
Su Banyosu	Wisebath
Sıvı Azot Tankı	Thermo Scientific

### **3.5 İnsan Böbrek (HK-2) Hücrelerin Kültürlenmesi:**

HK-2 hücre hattı yetişkin insan böbreği proksimal tübül epitelinden izole edilen hücrelerin, insan papilloma virüsüne (HPV 16) ait E6/E7 genlerinin transdüksiyonu ile immortal hale getirilmesiyle oluşturulmuştur. Normal yetişkin insan böbrek korteksinden primer proksimal tübül hücre (PTH) kültürü yapılmıştır. PTH kültürü HPV 16 E6/E7 genlerini içeren rekombinant bir retrovirüse maruz bırakılmıştır. Sonuçta, bir yıldan daha uzun süre ile serumsuz besiyerinde sürekli olarak büyütülmüş HK-2 (human kidney-2) hücre hattı elde edilmiştir (97).

Çalışmamızda kullanılan HK-2 hücreleri Pamukkale Üniversitesi Doç. Dr. Onur Tokgün tarafından bağışlandı. Hücreler laboratuvara getirildikten sonra tripan mavisi ile canlılık kontrolü yapıldı. Daha sonra kendi büyüme şartlarında idameleri sağlandı. Hücreler %10'luk Fetal Bovin Serum (FBS) (Capricorn), 200 mM glutamin (Gibco), 100 U/ml penisilin/streptomisin (Gibco) içeren Dulbecco's Modified Eagle Medium/Nutrient Mixture F-12 (DMEM F:12) (Gibco) ortamında %5 CO<sub>2</sub> ve 37°C

şartlarında kültürlendi. Hücrelerin yoğunluğu yaklaşık %80-90 oranına ulaştığında alt kültürleri yapıldı. Hücreler yeterli miktarda çoğaldığında bir kısmı çalışmamızda gerekli oldukça kullanılmak üzere donduruldu. Dondurulacak hücreler için hücre dondurma ortamı (%10 DMSO+%90 FBS) ile süspanse edildikten sonra kriyotüplere aktarılarak -80°C'ye kaldırıldı. Alt kültürü yapılacak hücreler için 25 cm<sup>2</sup> lik flasttaki hücrelerin yüzeyi 1ml Fosfat Tamponlu Salin (PBS)(Serox) ile yıkandı. 500 µl %0,25 Tripsin/EDTA (Gibco) kullanıldı. Flast 2-3 dakika inkübatörde bekletildi. 5ml %10'luk FBS'li ortam ile flasttaki hücreler toplandı. 900 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi.

### **3.6 Hücre Canlılığı ve Tripan Mavisi ile CDC Sonuçlarının Değerlendirilmesi**

Bunun için 75cm<sup>2</sup> 'lik flastta bulunan hücrelerin ortamı uzaklaştırıldı ve 2 mL steril PBS çözeltisi ile yıkandı. Ardından 1 ml %0,25'lik Tripsin/EDTA solüsyonu ile muamele edildi. Flast 37°C'de %5 CO<sub>2</sub> içeren inkübatör içerisinde 2-3 dakika bekletildi. İnkübatörden alınan hücreler 5ml hücre ortamı ile flasttan toplandı ve 15 ml falkona aktarıldıktan sonra 900 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Hücre sayımı ve canlılık kontrolü için tripan mavisi boyama yapıldı. Daha sonra hemositometrik olarak sayım yapıldı. Hücreler, 12 kuyulu plakaya her bir kuyuda 5x10<sup>4</sup>/500µl hücre olacak şekilde hücre ortamı ile birlikte ekildi. Ekimi yapılan hücreler 37°C'de %5 CO<sub>2</sub> içeren inkübatörde kültüre edildi. Ertesi gün hücrenin ortamı çekildi. 60 dakika süreyle DSA (+) serum ile inkübe edildi. Her bir serum açıklık ortamı (FBS içermeyen ortam) ile 1:1 oranında seyreltildi. Hücreler yıkandı ve komplemansız koşulların (C-) kuyuları toplandı, komplemanlı koşul (C+) için ilgili kuyular 60 dakika boyunca tavşan kompleman serumu (Inno-train, Kaninchenkomplement lot no: HKL0322) ile inkübe edildi. Liyofilize halde bulunan kompleman 1ml PBS ile sulandırıldı. Aynı işlem basamakları DSA (-) serum örneği için de tekrarlandı. 1:1 oranında hücre ortamı ile tripan mavisi (Gibco) ile karıştırıldı ve canlı-ölü hücre ayırımı yapıldı. İverted mikroskop ile görüntülendi.

### 3.7 HK-2 Hücrelerinin Yüksek Çözünürlüklü Doku Tiplemesi

#### 3.7.1 DNA izolasyonu

HK-2 hücreleri 6 kuyulu plaka (plate) her kuyuda  $5 \times 10^5$  hücre olacak şekilde ekim gerçekleştirildi. İzolasyon için ticari olarak alınan kitin (Geneall,Kore) prosedürüne göre gerçekleştirildi.

- Ependorfa 200 µl kan, 20 µl Proteaz K eklendi. 2 dk oda sıcaklığında inkübe edildi. 200 µl Buffer BL eklendi ve vorteks yapıldı.
- 56°C’de 10 dk inkübe edildi ve 200 µl saf etanol eklendi.
- Tüm karışım kolon tip G’ye (yeşil) aktarıldı. 6000g 1dk santrifüjlendi. 600 µl BW tampon eklendi ve tekrar 6000g’de santrifüjlendi.
- 700 µl TW tampon eklenerek 6000g santrifüjlendikten sonra tam hızda 1dk yıkama tamponu ile santrifüjlendi.
- Son aşamada 200 µl AE tamponu eklenip 1dk oda sıcaklığında bekletildikten sonra tam hızda 1dk santrifüjlendi ve DNA ependorfta toplandı.
- İzole edilen genomik DNA’dan 1,5 µl alındı ve Nanodrop cihazında 260-280 nm’de absorbansları ölçüldü.
- DNA saflık dereceleri ve konsantrasyonları ölçüldü. DNA konsantrasyonları 88,6/1,87 µl/ng olarak bulundu. Yüksek çözünürlüklü yöntem ile HLA doku tipi HLA-A\*02:01, A\*30:01, HLA-B\*13:02, B\*44:05, HLA-C\*02:02, C\*06:02, HLA-DRB1\*01:01, DRB1-16:01, HLA-DQB1\*05:01, DQB1\*05:02 olarak belirlendi\*\*

\*\*HLA tiplemesi Genplus firmasının desteği ile yapılmıştır.

CDC testi öncesi HK-2 hücrelerinden RNA izolasyonu yapılmıştır. Yöntem 3.9.1’de anlatılmıştır.

### 3.8 Serum Örneklerinin Belirlenmesi

Bu tez çalışmasına HK-2 hücrelerinin HLA tipine göre antikorunu (DSA (+)) olan hasta ve kontrol olarak anti-HLA antikorunu içermeyen sağlıklı serumu kullanıldı. DSA (+) serum böbrek nakli bekleme listesinde kayıtlı ve rutin PRA tanımlama testleri yapılan hastalar içinden belirlendi. DSA (+) serum örneği anti-HLA-A2

antikoru içermekteydi. Böylece anti HLA antikoruna sahip olan böbrek hastası ve anti HLA antikoruna sahip olmayan gönüllüden serum örneği bir adet biyokimya tüpüne (sarı kapaklı) alındı. Alınan örnekler +4 °C'de taşındı. mRNA ve miRNA ekspresyon çalışması için hemen serumdan RNA ve miRNA izolasyonu yapıldı. HK-2 ve serum RNA'ları bekletilmeden cDNA'ya dönüştürüp -20°C'e kaldırıldı. DSA (+) ve DSA (-) serum örnekleri ve HK-2 hücreleri ile CDC testi yapılarak DSA pozitifliği ön çalışmalar ile doğrulandı. Kalan serum örnekleri ise hücre kültürü çalışması yapılana kadar -80 °C'de saklandı. Hastalardan imzalı onam formları ve İzmir Kâtip Çelebi Üniversitesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu tarafından Helsinki Bildirgesi'ne göre Etik Kurulu onayı alındı (Karar No:52).

### 3.8.1 Serumdan miRNA izolasyonu

- Biyokimya tüpünde kan örnekleri alınır alınmaz 4000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilerek serumları ayrıldı. miRNA, üreticinin talimatlarına göre miRNeasy Serum/Plasma Advanced Kit (Qiagen, Almanya) kullanılarak taze serumdan izole edildi.
- 200 µl serum örneği üzerine 1 ml QIAzol Lizis Reaktifi eklendi. Vorteksleyerek karıştırıldı. Karışım oda sıcaklığında (15–25 °C) 5 dakika inkübe edildi.
- 3,5 µl miRNeasy Serum / Plazma Spike-In Kontrolü eklendi ( $1,6 \times 10^8$  kopya/µl'de). 200 µl kloroform eklendi ve tüpü sıkıca kapatıldı. 15 saniye kuvvetlice çalkalandı. Oda sıcaklığında 2-3 dakika inkübe edildi. 4°C'de 12.000 x g'de 15 dakika santrifüjlendi.
- Üst sulu fazı yeni ependorf tüpe aktarıldı. 600 µl sulu faz üzerine 900 µl %100 etanol eklendi. Pipetleyerek iyice karıştırıldı. 700 µl RNeasy MinElute spin kolonuna pipetlendi. Kapağı kapalı olarak oda sıcaklığında 15 saniye boyunca  $\geq 8000 \times g$ 'de santrifüjlendi. Toplama tüpüne geçen kısım atıldı.
- Numunenin geri kalanı da aynı şekilde filtreden geçirildi. RNeasy MinElute spin kolonuna 700 µl Tampon RWT eklendi. Kapağı kapatıldı ve  $\geq 8000 \times g$  hızda 15 saniye santrifüjlendi. Toplama tüpüne geçen kısım atıldı.
- 500 µl Tampon RPE'yi RNeasy MinElute spin kolonuna pipetlendi ve  $\geq 8000 \times g$  hızda 15 saniye santrifüjlendi.

- RNeasy MinElute spin kolona 500 µl %80 etanol eklendi. 2 dakika boyunca  $\geq 8000 \times g$ 'de santrifüjlendi. Toplama tüpüne geçen kısım atıldı.
- RNeasy MinElute spin kolona yeni 2 ml toplama tüpü yerleştirildi.
- Spin kolonunun kapağı açıldı ve membranı kurutmak için 5 dakika boyunca tam hızda santrifüjlendi. Toplama tüpü atıldı. RNeasy MinElute spin kolonu yeni bir 1,5 ml ependorf tüpüne yerleştirildi.
- Spin kolon membranının merkezine 14 µl RNaz içermeyen su eklendi. Kapağı yavaşça kapatıldı ve RNA'yı ayırtmak için en yüksek hızda 1 dakika santrifüjlendi.
- Sonuçta 12 µl örnek elde edildi. miRNA örnekleri cDNA'ya dönüştürülene kadar hemen  $-80^{\circ}\text{C}$ 'e kaldırıldı.

### 3.9 CDC Testi

Hücre kültürü ortamında CDC prosedürüne bağlı kalarak çalışma planı oluşturuldu. Bölüm 3.6.'da anlatıldığı gibi hücreler flasktan toplandı ve hücre sayımı gerçekleştirildi. 12 kuyulu plakaya her bir kuyuda  $5 \times 10^4 / 500 \mu\text{l}$  hücre olacak şekilde hücre ortamı ile birlikte ekildi. Ekimi yapılan hücreler  $37^{\circ}\text{C}$ 'de %5  $\text{CO}_2$  içeren inkübatörde kültüre edildi. 24 saat sonra hücrenin ortamı çekildi. 60 dakika süreyle DSA(-) ve DSA (+) serum ile ayrı ayrı inkübe edildi. Her biri açlık ortamı (FBS içermeyen ortam) ile 1:1 oranında seyreltildi. Hücreler yıkandı ve ardından 60 dakika boyunca tavşan kompleman serumu (Inno-train, Kaninchenkomplement lot no: HKL0322) ile inkübe edildi. Ayrıca kompleman proteinlerinin bu süreçteki etkisini değerlendirmek için ortama kompleman eklediğimiz (CDC C(-)) ve kompleman eklediğimiz (CDC C(+)) olmak üzere koşullar oluşturuldu. Test sonunda tüm serilerden RNA ve miRNA izolasyonunu aşağıdaki protokole göre yaptık.

#### 3.9.1 Total RNA ve miRNA izolasyonu:

- Üreticinin protokolüne göre, in vitro deneyden toplanan hücrelerden RNA ve miRNA izolasyonu yapıldı (Nucleospin Macherey-Nagel, Almanya).



- Hücrelerin bulunduğu 12 kuyulu plakanın her bir kuyusuna 500 µl RiboEx TM eklendi ve hücreler ependorf tüpe toplandı.
- Hücreler toplanarak PBS ile yıkandı. Daha sonra hücreler 5 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. Tüp 12000 g de 10 dakika 4°C'de santrifüjlendi.
- Süpernatant üzerine 100 µl Kloroform eklendi ve 15 saniye kuvvetlice çalkalandı. 4°C'de 15 dakika boyunca 12.000 x g'de santrifüjlendi.
- Karışım; bir alt tabaka, bir ara faz ve bir renksiz üst sulu tabaka üç faza ayrıldı. Sulu faz yeni tüpe alındı. Tüpe içindeki hacim kadar %50 etanol eklendi.
- Santrifüjlemeden kırmızı halka ile kolon tüpe aktarıldı. 10.000g'de 30 saniye santrifüjlendi.
- Kolon yeni tüpe aktarıldı. RNA mini spin kolona bağlanır (tip B, kırmızı halka) ve süpernatantta ise miRNA bulunur.

#### **Bu basamaklardan sonra miRNA izolasyonu için;**

- Süpernatanta, süpernatantın hacmi kadar üzerine %100 etanol eklendi.
- 650 µl mavi halkalı kolona aktarıldı. 10.000g'de 30 saniye santrifüjlendi. Bu basamak 2 kez yapıldı. Kolonun altına temiz toplama tüpü geçirildi.
- 500 µl RBW eklendi. 10.000g'de 30 saniye santrifüjlendi. Kolonun altına temiz toplama tüpü geçirildi.
- 500 µl RNW eklendi. 10.000g'de 30 saniye santrifüjlendi. Bu basamak 2 kez yapıldı.
- Kolon temiz bir ependorfa aktarıldı. 50 µl RNAase içermeyen su eklendi. 10.000g'de 1 dakika santrifüjlendi.

#### **RNA izolasyonu için;**

- Kırmızı kolonda kalan büyük RNA'lar kullanıldı. Kırmızı halkalı kolona 500 µl SWI eklendi ve 10.000g'de 30 saniye santrifüjlendi.
- 500 µl RNW eklendi ve 10.000g'de 30 saniye santrifüjlendi. Bu basamak 2 kez gerçekleştirildi. Kolon temiz bir ependorfa takıldı.
- 50 µl RNAase içermeyen su eklendi. 10.000g'de 1 dakika santrifüjlendi.

- RNA ve miRNA örneklerinin saflık dereceleri NanoDrop 2000 spektrofotometre ile ölçülen 260 ve 280 nm dalga boylarındaki absorbans değerleri kullanılarak değerlendirildi.
- RNA saflık tayininde en ideal değer A260/A280 oranı için 1.8-2 kabul edildi. Elde edilen mRNA ve miRNA örnekleri çalışma yapılana kadar -80°C 'de saklandı.

### 3.10. cDNA Sentez

cDNA sentezi, Qiagen miRCURY LNA RT Kiti, Kat No/ID:339340 kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Örneklerin cDNA sentezi, kit talimatları izlenerek gerçekleştirildi. Bunun için Tablo 2'de belirtilen hacimde karışım solüsyonu hazırlandı ve Tablo 3'te ki protokole göre PCR yapıldı.

**Tablo 2.** Reaktifler ve karışımdaki miktarlar

Reaktifler	Miktarlar
RNaz içermeyen su	5µl
Reaksiyon tampon çözeltisi	2µl
Ters transkriptaz enzim	1µl
Kalıp RNA	2µl

**Tablo 3.** cDNA sentezi için PCR koşulları

Basamak	Sıcaklık	Zaman
Ters transkripsiyon	42°C	60 dk
Reaksiyon inaktivasyonu	95°C	5dk
Saklama	4°C	∞

Elde edilen cDNA örnekleri kullanılmadan önce kit prosedürüne göre 1/60 oranında seyreltildi.

### 3.11. Primer Optimizasyonu

Tablo 4'te belirtilen primerler liyofilize halde alındı ve üretici firmanın talimatına göre 100 µM konsantrasyonda olacak şekilde nükleaz içermeyen steril

suyla sulandırıldı. Daha sonra bu stok çözeltiden 1/10 oranında seyreltme yapılarak PCR reaksiyonlarında 10 µM konsantrasyonda kullanıldı. Primerlerin optimizasyonu için ampliconlar geleneksel PCR yöntemiyle çoğaltılıp agaroz jel elektroforezinde bantlar incelendi. Uygun erime sıcaklığı (T<sub>m</sub>) dereceleri belirlendi.

### 3.12. Gerçek Zamanlı (RT)-PCR ile Gen İfade Analizi

İlgili genlerin ifade düzeylerinin belirlenmesi için Real Q SYBR Green (Ampliqon, Danimarka) boyası ve Thermo Scientific PikoReal Real-Time PCR System (Thermo Scientific, Finlandiya) cihazı kullanıldı. Elde edilen cDNA örnekleri ile Tablo 5'te verilen koşullar oluşturuldu. 96 kuyucuklu plakalara (96-well piko PCR plate, Thermo Scientific, Birleşik Krallık) dağıtıldı. Bu plakaların üzeri yapışkan filmle (Thermo Scientific, Birleşik Krallık) kapatıldı ve cihaza yerleştirildi. Tablo 6'da gösterilen PCR protokolü gerçekleştirildi. Gen örnekleri için GAPDH miRNA örnekleri için U6 referans gen seçildi.

**Tablo 4.** Gen İfadesi için kullanılan primer dizileri ve özellikleri

Gen Adı	Primer Dizisi	Baz Uzunluğu (bç)	Referans
<b>GAPDH</b>	F:5'-GAGTCAACGGATTTGGTCGT-3'	23	98
	R: 5'GACAAGCTTCCCGTTCTCAG-3'	23	
<b>TGF-β</b>	F:5'-TTGATGTCACCGGAGTTGTG-3'	20	99
	R:5'-TCCACTTGCAGTGTGTTATCC-3'	21	
<b>TNF-α</b>	F:5'-CCAGGGACCTCTCTAATCA-3'	21	
	R: 5'-TCAGCTTGAGGGTTTGCTAC-3'	20	
<b>C1qA</b>	F:5'-ATGGTGACCGAGGACTTGTG-3'	20	
	R:5'-GTCCTTGATGTTTCCTGGGC-3'	20	
<b>C1qB</b>	F:5'-CAGGTTGAAATCAGCATTGCC-3'	21	100
	R:5'-CTGTGTCAGACGCCTCCTTTC-3'	21	
<b>C1qC</b>	F:5'- AAGGATGGGTACGACGGACTG-3'	21	
	R:5'-TTTCTGCTTGTATCTGCCCTC-3'	21	
<b>U6</b>	F: 5'- CTCGCTTCGGCAGCACA-3'	17	101
	R:5'- AACGCTTCACGAATTTGCGT-3'	20	
<b>Let-7c-</b>	F:5'-GCGGCGTTGAGGTAGTAGGT-3'	20	102
	R:5'-GTGCAGGGTCCGAGGTATTC-3'		

<b>5p</b>		20	
<b>miR-21</b>	F: 5'-TGCGCTAGCTTATCAGACTGA-3'	21	103
	R: 5'-CCAGTGCAGGGTCCGAGGTATT-3'	22	
<b>miR-28-3p</b>	F:5'-CGCGCACTAGATTGTGAGCT-3'	20	104
	R:5'-AGTGCAGGGTCCGAGGTATT-3'	20	
<b>miR-29b-3p</b>	F:5'-ACACTCCAGCTGGGTAGCACCATTTGAAATC-3'	31	105
	R:5'-GTAGGCTACTACAGGATTTG-3'	20	
<b>miR-125a-5p</b>	F: 5'-GGTCCCTGAGACCCTTTAACC-3'	21	106
	R: 5'-CAGTGCCTGTCGTGGAGT -3'	18	
<b>miR-142-5p</b>	F: 5'-CATAAAGTAGAAAGCACTAC-3'	20	107
	R: 5'-GAACATGTCTGCGTATCTC-3'	19	
<b>miR-145</b>	F: 5'-GTCCAGTTTTCCAGGA-3'	17	108
	R: 5'-GTGCAGGGTCCGAGGT-3'	16	
<b>miR-155</b>	F: 5'-CGGCGGTTAATGCTAATTGTGAT-3'	23	109
	R: 5'-GTGCAGGGTCCGAGGT-3'	16	
<b>miR-217</b>	F:5'-CGCAGATACTGCATCAGGAA-3'	20	110
	R:5'-CTGAAGGCAATGCATTAGGAACT-3'	23	
<b>miR-520e</b>	F:5'-AAAGTGCTTCCTTTTTGAGGG-3'	21	94
	R:5'-GCGAGCACAGAATTAATACGAC-3'	22	
<b>miR-885</b>	F:5'-CCATTACACTACCCTGC-3'	17	111
	R:5'-GAACATGTCTGCGTATCTC-3'	19	

F:İleri, R:Geri Tm: Erime sıcaklığı

**Tablo 5.** Real-Time PCR koşulları

<b>Bileşenler</b>	<b>Miktar</b>
RealQ SYBR Green master mix	6,25µl
RNA-DNA içermeyen su	2,75 µl
Primer Forward (İleri)	0,5 µl
Primer Reverse (Geri)	0,5 µl
cDNA	2 µl
Toplam hacim	12 µl

**Tablo 6.** Real time PCR protokolü

<b>Basamak</b>	<b>Sıcaklık</b>	<b>Süre</b>	<b>Döngü</b>
Ön denatürasyon	95 °C	15 dk	1
Denatürasyon	95°C	30 sn	40
Bağlanma	58-60°C	30 sn	40
Uzama	72°C	30 sn	40
Erime Eğrisi	60-95°C	10 dk	1

### 3.13. İstatistiksel Analizler

Rölatif gen ekspresyon analizleri  $\Delta\Delta Ct$  metoduna göre yapıldı.  $\Delta\Delta Ct$  değerleri  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  şeklinde işleme alınarak kat değişimi (Fold Change) aşağıdaki formül ile hesaplanması yapıldı.

$$\Delta Ct = Ct (\text{hedef gen}) - Ct (\text{referans gen})$$

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct (\text{hasta}) - \Delta Ct (\text{sağlıklı kontrol})$$

$$2^{-\Delta\Delta Ct} = 2^{-[(Ct \text{ hedef} - Ct \text{ ref}) \text{ hasta} - (Ct \text{ hedef} - Ct \text{ ref}) \text{ sağlıklı kontrol}]}$$

Gen ekspresyon analizleri hem manuel olarak hem de <https://geneglobe.qiagen.com/tr/analyze> web sitesinde online olarak hazır bulunan istatistik programında hesaplandı. Diğer analizler GraphPad Prism 21 ile yapıldı. Veriler varyans analizi (ANOVA) testi kullanılarak mRNA-miRNA ilişkisi Cytoscape ver. 3.10.0 ile analiz edildi.

### 3.14. Etik İzinler

Araştırmanın yapılabilmesi için İzmir Kâtip Çelebi Üniversitesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulundan 04/08/2022 tarih ve Karar No:52 ile etik kurul izni alındı (Ek 1).

## 4. BULGULAR

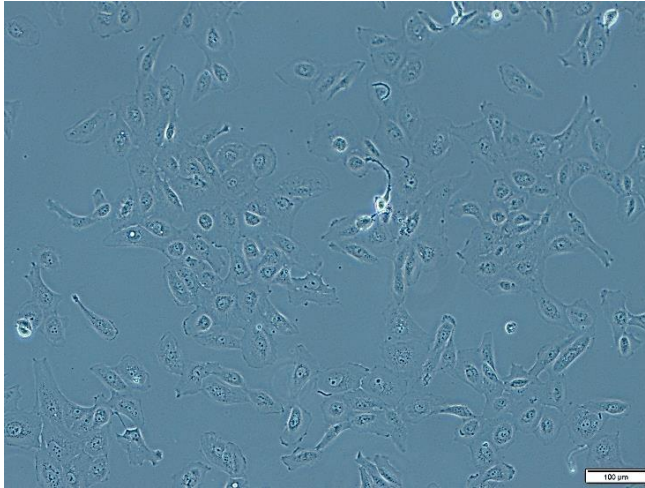
### 4.1. Deney Planlaması ve Hasta Bilgisi

Çalışmamızda miRNA ekspresyon paternlerinin AAR ile ilişkili olup olmadığını belirlemek için HLA sınıf I DSA'ya sahip hasta serumu ile in vitro koşullarda nakil modellemesi yaptık. Bu tez çalışmasında böbrekteki harabiyeti yansıtan proksimal tübüler hücrelerini kullanarak in vitro şartlarda DSA ve kompleman varlığında miRNA panelindeki değişiklikleri ve bu değişikliklerin hücre ölümü ve belirlediğimiz genlerin ekspresyonu üzerine etkisini araştırdık.

Çalışmada tercih edilen hasta serumu anti-HLA-A2 pozitif antikora sahiptir. HK-2 hücrelerinde de HLA-A\*02 alleli saptandı. Hücre serum kombinasyonu ile CDC testi yapılarak DSA pozitifliği doğrulandı ve serum tez çalışmasına dahil edildi. Sağlıklı gönüllüden elde edilen serum örneğinin PRA ve CDC testleri ile anti HLA antikoru içerip içermediği doğrulandı.

### 4.2 HK-2 Hücrelerinin Kültüre Edilmesi

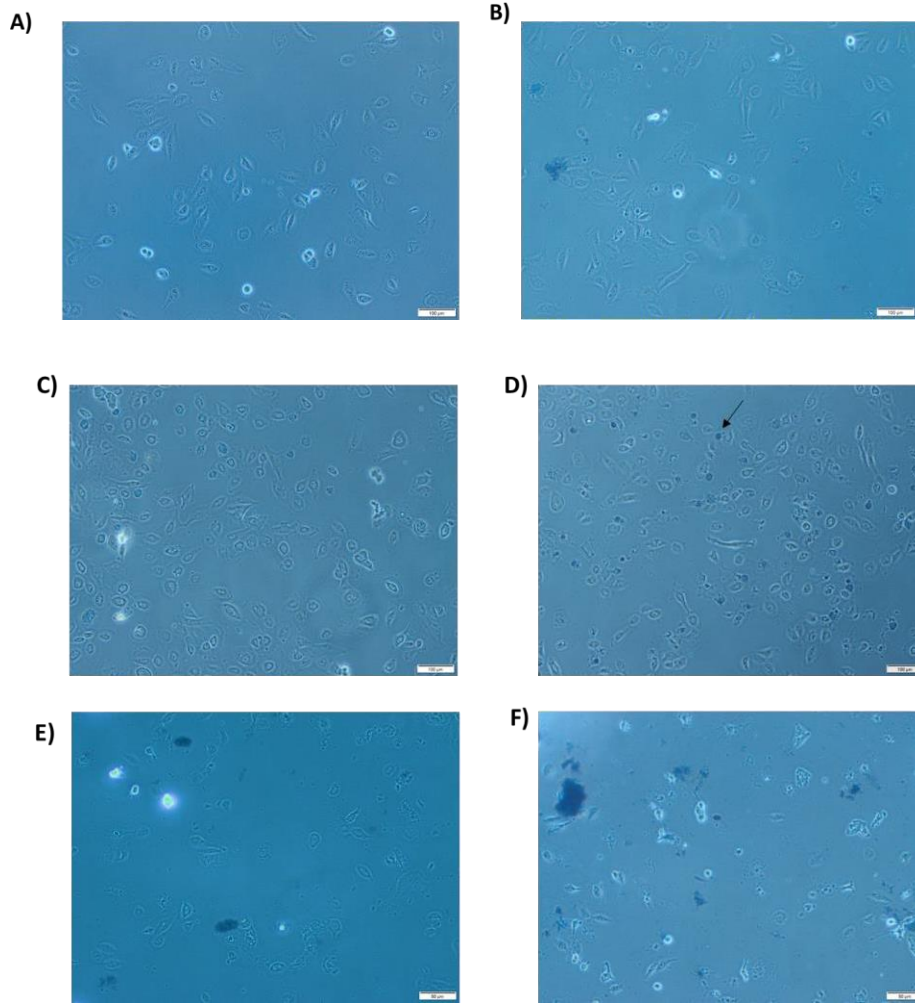
75 cm<sup>2</sup>'lik flaskta çoğaltılan HK-2 hücrelerinin morfolojik görüntüsü inverted mikroskop ile görüntülendi (Şekil 4).



Şekil 4. HK-2 hücre hattının mikroskopik görüntüsü (10X)

### 4.3. CDC Testi

Şekil 5’de gösterildiği gibi HK-2 hücreleri 60 dk DSA (+) ve DSA (-) serum ile muamele edildi. Bu süre sonunda komplemansız (CDC C (-)) ve komplemanlı (CDC C (+)) koşul oluşturuldu. 60 dk ile oluşturulan koşulda DSA (+) serum ile HK-2 hücrelerinin inkübasyonunda gözle görünecek düzeyde hücre ölümü görüldü.

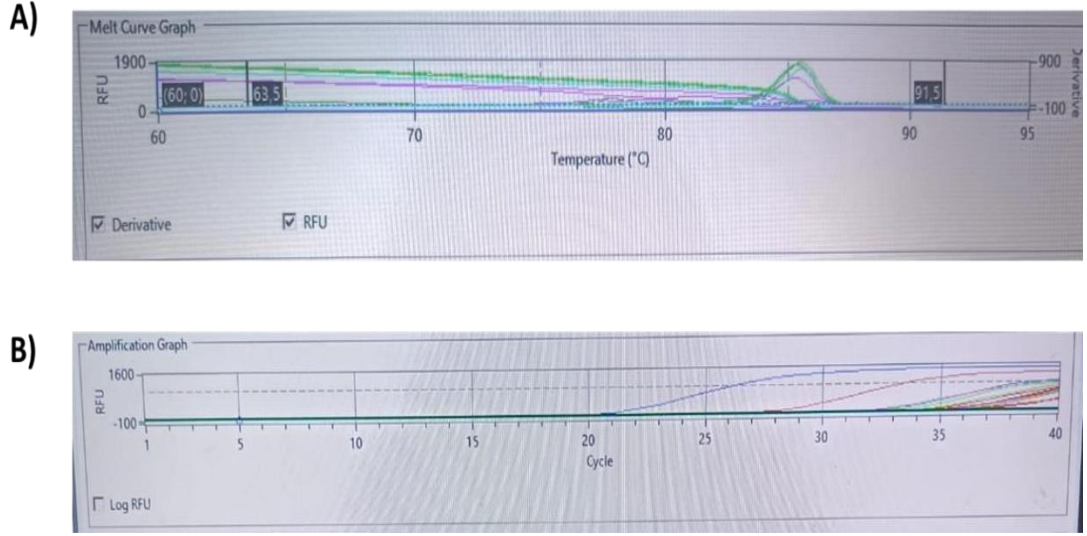


Şekil 5. CDC testi ön çalışmaları A) HK-2 hücresi, B) Kompleman muamelesi yapılmış HK-2 hücreleri C) DSA (-) CDC C (-), D) DSA (+) CDC C (-), E) DSA (-) CDC C (+), F) DSA (+) CDC C (+) ( : Ölü hücre)

### 4.4. Real time PCR ile Gen İfade Düzeyleri

İn vitro koşullardan elde edilen örneklerin mRNA ve miRNA ifade değişimini belirlemek için kantitatif PCR yapıldı. Her bir reaksiyon 3 tekrarlı olarak gerçekleştirildi. Her genin ve miRNA’nın 3 adet Ct değeri elde edildi. Bu Ct

değerlerinin ortalaması alındı. Genlerin ve miRNA ifadesi testlerinin analizleri hem  $\Delta\Delta Ct$  yöntemiyle hem de Qiagen hazır gen analiz platformuyla yapıldı.  $\Delta\Delta Ct$  yönteminde elde edilen Ct değerlerinden referans genden elde edilen Ct değerleri çıkarılarak her bir gen için  $\Delta Ct$  değerleri elde edildi.  $\Delta Ct$  çalışılan gruptan  $\Delta Ct$  kontrol grubu çıkararak  $\Delta\Delta Ct$  bulundu.  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  formülünde yerine yazıldı.

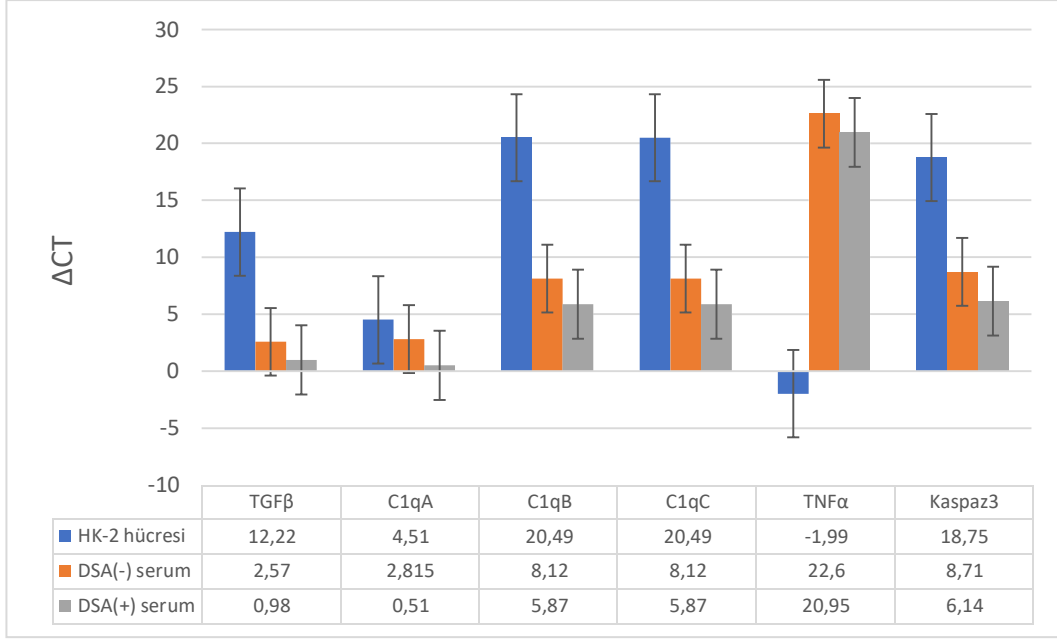


**Şekil 6.** Real time PCR analiz grafikleri A) Erime eğrisi analizi B) Çoğalma eğrisi analizi

miRNA ekspresyonları referans gen U6'ya göre mRNA ekspresyonları ise GAPDH'a göre normalize edildi. Böylece  $\Delta Ct$  değerleri bulundu.

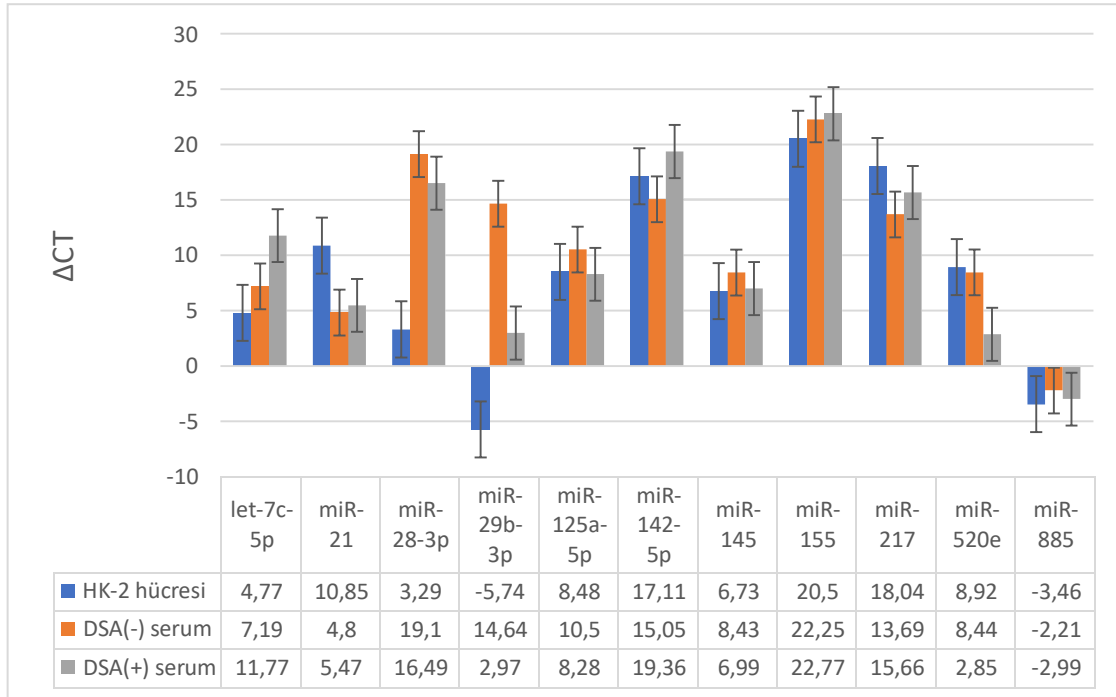
Çalışmada oluşturulan koşullardan önce HK-2 hücresinde ve DSA (-) ve DSA (+) serum örneklerindeki ekspresyon düzeyleri incelendi. Daha sonra yaptığımız koşulların değerlendirilmesinde bu sonuçlar ön bilgi vermiştir. Şekil 7'de HK-2 hücresinde  $\Delta Ct$  değerlendirildiğinde; en az TNF- $\alpha$ , en fazla C1qB ve C1qC'nin olduğu gözlemlenmiştir. DSA (-) serumda  $\Delta Ct$  en az TGF- $\beta$  en fazla  $\Delta Ct$  TNF- $\alpha$ 'dır. DSA (+) serumda en düşük  $\Delta Ct$  C1qA en fazla  $\Delta Ct$  TNF- $\alpha$ 'dır.





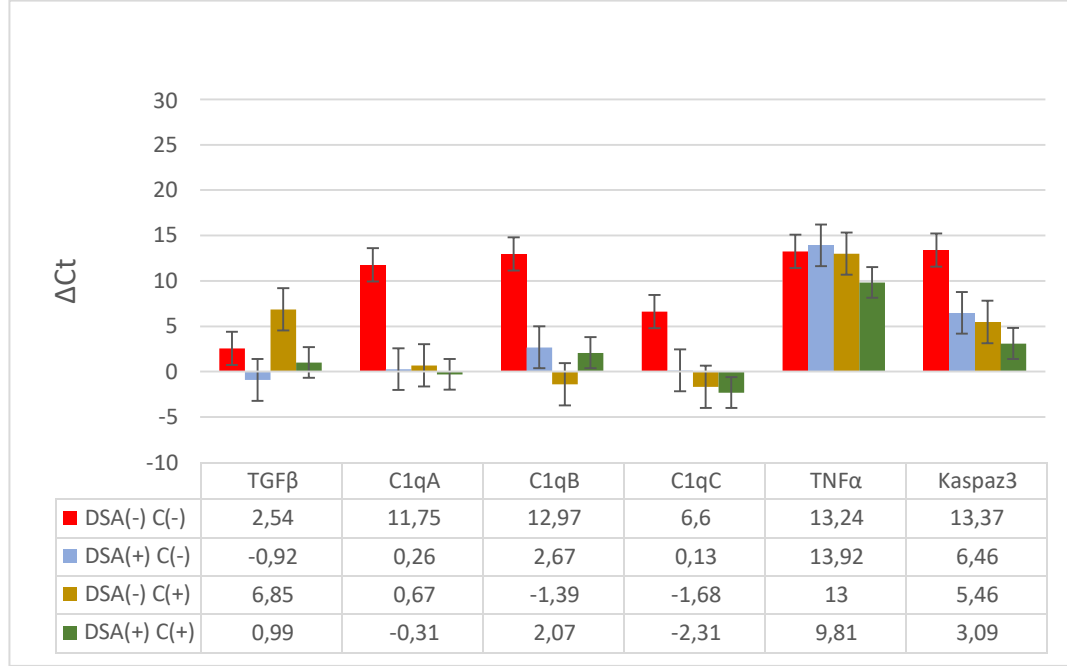
**Şekil 7.** mRNA'ların HK-2 hücresi, DSA (-) ve DSA (+) serumlardaki  $\Delta C_t$  değerleri

Şekil 8'de HK-2 hücresinde en fazla  $\Delta C_t$  miR-155 en az  $\Delta C_t$  miR-29b-3p'dir. DSA (-) serum ve DSA (+) serum birbirleriyle paralel sonuçlar gösterdi. Her iki örnekte de en fazla  $\Delta C_t$  miR-155 en az  $\Delta C_t$  miR-885 olarak bulundu.



**Şekil 8.** miRNA'ların HK-2 hücresi, DSA (-) ve DSA (+) serumlardaki  $\Delta C_t$  değerleri

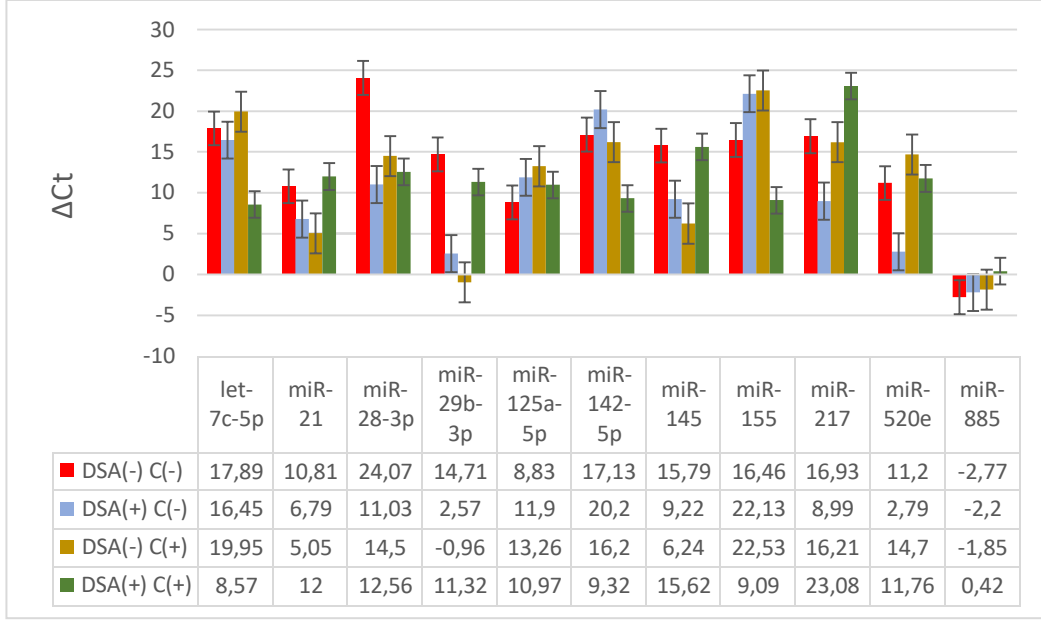
Test çalışmamıza dahil ettiğimiz mRNA ve miRNA ekspresyonlarını hücre ve serum örneklerinde belirledikten sonra CDC test serilerinde kompleman proteinlerinin bu ekspresyonları üzerindeki etkisini görmek için CDC C (-) ve CDC C (+) sonuçlarındaki kat artışlarını analiz ettik.



**Şekil 9.** mRNA'ların DSA (-) ve DSA (+) örneklerde CDC C (-) ve CDC C (+) koşullarında  $\Delta C_t$  değerleri

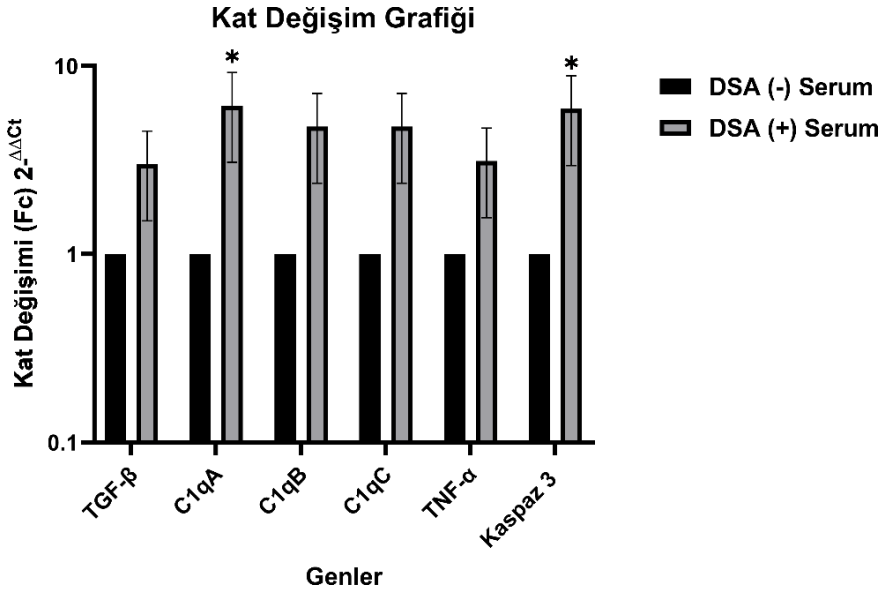
DSA (-) CDC C (-) en fazla  $\Delta C_t$  Kaspaz 3 geninde en az  $\Delta C_t$  TGF- $\beta$  'de iken DSA (+) CDC C (-) en fazla  $\Delta C_t$  TNF- $\alpha$  en az  $\Delta C_t$  TGF- $\beta$  olarak bulundu. DSA (-) CDC C (+) en fazla  $\Delta C_t$  TNF- $\alpha$  en az  $\Delta C_t$  C1qC'dir. DSA (+) CDC C (+) en fazla  $\Delta C_t$  TNF- $\alpha$  en az  $\Delta C_t$  C1qC'dir.

Şekil 10'da DSA (-) CDC C (-) en fazla  $\Delta C_t$  miR-28-3p en az  $\Delta C_t$  miR-885'dir. miR-29b-3p, DSA (+) CDC C (-) örnekte DSA(-) CDC C (-)'e göre azalırken DSA (+) CDC C (+) örnekte DSA (-) CDC C (+)'e göre artış olduğu görülmüştür. DSA (-) CDC C (+) en fazla  $\Delta C_t$  miR-155 iken en az  $\Delta C_t$  miR-885'dir. miR-217, DSA(+) C(-) örnekte DSA (-) C (-)'e göre azalırken DSA(+) CDC C(+) örnekte DSA (-) CDC C (+)'e göre artış olduğu görüldü.



**Şekil 10.** miRNA'ların DSA (-) ve DSA (+) örneklerde CDC C(-) ve CDC C(+) koşullarında  $\Delta Ct$  değerleri

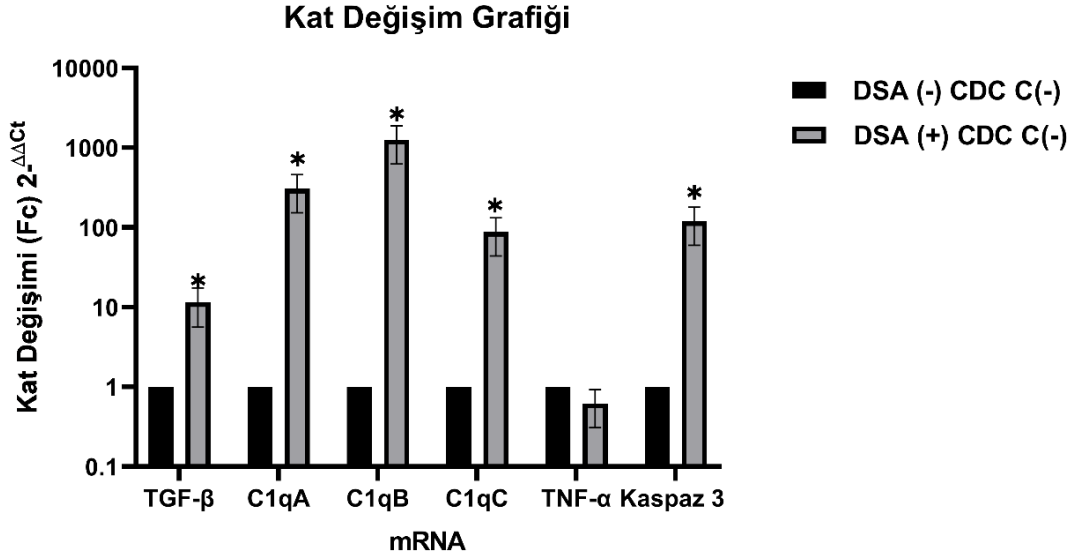
RNA ekspresyonlarını referans gen (GAPDH) baz esas alınarak karşılaştırdıktan sonra kontrol serum örneği olarak kullandığımız DSA (-) serumuna göre DSA (+) serumdaki RNA ekspresyonlarındaki kat değişimlerini Şekil 11'de değerlendirdik.



**Şekil 11.** Serum örneklerinde genlerin kat değişim grafiği. DSA (-) serum 1 kabul edildi. (Grafik Log 10 olarak gösterilmiştir.) \* $p < 0,05$

C1qA ve Kaspaz 3 genleri DSA (+) ve DSA (-) serum örnekleri arasında kat değişimleri istatistiksel olarak anlamlı bulundu.

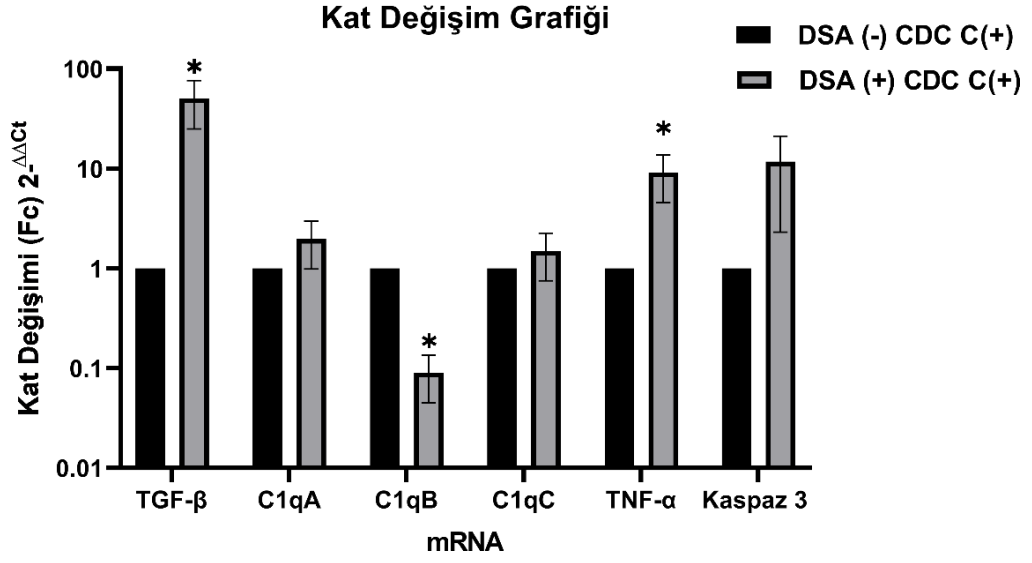
Şekil 12’de CDC C (-) testinde DSA (-) ve DSA (+) serum örneklerinde mRNA ekspresyonlarındaki kat değişimleri görülmektedir.



**Şekil 12.** CDC C (-) örneklerde genlerin kat değişim grafiği. CDC C (-): Komplemansız CDC, DSA (-) CDC C(-) 1 kabul edilmiştir. (Grafik Log 10 olarak gösterilmiştir.) \*p<0,05

CDC C (-) örneklerinin kat değişimleri TGF-β, C1qA, C1qB, C1qC ve Kaspaz 3 genlerinde istatistiksel olarak anlamlı bulundu.

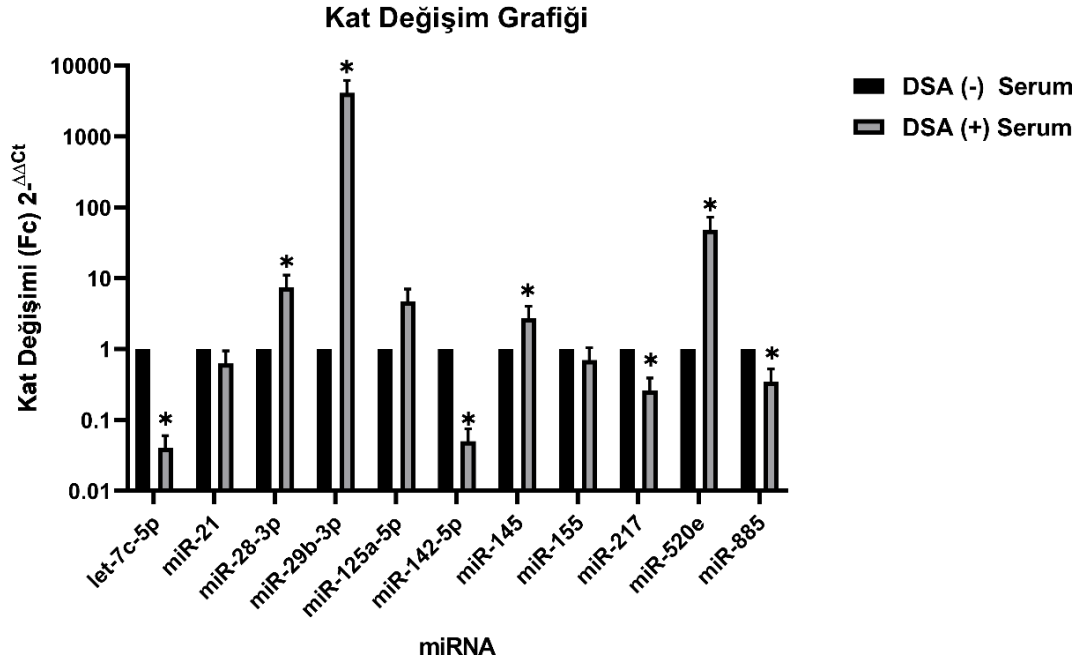
Şekil 13’te ise CDC C (+) testinde DSA (-) ve DSA (+) serum örneklerinde mRNA ekspresyonlarındaki kat değişimleri görülmektedir.



**Şekil 13.** CDC C (+) örneklerde genlerin kat değişim grafiği. CDC C (+): Komplemanlı CDC, DSA (-) CDC 1 kabul edilmiştir. (Grafik Log 10 olarak gösterilmiştir.) \*p<0,05

CDC C (+) örneklerinin kat değişimleri TGF-β, C1qB, TNF-α genlerinde istatistiksel olarak anlamlı bulundu.

Şekil 14'te ise DSA (-) ve DSA (+) serum örneklerinde miRNA ekspresyonlarındaki kat değişimleri görülmektedir.

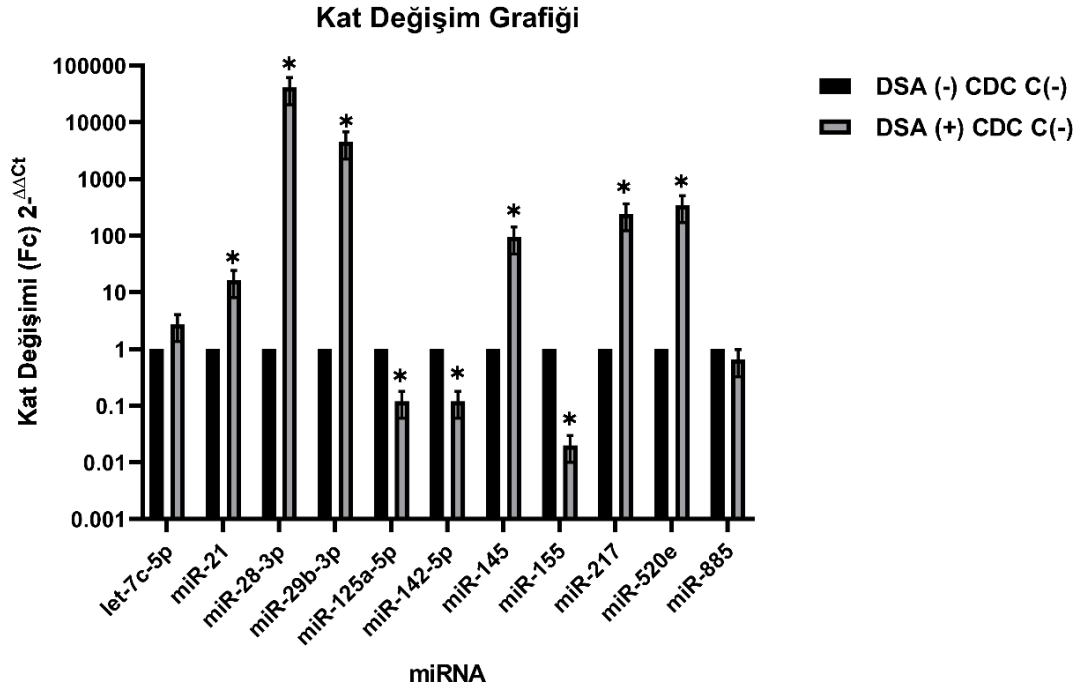


**Şekil 14.** Serum örneklerde miRNA'ların kat değişim grafiği. (Grafik Log 10 olarak gösterilmiştir.)

\*p<0,05

DSA (-) ve DSA (+) serumların kat değişimlerinde let-7c-5p, miR-28-3p, miR-29b-3p, miR-142-5p, miR-145, miR-217, miR-520e, miR-885 istatistiksel olarak anlamlı bulundu.

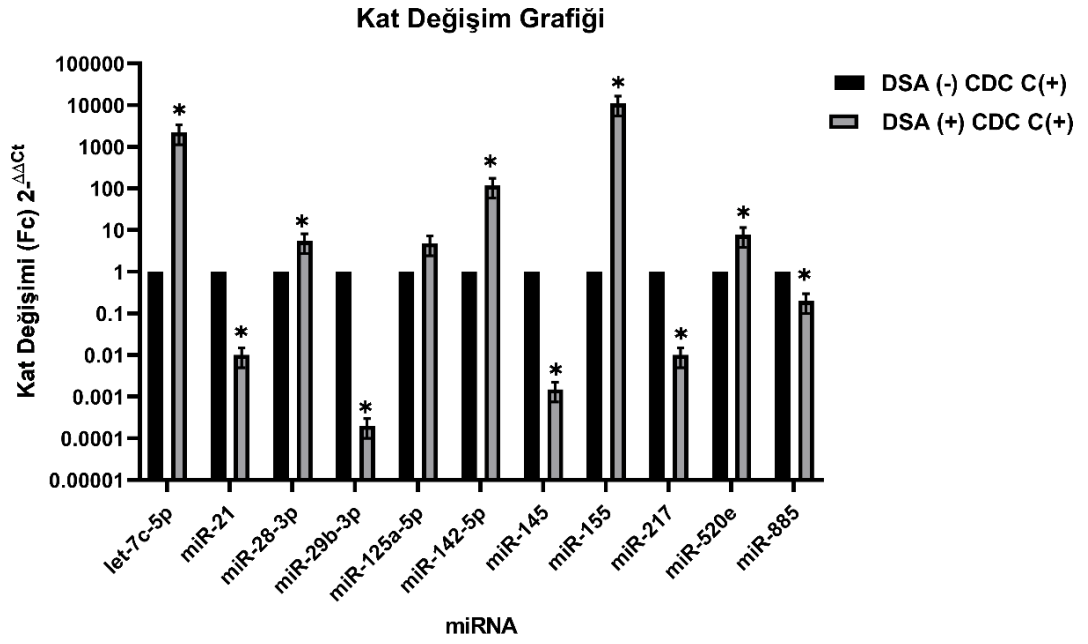
Şekil 15'te ise DSA (-) CDC C (-) ve DSA (+) CDC C (-) örneklerinde miRNA ekspresyonlarındaki kat değişimleri görülmektedir.



**Şekil 15.** CDC C(-) örneklerde miRNA'ların kat değişim grafiği. (Grafik Log 10 olarak gösterilmiştir.) \* $p < 0,05$

DSA (+) CDC C (-) örneklerinin DSA (-) CDC C (-)'e göre kat değişimleri incelendiğinde miR-21, miR-28-3p, miR-29b-3p, miR-125a-5p, miR-142-5p, miR-145, miR-155, miR-217, miR-520e istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur.

Şekil 16'da DSA (-) CDC C (+) ve DSA (+) CDC C (+) örneklerinde miRNA ekspresyonlarındaki kat değişimleri görülmektedir.

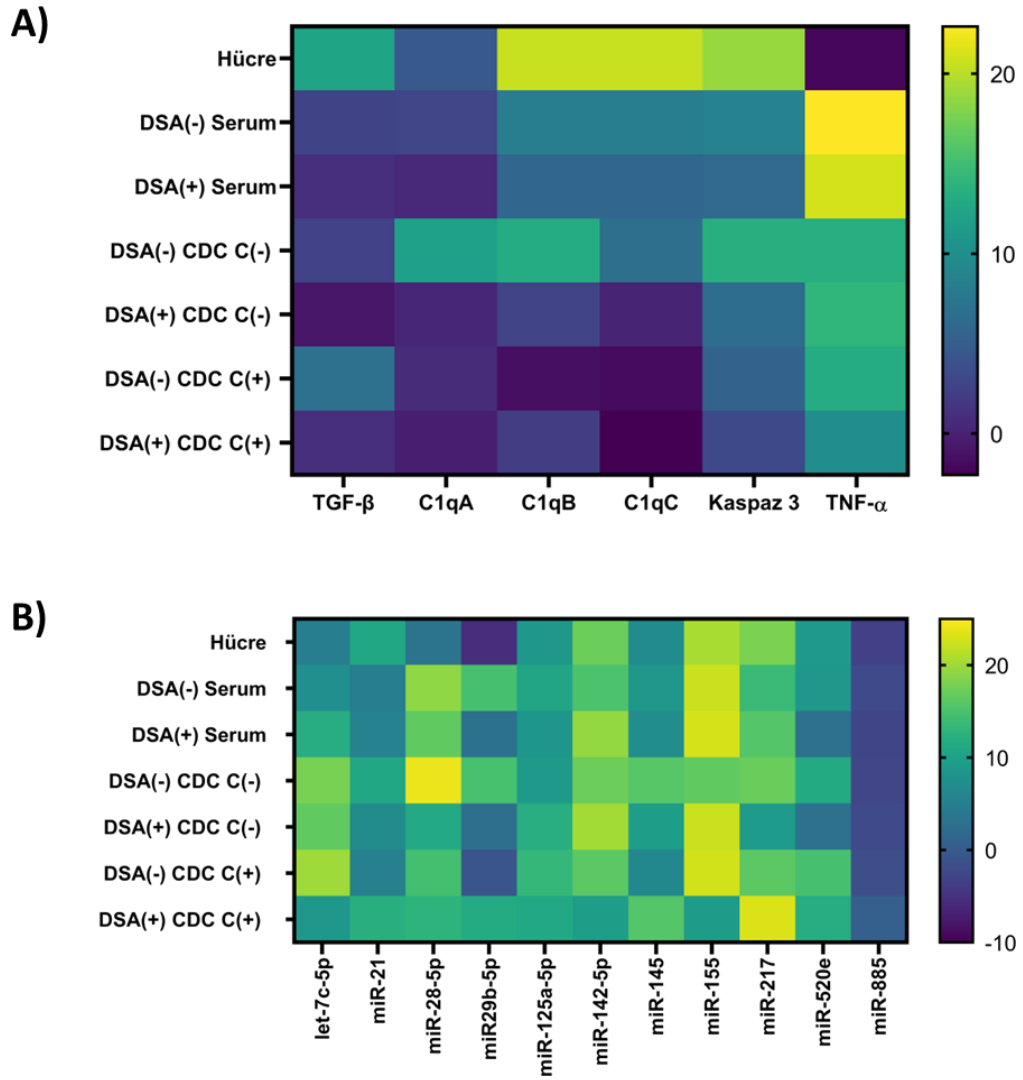


**Şekil 16.** CDC C (+) örneklerde miRNA'ların kat değişim grafiği. (Grafik Log 10 olarak gösterilmiştir.) \*p<0,05

CDC C (+) örneklerde, let-7c-5p, miR-21, miR-28-3p, miR-29b-3p, miR-142, miR-145, miR-155, miR-217, miR-520e ve miR-885 istatistiksel olarak anlamlı bulundu.

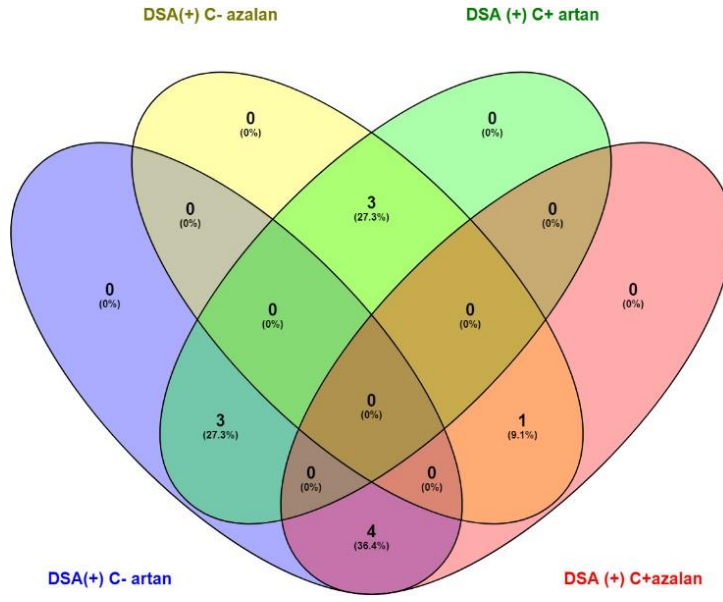
Şekil 17'de çalışmadaki tüm koşulların  $\Delta Ct$  düzeyleri ile heatmap analizi yapılmıştır.





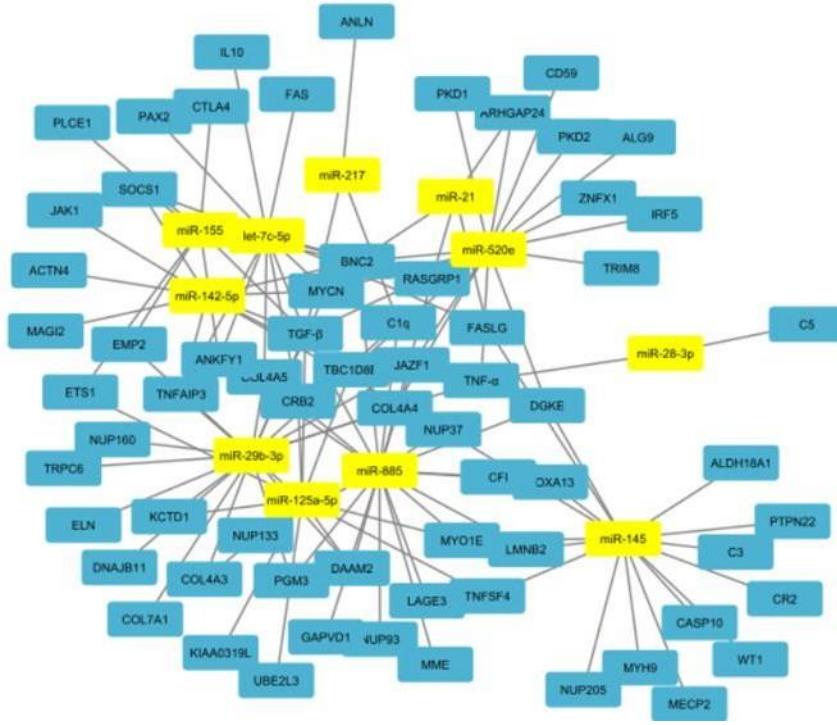
**Şekil 17.** Heatmap (Kümeleme) analizi A) mRNA için Heatmap analizi B) miRNA'lar için Heatmap analizi

Heatmap analizinde mRNA'lar arasında en yüksek  $\Delta Ct$  DSA (-) serum da TNF- $\alpha$  görülürken, en az  $\Delta Ct$  ise DSA (+) CDC C (+) C1qC 'de görülmüştür. Heatmap analizine göre miRNA'lara bakacak olursak, en yüksek  $\Delta Ct$  değeri miR-28-3p DSA (-) CDC C (-) de görülürken, HK-2 hücresinde miR-29b-3p de en az  $\Delta Ct$  değeri görüldü. DSA (+) CDC C (-) 'ye göre DSA (+) CDC C (+)'nin kat değişim karşılaştırmasından elde edilen miRNA setinin "Venn" analizine dâhil edilmesi ile ulaşılan diyagram Şekil 18'de gösterildi.



**Şekil 18.** İn vitro koşullardaki DSA (+) CDC C (-) 'ye göre DSA (+) CDC C (+)'nin kat değişimindeki miRNA 'ların kesişim kümesi

miR-125a-5P, miR-142-5P, miR-155 C(-) iken azalan aynı zamanda C(+) olduğunda artış gösteren miR'lerdir. C(-) iken artan C(+) artan miR'ler ise let-7c-5p, miR-28-3p, miR-520e'dir. miR-21, miR-29b-3p, miR-145, miR-217C(-) artan ve C(+) azalan miR'lerdir. miR-885 ise hem C(-)'de hem de C(+)'da azalmaktadır.



**Şekil 19.** mRNA-miRNA'ların böbrek inflamasyonundaki etkileşimi

Şekil 19'da çalışmamızda yer alan miRNA'ların hedef genleri TransmiR, (TargetScanHuman [www.targetscan.org]; <http://mirdb.org/>; DIANA-microT-CDS [[http://diana.imis.athena-innovation.gr/DianaTools/index.php?r5microT\\_CDS/index](http://diana.imis.athena-innovation.gr/DianaTools/index.php?r5microT_CDS/index)]) Human Phenotype Ontology gibi veritabanları kullanılarak tespit edildi. Daha sonra hedef genler içerisinde böbrek inflamasyonunda rol oynayan ve immünolojik olan genler filtre edildi. Cytoscape programı ile görselleştirildi. Tez çalışmasında çalışılan genler ve miRNA'ların birbirleriyle olan ilişkileri analiz edilerek gösterildi.

Tablo 7'de C(-) ve C(+) durumlarında miRNA'lardaki artan ve azalan ekspresyon değişimleri ve bu miRNA'ların hem immünolojik hem de böbrek inflamasyonunda rol oynayan hedef genleri gösterildi.

**Tablo 7.** CDC C(-) ve CDC C(+) durumlarında miRNA'lardaki değişimler ve hedef genleri

miRNA	Ekspresyon Düşük	Ekspresyon Yüksek	Hedef gen
<b>Let-7c-5p</b>		C-, C+	FASLG, RASGRP1, BNC2, COL4A5, MYCN, TNFAIP3, ANKFY1, CRB2, SOCS1, FAS, IL-10, PAX2, TGF-β
<b>miR-21</b>	C+	C-	FASLG, ARHGAP24, RASGRP1, BNC2
<b>miR-28-3p</b>		C-, C+	TNF-α, C5
<b>miR-29b-3p</b>	C+	C-	ELN, COL4A5, COL7A1, MYCN, TNFAIP3, JAZF1, TRPC6, DNAJB11, DAAM2 EMP2, COL4A3, NUP160, PGM3, KCTD1, TNF-α, TGF-β
<b>miR-125a-5p</b>	C-	C+	TNFAIP3, DAAM2, COL4A3, KCTD1, TNFSF4, ETS1, KIAA0319L, TBC1D8B, MYO1E, UBE2L3, TGF-β
<b>miR-142-5p</b>	C-	C+	BNC2, MYCN, TNFAIP3, TBC1D8B, SOCS1, ACTN4, JAK1, MAGI2, NUP37, TGF-β
<b>miR-145</b>	C+	C-	FASLG, TNFSF4, MYO1E, NUP37, ALDH18A1, CR2, HOXA13, CASP10, NUP205, LMNB2, MECP2, C3, WT1, MYH9
<b>miR-155</b>	C-	C+	BNC2, EMP2, ANKFY1, ETS1, SOCS1, CTLA4, PLCE1, TGF-β
<b>miR-217</b>	C+	C-	ANLN, TGF-β
<b>miR-520e</b>		C-, C+	ARHGAP24, BNC2, COL4A4, MYCN, JAZF1, TBC1D8B, DGKE, PKD2, TRIM8, IRF5 ZNFX1, PKD1, CD59, ALG9, TGF-β, TNF-α
<b>miR-885</b>	C-, C+		RASGRP1, BNC2, COL4A5, JAZF1, DAAM2, PGM3, ANKFY1, MYO1E, NUP37 HOXA13, DGKE, LMNB2, LAGE3, CFI, GAPVD1, MME, NUP93, NUP133, C1q TGF-β

## 5. TARTIŞMA

Antikor aracılı rejeksiyon, solid organ transplantasyonunda, özellikle böbrek transplantasyonunda allogreft disfonksiyonunun önemli bir nedenidir. AAR temel nedeni donör HLA'larına özgü oluşan antikorlardır. Antijen-antikor kompleksi tarafından klasik kompleman yolağı aktive olur, MAC oluşur ve hücrel hasara yol açar. Bugün hücrelerin gerek fizyolojik gerekse patolojik süreçlerinde mRNA ve miRNA ekspresyon düzeylerinde değişimler olduğu, bu değişimlerinde biyokimyasal reaksiyonlar açısından önemli olduğu bilinmektedir. miRNA'lar gen ekspresyonunun düzenlenmesinde önemli olan epigenetik mekanizmalar içinde değerlendirilmektedir. Hücrede hasar meydana geldiğinde hücre içerisinde mRNA ve miRNA ekspresyon düzeylerinde değişimler olmaktadır. Organ transplantasyonunu takiben alıcıların alloimmün tepkilerinde rol oynadığı bilinen spesifik mRNA ve miRNA'ların kritik rolünün olduğu düşünülmektedir. Bazı çalışmalarda ise mRNA ve miRNA'lar nakil sonrası hasta örneklerinde AAR ile ilişkilendirilmiştir.

Böbrek transplantasyonunda, TGF- $\beta$  uzun yıllardır ilgi konusu olmuştur ve TGF- $\beta$ 'nin allogreft sağkalımını farklı şekillerde etkilediği öne sürülmüştür (112). Ayrıca TGF- $\beta$  böbrek hastalarında fibroze neden olmaktadır (113). Nakil sonrası antikor aracılı allogreft reddi riski taşıyan alıcılarda ELISA ile sitokin seviyelerine bakıldığında TGF- $\beta$  protein seviyesinin yüksek olduğu görülmüştür (114). Çalışmamızda da CDC C(+) örneğimizde TGF- $\beta$  yaklaşık 50 kat daha fazla eksprese edildiği saptandı. Bu kadar anlamlı ekspresyon artışının olması böbrek allograftın kötü prognozunun bir sonucu olabilir.

Kompleman sistemi hem adaptif hem de doğuştan gelen bağışıklık sistemlerinin önemli bir bileşenidir. C1q, kompleman sisteminin klasik yolunun başlangıç molekülüdür (115). C1q, birçok kanser mikro ortamında aşırı eksprese edilir. (116). Böbrek nakilli hastalarla yapılan bir çalışmada, hastalar dört gruba (gecikmiş greft fonksiyonlu hastalar, hücrel rejeksiyonu olan hastalar, AAR'li hastalar ve kontrol grubu) ayrılmış ve biyopsi örneklerinde bazı kompleman proteinlerinin gen ekspresyonları araştırılmıştır. C1qB ekspresyonunun kontrole kıyasla hücrel rejeksiyonlu ve AAR'li hasta gruplarında 2-4 kat daha yüksek olması C1q sentezleyen lökositlerin özellikle de makrofajların ve dendritik hücrelerin

allogreftte hızlı akın etmesi ile açıklanmıştır (117). Mast hücreleri ile yapılan bir çalışmada C1q molekülü oluşturan C1qA, C1qB ve C1qC alt birimlerin ekspresyonu araştırılmış ve C1qA ekspresyonunun diğer alt birimlerden yaklaşık 2 kat daha fazla olduğunu görülmüştür (118). Ayrıca Negera ve arkadaşlarının Eritema Nodosum Leprosum (ENL) hastalığıyla ilgili yaptığı çalışmada hastaların deri biyopsilerinde C1qA ve C1qC ekspresyonunun C1qB ekspresyonuna göre daha yüksek olduğu görülmüştür (100). Çalışmamızda da DSA(-) CDC C(+)’a göre DSA(+) CDC C(+) karşılaştırıldığında C1qA, C1qC ekspresyonu yüksek iken C1qB düşüktür. Tez çalışmamızın sonuçlarını benzer literatürler ile karşılaştırdığımızda C1q kompleman proteininin yapısında üç alt birimin eşit oranda bulunmasına rağmen farklı hücre tiplerinde gen ekspresyonlarının farklı olduğu görülmektedir. Mikro çevre bu mekanizmayı etkileyen önemli faktörlerdendir. DSA (+) serumdaki antijen-antikor bağlanması henüz tam olarak aydınlatılamamış sinyal yolları üzerinden C1q genlerinin ekspresyonunu düzenlemiş olabilir.

Kanser hücrelerinde C1q’nun Bax ve Fas’ı düzenleyerek TNF- $\alpha$  ile indüklenen apoptoz yolunu yukarı regüle edebildiği gösterilmiştir (119). Böbrek nakli sonrası AAR’li hastaların ve kontrol grubunun PBMC’leri ile tek hücreli RNA dizilimi (scRNA-seq) yapıldığında AAR hastalarda TNF- $\alpha$ ’nın fazla eksprese edildiği görülmüştür (120). Bizim çalışmamızda CDC C(-)’li ve CDC C(+) serilerde kat artışının olduğu görüldü.

Apoptotik hücrelerin hücre zarı üzerindeki fosfolipitler, kompleman aktivatörleri olarak iyi adaylardır. Klasik veya alternatif yollar yoluyla kompleman sistemini aktive etme kapasitesine sahip oldukları gösterilmiştir (121). Hiperakut greft reddi ve I/R yaralanması gibi doku hasarının komplemana bağlı olduğu durumlarda apoptotik hücre ölümü tespit edilmiştir. Ayrıca kompleman apoptozun inhibisyonu, enflamasyonunu ve doku hasarını etkili bir şekilde azalmıştır (122). Farklı bir çalışma ise, komplemanın doku hasarına sadece hücre lizisi yoluyla değil, aynı zamanda apoptozun indüklenmesi yoluyla da katkıda bulunduğunu göstermektedir (123). İn vivo renal I/R modelinde C3 ve Kaspaz 3 genlerinin susturulmasıyla hasarın önlenebileceği gösterilmiştir (44). Laboratuvarında oluşturduğumuz AAR modeli hiperakut rejeksiyondur. Tüm serilerde AAR modelinde Kaspaz 3 ekspresyonunun arttığı görülmektedir. Bu sonuçlar ile in vitro

AAR'de de apoptozun indüklendiğini ve sonuçlarımızın literatür ile uyumlu olduğunu göstermektedir.

AAR hem akut hem de kronik olabilir ve yapılan araştırmalar, miRNA'ların bu tip red yanıtına katkıda bulunabileceğini düşündürmektedir (124).

Kronik böbrek yetmezliği (KBY) hastalarında yapılan bir çalışmada TGF- $\beta$  ekspresyonu ile renal doku let-7c-5p seviyeleri arasında negatif korelasyon bulunmuştur. SDBY hastalarının biyopsi materyallerinde let-7c-5p düzeyleri azalırken, TGF- $\beta$  ekspresyon seviyelerinin, normal böbrek dokusu ile karşılaştırıldığında artmış olduğu görülmüştür (125). Çalışmamızda DSA (+) serum örneği SDBY hastasına ait iken, DSA (-) serum örneği sağlıklı kontrole aitti. Bizim sonuçlarımızda da hasta serumunda let-7c anlamlı derecede düşük iken TGF- $\beta$  ekspresyonu kontrole oranla yüksek idi. Serum örneklerindeki ekspresyon düzeyleri de bu miRNA ve TGF- $\beta$  arasındaki negatif korelasyonu invazif bir girişime gerek olmaksızın yansıtmıştır.

Anglicheau ve arkadaşları normal allograft biyopsi örnekleri ve akut rejeksiyonlu biyopsi örneklerini referans gene göre oranladıklarında let-7c ekspresyonunun azaldığı göstermiştir (126). Literatürde in vitro AAR modeli ile çalışılmış tek yayında glomerular endotelial hücre hattı kullanılmıştır. XM testi bakımından tez çalışmasına benzeyen araştırmada CDC serilerinde DSA (+) hastalarda CDC C (+)'de daha fazla olmak üzere let-7c ekspresyonunun arttığı belirlenmiştir (71). Bizim çalışmamızdaki sonuçlar bu in vitro çalışma ile uyumludur.

Aglicheau ve arkadaşları yaptığı normal allograft biyopsi örneklerinde miR-142 ve miR-155 ekspresyonundaki artışın let-7c'deki azalma ile birlikte değerlendirildiğinde AAR tanısı açısından biyobelirteç olarak kullanılabilceği belirtilmiştir (126). CDC C (+) serilerde sonuçlarımız bu son iki mir açısından çalışma ile uyumludur. Let-7c'deki farklılığı açıklayamamakla birlikte bazı moleküllerin yüksek hassasiyetinden dolayı in vivo ortamı tam olarak yansıtmamasından kaynaklanabileceğini düşünmekteyiz.

Tez çalışmasına dahil ettiğimiz diğer miRNA'lara sırasıyla bakacak olursak, Pek çok sağlıklı dokuda olduğu gibi böbrek hücrelerinde miR-21 esas olarak kortekste eksprese edilir. Yaralanma veya hasar durumunda ekspresyonu büyük

ölçüde artar ve tübüler epitelde lokalize olur. Bu durum, miR-21'in tübüler epitel hücrelerinde ve çoğunlukla yaralanma sırasında genleri hedef aldığını düşündürür (127). Bizde HK-2 hücrelerinde miR-21 ekspresyonunu mevcut olduğunu tespit ettik. miR-21 ekspresyonu ile ilgili farklı sonuçlar mevcuttur. Zang ve arkadaşları diyabetik böbrek hastalarından elde edilen idrar eksozom örneklerinde mir-21'in arttığını bulmuşlardır (128). İnsan greft biyopsi dokusunda yükselmiş miR-21 seviyelerinin tubulointerstisyel fibroz ile ilişkili olduğu bulunmuştur (129). Glowacki ve arkadaşları böbrek nakli hastalarının plazma örneğinde miR-21 artışının greft böbreğinde şiddetli IF/TA ile ilişkili olduğunu bildirmiştir (130). Başka bir çalışmada fibroblast hücrelerinde mimik uygulaması yaparak miR-21 ekspresyonunun artışı sağlanmış ve bu uygulama sonrasında TGF- $\beta$  ekspresyonunu da arttığı görülmüş. miR-21'in de fibrozis sürecinde rol alabileceği düşünülmüştür (131). 10 yıldan fazla geç greft sağkalımına sahip 40 böbrek nakli alıcısının dahil edildiği bir çalışmada plazma örneğinde miR-21 'in azaldığı görülmüştür (132). İn vivo bir çalışma tübüler epitel hücrelerinde miR-21'in susturulması hücre ölümünü arttırmıştır (133). Bizim çalışmamızda da AAR modelinde miR-21 ekspresyonunun azaldığı bunun da hücre ölümü ile ilişkili olduğu görülmektedir.

Böbrek kanseri çalışmasında miR-28 ekspresyonunun arttığı bulunmuştur (134). Kardiyomiyositlerde yapılan bir in vitro çalışma, miR-28-3p'nin bir fonksiyonu olarak PDPK1/AKT1/MTOR sinyal yolunun baskılandığı bulunmuştur. Bu yolun daha az baskılanması, allojenik düzenleyici T hücrelerinin endotel hücreleri tarafından daha az aktivasyonuna ve mTORC2 yoluyla endotel hücrelerinde proinflamatuvar VCAM1'in daha az baskılanmasına neden olur (135). Bizim çalışmamızda da C+ grupta miR-28-3p ekspresyonu DSA(-) e göre DSA(+) 'de anlamlı derecede artmıştır.

miR-29 ailesi, proksimal tübüler hücrelerde TGF- $\beta$ 1 tarafından aşağı regüle edilmiştir. Ayrıca diyabetik olmayan kronik böbrek hastalığının gelişiminde hastalık ilerledikçe miR-29b ekspresyonunun azaldığı görülmüştür (136). miR-29b COL1A1, COL3A1, COL4A1, MMP2, TGF $\beta$ 1 ve TGF $\beta$ 2 dahil olmak üzere hücre dışı matrisle ilişkili genleri inhibe etmesiyle iyi bilinirken aynı zamanda anti fibrozis tedavisi için terapötik bir hedef olarak en fazla potansiyele sahiptir (137). Wang ve arkadaşları miR-29b 'nin hedef genleri arasında yer alan C3 kompleman proteini ile arasında ters



ilişki bulmuştur. Otoimmün bir hastalık olan sistemik lupus eritematozus (SLE) C3 ekspresyonu artarken miR-29b ekspresyonunun azaldığı görülmüştür (138). Bizim çalışmamızda ise CDC C(+)serilerinde miR-29b-3p'in ekspresyonunun azaldığı görülmüştür. C3 proteini klasik kompleman yolağının ilerlemesinde MAC oluşumunu başlatan C5 konvertazın oluşumunda önemlidir. CDC testinde MAC oluşumu hücre ölümünün nedenidir. miR-29b-3p ekspresyonunun azalması bize miRNA'nın klasik kompleman yolağının aktivasyonunun göstergesi olduğunu düşündürdü.

AAR'li hastalarda anti-humoral tedavi öncesinde let-7c, miR-125a-5p, miR-28-3p ve miR-99b'nin ekspresyonu alınan biyopsi örneklerinde kontrollere göre daha yüksek bulunmuştur (139). miR-125a-5p'in aşırı ekspresyonu, böbrek kanserinde hücre büyümesini, istilasını ve göçünü baskılamış ve apoptozu indüklemiştir (140). Çalışmamızda ise DSA (-) CDC C (+)'ye göre DSA (+) CDC (+) miR-125a-5p ekspresyonu artarken DSA(-) CDC C(-)'ye göre DSA (+) CDC C(-) miR-125a-5p ekspresyonu azalmıştır.

Anglicheau ve arkadaşları akut rejeksiyon biyopsilerileri referans gene göre oranladıklarında artmış miR-155 ekspresyonu gözlemlemiştir (126). Ayrıca başka bir çalışmada ise interstisyel fibroz ve tübüler atrofi (IFTA)'lı hastaların plazma örneklerinde sağlıklı gruba göre miR-21, miR-155 ve miR-142-3p ekspresyonunun arttığı görülmüştür (63).

miR-142-5p, AAR'li hastaların kanında ve biyopsi örneklerinde artmış, ancak böbrek yetmezliği olan hastaların periferik kan örneklerinde artmamıştır (75). miR-142-5p'nin bu şekilde artan ekspresyonu, kronik antikor aracılı rejeksiyon lezyonları sergileyen sıçanlardan alınan kalp nakli biyopsilerinde de gözlemlenmiştir (141). miR-142-5p, sisplatin tedavisi ile HK-2 hücrelerinde az eksprese edilmiştir. Özellikle, miR-142-5p'nin aşırı ekspresyonu, in vitro olarak akut böbrek hasarı oluşturulan hücrenin apoptozunu azaltmıştır. miR-142-5p, böbrek naklinde AAR'in erken saptanması için bir biyobelirteç olarak görülmüştür (142). Danger ve arkadaşları AAR'nin böbrek hastalarının periferik kan mononükleer hücre (PBMC)'lerinde mir-142-5p'nin ifadesinin arttığını gösterirken, Iwasaki ve ark yaptıkları çalışmada miR-142-5p'nin DSA'lı hastalarda önemli ölçüde ( $p < 0.01$ ) az ifade edildiği görülmüştür (75,143). Çalışmamızda miR-142-5p DSA(-) CDC C(+)

gruba göre DSA(+) CDC C(+) grupta fazla eksprese edildi. DSA(-) CDC C(-) gruba göre DSA(+) CDC C(-) grupta ise az eksprese edildi.

miR-145'in KBY ve evre III-V ve hemodiyaliz hastalarında artabileceğini böbrek nakli alıcılarında azalabileceği gösterilmiştir (144). Başka bir çalışmada böbrek hastalarının PBMC örneklerinde T hücre aracılı rejeksiyona sahip hastalarda miR-145 ekspresyonu artarken ve AAR sahip hastalarda azaldığı görülmüştür (145). Bizim çalışmamızda CDC C(+) serilerde AAR modelinde miR-145 ekspresyonu azaldı.

HK-2 hücrelerinde miR-155'in TGF  $\beta$ 1'i ve epitelyal mezenkimal geçiş (EMT) sürecini modüle etme yeteneğine sahip olduğu ortaya koyuldu. Hipoksi ile indüklenen miR-155'in hem HIF-1 $\alpha$  tarafından pozitif olarak düzenlenen bir profibrotik sitokin olduğu hem de TGF- $\beta$ 1'i düzenleyerek proksimal tübül hücrelerinin fibrozunu desteklediği gösterilmiştir (146). Başka bir çalışma ise epileptik hastalarda miR-155'in, inflamatuvar yanıtı arttırmak için TNF- $\alpha$  ekspresyonunu artırabileceğini göstermiştir (147). Anglicheau ve arkadaşları normal allograft biyopsi örnekleri ve akut rejeksiyonlu biyopsi örneklerinde miR-142-5p ve miR-155'in ekspresyonunun arttığını göstermiştir (126). Yapmış olduğumuz çalışmamızda CDC C(+) 'de AAR modelinde miR-155 'in oldukça yüksek ekspresyona sahip olduğu bulundu. Hem fibrotik yanıt hem de proinflamatuvar yanıtta rolü olduğu bilindiği için literatürdeki sonuçlar ile sonuçlarımız tutarlıdır.

miR-217 lösemide CD46 ve CD55 ekspresyonunun potansiyel düzenleyicisi ve komplemana karşı K562 hücre direnci düzenleyici olarak bulunmuştur. miR-200b, miR-200c ve miR-217'yi eksprese eden K562 hücreleri, kompleman bağlı sitotoksositeye karşı düşük hassasiyet gösterirken, miR-200c ve miR-217'nin inhibisyonu, hücre ölümünü arttırmıştır (89). Başka bir çalışma renal hücreli karsinomda azalan miR-217 ekspresyonunun hücre göçünü ve proliferasyonunu azalttığını göstermiştir (148). İn vitro diyabetik nefropati modeli oluşturulan bir çalışmada miR-217 ekspresyon seviyesinin yükseldiği gösterilmiştir (149). Ayrıca Han ve arkadaşları miR-217'nin, insan renal proksimal tübül hücrelerinde fibrozda TGF- $\beta$  hedefleyerek dopamin D2 reseptörü üzerinde koruyucu bir etki gösterdiğini bulmuştur (150). Bizim çalışmamızda ortama kompleman eklenmesinin miR-217

ekspresyonu üzerinde ters etki oluşturduğu ve miR-217'in ekspresyonunun azaldığı görüldü.

miR-520e ekspresyonunun küçük hücreli olmayan akciğer kanseri (NSCLC) metastatik tümör dokularında metastatik olmayanlara kıyasla fazla eksprese edildiği bulunmuştur. Ayrıca aynı çalışma TGF- $\beta$  ile indüklenen TGF $\beta$ R2'nin miR-520e yi baskıladığını da göstermiştir (151). Zhang ve ark. miR-520e'nin hepatoselüler karsinom hücrelerinde az eksprese edildiği bulmuştur (94). Başka bir çalışmada ise Heinemann ve arkadaşları renal glomerüler endotel hücreleri ile yapılmış bir çalışmada miR-520e'nin etkileri detaylı olarak araştırılmamış, ancak DSA (+) serum ile muamele edilen CDC C(+) grubun DSA (-) CDC C(+) gruba göre ekspresyonunun arttığı gösterilmiştir (71). Bu çalışma ile bizim sonuçlarımızda tutarlı olarak bulunmuştur. Literatür çalışmaları miR-520e'nin hem bir tümör baskılayıcı hem de TGF- $\beta$  sinyalini düzenleyen diğer birkaç miRNA'ya benzer bir onkogen olarak işlev görebileceğini göstermektedir.

Nöroblastoma hücrelerinde miR-885'in proliferasyonu ve hayatta kalmayı engellediğini ve p53 yolunu pozitif olarak düzenlediği görülmüştür. CASP3 geni hedef genleri arasında yer aldığı için Kaspaz 3 hedeflemesi için miR-885 önemli rol oynamaktadır (152). Çalışmamızda da DSA(+)/CDC (+) grupta DSA (-) CDC C(+) göre miR-885'in ekspresyon düzeyinde anlamlı derecede azalma olduğu bulundu.

Doku tiplene laboratuvarlarında donör lenfositleri kullanılarak DSA varlığı araştırılmaktadır. Biz burada proksimal tübüler epitel hücre hattını kullanarak bu greftteki mekanizmaları ve burada rol oynayacağını düşündüğümüz bazı mRNA ve miRNA ekspresyonlarını değerlendirdik. Tez çalışması sonucunda standart CDC testi yapıldığında elde edilecek sonuçlar önemlidir. Çünkü HLA sınıf I ekspresyonu hücreden hücreye farklılık göstermektedir. Bunun dışında farklı hücre tiplerinin fizyolojik sürecide farklı olmaktadır. Burada bulduğumuz anlamlı sonuçlar klasik CDC testinde de benzer olursa o zaman nakil öncesinde ve nakil sonrası AAR'ların takibinde biyobelirteç olarak bazı miRNA ve mRNA'lar ön plana çıkabilecektir. Ayrıca sonuçları daha iyi yorumlamak için daha fazla miRNA ve mRNA ekspresyon çalışmasına örnek sayısının artmasına bu sonuçların biyopsi sonuçları ile eş zamanlı yapılarak sonuçların değerlendirilmesi ihtiyaç vardır.

## 6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Böbrek nakli planlanan hastalarda DSA varlığı nakli engellemektedir. Aynı zamanda nakil sonrası oluşan DSA'lar allogreft sağ kalımını olumsuz etkilemektedir. Doku tiplene laboratuvarların nakil açısından son derece önemli olan HLA spesifik DSA'ları tespit edebilmek için çeşitli XM testleri yapılmakla beraber bu antikorların sinyal mekanizması hakkında bilgilerimiz sınırlıdır. Bu sinyal mekanizmalarında gen ekspresyonları epigenetik mekanizmaların buradaki rolünün anlaşılması başta böbrek transplantasyonu olmak üzere özellikle kalp, akciğer ve ince bağırsak nakillerinin immünolojik değerlendirmesine katkı sağlayacaktır.

miRNA'ların böbrek transplantasyonunda ret yanıtını tahmin etmek için potansiyel biyobelirteçler olduğu daha önce bildirilmiştir. Çalışmamızda elde ettiğimiz sonuçlara göre DSA (+) örnekte CDC C(+) koşula göre CDC C(-) ile oluşturulan koşulda miR-21, miR-29b-3p, miR-145, miR-217, miR-520e ekspresyonlarında istatistiksel anlamlı artış bulundu. Bunun yanında kompleman genlerinde de istatistiksel olarak anlamlı bir artış görüldü. Bu artışın olması miRNA'ların kompleman yolağında rollerinin olabileceğini ve biyobelirteç olarak kullanılabileceğini düşündürdü. Böylece bu miRNA'lar ve hedef genlerinin detaylı olarak araştırılması AAR'de ortaya çıkabilecek kompleman aktivasyonunun ve hatta hastalarda nakilden sonra gelişebilecek AAR'nin önüne geçmede etkili olacaktır.

Bu nedenle bu çalışma miRNA'ların böbrek greft hasarının patofizyolojisindeki rolünün aydınlatılması, hedeflenen terapötik önlemlerin geliştirilmesi için bir referans sağlayabilir.

Çalışmamızın sınırlandırıcı yönü ise DSA (+) tek serum örneği ile çalışmaktır. Çalışmaların lenfositler üzerinden yapılabilmesi, örnek sayısının artırılması, AAR'li hastaların biyopsi sonuçları in vitro AAR sonuçlarının karşılaştırılması ve DSA (+) serum havuzuyla ya da birden fazla serum örneği ile çalışma yapılması daha ayrıntılı sonuçlar sağlayabilir. Çünkü miRNA ekspresyonu epigenetik fark ve fizyolojik koşulların (yaş, cinsiyet, diğer hastalık) farklılığından değişkenlik gösterebilir. Mevcut çalışma RNA ekspresyonu seviyesinde değerlendirildi. Bu değerlendirme protein seviyesindeki çalışmayla desteklenebilir.

## 7. KAYNAKÇA

- 1) Chadban SJ, Ahn C, Axelrod DA, Foster BJ, Kasiske BL, Kher V, et.al. KDIGO Clinical Practice Guideline on the Evaluation and Management of Candidates for Kidney Transplantation. *Transplantation*. 2020 Apr;104(4S1 Suppl 1):S11-S103. DOI: 10.1097/TP.0000000000003136
- 2) Erdoğmuş, Ş., & Şengül, Ş. Immunologic risk assessment before kidney transplantation: an update. *Turk J Nephrol*, 28(3), 2019; 216-224.10.5152/turkjnephrol.2019.3513
- 3) Gueret-Wardle, A. (2019). Phenotype of HLA antibodies in patients with antibody mediated rejection.
- 4) Alegre, M. L., Lakkis, F. G., & Morelli, A. E. Antigen presentation in transplantation. *Trends in immunology*, 37(12), 2016; 831-843. doi: 10.1016/j.it.2016.09.003.
- 5) Hussain, M., Bashir, M. M., Tipu, H. N., Dawood, M., Afshan, N., & Arooj, A. Association of Panel Reactive Antibodies (PRA) with Complement Dependent Cytotoxicity (CDC) Cross-Match in Pre-Renal Transplant Recipients. *Pakistan Armed Forces Medical Journal*, 72(2), 2022; 509-12. doi.org/10.51253/pafmj.v72i2.4810
- 6) Patel, R., & Terasaki, P. I. Significance of the positive crossmatch test in kidney transplantation. *New England Journal of Medicine*, 1969; 280(14), 735-739. DOI: 10.1056/NEJM196904032801401
- 7) Bhaskaran, M. C., Heidt, S., & Muthukumar, T. Principles of virtual crossmatch testing for kidney transplantation. *Kidney International Reports*, 7(6), 2022; 1179-1188. doi.org/10.1016/j.ekir.2022.03.006
- 8) Varela, J. C., & Tomlinson, S. Complement: an overview for the clinician. *Hematology/Oncology Clinics*, 29(3), 2015; 409-427. doi: 10.1016/j.hoc.2015.02.001
- 9) Wang, Z., & Brenner, J. S. The nano-war against complement proteins. *The AAPS Journal*, 2021; 23, 1-8. doi: 10.1208/s12248-021-00630-9
- 10) Kılıçaslan Ayna, T., & Pirim, İ. Böbrek Nakillerinde Kompleman Sistemine Bakış. *Türkiye Klinikleri Journal of Internal Medicine*, 2020; 5(3). doi:10.5336/intermed.2019-72752
- 11) Janeway, C. A., Capra, J. D., Travers, P., & Walport, M. (1999). Immunobiology: the immune system in health and disease.
- 12) Matsushita, M. Ficolins: complement-activating lectins involved in innate immunity. *Journal of innate immunity*, 2(1), 2009; 24-32. doi: 10.1159/000228160
- 13) Macedo, A. C. L., & Isaac, L. Systemic lupus erythematosus and deficiencies of early components of the complement classical pathway. *Frontiers in immunology*, 2016; 7, 55. Doi:10.3389/fimmu.2016.00055
- 14) Lu, J., & Kishore, U. C1 complex: an adaptable proteolytic module for complement and non-complement functions. *Frontiers in immunology*, 2017; 8, 592. Doi: 10.3389/fimmu.2017.00592
- 15) Mathern, D. R., & Heeger, P. S. Molecules great and small: the complement system. *Clinical journal of the American Society of Nephrology: CJASN*, 2015; 10(9), 1636. doi: 10.2215/CJN.06230614

- 16) Sikorski, P. M., Commodaro, A. G., & Grigg, M. E. A protective and pathogenic role for complement during acute *Toxoplasma gondii* infection. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2021; 11, 634610. doi: 10.3389/fcimb.2021.634610
- 17) Montgomery, R. A., Loupy, A., & Segev, D. L. Antibody-mediated rejection: new approaches in prevention and management. *American Journal of Transplantation*, 2018; 18, 3-17.
- 18) Wijtvliet VP, Plaeke P, Abrams S, Hens N, Gielis EM et.al. Donor-derived cell-free DNA as a biomarker for rejection after kidney transplantation: A systematic review and meta-analysis. *Transplant International*, 2020; 33(12), 1626-1642
- 19) Callemeyn J, Lamarthée B, Koenig A, Koshy P, Thauinat O et.al. Allorecognition and the spectrum of kidney transplant rejection. *Kidney International*. 2021
- 20) Justiz Vaillant AA, Mohseni M. Chronic transplantation rejection In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2022 Jan-. PMID: 30571056
- 21) Naik RH, Shawar SH. Renal Transplantation Rejection. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2022 Jan-. PMID: 31971715
- 22) Subramaniam, K., & Sakai, T. (Eds.). (2017). *Anesthesia and perioperative care for organ transplantation* (No. 24877). Springer New York.
- 23) Stegall, M. D., Chedid, M. F., & Cornell, L. D. (2012). The role of complement in antibody-mediated rejection in kidney transplantation. *Nature reviews nephrology*, 2012; 8(11), 670-678. Doi: 10.1038/nrneph.2012.212
- 24) Peng, Q., Li, K., Sacks, S. H., & Zhou, W. The role of anaphylatoxins C3a and C5a in regulating innate and adaptive immune responses. *Inflammation & Allergy-Drug Targets (Formerly Current Drug Targets-Inflammation & Allergy)(Discontinued)*, 2009; 8(3), 236-246. DOI: 10.2174/187152809788681038
- 25) Feucht, H. E., Felber, E., Gokel, M. J., Hillebrand, G., Nattermann, U., Brockmeyer, C., ... & Albert, E. Vascular deposition of complement-split products in kidney allografts with cell-mediated rejection. *Clinical & Experimental Immunology*, 1991; 86(3), 464-470. DOI: 10.1111/j.1365-2249.1991.tb02954.x
- 26) Racusen, L. C., Colvin, R. B., Solez, K., Mihatsch, M. J., Halloran, P. F., Campbell, P. M., ... & Trpkov, K. Antibody-mediated rejection criteria—an addition to the Banff' 97 classification of renal allograft rejection. *American Journal of Transplantation*, 2003; 3(6), 708-714. Doi:10.1034/j.1600-6143.2003.00072.x
- 27) Wehner, J., Morrell, C. N., Reynolds, T., Rodriguez, E. R., & Baldwin III, W. M. Antibody and complement in transplant vasculopathy. *Circulation research*, 2007; 100(2), 191-203. doi: 10.1161/01.RES.0000255032.33661.88
- 28) Canossi, A., Iesari, S., Lai, Q., Ciavatta, S., Del Beato, T., Panarese, A., ... & Pisani, F. Longitudinal monitoring of mRNA levels of regulatory T cell biomarkers by using non-invasive strategies to predict outcome in renal transplantation. *BMC nephrology*, 2022; 23(1), 1-20 doi.org/10.1186/s12882-021-02608-3

- 29) Krajewska, M., Kościelska-Kasprzak, K., Kamińska, D., Żabińska, M., Myszkowska-Kozłowska, M., Gomulkiwicz, A. et al. Kidney transplant outcome is associated with regulatory T cell population and gene expression early after transplantation. *Journal of immunology research*, 2019 doi.org/10.1155/2019/7452019
- 30) Grafals, M., & Thurman, J. M. The role of complement in organ transplantation. *Frontiers in immunology*, 2019; 10, 2380. doi.org/10.3389/fimmu.2019.02380
- 31) Kang, Z. Y., Liu, C., Liu, W., & Li, D. H. Effect of C1q-binding donor-specific anti-HLA antibodies on the clinical outcomes of patients after renal transplantation: A systematic review and meta-analysis. *Transplant Immunology*, 2022; 72, 101566. doi.org/10.1016/j.trim.2022.101566
- 32) Mangogna, A., Agostinis, C., Bonazza, D., Belmonte, B., Zacchi, P., Zito, G., ... & Bulla, R. Is the complement protein C1q a pro-or anti-tumorigenic factor? Bioinformatics analysis involving human carcinomas. *Frontiers in immunology*, 2019; 10, 865. doi: 10.3389/fimmu.2019.00865
- 33) Cai, Y., Yang, Q., Tang, Y., Zhang, M., Liu, H., Zhang, G., ... & Chen, X. Increased complement C1q level marks active disease in human tuberculosis. *PloS one*, 2014; 9(3), e92340. doi.org/10.1371/journal.pone.0092340
- 34) Thurman, J. M., Panzer, S. E., & Le Quintrec, M. The role of complement in antibody mediated transplant rejection. *Molecular immunology*, 2019; 112, 240-246. doi.org/10.1016/j.molimm.2019.06.002
- 35) Gewin, L. S. Transforming growth factor- $\beta$  in the acute kidney injury to chronic kidney disease transition. *Nephron*, 2019; 143(3), 154-157. doi.org/10.1159/000500093
- 36) Loeffler, I., & Wolf, G. (2014). Transforming growth factor- $\beta$  and the progression of renal disease. *Nephrology Dialysis Transplantation*, 29(suppl\_1), i37-i45. DOI: 10.1093/ndt/gft267
- 37) Du, C. Transforming growth factor-beta in kidney transplantation: a double-edged sword. In *Kidney Transplantation-New Perspectives*. IntechOpen. 2011. doi: 10.5772/20450.
- 38) Koesters, R., Kaissling, B., LeHir, M., Picard, N., Theilig, F., Gebhardt, R. et al. Tubular overexpression of transforming growth factor- $\beta$ 1 induces autophagy and fibrosis but not mesenchymal transition of renal epithelial cells. *The American journal of pathology*, 2010; 177(2), 632-643 doi: 10.2353/ajpath.2010.091012
- 39) Hehlhans, T. and Pfeffer, K. 'The intriguing biology of the tumour necrosis factor/tumour necrosis factor receptor superfamily: players, rules and the games', *Immunology*. Wiley Online Library, 2005;115(1), pp. 1–20
- 40) Hajeer, A. H. and Hutchinson, I. V 'TNF- $\alpha$  gene polymorphism: Clinical and biological implications', *Microscopy research and technique*. Wiley Online Library, 2000; 50(3), pp. 216–228
- 41) Idriss HT, Naismith JH. TNF $\alpha$  and the TNF receptor superfamily: Structurefunction relationship(s). *Microsc Res Tech*. 2000;50(3):184–95
- 42) Papadimitriou, J. C., Drachenberg, C. B., Shin, M. L., & Trump, B. F. Ultrastructural studies of complement mediated cell death: a biological

- reaction model to plasma membrane injury. *Virchows Archiv*, 1994; 424, 677-685. DOI: 10.1007/BF00195784
- 43) Zhou, W., Farrar, C. A., Abe, K., Pratt, J. R., Marsh, J. E., Wang, Y., ... & Sacks, S. H. Predominant role for C5b-9 in renal ischemia/reperfusion injury. *The Journal of clinical investigation*, 105(10), 2000; 1363-1371. Doi:10.1172/JCI8621
  - 44) Zheng, X., Zhang, X., Sun, H., Feng, B., Li, M., Chen, G., ... & Min, W. P. Protection of renal ischemia injury using combination gene silencing of complement 3 and caspase 3 genes. *Transplantation*, 2006; 82(12), 1781-1786. DOI: 10.1097/01.tp.0000250769.86623.a3
  - 45) Wang, M., Gu, J., Shen, C., Tang, W., Xing, X., Zhang, Z., & Liu, X. (2021). Association of MicroRNA Biogenesis Genes Polymorphisms with Risk of Large Artery Atherosclerosis Stroke. *Cellular and Molecular Neurobiology*, 1-7
  - 46) Kalla, R., Ventham, N. T., Kennedy, N. A., Quintana, J. F., Nimmo, E. R., Buck, A. H., & Satsangi, J. MicroRNAs: new players in IBD. *Gut*, 2015; 64(3), 504-513
  - 47) Alfaro R, Legaz I, Jimenez-Coll V, El kaaoui El band J, Martínez-Banaclocha H, Galián JA, et al. MicroRNA Expression Changes in Kidney Transplant: Diagnostic Efficacy of miR-150-5p as Potential Rejection Biomarker, Pilot Study. *Journal of Clinical Medicine*. 2021; 10(13):2748. doi.org/10.3390/jcm10132748
  - 48) Khalid, U., Newbury, L.J., Simpson, K. *et al.* A urinary microRNA panel that is an early predictive biomarker of delayed graft function following kidney transplantation. 2019; *Sci Rep* 9, 3584. doi.org/10.1038/s41598-019-38642-3
  - 49) Marí-Alexandre J, Sánchez-Izquierdo D, Gilabert-Estellés J, Barceló-Molina M, Braza-Boïls A, Sandoval J. miRNAs Regulation and Its Role as Biomarkers in Endometriosis. *International Journal of Molecular Sciences*. 2016; 17(1):93. doi.org/10.3390/ijms17010093
  - 50) Mario Acunzo , Carlo M. Croce, MicroRNA in Cancer and Cachexia—A Mini-Review, *The Journal of Infectious Diseases*, Volume 212, Issue suppl\_1, July 2015, Pages S74–S77, <https://doi.org/10.1093/infdis/jiv197>
  - 51) Treiber, T., Treiber, N. & Meister, G. Regulation of microRNA biogenesis and its crosstalk with other cellular pathways. *Nat Rev Mol Cell Biol* 20, 5–20 (2019). <https://doi.org/10.1038/s41580-018-0059-1>
  - 52) Abdelfattah, A.M., Park, C., Choi, M.Y. Update on non-canonical microRNAs. *Biomolecular Concepts*, 2014; 5(4):275-87.
  - 53) Cerqueira DM, Tayeb M, Ho J. MicroRNAs in kidney development and disease. *JCI Insight*. 2022 May 9;7(9):e158277. doi: 10.1172/jci.insight.158277
  - 54) Ha, M., & Kim, V. N. Regulation of microRNA biogenesis. *Nature reviews Molecular cell biology*, 2014; 15(8), 509-524. doi.org/10.1038/nrm3838
  - 55) Yao, S. MicroRNA biogenesis and their functions in regulating stem cell potency and differentiation. *Biol Proced Online* 18, 8 (2016). doi.org/10.1186/s12575-016-0037-y
  - 56) Nadiminty, N., Tummala, R., Lou, W., Zhu, Y., Shi, X. B., Zou, J. X., ... & Gao, A. C. MicroRNA let-7c is downregulated in prostate cancer and



- suppresses prostate cancer growth. *PloS one*, 2012; 7(3), e32832. doi:10.1371/journal.pone.0032832
- 57) Su, J. L., Chen, P. S., Johansson, G., & Kuo, M. L. Function and regulation of let-7 family microRNAs. *Microna*, 2012; 1(1), 34-39. doi: 10.2174/2211536611201010034
- 58) Hertel, J., Bartschat, S., Wintsche, A., Otto, C., of the Bioinformatics Computer Lab, T. S., & Stadler, P. F. Evolution of the let-7 microRNA family. *RNA biology*, 2012; 9(3), 231-241. doi.org/10.4161/rna.18974
- 59) Brennan, E. P., Nolan, K. A., Börgeson, E., Gough, O. S., McEvoy, C. M., Docherty, N. G., ... & GENIE Consortium. Lipoxins attenuate renal fibrosis by inducing let-7c and suppressing TGF $\beta$ R1. *Journal of the American Society of Nephrology: JASN*, 2013; 24(4), 627. doi: 10.1681/ASN.2012060550
- 60) Çınar, İ., & Dursun, H. G. miRNA Biyogenezi ve Kanser Patogenezindeki Fonksiyonu. *Sakarya Tıp Dergisi*, 2016; 6(2). doi: 10.5505/sakaryamedj.2016.93764
- 61) Panizo, S., Martínez-Arias, L., Alonso-Montes, C., Cannata, P., Martín-Carro, B., Fernández-Martín, J. L., ... & Cannata-Andía, J. B. Fibrosis in chronic kidney disease: pathogenesis and consequences. *International Journal of Molecular Sciences*, 2021; 22(1), 408. doi.org/10.3390/ijms22010408
- 62) Franco-Acevedo, A., Melo, Z., & Echavarría, R. Diagnostic, prognostic, and therapeutic value of non-coding RNA expression profiles in renal transplantation. *Diagnostics*, 2020; 10(2), 60. doi.org/10.3390/diagnostics10020060
- 63) Zununi Vahed, S., Poursadegh Zonouzi, A., Ghanbarian, H., Ghojzadeh, M., Samadi, N., Omidi, Y., & Ardalan, M.. Differential expression of circulating miR-21, miR-142-3p and miR-155 in renal transplant recipients with impaired graft function. *International urology and nephrology*, 2017; 49, 1681-1689. doi.org/10.1007/s11255-017-1602-2
- 64) Kölling, M., Kaucsar, T., Schauerte, C., Hübner, A., Dettling, A., Park, J. K., ... & Lorenzen, J. M.. Therapeutic miR-21 silencing ameliorates diabetic kidney disease in mice. *Molecular Therapy*, 2017; 25(1), 165-180. doi.org/10.1016/j.ymthe.2016.08.001
- 65) Girardot, Michael, Christian Pecquet, Ilyas Chachoua, Joanne Van Hees, Sylvain Guibert, Augustin Ferrant, Laurent Knoops et al. "Persistent STAT5 activation in myeloid neoplasms recruits p53 into gene regulation." *Oncogene* 34, no. 10. 2015; 1323-1332.
- 66) Schneider, C., Setty, M., Holmes, A. B., Maute, R. L., Leslie, C. S., Mussolin, L. et al. MicroRNA 28 controls cell proliferation and is down-regulated in B-cell lymphomas. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2014; 111(22), 8185-8190. doi.org/10.1073/pnas.1322466111
- 67) Yan, B., Guo, Q., Fu, F. J., Wang, Z., Yin, Z., Wei, Y. B et al. The role of miR-29b in cancer: regulation, function, and signaling. *OncoTargets and therapy*, 2015; 539-548. doi.org/10.2147/OTT.S75899
- 68) Wang B, Komers R, Carew R, Winbanks CE, Xu B, Herman-Edelstein M. et al. Suppression of microRNA-29 expression by TGF- $\beta$ 1 promotes collagen expression and renal fibrosis. *J Am Soc Nephrol* 2012; 23: 252–265

- 69) Kriegel AJ, Liu Y, Fang Y, Ding X, Liang M. The identification of miRNA biomarkers of chronic kidney disease and development of minimally-invasive methods of molecular detection. *Physiol Genomics* 2012; 44: 237–244.
- 70) Xu, Y., Zhu, J., Lei, Z., Wan, L., Zhu, X., Ye, F. et al. Expression and functional role of miR-29b in renal cell carcinoma. 2015; 8(11): 14161–14170
- 71) Heinemann, F. M., Jindra, P. T., Bockmeyer, C. L., Zeuschner, P., Wittig, J., Höflich, H., ... & Becker, J. U. Glomerulocapillary miRNA response to HLA-class I antibody in vitro and in vivo. *Scientific reports*, 2017; 7(1), 14554. DOI:10.1038/s41598-017-14674-5
- 72) Liang, Z., Pan, Q., Zhang, Z., Huang, C., Yan, Z., Zhang, Y., & Li, J. MicroRNA-125a-5p controls the proliferation, apoptosis, migration and PTEN/MEK1/2/ERK1/2 signaling pathway in MCF-7 breast cancer cells. *Molecular Medicine Reports*, 20(5), 2019; 4507-4514. doi: 10.3892/mmr.2019.10704
- 73) Lu, Y., Ji, N., Wei, W., Sun, W., Gong, X., & Wang, X. (2017). MiR-142 modulates human pancreatic cancer proliferation and invasion by targeting hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1 $\alpha$ ) in the tumor microenvironments. *Biology open*, 6(2), 252-259. doi.org/10.1242/bio.021774
- 74) Pedersen, I., & David, M. MicroRNAs in the immune response. *Cytokine*, 2008;43(3), 391-394. doi: 10.1016/j.cyto.2008.07.016
- 75) Danger, R., Paul, C., Giral, M., Lavault, A., Foucher, Y., Degauque, N., .....& Brouard, S. (2013). Expression of miR-142-5p in peripheral blood mononuclear cells from renal transplant patients with chronic antibody-mediated rejection. *PloS one*, 8(4), e60702. doi: 10.1371/journal.pone.0060702
- 76) Gholaminejad, A., Abdul Tehrani, H., & Gholami Fesharaki, M. Identification of candidate microRNA biomarkers in renal fibrosis: a meta-analysis of profiling studies. *Biomarkers*, 2018; 23(8), 713-724. Doi.org/10.1080/1354750X.2018.1488275
- 77) Michael MZ, SM OC, van Hoist Pellekaan NG, Young GP, James RJ. Reduced accumulation of specific microRNAs in colorectal neoplasia. *Mol Cancer Res*. 2003;1:882–891
- 78) Jasík, M. Genetické Modifikace U Nekódujících Rna Pomocí Metody Crispr/Cas9 Bakalářská práce Matěj Jasík. doi.org/10.1073/pnas.080804210
- 79) Anonim, 2020. Web Sites: <http://mirnamap.mbc.nctu.edu.tw>, Erişim Tarihi: 10.01.2021.
- 80) Chen, L., Fukuda, N., Otsuki, T., Tanaka, S., Nakamura, Y., Kobayashi, H. et al. Increased complement 3 with suppression of miR-145 induces the synthetic phenotype in vascular smooth muscle cells from spontaneously hypertensive rats. *Journal of the American Heart Association*, 2019; 8(10), e012327. doi: 10.1161/JAHA.119.012327
- 81) Sachdeva, M., Zhu, S., Wu, F., Wu, H., Walia, V., Kumar, S. Et al. p53 represses c-Myc through induction of the tumor suppressor miR-145. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009; 106, 3207-12
- 82) Sachdeva M, Mo YY. miR-145-mediated suppression of cell growth, invasion and metastasis. *Am J Transl Res*. 2010 Mar 25;2(2):170-80

- 83) Thai, T. H., Calado, D. P., Casola, S., Ansel, K. M., Xiao, C., Xue, Y., ... & Rajewsky, K. Regulation of the germinal center response by microRNA-155. *Science*, 2007; 316(5824), 604-608. DOI: 10.1126/science.1141229
- 84) Lindsay, M. A. microRNAs and the immune response. *Trends in immunology*, 2008; 29(7), 343-351. doi:10.1016/j.it.2008.04.004
- 85) Bruning, U., Cerone, L., Neufeld, Z., Fitzpatrick, S. F., Cheong, A., Scholz, C. C., ... & Taylor, C. T. MicroRNA-155 promotes resolution of hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$  activity during prolonged hypoxia. *Molecular and cellular biology*, 2011; 31(19), 4087-4096. DOI: 10.1128/MCB.01276-10
- 86) Wan, G., Xie, W., Liu, Z., Xu, W., Lao, Y., Huang, N., ... & Zhang, Y. Hypoxia-induced miR155 is a potent autophagy inducer by targeting multiple players in the MTOR pathway. *Autophagy*, 2014; 10(1), 70-79. doi.org/10.4161/auto.26534
- 87) Faraoni, I., Antonetti, F. R., Cardone, J., & Bonmassar, E. miR-155 gene: a typical multifunctional microRNA. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*, 2009; 1792(6), 497-505. doi.org/10.1016/j.bbadis.2009.02.013
- 88) Yılmaz N. Kolorektal Kanser Hastalarında APC ve K-Ras Genleri İle İlişkili Mirna Ekspresyonlarının İncelenmesi. Doktora Tezi. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü. 2017
- 89) Hillman, Y., Mazkereth, N., Farberov, L., Shomron, N., & Fishelson, Z. Regulation of complement-dependent cytotoxicity by microRNAs miR-200b, miR-200c, and miR-217. *The Journal of Immunology*, 2016; 196(12), 5156-5165. doi: 10.4049/jimmunol.1502701
- 90) [https://www.mirbase.org/cgi-bin/mirna\\_entry.pl?acc=hsa-mir-520e](https://www.mirbase.org/cgi-bin/mirna_entry.pl?acc=hsa-mir-520e)
- 91) <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/574461>
- 92) Yi, M., Li, M., Long, X., Ye, J., Cui, J., Wei, W. et al. miR-520e regulates cell proliferation, apoptosis and migration in breast cancer. *Oncology Letters*, 2016; 12, 3543-3548. doi.org/10.3892/ol.2016.5085
- 93) Wenjing Cui, Yiwen Zhang, Nan Hu, Changliang Shan, Shuai Zhang, Weiying Zhang, Xiaodong Zhang & Lihong Ye. miRNA-520b and miR-520e sensitize breast cancer cells to complement attack via directly targeting 3'UTR of CD46, *Cancer Biology & Therapy*, 2010; 10:3, 232-241, doi: 10.4161/cbt.10.3.12277
- 94) Zhang, S., Shan, C., Kong, G. et al. MicroRNA-520e suppresses growth of hepatoma cells by targeting the NF- $\kappa$ B-inducing kinase (NIK). *Oncogene* 2012; 31, 3607-3620. doi.org/10.1038/onc.2011.523
- 95) <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=MIR885>
- 96) Lixin, S., Wei, S., Haibin, S., Qingfu, L., & Tiemin, P. (2020). miR-885-5p inhibits proliferation and metastasis by targeting IGF2BP1 and GALNT3 in human intrahepatic cholangiocarcinoma. *Molecular Carcinogenesis*, 59(12), 1371-1381. doi:10.1002/mc.23262
- 97) Ryan M. J., Johnson G., Kirk J., Fuerstenberg S. M., Zager R. A., Torok-Storb B. "HK-2: An immortalized proximal tubule epithelial cell line from normal adult human kidney", *Kidney International*, 1994; 45, 48-57
- 98) Kuang, L., Lu, A., & Yao, S. CircTLK1 alleviates oxygen-glucose deprivation/reperfusion induced apoptosis in HK-2 cells through miR-136-5p/Bcl2 signal axis. *Renal Failure*, 2023; 45(1), 2236219.

- 99) Özkızılcık Koçyiğt. A. Böbrek Naklinden Sonra İmmün Moleküllerin Akut Dönemdeki Rollerini. Doktora Tezi, Katip Çelebi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İzmir 2022.
- 100) Negera, E., Walker, S. L., Lema, T., Aseffa, A., Lockwood, D. N., & Dockrell, H. M. Complement C1q expression in Erythema nodosum leprosum. *PLoS neglected tropical diseases*, 2018; 12(3), e0006321. doi.org/10.1371/journal.pntd.0006321
- 101) Xu, Y., He, Q., Lu, Y. *et al.* MicroRNA-218-5p inhibits cell growth and metastasis in cervical cancer via LYN/NF- $\kappa$ B signaling pathway. *Cancer Cell Int* 2018; 18, 198 2018. doi.org/10.1186/s12935-018-0673-1
- 102) Fu, X., Mao, X., Wang, Y., Ding, X., & Li, Y. Let-7c-5p inhibits cell proliferation and induces cell apoptosis by targeting ERCC6 in breast cancer. *Oncology Reports*, 2017; 38(3), 1851-1856. doi.org/10.3892/or.2017.5839
- 103) Zhang, J., Xing, Q., Zhou, X., Li, J., Li, Y., Zhang, L. *Et al.* Circulating miRNA-21 is a promising biomarker for heart failure. *Molecular Medicine Reports*, 2017; 16, 7766-7774. https://doi.org/10.3892/mmr.2017.7575
- 104) Lv, Y., Yang, H., Ma, X., & Wu, G. Strand-specific miR-28-3p and miR-28-5p have differential effects on nasopharyngeal cancer cells proliferation, apoptosis, migration and invasion. *Cancer cell international*, 2019; 19(1), 1-12. Doi:10.1186/s12935-019-0915-x
- 105) Gu, L., Li, Q., Liu, H., Lu, X., & Zhu, M. (2020). Long noncoding RNA TUG1 promotes autophagy-associated paclitaxel resistance by sponging miR-29b-3p in ovarian cancer cells. *OncoTargets and therapy*, 2007-2019. doi: 10.2147/OTT.S240434
- 106) Jiang, L. H., Hou, J. C., Zhong, S. L., Zhou, S. Y., Zhu, L. P., Li, J., ... & Tang, J. H. Circular RNA hsa\_circ\_0052112 promotes cell migration and invasion by acting as sponge for miR-125a-5p in breast cancer. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2018; 107, 1342-1353. doi.org/10.1016/j.biopha.2018.08.030
- 107) Li, H., Fan, D., Wang, W., Zhang, X., Song, L., & Huang, Y. MiR-142-5p serves as a tumor suppressor in retinoblastoma cells by regulating MYCN. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2021; 574, 20-26. doi.org/10.1016/j.bbrc.2021.07.099
- 108) Hui, Y., & Yin, Y. MicroRNA-145 attenuates high glucose-induced oxidative stress and inflammation in retinal endothelial cells through regulating TLR4/NF- $\kappa$ B signaling. *Life sciences*, 2018; 207, 212-218. doi.org/10.1016/j.lfs.2018.06.005
- 109) Chen, X., Zhang, X. B., Li, D. J., Qi, G. N., Dai, Y. Q., Gu, J. *Et al.* miR-155 facilitates calcium oxalate crystal-induced HK-2 cell injury via targeting PI3K associated autophagy. *Experimental and Molecular Pathology*, 2020; 115, 104450. doi.org/10.1016/j.yexmp.2020.104450
- 110) Zhou, C., Chen, Y., He, X., Zheng, Z., & Xue, D. Functional implication of exosomal miR-217 and miR-23b-3p in the progression of prostate cancer. *OncoTargets and therapy*, 2020; 11595-11606. Doi:10.2147/OTT.S272869

- 111) Guo, H. M., & Liu, Z. P. Up-regulation of circRNA\_0068481 promotes right ventricular hypertrophy in PAH patients via regulating miR-646/miR-570/miR-885. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 2021; 25(8), 3735-3743. doi.org/10.1111/jcmm.16164
- 112) Du C. Transforming Growth Factor-Beta in Kidney Transplantation: A Double-Edged Sword [Internet]. In: *Kidney Transplantation- New Perspectives*. InTech, 2011.
- 113) Wei, J., Xu, Z., & Yan, X. The role of the macrophage-to-myofibroblast transition in renal fibrosis. *Frontiers in Immunology*, 2022; 13, 93437. Doi: 10.1038/nrneph.2016.48
- 114) Priscilla, C., Parameswaran, S., Srinivas, N., & Ganesh, R. N. Assessment of Cytokines as Potential Biomarkers to Predict Allograft Rejection in Kidney Transplant Recipients. *Indian Journal of Science and Technology*, 2023; 16(7), 509-515. doi.org/10.17485/IJST/v16i7.2302
- 115) Laskowski, J., Renner, B., Le Quintrec, M., Panzer, S., Hannan, J. P., Ljubanovic, D., ... & Thurman, J. M. Distinct roles for the complement regulators factor H and Crry in protection of the kidney from injury. *Kidney international*, 2016; 90(1), 109-122. doi:10.1016/j.kint.2016.02.036
- 116) Bulla R, Tripodo C, Rami D, Ling GS, Agostinis C, Guarnotta C, Zorzet S, Durigutto P, Botto M, Tedesco F. C1q acts in the tumour microenvironment as a cancer-promoting factor independently of complement activation. *Nat Commun*. 2016 Feb 1;7:10346. doi: 10.1038/ncomms10346.
- 117) Vonbrunn, E., Ries, T., Söllner, S., Müller-Deile, J., Büttner-Herold, M., Amann, K., & Daniel, C. Multiplex gene analysis reveals T-cell and antibody-mediated rejection-specific upregulation of complement in renal transplants. *Scientific Reports*, 2021; 11(1), 15464. doi: 10.1038/s41598-021-94954-3
- 118) Van Schaarenburg, R. A., Suurmond, J., Habets, K. L., Brouwer, M. C., Wouters, D., Kurreeman, F. A., ... & Trouw, L. A. The production and secretion of complement component C1q by human mast cells. *Molecular immunology*, 2016; 78, 164-170. doi:10.1016/j.molimm.2016.09.001
- 119) Hong, Q., Sze, C. I., Lin, S. R., Lee, M. H., He, R. Y., Schultz, L., ... & Chang, N. S. Complement C1q activates tumor suppressor WWOX to induce apoptosis in prostate cancer cells. *PloS one*, 2009; 4(6), e5755. doi:10.1371/journal.pone.0005755
- 120) Yeh, H. Applications of Transcriptomics in the Research of Antibody-Mediated Rejection in Kidney Transplantation: Progress and Perspectives. *Organogenesis*, 2022; 18(1), 2131357. doi: 10.1080/15476278.2022.2131357
- 121) Botto, M., & Walport, M. J. (2002). C1q, autoimmunity and apoptosis. *Immunobiology*, 2002; 205(4-5), 395-406. doi.org/10.1078/0171-2985-00141
- 122) Daemen, M. A., van't Veer, C., Denecker, G., Heemskerk, V. H., Wolfs, T. G., Clauss, M., ... & Buurman, W. A. (1999). Inhibition of apoptosis induced by ischemia-reperfusion prevents inflammation. *The Journal of clinical investigation*, 104(5), 541-549. Doi: 10.1172/JCI6974

- 123) Nauta, A. J., Daha, M. R., Tijmsa, O., van de Water, B., Tedesco, F., & Roos, A. The membrane attack complex of complement induces caspase activation and apoptosis. *European journal of immunology*, 2002; 32(3), 783-792. doi.org/10.1002/1521-4141(200203)32:3<783::AID-IMMU783>3.0.CO;2-Q
- 124) Boštjančič, E., Večerić-Haler, Ž., & Kojc, N. The Role of Immune-Related miRNAs in the Pathology of Kidney Transplantation. *Biomolecules*, 2021; 11(8), 1198. doi.org/10.3390/biom11081198
- 125) Wang, Z., Zhou, C., Sun, Y., Chen, Y., & Xue, D. Let-7c-5p is involved in chronic kidney disease by targeting TGF- $\beta$  signaling. *BioMed Research International*, 2020. doi: 10.1155/2020/6960941
- 126) Anglicheau, D., Sharma, V. K., Ding, R., Hummel, A., Snopkowski, C., Dadhania, D., ... & Suthanthiran, M. MicroRNA expression profiles predictive of human renal allograft status. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2009; 106(13), 5330-5335. doi: 10.1073/pnas.0813121106
- 127) Zarjou, A., Yang, S., Abraham, E., Agarwal, A., & Liu, G. Identification of a microRNA signature in renal fibrosis: role of miR-21. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, 2011; 301(4), F793-F801. doi.org/10.1152/ajprenal.00273.2011
- 128) Zang, J., Maxwell, A. P., Simpson, D. A., & McKay, G. J. Differential expression of urinary exosomal microRNAs miR-21-5p and miR-30b-5p in individuals with diabetic kidney disease. *Scientific reports*, 2019; 9(1), 10900. doi.org/10.1038/s41598-019-47504-x
- 129) Ben-Dov, I. Z., Muthukumar, T., Morozov, P., Mueller, F. B., Tuschl, T., & Suthanthiran, M. MicroRNA sequence profiles of human kidney allografts with or without tubulointerstitial fibrosis. *Transplantation*, 2012; 94(11). doi: 10.1097/TP.0b013e3182751efd
- 130) Glowacki, F., Savary, G., Gnemmi, V., Buob, D., Van der Hauwaert, C., Lo-Guidice, J. M., & Cauffiez, C. Increased circulating miR-21 levels are associated with kidney fibrosis. *PloS one*, 2013;8(2), e58014. doi.org/10.1371/journal.pone.0058014
- 131) Yuan, J., Chen, H., Ge, D., Xu, Y., Xu, H., Yang, Y. et al. Mir-21 promotes cardiac fibrosis after myocardial infarction via targeting Smad7. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 2017;42(6), 2207-2219. doi.org/10.1159/000479995
- 132) Chen, Y. J., Hsu, C. T., Tsai, S. F., & Chen, C. H. (2022). Association between Circulating MicroRNAs (miR-21-5p, miR-20a-5p, miR-29b-3p, miR-126-3p and miR-101-3p) and Chronic Allograft Dysfunction in Renal Transplant Recipients. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(20), 12253. doi.org/10.3390/ijms232012253
- 133) Godwin, J. G., Ge, X., Stephan, K., Jurisch, A., Tullius, S. G., & Iacomini, J. Identification of a microRNA signature of renal ischemia reperfusion injury. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2010; 107(32), 14339-14344. Do: 10.1073/pnas.0912701107
- 134) Wang, C., Wu, C., Yang, Q., Ding, M., Zhong, J., Zhang, C. Y., & Zhang, C. miR-28-5p acts as a tumor suppressor in renal cell carcinoma for

- multiple antitumor effects by targeting RAP1B. *Oncotarget*, 2016;7(45), 73888. doi: 10.18632/oncotarget.12516
- 135) Zhu, R. Y., Zhang, D., Zou, H. D., Zuo, X. S., Zhou, Q. S., & Huang, H. MiR-28 inhibits cardiomyocyte survival through suppressing PDK1/Akt/mTOR signaling. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Animal*, 2016; 52, 1020-1025. Doi: 10.1007/s11626-016-0065-6
- 136) Wang, B., Komers, R., Carew, R., Winbanks, C. E., Xu, B., Herman-Edelstein, M. Et al. Suppression of microRNA-29 expression by TGF- $\beta$ 1 promotes collagen expression and renal fibrosis. *Journal of the American Society of Nephrology: JASN*, 2012; 23(2), 252. doi: 10.1681/ASN.2011010055
- 137) Srivastava, S. P., Hedayat, A. F., Kanasaki, K., & Goodwin, J. E. microRNA crosstalk influences epithelial-to-mesenchymal, endothelial-to-mesenchymal, and macrophage-to-mesenchymal transitions in the kidney. *Frontiers in pharmacology*, 2019; 10, 904. doi.org/10.3389/fphar.2019.00904
- 138) Wang, X., Zhang, C., Wu, Z., Chen, Y., & Shi, W. CircIBTK inhibits DNA demethylation and activation of AKT signaling pathway via miR-29b in peripheral blood mononuclear cells in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Research & Therapy*, 2018; 20, 1-10. doi.org/10.1186/s13075-018-1618-8
- 139) Abstract# A370 Glomerular miRNA Expression Profiling as a Diagnostic and Predictive Tool in Chronic Antibody-Mediated Renal Allograft Rejection
- 140) Yang, L., Wang, L., Wu, J., & Wang, Y. (2023). Circ\_0000069 contributes to the growth, metastasis and glutamine metabolism in renal cell carcinoma (RCC) via regulating miR-125a-5p-dependent SLC1A5 expression. *Transplant Immunology*, 2023; 77, 101764. doi.org/10.1016/j.trim.2022.101764
- 141) Ballet, C., K. Renaudin, N. Degauque, H. L. Mai, F. Boeffard, D. Lair, L. Berthelot et al. "Indirect CD4+ TH1 response, antidonor antibodies and diffuse C4d graft deposits in long-term recipients conditioned by donor antigens priming." *American Journal of Transplantation* 9, no. 4 2009; 697-708
- 142) Chen, G., Xue, H., Zhang, X., Ding, D., & Zhang, S. p53 inhibition attenuates cisplatin-induced acute kidney injury through microRNA-142-5p regulating SIRT7/NF- $\kappa$ B. *Renal Failure*, 2022;44(1), 368-380. doi.org/10.1080/0886022X.2022.2039195
- 143) Iwasaki, K., Yamamoto, T., Inanaga, Y., Hiramitsu, T., Miwa, Y., Murotani, K., ... & Kobayashi, T. MiR-142-5p and miR-486-5p as biomarkers for early detection of chronic antibody-mediated rejection in kidney transplantation. *Biomarkers*, 2017; 22(1), 45-54. doi.org/10.1080/1354750X.2016.1204000
- 144) Franczyk, B., Gluba-Brzózka, A., Olszewski, R., Parolczyk, M., Rysz-Górzyńska, M., & Rysz, J. miRNA biomarkers in renal disease. *International Urology and Nephrology*, 2022; 54(3), 575-588. doi.org/10.1007/s11255-021-02922-7
- 145) Matz, M., Heinrich, F., Lorkowski, C., Wu, K., Klotsche, J., Zhang, Q. et al. MicroRNA regulation in blood cells of renal transplanted patients with

- interstitial fibrosis/tubular atrophy and antibody-mediated rejection. *PLoS One*, 2018; 13(8), e0201925. doi.org/10.1371/journal.pone.0201925
- 146) Xie, S., Chen, H., Li, F., Wang, S., & Guo, J. Hypoxia-induced microRNA-155 promotes fibrosis in proximal tubule cells. *Molecular medicine reports*, 2015; 11(6), 4555-4560. doi.org/10.3892/mmr.2015.3327
- 147) Ashhab, M. U., Omran, A., Kong, H., Gan, N., He, F., Peng, J., & Yin, F. Expressions of tumor necrosis factor alpha and microRNA-155 in immature rat model of status epilepticus and children with mesial temporal lobe epilepsy. *Journal of Molecular Neuroscience*, 2013; 51, 950-958. doi.org/10.1007/s12031-013-0013-9
- 148) Li, H., Zhao, J., Zhang, J. W., Huang, Q. Y., Huang, J. Z., Chi, L. S., ... & Ma, W. M. MicroRNA-217, down-regulated in clear cell renal cell carcinoma and associated with lower survival, suppresses cell proliferation and migration. *Neoplasma*, 2013; 60(5), 511-515. DOI: 10.4149/neo\_2013\_066
- 149) Sun, J., Li, Z. P., Zhang, R. Q., & Zhang, H. M. Repression of miR-217 protects against high glucose-induced podocyte injury and insulin resistance by restoring PTEN-mediated autophagy pathway. *Biochemical and biophysical research communications*, 2017; 483(1), 318-324. doi.org/10.1016/j.bbrc.2016.12.145
- 150) Han, F., Konkalmatt, P., Chen, J., Gildea, J., Felder, R. A., Jose, P. A. et al. MiR-217 mediates the protective effects of the dopamine D2 receptor on fibrosis in human renal proximal tubule cells. *Hypertension*, 2015; 65(5), 1118-1125. doi: 10.1161/hypertensionaha.114.05096
- 151) Küçüksayan, H., Akgun, S., Ozes, O. N., Alikanoglu, A. S., Yildiz, M., Dal, E., & Akça, H. TGF- $\beta$ -SMAD-miR-520e axis regulates NSCLC metastasis through a TGFBR2-mediated negative-feedback loop. 2019. doi.org/10.1093/carcin/bgy166
- 152) Afanasyeva, E. A., Mestdagh, P., Kumps, C., Vandesompele, J., Ehemann, V., Theissen, J., ... & Westermann, F. MicroRNA miR-885-5p targets CDK2 and MCM5, activates p53 and inhibits proliferation and survival. *Cell Death & Differentiation*, 2011; 18(6), 974-984. doi.org/10.1038/cdd.2010.164



## **EKLER**







## ÖZGEÇMİŞ