

Tüberkülozda miRNA Karakterizasyonu

Dr. Cengiz ÇAVUŞOĞLU
Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi
Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Bornova-İZMİR

Tüberküloz (TB)



Robert Koch



Rudolf Virchow



24 Mart 1882 akşamı, Berlin Fizyoloji Derneği
Die Aetiologie der Tuberkulose

TB patogenezi



TB patogenezi

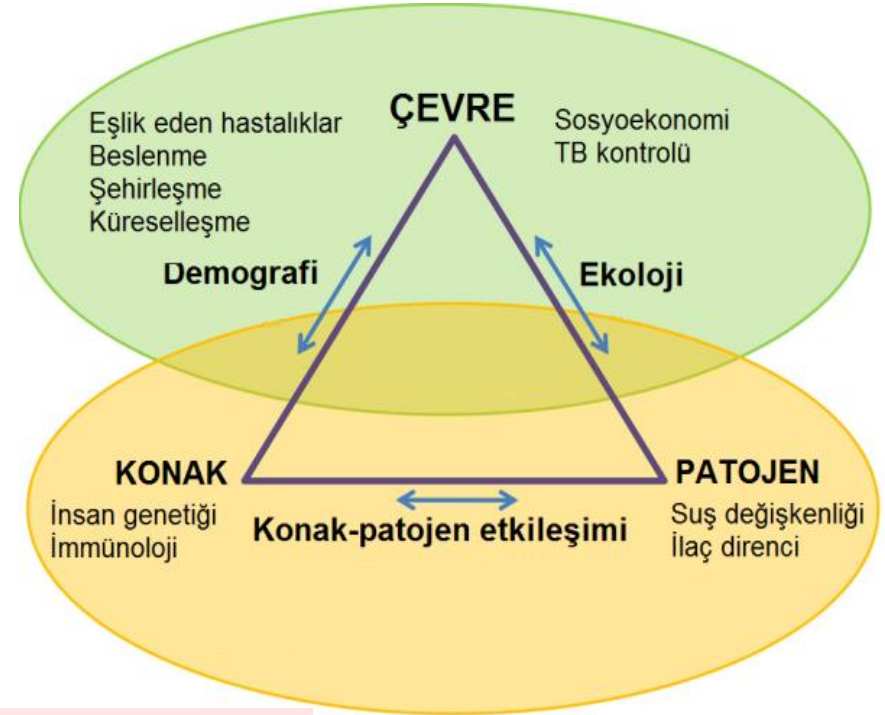
- **Bakteri**

- Genotipi, ilaç direnci

- **Konak**

- HLA tipi
- Etnik kökeni
- Mikrobiyomu
- Gen polimorfizmleri
- İnflamasyonla ilişkili mRNA ekspresyonları
- İnflamasyonla ilişkili miRNA ekspresyonları
- Çevresel ve demografik özellikleri
- Bağışıklık durumu

- ile enfeksiyonun şekli ve klinik seyri arasında bir ilişki var mı?

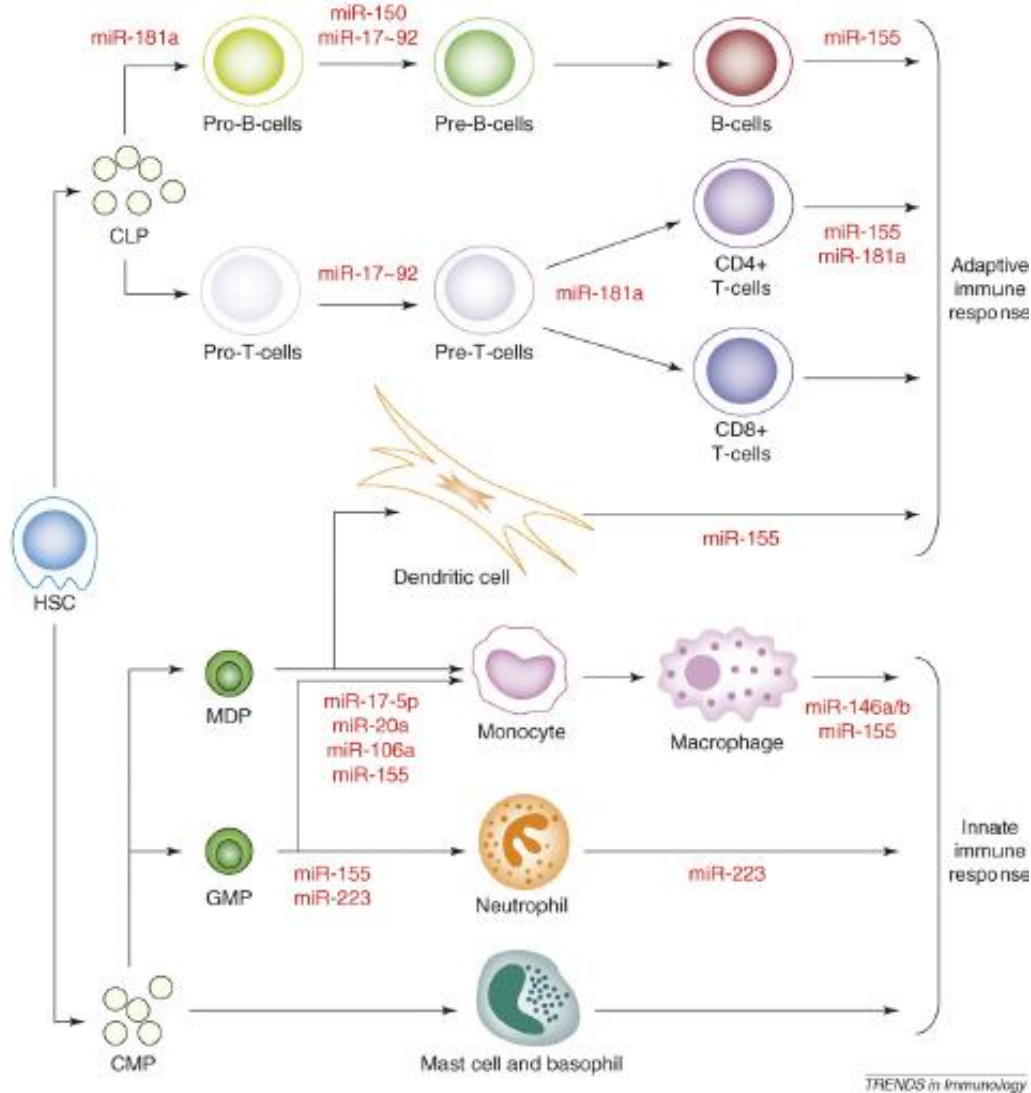


Konağın inflamasyonla ilişkili miRNA ve mRNA ekspresyonları ile bakterinin genotipik özelliklerinin tüberküloz enfeksiyonu ve aktif tüberkülozun klinik seyri üzerine etkilerinin araştırılması **(115S333)**

- TB enfeksiyonunun seyri, klinik formları ve tedaviye yanıtı ile konaktaki belirli miRNA ve sitokin ekspresyonları arasındaki ilişkinin araştırılması
- Konağın inflamasyonla ilişkili miRNA ve mRNA ekspresyonları ile bakterinin genotipleri arasındaki ilişkinin araştırılması

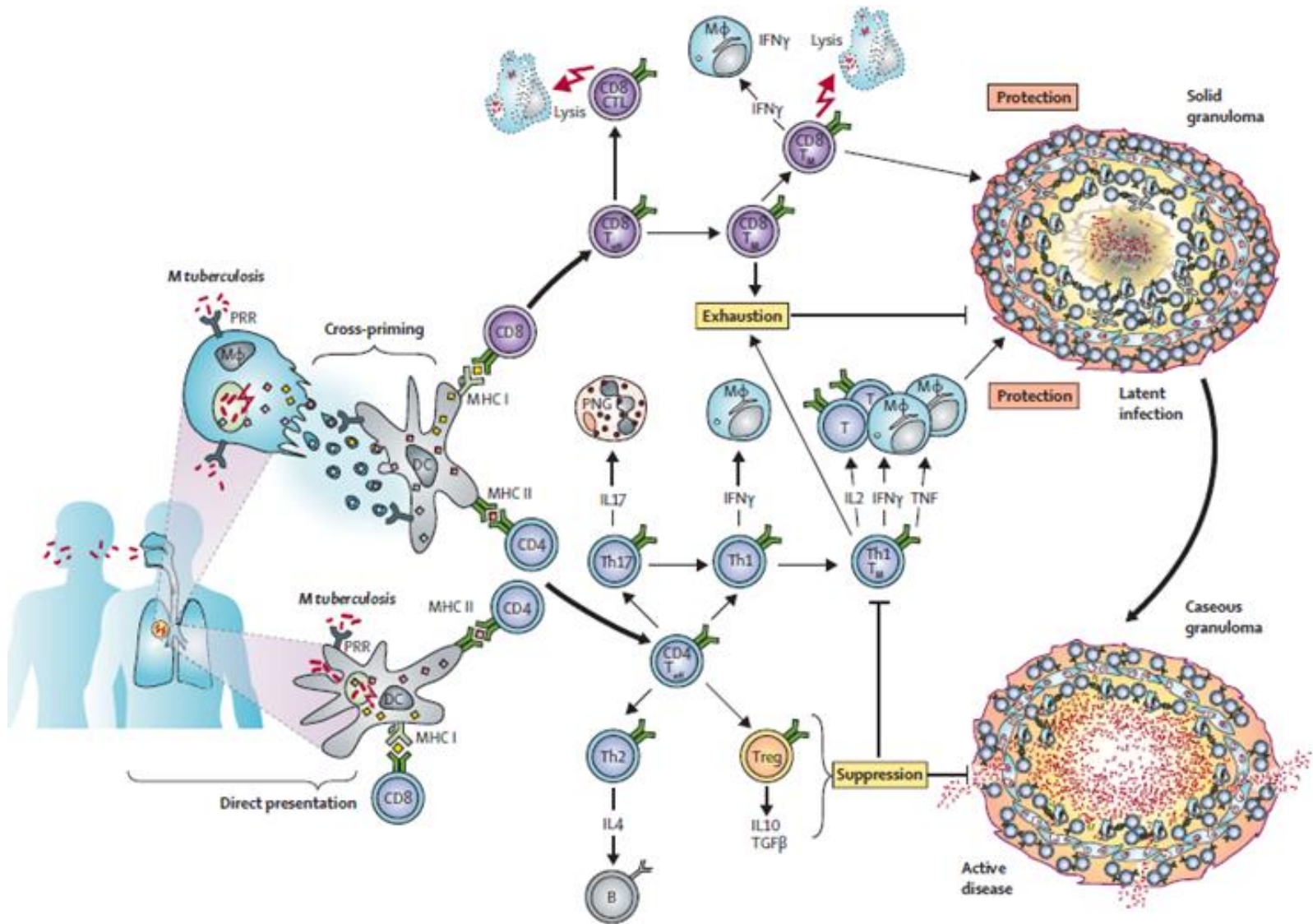
Bağıışıklık yanıtı ve miRNA

MicroRNA'lar post-transkripsiyonel gen ekspresyonuna katılarak doğal ve kazanılmış bağışıklık yanıtının düzenlenmesinde etkili olmaktadır.



miR-155
miR-181a
miR-146a/b
miR-223
miR-17-5p
miR-150
miR-17-92
miR-20a
miR-106a

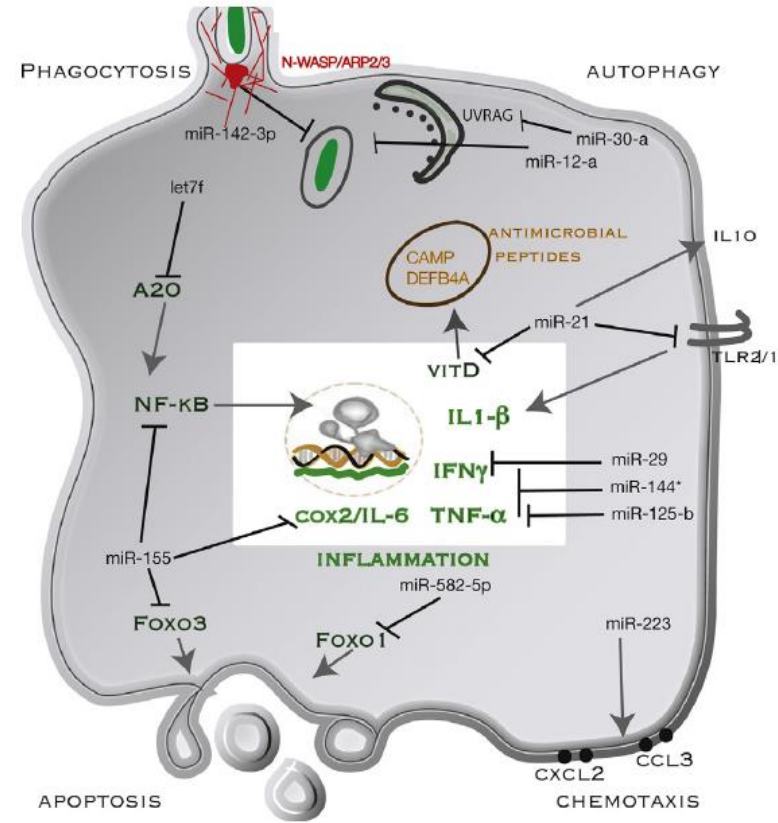
TB, bağışıklık yanıtı



TB, bağışıklık yanıtı ve miRNA



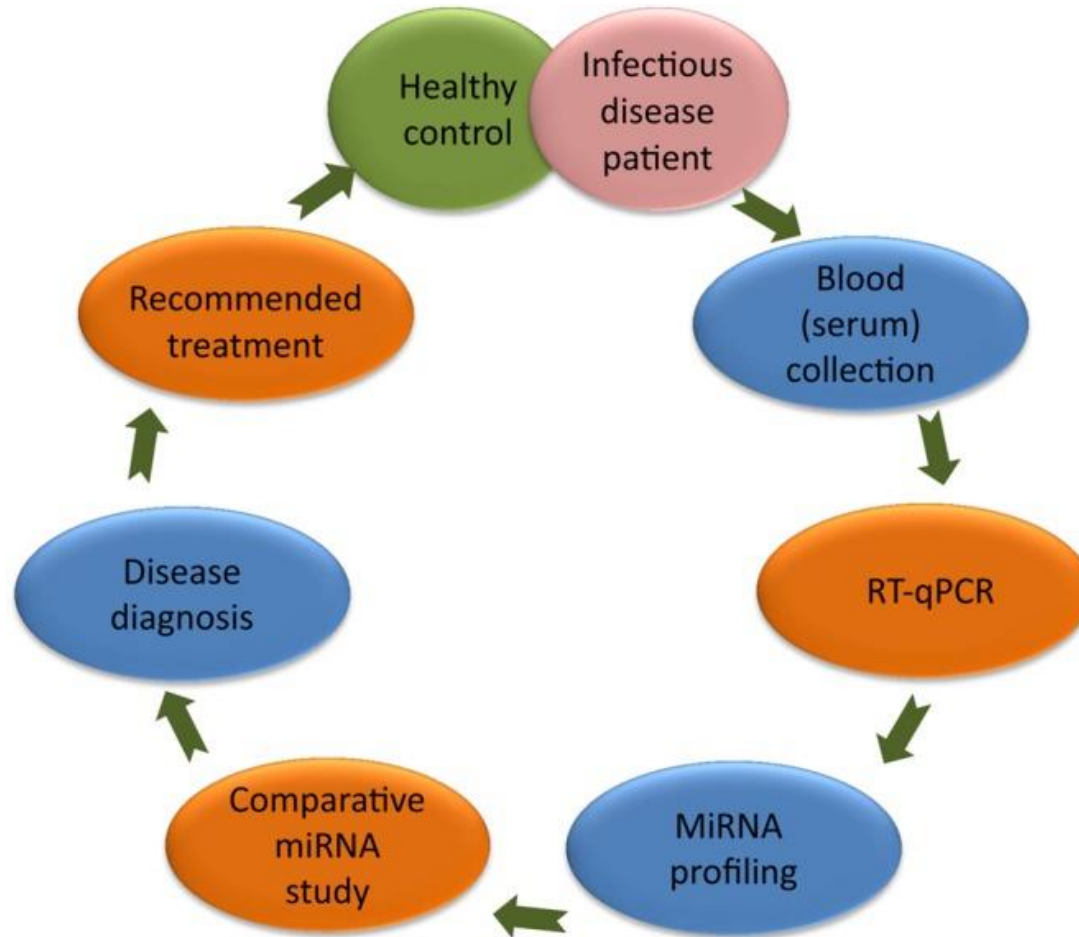
- Farklı mikroorganizmalarda düzenleyici özellikleri olan küçük kodlanmayan RNA'lar tanımlanmıştır.
- Konak mRNA'larını etkileyen bakteriyel RNA tanımlanmamıştır.
- *M.tuberculosis* konakta miRNA ekspresyonunu (azaltarak/artırarak) etkiler.
 - ESAT-6 miR-155 ekspresyonunu indükler, dolayısıyla COX-2 and IL-6 ekspresyonunu inhibe eder.



TB, bakteri ve miRNA

- Enfekte makrofajlarda miRNA ekspresyonu;
 - Virülan H37Rv ve avirülan H37Ra *M.tuberculosis* suşları arasında farklılık göstermektedir.
 - Beijing/W ve Beijing/W dışı *M.tuberculosis* suşları arasında farklılık göstermektedir.
 - Hsa-miR485-3p Beijing/W ile enfekte makrofajlarda artmaktadır.

Enfeksiyon hastalıklarının tanısında miRNA



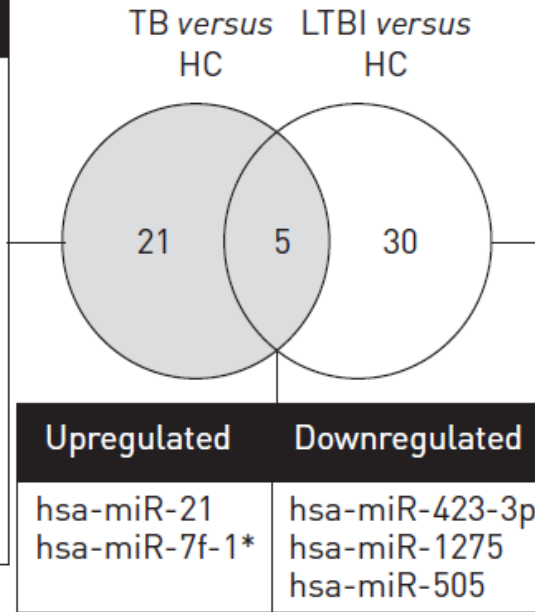
TB, LTBE ve miRNA

Aktif TB, LTBE ve sağlıklıları ayırabilen miRNA(lar) henüz tanımlanmadı.

- **Barselona**
- 50 olgu (17 TB, 17 LTBE, 17 sağlıklı kontrol)

Front Genet. 2014 Jul 15;5:231.

Upregulated	Downregulated
hsa-miR-194	hsa-miR-150
hsa-miR-223	hsa-miR-361-3p
hsa-miR-374a	hsa-miR-629
hsa-miR-215	hsa-miR-342-5p
hsa-miR-142-5p	hsa-miR-15b
hsa-miR-29c	hsa-miR-130a
hsa-miR-192	hsa-miR-210
hsa-miR-140-3p	hsa-miR-502-3p
	hsa-miR-324-5p
	hsa-miR-93*
	hsa-let-7i
	hsa-miR-532-5p
	hsa-miR-629*



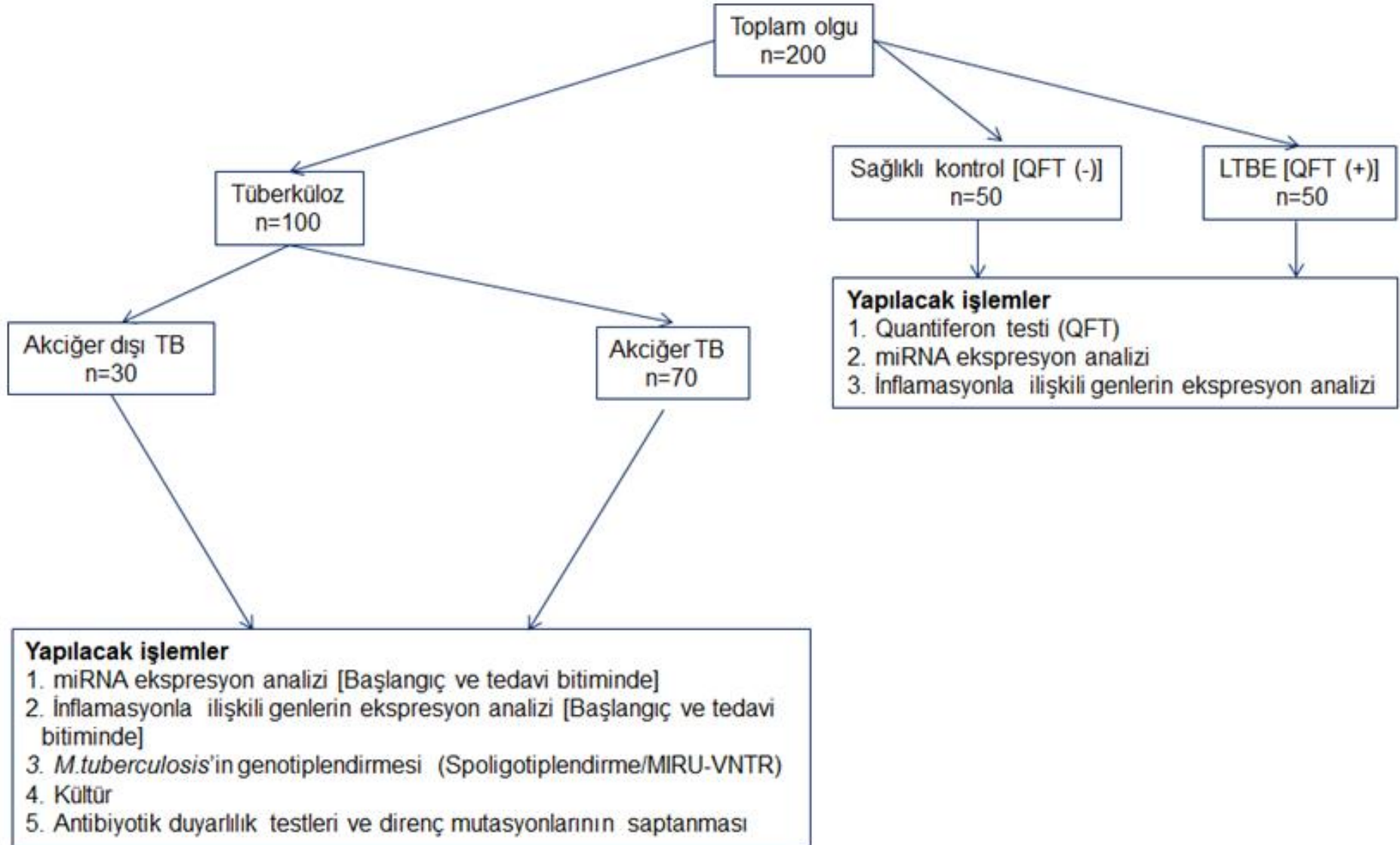
Upregulated	Downregulated
hsa-miR-96	hsa-miR-320b
hsa-miR-18a	hsa-miR-484
hsa-miR-20a	hsa-miR-197
hsa-miR-20b	hsa-miR-320e
hsa-miR-93	hsa-miR-3198
hsa-miR-17	hsa-miR-320d
hsa-miR-18b	hsa-miR-320c
hsa-miR-15a	hsa-miR-942
hsa-miR-454	hsa-miR-1305
hsa-miR-183	hsa-miR-4323
hsa-miR-106b	hsa-miR-574-3p
hsa-miR-222	hsa-miR-766
hsa-miR-30e	hsa-miR-320a
hsa-miR-148a	hsa-miR-331-3p
hsa-miR-17*	
hsa-miR-103	

Eur Respir J. 2015 Apr;45(4):1173-6.

miR-155 ve miR-132 akciğer TB için potansiyel tanısal biyogösterge olabilir

Microb Pathog. 2016 Sep 8;100:78-83

Çalışma planı(115S333)



RT-qPCR

- RNA izolasyonu (TRIzol® Plus Isolation)



- miRNA → cDNA (TaqMan™ miRNA Reverse Transcription Kit)



RT-qPCR

- RT-qPCR (ABI 7500 FAST)



- Veri analizi

- <http://pcrdataanalysis.sabiosciences.com/pcr/arrayanalysis.php>

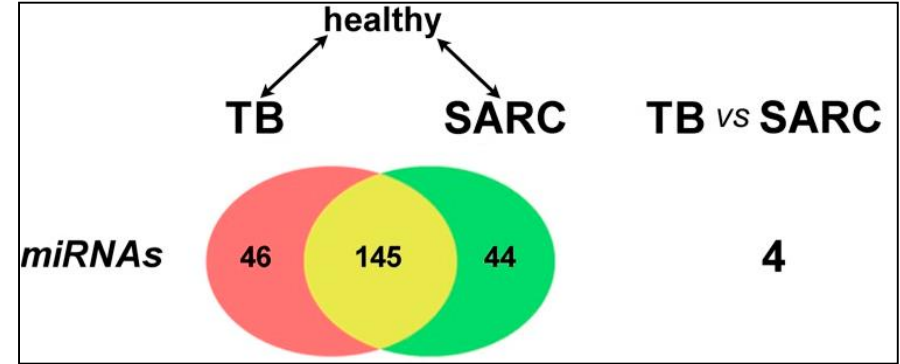
The screenshot shows the web interface for RT² Profiler PCR Array Data Analysis version 3.5. The browser address bar shows the URL <http://pcrdataanalysis.sabiosciences.com/pcr/arrayanalysis.php>. The page has a navigation menu with tabs: Upload Data, Analysis Setup, Analysis, Plots & Charts, Export Data, and What's Next. The main content area includes:

- Experiment Performed Using:** Radio buttons for Standard RT² PCR Array, Custom RT² PCR Array, and Single or Multi-Gene qPCR Assays.
- File:** A text input field and buttons for 'Clear' and 'Upload'. A note states: '* File must be a MS Excel Sheet (in .XLS format, not .XLSX)'.
- Excel Templates for Formatting your Experimental Data:** Links for Cataloged PCR Array, Custom PCR Array, and Single/Multi-Gene Assays.
- For Custom PCR Arrays - Data Analysis Patches:** A table with two columns: 96-well and 384-well. Each column lists configurations of genes and samples.
- New to RT² Data Analysis? Learn more by:** Links for Taking a test run, Watching a movie guide (Flash), and Attending a webinar.
- Notes:** A list of three instructions regarding session completion, screen resolution (1024 X 768 or greater), and window pop-up blockers.
- Instructions:** A list of four steps for using the software, including selecting the experiment type, entering the PCR Array Pathway Number, reviewing the 'Data QC' section, and normalizing data.

96-well	384-well
8 genes x 12 samples	8 genes x 48 samples
12 genes x 8 samples	12 genes x 32 samples
16 genes x 6 samples	16 genes x 24 samples
24 genes x 4 samples	24 genes x 16 samples
32 genes x 3 samples	32 genes x 12 samples
48 genes x 2 samples	48 genes x 8 samples

Moleküler biyogösterge olarak miRNA'nın zorlukları

- Tek bir miRNA yüzlerce farklı mRNA'yı hedefleyebildiği gibi, farklı miRNA'lar da aynı mRNA'yı hedefleyebilmektedir.



- Ekspresyonları çok hızlı değişiyor (*Use it or lose it*).
- MiRNA düzeyleri çeşitli durumlardan (sabah, akşam, eşlik eden inflamatuvar ve enfeksiyöz durumlardan, alınan ilaçlardan) etkilenebilir.

Moleküler biyogösterge olarak miRNA'nın zorlukları

- Spesifik miRNA'ların izolasyon ve tanımlanması sırasında karışan prematür miRNA'lar ve tRNA yalancı pozitif ve negatif sonuçlara yol açabilir.
- MiRNA'ların tanımlanması moleküler biyoloji ve biyoinformatik konusunda bilgili deneyimli araştırmacılar tarafından yapılmalıdır.
- Çalışmalar sırasında veri değerlendirmesinde yanlış sonuçlara yol açabilecek deneysel kontaminasyondan özellikle kaçınılmalıdır.

Teşekkür

- Konağın inflamasyonla ilişkili miRNA ve mRNA ekspresyonları ile bakterinin genotipik özelliklerinin tüberküloz enfeksiyonu ve aktif tüberkülozun klinik seyri üzerine etkilerinin araştırılması **(115S333)** başlıklı proje **TÜBİTAK SBAG 1001** kapsamında desteklenmiştir.